



**VÜCUT SIVILARINDA KEMİK YAPIM-YIKIM BİYOBELİRTEÇ
TAYİNİNE YÖNELİK BİYONSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Rabia ŞEMSİ

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2025

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.

Rabia ŞEMSİ

21/10/2025

VÜCUT SIVILARINDA KEMİK YAPIM-YIKIM BİYOBELİRTEÇ TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Rabia ŞEMŞİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ekim 2025

ÖZET

Kemik dokusu, sürekli bir oluşum ve yıkım döngüsü sergileyen dinamik bir yapıya sahiptir. Bu döngüdeki dengenin sürdürülmesi, metabolik kemik hastalıkları ve ilişkili patolojilerin patofizyolojisinin aydınlatılması açısından kritik öneme sahiptir. Kemik metabolizmasının biyokimyasal göstergeleri olarak, Prokollajen Tip I N-Terminal Propeptit (PINP) ve β -C-Terminal Telopectit (β -CTX) gibi temel biyobelirteçler bu süreçlerin izlenmesinde merkezi rol oynamaktadır. Mevcut analitik yöntemlerin (örn. ELISA, ECLIA) yüksek maliyetler ve uzun işlem süreleri ile sınırlı olması, bu biyobelirteçlerin hızlı, yüksek hassasiyetli ve uygun maliyetli ölçümü için biyosensör teknolojilerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, kemik oluşumu ve yıkımını eş zamanlı izlemeye yönelik bir elektrokimyasal biyosensörün tasarımı ve optimizasyonuna odaklanmıştır. Geliştirilen sensörün analitik performansını değerlendirmek amacıyla, PINP ve β -CTX düzeylerinin ölçümünden elde edilen değerler, mevcut üç farklı analitik yöntemle karşılaştırılmış ve yapay serum, tükürük ve idrar örnekleri üzerindeki avantajları değerlendirilmiştir. Sensör sistemi, altın elektrot yüzeyinin 3-merkaptopropiyonik asit (MPA) ile modifikasyonu ve ardından PINP ve β -CTX'e özgül antikolların immobilizasyonu ile oluşturulmuştur. Elektrot yüzey modifikasyonunun etkinliği ve biyobelirteç tanıma kapasitesi, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ve Döngüsel Voltametri (CV) teknikleri kullanılarak detaylıca karakterize edilmiştir. Sensörün analitik performansı, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ redoks çifti kullanılarak değerlendirilmiş ve biyobelirteçlerin düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek hassasiyetle tespit edilebildiği kanıtlanmıştır. Bulgularımız, geliştirilen biyosensörün yüksek hassasiyet, seçicilik ve mükemmel tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermektedir. Yapay biyolojik örneklerde üç farklı yöntemle gerçekleştirilen ölçümlerin karşılaştırmalı analizi sonucunda, biyosensörün tespit doğruluğu ve veri geçerliliği açısından geleneksel ECLIA ve ELISA tekniklerine eşdeğer olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, geliştirilen biyosensör; düşük maliyeti, yüksek hassasiyeti ve hızlı sonuç verme potansiyeli ile bu geleneksel yöntemlere alternatif bir analitik platform olarak önerilmektedir. Ayrıca, invaziv olmayan tükürük ve idrar örneklerinin kullanımıyla ilgili bulgularımız, bu örnek matrislerinin serum örneklerine etkili bir alternatif olabileceğini desteklemektedir. Sonuç olarak, tasarlanan elektrokimyasal biyosensör, kemikle ilgili metabolik hastalıkların erken teşhisi ve izlenmesi için yenilikçi bir biyomühendislik çözümü sunmaktadır.

Bilim Kodu : 1090

Anahtar Kelimeler : Tükürük, Serum, PINP, β -CTX, Biyosensör

Sayfa Adedi : 295

Danışman : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

İkinci Danışman : Dr. Dt. Erdal ERGÜNOL

DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF BONE
CONSTRUCTION AND RESORPTION BIOMARKERS IN BODY FLUIDS

(Ph. D. Thesis)

Rabia ŞEMSİ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

October 2025

ABSTRACT

Bone tissue has a dynamic structure, and maintaining a balance between the processes of formation and resorption is crucial for understanding the pathophysiology of metabolic bone diseases and related pathologies.. Important biomarkers, such as procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) and β -C-terminal telopeptide (β -CTX), serve as biochemical key indicators for monitoring these processes. Current biochemical analytical methods are limited by high costs and long processing times, which highlights the importance of developing biosensors for quick, sensitive, and cost-effective measurement of these biomarkers. This study focused on designing and optimizing an electrochemical biosensor for monitoring bone formation and resorption. We aimed to compare the values obtained from measuring PINP and β -CTX levels using three different analytical methods and to assess the advantages of these methods when applied to simulated serum, saliva, and urine samples. To achieve this, we modified the gold electrode surface with 3-mercaptopropionic acid to immobilize specific antibodies for PINP and β -CTX. The effectiveness of the electrode surface modification and its ability to recognize biomarkers were characterized using electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry techniques. The sensor's performance was evaluated using the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ redox couple, revealing that the biomarkers could be detected sensitively at low concentrations. Our findings indicated that the developed biosensor exhibits high sensitivity, selectivity, and reproducibility. After measuring artificial serum, saliva, and urine samples using three different methods, we analyzed the relationships between them. Given the biosensor's low cost, high sensitivity, selectivity, and rapid results, we propose it as an alternative analytical method to traditional ECLIA and ELISA techniques, with comparable detection accuracy and data validity. We also suggest that noninvasive saliva and urine samples can effectively serve as alternatives to serum samples. In conclusion, the biosensor represents an innovative bioengineering solution for the early monitoring of bone related metabolic diseases.

Science Code : 1090

Key Words : Saliva, Serum, PINP, β -CTX, Biosensor

Page Number : 295

Supervisor : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

Co-Supervisor : Dr. Dt. Erdal ERGÜNOL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik gelişimime yön veren, bilgi ve deneyimini her zaman paylaşarak bana yol gösteren, araştırmamın planlanmasından sonuçlanmasına kadar her aşamada desteğini hissettiren, bilimsel yaklaşımı, vizyonu ve insani değerleriyle örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL'e,

Deneyisel süreçlerin yürütülmesinde değerli katkılarını sunan, her zaman yapıcı önerileriyle destek olan ikinci danışman hocam Dr. Dt. Erdal ERGÜNOL'a,

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve dostluklarıyla bana destek olan değerli arkadaşlarım Aslıhan ÇOBAN ETİKCAN ve Sahra Setenay BARAN'a,

2024-9725 numaralı proje sözleşmesi kapsamında sağladığı destekle tez çalışmamın yürütülmesine katkı sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Laboratuvar çalışmaların da yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvar ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum Arş. Gör. Dr Günay AFANDİYEVA ve Kimyager Deren KAYA'ya,

Hayatım boyunca yanımda olup sevgileri, anlayışları ve sonsuz sabırlarıyla bana güç veren, varlıklarıyla her zaman desteklerini hissettiren annem Saadet ŞEMSİ, babam Ziya ŞEMSİ
ve babaannem Melahat ŞEMSİ'ye,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

RABİA ŞEMSİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kemğin Yapısı.....	5
2.2. Kemğin Hücresel Kompozisyonu ve Yapısal Organizasyonu.....	6
2.2.1. Kemik hücreleri.....	8
2.2.2. Kemik matriksi.....	11
2.3. Kemik Oluşumu.....	12
2.3.1. Kemik şekillenmesi.....	14
2.4. Kemik Durum İndeksleri.....	19
2.4.1. Kemik yapım biyobelirteçleri	19
2.4.2. Kemik yıkım biyobelirteçleri.....	24
2.5. Prokollajen Tip I N-Terminal Propeptit (PINP).....	32
2.5.1. Biyosentezi.....	32
2.5.2. PINP'in özellikleri ve metabolizması.....	34
2.6. Tip I Kollajenin Karboksiterminal Çapraz Bağlı Telopektiti (CTX-I).....	36
2.6.1. Biyosentezi.....	36
2.6.2. CTX-I'in yapısal özellikleri.....	37
2.6.3. Metabolizması.....	38
2.7. Sensörler.....	39
2.7.1. Sensörlerin sınıflandırılması	39
2.8. Biyosensörler.....	40
2.8.1. Biyosensörlerin tarihçesi ve gelişimi.....	41
2.9. Elektrokimyasal Biyosensörler: Tanım ve Uygulama Teknikleri.....	42
2.9.1. Elektrokimyasal biyosensörlerin türleri ve temel bileşenleri.....	43
2.9.2. Elektrokimyasal biyosensörlerin özellikleri.....	46
2.10. Biyosensör Uygulamaları.....	49
2.11. Biyosensör Uygulamalarında Elektrokimyasal Tespit Teknikleri.....	50

	Sayfa
2.11.1. Elektrokimyasal tespit teknikleri.....	50
2.12. Elektrokimyasal Biyosensörler için Yüzey İmmobilizasyon Yöntemleri..	56
2.12.1. Yüzey immobilizasyonunun gerekliliği.....	57
2.12.2. İmmobilizasyon.....	58
2.13. Biyoreseptörler.....	68
2.13.1. Biyoreseptörlerin sınıflandırılması.....	68
2.14. 3-Merkaptopropiyonik Asit (3-MPA).....	75
2.15. Bovine (Sığır) Serum Albumin (BSA).....	76
2.16. Biyoaktif Tabakanın Değerlendirilmesi.....	78
2.16.1. Fiziksel olarak değerlendirilmesi.....	78
2.16.2. Kimyasal olarak değerlendirilmesi.....	83
2.17. ELISA, ECLIA ve Biyosensör Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	84
2.18. Yöntem Karşılaştırma Analizi.....	86
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	89
3.1. Kullanılan Üçlü Elektrot Sistemi.....	89
3.2. Kullanılan Cihaz, Malzemeler ve Kitler.....	89
3.2.1. Cihazlar.....	89
3.2.2. Kimyasal maddeler-çözeltiler.....	90
3.2.3. Kullanılan tamponlar.....	91
3.2.4. Kullanılan çözeltiler.....	91
3.2.5. Kitler.....	92
3.3. Deneysel Yöntemler.....	92
3.3.1. Çalışma elektrodunun (altın elektrot) temizliği.....	92
3.3.2. Elektrokimyasal analiz metotları.....	93
3.3.3. Veri değerlendirilmesi ve eş değer devre modeli uygulaması.....	93
3.3.4. Tasarlanan β -CTX ve PINP biyosensörünün ölçüm prensipleri.....	95
3.4. β -CTX Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörün Hazırlanması.....	95
3.5. β -CTX Antikoru'nun İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyon Çalışmaları.....	96
3.5.1. SAM yapımında kullanılan 3-MPA konsantrasyonunun optimizasyonu.....	96
3.5.2. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu.....	96
3.5.3. Anti-CTX konsantrasyonunun optimizasyonu.....	97

	Sayfa
3.6. β -CTX ve PINP Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonu.....	97
3.6.1. Doğrusal tayin aralığı ve duyarlılık.....	97
3.6.2. β -CTX ve PINP biyosensörü yüzey alanının hesaplanması.....	97
3.6.3. Tekrar üretilebilirlik.....	98
3.6.4. Yapay serum, tükürük ve idrar da uygulama.....	98
3.7. PINP Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörün Hazırlanması.....	98
3.8. PINP Antikörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyon Çalışmaları.....	99
3.8.1. Antikor ve antijen için en uygun çözücü türünün belirlenmesi.....	99
3.8.2. 3-Merkaptopropiyonik asit konsantrasyonunun optimizasyonu.....	100
3.8.3. 3-Merkaptopropiyonik asit çözeltisinden en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	100
3.8.4. EDC/NHS konsantrasyonlarının optimizasyonu.....	101
3.8.5. EDC/NHS aktivasyonunda inkübasyon süresinin optimizasyonu.....	101
3.8.6. Antikor konsantrasyonunun optimizasyonu.....	102
3.8.7. Antikor inkübasyon süresinin optimizasyonu.....	102
3.8.8. PINP ile etkileşim süresinin optimizasyonu.....	102
3.9. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) Yöntemi ile PINP Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	103
3.9.1. Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	103
3.9.2. Tekrar üretilebilirlik.....	103
3.9.3. Tekrarlanabilirlik ve analitik limitlerin (LOD ve LOQ) belirlenmesi.....	104
3.9.4. Depo ömrü.....	104
3.10. Yapay Serum Matriksinde Uygulama ve Doğrulama.....	104
3.11. Yapay Tükürük Matriksinde Uygulama ve Doğrulama.....	105
3.12. Yapay İdrar Matriksinde Uygulama ve Doğrulama.....	105
3.13. İstatistiksel Analiz.....	106
3.14. Biyoaktif Tabakanın Görüntülenmesi için Yapılan Analizler.....	106
3.14.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin elde edilmesi.....	106
3.14.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FT-IR) analizlerinin geliştirilmesi.....	107
3.14.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yüzey analizlerinin gerçekleştirilmesi.....	108

	Sayfa
3.14.4. Temas açısı ile yüzey analizlerinin gerçekleştirilmesi.....	108
3.15. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	109
3.15.1. Elektrokimyasal çalışma aralığının optimizasyonu.....	109
3.15.2. pH – tampon optimizasyonu.....	109
3.15.3. Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu.....	110
3.16. ELISA Ölçümleri.....	110
3.16.1. β -CTX ölçüm prosedürü.....	110
3.16.2. PINP ölçüm prosedürü.....	110
3.17. ECLIA Ölçümü.....	111
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	113
4.1. Biyoaktif Tabakanın SEM Mikrografisinin İncelenmesi.....	113
4.1.1. Boş altın elektrodun SEM mikrografisi.....	113
4.2. FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi.....	115
4.3. AFM Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	117
4.4. Temas Açısı Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	120
4.5. β -C-Terminal Telopeptit (β -CTX) Biyosensörüne Dayalı Ölçümlerde Elde Edilen Analitik Veriler.....	121
4.5.1. β -C-Terminal Telopeptit (β -CTX) biyosensörünün tasarımına ilişkin bulgular.....	121
4.6. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	123
4.6.1. Uygun pH ve tampon konsantrasyonu.....	123
4.7. β -CTX Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu	124
4.7.1. 3-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	124
4.7.2. 3-MPA çözeltisinde en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi....	125
4.7.3. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	127
4.7.4. EDC/NHS aktivasyonunda inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	128
4.7.5. Anti β -CTX konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	129
4.7.6. Anti β -CTX inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	131
4.8. β -CTX Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Veriler.....	132
4.8.1. Doğrusal tayin aralığı ve duyarlılık.....	132
4.8.2. β -CTX biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....	134
4.8.3. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik.....	134
4.8.4. Depo ömrü.....	136
4.8.5. Yapay serum matrisinde analitik validasyon.....	137
4.8.6. Yapay tükürük matrisinde analitik validasyon.....	138

Sayfa

4.8.7. Yapay idrar matrisinde analitik validasyon.....	139
4.9. Prokollajen I-N Terminal Propeptit Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular.....	140
4.9.1. Prokollajen I-N Terminal Propeptit biyosensörünün tasarımına ilişkin bulgular.....	140
4.9.2. Prokollajen I-N Terminal Propeptit biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının optimizasyonuna ilişkin veriler.....	142
4.10. PINP Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Veriler.....	149
4.10.1. Doğrusal tayin aralığı ve duyarlılık.....	149
4.10.2. PINP biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....	150
4.10.3. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik.....	151
4.10.4. Depo ömrü.....	153
4.10.5. Yapay serum matrisinde analitik validasyon.....	154
4.10.6. Yapay tükürük matrisinde analitik validasyon.....	154
4.10.7. Yapay idrar matrisinde analitik validasyon.....	155
4.11. ELISA ve ECLIA Sonuçları.....	156
4.12. ELISA, Biyosensör ve ECLIA Sonuçları.....	158
4.13. ELISA, ECLIA ve Biyosensör Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	159
4.13.1. β -CTX için ELISA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması.....	160
4.13.2. β -CTX için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması.....	174
4.13.3. β -CTX için ECLIA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması.....	187
4.13.4. PINP için ELISA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması.....	201
4.13.5. PINP için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması.....	215
4.13.6. PINP için ECLIA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması.....	228
5. TARTIŞMA.....	243
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	251
KAYNAKLAR.....	253
ÖZGEÇMİŞ.....	281

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kemik yapımına ait biyokimyasal belirteçler.....	20
Çizelge 2.2. Kemik yıkımına ait biyobelirteçler.....	26
Çizelge 2.3. Biyosensör, ECLIA ve ELISA cihazlarının karşılaştırılması.....	85
Çizelge 4.1. 3-MPA konsantrasyonunun optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	125
Çizelge 4.2. 3-MPA inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	126
Çizelge 4.3. EDC/NHS konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	128
Çizelge 4.4. EDC/NHS aktivasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	129
Çizelge 4.5. Anti β -CTX konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemleri ve R^2 değerleri.....	130
Çizelge 4.6. Anti β -CTX inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	132
Çizelge 4.7. β -CTX sensörünün LOD ve LOQ değerleri	133
Çizelge 4.8. 10-60 pg/mL aralığında β -CTX biyosensörünün tekrarüretilebilirliği.....	136
Çizelge 4.9. Yapay serumda geri kazanım analizi.....	137
Çizelge 4.10. Yapay tükürük de geri kazanım analizi.....	138
Çizelge 4.11. Yapay idrarda geri kazanım analizi.....	139
Çizelge 4.12. 3-MPA konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	142
Çizelge 4.13. 3-MPA inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	144
Çizelge 4.14. EDC/NHS konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	145

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.15. EDC/NHS aktivasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	146
Çizelge 4.16. Anti-PINP konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.....	147
Çizelge 4.17. Anti PINP inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri	148
Çizelge 4.18. PINP sensörünün LOD ve LOQ değerleri.....	150
Çizelge 4.19. 10-60 ng/mL aralığında PINP biyosensörünün tekrarüretilebilirliği.....	153
Çizelge 4.20. Yapay serumda geri kazanım analizi.....	154
Çizelge 4.21. Yapay tükürük de geri kazanım analizi.....	155
Çizelge 4.22. Yapay idrarda geri kazanım analizi.....	156
Çizelge 4.23. β -CTX konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri.....	156
Çizelge 4.24. PINP konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri.....	157
Çizelge 4.25. Yapay serumda β -CTX konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları.....	158
Çizelge 4.26. Yapay tükürük de β -CTX konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları.....	158
Çizelge 4.27. Yapay idrarda β -CTX konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları.....	158
Çizelge 4.28. Yapay serumda PINP konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları.....	159
Çizelge 4.29. Yapay tükürük de PINP konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları.....	159
Çizelge 4.30. Yapay idrarda PINP konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları	159
Çizelge 4.31. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	161
Çizelge 4.32. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	163

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.33. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	164
Çizelge 4.34. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	166
Çizelge 4.35. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	167
Çizelge 4.36. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	169
Çizelge 4.37. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	171
Çizelge 4.38. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	172
Çizelge 4.39. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	173
Çizelge 4.40. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	175
Çizelge 4.41. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	176
Çizelge 4.42. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	178
Çizelge 4.43. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	180
Çizelge 4.44. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	181
Çizelge 4.45. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	182
Çizelge 4.46. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	184
Çizelge 4.47. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	185
Çizelge 4.48. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	187
Çizelge 4.49. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki...	189
Çizelge 4.50. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	190
Çizelge 4.51. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	192
Çizelge 4.52. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki...	194

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.53. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	195
Çizelge 4.54. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	196
Çizelge 4.55. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki....	198
Çizelge 4.56. Passing Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	200
Çizelge 4.57. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	201
Çizelge 4.58. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki....	203
Çizelge 4.59. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	205
Çizelge 4.60. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	206
Çizelge 4.61. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki....	208
Çizelge 4.62. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	209
Çizelge 4.63. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	210
Çizelge 4.64. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki....	212
Çizelge 4.65. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	214
Çizelge 4.66. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	215
Çizelge 4.67. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	217
Çizelge 4.68. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	219
Çizelge 4.69. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	220
Çizelge 4.70. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	222
Çizelge 4.71. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	223
Çizelge 4.72. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	224

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.73. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (ECLIA-ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki.....	226
Çizelge 4.74. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	227
Çizelge 4.75. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	228
Çizelge 4.76. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki...	230
Çizelge 4.77. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	232
Çizelge 4.78. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	233
Çizelge 4.79. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki...	235
Çizelge 4.80. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	236
Çizelge 4.81. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler.....	237
Çizelge 4.82. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör-ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki...	239
Çizelge 4.83. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin.....	241
Çizelge 4.84. Deming regresyon analizine ilişkin veriler.....	242

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kemğin üç boyutlu mimarisi.....	7
Şekil 2.2. İntramembranöz kemik oluşumunu gösteren şematik diyagram (Kenkre ve Bassett 2018).....	12
Şekil 2.3. Endokondral kemik oluşumunu gösteren şema (Kenkre ve Bassett 2018).....	13
Şekil 2.4. Kemik yeniden şekillenme döngüsü (Allen ve Burr, 2019 ; Baron, 2003; Brighurst ve diğerleri, 2005; Lindsay ve diğerleri, 1999).....	16
Şekil 2.5. Tip I prokollajen tipi molekülünün yapısı. Oklar, amino terminal (PINP) ve karboksi terminal (PICP) propeptitlerinin proteolitik bölünme bölgelerini gösterir.....	33
Şekil 2.6. Çeşitli havuzlar arasındaki dağılımın ve sağlam PINP ve Col1 bölgesinin klerensinin şematik gösterimi. Kalın oklar ana yolları göstermektedir.....	35
Şekil 2.7. CTX oluşumu (Dincel, 2012).....	37
Şekil 2.8. Prokollajen tip I N propeptidinin ve tip I kollajenin C-terminal telopeptidinin dolaşıma salgılanmasını gösteren şematik gösterimi....	39
Şekil 2.9. Biyosensörleri oluşturan bileşenler.....	41
Şekil 2.10. Elektrokimyasal biyosensörlerin türleri ve genel mekanizmaları (Tong ve diğerleri, 2023).....	45
Şekil 2.11. Biyosensörlerin farklı alanlardaki uygulamaları.....	50
Şekil 2.12. Son on yılda (1 Ocak 2015-1 Ocak 2025) biyosensör yayınlarında görülen yaygın elektrokimyasal tekniklerin göreceli sıklığını gösteren orantı Venn diyagramı.....	51
Şekil 2.13. Elektrokimyasal biyosensörlerde yaygın ölçüm teknikleri (Liu ve diğerleri, 2014 ; Rosello ve diğerleri, 2020).....	54
Şekil 2.14. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin genel görünümü ve grafiksel temsilleri (Pedersen ve diğerleri, 2025).....	59
Şekil 2.15. 3-Merkaptopropiyonik asidin kimyasal yapısı.....	76
Şekil 2.16. BSA yapısı (www.rcsb.org).....	77

Şekil	Sayfa
Şekil 2.17. Taramalı elektron mikroskopunun çalışma prensibi.....	78
Şekil 2.18. AFM çalışma prensibi (Jandt, K.D., 2001; Joshi, J. ve diğerleri, 2022).....	80
Şekil 2.19. AFM çalışma modları.....	81
Şekil 2.20. FT-IR çalışma prensibi.....	84
Şekil 3.1. Üç elektrotlu sistem.....	89
Şekil 3.2. Elde edilen Nyquist eğrisi.....	94
Şekil 3.3. PSTRace 5.11. yazılımı kullanılarak elde edilen eş değer devre modeli.....	94
Şekil 3.4. Geliştirilen β -CTX biyosensörünün tasarımı sırasında Anti-CTX antikorunun Au elektrot yüzeyine immobilizasyon basamakları.....	96
Şekil 3.5. Geliştirilen PINP biyosensörünün tasarımı sırasında Anti-PINP antikorunun Au elektrot yüzeyine immobilizasyon basamakları.....	99
Şekil 4.1. Au Bare elektrodun SEM mikrografisi.	113
Şekil 4.2. Au Bare /3-MPA elektrodunun SEM mikrografisi	114
Şekil 4.3. Au Bare/ 3-MPA/EDC-NHS elektrodunun SEM mikrografisi	114
Şekil 4.4. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti-CTX elektrodunun SEM mikrografisi.	114
Şekil 4.5. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti-PINP elektrodunun SEM mikrografisi.	115
Şekil 4.6. β -CTX sensörünün immobilizasyon basamaklarına ait FT-IR spektrumları.....	116
Şekil 4.7. PINP sensörünün immobilizasyon basamaklarına ait FT-IR spektrumları.....	117
Şekil 4.8. Au Bare elektroduna ait AFM görüntüsü ve istatistiği.....	118
Şekil 4.9. Au Bare/3-MPA elektroduna ait AFM görüntüsü ve istatistiği.....	118
Şekil 4.10. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS elektroduna ait AFM görüntüsü ve İstatistiği	118

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti-PINP elektroduna ait AFM görüntüsü ve istatistiği.....	119
Şekil 4.12. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti-CTX elektroduna ait AFM görüntüsü ve istatistiği.....	119
Şekil 4.13. Farklı yüzeyler için temas açısı ölçümü.....	120
Şekil 4.14. β -CTX biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının EIS spektrumları.....	122
Şekil 4.15. β -CTX biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları.....	122
Şekil 4.16. Elde edilen akıma karşı çizilen pH ve tampon grafiği.	124
Şekil 4.17. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi	124
Şekil 4.18. 3-MPA konsantrasyonunun biyosensörün cevabına etkisi.....	125
Şekil 4.19. Optimum 3-MPA inkübasyon süresi.....	126
Şekil 4.20. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	127
Şekil 4.21. EDC/NHS aktivasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	129
Şekil 4.22. Anti β -CTX konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	130
Şekil 4.23. Anti β -CTX antikorunun inkübasyon süresinin optimizasyonu	131
Şekil 4.24. β -CTX için elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği.....	133
Şekil 4.25. β -CTX tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarüretilebilirlik sonuçları	135
Şekil 4.26. β -CTX tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik sonuçları	135
Şekil 4.27. β -CTX'in depo ömrü.....	136
Şekil 4.28. PINP biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları.....	140
Şekil 4.29. PINP biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları.....	141
Şekil 4.30. 3-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	142

Şekil	Sayfa
Şekil 4.31. 3-MPA inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	143
Şekil 4.32. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	144
Şekil 4.33. EDC/NHS aktivasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	145
Şekil 4.34. Anti-PINP konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	147
Şekil 4.35. PINP antikorunun inkübasyon süresinin optimizasyonu.....	148
Şekil 4.36. PINP için elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği.....	149
Şekil 4.37. PINP tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik sonuçları.....	152
Şekil 4.38. PINP tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarüretilebilirlik sonuçları.....	152
Şekil 4.39. PINP sensörünün depo ömrü.....	153
Şekil 4.40. β -CTX ELISA kitinin standart grafiği.....	157
Şekil 4.41. PINP ELISA kitinin standart grafiği	157
Şekil 4.42. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.	160
Şekil 4.43. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland- Altman grafiği	161
Şekil 4.44. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	162
Şekil 4.45. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	163
Şekil 4.46. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.....	165
Şekil 4.47. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland- Altman grafiği	166
Şekil 4.48. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	167
Şekil 4.49. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	168

Şekil	Sayfa
Şekil 4.50. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.....	170
Şekil 4.51. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği.....	170
Şekil 4.52. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	172
Şekil 4.53. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	173
Şekil 4.54. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.	174
Şekil 4.55. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği.....	175
Şekil 4.56. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	176
Şekil 4.57. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.	177
Şekil 4.58. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yönteminin dağılım grafiği	179
Şekil 4.59. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	179
Şekil 4.60. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	181
Şekil 4.61. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	182
Şekil 4.62. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.....	183
Şekil 4.63. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği.....	184
Şekil 4.64. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	185
Şekil 4.65. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.	186
Şekil 4.66. Yapay serumda biyosensör ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.....	188

Şekil	Sayfa
Şekil 4.67. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	189
Şekil 4.68. Yapay serumda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	190
Şekil 4.69. Yapay serumda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.	191
Şekil 4.70. Yapay tükürük de biyosensör ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.	193
Şekil 4.71. Yapay tükürük de biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	193
Şekil 4.72. Yapay tükürük de biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.	195
Şekil 4.73. Yapay tükürük de biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	196
Şekil 4.74. Yapay idrarda biyosensör ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.	197
Şekil 4.75. Yapay idrarda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	198
Şekil 4.76. Yapay idrarda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.	199
Şekil 4.77. Yapay idrarda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	201
Şekil 4.78. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.	202
Şekil 4.79. Yapay serumda ELISA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	203
Şekil 4.80. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.	204
Şekil 4.81. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	206

Şekil	Sayfa
Şekil 4.82. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.....	207
Şekil 4.83. Yapay tükürük de ELISA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	207
Şekil 4.84. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	209
Şekil 4.85. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	210
Şekil 4.86. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği.....	211
Şekil 4.87. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	212
Şekil 4.88. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	213
Şekil 4.89. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	215
Şekil 4.90. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.	216
Şekil 4.91. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği.....	217
Şekil 4.92. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	218
Şekil 4.93. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	220
Şekil 4.94. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği	221
Şekil 4.95. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	221
Şekil 4.96. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	223
Şekil 4.97. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.	224

Şekil	Sayfa
Şekil 4.98. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.....	225
Şekil 4.99. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	225
Şekil 4.100. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	227
Şekil 4.101. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	228
Şekil 4.102. Yapay serumda biyosensör ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.....	229
Şekil 4.103. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	230
Şekil 4.104. Yapay serumda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	231
Şekil 4.105. Yapay serumda biyosensör ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	233
Şekil 4.106. Yapay tükürük de biyosensör ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.....	234
Şekil 4.107. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	234
Şekil 4.108. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi.....	236
Şekil 4.109. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.....	237
Şekil 4.110. Yapay idrarda biyosensör ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.....	238
Şekil 4.111. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland-Altman grafiği	239
Şekil 4.112. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Passing-Bablok regresyon analizi grafiği.....	240
Şekil 4.113. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.....	242

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
Au	Altın
β	Beta
GOx	Glukoz oksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Pt	Platin
Si	Silisyum
Si ₃ N ₄	Silisyum nitrür

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABS	Absorbans
ACP	Asit fosfataz
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALP	Alkalen fosfataz
BALP	Kemik-spesifik alkalen fosfataz
BMP	Kemik morfogenetik protein
BMU	Temel çok hücreli birim
BSA	Bovine serum albumin

Kısaltmalar	Açıklamalar
BSP	Kemik sialoproteini
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
CTSK	Katepsin K
CTX-I	C-terminal telopeptit
CV	Döngüsel voltametri
CV	Varyasyon katsayısı
DEXA	Dual enerjili X-ışını absorpsiyometrisi
DKK-1	Dickkopf-related protein-1
DPV	Diferansiyel darbe voltametri
DPD	Deoksipiridinolin
ECLIA	Elektrokemilüminesans immünoassay
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ELISA	Enzim-bağılı immünosorbent testi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGF23	Fibroblast büyüme faktörü 23
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GGHYL	Glukozilgalaktozil-hidroksilizin
GHYL	Galaktozil-hidroksilizin
HYL	Hidroksilizin
HYP	Hidroksiprolin
IHH	Indian Hedgehog
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Kısaltmalar	Açıklamalar
KMY	Kemik mineral yoğunluğu
KSi	Kemik durum indeksleri
LRP5/6	Frizzled ve koreseptörleri LDL reseptörleri ilişkili protein 5/6
MW	Molekül ağırlığı
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
NTX-I	N-terminal telopeptid
OC	Osteokalsin
ON	Osteonektin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PAM	Poliakrilamid
PICP	Prokollajen Tip I C-Terminal Propeptid
PINP	Prokollajen Tip I N-Termial Propeptid
PTH	Paratiroid hormon
PTHrP	Paratiroid hormon ile ilişkili protein
PVA	Polivinil alkol
PYD	Piridinolin
RANKL	Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa-B ligand
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPE	Ekran baskılı elektrot
SWV	Kare dalga voltametrisi
TRACP5b	Tartarat-dirençli asit fosfataz izoform 5b
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1.GİRİŞ

Kemik dokusu, sürekli olarak yeniden şekillenen (remodelling) dinamik bir yapıya sahiptir. Bu yeniden şekillenme süreci, osteoblastlar tarafından yürütülen kemik yapımı (formasyon) ve osteoklastlar aracılığıyla gerçekleştirilen kemik yıkımı (rezorpsiyon) olmak üzere iki temel aşamadan oluşur. Bu fizyolojik döngüdeki dengenin bozulması; osteoporoz, romatoid artrit, Paget hastalığı, maligniteler ve diğer metabolik kemik hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle kemik metabolizmasının nicel olarak izlenmesi, söz konusu hastalıkların tanı, tedavi takibi ve prognozunun değerlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Eastell ve Hannon, 2008 ; Indarwulan ve diğerleri, 2024 ; Mehreen ve diğerleri, 2025 ; Vasikaran ve diğerleri, 2011; Qu ve diğerleri, 2024).

Günümüzde kemik dokusunun yapısal ve metabolik özelliklerinin değerlendirilmesinde başlıca yöntemler arasında görüntüleme teknikleri ve biyokimyasal belirteç analizi yer almaktadır. En yaygın radyolojik yöntemlerden biri olan dual enerjili X-ışını absorpsiyometrisi (DEXA) ile kemik mineral yoğunluğu (KMY) ölçülerek, kemik kitlesi hakkında kantitatif bilgi elde edilebilmektedir. Ancak bu teknikler kemik yapısındaki biyokimyasal değişiklikleri erken dönemde tespit etmekte yetersiz kalabilmektedir (Eastell ve diğerleri, 2020 ; Kanis ve diğerleri, 2013).

Osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve bozulmuş kemik mikroyapısı ile karakterize, kırık riskini artıran sistemik bir iskelet hastalığıdır. Klinik pratiğin temel taşlarından biri olan dual enerjili X-ışını absorpsiyometrisi, kemik mineral yoğunluğu ölçümü açısından uzun süredir altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, DEXA yalnızca iki boyutlu areal KMY (aKMY) verisi sağlaması ve kemik mikroyapısı ile mekanik dayanımı doğrudan değerlendirememesi nedeniyle, özellikle bireysel kırık riskinin hassas katmanlanmasında sınırlılıklar taşımaktadır.

Son yıllarda kantitatif bilgisayarlı tomografi (QCT), volumetrik KMY (vKMY) ölçümleri ve üç boyutlu (3B) morfometrik analizler, kırık risk sınıflamasının doğruluk ve öngörü gücünü artıran yöntemler olarak öne çıkmıştır. 2024–2025 yılları arasında yayımlanan sistematik derleme ve meta-analizler, rutin klinik bilgisayarlı tomografi görüntülerinden elde edilen opportunistic ve fantomsuz (phantom-less) QCT yaklaşımlarının, özellikle omurga ve

kalça bölgelerinde, DEXA'ya kıyasla kırık öngörüsünde anlamlı üstünlük sağladığını bildirmektedir (Eastell ve diğerleri, 2020). Fantomsuz kalibrasyon tekniklerinin kullanımıyla ek çekim gereksinimi olmaksızın güvenilir uzunlamasına izlem yapılabilmesi, bu yöntemin klinik uygulanabilirliğini daha da artırmaktadır.

Yüksek çözünürlüklü periferel QCT (HR-pQCT) ise periferik iskelette trabeküler ve kortikal mikroyapıyı yüksek hassasiyetle değerlendirebilmekte, ayrıca sonlu eleman analizleri ile kemik dayanımı hakkında öngörüler sunmaktadır. Güçlü örneklem büyüklüklerine sahip yakın dönem çalışmalar, HR-pQCT parametrelerinin kalça kırığı öngörüsünde bağımsız katkı sağladığını ve geleneksel ölçümlerin ötesinde bilgi sunduğunu göstermektedir (Boutroy ve diğerleri, 2005; Whittier ve diğerleri, 2020).

Bu gelişmiş görüntüleme tekniklerinin, biyokimyasal kemik dönüşüm belirteçleri ile birlikte kullanımı, kırık risk değerlendirmesinin kapsamını daha da genişletmektedir. Özellikle prokollajen tip I N-terminal propeptit (PINP) ve β -C-terminal telopeptit (β -CTX) gibi belirteçler, kemik dönüşüm hızını yansıtarak mikroyapısal bozulmanın dinamiklerini ortaya koymaktadır. Longitudinal veriler, yüksek kemik dönüşüm hızına sahip olgularda mikroyapı ve mekanik dayanım kaybının daha hızlı seyredebileceğini göstermekte; bu da erken tedavi yanıtının ve refraktür riskinin daha hassas biçimde öngörülmesine olanak tanımaktadır.

Dolayısıyla, klinik izlemin temelinde DEXA temelli ölçümler yer almaya devam ederken, seçilmiş yüksek riskli olgularda QCT veya HR-pQCT ile eş zamanlı PINP/ β -CTX değerlendirmesi, tedaviye yanıtın erken dönemde belirlenmesi ve kırık riskinin daha doğru katmanlanması açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır.

Bu nedenle, serum, plazma gibi vücut sıvılarından elde edilen kemik metabolizmasına özgü (biyobelirteçler, kemik yapım ve yıkım süreçlerinin daha dinamik ve zamanında izlenmesine olanak tanımaktadır. Kemik durum indeksleri (KSI'ler), biyolojik işlevleri ve ait oldukları genel süreçler temelinde i) Kemik dönüşüm belirteçleri (kemik yapım ve yıkım süreçlerinin biyokimyasal göstergeleri), ii) Kemik hücrelerine özgü enzimler (osteoblast, osteoklast veya osteosit aktivitesini yansıtan özgül enzimler) ve iii) Düzenleyici moleküller (kemik metabolizmasını düzenleyen sitokinler, büyüme faktörleri ve sinyal iletim yollarının anahtar proteinleri) olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma,

kemik metabolizmasının dinamik dengesinin anlaşılması ve tanısal amaçlarla biyobelirteç seçiminde sistematik bir yaklaşım sağlamaktadır (Lombardi ve diğerleri, 2025).

Bu biyobelirteçler kemik dönüşüm belirteçleri [Tip I Kollagen Propeptitler (PINP, Intact PINP, Total PINP ve PICP) ve Tip I Kollajen Çapraz-Bağlı Telepeptitler (NTX, α -CTX-I, β -CTX-I, CTX-MMP, ve ICTP)], kemik hücrelerine özgü enzimler [alkalen fosfataz (ALP), kemik-spesifik alkalen fosfataz (BALP), asit fosfataz (ACP), tartarat- dirençli asit fosfataz izoform 5b (TRACP5b) ve Katepsin K (CTSK)] ve düzenleyici moleküller [osteokalsin (OC), D vitamini metabolitleri (vitD, 25-(OH)D, 1,25-(OH)₂D, kalsitriol, serbest kalsitriol, 24,25-(OH)₂), paratiroid hormon (PTH), fibroblast büyüme faktör 23 (FGF23), Wnt sinyal yolu inhibitörleri (Sklerostin, Dickkopf-related protein 1 (DKK-1), tümör nekrozis faktör süper ailesi (RANKL, osteoprotegerin (OPG), hücre göçü ve adhezyonunda rol oynayan faktörler (periostin, osteopontin (OP), osteonektin (ON)]'dir (Lombardi ve diğerleri, 2025). Bu biyobelirteçler, yalnızca metabolik kemik hastalıklarının tanı ve prognozunda değil, aynı zamanda farmakolojik tedaviye verilen biyolojik yanıtın takibinde de değerli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca non-invaziv özellikleri sayesinde uzun dönemli izlem için de klinik avantaj sağlamaktadırlar.

Günümüzde bu biyobelirteçlerin tespiti amacıyla en yaygın olarak kullanılan geleneksel yöntemler, ELISA tabanlı enzim immünoassay teknikleri ile yüksek verimli otoanalizör sistemleridir. ELISA, yüksek özgüllüğe sahip olmasına rağmen uzun inkübasyon süreleri, çok basamaklı yıkama adımları ve laboratuvar ortamı gereksinimi nedeniyle zaman ve kaynak açısından sınırlayıcı olabilmektedir (Crowther, 2000). Otoanalizör sistemleri ise yüksek numune kapasitesi ve tekrarlanabilirliğiyle rutin klinik uygulamalarda avantaj sağlamaktadır; ancak cihaz maliyetleri yüksek olup, analizler genellikle merkezi laboratuvarlara bağımlıdır ve anlık sonuç verme potansiyeli düşüktür (Rifai ve diğerleri, 2018).

Elektrokimyasal biyosensörler, son yıllarda biyobelirteçlerin tayinine yönelik geliştirilen yöntemler arasında, yüksek özgüllük, duyarlılık ve taşınabilirlik özellikleri sayesinde yenilikçi ve umut vadeden bir çözüm olarak öne çıkmaktadır (Maduraiveeran ve diğerleri, 2018 ; Ronkainen ve diğerleri, 2010). Ayrıca az hacimli örneklerle çalışabilme, düşük üretim maliyeti, minimal numune hazırlığı ve gerçek zamanlı ölçüm yapabilme gibi avantajlar da sunmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında, kemik yapım ve yıkımına ilişkin PINP ve CTX biyobelirteçlerinin serum, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında tayinine yönelik, özgün bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi hedeflenmektedir. Geliştirilecek sensör sisteminde yüzey modifikasyonları, antikor immobilizasyon yöntemleri, redoks problemleri ile ölçüm optimizasyonları detaylı şekilde ele alınacaktır. Ayrıca elde edilen biyosensör performansı, ELISA ve ECLIA sistemlerinden elde edilen verilerle karşılaştırılarak analitik güvenilirlik ve klinik uygulanabilirlik değerlendirilecektir. Bu kapsamda, çalışma biyosensör teknolojilerinin kemik metabolizması biyobelirteçleri için klinik tanı süreçlerine entegrasyonu açısından önemli katkılar sunmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemiğin Yapısı

Kemik, osteoid matriks ve hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ kristalinin birleşimidir ancak kemik aynı zamanda su, kollajen olmayan proteinler, lipitler ve özel kemik hücreleri de içerir (Boskey ve Robey, 2013 ; Clarke, 2008; Kenkre ve Bassett, 2018).

Tip 1 kollajen kemik matriksi kemiğe elastikiyet, esneklik ve çekme kuvveti kazandırır. Kollajen lifleri üç sarmal zincirden oluşur ve bir araya gelerek fibrilleri oluştururlar. Daha sonra fibriller iç içe geçer ve çapraz bağlarla bağlanır (Kenkre ve Bassett, 2018 ; Viguet-Carrin ve diğerleri, 2006). Serumdan adsorbe edilen kollajen olmayan proteinler de matriksi oluşturur. Söz konusu proteinlerin biyolojik rolleri gün geçtikçe daha iyi anlaşılmakta, başlıca görevleri arasında kollajen matriksin kararlılığı ve mineralizasyonun modülasyonu bulunmaktadır. Kemik minerali, hidroksiapatit kristalleri formunda olup, mineral homeostazisi için gerekli olan kalsiyum ve fosfatın temel bir deposudur ve iskelete mekanik sertlik ve basınç dayanımı sağlar. Son zamanlarda NMR spektroskopisi kemik matriksi ve mineralinin detaylı bileşimi hakkında yeni bilgiler sağlamıştır (Duer, 2015 ; Kenkre ve Bassett, 2018 ; Patra ve diğerleri, 2025).

Kemikler koruyucu ve destekleyici bir rol üstlenmenin yanı sıra hareket için de gereklidir; Bu nedenle hem kuvvetli hem de hafif olmaları gerekir. Sonuç olarak kemikler yapısal olarak kortikal ve trabeküler (süngerimsi) olmak üzere farklı iki kemik türünden oluşur. Kortikal kemik, içinde nüfuz eden damar kanalları bulunan sağlam bir kemiktir ve dıştaki yoğun kabuğu oluşturur. Dışta kan damarları, sinir uçları, osteoblastlar ve osteoklastlar içeren periosteal yüzey ve kemik iliğine bitişik içte endosteal yüzey bulunur (Augat ve Schorlemmer, 2006 ; Kenkre ve Bassett, 2018) . Kortikal kemiğin endosteal yüzeyinde, bağlantı plakaları ve çubuklarının ince bir ağından oluşan bal peteği benzeri trabeküler kemik bulunur (Kenkre ve Bassett, 2018 ; Lerebours ve diğerleri, 2020 ; Young, 2006).

Kortikal ve trabeküler kemik arasındaki yapısal farklılıklar, bu kemik tiplerinin farklı biyomekanik ve fizyolojik işlevlerinin temelini oluşturur. Olgun iskeletin yaklaşık %80'ini oluşturan kortikal kemik, yüksek mekanik dayanıklılık ve düşük dönüşüm oranı ile karakterizedir. Bununla birlikte, kortikal kemik, belirgin ya da kronik mineral yetersizliklerine karşılık olarak mineral mobilizasyonu gerçekleştirebilir. Buna karşın, daha

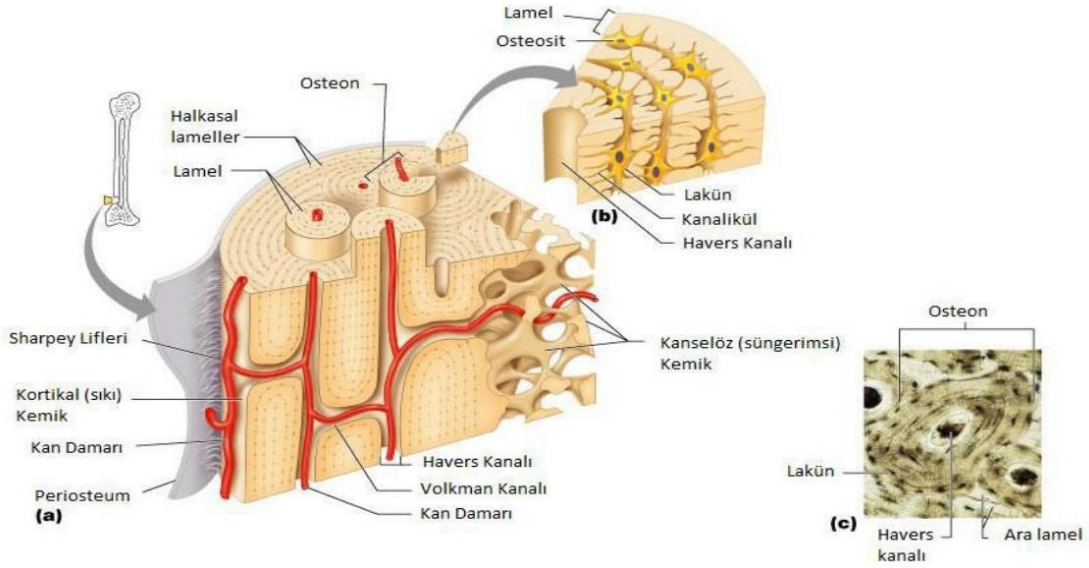
düşük yoğunluklu, elastik özellikte, yüksek dönüşüm oranına sahip ve kompresif kuvvetlere karşı dayanıklı olan trabeküler kemik, iskeletin geri kalan bölümünü meydana getirir. Trabeküler kemik, mekanik yükleri karşılamak amacıyla trabekül yapıların optimal bir geometrik düzen içinde organize olması sayesinde iskeletin yapısal bütünlüğünü destekler. Geniş yüzey alanı nedeniyle mineral metabolizması açısından elverişli bir mikroçevre sunar ve kortikal kemikten daha yüksek metabolik aktivite göstererek, ani mineral eksikliklerine karşı hızlı mineral mobilizasyonu sağlar (Kenkre ve Bassett, 2018 ; Lerebours ve diğerleri, 2020 ; Parkinson ve Fazzalari, 2013). Bu özelliklerinden dolayı, trabeküler kemik osteoporozun erken ve belirgin etkilerine en duyarlı kemik dokusu olarak öne çıkmaktadır (Kenkre ve Bassett, 2018 ; Seeman, 2003 ; Yeh ve diğerleri, 2019).

Mevcut kortikal ve trabeküler kemik oranları, her kemiğin işlevine bağlıdır. Omurgalılarda trabeküler kemik, kompresif yüklerin absorpsiyonunda temel rol oynarken, mekanik kaldırıcı sağlayan uzun kemikler, hem sıkıştırma hem de burulma kuvvetlere karşı optimal direnç sunabilmek adına büyük oranda kortikal kemikten yapılandırılmıştır (Amling ve diğerleri, 1996 ; Kenkre ve Bassett, 2018 ; Seeman, 2003).

2.2. Kemiğin Hücresel Kompozisyonu ve Yapısal Organizasyonu

Kemik dokusu, olağanüstü biyomekanik özellikleri ve çok yönlü işlevselliği sayesinde, canlı organizmalarda bulunan en karmaşık ve mükemmel biyomalzemelerden biri olarak kabul edilmektedir. Hem yüksek dayanıklılık hem de esneklik özelliklerini eş zamanlı olarak bünyesinde barındıran kemik, diğer biyolojik dokularla karşılaştırıldığında, yapısal bütünlüğünü koruma ve çevre koşullara biyolojik uyum sağlama kapasitesi bakımından benzersizdir. Kemik dokusunun bu özellikleri, onun son derece dinamik, metabolik olarak aktif ve mekanik uyarılara duyarlı bir yapı olmasından kaynaklanmaktadır (Raggatt ve Partridge, 2010 ; Rho ve diğerleri, 1998 ; Šromová ve diğerleri, 2023).

Kemiğin morfolojik yapısı, hacmi ve mekanik dayanıklılığı, organizma üzerindeki fizyolojik ve mekanik yüklenmelere göre şekillenmektedir. Bu bağlamda, kemik dokusu yalnızca pasif bir yapı değil, aynı zamanda çevresel mekanik uyarılara karşı aktif bir biyolojik yanıt verici konumundadır. Mekanik yüklenmedeki değişiklikler, örneğin hareketsizlik, artmış yük taşıma ya da travmatik etkenler; kemik yapım ve yıkım süreçlerini düzenleyen şekillenme ve yeniden şekillenme mekanizmalarını doğrudan etkilemektedir (Eriksen, 2010 ; Seeman, 2009 ; Singh ve diğerleri, 2012 ; Šromová ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.1. Kemiğin üç boyutlu mimarisi

Kemiğin üç boyutlu yapısı, çoğunlukla kompakt (kortikal) ve süngerimsi (trabeküler) olmak üzere iki temel yapısal bileşenden oluşur. Kortikal kemiğe mekanik dayanıklılığını kazandıran temel mikroyapısal birim osteondur. Trabeküler kemik ise, besin maddelerinin difüzyonunu kolaylaştırmak ve kemik-mineral homeostazında rol oynayan dolaşımsal sitokinler ile hormonlara maruz kalmayı artırmak amacıyla yüzey alanını maksimize edecek şekilde organize olmuştur. Periost, kortikal kemiğin dış yüzeyini saran, bağ dokularının kemiğe tutunmasını sağlayan, ek vaskülarizasyon sunan ve kırık iyileşmesinde kallus oluşumunun erken döneminde gerekli osteoprogenitör hücreleri sağlayan fonksiyonel bir dokudur (Buck ve diğerleri, 2012 ; Tunçay, 2013).

Kemik dokusu, mekanik yüklenmeye yanıt olarak kalınlaşmakta ve kütlesini artırmakta, yüklenmenin yetersizliği durumunda ise yıkım süreçleri aktive olmaktadır. Bu mekanotransdüksiyon odaklı yanıt, kemiğin fonksiyonel adaptasyon yeteneğini belirlemektedir. Hücresel düzeydeki bu düzenin herhangi bir bileşeninde oluşabilecek bir disfonksiyon, kemik döngüsünün fizyolojik sürekliliğini bozarak osteoporoz gibi düşük kemik kütlesi ile seyreden hastalıklara neden olabilir (Frost, 2003 ; Seeman ve Delmas, 2006). Dolayısıyla, kemik yeniden şekillenmesi yalnızca mekanik bir süreç değil, aynı zamanda hassas bir biyolojik dengeyi temsil etmektedir. Bu denge, bireyin yaşam tarzı, hormonal durumu, yaşlanma süreci ve sistemik hastalıklar gibi çok sayıda faktörden etkilenecek kemik sağlığının sürdürülebilirliğini belirlemektedir. Farklı fizyolojik yükleme

koşulları altında kemiğin gösterdiği direnç ve işlevsel süreklilik, esas olarak yapısal geometrisi ve mekanik davranışına bağlıdır; bu parametreler, hem kemik bütünlüğünün korunmasında hem de dayanıklılığın sağlanmasında kritik rol oynamaktadır.

2.2.1. Kemik hücreleri

Kemik dokusunda kıkırdak matriksi sentezleyen kondrositler, kemik matriksi üreten osteoblastlar, kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar ve mekanik uyarıları algılayarak kemik metabolizmasını düzenleyen osteositler olmak üzere dört temel hücre tipi bulunur.

Kondrositler pluripotent mezenkimal kök hücrelerden meydana gelmektedir. Yuvarlak veya oval bir çekirdek ve salgı materyali içeren belirgin pürüzlü endoplazmik retikulum içerir. Sitoplazmik uzantılar kondrositin çevredeki matriksle etkileşime girmesini sağlar (Young, 2006).

Proliferatif kondrositler, endokondral ossifikasyon sürecinde tip II kollajenden zengin bir kıkırdak matriks öncüsü sentezler ve salgılar. Ardından, kondrositler hipertrofik farklılaşma göstererek tip X kollajen içeren mineralize matriks üretir ve son aşamada apoptoza uğrarlar. Mineralize kıkırdak dokusu, kemik oluşumu için temel bir öncü işlevi görür. Bu süreç, büyüme döneminde uzun kemiklerin proksimal ve distal uçlarında devam eder ve epifiz büyüme plağında doğrusal uzunlamasına büyümeyi sağlar. Son dönem araştırmalar, hipertrofik kondrositlerin osteoblastlara dönüşme potansiyeline sahip olabileceğine dair yeni kanıtlar ortaya koymaktadır (Mackie ve diğerleri, 2011 ; Yang ve diğerleri, 2014 ; Šromová ve diğerleri, 2023).

Kondrosit farklılaşması, Indian Hedgehog (IHH) ve paratiroid hormonla ilişkili protein (PTHrP) tarafından oluşturulan negatif geri bildirim mekanizmasıyla düzenlenir. Prehipertrofik kondrositler, hem kondrosit proliferasyonunu doğrudan teşvik eden hem de osteoblast oluşumunu ve çevresindeki periostun kemikleşmesini başlatan IHH salgılar. Ayrıca, IHH, perikondral bölgede PTHrP ifadenmesini uyararak PTHrP/PTH reseptörü üzerinden kondrosit proliferasyonunun devamını sağlar ve hipertrofik farklılaşmayı engeller; böylece IHH üretimi negatif geri bildirimle baskılanır (Kronenberg, 2003).

Kondrositlerin proliferasyon ve farklılaşma süreçleri aynı zamanda fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyal yolu tarafından da kontrol edilir; FGF etkileri ise kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler) tarafından antagonize edilir. Kondrosit farklılaşmasının kritik transkripsiyon faktörleri arasında SOX9 ve Runx2 bulunur; SOX9 kondrosit farklılaşmasının tüm evrelerinde zorunlu iken, Runx2 özellikle hipertrofik kondrosit fenotipinin oluşumu için gereklidir. Doğrusal büyüme esnasında kondrositler, mineralize kıkırdak rezorpsiyonunu düzenleyen RANKL molekülünü de ifade ederek kemik yenilenme süreçlerine katkıda bulunur (Bilezikian, 2025 ; Kronenberg, 2013; Xiong ve diğerleri, 2011).

Kemik oluşturan hücelere dönüşen osteoprogenitör hücreler, kemik kanallarında, endosteumda, periosteumda ve ilikte bulunur. Ayrıca vasküler perisitler tarafından da sağlanabilirler. Osteoprogenitör hücreler, bir bölgeye göç etmek, çoğalmak ve osteoblastlara farklılaşmak için sinyaller alana kadar farklılaşmadan kalırlar. Bunlar kemiğin "kök hücreleridir" (Bilezikian, 2025 ; Florencio-Silva ve diğerleri, 2015).

Osteoblastlar, kemik yüzeylerinde yer alan mezenkimal kökenli hücrelerdir. Başlıca rolleri, iskelet dokusunun yapısal bütünlüğünü sağlayan kollajen ve kollajen dışı proteinlerin sentezlenmesi olmakla birlikte, aynı zamanda hem iskelet sistemi içerisinde hem de iskelet dışı dokularda çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli görev üstlenirler. Osteoblastların farklılaşma süreçleri ve fonksiyonel aktiviteleri; çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü, mekanik uyarılar, temel transkripsiyon faktörleri ile epigenetik düzenleyici mekanizmaların etkileşimi tarafından yönlendirilmektedir (Šromová ve diğerleri, 2023 ; Bilezikian, 2025) .

Transkripsiyon faktörü SOX9, osteoblast progenitör hücrelerinin tümünde ifade edilirken, osteoblast farklılaşmasının başlatılması için Runx2 faktörü gereklidir (Murshed ve diğerleri, 2005). Progenitör hücrelerin preosteoblastlara geçişi ise, Runx2'nin düzenlediği çinko-parmak transkripsiyon faktörü osterix (OSX) tarafından kontrol edilmektedir. Osteoblastogenez süreci, kanonik Wnt sinyal yolu aracılığıyla düzenlenir; bu yol, Wnt ligandının reseptörü Frizzled ve koreseptörleri LDL reseptörü ilişkili protein 5 veya 6 (LRP5/6) ile etkileşime girerek, osteoblastların mezenkimal öncüllerden farklılaşması için kritik olan nükleer β -katenin düzeylerini artırır. Wnt sinyalizasyonu, osteositler tarafından salgılanan ve kemik oluşumunu negatif düzenleyen sklerostin ile DKK-1 protein ailesi

üyeleri tarafından antagonize edilir. Ayrıca, Hedgehog, NOTCH, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve kemik morfogenetik proteinler (BMP) gibi diğer sinyal yolları da osteoblastogenez mekanizmasında önemli düzenleyici roller üstlenmektedir (Caetano-Lopes ve diğerleri, 2007; Daossis ve Andonopoulos, 2011 ; Dincel ve diğerleri, 2023 ; Ducy ve diğerleri, 1997 ; Hartman, 2006 ; Long, 2011 ; Maria, 2008 ; Nakashima ve diğerleri, 2002).

Osteositler, kemik içerisinde gömülü olan ve tüm yetişkin kemik hücrelerinin yüzde 90'ından fazlasını oluşturan, uzun ömürlü, farklılaşmış hücrelerdir. Bunlar, lakuna adı verilen vakuollerin içinde yaşamak için kendilerini organik matriksle çevreleyen osteoblastlardır. Osteositler, kemik matriksi boyunca ilerleyen kanaliküller içerisinde yer alan uzun dendritik uzantıları aracılığıyla birbirleriyle, kemik yüzey hücreleriyle ve kemik iliği hücreleriyle bağlantı kurarak dallanan, karmaşık bir hücresel iletişim ağı meydana getirir (Bilezikian, 2025 ; Bonewald, 2011 ; Franz-Odenaal ve diğerleri, 2006).

Osteositler, kemik modelleme ve yeniden şekillenme süreçlerini düzenlemek amacıyla osteoklast ve osteoblastların aktivite ve migrasyonunu kontrol eden mekanosensörler olarak görev yapar. Ayrıca mineral homeostazının sürdürülmesinde kritik rol oynar ve fosfat metabolizmasını düzenleyen fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23)'ü salgırlar. FGF23, böbrekte fosfat reabsorpsiyonunu inhibe ederken, aynı zamanda D vitamini aktivasyonunu baskılayarak serum fosfat düzeylerinin düşmesini sağlar; bu durum bağırsaklardan fosfat emiliminin azalmasına yol açar (Bonewald ve Johnson, 2008 ; Dallas ve diğerleri, 2013 ; Feng ve diğerleri, 2006 ; Quarles, 2012).

Osteositler, kemik yeniden şekillenmesi sürecinde osteoklastogenez için gerekli olan RANKL'nin başlıca kaynaklarından biridir (Nakashima ve Takayanagi 2011). Ayrıca, osteoblastik kemik oluşumunu sınırlayan Wnt sinyal yolunun negatif düzenleyicileri olan sklerostin ve DKK-1 proteinlerini salgırlar. Osteositlerin sklerostin ve DKK-1 üretimi, mekanik yüklenme altında inhibe edilmekte olup, bu durum artan mekanik stresin lokal kemik oluşumunu teşvik etmesine neden olmaktadır (Bilezikian, 2025 ; Bonewald ve Johnson, 2008 ; Moester ve diğerleri, 2010).

Monosit/makrofaj kökenli öncü hücrelerin füzyonu ile meydana gelen çok çekirdekli hücreler olan osteoklastlar, podozom yapıları aracılığıyla kemik yüzeyine güçlü bir şekilde tutunur. Bu bağlantı sonucunda oluşan izole bariyer bölgesi, osteoklastın mineral fazı

çözerek lizozomal enzimler yardımıyla kemik matriksini yıkabildiği, izole ve asidik bir mikroçevre sağlar (Boyle ve diğerleri, 2003). Kemik minerali hidroklorik asit salgılanmasıyla çözülür ve kemik matriksi katepsin K dahil proteolitik enzimlerin salgılanmasıyla parçalanır (Ross, 2013).

Osteoklast oluşumu ve fonksiyonel aktivitesi, çeşitli sitokinler ve düzenleyici faktörler tarafından kontrol edilir. Bu faktörler arasında RANKL (reseptör aktivatör of nükleer faktör kappa-B ligand), osteoprotegerin (OPG), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), paratiroid hormonu (PTH), 1,25-dihidroksivitamin D (kalsitriol) ve kalsitonin yer almaktadır. Farklılaşma, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) tarafından başlatılır ve öncü hücrelerdeki kendi reseptörü RANK üzerinde etki eden RANKL tarafından desteklenir. Osteoklastogenez, RANK'a bağlanmasını engellemek için RANKL'a bağlanan osteoblast kökenli tuzak reseptör OPG tarafından negatif olarak düzenlenir. Osteoklastogenez, romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda bağışıklık hücreleri tarafından da uyarılabilir (Bilezikian, 2025 ; Boyce ve diğerleri, 2008 ; Henriksen ve diğerleri, 2011 ; Ross, 2013).

2.2.2. Kemik matriksi

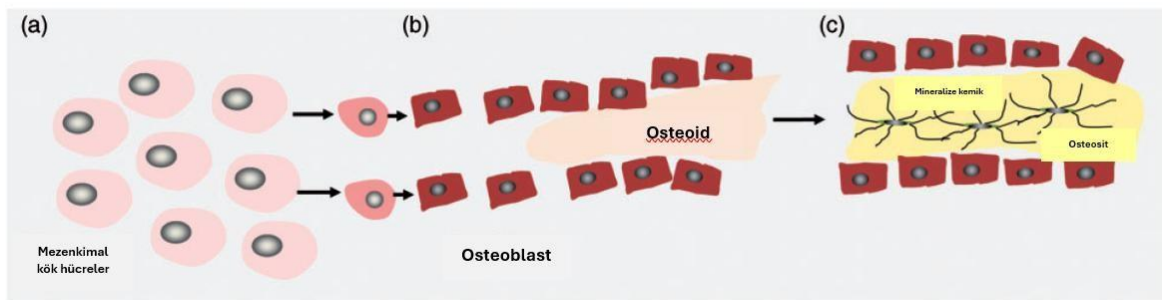
Kemik matriksi, toplam kemik hacminin %90'ını oluşturur. İnorganik veya mineral matriks (%65), organik matriks (%20), lipidler ve su (%15) olmak üzere dört ana bileşenden oluşur (Buck, 2012; Clarke, 2008 ; Šromová ve diğerleri, 2023). İnorganik kemik matriksi, vücudun kalsiyum depolamasının %99'unu, fosforun %85'ini ve magnezyum ve sodyum depolarının %40-%60'ını oluşturur. İnorganik matriks esas olarak hidroksiapatit formundadır ve kemik kuvvetinin, sertliğinin ve sıkıştırma kuvvetlerine karşı direncinin çoğunu sağlar (Buckwalter ve diğerleri, 1995 ; Buck, 2012 ; Šromová ve diğerleri, 2023). İnorganik matriksin kaybı, kemiğin mekanik sertliğini azaltarak dokuyu yumuşak, şekillendirilebilir ve süngerimsi bir yapıya dönüştürür; bu durum, D vitamini eksikliğine bağlı osteomalazi ve raşitizm gibi klinik tablolarda gözlemlenebilir (Heath, 2009).

Osteoblastlar tarafından sentezlenen organik matriksin yaklaşık %90'ını tip I kollajen oluşturmakla birlikte, aynı zamanda proteoglikanlar, glikoproteinler ve çeşitli büyüme faktörleri de içermektedir (Buckwalter ve diğerleri, 1995 ; Buck, 2012). Bu büyüme faktörleri kemik morfogenetik proteinleri, diğer dönüştürücü büyüme faktörü β -ailesi

faktörleri, interlökin-1, interlökin-6, osteokalsin, osteonektin ve kemik sialoproteinini içerir (Clarke, 2008 ; Gundberg, 2003). Bu faktörlerin hepsi kemik osteogenezisinde, mineralizasyonunda ve yeniden şekillenmesinde önemli roller oynar. Organik matriks kemiğe formunu verir ve çekme kuvvetlerine karşı direnç sağlar (Gundberg, 2003 ; Buck, 2012). Organik matristeki iyi bilinen anormallikler arasında sert ve kırılabilir kemiklerle sonuçlanan osteogenesis imperfecta bulunur (Dickson ve diğerleri, 1975; Šromová ve diğerleri, 2023).

2.3. Kemik oluşumu

İskelet sistemi, iki temel ossifikasyon mekanizması aracılığıyla şekillenir. Bunlardan ilki olan intramembranöz ossifikasyon, özellikle kafatası kubbesi gibi düz kemiklerin oluşumunda rol oynar. Bu süreçte mezenkimal kökenli hücreler osteoblastlara farklılaşır ve osteoid matriksini doğrudan salgılayarak mineralizasyon ile plaka benzeri kemik dokusunun gelişimini sağlar (Şekil 2.2). İkinci mekanizma olan endokondral ossifikasyon ise aksiyel ve apendiküler iskeletin büyük bir kısmının gelişiminden sorumludur. Çok aşamalı bir biyolojik süreç olarak gerçekleşen bu ossifikasyon tipi, kıkırdak modelinin oluşumunu, ardından bu modelin kademeli olarak kemik dokusu ile yer değiştirmesini içerir. Endokondral kemikleşmenin basamakları ayrıntılı biçimde Şekil 2.3’de gösterilmiştir (Kenkre ve Bassett, 2018 ; Shapiro, 2008 ; Sommerfeldt ve Rubin, 2001 ; Šromová ve diğerleri, 2023).

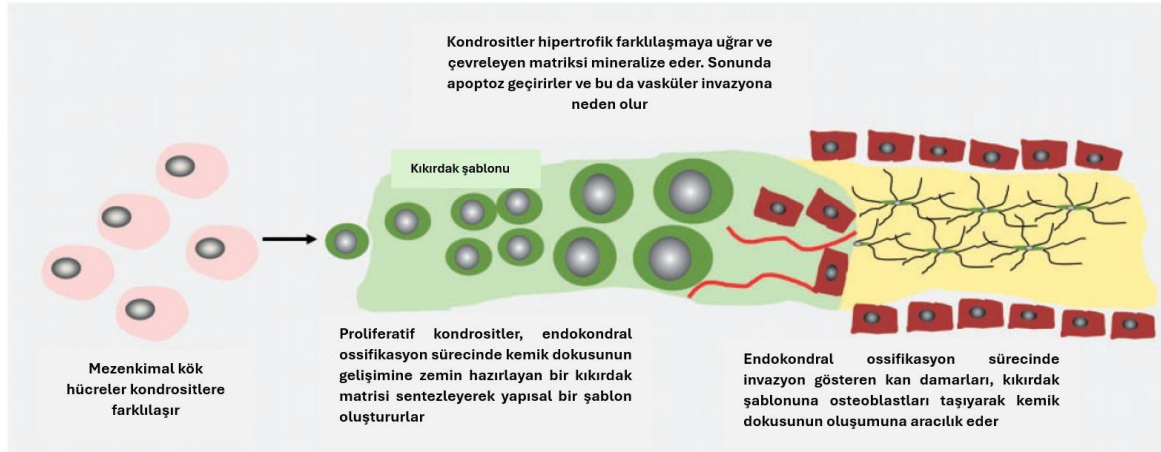


Şekil 2.2. İntramembranöz kemik oluşumunu gösteren şematik diyagram (Kenkre ve Bassett, 2018).

Mezenkimal kök hücreler osteoblastlara farklılaşarak doğrudan kemik oluştururlar. (a) Bağ dokusundaki mezenkimal kök hücreler bir küme oluşturur ve osteoblastlarda farklılaşır. (b) Olgun osteoblastlar osteoid adı verilen tip I kollajenden zengin bir matriks salgırlar. (c) Osteoid, mineralizasyonun yayıldığı bir kemikleşme merkezi oluşturmak üzere mineralize

olur. Osteoblastlar son olarak osteositlere farklılaşır ve yeni oluşan kemik matriksinin içine yerleşirler (Kenkre ve Bassett, 2018).

İntramembranöz ossifikasyon, endokondral ossifikasyondan farklı olarak, kıkırdak ara evresi olmaksızın doğrudan kemik dokusunun oluşumu ile karakterizedir. Bu mekanizma özellikle kraniyofasiyal düz kemiklerin gelişimi, primer kemik iyileşme süreçleri ve distraksiyon osteogenezi sırasında devreye girer. Süreç, mezenkimal kök hücrelerin osteoprogenitör hücrelere farklılaşması ve bu hücrelerin ekstrasellüler matriks içerisinde bir ossifikasyon merkezi oluşturarak osteoblastlara dönüşmesi ile ilerler (Kenkre ve Bassett, 2018 ; Olsen, 2000 ; Patel, 2011 ; Šromová ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.3. Endokondral kemik oluşumunu gösteren şema (Kenkre ve Bassett, 2018).

Endokondral ossifikasyon, kıkırdak matriks aracılığıyla gerçekleşen kemik oluşumu ile karakterizedir. Bu süreç, özellikle uzun kemiklerin gelişiminde belirleyici olup, epifiz plağı üzerinden boyuna büyüme ve fizyolojik kemik iyileşme süreci açısından temel bir rol üstlenmektedir (Ortega ve diğerleri, 2004 ; Šromová ve diğerleri, 2023). Endokondral ossifikasyon, kondrositlerin dört farklı bölgeden oluşan hiyalin kıkırdak iskeletine proliferasyonu ile başlar. Sürecin en dış kısmında yer alan dinlenme bölgesi, kemikleşme hattına en uzak konumda bulunan ve farklılaşmamış kondrositleri içeren bir alandır. Proliferatif bölgede kondrositler mitotik olarak çoğalır, ardından hipertrofiye uğrayarak alkalen fosfataz salgırlar. Bu enzimatik aktivite, kondrositlerin apoptozunu tetikler ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) başta olmak üzere çeşitli anjiyojenik faktörlerin salınımına yol açar. Hipertrofik hücrelerin ardından oluşan kalsifikasyon bölgesi, damar filizlenmesini ve osteoprogenitör hücrelerin migrasyonunu kolaylaştıran mineralize

ve canlılıktan yoksun bir matriksle karakterizedir (Şekil 3) (Ortega ve diğerleri, 2004 ; Olsen ve diğerleri, 2000 ; Kenkre ve Bassett, 2018).

2.3.1. Kemik şekillenmesi

İskelet gelişiminin erken evrelerinde başlayan kemik modellemesi, kemiğin boyut ve şeklinde değişikliklere yol açan temel bir biyolojik süreçtir. Bu süreçte kemik yıkımı ve kemik oluşumu, birbirinden bağımsız ve farklı bölgelerde gerçekleşir; bir anatomik alandan kemik dokusu uzaklaştırılırken, başka bir bölgede yeni kemik dokusu inşa edilir. Modellemenin tipik bir örneği, doğrusal büyüme sırasında iskeletin morfolojik bütünlüğünün korunmasıdır. Bu dönemde metafiz bölgesinde, büyüme plağının hemen altında periosteal yüzeyde osteoklastik yıkım meydana gelirken, eşzamanlı olarak endosteal yüzeyde osteoblastik kemik oluşumu gerçekleşir. Bu eş zamanlı süreçler sonucunda epifizin morfolojisi kademeli olarak diyafiz yapısına uyum sağlar (Allen ve Burr, 2014 ; Kenkre ve Bassett, 2018 ; Seeman, 2003). Normal metafiz modellemesinin bozulması, özellikle çocukluk çağında osteogenesis imperfekta olgularında uygulanan antirezorptif (bifosfonat) tedavilerin ardından belirgin hale gelmektedir. Bu durum, fizyolojik modelleme sürecinin dramatik biçimde inhibe edilmesine yol açmaktadır (Grissom ve Harcke, 2003 ; Kenkre ve Bassett, 2018). Modelleme, aynı zamanda uzun kemiklerin diyafizlerinde radyal büyümeden de sorumludur. Bu bağlamda, endosteal yüzeyde osteoklastik oluşum ile eşzamanlı olarak periosteal yüzeyde osteoblastik kemik oluşumu gerçekleşmekte, böylece yaşla birlikte kemik çapında genel bir artış sağlanmaktadır (Ortega ve diğerleri, 2004 ; Olsen ve diğerleri, 2000 ; Šromová ve diğerleri, 2023).

Kemik şekillenmesi, büyük ölçüde iskelet maturasyonunun tamamlandığı ergenlik dönemi sonuna kadar aktif olarak sürmekte olup, bu süreç boyunca kemik şekli, boyutu ve kütlesi gelişimsel sinyaller doğrultusunda yeniden düzenlenmektedir. Ancak, modelleme yalnızca gelişimsel evrelerle sınırlı değildir; mekanik yüklenme, fiziksel aktivite düzeyi ve patofizyolojik uyarılara bağlı olarak erişkin dönemde de belirli derecelerde devam edebilir. Özellikle mekanik strese adaptif yanıt olarak meydana gelen kemik modelleme, yoğun egzersiz, mikrotravmalar veya protez uygulamaları gibi durumlarda yeniden aktive olabilir. Ayrıca, kronik böbrek hastalığına bağlı renal osteodistrofi gibi sistemik metabolik bozukluklar da erişkin bireylerde şekillenme süreçlerinin yeniden ortaya çıkmasına veya düzensizleşmesine neden olabilmektedir (Bolamperti ve diğerleri, 2022 ; Frost, 1990 ; Moe, 2006).

Kemik yeniden şekillendirme döngüsü

İskelet, yeniden şekillenme (remodelling) yoluyla kendi bakımını ve onarımını düzenler ve bu süreç aynı zamanda mineral homeostazını korumak, kalsiyum ve fosfata hızlı erişim için bir mekanizma sağlar (Bentolila ve diğerleri, 1998 ; Mori ve Burr, 1993). İlk olarak Frost tarafından tanımlanan kemik yeniden şekillenme döngüsü, eski ve hasarlı kemiği yenisiyle değiştiren sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir süreçtir (Frost, 1963). Kemik yeniden şekillenme süreci, osteoklastlar, osteoblastlar ve mikrovasküler yapılardan oluşan ve bu hücresel elemanların koordineli olarak görev yaptığı temel çok hücreli birim (basic multicellular unit, BMU) içerisinde gerçekleşmektedir (Bolamperti ve diğerleri, 2022 ; Cook ve diğerleri, 2024 ; Frost, 1990). Temel çok hücreli birim, içeriğinde yer alan osteoblast ve osteoklast hücrelerinin yaşam sürelerinden daha uzun bir yeniden şekillenme döngüsüne sahiptir. Bu nedenle, temel çok hücreli birim içerisindeki hücresel aktivitenin sürekliliği, büyük ölçüde osteositler tarafından düzenlenen sinyal ağları ile sağlanmaktadır (Bolamperti ve diğerleri, 2022 ; Manolagas, 2018). Osteositler, hem mekanik hem de biyokimyasal uyarılara yanıt vererek, kemik modelleme ve yeniden şekillenme süreçlerinin spatiotemporal kontrolünde kilit rol oynamaktadır. Temel çok hücreli birimin morfolojik yapısı ve hücresel organizasyonu, bulunduğu kemik tipine göre farklılık göstermektedir. Trabeküler kemikte temel çok hücreli birimler kemiğin yüzeyine lokalizedir. Bu bölgelerde ilk olarak osteoklastlar tarafından, yüzeysel rezorptif aktivite sonucu *Howship lakunaları* olarak adlandırılan çöküntüler oluşturulur. Takiben, bu alanlar farklılaşmış osteoblastlar tarafından yeni kemik dokusu ile doldurularak yeniden yapılandırılır. Buna karşılık, kortikal kemikte temel çok hücreli birimin osteoklastik bileşeni, kompakt kemik dokusu içerisinde 'kesme konisi' olarak adlandırılan tünel benzeri bir yıkım yapısı oluşturarak hasarlı kemiği uzaklaştırır. Bu yapının ardında ilerleyen osteoblastlar, yeni oluşan kemiği tünelin iç yüzeyine eş merkezli lameller hâlinde yerleştirir; bu süreç, sonunda ortasında bir damar içeren *Havers kanalı* yapısının oluşumuyla sonuçlanır ve böylece yeni bir osteon meydana gelir. Her iki kemik tipinde de yeniden şekillenme süreci, osteoklastlar ve osteoblastların koordineli olarak etkileşimde bulunduğu, *Kemik Yeniden Şekillenme Bölmesi* olarak adlandırılan özel bir mikroskobik ortamda gerçekleşir. genellikle bir hücresel örtü ile çevrelenmiş olup, burada farklılaşma, aktivasyon ve hücresel işlev sürekliliği gibi süreçlerin spatiotemporal olarak düzenlendiği kritik bir mikroçevreyi temsil eder (Bolamperti ve diğerleri, 2022 ; Eriksen, 2010 ; Hauge ve diğerleri, 2001; Marahleh ve diğerleri, 2023 ; Loundagin ve diğerleri, 2024).

Yeniden şekillenme döngüsündeki temel adımlar – Hücresel ve moleküler mekanizmalar

Yeniden şekillenme döngüsü, kortikal ve trabeküler kemikte sırasıyla 120-200 gün boyunca gerçekleşen aktivasyon, yıkım, ters çevirme, oluşum ve sonlandırma olmak üzere beş örtüşen adımla son derece düzenlenmiş bir şekilde gerçekleşir (Agerback ve diğerleri, 1991; Parolini, 2025). Osteositler, Şekil 2.4’de görüldüğü gibi osteoklast ve osteoblast farklılaşmasını ve dolayısıyla kemik yıkımını ve oluşumunu düzenleyerek kemik yeniden şekillenmesini düzenler.

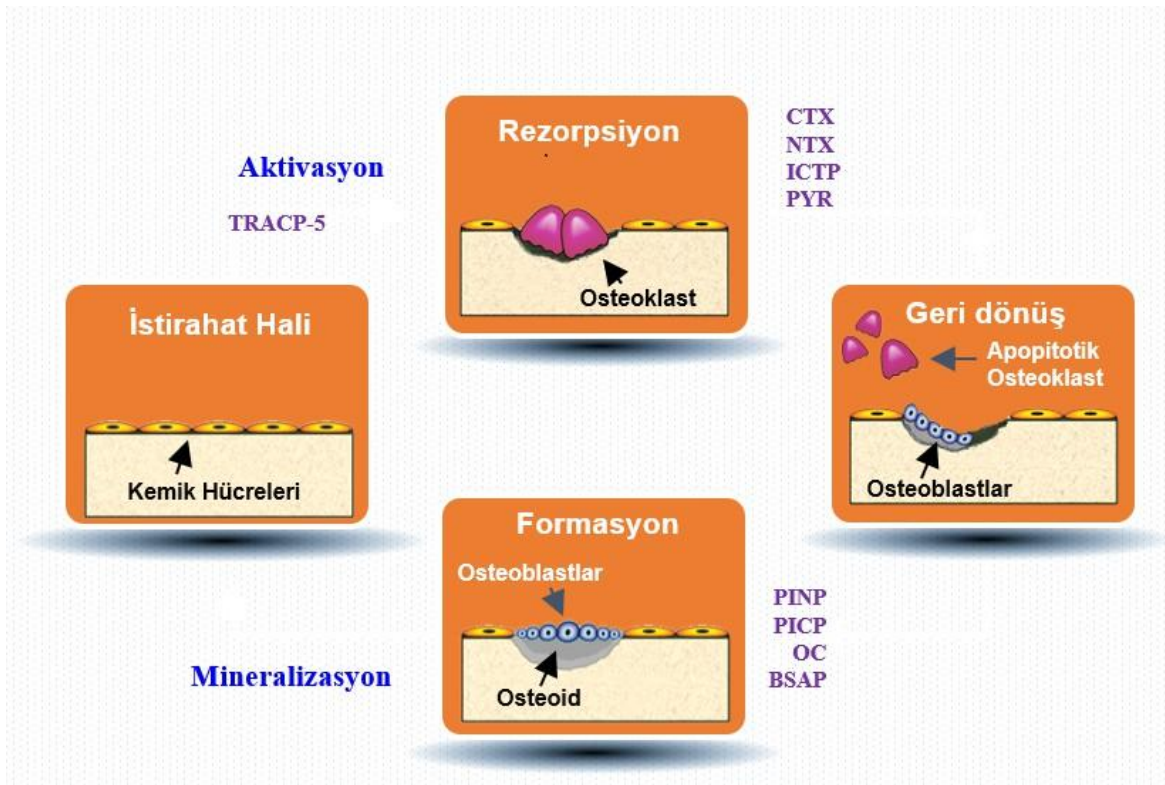


Illustration Copyright © 2009 Nucleus Medical Art, All rights reserved. www.nucleusinc.com.

Şekil 2.4. Kemik yeniden şekillenme döngüsü (Allen ve Burr, 2019; Baron, 2003; Brighurst ve diğerleri, 2005; Lindsay ve diğerleri, 1999).

Aktivasyon

Osteoklast öncü hücreleri dolaşımdan kemik mikroçevresine alındıktan sonra aktive edilir. Kemik yüzeyi, kemik yüzey hücrelerinin alttaki matriksten ayrılması ve yıkılacak alanın üzerinde bir hücre örtüsü oluşturmasıyla açığa çıkar (Hauge ve diğerleri, 2001). Ardından, dolaşımdan gelen çoklu mononükleer hücreler kemik yüzeyine göç eder ve burada kaynaşarak, kemik matriksine bağlanan ve yıkım bölgesinin çevresinde sızdırmazlık bölgeleri oluşturan çok çekirdekli olgun osteoklastlara dönüşür. Bu şekilde oluşturulan izole

mikroortam, kemik matriksinin lokalize yıkımı için gerekli olan yıkım çukurunu (resorption lacuna) çevredeki dokudan ayırır.

Kemik yeniden şekillenmesinin başlatılması, bu sürecin yalnızca fizyolojik gereklilik durumlarında aktive edilmesini sağlayan kritik bir adımdır. 'Hedefli yeniden şekillenme' olarak adlandırılan bu mekanizmada, hasarlı ya da yaşlanmış kemik bölgelerinin seçici yıkımı gerçekleştirilir. Bu sürecin başlatıcı sinyali, geniş dendritik uzantılar aracılığıyla çevre hücrelerle iletişim kurabilen osteositlerden kaynaklanır. Örneğin, kemik matriksinde meydana gelen mikrohasarlar sonucunda osteosit kanaliküler ağının bütünlüğünün bozulması, osteosit apoptozunu tetikler ve bu durum, lokal anjiyogenez ile birlikte osteoklast ve osteoblast öncüllerinin kemik mikroçevresine hücrelerin yönlendirilmesini artıran çeşitli parakrin faktörlerin salınımına yol açar (Mori ve Burr, 1993 ; Goldring, 2015 ; Parfitt, 2002). Buna karşılık, hedeflenmemiş yeniden şekillenme; paratiroid hormonu (PTH) gibi hormonlardaki sistemik değişimlere yanıt olarak gerçekleşir. Bu süreçte amaç, kemikte depolanan kalsiyuma erişim sağlamaktır ve yeniden şekillenme belirli bir kemik bölgesine odaklanmaz, tüm iskelet genelinde yaygın olarak gerçekleşir (Atkins ve Findlay 2012 ; Chen ve diğerleri, 2015 ; Dallas ve diğerleri, 2013 ; Tatsumi ve diğerleri, 2007).

Yıkım (yaklaşık iki hafta sürer)

Osteoklast farklılaşması ve fonksiyonel aktivasyonu, osteositlerden kaynaklanan sinyallerle kontrol edilir. Osteoklastların hücre iskeleti yapısında meydana gelen yeniden düzenleme, hücrenin kemik yüzeyine sıkı şekilde tutunmasını ve çevresinde sızdırmazlık bölgesi oluşturmasını sağlar; ayrıca, bu süreç kıvrımlı kenar adı verilen ve salgı yüzey alanını belirgin şekilde artıran membran yapısının gelişimi ile sonuçlanır. Osteoklastlar, karbonik anhidraz II aracılığıyla ürettikleri protonları, kemik matriksinin mineral fazını eritmek üzere yıkım bölgesine pompalarlar (Tolar ve diğerleri, 2004). Özellikle H^+ -ATPaz, H^+ 'yi boşluklara pompalar; bu, klorür kanalı aracılığıyla Cl^- taşınmasına bağlanır ve böylece elektronötralite korunur. Daha sonra kollajen açısından zengin kemik matriksi, katepsin K ve matriks metalloproteinazlar gibi proteazlar tarafından parçalanır (Delaisse ve diğerleri, 2003 ; Silver ve diğerleri, 1988). Yıkım fazı osteoklastların programlanmış hücre ölümüyle sonlanır ve aşırı yıkımın olmaması sağlanır (Xing ve Boyce, 2005).

Tersine çevirme (yaklaşık dört - beş hafta sürer)

Kemik yıkımının kemik yapımına dönüştüğü ters faz henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, iki önemli olayın meydana geldiği düşünülmektedir (Eriksen ve diğerleri, 1984). İlk aşamada, yıkım ile açığa çıkan kemik yüzeyi yeni matriksin depolanmasına elverişli hale getirilir; bu süreçte kemik yıkımı ile kemik oluşumunu birbirine bağlayan ileri sinyal mekanizmaları devreye girer ve böylece net kemik kaybının meydana gelmesi engellenir. (Howard ve diğerleri, 1981 ; Sims ve Martin, 2014). Kemik yüzeyinin hazırlanması, mineralize olmayan kollajen matriksini uzaklaştıran osteoblastik soy hücreleri tarafından gerçekleştirilir ve daha sonra osteoblastik yapışmayı artırmak için kollajen olmayan mineralize bir matriks "çimento hattı" biriktirilir (Zhou ve diğerleri, 1994). Kemik yıkımını daha sonraki oluşuma bağlayan kesin sinyal henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, ters fazdaki hücrelerin bu sinyalleri gönderme veya almada rol oynaması olasıdır. Osteoklastların, interlökin 6 (IL-6) gibi sitokinleri salgılayarak veya yüzeylerindeki Ephrin reseptör ailesi ve osteoblastlarda bulunan membran bağlı ligandı Ephrinler gibi düzenleyici bir reseptör aracılığıyla bağlantı faktörünün kaynağı olabileceği varsayılmıştır (Kim ve diğerleri, 2020 ; Matsuo ve Otaki, 2012 ; Zhao ve diğerleri, 2006). Diğer sinyal yolları, BMP-2, dönüştürücü büyüme faktörü β ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi matriks kaynaklı faktörleri içerebilir (Delaisse, 2014 ; Everts ve diğerleri, 2002 ; Kim ve diğerleri, 2020 ; Raggatt ve Partridge, 2010).

Oluşum (yaklaşık dört ay sürer)

Yeni kemik oluşumu, osteoblastların önce tip I kollajenden zengin osteoid matriksi sentezleyip salgılaması, ardından bu osteoidin mineralizasyonunun düzenlenmesinde aktif rol almaları olmak üzere iki aşamada gerçekleşir (Atkins ve Findlay, 2012). Hidroksiapatit kristallerinin kollajen fibrilleri arasında biriktiği kemik mineralizasyon süreci karmaşıktır. Kontrol, kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarının sistemik düzenlenmesi, ekstrasellüler matriks veziküllerindeki lokal kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu ile pirofosfat ve osteopontin gibi kollajen olmayan proteinler dahil olmak üzere lokal mineralizasyon inhibitörleri tarafından uygulanır. İnorganik pirofosfat/fosfat oranı mineralizasyonun kritik bir düzenleyicisidir ve dokuya özgü olmayan alkalin fosfataz ile ektonükleotid pirofosfatazın göreceli aktiviteleri bu oranın temel belirleyicileridir (Anderson, 2003 ; Anderson ve diğerleri, 2005 ; Cui ve diğerleri, 2016 ; Šromová ve diğerleri, 2023).

Sonlandırma

Mineralizasyon tamamlandığında, osteoblastlar apoptozise uğrar, kemik yüzey hücrelerine dönüşür veya kemik matriksine yerleşir ve son olarak osteositlere dönüşür. Osteositler, osteogeneze karşı antagonistlerin, özellikle sklerostin gibi Wnt sinyal yolunun antagonistlerinin salgılanması yoluyla yeniden şekillenmenin sonunu işaret etmede önemli bir rol oynamaktadır (Bonewald, 2011 ; Šromová ve diğerleri, 2023).

2.4. Kemik Durum İndeksleri

2.4.1. Kemik yapım biyobelirteçleri

Kemik metabolizmasının biyokimyasal belirteçleri, genellikle serum veya idrar gibi vücut sıvılarında ölçülebilen, kemik oluşumu ya da yıkımı sonucu ortaya çıkan ve bu yönüyle kemik yeniden şekillenme sürecinin biyolojik aktivitesini yansıtan moleküllerdir. Son yıllarda çeşitli kemik yapım belirteçleri tanımlanmış olup, bu biyobelirteçlerin fizyolojik ve patolojik durumlara verdikleri yanıtların birbirinden farklılık gösterebildiği açıkça ortaya konmuştur. Her bir yapım belirteci, kemik oluşum sürecinin belirli bir fazına karşılık gelir; bu fazlar sırasıyla matriks sentezi, matriksin maturasyonu ve mineralizasyon evresi olarak tanımlanmaktadır (Çizelge 2.1) (Lombardi, 2025).

Çizelge 2.1. Kemik yapımına ait biyokimyasal belirteçler

Grup/Aile	Önerilen Ad	Kullanılan Kısaltmalar	Önerilen Kısaltma	Önerilen Birim
Tip I Kollajen Propeptitler	Prokollajen tip I N-propeptit	PINP, P1NP	PINP	µg/L
	İntakt prokollajen tip I N-propeptit (trimer)	İntakt PINP, intakt P1NP, iPINP, iP1NP	iPINP	µg/L
	Prokollajen tip I N-propeptit (trimer+monomer)	Toplam PINP, toplam P1NP, tPINP, tP1NP	tPINP	µg/L
	Prokollajen tip I C-propeptit	PICP, P1CP	PICP	µg/L
Alkalen Fosfataz	(Toplam dokuya özgül olmayan) alkalen fosfataz [UniProt: Alkalen fosfataz, dokuya özgül olmayan izoenzim – P05186]	ALP, tnsALP, AP, TNAP	ALP	U/L
	Kemik spesifik alkalen fosfataz (kütle konsantrasyonu)	BALP, kemik ALP, BAP, BSAP ACP	BALP	µg/L
	Kemik spesifik alkalen fosfataz (katalitik aktivite)			U/L
Osteokalsin	Osteokalsin (total)	OC, OCN, BGLAP, B-G LAP, kemik-gla-protein	OC	µg/L
	İntakt osteocalcin [UniProt: Osteocalcin-P]	iOC, intakt OC	iOC	µg/L
	Osteokalsinin N-ucu fragmanı	NmidOC, Nmid-OC, N-ter-mid OC	NmidOC	µg/L
	Tam karboksile osteokalsin	/	γ ₃ OC (g ₃ OC)e	µg/L
	Eksik karboksile osteokalsin	/	γ ₂ OC (g ₂ OC)e γ ₁ OC (g ₁ OC)e	µg/L
	Karboksilasyonu gerçekleşmemiş osteokalsin	/	γ ₀ OC (g ₀ OC)e	µg/L

Alkalen fosfataz (ALP)

Alkalen fosfataz (ALP), kan dolaşımında bulunan ve farklı doku kaynaklarından sentezlenen bir enzimdir. ALP izoenzimlerinin çoğunluğu karaciğerde üretilirken, kemik, bağırsak ve böbrek gibi organlarda da özgül izoenzimleri bulunmaktadır. Toplam ALP aktivitesi, kan örneği üzerinden ölçülmekte olup, rutin biyokimyasal testlerin temel bileşenlerinden biridir. İnsanlardaki normal ALP düzeyleri yaş, cinsiyet, kan grubu ve gebelik durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kandaki anormal ALP düzeyleri sıklıkla karaciğer, safra yolları veya kemik patolojilerine işaret eder. ALP ölçümü, raşitizm, osteomalazi ve Paget hastalığı gibi kemik metabolizması bozukluklarının tanısında önemli bir yardımcı belirteçtir. Ayrıca, ALP düzeyi ilgili hastalıkların tedavi etkinliğinin izlenmesinde de kullanılmaktadır (Compston ve diğerleri, 1987 ; Kuo ve Chen, 2017 ; Lombardi, 2025). Güncel araştırmalar, omurga kemiği mineral yoğunluğu ile serum toplam ALP arasında anlamlı korelasyonlar bulunduğunu göstermektedir. Serum toplam ALP aktivitesinin 129 U/L üzeri düzeylerinin erkeklerde osteoporoz göstergesi olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Fink ve diğerleri, 2016). Ayrıca, alendronat tedavisi uygulanan hastalarda toplam ALP düzeylerinin ortalama 79,7 U/L'den 64,8 U/L'ye düştüğü rapor edilmiştir (Kyd ve diğerleri, 1998). Bu bulgular, toplam ALP'nin osteoporoz tedavisinin etkinliğinin izlenmesinde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Ancak, özellikle menopoz sonrası kadınlarda toplam ALP'nin geniş referans aralığı ve küçük değişimlerin gözlemlenmesi, osteoporoz tanısında yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir.

Kemik-spesifik alkalen fosfataz (BALP)

Sağlıklı yetişkinlerde normal karaciğer fonksiyonu koşulları altında, serumda toplam Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesinin önemli bir kısmı kemik izoenzimi tarafından sağlanır ve bu oran, kaynaklara göre genellikle %40 civarındadır. Kemikten üretilen ALP izoenzimlerini karaciğerden elde edilen izoenzimlerden ayırt etmek zordur, çünkü bunlar yalnızca translasyon sonrası glikozilasyon ile farklıdır. Alkalen fosfatazın kemik özgül izoenziminin (BALP), tayini için agaroz elektroforezi, ısı ve kimyasal inaktivasyon, buğday tohumu aglütininin çöktürmesi, buğday tohumu aglütinin-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), immünoradyometrik analiz ve enzim immünolojik analiz gibi çeşitli metodolojik yaklaşımlar uygulanmaktadır (Behr ve Barnert, 1986 ; Crofton, 1992 ; Day ve diğerleri, 1992 ; Gonchoroff ve diğerleri 1991 ; Kuo ve Chen, 2017 ; Lombardi, 2025 ; Petit

Clerc, 1976 ; Schreiber ve Whitta, 1986 ; Štěpán ve diğerleri, 1976 ; Van Hoof ve diğerleri, 1988 ; Whiteaker ve diğerleri, 1977).

Kemik-spesifik alkalen fosfatazın enzim immünolojik analizinde tespit limiti 0,7 U/L olup, ortalama aktivite değerleri erkeklerde $24,9 \pm 7,0$ U/L, premenopozal kadınlarda ise $19,7 \pm 5,6$ U/L olarak bildirilmiştir (Gomez ve diğerleri, 1995). Osteoporotik bireylerde, özellikle 59 yaş üzeri kadınlarda BALP aktivitesi $66,4 \pm 8,7$ U/L düzeyinde ölçülmüştür. Rai AD ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, total ALP düzeylerinin postmenopozal kadınlarda (81 ± 6 U/L), premenopozal kadınlara (71 ± 23 U/L) kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, premenopozal kadınlarda BALP ortalama değeri (44 ± 24 U/L), postmenopozal kadınlara (27 ± 17 U/L) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, menopoz sonrasında BALP düzeylerinin yaşla birlikte artış gösterdiğini bildiren çeşitli çalışmalarla çelişmektedir. Seifert-Klauss ve arkadaşları, premenopozal, perimenopozal ve postmenopozal kadınlarda kemik kaybını değerlendirmek amacıyla yürüttükleri araştırmada, menopoz sonrası dönemde osteokalsin, kemik spesifik ALP ve tip I kollajenin C-terminal telopeptidleri gibi kemik dönüşüm belirteçlerinin anlamlı ölçüde yükseldiğini, ancak en belirgin artışın menopozal geçiş sürecinde gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Seifert-Klauss ve diğerleri, 2012). Bu nedenle menopozal geçiş döneminin yaklaşık 10 yıl boyunca devam ettiği ve bu süreçte trabeküler kemik kaybının hızlandığı sonucuna ulaşmışlardır. Dolayısıyla, Rai AD ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada premenopozal grupta gözlenen daha yüksek BALP düzeyleri, bu grubun ortalama yaşının menopozal geçiş dönemine daha yakın olmasına bağlanabilir (Rai AD ve diğerleri, 2021).

Osteokalsin (OC)

Kemik gama-karboksiglutamik asit içeren protein olarak da bilinen osteokalsin (OC), 49 amino asitten oluşan küçük bir proteindir. OC, olgun osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentezlenir. Ayrıca OC, insan vücudundaki toplam proteinin yaklaşık %2'sini oluşturan kemikteki en bol bulunan, kollajen olmayan proteindir.

Osteoblastlar tarafından üretilen OC, metabolik düzenleme, kemik mineralizasyonu ve kalsiyum iyon homeostazı için önemli bir rol oynar (Kuo ve Chen, 2017 ; Lee ve diğerleri, 2007). OC'nin, osteoporoz için kemik oluşumu ilaçlarıyla tedavi sırasında serum OC düzeyinin BMD artışıyla yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir. Serum OC, osteoporozda kemik oluşum hızının değerlendirilmesi için osteoblast fonksiyonunun özgül bir biyobelirteci olarak kabul edilmiştir. Birçok çalışma, osteokalsinin (OC) kemik oluşumu

üzerindeki farmakolojik etkinliğin değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteç olduğunu ortaya koymuştur. Örneğin, RNase ile zenginleştirilmiş laktoferrin (LF) takviyesi alan postmenopozal kadınlarda, OC'nin başlangıç düzeyine göre $7,2 \pm 2,8$ oranında artış gösterdiği ve bu durumun olumlu ve umut verici bir etki olarak değerlendirildiği bildirilmiştir (Bharadwaj ve diğerleri, 2009). Ayrıca, osteokalsin düzeylerinin postmenopozal osteoporotik kadınlarda ($16,16 \pm 4,5$ ng/mL) osteoporoz olmayan kontrollere ($11,26 \pm 3,07$ ng/mL) kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir (Singh ve diğerleri, 2015). Osteokalsin, kemik oluşumu biyobelirteci olarak kullanıldığında, doku özgüllüğü, geniş ölçüm erişilebilirliği ve düşük intra- ve inter-individual varyasyon gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Serum osteokalsinin, özellikle kadınlarda kemik yeniden şekillendirme sürecinin izlenmesi, osteoporoz tanısı ve yaşlı bireylerde kırık riskinin tahmin edilmesi açısından klinik değeri büyüktür.

Prokollajen tip I N-terminal propeptit (PINP)

Prokollajen Tip I N-terminal Propeptit (PINP), kemik oluşumunun biyokimyasal değerlendirilmesinde kullanılan özgül ve duyarlı bir biyobelirteçtir. Tip I kollajen, kemik organik matriksinin yaklaşık %90'ını oluşturur ve öncül formu olan prokollajen tip I, başlıca osteoblastlar ve fibroblastlar tarafından sentezlenir. Prokollajen, kollajene dönüşmeden önce, özgül proteazlar aracılığıyla N-terminal (PINP) ve C-terminal (P1CP) propeptitlerinden ayrılır. Bu ayrışma süreci, yeni kollajen liflerinin ekstrasellüler matrikse entegrasyonu sırasında gerçekleşir ve bu esnada PINP dolaşıma salınır. Bu nedenle, PINP düzeyleri, tip I kollajen sentez hızını ve dolayısıyla kemik matriksi oluşumunu doğrudan yansıtır (Justine ve diğerleri, 2025).

PINP dolaşımında genellikle trimerik yapı halinde bulunur; ancak, termal degradasyon gibi fiziksel etkilerle hızla monomerik formlara dönüşebilir. Trimerik PINP düzeyleri, enzim bağlantılı immünoabsorbtant analiz (ELISA) ve radyoimmünoassay (RIA) yöntemleri ile özgül olarak saptanabilmektedir.

Yakın zamanda gerçekleştirilen paratiroid hormon ve alendronat ile osteoporoz tedavisi çalışmasında, tedavi öncesi serum PINP düzeylerinin, osteoporoz tanısı konan postmenopozal kadınlarda, sağlıklı premenopozal kadınlara kıyasla %74 oranında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (ortalama $54,1$ µg/L). Bu bulgu, PINP'nin postmenopozal osteoporozda kemik oluşum hızını değerlendirmede duyarlı bir biyobelirteç olduğunu

göstermekte ve klinik uygulamalarda kullanım potansiyelini güçlendirmektedir (Garnero ve diğerleri, 2008).

Prokollajen tip I C-terminal propeptit (PICP)

Prokollajen Tip I C-terminal Propeptit (PICP), translasyon sonrası modifikasyonla mannoz açısından zengin karbohidrat yan zincirlerine sahip olan, yaklaşık 115 kDa molekül ağırlığında tek zincirli bir glikoproteindir. Dolaşıma salınan PICP, mannoza özgü reseptörler aracılığıyla karaciğerin endotel hücreleri tarafından hızla temizlenmekte olup, bu nedenle serumdaki yarı ömrü oldukça kısa (yaklaşık 6–8 dakika) olarak tanımlanmaktadır.

Yakın dönemde yapılan çalışmalar, serum PICP düzeylerinin, nandrolon dekanat ve kadın eşey hormonlarının kemik metabolizması üzerindeki etkilerini değerlendirmede kemik oluşumuna özgü bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Klinik bir örnek olarak, omurga kırığı olan postmenopozal kadınlarda ölçülen ortalama serum PICP düzeyi (97 ± 23 ng/mL), ön kol kırığı olan kadınlara kıyasla (116 ± 27 ng/mL) anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur (Hassager ve diğerleri, 1991 ; Kuo ve Chen, 2017) .

Günümüzde hem PINP hem de PICP, özgül immünolojik analiz yöntemleri (ELISA, RIA) ile güvenilir bir şekilde ölçülebilmektedir. Bununla birlikte, prokollajen tip I biyobelirteçleri arasında, PINP, klinik çalışmalar ve literatürde PICP'ye kıyasla daha kapsamlı biçimde araştırılmış ve daha sık tercih edilen bir belirteç haline gelmiştir. Yine de, bazı çalışmalarda serum PICP düzeyleri ile kemik oluşum hızı arasında kuvvetli korelasyonların bildirildiği ve bu belirtecin fizyolojik kemik yapımı sürecinin izlenmesinde değerli bilgiler sunduğu gösterilmiştir (Eriksen ve diğerleri, 1993).

2.4.2. Kemik yıkım biyobelirteçleri

Kemik yıkımına ilişkin biyokimyasal belirteçler, esas olarak kemik matriksinin %90'ından fazlasını oluşturan tip I kollajenin degradasyon ürünlerine dayanmaktadır. Bu belirteçler arasında en yaygın kullanılanlar; C-terminal telopeptit (CTX-I) ve N-terminal telopeptit (NTX-I) gibi kollajen yıkım ürünleridir. Bu moleküller osteoklastik aktivitenin bir sonucu olarak dolaşıma veya idrara salınır ve böylece kemik yıkım hızının dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilir (Lombardi, 2025 ; Seibel, 2005).

Başlangıçta bu belirteçlerin çoğu idrar örneklerinden tayin edilirken, biyolojik değişkenlik, örnekleme zorlukları ve günlük ritme bağlı dalgalanmalar nedeniyle son yıllarda serum bazlı

analizlere yönelim artmıştır (Lombardi, 2025 ; Szulc ve Delmas, 2008). Bununla birlikte, kollajen dışı proteinlere (tartarat dirençli asit fosfataz [TRACP 5b], kathepsin K) veya osteoklastlara özgü enzimatik aktivitelere dayalı belirteçler de geliştirilmiş olup, daha özgün ve kararlı ölçüm avantajları nedeniyle klinik ve araştırma uygulamalarında giderek daha fazla ilgi görmektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Kemik yıkımına ait biyobelirteçler

Grup/Aile	Önerilen Ad	Kullanılan Kısaltmalar	Önerilen Kısaltma	Önerilen Birim
Tip I Kollajen Çapraz-Bağlı Telopektitler	Tip I kollajenin N-terminal telopeptidi	NTX-I, NTX-1, NTx-I, NTx-1	NTX-I	µg/L (serum/plazma, idrar)
	Tip I kollajenin α-izomerize C-terminal telopeptidi	α-CTX-I, α-CTx-I, α-CTX-, α-CTx-, αCTX-I, αCTx-I, αCTX-, αCTx-, alfaCTX-I, alfaCTx-I, alfaCTX-, alfaCTx-	α-CTX-I (a-CTX-I)e	µg/L (serum/ plazma, idrar)
	Tip I kollajenin β-izomerize C-terminal telopeptidi	β-CTX-I, β-CTx-I, β-CTX-, β-CTx-, βCTX-I, βCTx-I, βCTX-, βCTx-, betaCTX-I, betaCTx-I, betaCTX-, betaCTx-, crosslaps, beta crosslaps	β-CTX-I (b-CTX-I)e	ng/L
	MMP'ler (matriks metalloproteinazlar) tarafından oluşturulan Tip I kollajenin C-terminal çapraz bağ telopeptidi	CTX-MMP, ICTP	CTX-I-MMP	µg/L
Asit Fosfataz	Asit fosfataz [UniProt: Tartarat'a dirençli asit fosfataz tip 5 – P13686]	ACP	ACP	U/L
	Tartarat'a dirençli asit fosfataz izoform 5b [UniProt: Tartarat'a dirençli asit fosfataz tip 5 – P13686]	TRACP5b, TRAP5b	TRACP5b	U/L
	Katepsin K [Uniprot: Katepsin K-P43235]	CTSK	CTSK	µg/L
Osteopontin	Osteopontin [UniProt: Osteopontin-P]	OPN, BSP-b, BNSPb, SPPb, Rich	OPN	ng/L

Hidroksiprolin (HYP)

Hidroksiprolin (HYP), translasyon sonrası modifikasyonla prolin kalıntılarının hidroksilasyonu sonucu oluşan bir amino asittir ve olgun tip I kollajenin amino asit içeriğinin yaklaşık %12–14'ünü oluşturur. Kemik matriksindeki tip I kollajenin katabolizması sırasında, HYP'nin yaklaşık %90'ı serbest formda açığa çıkar ve büyük ölçüde karaciğerde metabolize edilir (Lowry ve diğerleri, 1995 ; Kuo ve Chen, 2017). Klinik çalışmalarda, postmenopozal osteoporozlu kadınlarda idrar HYP düzeylerinin, osteoporoz tanısı olmayan postmenopozal kadınlara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu artış, kemik matriksinde kollajen yıkımının hızlandığını ve dolayısıyla kemik yıkımının arttığını düşündürmektedir (Jagtap ve Ganu, 2012).

Hidroksiprolin esas olarak kemik yıkımına yönelik bir biyobelirteç olarak değerlendirilmekle birlikte, dolaşımdaki HYP'nin yaklaşık %10'u, kemik oluşumu sürecinde yeni sentezlenen prokollajen peptitlerinden köken almaktadır. Buna ek olarak, HYP yalnızca kemik dokusuna özgü olmayıp, deri, kıkırdak, elastin ve komplement proteini C1q gibi diğer kollajen açısından zengin dokuların metabolizmasından da salınabilir. Bu nedenle, HYP, kemik metabolizmasına özgül olmayan bir kollajen dönüşüm belirteci olarak kabul edilmektedir (Prockop ve diğerleri, 1979).

Son yıllarda, HYP'nin düşük özgüllüğü ve sınırlı tanısal değeri nedeniyle, kemik yıkımının değerlendirilmesinde CTX-I ve NTX-I gibi daha özgül ve duyarlı biyobelirteçlerin tercih edildiği ve HYP kullanımının klinik rutinde giderek azaldığı bildirilmektedir (Delmas ve diğerleri, 2000).

Hidroksilizin (HYL)

Hidroksilizin (HYL), lizinin post-translasyonel hidroksilasyonu sonucu oluşan bir amino asittir ve kollajen yapısında önemli bir bileşendir. HYL, glikozilasyon derecesine bağlı olarak galaktozil-hidroksilizin (GHYL) ve glukozilgalaktozil-hidroksilizin (GGHYL) olmak üzere iki ana formda bulunur (Cunningham ve diğerleri, 1967 ; Kuo ve Chen, 2017). Bu iki form, kollajen degradasyonu sırasında dolaşıma salınmakta olup, kemik yıkımı ile ilişkili biyobelirteçler olarak değerlendirilmiştir. Özellikle GHYL, büyük oranda kemik kaynaklı olduğu için kemik metabolizmasına özgüllüğü daha yüksek bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Buna karşılık, GGHYL, cilt ve kompleman sistemi proteini C1q gibi diğer bağ dokularında da bulunabildiğinden, kemik özgüllüğü sınırlıdır.

Yapılan önceki çalışmalarda, idrar GHYL düzeylerinin, kırık geçmişi olmayan ve kırık öyküsü bulunan postmenopozal osteoporotik kadınlarda karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği ve kırık öyküsü olan bireylerde GHYL düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, kemik kollajen yapısında olası yapısal kusurların, GHYL düzeylerindeki artışla ilişkilendirilebileceğini ve GHYL'nin bu tür anormalliklerin biyokimyasal bir göstergesi olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (Cascio ve diğerleri, 1999).

Analitik açıdan GHYL, pre-analitik hidroliz işlemi gerektirmeksizin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile doğrudan ve güvenilir şekilde ölçülebilmektedir. Bu avantajına rağmen, GHYL'nin osteoporoz tanısında ve tedaviye yanıtın izlenmesinde klinik kullanım potansiyeli, halen sınırlı sayıda çalışmayla değerlendirildiğinden, rutin klinik uygulamalarda henüz yaygın olarak benimsenmemiştir (Bettica ve diğerleri, 1993). Ayrıca, GHYL için kolay erişilebilir ve standartlaştırılmış ölçüm yöntemlerinin eksikliği, bu biyobelirtecin yaygın klinik kullanımını kısıtlayan başlıca faktörlerden biridir.

Deoksipiridinolin (DPD)

Deoksipiridinolin (DPD), kollajen molekülleri arasında kovalent çapraz bağlar oluşturarak fibriler yapının mekanik kararlılığını sağlayan özgül bir bileşendir. Kemik yıkımı sırasında, bu çapraz bağlı kollajen yapılar proteolitik enzimler aracılığıyla parçalanır; bunun sonucunda açığa çıkan DPD, dolaşıma salınır ve daha sonra idrarla atılır. DPD, başlıca kemik ve dentin dokularında bulunması nedeniyle, kemik yıkımına özgül biyobelirteçler arasında yer alır.

Literatürde, DPD'nin idrarda hem serbest formda (%40) hem de peptide bağlı formda (%60) atıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle, özellikle HPLC ile yapılan kantitatif analizlerde, peptid bağlı DPD'nin ön işlem olarak hidroliz ve ekstraksiyonla serbest hale getirilmesi gerekmektedir. Bu işlemler, ölçüm doğruluğunu artırmakla birlikte, analitik süreci karmaşıktırmakta ve yöntemler arası geri kazanım değişkenliğine neden olabilmektedir (Bettica ve diğerleri, 1993 ; Kuo ve Chen, 2017).

Bu kısıtlamaları aşmak amacıyla geliştirilen kemilüminesans immünoassay (CLIA) ve enzim immunoassay (EIA) tabanlı yeni nesil yöntemler, idrarda serbest DPD düzeylerinin doğrudan ve daha pratik şekilde saptanmasına olanak tanımaktadır. Söz konusu immünolojik yöntemlerin sonuçları, HPLC analizleri ile yüksek düzeyde korelasyon gösterdiği için

güvenilir alternatifler olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, immünoassay tabanlı DPD tayin yöntemleri, osteoporoz ve diğer metabolik kemik hastalıklarının tanısı ve izleminde klinik uygulamaya uygun, duyarlı ve kolay erişilebilir biyokimyasal araçlar olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır (Kuo ve Chen, 2017 ; Robin ve diğerleri, 1994 ; Rosano ve diğerleri, 1998 ; Seyedin ve diğerleri, 1993).

Piridinolin (PYD)

Piridinolin (PYD), fibriler kollajenlerin ekstraselüler (hücre dışı) matürasyonu sırasında iki veya daha fazla kollajen molekülünü birbirine bağlayan, halkasal yapıdaki kuvvetli bir kovalent çapraz bağ bileşiğidir ve olgun kollajen liflerinin yıkımı sonucunda dolaşıma salınır. PYD, hem serbest hem de konjuge formlarda bulunabilir ve önceki çalışmalar, bu formların HPLC analizlerinde uzun süreli kimyasal kararlılık sergilediğini ortaya koymuştur. Ancak, PYD yalnızca kemik dokusunda sınırlı kalmayıp, aynı zamanda kıkırdak, bağ dokusu ve kan damarları gibi diğer kollajen içeriği yüksek dokularda da bulunur. Bu nedenle, PYD'nin biyokimyasal düzeyde kemik özgüllüğü, deoksipiridinoline (DPD) kıyasla daha düşüktür (Gerrits ve diğerleri, 1995).

Kemik sialoproteini (BSP)

Kemik sialoproteini, 60-80 kDa'lık görünür molekül ağırlığına sahip fosforile bir glikoproteindir. BSP, kemik, dentin, sement ve kalsifiye kıkırdak gibi mineralize dokuların bir elementidir. BSP, kemik ekstrasellüler matriksinin önemli bir bileşenidir ve kemik ve sementte bulunan tüm kollajen olmayan proteinlerin yaklaşık %8'inin oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (Fisher ve diğerleri, 1990 ; Kuo ve Chen, 2017). BSP, osteoblastlar, odontoblastlar ve osteoklastlar tarafından üretilir. Bu nedenle, BSP, hücre-matriks adezyon süreçlerinin düzenlenmesinde ve osteoklast aracılı kemik yıkımının uyarılmasında önemli bir düzenleyici faktör olarak kabul edilmektedir. Birçok çalışma, serumda BSP ölçümü için immünolojik analizler geliştirmiştir. Örneğin, radyoimmünokimyasal analiz ölçümleri, 90 sağlıklı kontrolden $12,1 \pm 5,0 \mu\text{g/L}$ ve Paget hastalığı olan hastalardan $32,3 \pm 17,3 \mu\text{g/L}$ ortalama serum BSP konsantrasyonları elde etmiştir (Karmatschek ve diğerleri, 1997). BSP'nin serum düzeylerinin osteoporoz hastalarında BALP ve OC ile anlamlı korelasyonu da gösterilmiştir. BSP, osteoporotik değerlendirme için bir kemik yıkım biyobelirteci olarak büyük potansiyel göstermiştir (Fassbender ve diğerleri, 1999).

Osteopontin (OP)

Osteopontin (OP veya SPP1), fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara sahip bir glikoprotein yapısında olan, çok yönlü (pleiotropik) bir matriks proteinidir. Bu protein; onkojenik transformasyon geçirmiş hücreler (kanserde olduğu gibi), makrofajlar, aktive edilmiş T lenfositleri, çeşitli epitel hücreleri ve kemik hücreleri (özellikle osteoblastlar ve osteositler) dahil olmak üzere farklı hücre tipleri tarafından sentezlenir (Kuo ve Chen, 2017 ; Zhang ve diğerleri, 1992). Osteoklastik aktivite, hücre adezyonu ve kemik yeniden şekillenme süreçlerinde rol oynayan OP, aynı zamanda çeşitli immünolojik ve inflamatuvar olaylarda da görev almaktadır. Son dönem çalışmalarda, osteopontin düzeylerinin aşırı ifadenmesinin, postmenopozal dönemdeki kadınlarda osteoporoz gelişimine karşı daha düşük direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, plazma OP düzeylerinin, menopozal osteoporozda aralıklı paratiroid hormonu (PTH) tedavisinin etkinliğini izlemeye yönelik potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Chiang ve diğerleri, 2011).

Tartarat dirençli asit fosfataz 5b (TRAP 5b)

Tartarat dirençli asit fosfataz 5b osteoklastlar tarafından kemik yıkım sürecinde salgılanan bir izoenzimdir ve bu özelliğiyle osteoklast sayısı ve aktivitesine ilişkin güvenilir bir biyokimyasal gösterge olarak kabul edilmektedir. Dolaşıma salınan TRAP 5b, karaciğerde metabolize edilir ve ardından idrar yoluyla atılır (Halleen ve diğerleri, 2000 ; Kuo ve Chen, 2017 ; Väänänen ve diğerleri, 2000). TRAP 5b, özgül immünolojik testler aracılığıyla serumda güvenle saptanabilmektedir. Literatürde, serum TRAP 5b düzeylerinin, meme kanseri hastalarında sınırlı ya da yaygın kemik metastazının tanımlanmasında kullanılabileceği gösterilmiştir (Chao ve diğerleri, 2005). Bunun yanı sıra, alendronat gibi antiresorptif tedavilere yanıtın izlenmesinde de TRAP 5b düzeylerinin etkili bir biyobelirteç olarak kullanılabildiği bildirilmiştir (Nenonen ve diğerleri, 2005). TRAP 5b, kemik yıkımına özgü biyobelirteçler arasında yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü ile öne çıkmakta, bu yönüyle klinik tanı ve tedavi takibinde değerli bir araç olarak değerlendirilmektedir.

Tip I kollajenin karboksi-terminal çapraz bağlı telopeptidi (CTX-I)

Tip I kollajenin telopeptitleri, kemik yıkımın biyokimyasal değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan belirteçlerdir ve bu kapsamda karboksi-terminal çapraz bağlı telopeptit (CTX-I) ile amino-terminal çapraz bağlı telopeptit (NTX-I) en çok araştırılan moleküller

arasında yer almaktadır. Her iki biyobelirteç de osteoklastik aktivite sonucu kollajen matriksinin degradasyonu sırasında dolaşıma salınır. CTX-I, tip I kollajenin $\alpha 1$ zincirindeki özgül bir oktapeptid dizisine (EKAHD- β -GGR) karşı geliştirilen monoklonal antikor kullanılarak, ELISA yöntemiyle kantitatif olarak ölçülmektedir. Güncel çalışmalar, CTX-I'in, postmenopozal osteoporoz tedavisinde sıklıkla uygulanan bifosfonatlara yanıtı hızlı ve duyarlı biçimde yansıtan, yüksek özgüllüğe sahip bir kemik yıkım biyobelirteci olduğunu ortaya koymuştur (Baim ve Miller, 2009 ; Kuo ve Chen, 2017). Bununla birlikte, serum CTX-I düzeyleri besin alımından önemli ölçüde etkilenmekte olup, bu nedenle kan örneklerinin açlık koşullarında alınması gerekmektedir. Bu özellik, CTX-I'in klinik uygulamalarda dikkatli yorumlanmasını zorunlu kılmakta ve ölçüm protokolünde standardizasyon ihtiyacını gündeme getirmektedir (Christgau, 2000).

Tip I kollajenin amino-terminal çapraz bağlı telopeptidi (NTX-I)

N-terminal telopeptit (NTX-I), idrar örneklerinde oda sıcaklığında 24 saate kadar kararlı kalabilen bir kemik yıkım biyobelirteci olup, genellikle ELISA yöntemi ile kantitatif olarak ölçülmektedir. İdrar NTX-I düzeyleri, özellikle postmenopozal kadınlarda osteoporotik kırık riskinin değerlendirilmesinde klinik olarak kullanılmıştır. NTX-I'in idrarda tespit edilebiliyor olması, besin alımından etkilenmemesi ve invaziv olmayan örnekleme avantajı sayesinde, pratik uygulamalar açısından serumda ölçülen CTX-I düzeylerine göre tercih edilebilirliğini arttırmıştır (Christgau, 2000 ; Kuo ve Chen, 2017). Bu özellikleri NTX-I'i, kemik yıkım hızının izlenmesinde ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde değerli bir biyobelirteç haline getirmektedir.

Katepsin K (CTSK)

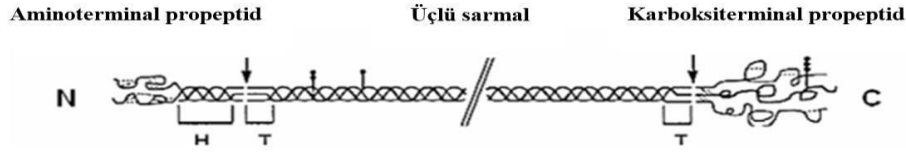
Katepsinler, 11 izoformu olan sistein proteaz ailesinin üyeleridir. CTSK, kininlere karşı yüksek özgüllüğü ile tanımlanır. CTSK, esas olarak aktif olarak yıkılan osteoklastların kıvrımlı sınırında ifade edilir (Kuo ve Chen, 2017 ; Pérez-Castrillón ve diğerleri, 2010). Osteoklastlar, tip 1 kollajen, osteopontin ve osteonektin dahil olmak üzere kemik matriks proteinlerinin bozunması için kemik yıkım defektine CTSK salgılar. Bu nedenle, CTSK kemik yıkımı sürecinde önemli bir faktördür. CTSK düzeyi, kontroller ve osteoporozlu hastalar arasında önemli ölçüde farklı olduğu ortaya çıkmıştır (Holzer ve diğerleri, 2005). Sonuç, serum CTSK düzeyinin kırık tahmini ve kemik mineral yoğunluğu için potansiyel bir biyobelirteç görevi görebileceğini göstermektedir.

2.5. Prokollajen Tip I N-terminal Propeptit (PINP)

2.5.1. Biyosentezi

Tip I prokollajen, iki α -zincirinden oluşan bir heterotrimerik yapıdır ve bu zincirlerin kodlandığı genler farklı kromozomlarda lokalizedir: *colla1* geni kromozom 17'de, *colla2* geni ise kromozom 7'de yer alır (Kamala ve Hijam, 2023 ; Koivula ve diğerleri, 2012 ; Risteli ve diğerleri, 2012 ; Risteli ve Risteli, 2006). Salgılanacak veya zar proteini kodlayan mRNA'ların translasyonu, oluşan sinyal dizisi aracılığıyla sinyal tanıma parçacığı tarafından ER zarına yönlendirilen, zara bağlı ribozomlar üzerinde gerçekleşir. Yeni sentezlenen pro- α -zincirleri endoplazmik retikulum (ER) lümenine taşınır ve burada bir dizi post-translasyonel modifikasyon işlemi gerçekleşir. Zincirlerin trimerik prokollajen molekülüne organizasyonu, karboksiterminal propeptid bölgeleri aracılığıyla başlatılır ve disülfid bağlarının oluşumu ile kararlı hale getirilir. Üçlü sarmal yapının (triple helix) oluşumu, molekülün ortasından amino ucuna doğru ilerler ve en son olarak N-terminal propeptid bölgesi doğal konformasyonunu kazanır. Üçlü sarmalın tamamlanması, ER'deki post-translasyonel modifikasyonların sonlanması tetikler. Bu modifikasyonlar arasında en kritik olanı, prolin kalıntılarının 4-hidroksiprolin haline hidroksilasyonudur; hidroksiprolin, hem ana kollajen zincirlerinde hem de N-terminal propeptid bölgesinin helikal kısmında, vücut sıcaklığında üçlü sarmal yapının kararlılığının korunması için zorunludur.

Tip I prokollajen molekülünün yapısal organizasyonu Şekil 2.5'te şematik olarak gösterilmiştir. Ekstrasellüler matrikse salındıktan sonra, özgül prokollajen peptidazlar aracılığıyla prokollajen molekülünün amino- ve karboksiterminal propeptid bölgeleri enzimatik olarak uzaklaştırılır. Özellikle, hacimli ve globüler yapıya sahip olan C-terminal propeptidin uzaklaştırılması, kollajen moleküllerinin düzgün şekilde hizalanarak fibriller halinde polimerize olabilmesi için zorunlu bir ön koşuldur. Buna karşın, daha lineer ve çubuk benzeri bir yapıya sahip olan N-terminal propeptid, kollajen fibrillerinin yüzeyine geçici olarak bağlı kalabilir. Ancak, fibrillerin kalınlaşma süreci ilerledikçe, bu N-terminal uzantılar da tamamıyla uzaklaştırılarak olgun (matür) kollajen fibril yapısı tamamlanmış olur (Koivula ve diğerleri 2012).



Şekil 2.5. Tip I prokollajen tipi molekülünün yapısı. Oklar, N-terminal (PINP) ve C-terminal (PICP) propeptitlerinin proteolitik bölünme bölgelerini gösterir.

Genellikle amino-terminal ve karboksiterminal propeptitler olarak adlandırılan ve sırasıyla PINP ve PICP olarak kısaltılan yapılar, her ne kadar "propeptid" olarak adlandırılırsalar da, yapısal olarak oldukça büyük ve kompleks protein molekülleridir. Bu iki propeptid birbirinden farklı protein yapısına sahip olmakla birlikte, tip I kollajenin biyosentezi sürecinde birbirleriyle ve olgun kollajen fibrilleriyle eş mol oranında üretilirler. Örneğin, tip I kollajen ifadenmesinin belirgin şekilde uyarıldığı akut fibroproliferatif süreçlerde, özellikle yara iyileşmesi sırasında ekstrasellüler matriks içerisinde hem PINP hem de PICP düzeylerinde eşzamanlı ve anlamlı bir artış gözlemlenmektedir (Chalikias ve Tziakas, 2015 ; Melkko ve diğerleri, 1996). Bu paralel artış, her iki propeptitin kollajen sentezinin dinamik biyobelirteçleri olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Tip I kollajen, molekül ağırlığı (MW) 300 kD, osteoblastlar tarafından prokollajen I adı verilen daha büyük bir öncü protein olarak sentezlenir ve yaklaşık 450 kD'lik bir MW'na sahiptir. Tip I prokollajenin karboksi-terminal ve amino-terminal propeptitleri, kollajen moleküllerinin ekstrasellüler matrikse dahil edilmesinden önce, fibril oluşumu süreci sırasında özgül enzimatik işlemlerle uzaklaştırılmaktadır. Bu proteolitik bölünme sonucunda, sırasıyla yaklaşık 100 kDa ve 35 kDa molekül ağırlığına sahip iki büyük uzantı peptidi olan PICP ve PINP oluşur. PICP, translasyon sonrası modifikasyonlarla yüksek oranda mannoz içeren karbohidrat yan zincirleriyle zenginleştirilmiş, disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmış üç alt birimden oluşan küresel yapıda bir glikoproteindir. Dolaşımdaki PICP başta olmak üzere, kollajen yıkım ürünlerinin kandan temizlenmesi, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri üzerinde yüksek oranda ifade edilen mannoz reseptörü aracılığıyla gerçekleştirilen spesifik bir reseptör aracılı endositoz mekanizması ile sağlanır.

Tip I kollajenin biyosentezi, başlıca fibroblastlar ve osteoblastlar tarafından gerçekleştirilir. Fibroblastlar tarafından sentezlenen tip I kollajen, özellikle yara iyileşmesi ve fibroproliferatif yanıtlar sırasında yoğun olarak üretilirken; osteoblast kaynaklı kollajen,

kemik matriksinin organik bileşeninin temelini oluşturmaktadır. Yetişkin bir bireyde, yıllık toplam kollajen üretimi yaklaşık 400-1200 gram arasında değişmektedir ve bu üretimin büyük çoğunluğunu tip I kollajen oluşturmaktadır. Bu süreçte, prokollajenin kollajene dönüşümü sırasında ortaya çıkan propeptidlerin toplamı yaklaşık 150–500 gramdır. Bu miktarın yaklaşık üçte birini PINP, geri kalanını ise PICP oluşturmaktadır. Bu biyolojik süreç, hem doku yeniden yapılanmasının hem de kemik metabolizmasının dolaylı göstergesi olan biyobelirteçlerin oluşumuna zemin hazırlamaktadır.

Tip I kollajenin alternatif bir moleküler formu olan homotrimerik tip I $\alpha 1$ kollajen, bazı patolojik dokularda tanımlanmıştır. Bu izoform, klasik heterotrimerik yapıdan farklı olarak, üç özdeş $\alpha 1(I)$ zincirinden oluşur ve meme kanseri dokuları, osteoartritli kemik bölgeleri ile plevral ya da asitli sıvı üreten lezyonlarda tespit edilmiştir (Bailey ve diğerleri, 2002 ; Makareeva ve diğerleri, 2010). Homotrimerik yapıya sahip PINP, örneğin plevral efüzyon örneklerinden izole edilebilmesine rağmen, mevcut immünolojik analiz yöntemleri PINP'nin homotrimerik ve heterotrimerik izoformlarını ayırt etme yeteneğine sahip değildir (Kauppila ve diğerleri, 2001). Bu durum, hastalık durumlarında izoform özgüllüğünün belirlenmesinde metodolojik bir sınırlılık oluşturmaktadır.

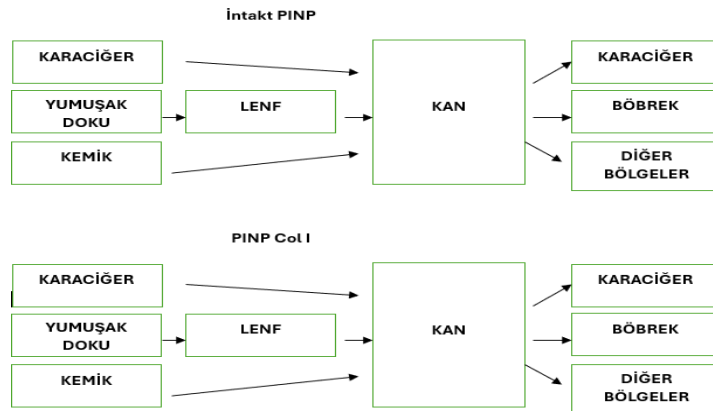
2.5.2. PINP'in özellikleri ve metabolizması

Tip I kollajen, insan vücudunda en yaygın bulunan fibriler kollajen tipi olup, kemik, tendon, deri ve diğer bağ dokularının yapısal bütünlüğünü sağlayan temel proteinlerden biridir. PINP ilk olarak amniyotik sıvıdan izole edilmiş ve "fetal antijen 2" olarak tanımlanmıştır (Koivula ve diğerleri, 2012 ; Risteli ve diğerleri, 2012 ; Risteli ve Risteli, 2006). Moleküler düzeyde yapılan analizlerde, PINP'nin yüksek molekül ağırlıklı (35000) bir peptid olduğu ve yapısal olarak bir heterotrimer formunda bulunduğu gösterilmiştir. Bu kollajen türü, iki adet 14250 Da moleküler ağırlığa sahip pro- $\alpha 1(I)$ ve bir adet 5500 Da'lık pro- $\alpha 2(I)$ polipeptid zincirinden oluşan bir heterotrimerik yapı sergilemektedir. Pro- $\alpha 1$ zincirinin yapısal olarak farklı üç alanı vardır: von Willebrand faktörünün C tekrarına benzeyen bir aminoterminal küresel alanı, kısa bir kollajen üçlü sarmalın merkezi alanı ve çok kısa bir C-terminal alanı. Pro- $\alpha 2$ zinciri, N-terminal küresel alanından yoksun olduğu için daha kısadır. En immünojenik kısım küresel alandır (Linkhart ve diğerleri, 1993).

Tip I kollajen osteoblastlarda sentezlenirken ve yıkım boşluğunda osteoid olarak biriktirilirken, N-terminal propeptidin salınımı biraz gecikebilir ve en geç osteoblast gelişiminin matriks olgunlaşma evresinde gerçekleşir. Kemikte serbest propeptid

muhtemelen doğrudan kana erişir. Kemik dönüşüm hızı, iskeletteki aktif kemik yeniden şekillendirme birimlerinin sayısı ile ilişkilidir ve bu da bireyler arasında geniş bir çeşitlilik gösterir. Bu, PINP dahil olmak üzere biyokimyasal kemik dönüşüm belirteçleri için referans aralıklarının geniş olma eğiliminde olması gerçeğiyle uyumludur.

Tip I kollajenin biyosentezine ilişkin süreçler hem kemik hem de yumuşak dokularda benzer mekanizmalarla gerçekleşmekle birlikte, dolaşımdaki karşılık gelen prokollajen propeptitlerinin (özellikle PINP ve PICP) konsantrasyonlarının büyük ölçüde kemik kaynaklı biyosentezden etkilendiği düşünülmektedir (Şekil 2.6). Bunun üç temel nedeni bulunmaktadır: Birincisi, Tip I kollajenin büyük çoğunluğu iskelet sisteminde yer almaktadır. İkincisi, iskelet dokusundaki kollajen dönüşüm hızı, yumuşak dokulara kıyasla daha yüksektir. Üçüncüsü, yumuşak doku kaynaklı PINP'nin dolaşıma geçişi genellikle doğrudan değil, lenfatik sistem aracılığıyla dolaylı yoldan gerçekleşmektedir (Jensen ve diğerleri, 1990 ; Kauppila ve diğerleri, 2001). Lenf akışındaki değişiklikler, yumuşak doku kollajen sentezinin bir belirteci olan PIIINP'de (tip III prokollajenin N-terminal propeptidi) büyük değişikliklere neden olmalarına rağmen, PICP'nin dolaşımdaki konsantrasyonunu tespit edilebilir şekilde etkilemez. Bu bulgu, yumuşak dokuların dolaşımdaki PINP konsantrasyonuna katkısının normalde oldukça küçük olduğunu göstermektedir (Jensen ve diğerleri, 1990 ; Ihlberg ve diğerleri, 1993). Bununla birlikte, tip I kollajen sentezi yumuşak dokularda kuvvetli bir şekilde artarsa, örneğin büyük bir cerrahi travmanın iyileşmesi sırasında, kandaki PINP'nin bu onarım fenomenini yansıtmaya beklenir. Bu gibi durumlarda, kemiklerdeki de dahil olmak üzere yapısal kollajen sentezi organizma için daha düşük bir önceliğe sahiptir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Çeşitli havuzlar arasındaki dağılımın ve sağlam PINP ve Col1 bölgesinin klerensinin şematik gösterimi. Kalın oklar ana yolları göstermektedir.

PINP Coll1, toplam PINP analizleri tarafından tanınan, pro α 1 zincirinin Coll1 bölgesiyle ilişkili, daha küçük, tek zincirli antijendir.

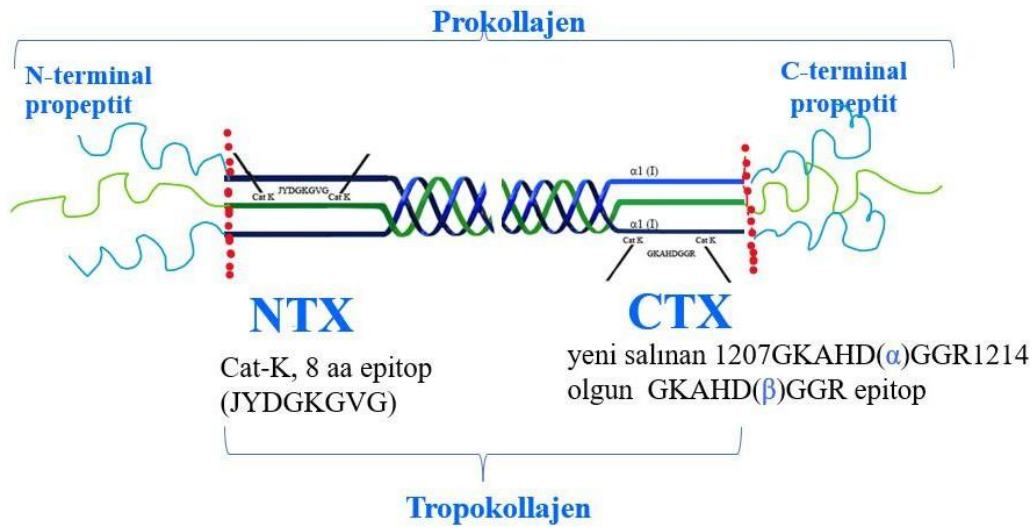
Tip I prokollajenin olgun kollajen formuna dönüşüm sürecinde serbestleşen N-terminal ve C-terminal propeptitler, birbirinden bağımsız proteinler gibi davranmakta ve farklı metabolik yollar aracılığıyla elimine edilmektedir. PINP, dolaşıma geçtikten sonra karaciğerdeki endotel hücreler üzerinde bulunan scavenger (süpürücü) reseptörler aracılığıyla hızla tanınmakta, bağlanmakta ve hücre içine alınmaktadır (Melkko ve diğerleri, 1994). İnsanlarda arteriyel ve hepatik venöz kan örnekleri karşılaştırıldığında, PINP'nin karaciğer ekstraksiyon oranının %11-%17 arasında değiştiği bildirilmiştir. Mevcut *in vitro* çalışmalar, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri tarafından endositoz yoluyla hücre içine alınan Propeptit Tip I N-terminali (PINP)'nin, hücre içi lizozomal ortamda antijenik determinantlarını (yapısal kimliğini) koruyarak, tamamen küçük peptitlere katabolize edilmediğini göstermektedir (Schytte ve diğerleri, 1999). Ayrıca, PICP'nin dolaşımdan uzaklaştırılması ise yüksek mannoz içeren oligosakkarit zincirlerini tanıyan farklı bir hücre yüzeyi reseptör grubu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu ayırt edici reseptör sistemleri, her iki propeptidin dolaşımdan elimine edilme süreçlerinde izledikleri özgül metabolik yolları yansıtmaktadır (Qvist ve diğerleri, 2006).

2.6. Tip I Kollajenin Karboksiterminal Çapraz Bağlı Telopektiti (CTX-1)

2.6.1. Biyosentezi

Tip I kollajen, kemik dokusunun ana fibriler proteinidir ve osteoblastlar tarafından sentezlenir. Kollajen biyosentezi endoplazmik retikulumda başlar; burada colla1 ve colla2 genleri tarafından kodlanan iki α 1(I) ve bir α 2(I) polipeptid zinciri bir araya gelerek triplet heliks oluşturur. Bu öncül molekül, prokollajen olarak adlandırılır ve N- ve C-terminal propeptid bölgeleri içerir. Prokollajen, golgi aygıtından geçerek hücre dışına salgılandıktan sonra propeptid bölgeleri proteolitik enzimler (prokollajen peptidazlar) tarafından uzaklaştırılır ve olgun kollajen molekülü oluşur. Bu olgun kollajen, dış ortamda fibril oluşumunu tamamlayarak ekstrasellüler matrikste çapraz bağlarla kararlı hale getirilir (Marian Schini ve diğerleri, 2023 ; Prockop ve Kivirikko, 1995). CTX-I (C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen), bu fibrillerin yıkımı sırasında osteoklastlar tarafından parçalanması sonucu ortaya çıkan bir peptidik parçadır (Şekil 2.7).

Bu çapraz bağlar genellikle piridinyum çapraz bağları, piridinolin ve deoksipiridinolindir. Çapraz bağlar heliksin 2 zinciri ile telopeptit bölgesinin 2 zinciri arasında oluşur. Telopeptit bölgesi kollajen molekülünün son kısmıdır; N-telopeptit ve C-telopeptit bölgeleri vardır. Heliks üzerinde bu tür çapraz bağlanmanın gerçekleştiği 2 yer vardır. Heliks üzerindeki 87. pozisyonda çapraz bağ C-telopeptit bölgesine bağlanır. Heliks üzerindeki 930. pozisyonda, çapraz bağ N-telopeptid bölgesine bağlanır (Calvo ve diğerleri, 1996 ; Marian Schini ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.7 CTX oluşumu (Dincel, 2012).

CTX ve NTX ilk oluştuğunda, amino asit dizisi doğrusaldır ve olağan alfa konfigürasyonundadır. Birkaç ay sonra, CTX beta-izomerizasyonuna uğrar, bu da aspartik asit kalıntısının alfa karbonuna başlangıçta bağlı olan peptid omurgasının (enzimatik olmayan bir şekilde) beta-karbona hareket ettiği anlamına gelir. Bu izomerizasyon NTX ile gerçekleşmez (Fledelius ve diğerleri, 1997 ; Marian Schini ve diğerleri, 2023) .

2.6.2. CTX-I'nin yapısal özellikleri

CTX-I (C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen), tip I kollajenin C-terminal telopeptit bölgesinden türeyen, kemik yıkımı sırasında osteoklast aktivitesiyle açığa çıkan, çapraz bağlı bir peptit parçasıdır. CTX-I epitopu, $\alpha 1(I)$ zincirinin C-terminal ucunda yer alan, genellikle 8 amino asitlik bir diziden oluşur: EKAHD- β -GGR. Bu dizide yer alan aspartil-glisin motifi, izomerizasyona ve rasemizasyona yatkındır ve kollajenin yaşlanma sürecini biyokimyasal olarak yansıtır (Eyre ve diğerleri, 2008; Garnero ve diğerleri, 2003).

CTX-I molekülü, post-translasyonel modifikasyonlara uğramış olgun kollajen liflerinin katepsin-K gibi lizozomal proteazlar aracılığıyla yıkılması sonucu oluşur. Özellikle osteoklastların oluşturduğu asidik yıkım lakünlerinde, kollajen çapraz bağları parçalanarak çözünür formlara ayrılır. CTX-I, bu sürecin doğrudan bir ürünüdür ve bu nedenle kemik yıkımının en özgül ve hassas bir biyobelirteci olarak değerlendirilir (Delmas ve diğerleri, 2000 ; Seibel, 2005).

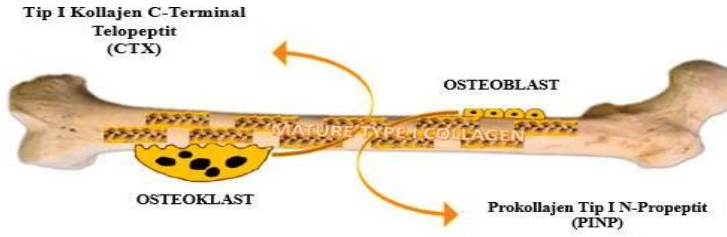
CTX-I'nin biyolojik izoformları, α CTX (yeni sentezlenmiş kollajenden) ve β -CTX (yaşlı, izomerize kollajenden) olmak üzere iki temel yapısal form içerir. Bu izoformlar, kemik dokusunun olgunluk durumuna ilişkin bilgi sağlar. Özellikle α/β oranı, dokunun ne kadar “genç” veya “olgun” olduğunu göstermekte kullanılır. İzofomların ayırt edilmesi, osteoporoz gibi kemik metabolizması bozukluklarında tanısal açıdan değer taşır. Ayrıca, α L- β L- β D ve α D gibi izoform kombinasyonları, kemik yıkım süreçlerinin detaylarını yansıtmak için kullanılabilir (Garnero ve diğerleri, 2003 ; Seibel, 2005).

2.6.3. Metabolizması

CTX-I dolaşıma salındıktan sonra, esasen plazma ve idrarda saptanabilir. Serumdaki düzeyi kısa süreli değişimlere duyarlıdır ve yarı ömrü birkaç saati geçmez, bu da CTX-I'yi tedavi yanıtlarını erken dönemde izlemek için uygun hale getirir (Eastell ve diğerleri, 2016). β CTX, serum ve idrarda tespit edilebilirken, α CTX genellikle idrarda ölçülür (Şekil 2.8).

CTX-I'nin metabolik kaderi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, dolaşıma girdikten sonra renal sekresyonla idrara atıldığı bilinmektedir. Böbrekler yoluyla glomerüler filtrasyona uğrayan CTX-I, idrarda serbest formda veya peptit bağlı olarak bulunabilir. Bu formlar genellikle toplam CTX-I düzeyiyle korelasyon gösterir. İdrar CTX-I, özellikle gıda alımından etkilenmemesi nedeniyle pratik ölçüm avantajı sağlar. Buna karşın, serum CTX-I düzeyi, yemek sonrası belirgin olarak düşer ve bu nedenle açlık durumunda alınan örneklerde değerlendirilmelidir (Delmas ve diğerleri, 2000 ; Vasikaran ve diğerleri, 2011).

CTX-I ayrıca kemik yıkımı ile doğrudan ilişkili olduğu için bifosfonat, denosumab ve teriparatid gibi anti-resorptif ve anabolik tedavilere yanıtı izlemek için kullanılmaktadır. Özellikle postmenopozal osteoporozda, serum CTX-I düzeyindeki hızlı düşüş, tedaviye etkin yanıtın erken bir göstergesidir (Eastell ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.8. Prokollajen tip I N propeptidinin ve tip I kollajenin C-terminal telopeptidinin dolaşıma salgılanmasını gösteren şematik gösterimi.

2.7. Sensörler

Sensör, fiziksel bir niceliği girdi olarak kabul eden ve bu girdiyi işlevsel olarak bağlantılı bir çıktıya dönüştüren bir cihaz olarak tanımlanır. Bu çıktı, çoğunlukla insan kullanıcılar veya elektronik sistemler tarafından algılanabilir veya okunabilen elektriksel veya optik bir sinyal biçimindedir. Sensörler ve onlara entegre edilmiş ara yüzler, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerin, bileşiklerin sıcaklık, pH, kuvvet, koku, basınç, özgül kimyasalların varlığı, akış, pozisyon ve ışık şiddeti gibi özelliklerin saptanması ve ölçülmesi amacıyla yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Ensafi ve Kazemzadeh, 1999 ; Zhu ve diğerleri, 2018 ; Selvolini ve Giovanna, 2023).

Bir sensörün temel özellikleri, (1) yalnızca ölçülmek istenen kimyasal veya fiziksel parametreye seçici olarak duyarlı olması ve uygulama sırasında karşılaşılabilecek diğer değişkenlere karşı minimum düzeyde hassasiyet sergilemesi, (2) çalışırken, girdi olarak alınan kimyasal veya fiziksel büyüklüğün özelliklerini değiştirmemesi şeklinde belirlenmektedir. Sensörün duyarlılığı, ölçülen kimyasal veya fiziksel parametredeki değişime bağlı olarak çıktı değerinde meydana gelen değişim miktarını ifade eder. Sensör seçimi, seçicilik (Fraden, 2004), duyarlılık, doğruluk, kalibrasyon aralığı, çözünürlük, maliyet etkinliği ve tekrarlanabilirlik gibi temel parametrelere ek olarak, sensörün çalıştırılacağı çevresel koşullar dikkate alınarak gerçekleştirilmelidir (Ensafi ve diğerleri, 2011; Grandke ve Ko, 2008 ; Gründler, 2007 ; Selvolini ve Giovanna, 2023 ; Vetelino ve Reghu, 2010).

2.7.1. Sensörlerin sınıflandırılması

Ölçümü amaçlanan hedef madde veya analitin niteliklerine göre sensörler genel şekliyle fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Fiziksel sensörler, sıcaklık,

basınç, manyetik alan, kuvvet, absorpsiyon, kırılma indisi, iletkenlik ve kütle değişimi gibi fiziksel parametreleri algılayan ve/veya ölçen cihazlardır (Gründler, 2007). Bu tür sensörler, herhangi bir kimyasal ara yüzey içermemekte sadece fiziksel değişkenlere tepki vermektedir.

Kimyasal sensörler ise özgül bir analite karşı seçici bir yanıt ortaya koyan kimyasal olarak aktif bir tabakaya sahiptir (Janata, 2009 ; Selvolini ve Giovanna, 2023). Bu sensörler, analitin kimyasal tepkimelerinden veya incelenen sistemin fiziksel özelliklerinden elde edilen kimyasal bilgiyi değerlendirmekte olup, belirli bir bileşenin konsantrasyonu ya da bileşim analizi gibi parametreleri tayin etmektedir. Kimyasal sensörler, analiz edilen sistemin kimyasal özelliklerine bağlı olarak iletkenlik değişimi, ışık, voltaj, akım veya ses gibi analitik sinyallere dönüştürülebilen veriler sunabilmektedir.

Kimyasal sensörler, sahip oldukları yüksek seçicilik, duyarlılık ve hızlı tepkime süresi gibi avantajlar dolayısıyla, günümüzde ticari olarak erişilebilir sensörler arasında önemli bir yer edinmiştir. Klinik, endüstriyel, çevresel ve tarımsal uygulamalar başta olmak üzere geniş bir uygulama alanına sahip olup, özellikle biyomedikal ve farmasötik analizlerde sıklıkla tercih edilmektedir.

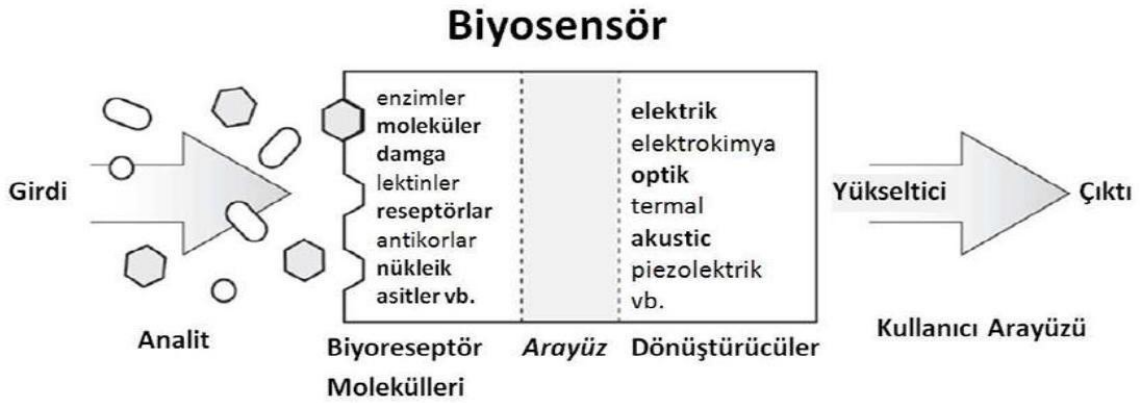
2.8. Biyosensörler

Biyosensörlerin temel yapısal unsuru, bir biyolojik tanıma bileşeni (biyoreseptör), bir fizikokimyasal dedektör ve bir dönüştürücünün bileşiminden oluşmaktadır (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Buerk, 1993). Biyosensörlerde biyoreseptör işlevini gören biyomoleküller—antikorlar, aptamerler, enzimler, nükleik asitler veya hücreler—özgül bir hedef analiti tanıma veya tespit etme yeteneğine sahiptir. Bu sensörler, biyoreseptörün hedef analit ile seçici etkileşim kurma potansiyeline bağlı olarak yüksek bir seçicilik düzeyi sergilemektedir (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Buerk, 1993 ; Nemiwal ve diğerleri, 2022). Özellikle, bu biyotanıma mekanizması, diğer bileşenlerin sinyallerinin biyosensör tarafından üretilen özgün sinyale müdahalesini önleyerek analitik ölçümlerin doğruluğunu arttırmaktadır. Tanıma olayının gerçekleşmesinin ardından, biyoreseptör tarafından algılanan biyokimyasal değişimler, bir dönüştürücü aracılığıyla ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmektedir (Tüylek, 2017).

Biyosensörlerin kararlılığı, biyoreseptörün dönüştürücü yüzeyine immobilizasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Söz konusu immobilizasyon süreci, geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz yöntemler aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Kullanılan immobilizasyon

teknikleri; yüzey adsorpsiyonu, kovalent bağlanma, çapraz bağlama, hapsolma (mikroküreler veya lifler içerisinde), biyobağlanma ve şelasyon veya metal bağlanması şeklinde sınıflandırılmaktadır. Uygun stratejinin seçimi, numune matriksi, hedef analitin niteliği, istenilen seçicilik, işlem zorluğu ve yöntem kapsamı gibi kriterlere bağlıdır (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Buerk, 1995 ; Nemiwal ve diğerleri, 2022).

Biyosensörlerde dönüştürücü, biyokimyasal bir tanıma olayının neden olduğu fiziksel değişimi kantitatif bir sinyale dönüştüren esansiyel bir bileşen olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç, literatürde "sinyalizasyon" olarak adlandırılmaktadır. Dönüştürücüler; optik, elektrokimyasal, kuvars kristal piezoelektrik, kalorimetrik (tepkiye sırasında açığa çıkan veya absorbe edilen ısı) ve termal olmak üzere farklı kategorilere ayrılmaktadır (Karunakaran ve diğerleri, 2015). Bununla birlikte, biyosensörlerde en sık kullanılan dönüştürücüler, optik veya elektrokimyasal sinyaller üreten sistemlerdir, çünkü bu yöntemler analit-biyoreseptör etkileşimlerinin yüksek bir hassasiyetle tespit edilmesine olanak tanımaktadır. Biyosensörlerin temel bileşenlerini gösteren şematik diyagram Şekil 2.9'de sunulmaktadır.



Şekil 2.9. Biyosensörleri oluşturan bileşenler

2.8.1. Biyosensörlerin tarihçesi ve gelişimi

Clark ve Lyons (1962), 1962 yılında ilk biyosensörü geliştirmiştir. Bu sensör, tanıma elemanı olarak glukoz oksidaz (GOx) enzimini kullanan amperometrik bir oksijen elektrokimyasal sensörü olup glukozun tespiti amacıyla tasarlanmıştır. "Biyosensör" terimi ise ilk kez Rechnitz ve arkadaşları (1977) tarafından, tanıma elemanı olarak canlı

organizmaları kullanan arginin seçici elektrot için önerilen "biyoselektif sensör" ifadesinin kısaltılmış hali olarak literatüre kazandırılmıştır (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Juska ve Pemble, 2020).

Biyosensörler, analitik ve tanısal uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bularak önemli bir ilgi odağı haline gelmiştir. Günümüzde kullanılan diğer algılama yöntemlerine kıyasla üstün bir performans sergilemeleri nedeniyle popülerite kazanmışlardır. Çalışma prensiplerinin basit olması, düşük maliyetleri ve özel teknik bilgi gerektirmemeleri, biyosensörlerin gündelik kullanıma uygun bir nitelik kazanmasını sağlamıştır. Bu avantajlar, diyabet ve kardiyak hastalıkların kişisel takibi, adli tıp ve ilaç keşfi, tarımsal ve çevresel analiz sistemleri, gıda endüstrisi ve biyolojik savunma gibi geniş bir uygulama spektrumuna sahip olmalarına olanak vermektedir (Scott, 1998). Bununla birlikte, biyosensörlerin ticari anlamda daha fazla yaygınlaşması, seçicilik, hassasiyet, kararlılık, tekrarlanabilirlik ve taşınabilirlik gibi özelliklerin iyileştirilmesine ve bunun düşük maliyetle sağlanmasına bağlıdır (Bhalla ve diğerleri, 2016).

Biyosensörlerde farklı transdüser tabanlı sinyal çıktıları kullanılmaktadır ve bu sinyaller arasında optik (absorbsiyon, lüminesans, kemilüminesans ve yüzey plazmon rezonansı) (Ligler ve Tait, 2008), kütle bazlı (piezoelektrik ve manyetoelektrik) (Steinem ve Janshoff, 2007), termometrik (Zhou ve diğerleri, 2013) ve elektrokimyasal (Cosnier, 2013) yöntemler öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımlar arasında elektrokimyasal biyosensörler, ekonomik olmaları, kullanıcı dostu yapıları, taşınabilir ve minyatürize edilebilen dayanıklı sistemlerin geliştirilmesine olanak tanımaları nedeniyle özel bir önem taşımaktadır. Ayrıca elektrot potansiyeli, akım, yük transfer direnci veya kapasitans değişimlerini analit konsantrasyonu ile ilişkilendirme kabiliyetleri sayesinde yüksek hassasiyetle algılama ve izleme imkânı sunmakta, bu da onların geniş bir ticari uygulama alanına uyarlanabilmesini sağlamaktadır (Ensafi ve diğerleri, 2014).

2.9. Elektrokimyasal Biyosensörler: Tanım ve Uygulama Teknikleri

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC), elektrokimyasal biyosensörleri, biyolojik tanıma bileşeninin (biyokimyasal reseptör) bir elektrokimyasal dönüştürücü ile doğrudan temas halinde bulunduğu, bağımsız ve entegre bir cihaz olarak tanımlamaktadır. Bu sensörler, hedef analite ilişkin nicel veya yarı-nicel analitik bilgi sağlayabilmekte olup, biyolojik tanıma bileşeninin elektrokimyasal dönüştürücü aracılığıyla saptadığı değişimleri ölçmektedir (Thévenot ve diğerleri, 1999 ; www.iupac.org).

Elektrokimyasal biyosensörlerde, çeşitli tespit yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında amperometri, potansiyometri, voltametri, kronoamperometri, kronokoulometri ve alan etkili transistörler (FET) gibi teknikler bulunmaktadır. Ek olarak, elektrokimyasal empedans spektroskopisi, yüzey plazmon rezonansı, elipsometri, dalga kılavuzu temelli metotlar ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile elektrokimyasal ölçümlerin eş zamanlı kombinasyonu gibi ileri düzey teknikler de uygulanmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan bir diğer önemli yöntem ise elektrokimyasal kuvars kristal mikroterazisi (QCM)'dir.

Bu tespit yöntemlerinin her biri, özgül analitik ihtiyaçları karşılamak üzere farklı faydalar sunmakta olup, hassasiyet, seçicilik, doğruluk ve tayin sınırları gibi faktörlere bağlı olarak farklı uygulamalarda tercih edilmektedir.

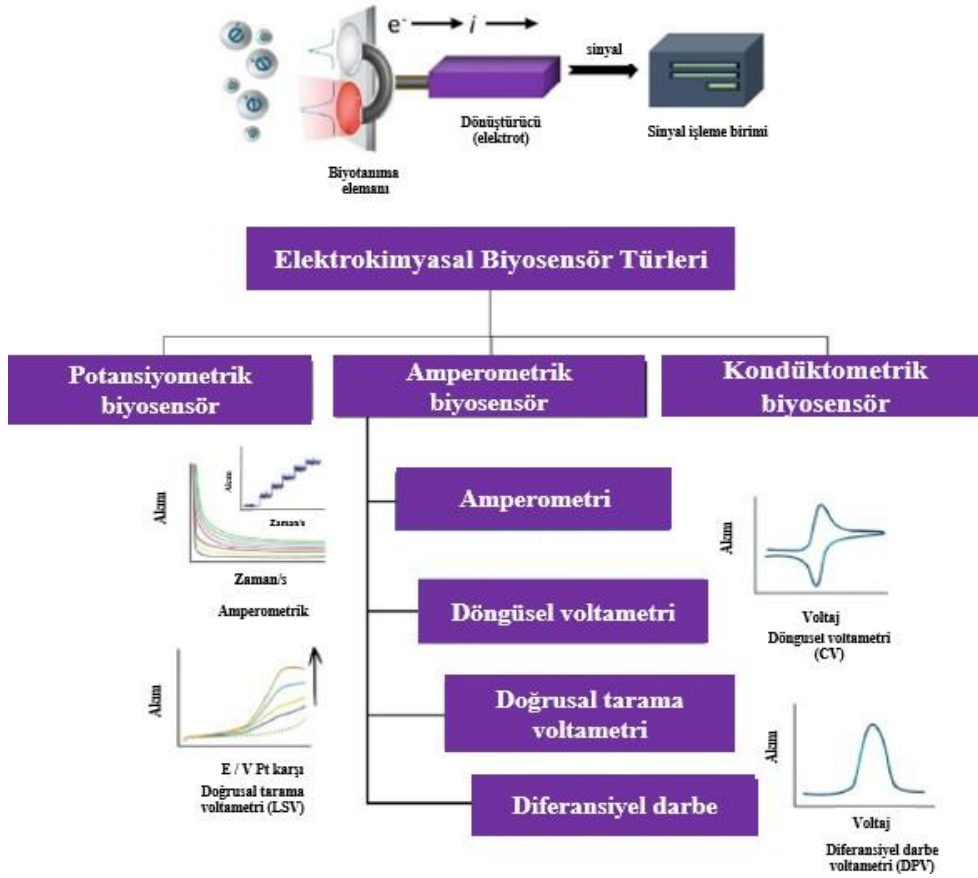
2.9.1. Elektrokimyasal biyosensörlerin türleri ve temel bileşenleri

Potansiyometrik biyosensörler, özellikle klinik ortamlarda glukoz gibi analitlerin tayini açısından kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, bu sensörler yalnızca tıp alanında değil; endüstri, gıda güvenliği, çevre izleme ve halk sağlığı gibi farklı disiplinlerde de geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Potansiyometrik biyosensörler alanındaki son gelişmeler, yeni araştırmacılara mevcut sensör türlerine ilişkin kapsamlı bir genel bakış sunarken, deneyimli uygulayıcılar için de güncel trendler ve yenilikler hakkında özlü fakat derinlemesine bir değerlendirme sağlamaktadır. Bu eğilimler arasında nanomalzemelerin, grafen tabanlı yapıların ve yeni immobilizasyon stratejilerinin kullanımı ön plana çıkmakta; ayrıca saha veya ev ortamlarında kullanılabilecek küçük boyutlu, esnek ve kendi kendine enerji üretebilen cihazların geliştirilmesine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır.

Bununla birlikte, potansiyometrik biyosensörler; girişim etkileri, karıştırıcı değişkenler ve karmaşık analitik ortamlarda sınırlı performans gibi çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Ayrıca, bu yaklaşımlar elektrot özellikleri ve elektrokimyasal prensipler hakkında ileri düzey bilgi gerektirdiğinden, klinik uygulamadaki yaygın kullanımını kısıtlayabilmektedir. Gelecekte sensör tasarımında gerçekleştirilecek yenilikler ve disiplinler arası işbirlikleri, söz konusu sınırlılıkların aşılmasına katkı sağlayarak potansiyometrik biyosensörlerin tıbbi tanı ve kişiselleştirilmiş tıptaki potansiyelini daha etkin bir şekilde ortaya çıkarabilecektir. Bu çerçevede, mevcut kısıtlamaların ve engellerin farkına varılması, bu teknolojilerin geniş çaplı benimsenmesi ve uygulanması açısından kritik bir öneme sahiptir.

Amperometrik sensörler, analit konsantrasyonuna bağlı olarak sabit bir potansiyel altında gerçekleşen redoks tepkimelerinin ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.10). Enzimler, yüksek tepkime hızları, seçicilikleri ve immobilizasyon açısından uygunlukları nedeniyle biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, doğal enzimlerin protein temelli yapılarından kaynaklanan belirli dezavantajları mevcuttur. Bu sınırlılıkların aşılabilmesi için, enzim benzeri katalitik özelliklere sahip nanomalzemeler olan nanozimler geliştirilmiştir (Tong ve diğerleri, 2023).

Liu ve arkadaşları, tükürük analitlerinin tespitine yönelik olarak dil basacağı ve diş ipi tabanlı yeni amperometrik biyosensörler geliştirmiştir. Bu çalışma ile ilk kez bir diş bakım aracına entegre edilmiş amperometrik biyosensör üretimi ortaya konmuştur. Glukoz, hem tükürükte bulunması hem de biyosensör araştırmalarında sıklıkla kullanılan tipik bir analit olması nedeniyle sensörün model analiti olarak seçilmiştir. Ayrıca, glukozun enzimatik yolla oksidasyonu sonucu ortaya çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2), tükürükte de doğal olarak bulunabilen bir yan ürün olarak değerlendirilmiştir. Söz konusu bulgular umut verici olmakla birlikte, sensör üretim tekniklerinin optimize edilmesi, kablosuz iletişim için baskılı devre kartı (PCB) veya mikroçiplerle entegrasyonun sağlanması ve algılama performansının gerçek ağız içi koşullar ile ilişkisini daha iyi anlamaya yönelik ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.10. Elektrokimyasal biyosensörlerin türleri ve genel mekanizmaları (Tong ve diğerleri, 2023)

Kondüktometrik biyosensörler, sahip oldukları çok sayıda avantaj nedeniyle biyosensör teknolojileri arasında önemli bir yere sahiptir. Öncelikle, referans elektroda ihtiyaç duymamaları önemli bir pratik kolaylık sağlamaktadır. Ayrıca, düşük genlikli alternatif voltajda çalışmaları elektrot yüzeyinde Faraday süreçlerinin oluşumunu engelleyerek ölçümlerde güvenilirliği artırmaktadır. Bunun yanı sıra, ışığa duysız olmaları ve düşük maliyetli ince film teknolojisi ile kolaylıkla minyatürleştirilip farklı sistemlere entegre edilebilmeleri bu sensörlerin öne çıkan özellikleri arasında yer almaktadır. Berketa ve arkadaşları, analitik performansı artırmak amacıyla monoenzim oksidaz tabanlı bir biyosensöre ek bir enzim ilavesinin uygulanabilirliğini araştırmış ve bu yaklaşımın oksidaz esaslı kondüktometrik enzim biyosensörlerinin optimizasyonunda etkili bir yöntem sunduğunu göstermiştir (Berketa ve diğerleri, 2023).

Biyosensörlerin temel bileşenlerinden biri olan elektrot, biyomoleküllerin (enzimler, antikorlar, nükleik asitler vb.) immobilizasyonu ve elektron transferinin sağlanması açısından kritik bir rol üstlenmektedir. Genel olarak bir biyosensör, elektrokimyasal bir dönüştürücü ile biyotanıma elemanlarının (enzimler, antikorlar ve nükleik asitler) entegrasyonuna dayalı olarak tasarlanmaktadır.

2.9.2. Elektrokimyasal biyosensörlerin özellikleri

Biyosensörlerin performansı ve verimliliği, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından belirlenen yönergeler doğrultusunda, özgül teknik ve fonksiyonel özellikler çerçevesinde değerlendirilmektedir (Thévenot ve diğerleri, 1999). Bir biyosensörün, farklı uygulama alanlarında verimli ve uygun bir şekilde işlev görebilmesi, sensörün dönüştürücü tipi ve numune karakterizasyonu gibi faktörlerin yanı sıra, sensörün performansını tayin eden çeşitli parametrelere de bağlıdır. Bu parametreler arasında, doğrusal dinamik aralık, hassasiyet, tespit sınırı, seçicilik, tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik, doğruluk, yanıt süresi, iyileşme süresi, depolama koşulları ve dayanıklılık gibi faktörler ön plana çıkmaktadır. Bu parametrelerin her biri, biyosensörün genel işlevselliğini ve güvenilirliğini doğrudan etkileyen önemli kriterlerdir (Bhalla ve diğerleri, 2016).

Doğrusallık

Bir sensörün doğrusallığı, kalibrasyon eğrisinin ne kadar düz bir doğruya yakın olduğuna göre belirlenir; diğer bir ifade ile, sistemin doğrusallığı, kalibrasyon eğrisinin bir doğruya olan benzerliği ile ölçülür.

Doğrusal dinamik aralık

Bir sistemde incelenen maddenin konsantrasyonunun belirlenmesi, biyosensörün test numunesinde ölçebileceği maksimum ve minimum değerlerin kesin bir şekilde bilinmesine dayanır. Bu sınırlar tespit edildikten sonra, bu verilere dayalı olarak bir kalibrasyon grafiği oluşturulur ve bu grafik aracılığıyla, test numunelerindeki analit konsantrasyonları, interpolasyon yöntemi ile tayin edilebilir. Kalibrasyon grafiği, biyosensörün analit konsantrasyonunu doğrusal bir şekilde ölçebilmesini sağlar.

Hassasiyet

Hassasiyet, analitik tekniklerde kalibrasyon grafiğinin eğimi olarak tanımlanabilirken, analitik hassasiyet, kalibrasyon grafiğinin eğiminin standart sapmaya bölünmesiyle

hesaplanır (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Skoog ve diğerleri, 2014). Basit bir ifadeyle hassasiyet, bir cihazın algılayabildiği en küçük konsantrasyon veya miktar farkını ifade eder. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal bölgesi, daha hassas sonuçların elde edilmesinde genellikle tercih edilir ve bu bölgedeki ölçümler, doğruluk ve güvenilirlik açısından daha yüksek bir güvence sağlar.

Tespit sınırı (Limit of Detection - LOD)

Bir maddenin varlığını, yokluğundan (kör değer) ayıran eşik miktar, belirli bir güven düzeyine dayalı olarak tespit sınırı olarak tanımlanır. Diğer bir ifade ile, tespit sınırı, bir biyosensörün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde saptayabileceği en düşük analit konsantrasyonunu belirler ve bu, sensörün yeterli sinyal-gürültü oranına sahip olması koşuluyla mümkündür (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Skoog ve diğerleri, 2014). Tespit sınırı (LOD), genellikle, temel gürültü seviyesinin (kör numune standart sapması) üç katının (3σ) sensörün eğim duyarlılığı (hassasiyet/analitik duyarlılık) değerine (m) bölünmesiyle hesaplanır ve bu, analitik performansın kritik bir parametresidir. Düşük sinyal-gürültü oranı, tespit sınırını kısıtlayabilse de, sensörün hassasiyetini artırabilir.

Seçicilik

Bir sensörün, potansiyel olarak interferans oluşturabilecek türlerden kaynaklanabilecek hatalı sonuçları önleme yeteneği, o sensörün seçiciliği olarak tanımlanır. Seçicilik, alternatif bir ifadeyle, bir reaktörün iki veya daha fazla substrat arasında ya da aynı substrat üzerindeki farklı pozisyonlar arasında ayırım yapabilme potansiyeli olarak da ifade edilebilir. Biyosensör seçiciliği, analiz edilen madde, kullanılan dönüştürücü ve çözeltinin pH değeri olmak üzere üç temel faktörden etkilenir. Örneğin, antikor ve enzim temelli dönüştürücüler genellikle tek bir analite özgülken, mikroorganizmalar gibi biyomoleküller daha düşük bir özgüllük sergiler (Bhalla ve diğerleri, 2016 ; Skoog ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, antikor ve enzim bazlı biyosensörler daha yaygın bir kullanım alanına sahipken, mikroorganizmalar gibi biyomoleküllerin kullanımı daha sınırlıdır.

Bununla birlikte, biyosensörlerin yanıtları, interferans oluşturan bileşiklerin varlığı ile artırılabilir veya azaltılabilir. Yapısal ve/veya kimyasal açıdan analiz edilen maddeye benzer olan interferans türleri, genellikle biyosensör sinyalini yükseltirken; immobilize edilmiş biyokatalizöre karşı inhibisyon etkisi gösteren bileşikler, genellikle algılama elektrotunun yanıtında belirgin bir düşüşe neden olur.

Yanıt ve iyileşme zamanı

Yanıt süresi, bir biyosensörün laboratuvar ölçeğinden endüstriyel ölçeğe taşınabilme kapasitesini belirleyen kritik bir parametredir. Yanıt süresine etki eden faktörler arasında örneğin sıcaklık ve numune konsantrasyonu; biyoreseptörün kalınlığı, geometrisi ve geçirgenliği; ayrıca analiz karışımının karıştırma hızı bulunmaktadır. Uygulamada, iki tür yanıt süresi birbirinden ayırt edilir: denge durumu yanıt süresi ve geçici yanıt süresi. Denge durumu yanıt süresi, yanıt sinyalinin sabit durum değerinin %95'ine ulaşması için gereken zaman dilimi olarak tanımlanırken; geçici yanıt süresi, yanıt sinyalinin türevine ulaşması için gereken zaman dilimi olarak tanımlanır. Hızlı bir yanıt süresi, gerçek zamanlı veya sürekli izleme uygulamaları için önemlidir.

İyileşme zamanı ise, iki ardışık ölçüm arasında gereken minimum zaman aralığını ifade eder. Bu süre, biyoreseptörün türü, kalınlığı, geçirgenliği ve analit konsantrasyonu gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir.

Dayanıklılık

Biyosensörlerin analitik performans değerlendirmesinde, özgüllük, hassasiyet, doğruluk ve tekrar edilebilirlik gibi temel parametrelerin yanı sıra dayanıklılık (ruggedness) da önemli bir kalite kriteridir. Dayanıklılık, bir biyosensörün küçük fiziksel (sıcaklık, titreşim, nem vb.) veya elektriksel (gerilim değişimleri, sinyal gürültüsü vb.) değişkenliklere karşı duyarlılığını yitirmeden, kalibrasyon sapması göstermeden çalışabilme kapasitesini ifade eder. Bu özellik, özellikle saha koşullarında ya da farklı laboratuvar ortamlarında tutarlı ve güvenilir veri elde edebilmek açısından kritik öneme sahiptir.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Bir algılama sisteminin, değişen ölçüm koşulları altında aynı sonuçları verme yeteneği tekrarlanabilirlik olarak tanımlanır. Tekrar üretilebilirlik, belirli bir zaman dilimi içinde aynı girişlerin tekrarlanması sonucu elde edilen çıktının tutarlılığını ifade eder. Yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik, biyosensörlerin güvenilirliğini artırırken, sistemin performansını da iyileştirir (Miller ve Miller, 2000).

Doğruluk

Bir algılama sistemi, doğruluğu, ölçümün doğruluğunun, referans bir ölçümle doğrulanabilmesiyle değerlendirilir. Doğruluk, biyosensörün bir standart ölçüm ile

karşılaştırılması veya daha hassas bir sistemle karşılaştırılması yoluyla doğrulanabilir. Bu özellik, biyosensörlerin uygulamalarında güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlar (Miller ve Miller, 2000).

Depolama ve çalışma kararlılığı

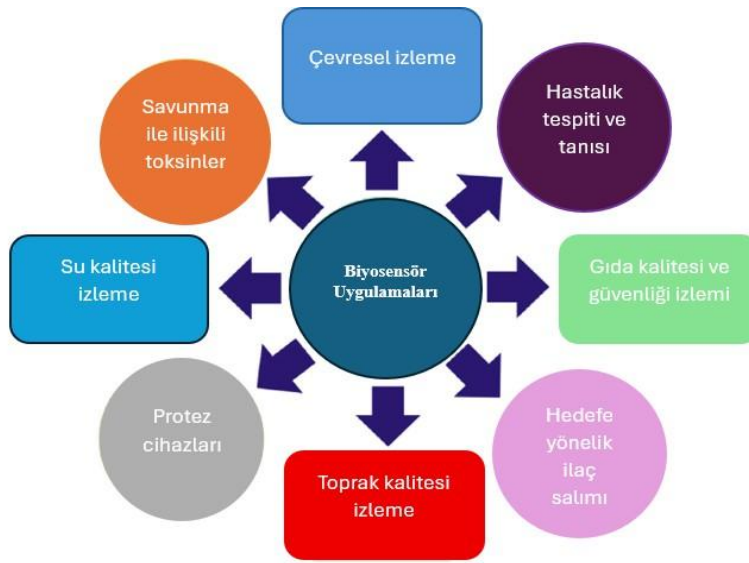
Kararlılık, biyosensörün zaman içerisindeki temel değer değişikliklerini veya hassasiyetindeki sapmaları ifade eden bir ölçüttür. Ticari değere sahip biyosensörler, zaman içinde kabul edilebilir bir kararlılığa sahip olup, yüksek hassasiyet ve seçicilik sunar. Biyosensör kararlılığı, çalışma ve depolama kararlılığı olmak üzere iki farklı şekilde ele alınabilir. Çalışma kararlılığı, sıcaklık, pH, organik çözücüler ve biyoreseptör immobilizasyonu gibi faktörlerden etkilenir. Depolama kararlılığı ise, biyosensörün depolama koşulları (kuru ya da nemli ortamda), kullanılan tamponun bileşimi, pH değeri ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. .

Sonuç olarak, ideal bir biyosensör, yüksek seçicilik, hassasiyet, tekrarlanabilirlik, güvenilirlik ve kararlılığa sahip olmalı, nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere karşı düşük bir duyarlılık göstermeli, kolay kalibrasyona ve kullanıma imkan tanımalı, dayanıklı ve uzun ömürlü olmalı, taşınabilir ve kısa tepkime süresi ile iyileşme süresine sahip olmalıdır.

2.10. Biyosensör Uygulamaları

Elektrokimyasal yöntemlerle tespit edilebilen elektroaktif analitleri kapsayan ve yüksek doğruluk, kesinlik, duyarlılık ile seçicilik gerektiren çok sayıda araştırma problemi, bu özellikleri karşılayabilen çözümler talep etmektedir. Bu bağlamda, söz konusu problemlerin çözümünde kullanılan yöntemler, genel olarak elektroanalitik teknikler olarak adlandırılmaktadır.

Biyosensörler, çok çeşitli alanlarda geniş bir kullanım alanına sahip olup, bu alanlar arasında point-of-care tanı yöntemleri, genetik hastalıkların (kanser, diyabet gibi) teşhisi, biyolojik numunelerde analitlerin tespiti ve değerlendirilmesi, çevresel izleme, ilaç keşfi, toprak kalitesinin izlenmesi, su yönetimi ve gıda kalite kontrolü gibi önemli uygulama alanları bulunmaktadır (Bhalla ve diğerleri ,2016 ; Karunakaran ve diğerleri, 2015) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Biyosensörlerin farklı alanlardaki uygulamaları.

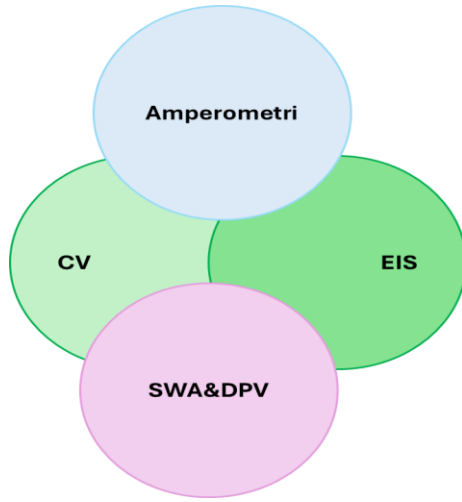
Elektrokimyasal bazlı transdüksiyon sistemleri genellikle sağlamlıkları, uygulama kolaylıkları, taşınabilirlikleri ve düşük maliyetleri ile karakterize edilirler. Elektrokimyasal biyosensörlerde elektrotlarda kullanılan malzemeler arasında camsı karbon, karbon macunu, grafit kompozitler, karbon/grafit formülasyonları, karbon nanotüpler, grafen ve altın gibi malzemeler yer almaktadır. Hem laboratuvar hem de ticari ölçekte kolay ve tekrarlanabilir üretimleri sayesinde, serigrafi baskılı elektrotlar (SPE'ler) ölçüm elemanı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Taleat ve diğerleri, 2014). Fonksiyonelleştirilmiş veya fonksiyonelleştirilmemiş çeşitli SPE türleri artık ticari olarak mevcuttur (Gwent Group Ltd), birçok laboratuvarın ise kendi tesislerinde üretim yapma olanağı bulunmaktadır. Ancak, yalnızca elektrotun konfigürasyonu ve kullanılan malzemeler değil, aynı zamanda biyoreseptörün elektrot yüzeyinde sabitlenmesi de hayati önem taşımaktadır.

2.11. Biyosensör Uygulamalarında Elektrokimyasal Tespit Teknikleri

2.11.1. Elektrokimyasal tespit teknikleri

Döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), Şekil 2.12’de gösterildiği gibi, son on yılda elektrokimyasal biyosensörlerde en yaygın kullanılan teknikler olarak ortaya çıkmıştır. Bu, CV'nin basitliği ve elektrokimyasal tepkimeler hakkında sağlayabileceği bilgi zenginliği ve EIS'nin elektrot-çözelti arayüzünün kantitatif karakterizasyonundaki kullanışlılığı ile ilişkilendirilebilir. Bir diğer faktör ise, hem EIS donanım özellikleri hem de elde edilen spektrumların verimli bir şekilde uygulanması için

yazılım araçları sunan ucuz bilgisayar kontrollü potansiyostatların yaygın olarak bulunabilmesidir. Bunları amperometri ve darbe voltametrisi teknikleri - diferansiyel darbe voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) yakından takip eder. Bir diğer ilginç nokta ise, örtüşme örneğinde görüldüğü gibi, birden fazla tekniğin genellikle bir arada kullanılmasıdır.



Şekil 2.12. Son 10 yılda (1 Ocak 2015-1 Ocak 2025) biyosensör yayınlarında görülen yaygın elektrokimyasal tekniklerin göreceli sıklığını gösteren orantılı Venn diyagramı.

Venn diyagramı oluşturulurken derlemeler hariç tutulmuştur. Örtüşmeler, iki veya daha fazla tekniğin kullanıldığı makaleleri temsil eder; SWV&DPV ile Amperometri arasındaki örtüşme yaklaşık %20'dir ancak geometrik nedenlerden dolayı gösterilmemiştir.

Yukarıda belirtilen en yaygın teknikler, uygulanan farklı voltajlar altında akımın ölçülmesini içerdiğinden, deneysel verilerin doğru yorumlanması için Faradaik ve Faradaik olmayan tepkilerin ayrımı esastır (Biesheuvel ve diğerleri, 2021). Bir Faradaik süreç genellikle elektrot/elektrolit arayüzü boyunca yük transferiyle ilişkilidir. Bu bağlamda, Faradaik akım gerçek elektrokimyasal reaksiyonları temsil eder ve elde edilen i - V eğrisi (polarizasyon eğrisi), tepkime ve kütle transfer kinetiğinin belirli bir etkileşimiyle ilişkilendirilebilir. Diğer yandan, Faradaik olmayan bir süreç, elektrot ve çözelti tarafından oluşturulan bir kapasitörün şarj edilmesini temsil eder ve yüklü türlerin redoks durumlarını değiştirmeden arayüzde biriktiği tüm süreçlerin (çift katmanlı kapasitif tepki ve adsorpsiyon gibi) katkılarını içerir. Bu nedenle, Faradaik olmayan süreçler cihaz boyunca sürekli doğru akım sağlayamaz, bunun yerine elektrot potansiyeli her değiştiğinde geçici bir akım ortaya çıkmasına neden

olur. Faradayik olmayan süreçler σ -V eğrisi (yüzey yükü - uygulanan voltaj) ile daha iyi tanımlanır.

Amperometrik yöntem

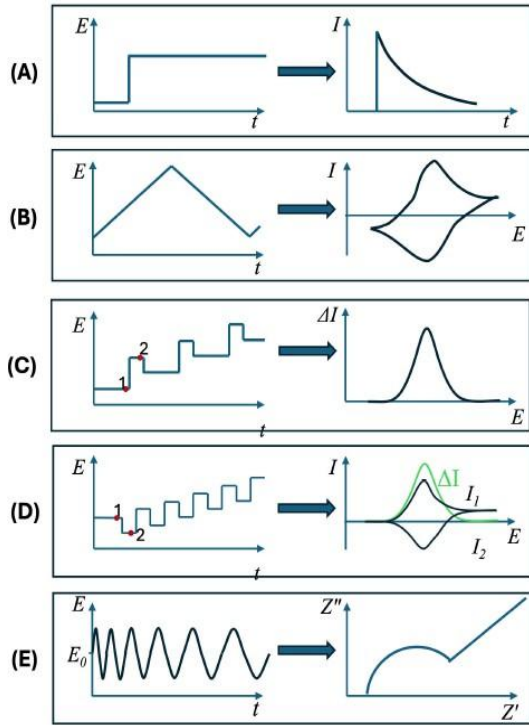
Amperometrik sensörler genellikle, WE potansiyelinin, elektrokimyasal tepkimenin gerçekleşmediği bir değerden elektrot yüzeyindeki elektroaktif konsantrasyonunun sıfıra düştüğü bir değere yükseltilmesi ile ortaya çıkan akımın ölçülmesine dayanan kronoamperometriyi (Şekil 2.13) kullanır (Wang, 2006). Potansiyel adımı kaçınılmaz olarak Faradayik olmayan bir akım tepkisi oluştursa da, çözelti direnci ve çift katmanlı kapasitans tarafından tanımlanan karakteristik zamanla ($\tau = RS \cdot Cdl$) üssel olarak azalır ve bu süre genellikle bir milisaniyenin altındadır. Bu nedenle, elde edilen i - t eğrisinin ilk yaklaşık 100 ms'sini atlamak, Faradayik olmayan katkıyı dışlamak ve kalan eğriyi Cottrell denkleminde uydurmak için genellikle yeterlidir. Çoğu amaç için, Cottrell denklemindeki akımın genliğinin, herhangi bir zamandaki ilgili elektroaktif türlerin kütle konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu gerçeğini kullanmak ve örneğin, ölçülen akımın belirli bir zaman aralığında ortalamasını almak yeterlidir (Pedersen ve diğerleri, 2023). Amperometri, enzimatik ve enzimatik olarak etiketlenmiş biyosensörlerde sinyal okuması için yaygın olarak kullanılır. Bu durumda, tipik olarak, aynı elektroaktif türler hem enzimatik redoks işleminde hem de elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal işlemlerde rol oynar. Ölçülen elektrokimyasal akım, elektroaktif türlerin konsantrasyonunu veya sabitse, immobilize edilmiş enzim miktarını belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca, bir sensörde yüksek hassasiyet elde etmek için, elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal tepkimenin hızlı kinetiğini sağlamanın önemli olduğu unutulmamalıdır. Çoğu durumda, bu, elektrotun indirgenmiş GO, metal NP'ler ve CNT'ler gibi nanomalzemelerle modifiye edilmesiyle elde edilebilir. Kronoamperometri, lakkaz veya tirozinaz enzimleri kullanılarak katekol ve diğer fenolik bileşikler ölçmek için kullanılırken (Vlamiadis ve diğerleri, 2017), kolesterol, kolesterol oksidaz ve kolesterol esterase kullanılarak ölçülmüştür (Li ve diğerleri, 2019). HRP, şarap ve çeşitli biyobelirteçlerdeki *Brettanomyces bruxellensis* maya hücrelerinin konsantrasyonlarını ölçmek için ilgili antikorlarla birlikte bir etiket olarak kullanılmıştır (Villalonga ve diğerleri, 2019 ; Pedersen ve diğerleri, 2023). Amperometrik sensörlerin önemli bir avantajı, sensör tasarımı, ölçüm protokolü ve donanım uygulaması açısından basitliklerinin yanı sıra mükemmel hassasiyetleridir. Bu, onları kişisel glikoz sensörleri için tercih edilen yöntem haline getirir (Saha ve diğerleri, 2023). Diğer yandan, yöntem aynı potansiyel aralığında yükseltgenebilen

veya indirgenebilen bileşiklerden ve yüzey bozulmasından kaynaklanan girişime eğilimlidir ve bu da ölçülen akımı sınırlayabilir.

Döngüsel voltametri (CV)

Döngüsel voltametri (CV) (Şekil 2.13), üçgen bir dalga formu kullanılarak çalışma elektrodu (WE) potansiyelinin doğrusal taranmasını içerir (Elgrishi ve diğerleri 2018 ; Wang, 2006). Bu teknik, elektrokimyasal tepkime hakkında zengin bilgi sağlar; tepkimenin resmi potansiyeli, elektroaktif türlerin konsantrasyonu, tepkimenin geri döndürülebilirliği ve kinetik parametreleri, elektroaktif türlerin indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlardaki kararlılığı vb. ve yalnızca sensör çalışması için değil, aynı zamanda karakterizasyon ve optimizasyon amaçları için de kullanılır.

Elektrokimyasal biyosensörler üzerine yapılan çalışmaların çoğu, Şekil 2.13'den de görülebileceği gibi, CV ölçümlerini diğer yöntemlerle birlikte içermektedir. Amperometrik sensörlerle karşılaştırıldığında, birden fazla elektroaktif bileşenin mevcut olması durumunda CV ile farklı potansiyellerdeki bazı özellikler gözlemlenebilir. Ancak bu, küçük tepe noktalarının tespit edilmesine ve tepe akımlarının ve tepe konumlarının doğru bir şekilde belirlenmesine dayanır. Bunun için elde edilen CV eğrilerinde Faradayik ve Faradayik olmayan akımların ayrılması esastır; bu genellikle arka plan eğiminin çıkarılmasıyla elde edilir. Ancak bu işlem hassastır ve özellikle yüksek tarama hızlarında hem tepe akımında hem de pozisyonda önemli belirsizlik yaratabilir. Bu nedenle, temel bileşen analizi, kısmi en küçük kareler regresyonu ve yapay sinir ağları gibi modern hesaplamalı işleme yöntemleri, CV'yi çay, amino asit karışımları veya bira gibi karmaşık çok bileşenli sistemlerin analizi için tercih edilen bir yöntem haline getirmektedir (Liu ve diğerleri, 2014 ; Roselló ve diğerleri, 2020).



(A) Kronoamperometri; (B) döngüsel voltametri; (C) diferansiyel darbe voltametrisi (DPV); (D) kare dalga voltametrisi (SWV); (E) elektrokimyasal empedans spektroskopisi. Sol paneller giriş modülasyonunu; sağ paneller ise elde edilen sinyallerin şematik bir temsilini göstermektedir. Kırmızı noktalar, DPV ve SWV yöntemlerinde I_1 ve I_2 akımlarının ölçüldüğü noktaları göstermektedir; ΔI , akımlar arasındaki farkı ifade eder.

Şekil 2.13. Elektrokimyasal biyosensörlerde yaygın ölçüm teknikleri (Liu ve diğerleri, 2014 ; Roselló ve diğerleri, 2020).

Diferansiyel darbe voltametrisi (DPV) ve Kare dalga voltametrisi (SWV)

DPV ve SWV (Şekil 2.13), darbeli voltametrik tekniklerin en sık kullanılan üyeleridir. Bu tekniklerin genel fikri, voltajın küçük adımlarla değiştirilmesi ve akım ölçümlerinin voltaj adımından sonra genellikle yaklaşık 50 ms'lik belirli bir gecikmeyle gerçekleştirilmesidir. Bu şekilde, çift katmanlı kapasitörün şarj edilmesiyle ilgili faradayik olmayan (şarj) akımlar büyük ölçüde bastırılır. Ayrıca, hem DPV hem de SWV'de akım, ileri ve geri darbe cephelerinden sonra iki kez ölçülür ve bu da şarj akımlarının daha da güçlü bir şekilde bastırılmasıyla diferansiyel bir ölçüme yol açar. Yöntem, söz konusu analitin indirgenmesi/yükseltgenmesi doğrudan veya bir redoks probuna uygulanabilir. İkinci durumda, analitin bağlanması üzerine yüzey özelliklerinde meydana gelen değişiklikler ölçülür. Liu ve arkadaşları, nokta-üzeri-tanı (PoC) ortamına uygun olarak tükürükteki kortizolün tespiti için bu yaklaşımı kullanarak bir sensör geliştirmişlerdir. Çalışmada, ferro-/ferrisiyanür redoks probu eşliğinde diferansiyel puls voltametrisi (DPV), anti-kortizol antikoru ile fonksiyonlandırılmış AuNP/MoS₂/AuNP tabakasıyla modifiye edilmiş karbon esaslı tek kullanımlık ekran baskılı elektrot (SPE) üzerindeki değişimleri izlemek amacıyla uygulanmıştır. Bu yöntem, SPE elektrotlu taşınabilir ve akıllı telefon tabanlı bir sistemle

dahi kullanıldığında, nM altı düzeylerde kortizol için düşük bir tespit limiti (LOD) sağlamıştır (Liu ve diğerleri, 2014). Analitlerin doğrudan elektrooksidasyonuna ilişkin bir örnek ise Sakthivel ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. Yazarlar, askorbik asit, dopamin ve ürik asit karışımı için yüzlerce nM düzeyinde LOD değerleri elde etmiş ve her bir bileşene karşılık gelen iyi tanımlanmış DPV tepeleri raporlamışlardır (Sakthivel ve diğerleri, 2024). Akım ölçümüne dayalı diğer tekniklerde olduğu gibi, daha yüksek çözünürlük ve düşük LOD elde edebilmek için hem elektrokimyasal tepkime hızının hem de elektrot yüzey alanının artırılması gereklidir. Bu amaçla, ticari olarak temin edilebilen bir karbon SPE üzerine altın nanoparçacıkları (AuNP) ile dekore edilmiş karbonize elektrodeğirilmiş nanolifler biriktirilmiş ve böylece performans iyileştirilmiştir.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) (Şekil 2.12), küçük genlikli sinüzoidal bir uyarı uygulanarak ve uyarılan akım, genlik ve faz ölçülerek gerçekleştirilir (Wang, 2006 ; Wang ve diğerleri 2021). Buna dayanarak, karmaşık empedans hesaplanır ve bu, genellikle empedansın sanal (Z'') ve gerçek (Z') kısımlarının sırasıyla dikey ve yatay eksenler boyunca çizildiği Nyquist grafiği olarak çizilir. Bu grafikten eşdeğer bir elektrik devresi oluşturulabilir. Faradayik ve Faradayik olmayan akımların ayrılması açısından, bu, tekniğin önemli bir avantajını temsil eder; çünkü farklı fiziksel olaylarla ilgili çeşitli kapasitif ve rezistif katkılar: elektrot-çözelti arayüzünde çift katman, yük transferi, difüzyon, adsorpsiyon ve kaçak kapasitanslar devre bileşenlerine atanabilir ve ayrı ayrı belirlenebilir. Bu nedenle EIS, CV ile birlikte elektrot yüzeyini ve modifikasyon/immobilizasyon prosedürlerini karakterize etmek için rutin bir yöntem haline gelmiştir.

Tipik olarak, EIS ölçümleri elektrot-çözelti arayüzü boyunca gerçekleştirilir, çözeltiye iyi karakterize edilmiş bir redoks probu (ferro-/ferrisiyanür veya ferrosen) eklenir ve deney probun formal potansiyeline yakın bir noktada gerçekleştirilir. Bu yaklaşım, Bahner ve arkadaşları tarafından gösterilen doksorubisin tespiti için aptamer tabanlı empedans biyosensöründe uygulanmıştır. Yazarlar, doksorubisinin aptamer tabakasına bağlanması üzerine ferro-/ferrisiyanür redoks probu için yük transfer direncinde bir artış ölçmüşlerdir (Bahner ve diğerleri, 2018). Sensör, 31 nM ile 125 nM arasındaki doksorubisin konsantrasyon aralığında ve 28 nM'lik LOD'da doğrusal davranış göstermiştir. Diğer yandan, EIS ölçümleri iç içe geçmiş elektrot parmakları arasındaki düzlemsel bir geometride

de gerçekleştirilebilir. Bu yaklaşımın yakın tarihli bir uygulaması Panagopoulou ve arkadaşları tarafından raporlanmıştır. Çalışmada, iyonların varlığında daha küçük fragmanlara ayrılan DNAzimler kullanılarak Pb^{+3} ve Cr^{+3} iyonlarının tespiti gerçekleştirilmiştir. DNAzimler, mikrofabiike edilmiş altın iç içe geçmiş elektrotların üzerine biriktirilmiş platin nanoparçacık (PtNP) filmi üzerine immobilize edilmiştir. Analit iyonlarına maruz bırakılan sistemde, Pb^{+3} ve Cr^{+3} iyonları için sırasıyla 0,8 nM ve 10 nM düzeyinde tespit limitleri (LOD) elde edilmiş ve bu süreç elektrotlar arası empedans artışı ile doğrulanmıştır (Panagopoulou ve diğerleri, 2024).

2.12. Elektrokimyasal Biyosensörler için Yüzey İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyolojik türlerin biyolojik veya biyokimyasal süreçlerde niceliksel ve niteliksel olarak belirlenmesi, tıp, eczacılık, gıda, çevre ve biyoteknoloji gibi alanlarda büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle biyosensörlerin geliştirilmesi her zaman ilgi çekici ve popüler bir araştırma konusudur. Genel olarak biyosensörler, seçici bir analit ara yüzü veya bir biyoreseptör ile bir transdüserden oluşur.

Biyoreseptör, hedef analit molekülüne özgül olarak bağlanan veya onu tanıyan biyolojik veya biyomimetik bir materyaldir. Transdüser ise, bu etkileşimi algılanabilir bir analitik sinyale dönüştürür. Hedef analit mevcut olduğunda, biyoreseptör ile analit arasındaki etkileşim, transdüser aracılığıyla sinyal üretimi ve amplifikasyonunu tetiklemektedir.

Biyosensör geliştirmede kullanılan biyotanıma elemanları arasında proteinler (enzimler, antikorlar), nükleik asitler (DNA, RNA), tüm hücreler veya hücresel bileşenler bulunur. Biyotanıma elemanlarına göre biyosensörler; enzim bazlı biyosensörler, antikor bazlı biyosensörler, afinite bazlı biyosensörler, nükleik asit biyosensörleri ve tüm hücre biyosensörleri olarak sınıflandırılır.

Kullanılan transdüserle ilgili olarak ise biyosensörler; optik biyosensörler, piezoelektrik biyosensörler, iyon duyarlı biyosensörler, kalorimetrik biyosensörler ve elektrokimyasal biyosensörler olarak kategorize edilir. Bu sınıflandırmalar arasında elektrokimyasal biyosensörler, düşük üretim maliyeti, yüksek duyarlılık ve kullanım kolaylığı gibi avantajları nedeniyle öne çıkmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal tekniklerin analitik gücünü biyoreseptörlerin özgüllüğü ile birleştirir.

Tespit mekanizması, biyotanıma elemanı ile analit arasındaki etkileşim sırasında elektron gibi elektrokimyasal türlerin tüketilmesi veya üretilmesi ve bunun sonucunda

elektrokimyasal bir sinyal oluşmasına dayanır. Bu sinyal, elektrokimyasal transdüser tarafından algılanır. Elektrokimyasal biyosensörler bulanık ortamlarda çalışabilir, yüksek duyarlılığa sahiptir, minyatürleştirmeye daha uygun olmakta ve en yaygın kullanılan biyosensör sınıfını oluşturmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörlerde, hedef moleküllerin niceliksel ve niteliksel bilgileri voltaj veya akım şeklinde elde edilir. Bu prensibe göre biyosensörler; potansiyometrik biyosensörler (voltaj ölçen) veya amperometrik biyosensörler (akım ölçen) olarak sınıflandırılır. Analit konsantrasyonu, bilinen konsantrasyonlardaki çözeltilere karşılık gelen ölçülen akım ile biyosensörün kalibre edilmesi yoluyla belirlenir.

2.12.1. Yüzey immobilizasyonunun gerekliliği

Tüm elektrokimyasal biyosensörler, elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyolojik etkileşimi tespit etmeye dayanır. Sensörün hassasiyeti, kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği, özgüllüğü ve maliyeti, biyotanıma elemanının özelliklerine ve onun erişilebilirliği/reaktivitesine bağlıdır. Elektrokimyasal biyosensörlerin işlevsel mekanizması göz önüne alındığında, elektrot yüzeyinin uygun şekilde modifiye edilmesi performans açısından kritik bir faktördür.

Yüzey modifikasyonu, biyoreseptörlerin uygun şekilde immobilizasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sinyal-gürültü oranını iyileştirerek hassasiyeti artırır. Daha da önemlisi, yüzeyin fonksiyonelleştirilmesi, analitin veya diğer bileşenlerin istenmeyen özgül olmayan bağlanmasını azaltmaya yardımcı olur. Ayrıca, biyomoleküllerin yüzeydeki konformasyonu, biyosensörün hassasiyetini ve seçiciliğini belirlemede önemli bir rol oynar. Başka bir ifade ile, biyosensör performansı büyük ölçüde yüzey modifikasyonunda kullanılan malzemelere ve biyoreseptörlerin immobilizasyonunda uygulanan yüzey kimyası veya fonksiyonelleştirme yöntemine bağlıdır.

Elektrokimyasal biyosensörlerde biyomoleküllerin immobilizasyonu için kullanılan çeşitli elektrot yüzeyleri arasında silikon, cam, altın, karbon nanotüpler (CNT), iletken polimerler ve grafen bulunmaktadır. Literatürde farklı yüzey modifikasyon stratejileri mevcuttur ve her bir modifikasyon yöntemi biyosensör performansını farklı şekilde etkileyebilir. Uygulanan immobilizasyon yöntemi, kullanılan alt tabakaya göre değişiklik göstermektedir.

Özgöl-özgül olmayan bağlanma

Biyomedikal sensörlerde en kritik parametrelerden biri, hedef analite karşı gösterilen özgülüktür. Reseptör–analit etkileşimi “özgül bağlanma” olarak tanımlanırken, sensör yüzeyinde reseptör dışı bölgeler veya farklı moleküllerle gerçekleşen etkileşimler “özgül olmayan bağlanma” olarak adlandırılmaktadır (Bongrand, 1998). Antijen–antikor etkileşimi ya da nükleik asit temelli sensörlerde DNA/RNA zincirlerinin tamamlayıcı eşleşmesi, özgül bağlanmaya örnek teşkil etmektedir. Bu tür etkileşimler, analitin reseptör yüzeyindeki tamamlayıcı fiziksel ve kimyasal özelliklerle uyum göstermesi durumunda gerçekleşmektedir. Ancak biyolojik örnekler, proteinler, biyolojik sıvılar ve girişim potansiyeline sahip moleküller gibi karmaşık bileşenler içerdiklerinden, elektrot yüzeyinde istenmeyen özgül olmayan adsorpsiyon (NSA) meydana gelebilmekte ve bu durum hatalı sinyallerin oluşmasına neden olabilmektedir. Özgül olmayan bağlanma, herhangi bir özgül reseptör aracılığı olmaksızın biyomoleküllerin kovalent olmayan şekilde yüzeye tutunmasıyla gerçekleşir ve çoğunlukla hidrofobik veya elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanır. Hidrofobik özellik gösteren moleküller yüzeye tutunarak bu tür bağlanmaya neden olurken, elektrostatik etkileşimler ise analitin elektriksel yükü ve ortamın iyonik gücüne bağlı olarak yüzey–analit arasındaki çekim ya da itme kuvvetleri aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Biyosensörlerde görülen özgül olmayan adsorpsiyon, yüzeyde biyokirlenmeye (biofouling) yol açarak yanlış sinyallerin artmasına sebep olmakta, özellikle işaretsiz (label-free) sensörlerde önemli bir sorun oluşturmaktadır (Sadana ve Chen, 1996). Bu nedenle özgül olmayan bağlanmayı azaltmaya yönelik çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Örneğin inert elektrot yüzeylerinin kullanılmasıyla arka plan sinyalinin düşürülmesi, elektrotların bovin serum albümini (BSA) gibi engelleyici ajanlarla kaplanması veya Tween-20 gibi deterjanlar ile yıkama adımlarının uygulanması bu stratejiler arasında yer almaktadır. Tüm bu yaklaşımlar, sensör yüzeyinde biyomoleküllerin doğal konformasyonlarını ve biyokimyasal aktivitelerini koruyarak immobilizasyonunu sağlayabilecek yüzey modifikasyon yöntemlerinin geliştirilmesine olan gereksinimi ortaya koymaktadır.

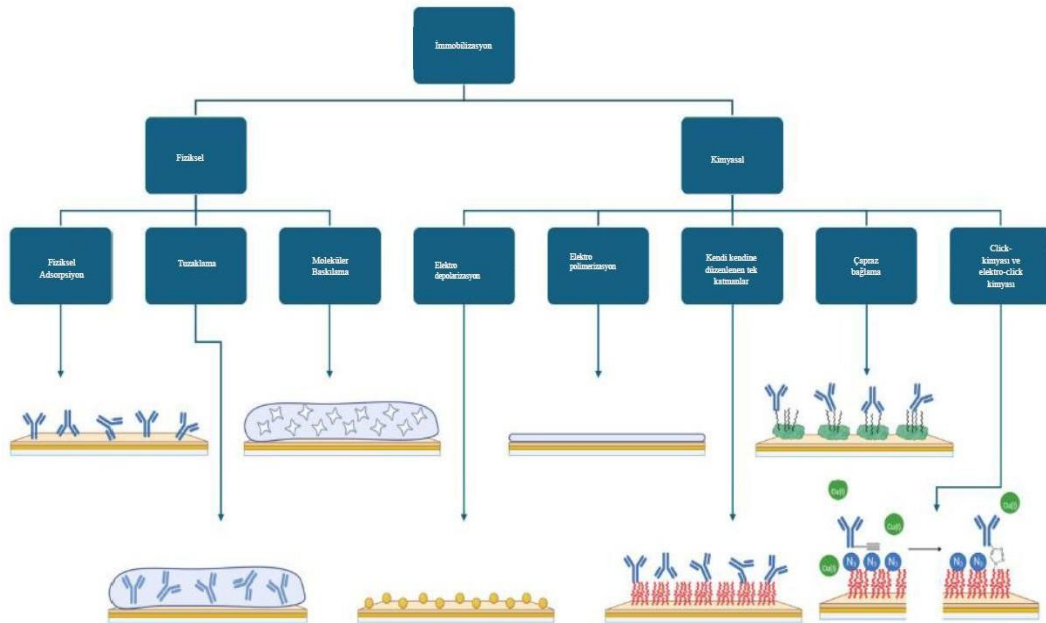
2.12.2. İmmobilizasyon

Bir reseptörün (DNA, enzimler, antikorlar ve hücreler) elektrot yüzeyine immobilizasyonu, elektrokimyasal biyosensörler için kritik bir adımdır. Özgül bağlanma olaylarından elde edilen sinyali doğrudan etkilerken, biyosensörün kararlılığını ve uygulanabilirliğini de etkiler. Reseptörün aktivitesini koruyan, bağlanmayı kolaylaştırmak için uygun reseptör

yönelimini sağlayan ve elektrot yüzeyinde iyi bir reseptör yoğunluğu sağlayan uygun bir immobilizasyon yöntemi seçmek önemlidir (Luppa ve diğerleri, 2001; Mollarasou ve diğerleri, 2019 ; Pedersen ve diğerleri, 2025).

Herhangi bir immobilizasyon veya yüzey modifikasyonu gerçekleştirmeden önce, iyi elektrokimyasal performans ve yüksek immobilizasyon yoğunluğu elde etmek için elektrot yüzeyinin mekanik ve/veya elektrokimyasal olarak temizlenmesi önemlidir (Fischer ve diğerleri, 2009 ; Lee ve diğerleri, 2016 ; Stan ve diğerleri, 2022).

Şekil 2.14’de belirtildiği gibi immobilizasyonu gerçekleştirmek için birden fazla teknik kullanılabilir ve bu teknikler, etkileşimlere bağlı olarak iki kategoriye ayrılabilir: fiziksel adsorpsiyon ve kimyasal adsorpsiyon. Fiziksel adsorpsiyon, van der Waals kuvvetleri gibi zayıf etkileşimlere dayanırken, kemisorpsiyon kovalent bağlar gibi kuvvetli etkileşimlere dayanır (Pedersen ve diğerleri, 2025). Yüzeyi değiştirmek, fonksiyonel gruplar oluşturmak ve daha iyi tekrarlanabilirlik, kararlılık ve performans sağlamak için immobilizasyon amacıyla birden fazla teknik kullanmak veya birleştirmek yaygındır (Aydogdu Tığ ve diğerleri, 2020 ; Leva-Bueno ve diğerleri, 2022).



Şekil 2.14. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin genel görünümü ve grafiksel temsilleri. (Pedersen ve diğerleri, 2025).

Fiziksel adsorpsiyon

Fiziksel (pasif) adsorpsiyon

Bu tip immobilizasyon, bir reseptörü elektrot yüzeyine bağlamak için en basit yöntemdir. Bağlanma, elektrostatik ve hidrofobik kuvvetler, hidrojen bağı ve van der Waals etkileşimleri gibi zayıf etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Yeterince yüksek konsantrasyonlarda, bu yöntem kullanılarak yüzeyde bir tabaka oluşturmak mümkündür. Adsorplanan tabakanın kalitesini etkileyen çeşitli faktörler vardır; bunlar arasında elektrot yüzeyinin kirlenmesi, reseptörün yetersiz oryantasyonu nedeniyle bağlanma bölgelerinin tıkanması ve reseptörün kısmi denatürasyonu sayılabilir. Adsorpsiyon, reseptörlerin rastgele oryantasyonunun bir sonucu olarak desorpsiyon değişikliklerine yol açabilir. Bu faktörler, daha düşük hassasiyet, tekrarlanabilirlik, kararlılık ve stabiliteyi azaltarak onu daha az verimli bir biyosensör haline getirir. Ancak, yapısı, süreci, düşük maliyeti ve uygulama kolaylığı nedeniyle bu durum hala yaygın olarak kabul edilmektedir (Mollarasouli ve diğerleri, 2019 ; Eş ve diğerleri, 2015 ; Pedersen ve diğerleri, 2025 ; Smutok ve Katz, 2022).

Çoğu durumda, adsorpsiyon immobilizasyon sürecinde ara bir adım görevi görür. Reseptörleri doğrudan yüzeye adsorbe etmek yerine, yüzeye güçlü bir afinitesi olan malzemeler (örneğin piren bileşikler, karboksimetil dekstran, altın nanopartikülleri (AuNP'ler) ve diğerleri) önce adsorbe edilir. Daha sonra, mevcut fonksiyonel gruplara bağlı olarak, reseptör üste adsorbe edilebilir veya çapraz bağlama veya karbodiimid kimyası gibi yöntemlerle kovalent olarak bağlanabilir (Dammati ve diğerleri, 2019 ; Parkash ve diğerleri, 2020 ; Yaiwong ve diğerleri, 2023). Diğer bir seçenek ise, yüzeyi özgül afiniteye (kilit-anahat etkileşimi) sahip proteinlerle kaplamak ve ardından bu kaplamayı Protein A veya G ve (strept)avidin-biyotin (Parkash ve diğerleri, 2020) gibi bir reseptöre bağlanmak ve yönlendirmek için kullanmaktır. Elshafey ve ark. ile Kausaite-Minkstimiene ve ark. antikörlerin yönlendirilmiş bağlanmasını artırmak için Protein G'yi kullandı ve bunun sonucunda analit için artan bir bağlanma kapasitesi elde edildi (Elshafey ve diğerleri, 2013 ; Kausaite-Minkstimiene ve diğerleri, 2010). Reseptör yönlendirilmiş olduğunda, sinyalin rastgele bağlanmadığı duruma kıyasla 11 kat daha yüksek olduğunu gözlemlediler.

Tuzaklama

Alternatif bir yaklaşım, bir reseptörün polimer matriksi içinde, örneğin hidrojel, sol-jel veya kitosan içine hapsedilmesidir. Reseptör, polimerin yapı taşları ile karıştırıldıktan sonra,

polimerizasyon/jelleşme ya (1) kimyasal bir tepkime ile ya da (2) sıcaklık veya pH gibi çevresel koşullardaki bir değişiklik ile başlatılabilir; bu da reseptörün hapsedilmesini kolaylaştırır.

Tuzaklama yöntemi, pasif adsorpsiyona kıyasla kimyasal inertlik, mekanik sertlik, daha yüksek termal kararlılık ve denatürasyonun azaltılması gibi çeşitli avantajlar sunarken aynı zamanda hazırlanması da kolaydır. Ek bir avantajı ise tuzanın(hapsetmenin) düşük sıcaklıklarda yapılabilmesi ve gözenekliliği hassas bir şekilde ayarlanabilen şeffaf jeller elde edilmesidir (Imam HT ve diğerleri, 2021 ; Mollarasouli ve diğerleri, 2019 ; Naresh ve Lee, 2021).Ancak, matriksin gözenekliliği yeterli değilse, bu difüzyon kısıtlamalarına yol açacak ve bu da duyarlılığı düşürerek biyosensör performansını olumsuz etkileyecektir. Diğer yandan, gözenek boyutu çok büyük olursa, reseptörün sızmasına neden olacaktır (Imam ve diğerleri, 2021).

Bessueille ve diğerleri (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, oligonükleotid biyomoleküllerinin gözenekli silikon altlıklar üzerinde sentezlenerek yüzey yoğunluğunun on kat arttığı ve biyomoleküllerin 25 hibridizasyon/stripping döngüsüne kadar kararlılığını koruduğu gösterilmiştir. Su içeren polimer ağları olan iletken polimer hidrojel, biyolojik ortamı taklit etmesi nedeniyle biyomoleküllerin tuzaklanması için sıklıkla tercih edilen bir malzemedir. Yüksek hidrofilik özellikleri, biyouyumluluğu ve geniş yüzey alanı sayesinde bu hidrojel materyalleri, moleküllerin kararlılığı artırarak raf ömürlerini uzatır ve biyomoleküller için umut verici bir immobilizasyon matriksi olarak kullanılmaktadır (Li ve diğerleri, 2015).

Lipińska ve diğerleri tarafından tuzaklama yöntemi kullanılarak glukoz oksidaz, AuNP'lerle kaplanmış nanoyapılı titanyum folyoya kitosan matriksi içinde immobilize edilmiştir; bu sayede çeşitli girişimcilere karşı dirençli ve iyi duyarlılığa sahip bir glukoz biyosensörü oluşturulmuştur (Lipinska ve diğerleri, 2021) .

Son dönemde, enzim immobilizasyonu için yeni bir polimer matriksi geliştirilmiş olup, bu matriks, polimerizasyon yöntemiyle elektropolimerize edilen polietilenodiositiopen (PEDOT), grafen oksit nano-levhaları (GON'lar) ve lakkaz (Lac) kullanılarak hazırlanmıştır (Maleki ve diğerleri, 2017). Ayrıca, katyonik bir polimer olan poli(2-(dimetilamino)etil metakrilat) (MADQUAT) ile modifiye edilmiş tek duvarlı karbon nanotüp ve indirgenmiş grafen oksit (SWCNTerGO) nanokompoziti kullanılarak enzim tuzaklaması için etkili bir platform geliştirilmiştir. Bu matriks, model bir enzim olan alkol dehidrogenazı (ADH)

immobilize etmek için etkili bulunmuş ve etanolün elektrokimyasal tespiti için kullanılmıştır. Hapsolmuş enzim, hızlı bir elektron değişimi gerçekleştirmiş ve SWCNT-rGO nanokompoziti, immobilize edilen ADH'nin biyokatalitik aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır (Adhikari ve diğerleri, 2017).

Moleküler baskılama

Teknik olarak bir immobilizasyon tekniği olarak sınıflandırılmasa da, moleküler baskılama, immobilize edilmiş bir reseptörle aynı tanıma ve bağlanma işlevlerine sahip bir tabaka oluşturur. Bu yöntem, tuzaklama yöntemine benzer; ancak aralarındaki temel farklardan biri, biyolojik elementin ilkinde tuzaklanırken, ikincisinde yalnızca kısmen bağlanmasıdır. Baskılamanın (imprinting) amacı, analite tamamlayıcı boyut ve kimyasal etkileşime sahip bir boşluk oluşturmaktır; bu, bir örnek analit içeriyorsa, bu boşluklara seçici ve özgül olarak bağlanacağı anlamına gelir. Bunu başarmak için, analit başlangıçta polimer matrikse yerleştirilir, ardından çapraz bağlama yapılır ve analit çıkarılır. Boşluk oluşturma süreci, matriksin doğru şekli oluşturacak kadar çapraz bağlanmasını sağlamak için birden fazla faktörün kontrol edilmesi gerektiğinden önemli bir zorluk olabilir; ancak analitin boşlukta kilitlenmemesi gerekir, aksi takdirde kullanılamaz hale gelir. Bu yöntem, tuzağa düşürme yönteminin sağlamlık ve kimyasal eylemsizlik gibi birçok avantajına sahiptir. Ayrıca, yöntem reseptörlerin veya analitlerin immobilize edilmesini gerektirmediğinden, reseptör/analit denatürasyonu sorununu ortadan kaldırırken hedefe eşdeğer veya daha yüksek hassasiyet ve afinite sağlar. Polimer matriksine grafen oksit (GO), AuNP'ler vb. gibi nanomalzemelerin eklenmesi, katalitik aktivite, biyoyumluluk ve iletkenlik üzerinde olumlu bir etki göstererek elektrokimyasal biyosensör performansını iyileştirmiştir (Choi ve diğerleri, 2023 ; Frasco ve diğerleri, 2017 ; Moreira Gonçalves, 2021 ; Zhou ve diğerleri, 2022). Özcan ve diğerleri grafen kuantum noktalarıyla işlevselleştirilmiş çok duvarlı CNT'lerden oluşan bir nanokompozit malzeme ile modifiye edilmiş camsı bir karbon elektrot üzerinde seçici boşluklar oluşturmak için baskılama yönteminden yararlandı (Özcan ve diğerleri, 2020). Nanokompozit malzeme kullanılarak biyosensör, geliştirilmiş elektrokimyasal özellikler (yük transfer direnci ve tepe ayırma voltajı) ve hassasiyet gösterdi. Biyosensör, baskılama yöntemiyle birlikte kullanıldığında, girişimlerden gelen minimum sinyal, tekrarlanabilirlik ve kararlılık ile iyi seçicilik göstermiştir.

Kimyasal adsorpsiyon

Kimyasal adsorpsiyon, biyomoleküllerin elektrot yüzeyine doğrudan kovalent bağlanmasıyla gerçekleşen bir immobilizasyon yöntemidir ve bu bağlanma, biyomoleküllerin yüzeydeki fonksiyonel grupları aracılığıyla sağlanır. Kovalent bağlanma, alan yönlendirmeli (site-directed) ya da alan yönlendirmesiz (non-site directed) olabilir. İlk yöntemde, biyomolekül yüzeye bağlanırken organik moleküller, metal köprüleri veya polimerler gibi dış ajanlar kullanılır ve biyomolekülün yüzeye düzenlenmemiş bir şekilde kovalent bağlanması, analiz için aktif bölgeyi kısıtlayabilir veya biyomolekülün denatürasyonuna neden olabilir. İkinci yöntemde ise biyomoleküller, yüzeydeki molekülle doğrudan, belirli bağlanma noktaları aracılığıyla bağlanır. Biyomoleküllerin kimyasal adsorpsiyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, amine ya da karboksilik asit gibi terminal fonksiyonel gruplara sahip SAM ara yüzey katmanlarının kullanılmasıdır; bu gruplar genellikle N-hidroksisüksinimid (NHS) ester ile aktive edilir. Kovalent immobilizasyonun en sık tercih edilen yöntemlerinden biri olan aktif ester kimyası, biyomoleküllerin immobilizasyonu için etkin bir strateji olarak kullanılmaktadır (Sanati ve diğerleri, 2019).

Elektrodepozisyon

Çözeltiden adsorpsiyon yoluyla yüzeyin modifiye edilmesi en basit yöntemdir ve daha önce de belirtildiği gibi çeşitli bileşikler, proteinler ve nanomalzemelerle kullanılabilir. Nanomalzemeler burada özellikle ilgi çekicidir çünkü bunlar önceden özelleştirilebilir ve elektron transfer direncini düşürürken, elektrot yüzey alanını artırarak, hassasiyeti artırarak ve elektrokimyasal biyosensör performansını iyileştirerek immobilizasyon için belirli fonksiyonel gruplar sunar (Danvirutai ve diğerleri, 2020 ; Kathiresan ve diğerleri, 2021 ; Sanati ve diğerleri, 2019). Nanomalzemeyi elektrot yüzeyine adsorbe etmek yerine, malzemeyi dahil etmek veya biriktirmek için elektrotun kendisini aktif olarak kullanmak mümkündür. Bu, reseptörün immobilizasyonu için gereken fonksiyonel grupların tanıtılmasına yardımcı olur. Bu tekniğe elektrodepozisyon denir ve nanomalzemelerin biriktirilmesinde kullanılması yalnızca daha hızlı olmakla kalmaz, aynı zamanda yüzey modifikasyonu üzerinde daha fazla kontrol sağlar (Zaki ve diğerleri, 2020). Elektrodepozisyona benzer farklı bir modifikasyon yöntemi ise elektropolimerizasyondur.

Elektropolimerizasyon

Elektropolimerizasyon, genellikle elektrot yüzeyinde bir film oluşturmak için iletken polimerler kullanır. Bu yöntem, film kalınlığı ve morfolojisi üzerinde basit bir kontrol sağlar ve kimyasal, elektriksel ve yapısal özelliklerinin hassas bir şekilde ayarlanmasını sağlayarak bunları elektrokimyasal biyosensör uygulamaları için uygun hale getirir (Moreira Gonçalves, 2021; Lakard, 2020 ; Tajik ve diğerleri, 2021). Mevcut fonksiyonel gruplara bağlı olarak çeşitli kovalent bağlar oluşturulabilir; ayrıca, yöntem genellikle analiti tuzaklamak veya baskılamak için kullanılır. Wang ve ark. hem elektrodpozisyon hem de elektropolimerizasyonun bir biyosensör oluşturmak için nasıl birlikte kullanılabileceğini göstermiştir (Wang ve diğerleri, 2020). İlk olarak camsı bir karbon elektrot temizlenmiş ve ardından AuNP'leri elektrot yüzeyine oluşturmak ve biriktirmek için CV'nin gerçekleştirildiği H₂AuCl₄ çözeltisine daldırılmıştır. Modifikasyondan sonra elektrot, AuNP'lere tiyol bağı yoluyla bağlanan çok işlevli bir peptide maruz bırakılmış ve ardından iletken bir ince film oluşturmak için 3,4-etilendioksitiyofen monomerinin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Filmin kalınlığını oluşturmak ve kontrol etmek için elektropolimerizasyon kullanılarak hem kararlılık hem de iletkenlikte iyileştirmeler gözlemlenmiştir. Bunu çok fonksiyonlu peptit ile birleştirdiklerinde, seyreltilmemiş insan serumuna maruz kalma sonucu oluşan özgül olmayan bağlanma nedeniyle sırasıyla %3 ve %75'lik bir düşüşle 6-merkaptohexanol SAM'a kıyasla daha iyi bir performans gözlemlenmiştir.

Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (Self-Assembled Monolayers, SAMs)

Tiyol-altın etkileşimi, sadece molekülleri doğrudan yüzeye bağlamak için değil, aynı zamanda SAM'lar (kendiliğinden düzenlenen monolayerler) oluşturmak için de kullanılmıştır. Genellikle, bir tiyol grubu, bir alkil zinciri ve ek bir fonksiyonel gruptan oluşan alkanetioller SAM'lar için kullanılır. Bu moleküller, mükemmel özelleştirilebilirlik ve çok yönlülük sunan çok sayıda fonksiyonel grupta birlikte mevcuttur ve değişken alkil zincir uzunluğuyla birlikte kullanıcıya yüzey özelliklerinin immobilizasyonu ve ince ayarı için daha fazla seçenek sunar. Tiyol bağlanmasını kolaylaştırmak ve altın yüzeyinde SAM oluşturmak için yaygın bir yöntem, yüzeyi uzun bir süre alkanetiyol çözeltisine maruz bırakmaktır. Yüzeyin maruz kalma süresine bağlı olarak, katman yoğunluk ve yüzey izin veriyorsa düzen açısından farklı özelliklere sahiptir. Sürecin arkasındaki itici güçlerden biri, alkil zincirleri arasındaki van der Waals etkileşimidir. Bu kuvvet, katmanın yavaşça

oluşmasında önemli bir rol oynar ve daha yüksek paketlenmiş monokatmanların oluşumuna yardımcı olur. Fonksiyonel grup ayrıca SAM'lerin oluşumunda da rol oynar: eğer grup yüklü veya kısmen yüklü ise bu gruplar arasında bir itmeye yol açar ve bu da yoğun bir şekilde paketlenmiş bir tabakanın oluşumunu engelleyebilir (Bahadır ve diğerleri, 2016 ; Singh ve diğerleri, 2020). SAM'ler için en yaygın fonksiyonel gruplardan biri karboksilik asittir. Karboksilik asit grupları, N-hidroksisüksinimidil (NHS) esterleri ve/veya 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) gibi karbodiimidler kullanılarak kolayca aktive edilebilir ve bunlar daha sonra birincil aminlerle tepkimeye girerek kovalent bir bağ oluşturabilir. Bu yaklaşımla, birincil amin grubu içeren herhangi bir reseptör SAM'e bağlanabilir. Fonksiyonelleştirme stratejilerinde sıralamanın tersine çevrilmesi de mümkündür. Bu yaklaşımda, altın yüzey üzerinde oluşturulan kendiliğinden düzenlenen monolayer tabakası birincil amin grupları ile fonksiyonelleştirilmekte, ardından reseptör molekülü üzerinde bulunan karboksilik asit grupları uygun aktivasyon ajanları aracılığıyla aktive edilerek kovalent bağlanma gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem, immobilizasyon verimliliğini artırmanın yanı sıra yüzey kimyasında farklı bağlanma modlarına olanak tanımakta ve biyosensör performansının optimizasyonuna katkıda bulunmaktadır (Love ve diğerleri, 2005).

Kendiliğinden düzenlenen monolayerlerin önemli avantajlarından biri, kirlenme önleyici özellikleridir. Bu özellik, biyosensörlerde özgül olmayan bağlanmanın azaltılmasıyla doğrudan ilişkili olduğundan, sensör performansının artırılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla, bu sorunu başlangıç aşamasında hafifletebilecek bir yöntemin kullanılması oldukça cazip bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Bu tür bir etkiyi elde edebilmek için, tabakanın yapısının ve özelliklerinin hassas bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir; bu kontrol ise uygun fonksiyonel grupların ve zincir uzunluklarının seçimiyle sağlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, iki veya daha fazla farklı tiyol bileşiğinin birlikte kullanılmasıyla karışık SAM'ler oluşturulabilmekte ve böylelikle çoklu işlevsellik sağlanabilmektedir. Karışık SAM yaklaşımı sayesinde tabaka yoğunluğu artırılabilir, spesifik bağlanma desteklenebilir, özgül olmayan bağlanma azaltılabilir ve ayrıca yüzeyin ıslanabilirlik gibi özellikleri ayarlanabilmektedir. Bunun bir örneği Ferreira ve diğerleri tarafından gerçekleştirilmiştir (Ferreira ve diğerleri, 2021), burada iki farklı immobilizasyon stratejisi karşılaştırıldı: biri saf 6-merkaptio-1-hekzanetiol SAM kullanırken diğeri 6-merkaptio-1-hekzanetiol ve hekzanetiolün karışık bir SAM'ini kullanmıştır. Karışık SAM katmanının daha düşük bir tespit sınırı (LOD) sağladığını ve özgül olmayan bağlanmayı

azalttığını bulmuşlardır. Alkanetiyoillere ek olarak, poli (etilen glikol) ve oligo (etilen glikol) gibi SAM'ler veya karışık SAM'ler için kullanılabilen, kirlenme önleyici, aromatik bileşikler (tiyofenol, p-bifeniltiyol ve p-terfeniltiyol veya N-heterosiklik karbenler) üzerinde olumlu bir etkiye sahip başka seçenekler de mevcuttur (Choi, 2022 ; Love ve diğerleri, 2005). Bu yöntemin olası bir dezavantajı, uzun vadeli kararlılığıdır; çünkü SAM katmanının ortam koşullarına, özellikle UV ışınlarına uzun süre maruz kalması, kükürt baş gruplarının oksidasyona uğramasına neden olarak yüzeyin işlevselliğini olumsuz etkiler. SAM oluşumuyla ilgili bir diğer sorun ise tekrarlanabilirliktir. Süreç moleküllerin kendiliğinden kendi kendine organize olması olduğundan sıcaklık, çözücü, su içeriği, maruz kalma süresi ve SAM çözeltisi konsantrasyonu gibi birden fazla faktörden etkilenebilir ve bu da onu tamamen kontrol etmeyi neredeyse imkansız hale getirir (Singh ve diğerleri, 2020).

Çapraz bağlama

Çapraz bağlama, moleküllerin kimyasal olarak kovalent bağlar aracılığıyla birleştirilmesi yöntemidir ve bu işlemde biyomoleküller, yüzeydeki belirli fonksiyonel gruplara tepki veren çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanır. Bu yöntem, sığır serum albümini gibi fonksiyonel olmayan bir protein olan reseptör ile bağlayıcı görevi gören çok fonksiyonlu reaktifler kullanır ve bu reaktifler daha sonra Rafat ve arkadaşları tarafından gösterildiği gibi yüzeye fizyosorblanabilir (Rafat ve diğerleri, 2021). Glutaraldehit, bis (sülfosüksinimidil) süberat ve imidoesterler gibi çeşitli reaktifler mevcuttur ve bunlar, reaktif grubun aynı mı yoksa farklı mı olduğuna bağlı olarak homobifonksiyonel veya heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar olarak sınıflandırılabilir.

Optimum çapraz bağlamayı sağlamak için pH, sıcaklık, süre, bağlayıcı konsantrasyonu ve iyonik kuvvet gibi faktörlerin dikkate alınması önemlidir. Yöntem, reseptörün güçlü bağlanması ve ısıya ve organik çözücülere karşı artan kararlılık gibi avantajlar sunmasına rağmen bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Çapraz bağlama tepkimesi tipik olarak bölgeye özgü olmadığından ve uygun herhangi bir grupla tepkimeye gireceğinden, bazıları istenen reseptör-x ve diğerleri örneğin reseptör-reseptör kompleksleri olan çeşitli çapraz bağlı komplekslerin oluşumuna yol açar.

Çapraz bağlanmanın derecesine ve konumuna bağlı olarak bu durum, reseptörün denatürasyonuna, agregasyonuna ve/veya aktivite kaybına neden olabilir. Bununla birlikte, bu sorunun boyutu, optimum çapraz bağlama koşulları kullanılarak bir miktar hafifletilebilir, ancak bu koşulları bulmak sorunlu olabilir (Naresh ve Lee, 2021 ; Sheldon, 2011). Çapraz

bağlama yoluyla oluşan agregatları aktif olarak kullanan bir örnek, çapraz bağlı enzim agregatlarıdır (CLEA'lar). Šulek ve diğerleri, serbest enzime kıyasla %83 aktiviteyi koruyarak yaban turpu peroksidazını (HRP) çapraz bağlayarak CLEA'ları başarıyla oluşturmuşlardır; bu, örneğin bir geliştirme aracı olarak biyosensör uygulamalarında potansiyel olarak kullanılabilir (Šulek ve diğerleri, 2011).

Click elektro-Click kimyası

Reseptörü hareketsiz hale getirmek için uygulanabilecek kuvvetli ancak basit bir yaklaşım click kimyasıdır. Muhtemelen en bilinen click kimyası türü, bir alkin ve bir azit (CuAAC) arasında Cu(I) tarafından katalize edilen sikloadisyondur. Söz konusu yöntem ilk olarak 2002 yılında Sharpless ve arkadaşları ile Meldal ve arkadaşları tarafından literatüre kazandırılmıştır (Sharpless ve diğerleri, 2002; Meldal ve diğerleri, 2002). Suş destekli alkin-nitron sikloadisyon, özellikle gergin heterosiklik elektrofillerin (epoksitler, aziridinler, aziridinyum iyonları ve episülfonyum iyonları) halka açılması gibi nükleofilik yer değiştirmeler, aldol olmayan tipte karbonil tepkimeleri ve karbon-karbon çoklu bağlarına katılma tepkimeleri gibi başka türler de mevcuttur (Devaraj ve Finn, 2021 ; Kolb ve diğerleri, 2001; Nie ve diğerleri, 2015 ; Yáñez-Sedeño ve diğerleri, 2019). Bu yöntemlerin çekiciliği, yüksek verimlerinden, minimum yan tepkime ve yan ürünlerinden, reseptör aktivitesinin korunmasından, biyoortogonalitesinden ve farklı çözücüler, pH'lar ve sıcaklıklarda uygulanabilirken yüksek seçiciliğinden kaynaklanmaktadır (Nie ve diğerleri, 2015).

CuAAC ve elektrokimyasal biyosensörlerin ilginç bir yönü, katalizör olarak bakır(I) kullanılmasıdır. Cu(I) tuzu ilave edilerek veya Cu(II) iyonlarının indirgenmesiyle sağlanabilir. Özellikle, Cu(II) iyonlarını elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak Cu(II)'den üretmek mümkündür; bu, elektro-click kimyası olarak da bilinir. Bu, katalizörün kontrollü yerel üretimine olanak tanır; bu da bir reseptörün istenen yüzeye seçici olarak sabitlenebileceği anlamına gelir. Bu, katalizörün kontrollü lokal üretimine olanak tanır; bu da bir reseptörün istenen yüzeye seçici olarak sabitlenebileceği anlamına gelir. Bu, immobilizasyonun her bir elektrot yüzeyine lokalize olması ve açılıp kapatılabilmesi sayesinde benzersiz bir özelleştirmeye olanak tanır ve bu da onu elektrot dizilerini modifiye etmek için ideal bir yöntem haline getirir (Devaraj ve diğerleri, 2006 ; Guerrero ve diğerleri 2020, ; Krishnan ve diğerleri, 2023 ; Wang ve diğerleri, 2019). Svalova ve arkadaşları, bu tekniği antikorların kovalent immobilizasyonunu mümkün kılan bir NHS fonksiyonel

grubunun bağlanması kullanmıştır. Çalışmada ilk olarak elektropolimerizasyon yöntemiyle elektrot yüzeyinde polivinilbenzilazid filmi oluşturulmuş ve bu süreç aynı zamanda bakır nanoparçacıklarının (NP) sentezini ve film yapısına dahil edilmesini sağlamıştır. Ardından, elektrot üzerine propargil-NHS eklenmiş ve bakır NP'lerin Cu(I) katalizörüne dönüşmesini sağlayan bir voltaj uygulanarak klik kimyası reaksiyonu başlatılmıştır. Bu işlem sonucunda elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanmış bir NHS fonksiyonel grubu elde edilmiştir. Daha sonra, immobilizasyon aşamasında bu NHS grubu antikorların bağlanması kullanılmıştır. Araştırmacılar, bu yaklaşım sayesinde tepkimenin elektrot yüzeyine yakın bölgede gerçekleştiğini ve bunun da antikorların immobilizasyon süresini önemli ölçüde kısalttığını rapor etmişlerdir (Svalova ve diğerleri, 2020).

2.13. Biyoreseptörler

2.13.1. Biyoreseptörlerin sınıflandırılması

Biyoreseptörler, biyosensörlerin temel bileşenleri olup algılama birimleri olarak işlev görürler ve çeşitli biyolojik ya da sentetik kaynaklardan elde edilebilirler. Bu çerçevede enzimler, yalnızca tanıma değil aynı zamanda katalitik dönüşüm özellikleriyle öne çıkarken; antikorlar, yüksek özgüllükleri sayesinde hedef antijenlerin seçici olarak tanınması ve bağlanmasında kullanılır. Sentetik moleküler baskılı polimerler, analitlere yönelik yapay bağlanma bölgeleri oluşturarak biyoreseptör işlevi görürken; hücre zarı reseptörleri özgül biyolojik aktiviteleri tanıyıp tetikleyerek hücresel yanıtların takibine olanak sağlar. Nükleik asit temelli biyoreseptörler arasında yer alan DNA, tamamlayıcı zincirler ve diğer biyomoleküllerle seçici etkileşim kurabilirken, aptamerler ise peptit veya nükleik asit zincirlerinden türetilmiş sentetik biyomoleküller olarak antikora benzer şekilde yüksek seçicilikle hedef analitlere bağlanırlar. Daha kompleks biyoreseptörler arasında tüm hücreler (mikroorganizmalar, bitki ya da hayvan hücreleri) yer almakta olup doğal katalitik ortamların yanı sıra fizyolojik ve patolojik süreçlerin incelenmesinde kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, doku veya organ temelli biyoreseptörler (koku alma epiteli ya da tat tomurcukları), kimyasal uyarımları aksiyon potansiyellerine dönüştürerek biyosensör uygulamalarında işlevsel yanıtların takibini sağlamaktadır.

Protein bazlı reseptörler

En yaygın ve en eski biyoreseptör sınıfı, enzimler, antikorlar ve kapılı iyon kanalları ile porinler gibi transmembran proteinlerden oluşmaktadır. Bu biyomoleküllerin ortak özelliği, tamamının doğal kökenli olmasıdır; en basit prokaryotik organizmalardan, yüksek derecede kompleks yapıya sahip çok hücreli hayvanlara kadar geniş bir biyolojik yelpazede sentezlenmektedirler. Antikorlar, canlılarda antijenlerin enjeksiyonu sonrasında bağışıklık yanıtı oluşturarak B lenfositleri tarafından üretilmekte ve özgül protein reseptörlerinin biyosentezini uyarmaktadır (Nossal, 1967; Pasquarelli, 2021). Bunun yanı sıra, genetik mühendisliği teknikleri sayesinde uygun hücre hatlarının kullanımıyla, doğal tip organizmalarda sentezlenmeyen proteinlerin üretimi mümkün olmakta ya da doğal olarak var olan proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri hedeflenen biyosensör uygulamalarına daha uygun hale getirilecek şekilde modifiye edilebilmektedir (Lee ve Jeong, 2015 ; Sinha ve Shukla, 2019 ; Pasquarelli, 2021).

Uygun bir analit molekülü, kemoterapiye duyarlı bir iyon kanalı gibi bir transmembran proteinin reseptörüne bağlandığında, kanal aktive olur. Bu kanallar oldukça seçicidir ve yalnızca belirli bir iyon türünün (Ca^{+2} iyonları) geçmesine izin verir.

Enzimler, doğal yapılarını koruyarak fizyolojik ortamda su ile temasın engellendiği hidrofobik bir çekirdeğe sahiptir. Ortam koşullarının değişimi, enzimin yapısal bütünlüğünü bozarak bağlanma bölgesinde deformasyon, bağlanma yeteneğinde azalma ve katalitik aktivitede kayba yol açabilir. Bu nedenle, biyosensör tasarımında uygun bir immobilizasyon yönteminin geliştirilmesi gereklidir. Enzimlerin doğrudan çıplak metal yüzeylere bağlanması durumunda denatürasyon ya da biyolojik aktivitede azalma gözlemlenmektedir. Metal elektrotların redoks enzimleri ile biyoyumlu hale getirilmesi ve aktif bölgeden elektrot yüzeyine etkin elektron transferinin sağlanabilmesi için yüzey modifikasyonu gereklidir. Sensör üretiminde kullanılan enzim immobilizasyon yöntemi, enzimin katalitik aktivitesinin korunması ve yapısal kararlılığının sürdürülmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Enzim immobilizasyonunda tutuklama, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve afinite immobilizasyonu gibi farklı yöntemler yaygın olarak uygulanmaktadır. Ayrıca, enzimin etkinliğini belirlemede, immobilizasyon için kullanılan destek materyalin özellikleri büyük önem taşımaktadır. Bu destek materyallerinin, mekanik dayanıklılık, hidrofiliklik, enzimlere karşı kimyasal inertlik, biyoyumluluk ve yüzey fonksiyonelleştirme kolaylığı gibi niteliklere sahip olması gerekmektedir.

Gözenekli tuzaklama yönteminde, tanıma elemanının çevresinde, sensör yüzeyine bağlanmasını sağlayan gözenekli bir matriks oluşturulur. Mezogözenekli elektrotların geliştirilmesi, enzimlerin elektrot yüzeyinde hapsedilmesini ve enzimden elektrota doğrudan elektron transferine olanak tanınması nedeniyle önemli ilgi görmüştür (Walcarius, 2015). Mezogözenekli silika, yaygın olarak tercih edilen bir tuzaklama matriksi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, iletken polimerler içerisinde enzimlerin hapsolması, aktif bölge ile elektrot arasındaki doğrudan elektron iletimini desteklemesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Naveen ve diğerleri, 2017). Elektrot yüzeyinde polimerin elektropolimerizasyonu, yüzey modifikasyonu için hem uygulanabilir hem de cazip bir yöntemdir. Enzimler, elektropolimerize edilmiş elektrot yüzeyine tek aşamalı veya iki aşamalı yöntemlerle immobilize edilebilir. Tek aşamalı yöntemde, elektrot bir monomer ve enzim içeren çözeltiye daldırılarak uygun potansiyel altında polimerizasyon gerçekleştirilir; bu süreçte enzim de polimer matriks içerisinde hapsedilerek elektrot yüzeyine immobilize edilir. Örneğin, Njagi ve Andreescu (2007) glukoz oksidazını (GOx), altın-polipirol nanokompozit üzerine immobilize ederek bir glukoz sensörü geliştirmiştir. Elektropolimerizasyon sırasında enzimde hafif bir denatürasyon meydana gelme olasılığı vardır; bu durum aktif bölgenin dışa açığa çıkmasını sağlayarak enzimin katalitik aktivitesini artırabilir. İki aşamalı yöntemde ise önce polimer elektropolimerizasyon yoluyla elektrot yüzeyine biriktirilir, ardından ikinci aşamada enzim elektrostatik etkileşim veya kovalent bağlanma yoluyla yüzeye konjuge edilir.

Sentetik reseptörler

Altın standart reseptör yakalama stratejisi antikorlardır. Ancak, her tür analit için doğal olarak mevcut olmadıklarından, bu tür durumlarda özel olarak üretilmeleri gerekmektedir; fakat bu yaklaşım oldukça maliyetli olup önemli düzeyde uzmanlık gerektirir. Antikora dayalı biyosensörler, bir antikor veya antijenin sensör yüzeyine immobilize edildiği ve antijenin veya antikoron analit çözeltisindeki bağlanma olayının ölçüldüğü immünosensörler olarak adlandırılır. Antikorlar ile antijenler arasındaki stokiyometrik ilişki göz önünde bulundurulduğunda, antikorların ve afiniteye dayalı antikor sensörlerinin immobilizasyonu kritik bir adımdır. Antikor immobilizasyonu için yaygın olarak tercih edilen yöntemler arasında, Protein A veya Protein G gibi bağlayıcı proteinlerin kullanımı ve biyotin-avidin sistemine dayalı stratejiler yer almaktadır. Bu yöntemler, adsorpsiyon, fiziksel tuzaklama, kovalent bağlama (hem yönlendirilmiş hem de dolaylı) ve çapraz bağlama tekniklerini kapsamaktadır. Ayrıca, çoğu fonksiyonel protein gibi antikorlar da yalnızca pH ve sıcaklık

gibi sınırlı parametre aralıklarında kararlı ve tam işlevsel kalabilmektedir. Bu nedenlerle, alternatif yaklaşımların geliştirilmesine yönelik önemli bir ilgi bulunmaktadır (Kodadek, 2010).

Biyomimetik kimya, biyokimyasal tepkimeleri taklit eden kimyasal süreçlerle ilgilenir. Özellikle Moleküler Baskılama Tekniği (Molecular Imprinting Technique, MIT) (Dar ve diğerleri, 2020 ; Ertürk ve Mattiasson, 2017 ; Saylan ve diğerleri, 2017) sentetik afinite reseptörlerinin üretiminde oldukça uygun bir yöntem olup, “moleküler anahtarlar” için yapay “kilitler” oluşturma yöntemi olarak tanımlanabilir. MIT farklı teknolojik süreçleri içermekte olup; reseptörler, kütle baskılama, yüzey baskılama (yumuşak litografi, şablon immobilizasyonu, aşılmalı polimerizasyon, emülsiyon polimerizasyonu) ve epitop baskılama gibi çeşitli yöntemlerle üretilebilmektedir (Ertürk ve Mattiasson, 2017). Çoğu durumda reseptörler sentetik polimerlerden üretilse de, nükleik asit elementleri ve amino asitler gibi biyomoleküller de bu amaçla başarıyla kullanılabilir. (Pavan ve Berti, 2012 ; Pasquarelli, 2021 ; Zhang ve Liu, 2019).

Antikor bazlı biyosensörler

Antikorlar, yüzlerce amino asitten oluşan ve yüksek derecede düzenli bir yapıya sahip globüler serum proteinleridir. Bir antikor, iki ana parçadan oluşur: Antijen bağlama (Fab) bölgesi, iki kolun uçlarında yer alırken, kristalleşebilir (Fc) bölgesi ise daha sabit bir yapıya sahiptir. Her antikor, iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşan dört polipeptit zincirinden meydana gelir ve bu zincirler "Y" şeklinde bir molekül oluşturacak şekilde birleşir. Ağır ve hafif zincirlerin uçlarındaki amino asit dizilimi, farklı antikorlar arasında büyük farklılıklar gösterir. Bu varyasyon, antijen özgüllüğünü ve her bir antikoru bağlama afinitesini belirleyen önemli bir faktördür. Antikorlar, sabit bölge yapısı ve immün fonksiyonlarına dayalı olarak beş ana sınıfa ayrılır: immüoglobulin M (IgM), immüoglobulin G (IgG), immüoglobulin A (IgA), immüoglobulin D (IgD) ve immüoglobulin E (IgE).

Monoklonal ve poliklonal antikorlar

Monoklonal antikorlar, tek bir ana hücrenin klonları olan özdeş bağışıklık hücrelerinden türetilirken, poliklonal antikorlar birden fazla plazma hücresi tarafından üretilir. Hem monoklonal hem de poliklonal antikorlar, biyosensörlerde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Antikorlar, belirli antijenlere yüksek özgüllük ve yüksek afinitesi ile özgül olarak bağlanabilen biyomoleküllerdir (North, 1985). Antikorların belirli antijenlere yönelik

yüksek özgüllükleri ve güçlü afiniteleri, onları ideal biyorekognisyon elemanları haline getirir. Monoklonal antikorlar, poliklonal antikorlara göre antijenlerin daha özgül bölgelerini tanıyabilir.

Antikor bazlı biyosensörlerin etkinliğini belirleyen başlıca parametreler, antikorum hassasiyeti, seçiciliği, kararlılığı, immobilizasyonu, etiketlenmesi ve boyutudur. Elektrot yüzeyine antikor immobilizasyonu, biyosensörlerin performansını belirleyen en kritik faktördür. Bunun nedeni, antikorum yöneliminin antijenle özgül bağlanma açısından önemli bir rol oynamasıdır. Antikor immobilizasyonunun en önemli sınırlamalarından biri, antikor molekülünün rastgele yönelimi olup, bu rastgele yönelim, immobilize edilen antikorların önemli bir kısmının antijen bağlanma bölgelerinin antijen ile etkileşime girmesini engeller. Bu nedenle, antikor yöneliminin doğru bir şekilde belirlenmesi, antikor bazlı biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli bir aşamadır.

Antikorlar için kullanılan immobilizasyon yöntemleri, adsorpsiyon, tuzaklama, çapraz bağlama, kovalent bağlanma ve protein A veya protein G kullanımı gibi çeşitli yöntemleri içermektedir. Antikor immobilizasyonu için sıkça kullanılan bir yöntem, fiziksel adsorpsiyondur. Bu yöntem, basit olup sınırlı sayıda test için yeterli olsa da, analiz sırasında antikorum desorpsiyonu nedeniyle birden fazla test için uygun değildir. Ayrıca, antikorların poliakrilamid (PAM), polivinil alkol (PVA), epoksi veya inorganik sol-jeller gibi polimerlerde tuzaklanması da yaygın bir uygulamadır. Tuzaklama yöntemleri, biyoreseptör yükleme gibi değişkenlerin optimize edilmesine olanak tanırken, antikor sızıntısı, yönelim ve biyolojik aktivitenin korunması gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır.

DNA reseptörleri

DNA reseptörlerinin temel uygulaması, analiz edilecek numunede bulunan DNA zincirlerini hibridizasyon yoluyla yakalamaktır. Bu amaçla, tek zincirli yakalama DNA molekülleri diziler halinde immobilize edilir ve hizalanır. DNA dizisindeki noktalara farklı, iyi bilinen DNA dizileri bağlanmıştır, yani bir noktada çok sayıda özdeş iplikçik bulunurken, başka bir noktada farklı dizilime sahip özdeş iplikçikler bulunur ve bu böyle devam eder. Analitte bulunan farklı DNA zincirleri, farklı algılama noktalarında bulunan işlevselleştirmeye eşleşebilir ve hibridize olabilir. Bu yöntem, tür tanımlamadan adli tıbbı, genetik varyasyonların ve hastalıkların tanımlanmasından kanser tedavisine, ilaç taramasından kişiselleştirilmiş tıbbı kadar biyoloji ve tıbbi teşhisin birçok alanında çok önemlidir. Ayrıca,

DNA reseptörleri, sentetik reseptörler olarak veya antikorların yerine kullanılan aptamerler olarak da üretilebilir (Pasquarelli, 2021).

Elektrokimyasal DNA sensörleri, diziye özgü bir prob ve bir elektrokimyasal sinyal dönüştürücüyü bir araya getirir. DNA sensörleri, hastalıkla ilgili hedef DNA zincirlerini izleyerek patojenik veya genetik hastalıkları tespit edebilir. Hedef DNA, hareketsizleştirilmiş tamamlayıcı tek zincire bağlanır ve mevcut DNA miktarını gösteren bir sinyal üretir (Homs, 2002). Belirli DNA dizilerinin eser miktarının anında ve hassas bir şekilde tespiti, önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir ve son derece hassas DNA mikrodizileri veya DNA sensörleri geliştirilmiştir (Sassolas ve diğerleri 2008). Genellikle, bir DNA sensörünün yüzeyi, tamamlayıcı hedef DNA dizisine hibridize olan hareketsizleştirilmiş bir ssDNA içerir. Hibridizasyon süreci, sırasıyla akım, ışık veya frekans gibi okunabilir sinyaller üreten elektrokimyasal (Wang, 2006), optik (Ermini ve diğerleri, 2013) veya kütleyle duyarlı elemanlar (Rasheed ve Sandhyarani, 2016) gibi uygun sinyal dönüştürücüler tarafından izlenir. DNA sensörleri, (1) optik DNA sensörleri, (2) piezoelektrik DNA sensörleri, (3) elektriksel DNA sensörleri ve (4) elektrokimyasal DNA sensörleri gibi dönüştürücü türlerine göre ayrılır.

Tüm hücrelere dayalı reseptörler

Analitlerin substrat veya inhibitör olarak izlenebilmesi amacıyla genellikle bakterilerden elde edilen hücrelerin solunum ve metabolik fonksiyonlarından yararlanmakta olup, elektrokimyasal, optik veya kalorimetrik transdüksiyon teknikleriyle bu yöntem entegre edilebilmektedir. Yöntemin en önemli avantajları arasında enzimlerin ekstraksiyon ve saflaştırma adımlarının ortadan kaldırılması, evrimsel olarak optimize edilmiş biyokimyasal ortam sayesinde enzim kararlılığının korunması, tek bir enzim kullanılarak gerçekleştirilemeyen çok basamaklı tepkimelerin mümkün hale gelmesi ve doğanın metabolik aktiviteleri geniş bir aralığı kapsayan çok çeşitli mikroorganizmalar sunması yer almaktadır. Bununla birlikte, çoklu reseptör özelliğinin özgüllüğü tek moleküllere kıyasla azaltması, uzun vadeli kararlılığın zorluk oluşturması, hücrelerin oksijen ve besin kaynağına gereksinim duyması, dar bir sıcaklık aralığında işlevsel olabilmeleri, doğrudan elektrik sinyalinin güvenilir biçimde elde edilip yorumlanmasının güçlüğü ve substrat ile ürün moleküllerinin hücre zarından difüzyonunun basit çözeltilere göre daha yavaş olması nedeniyle tepki süresinin uzaması gibi sınırlılıklar da dikkate alınmalıdır (Sørensen ve diğerleri, 2006 ; Dunlap ve Urbanczyk, 2013 ; Pasquarelli, 2021).

Belirli hücre tiplerine özgü bağlanma yeteneğine sahip hücreler, mikroorganizmalar veya özgül hücresel bileşenler gibi sağlam biyolojik yapılar, biyosensör uygulamalarında kritik öneme sahiptir. Özellikle bakteriyel tam hücre biyosensörleri, toksisite analizleri ve biyokimyasal oksijen ihtiyacının ölçümü gibi alanlarda geniş kullanım alanı bulmaktadır. Hücrelerin elektrokimyasal dönüştürücü yüzeyine immobilizasyon yöntemi, hücrelerin morfolojisi ile yapısal, biyolojik ve kimyasal kararlılığını doğrudan etkilediğinden, uygun immobilizasyon yönteminin seçimi son derece önemlidir. Hücre immobilizasyonunda kullanılan en temel yöntemlerden biri, hücrelerin katı veya gözenekli matriks üzerine çekilerek adsorpsiyon yoluyla tutturulmasıdır. Bu matriks-hücre etkileşimleri, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik çekim, hidrofobik etkileşimler ve hidrasyon kuvvetleri gibi fizikokimyasal mekanizmalarla sağlanmaktadır. Adsorpsiyon yöntemi, canlı hücrelerin immobilizasyonunda yaygın şekilde tercih edilmektedir. Enzim immobilizasyonunda uygulanan uygun modifikasyon teknikleri de hücre immobilizasyonunda kullanılabilir. Hücreler için sıklıkla tercih edilen diğer immobilizasyon prosedürleri arasında fiziksel tuzaklama ve yüzey bağlanma teknikleri yer almaktadır. Fiziksel tuzaklama yöntemi, hücrelerin polimerik veya sol-jel matriks içerisine jelatizasyon veya çapraz bağlayıcı ajanlar eklenerek hapsedilmesi esasına dayanır.

Pseudomonas syringae bakterisi, yüksek gözenekliliğe sahip mikro hücresel bir polimer matriks içerisine hapsedilerek mikrobiyal bir biyosensör geliştirilmiş ve biyolojik oksijen ihtiyacının belirlenmesinde kullanılmıştır (Kara ve diğerleri, 2009). Sensör tasarımı, diske immobilize edilmiş mikroorganizmaların sürekli rejenerasyon ve büyümesine olanak tanıyarak, uzun süreli kararlılık ve kullanım ömrü sağlamıştır. Canlı bakteri hücrelerinin tespiti amacıyla seçicilik ve hassasiyetin artırılması için bakteriyofajların yüzeyde yönlendirilmiş immobilizasyonu, rastgele immobilizasyona kıyasla kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, canlı bakteri hücrelerinin tespiti için T2 bakteriyofajının (virüs) kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu, polietilenim ile fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüpler (CNT) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Zhou ve diğerleri, 2017). Söz konusu çalışmada, yönlendirilmiş faj immobilizasyonu, elektrik alan ile uyarılan immobilizasyon, yük yönlendirmeli immobilizasyon ve kovalent çapraz bağlama tekniklerinin kombinasyonu ile sağlanmıştır. İlk olarak, çok duvarlı karbon nanotüpler, pozitif yüzey yükü elde etmek amacıyla polietilenim ile modifiye edilmiştir. Ardından, faj birikimini teşvik etmek için pozitif potansiyel uygulanmış ve sonrasında 1-pirenbütanoik asit süksinimidil ester (PBSE) aracılığıyla yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır. Bu yöntem, bakteriyofajın yüzeyde

yönlendirilmiş immobilizasyonunu mümkün kılarak yüksek biyoreseptör yoğunluğuna ulaşılmasını sağlamış ve bu durum sensörün hassasiyet ve seçiciliğinin artmasına önemli katkıda bulunmuştur.

Bakteri kaynaklı biyoimprintli filmler, seçici bakteri tespiti amacıyla araştırılmıştır. Bu yöntemde, indirgenmiş grafen tabakaları ve kitosan, bakteriyel bağlanma matrisi olarak işlev gören indiyum kalay oksit (ITO) yüzeyine elektrokaplanmıştır. Sülfat indirgeyici bakterilerin (SRB) adsorpsiyonunu takiben, bakterilerin çevresine ince bir kitosan tabakası kaplanmıştır. Ardından, SRB yüzeyden uzaklaştırılarak biyosensör yüzeyinde özgül bir biyoimprint oluşturulmuştur. Hedef SRB'nin yeniden bağlanması, biyosensörün empedans değişimleri aracılığıyla izlenmiş ve bu biyoimprint, 10^4 ile 10^8 CFU/mL aralığında hedef SRB'nin yakalanmasını sağlamıştır.

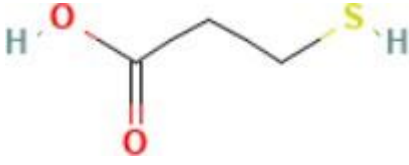
Dokular ve organlar

Dokular ve organlar da enzim veya kemoreseptörlerin uygun maliyetli ve kullanışlı kaynakları olabilir ve karmaşık ve özelleşmiş tanıma yetenekleri sunabilir. Bu reseptörler, tüm biyomoleküler yolların ve kofaktörlerin mevcut olduğu doğal ortamlarında bulunduklarında istikrarlı ve optimum aktivite sağlarlar. Elektrot üzerindeki immobilizasyon genellikle yarı geçirgen bir zarın içine hapsedilerek yapılır. Avantajları ve dezavantajları, tüm hücre elemanlarının durumuna benzer, hatta daha da belirgindir. Biyosensör kullanımları için uygun dokular hem bitkilerden hem de hayvanlardan elde edilebilir (Pasquarelli, 2021 ; Wijesuriya ve Rechnitz, 1993).

2.14. 3-Merkaptopropiyonik Asit (3-MPA)

Düşük molekül ağırlıklı tiyoller, doğal ortamlardaki biyolojik dönüşümleri nedeniyle önemlidir. Aslında, mikrobiyal organik kükürt dönüşümlerinde yer alan süreçlerde önemli ara maddeler olarak kükürt biyojeokimyasında temel bir role sahiptirler. Ek olarak, tıp, gıda, ilaç ve aroma endüstrilerindeki benzersiz rolleri nedeniyle önemli bir bileşik grubudurlar.

3-Merkaptopropionik asit (3-MPA), $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ formülüne sahip bir organosülfür bileşiğidir. Hem karboksilik asit hem de tiyol grupları içeren bifonksiyonel bir moleküldür. Renksiz bir yağdır. Akrilik aside hidrojen sülfür eklenmesiyle elde edilir.



Şekil 2.15. 3-Merkaptopropiyonik asidin kimyasal yapısı

Glutamat dekarboksilazın rekabetçi inhibitörüdür ve bu nedenle konvülzan olarak etki eder. Allilglisine kıyasla daha yüksek bir potansiyele ve daha hızlı bir etki başlangıcına sahiptir (Horton ve Meldrum, 1973). Altının kükürt ligandlarına olan afinitesinden yararlanarak hidrofilik altın nanopartikülleri hazırlamak için kullanılır (Subramanian ve diğerleri, 2004). Pentaeritritol bazlı pentaeritritol tetrakis(3-merkaptopropionat) gibi tiyol bazlı polimer çapraz bağlayıcı ajanlar oluşturmak için poliollerle esterleştirilir (Hoyle ve Bowman Christopher, 2010).

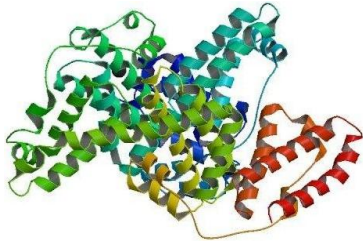
3-Merkaptopropiyonik asit (3-MPA), hem tiyol (-SH) hem de karboksilik asit (-COOH) fonksiyonel gruplarını içeren düşük moleküler ağırlıklı bir organik bileşiktir. Kısa karbon zincirine sahip olması nedeniyle, kendiliğinden oluşan tek tabaka (self-assembled monolayer, SAM) yapılarının oluşturulmasında yaygın olarak tercih edilir. 3-MPA, özellikle altın yüzeyler ve metal nanopartiküller ile yüksek afinite gösteren tiyol grubu aracılığıyla yüzeye bağlanır; serbest karboksilik grup ise yüzey modifikasyonuna veya biyoreseptör immobilizasyonuna olanak tanır. Bu özellikleri sayesinde, 3-MPA genellikle nanopartiküller üzerinde kaplayıcı (capping) ajan olarak görev yapar ve biyosensör yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesinde kritik rol oynar. Yüzeyin kimyasal özelliklerinin kontrol edilmesine ve biyomoleküllerle özgül etkileşimlerin sağlanmasına imkân tanıyan bu yapı, elektrokimyasal biyosensör uygulamalarında yüksek hassasiyet ve özgüllük elde edilmesine katkıda bulunur (Fan ve diğerleri, 2015).

2.15. Bovine (Sığır) Serum Albumini (BSA)

Sığır serum albümini (BSA veya "Fraction V") ineklerden elde edilen bir serum albümin proteindir. Sığır serum albümini (BSA), karaciğerde sentezlenen ve 538 amino asit kalıntısı olan tek bir polipeptit zincirinden oluşan, 66,5 kDa ağırlığında çok yönlü, monomerik bir

proteindir. Ekstraselüler sıvı hacmini stabilize etmedeki ve steroidler, yağ asitleri ve tiroid hormonları dahil olmak üzere çeşitli küçük moleküller için bir taşıyıcı görevi görmedeki önemli rolü, bilimsel araştırmalarda ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın kullanımının temelini oluşturur. Bir antioksidan olarak BSA, zararlı serbest radikalleri yakalayarak hücresel korumaya katkıda bulunur (Majorek ve diğerleri, 2012).

BSA, yapısal olarak üç homolog fakat birbirinden farklı alana sahiptir. Bu alanlar, alan I, alan II ve alan III olarak tanımlanır. Her bir alan, yapısal düzen bakımından A ve B olmak üzere iki alt alana ayrılır. Bu modüler yapı, BSA'nın ligand bağlama kapasitesini ve çok yönlü biyolojik işlevlerini destekleyen temel yapısal özelliktir (Majorek ve diğerleri, 2012). BSA, özellikle yapısal olarak %76 oranında benzer olduğu insan serum albümini olmak üzere diğer serum albümin proteinleri için sıklıkla model olarak kullanılır.



Şekil 2.16. BSA yapısı (www.rcsb.org).

BSA'nın moleküler yapısı, steroidler, yağ asitleri ve hormonlar gibi çeşitli küçük moleküller için taşıyıcı protein rolünü desteklemek üzere tasarlanmıştır. Amino asit bileşimi, yapısal bütünlüğü korumak ve bağlanma etkileşimlerini etkinleştirmek için çok önemli olan lizin, lösin ve valin gibi temel kalıntıları içerir. Hidrofilik ve hidrofobik amino asitlerin varlığı, BSA'nın bir dizi ligandla etkili bir şekilde etkileşime girmesini sağlar.

BSA'nın üçüncül yapısı, sistein kalıntıları arasında oluşan çok sayıda disülfür bağıyla kararlı hale getirebilir. Bu bağlar, proteinin fizyolojik koşullar altında kararlılığını korumak için hayati önem taşır. Ayrıca, BSA'nın yaklaşık 4,7'lik bir izoelektrik noktası (pI) vardır ve bu, çözünürlüğünü ve değişen pH seviyelerinde diğer moleküllerle etkileşimini etkiler.

BSA içindeki fonksiyonel gruplar, kan dolaşımındaki çeşitli ligandları bağlamasına ve taşımaya olanak tanıyarak biyokimyasal özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunur. Bu

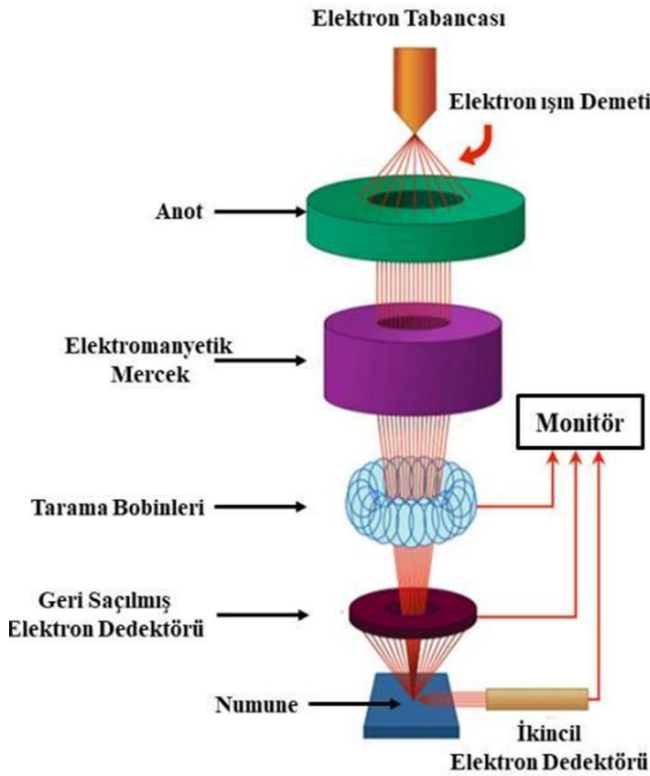
bağlanma kapasitesi, vücuttaki küçük molekülleri kararlı hale getirme ve taşımadaki önemini vurgular.

2.16. Biyoaktif Tabakanın Değerlendirilmesi

2.16.1. Fiziksel olarak değerlendirilmesi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscopy, SEM), düşük enerjide hareket eden bir elektron demeti kullanarak örnekleri odaklayıp tarayan, mikroorganizmaların yüzeylerini tarayan bir tür elektron mikroskobudur. Elektron mikroskoplarının geliştirilmesi ışık mikroskoplarının dalga boylarının yetersiz olmasından kaynaklanmıştır. Elektron mikroskopları ışık mikroskobuna göre çok kısa dalga boylarına sahiptir, bu da daha iyi çözünürlük gücüne olanak sağlar.



Şekil 2.17. Taramalı Elektron Mikroskobunun Çalışma Prensibi

İletilen elektronları kullanan transmisyon elektron mikroskobu'nun aksine, taramalı elektron mikroskobu yayılan elektronları kullanır. Taramalı elektron mikroskobu, elektronların etkileşimi sonucu kinetik enerji uygulanarak sinyaller üretilmesi prensibine göre çalışır. Bu

elektronlar, kristalleşmiş elementleri ve fotonları görüntülemek için kullanılan ikincil elektronlar, geri saçılmış elektronlar ve kırınımlı geri saçılmış elektronlardır. Görüntüyü oluşturmak için ikincil ve geri saçılan elektronlar kullanılır. Numuneden yayılan ikincil elektronlar, numunenin morfolojisi ve topografisinin tespit edilmesinde birincil rol oynarken, geri saçılan elektronlar numunenin elementlerinin bileşiminde kontrast gösterir (Goldstein, 2003).

Elektronların kaynağı ve elektromanyetik mercekler, kolonun en üst kısmına yerleştirilen tungsten filaman lambalardan gelir ve transmisyon elektron mikroskobundakilere benzer. Elektron kaynağına termal enerji uygulandıktan sonra elektronlar yayılır ve pozitif yüklü anoda hızlı bir şekilde hareket etmelerine izin verilir (Egerton, 2005).

Elektron demeti, numune yüzeyinden yüksek enerji seviyelerinde birincil saçılmış (birincil) elektronların ve düşük enerji seviyelerinde ikincil elektronların emisyonunu aktive eder. Elektron demeti numuneyle etkileşime girerek numunenin yüzey topografyası ve bileşimi hakkında bilgi veren sinyaller üretir (Egerton, 2005) .

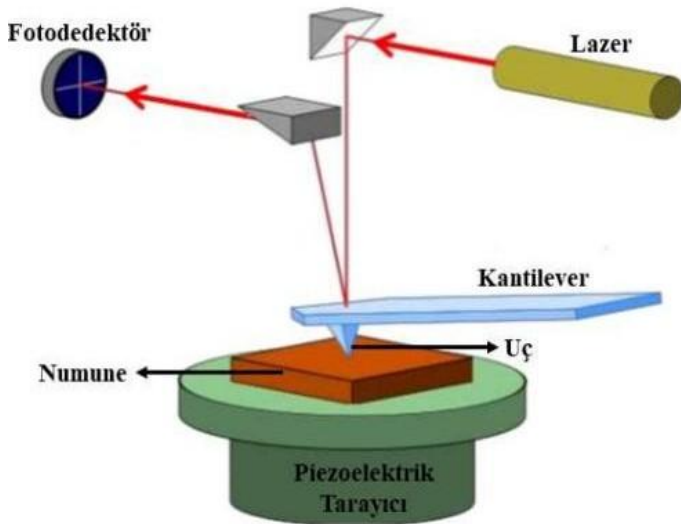
Numunenin SEM altında görüntülenmesi için özel bir işleme gerek yoktur, hatta hava ile kurutulmuş numuneler bile doğrudan incelenebilir. Ancak hücrelerin yapısal özelliklerinin korunması ve mikroskobun yüksek vakumuna maruz kaldığında çökmesinin önlenmesi için mikrobiyal örneklerin fiksasyon, dehidratasyon ve kurutulmasına ihtiyaç vardır. Örnekler, numunenin yüzeyindeki elektrik yüklerinin mekansal dağılımına izin vermek için ince bir ağır metal element tabakasıyla kaplanır, bu da yüksek netlikte daha iyi görüntü üretimi sağlar (Egerton, 2005 ; Goldstein, 2003).

Bu mikroskopla tarama, elektron demetinin mikroskobun ince bir kesiti üzerinde ileri geri kaydırılmasıyla elde edilir. Elektronlar numuneye ulaştığında, yüzey ikincil elektronlar olarak bilinen küçük bir elektron yığını serbest bırakır ve bu elektronlar daha sonra özel bir dedektör cihazı tarafından yakalanır. İkincil elektronlar dedektöre ulaştığında ve girdiğinde bir sintilatöre (yüklü bir parçacık veya yüksek enerjili bir foton çarptığında floresan ışığı yayan bir lüminesans malzemesi) çarparlar. Bu, bir fotoçoğaltıcı tarafından elektrik akımına dönüştürülen ışık flaşları yayar ve katot ışın tüpüne bir sinyal gönderir. Bu, izlenebilen ve fotoğraflanabilen, televizyon görüntüsüne benzeyen bir görüntü üretir (Egerton, 2005 ; Goldstein, 2003).

Dedektöre giren ikincil elektronların miktarı, numunenin doğası tarafından büyük ölçüde belirlenir, örneğin dedektöre giren yüksek miktarda elektronu almak için yükseltilmiş yüzeyler, basık yüzeylerde ise yüzeye ulaşan daha az elektron vardır ve dolayısıyla dedektöre giren elektron sayısı daha azdır. Bu nedenle ekranda yükseltilmiş yüzeyler daha parlak, basık yüzeyler ise daha koyu görünecektir (Egerton, 2005 ; Goldstein, 2003).

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu (atomic force microscopy, AFM), taramalı prob mikroskobu (scanning probe microscopy, SPM) tekniklerinden biridir. Genel çalışma prensibi aşağıda gösterildiği şekilde özetlenebilir: Ucu genellikle silisyum (Si) veya silisyum nitrürden (Si_3N_4) üretilen ve tipik olarak 1 nm ile 20 nm arasında, bazen daha büyük yarıçapa sahip bir prob, bir kantileverin ucuna bağlanır. Bu kantilever, belirli bir yay sabitine sahip olacak şekilde titreşebilir ve genellikle birkaç onlar ile birkaç yüz kilohertz arasında frekanslarda çalışır. Bir fotodiyot üzerindeki sinyalin ölçülmesiyle, uç ile yüzey arasındaki kuvvet sabit tutulacak şekilde kantilever tutucusunun z-ekseni boyunca pozisyonu değiştirilir. Bu z-eksenindeki hareket, yüzey topografyasına dönüştürülerek yüzeyin yüksek çözünürlüklü bir haritası elde edilir (Giessibl, 1995 ; Jandt, 2001; Zhou ve Du, 2022 ; Joshi ve diğerleri, 2022).

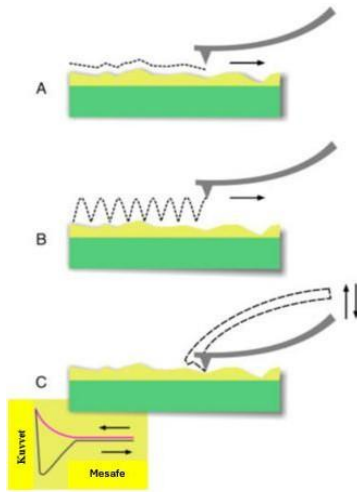


Şekil 2.18. AFM çalışma prensibi (Jandt, 2001; Joshi ve diğerleri, 2022).

Uç ile yüzey arasındaki kuvvetler, uç üzerinde herhangi bir işlevsel modifikasyon yapılmadığı durumlarda çoğunlukla elektrostatik Coulomb kuvvetlerine (itici) ve van der Waals kuvvetlerine (çekici) dayanır ve büyüklükleri son derece küçüktür; genellikle 10^{-11} N

ile 10^{-7} N aralığındadır. Uç ile yüzey arasındaki oldukça küçük mesafeler genelde 0,1 nm ile 10 nm arasında özellikle yüzeyin tamamen düzgün olduğu ideal koşullarda, yaklaşık 0,1 nm'de çözünürlük elde edilmesini mümkün kılar. Bununla birlikte, bahsedilen kuvvetlere ek olarak farklı kuvvetler de bu etkileşimlere üst üste binebilir ve AFM görüntülerinin yorumlanması sırasında dikkate alınmaları gerekir (Jant, 2001; Joshi ve diğerleri, 2022).

Kantilever, örnek yüzeyine farklı yaklaşımlarla hareket ettirilebilir; bu yaklaşımlar genellikle temas modu veya dinamik (tapping) mod olarak sınıflandırılır (Liu ve Wang, 2010). Temas modunda daha yüksek düzeyde çözünürlük elde edilebilmesine rağmen, uç ile yüzey arasındaki sürtünme kaynaklı lateral kuvvetler, özellikle yumuşak veya düzensiz topografiye sahip örneklerde yüzey hasarına yol açabileceğinden, bu tür örneklerde sıklıkla dinamik mod tercih edilmektedir. Dinamik modda, kantilever rezonans frekansına yakın bir frekansta salınım yapar ve yalnızca yüzeye kısa süreli temaslarda bulunur; böylece ucu yüzeye yapışmadan yatay tarama gerçekleştirilir (Liu ve Wang, 2010).



Şekil 2.19. AFM çalışma modları: (A) temas modu; (B) topografik görüntüleme için dinamik mod (dinamik moddaki salınım frekansı görseldekinden çok daha yüksektir, uç piksel başına birçok kez salınım yapar); ve (C) etkileşim araştırması için kuvvet spektroskopisi modu (Liu ve Wang, 2010).

Temassız modda ise kantilever benzer şekilde titreşir, ancak daha düşük genlikte ve yüzeyle fiziksel temas kurmadan çalışır. Yang ve ark. , temassız modun örneğe yalnızca minimal düzeyde mekanik yük bindirdiğini, ancak bu durumun ölçüm hassasiyetinden ödün verilmesine neden olduğunu belirtmiştir (Yang ve diğerleri, 2007). Ayrıca, tapping modunun özellikle sıvı ortamlarda yumuşak malzemelerde deformasyon riskini artırabileceği

bildirilmiştir. Son on yıl içerisinde, bu tür topografik incelemeler; gıda biyopolimerleri (Morris ve diğerleri 2001), biyopolimer ağları (Morris ve diğerleri, 2000), proteinler ve DNA (Hansma ve diğerleri, 2000 ; Ellis, 2005) ile hidrojel sistemleri (Raghuwanshi ve Garnier, 2019) gibi çok çeşitli biyolojik ve polimerik materyaller üzerinde başarıyla uygulanmıştır.

Topografik ölçümler, özellikle homojen ve izotropik yüzeylerde yüzey pürüzlülüğünün nicel olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Ancak, anizotropik morfolojiye sahip yapılar, örneğin nanofiberler veya fibroblastlar gibi genellikle yalnızca pürüzlülük ölçümlerinden çok, tam yüzey topografisi üzerinden elde edilen görsel ve yapısal veriler aracılığıyla daha anlamlı bilgiler sunar.

Uç ile yüzey arasındaki etkileşim kuvvetlerinin belirlenmesine olanak tanıyan kuvvet spektroskopisi modunda, uç tarafından uygulanan kuvvetle ilişkili olarak kantileverin sapma miktarının ölçülmesiyle, dikey yer değiştirme süreci boyunca kuvvet-mesafe eğrileri elde edilebilmektedir. Bu mod, özellikle mikroorganizmalar, nanopartiküller, hidrojjeller veya diğer küçük ölçekli numunelerin karakterizasyonu açısından önem taşımakta olup, makroskobik mekanik testlerle elde edilen değerlerden farklılık gösterebilen elastik modül (Young modülü) gibi mekanik özelliklerin hesaplanmasına da imkân sunar (Liu ve Wang, 2010). Kuvvet-mesafe eğrisinin yaklaşma fazında (eğrinin kırmızı bölgesi), elektrostatik ve van der Waals kuvvetlerine bağlı olarak artan bir kuvvet gözlemlenir. Geri çekilme fazında ise, uç öncelikle adezyon kuvvetleri nedeniyle yüzeye yapışır; bu durum kuvvetin belirgin şekilde azalmasına ve kantileverin negatif sapmasına neden olur. Sonrasında ise uç yüzeyden ayrılır ve kuvvet değeri başlangıç seviyesine geri döner. Genellikle bu kuvvetler, hücreler, dokular, yumuşak hidrojjeller ve çeşitli biyopolimer formları gibi biyolojik örneklerde oldukça düşük düzeydedir. Ancak, AFM ucunun özgül fonksiyonel gruplar veya moleküllerle modifiye edilmesi durumunda, uç ile numune arasındaki seçici etkileşimlerden daha detaylı yapısal ve kimyasal bilgi elde edilmesi mümkün hale gelmektedir.

Temas açısı

Temas açısı ölçümü, özel ıslatma yüzeylerinden mürekkep püskürtmeli ve püskürtmeli soğutma teknolojilerine kadar çeşitli uygulamalarda yüzey özelliklerini araştırmak için basit ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Mishchenko ve diğerleri, 2010 ; Spori ve diğerleri, 2008). Sıvı damlasının katı bir yüzey üzerindeki temas açısı kavramı ilk olarak

1805 yılında Thomas Young tarafından ortaya konmuştur. Young'ın adıyla anılan ve literatürde yaygın olarak kullanılan denge denklemi, eşitlik 1'de

$$\gamma_{ls} + \gamma_{lg} \cos \theta_e = \gamma_{sg} \quad (1)$$

şeklinde ifade edilir. Bu denklem, sıvı (l), gaz (g) ve katı (s) fazlarının kesişiminde yer alan üçlü temas hattında etkili olan yüzey gerilimleri (γ) arasındaki ilişkiyi, denge temas açısı (θ_e) bağlamında tanımlayan bir kuvvet dengesi esasına dayanmaktadır (Kung ve diğerleri 2019 ; Akbari ve Antonini, 2021; Drelich ve diğerleri, 2020).

Bir sıvı ile katı yüzey arasındaki temas açısı (θ), bu iki faz arasındaki karmaşık etkileşimlerin makroskopik düzeydeki bir yansımasıdır ve yüzeyin mikro/nano ölçekli kimyasal bileşimi, topografik özellikleri ve kılcal kuvvetleri hakkında değerli ipuçları sağlar. Hidrofobik yüzeylerde temas açısı 90° 'nin üzerinde olup, sıvı damlası küresel bir form alırken; hidrofilik yüzeylerde 90° 'nin altında değerler gözlenir ve damla yüzey boyunca yayılma eğilimindedir (Akbari ve Antonini, 2021 ; Butt ve diğerleri, 2014 ; Mugele ve Heikenfeld, 2018 ; Qu'er'e, 2008).

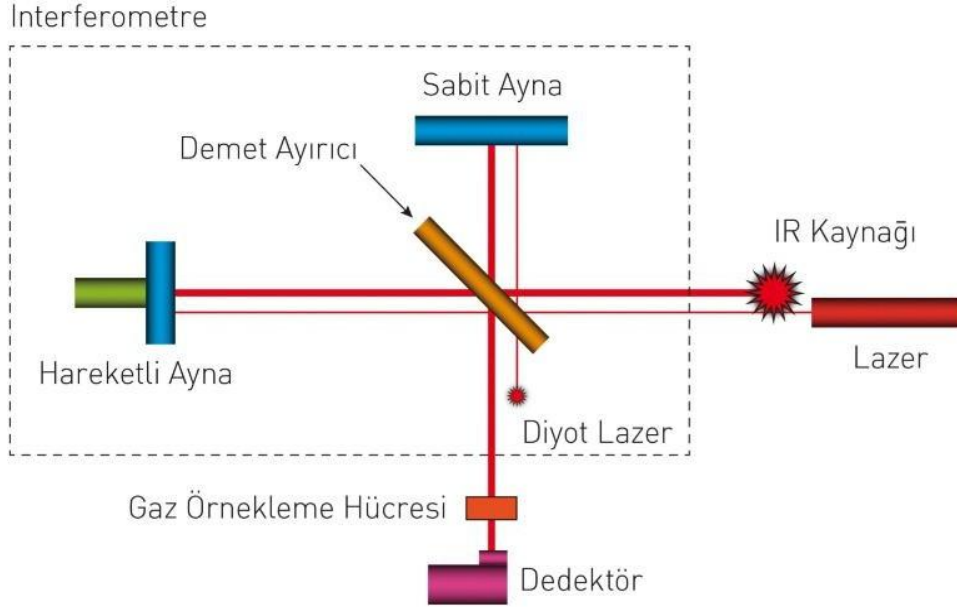
Wenzel ve Cassie-Baxter modelleri, pürüzlü yüzeylerde temas açısının nasıl değiştiğini açıklamak amacıyla geliştirilmiş ve bu bağlamda yüzey morfolojisinin temas açısı üzerindeki etkilerini teorik olarak ortaya koymuştur (Wenzel, 1936 ; Cassie ve Baxter, 1944). Bu nedenle, temas açısı ölçümleri, özellikle yüzey modifikasyonu, kaplama teknolojileri ve biyomalzeme araştırmalarında yüzey özelliklerinin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.16.2. Kimyasal olarak değerlendirilmesi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Kızılötesi spektroskopisinin (IR) tercih edilen yöntemi fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisidir. Kızılötesi spektroskopisinde IR radyasyonu bir numune üzerinden iletilir. Numune kızılötesi enerjinin bir kısmını emer, bir kısmını da aktarır (geçirir). Elde edilen spektrum moleküler emilimi ve iletimi temsil eder ve numunenin moleküler parmak izini oluşturur. İki parmak izi asla uyuşmadığı gibi, hiçbir iki benzersiz moleküler yapı da aynı IR spektrumunu üretmez. Bu, IR spektroskopisini birçok analiz türü için kullanışlı hale getirir (Thermo Nicolet Corporation; Dutta, 2017).

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometreleri genellikle organik sentez, polimer bilimi, petrokimya mühendisliği, ilaç sektörü ve gıda analizlerinde kullanılır. Ayrıca, FT-IR spektrometreleri kromatografi ile birleştirilebildiğinden, kimyasal tepkimelerin mekanizmasının araştırılması ve kararsız bileşiklerin tespiti için kullanılabilir.



Şekil 2.20. FT-IR Çalışma Prensibi

Her bir malzemenin kendine özgü bir bileşimi ve buna bağlı olarak farklı atom dizilimi olduğundan, hiçbir iki bileşik tam olarak aynı IR spektrumunu üretmez. Bu nedenle IR spektroskopisi her türlü malzemenin pozitif olarak tanımlanmasını (kalitatif analiz) sağlayabilir. Ayrıca spektrumdaki bir tepe noktasının büyüklüğü, orada bulunan madde miktarının doğrudan bir göstergesidir. Modern yazılım algoritmalarıyla IR, kantitatif analiz için mükemmel bir araçtır.

2.17. ELISA, ECLIA ve Biyosensör Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Bilimsel araştırmalarda ve klinik tanı süreçlerinde biyobelirteç tespitine yönelik kullanılan yöntemler, duyarlılık, özgüllük, analiz süresi ve maliyet gibi çeşitli kriterler bakımından farklılık göstermektedir.

Günümüzde en yaygın kullanılan yöntemler arasında Enzim-bağlı immünosorbent test (ELISA), Elektrokemilüminesans immünoassay (ECLIA) ve biyosensör tabanlı cihazlar yer almaktadır. ELISA, yüksek duyarlılık ve özgüllük avantajı ile araştırma ve tanı amaçlı olarak

standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. ECLIA ise yüksek otomasyon düzeyi sayesinde klinik laboratuvarlarda çok sayıda parametrenin hızlı ve eş zamanlı ölçümünü mümkün kılmaktadır.

Son yıllarda gelişmekte olan biyosensör teknolojileri ise yüksek hassasiyet, düşük örnek hacmi gereksinimi ve taşınabilirlik gibi özellikleriyle öne çıkmakta, özellikle hasta başı (point-of-care) testlerde büyük potansiyel taşımaktadır.

Bu yöntemlerin farklı avantaj ve sınırlılıklarını daha net açıklamak amacıyla ELISA, ECLIA ve biyosensör cihazlarının temel özellikleri Çizelge 2.3’de verilmiştir (Bhattoa ve diğerleri, 2020 ; Chen ve diğerleri, 2023;D’Orazio, P., 2003; Yu ve diğerleri, 2024 ; Wild , 2018).

Çizelge 2.3. Biyosensör, ECLIA ve ELISA Cihazlarının Karşılaştırılması

Özellikler	Biyosensör	ECLIA	ELISA
Genel Mekanizma	Biyolojik tanıma elemanı (antikor, enzim, DNA gibi) ile analit arasındaki etkileşimin bir fiziksel sinyale (elektrik, optik veya piezoelektrik, vb.) dönüştürülmesi	Kimyasal-enzimatik tepkimelerin fotometrik, türbidimetrik veya elektrokimyasal ölçümü	Antijen-antikor bağlanması üzerine dayalı, enzimatik tepkimenin renk değişimi (kromojenik substrat) ile saptanması
Numune Hacmi	Tasarımına bağlı olarak daha küçük hacimlerde ölçüm mümkün (1-50 µL)	50-100 µL	100-200 µL
Duyarlılık	Çok yüksek (10^{-12} - 10^{-15} M, pg/mL)	Yüksek (10^{-11} – 10^{-13} M)	Orta (10^{-9} - 10^{-11} M))
Tayin Aralığı	0,1-100 ng/mL (tasarımına bağlı)	0,2 – 200 ng/mL	1 -500 ng/mL
LOD (Saptama sınırı)	0,01-0,5 ng/mL	0,05-1,0 ng/mL	0,5-5,0 ng/mL
Özgüllük	Biyoreseptörün seçiciliğine bağlı olarak yüksektir	Analiz yöntemine göre değişkenlik gösterir, çapraz tepkime riski vardır	Antikor seçiciliğine bağlı olarak yüksektir
Tekrarlanabilirlik	%2-6	%3-5	%5-10
Tekrarüretilebilirlik	%4-8	%4-7	%8-12

Analiz Süresi	Dakika (gerçek zamanlı ölçü yapabilir)	Dakikalar-saatler (tam otomatik-çoklu test imkanı)	2-6 saat (birden fazla basamaklı işlem içerir)
Otomasyon Uygunluğu	Yüksek (mikroçip, lab-on-a-chip sistemleri)	Yüksek (tam otomatik analizörlerde)	Orta (manuel veya yarı otomatik)
Teknik Alt-Yapı İhtiyacı	Saha kullanımına uygundur. Masaüstü veya portatif cihazlardır	Yüksek otomasyonlu cihazlar, klinik laboratuvar koşulları gereklidir.	Manuel veya yarı otomatik kit gereklidir, laboratuvar ortamı zorunludur, mikrotitre plaka okuyucu
Maliyet	Geliştirme maliyeti yüksek, kullanım maaliyeti düşük olabilir. Değişkenlik gösterir	Cihaz maliyeti yüksektir, test başına maliyet düşüktür	Kit maliyeti yüksek, cihaz basittir
Birden Fazla Analiz İmkanı	Multipleks sensörler ile mümkün	Aynı anda çok sayıda parametre- yüksek	Sınırlı- tek parametre
Taşınabilirlik	Yüksek- (mini sistemler point-of-care uyumlu, geliştirilebilir)	Orta (laboratuvar tabanlı cihaz)	Düşük (mikroplaka okuyucuya bağımlı)
Klinik Uygulamalar	Point-of-care testler, kişiselleştirilmiş tıp, giderek artan (non-invaziv tükürük/idrarda ölçüm olanağı)	Rutin biyokimya, hematoloji ve immünoloji testleri (yaygın (serum/plazma testlerinde)	Araştırma amaçlı biyobelirteç ölçümleri
Avantajlar	Hızlı, çok yüksek duyarlılık, taşınabilir, gerçek zamanlı ölçüm	Yüksek hassasiyetli, geniş dinamik aralığı ve çok parametrelili analiz imkanı	Yüksek özgüllük, standart yöntem
Dezavantajlar	Yeni teknoloji validasyon ve standardizasyonu kısıtlı	Yüksek cihaz maliyeti, taşınabilir olmaması	Analiz süresi uzun, birden fazla basamaklı işlem gerektirmesi, laboratuvar ortamının gerekliliği

2.18. Yöntem Karşılaştırma Analizi

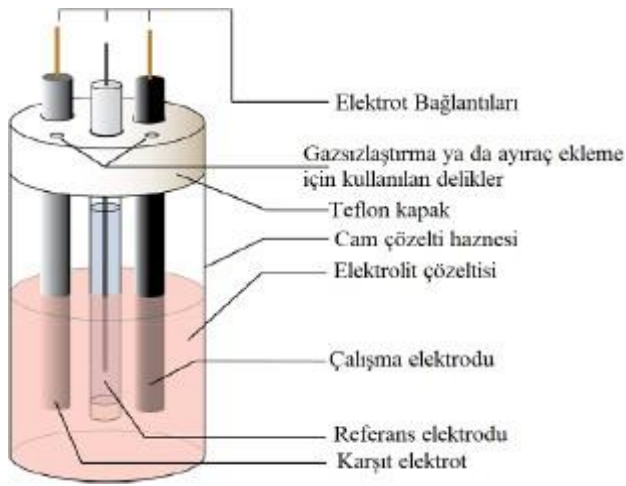
Yöntem karşılaştırma çalışmaları, bilimsel araştırmalarda yeni geliştirilen veya alternatif ölçüm yöntemlerinin doğruluk ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla kullanılan önemli yaklaşımlardır. Bu kapsamda elde edilen verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında sıklıkla Scatter Plot, Bland-Altman analizi, Deming regresyonu ve Passing-Bablok

regresyon analizi tercih edilmektedir. Scatter Plot, iki yöntemin ölçüm sonuçları arasındaki genel ilişkiyi görsel olarak sunarken, Bland-Altman analizi yöntemler arasındaki sistematik ve rastgele hataları ortaya koyarak uyumu değerlendirmede altın standart kabul edilmektedir. Deming regresyonu ise her iki yöntemin ölçüm hatalarını eşit düzeyde dikkate alarak sistematik sapma ve hata bileşenlerini daha doğru biçimde belirlemekte, bu yönüyle özellikle biyomedikal ve analitik kimya alanlarında yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Passing-Balok analizi ise iki nicel ölçüm yönteminin yani referans yöntem ile geliştirilen yöntemin birbirleriyle uyumunu ve sistematik farklarını değerlendirmek için kullanılan non-parametrik bir regresyon analizidir. Sonuç olarak, bu dört yöntemin birlikte uygulanması, ölçüm yöntemleri arasındaki uyumun ve farklılıkların kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Bland ve Altman 1986 ; Altman ve Bland 1983 ; Hollis, 1997 ; Pollack ve diğerleri 1992; Şemsi, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Üçlü Elektrot Sistemi

Elektrokimyasal ölçümler için gerçekleştirilen deneylerde kullanılan üç elektrotlu sistem, Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Elektrokimyasal hücre içerisinde ölçüm sırasında redoks özelliklere sahip bir çözelti bulunmaktadır. Bu sistemde, çalışma elektrodu olarak altın elektrot (Au), referans elektrot olarak gümüş klorür içerisinde yer alan gümüş tel (Ag/AgCl) ve karşıt elektrot olarak platin tel (Pt) tercih edilmiştir. Bu elektrotların seçimi, yüksek iletkenlik, kimyasal kararlılık ve doğru potansiyel ölçümleri sağlaması nedeniyle yapılmıştır.



Şekil 3.1. Üç elektrotlu sistem

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri ve döngüsel voltamogramlar PSTrace5.11 yazılımı içeren bilgisayarın bağlı olduğu Palm Sens marka Potansiyotat/Galvanostat cihazı ile gerçekleştirildi. Elde edilen ölçümler, ölçüm cihazının bağlı olduğu bilgisayar sistemine kurulu ve Palm Sens firmasının geliştirdiği PSTrace 5.11 yazılımı ile değerlendirildi.

3.2. Kullanılan Cihaz, Malzemeler ve Kitler

Çalışmada kullanılan gereçler ve kimyasal maddeler:

3.2.1. Cihazlar

- Altın Çalışma Elektrodu (Basi Mf 2014, ABD)
- Platin Tel Yardımcı Elektrot (Basi Mf 1032, ABD)

- Ag/AgCl Referans Elektrot (Basi Mf2021, ABD)
- Potensiyostat (Palm Sens EmStat3, Hollanda)
- Platin Tel Yardımcı Elektrot (CHI115, A.B.D)
- Ölçüm Hücresi (Basi C3, ABD)
- Sonikatör
- Manyetik Karıştırıcı (DB LAB)
- Hassas Terazî (Mettler Toledo)
- pH metre (DB LAB)
- Taramalı Elektron Mikroskobu (HITACHI SU8700)
- Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FT-IR)
- Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler
- Otomatik Eliza okuyucu ve yıkayıcı (Chromate Awareness Technology INC. ve COMBIWASH Human)
- ECLIA (ROCHE e-cobas Immunoassay System)

3.2.2. Kimyasal maddeler-çözeltiler

- Distile/Bidistile su
- [3-(Dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimit metiodit (EDC) Sigma
- N-Hidroksi süksinimit (NHS)- Sigma
- 3-Merkapto propiyonik asit (3-MPA)- Sigma
- NaOH (Sigma)
- HCl (Sigma)
- H₂SO₄ (Sigma)
- Alümina (Sigma)
- Alümina çözeltileri
- %96 Etil alkol (Sigma)
- Monosodyumhidrojenfosfat NaH₂PO₄ (Merck)
- Disodyumhidrojenfosfat Na₂HPO₄ (Merck)
- Glisin (Sigma)
- Potasyum ferrosiyanyür trihidrat (K₄[Fe(CN)₆]. 3H₂O)
- Potasyum ferrisiyanür trihidrat (K₃[Fe(CN)₆]. 3H₂O)
- Potasyum klorür (KCl)

- Procollagen I N- Terminal Propeptide (PINP) monoklonal antikor - MyBioSource
- Cross Linked C-Telepeptide of Type I Collagen (CTX I) monoklonal antikor- MyBioSource
- Yapay tükürük, serum ve idrar çözeltileri (Sigma ve Biochromozome)

3.2.3. Kullanılan tamponlar

Fosfat tamponu: 0,1 M, pH 7,0 fosfat (Disodyumhidrojen fosfat ve monosodyumhidrojen fosfat) tampon hazırlandı.

Asetat tamponu: 0,1 M, pH 5,5 asetat (Sodyumasetatrrihidrat ve asetik asit) tamponu hazırlandı.

Glisin tamponu: 0,1 M pH 8,5 Glisin (Glisin/NaOH) tampon hazırlandı.

3.2.4. Kullanılan çözeltiler

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl saf su ile seyreltilerek 0,1 M konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı haldeki sodyum hidroksit saf suda çözülerek 0,1 M konsantrasyonda çözelti hazırlandı.

5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$: Hassas terazide 1,0560 g $K_4[Fe(CN)_6]$ tartılarak daha önce hazırlanan 50 mM pH 7,4 fosfat tamponu ile 500 mL'ye tamamlandı.

5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$: Hassas terazide 0,8231 g $K_3[Fe(CN)_6]$ tartılarak daha önce hazırlanan 50 mM pH 7,4 fosfat tamponu ile 500 mL'ye tamamlandı.

Redoks prob çözeltisi : 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ ve 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltileri (1:1) 1 L olacak şekilde karıştırıldı, bu çözeltinin içerisine 3,72 mg KCl (0,1M) eklendi

0,2 M EDC (w/v): 115,02 mg EDC tartılarak 2 mL'ye hazırlanmış olan 50 mM pH 7,4 fosfat tamponu ile tamamlandı.

0,05 M NHS (w/v): 23,02 mg NHS tartılarak 2 mL'ye hazırlanmış olan 50 mM pH 7,4 fosfat tamponu ile tamamlanır.

5 mM 3-MPA : 600 μ L 3-MPA alınıp son hacim 15 mL olacak şekilde absolute (saf) etanolde çözülür.

3.2.5. Kitler

- PINP ELISA kiti (BT Lab; E1350Hu; Lot:202508007)
- β -CTX ELISA kiti (Elabscience; E-EL-H0960; Lot:WZ2866T63276)

3.3. Deneysel Yöntemler

3.3.1. Çalışma elektrodunun (altın elektrot) temizliği

Elektrokimyasal ölçümlerin doğruluk ve tekrarlanabilirliğini güvence altına almak amacıyla, çalışma elektrodu olarak kullanılan altın elektrot (Au elektrot) her deney öncesinde yüzey temizliği özenle uygulanarak hazırlanmıştır. Elektrot yüzeyinde önceki ölçümlerden kalan kalıntıların veya çevresel etkenlerden kaynaklanan safsızlıkların sonuçlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmamasını önlemek açısından bu işlem kritik önem taşımaktadır. Dolayısıyla, yüzey temizliğinin her deneyde tutarlı olacak şekilde sağlanmalı ve uygulanan adımlara özen gösterilmelidir.

Elektrot temizliği, fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal olmak üzere üç aşamalı olarak uygulanmıştır: Bir miktar gama-alümina çözeltisi kadife ped üzerine damlatılmış ve elektrot yüzeyi ped üzerinde hafif dairesel hareketlerle gezdirilerek mekanik temizlik uygulanmıştır. Bu adım ile yüzeyde bulunan tabaka ve olası kirleticiler uzaklaştırılmıştır. Ardından elektrot distile su ile durulanmış ve yüzeye adsorbe olmuş partiküllerin elimine edilmesi amacıyla 5–10 dakika süreyle %96'lık etil alkol içerisinde sonikasyona tabi tutulmuştur. Bu işlemin ardından elektrot yeniden distile su ile durulanmış ve ek olarak 10 dakika boyunca distile su içerisinde sonikatörde bekletilmiştir.

Mekanik ve kimyasal temizlik adımlarının ardından elektrot, elektrokimyasal temizlik işlemine alınmıştır. Bu aşamada, 0,1 N H_2SO_4 çözeltisi içerisinde +1,0 V ile -1,0 V potansiyel aralığında en az 15 döngü boyunca döngüsel voltametri ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Böylece elektrot yüzeyinde herhangi bir kalıntının kalmaması ve yüzeyin elektroaktif hale getirilmesi sağlanmıştır.

Temizlik işlemleri tamamlanan altın elektrot yüzeyi üzerine biyoaktif tabaka immobilize edilmiş ve elektrokimyasal çalışmalar bu hazırlanmış yüzey üzerinde yürütülmüştür.

3.3.2. Elektrokimyasal analiz metotları

Elektrokimyasal analizler, biyosensör geliştirme sürecindeki her bir modifikasyon adımının etkinliğini, altın elektrot yüzeyinin temizliğini doğrulamak ve antijen-antikor bağlanma düzeylerini belirlemek için kullanılmıştır. PINP ile β -CTX konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla EIS ve CV yöntemleri tercih edilmiştir. Tüm elektrokimyasal ölçümler, 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) ve 0,1 M KCl içeren çözelti kullanılarak, üç elektrotlu standart bir hücre konfigürasyonunda gerçekleştirilmiştir.

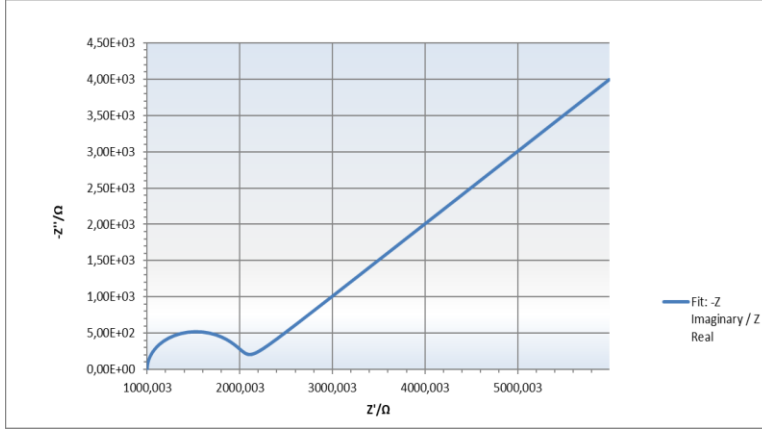
CV ölçümleri, -0,2 V ile 0,6 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızı ve 20 mV adım büyüklüğü kullanılarak; EIS ölçümleri ise 100 kHz ile 0.01 Hz frekans aralığında ve 5 mV genliğinde alternatif akım (AC) uygulanarak yapılmıştır. Tüm empedans ölçümleri, 0 V bias potansiyeli altında gerçekleştirilmiş olup, bu potansiyel bilgisi PSTrace 5.11 yazılımındaki Açık Devre Potansiyeli (OCP) komutu ile belirlenen değere dayanmaktadır.

3.3.3. Veri değerlendirilmesi ve eş değer devre modeli uygulaması

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS), yüzeyde meydana gelen elektrokimyasal süreçlerin rezistif ve kapasitif özellikler üzerindeki etkilerini hassasiyetle belirlemek için kullanılmıştır. Yöntem, elektrokimyasal hücreye düşük genlikli sinüzoidal bir voltaj ($U(j\omega)$) uygulanarak ölçülebilir bir akım tepkisi ($I(j\omega)$) elde edilmesine dayanır. Sistemin toplam elektriksel tepkisini tanımlayan empedans (Z), uygulanan voltaj ve elde edilen akım vektörleri arasındaki oran olarak tanımlanır ve $Z(j\omega) = Z_{re}\omega + jZ_{im}\omega$ (Eşitlik 2) şeklinde ifade edilir. Bu ölçüm parametreleri, potansiyostata entegre edilen frekans analizörü tarafından kaydedilip değerlendirilmiştir.

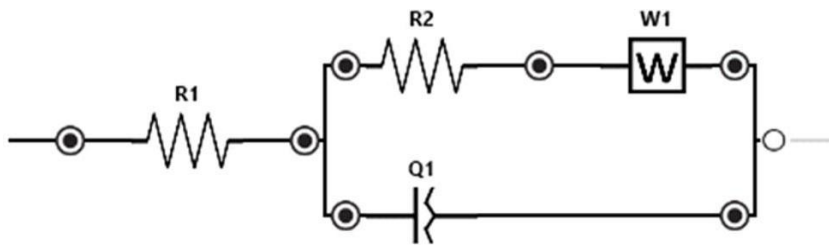
Empedans ölçümleri sonucunda elde edilen Z_{re} (gerçek bileşen) ve Z_{im} (sanal bileşen) değerleri, elektrot-elektrolit arayüzeyinin karakteristik direnç ve kapasitans unsurlarını temsil eder. Elektrot yüzey kalınlığında meydana gelen değişiklikler, yüzey kapasitansında gözlemlenen farklılıklarla ve yüzeyler arası elektron transfer direncinde (R_{et}) artışlarla kendini gösterir. R_{et} , elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks tepkimelerinin elektron transfer hızını doğrudan etkilediğinden, makromoleküllerin bağlanma bölgeleriyle (antijen-antikor etkileşimleri) gerçekleştirdiği özgül etkileşimler, elektrot yüzeyinde ayırt edici bir tabaka oluşturur. Bu tabaka, elektronların elektrot yüzeyine ulaşmasını zorlaştırarak elektron transfer direncinde artışa yol açar. Bu nedenle, bu çalışmada yüzey modifikasyon adımları

ile antijen-antikor kompleksleşme düzeyleri, dolaylı olarak R_{et} değeri üzerinden izlenmiştir. Elde edilen deneysel veriler, Şekil 3.2’de sunulan ve tipik bir Nyquist grafiği desenini gösteren eğriler ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Elde edilen Nyquist eğrisi

Verilerin nicel analizi ve arayüzey süreçlerinin ayrıştırılması için deneysel noktalar non-lineer en küçük kareler uyarlama (NLLS) yöntemiyle $[R_1(R_2Q_1)W]$ eşdeğer devre modeline başarıyla uyarlanmıştır (Şekil 3.3). Bu modelde R_1 (Çözelti Direnci, R_s), yüksek frekanstaki ohmik kaybı; yarı dairenin çapı olan R_2 (Şarj Transfer Direnci, R_{ct}), redoks probunun elektron transfer kinetiğini; yüzey heterojenliğini yansıtan Q_1 (Sabit Faz Elemanı, CPE), ideal olmayan çift katman kapasitesini; ve düşük frekanstaki lineer kısım ise kütle transferinin sınırlamasını temsil eden W_1 (Warburg Empedansı, Z_w) bileşenlerini ifade etmektedir. Bu uyarlama prosedürü, sistemin temel elektrokimyasal parametrelerinin yüksek doğrulukla belirlenmesini sağlamıştır.



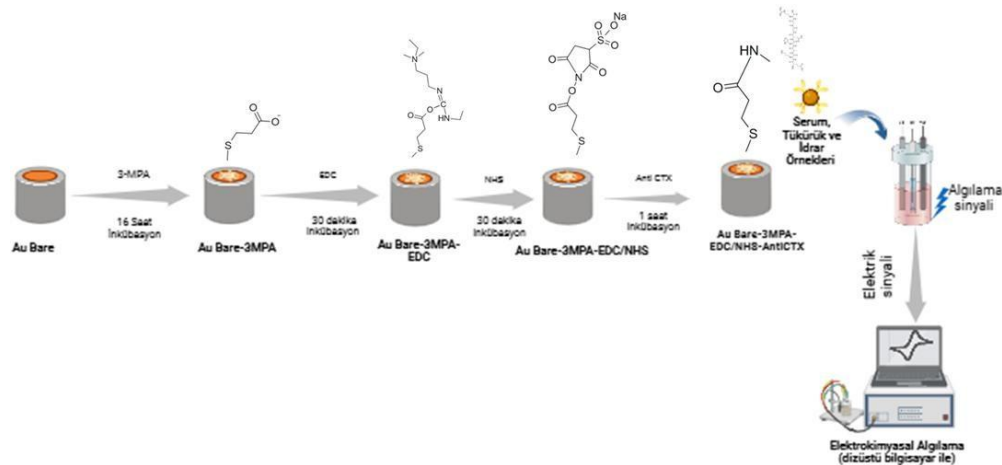
Şekil 3.3. PSTrace 5.11 yazılımı kullanılarak elde edilen eş değer devre modeli.

3.3.4. Tasarlanan β -CTX ve PINP biyosensörünün ölçüm prensipleri

β -CTX ve PINP biyosensörlerinin tasarımları; β -CTX ve PINP antikorlarının farklı kimyasal stratejiler ile 6 mm çapa ($0,28 \text{ cm}^2$ 'lik alana) sahip çalışma elektrodu merkezine uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Sonrasında analit β -CTX ve PINP miktar analizlerine geçilmiştir. Bu amaçla; standart analit çözeltilerinin 5'er μL 'lik porsiyonları (10 pg/mL β -CTX ve 5 ng/mL PINP içeren) elektrot yüzeylerine mikropipet yardımıyla eklenmiştir ve 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonra elektrot yüzeyine bağlanmamış CTX ve PINP proteinlerini uzaklaştırmak için ultra saf su ile elektrot yüzeyi yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elektrolit çözeltisinin bulunduğu hücrede CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Bu 5'er μL 'lik standart çözelti (10 pg/mL β -CTX ve 5 ng/mL PINP içeren) ilavesi ve yıkama işlemleri, ardından CV-EIS ölçümleri 6 kez tekrarlandı. Böylece, $10\text{-}60 \text{ pg/mL}$ β -CTX ve $10\text{-}60 \text{ ng/mL}$ PINP konsantrasyon aralığında geliştirilen biyosensörlerin cevapları elde edilmiştir .

3.4. β -CTX Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörün Hazırlanması

Biyosensör sisteminin geliştirilmesinde çalışma elektrodu olarak altın elektrot tercih edilmiştir. Elektrot yüzeyinde kendi kendine düzenlenen tek tabaka (SAM) oluşturmak amacıyla, elektrot 5 mM konsantrasyonunda ve etanolde hazırlanmış 3-Merkaptopropiyonik asit (3-MPA) çözeltisinde 16 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından, elektrot 50 mM fosfat tamponunda ($\text{pH } 7,4$) çözölmüş ve $0,2 \text{ M}$ EDC ile $0,05 \text{ M}$ NHS içeren çözeltiye daldırılarak, karanlık ortamda ve çalkalayıcıda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu adımda, SAM tabakasının serbest karboksil grupları N-hidroksi süksinimid esterlerine dönüştürülerek aktivasyon sağlanmıştır. Sonrasında, elektrot yüzeyi 10 pg/mL konsantrasyonundaki CTX'e özgül antikor (anti-CTX) $5 \mu\text{L}$ 'lik halinde elektrot yüzeyine pipetlendi ve 1 saat süreyle muamele edilerek antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyosensör tasarımı [Au-3MPA- $0,2 \text{ M}$ EDC/ $0,05 \text{ M}$ NHS- Anti-CTX] olarak tamamlanmıştır.



Şekil 3.4. Geliştirilen β -CTX biyosensörünün tasarımı sırasında Anti-CTX antikoru Au elektrot yüzeyine immobilizasyon basamakları

3.5. β -CTX Antikoru İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyon Çalışmaları

Çalışma koşullarının optimize edilmesi, biyosensörlerin duyarlılık, özgünlük ve tekrarlanabilirlik açısından daha yüksek performans göstermesine katkı sağlamakta, aynı zamanda sensörün potansiyel uygulama alanlarındaki etkinliğini de artırmaktadır. Bu doğrultuda, tasarlanan biyosensörün güvenilirliğini ve performansını en üst düzeye çıkarmak amacıyla deneysel koşullar sistematik olarak optimize edilmiştir.

3.5.1. SAM yapımında kullanılan 3-MPA konsantrasyonunun optimizasyonu

β -CTX biyosensörünün hazırlanmasında SAM oluşturmak için kullanılan 3-merkaptopropiyonik asitin optimum konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM konsantrasyonlarda hazırlanan 3-merkaptopropiyonik asit çözeltileri ile SAM oluşturularak 6 farklı biyosensör hazırlandı. Biyosensörün hazırlanmasında kullanılan diğer kimyasal bileşenlerin konsantrasyonları 0,2 M EDC/0,05 M NHS, Anti-CTX (10 pg/mL) ve CTX (10 pg/mL) olarak sabit tutuldu.

3.5.2. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu

SAM tabaka olarak kullanılan 3-merkaptopropiyonik asitin açıkta kalan karboksil uç gruplarını Anti-CTX antikoru amino gruplarıyla kovalent bağ yapabilmek üzere aktive etmek için EDC/NHS çözelti karışımı kullanıldı. Optimum EDC/NHS konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 0,3 M/0,1 M, 0,75 M/0,25 M ve 0,03 M/0,01 M, 0,2 M/0,05 M konsantrasyonlarında hazırlanan EDC/NHS karışımları kullanılarak biyosensörler

hazırlandı. İmmobilizasyon işleminde kullanılacak EDC/NHS çözelti karışımlarının konsantrasyonlarını belirlemek için gerçekleştirilen bu çalışmada, biyosensör hazırlanmasında kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları 3-MPA (5 mM), Anti-CTX (10 pg/mL) ve CTX (10 pg/mL) şeklinde sabit tutuldu.

3.5.3. Anti-CTX konsantrasyonunun optimizasyonu

Anti-CTX konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisini belirlemek amacıyla 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 pg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan Anti-CTX çözeltileri kullanılarak hazırlandı. Biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasal bileşenlerin konsantrasyonları 3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M) ve CTX (10 pg/mL) olarak sabit tutuldu.

3.6. β -CTX ve PINP Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonu

3.6.1. Doğrusal tayin aralığı

Optimum immobilizasyon koşullarında elde edilen sonuçlar kullanılarak [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-CTX (10 pg/mL) ve CTX (10 pg/mL)(1 saat)] hazırlanan biyosensör ile CTX (10-60 pg/ μ L) için; [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2M/0,05M) Anti-PINP (5 pg/mL) ve PINP (10 pg/mL)] hazırlanan biyosensör ile PINP (10-60 pg/mL) için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

3.6.2. β -CTX ve PINP biyosensör yüzey alanının hesaplanması

Biyosensörün elektrot yüzeyinde meydana gelen antikor molekülü ile kaplanma ölçüsünü belirlemek amacıyla; 15 farklı tarama hızında (10-100 mV) CV ölçümleri alındı. Elde edilen döngüsel voltamogramlardan yararlanılarak elde edilen veriler, aşağıda belirtilen Laviron Eşitliğine uygulandı:

$$Q=n \times F \times A \times \Gamma \quad (3)$$

Formülde;

Q: yük miktarı

A: elektrot alanı

n: 15 farklı tarama hızında elde edilen CV'lerden belirlenen, akımlara karşı çizilen grafiklerin eğimi

F: Faraday sabiti (96485 C/mol)

Γ : Kaplanan yüzey alanı (mol/cm^2)'dır.

Laviron eşitliği kullanılarak yalın elektrot ve antikor kaplanmış biyosensörün yüzey alanları belirlendi.

3.6.3. Tekrar üretilebilirlik

β -CTX ve PINP için optimize edilmiş değerleri kullanarak [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M) , Anti-CTX (10 pg/mL) ve CTX (10 pg/mL)(1 saat)] hazırlanan farklı biyosensörlerle PINP için optimize edilmiş olan değerler kullanılarak [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M) , Anti-PINP (5 ng/mL) ve PINP (5 ng/mL)(1 saat)] hazırlanan biyosensörlerde EIS ve CV ölçümleri alındı ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği araştırıldı.

3.6.4. Yapay serum, tükürük ve idrarda uygulama

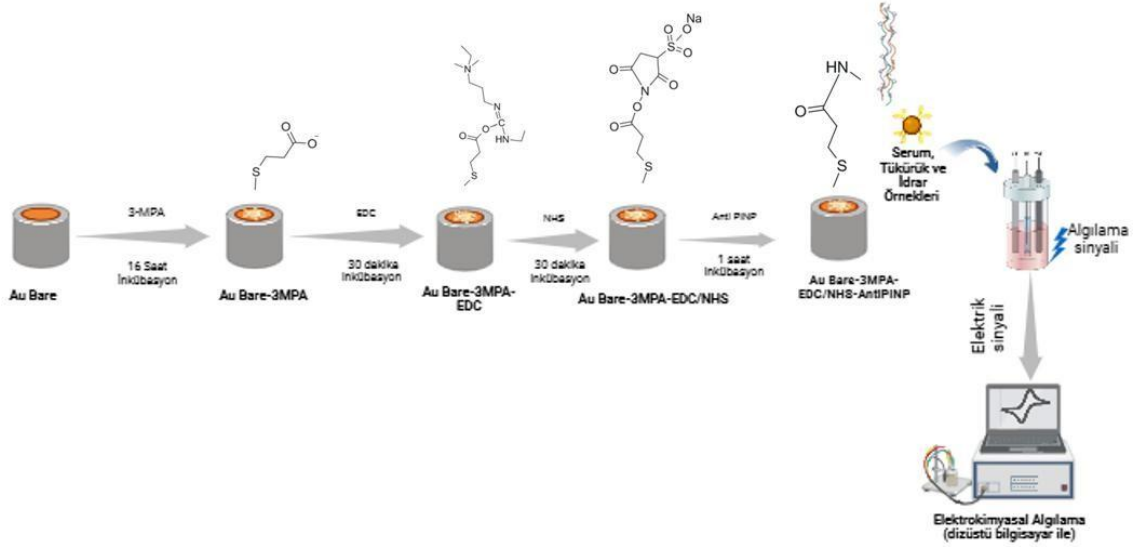
Hazırlanan β -CTX ve PINP biyobelirteçleri, matriks etkileşimlerini değerlendirmek üzere, yapay serum, yapay tükürük ve yapay idrar gibi üç farklı fizyolojik matrikste 10-60 pg/mL konsantrasyon aralığında standardize edilmiştir; bu çözeltilerle alınan EIS ve CV ölçümleri, biyosensör cevabı üzerindeki kompleks matriks bileşenlerinin interferans etkilerinin belirlenmesini sağlamıştır.

3.7. PINP Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörün Hazırlanması

PINP biyosensörünün geliştirilmesinde, en yüksek antikor bağlanma etkinliğini elde etmek amacıyla, anti-PINP antikorunun yapısal formuna odaklanan bir optimizasyon çalışması yürütülmüştür. İmmobilizasyon basamakları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

Altın elektrot yüzeyi, 3-MPA çözeltisi içinde 16 saat inkübe edilerek karboksil grupları içeren kararlı bir SAM oluşturulmuştur. Oluşturulan SAM üzerindeki karboksil grupları, pH 7,4 50 mM fosfat tamponu içinde çözülmüş 0,2 M EDC ve 0,05 M NHS çözeltileri kullanılarak 1 saat süreyle aktive edilmiştir. Biyoseçici tabakanın hazırlanması amacıyla, aktive edilmiş yüzey 1000 ng/mL monoklonal anti-PINP antikor çözeltisi ile 1 saat süreyle etkileştirilmiştir. Antikoru bağlanma kapasitesini ve analitik performans üzerindeki etkisini optimize etmek için, antikor çözeltileri 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve her bir konsantrasyon ile 60 dakikalık inkübasyonlar

gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyon, PINP antijenine karşı en yüksek bağlanma verimini sağlayan antikor formunun belirlenmesiyle sonuçlanmıştır.



Şekil 3.5. Geliştirilen PINP biyosensörünün tasarımı sırasında monoklonal Anti-PINP antikorunun Au elektrot yüzeyine immobilizasyon basamakları

3.8. PINP Antikorunun İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyon Çalışmaları

3.8.1. Antikor ve antijen için en uygun çözücü türünün belirlenmesi

Antijen ve antikor sisteminin en yüksek duyarlılıkta yanıt vereceği optimum çözelti ortamını belirlemek amacıyla farklı çözücüler test edilmiştir. Bu doğrultuda, pH 7,4 fosfat tampon sistemi, pH 6,0 MES tamponu ve ultra saf su kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın tüm immobilizasyon aşamalarında, belirli protokol adımları dikkatle takip edilmiştir.

Öncelikle, altın elektrot yüzeyinde SAM oluşturmak amacıyla 5 mM 3-MPA çözeltisi kullanılarak 16 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, SAM tabakasındaki karboksil gruplarının aktif esterlere dönüştürülmesi amacıyla, 50 mM pH 7,4’de hazırlanmış fosfat tamponu içerisinde çözölmüş olan 0,2 M EDC ve 0,05 M NHS çözeltileri ile 1 saatlik inkübe uygulanmıştır.

Antikor immobilizasyonu için 1000 ng/mL konsantrasyonunda monoklonal anti-PINP antikoru kullanılmış ve yüzeyle 1 saat süreyle etkileşim sağlanmıştır. Sonrasında, bağlanma kapasitesini değerlendirmek üzere, PINP proteinine ait çeşitli konsantrasyonlar (5, 10, 20,

30, 40 ve 50 ng/mL) kullanılarak her bir örnek 60 dakika süreyle yüzeyde inkübe edilmiştir. Bu çalışmalar, antijen ve antikor sisteminin en yüksek biyosensör yanıtını vereceği optimal çözücü ortamının belirlenmesine olanak tanımıştır.

3.8.2. 3- Merkaptopropiyonik asit konsantrasyonunun optimizasyonu

Bu çalışma kapsamında, altın elektrot yüzeyinde kendiliğinden düzenlenmiş monolayer (SAM) oluşturmak amacıyla 3-Merkaptopropiyonik asit (3-MPA) çözeltisi tercih edilmiştir. Bu süreçte, elektrot yüzeyi 1, 2,5 ve 5,0 mM konsantrasyonlarda 16 saat süreyle inkübe edilerek, 3-MPA ile tek tabaka (SAM) formasyonu sağlanmıştır. Bu modifikasyonun ardından, elektrot yüzeyi, sırasıyla 50 mM pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlanan 0,2-0,05 M EDC ve NHS çözeltileri ile 1 saat süreyle inkübe edilerek aktif hale getirilmiştir.

Son olarak, elektrot yüzeyine 1000 pg/mL konsantrasyonunda anti-PINP antikorı uygulanarak 1 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. PINP proteinlerinin bağlanma düzeyini değerlendirmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200, 300, 400 pg/mL) PINP çözeltileri ile 30 dakika süreyle inkübasyon yapılmıştır. Bu adımlar, elektrot yüzeyinin her aşamada etkin bir şekilde modifiye edilmesi ve bağlanma kapasitesinin optimize edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3.8.3. 3-Merkaptopropiyonik asit çözeltisinde en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

PINP biyosensörünün elektrokimyasal algılama yüzeyini hazırlamak amacıyla, altın elektrot üzerinde 3-MPA SAM oluşumu hedeflenmiştir. SAM oluşumu için optimal 3-MPA konsantrasyonunu belirlemek üzere, elektrot yüzeyleri sırasıyla 1, 2,5, 5, 10, 15 ve 20 mM konsantrasyonlardaki çözeltilerde 16 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Bu modifikasyonu takiben, SAM tabakasındaki karboksil grupları 50 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 0,2 M EDC ve 0,05 M NHS çözeltileri ile 1 saat süreyle inkübe edilerek aktif esterlere dönüştürülmüştür.

Biyoseçici tabakanın immobilizasyonu için, aktif yüzeye 1000 ng/mL konsantrasyonunda monoklonal anti-PINP antikorı uygulanarak 1 saatlik etkileşim sağlanmıştır.

Son olarak, optimize edilmiş yüzeyin PINP antijenine bağlanma kapasitesini ve duyarlılığını değerlendirmek amacıyla, 10-60 ng/mL aralığındaki PINP çözeltileri 60 dakikalık inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu immobilizasyon basamakları, elektrot yüzeyinin her

aşamada etkin bir şekilde modifiye edilmesini ve antijen bağlanma veriminin optimize edilmesini sağlamıştır.

3.8.4. EDC-NHS konsantrasyonlarının optimizasyonu

PINP biyosensörünün geliştirilmesinde, antikor immobilizasyonu için en uygun kimyasal aktivasyon koşullarını belirlemek amacıyla, SAM üzerindeki serbest karboksil gruplarının aktivasyonu, EDC/NHS reaktif çifti kullanılarak optimize edilmiştir.

50 mM pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan 0,2 M/0,05 M, 1 M/0,25 M, 0,02 M/0,005 M, 2 M / 0,5 M dört farklı EDC/NHS konsantrasyon oranı test edilmiştir. Aktivasyon çözeltileriyle elektrot yüzeyi 1 saat süreyle inkübe edilerek, karboksil gruplarının N-hidroksisüksinimid (NHS) esterlerine dönüşümü sağlanmıştır. Bu optimizasyon denemeleri sırasında, 5 mM 3-MPA çözeltisi ile 16 saatlik SAM oluşturma ve 1000 ng/mL monoklonal anti-PINP antikor ile 1 saatlik immobilizasyon basamakları sabit tutulmuştur

Elde edilen modifiye yüzeylerin bağlanma etkinliğini belirlemek için, 10-60 ng/mL aralığındaki PINP antijen çözeltileri ile 60 dakikalık inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu sistematik süreç, elektrot yüzey modifikasyonunun verimliliğini maksimize eden ve optimal bağlanma kapasitesini sağlayan EDC/NHS konsantrasyonlarının tespit edilmesini amaçlamıştır.

3.8.5. EDC/NHS aktivasyonunda inkübasyon süresinin optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları kapsamında, belirlenen optimum EDC/NHS konsantrasyonları esas alınarak, biyosensör performansı üzerindeki karboksil aktivasyon süresinin etkisi araştırılmıştır. Tüm denemelerde, altın elektrot yüzeyinde 5 mM 3-MPA çözeltisi ile 16 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilerek SAM oluşturulması sağlanmıştır. Aktivasyon aşamasında, 50 mM, pH 7,4 içerisinde hazırlana fosfat tamponu içerisinde optimize edilmiş 0,2 M EDC/0,05 M NHS konsantrasyonları kullanılarak, elektrot yüzeyleri 15, 30, 60 ve 120 dakika olmak üzere farklı sürelerde inkübe edilmiştir.

Bu aktivasyonun ardından, yüzeyler 1000 ng/mL monoklonal anti-PINP antikor ile 1 saat süreyle etkileştirilmiştir. Antikor bağlanma verimini değerlendirmek amacıyla 10-60 ng/mL aralığındaki PINP antijen çözeltileri ile 60 dakikalık inkübasyonlar uygulanmıştır. Bu

sistematik yaklaşım, en yüksek biyosensör sinyalini sağlayan ve optimal antikor immobilizasyonunu sağlayan EDC/NHS aktivasyon süresinin belirlenmesini hedeflemiştir.

3.8.6. Antikor konsantrasyonunun optimizasyonu

Hazırlanan bu aktif yüzeyler, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 ng/mL olmak üzere dört farklı monoklonal anti-PINP antikor konsantrasyonu ile 1 saat süreyle muamele edilerek modifiye edilmiştir. Antikor immobilizasyon etkinliğini ve biyosensörün PINP'ye verdiği yanıtı değerlendirmek amacıyla, immobilize edilmiş elektrotların her biri, 10-60 ng/mL aralığındaki PINP antijen çözeltileri ile 60 dakikalık inkübasyonlara tabi tutulmuştur. Bu çalışma, en yüksek biyosensör sinyalini ve dolayısıyla en yüksek bağlanma kapasitesini sağlayan monoklonal anti-PINP antikor miktarının tespit edilmesini hedeflemiştir.

3.8.7. Antikor inkübasyon süresinin optimizasyonu

Antikorların aktive edilmiş SAM yüzeyindeki karboksil uçlarına kovalent bağlanma etkinliği, immobilizasyon süresine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir; bu süre, hem antikorun doğru yönelimini (oryantasyon) hem de yüzeye bağlanan son miktarını doğrudan etkilemektedir. Bu kritik parametreyi optimize etmek amacıyla, antikor inkübasyonu için 15, 30, 60 ve 120 dakika olmak üzere farklı süreler test edilmiştir. 5 mM 3-MPA çözeltisi ile 16 saatlik inkübasyon yapılarak SAM oluşumu sağlanmış, ardından 50 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,2 M EDC/0,05 M NHS konsantrasyonları 1 saat inkübasyon ile aktivasyon gerçekleştirilmiş ve 5 ng/mL monoklonal anti-PINP antikor ile elektrot yüzeyi modifiye edilmiştir.

İmmobilizasyon verimini ve bağlanma kapasitesini değerlendirmek için, modifiye edilmiş elektrotlar 10-60 ng/mL aralığındaki 5,10, 20, 30, 40 ve 50 ng/mL PINP antijen çözeltileri ile 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu deneyler, PINP antijenine karşı en yüksek biyosensör yanıtını sağlayan optimal antikor inkübasyon süresinin tespit edilmesini sağlamıştır.

3.8.8. PINP antijen-antikor etkileşim süresinin optimizasyonu

Biyosensör yüzey modifikasyon adımlarının tamamlanmasının ardından, immobilize edilmiş antikor ile PINP antijeni arasındaki etkileşimden elde edilen sinyali maksimize etmek amacıyla PINP inkübasyon süresi optimize edilmiştir.

Bu kapsamda, elektrot yüzeyine mikro-pipetleme yöntemiyle ilave edilen PINP antijen çözeltileri için 15,30,60 ve 120 dakika olmak üzere dört farklı etkileşim süresi test edilmiştir.

5 mM 3-MPA çözeltisi ile 16 saatlik inkübasyon yapılarak SAM oluşumu sağlanmış, ardından 50 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,2 M EDC/0,05 M NHS konsantrasyonları 1 saat inkübasyon ile aktivasyon gerçekleştirilmiş ve 5 ng/mL monoklonal anti-PINP antikoru ile elektrot yüzeyi modifiye edilmiştir.

İnkübasyon sürelerinin karşılaştırılması, 10 - 60 ng/mL aralığında belirlenen PINP antijen konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyon çalışması, antijen-antikor etkileşiminin denge durumuna ulaştığı ve dolayısıyla en yüksek analitik hassasiyetin sağlandığı optimal inkübasyon süresinin belirlenmesi açısından kritik bir öneme sahiptir.

3.9. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) Yöntemi ile PINP Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

3.9.1. Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün analitik validasyonu kapsamında, Doğrusal Tayin Aralığı (Linear Dynamic Range - LDR) belirlenmiştir. Bu belirleme çalışmaları için biyosensörler, önceki optimizasyon adımlarında saptanan optimal protokol koşulları altında hazırlanmış ve ölçümler bu koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

5 mM 3-MPA çözeltisi ile 16 saatlik inkübasyon yapılarak SAM oluşumu sağlanmış, ardından 50 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,2 M EDC/0,05 M NHS konsantrasyonları 1 saat inkübasyon ile aktivasyon gerçekleştirilmiş ve 5 ng/mL monoklonal anti-PINP antikoru ile elektrot yüzeyi modifiye edilmiştir.

Tüm ölçümler, belirlenen bu optimal şartlar altında yürütülerek, biyosensör sinyalinin analit konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğu doğrusal tayin aralığı tespit edilmiştir.

3.9.2. Tekrar üretilebilirlik

Geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik performansını değerlendirmek amacıyla, belirlenen optimal modifikasyon koşulları altında 5 mM 3-MPA çözeltisi ile 16 saatlik inkübasyon yapılarak SAM oluşumu sağlanmış, ardından 50 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 0,2 M EDC/0,05 M NHS konsantrasyonları 1 saat inkübasyon ile aktivasyon

gerçekleştirilmiş ve 5 ng/mL monoklonal anti-PINP antikoru ile elektrot yüzeyi modifiye edilmiştir ve 6 adet bağımsız biyosensör üretilmiştir.

Bu biyosensörlerle standart kalibrasyon eğrileri elde edilmiş ve eğrilerin eğim değerleri ile korelasyon katsayıları r^2 karşılaştırılmıştır. Elde edilen eğim ve r^2 değerlerinin karşılaştırması, biyosensörün üretimler arası hassasiyet tutarlılığını ve parti içi tekrarlanabilirliğini (intra-assay precision) ortaya koymak için temel analitik parametreler olarak kullanılmıştır.

3.9.3. Tekrarlanabilirlik ve analitik limitlerin (LOD/LOQ) belirlenmesi

Üretilebilirlik denemelerinden elde edilen sinyal yanıtları kullanılarak, her bir PINP konsantrasyonu için ortalama sinyal değeri hesaplanmıştır. Bu ortalama değerler referans alınarak standart kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Analitik tutarlılığı nicel olarak değerlendirmek amacıyla, bu verilere dayalı olarak standart sapma ve varyasyon katsayısı gibi istatistiksel parametreler hesaplanmıştır.

Geliştirilen PINP biyosensör sisteminin analitik performansının temel bir göstergesi olarak LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. LOD, biyosensörün hedef analiti (PINP) arka plan gürültüsünden ayırt edebileceği en düşük konsantrasyon seviyesini tanımlar. LOQ, biyosensörün hedef molekölü kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlik (precision) düzeyinde nicel olarak ölçebileceği en düşük konsantrasyonu belirtir.

Bu kapsamlı hesaplamalar EIS ölçümleri üzerinden gerçekleştirilmiş olup, biyosensör üretimindeki tekrar üretilebilirlik ve elde edilen verilerin analitik güvenilirliğini değerlendirmede kritik rol oynamıştır.

3.9.4. Depo ömrü

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

3.10. Yapay Serum Matriksinde Uygulama ve Doğrulama

Biyosensörlerin gerçekçi matriks koşullarındaki performansını doğrulamak amacıyla, bu aşamada çözücü matriksi olarak hazır yapay serum kullanılmıştır. Geliştirilen β -CTX ve

PINP biyosensörlerinin performansı, hazırlanan yapay serum matriksi içerisinde çözölen β -CTX ve PINP çözöltöleri ile EIS ölçömleri alınarak incelenmiştir. Analit konsantrasyonları, biyosensörler için daha önce belirlenmiş olan doğrusal tayin aralığı içerisindeki değörlere göre hazırlanmıştır.

Elde edilen ölçömler sonuöları, yapay serum bileşenlerinin biyosensör sinyali üzerindeki matriks etkisini (interferans) ve dolayısıyla biyosensör cevabının fizyolojik ortamdaki geçerliliğini değörlendirmek için kullanılmıştır.

3.11. Yapay Tükörük Matriksinde Uygulama ve Doğrulama

Biyosensörlerin gerçekçi matriks koşullarındaki performansını doğrulamak amacıyla, bu aşamada çözöcö matriksi olarak hazır yapay tükörük kullanılmıştır. Geliştirilen β -CTX ve PINP biyosensörlerinin performansı, hazırlanan yapay tükörük matriksi içerisinde çözölen β -CTX ve PINP çözöltöleri ile EIS ölçömleri alınarak incelenmiştir. Analit konsantrasyonları, biyosensörler için daha önce belirlenmiş olan doğrusal tayin aralığı, içerisindeki değörlere göre hazırlanmıştır.

Elde edilen ölçömler sonuöları, yapay tükörük bileşenlerinin biyosensör sinyali üzerindeki matriks etkisini (interferans) ve dolayısıyla biyosensör cevabının fizyolojik ortamdaki geçerliliğini değörlendirmek için kullanılmıştır.

3.12. Yapay İdrar Matriksinde Uygulama ve Doğrulama

Biyosensörlerin gerçekçi matriks koşullarındaki performansını doğrulamak amacıyla, bu aşamada çözöcö matriksi olarak hazır yapay idrar kullanılmıştır.

Geliştirilen β -CTX ve PINP biyosensörlerinin performansı, hazırlanan yapay idrar matriksi içerisinde çözölen β -CTX ve PINP çözöltöleri ile EIS ölçömleri alınarak incelenmiştir. Analit konsantrasyonları, biyosensörler için daha önce belirlenmiş olan doğrusal tayin aralığı içerisindeki değörlere göre hazırlanmıştır.

Elde edilen ölçömler sonuöları, yapay idrar bileşenlerinin biyosensör sinyali üzerindeki matriks etkisini (interferans) ve dolayısıyla biyosensör cevabının fizyolojik ortamdaki geçerliliğini değörlendirmek için kullanılmıştır.

3.13. İstatistiksel Analiz

Elde edilen deneysel verilerin istatistiksel analizleri, MedCalc 2025 ve Origin 2025 yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyosensör performansının referans yöntemler ELISA ve ECLIA ile karşılaştırılmasında korelasyon analizi kullanılmış; yöntemler arası mutlak uyumu görselleştirmek amacıyla Bland-Altman grafikleri çizilmiş (Bland ve Altman, 1999 ; Giavarina, 2015) ; ve ilişkisel uyumu (sistemik hatalar) belirlemek üzere Deming Regresyonu ile Passing-Bablok analizleri uygulanmıştır (Bablok ve Passing, 1985; . Tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise sinyal değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Tüm sonuçlar, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi esas alınarak, %95'lik güven aralığında değerlendirilmiştir.

3.14. Biyoaktif Tabakanın Görüntülenmesi İçin Yapılan Analizler

Biyoaktif tabaka, bir biyosensörün hedef analit veya molekülle özgül bir şekilde etkileşime girmesini sağlayan temel bileşenlerden biridir. Bu etkileşim sonucunda genellikle ölçülebilir bir sinyal oluşur ve bu sinyal sensör aracılığıyla algılanır. Biyoaktif tabakanın seçiciliği ve duyarlılığı, biyosensörün genel performansı üzerinde doğrudan etkili olan başlıca faktörlerdendir. Bu tabakanın karakterizasyonu ve görselleştirilmesi, biyosensörün yapısal tasarımının, işlevsel mekanizmalarının ve performans parametrelerinin daha iyi anlaşılması açısından büyük önem taşır. Ayrıca, en uygun çalışma koşullarının belirlenmesine de katkı sağlar. Bu amaçla; taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR), atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscopy, AFM) ve Temas açısı (contact angle) gibi ileri düzey görüntüleme ve analiz teknikleri kullanılmaktadır.

3.14.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinin elde edilmesi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), malzemelerin yüzey morfolojisinin yüksek çözünürlükle incelenmesine olanak tanıyan ileri düzey bir görüntüleme tekniğidir. Bu yöntemde, analiz edilmek istenen yüzeye yüksek enerjili bir elektron demeti yönlendirilir. Elektronların örnek yüzeyine çarpması sonucu ikincil elektronlar ve geri saçılan elektronlar gibi çeşitli sinyaller oluşur. İkincil elektronlar, numunenin yüzey topografyasına dair detaylı bilgi sağlarken; geri saçılan elektronlar, örneğin kimyasal bileşimi hakkında bilgi verir. SEM cihazı bu sinyalleri toplayarak bilgisayar ortamında yüksek çözünürlüklü görüntülerin elde

edilmesini sağlar ve bu görüntüler aracılığıyla malzemenin yüzey yapısı ayrıntılı biçimde analiz edilebilir.

Bu çalışmada, SEM görüntülemesi için beş farklı grup numune hazırlanmıştır: Boş, 3-MPA immobilize edilmiş, EDC/NHS bağlayıcı ve antikor. Her bir formülasyon tek kullanımlık elektrotlar üzerine uygulanarak kurutulmuş ve görüntüleme için hazır hale getirilmiştir. SEM analizi, antikorların elektrot yüzeyindeki morfolojik yapılarını ve antikor ile kovalent bağlayıcıların etkileşim bölgelerindeki homojenlik düzeylerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Görüntüleme işlemleri, Gazi Üniversitesi TEMEL VE MÜHENDİSLİK BİLİMLERİ MERKEZ LABORATUVARI UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ (GÜTMAM) bünyesinde bulunan HITACHI marka SU8700 model Alan Emisyonlu SEM cihazı ile yapılmıştır. SEM görüntüleri, antikorların yapısal özelliklerine bağlı olarak 500 ile 10.000 kat büyütme aralığında, 10,5–11,5 mm çalışma mesafesinde ve 5 µm ölçek kullanılarak elde edilmiştir.

3.14.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizlerinin gerçekleştirilmesi

Fourier dönüşümü, zaman alanında elde edilen interferogram verilerini frekans alanına dönüştürerek, bu sinyallerin spektral bileşenler halinde analiz edilmesine olanak tanıyan matematiksel bir yöntemdir. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ise, örnek içerisindeki moleküllerin kızılötesi ışınlama etkileşimlerini ölçerek, malzemenin kimyasal yapısı ve moleküler bileşimi hakkında niteliksel bilgiler sunar. Bu teknik, polimerik yapılar ve biyolojik moleküllerde meydana gelen değişimleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kızılötesi ışınım, elektromanyetik spektrumun uzun dalga boyu aralığında yer alır ve bu ışınımın örnek üzerindeki absorpsiyonu, moleküllerdeki karakteristik titreşim modlarının belirlenmesini sağlar. FT-IR spektrometresi, geniş bantlı bir ışık kaynağından elde edilen ham sinyalleri her bir dalga boyuna karşılık gelen soğurma düzeylerine dönüştürerek karakteristik spektrumları üretir. Bu çalışmada kullanılan spektral bölge, orta dalga boylu infrared (Mid-IR, M-IR) aralığı olup $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ dalga aralığını kapsamaktadır. Spektrumlarda yatay eksen (X) dalga sayısını, dikey eksen (Y) ise örnek tarafından

absorplanan kızılötesi ışığın şiddetini göstermektedir. Elde edilen tepe noktaları, örnekteki moleküllerin fonksiyonel gruplarına ve atomlar arası titreşimlere karşılık gelmektedir.

FT-IR analizlerinde, hazırlanan beş farklı numune grubu incelenmiştir: Boş, sadece 3-MPA içeren, 3-MPA-EDC/NHS içeren, 3-MPA-EDC/NHS-Anti-CTX ve 3-MPA-EDC/NHS-Anti-PINP içeren grup. Bu analizler, immobilizasyon sürecinde yer alan farklı kimyasal bileşenler arasındaki fonksiyonel grupların ve kimyasal bağların infrared absorpsiyon özelliklerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, Gazi Üniversitesi Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesindeki Jasco marka FTIR 6700 model spektrometre kullanılarak yapılmıştır.

3.14.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yüzey analizlerinin gerçekleştirilmesi

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), yüzeylerin üç boyutlu morfolojisini yüksek çözünürlükle görüntülemeye olanak tanıyan ileri düzey bir mikroskopi tekniğidir. Bu yöntem, örnek yüzeyi ile prob ucu arasındaki atomik veya moleküler düzeydeki etkileşimleri algılayarak, yüzeyin detaylı topografik haritasının oluşturulmasını sağlar. Özellikle yüzey modifikasyonlarının değerlendirilmesinde; yüzey pürüzlülüğü, yoğunluk dağılımı ve polimer-biyomolekül etkileşimlerinin gözlemlenmesi açısından önemli bir araçtır. Ayrıca, immobilizasyon işlemiyle yüzeye bağlanan moleküllerin dağılım ve yoğunluğunun belirlenmesi, yüzey kaplamalarının homojenliği ve etkinliği hakkında anlamlı bilgiler sunar.

AFM ölçümleri için hazırlanan numuneler, taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizinde kullanılan protokol ile benzer şekilde hazırlanmıştır. Bu analizde, yüzey topografyasının yanı sıra, antijen-antikor etkileşimlerinin değerlendirilmesi, immobilizasyon ajanları ile biyolojik moleküller arasındaki yapısal farklılıkların izlenmesi ve yüzey kaplama karakteristiklerinin detaylı olarak incelenmesi hedeflenmiştir. Görüntüleme işlemleri, Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) bulunan Atomik Kuvvet Mikroskobu Asylum cihazı ile gerçekleştirilmiş olup, veriler mikrometre ölçeğinde elde edilmiştir.

3.14.4. Temas açısı ile yüzey analizlerinin gerçekleştirilmesi

Yüzeylerin hidrofilik ve hidrofobik özelliklerini değerlendirmek için kullanılan karakterizasyon yöntemlerinden biri de temas açısı ölçümüdür. Katı yüzey üzerine belirli hacimde sıvı damlatılarak damlanın yüzey ile oluşturduğu denge açısı ile ölçülür. Yüzeyin kimyasal bileşimi, pürüzlülüğü ve fonksiyonel grupların varlığı temas açısı ile belirlenir.

Biyosensör geliştirme çalışmalarında temas açısı ölçümleri, elektrot yüzeyinde geliştirilen kimyasal modifikasyon ve biyomolekül immobilizasyon basamaklarının doğrulanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Her bir immobilizasyon sonrasında yüzeyin ıslanabilirlik özelliklerinde meydana gelen değişimler, ilgili modifikasyonun başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Temas açısı ölçümü, biyosensör yüzeylerinin karakterizasyonunda tamamlayıcı ve güvenilir bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Analiz işlemleri Bilkent Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bulunan Contact Angle Measurements System cihazı ile 0-180° arasında gerçekleştirilmiştir.

3.15. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Biyosensörlerin duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirlik açısından iyi bir performans göstermesi, büyük ölçüde uygun çalışma koşullarının belirlenmesine bağlıdır. Bu bağlamda, sensörün hedef uygulama alanlarında güvenilir sonuçlar verebilmesi ve fonksiyonlarının artırılması açısından çalışma parametrelerinin dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gereklidir. Bu doğrultuda, geliştirilen biyosensörün analitik güvenilirliğini ve genel performansını maksimize etmek amacıyla deneysel koşullar sistematik olarak optimize edilmiştir.

3.15.1. Elektrokimyasal çalışma aralığının optimizasyonu

Biyoaktif tabakanın karakterizasyon analizlerinden elde edilen bulgular ışığında, elektrokimyasal ölçümler için antikor bazlı bir algılama sistemi benimsenmiştir. Bu antikor matriksi kullanılarak, β -CTX ve PINP biyobelirteçlerinin tayinine yönelik tasarlanan biyosensörün optimal elektrokimyasal ölçüm koşulları belirlenmiştir. Bu kapsamda, sensörün en uygun ve kararlı elektrokimyasal yanıtı sağlayabildiği potansiyel aralığını tespit etmek amacıyla, -0,2 V ile 0,6 V arasında CV taramaları gerçekleştirilerek çalışma potansiyel aralığı optimize edilmiştir.

3.15.2. pH-tampon optimizasyonu

β -CTX ve PINP biyosensörünün optimum pH'sinin belirlenmesi için pH 5,5, 6,0 ve 6,5'te 0,1 M asetat; 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 ve 8,0'de 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,5, 9,0 ve 9,5'te 0,1 M glisin tamponu kullanılarak en iyi biyosensör yanıtının en yüksek pik akımına göre hangi pH değerlerinde elde edildiği göre belirlendi.

3.15.3. Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu

Elektrokimyasal olarak en iyi yanıtın görüldüğü tampon konsantrasyonunu belirlemek için bir önceki çalışmada en yüksek akımı veren pH değerine göre fosfat tamponun 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM konsantrasyonları kullanılarak deneyler gerçekleştirildi.

3.16. ELISA Ölçümleri

3.16.1. β -CTX ölçüm prosedürü

Elabscience Human β -CTX (Beta Crosslaps) ELISA Kiti kullanılarak yarışmalı ELISA tekniği ile β -CTX ölçümleri alındı. Analizden 20 dakika önce tüm kimyasallar ve numuneler oda sıcaklığına getirildi. Tüm kimyasallar ve standart çözeltileri prosedürde verildiği şekilde hazırlandı.

Aşağıda verilen basamaklar sırasıyla uygulandı:

1. Standart ve örneklerden (serum, tükürük ve idrar) 50 μ L alınarak uygun kuyucuklara eklendi ve ardından 50 μ L Biotinylated Detection Ab (biyotinlenmiş tanıma antikoru) çalışma çözeltisi eklendi ve üzeri kapatıldı. 37°C'de 45 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltıldı ve 3 kez 350 μ L yıkama çözeltisi ile yıkandı.
3. Her kuyucuğa 100 μ L HRP Conjugate çözeltisi eklendi, üzeri kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. Çözelti boşaltıldı ve 5 kez 350 μ L yıkama çözeltisi ile tekrar yıkandı.
5. Her kuyucuğa 90 μ L TMB (3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidin) substratı eklendi, üzeri kapatıldı ve 37 °C'de karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 μ L durdurucu çözelti eklendi. Sonuçlar 20 dakika içinde Chromate Awareness Technology INC. Cihazında 450 nm'de okundu.

3.16.2. PINP ölçüm prosedürü

BT Lab Human Procollagen I N-Terminal Propeptit (PINP) ELISA Kiti kullanılarak sandviç ELISA tekniği ile PINP ölçümleri alındı. Analizden 20 dakika önce tüm kimyasallar ve numuneler oda sıcaklığına getirildi. Tüm kimyasallar ve standart çözeltileri prosedürde verildiği şekilde hazırlandı.

Aşağıda verilen basamaklar sırasıyla uygulandı:

1. 50 µL Standartlardan alınarak uygun kuyucuklara eklendi.
2. 40 µL örneklerden (serum, tükürük ve idrar) alınarak uygun kuyucuklara eklendi ve 10 µL anti-PINP antikoru örnek kuyucuklarına eklendi. Ardından 50 µL streptavidin-HRP standart ve örnek kuyucuklarına (blank hariç) eklendi ve üzeri kapatıldı. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltıldı.
4. Çözelti boşaltıldı ve 5 kez 300 µL yıkama çözeltisi ile yıkandı.
5. Her kuyucuğa 50 µL substrat A çözeltisi eklendi, ardından 40 µL substrat B çözeltisi eklendi üzeri kapatıldı ve 37 °C'de karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyucuğa 50 µL durdurucu çözelti eklendi. Sonuçlar 10 dakika içinde Chromate Awareness Technology INC. cihazında 450 nm'de okundu.

3.17. ECLIA Ölçümü

Yapay serum, tükürük ve idrar örneklerinden bakılan β -CTX ve PINP biyobelirteçleri kemilüminesans yöntemler ile Roche Cobas E 800 otoanalizöründe ölçüldü. Numune ve reaktif içinde özel olarak bir manyetik bilyenin bulunduğu test kabına konur. Bu kap cihaz tarafından ara sıra sallanarak 37°C'de bekletilir. İnkübasyondan sonra test kabı dikey ekseninde yüksek hızda döndürülür. Bu dönmenin sonucunda kap içinde bulunan sıvılar kabın dışına çıkarılır. Bir dizi yıkama işleminden sonra bilyeye tam olarak tutunmamış olan maddeler bilyeden ve test kabının içinden çıkarılır. Kemilümünesans madde test kabına eklenir. Bunun sonucunda ışımaya ortaya çıkar. Bu ışımaya yüksek hassasiyetli bir foton sayıcı ile okunur. Bu ışımının miktarı ölçülmek istenilen madde ile orantılıdır.

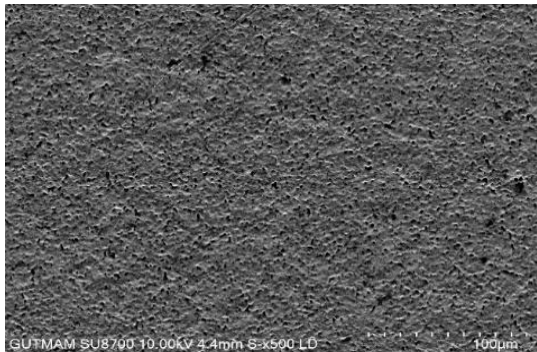
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Biyoaktif Tabakanın SEM Mikrografisinin İncelenmesi

β -CTX ve PINP biyosensör tasarımı için algılama performansındaki en önemli parametrelerden biri olan biyoaktif tabakayı ve buna bağlı olarak da en iyi yüzey özelliklerini gösteren immobilizasyon yüzeyini seçmek amacıyla; farklı konsantrasyonlarda 3-MPA ve EDC/NHS kullanıldı. Geliştirilen β -CTX ve PINP biyosensörünün biyoaktif tabakasını oluşturan polimer sistemi ve immobilize β -CTX ve PINP antikorunun β -CTX ve PINP ile olan elektrot üzerindeki etkileşimi, mikroskobik yapıların ve yüzey morfolojisinin görüntülenmesi amacıyla, her oluşturulan tabaka için SEM analizi yapıldı.

4.1.1 Boş altın elektrodun SEM mikrografisi

Kullanılan 3-MPA, EDC/NHS ile antikor-antiijen etkileşimlerinin görüntülerinden önce boş Au elektrodun yüzey morfolojisini değerlendirmek amacıyla SEM mikrografı alındı (Şekil 4.1).

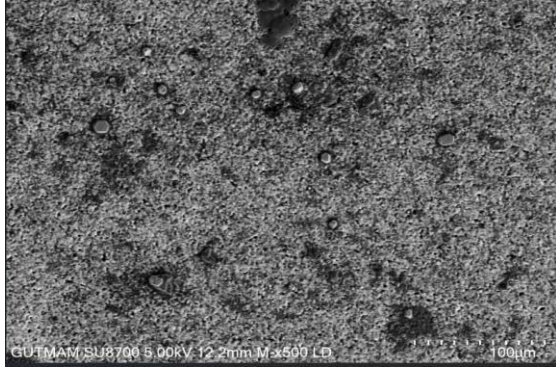


Şekil 4.1. Boş Au elektrodun SEM mikrografisi

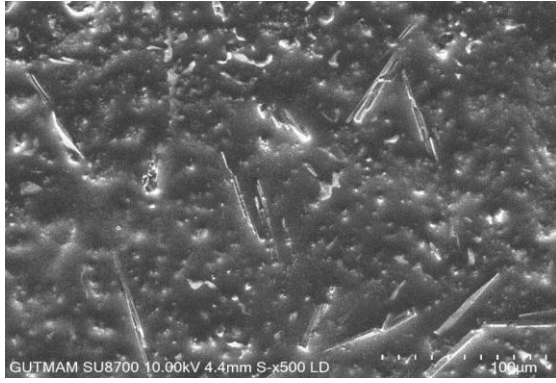
Şekil 4.1’de görülen boş Au elektrodun SEM mikrografisi görüntüsünde yüzeyin homojen ve temiz olduğu, ayrıca, polikristalin yapıya bağlı olarak mikropürüzlülüğün ve sınırlarının seçilebildiği görülmektedir. Boş elektrot yüzeyi, immobilizasyon ve modifikasyon için uygun olduğu yapı sunmaktadır.

Biyosensör geliştirme çalışmalarında immobilizasyon basamaklarının doğrulanması, yüzeyde gerçekleşen kimyasal ve biyolojik modifikasyonların morfolojik olarak izlenmesi açısından önemlidir. Bu amaçla, altın elektrot yüzeyinin boş haldeki durumu ile ardışık

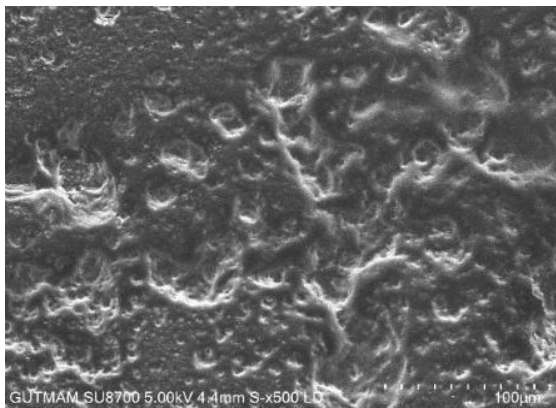
olarak gerçekleştirilen kaplama ve immobilizasyon adımları SEM ile karakterize edilmiştir (şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5).



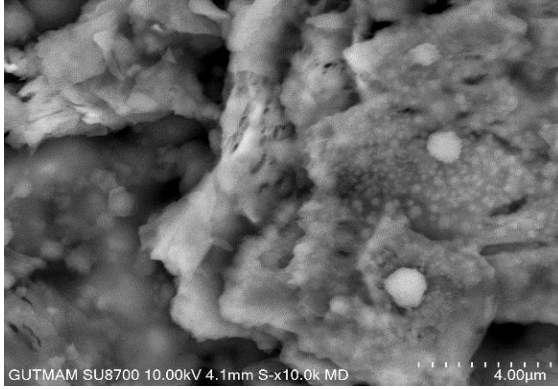
şekil 4.2. Au Bare/3-MPA elektrodunun SEM mikrografisi



şekil 4.3. Au Bare/ 3-MPA/EDC-NHS elektrodunun SEM mikrografisi



şekil 4.4. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti-CTX elektrodunun SEM mikrografisi



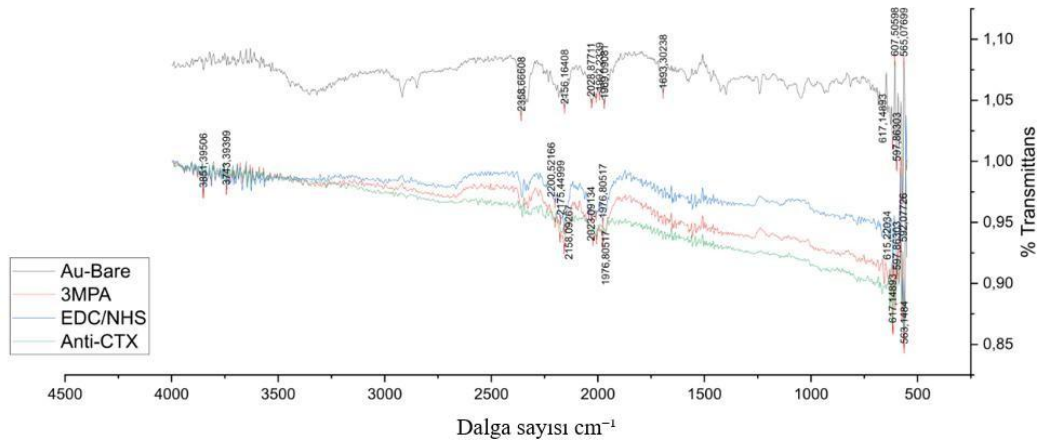
Şekil 4.5. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti-PINP elektrodunun SEM mikrofrafisi

SEM görüntülerinde, Şekil 4.2.'de 3-MPA kaplaması sonrasında daha düzenli bir morfoloji kazandığı görülmüştür. EDC/NHS sonrasında yüzeyde gözle görülür bir partikül artışı olmaz, fakat kaplama kalınlığına bağlı olarak doku değişimi olabilir veya bazı bölgelerde daha yoğun görünüm, yüzeyde aktivasyonun gerçekleştiğini düşündürülebilir. Şekil 4.3'te gözlemlenen düzgün matris üzerindeki iğne şeklindeki kristallerin, EDC/NHS kimyasal aktivasyon sürecinin bir yan ürünü veya tepkime kalıntısı olduğu düşünülmektedir. Bu durumun nedeni, EDC ve NHS'nin genellikle tuz formunda kullanılmasıdır; bu reaktiflerin veya tepkime sonucunda oluşan yan ürünlerin, sulu çözelti buharlaştığında elektrot yüzeyinde kristalleşme eğilimi göstermesidir. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de antikor immobilizasyonu ile yüzeyde granüler partiküller belirginleşmiş, analit bağlanması sonrası ise yüzey yoğunluğunda artış meydana gelmiştir. Bu bulgular, immobilizasyon basamaklarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini morfolojik olarak doğrulamaktadır.

4.2. FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

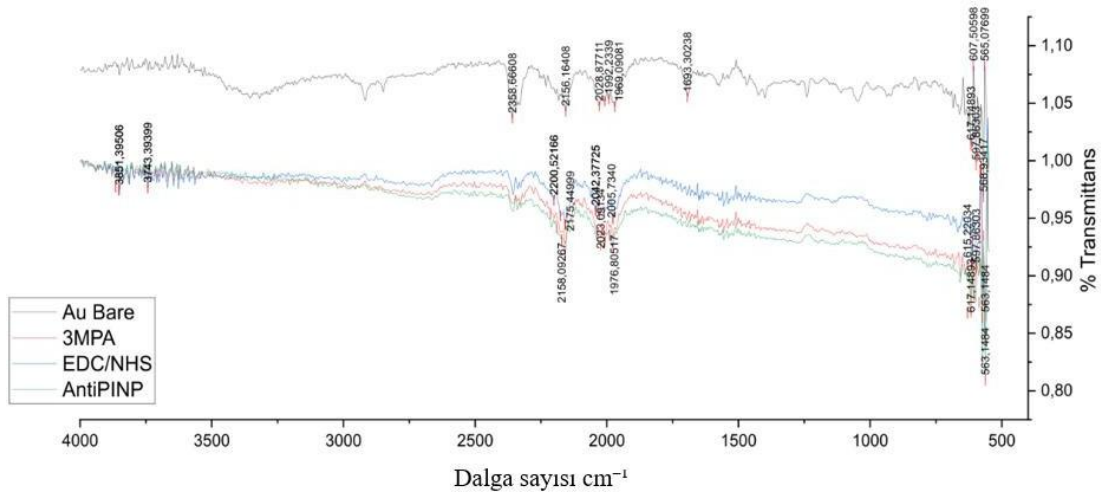
Polimer yapısı ile antijen-antikor etkileşimlerinin moleküler düzeyde karakterizasyonu, 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FT-IR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu teknik, elektromanyetik radyasyonun moleküllerle etkileşimine dayanarak yüzey modifikasyonu ve biyomoleküler bağlanma süreçlerini tanımlamayı sağlamıştır.

PINP ve β -CTX sensörünün immobilizasyonuna ait FTIR spektrumlarına bakıldığında x eksenini 4000-400 cm^{-1} tipik bir IR bölgesini, y eksenini ise transmittansı göstermektedir. Kaplama arttıkça yüzeyden geçen ışık azalmakta, bu da transmittansı düşürmektedir.



Şekil 4.6. β -CTX sensörünün immobilizasyon basamaklarına ait FT-IR spektrumları

Şekilde 4.6'da verilen FT-IR spektrumları, β -CTX biyosensörünün ardışık modifikasyon adımlarının kimyasal kanıtlarını sağlamaktadır. Spektrumun genelinde, çıplak altın (Au-Bare) (siyah) referansına kıyasla, 3-MPA (kırmızı) immobilizasyonu sonrasında 1693 cm^{-1} civarında belirginleşen (C=O) karboksil gerilme titreşim bandı, SAM'in başarıyla oluşumunu göstermektedir. EDC/NHS (mavi) aktivasyonu, $1776 - 2158\text{ cm}^{-1}$ aralığında aktif ester oluşumuna atfedilen yeni titreşim bantlarının ortaya çıkmasıyla doğrulanmıştır. Son aşama olan Anti β -CTX (yeşil) antikorunun kovalent bağlanması ise, 1650 cm^{-1} civarındaki kuvvetlenen Amid I (C=O) ve 1550 cm^{-1} civarındaki Amid II (N-H) bantlarındaki karakteristik değişimler ile kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, $3700 - 3900\text{ cm}^{-1}$ aralığı incelendiğinde, bu bölgede gözlemlenen geniş bantlar, yüzeyde ve çözelti ortamında bulunan hidrojen bağları ile bağlı hidroksil (O-H) gruplarının varlığına işaret etmektedir; bu durum, karboksilik asit gruplarının hidrasyon durumunu ve işlem süresince yüzeyde adsorbe edilmiş suyun etkinliğini desteklemektedir. Bu FT-IR veriler bütünü, her bir yüzey modifikasyonunun etkinliğini ve biyoaktif tabakanın başarılı immobilizasyonunu doğrulamaktadır.

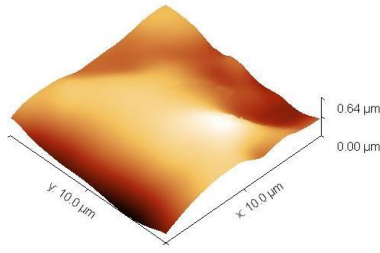


Şekil 4.7. PINP sensörünün immobilizasyon basamaklarına ait FT-IR spektrumları

PINP biyosensörünün ardışık yüzey modifikasyon adımları, FT-IR ile başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Au Bare (siyah) referansına kıyasla, 3-MPA immobilizasyonu sonrasında 1693 cm^{-1} civarında (C=O) karboksil gerilme titreşim bandının oluşumu SAM oluşumunu gösterirken; EDC/NHS aktivasyonu, 1976 cm^{-1} ile 2158 cm^{-1} aralığında aktif ester oluşumunu gösteren yeni karakteristik bantların ortaya çıkmasıyla kanıtlanmıştır. Son aşama olan Anti-PINP antikorunun bağlanması, 1650 cm^{-1} civarındaki Amid I ve 1550 cm^{-1} civarındaki Amid II protein bantlarında gözlenen belirgin şiddetlenmeler ve kaymalar ile doğrulanmıştır. Ayrıca, $3700 - 3900\text{ cm}^{-1}$ yüksek dalga sayısı bölgesindeki geniş bantların varlığı (3851 cm^{-1} ve 3743 cm^{-1} değerler), immobilizasyon sürecinde yüzeyde hidrojen bağlı hidroksil (O-H) gruplarının ve adsorbe suyun etkileşimini göstermektedir. Bu FT-IR verileri, biyoaktif antikor tabakasının altın elektrot yüzeyine beklenen kimyasal tepkimeler ile etkin bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir.

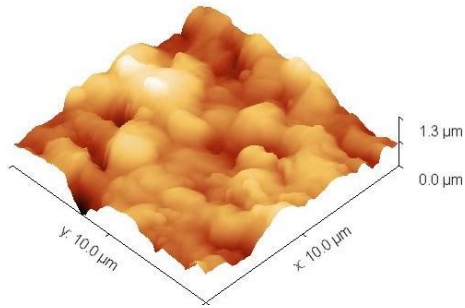
4.3. AFM Analizlerinin Değerlendirilmesi

β -CTX ve PINP antikorlarının biyotabaka ile olan etkileşiminin topolojik görüntüsünü değerlendirmek için yüzey pürüzlülük ölçümlerinden AFM analizini kullanıldı (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve Şekil 4.12).



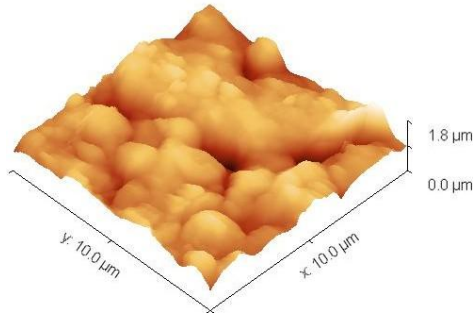
R_a	41,54 ± 20,31 nm
R_q (RMS)	59,84 ± 23,4 nm

Şekil 4.8. Au Bare elektrotuna ait AFM görüntüsü ve istatistiği



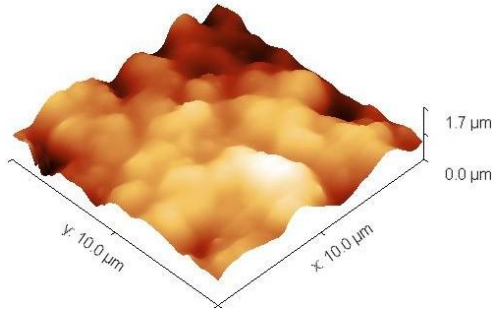
R_a	114,1 ± 30,15 nm
R_q (RMS)	144,9 ± 42,24 nm

Şekil 4.9. Au Bare/3-MPA elektrotuna ait AFM görüntüsü ve istatistiği



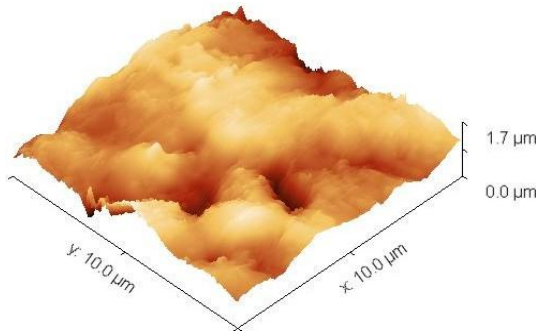
R_a	134,6 ± 40,65 nm
R_q (RMS)	180,2 ± 57,92 nm

Şekil 4.10. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS elektrotuna ait AFM görüntüsü ve istatistiği



R_a	189,2±67,31 nm
R_q (RMS)	235,6±76,6 nm

Şekil 4.11 Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti PINP elektrotuna ait AFM görüntüsü ve istatistiği



R_a	171,8 ± 48,41 nm
R_q (RMS)	214,4±59,34 nm

Şekil 4.12. Au Bare/3-MPA/EDC-NHS/Anti CTX elektrotuna ait AFM görüntüsü ve istatistiği

Atomik kuvvet mikroskobu biyoaktif tabakanın yapısal özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılır, yüzey pürüzlülüğü genellikle aritmetik ortalama pürüzlülük ve karekök ortalama pürüzlülük değerleri üzerinden incelenir. Her iki parametrede yüksek değerler, yüzey topografyasının daha düzensiz ve pürüzlü olduğunu gösterirken, bu pürüzlülük farklılıkları ise, özellikle yüzeye gerçekleştirilen biyomoleküler immobilizasyonunun etkinliği hakkında önemli bilgiler sağlar.

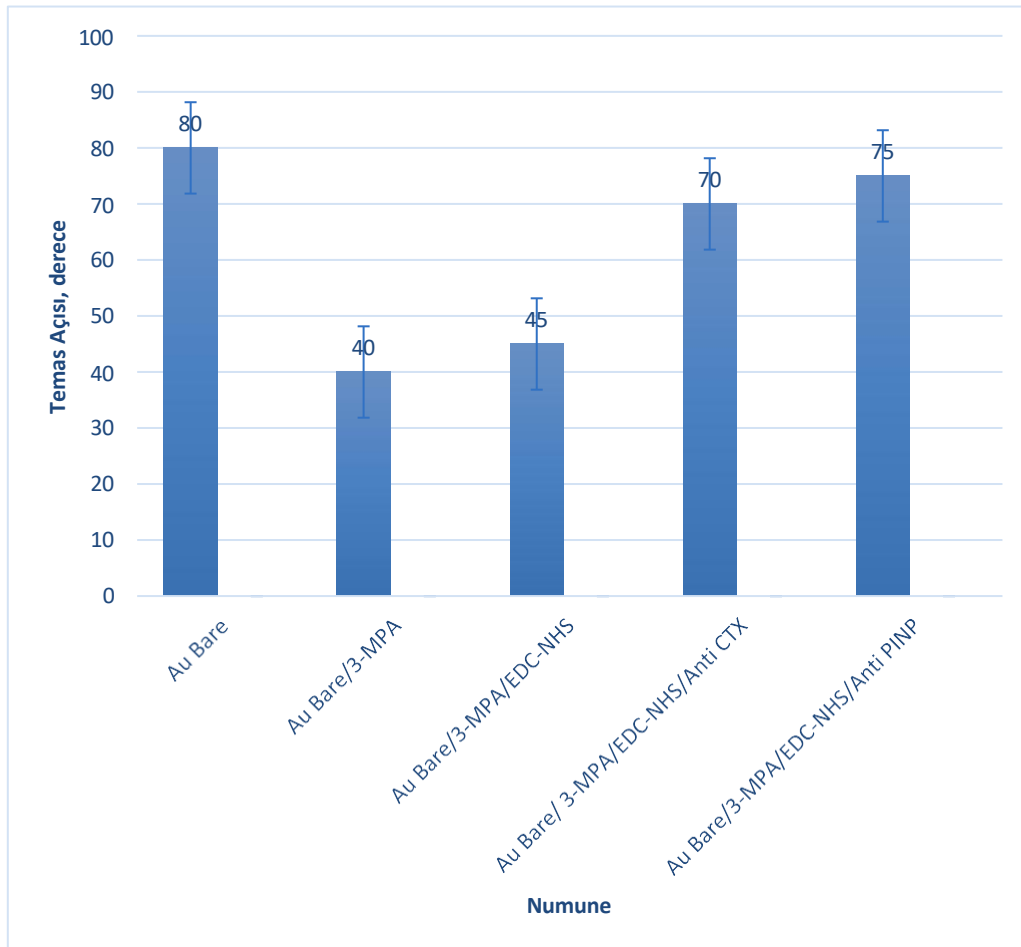
Atomik kuvvet mikroskobunun topografik görüntülerinde yüzeyin yüksek bölgeleri açık renk, alçak bölgeler ise koyu renkler ile belirtilmektedir. PINP ve CTX antikorlarının immobilizasyonunda elde edilen yüzey görüntülerinde R_a ve R_q değerlerinin belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. 3- MPA ile fonksiyonelleştirilmiş ve EDC/NHS ile aktive edilmiş

polimer yüzeylerde R_a ve R_q değerleri düşük düzeylerde (sırasıyla, R_a : $41,54 \pm 20,31$ nm , R_q : $59,84 \pm 23,4$ nm ; R_a : $114,1 \pm 30,15$ nm, R_q : $144,9 \pm 42,24$ nm) ölçülürken, PINP ve CTX immobilizasyonundan sonra R_a ve R_q değerleri sırasıyla R_a : $189,2 \pm 67,31$ nm , R_q : $235,6 \pm 76,6$ nm ; R_a : $171,8 \pm 48,41$ nm, R_q : $214,4 \pm 59,34$ nm olarak yükselmiştir. R_a ve R_q değerlerinde görülen bu artış biyomoleküllerin yüzeye başarılı bir şekilde tutunduğunu ve aktif tabakanın oluştuğunu göstermektedir.

PINP ve CTX antikorlarının immobilizasyonu sonrası R_a ve R_q değerlerinden gözlenen yüksek artış ile birlikte yüzey topografyasında meydana gelen belirgin değişiklikler biyosensörün yüzeyinde biyoaktif tabakanın aktif bir şekilde oluştuğunu göstermektedir.

4.4 Temas Açısı Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Temas açısı ölçümleri, biyosensör hazırlama sürecindeki ardışık yüzey modifikasyon adımlarının yüzey kimyası üzerindeki etkisini güçlü bir şekilde doğrulamaktadır.



Şekil 4.13. Farklı yüzeyler için temas açısı ölçümü

Boş altın elektrot yüzeyleri genellikle hidrofobik özellik gösterir. Temas açısı 80° 'dir. Kaplama öncesinde bu değer referans değer olarak kullanılır. 3-MPA, tiyol grupları ile Au yüzeye kovalent bağlanır ve yüzeyde karboksil fonksiyonları meydana gelir. Bu gruplar hidrofilik olduğundan dolayı temas açısında belirgin azalma görülmektedir. Bu azalma, 3-MPA'nın yüzeye başarılı şekilde bağlandığını göstermektedir (Temas açısı 40°). EDC/NHS aktivasyonu sırasında karboksil grupları aktif ester formlarına dönüşür, bu gruplar kararlı ama biraz daha hidrofobiktir. Temas açısında 3-MPA yüzeyine göre bir miktar artış görülmüştür (45°). Son basamak da büyük ve globüler protein moleküllerinin (anti β -CTX ve anti-PINP) yüzeye kovalent bağlanması, temas açısını sırasıyla 70° ve 75° 'e çıkararak yüzeyin hidrofobisitesinin kısmen geri kazanıldığını ve biyoaktif antikor tabakasının başarılı immobilizasyonunu kesin olarak göstermiştir (Şekil 4.13).

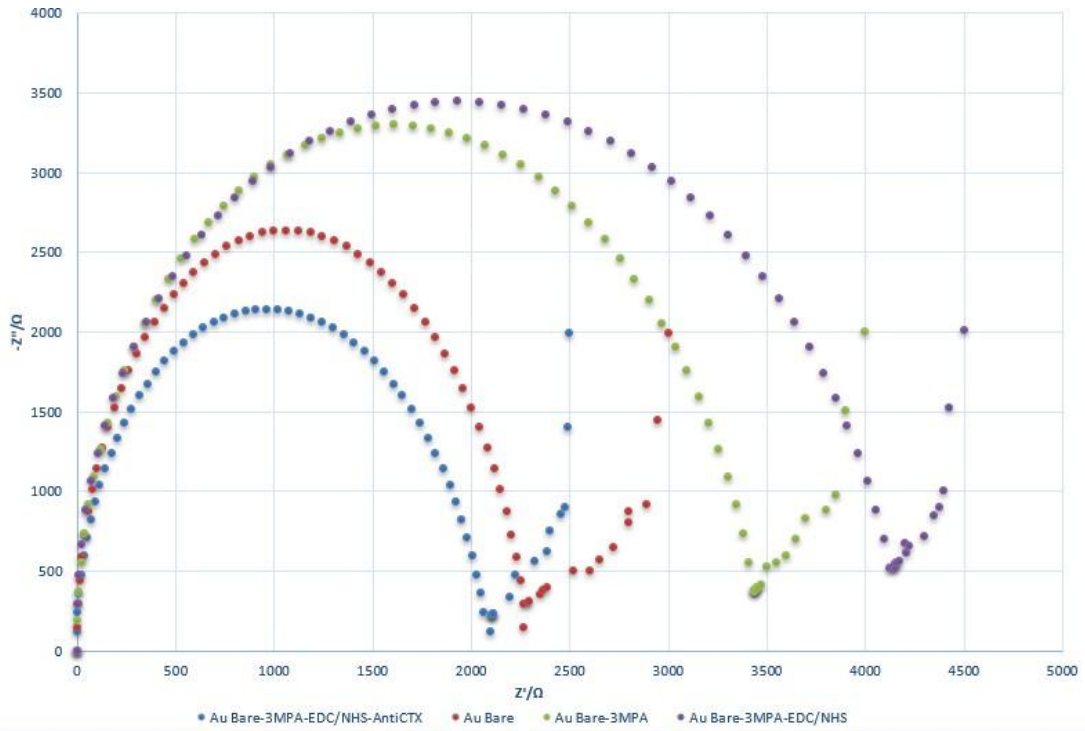
4.5. β -C-Terminal Telopektit (β -CTX) Biyosensörüne Dayalı Ölçümlerden Elde Edilen Analitik Veriler

4.5.1 β -C-terminal telopeptit (β -CTX) biyosensörünün tasarımına ilişkin bulgular

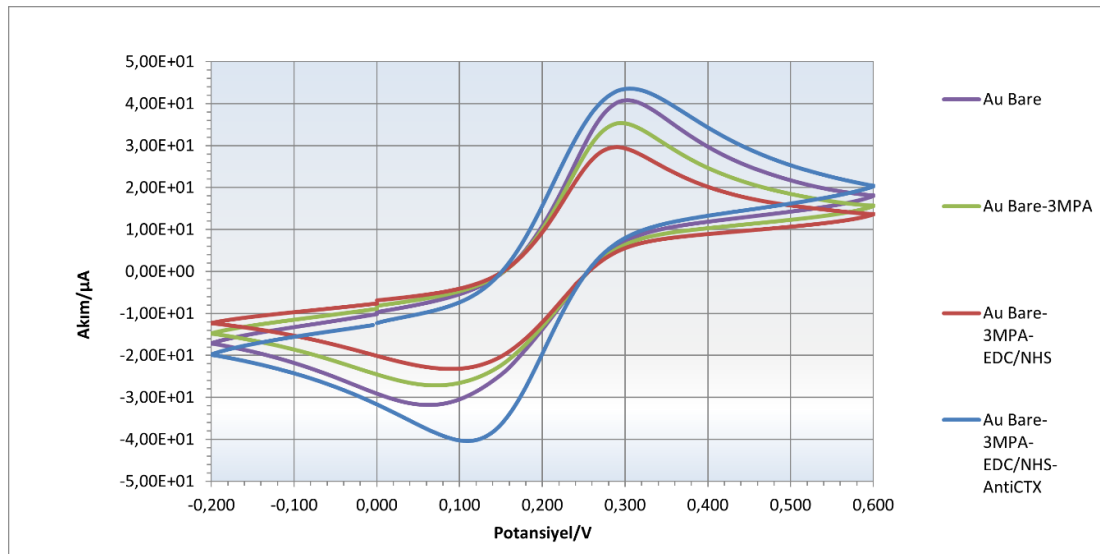
Bu bölümde, geliştirilen β -CTX biyobelirteci için özgün bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiş ve her bir immobilizasyon basamağından sonra elektrot yüzeyindeki değişimler EIS ve CV ölçümleri alınarak ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Biyosensör tasarımı, hedef biyobelirtecin hızlı, duyarlı ve özgül tespiti için optimize edilmiştir. β -CTX biyosensörünün tasarım sürecinde uygulanan her iki immobilizasyon aşaması, aşağıda belirtilen kısaltmalarla tanımlanmıştır:

- Au-Bare: Temiz altın elektrot yüzeyi
- Au-3MPA : 3-MPA ile kaplanan elektrot yüzeyi
- Au-3MPA-EDC/NHS: EDC/NHS ile aktive edilmiş modifiye elektrot yüzeyi
- Au-3MPA-EDC/NHS-Anti-CTX: Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi

Her bir immobilizasyon basamağı sonrasında hesaplanan yük transfer direnci (R_{ct}) değerleri, sensör yüzeyindeki değişimleri nicel olarak değerlendirmek amacıyla analiz edilmiştir.



Şekil 4.14. β -CTX biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının EIS spektrumları



Şekil 4.15. β -CTX biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

Şekil 4.15’de gösterilen CV spektrumları, yüzey modifikasyonunun her bir aşamasının elektrokimyasal etkisini, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ redoks probu kullanılarak doğrulamıştır. En yüksek pik akımını sergileyen Au Bare yüzeyine göre, 3-MPA’nın kendiliğinden düzenlenmiş tek tabaka (SAM) oluşturması, Au Bare- 3-MPA eğrisinde katodik ve anodik pik akımlarında ilk düşüşe neden olmuştur. Bu düşüş, negatif yüklü karboksil gruplarından kaynaklanan

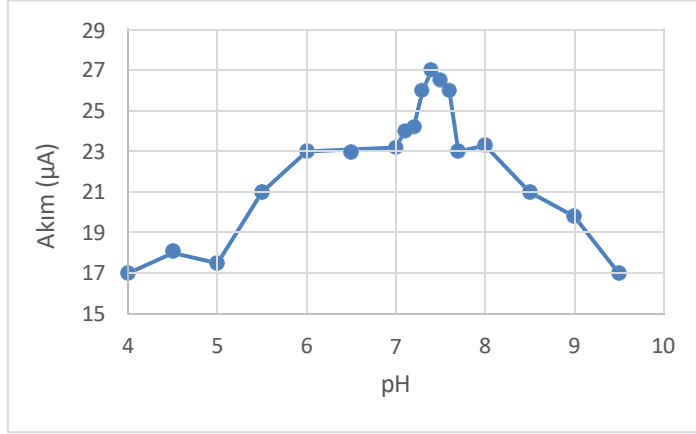
elektrostatik itme kuvvetinin redoks probunun elektron transferini kısmen engellediğini göstermektedir. Ardından uygulanan EDC/NHS aktivasyonu (Au Bare-3-MPA-EDC/NHS eğrisi), pik akımlarını hafifçe daha da azaltmıştır. Son olarak, büyük biyomolekül olan Anti β -CTX antikorunun yüzeye immobilize edilmesi, (Au Bare-3-MPA-EDC/NHS-Anti β -CTX eğrisi) elektron transferini en yüksek oranda engelleyerek pik akımlarında en belirgin azalmaya neden olmuştur. Bu kademeli ve sistematik pik akımı düşüşü, her bir modifikasyon adımının yüzeyde başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve biyosensörün katman katman oluşumunu elektrokimyasal olarak kanıtlamaktadır.

4.6. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

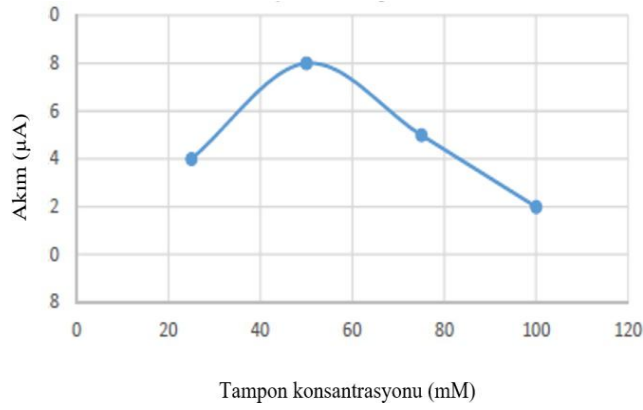
Geliştirilen biyosensörün analitik performansını en üst düzeye çıkarmak ve matriks etkilerini minimize etmek amacıyla, elektrokimyasal ölçüm parametreleri için detaylı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, sistemin duyarlılık, seçicilik ve kararlılık özelliklerini belirleyen kritik deneysel değişkenlerin (pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve potansiyel aralığı gibi) en uygun değerlerinin tespit edilmesini hedeflemiştir.

4.6.1. Uygun pH ve tampon konsantrasyonu

İncelenen sistemin pH aralığı pH 5.5 ile pH 8.0 olarak saptanmasına rağmen, biyolojik/kimyasal aktivitenin maksimize edilmesi amacıyla asetat, fosfat ve glisin gibi yaygın kullanılan farklı tampon sistemleri ile karşılaştırmalı çalışmalar yürütülmüştür. Fosfat tamponu, diğer sistemlere kıyasla daha üstün bir tamponlama kapasitesi sergilemiş ve bu, özgül olarak optimum pH 7.4 değerinde en yüksek verim ile sonuçlanmıştır. Tampon sistemi seçimi sonrasında, en iyi tampon konsantrasyonun da belirlenmesi amacıyla pH 7,4'te konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM olan fosfat tamponları kullanılarak tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçlar şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir. Bulgular, en yüksek performansın 50 mM konsantrasyonundaki fosfat tampon sistemi kullanılarak elde edildiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu bulgular, çalışılan sürecin fizyolojik veya kimyasal gerekliliklerinin pH 7.4 noktasında karşılandığını ve bu kritik değer 50 mM fosfat tamponu ile hassas bir şekilde korunmasının, deneysel validasyon ve tekrarlanabilirlik açısından mutlak bir zorunluluk oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 4.16. Elde edilen akıma karşı çizilen pH ve tampon grafiği



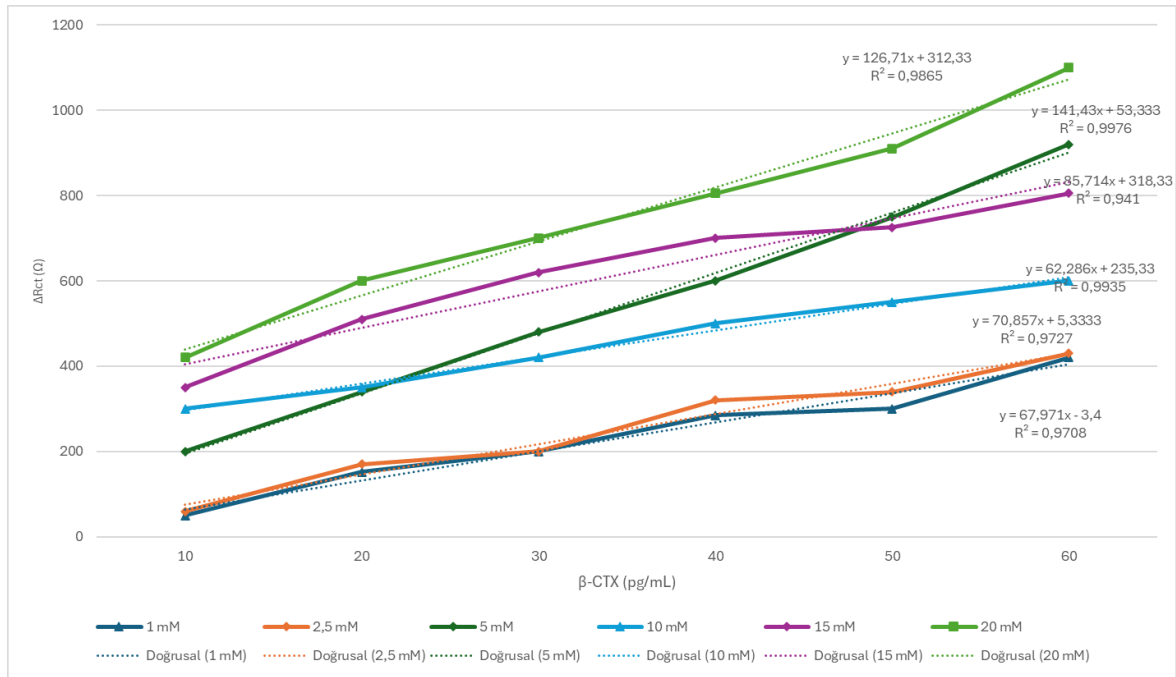
Şekil 4.17. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

4.7. β -CTX Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

4.7.1. 3-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Geliştirilen biyosensörün performansını optimize etmek amacıyla, 3-MPA kullanılarak hazırlanan kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakanın (SAM) konsantrasyon etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, 1mM'dan 20 mM'a kadar (1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM) değişen altı farklı 3-MPA konsantrasyonu test edilmiştir.

Bu çözeltilerle modifiye edilen biyosensörlerin β -CTX konsantrasyonuna karşı verdiği yanıt, Nyquist eğrilerinden elde edilen yük transfer direnci (R_{ct}) değerleri ile kalibrasyon grafikleri oluşturularak değerlendirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin determinasyon katsayıları ve doğru denklemleri sırasıyla Çizelge 4.1'de sunulmuştur; ilgili R_{ct} verileri ise Şekil 4.18'de gösterilmektedir.



Şekil 4.18. 3-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.1. 3-MPA konsantrasyonunun optimizasyonuna ait denklemler ve R² değerleri

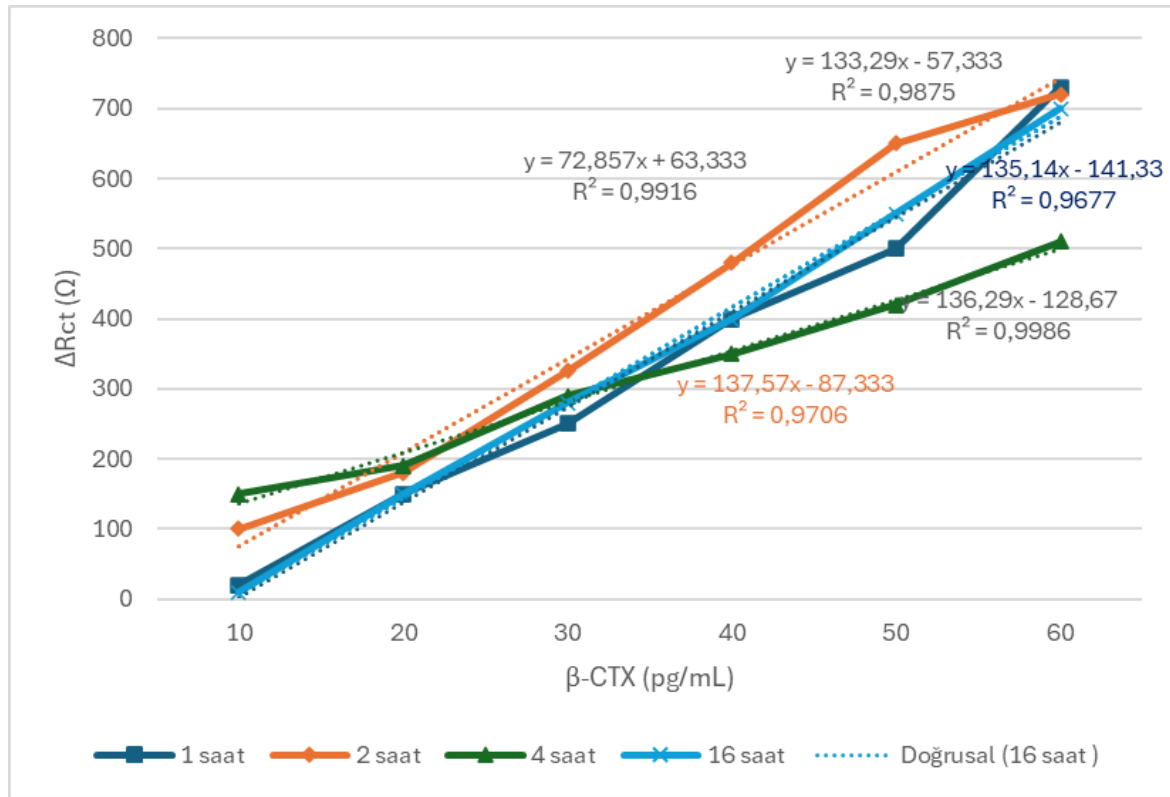
3-MPA konsantrasyonu (mM)	Determinasyon katsayısı (R ²)	Doğru denklemi
1	0,9708	$y = 67,971x - 3,4$
2,5	0,9727	$y = 70,857x + 5,33$
5	0,9976	$y = 141,43x + 53,333$
10	0,9935	$y = 62,286x + 235,33$
15	0,941	$y = 85,714x + 318,33$
20	0,9865	$y = 126,71x + 312,33$

Şekil 4.18'de sunulan kalibrasyon eğrileri incelendiğinde, en yüksek doğrusal ilişki katsayısı ve en belirgin biyosensör yanıtı, 5 mM ve 10 mM 3-MPA konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde gözlemlenmiştir. 10 mM üzerindeki 3-MPA konsantrasyonlarında biyosensör cevabında ihmal edilebilir veya minimal bir artış (doygunluk) gözlemlenmesi nedeniyle, maliyet etkinliği ve kararlılık dikkate alınarak 5 mM 3-MPA konsantrasyonu optimal yüzey modifikasyon koşulu olarak belirlenmiştir.

4.7.2. 3-MPA çözeltisinde en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum 3-MPA konsantrasyonunun belirlenmesini takiben, elektrot yüzeyinde kararlı ve iyi paketlenmiş bir SAM oluşumu için kritik olan optimum inkübasyon süresi tespit edilmiştir. Inkübasyon süresi, alkantiyol gruplarının yüzeyi tam olarak kaplama verimliliğini

doğrudan etkilediği için büyük öneme sahiptir. Bu amaçla yapılan denemelerde 1, 2, 4 ve 16 saatlik inkübasyon süreleri test edilmiştir.



Şekil 4.19. Optimum 3-MPA inkübasyon süresi

Çizelge 4.2. 3-MPA inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.

3-MPA çözeltisinde inkübasyon süresi (saat)	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
1	0,9677	$y=135,14x-141,33$
2	0,9706	$y=137,57x-87,333$
4	0,9916	$y=72,857x+63,333$
16	0,9986	$y=136,29x-128,67$

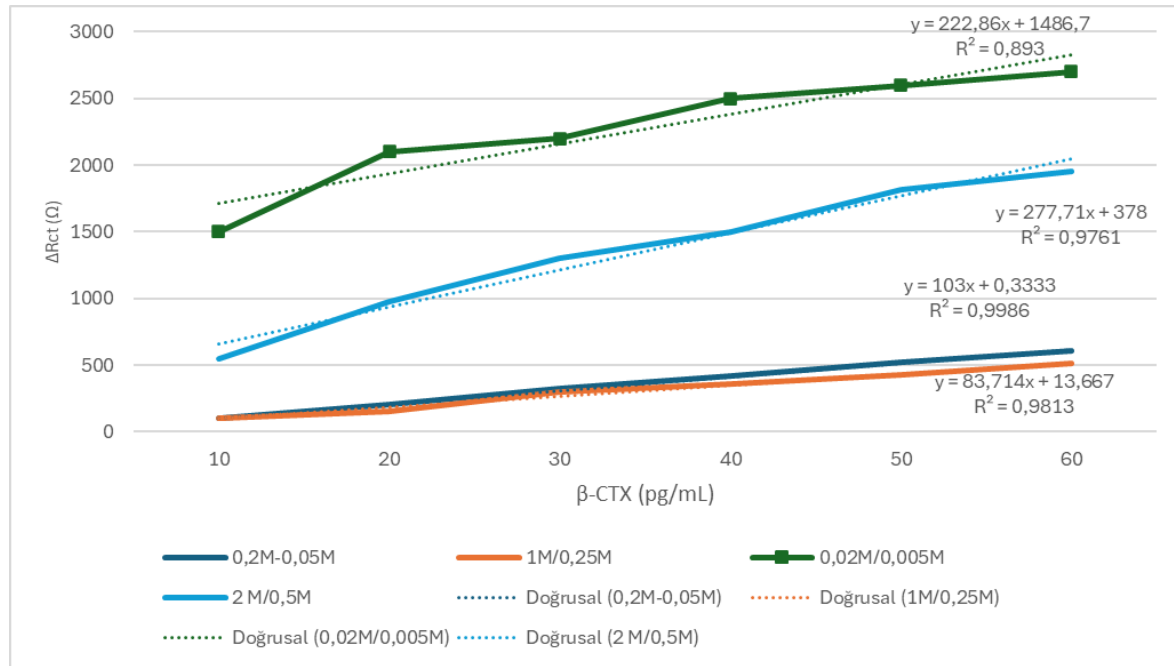
Düzenli ve kararlı SAM oluşumunda bir diğer önemli parametre inkübasyon süresidir. Yüksek konsantrasyonlarda kısa sürede düzenli bir yapı gözlenirken, düşük konsantrasyonlarda bu süre artar (Chaki ve Vijayamohanan, 2002b). Çok uzun sürelerde ise (6 gün) çoklu tabakalar oluşumu gerçekleşebilir (Chaki ve Vijayamohanan, 2002b).

Şekil 4.19'da sunulan 3-MPA inkübasyon süresi optimizasyonu sonuçları, test edilen sürelerde biyosensör yanıtlarının birbirine yakın bir dağılım sergilediğini göstermektedir. Ancak, en yüksek doğrusallık katsayısı değerleri, 4 ve 16 saatlik inkübasyon sürelerinde elde

edilmiştir. Dört saatlik inkübasyon süresi, biyosensör üretimindeki ardışık modifikasyon adımlarının döngüsel uygulama kolaylığı ve pratik zamanlama süreci açısından uygun bulunmamıştır. Bu nedenle, analitik performans açısından neredeyse eşdeğer sonuçlar sağlayan ve rutin laboratuvar prosedürlerine daha iyi entegre edilebilen 16 saatlik inkübasyon süresi, optimal SAM oluşum süresi olarak kabul edilmiştir.

4.7.3. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Antikor immobilizasyonu için en uygun kimyasal aktivasyon koşullarını belirlemek amacıyla, dört farklı EDC/NHS konsantrasyon oranı test edilmiştir: 0,2 M/0,05 M, 1 M/0,25 M, 0,02 M/0,005 M ve 2 M/0,5 M. Bu çözeltilerle aktive edilen biyosensörlerin β -CTX konsantrasyonuna karşı verdiği yanıt, EIS kullanılarak değerlendirilmiştir. Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile β -CTX konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.20'de sunulmuştur. Ayrıca, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri Çizelge 4.3'te detaylandırılmıştır.



Şekil 4.20. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

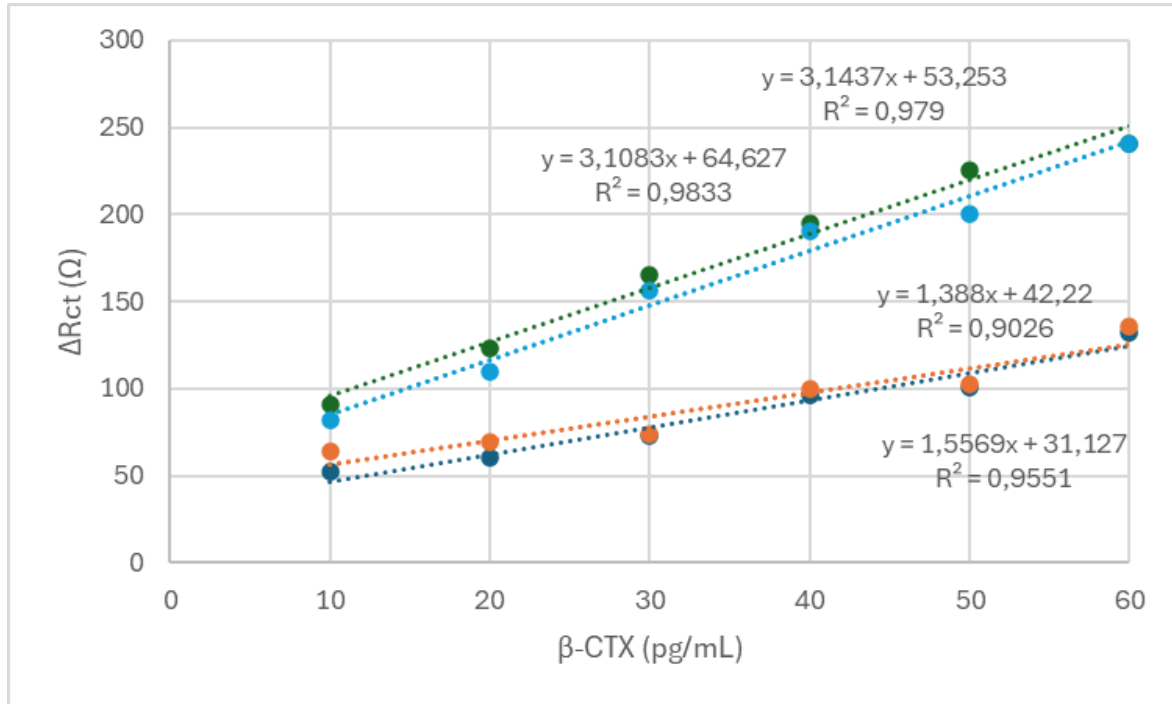
Çizelge 4.3. EDC/NHS konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R² değerleri

EDC/NHS konsantrasyonu	Determinasyon Katsayısı (R ²)	Doğru denklemi
0,2 M/0,05 M	0,9986	$y=103x + 0,3333$
1 M/0,25 M	0,9813	$y=83,714x + 13,667$
0,02 M/0,005 M	0,893	$y=222,86x + 1486,7$
2 M/0,5 M	0,9761	$y=277,71x + 378$

Şekil 4.20’de görüldüğü üzere, biyosensör cevabının en yüksek olduğu EDC/NHS konsantrasyonu 2 M/0,5 M konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Ancak bu konsantrasyonda elde edilen doğrusallık katsayısı değeri düşüktür. Ayrıca, bu yüksek EDC/NHS konsantrasyonlarının kullanımı sırasında, çözeltilerin elektrot yüzeyinde katılaşma (presipitasyon) eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir; bu durum, sonraki temizleme adımlarında operasyonel zorluklara yol açmaktadır. Bu deneysel ve pratik kısıtlamalar dikkate alınarak, nispeten yüksek biyosensör cevabı ve kabul edilebilir determinasyon katsayısına sahip olan 0,2 M/0,05 M EDC/NHS konsantrasyonu optimum aktivasyon koşulu olarak seçilmiştir.

4.7.4. EDC/NHS aktivasyonunda inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum EDC/NHS konsantrasyonları belirlendikten sonra, karboksil gruplarının aktif esterlere dönüşümünü sağlayan inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Test edilen 15,30,60 ve 120 dakika süreler arasında, 60 dakika inkübasyonun biyosensör yanıtı açısından en yüksek determinasyon katsayısı değeri ile birlikte en iyi performansı sağladığı tespit edilmiştir. Daha uzun sürelerin 120 dakika kullanılması, pik akımı veya analitik hassasiyet üzerinde anlamlı bir iyileşme sağlamamış, aksine reaktiflerin hidroliz riskini artırmıştır. Bu nedenle, 60 dakika inkübasyon süresi, yüksek verimlilik ve zaman etkinliği dengesi gözetilerek optimum aktivasyon süresi olarak belirlenmiştir.



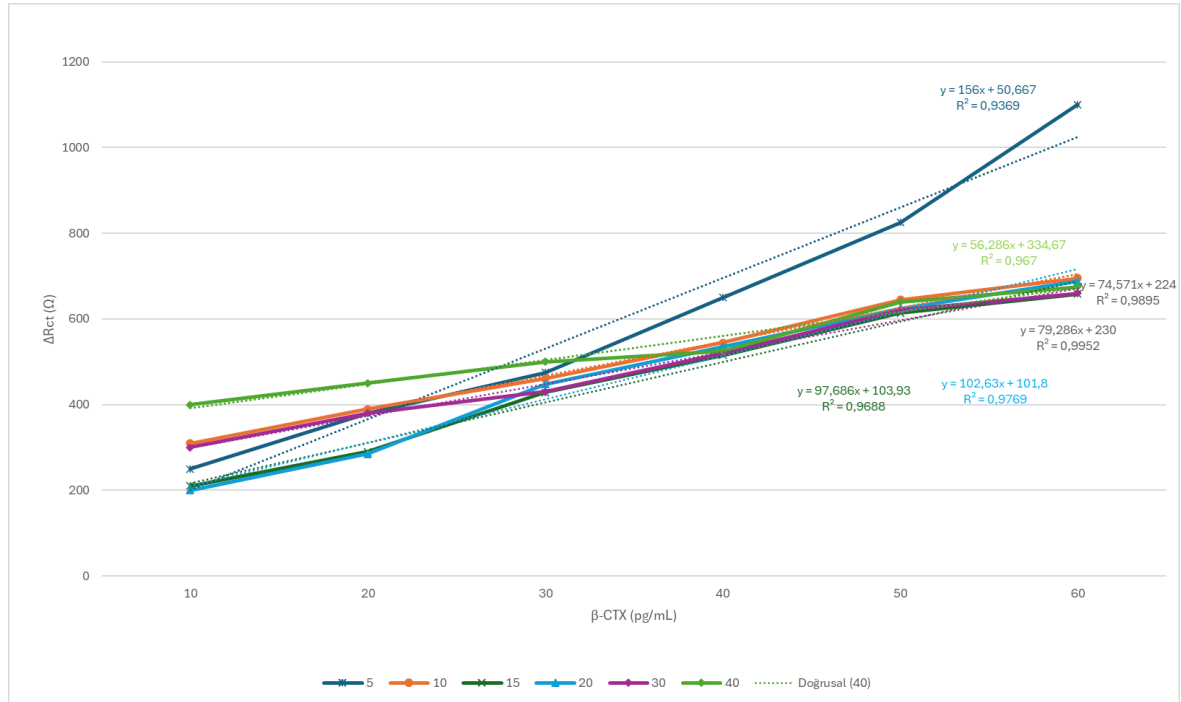
Şekil 4.21. EDC/NHS aktivasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.4. EDC/NHS aktivasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R² değerleri

EDC/NHS aktivasyon süresi (dakika)	Determinasyon katsayısı (R ²)	Doğru denklemi
15	0,9551	$y=1,5569x + 31,127$
30	0,9026	$y=1,388x + 42,22$
60	0,9833	$y=3,1083x + 64,627$
120	0,979	$y=3,1437x + 53,253$

4.7.5. Anti β-CTX konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Antikor immobilizasyon verimini optimize etmek amacıyla, farklı konsantrasyonlardaki anti β-CTX antikor porsiyonları kullanılmıştır. Altı farklı antikor konsantrasyonu (5 pg/mL, 10 pg/mL, 20 pg/mL, 30 pg/mL, 40 pg/mL ve 50 pg/mL) ile hazırlanan biyosensörlerin βCTX konsantrasyonuna karşı verdiği yanıt, EIS ile değerlendirilmiştir. Rct değerleri ile β-CTX konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.22’de sunulmuştur. Ayrıca, elde edilen kalibrasyon doğrularının determinasyon katsayıları ve doğru denklemleri Çizelge 4.5’te detaylı olarak verilmiştir.



Şekil 4.22. Anti β -CTX konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

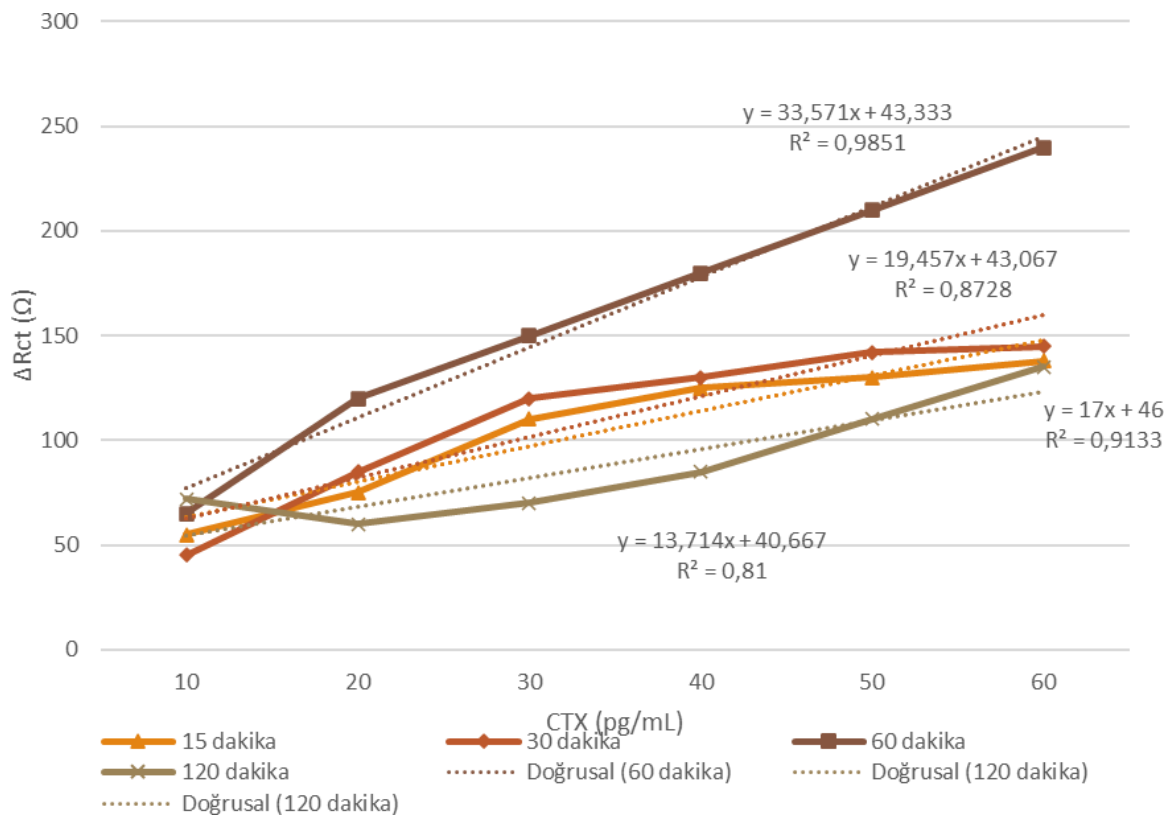
Çizelge 4.5. Anti β -CTX konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemleri ve R^2 değerleri

Anti-CTX konsantrasyonu (pg/mL)	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
5	0,9369	$y=156x + 50,667$
10	0,9952	$y=79,286x + 230$
15	0,9688	$y=97,686x + 103,93$
20	0,9769	$y=102,63x + 101,8$
30	0,9895	$y=74,571x + 224$
40	0,967	$y=56,286x + 334,67$

Şekil 4.22’de sunulan kalibrasyon eğrileri incelendiğinde, 10, 15, 20, 30 ve 40 pg/mL Anti β -CTX konsantrasyonlarında hazırlanan biyosensörler için elde edilen standart grafik eğimlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Bu konsantrasyon aralığı içinde, en yüksek determinasyon katsayısını veren 10 pg/mL Anti β -CTX konsantrasyonu optimum immobilizasyon koşulu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 5 pg/mL Anti β -CTX konsantrasyonunda en yüksek biyosensör yanıtı elde edilmesine rağmen, düşük doğrusallık katsayısı nedeniyle analitik güvenilirlik açısından bu konsantrasyonun optimum olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.7.6. Anti β -CTX inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Biyosensör yüzeyinde optimum antikor immobilizasyon koşullarının sağlanması ve analitik süreçte zaman verimliliğinin artırılması hedefiyle, farklı inkübasyon sürelerinin yüzey etkileşimleri üzerindeki etkisi detaylı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, 3-MPA ile fonksiyonelleştirilen elektrot yüzeylerine, optimize edilmiş 10 pg/mL konsantrasyonundaki antikor çözeltileri uygulanmış ve 15, 30, 60 ve 120 dakika olmak üzere dört farklı inkübasyon süresi test edilmiştir. İnkübasyon süresinin Rct değerleri üzerindeki etkisi, Nyquist eğrilerinden hesaplanan veriler kullanılarak değerlendirilmiştir. β -CTX konsantrasyonları ile Rct değerleri ilişkilendirilerek oluşturulan standart kalibrasyon grafiği sonuçları Şekil 4.23'de, elde edilen doğrusal denklemler ve bunlara karşılık gelen determinasyon katsayıları ise Çizelge 4.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.23. Anti β -CTX antikorunun immobilizasyon süresinin optimizasyonu

Çizelge 4.6. Anti β -CTX inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri

Anti-CTX inkübasyon süresi (dakika)	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
15	0,9619	$y=18,286x + 39,333$
30	0,8505	$y=17,457x + 45,067$
60	0,9915	$y=34,429x + 38,667$
120	0,7557	$y=13,143x + 39$

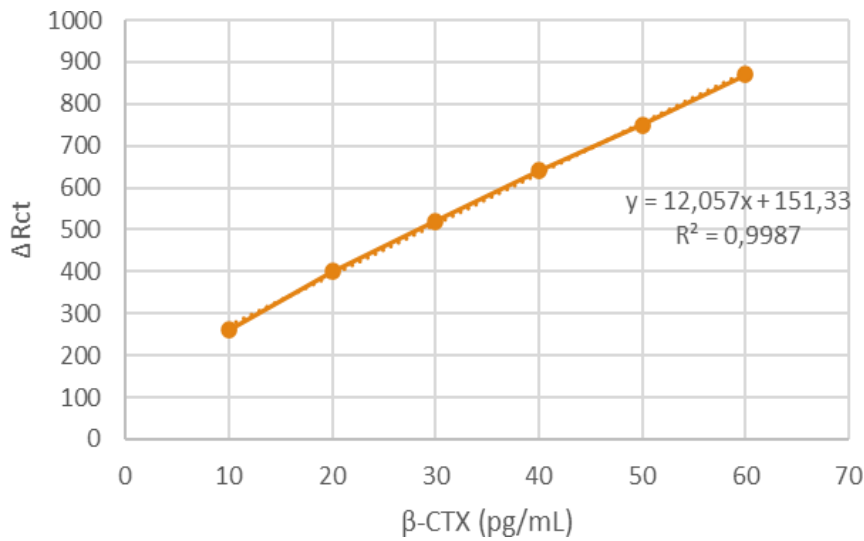
Antikor immobilizasyonu için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, 60 dakika en uygun inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. 15 dakikalık kısa immobilizasyon süresi, antikor-yüzey kovalent bağlanma reaksiyonunun tamamlanması için yetersiz kalmış; bu durum, antikoru yüzeyde etkin bir şekilde tutulamamasına ve yıkama aşamasında kaybına yol açarak düşük analitik yanıtlara neden olmuştur. Diğer yandan, 120 dakikalık uzun inkübasyon süresi, (Xiao ve diğerleri, 2017) elektrot yüzeyindeki antikor çözeltisinin kısmi buharlaşmasına sebep olmuştur. Buharlaşmanın neden olduğu yüzey yapısındaki değişim, antijen-antikor etkileşim verimliliğini düşürerek elde edilen yanıtlara düşük ve doğrusal olmayan cevaplar olarak yansımıştır. Sonuç olarak, yüksek verimlilik ve sinyal kalitesi açısından 60 dakikalık inkübasyon süresi optimum koşul olarak kabul edilmiştir.

Geliştirilen β -CTX biyosensör sisteminin tasarımında kullanılan immobilizasyon basamakları için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, aşağıdaki anahtar parametreler optimum değerler olarak belirlenmiştir: 3-MPA konsantrasyonu için 5 mM, EDC/NHS aktivasyon konsantrasyonu için 0,2 M/0,05 M, ve Anti β -CTX antikor immobilizasyon konsantrasyonu için 10 pg/mL.

4.8. β -CTX Biyosensörünün Karakterizasyonuna ilişkin Veriler

4.8.1. Doğrusal tayin aralığı ve duyarlılık

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları kullanılarak hazırlanan biyosensör sisteminin [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-CTX (10 pg/mL) ve CTX (1 saat)] ile hazırlanan biyosensör ile daha geniş bir doğrusal tayin aralığı belirlemek amacıyla, iki farklı CTX konsantrasyonu aralığında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 10-60 pg/mL β -CTX konsantrasyonu aralığında yapılan deneyler sonucunda elde edilen ΔR_{ct} değerleri ile β -CTX konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrisi belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. β -CTX için elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

β -CTX sensörlerinin doğrusal tayin aralıkları, sensörlerin ölçüm sinyali ile analit konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkinin belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir. β -CTX sensörü için doğrusal tayin aralığı 10 - 60 pg/mL olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen β -CTX biyosensörünün analitik performansı, fizyolojik matrislerin etkisini değerlendirmek amacıyla yapay serum, tükürük ve idrar örnekleri üzerinde ayrı ayrı incelenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda, biyosensörün LOD ve LOQ değerleri, test edilen her bir matris için aşağıda belirtildiği şekilde belirlenmiştir (Çizelge 4.7.):

Çizelge 4.7 β -CTX sensörünün LOD ve LOQ değerleri

Matriks türü	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)
Yapay Serum	2,9	9,1
Yapay Tükürük	7,5	22,3
Yapay İdrar	5,6	17,4

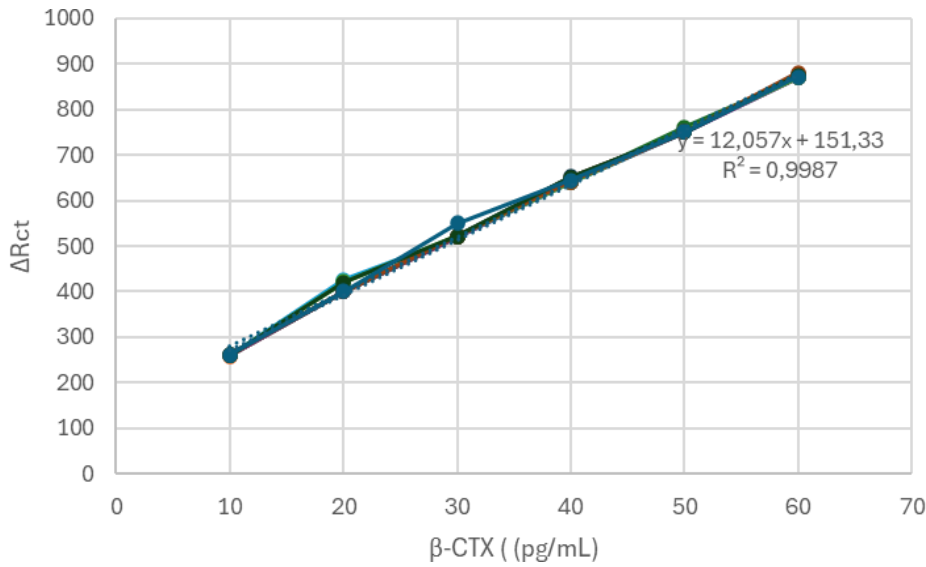
Bu değerler, biyosensörün yapay serumda en yüksek hassasiyete sahip olduğunu gösterirken, kompleks biyolojik matrislerdeki (tükürük ve idrar) etkileşimler nedeniyle LOD ve LOQ değerlerinde nispeten hafif bir artış gözlemlenmiştir. Elde edilen tüm LOD ve LOQ değerleri, pg/mL seviyesinde yüksek bir duyarlılık ve kesinlik sergilemektedir.

4.8.2. β -CTX biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

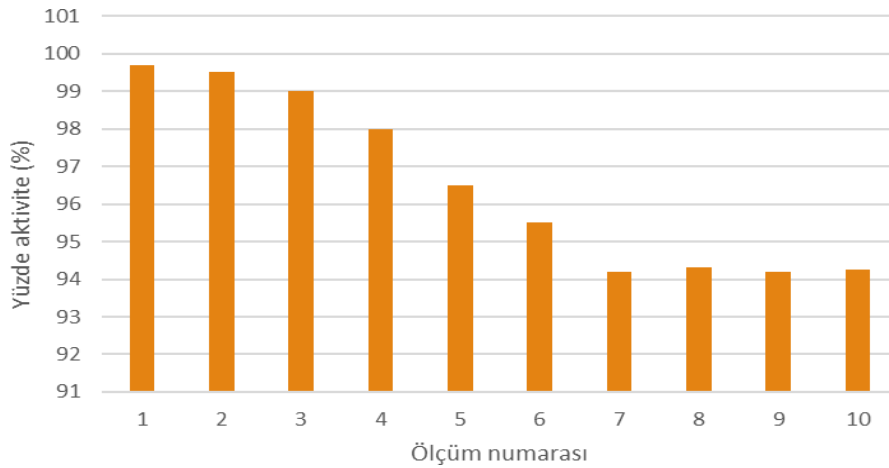
β -CTX biyosensörünün elektrot yüzeyinde gerçekleşen katmanlaşma süreci ve antikör immobilizasyon etkinliği, 10–100 mV s⁻¹ aralığında değişen 15 farklı tarama hızında gerçekleştirilen CV ölçümleriyle detaylı olarak incelenmiştir. -0,2 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen veriler, elektrot yüzeyinde adsorbe edilen aktif türlerin yüzey yoğunluğunu (Γ) hesaplamak üzere Bölüm 3'te belirtilen Laviron eşitliği kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu hesaplamalar sonucunda, Au Bare elektrot yüzeyi için Γ değeri $0,314 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² olarak bulunmuştur. Buna karşılık, Au/3-MPA/EDC-NHS/Anti-CTX elektrodunun Γ değeri $0,518 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² olarak tespit edilmiştir. Modifiye elektrottaki Γ değerinin, Au bare elektroda kıyasla belirgin derecede yüksek olması, Anti β -CTX antikörünün altın elektrot yüzeyine başarılı ve yüksek yoğunlukta immobilize edildiğini açıkça göstermektedir.

4.8.3. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

β -CTX biyosensörünün analitik güvenilirliği, tekrar üretilebilirlik (inter-assay) ve tekrarlanabilirlik (intra-assay) çalışmaları ile kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Optimizasyonu yapılmış immobilizasyon koşulları [3-MPA (5 mM, 16 saat), EDC/NHS (0,2 M / 0,05 M, 60 dakika), Anti-CTX (10 pg/mL, 60 dakika) ve CTX antijen inkübasyonu (1 saat)] kullanılarak hazırlanan 10 bağımsız biyosensör ile testler gerçekleştirilmiştir. Her bir sensör, 10–60 pg/mL konsantrasyon aralığındaki β -CTX örneklerine tabi tutulmuş ve elde edilen R_{ct} değerleri kullanılarak standart kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.25 ve Çizelge 4.8). Tekrarlanabilirlik (aynı gün ve aynı koşullar) testlerinde, sensörler arası varyasyon katsayısı (CV) değerleri %2,1–3,5 aralığında bulunmuştur (Şekil 4.26). Bu düşük CV aralığı, geliştirilen β -CTX biyosensörünün yüksek düzeyde ölçüm tutarlılığı ve hassasiyetini doğrulamaktadır.



Şekil 4.25. β-CTX tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarüretilebilirlik sonuçları



Şekil 4.26. β-CTX tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik sonuçları

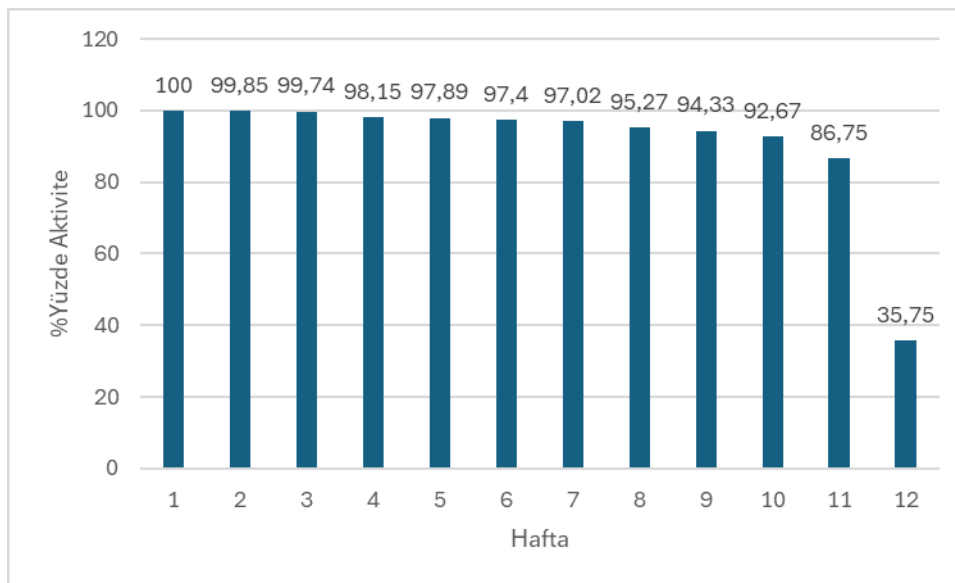
Tekrar üretilirlik (farklı günler) incelemesi, biyosensörün farklı laboratuvar koşulları altında gösterdiği performansı ortaya koymuştur. Bu testlerde elde edilen CV değerleri %3,8–5,2 aralığında tespit edilmiştir. Aynı zamanda, 10 bağımsız biyosensörden elde edilen kalibrasyon eğrileri, biyosensörler arasında yüksek bir doğrusal ilişki (R^2 0,9741–0,9982) ve minimal bir sapma ile ölçüm yapılabilirdiğini göstermiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.26). Bu bulgular, β-CTX biyosensörünün sadece aynı koşullar altında değil, aynı zamanda farklı zaman ve operatörler altında da güvenilir ve tutarlı ölçümler sunma yeteneğine sahip olduğunu teyit etmektedir. Sonuç olarak, geliştirilen biyosensörün hem tekrarlanabilir hem de tekrar üretilir bir analitik araç olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.8. 10-60 pg/mL aralığında β -CTX biyosensörünün tekrarüretilebilirliği

Biyosensör	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi	Tayin aralığı (pg/mL)
1	0,9762	$y = 6,590x + 209,15$	10-60
2	0,991	$y = 8,2857x + 237,97$	10-60
3	0,9741	$y = 7,429x + 423,97$	10-60
4	0,9982	$y = 10,845x + 186,2$	10-60
5	0,9952	$y = 7,9286x + 230,82$	10-60
6	0,9849	$y = 10,3311x + 170,56$	10-60
7	0,9922	$y = 10,126x + 256,16$	10-60
8	0,9895	$y = 7,4571x + 142,85$	10-60
9	0,9835	$y = 10,671x + 312,33$	10-60
10	0,9956	$y = 6,8524x + 356,8$	10-60

4.8.4. Depo ömrü

β -CTX biyosensörünün depolama kararlılığı 12 haftalık süre boyunca değerlendirilmiştir. İlk 10 hafta boyunca sensör aktivitesinde yalnızca minimal bir azalma gözlenmiş olup (%100'den %92,67'ye), bu durum biyosensörün bu süre zarfında yüksek düzeyde kararlılığını koruduğunu göstermektedir. Ancak 10. haftadan sonra aktivitede belirgin bir düşüş meydana gelmiş ve 12. haftada %35,75 düzeyine gerilemiştir. Bu bulgular, β -CTX biyosensörünün yaklaşık 10 haftaya kadar kararlı olduğunu, bu sürenin ardından ise duyarlılık ve bağlanma kapasitesinde önemli kayıplar oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.27).

**Şekil 4.27.** β -CTX'in depo ömrü

4.8.5. Yapay serum matriksinde analitik validasyon

Biyosensör sisteminin kompleks biyolojik ortamlardaki analitik geçerliliğini değerlendirmek amacıyla, yapay serum matriksinde uygulama çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, optimize edilmiş immobilizasyon koşulları [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-CTX (10 pg/mL, 1 saat) ve CTX (1 saat)] ile hazırlanan biyosensörler, yapay serum örneklerinde test edilmiştir. Yapay serum matriksinin biyosensör cevabı üzerindeki potansiyel matriks etkisini değerlendirmek amacıyla, 10–60 pg/mL konsantrasyon aralığında β -CTX içeren yapay serum örnekleri hazırlanmış ve bu örneklerle ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen yanıtlar kullanılarak, biyosensör ile yapay serumdaki β -CTX miktarları saptanmış; oluşturulan standart kalibrasyon denklemi aracılığıyla tayin edilen β -CTX miktarları ve analitik geri kazanım yüzdesi (% geri kazanım) hesaplanmış ve Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Yapay serumda geri kazanım analizi

Yapay serumda β -CTX düzeyi (pg/mL)	Ölçülen β -CTX düzeyi (pg/mL)	Geri kazanım (%)
10	8,8	88
20	20,7	103,5
30	29,1	97
40	39,95	99,98
50	51,27	102,54
60	60,25	100,42

Yapay serum matriksinde gerçekleştirilen β -CTX tayin sonuçları (Çizelge 4.9), geliştirilen biyosensörün analitik doğruluğunu ve matriks toleransını göstermektedir. 10 birimden 60 birime kadar değişen konsantrasyon aralığında, β -CTX için hesaplanan geri kazanım (%) değerleri, %88 (en düşük) ile %103,5 (en yüksek) arasında bir dağılım göstermiştir. Bu aralık, biyosensörün teorik olarak hazırlanan β -CTX düzeylerini, kabul edilebilir analitik sınırlar içinde yüksek bir doğrulukla tayin edebildiğini kanıtlamaktadır. 10 birimlik en düşük konsantrasyonda elde edilen %88 geri kazanım, düşük konsantrasyonlarda bile iyi bir performans sağlandığını, diğer konsantrasyonlarda ise değerlerin %97 ile &103,5 arasında değişerek mükemmel bir doğruluğu işaret ettiğini göstermektedir.

4.8.6. Yapay tükürük matrisinde analitik validasyon

Biyosensör sisteminin kompleks biyolojik ortamlardaki analitik geçerliliğini değerlendirmek amacıyla, yapay tükürük matrisinde uygulama çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, optimize edilmiş immobilizasyon koşulları [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-CTX (10 pg/mL, 1 saat) ve CTX (1 saat)] ile hazırlanan biyosensörler, yapay tükürük örneklerinde test edilmiştir. Yapay tükürük matrisinin biyosensör cevabı üzerindeki potansiyel matriks etkisini değerlendirmek amacıyla, 10–60 pg/mL konsantrasyon aralığında β -CTX içeren yapay tükürük örnekleri hazırlanmış ve bu örneklerle ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen yanıtlar kullanılarak, biyosensör ile yapay tükürükteki β -CTX miktarları saptanmış; oluşturulan standart kalibrasyon denklemi aracılığıyla tayin edilen β -CTX miktarları ve analitik geri kazanım yüzdesi (% geri kazanım) hesaplanmış ve Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Yapay tükürük de geri kazanım analizi

Yapay tükürük de β -CTX düzeyi (pg/mL)	Ölçülen β -CTX düzeyi (pg/mL)	Geri kazanım(%)
10	8,4	84
20	20,01	100,5
30	28,5	95
40	39,5	98,75
50	51,02	102,04
60	59,95	99,92

Geliştirilen β -CTX biyosensörünün klinik açıdan ilgili bir vücut sıvısı olan yapay tükürük matrisindeki analitik doğruluğunu değerlendirmek amacıyla geri kazanım testleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.10). 10 pg/mL’den 60 pg/mL’ye kadar değişen β CTX konsantrasyon aralığında, biyosensörün geri kazanım yüzdeleri %84 (en düşük) ile %102,04 (en yüksek) arasında rapor edilmiştir. En düşük konsantrasyon olan 10 pg/mL düzeyinde gözlemlenen %84’lük değer, alt saptama sınırına yakın konsantrasyonlarda bile iyi bir performans ve matriks etkisine karşı yüksek bir tolerans olduğunu göstermektedir. Diğer konsantrasyon düzeylerinde elde edilen %95 ve üzeri geri kazanım değerleri, yapay tükürük matrisinde bile β -CTX tayininin yüksek kesinlik ve güvenilirlikle gerçekleştirilebileceğini kanıtlamaktadır.

4.8.7. Yapay idrar matriksinde analitik validasyon

Biyosensör sisteminin kompleks biyolojik ortamlardaki analitik geçerliliğini değerlendirmek amacıyla, yapay idrar matriksinde uygulama çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, optimize edilmiş immobilizasyon koşulları [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-CTX (10 pg/mL, 1 saat) ve CTX (1 saat)] ile hazırlanan biyosensörler, yapay idrar örneklerinde test edilmiştir. Yapay idrar matriksinin biyosensör cevabı üzerindeki potansiyel matriks etkisini değerlendirmek amacıyla, 10–60 pg/mL konsantrasyon aralığında β -CTX içeren yapay idrar örnekleri hazırlanmış ve bu örneklerle ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen yanıtlar kullanılarak, biyosensör ile yapay idrardaki β -CTX miktarları saptanmış; oluşturulan standart kalibrasyon denklemi aracılığıyla tayin edilen β -CTX miktarları ve analitik geri kazanım yüzdesi (% geri kazanım) hesaplanmış ve Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Yapay idrarda geri kazanım analizi

Yapay idrarda β -CTX düzeyi (pg/mL)	Ölçülen β -CTX düzeyi (pg/mL)	Geri kazanım (%)
10	8,6	86
20	20,5	102,5
30	59,23	97,43
40	40,01	100,03
50	51,42	102,84
60	60,05	100,08

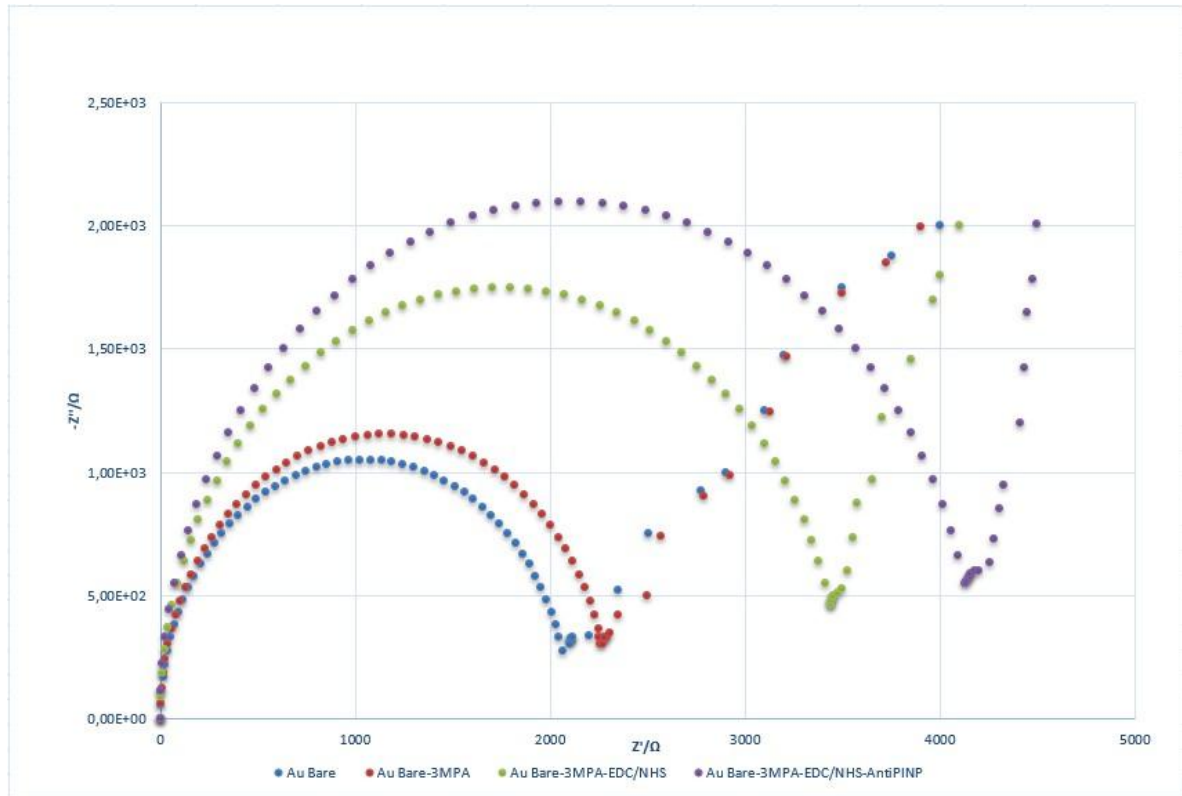
Geliştirilen β -CTX biyosensörünün, klinik uygulamalar için önem taşıyan bir matriks olan yapay idrar içerisindeki analitik doğruluğunu saptamak amacıyla geri kazanım testleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.11). 10 pg/mL’den 60 pg/mL’ye kadar değişen konsantrasyon aralığında, ölçülen β -CTX düzeyleri referans düzeylere oldukça yakın sonuçlar vermiştir. Hesaplanan geri kazanım yüzdeleri %86 (en düşük) ile %102,84 (en yüksek) arasında bir aralıkta rapor edilmiştir. Alt sınır düzeyi olan 10 pg/mL’lik %86’lık kabul edilebilir bir geri kazanım elde edilmesi, biyosensörün idrar matriksinin potansiyel kompleks etkileşimlerine karşı yüksek seçicilik ve dayanıklılık sergilediğini göstermektedir. Diğer konsantrasyon düzeylerindeki % 97,43 ve üzeri geri kazanım değerleri ise, biyosensör sisteminin yapay idrar matriksinde bile yüksek kesinlik ve kantitatif güvenilirliğe sahip olduğunu kanıtlamaktadır.

4.9. Prokollajen 1-N Terminal Propeptit Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular

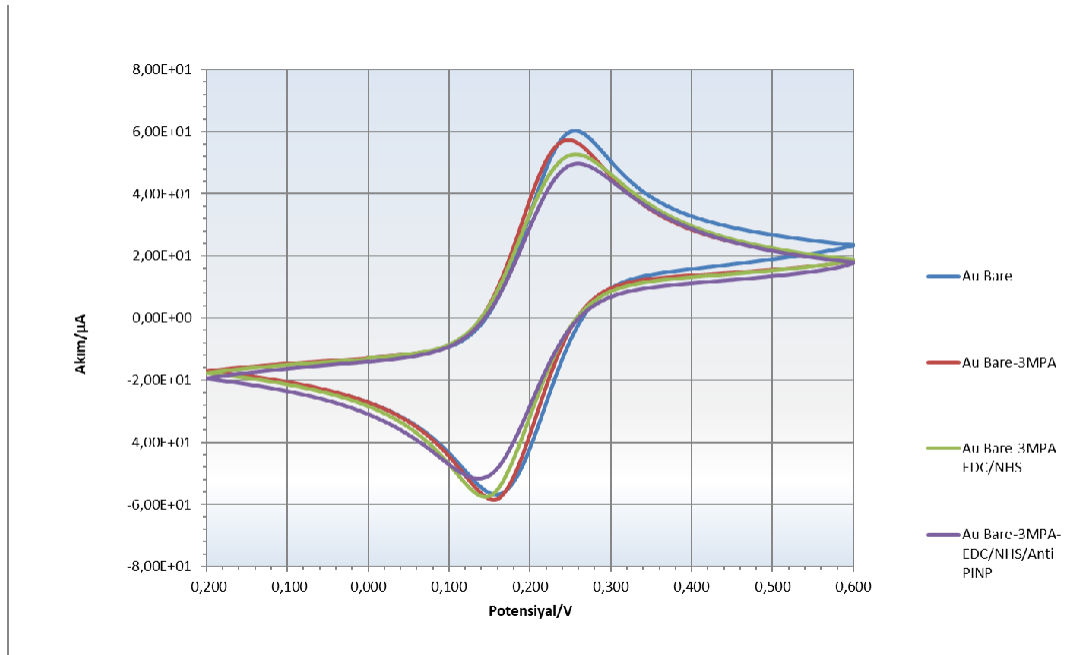
4.9.1. Prokollajen 1-N terminal propeptit biyosensörünün tasarımına ilişkin bulgular

Bu bölümde, geliştirilen PINP biyobelirteci için özgün bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiş ve her bir immobilizasyon basamağından sonra elektrot yüzeyindeki değişimler EIS ve CV ölçümleri alınarak ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Biyosensör tasarımı, hedef biyobelirtecin hızlı, duyarlı ve özgül tespiti için optimize edilmiştir. PINP biyosensörünün tasarım sürecinde uygulanan her iki immobilizasyon aşaması, aşağıda belirtilen kısaltmalarla tanımlanmıştır:

- Au-Bare: Temiz altın elektrot yüzeyi
- Au-3MPA : 3-MPA ile kaplanan elektrot yüzeyi
- Au-3MPA-EDC/NHS: EDC/NHS ile aktive edilmiş modifiye elektrot yüzeyi
- Au-3MPA-EDC/NHS-Anti-PINP: Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi



Şekil 4.28. PINP biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



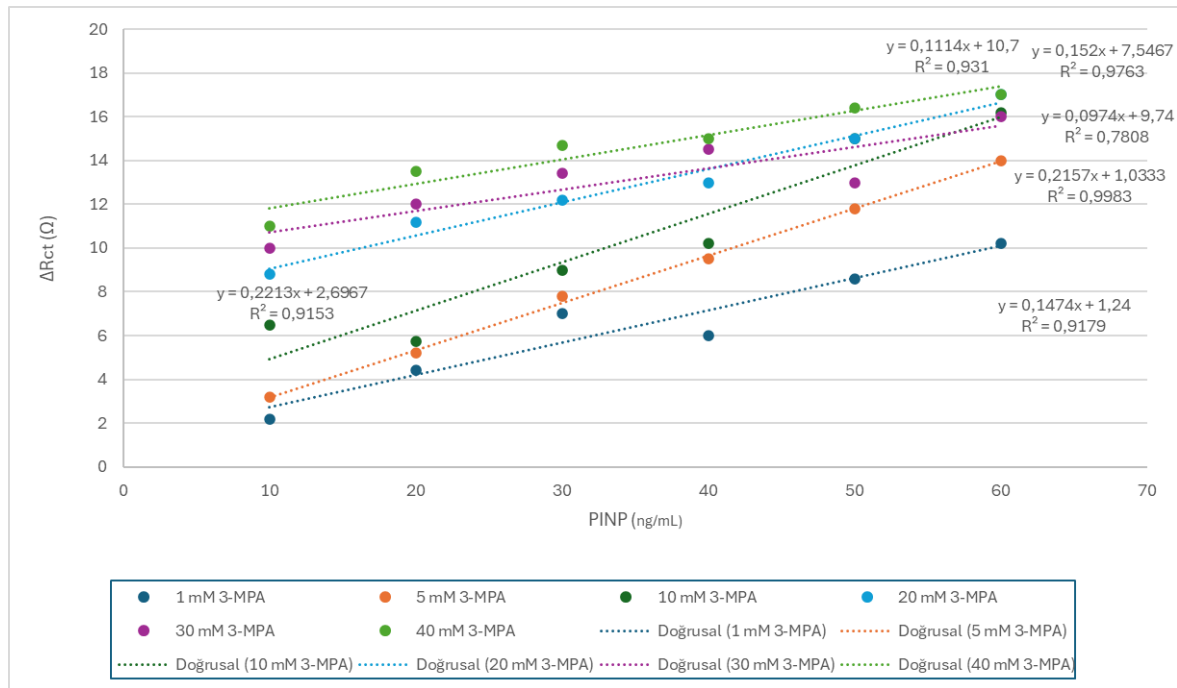
Şekil 4.29. PINP biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

Şekil 4.29’de gösterilen grafik, Au bare elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen ardışık biyosensör modifikasyon adımlarının elektrokimyasal etkilerini CV yöntemi ile incelemektedir. Analiz edilen dört farklı yüzey durumu, redoks probunun elektron transfer kinetiği üzerindeki etkileri açısından sistematik bir değişim göstermektedir. Au bare elektrot (beklediği gibi, en yüksek anodik ve katodik pik akımlarını (I_{pa}) ve (I_{pc}) sergileyerek hızlı bir elektron transferi olduğunu gösterir. İlk modifikasyon adımı olan 3-MPA ile yüzeyin fonksiyonelleştirilmesi, SAM oluşumu nedeniyle akım değerlerinde hafif bir düşüşe yol açar. Bu düşüş, organik bir bariyerin elektron transferini kısmen engellediğini gösterir. Ardından gelen EDC/NHS aktivasyon adımı, karboksil gruplarını amin bağlamaya uygun hale getirirken, pik akımlarında bir miktar daha düşüşe neden olur. Son ve en kritik adım olan Anti PINP antikorunun immobilizasyonu ise, akım değerlerindeki en belirgin ve en büyük düşüşü (I_p azalması) beraberinde getirir. Bu keskin azalma, yüksek molekül ağırlıklı antikorun elektrot yüzeyinde güçlü bir sterik ve dielektrik bariyer oluşturduğunu, dolayısıyla redoks probunun elektron transferini en üst düzeyde engellediğini kanıtlar. Bu sistematik akım düşüşü, biyosensör hazırlama adımlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini ve her katmanın yüzey üzerine başarılı bir şekilde yerleştiğini elektrokimyasal olarak gösteren tipik bir CV yanıtıdır.

4.9.2. Prokollajen 1-N terminal propeptit biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının optimizasyonuna ilişkin veriler

3-MPA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

3-merkaptopropiyonik asitin 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM , 15 mM ve 20 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Bu çözeltiler ile hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile PINP konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.30'da, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.12'da verilmiştir.



Şekil 4.30. 3-MPA konsantrasyonuna biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.12. 3-MPA konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R² değerleri

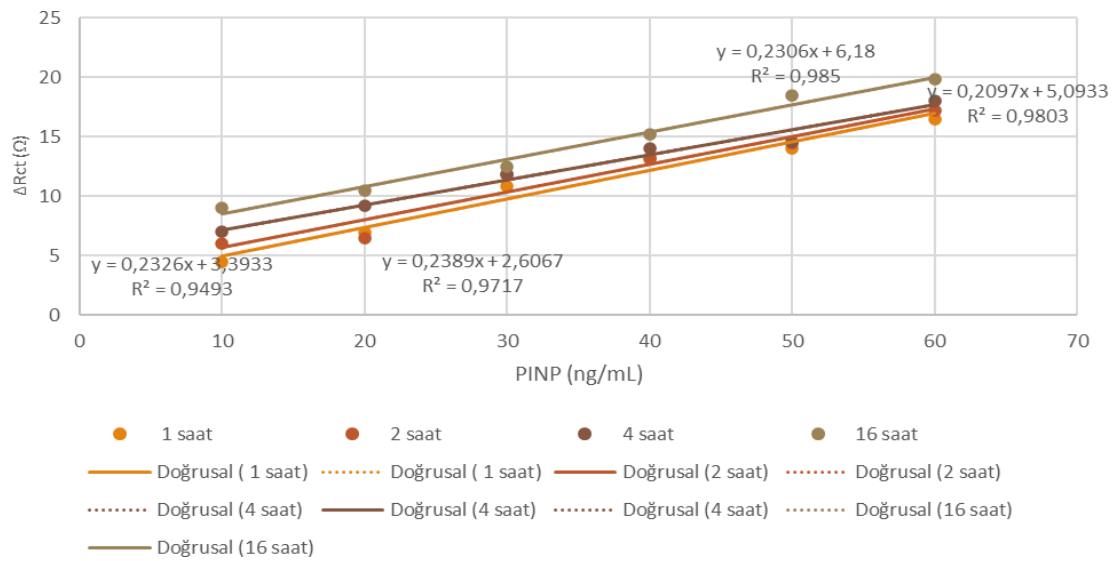
3-MPA konsantrasyonu (mM)	Determinasyon katsayısı (R²)	Doğru denklemi
1	0,9179	$y=0,1474x + 1,24$
5	0,9983	$y=0,2157x + 1,0333$
10	0,8079	$y=0,2213 + 2,6967$
20	0,9769	$y=0,152x + 7,5467$
30	0,9623	$y=0,164x + 6,734$
40	0,931	$y=0,1114x + 10,7$

Çalışmadaki tüm biyosensör sonuçları incelenirken, hesaplanan R_{ct} değerleri ile çalışılan parametrenin verileri arasında oluşturulan standart grafiklerin doğrusallık katsayısı 1'e en yakın ve biyosensör cevabı en yüksek olan konsantrasyon o çalışmada optimum konsantrasyon olarak seçilmiştir .

Şekil 4.30'da görüldüğü üzere 1 mM'lık 3-MPA'nın kullanıldığı biyosensörün verdiği cevabın diğer biyosensörlere göre daha yüksek olmasına rağmen lineerliğinin düşük olması nedeniyle doğrusallık katsayısının en yüksek olduğu 5 mM'lık 3-MPA optimum konsantrasyon olarak belirlendi.

3-MPA inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

3-MPA inkübasyon süresinin elektrot yüzeyinde oluşturulan karboksil gruplarının yoğunluğu ve düzenliliği üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla 1, 2, 4 ve 16 saatlik inkübasyon süreleri karşılaştırılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda, 16 saatlik inkübasyonun uygulandığı elektrotlarda en yüksek yüzey düzenliliği, karboksil grup yoğunluğu ve biyoreaktif bağlanma cevabı elde edilmiştir. Daha kısa sürelerde (1–4 saat) yüzeyde tamamlanmamış veya heterojen monolayer oluşumu gözlenmiş, bu durumun EDC/NHS aktivasyon verimini ve antikor immobilizasyon etkinliğini sınırladığı belirlenmiştir. Buna karşın, 16 saatlik inkübasyon süresi, altın yüzeyinde daha kararlı ve homojen bir 3-MPA tabakası oluşmasını sağlayarak sonraki kimyasal bağlanma basamaklarının verimini artırmış ve sistem için optimum koşul olarak belirlenmiştir.



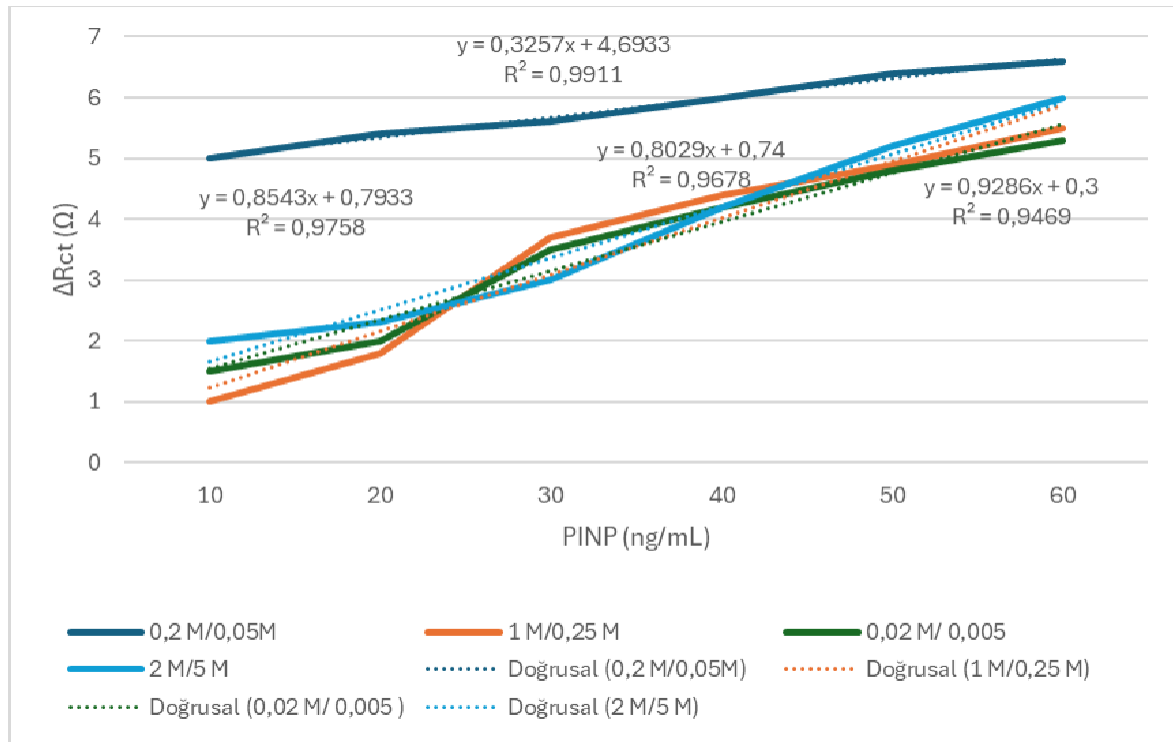
Şekil 4.31. 3-MPA inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.13. 3-MPA inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri.

3-MPA inkübasyon süresi (saat)	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
1	0,9179	$y=0,1474x + 1,24$
2	0,9983	$y=0,2157x + 1,0333$
4	0,8079	$y=0,2213 + 2,6967$
16	0,9769	$y=0,152x + 7,5467$

EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

EDC/NHS 0,2 M/0,05 M, 1 M/0,25 M, 0,02 M/0,005 M ve 2 M/5 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile PINP konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.32’de elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.14’de verilmiştir.

**Şekil 4.32.** EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

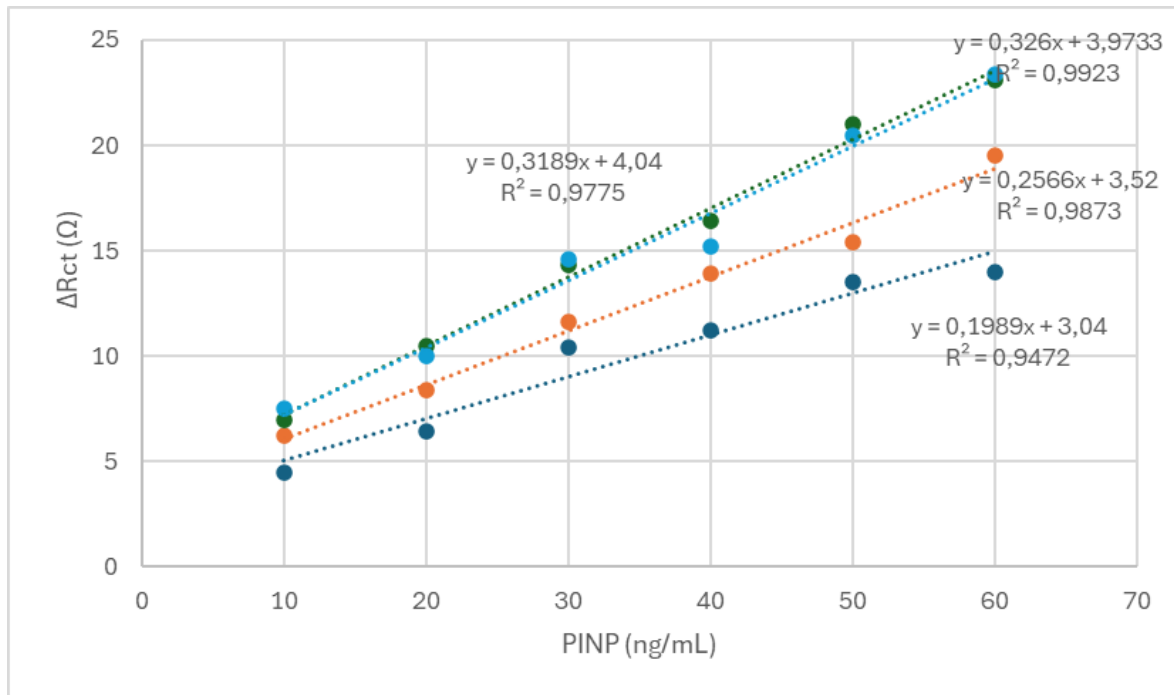
Çizelge 4.14. EDC/NHS konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri

EDC/NHS konsantrasyonu	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
0,2 M/0,05 M	0,9911	$y=0,3257x+4,6933$
1 M/0,25 M	0,9678	$y=0,8029x+0,74$
0,02 M/0,005 M	0,9469	$y=0,9286x+0,3$
2 M/5 M	0,9758	$y=0,8543x+0,7933$

Şekil 4.32’de görüldüğü üzere, biyosensör cevabının en yüksek olduğu EDC/NHS konsantrasyonu 0,2 M/0,05 M konsantrasyonu optimum koşul olarak seçilmiştir.

EDC/NHS aktivasyon süresinin belirlenmesi

EDC/NHS aktivasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 15, 30, 60 ve 120 dakika süreleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.33. EDC/NHS aktivasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

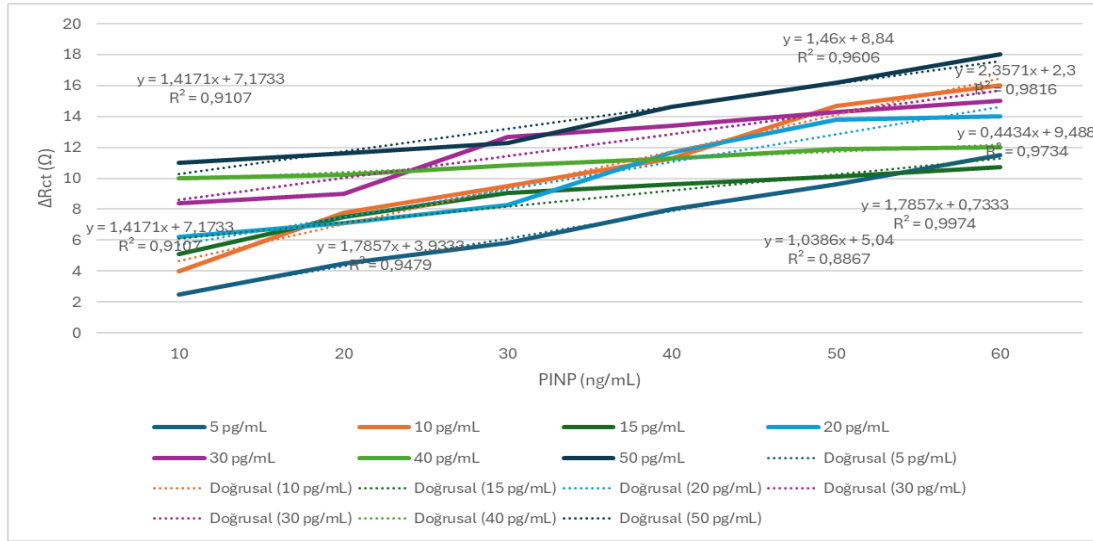
Çizelge 4.15. EDC/NHS aktivasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri

EDC/NHS aktivasyon süresi (dakika)	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
15	0,9472	$y=0,1989x + 3,04$
30	0,9873	$y=0,2566x + 3,52$
60	0,9923	$y=0,326x + 3,9733$
120	0,9775	$y=0,3189x + 4,04$

EDC/NHS aktivasyon süresi bu çalışmada 1 saat olarak optimize edilmiştir. 15–30 dakika aktivasyon süreleriyle karşılaştırıldığında, 1 saatlik sürenin uygulanması sonucunda yüzeydeki karboksil gruplarının daha etkin şekilde aktive olduğu ve antikor immobilizasyon veriminin anlamlı biçimde arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu, daha uzun aktivasyon süresinin kararlı NHS-ester oluşumunu destekleyerek bağlanma kapasitesini artırdığını ve biyosensör yüzeyinde daha homojen, yoğun ve kararlı bir biyoaktif tabaka elde edilmesine katkı sağladığını göstermektedir. Kısa süreli aktivasyon koşullarında ise, özellikle yüzey modifikasyon yoğunluğu yüksek veya reaktif bölgelerin erişilebilirliği sınırlı sistemlerde, aktivasyonun tamamlanmadığı ve antikor bağlanma etkinliğinin azaldığı saptanmıştır.

Anti-PINP konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL, 40 ng/mL ve 50 ng/mL olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki Anti-PINP porsiyonlarıyla hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile PINP konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafiği ile belirlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Anti-PINP konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.16. Anti-PINP konsantrasyon optimizasyonuna ait denklemler ve R^2 değerleri

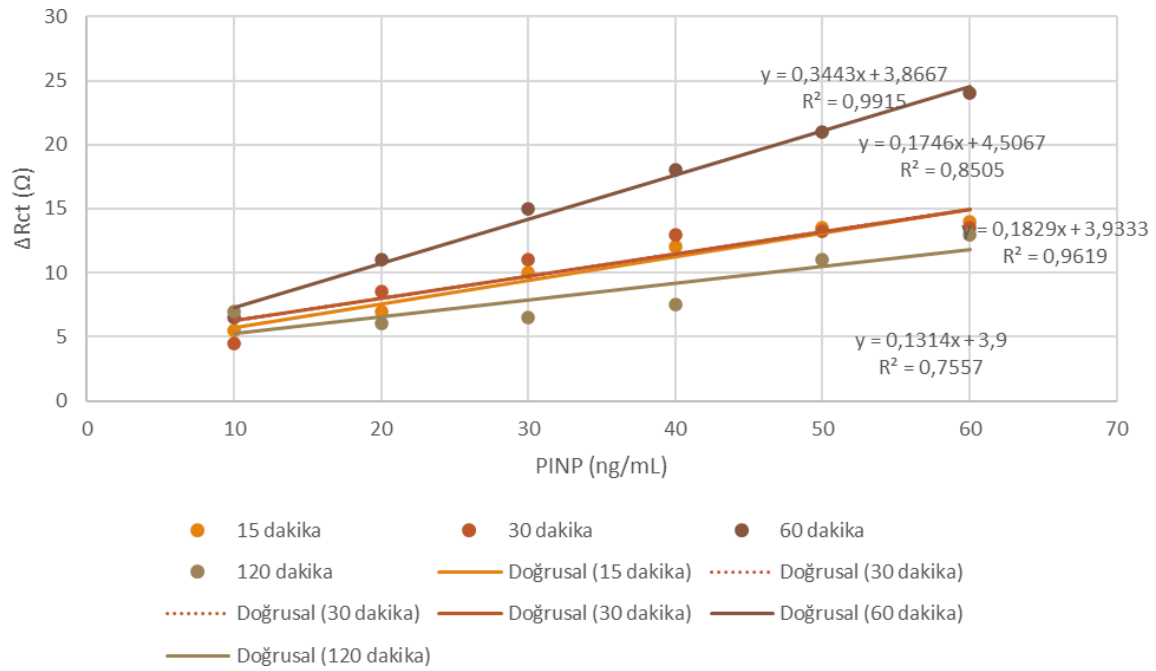
Anti-PINP konsantrasyonu (ng/mL)	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
5	0,9974	$y = 1,7857x + 0,733$
10	0,9816	$y = 2,3571x + 2,3$
15	0,8867	$y = 1,0386x + 5,04$
20	0,9479	$y = 1,7857x + 3,9333$
30	0,9107	$y = 1,4171x + 7,1733$
40	0,9734	$y = 0,4434x + 9,488$
50	0,9606	$y = 1,46x + 8,84$

10, 20, 30 ve 40 ng/mL Anti-PINP konsantrasyonlarında hazırlanan biyosensörler için oluşturulan standart grafiklerin eğimleri birbirine yakındır. Bu nedenle bu dört konsantrasyondan en yüksek doğrusallık katsayısının elde edildiği 5 ng/mL optimum Anti-PINP konsantrasyonu olarak belirlendi. 10 ng/mL Anti-PINP konsantrasyonunda, en yüksek biyosensör cevabı alınmasına rağmen doğrusallık katsayısı düşüktür.

Anti-PINP inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Biyosensör yüzeyinde optimum antikor immobilizasyon koşullarının sağlanması ve süreçte zaman verimliliğinin artırılması amacıyla, farklı inkübasyon sürelerinin etkileri detaylı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, 3-MPA ile fonksiyonelleştirilen elektrot yüzeylerine 10 ng/mL konsantrasyonundaki antikor çözeltileri uygulanmış ve 15, 30, 60 ve 120 dakikalık inkübasyon süreleri boyunca yüzey etkileşimleri izlenmiştir. İnkübasyon süresinin Ret

değerleri üzerindeki etkisi, Nyquist eğrilerinden hesaplanan veriler kullanılarak değerlendirilmiş; PINP konsantrasyonlarının değerleri ile ilişkilendirilerek standart kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen doğrusal denklemleri ve bunlara karşılık gelen doğrusallık katsayıları, sırasıyla Şekil 4.35 ve Çizelge 4.13’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.35. PINP antikorunun inkübasyon süresinin optimizasyonu

Çizelge 4.17. Anti PINP inkübasyon süre optimizasyonuna ait denklemler ve R² değerleri

Anti-PINP inkübasyon süresi (dakika)	Determinasyon katsayısı (R ²)	Doğru denklemi
15	0,9619	$y=0,1829x + 3,9333$
30	0,8505	$y=0,1746x + 4,5067$
60	0,9915	$y=0,3443x + 3,8667$
120	0,7557	$y=0,1314x + 3,9$

Elde edilen sonuçlar, antikor immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresinin 60 dakika olduğunu gösterdi. 15 dakikalık immobilizasyon süresinin, antikoru yüzeye immobilizasyonu için gerçekleşmesi gereken tepkime açısından kısa olduğu tespit edildi. Bu kısa sürede antikor yüzeye etkin bir şekilde bağlanamamış ve bir miktarı ortamdan yıkamayla uzaklaşmıştır. Dolayısıyla elde edilen yanıtların düşük olduğu gözlemlendi. 120 dakikalık sürede, elektrot yüzeyine eklenen antikor çözeltisinin kısmen buharlaşmasına

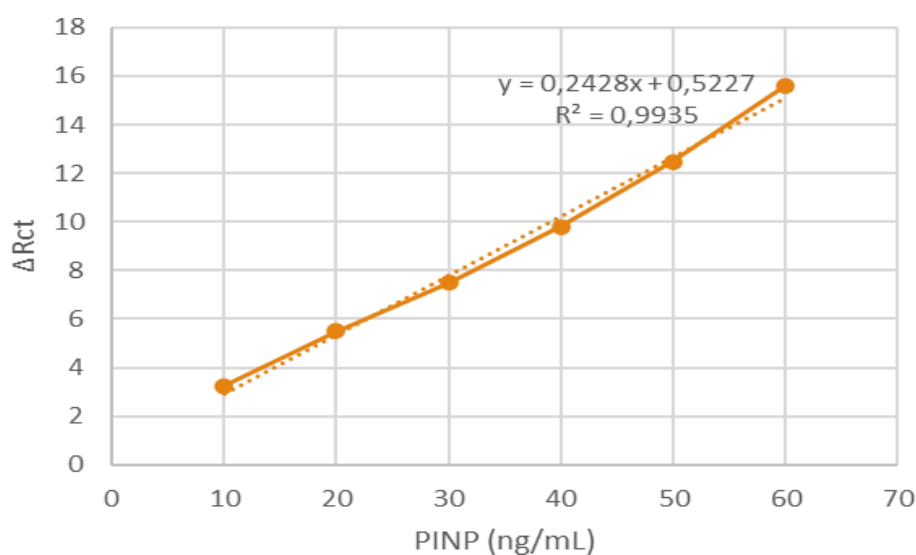
sebebi olduğu için (Xiao K, ve diğerleri 2017), etkili bir immobilizasyon gerçekleşmemiştir. Buharlaşma nedeniyle yapısı değişen yüzeyde verimli bir antijen – antikor etkileşimi olmamıştır. Bu durum da sonuçlara düşük ve doğrusal olmayan cevaplar olarak yansımıştır. Sonuç olarak 60 dakikalık inkübasyon süresi en uygun süre olarak kabul edildi.

Geliştirilen PINP biyosensör sisteminin tasarımında kullanılan immobilizasyon basamakları için elde edilen optimum değerler; 3-MPA konsantrasyonu 5 mM, EDC/NHS konsantrasyonu 0,2 M/0,05M ve Anti-PINP konsantrasyonu ise 5 ng/mL'dir.

4.10. PINP Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Veriler

4.10.1. Doğrusal tayin aralığı ve duyarlılık

Optimize edilmiş immobilizasyon parametreleri [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-PINP (5 ng/mL) ve PINP (5 ng/mL) 1 saat inkübasyon] kullanılarak hazırlanan biyosensör ile, PINP için geniş bir doğrusal tayin aralığı belirlemek amacıyla iki farklı konsantrasyon aralığında çalışmalar yürütülmüştür. Özellikle 10–60 ng/mL PINP konsantrasyonu aralığında gerçekleştirilen deneyler sonucunda, Nyquist eğrileri elde edilmiş ve bu elektrokimyasal veriler üzerinden hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile PINP konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.36). Elde edilen kalibrasyon eğrisi, biyosensörün belirlenen konsantrasyon aralığında yüksek doğruluk ve duyarlılık ile doğrusal tepki verdiğini göstermiştir.



Şekil 4.36. PINP için elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

PINP sensörlerinin doğrusal tayin aralıkları, sensörlerin ölçüm sinyali ile analit konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkinin belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir. PINP sensörü için doğrusal tayin aralığı 10 - 60 pg/mL olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen PINP biyosensörünün analitik performansı, fizyolojik matrikslerin etkisini değerlendirmek amacıyla yapay serum, tükürük ve idrar örnekleri üzerinde ayrı ayrı incelenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda, biyosensörün LOD ve LOQ değerleri, test edilen her bir matriks için aşağıda belirtildiği şekilde belirlenmiştir (Çizelge 4.18):

Çizelge 4.18. PINP sensörünün LOD ve LOQ değerleri

Matriks türü	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Yapay Serum	3,4	10,2
Yapay Tükürük	6,2	18,7
Yapay İdrar	4,8	15,1

Bu bulgular, biyosensörün PINP saptamasında ng/mL düzeyinde yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu, ancak kompleks yapıli biyolojik matrikslerin varlığının sensörün analitik sınırlarını olumsuz yönde etkilediğini ve hassasiyetin yapay serum > yapay idrar > yapay tükürük sıralamasıyla azaldığını ortaya koymaktadır. Tükürüğün doğal olarak daha yüksek viskoziteye ve farklı bileşen profiline sahip olması, sensör yüzeyindeki kütle transferini veya özgül olmayan bağlanmaları artırarak analitik hassasiyeti (LOD ve LOQ değerlerinin artması şeklinde) düşürmüştür.

4.10.2. PINP biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

PINP biyosensörünün elektrot yüzeyinde meydana gelen kaplanma durumu 15 farklı tarama hızında (10-100 mV) CV ölçümleri alınarak gerçekleştirildi. Au elektrot ve Au /3-MPA / EDC-NHS / Anti-PINP elektrot için -0,2 ve 0,6 V potansiyel aralığında 10-20-30-40-50-60-70-80-90-100 mVs⁻¹ olacak şekilde 15 farklı tarama hızında CV ölçümlerinden elde edilen veriler materyal ve metot bölümünde verilen Laviron eşitliğinde yerine konularak Au elektrot yüzeyi için yüzey alanı 0.245 mol/cm², Au/3-MPA/EDC-NHS/Anti-PINP elektrotunun yüzeyi için 0.295 mol/cm² olarak hesaplandı. Au/ 3-MPA/EDC-NHS/Anti-PINP elektrotunun Γ değerleri, çıplak elektrot için elde edilen yüzey alanı değerinden

belirgin şekilde daha yüksek olduğu belirlendi. Bu da altın elektrot yüzeyinde Anti-PINP immobilizasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir.

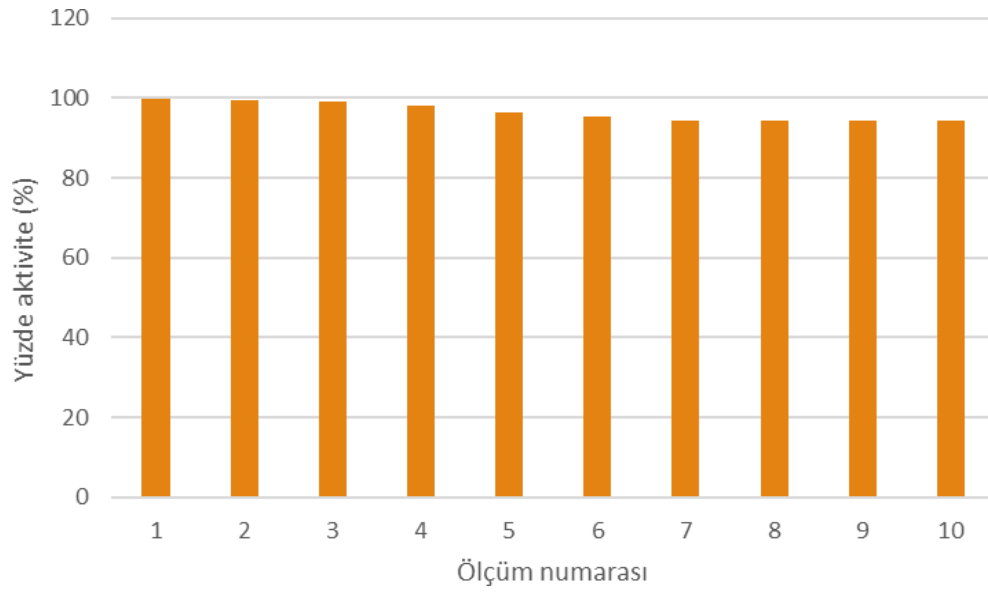
4.10.3. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

PINP biyosensörünün güvenilirliğini ve tutarlılığını değerlendirmek amacıyla, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik performansları incelenmiştir. Optimizasyonu yapılmış immobilizasyon koşulları [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05 M), Anti-PINP (5 ng/mL) ve PINP inkübasyonu (1 saat)] kullanılarak 10 farklı biyosensör hazırlanmıştır.

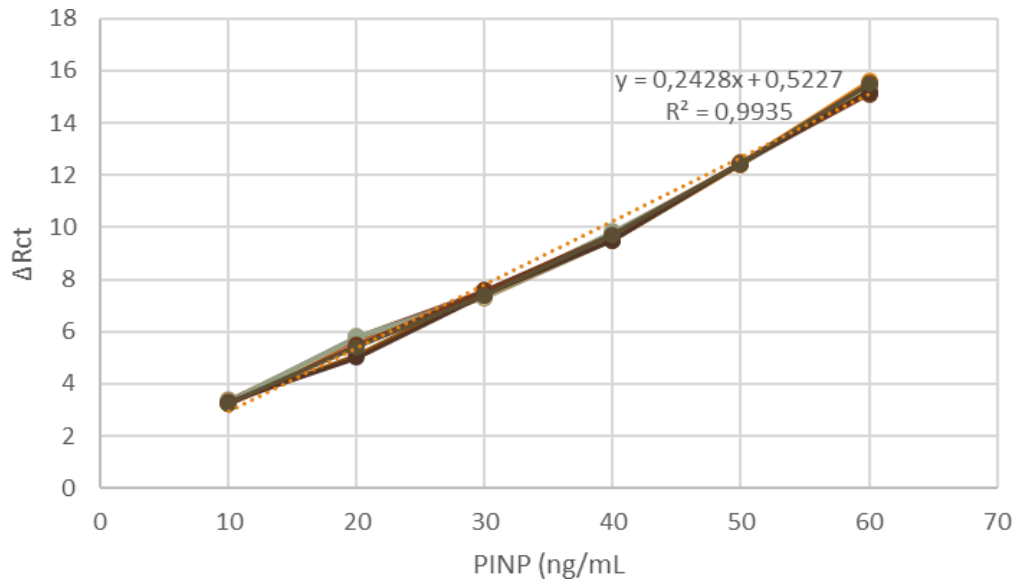
Hazırlanan bu sensörler ile 10–60 ng/mL konsantrasyon aralığındaki PINP örneklerinin elektrokimyasal cevapları alınmıştır. Ölçümlerden elde edilen Nyquist eğrileri üzerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ile PINP konsantrasyonları arasındaki ilişki incelenmiş ve standart kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

Tekrarlanabilirlik (aynı gün ve aynı koşullar) testlerinde, sensörler arası varyasyon katsayısı (CV) değerleri %4,1–4,7 aralığında bulunmuştur. Bu düşük CV aralığı, geliştirilen PINP biyosensörünün yüksek düzeyde ölçüm tutarlılığı ve hassasiyetini doğrulamaktadır.

Tekrar üretilebilirlik (farklı günler) incelemesi, biyosensörün farklı laboratuvar koşulları altında gösterdiği performansı ortaya koymuştur. Bu testlerde elde edilen CV değerleri %6,5–7,4 aralığında tespit edilmiştir. Aynı zamanda, 10 bağımsız biyosensörden elde edilen kalibrasyon eğrileri, biyosensörler arasında yüksek bir doğrusal ilişki (R^2 0,978–0,9976) ve minimal bir sapma ile ölçüm yapılabildiğini göstermiştir (Çizelge 4.19 ve Şekil 4.37). Elde edilen R^2 değerlerinin yüksek olması, bağımsız biyosensörler arasında tutarlı bir doğrusal ilişki kurulabildiğini ve geliştirilen PINP biyosensörünün hem tekrarlanabilirlik hem de tekrar üretilebilirlik açısından güçlü bir analitik performansa sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.37. PINP tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik sonuçları



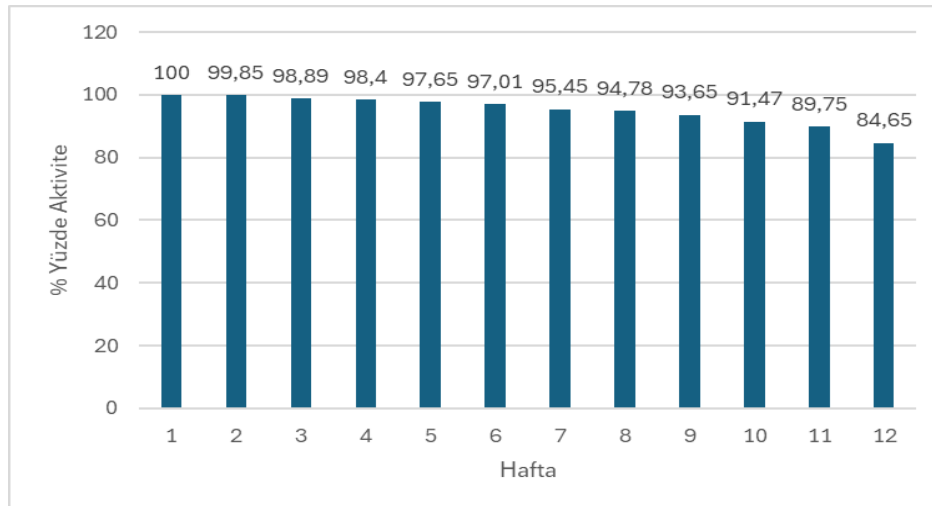
Şekil 4.38. PINP tespiti için geliştirilen biyosensör sisteminin tekrarüretilebilirlik sonuçları

Çizelge 4.19. 10-60 ng/mL aralığında PINP biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensör	Determinasyon katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi	Tayin aralığı (ng/mL)
1	0,9976	$y=0,1414x+1,105$	10-60
2	0,9916	$y=0,295x-0,033$	10-60
3	0,9915	$y=0,108x+1,343$	10-60
4	0,987	$y=0,201x-0,234$	10-60
5	0,9865	$y=0,1267x+2,315$	10-60
6	0,986	$y=0,3311x-1,662$	10-60
7	0,985	$y=0,299x-0,037$	10-60
8	0,9813	$y=0,237x+2,367$	10-60
9	0,98	$y=0,247x+2,143$	10-60
10	0,978	$y=0,485x-1,092$	10-60

4.10.4. Depo ömrü

PINP biyosensörünün depolama süresine bağlı aktivite değişimi 12 haftalık periyot boyunca izlenmiştir. İlk hafta için %100 olarak kabul edilen başlangıç aktivitesi, 4. haftada %98,4, 8. haftada %93,65 ve 12. haftada %84,65 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.39). Depolamanın ilk 8 haftasında aktivite kaybının minimal düzeyde olduğu, 8. haftadan sonra ise daha belirgin bir azalma eğilimi gösterdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgular, biyosensörün 8 haftalık süre boyunca yüksek kararlılığını koruduğunu, bu sürenin ardından ise aktivitenin anlamlı düzeyde azaldığını ortaya koymaktadır.

**Şekil.4.39.** PINP sensörünün depo ömrü

4.10.5. Yapay serum matrisinde analitik validasyon

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05M), Anti-PINP (5 ng/mL) ve PINP 1 saat] hazırlanan biyosensörler ile yapay serumda ölçümler alınmıştır. Yapay serumun biyosensör cevabı üzerindeki etkisi 10-60 ng/mL PINP konsantrasyon aralığında incelendi. Yapay serumda hazırlanan PINP porsiyonları optimum immobilizasyon koşulları altında hazırlanan biyosensörler ile ölçümler alındı.

Hazırlanan PINP biyosensörü ile yapay serumdaki PINP miktarları belirlenerek, oluşturulan standart grafik denkleminde PINP miktarları ve % geri kazanım sonuçları hesaplanmış ve Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Yapay serum da geri kazanım analizi

Yapay serumda PINP düzeyi (ng/mL)	Ölçülen PINP düzeyi (ng/mL)	Geri kazanım (%)
10	9,87	98,7
20	21,12	105,6
30	29,87	99,57
40	40,1	100,25
50	51,2	102,4
60	59,75	99,58

Yapay serum numuneleri kullanılarak ölçülen PINP düzeyleri ve % dönüşüm verileri yapay serum bileşimindeki tuzların ve diğer biyomoleküllerin biyosensör yanıtı üzerinde çok etkisi olmadığını göstermektedir. Bu da; geliştirilen PINP biyosensörünün gerçek serum örneklerinde PINP miktar tayininin kesin ve özgül olarak belirlenmesi için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

4.10.6. Yapay tükürük matrisinde analitik validasyon

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0,2 M/0,05M), Anti-PINP (5 ng/mL) ve PINP 1 saat] hazırlanan biyosensörler ile yapay serumda ölçümler alınmıştır. Yapay tükürüğün biyosensör cevabı üzerindeki etkisi 10-60 ng/mL PINP konsantrasyon aralığında incelendi. Yapay tükürük de hazırlanan PINP çözeltileri optimum immobilizasyon koşulları altında hazırlanan biyosensörler ile ölçümler alındı.

Hazırlanan PINP biyosensörü ile yapay serumdaki PINP miktarları belirlenerek, oluşturulan standart grafik denkleminde PINP miktarları ve % geri kazanım sonuçları hesaplanmış ve Çizelge 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4.21 Yapay tükürük de geri kazanım analizi

Yapay tükürük de PINP düzeyi (ng/mL)	Ölçülen PINP düzeyi (ng/mL)	Geri kazanım (%)
10	9,85	98,5
20	21,1	105,5
30	29,85	99,5
40	39,9	99,75
50	51,5	103
60	59,9	99,83

Yapay tükürük numuneleri kullanılarak ölçülen PINP düzeyleri ve % dönüşüm verileri yapay tükürük bileşimindeki tuzların ve diğer biyomoleküllerin biyosensör yanıtı üzerinde çok etkisi olmadığını göstermektedir. Bu da; geliştirilen PINP biyosensörünün gerçek tükürük örneklerinde PINP miktar tayininin kesin ve özgül olarak belirlenmesi için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

4.10.7 Yapay idrar matriksinde analitik validasyon

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [3-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2M/0,05M), Anti-PINP (5 ng/mL) ve PINP 1 saat] hazırlanan biyosensörler ile yapay idrarda ölçümler alınmıştır. Yapay idrarın biyosensör cevabı üzerindeki etkisi 10-60 ng/mL PINP konsantrasyon aralığında incelendi. Yapay idrarda hazırlanan PINP çözeltileri optimum immobilizasyon koşulları altında hazırlanan biyosensörler ile ölçümler alındı.

Hazırlanan PINP biyosensörü ile yapay serumdaki PINP miktarları belirlenerek, oluşturulan standart grafik denkleminde PINP miktarları ve % geri kazanım sonuçları hesaplanmış ve Çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.22. Yapay idrarda geri kazanım analizi

Yapay idrarda PINP düzeyi (ng/mL)	Ölçülen PINP düzeyi (ng/mL)	Geri kazanım (%)
10	10,19	101,49
20	20,28	101,4
30	29,13	97,1
40	40,12	100,3
50	51,01	102,02
60	59,05	98,42

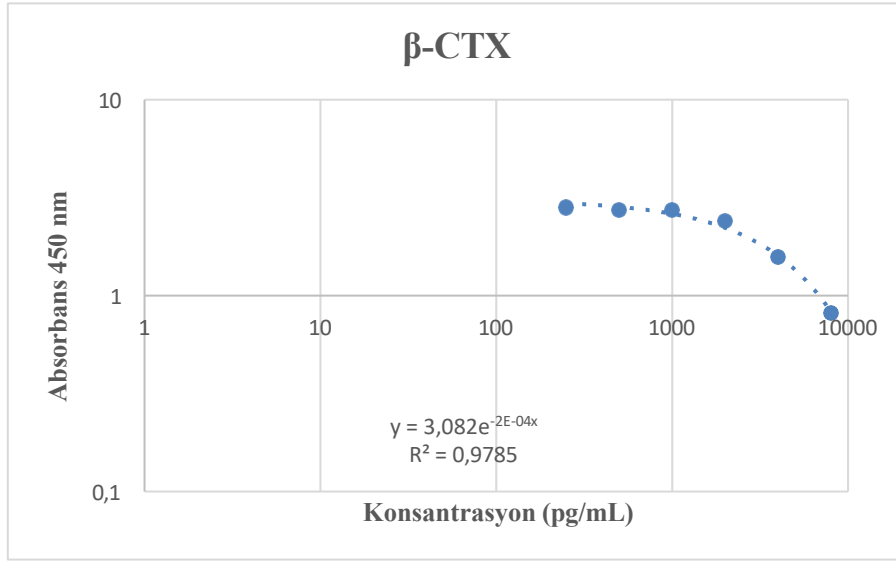
Yapay idrar numuneleri kullanılarak ölçülen PINP düzeyleri ve % dönüşüm verileri yapay idrar bileşimindeki tuzların ve diğer biyomoleküllerin biyosensör yanıtı üzerinde çok etkisi olmadığını göstermektedir. Bu da; geliştirilen PINP biyosensörünün gerçek idrar örneklerinde PINP miktar tayininin kesin ve özgül olarak belirlenmesi için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

4.11. ELISA ve ECLIA SONUÇLARI

β -CTX ve PINP'ın konsantrasyonunun belirlenmesi için kullandığımız ELISA kitlerine ait standart konsantrasyonları ve absorbands değerleri Çizelge 4.23 ve 24'de, oluşturulan standart grafik Şekil 4.40 ve 41'de verilmiştir.

Çizelge 4.23. β -CTX konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbands değerleri

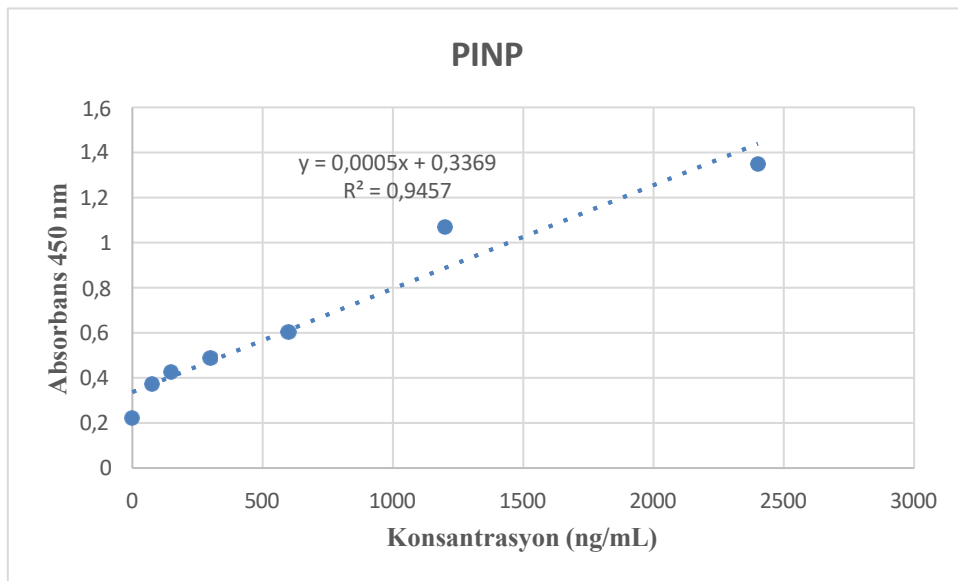
β -CTX konsantrasyonu (pg/mL)	Absorbans değeri (450 nm)
8000	0,8155
4000	1,575
2000	2,390
1000	2,718
500	2,738
250	2,809



Şekil 4.40. β-CTX ELISA kitinin standart grafiği

Çizelge 4.24. PINP konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri

PINP Konsantrasyonu (ng/mL)	Absorbans değerleri (450 nm)
2400	1,348
1200	1,068
600	0,603
300	0,486
150	0,426
75	0,373
0	0,223



Şekil 4.41. PINP ELISA kitinin standart grafiği

4.12. ELISA, Biyosensör ve ECLIA Sonuçları

Hazırlanan yapay serum ,tükürük ve idrar örneklerinde β -CTX, PINP konsantrasyonu içeren numuneler, ELISA, biyosensör ve ECLIA yöntemi kullanılarak ölçüm alındı. Çizelge 4.25, 26, 27, 28, 29 ve 30’da β -CTX ve PINP konsantrasyonlarının ELISA, biyosensör ve ECLIA sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.25. Yapay serumda β -CTX konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları

Yapay serumda β -CTX konsantrasyonları (pg/mL)	Biyosensör	ECLIA	ELISA
10	8,8	10,2	11,5
20	20,7	23,6	21,9
30	29,1	34,6	32,5
40	39,95	40,3	41,8
50	51,27	49,7	50,7
60	60,25	61,5	62,5

Çizelge 4.26. Yapay tükürükte β -CTX konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları

Yapay tükürükte β -CTX konsantrasyonları (pg/mL)	Biyosensör	ECLIA	ELISA
10	8,4	8,0	9,1
20	20,01	19,5	21,2
30	28,5	29,9	30,5
40	39,5	41,3	42,5
50	51,02	50,6	50,2
60	59,95	60,5	62

Çizelge 4.27. Yapay idrarda β -CTX konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları

Yapay idrarda β -CTX konsantrasyonları (pg/mL)	Biyosensör	ECLIA	ELISA
10	8,6	9,8	10,2
20	20,5	24,6	20,2
30	29,23	31,5	31,8
40	40,01	39,2	40,1
50	51,42	55,7	50,6
60	60,05	62,5	61,4

Çizelge 4.28. Yapay serumda PINP konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları

Yapay serumda PINP konsantrasyonları (ng/mL)	Biyosensör	ECLIA	ELISA
10	9,87	10,5	10,2
20	21,12	20,7	20,2
30	29,87	29,1	32,2
40	40,1	41,3	42,2
50	51,2	53,0	52,2
60	59,75	60,8	60,2

Çizelge 4.29. Yapay tükürükte PINP konsantrasyonlarının biyosensör, ECLIA ve ELISA sonuçları

Yapay tükürükte PINP konsantrasyonları (ng/mL)	Biyosensör	ECLIA	ELISA
10	9,85	9,56	10,1
20	21,1	20,2	19,9
30	29,85	28,3	31,2
40	39,9	38,3	41,5
50	51,5	49,5	51,8
60	59,9	58,1	58,9

Çizelge 4.30. Yapay idrarda PINP konsantrasyonlarının biyosensör , ECLIA ve ELISA sonuçları

Yapay idrarda PINP konsantrasyonları (ng/mL)	Biyosensör	ECLIA	ELISA
10	10,19	9,45	9,65
20	20,28	19,3	19,8
30	29,13	27,8	27,2
40	40,12	38,9	39,5
50	51,01	49,9	50,5
60	59,05	58,5	59,9

4.13. ELISA, ECLIA ve Biyosensör Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Yapılan çalışmada yapay serum, tükürük ve idrar numuneleri standart ekleme yöntemi ile üç farklı yöntemle analiz edildi ve elde edilen β -CTX ve PINP değerleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Aralarındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla MedCalc 2025 programında

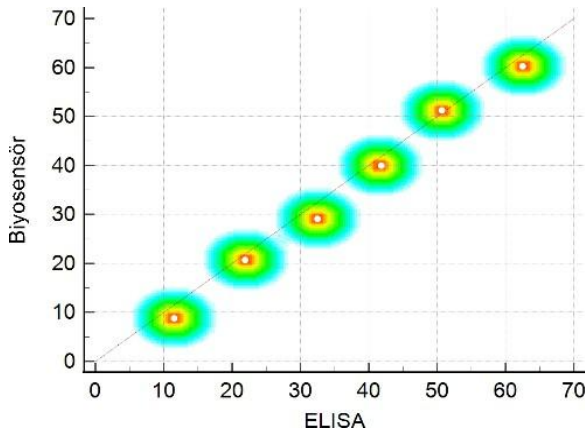
Bland Altman, Deming regresyon analizi ve Passing Bablok yöntem karşılaştırılması yapıldı.

4.13.1. β -CTX için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışma da yapay serum, tükürük ve idrar numunelerinden, ELISA ve biyosensör yöntemleri ile elde edilen β -CTX değerleri MedCalc 2025 istatistik programında Bland Altman, Deming regresyon analizi ve Passing Bablok analiz tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, ELISA ve biyosensör arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmış, değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

Yapay serumda β -CTX için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

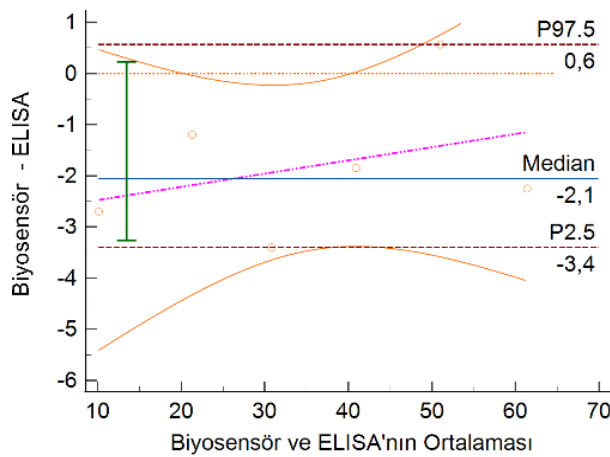
Yapay serumda β -CTX düzeylerinin ELISA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen biyosensör ile ELISA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9977$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9780 ile 0,9998 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay serumda β -CTX düzeyinin ELISA ve Biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.43’de gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) -2.05 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (-3.26 ile 0.23) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla -3.40 ve 0.57 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.31. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -2,7333 + 0,02585 x$
Rezidüel standart sapma	1,4446

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-eksenini kesme noktası	-2,7333	1,3565	-2,0149	0,1142	-6,4996 - 1,0331
Eğim katsayısı	0,02585	0,03402	0,7598	0,4897	-0,06860 - 0,1203

Yapay serum da biyosensör ve ELISA yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

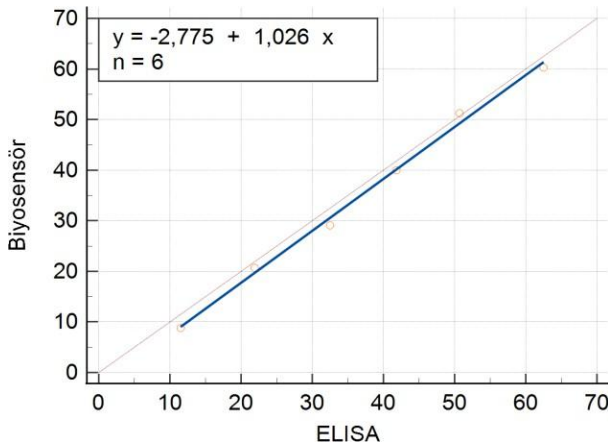
arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 4) tanımlanmıştır:

$$y = -2.7333 + 0.02585x \quad (4)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,02585) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,4897$; %95 GA: $-0,0686 - 0,1203$). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-eksenini kesme noktası ($-2,7333$) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,1142$; %95 GA: $-6,4996 - 1,0331$), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,4446 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki doğrusal ilişki Deming regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve Şekil 4.44' de gösterilmiştir.

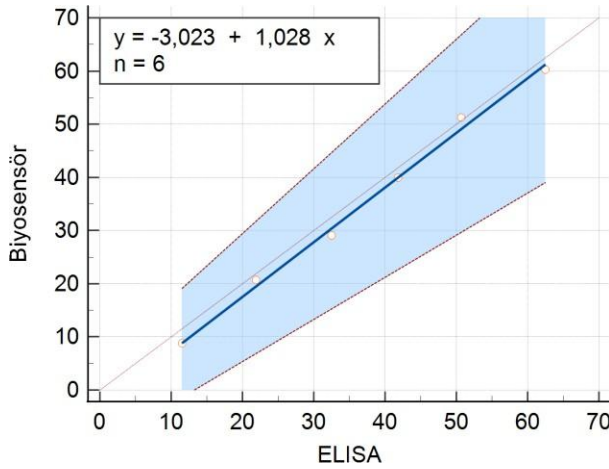


Şekil 4.44. Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.32. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

Regresyon Denklemi			
$y = -2,7746 + 1,0263 x$			
Parametre	Katsayısı	Std.Hata	%95 GA
y-eksenini kesme noktası	-2,7746	1,1902	-5,8341- 0,2850
Eğim katsayısı	1,0263	0,04027	0,9228 -1,1299

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0263; %95 GA: 0,9228–1,1299) ve y-eksenini kesme noktası (-2,7746; %95 GA: -5,8341–0,2850) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9977$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

**Şekil 4.45.** Yapay serumda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.33. Passing -Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

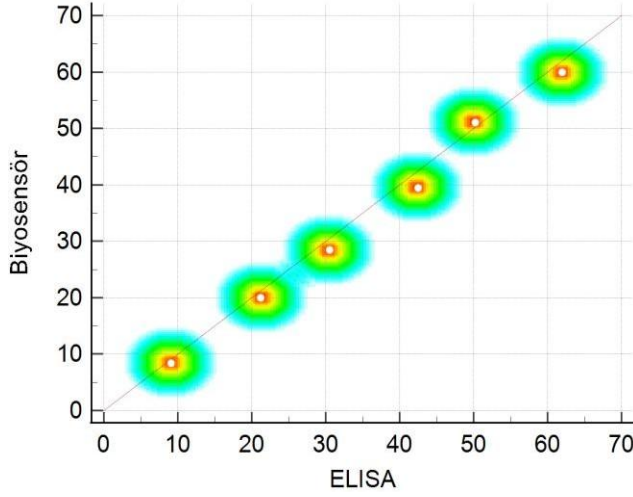
$y = -3,022607 + 1,028053 x$	
Sistemik farklar	
y-eksenini kesme noktası A	-3,0226
%95 GA	-10,4893 - 5,0854
Orantısal farklar	
Eğim Katsayısı B	1,0281
%95 GA	0,7925 -1,2181
Rastgele farklar	
Rezidüel Standart Sapma (RSD)	1,0338
± 1.96 RSD Interval	-2,0263 - 2,0263
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için CUSUM testi	Doğrusallıktan anlamlı bir sapma gözlenmemiştir (p=0,93)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (1,0281; %95 GA: 0,7925–1,2181) ve y-eksenini kesme noktası (-3,0226; %95 GA: -10,4893–5,0854) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,93$) doğrusallık varsayımının karşılandığını ve ilişkinin doğası gereği doğrusal bir yapıda ele alınmasının uygun olduğunu göstermektedir. p değerinin yüksek olması ($p > 0,05$), gözlemlenen sapmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ve dolayısıyla ilişkinin doğrusal olarak kabul edilebileceğini desteklemektedir. Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında tam uyum ve son derece anlamlı pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Tüm yöntemler birlikte değerlendirildiğinde, biyosensör yöntemi ile ELISA arasında yüksek düzeyde uyum, doğruluk ve tekrarlanabilirlik bulunduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen veriler, biyosensörün yapay serumda β -CTX'in tespiti için referans yöntemine güçlü bir alternatif olabileceğini desteklemektedir.

Yapay tükürük de β -CTX için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

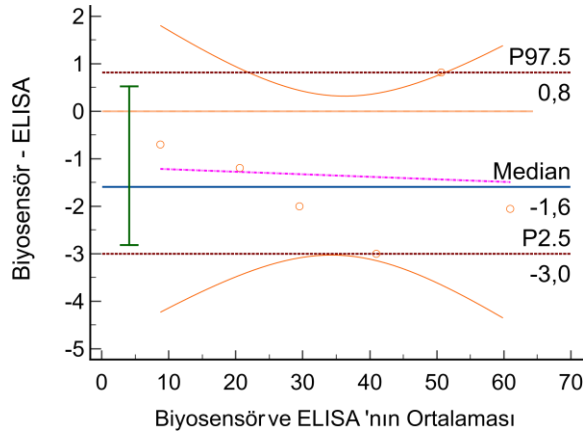
Yapay tükürük de β -CTX düzeylerinin ELISA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen biyosensör ile ELISA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9977$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9779 ile 0,9998 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay tükürük de β -CTX düzeyinin ELISA ve Biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.47’de gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-1,595$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-2,815$ ile $0,524$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-3,00$ ve $0,82$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.34. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -1,1660 - 0,005315 x$
Rezidüel standart sapma	1,4781

Parametre	Katsayısı	Std. Hata	t	p	% 95 GA
y-eksenini kesme noktası	-1,1660	1,3442	-0,8675	0,4346	-4,8981 - 2,5660
Eğim katsayısı	-0,005315	0,03408	-0,1559	0,8836	-0,09995 - 0,08932

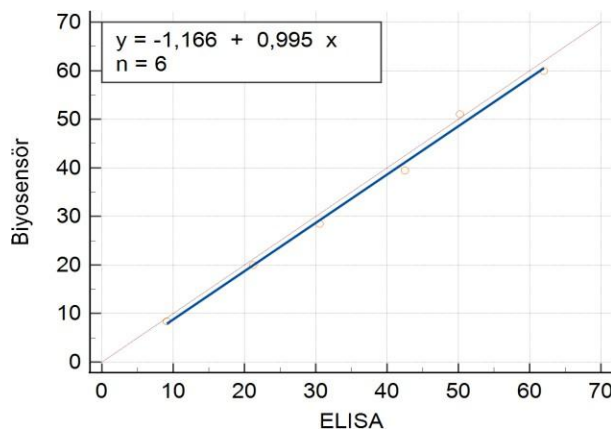
Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 5) tanımlanmıştır:

$$y = -1,1660 - 0,005315 x \quad (5)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,005315) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,8836$; %95 GA: -0.09995 – 0,08932). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası (-1,1660) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,4346$; %95 GA: -4,8981– 2,5660), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,4781 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki doğrusal ilişki Deming regresyon analizi ile değerlendirilmiş ve Şekil 4.48’de gösterilmiştir.

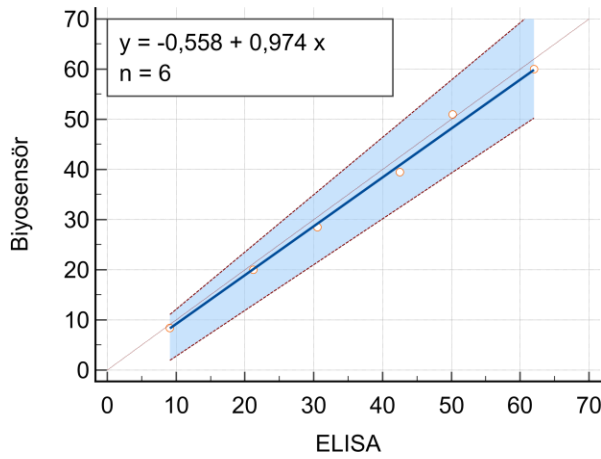


Şekil 4.48. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.35. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -1,1659 + 0,9948 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-1,1659	0,8703	-3,4030 - 1,0712
Eğim katsayısı	0,9948	0,03149	0,9138 - 1,0757

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9948; %95 GA: 0,9138–1,0757) ve y-ekseni kesme noktası (-1,1659; %95 GA: -3,4030–1,0712 değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısız yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9977$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.49. Yapay tükürük de biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.36. Passing- Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

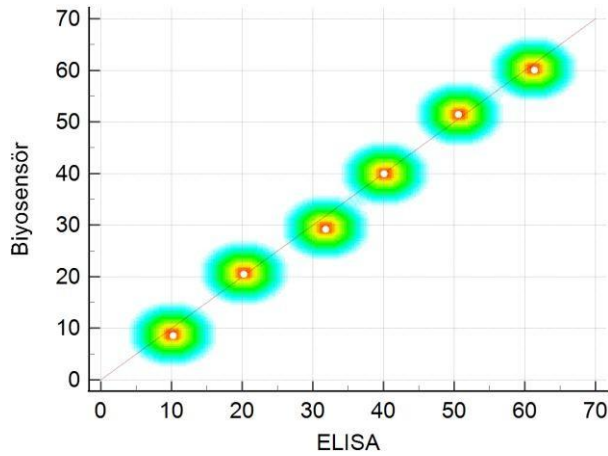
$y = -0,558374 + 0,974480 x$	
Sistemik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	-0,5584
%95 GA	-6,3660 - 0,6790
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9745
%95 GA	0,9129 - 1,1431
Rastgele farklar	
Residüel Standart Sapma (RSD)	1,0967
± 1.96 RSD Interval	-2,1495 - 2,1495
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için CUSUM testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9745; %95 GA: 0,9129–1,1431) ve y-ekseni kesme noktası (-0,5584; %95 GA: -6,3660–0,6790) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistemik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Tüm yöntemler birlikte değerlendirildiğinde, biyosensör yöntemi ile ELISA arasında yüksek düzeyde uyum, doğruluk ve tekrarlanabilirlik bulunduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen veriler, biyosensörün yapay serumda β -CTX'in tespiti için referans yönteme güçlü bir alternatif olabileceğini desteklemektedir.

Yapay idrar da β -CTX için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

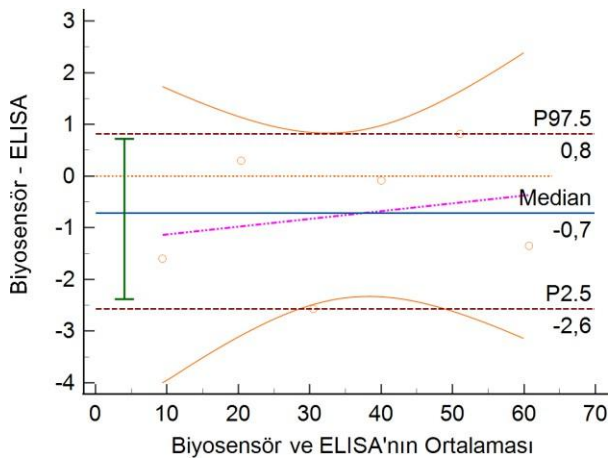
Yapay idrar da β -CTX düzeylerinin ELISA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.51).



Şekil 4.50. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen biyosensör ile ELISA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9978$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9793 ile 0,9998 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay idrarda β -CTX düzeyinin ELISA ve Biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.51’de gösterilmiştir.



Şekil 4.51. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-0,72$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-2,3817$ ile $0,7191$) sıfır değerini

içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-2,57$ ve $0,82$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.37. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -1,2800 + 0,01504 x$
Rezidüel standart sapma	1,4127

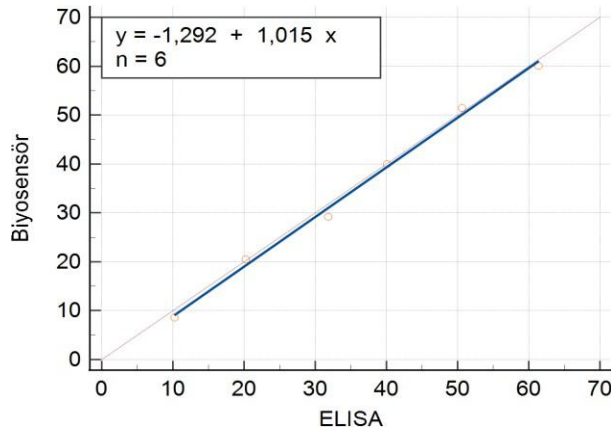
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesim noktası	-1,2800	1,3010	-0,9838	0,3809	-4,8921 - 2,3322
Eğim katsayısı	0,01504	0,03300	0,4559	0,6721	-0,07657 - 0,1067

Yapay idrar da biyosensör ve ELISA yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 6) tanımlanmıştır:

$$y = -1,2800 + 0,01504x \quad (6)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,01504) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,6721$; %95 GA: $-0,07657 - 0,1067$). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası ($-1,2800$) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,3809$; %95 GA: $-4,8921 - 2,3322$), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,4127 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

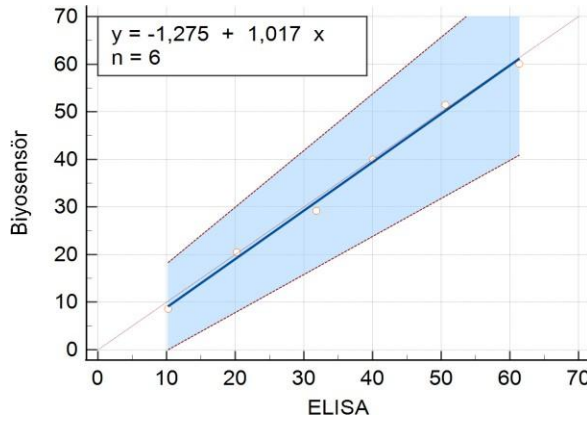


Şekil 4.52. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.38. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -1,2919 + 1,0152 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-1,2919	1,2977	-4,6277 - 2,0439
Eğim katsayısı	1,0152	0,03622	0,9221 - 1,1083

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0152; %95 GA: 0,9221–1,1083) ve y-ekseni katsayısı (-1,2919; %95 GA: -4,6277–2,0439) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9978$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.53. Yapay idrarda biyosensör ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.39. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -1,275197 + 1,017105 x$	
Sistemik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	-1,2752
%95 GA	-8,1605 - 6,1629
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	1,0171
%95 GA	0,7991 - 1,1900
Rastgele farklar	
Residüel Standart Sapma (RSD)	1,0019
± 1.96 RSD Interval	-1,9638 - 1,9638
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,99)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (1,0171; %95 GA: 0,7991–1,1900) ve y-ekseni kesim noktası (-1,2752; %95 GA: -8,1605–6,1629) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistemik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi (p = 0,99) doğrusal modelden sapma olmadığını,

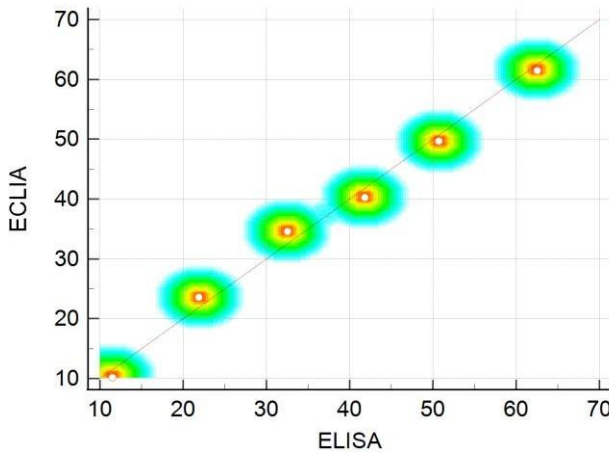
Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1.000$, $p < 0.0001$) ise iki yöntem arasında tam uyum ve son derece anlamlı pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.

4.13.2. β -CTX için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışma da yapay serum, tükürük ve idrar numunelerinden, ELISA ve ECLIA yöntemleri ile elde edilen β -CTX değerleri MedCalc 2025 istatistik programında Bland Altman, Deming regresyon analizi ve Passing Bablok analiz tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, ELISA ve ECLIA arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmış, değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

Yapay serumda β -CTX için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

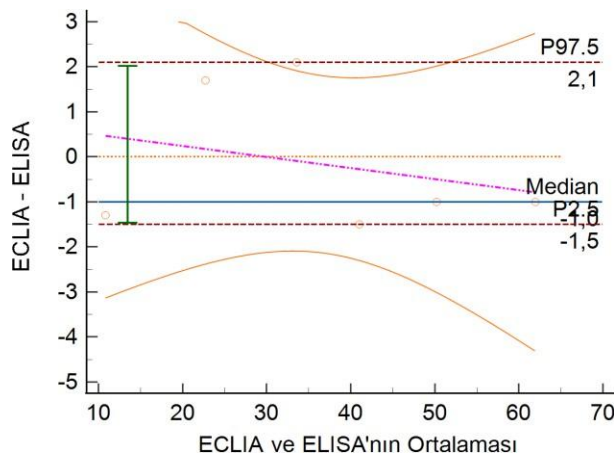
Yapay serumda β -CTX düzeylerinin ELISA ve ECLIA ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ELISA ile ECLIA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9965$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9668 ile 0,9996 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay serumda β -CTX düzeyinin ELISA ve ECLIA yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.55’de gösterilmiştir.



Şekil 4.55. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-1,00$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-1,46$ ile $2,02$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-1,50$ ve $2,10$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.40. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = 0,7338 - 0,02451 x$
Rezidüel standart sapma	1,7352

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-eksenini kesme noktası	0,7338	1,6947	0,4330	0,6873	-3,9715 - 5,4391
Eğim katsayısı	-0,02451	0,04191	-0,5849	0,5900	-0,1409 - 0,09185

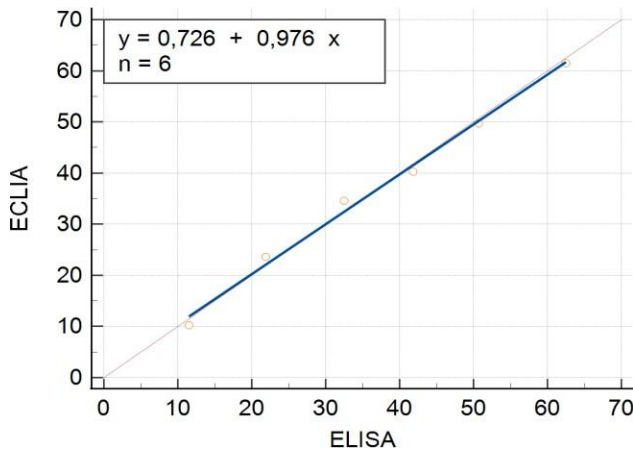
Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki

yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 7) tanımlanmıştır:

$$y = 0,7338 - 0,02451x \quad (7)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,02451) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,5900$; %95 GA: -0,1409 – 0,09185). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası (0,7338) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,6873$; %95 GA: 3,9715 – 5,4391), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,7352 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

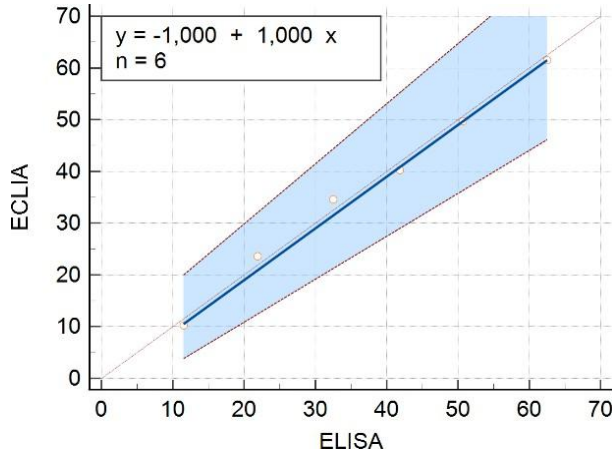


Şekil 4.56. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.41. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,7259 + 0,9758 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,7259	2,7017	-6,2191 - 7,6709
Eğim katsayısı	0,9758	0,05487	0,8347 - 1,1168

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim 0,9758; %95 GA: 0,8347–1,1168) ve kesişim (0,7259; %95 GA: -6,2191–7,6709 değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısız yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9965$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir



Şekil 4.57. Yapay serumda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

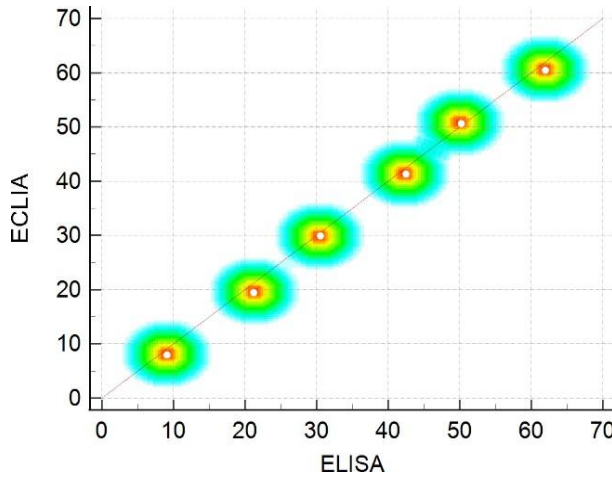
Çizelge 4.42. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -1,000000 + 1,000000 x$	
Sistematiik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	-1,0000
%95 GA	-5,7148 - 6,6277
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	1,0000
%95 GA	0,8297 - 1,1619
Rastgele farklar	
Residüel Standart Sapma (RSD)	1,4680
± 1.96 RSD Interval	-2,8773 - 2,8773
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,93)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (1,0000; %95 GA: 0,8297–1,1619) ve y-ekseni kesme noktası (-1,0000; %95 GA: -5,7148–6,6277) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematiik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,93$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Yapay tükürük de β -CTX için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

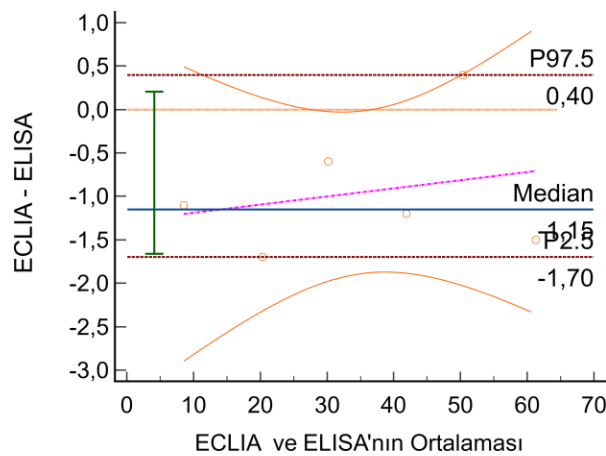
Yapay tükürük de β -CTX düzeylerinin ELISA ve ECLIA ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ELISA ile ECLIA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9993$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9932 ile 0,9999 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay tükürük de β -CTX düzeyinin ELISA ve ECLIA yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.59’da gösterilmiştir.



Şekil 4.59. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-1,15$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-1,66$ ile $0,20$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-1,70$ ve $0,40$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.43. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -1,2822 + 0,009373 x$
Rezidüel standart sapma	0,8257

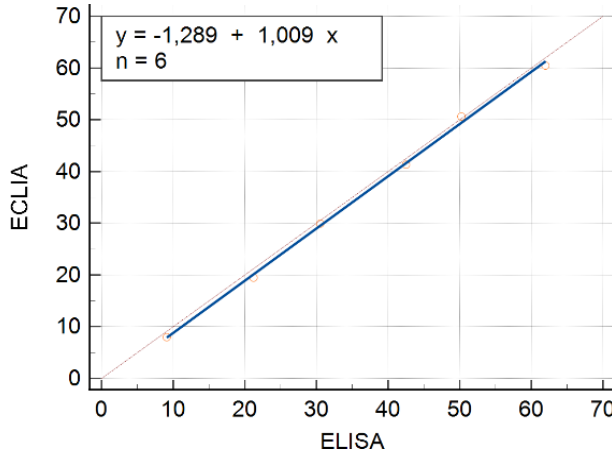
Parametre	Katsayı	Std.Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-1,2822	0,7497	-1,7103	0,1624	-3,3637 - 0,7993
Eğim katsayısı	0,009373	0,01889	0,4961	0,6458	-0,04308 - 0,06183

Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 8) tanımlanmıştır:

$$y = -1,2822 + 0,009373x \quad (8)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,009373) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,6458$; %95 GA: $-0,04308 - 0,06183$). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlılık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası ($-1,2822$) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,1624$; %95 GA: $-3,3637 - 0,7993$), bu da yöntemler arasında sabit yanlılık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 0,8257 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

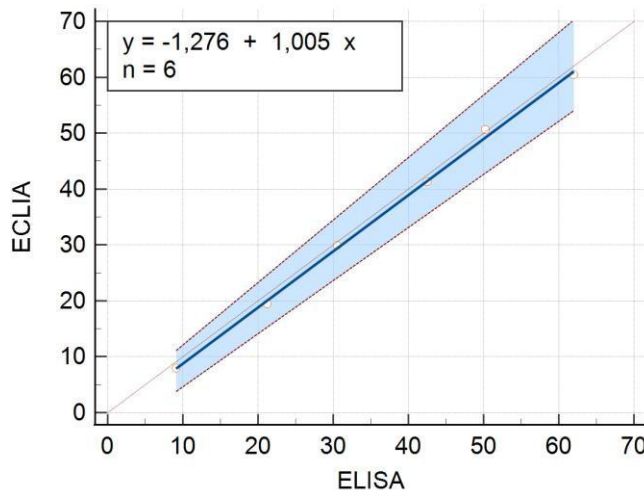


Şekil 4.60. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.44. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -1,2891 + 1,0094 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-1,2891	0,6481	-2,9551 - 0,3770
Eğim katsayısı	1,0094	0,02471	0,9459 - 1,0730

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0094; %95 GA: 0,9459–1,0730) ve y-ekseni kesme noktası (-1,2891; %95 GA: -2,9551–0,3770 değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9993$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.61. Yapay tükürük de ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.45. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

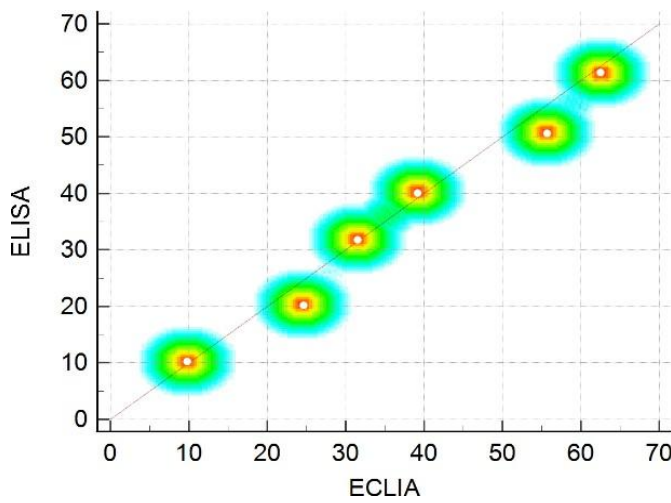
y = -1,276471 + 1,004902 x		
Sistematik farklar		
y-ekseni kesme noktası A	-1,2765	
%95 GA	-4,8726 - 0,9250	
Orantısal farklar		
Eğim katsayısı B	1,0049	
%95 GA	0,9500 - 1,1183	
Rastgele farklar		
Rezidüel Standart Sapma (RSD)	0,6021	
± 1.96 RSD Interval	-1,1802 - 1,1802	
Doğrusal modelin geçerliliği		
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,99)	

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (1,0049; %95 GA: 0,9500–1,1183) ve y-ekseni kesme noktası (-1,2765; %95 GA: -4,8726–0,9250) değerlerinin güven aralıkları

sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,99$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Yapay idrar da β -CTX için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

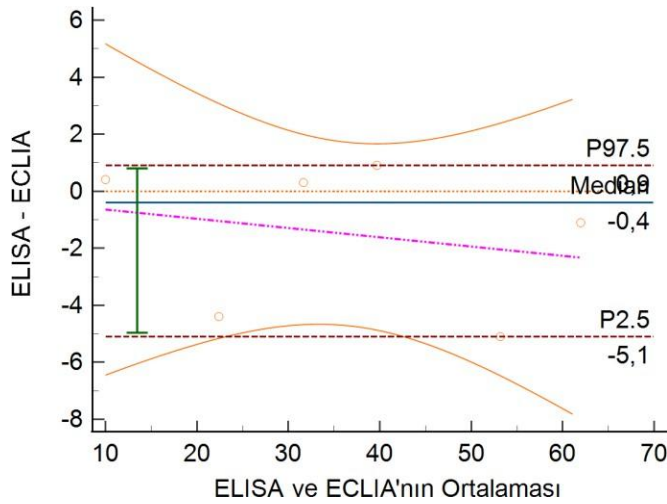
Yapay idrar da β -CTX düzeylerinin ELISA ve ECLIA ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ELISA ile ECLIA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9914$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9201 ile 0,9991 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay idrarda β -CTX düzeyinin ELISA ve ECLIA yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.63’te gösterilmiştir.



Şekil 4.63. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-0,4$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-4,96$ ile $0,80$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-5,10$ ve $0,90$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.46. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (ELISA - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -0,3156 - 0,03248 x$
Rezidüel standart sapma	2,8363

Parametre	Katsayı	Std.Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,3156	2,6635	-0,1185	0,9114	-7,7107 - 7,0794
Eğim katsayısı	-0,03248	0,06578	-0,4938	0,6474	-0,2151 - 0,1501

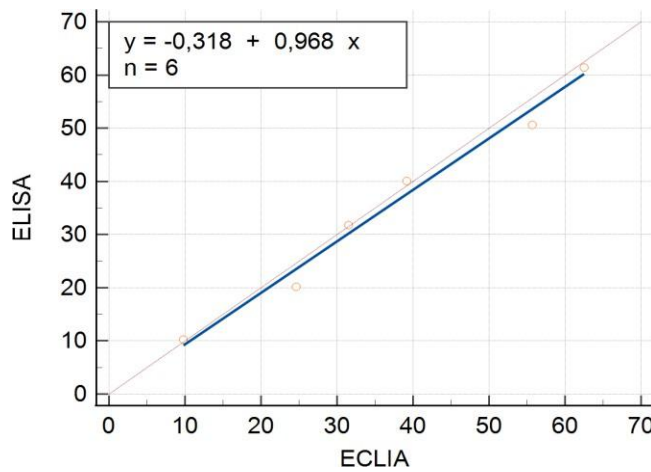
Yapay idrarda da ECLIA ve ELISA yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 9) tanımlanmıştır:

$$y = -0,3156 - 0,03248x \quad (9)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,03248) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,6474$; %95 GA: -0,2151 – 0,1501). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası (-0,3156) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,9114$; %95 GA: -7,7107 – 7,0794), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 2,8363 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

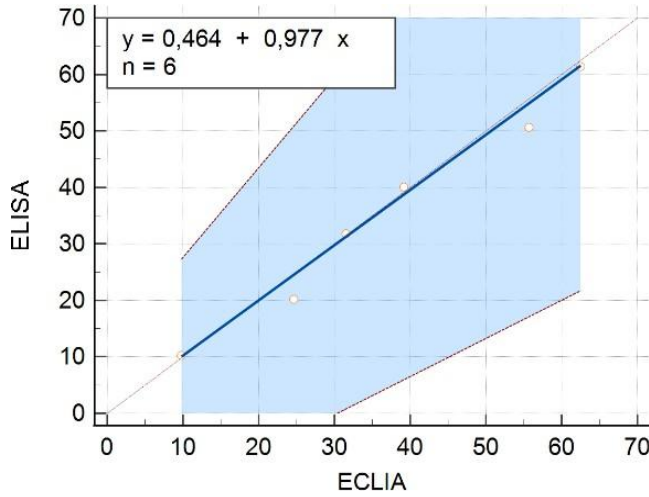


Şekil 4.64. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.47. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,3184 + 0,9683 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,3184	2,5864	-6,9669 - 6,3301
Eğim katsayısı	0,9683	0,06382	0,8042 - 1,1323

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim 0,9683; %95 GA: 0,8042–1,1323) ve kesişim (-0,3184; %95 GA: -6,9669–6,3301 değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9914$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.65. Yapay idrarda ECLIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.48. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,463666 + 0,977492 \cdot x$		
Sistematik farklar		
y-ekseni kesme noktası A	0,4637	
%95 GA	-20,5147 - 11,7405	
Orantısal farklar		
Eğim katsayısı B	0,9775	
%95 GA	0,6757 - 1,5882	
Rastgele farklar		
Rezidüel Standart Sapma (RSD)	2,2397	
± 1.96 RSD Interval	-4,3898 - 4,3898	
Doğrusal modelin geçerliliği		
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)	

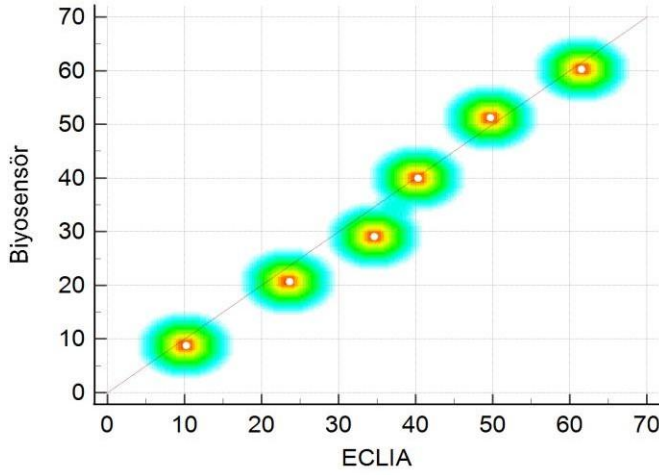
Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9775; %95 GA: 0,6757–1,5882) ve y-ekseni kesme noktası (0,4637; %95 GA: -20,5147–11,7405) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematiik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.

4.13.3. β -CTX için ECLIA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışma da yapay serum, tükürük ve idrar numunelerinden, ECLIA ve biyosensör yöntemleri ile elde edilen β -CTX değerleri MedCalc 2025 istatistik programında Bland Altman, Deming regresyon analizi ve Passing Bablok analiz tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, ECLIA ve ELISA arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmış, değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

Yapay serumda β -CTX için ECLIA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

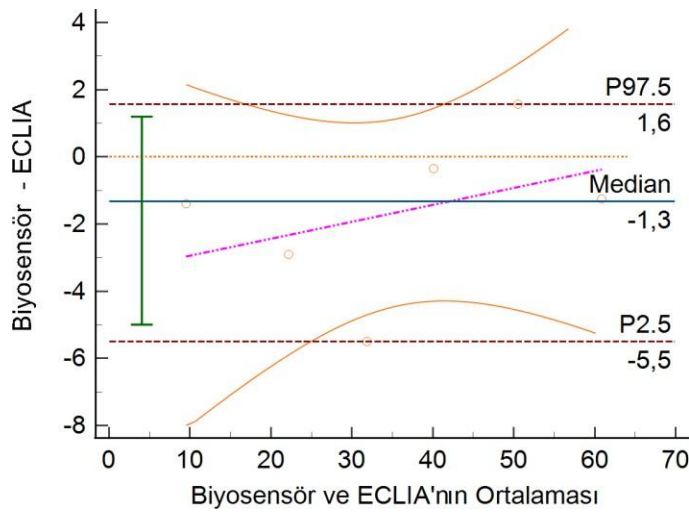
Yapay serumda β -CTX düzeylerinin ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9931$; $p = 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9358 ile 0,9993 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay serumda β -CTX düzeyinin ECLIA ve Biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.67’de gösterilmiştir.



Şekil 4.67. Yapay serum da ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-1,32$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-4,99$ ile $1,19$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-5,50$ ve $1,57$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.49. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -3,4461 + 0,05045 x$
Rezidüel standart sapma	2,4593

Parametre	Katsayısı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-3,4461	2,3299	-1,4791	0,2132	-9,9149 - 3,0227
Eğim katsayı	0,05045	0,05868	0,8598	0,4384	-0,1125 - 0,2134

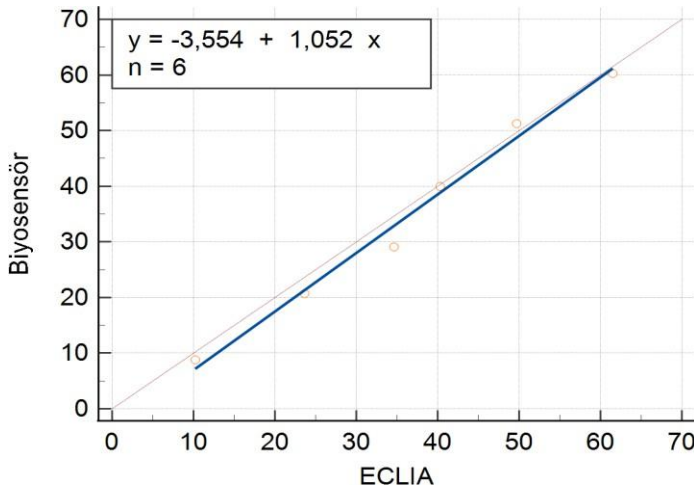
Yapay serum da ECLIA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 10) tanımlanmıştır:

$$y = 3,4461 + 0,05045x \quad (10)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,05045) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,4384$; %95 GA: -0,1125 – 0,2134). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık (bulunmadığını) göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası (-3,4461) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,2132$; %95 GA: -9,9149 – 3,0227), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 2,4593 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

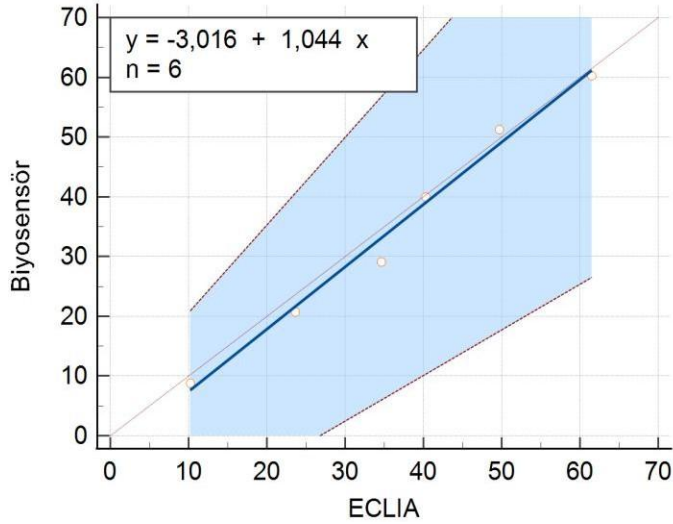


Şekil 4.68. Yapay serumda ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.50. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -3,5541 + 1,0523 x$			
Parametre	Katsayı	Std.Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-3,5541	2,8265	-10,8199 - 3,7117
Eğim katsayısı	1,0523	0,06521	0,8847 - 1,2199

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0523; %95 GA: 0,8847–1,2199) ve y-ekseni kesim noktası (-3,5541; %95 GA: -10,8199-3,7117) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısız yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9931$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.69. Yapay serumda ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

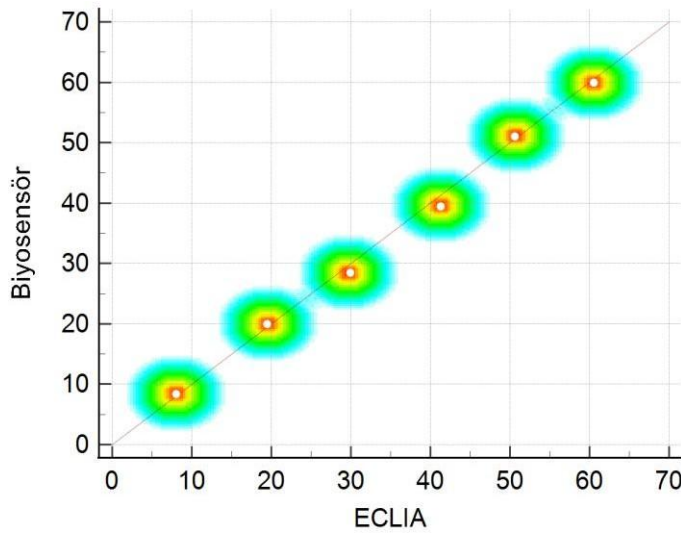
Çizelge 4.51. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -3,015963 + 1,043536 x$	
Sistematiik farklar	
y-ekseni kesim noktası A	-3,0160
%95 GA	-20,4595 - 5,9268
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	1,0435
%95 GA	0,7636 - 1,4682
Rastgele farklar	
Rezidüel Standart Sapma (RSD)	1,7523
± 1.96 RSD Interval	-3,4344 - 3,4344
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,99)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (1,0435 %95 GA: 0,7636–1,4682) ve y-ekseni kesim noktası (-3,0160; %95 GA: -20,4595–5,9268) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematiik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi (p = 0,99) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı (r = 1,000, p < 0,0001) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Yapay tükürük de β -CTX için ECLIA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

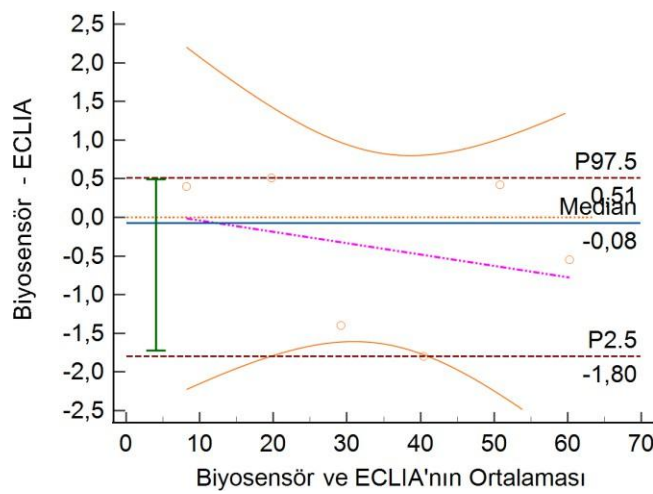
Yapay tükürük de β -CTX düzeylerinin ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.70).



Şekil 4.70. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9988$; $p = 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9881 ile 0,9999 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay tükürük de β -CTX düzeyinin ECLIA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.71’de gösterilmiştir.



Şekil 4.71. Yapay tükürük de ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-0,075$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-1,72$ ile $0,49$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-1,80$ ve $0,51$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.52. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = 0,1073 - 0,01469 x$
Rezidüel standart sapma	1,0855

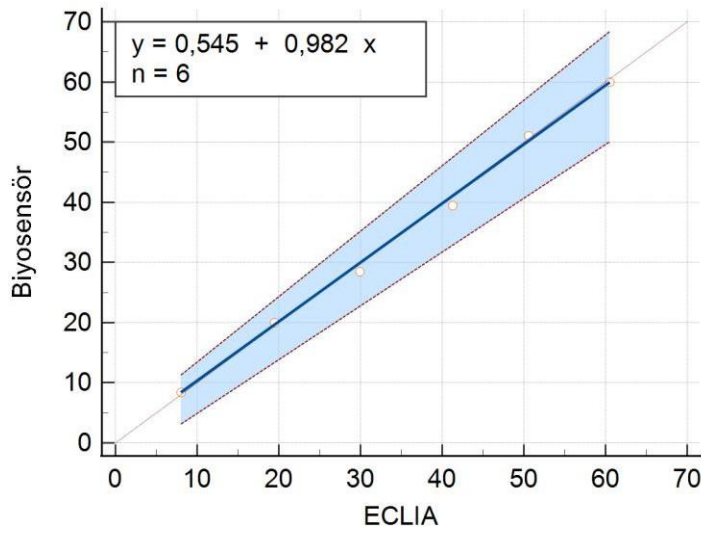
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,1073	0,9727	0,1103	0,9175	-2,5934 - 2,8079
Eğim katsayısı	-0,01469	0,02491	-0,5897	0,5871	-0,08384 - 0,05447

Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 11) tanımlanmıştır:

$$y = 0,1073 - 0,01469x \quad (11)$$

Bu modelde, eğim katsayısı ($-0,01469$) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,5871$; %95 GA: $-0,08384 - 0,05447$). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlılık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası ($0,1073$) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,9175$; %95 GA: $-2,5934 - 2,8079$), bu da yöntemler arasında sabit yanlılık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma $1,08553$ olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

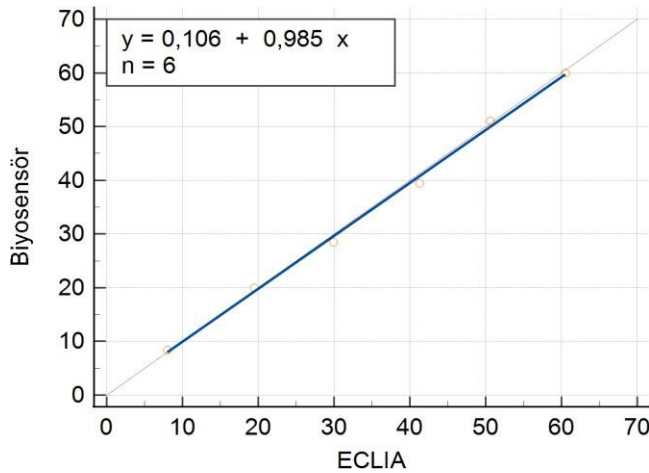


Şekil 4.72. Yapay tükürük de ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.53. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,544762 + 0,981905 x$	
Sistematiik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	0,5448
%95 GA	-4,0289 - 2,5763
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9819
%95 GA	0,8940 - 1,0879
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,8174
± 1.96 RSD Interval	-1,6020 - 1,6020
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,93)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim (0,9819; %95 GA: 0,8940–1,0879) ve y-ekseni kesim noktası (0,5448 ; %95 GA: -4,0289–2,5763) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,93$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.73. Yapay tükürük de ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

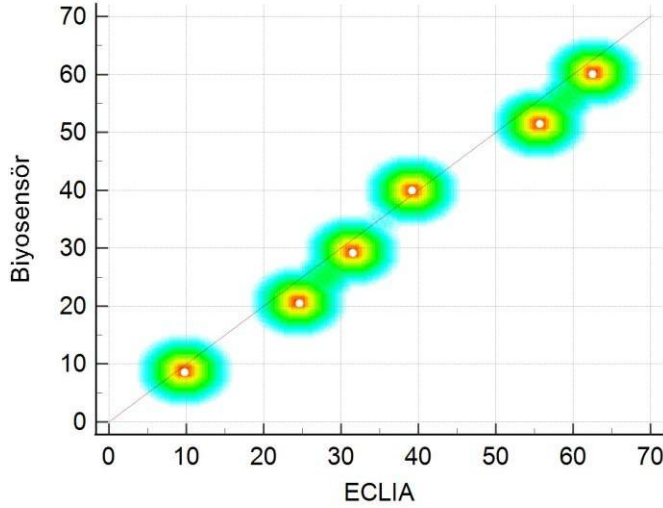
Çizelge 4.54. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,1063 + 0,9854 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,1063	0,7647	-1,8593 - 2,0719
Eğim katsayısı	0,9854	0,01920	0,9361 - 1,0348

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9854; %95 GA: 0,9361-1,0348) ve y-ekseni kesme noktası (0,1063; %95 GA: -1,8593-2,0719) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısız yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9988$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

Yapay idrarda β -CTX için ECLIA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

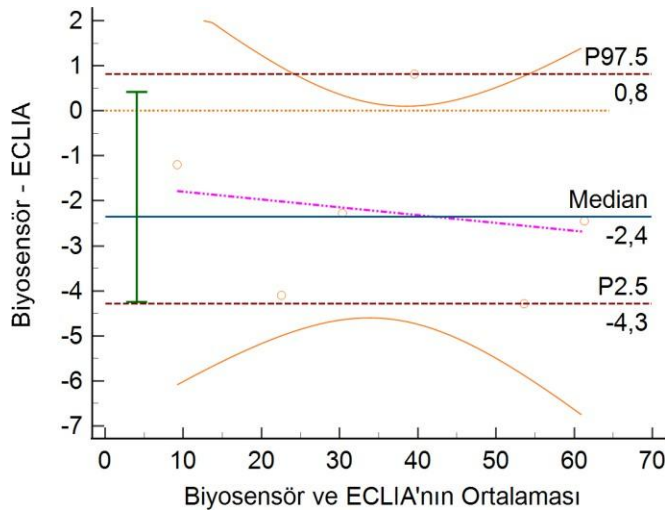
Yapay idrarda β -CTX düzeylerinin ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.74).



Şekil 4.74. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9954$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9565 ile 0,9995 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay idrarda β -CTX düzeyinin ECLIA ve Biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.75’de gösterilmiştir.



Şekil 4.75. Yapay idrarda ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-2,36$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-4,24$ ile $0,41$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-4,28$ ve $0,81$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.55. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -1,6220 - 0,01735 x$
Rezidüel standart sapma	2,0905

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-1,6220	1,9336	-0,8388	0,4488	-6,9905 - 3,7465
Eğim katsayısı	-0,01735	0,04807	-0,3610	0,7364	-0,1508 - 0,1161

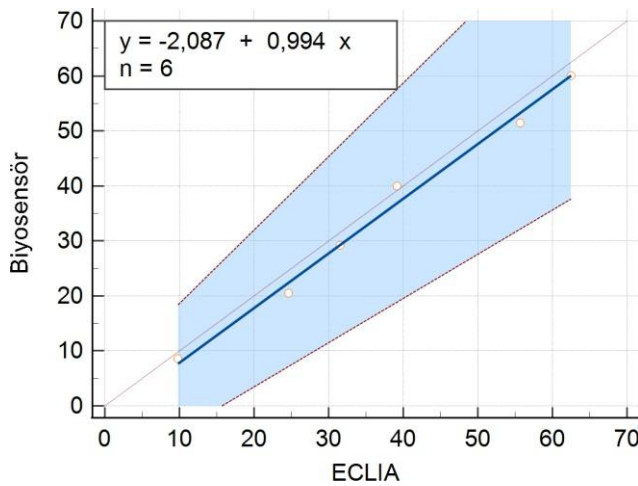
Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen β -CTX ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 12) tanımlanmıştır:

$$y = -1,6220 - 0,01735x \quad (12)$$

Bu modelde, eğim katsayısı $(-0,01735)$ değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,7364$; %95 GA: $-0,1508 - 0,1161$). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası $(-1,6220)$ değeri de anlamlı değildir ($p = 0,4488$; %95 GA: $-6,9905 - 3,7465$), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 2,0905 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

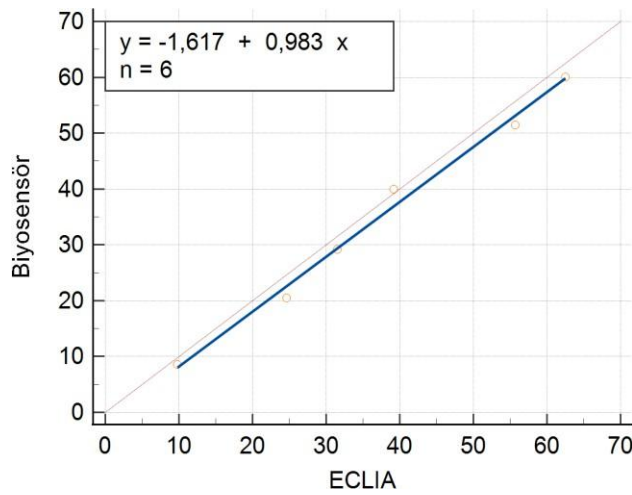


Şekil 4.76. Yapay idrarda ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.56. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -2,087097 + 0,994194 x$	
Sistemantik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	-2,0871
%95 GA	-12,6183 - 5,2682
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9942
%95 GA	0,8041 - 1,3363
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	1,4895
± 1.96 RSD Interval	-2,9195 - 2,9195
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,88)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9942; %95 GA: 0,8041–1,3363) ve y-ekseni kesme noktası (-2,0871 ; %95 GA: -12,6183–5,2682) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistemantik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi (p = 0,88) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı (r = 1.000, p < 0.0001) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.77. Yapay idrarda ECLIA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.57. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -1,6171 + 0,9830 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-1,6171	1,4724	-5,4021 - 2,1678
Eğim katsayısı	0,9830	0,03377	0,8962 - 1,0698

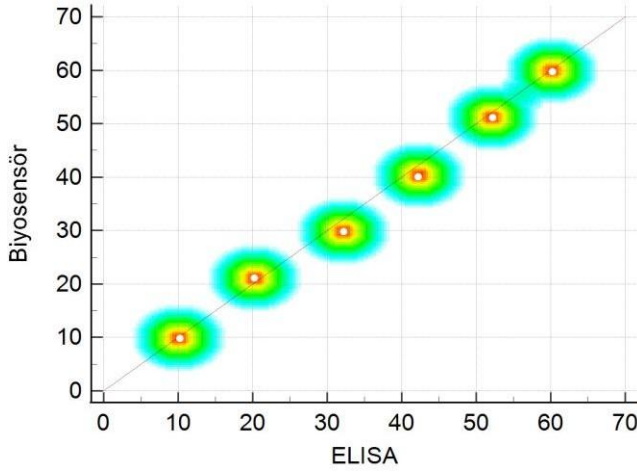
Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9830; %95 GA: 0,8962-1,0698) ve y-ekseni kesme noktası (-1,6171; %95 GA: -5,4021-2,1678) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9954$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

4.13.4. PINP için ELISA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışma da yapay serum, tükürük ve idrar numunelerinden, ELISA ve biyosensör yöntemleri ile elde edilen PINP değerleri MedCalc 2025 istatistik programında Bland Altman, Deming regresyon analizi ve Passing Bablok analiz tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, ELISA ve biyosensör arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmış, değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

Yapay serumda PINP için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

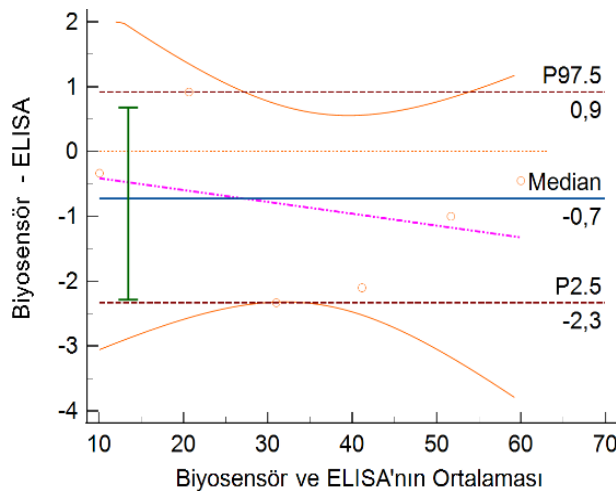
Yapay serumda PINP düzeylerinin ELISA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.78).



Şekil 4.78. Yapay serumda ELISA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ELISA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9981$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9820 ile 0,9998 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay serumda PINP düzeyinin ELISA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.79’da gösterilmiştir.



Şekil 4.79. Yapay serumda ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-0,72$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-2,28$ ile $0,67$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-2,33$ ve $0,92$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.58. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -0,2283 - 0,01827 x$
Rezidüel standart sapma	1,2979

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,2283	1,2205	-0,1870	0,8607	-3,6171 - 3,1605
Eğim katsayısı	-0,01827	0,03075	-0,5942	0,5843	-0,1036 - 0,06710

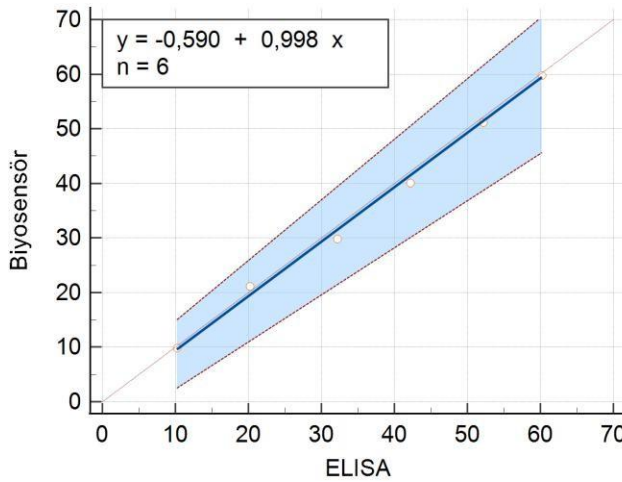
Yapay serumda ELISA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 13) tanımlanmıştır:

$$y = -0,2283 - 0,01827x \quad (13)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,01827) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,5843$; %95 GA: -0,1036 – 0,06710). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası (-0,2283) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,8607$; %95 GA: -3,6171 – 3,1605), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,2979 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

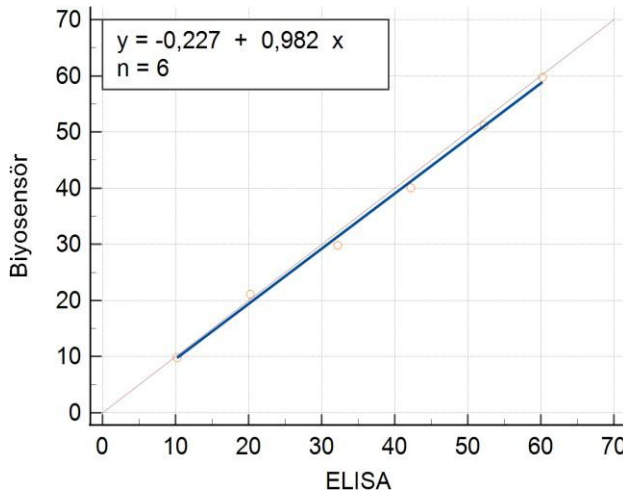


Şekil 4.80. Yapay serumda ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.59. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,590120 + 0,997600 x$	
Sistematik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	-0,5901
%95 GA	-6,3070 - 3,6929
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9976
%95 GA	0,8627 - 1,1100
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,9643
± 1.96 RSD Interval	-1,8900 - 1,8900
Doğrusal model geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9976; %95 GA: 0,8627–1,1100) ve y-ekseni kesme noktası (--0,5901; %95 GA -6,3070 – 3,6929) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.81. Yapay serumda ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

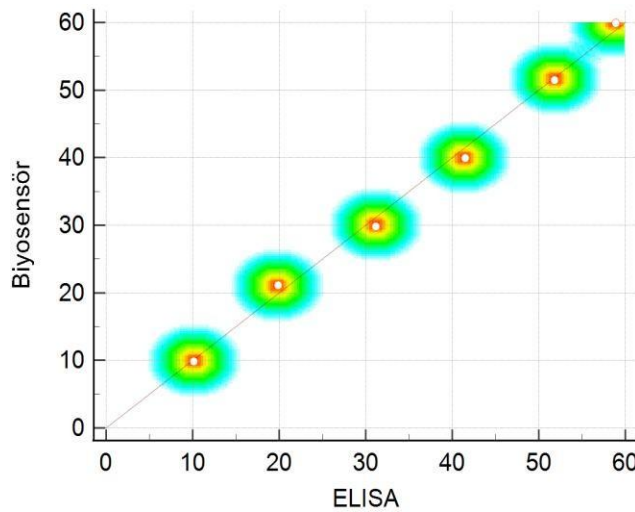
Çizelge 4.60. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,2273 + 0,9819 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesim noktası	-0,2273	1,1517	-3,1878 - 2,7333
Eğim katsayısı	0,9819	0,02741	0,9115 - 1,0524

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı 0,9819; %95 GA: 0,9115-1,0524) ve y-ekseni kesme noktası (-0,2273; %95 GA: -3,1878-2,7333) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9981$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

Yapay tükürük de PINP için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

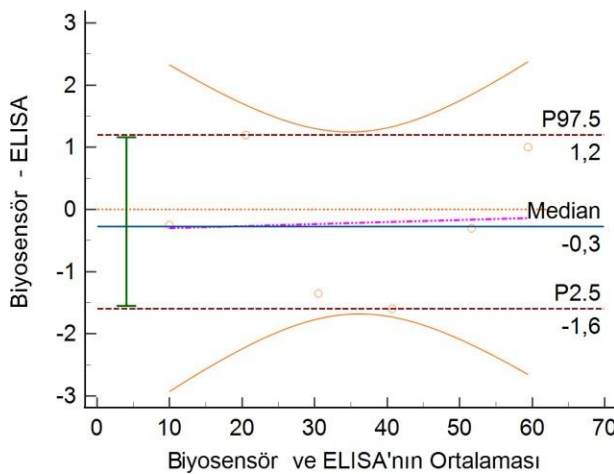
Yapay tükürük de PINP düzeylerinin ELISA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.82).



Şekil 4.82. Yapay tükürük de ELISA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği

Altı numuneden elde edilen ELISA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9981$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9819 ile 0,9998 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay tükürük de PINP düzeyinin ELISA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.83’de gösterilmiştir.



Şekil 4.83. Yapay tükürük de ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) $-0,275$ olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı ($-1,55$ ile $1,16$) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla $-1,60$ ve $1,20$ olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.61. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = -0,3331 + 0,003283 x$
Rezidüel standart sapma	1,2917

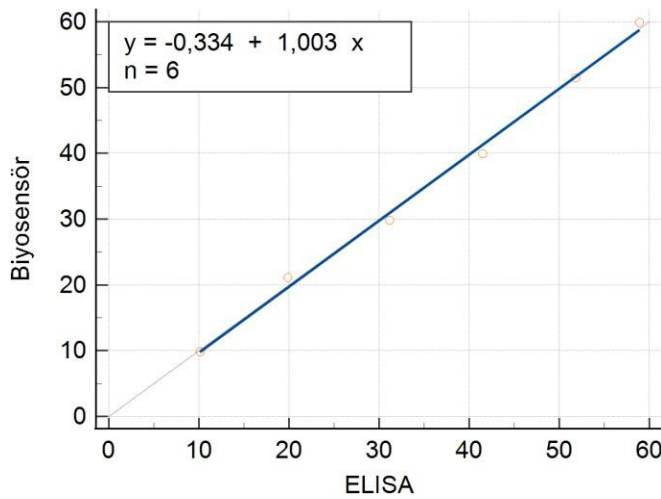
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,3331	1,2124	-0,2747	0,7971	-3,6992 - 3,0330
Eğim katsayısı	0,003283	0,03079	0,1066	0,9202	-0,08220 - 0,08876

Yapay tükürük de ELISA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 14) tanımlanmıştır:

$$y = -0,3331 + 0,003283x \quad (14)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,003283) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,9202$; %95 GA: $-0,08220 - 0,08876$) Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası ($-0,3331$) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,7971$; %95 GA: $-3,6992 - 3,0330$), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,2917 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

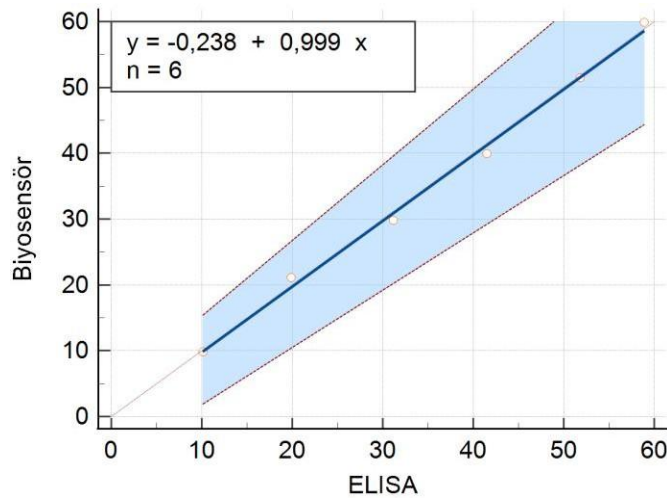


Şekil 4.84. Yapay tükürük de ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.62. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,3341 + 1,0033 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,3341	1,1597	-3,3151 - 2,6469
Eğim katsayısı	1,0033	0,03248	0,9198 - 1,0868

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0033; %95 GA: 0,9198-1,0868) ve y-ekseni kesme noktası (-0,3341; %95 GA: -3,3151-2,6469) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9981$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.85. Yapay tükürük de ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

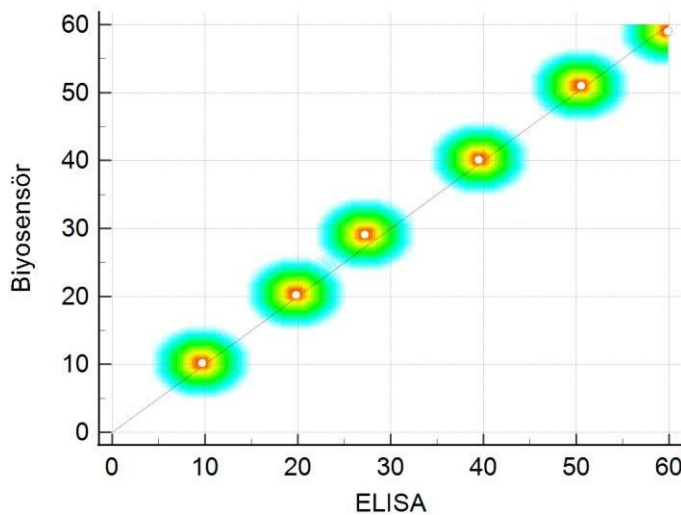
Çizelge 4.63. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,237890 + 0,998801 x$	
Sistemik farklar	
y-ekseni kesim noktası A	-0,2379
%95 GA	-6,9066 - 3,7796
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9988
%95 GA	0,8704 - 1,1494
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,9175
± 1.96 RSD Interval	-1,7983 - 1,7983
Doğrusal model geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,57)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9988; %95 GA: 0,8704–1,1494) ve y-ekseni kesim noktası (-0,2379; %95 GA -6,9066 – 3,7796) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,57$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1.000$, $p < 0.0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Yapay idrarda PINP için ELISA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

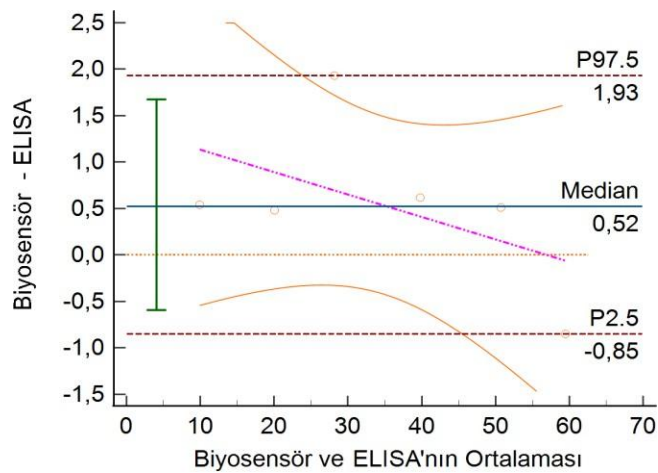
Yapay idrarda PINP düzeylerinin ELISA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.86).



Şekil 4.86. Yapay idrarda ELISA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ELISA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9992$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9923 ile 0,9999 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay idrarda PINP düzeyinin ELISA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.87’de gösterilmiştir.



Şekil 4.87. Yapay idrarda ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) 0,52 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (–0,59 ile 1,67) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla –0,85 ve 1,93 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.64. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (Biyosensör - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

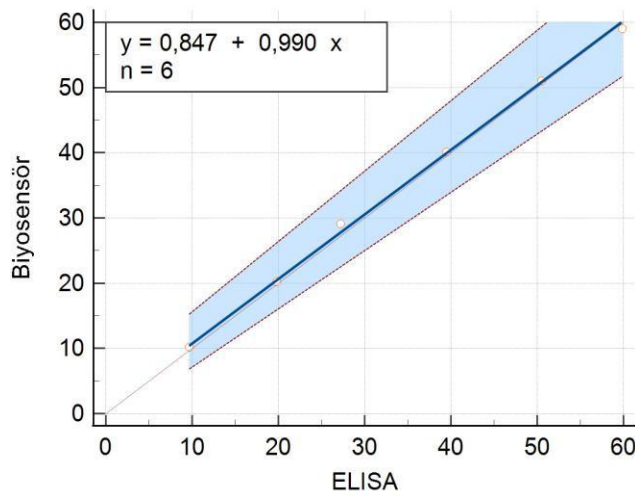
Regresyon Denklemi	$y = 1,3759 - 0,02414 x$				
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	1,3759	0,7760	1,7731	0,1509	-0,7786 - 3,5304
Eğim katsayısı	-0,02414	0,02005	-1,2043	0,2949	-0,07980 - 0,03151

Yapay idrarda ELISA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 15) tanımlanmıştır:

$$y = 1,3759 - 0,02414x \quad (15)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,02414) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,2949$; %95 GA: -0,07980 – 0,03151) Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası (1,3759) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,1509$; %95 GA: -0,7786–3,5304), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 0,8432 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

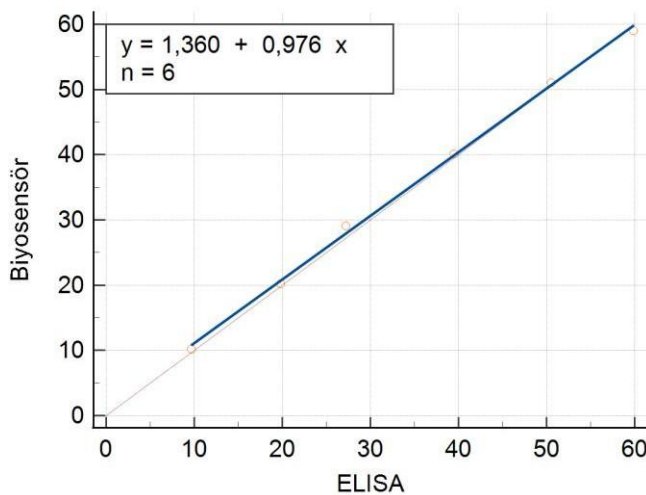


Şekil 4.88. Yapay idrarda ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.65. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,846500 + 0,990000 x$	
Sistemantik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	0,8465
%95 GA	-1,7983 - 4,8269
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9900
%95 GA	0,8935 - 1,0792
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,6328
± 1.96 RSD Interval	-1,2402 - 1,2402
Doğrusal model geçerliliği	
Doğrusalık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9900; %95 GA: 0,8935–1,0792) ve y-ekseni kesme noktası (0,8465; %95 GA -1,7983 – 4,8269) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistemantik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi (p = 0,43) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı (r = 1,000, p < 0,0001) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.89. Yapay idrarda ELISA ve Biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.66. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 1,3602 + 0,9761 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	1,3602	0,9635	-1,1166 - 3,8371
Eğim katsayısı	0,9761	0,02671	0,9075 - 1,0448

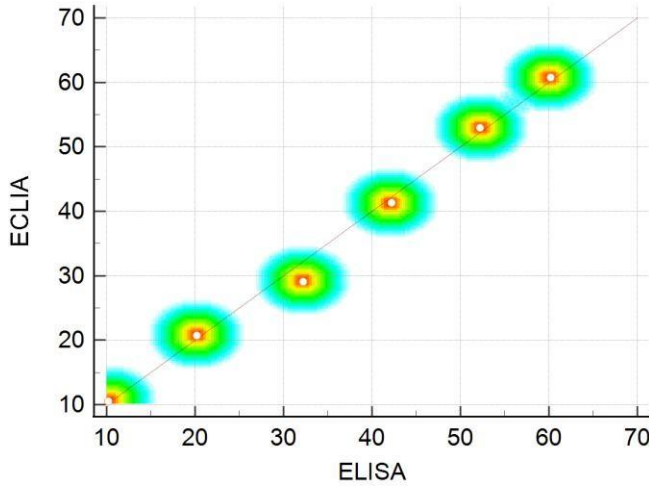
Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9761; %95 GA: 0,9075-1,0448) ve y-ekseni kesim noktası (1,3602; %95 GA: -1,1166-3,8371) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0.9992$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

4.13.5. PINP için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışma da yapay serum, tükürük ve idrar numunelerinden, ELISA ve ECLIA yöntemleri ile elde edilen β -CTX değerleri MedCalc 2025 istatistik programında Bland Altman, Deming regresyon analizi ve Passing Bablok analiz tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, ECLIA ve ELISA arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmış, değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

Yapay serumda PINP için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

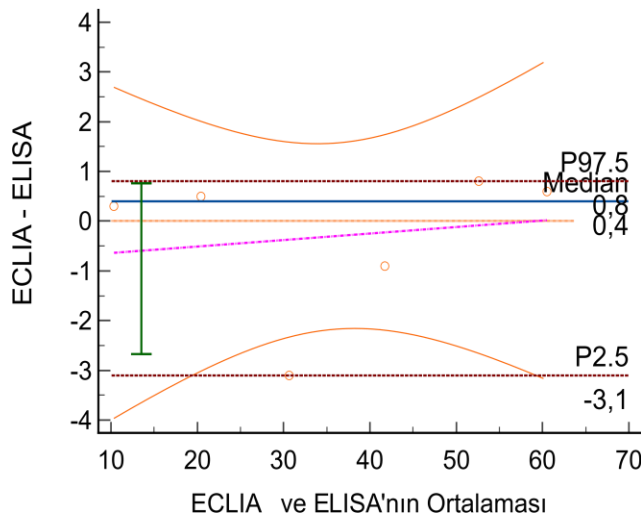
Yapay serumda PINP düzeylerinin ELISA ve ECLIA ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.90).



Şekil 4.90. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ELISA ve ECLIA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9970$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9719 ile 0,9997 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay serumda PINP düzeyinin ELISA ve ECLIA yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.91’de gösterilmiştir.



Şekil 4.91. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) 0,40 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (–2,67 ile 0,76) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla –3,10 ve 0,80 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.67. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (ECLIA - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon denklemi	$y = -0,7711 + 0,01307 x$
Rezidüel standart sapma	1,6512

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,7711	1,5437	-0,4995	0,6436	-5,0572 - 3,5150
Eğim katsayısı	0,01307	0,03852	0,3392	0,7515	-0,09389 - 0,1200

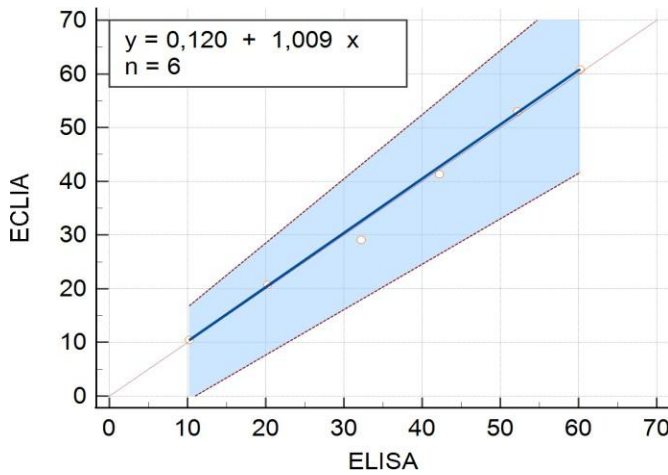
Yapay serumda ELISA ve ECLIA yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 16) tanımlanmıştır:

$$y = -0,7711 + 0,01307x \quad (16)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,01307) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,7515$; %95 GA: -0,09389 – 0,1200) Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası (-0,7711) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,6436$; %95 GA: -5,0572–3,5150), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,6512 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

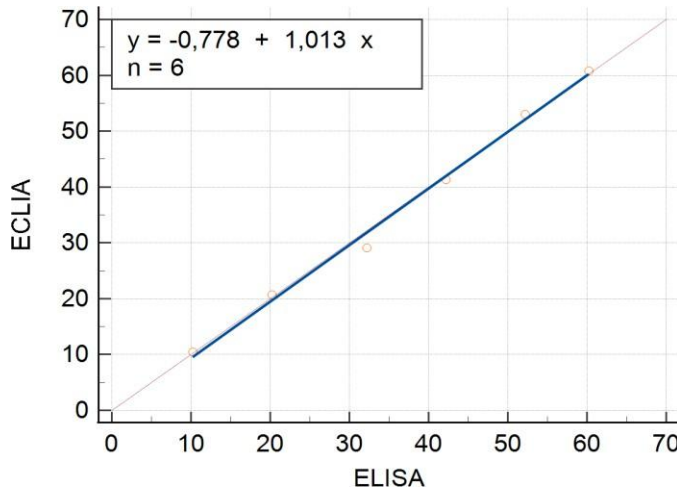


Şekil 4.92. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.68 Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,120000 + 1,009375 \cdot x$		
Sistematiik farklar		
y-ekseni kesme noktası A	0,1200	
%95 GA	-9,2540 - 4,6218	
Orantısal farklar		
Eğim katsayısı B	1,0094	
%95 GA	0,8455 - 1,1950	
Rastgele farklılıklar		
Rezidüel Standart Sapma (RSD)	1,3397	
± 1.96 RSD Interval	-2,6259 - 2,6259	
Doğrusal modelin geçerliliği		
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)	

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (1,0094; %95 GA: 0,8455–1,1950) ve y-eksenini kesme noktası (0,1200; %95 GA -9,2540 – 4,6218) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematiik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1.000$, $p < 0.0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.93. Yapay serumda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

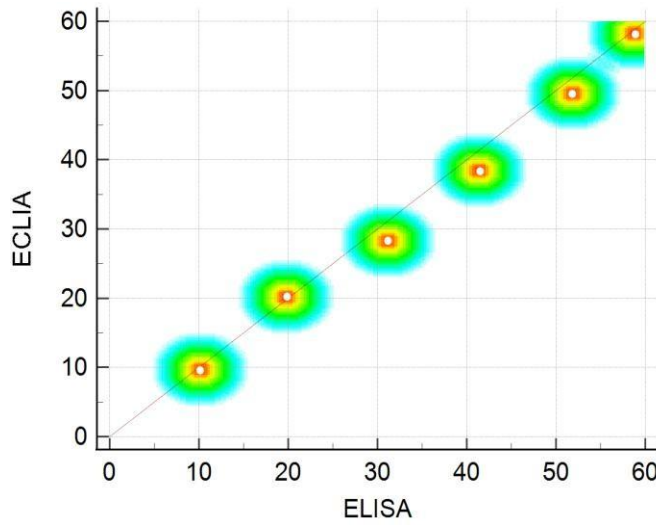
Çizelge 4.69. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,7778 + 1,0132 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesim noktası	-0,7778	1,6637	-5,0546 - 3,4990
Eğim katsayısı	1,0132	0,03458	0,9243 -1,1021

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0132; %95 GA: 0,9243-1,1021) ve y-ekseni kesim noktası (-0,7778; %95 GA: -5,0546 - 3,4990) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9970$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

Yapay tükürük de PINP için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

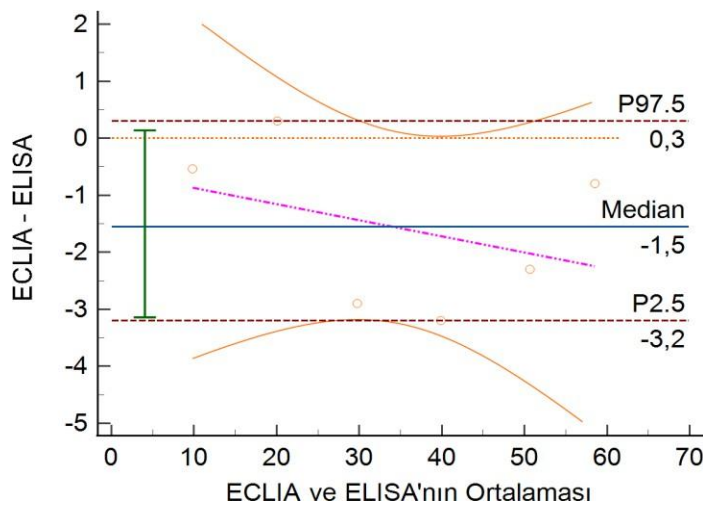
Yapay tükürük de PINP düzeylerinin ELISA ve ECLIA ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.94).



Şekil 4.94. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ELISA ve ECLIA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9974$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9756 ile 0,9997 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay tükürük de PINP düzeyinin ELISA ve ECLIA yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.95’te gösterilmiştir.



Şekil 4.95. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) -1,55 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (-3,14 ile 0,13) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla -3,20 ve 0,30 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.70. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (ECLIA - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon denklemi	$y = -0,5900 - 0,02827 x$
Rezidüel standart sapma	1,4787

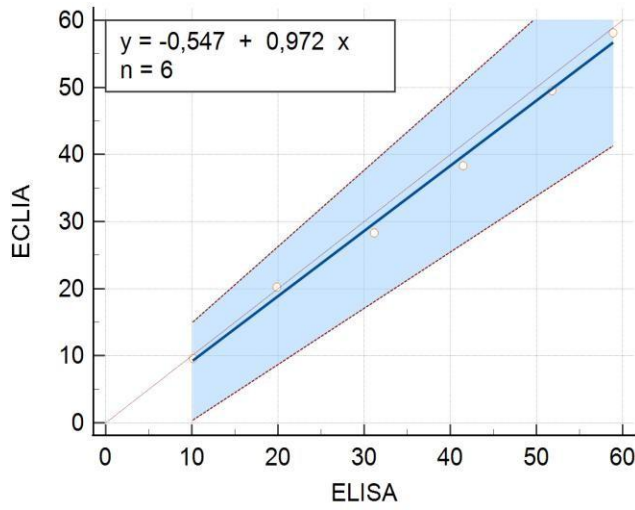
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,5900	1,3839	-0,4263	0,6918	-4,4324 - 3,2524
Eğim katsayısı	-0,02827	0,03581	-0,7896	0,4739	-0,1277 - 0,07114

Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 17) tanımlanmıştır:

$$y = -0,5900 - 0,02827x \quad (17)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,02827) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,4739$; %95 GA: -0,1277 – 0,07114) Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlılık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası (-0,5900) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,6918$; %95 GA: -4,4324–3,2524), bu da yöntemler arasında sabit yanlılık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 1,4787 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır



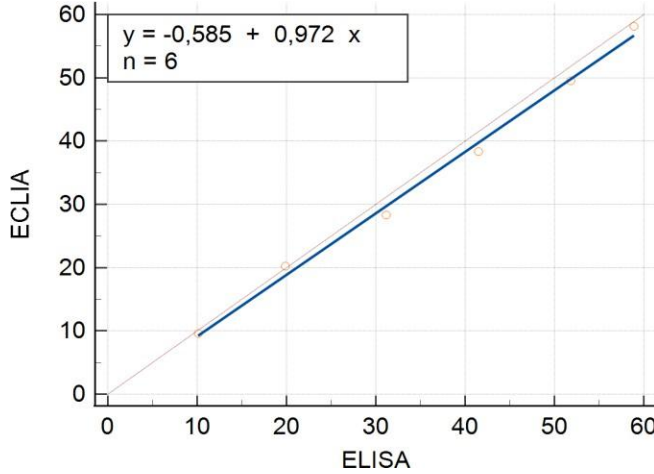
Şekil 4.96. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.71. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,547051 + 0,971795 x$	
Sistemik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	-0,5471
%95 GA	-8,0638 - 3,5245
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9718
%95 GA	0,8380 - 1,1379
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	1,0457
± 1.96 RSD Interval	-2,0495 - 2,0495
Doğrusal model geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9718; %95 GA: 0,8380–1,1379) ve y-ekseni kesme noktası (-0,5471; %95 GA -8,0638 – 3,5245) değerlerinin güven aralıkları

sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.97. Yapay tükürük de ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

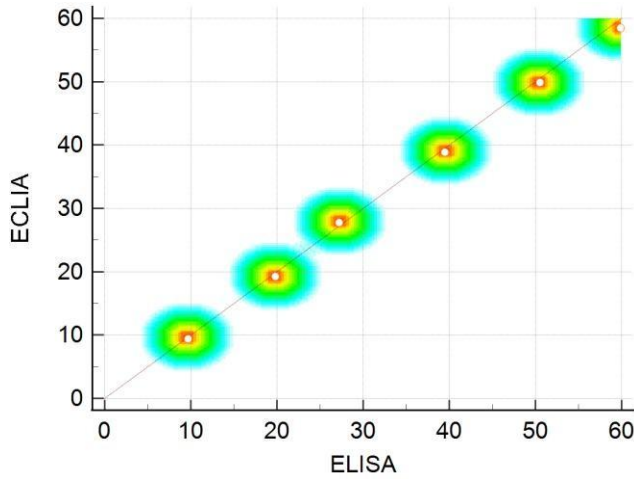
Çizelge 4.72. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = -0,5845 + 0,9722 x$			
Parametre	Katsayı	Std.Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	-0,5845	1,3530	-4,0625 - 2,8935
Eğim katsayısı	0,9722	0,03999	0,8694 - 1,0750

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9722; %95 GA: 0,8694-1,0750) ve y-ekseni kesme noktası (-0,5845; %95 GA: -4,0625 – 2,8935) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9974$) yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

Yapay idrarda PINP için ELISA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması

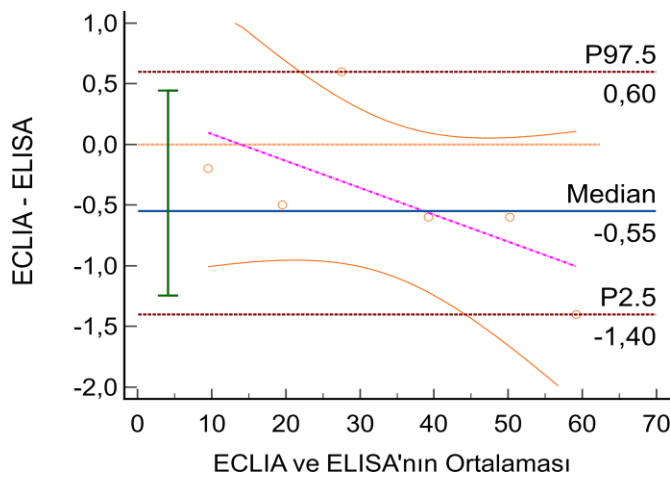
Yapay idrarda PINP düzeylerinin ELISA ve ECLIA ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.98).



Şekil 4.98. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ELISA ve ECLIA ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9970$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9719 ile 0,9997 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay idrarda PINP düzeyinin ELISA ve ECLIA yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.99’da gösterilmiştir.



Şekil 4.99. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) -0,55 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (-1,24 ile 0,44) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla -1,40 ve 0,60 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.73. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (ECLIA - ELISA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = 0,3093 - 0,02220 x$
Rezidüel standart sapma	0,5570

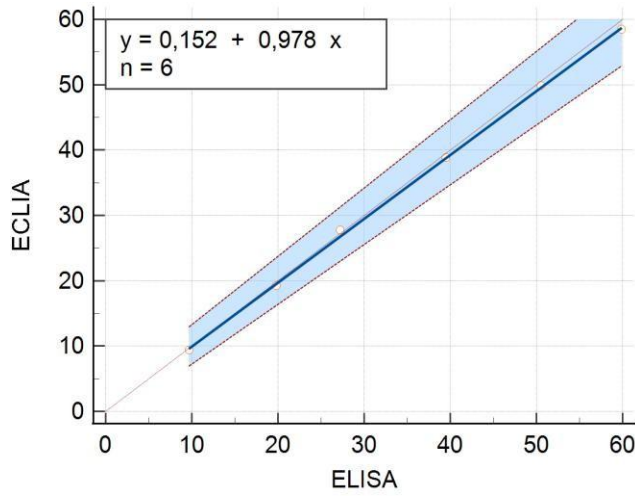
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,3093	0,5063	0,6108	0,5743	-1,0965 - 1,7151
Eğim katsayısı	-0,02220	0,01323	-1,6783	0,1686	-0,05893 - 0,01453

Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 18) tanımlanmıştır:

$$y = 0,3093 - 0,02220x \quad (18)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (-0,0220) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,1686$; %95 GA: -0,05893 – 0,01453). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlılık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesim noktası (0,3093) değeri de anlamlı değildir ($p = 0,5743$; %95 GA: -1,0965 – 1,7151), bu da yöntemler arasında sabit yanlılık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 0,5570 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.



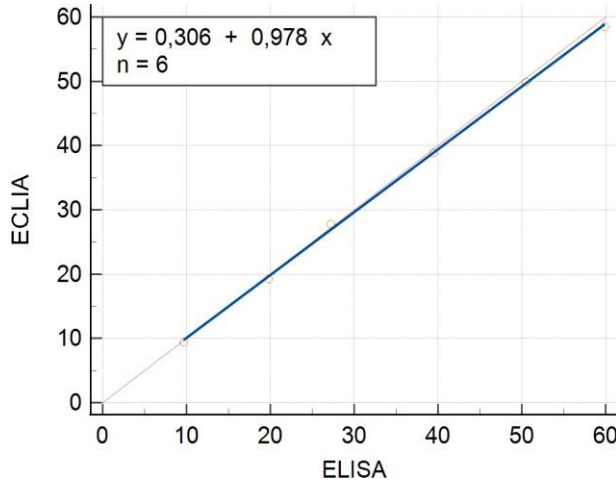
Şekil 4.100. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.74. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,151559 + 0,977556 x$	
Sistemik farklar	
y-ekseni kesim noktası A	0,1516
%95 GA	-1,9016 - 2,8383
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9776
% 95 GA	0,9149 -1,0456
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,4214
± 1.96 RSD Interval	-0,8260 - 0,8260
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9776; %95 GA: 0,9149–1,0456) ve y-ekseni kesim noktası (0,1516; %95 GA -1,9016 – 2,8383) değerlerinin güven aralıkları

sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.101. Yapay idrarda ELISA ve ECLIA yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.75. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,3058 + 0,9780 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,3058	0,5576	-1,1274 - 1,7391
Eğim katsayısı	0,9780	0,01412	0,9418 - 1,0143

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9780; %95 GA: 0,9418 - 1,0143) ve y-ekseni kesme noktası (0,3058; %95 GA: -1,1274 - 1,7391) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9997$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

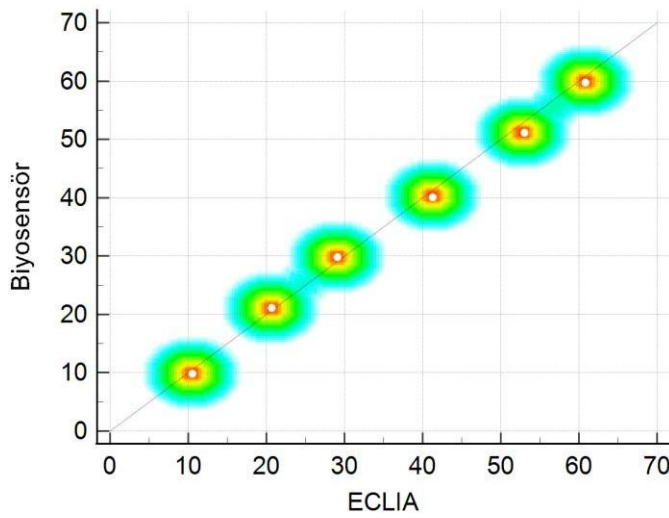
4.13.6. PINP için ECLIA ve Biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışma da yapay serum, tükürük ve idrar numunelerinden, ECLIA ve biyosensör yöntemleri ile elde edilen PINP değerleri MedCalc 2025 istatistik programında Bland Altman, Deming

regresyon analizi ve Passing Bablok analiz tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, ECLIA ve biyosensör arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmış, değişkenlerin normal dağılım göstermemesi durumunda Spearman korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

Yapay serumda PINP için ECLIA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

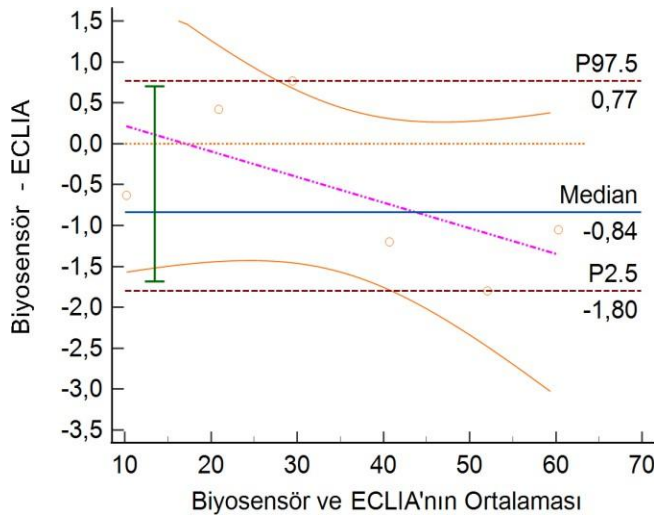
Yapay serumda PINP düzeylerinin ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.102).



Şekil 4.102. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9991$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9917 ile 0,9999 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay serumda PINP düzeyinin ECLIA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.103’de gösterilmiştir



Şekil 4.103. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) -0,84 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (-1,68 ile 0,70) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla -1,80 ve 0,77 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.76. Yapay serumda regresyon analizi sonuçları: Fark (biyosensör - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon Denklemi	$y = 0,5335 - 0,03132 x$
Rezidüel standart sapma	0,8870

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,5335	0,8267	0,6453	0,5539	-1,7620 - 2,8289
Eğim katsayısı	-0,03132	0,02087	-1,5004	0,2079	-0,08926 - 0,02663

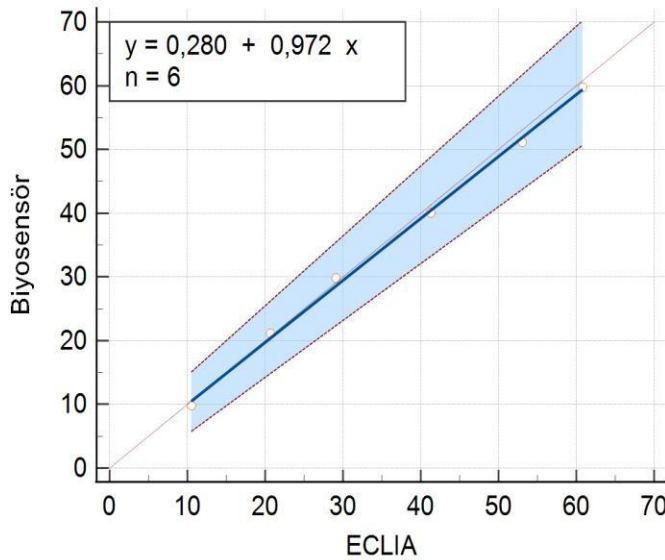
Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 19) tanımlanmıştır:

$$y = 0,5335 - 0,03132x \quad (19)$$

Bu modelde, eğim katsayısı $(-0,03132)$ değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,2079$; %95 GA: $-0,08926 - 0,02663$). Bu durum, ölçüm farklarının ortalama değerlere bağlı olarak anlamlı bir değişim göstermediğini ve iki yöntem arasında orantısal yanlışlık bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası $(0,5335)$ değeri de anlamlı değildir ($p = 0,5539$; %95 GA: $-1,7620 - 2,8289$), bu da yöntemler arasında sabit yanlışlık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma $0,8870$ olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

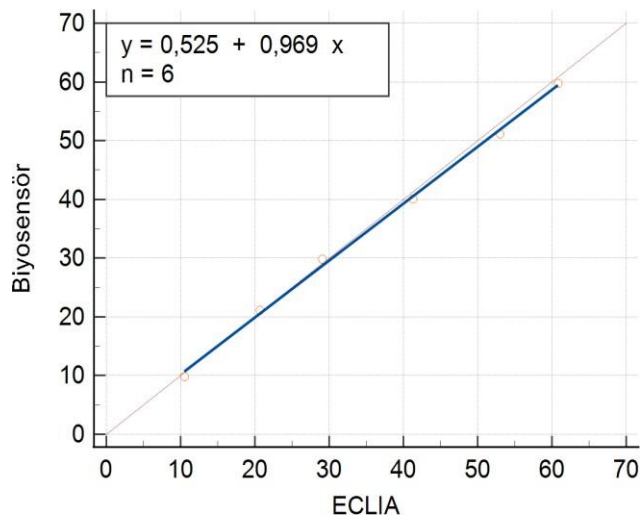


Şekil 4.104. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.77. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,280376 + 0,972471 x$	
Sistematiik farklar	
y-ekseni kesme noktası A	0,2804
%95 GA	-3,5996 - 3,5701
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9725
%95 GA	0,8925 - 1,0962
Rastgele farklılıklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,6389
± 1.96 RSD Interval	-1,2523 - 1,2523
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,99)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9725; %95 GA: 0,8925–1,0962) ve y-ekseni kesim noktası (0,2804; %95 GA -3,5996 – 3,5701) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematiik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi (p = 0,99) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı (r = 1.000, p < 0.0001) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif anlamlılışı bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.105. Yapay serumda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

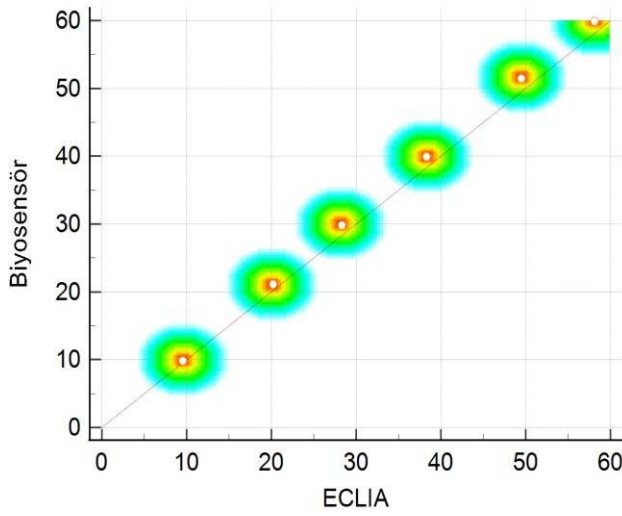
Çizelge 4.78. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,5252 + 0,9692 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	% 95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,5252	1,1626	-2,4632 - 3,5137
eğim katsayısı	0,9692	0,02524	0,9043 - 1,0340

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9692; %95 GA: 0,9043 - 1,0340) ve y-ekseni kesme noktası (0,5252; %95 GA: -2,4632 – 3,5137) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlılık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9991$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

Yapay tükürük de PINP için ECLIA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

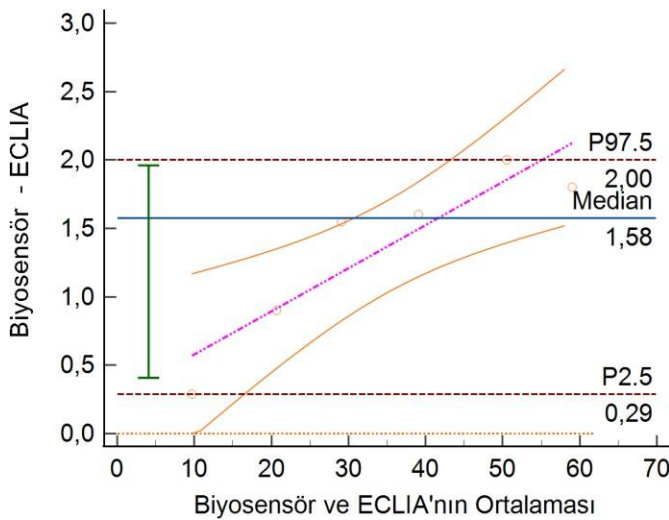
Yapay tükürük de PINP düzeylerinin ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.106).



Şekil 4.106. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9999$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9990 ile 1,000 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay tükürük de PINP düzeyinin ECLIA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.107’de gösterilmiştir.



Şekil 4.107. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) 1,575 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (0,40 ile 1,96) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla 0,29 ve 2,00 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.79. Yapay tükürük de regresyon analizi sonuçları: Fark (biyosensör - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

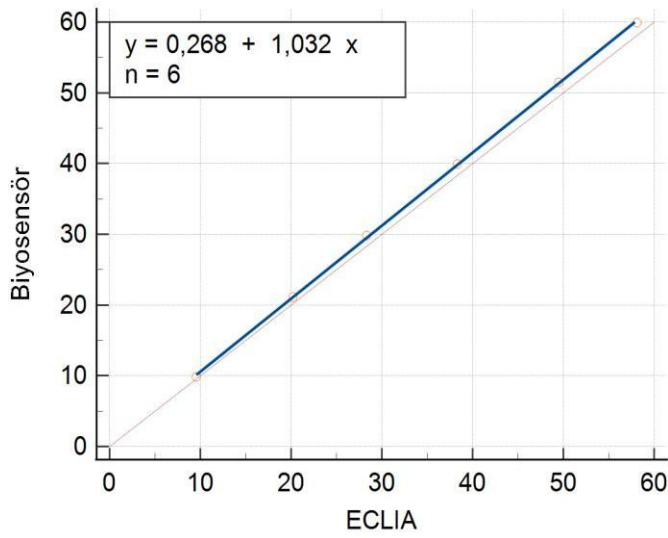
Regresyon denklemi	$y = 0,2639 + 0,03152 x$				
Rezidüel standart sapma	0,2964				
Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	0,2639	0,2762	0,9554	0,3935	-0,5030 - 1,0308
Eğim katsayısı	0,03152	0,007161	4,4012	0,0117	0,01164 - 0,05140

Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 20) tanımlanmıştır:

$$y = 0,2639 + 0,03152x \quad (20)$$

Bu modelde, eğim katsayısı (0,03152) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,0117$; %95 GA: 0,01164 – 0,05140). Bu durum, düşük değerlerde yöntemler birbirine yakın ölçüm yaparken, yüksek değerlerde farklılık arttığını göstermektedir. Bu durum, ve iki yöntem arasında orantısal yanlılık bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası (0,2639) değeri anlamlı değildir ($p = 0,3935$; %95 GA: - 0,5030 – 1,0308), bu da yöntemler arasında sabit yanlılık olmadığını göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 0,2964 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

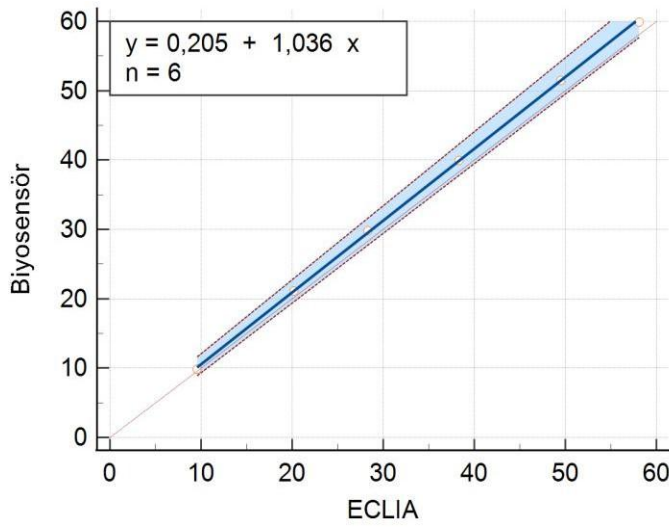


Şekil 4.108. Yapay tükürükte ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği.

Çizelge 4.80. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 0,2682 + 1,0320 x$			
Parametre	Katsayı	Std.Hata	%95 GA
y-ekseni kesim noktası	0,2682	0,4356	-0,8516 -1,3880
Eğim katsayısı	1,0320	0,01230	1,0004 - 1,0636

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (1,0320; %95 GA: 1,0004 - 1,0636) ve y-ekseni kesim noktası (0,2682; %95 GA: -0,8516 – 1,3880) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9999$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.



Şekil 4.109. Yapay tükürük de ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.81. Passing-Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

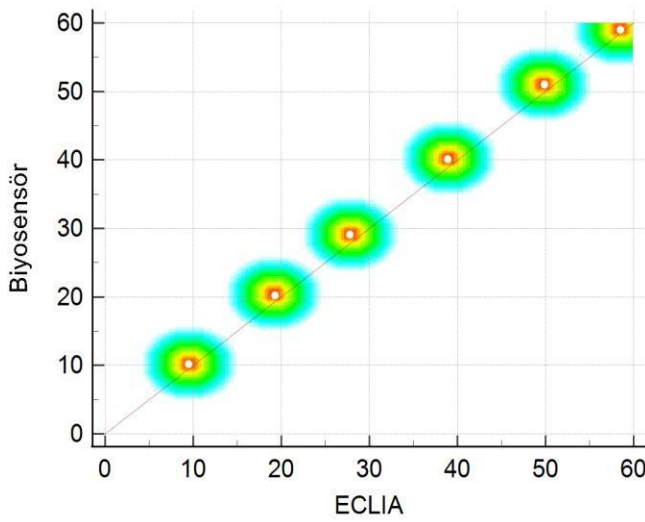
$y = 0,205357 + 1,035714 x$	
Sistematik farklar	
y-ekseni kesim noktası A	0,2054
%95 GA	-0,7166 - 1,4085
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	1,0357
%95 GA	1,0050 - 1,0672
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,2225
± 1.96 RSD Interval	-0,4360 - 0,4360
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum Testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı 1,0357; %95 GA: 1,0050–1,0672) ve y-ekseni kesim noktası (0,2054; %95 GA -0,7166 – 1,4085) değerlerinin güven aralıkları

sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi ($p = 0,43$) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı ($r = 1,000$, $p < 0,0001$) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif ilişki bulunduğunu göstermiştir.

Yapay idrarda PINP için ECLIA ve biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması

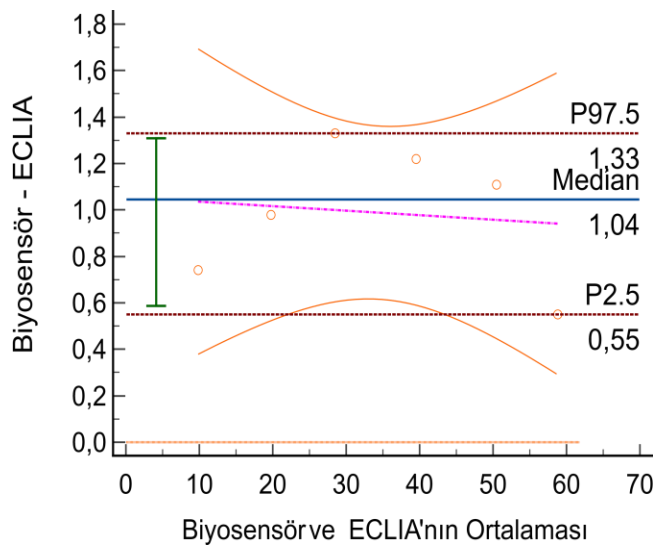
Yapay idrarda PINP düzeylerinin ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasındaki doğrusal ilişkiyi değerlendirmek amacıyla korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.110).



Şekil 4.110. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yönteminin dağılım grafiği.

Altı numuneden elde edilen ECLIA ve biyosensör ölçümleri arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı, yüksek düzeyde kuvvetli bir doğrusal ilişki gözlenmiştir ($r = 0,9999$; $p < 0,0001$). Korelasyon katsayısı için %95 güven aralığı 0,9988 ile 1,000 arasında olup, bu sonuçlar değişkenler arasındaki ilişkinin yüksek düzeyde güvenilir, kuvvetli ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

Yapay idrarda PINP düzeyinin ECLIA ve biyosensör yöntemi arasındaki ölçüm uyumu Bland–Altman analiziyle değerlendirilmiş olup, farkların ortalama değerlere karşı dağılımı Şekil 4.111’de gösterilmiştir.



Şekil 4.111. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımını gösteren Bland–Altman grafiği.

Bland–Altman analizi sonucunda iki yöntem arasındaki ortalama fark (bias) 1,045 olarak bulunmuştur. Bias için hesaplanan %95 güven aralığı (0,58 ile 1,30) sıfır değerini içermekte olup, yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Alt ve üst uyum sınırları sırasıyla 0,55 ve 1,33 olarak belirlenmiş, farkların büyük çoğunluğunun bu sınırlar içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, ölçüm yöntemleri arasında klinik olarak kabul edilebilir düzeyde bir uyum olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.82. Yapay idrarda regresyon analizi sonuçları: Fark (biyosensör - ECLIA) ve iki yöntem ortalaması arasındaki ilişki

Regresyon denklemi	$y = 1,0550 - 0,001935 x$
Rezidüel standart sapma	0,3289

Parametre	Katsayı	Std. Hata	t	p	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	1,0550	0,3038	3,4733	0,0255	0,2117 - 1,8984
Eğim katsayısı	-0,001935	0,007905	-0,2448	0,8187	-0,02388 -0,02001

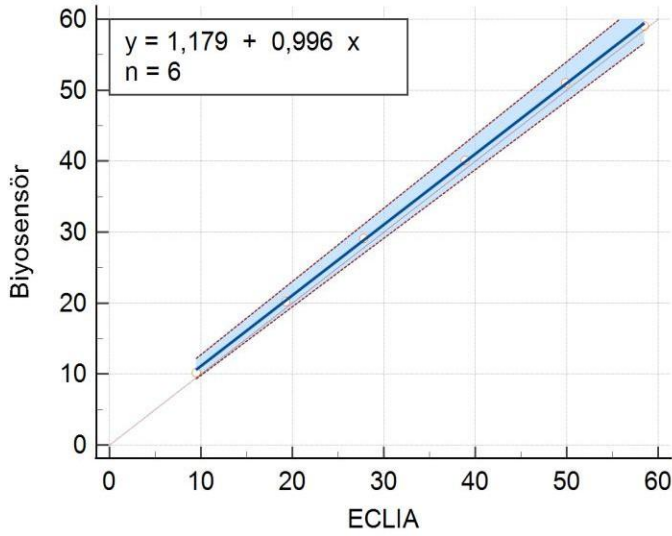
Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemlerinden elde edilen PINP ölçüm sonuçları arasındaki uyum, Bland–Altman analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda iki yöntem

arasındaki farkların ortalama değerlere göre dağılımı incelenmiş ve regresyon doğrusu aşağıdaki denklemle (Eşitlik 21) tanımlanmıştır:

$$y = 1,0550 - 0,001935x \quad (21)$$

Bu modelde, eğim katsayı (-0,001935) değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,8187$; %95 GA: -0,02388 – 0,02001). Bu durum, ölçüm düzeyine bağlı orantılı bir bias bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca y-ekseni kesme noktası (1,0550) değeri anlamlıdır ($p = 0,0255$; %95 GA: 0,2117 – 1,8984), bu da yöntemler arasında sabit yanlılık olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, iki yöntem genel olarak birbiri ile tutarlı ölçümler meydana getirmekte, ancak ECLIA değerlerinin sistematik olarak biyosensörden daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Rezidüel standart sapma 0,3289 olarak belirlenmiştir. Bu değer, ölçüm farklarının dağılımının düşük düzeyde olduğunu ve yöntemler arasındaki ölçüm sonuçlarının genel olarak iyi bir uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır.

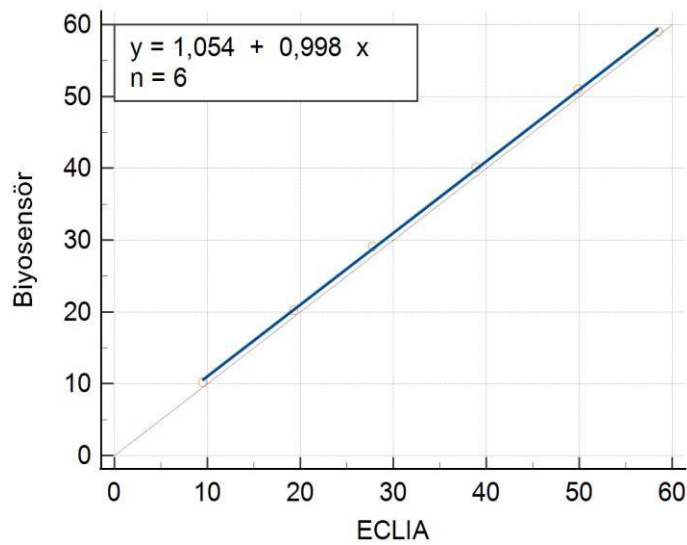


Şekil 4.112. Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Passing Bablok regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.83. Passing Bablok regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 1,179027 + 0,996126 x$	
Sistematiik farklar	
y-ekseni kesim noktası A	1,1790
%95 GA	0,1644 - 2,4150
Orantısal farklar	
Eğim katsayısı B	0,9961
%95 GA	0,9658 - 1,0322
Rastgele farklar	
Rezidüel standart sapma (RSD)	0,2398
± 1.96 RSD Interval	-0,4701 - 0,4701
Doğrusal modelin geçerliliği	
Doğrusallık için Cusum testi	Doğrusallıktan anlamlı sapma gözlenmemiştir (p=0,43)

Passing Bablok regresyon analizi de eğim katsayısı (0,9961; %95 GA: 0,9658 – 1,0322) ve y-ekseni kesim noktası (1,1790; %95 GA 0,1644 – 2,4150) değerlerinin güven aralıkları sırasıyla 1 ve 0 değerlerini içermektedir. Bu da yöntemler arasında anlamlı sistematiik fark olmadığını göstermektedir. Cusum testi (p = 0,43) doğrusal modelden sapma olmadığını, Spearman korelasyon katsayısı (r = 1,000, p < 0,0001) ise iki yöntem arasında mükemmel düzeyde pozitif anlamlı ilişki bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 4.113 Yapay idrarda ECLIA ve biyosensör yöntemleri arasındaki Deming regresyon analizi grafiği

Çizelge 4.84. Deming regresyon analizine ilişkin veriler

$y = 1,0541 + 0,9981 x$			
Parametre	Katsayı	Std. Hata	%95 GA
y-ekseni kesme noktası	1,0541	0,4411	-0,07972 - 2,1880
Eğim katsayısı	0,9981	0,01317	0,9642 - 1,0319

Deming regresyon analizi sonucunda elde edilen eğim katsayısı (0,9981; %95 GA: 0,9641 – 1,0319) ve y-ekseni kesme noktası (1,0541; %95 GA: -0,07972 – 2,1880) değerleri, sırasıyla 1 ve 0 değerlerini kapsayan güven aralıkları göstermiştir. Bu durum, yöntemler arasında ne sabit ne de orantısal yanlışlık bulunduğunu, dolayısıyla ölçüm doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,9999$) oldukça yüksek bulunarak, iki yöntem arasındaki doğrusal ilişkinin kuvvetli olduğunu desteklemiştir.

5. TARTIŞMA

Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC) ve Uluslararası Osteoporoz Vakfı (IOF) osteoporoz için referans kemik döngü belirteçleri olarak Prokollajen Tip I N-Terminal Peptidi ve Tip I Kollajenin β -İzomerize C-Terminal Telopektidi'ni tavsiye etmektedir.. Prokollajen Tip I N-Terminal Peptidinin kantifikasyonu için tam (intact) veya total PINP'yi ölçen çeşitli ticari immünoassay'ler mevcuttur. Tam PINP, peptidin tam uzunlukta ve değişmemiş formunu ifade ederken, total PINP bu tam form ile ilişkili kısımları da kapsamaktadır. PINP'nin non-kovalent bağlanma eğilimi, dolaşımda disgregasyona yol açarak 'PINP monomerleri' oluşumuna neden olabilir. Tam PINP analizleri arasında Orion Diagnostica (Espoo, Finlandiya) tarafından geliştirilen Radyoimmünoassay ve ImmunoDiagnostic Systems Holdings PLC (Baldon, Birleşik Krallık) iSYS sistemi için olan otomatize kemilüminesans immünoassay bulunmaktadır. Total PINP ise Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. (Shenzhen, Çin) Maglumi için Elektrokemilüminesans İmmünoassay (ECLIA) ve Usen Life Science Inc. (Çin) tarafından sunulan bir ELISA ile ölçülebilmektedir. Ayrıca, osteoporoz ve kalıtsal kemik metabolizması bozuklukları gibi hastalıkların incelenmesi amacıyla özelleştirilmiş immünoassay'ler de geliştirilmiştir (Bhattoa ve diğerleri, 2024 ; Demeuse ve diğerleri, 2025).

Kemik rezorpsiyon belirteçlerinin tayini için güncel durumda ticari olarak erişilebilir dört farklı immünoassay bulunmaktadır: ImmunoDiagnostic Systems Holdings PLC'nin manuel ELISA'sı ve IDS-iSYS immünoanalizörü için otomatize CLIA'sı; Roche Diagnostic GmbH'nin Elecsys analizörleri için Roche Cobas β -Crosslaps CTX ECLIA'sı; ve SNIBE Maglumi Sistemi için CTX CLIA'dır. Ticari kit sayısındaki bu artışa rağmen, özellikle IOF ve IFCC tarafından önerilen başlıca belirteçler olan CTX ve PINP arasında harmonizasyon eksikliği açıkça görülmektedir (Bhattoa ve diğerleri, 2024 ; Demeuse ve diğerleri, 2025).

Yüksek kemik döngü belirteç konsantrasyonları, postmenopozal kadınlarda artmış kırık riski ile korelasyon göstermektedir. Dolaşımda ölçülen PINP ve β -CTX-I'nin kırık riski ile ilişkisi kanıtlanmış olmakla birlikte, diğer risk faktörleri ile olan etkileşimleri yeterince araştırılmamıştır; bu durum, kırık riski algoritmalarına entegrasyonlarını kısıtlamaktadır. Tedaviye bağlı olarak PINP ve β -CTX-I'de meydana gelen değişiklikler, kırık riskindeki belirgin azalmadan sorumlu olup, hasta uyumunu iyileştirmede yarar sağlamaktadır. Bu nedenle, bireysel hasta düzeyinde tedaviye uyumu değerlendiren çalışmalara bu belirteçlerin dâhil edilmesi önerilmektedir (Bhattoa ve diğerleri, 2024 ; Demeuse ve diğerleri, 2025).

Biyosensörler, proteinler veya nükleik asitler gibi biyolojik makromoleküllerin kimyasal ya da elektrostatik etkileşimler aracılığıyla katı elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle oluşturulmaktadır.

Çalışmamızda, kemik yapım ve yıkım biyobelirteçlerinin vücut sıvılarında tayinine yönelik elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiş, analitik performansı değerlendirilmiş, sonuçlar ECLIA ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Geleneksel yöntemler olan ECLIA ve ELISA, yüksek özgüllük ve duyarlılık sağlasa da yüksek maliyet, uzun işlem süresi, yetişmiş uzman personel ihtiyacı, laboratuvar bağımlılığı ve çoğunlukla invaziv numunelere ihtiyaç duyması gibi dezavantajlar taşımaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler ise taşınabilirlik, hız, düşük numune hacmi ve maliyet avantajlarıyla bu sınırlılıkların aşılmasında umut vadetmektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında elektrot yüzeyinin karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Altın elektrot yüzeyi 3-MPA ile fonksiyonelleştirilmiş ve karboksil grupları üzerinden antikor immobilizasyonu sağlanmıştır. SEM ve AFM analizleri, yüzeyin her modifikasyon basamağında morfolojik değişiklikleri doğrulamış; özellikle antikor immobilizasyonu sonrası granüler partiküllerin oluşması, biyomoleküler tutulumun başarılı olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, literatürde bildirilen benzer yüzey modifikasyon stratejileriyle uyumlu bulunmuştur (Zhang ve diğerleri, 2019; Li ve diğerleri, 2021).

Bir immünosensörün dinamik aralığı ve algılama kapasitesi, algılama katmanının maksimum biyomolekül yükleme kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, çalışmanın bir sonraki aşamasında elektrot yüzeyinde katmanların ardışık birikiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, elektrot yüzeyindeki antikorların doğru yönelimini, bozulmamış konformasyonunu ve yeterli yoğunluğunu korumak, dizinin tekrarlanabilir, biyoyumlu, uygun maliyetli, uzun vadeli kararlılığa ve geniş yüzey alanına sahip olmasını garantilemek için kritik öneme sahiptir (Welch ve diğerleri, 2017). Farklı konsantrasyonlara ve çeşitli inkübasyon sürelerine sahip çeşitli ticari ve özel yapım bağlayıcı türünün karşılaştırılması, elektrot substratlarının bağlayıcı olarak etil alkolde 5 mM 3-MPA çözeltisine 16 saat daldırıldığını ortaya koymuştur. 3-MPA, özellikle altın elektrot yüzeylerinin modifiye edilmesinde olmak üzere biyosensör geliştirmede yaygın olarak kullanılan bifonksiyonel bir moleküldür. Tiyol ($-SH$) grubu kuvvetli $Au-S$ bağları oluşturarak kararlı bir kendiliğinden birleşen tek tabaka oluştururken, karboksil ($-COOH$) grubu daha ileri kimyasal aktivasyon için açıkta kalır. Tipik olarak, karboksil grupları

EDC/NHS kimyası kullanılarak aktive edilir ve antikorlar gibi biyomoleküllerin amin gruplarıyla amid bağı oluşumu yoluyla kovalent olarak bağlanmasını sağlar. Bu, biyomolekül immobilizasyonu için kararlı, yönlendirilmiş ve işlevsel bir arayüz sağlayarak elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini, tekrarlanabilirliğini ve kararlılığını artırır. Ayrıca, 3-MPA güçlü metal bağlama ve reaktif özellikleri nedeniyle nanopartikül işlevselleştirme, organik sentez ve korozyon inhibisyonu için kullanılır.

Bir immünosensörün seçiciliğinin yalnızca antikorun bağlanma özelliklerine değil, aynı zamanda hedef çözeltinin bileşimine ve matriksine de bağlı olduğu iyi bilinmektedir (Tate ve Ward, 2004). Bu nedenle, test girişi, numunedeki analitlerin konsantrasyonunu veya antikor bağlama kapasitelerini değiştiren çapraz tepkimeye giren türlerin varlığından kaynaklanabilir. Her ikisi de sonuçların yanlış yorumlanmasına yol açabilir. Monoklonal antikorların kullanımının, kan/serum/plazma matriksinde yaygın olarak bulunan diğer analitlere karşı çapraz tepkimeyi azaltarak sensörün performansını iyileştirmeye yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bu endojen moleküller, hedef analitle benzer bir yapıya veya ortak çapraz tepkimeye giren epitoplara sahip olabilir. Bundan dolayı, yalnızca hedef analitle tepkimeye giren ve bilinen karıştırıcıların hiçbirisiyle tepkimeye girmeyen monoklonal antikorlar kullanılmıştır.

Bir sonraki aşamada, antikor konsantrasyonu optimize edilmiştir. Elektrot yüzeyindeki antikor yoğunluğunun immünosensör performansını önemli ölçüde etkileyebileceği iyi bilinmektedir; bu faktörün yüzey konformasyonunu, dolayısıyla ölçülen elektrokimyasal sinyali ve son olarak immünosensörün LOD'sini ve hassasiyetini etkileyebilmesidir (Zorea ve diğerleri, 2020). Daha yüksek antikor konsantrasyonlarının yüzeyde farklı şekilde düzenlendiği ve aynı zamanda çözelti direncini artırarak antijen birikimini iyileştirdiği gösterilmiştir. Sonuçlarımız da benzer şekilde, daha yüksek antikor konsantrasyonlarının daha iyi sensör performansı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, her bir antikordan 100 µg/ mL kullanılmasının (tampon olarak PBS içinde) en yüksek doğrusallık ve hassasiyetle ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, çalışma boyunca antikorların optimum inkübasyon süresi 1 saat kabul edilmiştir.

Monoklonal antikorların uygulanmasının yanı sıra, çoğu çalışmada, engelleyici maddelerin özgül olmayan bağlanmasını daha etkili bir şekilde bastırmak için ek bir engelleyici (bloke edici) ajan uygulanır. Bazı araştırmacılar daha küçük ve daha hidrofilik moleküllerin

(etanolamin gibi) daha iyi engelleme kapasitelerine sahip olduğunu düşünse de, çalışmamızda %1 BSA tercih edilmiştir. Optimum engelleyici ajanların, tanıma elemanının moleküler boyutuna ve olası istenmeyen engelleyicilerin moleküler boyutuna göre seçilmesi gerekir.

Daha önce de belirtildiği gibi, EIS, katman katman birikimi ve analitin farklı konsantrasyonlarına tepkiyi değerlendirmek için kullanılmıştır. Beklendiği gibi, kapasitif akımlar her katman döküldükten sonra artarak, arayüzey yük transfer direncinde (R_{ct}) önemli bir değişiklik göstermiştir ve böylece immünosensörün başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamıştır. Son aşama da ise, PINP ve β -CTX'in bilinen konsantrasyonları kullanarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Elde edilen CV akım yoğunlukları, üretilen dizilerin oldukça tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. Beklendiği gibi, yeni hazırlanmış dizilerle karşılaştırıldığında, hedef analitlerin konsantrasyonundaki herhangi bir artışla birlikte CV akım tepe değerlerinde PINP için kademeli bir azalma kaydedilirken, β -CTX için bu azalma antikor immobilizasyon basamağında artışa neden olmuştur. Bu durum, PINP için algılama katmanı ile analit arasındaki başarılı tepkimeyi göstermiştir. β -CTX için ise protein tabakasının yükü ve antikorların yüzeye oryantasyonuna bağlı olarak redoks probunun difüzyonunu kolaylaştırmış ve elektrot yüzeyinin erişime daha açık hale gelmesi sağlanmıştır.

Yapılan karşılaştırmalı analizlerde, elektrot yüzeyinin fosfat çözeltisi veya özgül olmayan hedef analit ile inkübasyonu sonucunda ölçülen elektrokimyasal akım değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p < 0.05$). Bu durum, genellikle %5'in altında bir düşüşle karakterize edilmiştir. Bu bulgu, sensör yüzeyinin yüksek özgülüğünü ve rastgele/non-spesifik bağlanmaya karşı direncini doğrulamaktadır.

Ayrıca, kinetik çalışmalar, β -CTX analiti için 10 dakikalık inkübasyon süresinin ve PINP analiti için 15 dakikalık inkübasyon süresinin yeterli olduğunu göstermiştir. Bu süreler, hedeflenen analitlerin yüzey immobilize edilmiş antikorlar ile kantitatif ve dengeli bir şekilde etkileşime girmesi/bağlanması için gerekli optimum tepkime zamanları olarak belirlenmiştir.

Biyosensörün analitik performansı elektroanalitik yöntemler ile test edilmiş, antijen–antikor etkileşimine bağlı olarak akım yoğunluğunda belirgin değişiklikler saptanmıştır (Chen ve diğerleri, 2020; Wu ve diğerleri, 2022). Çalışmada geliştirilen biyosensörün non-invaziv biyolojik sıvılar olan tükürük ve idrarda da uygulanabilirliği araştırılmış ve bu doğrultuda

LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Farklı hesaplama yöntemleri mevcut olmakla birlikte, çalışmada hesaplamalar, standart eğrilerden elde edilen regresyon doğruları temel alınarak $LOD = 3.3 \times (\sigma/S)$ ve $LOQ = 10 \times (\sigma/S)$ formülleri üzerinden yapılmıştır.

Bu değerler, literatür ve biyosensör ile ilgili çalışmalar temel alınarak ve IUPAC sistemine göre belirlenmiştir. Rutin kullanımda temel olarak kullanarak klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü (CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute) kılavuzları gibi benzer kaynaklar biyosensör çalışmaları için mevcut değildir. Elde edilen sonuçlar, biyosensörün yalnızca serumda değil, aynı zamanda tükürük ve idrar gibi non-invaziv biyolojik sıvılarda da güvenilir bir alternatif ölçüm sistemi sunabileceğini, dolayısıyla klinik kullanım potansiyelini arttırdığını ortaya koymaktadır.

Depolama ömürleri dikkate alındığında, her iki biyosensörün de yaklaşık 8 haftalık süre boyunca yüksek kararlılık sergilediğini, bu sürenin ardından ise antikor immobilizasyonuna bağlı olarak biyosensör performansında azalma meydana geldiğini göstermektedir. Aktivite kaybının temel nedeni olarak, depolama süresinin uzamasıyla birlikte antikor yapısında gerçekleşen konformasyonel değişiklikler, bağlanma bölgelerinde esneklik kaybı ve yüzey etkileşimlerinde zayıflama olasılığı değerlendirilebilir. Bu durum, elektrokimyasal ölçümlerde yük transfer direncinin artması ve redoks yanıtlarının zayıflamasıyla kendini göstermektedir. Literatürde, antikor temelli elektrokimyasal biyosensörlerin depolama kararlılıklarının genellikle 6–10 hafta arasında değiştiği, bu süreden sonra aktivite kaybının hızlandığı bildirilmektedir (Brito F., ve diğerleri, 2022). Bu açıdan değerlendirildiğinde, geliştirilen PINP ve β -CTX biyosensörlerinin 8 haftaya kadar olan kararlı performansı, sistemin hem immobilizasyon stratejisinin hem de sensör yüzey kimyasının uygun şekilde optimize edildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, β -CTX biyosensöründe gözlenen aktivite kaybının PINP biyosensörüne göre daha erken başlaması, β -CTX antikorunun yapısal kararlılığın ve yüzeye bağlanma kuvvetinin PINP antikoruna kıyasla daha düşük olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca β -CTX molekülünün daha küçük peptid yapısına sahip olması, antikor-antiğen etkileşiminin depolama süresine karşı daha hassas hale gelmesine neden olabilir.

Her iki biyosensör de kısa ve orta vadeli depolama koşullarında yüksek kararlılık sergilemiş, ancak uzun vadede (8. haftadan sonra) antikor duyarlılığında azalma meydana gelmiştir. Bu bulgu, geliştirilen biyosensörlerin klinik uygulamalarda rutin kullanım açısından yeterli

kararlılığa sahip olduğunu; ancak daha uzun süreli saklama koşullarında performansın korunabilmesi için antikor immobilizasyon yöntemlerinin ve depolama ortamının ileri araştırmalar ile incelenmesini gerektirmektedir.

Metot karşılaştırma çalışmaları vücut sıvılarında Bland altman ve regresyon analizleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, biyosensörün, rutinde kullanılan ECLIA ve ELISA yöntemlerine alternatif olarak kullanılabileceği ve geliştirilen biyosensörün hem serum hem de non-invaziv numunelerin hasta uyumunu arttırabileceği, düzenli takipte kolaylık sağlayabileceği ve özellikle risk gruplarında erken tanıyı destekleyebileceği sonucuna varılmıştır.

Geliştirilen biyosensörün, ECLIA ve ELISA ile gösterdiği yüksek uyum, klinik laboratuvarlarda validasyon çalışmalarının yapılabilmesini göstermektedir. Bununla birlikte, biyosensörün taşınabilir cihazlarla entegrasyonu, hasta başı test (POCT) uygulamaları için potansiyel taşımaktadır. Osteoporoz, metastatik kemik hastalıkları ve tedaviye yanıtın izlenmesinde hızlı ve erişilebilir biyobelirteç ölçümü klinisyenlerin karar süreçlerini kolaylaştıracaktır.

Genel literatür taraması sonucunda konu ile ilgili çok kısıtlı literatür bilgisi mevcuttur. Inal Kabala ve diğerlerinin 2019 yılında yapay serum kullanarak osteoporoz tanısında kullanılabileceğini önerdikleri osteokalsin biyosensör çalışması mevcuttur. Bu çalışmada da biyosensör antikor temelli üretilmiştir (Inal Kabala ve diğerleri, 2019) .

Khashayar ve diğerleri 2024 yılında yayınladıkları makalelerinde kemik döngüsü biyobelirteçlerinin ölçüm ve monitorizasyonu için multipleks olarak hazırladıkları CTX ve PINP antikor temelli biyosensör kullanımını serum örneklerinde çalışarak ECLIA ile karşılaştırarak kullanılabilişliğini savunmuş ve gelecek için tükürük, idrar ve ter örneklerinin de kullanılabileceğini önermişlerdir (Khashayar ve diğerleri, 2024). Ancak, makale metodolojisi incelendiğinde biyosensör oluşturma detayları içeren kaynağı halihazırda yayın aşamasında olduğu görülmektedir.

Biyosensör kullanım alanları dikkate alındığında osteoporoz ile ilişkili olarak her iki belirtecin kullanım alanının araştırma ve rutin çalışmalar olarak değerlendirilmesi

mümkündür. Araştırmalardaki kullanım kolaylığı düşünüldüğünde dikkatimizi çeken uzay çalışmalarıdır (Walle ve diğerleri, 2024; Baran ve diğerleri, 2022).

Sonuç olarak, bu çalışma ile geliştirilen elektrokimyasal biyosensör, hem invaziv hem de non-invaziv örneklerde PINP ve β -CTX tayininde yüksek duyarlılık, özgüllük ve güvenilirlik göstermiştir. ECLIA ve ELISA ile kuvvetli korelasyonu biyosensörün translasyonel potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu özellikleriyle biyosensör kullanımı, kemik metabolizması ile ilişkili hastalıklar da tedavi yanıtının izlenmesi ve hasta uyumunun artırılmasına yönelik klinik uygulamalarda yenilikçi bir yaklaşım olma potansiyeline sahiptir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, gerçek zamanlı PINP ve CTX ölçümü için hassas, güvenilir, taşınabilir ve uygun maliyetli bir sistem geliştirmektir. Çeşitli vücut sıvılarında (serum, tükürük, idrar gibi) PINP ve CTX ölçümü için yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip böyle bir sistem ilk kez geliştirilmiştir.

Referans kemik döngüsü belirteçleri olarak serum/plazma total PINP ve plazma CTX kullanımı önerilmektedir. Normal renal fonksiyona sahip bireylerde yürütülen klinik çalışmalarda, osteoporoz tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve farmakokinetik/farmakodinamik izlemi için, uygun hasta hazırlığının yanı sıra standardize/uyumlu analiz yöntemleri ile gerçekleştirilen örnek işleme ve ölçüm süreçlerine dikkat çekilmektedir.. Tip I kollajen türevli belirteçlerin kemik rezorpsiyon ve formasyon belirteçleri olarak etkin kullanımı için, bu belirteçlerin yapılarının detaylı karakterizasyonu kritik öneme sahiptir. Yapısal karakterizasyonları tamamlandığında, immünoassay'lerin standardizasyonunu sağlamak üzere "altın standart" referans yöntemlerinin oluşturulması gerekmektedir. Standardizasyon, farklı kitler arasında tutarlı sonuçlar elde edilmesini sağlayarak bu biyobelirteçlere olan güveni artıracak ve hastaların izlem ve yönetimindeki belirsizliği azaltacaktır.

Çalışmamızdaki sonuçlar en son teknoloji olan ECLIA ile yüksek oranda uyum gösterirken, 10 dakikadan çok daha kısa bir işlem süresi sağlamıştır. Önerilen sistem, ELISA ve ECLIA gibi benzerlerinin ihtiyaç duyduğundan çok daha düşük hacmi kullanmaktadır.

Mevcut yöntemler ile karşılaştırıldığında, kemik kaybının değerlendirilmesi ve tedavi takibi için umut verici bir yöntem haline gelmiştir. Çalışmanın önemi, özellikle non-invaziv biyolojik sıvılarda (tükürük ve idrar) elde edilen değerlerin klinik açıdan kabul edilebilir sınırlar içerisinde bulunmasından ileri gelmektedir. Bu durum, biyosensörlerin yalnızca serum tabanlı ölçümler için değil, aynı zamanda invaziv olmayan alternatif sıvılar üzerinden de uygulanabilirliğini desteklemektedir. Bulgular, serumda gerçekleştirilen ölçümlere ilişkin önceki araştırmalarla büyük ölçüde tutarlılık göstermektedir. Bununla birlikte, tükürük ve idrara yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunması nedeniyle bu araştırma, literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

Sonuçların farklı açılardan ifade edilmesi mümkündür. Bir yandan geliştirilen biyosensör, hızlı, duyarlı ve düşük maliyetli bir tanı aracı olarak değerlendirilirken; diğer yandan tedavi etkinliğinin takibinde ve hastalık prognozunun öngörülmesinde potansiyel bir klinik uygulama alanı sunmaktadır. Bu alternatif yaklaşımlar arasında öncelikli olan, biyosensörün non-invaziv biyolojik sıvılarda güvenilir ölçüm kapasitesinin vurgulanmasıdır.

Elde edilen veriler aynı zamanda ileri düzey araştırmalar için güçlü bir temel oluşturmaktadır. Gelecek çalışmalarda, farklı hasta popülasyonlarında geniş örneklemli doğrulama çalışmaları, aynı anda birden fazla biyobelirtecini tayinine imkân veren multiplex biyosensörlerin geliştirilmesi, cihazın taşınabilir sistemler ile entegrasyonu ve elektrot yüzey kararlılığının uzun dönemli olarak değerlendirilmesi öncelikli araştırma alanları olarak öne çıkmaktadır. Dolayısıyla bu tez çalışması, yalnızca ulaşılan sonuçları ile değil, aynı zamanda yönlendirdiği bilimsel araştırma perspektifleri ile de literatüre katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Adhikari, B.R., Schraft, H., Chen, A. (2017). A high-performance enzyme entrapment platform facilitated by a cationic polymer for the efficient electrochemical sensing of ethanol. *Analyst*, 142 (14), 2595e2602.
- Agerbaek, M.O., Eriksen, E.F., Kragstrup, J. ve diğerleri (1991). A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner*, 12: 101–112.
- Akbari, R., Antonini, C. (2021). Contact angle measurements: From existing methods to an open-source tool. *Advances in Colloid and Interface Science*, MM 294.
- Altman, D.G., Bland, J.M. (1983). Measurement in medicine: The analysis of comparison studies. *Statistician*, 32, 307-317.
- Amling, M., Herden, S., Posl M., ve diğerleri (1996). Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus. *J Bone Miner Res*, 11: 36–45.
- Anderson, H.C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*, 5: 222–226.
- Anderson, H.C., Garimella, R. and Tague, S.E. (2005). The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*, 10: 822–837.
- Atkins, G.J. ve Findlay, D.M. (2012). Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int*, 23: 2067–2079.
- Augat P. ve Schorlemmer, S. (2006). The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing*, 35(Suppl 2): ii27–ii31.
- Aydogdu Tığ G., Pekyardımcı S. (2020). An Electrochemical Sandwich-Type Aptasensor for Determination of Lipocalin-2 Based on Graphene Oxide/Polymer Composite and Gold Nanoparticles. *Talanta*, 210, 120666.
- Bablok W, Passing H. (1985) Application of statistical procedures in analytical instrument testing. *Journal of Automatic Chemistry* 7:74-79.
- Bahadır, E.B., Sezginturk, M.K. (2016). A Comparative Study of Short Chain and Long Chain Mercapto Acids Used in Biosensor Fabrication: A VEGF-R1-Based Immunosensor as a Model System. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*, 44, 462–470.
- Bahner, N., Reich, P., Frense, D., Menger, M., Schieke, K., Beckmann, D. (2018). An aptamer-based biosensor for detection of doxorubicin by electrochemical impedance spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, Feb;410(5):1453-1462. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0786-8>.
- Bailey, A.J., Sims, T.J., Knott, L. (2002). Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 176–82.

- Baim, S. ve Miller, P.D. (2009). Perspective: assessing the clinical utility of serum CTX in postmenopausal osteoporosis and its use in predicting risk of osteonecrosis of the jaw. *J Bone Miner Res*, 24:561–74.
- Baran, R., Wehland, M., Schulz, H., Heer, M., Infanger, M., Grimm, D. (2022). Microgravity-Related Changes in Bone Density and Treatment Options: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. Aug 3;23(15):8650. <https://doi.org/10.3390/ijms23158650>.
- Baron R.(2003). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 5th, 1-8.
- Behr, W. ve Barnert, J. (1986). Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin Chem*, 32:1960–6.
- Bentolila, V., Boyce ,T.M., Fyhrie, D.P., ve diğerleri (1998). Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. *Bone*, 23: 275–281.
- Berketa, K. O., Mruga, D. O., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, O. O. (2023). Development of a new method of improving the oxidase-based biosensors' analytical characteristics by adding catalase as an auxiliary enzyme. *Electroanalysis*, 35(12), e202300190.
- Bessueille, F., Dugas, V., Vikulov, V., Cloarec, J.P., Souteyrand, E., Martin, J.R. (2005). Assessment of porous silicon substrate for well-characterised sensitive DNA chip implement. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (6), 908e916.
- Bettica, P., Baylink, D., Moro, L. (1993). Galactosyl hydroxylysine and deoxypyridinoline: a methodological comparison. *Clin Chem Lab Med*, 31:459–66.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays Biochem*, 30;60(1):1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- Bharadwaj, S., Naidu, A., Betageri, G., Prasadaraao, N., Naidu A. (2009). Milk ribonucleaseenriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 20:1603–11.
- Bhattoa, H.P., Cavalier, E., Eastell, R., Heijboer, A.C., Jørgensen, N.R., Makris, K., Ulmer, C,Z., Kanis, J.A., Cooper, C., Silverman, S.L., Vasikaran, S.D.,; IFCC-IOF Committee for Bone Metabolism.(2021). Analytical considerations and plans to standardize or harmonize assays for the reference bone turnover markers PINP and β -CTX in blood. *Clin Chim Acta*. Apr;515:16-20. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.12.023>.
- Biesheuvel, P.M., Porada, S., Dykstra, J.E. (2021). The Difference between Faradaic and Non-Faradaic Electrode Processes. *arXiv*, arXiv:1809.02930.

- Bilezikian, J.P. (2025). Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 10th Edition. Lippincott Williams & Wilkins (LWW). ISBN-10: 97811975215620.
- Bland, J.M. ve Altman, D.G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1, 307-10.
- Bland, J.M, ve Altman, D.G. (1999) Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research* 8:135-160.
- Bolamperti, S., Villa, I., Rubinacci, A. (2022). Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res*, Jul 18;10(1):48. [https://doi.org/ 10.1038/s41413-022-00219-8](https://doi.org/10.1038/s41413-022-00219-8).
- Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, 26: 229–238.
- Bonewald, L.F. ve Johnson, M.L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 42: 606–615.
- Bongrand, P. (1998). Specific and nonspecific interactions in cell biology. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 19 (6e7), 963e978.
- Boskey, A.L. ve Robey, P.G. (2013). The composition of bone. In: Rosen CJ, ve diğerleri (eds) Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc. pp.49–58.
- Boutroy, S., Mary, L.B., Pierre, F.M., Delmas, D. (2005). *In Vivo* Assessment of Trabecular Bone Microarchitecture by High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 90, Issue 12, 1, Pages 6508–6515, <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1258>.
- Boyce, B.F. ve Xing L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, May 15;473(2):139-46. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018>.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. ve Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423: 337–342.
- Bringhurst F.R., ve diğerleri (2005). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. 2238-2249.
- Brito, F., Furtado, R.F., Bezerra, L.C., Figueiredo, E.A., Melo, A.M., Alves, C.R., Cheng, H.N., ve Biswas, A. (2022). Effect of time and storage condition on the performance of an electrochemical immunosensor for Salmonella. *Food Science and Technology*. 42, <https://doi.org/10.1590/fst.91621>.
- Buck, D.W., ve diğerleri (2012). Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals. *Plast. Reconstr. Surg*, 129(6) 1314. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824eca94>.

- Buckwalter, J.A., Glimcher, M., Cooper, R.R., Recker, R. (1995). Bone biology. *J Bone Joint Surg Am*, 77:1256–1275.
- Buerk, D.G. (1993). *Biosensors: Theory and Applications* (1st ed.). CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781498710770>.
- Buerk, D.G. (1995). *Biosensors: Theory and Applications* (1st ed.). CRC Press.
- Burr, D.B. ve Allen, M.R. (2014). *Basic and applied bone biology / edited by David. B. Burr, Matthew R. Allen*, Academic Press.
- Burr, D.B ve Allen, M.R. (2019). *Basic and applied bone biology edition 2 / edited by David. B. Burr, Matthew R. Allen*. Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/C2016-0-03781-6>.
- Butt, H.J., Roisman, I.V., Brinkmann, M., Papadopoulos, P., Vollmer, D., Semprebon, C. (2014). Characterization of super liquid-repellent surfaces. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 19:343–54.
- Caetano-Lopes, J., Canhao, H. ve Fonseca, J.E. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 32: 103–110.
- Calvo, M.S., Eyre, D.R., Gundberg, C.M. (1996). Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev*, 17(4):333–368.
- Cascio, V.L., Bertoldo, F., Gambaro, G., Gasperi, E., Furlan, F., Colapietro, F., ve diğerleri (1999). Urinary galactosyl-hydroxylysine in postmenopausal osteoporotic women: a potential marker of bone fragility. *J Bone Miner Res*, 14:1420–4.
- Cassie, A.B.D. ve Baxter, S. (1944). Wettability of porous surfaces. *Trans Faraday Soc*, 40: 546–51.
- Chalikias, G.K. ve Tziakas, D.N. (2015). Biomarkers of the extracellular matrix and of collagen fragments. *Clin Chim Acta*, 443; 39–47.
- Chao, T.Y., Yu, J.C., Ku, C.H., Chen, M.M., Lee, S.H., Janckila, A.J., ve diğerleri (2005). Tartrateresistant acid phosphatase 5b is a useful serum marker for extensive bone metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 11:544–50.
- Chen, H., Senda, T. ve Kubo, K.Y. (2015). The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol*, 48: 61–68.
- Chen, H., Zhang, J., Huang, R., Wang, D., Deng, D., Zhang, Q., ve Luo, L. (2023). The Applications of Electrochemical Immunosensors in the Detection of Disease Biomarkers: A Review. *Molecules*, 28(8), 3605.
<https://doi.org/10.3390/molecules28083605>.
- Chiang, T.I., Chang, I.C., Lee, H.S., Lee, H., Huang, C.H., Cheng, Y.W. (2011). Osteopontin regulates anabolic effect in human menopausal osteoporosis with intermittent parathyroid hormone treatment. *Osteoporos Int*, 22:577–85.

- Choi, E.J., Drago, N.P., Humphrey, N.J., Van Houten, J., Ahn, J., Lee, J., Kim, I.-D., Ogata, A.F., Penner, R.M. (2023). Electrodeposition- Enabled, Electrically-Transduced Sensors and Biosensors. *Mater. Today*, 62, 129–150.
- Choi, Y., Tran, H.-V., Lee, T.R. (2022). Self-Assembled Monolayer Coatings on Gold and Silica Surfaces for Antifouling Applications: A Review. *Coatings*, 12, 1462.
- Christgau, S. (2000). Circadian variation in serum CrossLaps concentration is reduced in fasting individuals. *Clin Chem*, 46:431.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3: S131–S139.
- Compston, J., Judd ,D., Crawley, E., Evans, W., Evans, C., Church, H., ve diğerleri (1987). Osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 28:410–5.
- Cook, C.V., Lighty, A.M., Smith, B.J., Ford Versypt, A.N. (2024). A review of mathematical modeling of bone remodeling from a systems biology perspective. *Front Syst Biol*, 4:1368555. <https://doi.org/10.3389/fsysb.2024.1368555>.
- Cosnier, S. (Ed.), (2013). *Electrochemical Biosensors*. CRC Press.
- Crowther, J.R. (2000). *The ELISA Guidebook*. Humana Press.
- Crofton, P. (1992). Wheat-germ lectin affinity electrophoresis for alkaline phosphatase isoforms in children: age-dependent reference ranges and changes in liver and bone disease. *Clin Chem*, 38:663–70.
- Cui, L., Houston, D.A., Farquharson, C., ve diğerleri (2016). Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone*, 87: 147–158.
- Cunningham, L.W., Ford, J.D., Segrest, J.P. (1967). The isolation of identical hydroxyllysyl glycosides from hydrolysates of soluble collagen and from human urine. *J Biol Chem*, 242:2570–1.
- Dallas, S.L., Prideaux, M. ve Bonewald, L.F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*, 34: 658–690.
- Damiati, S., Scheberl, A., Zayni, S., Damiati, S.A., Schuster, B., Kompella, U.B. (2019). Albumin-bound nanodiscs as delivery vehicle candidates: Development and characterization. *Biophys Chem*, 251:106178. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106178>.
- Danvirutai, P., Ekpanyapong, M., Tuantranont, A., Bohez, E., Anutrakulchai, S., Wisitsoraat, A., Srichan, C. (2020). Ultra-Sensitive and Label-Free Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Electrochemical Sensor Using Gold Nanoparticles Decorated 3D Graphene Foam towards Acute Kidney Injury Detection. *Sens. Bio-Sens. Res*, 30, 100380.

- Daoussis, D. ve Andonopoulos, A.P. (2011). The emerging role of Dickkopf-1 in bone biology: is it the main switch controlling bone and joint remodeling? *Semin Arthritis Rheum*, 41: 170–177.
- Dar, K.K., Shao, S., Tan, T., Lv, Y. (2020). Molecularly imprinted polymers for the selective recognition of microorganisms. *Biotechnol Adv*, 45:107640.
- Day, A., Saward, S., Royle, C., Mayne, P. (1992). Evaluation of two new methods for routine measurement of alkaline phosphatase isoenzymes. *J Clin Pathol*, 45:68–71.
- Delaisse, J.M., Andersen, T.L., Engsig, M.T., ve diğerleri (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*, 61: 504–513.
- Delaisse, J.M. (2014). The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep*, 3: 561.
- Delmas, P., Eastell, R., Garnero, P., Seibel, M., Stepan, J. (2000). The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int*, 11:S2–S17.
- Demeuse, J., Mackowiak, A., Grifnée, E., Massonnet, P., Huyghebaert, L., Dubrowski, T., Peeters, S., Goff, C.L., Cavalier, E. (2025). Latest Advances in Structural Insights and Quantification Techniques for Type I Collagen Biomarkers: A path toward standardization? *Biomark Insights*. May 24;20:11772719251336274.
<https://doi.org/10.1177/11772719251336274>.
- Devaraj, N.K., Dinolfo, P.H., Chidsey, C.E.D., Collman, J.P. (2006). Selective Functionalization of Independently Addressed Microelectrodes by Electrochemical Activation and Deactivation of a Coupling Catalyst. *J. Am. Chem. Soc*, 128, 1794–1795.
- Devaraj, N.K. ve Finn, M.G. (2021). Introduction: Click Chemistry. *Chem. Rev*, 121, 6697–6698.
- Dickson, I.R., Millar, E.A., Veis, A. (1975). Evidence for abnormality of bone–matrix proteins in osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 306:586–587.
- Dincel, A.S., Jørgensen, N.R., IOF-IFCC Joint Committee on Bone Metabolism (C-BM). (2023). New Emerging Biomarkers for Bone Disease: Sclerostin and Dickkopf-1 (DKK1). *Calcif Tissue Int*, 112(2):243-257.
<https://doi.org/10.1007/s00223-022-01020-9>.
- Dincel A.S. (2012). Romatoloji; Bölüm II, Romatizmal Hastalıklar; (17.4) Konnektif Doku, Kemiğin Genetik ve Metabolik Hastalıkları. Osteoporozda Laboratuvar, sayfa 1141-1155. Editörler; Şebmen Ataman, Peyman Yalçın, MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, ISBN:978-975-567-077-5.
- D'Orazio P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. Aug;334(1-2):41-69.
[https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00241-9](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00241-9).

- Drelich, J.W., Boinovich, L., Chibowski, E., Della, Volpe, C., Hołysz, L., Marmur A., ve diğerleri (2020). Contact angles: history of over 200 years of open questions. *Surf Innov*, 8: 3–27.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., ve diğerleri (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89: 747–754.
- Duer, M.J. (2015). The contribution of solid-state NMR spectroscopy to understanding biomineralization: atomic and molecular structure of bone. *J Magn Reson*, 253: 98–110.
- Dunlap, PV. ve Urbanczyk, H. (2013). Luminous bacteria. In: Rosenberg E, De Long EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry. Berlin, Heidelberg: Springer; p. 495–528.
- Eastell, R., Hannon, RA. (2008). Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2); 157–162.
<https://doi.org/10.1017/S0029665108007005>.
- Eastell, R., ve diğerleri (2016). Bone turnover markers: biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(2); 96–105.
- Eastell, R., Rosen, C.J., Black, D.M., ve diğerleri (2020). Pharmacological management of osteoporosis in postmenopausal women: An Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(3); 587–594.
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa048>.
- Egerton, R.F. (2005) Physical principles of electron microscopy : an introduction to TEM, SEM, and AEM. Springer.
- Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T., Dempsey, J.L., (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95, 197e206.
- Ellis, J.S., Allen, S., Chim, Y.T.A., Robersts, C.J., Tendler, S.J.B., Davies, M.C. (2005). Molecular-scale studies on biopolymers using atomic force microscopy. In *Polymer Therapeutics II*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 123–172.
- Elshafey, R., Tavares, A.C., Siaj, M., Zourob, M. (2013). Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles-protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue. *Biosens Bioelectron*, Dec 15;50:143-9. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.05.063>.
- Ensafi, A.A. ve Kazemzadeh, A. (1999). Optical pH sensor based on chemical modification of polymer film. *Microchemical Journal* 63, 381e389.
- Ensafi, A.A., Karimi-Maleh H., Ghiaci, M., Arshadi, M., (2011). Characterization of Mn-nanoparticles decorated organo-functionalized SiO₂eAl₂O₃ mixed-oxide as a novel electrochemical sensor: application for voltammetric determination of captopril. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 15022e15030.

- Ensafi, A.A., Amini, M., Rezaei B. (2014). Impedimetric DNA-biosensor for the study of anticancer action of mitomycin C: comparison between acid and electroreductive activation. *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 282e288.
- Eriksen, E.F., Melsen, F. ve Mosekilde L. (1984). Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metab Bone Dis Relat Res*, 5: 235–242.
- Eriksen, E.F., Charles, P., Melsen, F., Mosekilde, L., Risteli, L., Risteli, J. (1993). Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res*, 8:127–32.
- Eriksen, E.F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11(4):219-27.
- Ermini, M.L., Mariani, S., Scarano, S., Campa, D., Barale, R., Minunni, M., (2013). Single nucleotide polymorphism detection by optical DNA-based sensing coupled with whole genomic amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2e3), 985e993.
- Ertürk, G. ve Mattiasson, B. (2017). Molecular imprinting techniques used for the preparation of biosensors. *Sensors*, 17:2.
- Eş, I., Vieira, J.D.G., Amaral, A.C. (2015). Principles, Techniques, and Applications of Biocatalyst Immobilization for Industrial Application. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 99, 2065–2082.
- Everts, V., Delaisse, J.M., Korper, W., ve diğerleri (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*, 17: 77–90.
- Eyre, D.R. ve Koob, T.J. (2008). Collagen cross-links. In *Connective tissue and its heritable disorders* (pp. 207–229). Wiley-Liss.
- Fan, Z., Huang, X., Han, Y., ve diğerleri (2015). Surface modification-induced phase transformation of hexagonal close-packed gold square sheets. *Nat Commun*, 6571. <https://doi.org/10.1038/ncomms7571>.
- Fassbender, W., Ruf, T., Kaiser, H., Stracke H. (1999). Serum levels of immunoreactive bone sialoprotein in osteoporosis: positive relations to established biochemical parameters of bone turnover, vol. 14. Athens: In vivo; p. 619–24.
- Feng, J.Q., Ward, L.M., Liu, S., ve diğerleri. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*, 38: 1310–1315.
- Ferreira, D.C., Batistuti, M.R., Bachour, B., Mulato, M. (2021). Aptasensor Based on Screen-Printed Electrode for Breast Cancer Detection in Undiluted Human Serum. *Bioelectrochemistry*, 137, 107586.

- Fink, H.A., Litwack-Harrison S., Taylor, B.C., Bauer, D.C., Orwoll, E.S., Lee, C.G., ve diğeri (2016). Clinical utility of routine laboratory testing to identify possible secondary causes in older men with osteoporosis: the osteoporotic fractures in men (MrOS) study. *Osteoporos Int*, 27:331–8.
- Fischer, L.M., Tenje, M., Heiskanen, A., Masuda, N., Castillo, J., Bentien, A., Emneus, J., Jakobsen, M.H., ve Boisen A. (2009). Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic Engineering*, 86(4-6),1282-1285
<https://doi.org/10.1016/j.mee.2008.11.045>.
- Fisher, L., McBride, O., Termine, J., Young, M. (1990). Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem*, 265:2347–51.
- Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K. ve Witten, P.E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, 235: 176–190.
- Fledelius, C., Johnsen, A.H., Cloos, P.A., Bonde, M., Qvist, P. (1997). Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem*, 272(15):9755-9763.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, PS. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015:421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- Fraden, J. (2004). Handbook of Modern Sensors, Physics, Designs, and Applications, third ed. Springer.
- Frasco, M.F., Truta, L.A.A.N.A., Sales, M.G.F., Moreira, F.T.C. (2017). Imprinting Technology in Electrochemical Biomimetic Sensors. *Sensors* 17, 523.
- Frost, H.M. (1963). Bone Remodelling Dynamics. Springfield, IL: Thomas.
- Frost, H.M. (1990). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: The bone modeling problem. *The Anatomical Record*, 226(4), 403–413. <https://doi.org/10.1002/ar.1092260402>.
- Frost, H.M. (2003). Bone's mechanostat: A 2003 update. *The Anatomical Record Part A*, 275A(2), 1081–1101. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10119>.
- Garnero, P., Gineyts, E. ve Delmas, P.D. (2003). Marker of bone turnover: biochemistry and clinical use in osteoporosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 41(7), 859–864.
- Garnero, P., Vergnaud, P., Hoyle, N. (2008). Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem*, 54(1):188-96. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.094953>.

- Gerrits, M.I., Thijssen, J., Van Rijn, H. (1995). Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin Chem*, 41:571–4.
- Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. Jun 5;25(2):141-51. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>.
- Giessibl, F.J. (1995). Atomic resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy. *Science*, Jan 6;267(5194):68-71. <https://doi.org/10.1126/science.267.5194.68>.
- Goldring, S.R. (2015). The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open*, 15;1(Suppl 1):e000049. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2015-000049>.
- Goldstein, J. (2003). Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 689 p.
- Gonchoroff, D.G., Branum, E.L., Cedel, S.L., Riggs, B.L., O'Brien, J.F. (1991). Clinical evaluation of high-performance affinity chromatography for the separation of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta*, 199:43–50.
- Grandke, T. ve Ko, W.H. (Eds.), (2008). Sensors: Fundamentals, vol. 1. Wiley.
- Grissom, L.E., Harcke, H.T. (2003). Radiographic features of bisphosphonate therapy in pediatric patients. *Pediatric Radiology*, Apr;33(4):226-229. <https://doi.org/10.1007/s00247-003-0865-1>.
- Gruñdler, P., (2007). Chemical Sensors, an Introduction for Scientists and Engineers. Springer.
- Guerrero, S., Agui, L., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M. (2020). Design of Electrochemical Immunosensors Using Electro-Click Chemistry. Application to the Detection of IL-1 β Cytokine in Saliva. *Bioelectrochemistry* , 133, 107484.
- Gundberg, C.M. (2003). Matrix proteins. *Osteoporos Int*. 14(Suppl.): S37–S42.
- Hall, B.K. (2005). Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology. Elsevier Academic Press.
- Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A.J., Väänänen, H.K. (2000). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 15:1337–45. 56.
- Hansma, H.G., Pietrasanta, L.I., Auerbach, I.D., Sorenson, C., Golan, R., Holden, P.A. (2000). Probing biopolymers with the atomic force microscope: A review. *J. Biomater. Sci. Polym Ed.*, 11, 675–683.
- Hartmann, C. (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol*, 16: 151–158.

- Hassager, C., Jensen, L., Johansen, J., Riis, B., Melkko, J., Pødenphant, J., ve diğerleri (1991). The carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in serum as a marker of bone formation: the effect of nandrolone decanoate and female sex hormones. *Metabolism*, 40:205–8.
- Hauge, E.M., Qvesel, D., Eriksen EF., ve diğerleri (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res*, 16:1575–1582.
- He, P., Xu, Y., Fang, Y., (2005). A review: electrochemical DNA biosensors for sequence recognition. *Analytical Letters*, 38 (15), 2597e2623.
- Heath, V. (2009). Bone: Vitamin D deficiency implicated in bone mineralization defects. *Nat Rev Endocrinol*, 5:583.
- Henriksen, K., Bollerslev, J., Everts, V., Karsdal, M.A. (2011). Osteoclast Activity and Subtypes as a Function of Physiology and Pathology—Implications for Future Treatments of Osteoporosis, *Endocrine Reviews*, Volume 32, Issue 1, 1 February Pages 31–63, <https://doi.org/10.1210/er.2010-0006>.
- Hollis, S. (1997). Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem*, 33:1-4.
- Holzer, G., Noske, H., Lang, T., Holzer, L., Willinger, U. (2005). Soluble cathepsin K: a novel marker for the prediction of nontraumatic fractures? *J Lab Clin Med*, 146:13–7.
- Homs, M.C.I. (2002). DNA sensors. *Analytical Letters* 35 (12), 1875e1894.
- Horton, R. W. ve Meldrum, B.S. (1973). Seizures induced by allylglycine, 3-mercaptopropionic acid and 4-deoxypyridoxine in mice and photosensitive baboons, and different modes of inhibition of cerebral glutamic acid decarboxylase. *British Journal of Pharmacology*, 49 (1): 52–63. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1973.tb08267.x>.
- Hoyle, C.E. ve Bowman, C.N. (2010). Thiol–Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*. 49 (9): 1542–1543. <https://doi.org/10.1002/anie.200903924>.
- Howard, G.A., Bottemiller, B.L., Turner, R.T., ve diğerleri (1981). Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci, USA* 78: 3204–3208.
- Ihlberg, L., Haukipuro, K., Risteli, L., Oikarinen, A., Kairaluoma, M.I., Risteli, J. (1993). Collagen synthesis in intact skin is suppressed during wound healing. *Ann Surg*, 4: 397–403.
- Imam, H.T., Krasňan, V., Rebroš, M., Marr, A.C. (2021). Applications of Ionic Liquids in Whole-Cell and Isolated Enzyme Biocatalysis. *Molecules*, 7;26(16):4791. <https://doi.org/10.3390/molecules26164791>.

- Inal Kabala S., Yagar H., Ozcan H.M. (2019). A new biosensor for osteoporosis detection. *Prep Biochem Biotechnol.* 49(5):511-520. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587628>.
- Indarwulan, N., Savitri, M., Ashariati, A., Bintoro, S.U.Y., Diansyah, M.N., Amrita, P.N.A., Romadhon, P.Z. (2024). Bone Mineral Density, C-Terminal Telopeptide of Type I Collagen, and Osteocalcin as Monitoring Parameters of Bone Remodeling in CML Patients Undergoing Imatinib Therapy: A Basic Science and Clinical Review. *Diseases.* Nov 2;12(11):275. <https://doi.org/.3390/diseases12110275>.
- Jagtap, V.R ve Ganu, J.V. (2012). Effect of antiresorptive therapy on urinary hydroxyproline in postmenopausal osteoporosis. *Indian J Clin Biochem*, 27:90–3.
- Janata, J. (2009). Principles of Chemical Sensors. Springer.
- Jandt, K.D.(2001). Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. *Surf. Sci*, 491, 303–332.
- Jensen, L.T., Olesen, H.P., Risteli, J., Lorenzen, I. (1990). External thoratic duct-venous shunt in conscious pigs for long-term studies of connective tissue metabolites in lymph. *Lab Anim Sci*, 40:620–4.
- Joshi, J., Homburg, S.V. ve Ehrmann, A. (2022). Atomic Force Microscopy (AFM) on Biopolymers and Hydrogels for Biotechnological Applications—Possibilities and Limits. *Polymers*, 14(6), 1267. <https://doi.org/10.3390/polym14061267>.
- Juska, V.B., Pemble, M.E. (2020). A Critical Review of Electrochemical Glucose Sensing: Evolution of Biosensor Platforms Based on Advanced Nanosystems. *Sensors (Basel)*. Oct 23;20(21):6013. <https://doi.org/10.3390/s20216013>.
- Justine, D., Alix, M., Elodie, G., Philippe, M., Loreen, H., Thomas, D., Stéphanie, P., Caroline, Le G., and Etienne, C. (2025). Latest Advances in Structural Insights and Quantification Techniques for Type I Collagen Biomarkers: A path toward standardization? *Biomarker Insights* Volume 20: 1-12, <https://doi.org/10.1177/11772719251336274>.
- Kamala, Devi L. ve Hijam, D. (2023). Futuristic Trends in Medical Sciences e-ISBN: 978-93-6252-809-4 IIP Series, Volume 3, Book 9, Part 1, Chapter 32 Procollagen Type 1 Amino Terminal Propeptide (PINP) – An Overview.
- Kanis, J.A., McCloskey, E.V., Johansson, H. ve diğerleri (2013). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 24(1), 23–57. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2074-y>.
- Kara, S., Keskinler, B., Erhan, E., (2009). A novel microbial BOD biosensor developed by the immobilization of *P. Syringae* in micro-cellular polymers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* 84 (4), 511e518.

- Karmatschek, M., Maier, I., Seibel, M.J., Woitge, H.W., Ziegler, R., Armbruster, F.P. (1997). Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay. *Clin Chem*, 43:2076–82.
- Karunakaran, C., Bhargava, K., Benjamin, R. (2015). Chapter 1- Introduction to Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, Pages 1-68, ISBN 9780128031001, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>.
- Kathiresan, V., Thirumalai, D., Rajarathinam, T., Yeom, M., Lee, J., Kim, S., Yoon, J.-H., Chang, S.-C. (2021). A Simple One-Step Electrochemical Deposition of Bioinspired Nanocomposite for the Non-Enzymatic Detection of Dopamine. *J. Anal. Sci. Technol*, 12, 5.
- Kaupila, S., Jukkola, A., Melkko, J., Risteli, L., Turpeeniemi-Hujanen, T., Vuorinen, K., ve diğerleri (2001). Aminoterminal propeptide of the alpha1-homotrimer variant of human type I procollagen (hotPINP) in malignant pleural effusion. *Anticancer Res*, 21:2293–6.
- Kausaite-Minkstiniene, A., Ramanaviciene, A., Kirlyte, J., Ramanavicius, A. (2010). Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Anal Chem*, 1;82(15):6401-8. <https://doi.org/10.1021/ac100468k>.
- Kenkre, J.S. ve Bassett, J. (2018). The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*, 55(3):308-327. <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>.
- Khashayar P, Lopes P, Ragaert P, Hoogenboom R, Latta D, Gransee R, Lenartowicz D, Biggs P, Etxebarria I, Luegger B, Obermayer-Pietsch B, Dimai HP, Vanfleteren J. (2024). PoCOsteo: generic novel platform for bone turnover marker measurement & monitoring. *Anal Methods*. May 30;16(21):3337-3348. <https://doi.org/10.1039/d4ay00207e>.
- Kim J.M., Lin C., Stavre Z., Greenblatt M.B., Shim J.H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 10;9(9):2073. <https://doi.org/10.3390/cells9092073>.
- Kodadek T. (2010). Synthetic receptors with antibody-like binding affinities. *Curr Opin Chem Biol* 14(6):713–20.
- Koivula, K.M., ve diğerleri (2012). Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. *Clinical Biochemistry*, 45, 920-927.
- Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2004–2021.
- Krishnan, M., Kathiresan, M., Praveen, C. (2023). Electrochemically Generated Copper(I)-Catalyzed Click Chemistry: Triazole Synthesis and Insights into Their Photophysical Properties. *Eur. J. Org. Chem.*, 26, e202201405.
- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937): 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>.

- Kung, C.H., Sow, P.K., Zahiri, B., M'erida, W. (2019). Assessment and interpretation of surface wettability based on sessile droplet contact angle measurement: challenges and opportunities. *Adv Mater Interfaces*, 6:1–27.
- Kuo, T.R. ve Chen, C.H. (2017). Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res*, 18;5:18. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0097-4>.
- Kyd, P., De Vooght, K., Kerkhoff, F., Thomas, E., Fairney, A. (1988). Clinical usefulness of bone alkaline phosphatase in osteoporosis. *Ann Clin Biochem*, 35:717–25.
- Lakard, B. (2020). Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review. *Appl. Sci*, 10, 6614.
- Lee, N.K, Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., ve diğerleri (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130:456–69.
- Lee YJ, Jeong KJ. (2015). Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast. *J Biosci Bioeng*. 120(5):483–90.
- Lee, J., Arrigan, D.W.M., Silvester, D.S. (2016). Mechanical Polishing as an Improved Surface Treatment for Platinum Screen-Printed Electrodes. *Sens. Bio-Sens. Res.*, 9, 38–44.
- Lerebours, C., Weinkamer, R., Roschger, A., Buenzli, P.R. (2020). Mineral density differences between femoral cortical bone and trabecular bone are not explained by turnover rate alone. *Bone Rep*, 31;13:100731. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100731>.
- Leva-Bueno, J., Meuskens, I., Linke, D., Millner, P.A. ve Peyman, S.A. (2022). A novel, proof-of-concept electrochemical impedimetric biosensor based on extracellular matrix protein-adhesin interaction. *Sensors and Diagnostics*, 1(5), 1003–1013. <https://doi.org/10.1039/d2sd00075j>.
- Li, G., Liu, Y., Zhang, Y., Kubo, N., Yu, M., Fang, R., Kellis, M., Ren, B. (2019). Joint profiling of DNA methylation and chromatin architecture in single cells. *Nat Methods*, Oct;16(10):991-993. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0502-z>.
- Li, L., Shi, Y., Pan, L., Shi, Y., Yu, G., (2015). Rational design and applications of conducting polymer hydrogels as electrochemical biosensors. *Journal of Materials Chemistry B* 3 (15), 2920e2930.
- Li, Z., Li, J., Dou, Y., Wang, L., ve Song, S. (2021). A Carbon-Based Antifouling Nano-Biosensing Interface for Label-Free POCT of HbA1c. *Biosensors*. 11(4),118. <https://doi.org/10.3390/bios11040118>.
- Ligler, L. ve Taitt, C. (Eds.) (2008). Optical Biosensors, second ed. Elsevier Science.
- Lindsay R., ve diğerleri (1999). *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects*. 2nd ed. 305-314.

- Linkhart, S.G., Linkhart, T.A., Taylor, A.K., Wergedal, J.E., Bettica, P., Baylink, D.J. (1993). Synthetic peptide-based immunoassay for amino-terminal propeptide of type I procollagen: application for evaluation of bone formation. *Clin Chem*, 39:2254–2258.
- Lipińska, W., Grochowska, K., Siuzdak, K. (2021). Enzyme Immobilization on Gold Nanoparticles for Electrochemical Glucose Biosensors. *Nanomaterials (Basel)*, 28;11(5):1156. <https://doi.org/10.3390/nano11051156>.
- Liu, S.Y. ve Wang, Y.F. (2010). Application of AFM in microbiology: A review. *Scanning* 32, 61–73.
- Liu, N., Liang, Y., Bin, J., Zhang, Z., Huang, J., Shu, R., Yang, K. (2014). Classification of Green and Black Teas by PCA and SVM Analysis of Cyclic Voltammetric Signals from Metallic Oxide-Modified Electrode. *Food Anal. Methods*, 7, 472–480.
- Lombardi, ve diğerleri (2025). Guidelines for the correct use of the nomenclature of biochemical indices of bone status: a position statement of the Joint IOF Working Group and IFCC Committee on Bone Metabolism. *Clin Chem Lab Med*, 63(4): 704–711. <https://doi.org/10.1515/cclm-2024-1148>.
- Long, F. (2011). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 27–38.
- Loundagin, L.L., Harrison, K.D., Wei, X., Cooper, D.M.L. (2024). Understanding basic multicellular unit activity in cortical bone through 3D morphological analysis: New methods to define zones of the remodeling space. *Bone*, 179:116960. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116960>.
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M. (2005). Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev*, 105, 1103–1170.
- Lowry, M., Hall, D.E., Brosnan, J.T. (1985). Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism*, 34:955–61.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. (2001). Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, Dec;314(1-2):1-26. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(01\)00629-5](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00629-5).
- Mackie, E.J., Tatarczuch, L. ve Mirams, M. (2011). The skeleton: a multifunctional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*, 211: 109–121.
- Maduraiveeran, G., Sasidharan, M., Ganesan, V. (2018). Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosens Bioelectron*, 30;103:113-129. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>.

- Majorek, K.A., Porebski, P.J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A.J., ve diğerleri (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52 (3–4):174-182.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>.
- Makareeva, E., Han, S., Vera, J.C., Sackett, D.L., Holmbeck, K., Phillips, C.L., ve diğerleri (2010). Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion. *Cancer Res*, 70:4366–74.
- Maleki, N., Kashanian, S., Maleki, E., Nazari, M., (2017). A novel enzyme based biosensor for catechol detection in water samples using artificial neural network. *Biochemical Engineering Journal*, 128, 1e11.
- Manolagas, S.C. (2018). Normal skeletal development and regulation of bone formation and resorption. In: Drezner MK and Mulder JE (eds) UpToDate. Waltham, MA: UpToDate.
- Marahleh, A., Kitaura, H., Otori, F., Noguchi, T., Mizoguchi I. (2023). The osteocyte and its osteoclastogenic potential. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 24;14:1121727.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1121727>.
- Marian Schini, Tatiane Vilaca, Fatma Gossiel, Syazrah Salam, Richard Eastell. (2023). Bone Turnover Markers: Basic Biology to Clinical Applications, *Endocrine Reviews*, Volume 44, Issue 3, Pages 417–473, <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac031>.
- Marie, P.J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 473: 98–105.
- Matsuo, K. ve Otake, N. (2012). Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adhes Migr*, 6: 148–156.
- Mehreen A, Faisal M, Zulfiqar B, Hays D, Dhananjaya K, Yaseen F, Liang Y. (2025). Connecting Bone Remodeling and Regeneration: Unraveling Hormones and Signaling Pathways. *Biology (Basel)*. Mar 7;14(3):274.
<https://doi.org/10.3390/biology14030274>.
- Melkko, J., Hellevik, T., Risteli, L., Risteli, J., Smedsrød, B. (1994). Clearance of NH₂-terminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med*, 179:405–12.
- Melkko, J., Kauppila, S., Niemi, S., Risteli, L., Haukipuro, K., Jukkola, A., ve diğerleri (1996). Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem*, 42:947–54.
- Miller, J.C. ve Miller, J.N. (2000). Statistics for Analytical Chemistry, fourth ed. Prentice Hall.
- Mishchenko, L., Hatton, B., Bahadur, V., Taylor, J.A., Krupenkin, T., Aizenberg, J. (2010). Design of ice-free nanostructured surfaces based on repulsion of impacting water droplets. *ACS Nano*, 4:7699–707.

- Moe, S.M. (2006). Renal osteodystrophy and vascular calcification in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1(Suppl 1), S10–S21. <https://doi.org/10.2215/CJN.01490506>.
- Moester, M.J., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., van Bezooijen, R.L. (2010). Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int*, 87(2):99-107. <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9372-1>.
- Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S., Ozkan, S.A. (2019). The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. *Biosensors*, 9, 86.
- Moreira Goncalves, L. (2021). Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymers: Perceptions Based on Recent Literature for Soon-to- Be World-Class Scientists. *Curr. Opin. Electrochem*, 25, 100640.
- Mori, S. ve Burr, D.B. (1993). Increased intracortical remodeling following fatigue damage. *Bone*, 14: 103–109.
- Morris, V.J., Mackie, A.R., Wilde, P.J., Kirby, A.R., Mills, E.C.N., Gunning, P. (2001). Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers at the molecular level. *LWT—Food Sci. Technol*, 34, 3–10.
- Morris, V.J., Gunning, A.P., Kirby, A.R., Mackie, A.R., Wilde, P.J. (2000). Viewing biopolymer networks, their formation and breakdown by AFM. *Hydrocolloids*, 1, 99–109.
- Mugele, F., Heikenfeld, J. (2018). Introduction to capillarity and wetting phenomena. *Electrowetting*, 1–59.
- Murshed, M., Harmey, D., Millan, J.L., ve diğerleri (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*, 19: 1093–1104.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., ve diğerleri (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108: 17–29.
- Nakashima, T. ve Takayanagi, H. (2011). [RANKL signal and osteoimmunology]. *Clin Calcium*, 21(8):1131-40.
- Naresh, V. ve Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, 21(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- Naveen, M.H., Gurudatt, N.G., Shim, Y.B. (2017). Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: a review. *Applied Materials Today*, 9, 419e433.

- Nemiwal, M., Zhang, T.C., Kumar, D. (2022). Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules. *Enzyme Microb Technol*, 156:110006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110006>.
- Nenonen, A., Cheng, S., Ivaska, K.K., Alatalo, S.L., Lehtimäki, T., Schmidt-Gayk H., ve diğerleri (2005). Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res*, 20:1804–12.
- Nie, J., Li, J.-P., Deng, H., Pan, H.-C. (2015). Progress on Click Chemistry and Its Application in Chemical Sensors. *Chin. J. Anal. Chem*, 43, 609–617.
- North, J.R. (1985). Immunosensors: antibody-based biosensors. *Trends in Biotechnology*, 3 (7), 180–186.
- Nossal, G.J.V. (1967). Mechanisms of antibody production. *Annu Rev Med*, 18(1):81–96.
- Olsen, B.R., Reginato, A.M., Wentz, W. (2000). Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:191–220.
- Ortega, N., Behonick, D.J., Werb Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol*, 14:86–93.
- Ozcan, N., Karaman, C., Atar, N., Karaman, O., Yola, M.L. (2020). A Novel Molecularly Imprinting Biosensor Including Graphene Quantum Dots/Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite for Interleukin-6 Detection and Electrochemical Biosensor Validation. *ECS J. Solid State Sci. Technol.*, 9, 121010.
- Panagopoulou, C., Skotadis, E., Aslanidis, E., Tzourmana, G., Rapesi, A., Tsioustas, C., Kainourgiaki, M., Kleitsiotis, G., Tsekenis, G., Tsoukalas, D. (2024). Non-Faradaic Impedimetric Detection of Heavy Metal Ions via a Hybrid Nanoparticle-DNAzyme Biosensor. *Biosensors (Basel)*, 27;14(7):321. <https://doi.org/10.3390/bios14070321>.
- Parfitt, A.M. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*, 30: 5–7.
- Parkash, O., Abdullah, M.A., Yean, C.Y., Sekaran, S.D., Shueb, R.H. (2020). Development and Evaluation of an Electrochemical Biosensor for Detection of Dengue-Specific IgM Antibody in Serum Samples. *Diagnostics (Basel)*. 26;11(1):33. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010033>.
- Parkinson, I.H. ve Fazzalari, N.L. (2013). Characterisation of trabecular bone structure. In: Silva MJ (ed.) *Skeletal Aging and Osteoporosis: Biomechanics and Mechanobiology*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp.31–51.
- Parolini, C. (2025). Pathophysiology of bone remodelling cycle: Role of immune system and lipids. *Biochem Pharmacol*, 235:116844. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.116844>.
- Pasquerelli, A. (2021). *Biosensor and Biochips*. ISSN 2509-6125 ISSN 2509-6133 (electronic), Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-76469-2>.

- Patel, P.K. (2011). Distraction osteogenesis: Emedicine. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1280653-overview>. Accessed on August 25
- Patra, B., Agarwal, V., Nishiyama, Y., Sinha, N. (2025). Probing Spatial Proximities Between Protons of Collagen Protein in Native Bone Using 2D ^1H Multiple Quantum Experiments Under Fast MAS NMR. *Magn Reson Chem*, 63(3):268-274. <https://doi.org/10.1002/mrc.5508>.
- Pavan, S., Berti, F. (2012). Short peptides as biosensor transducers. *Anal Bioanal Chem*, 402(10):3055–70.
- Pedersen, T., Fojan, P., Pedersen, A.K.N., Magnusson, N.E, Gurevich, L. (2023). Amperometric Biosensor for Quantitative Measurement Using Sandwich Immunoassays. *Biosensors (Basel)*, 5;13(5):519. <https://doi.org/10.3390/bios13050519>.
- Pedersen, T., Gurevich, L., Magnusson, N.E. (2025) Aspects of Electrochemical Biosensors Using Affinity Assays. *Biosensors*, 15, 166. <https://doi.org/10.3390/bios15030166>.
- Pérez-Castrillón, J.L., Pinacho, F., De Luis, D., Lopez-Menendez, M., Dueñas, L.A. (2010). Odanacatib, a new drug for the treatment of osteoporosis: review of the results in postmenopausal women. *J Osteoporos*, 2010:401581.
- PetitClerc, C. (1976). Quantitative fractionation of alkaline phosphatase isoenzymes according to their thermostability. *Clin Chem*, 22:42–8.
- Pollack, M.A., Jefferson, S.G., Kane, J.W., ve diğerleri (1992). Method comparison-a different approach. *Ann Clin Biochem*, 29, 556-560.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I, Tuderman, L., Guzman, N.A. (1979). The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med*, 301:77–85.
- Prockop, D.J. ve Kivirikko, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 403–434.
- Qu, Z., Zhao, S., Zhang, Y., Wang, X., Yan, L. (2024) Natural Compounds for Bone Remodeling: Targeting osteoblasts and relevant signaling pathways. *Biomed Pharmacother*, 180:117490. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117490>.
- Quarles, L.D. (2012). Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Exp Cell Res*, 15;318(9):1040-8. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.027>.
- Qu'ér'e, D. (2008). Wetting and roughness. *Annu Rev Mat Res*, 38:71–99.
- Qvist, P., Petersen, K.R., Jespersen, J., Vinberg, N., Christiansen, C. (2006). Lack of hepatic metabolism of C-telopeptides of type I collagen. *Clin Chim Acta*, 366:344–7.

- Rafat, N., Satoh, P., Worden, R.M. (2021). Electrochemical Biosensor for Markers of Neurological Esterase Inhibition. *Biosensors*, 11, 459.
- Raggatt, L.J. ve Partridge, N.C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*, 285(33):25103-8.
- Raghuwanshi, V.S. ve Garnier, G. (2019). Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale. *Adv. Colloid Interface Sci*, 274, 102044.
- Rai, A.D., Sherpa, M.L., Singh, A., Thejaswi, S.G., Bhutia, R.D. (2021). Bone Alkaline Phosphatase and Urine Hydroxyproline Assay in Pre and Postmenopausal Women in the State of Sikkim and its Correlation with Bone Mineral Density. *J Midlife Health*, 12(4):304-309. https://doi.org/10.4103/jmh.jmh_73_21.
- Rasheed, P.A, Sandhyarani, N. (2016). Quartz crystal microbalance genosensor for sequence specific detection of attomolar DNA targets. *Analytica Chimica Acta*, 905, 134e139.
- Rasheed, P.A., Sandhyarani, N. (2017a). Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. *Microchimica Acta* ,184 (4), 981e1000.
- Rasheed, P.A., Sandhyarani, N. (2017b). Carbon nanostructures as immobilization platform for DNA: a review on current progress in electrochemical DNA sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 97, 226e237.
- Rho JY, Kuhn-Spearing L, ve Zioupos P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics*, 20(2), 92–102. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1).
- Rifai, N., Horvath, A.R., Wittwer, C.T. (2018). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, (6th ed.). Elsevier.
- Risteli, J. ve Risteli L. (2006). Products of bone collagen metabolism. Chapter 23. In: Seibel, M.J., Robins, S.P., Bilizikian, R.J.P, editors. Dynamics of bone and cartilage metabolism: principles and clinical applications. 2nd edn. San Diego, CA, USA: Academic Press; p. 391–405.
- Risteli, J., Winter, W.E., Kleerekoper, M., Risteli, L. (2012). Bone and mineral metabolism. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns ,D.E., editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th Edition. St. Louis, MO, USA: Elsevier; p. 1733–801.
- Robins, S.P., Woitge, H., Hesley, R., Ju, J., Seyedin, S., Seibel, M.J. (1994). Direct, enzymelinked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res*, 9:1643–9.
- Ronkainen, N.J, Halsall, H.B, ve Heineman, W.R. (2010). *Electrochemical biosensors*. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747. <https://doi.org/10.1039/b714449k>.

- Rosano, T.G., Peaston, R.T., Bone, H.G., Woitge, H.W., Francis, R.M., Seibel, M.J. (1998). Urinary free deoxypyridinoline by chemiluminescence immunoassay: analytical and clinical evaluation. *Clin Chem*, 44:2126–32.
- Rosello, A., Serrano, N., Diaz-Cruz, J.M., Arino, C. (2021). Discrimination of Beers by Cyclic Voltammetry Using a Single Carbon Screen-printed Electrode. *Electroanalysis*, 33, 864–872.
- Ross, F.P. (2013). Osteoclast biology and bone resorption. In: Rosen, C.J., et al. (eds) Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp.25–33.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., Sharpless, K.B. (2002). A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed*, 41, 2596–2599.
- Sadana, A. ve Chen, Z. (1996). Influence Of Non-Specific Binding On Antigen-Antibody Binding Kinetics For Biosensor Applications, *Biosens. & Bioelectrons*, 11, 17.
- Saha, T., Caño, R.D., Mahato, K., ve diğerleri (2023). Wearable Electrochemical Glucose Sensors in Diabetes Management: A Comprehensive Review *Chemical Reviews*, 123 (12), 7854-7889. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00078>.
- Sakthivel, P., Ramachandran, K., Maheshvaran, K., Senthil, T.S., Manivel, P. (2024) Simultaneous Electrochemical Detection of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid Using Au Decorated Carbon Nanofibers Modified Screen Printed Electrode. *Carbon Lett*, 34, 2325–2341.
- Sanati, A., Jalali, M., Raeissi, K., Karimzadeh, F., Kharaziha, M., Mahshid, S.S., Mahshid, S. (2019). A Review on Recent Advancements in Electrochemical Biosensing Using Carbonaceous Nanomaterials. *Microchim. Acta*, 186, 773.
- Spori, D.M., Drobek, T., Zürcher, S., Ochsner, M., Sprecher, C., Mühlebach, A., ve diğerleri (2008). Beyond the lotus effect: roughness influences on wetting over a wide surface-energy range. *Langmuir*, 24:5411–7.
- Sassolas, A., Leca-Bouvier, B.D., Blum, L.J., (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*, 108 (1), 109e139.
- Saylan, Y., Yilmaz, F., Özgür, E., Derazshamshir, A., Yavuz, H., Denizli, A. (2017). Molecular imprinting of macromolecules for sensor applications. *Sensors*, 17:4.
- Schreiber, W.E. ve Whitta, L. (1986). Alkaline phosphatase isoenzymes resolved by electrophoresis on lectin-containing agarose gel. *Clin Chem*, 32:1570–3.
- Schytte, S., Hansen, M., Møller, S., Junker, P., Henriksen, J.H., Hillingsø, J., Teisner B. (1999). Hepatic and renal extraction of circulating type I procollagen aminopropeptide in patients with normal liver function and in patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Clin Lab Inves*, 59(8):627-33.
<https://doi.org/10.1080/00365519950185120>.

- Seeman, E. (2003). Invited review: pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol*, 95: 2142–2151.
- Seeman, E. (2009). Bone modeling and remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19(3):219.
- Seeman, E. ve Delmas, P.D. (2006). Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *New England Journal of Medicine*, 354(21), 2250–2261. <https://doi.org/10.1056/NEJMra053077>.
- Seibel, M.J. (2005). Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*, 26(4):97-122.
- Seifert-Klauss, V., Fillenberg, S., Schneider, H., Lippa, P., Mueller, D., Kiechle, M. (2012). Bone loss in premenopausal, perimenopausal, and postmenopausal women: Results of a prospective observational study over 9 years. *Climacteric*, 15:433–40. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.658110>.
- Semsi R. (2019). Genç Erişkin Bireylerde Strese Bağlı Tükürük Kortizol ve Amilaz Düzeylerinin Farklı Biyokimyasal Analiz Yöntemleri ile Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi.Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. S.64, Ankara.
- Seyedin, S.M., Kung, V.T., Daniloff, Y.N., Hesley, R.P. Gomez, B., Nielsen, L.A., ve diğerleri (1993). Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 8:635–41.
- Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair: The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cells Mater*, 15:53–76.
- Sheldon, R.A. (2011). Characteristic Features and Biotechnological Applications of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 92, 467–477.
- Selvolini, G., ve Giovanna, M. (2023). Sensor principles and basic designs. Fundamentals of Sensor Technology Principles and Novel Design Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials Pages 17-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88431-0.00018-1>.
- Silver, I.A., Murrills, R.J. ve Etherington D.J. (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res*, 175: 266–276.
- Sims, N.A. ve Martin, T.J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*, 3: 481.
- Singh, A., Mehdi, A.A., Srivastava, R.N., Verma, N.S. (2012). Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci*, 2(2):75-81.
- Singh, M., Kaur, N.; Comini, E. (2020). The Role of Self-Assembled Monolayers in Electronic Devices. *J. Mater. Chem. C*, 8, 3938–3955.

- Singh, S., Kumar, D., Lal, A.K. (2015). Serum osteocalcin as a diagnostic biomarker for primary osteoporosis in women. *J Clin Diagn Res*, 9:RC04–7.
- Sinha, R., Shukla, P. (2019). Current trends in protein engineering: updates and progress. *Curr Protein Pept Sci*, 20(5):398–407.
- Skoog, A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2014). Fundamentals of Analytical Chemistry, ninth ed.
- Smutok, O. ve Katz, E. (2022). Biosensors: Electrochemical Devices-General Concepts and Performance. *Biosensors (Basel)*, 28;13(1):44.
<https://doi.org/10.3390/bios13010044>.
- Sommerfeldt, D.W. ve Rubin, C.T. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10:S86–S95.
- Sørensen, S.J., Burmølle, M., Hansen, L.H. (2006). Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, 17(1):11–6.
- Šromová, V., Sobola, D., Kaspar, P. (2023). A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells*, 5;12(21):2576. <https://doi.org/10.3390/cells12212576>.
- Stan, D., Mirica, A.C., Iosub, R., Stan, D., Mincu, N.B., Gheorghe, M., Avram, M., Adiaconita, B., Craciun, G., Bocancia Mateescu, A.L. (2022). What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? *Processes*, 10, 723.
- Steinem, C. ve Janshoff, A. (Eds.), (2007). Piezoelectric Sensors. Springer.
- Štěpán, J., Volek, V., Kolář, J.A. (1976). A modified inactivation-inhibition method for determining the serum activity of alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta*, 69:1–9.
- Subramanian, V., Wolf, E.E., Kamat, P.V. (2004). Catalysis with TiO₂/Gold Nanocomposites. Effect of Metal Particle Size on the Fermi Level Equilibration. *Journal of the American Chemical Society*. 126 (15): 4943–4950. <https://doi.org/10.1021/ja0315199>.
- Šulek, F., Fernandez, D.P., Knez, Ž., Habulin, M., Sheldon, R.A. (2011). Immobilization of Horseradish Peroxidase as Crosslinked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Process Biochem*, 46, 765–769.
- Svalova, T.S., Medvedeva, M.V., Saigushkina, A.A., Kozitsin, I.V., Malysheva, N.N., Zhdanovskikh, V.O., Okhokhonin, A.V., Kozitsina, A.N. (2020). A Label-Free Impedimetric Immunosensor Based on Covalent Immobilization of Anti-E. Coli Antibody via Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Anal. Bioanal. Chem*, 412, 5077–5087.
- Szulc, P., ve Delmas, P.D. (2008). Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. In: Marcus, R. et al. (Eds.), *Osteoporosis*, (3rd ed., pp. 159–188). Academic Press.

- Tajik, S., Beitollahi, H., Nejad, F.G., Shoaie, I.S., Khalilzadeh, M.A., Asl, M.S., Le, Q.V., Zhang, K., Jang, H.W., Shokouhimehr, M. (2020). Recent Developments in Conducting Polymers: Applications for Electrochemistry. *RSC Adv*, 10, 37834–37856.
- Taleat Z., Khoshroo, A.R., Mazloum-Ardakani, M., (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: a review, 181 (9e10), 865e891.
- Tate, J., Ward, G. (2004). Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev*. 2May;25(2):105-20.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., ve diğerleri (2007). Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*, 5: 464–475.
- Thea^venot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (1999). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 71 (12), 2333e2348.
- Thermo Nicolet Corporation Dutta, A. (2017) Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy,
<http://www.eng.uc.edu/wbeaucag/Classes/Characterization/FTIRintro.pdf>.
- Tolar, J., Teitelbaum, S.L., ve Orchard, P.J. (2004). Osteopetrosis. *N Engl J Med*, 351: 2839–2849.
- Tong, A., Malkin, N., Fatras, K., Atanackovic, L., Zhang, Y., Huguet, G., Wolf, G., ve Bengio, Y. (2023). Improving and Generalizing Flow-Based Generative Models with Minibatch Optimal Transport. *Transactions on Machine Learning Research*, 34, 1-34.<https://doi.org/10.48550/arXiv.2302.00482>.
- Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* 67, 3057–3064.
- Tunçay Ekin Ö. (2013). Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. S. 4-7, Ankara.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *BEU Journal of Science*, 6(2), 71-80.
- Väänänen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., Halleen, JM. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*, 113:377–81.
- Van Hoof, V., Lepoutre, L., Hoylaerts, M., Chevigne, R., De Broe, M. (1988). Improved agarose electrophoretic method for separating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chem*, 34:1857–62.

- Vasikaran, S., Cooper, C., Eastell, R. ve diğerleri (2011). International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(8), 1271–1274. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.602>.
- Vasikaran., S, Eastell, R., Bruyère, O., ve diğerleri (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International*, 22(2), 391–420. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1501-1>.
- Vlamidis, Y., Gulandi, I., Tonelli, D. (2017). Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 799, Pages 285-292. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.012>.
- Vetelino, J. ve Reghu, A. (2010). Introduction to Sensors. CRC Press.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. ve Delmas, P.D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, 17: 319–336.
- Villalonga, M.L., Borisova, B., Arenas, C.B., Villalonga, A., Arevalo-Villena, M., Sanchez, A., Pingarron, J.M., Briones-Perez, A., Villalonga, R. (2019). Disposable. Electrochemical Biosensors for *Brettanomyces Bruxellensis* and Total Yeast Content in Wine Based on Core-Shell Magnetic Nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem*, 279, 15–21.
- Xing, L. ve Boyce, B.F. (2005). Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 709–720.
- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R.L., ve diğerleri (2011). Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* ; 17: 1235–1241.
- Yanez-Sedeno, P., Gonzalez-Cortes, A., Campuzano, S., Pingarron, J.M. (2019). Copper(I)-Catalyzed Click Chemistry as a Tool for the Functionalization of Nanomaterials and the Preparation of Electrochemical (Bio) Sensors. *Sensors*, 19, 2379.
- Yang, C.-W., Hwang, I.-S., Chen, Y.F., Chang, C.S., Tsai, D.P. (2007). Imaging of soft matter with tapping-mode atomic force microscopy and non-contact-mode atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 18, 084009.
- Yang, G., Zhu, L., Hou, N., ve diğerleri (2014). Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res*, 24:1266–1269.
- Yaiwong, P., Anuthum, S., Sangthong, P., Jakmunee, J., Bamrungsap, S., Ounnunkad K. (2023). A new portable toluidine blue/aptamer complex-on-polyethyleneimine-coated gold nanoparticles-based sensor for label-free electrochemical detection of alpha-fetoprotein. *Front Bioeng Biotechnol*, 22;11:1182880. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1182880>.

- Yeh, P.S., Lee, Y.W., Chang, W.H., Wang, W., Wang, J.L., Liu, S.H., Chen, R.M. (2019). Biomechanical and tomographic differences in the microarchitecture and strength of trabecular and cortical bone in the early stage of male osteoporosis. *PLoS One*, 8;14(8):e0219718. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0219718](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219718).
- Young, B. (2006). Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Yu, J., Stankovic, D., Vidic, J., ve Sojic, N. (2024).Recent advances in electrochemiluminescence immunosensing. *Sens. Diagn.*, 3, 1887-1898. <https://doi.org/10.1039/D4SD00272E>.
- Zaki, M.H.M., Mohd, Y., Chin, L.Y. (2020). Surface Properties of Nanostructured Gold Coatings Electrodeposited at Different Potentials. *Int. J. Electrochem. Sci*, 15, 11401–11415.
- Zhang, J., Guan, Y., Lin, W., Gu, X. (2019). Enhanced mechanical properties and biocompatibility of Mg-Gd-Ca alloy by laser surface processing. *Surface and Coatings Technology*, volume 362, sayfa 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.01.063>.
- Zhang, Q., Wana, J.L., Sodek, J. (1992). Characterization of the promoter region of the porcine opn (osteopontin, secreted phosphoprotein 1) gene. *Eur J Biochem*, 207:649–59.
- Zhang, Z., Liu, J. (2019). Molecular imprinting with functional DNA. *Small*, 15(26):e1805246.
- Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., ve diğerleri (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*, 4: 111–121.
- Zhou, H., Chernecky, R. ve Davies, J.E. (1994). Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. *J Bone Miner Res*, 9: 367–374.
- Zhou, S., Zhao, Y., Mecklenburg, M., Yang, D., Xie, B. (2013). A novel thermometric biosensor for fast surveillance of b-lactamase activity in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 49 (15), 99e104.
- Zhou, S., Liu, C., Lin, J., Zhu, Z., Hu, B., Wu, L. (2022). Towards Development of Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors for Food and Drug Safety: Progress and Trends. *Biosensors*, 12, 369.
- Zhou, Y., Marar, A., Kner, P., Ramasamy, R.P. (2017). Charge-directed immobilization of bacteriophage on nanostructured electrode for whole-cell electrochemical biosensors. *Analytical Chemistry*, 89 (11), 5734e5741.

- Zhou, Y., Du, J. (2022). Atomic force microscopy (AFM) and its applications to bone-related research. *Prog Biophys Mol Biol.* 176:52-66.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2022.10.002>.
- Zhu, J., Wen, M., Wen, W., Du, D., Zhang, X., Wang, S., Lin, Y. (2018). Recent progress in biosensors based on organic-inorganic hybrid nanoflowers. *Biosensors and Bioelectronics*, 120, 175e189.
- Zorea, J., Shukla, R.P., Elkabets, M., Ben-Yoav, H.(2020). Probing antibody surface density and analyte antigen incubation time as dominant parameters influencing the antibody-antigen recognition events of a non-faradaic and diffusion-restricted electrochemical immunosensor. *Anal Bioanal Chem.* Mar;412(7):1709-1717.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02417-x>.
- Walcarius, A. (2015). Mesoporous materials-based electrochemical sensors. *Electroanalysis*, 27 (6), 1303e1340.
- Walle, M., Gabel, L., Whittier, D.E., Liphardt, A.M, Hulme, P.A., Heer, M., Zwart, S.R., Smith, S.M., Sibonga, J.D., Boyd, S.K. (2024). Tracking of spaceflight-induced bone remodeling reveals a limited time frame for recovery of resorption sites in humans. *Sci Adv.* Dec 20;10(51):eadq3632. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adq3632>.
- Wang, G., Han, R., Li, Q., Han, Y., Luo, X. (2020). Electrochemical Biosensors Capable of Detecting Biomarkers in Human Serum with Unique Long-Term Antifouling Abilities Based on Designed Multifunctional Peptides. *Anal. Chem.*, 92, 7186–7193.
- Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (10), 1887e1892.
- Wang, S., Zhang, J., Gharbi, O., Vivier, V., Gao, M., Orazem, M.E. (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Nat. Rev. Methods Primers*, 1, 41.
- Wang, Z., Jinlong, L., An, Z., Kimura, M., Ono, T. (2019). Enzyme Immobilization in Completely Packaged Freestanding SU-8 Microfluidic Channel by Electro Click Chemistry for Compact Thermal Biosensor. *Process Biochem*, 79, 57–64.
- Welch, N.G., Scoble, J.A., Muir, B.W., Pigram, P.J. (2017). Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases.* Mar 16;12(2):02D301. <https://doi.org/10.1116/1.4978435>.
- Wenzel, R.N. (1936). Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind Eng Chem* 28:988–94.
- Wijesuriya, D.C., Rechnitz, G.A. (1993). Biosensors based on plant and animal tissues. *Biosens Bioelectron*, 8(3):155–60.
- Wild, D., ed. (2018) The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Essential Immunodetection Methods. 5th ed. Elsevier.

- Whitaker, K.B., Whitby, L., Moss, D. (1977). Activities of bone and liver alkaline phosphatases in serum in health and disease. *Clin Chim Acta*, 80:209–19.
- Whittier, D.E., Boyd, S.K., Burghardt, A.J., Paccou, J., Ghasem-Zadeh, A., Chapurlat, R., Engelke, K., Bouxsein, M.L. (2020). Guidelines for the assessment of bone density and microarchitecture *in vivo* using high-resolution peripheral quantitative computed tomography. *Osteoporos Int*, 31(9):1607-1627. <https://doi.org/10.1007/s00198-020-05438-5>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞEMSİ Rabia

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	2017-2019
Lisans	Anadolu Üniversitesi / Uluslararası İlişkiler	2015-2019
Lisans	Ankara Üniversitesi / Kimya Bölümü	2010-2014
Lise	Bahçelievler Deneme Lisesi	2006-2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2024	Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Girne, KKTC	Araştırma Görevlisi (Yarı Zamanlı)
2023	Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Girne, KKTC	Araştırma Görevlisi (Yarı Zamanlı)
2021-2022	Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Girne, KKTC	Araştırma Görevlisi (Yarı Zamanlı)
2013	Emniyet Genel Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı (ANKARA) 45 Gün	Staj

Yabancı Diller

Almanca

(Orta Seviyede)

İngilizce

(İyi Seviyede)

Yayınlar

Erdal Ergünol, Rabia Şemsi, Duygu Dayanır, Remzi Orkun Akgün, Okan Ekim, Altay Uludamar, Ayhan Özkul ve Aylin Sepici Dinçel. (2025). Sclerostin antibody promotes alveolar bone regeneration after tooth extraction. *Biomol Biomed.* <https://doi.org/10.17305/bb.2025.12999>.

Uğur Sözlü, Selda Başar, Rabia Şemsi, Esedullah Akaras ve Aylin Sepici Dinçel. (2025). Preventive effect of the neurodynamic mobilization technique on delayed onset of muscle soreness: a randomized, single-blinded, placebo-controlled study. *BMC Musculoskeletal Disord*, 26, 464. <https://doi.org/10.1186/s12891-025- 08723-8>.

Erdal Ergünol, Remzi Orkun Akgün, Rabia Şemsi, Okan Ekim, Altay Uludamar, Aylin Sepici Dinçel. (2025). Novel Method for Tooth Extraction in Rabbits: Advantages and Considerations. *Indian Journal of Animal Research*. 1-6.

Rabia Şemsi, Burcu Eser, Gülsüm Koçak, Göktuğ Gül, Pınar Arslan, Aysel Çağlan Günel, Aylin Sepici Dinçel. (2025). Oxidative DNA Damage of Lambda-Cyhalothrin in Model Vertebrate Organism. *Toxicology and Industrial ealth*. <https://doi.org/10.1177/07482337251316771>.

Rabia Şemsi, Umut Kökbaş, Burak Arslan, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel and Levent Kayrın. (2024). Saliva Glucose Determination by Biosensor: Method Comparison to Chemiluminescence Immunoassay. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, Vol. 18, No. 4, pp. 355–361. <https://doi.org/10.1134/S1990750824600286>.

Erdal Ergünol, Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. (2024). Age and gender related changes on total antioxidant/oxidant status and electrolyte composition of saliva. *Aspect of Molecular Medicine*. (4). <https://doi.org/10.1016/j.amolm.2024.100054>.

Rabia Şemsi, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel. (2024). Salivary kallikrein-8 as a favorable biomarker for stress response. *Vojnosanit Pregl* 81(7): 447–451. <https://doi.org/10.2298/VSP231013038S>.

Rabia Şemsi, Erdal Ergünol, Emre Kanad Er, Aylin Sepici Dinçel. (2023). Academic examination stress: Effects on salivary cortisol, neuropeptide Y and interleukin-1β. *Aspect of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.amolm.2023.100030>.

- Arzu Or Koca, Ayşe İriz, Burak Hazır, Rabia Şemsi, Nurgül Bilger, Asiye Uğraş Dikmen, Aylin Sepici Dinçel, İlhan Yetkin. (2023). Relationships of orexigenic and anorexigenic hormones with body fat distribution in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, May;280(5):2445-2452. <https://doi.org/10.1007/s00405-022-07799-5>.
- Mehmet Düzlü, Ayşe İriz, Süleyman Cebeci, Rabia Şemsi, Muaammer Melih Şahin, Aylin Sepici Dinçel. (2021). Decreased galectin-1 levels in obstructive sleep apnea: a novel biomarker. *B-ENT*, 17(3):169-173. <https://doi.org/10.5152/B-ENT.2021.21473>.
- Burak Arslan, Rabia Şemsi, Ayşe İriz, Aylin Sepici Dinçel. (2021). The evaluation of serum brain-derived neurotrophic factor and neurofilament light chain levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, Oct 20;6(6):1466-1473. <https://doi.org/10.1002/lio2.683>.
- Rabia Şemsi, Umut Kökbaş, Burak Arslan, Erdal Ergünol, Levent Kayrın, Aylin Sepici Dinçel. (2022). The Saliva Cortisol and Amylase Levels Related with Stress Response Compared by Different Analytical Methods, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Mar;194(3):1166-1177. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03676-9>.
- Erdal Ergünol, Rabia Şemsi and Aylin Sepici Dinçel. (2021). There Is Value in Taking The Time To Teach Dental History And Ethics In Dentistry Curriculum”, *Turkish Journal of Biochemistry*, <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0094>.
- Ayşe İriz, Rabia Şemsi, Burcu Eser, Burak Arslan, Aylin Sepici Dinçel. (2021). The evaluation of serum tryptophan and kynurenine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep and Breathing*, Sep;25(3):1389-1398. <https://doi.org/10.1007/s11325-020-02250>.
- Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. (2024). Tıbbi Biyokimya Laboratuvar Dersinde Takıma Dayalı Öğrenme Yaklaşımının Değerlendirilmesi: Retrospektif Bir İnceleme. *Future Biochemistry and Bioscience*, 6(3):109-114. <http://doi.org/10.48086/ASD0073>.
- Rabia Şemsi ve Aylin Sepici Dinçel (2024). The Interrelationship Between Sclerostin and the Wnt Signaling Pathway, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, vol.33, no.3, pp.186-197.
- Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. (2024). Atomik Spektroskopisinin Kuramsal Temelleri. *Future Biochemistry and Bioscience*, 6(1):27-36. <http://doi.org/10.48086/ASD0060>.
- Rabia Şemsi. (2021). Serbest Radikallerin ve Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı Olarak Mitokondri. *Future Biochemistry and Bioscience*, 3(2):71-82.
- Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. (2021). Yaşın Tükürük Transform Edici Büyüme Faktör Beta (TGF- β) Düzeyleri Üzerindeki Etkisi, *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 4(3):127-133. https://doi.org/10.17932/IAU.TFK.2018.008/tfk_v04i3003.
- Umut Kökbaş, Rabia Şemsi, Burak Arslan, Aylin Sepici Dinçel, Erdal Ergünol, Levent Kayrın (2020). Genç erişkin bireylerde tükürük ürik asit düzeylerinin biyosensör yöntemi ile değerlendirilmesi, *Cukurova Medical Journal*, 45(3),1137-1143.

Rabia Şemsi, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel. (2020). Geleneksel öğrenme modelinin biyokimya dersindeki akademik başarı ve kalıcılığın üzerine etkisi *Future Biochemistry and Bioscience*, 2(1):13-16. <http://doi.org/10.48086/ASD0004>.

V.Ercan Dinçel, Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. (2019). Romatoid Artrit Hastalarında N-Telopeptit Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *Future Biochemistry and Bioscience*, 1(1):13-16. <https://doi.org/10.48086/ASD0010>.

Katıldığı Ulusal Kurs, Çalıştay, Sempozyum ve Kongreler

Kurslar

2021 Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Ar-Ge Projesi Yazma Eğitimi (ANKARA)
 2021 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu (ANKARA)
 2021 ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi
 2021 Laboratuvar Uygulamalarında Moleküler Tekniklerin Yeri ve Kullanımı Kursu (MANİSA-Online)
 2021 Görüşme ve Mülakat Teknikleri
 2018 DNA Hasarı,Onarımı ve Tandem Kütle Spektrometrik Değerlendirilmesi (İZMİR)
 2018 Akım Sitometri Nerede? Nasıl? SBÜ Gülhane Tıp Fakültesi (ANKARA)
 2018 Laboratuvar Uygulamalarında Moleküler Tekniklerin Yeri ve Kullanımı Kursu (ADANA)
 2016 Biyoistatistik ve SPSS Kursu
 2014 Yaşamartı Gelişim Zirvesi
 Etkin Beden Dili Yönetimi
 Diksiyon ve Konuşma Estetiği
 Zaman Yönetimi
 Liderlik ve Yönetim Yetkinlikleri
 2010 Goethe Institute (ANKARA)
 Almanca Dil Kursu

Ulusal Kongrelerde–Çalıştaylarda-Kurslarda Görevler

Kurs Eğitmen Görevi: Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı Eğitim Kursu. Kırklareli, 18 Kasım – 22 Kasım 2024.

Kurs Eğitmen Görevi: Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı Eğitim Kursu. TÜBİTAK-2237-A Bilimsel Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Sivas, 29 Ocak-02 Şubat 2024.

Kurs Eğitmen Görevi: Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı Eğitim Kursu. TÜBİTAK-2237-A Bilimsel Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Online, 13 Haziran-18 Haziran 2021.

Kurs Eğitmen Görevi: Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı Eğitim Kursu. TÜBİTAK-2237-A Bilimsel Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Online, 20 Mayıs-26 Mayıs 2021.

Kurs Eğitmen Görevi: Araştırmada ve Tıbbi Uygulamada Kullanılan Moleküler Laboratuvar Teknikleri: Uygulamalı Eğitim Kursu. Tüm Laboratuvar Uygulamaları. TÜBİTAK-2237-A Bilimsel Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir, Ankara, 10 Eylül – 14 Eylül 2018.

Çalıştay, Sempozyum ve Kongreler

- 2025 Yüksek İhtisas Biyokimya Günü 15 Ekim 2025 (Ankara)
- 2025 IX. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu “Preklinik ve Klinik Modellemeler II” 9-11 Nisan 2025 (İZMİR)
- 2025 Kanser Hücrelerini Temelden Anlamak Sempozyumu 11 Şubat 2025 (Virtual)
- 2023 VIII. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu “Preklinik Modellemeler” 29 Kasım- 01 Aralık 2023 (İZMİR)
- 2023 III. Sci Gether Bilim Günleri 24-25 Haziran 2023 (Online)
- 2023 Kimya Araştırmalarında İnovasyonu Güçlendirmek için Reaxys: Tarım ve Gıda Kimyası 8 June 2023 (Virtual)
- 2023 MEDIVATION IV ZİRVEİ 4-5 Mayıs 2023 (Online)
- 2022 2. Gazi Tıp Biyokimya Günleri-İnflamasyona Multidisipliner Yaklaşım Sempozyumu (ANKARA)
- 2022 Kolon Kimyası, Parametreler ve Örnek Hazırlama
- 2022 İyon Kromatografi Tekniğinin Temelleri
- 2022 Titrasyon Ölçümlerinin Teori ve Temelleri (Online)
- 2022 VII. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu “İnflamasyon” (27-29 Nisan 2022-Online)
- 2022 Validasyon: Elektroanalitik Analizlerdeki Yeri ve İlgili Parametreleri (Online)
- 2022 Gıda, Çevre, Medikal ve Askeri Alanda Elektrokimyasal Biyosensörler (Online)
- 2022 MEDCON Sağlık Bilim ve Teknoloji Zirvesi (Online)
- 2022 II. SCIGETTER Bilim Günleri (Online)
- 2022 Biyo/Nanomalzemeler ve Biyomedikal Uygulamaları
- 2022 Üç Boyutlu Biyobasım ile Doku ve Organ Üretimi
- 2021 VI. Hacettepe Biyoloji ve Uygulamaları Kongresi “Genetik” Çalıştay1
- 2021 VI. Hacettepe Biyoloji ve Uygulamaları Kongresi
- 2021 MEDCON Sağlık, Bilim ve Teknoloji Zirvesi (Online)
- 2021 BioSem’21 (Online)
- 2021 Bioinfoconference - Biyoenformatik ve Disiplinlerarası Yaklaşımlar Konferansı (Online)
- 2021 Uluslararası Katılımlı Onkolojide Sıvı Biyopsi VI. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu (Online)
- 2021 Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Olgularla Laboratuvar Yaklaşımı (Online)
- 2021 Laboratuvar Güvenliği ve Çalışma Kuralları (Online)
- 2021 Covid-19 Pandemisinde Araştırma-Yayın Ve Eğitim Süreçlerine Bakış Kongresi (Online)
- 2021 Moleküler Genetik Uygulamalarında Çözelti Çeşitleri ve Çözelti Hazırlama Teknikleri (Webinar)
- 2020 31. Ulusal Biyokimya Kongresi 18-20 Aralık (Sanal Kongre)
- 2020 Sağlık Biyoteknolojisi V. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu (İZMİR)
- 2019 ORPHEUS İyi Uygulamalar Çalıştay1 (ANKARA)
- 2019 Türkiye Üniversiteleri Sağlık Bilimleri Enstitüleri 31. Toplantısı (ANKARA)
- 2019 Biyosensörler IV. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu (İZMİR)

2018 Endokrin ve Metabolik Hastalıklar Tanıdan-Tedaviye Biyobelirteçler III.Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu (İZMİR)

2017 1. OMFACELL Kök Hücre Araştırma Öğrenci Topluluğu Sempozyumu- Laboratuvaradan Dış Unitine Mezenkimal Kök Hücreler Gazi Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi (ANKARA)

2017 1.Gazi Tıp Biyokimya Günleri- Obeziteye Multidisipliner Yaklaşım Sempozyumu (ANKARA)

2017 Uluslararası Katılımlı Yeni Nesil İmmunoloji Testleri Çalıştayı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (ANKARA)

KATILDIĞI ULUSLARARASI KURS, ÇALIŞTAY , SEMPOZYUM ve KONGRELER

KURSLAR

2022 IFCC-C-CMBC Advanced Course- Adana 1-3 December 2022, (Türkiye)

2022 IFCC C-CMBC Pre-Course- Trainee, Institute of Clinical Chemistry at the University Medical Center Mannheim 18-22 July 2022 (GERMANY)

2022 R for Biochemists 101

2021 PCR Based Genetic Analysis Approaches Course 04-05 May 2021 (Online)

2014 St.Giles International Language School (LONDON)

İngilizce Dil Kursu

Çalıştay, Sempozyum Ve Kongreler

2025 49th FEBS Congress – Bridging Continents to Advance Life Science 5-9 July 2025 (İstanbul, Türkiye) (TDK-2024-9725 nolu BAP projesi)

2025 EUROMEDLAB 2025 26th IFCC-EFLM EUROMEDLAB Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 49th Annual Meeting of the Royal Belgian Society of Laboratory Medicine 18-22 May 2025 Brussels, Belgium (TCD-2024-8425 nolu BAP projesi)

2025 Bioinfocongress VII 21-23 March 2025 (Online)

2025 FEBS Education Workshop on Safe Learning Environment: Bridging the Gap Between Learning Partners , 28 February-02 March 2025 (İzmir) (TCD-2024-8425 nolu BAP projesi)

2024 IFCC Intelligent Biosensors in Medical Diagnostics, 27 November 2024 (Online)

2024 XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, 35th National Biochemistry Congress 28 October-1 November 2024, Antalya, Türkiye (Tübitak 2224-B)

2024 Machine Learning for Multiple Domains: From Concepts to Implementation. EuroCC National Competence Centres, 14-15 October 2024 (Online)

2024 48th FEBS Congress-Mining biochemistry for human health and well-being 29 June-3 July 2024 (Milano, Italy) (FEBS bursu)

2024 Scope of TUBITAK Ulakbim + WILEY Free Open Access Article Publication Agreement 28 May 2024 (Online)

2024 BIOINFOCONGRESS VI 18-19 May 2024 (Online)

2024 The International Higher Education Symposium 17-19 April 2024 (Online)

2024 FEBS Education and Training Conference 20-23 March 2024 (Antalya, Türkiye)

2023 Systematic reviews and meta analysis Workshop. 8-9 November 2023 (Online)

2023 Uluslararası Biyokimya Kongresi 2023/ 34. Ulusal Biyokimya Kongresi 29 Ekim-1 Kasım 2023 (Fethiye Muğla Türkiye)

2023 3rd International Congress. From Plant Health to Community Health: How Smart Sensors Can Improve It. 20 October 2023 (Virtual)

2023 FEBS Open Bio webinar entitled "Supporting Early Career Researchers –what FEBS can offer" 11 October 2023 (Online)

2023 XXX Meeting of the Balkan Clinical Laboratory Federation and II Montegrin Conference of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 27-30 September 2023 (Herceg Novi, MONTENEGRO)

2023 25th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 25th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 55th Congress of the Italian Society of clinical biochemistry and clinical biology, Worldlab-Euromedlab 21-25 May 2023 (Rome, ITALY) (IFCC bursu)

2023 ABMBBIH CONFERENCE 2023, Sarajevo, Bosna Hercegovina (18-20 May 2023)

2022 Educational Considerations for Training-ATSB-FEBS (07 Aralık)

2022 The 26th Biomedical Science and Technology Symposium-BIOMED 2022 (25-27 November)

2022 Uluslararası Biyokimya Kongresi/33. Ulusal Biyokimya Kongresi (26-30 October) (İZMİR)

2022 Bioinfocongress III (14-16 October)

2022 Thermo Fischer Scientific “Look Again Discovery Days”(6 October)(ANKARA)

2022 IFCC-YS FORUM Complimentary event “Post-pandemic situation and Current Trends in Lab Medicine-Meeting the Future” South KOREA, Seoul- (25-26 June)

2022 1st International Symposium of Ege University Graduate School of Health Sciences (8 Haziran)

2022 Bioinfocongress II (18-20 Mart)

2022 IFCC Neurofilament Light Chain (NfL), Troponin for the Brain: Measurement and Applications in Multiple Sclerosis and other neurological conditions

2021 Joint FEBS/SPB/UMinho Symposium on Evidence Based Teaching in Your Biomolecular Classroom: Catalysing Student Engagement (Online)

2021 VIII. International Congress of Molecular Medicine (Online)

2021 International Biochemistry Congress /32th National Biochemistry Congress (Gaziantep, Türkiye)

2021 IFCC Alzheimer’s disease CSF and Blood Tests: Current Practice and Future Prospects

2021 IFCC Common Laboratory Measures of Dysglycaemia; The Strengths and Weakness

2021 Understanding the How and the Why: Biosafety in Centrifugation

2021 Quality management of medical test results during the pandemic

2021 CRISPR 2021

2021 Bioinfocongress I 24-26 September 2021

2021 Un-Conventional QC: Implementing Appropriate QC Design Strategies in Your Lab

2021 Working in Tandem - 1st Annual TMT Symposium

2021 Elsevier Turkey Webinar - Increasing Scientific Productivity with ScienceDirect

2021 1st International Microscopy & Spectroscopy Congress/25. National Electron Microscopy Congress

2021 IFCC Evidence-based Laboratory Medicine (Online)

2021 IFCC Tumor Liquid Biopsy (Online)

2021 IFCC Different Perspectives On Laboratory 4.0 (Online)

2021 IFCC Newborn Screening (Online)

2021 IFCC Quality in Clinical Laboratory (Online)

2021 IFCC Point of care testing in resource limited settings: dotting the "i's" and crossing the "t's" (Online)

2021 45th FEBS Congress Molecules of Life: Towards New Horizons (LJUBLJANA, SLOVENIA, Online)
 2021 IFCC TF-YS Webinar: Emerging Clinical Mass Spectrometry Applications (Online)
 2021 Content Registration at Crossref (Online)
 2021 Evolving Molecular Bioscience Education 27-28 May 2021 (Online)
 2021 IFCC Risk Management in Clinical Laboratories (Online)
 2020 IFCC Advancing Internal and External Quality Assurance on a Global Scale (Online)
 2020 ACS Publications Advancements in Covid-19 Testing&Diagnostics
 2019 27th BCLF 2019 / 30th TBS National Biochemistry Congress (Antalya, Türkiye)
 2019 FEBS Workshop on Molecular Life Sciences Education (Tbilisi, Georgia)
 2018 TBD International Biochemistry Congress-29th National Biochemistry Congress (Bodrum, Türkiye)
 2018 FEBS Workshop on Molecular Life Sciences Education: TRAINING TOMORROW'S SCIENTISTS (İzmir, Türkiye)

Uluslararası Kongrelerde-Çalıştaylarda-Kurslarda Görevler

Oturum Başkanlığı : XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, 35th National Biochemistry Congress 28 October-1 November 2024, Antalya, Türkiye

Kurs Eğitmen Görevi miRNA Isolation and Expression Training Programme. 27th BCLF 2019 / 30th TBS National Biochemistry Congress, 27-31 October 2019.

Local Trainee 11th Beginners' Course in Molecular Diagnostics (C-CMBC/IFCC), 4-10 September 2022, Niğde, Türkiye

Kurs Sekreteryası: 11th Beginners' Course in Molecular Diagnostics (C-CMBC /IFCC), 4-10 Eylül 2022, Niğde, Türkiye

Kurs Sekreteryası: 2nd Advanced Course in Molecular Diagnostics (C-CMBC / IFCC), , 1-3 Aralık 2022, Adana, Türkiye

Eğitmen Görevi : European Medical Students' Association-Research Twinning etkinliği- Karaciğer Dokusundan Glikojen Tayini/Karbohidratların Kalitatif ve Kantitatif Tayini/Protein Miktar Tayini deneyleri 25 January 2023.

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

Uluslararası Tercüme Bilimsel Kitapta Bölüm Yazarlığı

1. Biochemical Calculations. Irwin Segel. Çeviren R.Semsi & Aylin Sepici Dinçel Bölüm 1 (Sulu Çözeltiler ve Asit-Baz Kimyası), 1-90, İkinci baskı, Çeviri Editörü: Rabia Şemsi & Aylin Sepici Dinçel (2025)
2. Biochemical Calculations. Irwin Segel. Çeviren R.Semsi & Aylin Sepici Dinçel Bölüm 2 (Biyolojik Moleküllerin Kimyası), 1-90, İkinci baskı, Çeviri Editörü: Rabia Şemsi & Aylin Sepici Dinçel (2025)

3. Biochemical Calculations. Irwin Segel. Çeviren R.Semsi & Aylin Sepici Dinçel Bölüm 5 (Spektrofotometri ve Diğer Optik Yöntemler), 1-90, İkinci baskı, Çeviri Editörü: Rabia Şemsi & Aylin Sepici Dinçel (2025)
4. Biochemical Calculations. Irwin Segel. Çeviren R.Semsi & Aylin Sepici Dinçel Bölüm 6 (Biyokimyada İzotoplar), 1-90, İkinci baskı, Çeviri Editörü: Rabia Şemsi & Aylin Sepici Dinçel (2025)
5. Lehninger Principles of Biochemistry. David L. Nelson, Michael M.Cox, Aaron A. Hoskins. Çeviren R.Semsi & Aylin Sepici Dinçel Bölüm 3 (Amino Asitler, Peptitler ve Proteinler), 70-105 Sekizinci baskı. Çeviri Editörü: Doğan Yücel.(2024)
6. Lehninger Principles of Biochemistry. David L. Nelson, Michael M.Cox, Aaron A. Hoskins. Çeviren R.Semsi & Duygu Şahin Bölüm 4 (Proteinlerin Üç Boyutlu Yapısı), 106-146 Sekizinci baskı. Çeviri Editörü: Doğan Yücel.(2024)
7. Lehninger Principles of Biochemistry. David L. Nelson, Michael M.Cox, Aaron A. Hoskins. Çeviren R.Semsi & Gözde Aydoğdu Tığ Bölüm 6 (Enzimler), 177-228 Sekizinci baskı. Çeviri Editörü: Doğan Yücel. (2024)
8. Harpers Illustrated Biochemistry. Victor Rodwell and David Bender. Çeviren R.Semsi: & A. Sepici Dinçel, Bölüm 39 (432 - 458), Otuzbirinci baskı. Çeviri Editörü: Doğan Yücel (2019)

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Zeliha Türkan Aşık, Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. "Diverse Outcomes of Peer Learning" Poster Presentation, 49th FEBS Congress-Bridging Continents to Advance Life Science, 5-9 July 2025, İstanbul, Türkiye
2. Rabia Semsi, Aylin Sepici Dinçel. "Design and Characterization of a Biosensor for the Detection of CTX and PINP in Biological Fluids" Poster Presentation, 49th FEBS Congress-Bridging Continents to Advance Life Science, 5-9 July 2025, İstanbul, Türkiye
3. Demet Abdullahoglu, Rabia Semsi, Aysel Çağlan Günal, Aylin Sepici Dinçel. Oxidative Stress Responses in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Perfluorooctane Sulfonate (PFOS): May TOS and TAS be a Rapid Biomarker?" Poster Presentation, 49th FEBS Congress-Bridging Continents to Advance Life Science, 5-9 July 2025, İstanbul, Türkiye
4. Rabia Semsi, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dincel. "A Biochemical Biosensor Designed To Track Bone Status Indices From Body Fluids", Poster Presentation. Euromedlab 2025, Brussels, Belgium, 18-22 May 2025.
5. Rabia Semsi. V.Ercan Dincel, Aylin Sepici Dincel. "Development of an Immunosensor for the Detection of Wnt Signaling Pathway Inhibitor Sclerostin in Saliva and Serum", Poster Presentation, Euromedlab 2025, Brussels, Belgium, 18-22 May 2025.

6. Rabia Semsî, Uğur Sözlü, Selda Başar, Aylin Sepici Dinçel “Impact Of Neurodynamic Mobilization Techniques On Muscle Damage And Brain- Derived Neurotrophic Factor Levels In Delayed Onset Muscle Soreness”, Poster Presentation. XXXI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, 35th National Biochemistry Congress 28 October-1 November 2024, Antalya, Türkiye.
7. Zeliha Türkan Asik, Rabia Semsî, Aylin Sepici Dinçel. Disrupted circadian rhythm results in diabetes in the offspring of rats. Poster Presentation. 48th FEBS CONGRESS Mining biochemistry for human health and well-being. Milano, Italy, 29 June-3 July 2024.
8. Rabia Semsî, Erdal Ergünol, Duygu Dayanir, Altay Uludamar, Ayhan Özkul, Aylin Sepici Dincel. “Evaluation of Osseointegration in Alveolar Bone Defects: A Preclinical Modelling”, Poster Presentation 48th FEBS CONGRESS Mining biochemistry for human health and well-being, Milano, Italy, 29 June - 3 July 2024.
9. Rabia Semsî, Aylin Sepici Dincel. “Developing Education and Training in Undergraduate Level Biochemistry Laboratories in Türkiye and Northern Cyprus” Poster Presentation 48th FEBS CONGRESS Mining biochemistry for human health and well-being, Milano, Italy, 29 June - 3 July 2024.
10. Rabia Şemsî, Aylin Sepici Dinçel. “Laboratuvar Güvenliği, Tehlikeli Maddelerin İmhası, Msds (Malzeme Güvenlik Bilgi Formu)”. Invited Speaker. ,”2nd International Azerbaijan Laboratory Medicine Congress &Lab Expo (AZLTK &LAB EXPO 2024) and ANKEM (Rational Antibiotic Use) Symposium. Baku-Azerbaijan 2-4 May 2024.
11. Rabia Semsî, Erdal Ergünol, Remzi Orkun Akgün, Okan Ekim, Altay Uludamar, Ayhan Özkul, Aylin Sepici Dincel “Wnt Signaling Inhibitors for Increasing Osseointegration”, Oral Presentation International Biochemistry Congress/34. National Biochemistry Congress, Fethiye/Muğla Türkiye 29 Ekim-1 Kasım 2023.
12. Gülsüm Koçak, Burcu Eser, Rabia Şemsî, Göktuğ Gül, Pınar Arslan, Aysel Çağlan Günal, Aylin Sepici Dinçel. “Omurgalı Model Organizma, Zebra Balıklarında Asetamipridin Oksidatif DNA Hasarı” Oral Presentation International Biochemistry Congress/34. National Biochemistry Congress, Fethiye/Muğla Türkiye 29 Ekim-1 Kasım 2023.
13. Rabia Semsî, Aylin Sepici Dincel. “Awareness of Medical Students About Green Chemistry, Green Labs and Sustainability”, Poster Presentation BCLF Congress, Herceg Novi/Montenegro, 27-30 September 2023.
14. Rabia Semsî, V.Ercan Dincel, Aylin Sepici Dincel "Wnt-Signal Inhibitors as Biomarkers in Osteoporotic Hip Fractures", Poster Presentation WorldLab-EuroMedLab Roma 2023 Congress (21-25 May 2023).

15. Erdal Ergunol, Rabia Semsî, Duygu Dayanır, Okan Ekim, Altay Uludamar, Ayhan Ozkul, Aylin Sepici Dincel. “ The Local Use of Sclerostin and Dickkopf-1 As A Therapeutic Composition To Increase Osseointegration at Alveolar Bone Grafting , Poster Presentation WorldLab-EuroMedLab Roma 2023 Congress (21-25 May 2023).
16. Rabia Semsî, Burak Hazır, Nurgül Birger, Arzu Or Koca, Asiye Uğraş Dikmen, Ayşe İriz, Aylin Sepici Dinçel, İlhan Yetkin. “Relationship of Orexigenic and Anorexigenic Hormones with Body fat Distribution in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome” , Oral Presentation International Biochemistry Congress/33 National Biochemistry Congress, Çeşme/İlca, Turkey, 26-30 October 2022.
17. Rabia Semsî. “Flipped Learning” Approach in Medical Biochemistry Laboratory: Medical Students’ Achievement and Attitudes, Invited Speaker, International Biochemistry Congress /32th National Biochemistry Congress, Gaziantep, Turkey, 27-30 October 2021.
18. Rabia Semsî, Aylin Sepici Dincel. Molecular Laboratory Techniques Used in Research and Medical Practice: Applied Training Course Pre-test/Post-test Evaluation Results, Poster Presentation, XXVIII. Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting and XIII. National Conference of Clinical Laboratory, Sofia, Bulgaria, 8-11 September 2021.
19. Rabia Semsî, Meryem Selvi, Aysel Çağlan Günel, Aylin Sepici Dinçel. The Effect of Portfolios on Medical Students’ Academic Achievement and Attitudes toward Endocrine Disruptors Course, Poster Presentation, 45th FEBS Congress Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, 3-8 July 2021.
20. Rabia Semsî, Umut Kökbas, Aylin Sepici Dinçel, Erdal Ergünol and event. Kayrın, Evaluation of Saliva Kallikrein-8 Levels Related with Stress, Oral Presentation, 27th Bclf 2019 / 30th Tbs National Biochemistry Congress, Antalya, Turkey, 27-31 October 2019.
21. Emre Kanad Er, Rabia Semsî, Erdal Ergünol and Aylin Sepici Dinçel. Evaluation of Environmental Conditions in Dental Practice with Inflammatory Biomarkers in Saliva Samples, Oral Presentation, 25rd International Dental Congress of TDA 4-7 September 2019.
22. Erdal Ergünol, Rabia Semsî, Emre Kanad Er and Aylin Sepici Dinçel, The Evaluation of Saliva Electrolyte and Antioxidant Status in Different Age Groups According to Health Status, Oral Presentation, 25rd International Dental Congress of TDA, 4-7 September 2019.
23. Rabia Semsî, Umut Kökbas, Burak Arslan, Aylin Sepici Dinçel, Erdal Ergünol and Levent Kayrın, Comparison of Chemiluminescence Immunoassay and Biosensor Methods for Measurement of Saliva Glucose Levels in Adults, Poster Presentation, 44th FEBS Congress: From molecules to living systems?, Poland 06-11 July 2019.

24. Aslıhan Coban, Rabia Semsî, Burak Arslan, Erdal Ergunol, Aylin Dincel. Absolute quantification of cell free, circulating DNA from plasma, urine and saliva, Poster Presentation, 44th FEBS Congress: From molecules to living systems? Poland, 06-11 July 2019.
25. Erdal Ergünol, Rabia Şemsî, Aylin Sepici Dinçel Implications For "History of Dentistry and Ethics" In Life Sciences "International Scientific Congress and Exhibition", İZMİR, 9-11 November 2018.
26. Rabia Şemsî, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel The View Of The Students About Biochemistry Course From Middle East Countries "TBD International Biochemistry Congress-29th National Biochemistry Congress", BODRUM, Oral Presentation, BODRUM, 26-30 October 2018 .
27. Ayşe İriz , Rabia Şemsî, Burak Arslan , Burcu Eser, Aylin Sepici Dinçel. The Association of Tryptophan-Kynurenine Level and Disease Activity of Mild and Medium/Severe Osas "TBD International Biochemistry Congress-29th National Biochemistry Congress" Poster Presentation, BODRUM, 26-30 October 2018.
28. Aysel Çağlan Günel , Rabia Tural , Rabia Şemsî Özkısa, Nagehan İpiçürük, Aylin Sepici Dinçel Effects of Zinc and Copper Pyrithione on Vitellogenin Levels of Zebrafish (Danio Rerio) "TBD International Biochemistry Congress-29th National Biochemistry Congress", Poster Presentation, BODRUM, 26-30 October 2018.
29. Erdal Ergünol, Rabia Şemsî, Aylin Sepici Dinçel. There is Value in Taking The Time To Teach Dental History And Ethics in Dentistry Curriculum "FEBS Workshop on Molecular Life Sciences: Training Tomorrow's Scientists", İZMİR, Poster Presentation, Award of Poster , 5-7 September 2018.
30. Rabia Şemsî, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel, Academic Performance Of International Students in Dental Biochemistry Course "FEBS Workshop on Molecular Life Sciences: Training Tomorrow's Scientists", Poster Presentation, İZMİR, 5-7 September 2018.
31. Rabia Semsî Ozkisa, Rabia Tural, Aysel Caglan Gunal ,Aylin Sepici Dincel The evaluation of endocrine disruptor effects of environmental pollutant zinc and copper pyrithione via apoptosis pathways by histopathological and biochemical analyses. Special Issue: 43rd FEBS Congress, FEBS Open Bio 8 (Suppl.S1), page 220, Czech Republic, July 2018.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Özer Tuç, Rabia Şemsî, Huriye Bilge Tuncer, Nuran Süngü , Sevdener Özduzgün Polat, Elvin Kesimci , Aylin Sepici Dinçel , Ezgi Erkiliç. "Deneyisel Modellemede Crush Hasarlanma ve Renal Fonksiyonların Değerlendirilmesi", Poster Sunumu, IX. Türkiye in vitro diyagnostik sempozyumu, "Preklinik ve Klinik Modellemeler II-Kanser Araştırmaları", İzmir 9-11 Nisan 2025

2. Rabia Şemsi, Burcu Eser, Gülsüm Koçak, Göktuğ Gül, Pınar Arslan, Aysel Çağlan Günal, Aylin Sepici Dinçel. Oxidative DNA Damage of Lambda-Cyhalothrin in Model Organism. VIII. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu, Poster Sunumu “Preklinik Modellemeler” İzmir, 29 Kasım/01 Aralık 2023
3. Arzu Or Koca, Ayşe İriz, Aylin Sepici Dinçel, Burak Hazır, Rabia Şemsi, Nurgül Bilger, Asiye Uğraş Dikmen, İlhan Yetkin. Obstrüktif Uyku Apne Sendrom’lu olgularda vücut yağ dağılımı ile oreksijenik ve anoreksijenik hormon ilişkileri. Sözlü Sunum. 43. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi, Antalya, 18-22 Mayıs 2022
4. Rabia Şemsi, Uğur Sözlü, Selda Başar, Aylin Sepici Dinçel. “Gecikmiş Kas Ağrısında Nörodinamik Mobilizasyon Tekniğinin İnflamasyon Biyobelirteçleri İle Ağrı, Basınç Ağrı Eşiği, Normal Eklem Hareketi, Kas Kuvveti ve Fonksiyonel Durum Üzerine Etkisinin Araştırılması.” Poster Sunumu, VII. Türkiye in vitro diyagnostik Sempozyumu. “İnflamasyon”, İzmir, 27-29 Nisan 2022.
5. Rabia Şemsi, Emre Kanad Er, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel “Akademik Sınav Stresi: Tükürük kortizolü, Nöropeptit Y ve İnterlökin-1β Üzerindeki Etkileri”, Sözlü Sunum, 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, 18-20 Aralık 2020.
6. Rabia Şemsi, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel, “Tıp, Tıp Dışı Yaşam Bilimleri ve Farklı Akademik Birimlerin Biyoetik Konularına İlişkin Tutum ve Görüşlerinin Değerlendirilmesi”, Poster Sunumu, V. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu, “Sağlık Biyoteknolojisi”, İZMİR, 19-21 Şubat 2020
7. Umut Kökbaş, Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dincel, Erdal Ergünol, Abdullah Tuli, Levent Kayrın “DNA-Chip for Determination of Point Mutations”, Sözlü Sunum, IV.Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu“Biyosensörler”, İZMİR, Sözlü Sunum Birincilik Ödülü 20 Şubat-22 Şubat 2019
8. Rabia Şemsi, Umut Kökbaş, Burak Arslan, Aylin Sepici Dinçel, Erdal Ergünol, Levent Kayrın “Evaluation Of Salivary Cortisol Levels Before And After Examinations In Young Adults Individuals By Different Biochemical Analysis Methods”, Poster Sunumu, IV.Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu, “Biyosensörler”, İZMİR, 20 Şubat-22 Şubat 2019
9. Umut Kökbaş, Rabia Şemsi, Burak Arslan, Aylin Sepici Dinçel, Erdal Ergünol, Levent Kayrın “Evaluation Of Saliva Uric Acid Levels In Young Adult Individuals By Biosensor Method”, Poster Sunumu, IV.Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu,“Biyosensörler”, İZMİR, 20 Şubat-22 Şubat 2019
10. Ayşe İriz, Rabia Şemsi Özkısa, Rabia Tural , Aylin Sepici Dinçel. “Biomarkers Related with Galectin-1 In Moderate And Medium/Severe Levels Of Obstructive Sleep Apne Syndrome”, Poster Sunumu, III. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu, “Endokrin ve Metabolik Hastalıklar, Tanıdan Tedaviye Biyobelirteçler”, İZMİR, 28 Şubat- 02 Mart 2018

11. Ercan Dinçel, Rabia Şemsi Özkısa, Funda Kosova, Aylin Sepici Dinçel.”Evaluation Of N-Telopeptide Levels in Romatoid Arthritis”, Poster Sunumu, III. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu, “Endokrin ve Metabolik Hastalıklar, Tanıdan Tedaviye Biyobelirteçler”, İZMİR, 28 Şubat- 02 Mart 2018.

Yazılan Ulusal/Uluslararası Kitaplar veya Kitaplardaki Bölümler

1. Uğur Sözlü, Selda Başar, Rabia Şemsi, Esedullah Akaras, Aylin Sepici Dinçel. International Studies and Evalations in the Field of Health Sciences. Chapter 10:Effectiveness of Neurodynamic Mobilization Technique on Delayed Onset Muscle Soreness- Associated Muscle Damage and Inflammatory Biomarkers. Editors: Prof. Dr. Engin Şahna, Prof. Dr. Hasan Akgül, Prof. Dr. Zeliha Selamoğlu. İngilizce (Bilimsel Kitap).
2. Rabia Şemsi, Erdal Ergünol, Aylin Sepici Dinçel. Diş Hekimliği Öğrencileri için Tıbbi Biyokimya. Tükürük Biyokimyası (2022). Nobel Tıp Kitabevleri. Editör: Doç. Dr. Mustafa Nisari and Dr. Öğretim Üyesi Umut Kökbaş. Türkçe (Bilimsel Kitap).
3. Rabia Şemsi, Aylin Sepici Dinçel. Diş Hekimliği Öğrencileri için Tıbbi Biyokimya. Bölüm : Metabolik Entegrasyon (2022). Nobel Tıp Kitabevleri. Editör: Doç. Dr. Mustafa Nisari and Dr. Öğretim Üyesi Umut Kökbaş. Türkçe (Bilimsel Kitap).
4. Rabia Şemsi, Ayşe İriz, Aylin Sepici Dinçel. Biophotonics, Tryptophan and Disease Book. Chapter 11:Tryptophan and kynurenine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome (2021). Elsevier Academic Press. Editor(s): Sordillo, P, Sordillo L. İngilizce (Bilimsel Kitap).

Projeler

1. Sepici Dinçel A. (Yürütücü), Şemsi R., Ergünol E. Vücut Sıvılarında Kemik Yapım-Yıkım Biyobelirteç Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2024-devam ediyor).
2. Sepici Dinçel A. (Yürütücü), Ergünol E., Şemsi R, Eser B. Diş Çekim Soketinde Kemik İyileşmesi ve Farklı Kimyasal Kaplama ile Hazırlanan Dental İmplant Uygulama Sonrası Osseointegrasyonun Domuzlarda Değerlendirilmesi. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2024- devam ediyor).
3. Sepici Dinçel A. (Yürütücü), Ergünol E., Şemsi R., Uludamar A. Diş Çekim Soketinde Kemik İyileşmesi ve Farklı Kimyasal Kaplama ile Hazırlanan Dental İmplant Uygulama Sonrası Osseointegrasyonun Domuzlarda Değerlendirilmesi. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2023-2024).
4. Sepici Dinçel A. (Yürütücü), Dayanır D., Ergünol E., Akgün R. Şemsi R., O., Ekim O., Uludamar A., ve diğerleri. Kemik Graftleri ile Osseointegrasyonun Artırılması için Terapötik Kompozisyonun Lokal Kullanımı Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2021-2024).

5. Sepici Dinçel A. (Yürütücü), Şemsi R., Ergünoğlu E., Çoban A. Circulating Cell Free Nükleik Asitlerin Plazma, İdrar ve Tükürükteki Mutlak Miktarlarının Bulunması Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2020-2023).
6. Başar S. (Yürütücü), Sözlü U., Şemsi R., Sepici Dinçel A., Akaras E. Gecikmiş Kas Ağrısında Nörodinamik Mobilizasyon Tekniğinin Kas Hasarı ve İnflamasyon Biyobelirteçleri ile Ağrı, Basınç Ağrı Eşiği, Normal Eklem Hareketi, Kas Kuvveti ve Fonksiyonel Durum Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2020-2021).
7. Sepici Dinçel A. (Yürütücü), Ergünoğlu E., Şemsi R. Genç Erişkin Bireylerde Sınav Öncesi ve Sonrası, Erişkin Bireylerde Diş Hekimliği Uygulamaları Öncesi ve Sonrası Tükürük ve Serumda Amilaz, Kortizol, Nitrik Oksit, Endotelin-1 Düzeylerinin Farklı Biyokimyasal Analiz Yöntemleri ile Değerlendirilmesi. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje (2019-2019).

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

1. Türk Biyokimya Derneği, Üye, 2018
2. EFLM Academy, Üye, 2023

Bilimsel Araştırma/Çalışma Grubu Üyelikleri

Sd Lab, Sepici-Dinçel Research Lab. <https://avesis.gazi.edu.tr/arastirma-grubu/sdlab>
Gazi Üniversitesi, Türkiye

Diğer

MEDICA- 11-14 NOVEMBER 2024, DUSSELDORF, GERMANY

YENİ FİKİRLER YENİ İŞLER- BOOTCAMP DAY-19-20 OCTOBER 2024,
ODTÜTEKNOKENT, ANKARA

YENİ FİKİRLER YENİ İŞLER -DEMO DAY- 4 ARALIK 2024, ODTÜ KKM,
ANKARA-BİTES ÖZEL ÖDÜLÜ

TAKE OFF FUAR, İSTANBUL FUAR ALANI, 11-12 Aralık 2024, İSTANBUL

Sosyal Sorumluluk

Yasemin Karakaya Bilim ve Sanat Merkezi Tübitak Bilim Söyleşileri, “Sağlıklı Yaşam ve Beslenme için Sağlıklı Çevre”-26 Nisan 2022

Editörlük

Journal of Future Biochemistry and Bioscience- Alan Editörü

Hobiler

Tenis ve voleybol oynamak ve izlemek, Futbol maçı izlemek, Kültürel seyahatler, Kitap okumak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..