

Kanser Biyobelirteçlerinin Tespiti İçin Tek Kullanımlık Biyosensörler

Disposable Biosensors for the Analysis of Cancer Biomarkers

 Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK^a

^aÇanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü,
Çanakkale, Türkiye

Yazışma Adresi/Correspondence:
Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü,
Çanakkale, Türkiye
msezginturk@comu.edu.tr

ÖZET Biyosensör, elektronik bir iletici ile biyokimyasal bir komponentin entegrasyonu sonucu oluşturulmuş, birçok farklı teknolojik alanda seçimli ve hassas analizler yapılmasına imkan veren analitik bir ayardır. Biyosensörler, klinik, gıda, çevre ve biyogüvenlik gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Multidisipliner bir alan olması sebebiyle birçok bilim dalının katkısı, biyosensörlerin hızla gelişmesini ve günlük yaşamımızda da sıklıkla kullanılmalarını mümkün hale getirmiştir. Bir biyosensörün genel çalışma prensibi; bioaktif tabakada moleküler tanıma sonucu meydana gelen fiziksel ya da kimyasal sinyalin bir dönüştürücü tarafından elektriksel sinyale dönüştürülmesini içermektedir. Biyosensörlerde kullanılan dönüştürücüler genellikle elektrokimyasal, optik ve kütle esaslı sistemlerdir. Tek kullanımlık biyosensör sistemleri maliyet, hassasiyet, sahada kullanım imkânı, seri üretime uygunluk gibi birçok üstünlüklerinden dolayı her geçen gün artan bir şekilde tercih edilmektedirler. Nanoteknolojinin gelişmesi tek kullanımlık biyosensör sistemlerinin analitik performanslarının artırılmasına çok önemli katkı sunmaktadır. Bu çalışmada öncelikle farklı teknolojilere sahip tek kullanımlık biyosensör sistemleri genel olarak tanıtılarak sunulmuştur. Bu kapsamda sunulan ve tartışılan sistemler, elektrokimyasal ve kanser biyobelirteçlerinin analizi için geliştirilmiş tek kullanımlık biyosensörleri içermektedir. Özellikle karbon pasta, kalem grafit, perde baskı, kağıt temelli, çip temelli ve indiyum-kalay oksit (ITO) temelli elektrotların kullanımıyla hazırlanan tek kullanımlık elektrokimyasal biyosensörler ve bunların kanser biyobelirteçlerinin tayininde kullanım potansiyelleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör; kanser biyobelirteçleri; tek kullanımlık elektrotlar; lateral flow assays; ITO

ABSTRACT Biosensor is an analytical device in which it incorporates an electronically transducer and a biochemical component and is used to make possible analysis selectively and specifically. Biosensors are utilized in many fields such as clinical, food, environmental, and biosafety. Because of it is a multidisciplinary field, contribution of many different scientific branches enables biosensors to improve rapidly and use in routinely our daily lives. General working principle of a biosensor comprises conversion of a physical or chemical signal occurred in a biochemically active layer by molecular recognition into an electrical signal via an electronically transducer. Transducers used for biosensors are generally electrochemical, optical, and mass-based systems. Due to the some superiorities such as low costs, selectivity, possibility of use in the field, and suitability for mass production, disposable biosensors systems are preferred increasing day by day. Nanotechnological developments make very important contributions into the enhancement of analytical performances of the disposable biosensor systems. In this work disposable biosensors which have different technologies are basically introduced. In this context, presented and discussed systems cover electrochemical and disposable biosensors developed for the analysis of cancer biomarkers. Especially disposable, electrochemical biosensors fabricated by incorporating carbon paste, pencil graphite, screen printed, chip and indium tin oxide.

Keywords: Biosensor; cancer biomarkers; disposable electrodes; lateral flow assays; ITO

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:

Sezgintürk MK. Kanser biyobelirteçlerinin tespiti için tek kullanımlık biyosensörler. Koçdor H, Pabuçuoğlu A, Zihnioglu F, Sağın F, editörler. Sağlık Biyoteknolojisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2022. p.85-102.

Biyosensör hikayesi, Amerikalı biyokimyacı Prof.Dr.Leland C.Clark Jr.'ın kandaki oksijeni ölçmek için geliştirdiği ve daha sonra "Clark elektrodu" olarak adlandırılacak olan keşfi ile başladı. Hemen ardından Clark elektrodu kan şekerinin hızlı bir şekilde ölçülmesinde kullanılmaya başlandı. Bugün milyonlarca diyabet hasta-

sının kullandığı modern glukoz analizörlerinin çalışma prensibi de Clark'ın geliştirdiği bu konseptte dayanmaktadır.

Biyosensörler önemli avantajlarından dolayı birçok alanda oldukça başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Özellikle diğer yöntemlere kıyasla çok daha ucuz, farklı analitlere uyarlanabilme ve yüksek seçicilik gibi nitelikleri sebebiyle son yıllarda her alanda kullanılmaktadırlar. Minyatürizasyona entegrasyon konusunda oldukça uygun olmaları da biyosensörleri özellikle sahada ve hasta bakımında ölçümler için vazgeçilmez cihazlar haline getirmiştir. Yaşam kalitesinin iyileştirilmesi için sağlık, gıda, çevre ve diğer alanlarda gerekli olabilecek her türlü kimyasalın basitçe analizinin yapılabilmesine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Biyosensörler bu ihtiyacı karşılayabilecek potansiyele sahip en güçlü adaylardır. Farklı kanser biyobelirteçlerinin analizine yönelik olarak camımsı karbon, altın, platin vb. tek kullanımlık olmayan elektrotların kullanıldığı elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiş ve rapor edilmiştir.¹⁻⁵ Ancak bu elektrotların kullanıldığı biyosensör sistemlerinin önemli dezavantajları bulunmaktadır. Her ölçümden sonra rejenerasyon zorunluluğunun olması ve bunun da elektrot yüzeyini deforme etmesi, yüzey temizliğinin çoğunlukla problem olması, zayıf tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik, dar doğrusal tayin aralığı, rutinde ve sahada kullanıma uygun olmaması gibi dezavantajlar bunlardan sadece birkaç tanesidir.⁶⁻⁸

Tek kullanımlık olmayan elektrotların yukarıda belirtilen dezavantajları araştırmacıları yeni elektrot materyalleri araştırmaya ve geliştirmeye sevk etmiştir. Özellikle tüm dünyada sağlık hizmetlerinin maliyetlerinin artması, birçok farklı alanın ortaklaşa geliştirebilecekleri yeni teknolojilere olan ihtiyacı her geçen gün arttırmaktadır. Yeni nesil biyosensörler, mikroakışkan çipler gibi entegre platformlar ile kompleks örneklerde ucuz, hassas, erken teşhise imkan tanıyacak ve ayrıca kullanıcı dostu ölçüm sistemleri olmak zorundadır. Sağlık hizmetlerinin kişiye özel tedaviye doğru evrildiği bir çağda ancak bu tür sistemlerle başarılı olunabileceği açıktır. Biyosensör araştırmalarına bu bağlamda en önemli katkı tek kullanımlık elektrotların kullanıldığı sistemler ile yapılabilecektir. Bu tür elektrotların fabrikasyonu kolay olduğu gibi maliyetleri de oldukça düşüktür. Bunun yanı sıra rutin analizler için en uygun elektrot türlerini oluşturmaktadırlar. Karbon nanotüp, metal nanopartikül veya grafen gibi nanopartiküllerin kullanımıyla bu tür elektrotların elektron transfer yetenekleri iyileştirilerek hassasiyetleri ve analitik özellikleri daha da artırılabilir. Tek kullanımlık elektrot temelli biyosensörler ile çok sayıda farklı kanser biyobe-

lirtecinin analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir.⁹⁻²⁶ Bu bölümde karbon pasta, kalem grafit, perde baskı, kağıt temelli, çip temelli ve indiyum-kalay oksit (ITO) temelli elektrotların kullanılarak hazırlanan tek kullanımlık elektrokimyasal biyosensörler ve bunların kanser biyobelirteçlerinin tayininde kullanım potansiyelleri tartışılmıştır.

TEK KULLANIMLIK ELEKTROT MATERYALLERİ VE UYGULAMA ALANLARI

Elektrokimyasal transduserlerin optik, kuartz kristal mikrobilans yada piezoelektrik gibi diğer transduserler arasında rutin analizler ve minyatürizasyon için en uygun iletici sistemler olduğu iyi bilinmektedir. Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde uzun yıllardır kullanılagelen geleneksel katı elektrotların birçok dezavantajından dolayı ticarileştirilebilme ve rutinde kullanılabilme potansiyelleri çok düşüktür. Özellikle tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, yüzey temizliğinin/rejenerasyonun çok zor olması, dar kalibrasyon aralığı gibi dezavantajlar bunlardan sadece birkaçıdır. Bu yüzden elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi için tek kullanımlık çalışma elektrotlarının kullanımı çok daha yaygın hale gelmiştir. Özellikle bu elektrotlarla nanopartiküllerin entegrasyonu, elektrokimyasal anlamda çok daha etkili ve hassas biyosensör sistemlerinin geliştirilebilmesine imkân tanımaktadır. Daha da önemlisi minyatürizasyon ve ticarileştirme potansiyellerinin mümkün ve yüksek olması tek kullanımlık elektrotları çok daha popüler hale getirmiştir. Bu bölümde, sırasıyla karbon pasta, kalem grafit, perde baskı, kağıt temelli, çip temelli ve indiyum-kalay oksit (ITO) temelli elektrotların temel özelliklerinden bahsedilerek örnekler üzerinde tartışılacaktır. Örnekler özellikle kanser biyobelirteçleri üzerinde yoğunlaşarak verilecektir.

KARBON PASTA ELEKTROTLAR VE UYGULAMALARI

Karbon pasta elektrotlar, 1958 yılında Kansas Üniversitesinden Ralph Norman Adams'ın sadece kısa bir sayfalık rapor ile keşfinden bu yana en çok kullanılan elektrot materyallerinden biri haline gelmiştir.²⁷ Karbon pastası, iletken grafit tozu ve bir bağlayıcı organik yağın karışımıdır ve birçok sensör ve biyosensör uygulamasından çalışma elektrodu olarak kullanılmış oldukça popüler bir tek kullanımlık materyaldir. Bu denli popüler olmasından dolayı karbon pastasının fizikokimyasal ve elektrokimyasal özellikleri birçok teorik ve deneysel elektrokimyacı tarafından incelenmiş ve rapor edilmiştir. Toz haline getirilmiş karbon (grafit) karbon pastasının temel bileşeni olup, elektrokim-

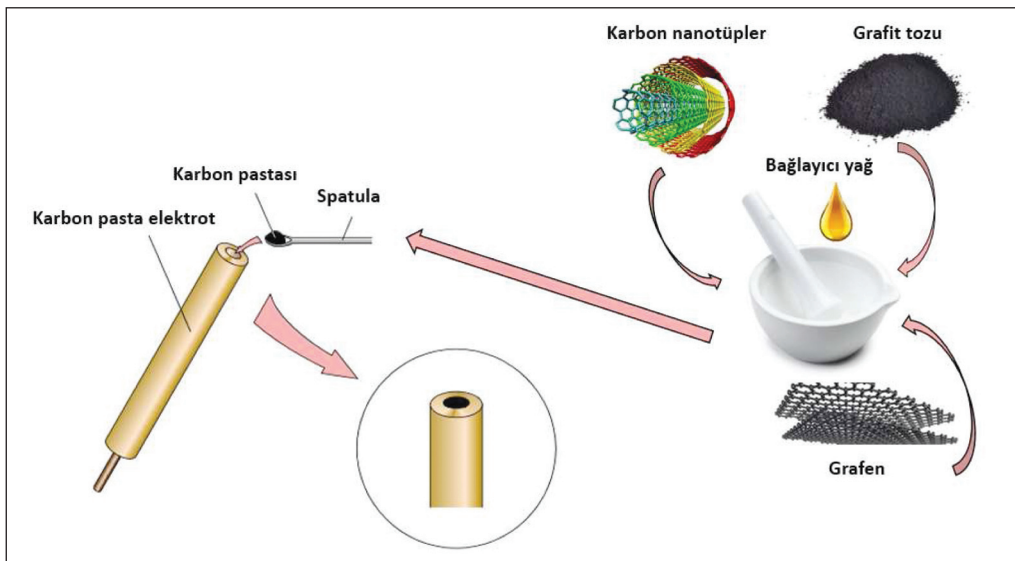
yasal bir ölçümde elektrot ya da sensör fonksiyonunu sağlamaktadır. Elektrokimyasal bir biyosensör ya da sensör sisteminde grafitten beklenen bazı özellikler şöyle sıralanabilir; mikrometre boyutunda partikül boyutu, partiküllerin düzenli dağılımı, yüksek kimyasal saflık düzeyi ve düşük adsorbsiyon özelliği.²⁸ Karbon pasta elektrotların keşfinden bugüne kadar yapılan ve rapor edilen çalışmalarda (bugüne kadar yapılan çalışmaların tahmini %80-90'ı) kullanılan karbon tozu, mikrometre boyutunda partiküle sahip (genellikle 5-20 µm) spektroskopik grafit olmuştur.^{29,30} Bunun yanı sıra kömür, asetilen siyahı, küresel partiküllü camsı karbon tozları gibi geleneksel malzemeler ve son yıllarda çok popüler olan fullerenler, karbon nanofiberler ve nanotüpler de karbon pasta temelli elektrotların yapımında kullanılmaktadırlar.³¹⁻³⁶ Geleneksel karbon pastaları, her bir grafit partikülünün mekanik olarak birbirine bağlanması amacıyla organik yağları içerirler. Bu organik bileşene genellikle "bağlayıcı" adı verilmektedir. Bağlayıcının bu temel görevi yanı sıra, karbon pastasının ikinci önemli bileşeni olarak bazı özelliklerini de belirlemektedir (Şekil 1). Organik bağlayıcıdan beklenen bazı kriterler; kimyasal olarak inertlik, elektroinaktiflik, yüksek viskozite ve düşük uçuculuk, sulu çözeltilerde minimum çözünürlük ve organik çözücülerle karışmazlık, olarak verilebilir.²⁸ Karbon pastaların hazırlanmasında kullanılan en popüler bağlayıcı ajanlar mineral (parafin) yağlar; Nujol ve Uvasol'dür. Karbon pasta temelli sistemler ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmaların en az %70'inde bu yağların kullanıldığı rapor edilmiştir. Bunların yanı sıra alifatik, aromatik hidrokarbonlar ve bunların halojenlenmiş türev-

leri, silikon yağları ve gresler de benzer amaçlarla kullanılmıştır.^{27,30,37,38} Genel olarak karbon pasta elektrotlar hem çok ucuz olmalarından hem de farklı karışımların kullanılmasıyla istenilen özelliklerde elektrotların hazırlanmasına imkân verdiklerinden dolayı çok popüler olmuşlardır. Bu sayede hazırlanan elektrotlar birçok organik ve inorganik molekülün tespitinde sensör olarak kullanılmışlardır. Ancak karbon pasta temelli elektrotların pratik analizlerde kullanımlarını sınırlayan önemli bir dezavantajları vardır; bu elektrotların başarısı büyük oranda kullanıcının deneyimine bağlıdır.

Aslında bu durum diğer birçok katı elektrot için de geçerlidir ancak karbon pasta elektrotlar için çok daha belirleyicidir. Her bir karbon pasta elektrotunun fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal özellikleri, bir hazırlamadan diğerine değişebilmektedir. Bu yüzden her elektrot kendi içinde kalibre edilmelidir.^{39,40} Bu zorunluluk araştırma çalışmalarında, belki maliyeti düşük olduğu için, kabul edilebilir ancak rutin analizlerde ve ticarileştirilme anlamında son derece önemli bir engeldir. Bu sebeple karbon pasta elektrotların son yıllarda kullanımı oldukça azalmış olmakla birlikte sadece bazı voltametrik uygulamalarda araştırma amaçlı kullanılmaktadırlar.

Karbon Pasta Elektrotların Kanser Biyobelirteçlerinin Tespitinde Kullanımları

Bir kanser biyobelirtecinin klinik analizi kanserin erken teşhis edilmesine olanak sağlamakta ve böylelikle tedavi-deki başarı oranı da artmaktadır. Prostat Spesifik antijen



ŞEKİL 1: Karbon pasta elektrotların hazırlanmasına ilişkin genel şema.

(PSA) prostat ve meme kanserleri için en iyi valide edilmiş serum biyobelirteçidir.⁴¹ PSA'nın analizi için geliştirilen karbon pasta elektrot temelli bir biyosensör sisteminde; elektrot politiyonin ile kaplanmış ve anti-PSA, politiyoninin amino uçlarından glutaraldehit yardımıyla çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir.⁴² PSA/Anti-PSA reaksiyonu, peroksidaz (HRP) ile işaretli poliklonal antikorlar vasıtasıyla, hidrojen peroksidin enzimatik katalitik indirgenme akımının ölçülmesiyle takip edilmiştir. Geliştirilen bu biyosensör ile 3-15 ng/mL ve 15-100 ng/mL aralıklarında, iki lineer kalibrasyon grafiğinin elde edildiği ve tayin limitinin ise 0,093 ng/mL olduğu rapor edilmiştir. Biyosensör ile gerçek insan serum örneklerinde PSA analizleri de gerçekleştirilmiş ve geri kazanımın %103 civarında olduğu belirtilmiştir. Ancak bu sistemde referans bir yöntemle validasyon yapılmamıştır.

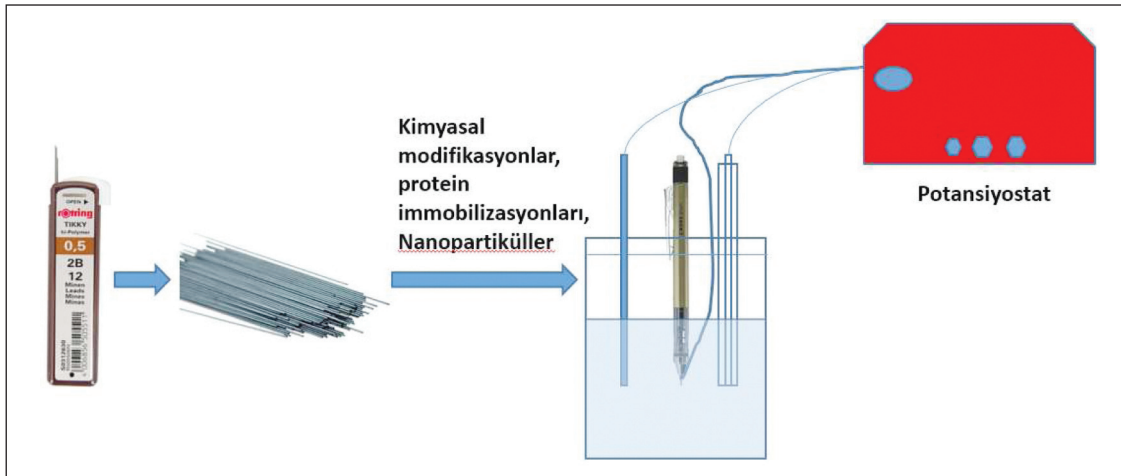
Meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser türlerinden bir tanesidir. Kanser antijen 15-3 (CA15-3) en önemli meme kanseri biyobelirteçlerinden biri olup insan serumundaki normal değeri 25 U/mL'nin altındadır. Meme kanseri hastalarının %30-50'sinde CA15-3 konsantrasyonunda önemli artışlar tespit edilmektedir. Bununla birlikte CA15-3 konsantrasyonunun 100 U/mL'nin üzerine çıktığı hastalar da rapor edilmiştir.^{43,44} CA15-3'ün tayini için, karbon nanotüplerle modifiye edilmiş ve poli-glutamik asit ile yüzeyi kaplanmış karbon pasta elektrot temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada karbon pasta temelli elektrot, 2:5:13 oranında, sırasıyla karbon nanotüp, parafin yağı ve karbon tozunun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.⁴⁵ Yüzeyin glutamik asit polimeri ile kaplanmasının ardından anti-CA15-3, EDC/NHS yardımıyla yüzeye immobilize edilmiştir. Geliştirilen bu biyosensörle impedans

temelli ölçümler yapılarak 0,025 U/mL LOD değeri elde edildiği rapor edilmiştir.

Kolon kanserinin diyagnozunda ve tedavi sonrasında izlenmesinde, klinisyenler tarafından önem verilen ve izlenmesi önerilen üç biyobelirteç, P53 (protein suppressor gene), KRAS (V-Ki-ras-2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) ve CEA (carcinoembryonic antigen) için karbon pasta temelli başka bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir.^{46,47} Bu üç panel biyobelirtecin eş zamanlı tayinini hedefleyen biyosensör sisteminde, platin/titanyum dioksit ile modifiye edilmiş grafen (TiO₂Pt/rGO) belirli miktarda parafin yağı ile karıştırılmış ve pasta haline getirilerek, grafen pasta temelli elektrot oluşturulmuştur.⁴⁸ Bu sensörle üç farklı biyobelirtecin kronoamperometrik olarak ölçülebildiği ve gerçek insan serum örneklerinde ilgili belirteçlerin tayin edilebildiği rapor edilmiştir.

KALEM GRAFİT ELEKTROTLAR VE UYGULAMALARI

Kalem grafit elektrotlar elektrokimyasal ve ekonomik özelliklerinden dolayı, son yıllarda birçok farklı inorganik ve organik bileşiğin analizi için kullanılmışlardır. Kalem grafit elektrot materyali çok iyi bilinen ve ticari olarak da kolaylıkla her kırtasiyeden temin edilebilen, grafit kalem (0,5-0,7 veya 0,9 olarak satılan) uçlarıdır. Bu yüzden kalem grafit elektrotlar oldukça ucuz hazırlanabilir ve tek kullanımlık olarak birçok uygulamada çalışma elektrodu olarak kullanılabilir (Şekil 2). Bununla birlikte, camı karbon, altın ya da platin gibi katı elektrotlarla karşılaşılan her bir ölçüm arasında yaşanan yüzey temizliği gibi önemli problemler bu ucuz kalem uçlarıyla yaşanmamaktadır. Bununla birlikte katı elektrotlara kıyasla, düşük gürültü akımları, yüksek hassasiyet, tekrar üretilebilirlik, modifiye edilebilir



ŞEKİL 2: Kalem grafit elektrotların genel hazırlık aşamaları.

yüzey alanı, düşük konsantrasyonlarda analit tayini, biriktirme/önderiştirme gibi herhangi bir adıma gereksinim duyulmaksızın düşük hacimlerde örnek gereksinimi gibi üstünlükleri de rapor edilmiştir.⁴⁹ Kalem grafit elektrotların yukarıda da belirtilen bazı durumlarda karşılaşılan avantajları olsa da onların çok sıklıkla kullanılmasının en önemli sebepleri basit ve çok ucuz olmalarıdır. Özellikle ucuz olmaları, onları araştırma amaçlı kullanılan önemli birer tek kullanımlık elektrot materyali haline getirmiştir. Literatürde kalem grafitler ile yapılmış araştırmalar incelendiğinde aslında onların birçok özelliklerinin gerçeği yansıtmayacak şekilde abartılarak verildiği görülmektedir. Öncelikle kalem grafit elektrotlar oldukça kırılabilir yapıya sahiptirler. Bu durum onlarla çalışırken çok dikkatli olmayı gerektirir. Dolayısıyla kalem grafit elektrotlar bu açıdan kullanıcı dostu değildirler. Bununla birlikte, bu elektrotların üretim amaçları araştırma temelli olmadığı için her bir ucun birbirinden farklı elektrokimyasal ve fiziksel davranış sergilediği bilinmektedir. Dolayısıyla bu farklılıklar tekrarlanabilir sonuçlar elde etmeyi çok zorlaştırmaktadır. Bu gibi hususlar kalem grafit elektrot temelli biyosensörlerin rutinde kullanılabilirliğini ve ticarileştirilebilme potansiyellerini ortadan kaldırmaktadır.

Kalem Grafit Elektrotların Kanser Biyobelirteçlerinin Tespitinde Kullanımları

Prostat spesifik antijen (PSA) için, kalem grafit elektrotun peptit nanotüp, altın nanopartikül ve polianilinden oluşan kompozit bir malzeme ile modifiye edildiği bir çalışma 2018 yılında rapor edilmiştir. Bu çalışmada biyoreseptör olarak anti-PSA kullanılmıştır. Ayrıca bu biyosensörün çalışma prensibi peroksidaz (HRP) işaretli ikincil anti-PSA'nın kullanıldığı bir sandviç-tip immünoassay olacak şekilde kurgulanmıştır.⁵⁰ Hidrojen peroksitin elektrokatalitik indirgenmesi kronoamperometrik olarak analizlenmiş ve PSA miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir. Geliştirilen bu biyosensör ile PSA için, LOD değeri 0,68 ng/mL ve doğrusal tayin aralığı 1-100 ng/mL PSA ($R^2=0,990$) olarak belirlenmiştir. Biyosensör ile gerçek insan serum örneklerinde de analizler yapılarak ELISA ile validasyon çalışmaları tamamlanmış, kabul edilebilir sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir.

MikroRNA'lar (miRNA), 18-25 nükleotidten oluşmuş, birçok organizmada post-transkripsiyonel genleri kontrol eden bir kodlamayan RNA sınıfıdır. Serum, idrar ve tükürükte bulunabilmektedirler.⁵¹ Yapılan araştırmalar sonucunda, kardiyovasküler hastalıklar, viral nöroinflamasyonlar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserler ile miRNA düzeyleri arasında önemli ilişkiler olduğu rapor

edilmiştir.⁵²⁻⁵⁵ Bununla birlikte, miRNA'ların terapinin etkinliğinin, hayatta kalma ve tedavinin başarı oranlarının takibinde de önemli birer biyobelirteç olabilecekleri değerlendirilmektedir.⁵⁶ Kalem grafit elektrotun tek kullanımlık çalışma elektrodu olduğu başka bir çalışmada miRNA-125a'nın tayini hedef alınmış ve kalem ucu bu kez, karbon siyahı, çok-duvarlı karbon nanotüpler ve grafen oksit gibi malzemelerle modifiye edilmiştir.⁵⁷ miRNA-125a'nın tayini impedans spektroskopisi ile yapılmıştır. LOD değeri 10 pM (1 pg/mL), doğrusal tayin aralığı 0,008-15 µg/mL (1nM-2µM) olarak belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen biyosensör ile insan serumunda da miRNA-125a'nın analiz edildiği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada ise, miRNA-21 tayini için sinyal yükseltilmesine yönelik bir enzim ile kombine edilmiş sandviç tip, altın nanopartikül modifiye kalem grafit elektrot temelli biyosensör tasarlanmıştır.⁵⁸ miRNA-21'in meme kanser hücrelerinde aşırı üretildiği, tümör invazyonu ve tümör hücre kolonizasyonu için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği değerlendirilmektedir.⁵⁹ Bu biyosensörün hazırlanma ve çalışma aşamaları ilgili yayında detaylıca incelenebilir.⁵⁸ Altın nanopartiküllerin elektrot yüzey alanını genişleterek daha çok miRNA-21 probunun immobilize edildiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra prob ve elektrot yüzeyi arasındaki kuvvetli etkileşimlerin, immobilize analitlerin yüzey yoğunluğunu artırdığı ve böylelikle düşük tayin limitlerine ulaşılabilirdiği de rapor edilmiştir. Geliştirilen biyosensör ile 200 pM-388 nM doğrusal tayin aralığında (100 pM tayin limiti, (10 fmol/100µL)) miRNA-21 analizi yapılmıştır.

PERDE BASKI ELEKTROTLAR VE UYGULAMALARI

Perde baskı teknolojisi (Screen-printing) basit, hızlı ve ekonomik biyosensör üretimi için gelecek vaat eden en önemli uygulamalardan bir tanesidir. Mikro-elektrotlar ve modifiye elektrotları da kapsayan perde-baskı elektrot (SPE) temelli tek kullanımlık elektrotlar, biyomolekül, antijen, pestisit, DNA, mikroorganizma ve enzimlerin tayininde yeni bir teknoloji olarak ortaya atılmıştır. SPE temelli biyosensörler, *in-situ* analizlerde ve taşınabilen cihazlarda artan hızlı ve doğru analiz gereksinimini karşılayabilecek özelliklere sahiptirler.⁶⁰ Hâlihazırda çevre, gıda, farmasötik veya klinik laboratuvarlarda ve ticari hasta başı cihazların çoğunda ölçüm sistemi elektrokimyasal temellere dayanmaktadır. Glukometrelerde kullanılan glukoz biyosensörleri bunun en yaygın ve bilinen örneklerinden bir tanesidir. Son yıllarda, SP elektrotlar düşük maliyetle çok fazla miktarda ve kolay üretilbildikleri için yeni elektrokimyasal algılama sistemlerinde çok sıklıkla kullanılmaktadırlar.

SPE'ler minyatürize edilebilme özelliklerinden dolayı da bu alandaki rekabette büyük avantaj sahibi olmuşlardır. Bununla birlikte minyatürizasyon ile analiz için sadece birkaç mikrolitre örnek hacminin yeterli olması SPE'lerin taşınabilir ölçüm cihazlarında kullanımının yolunu da açmıştır. Çok farklı amaçlar için SPE'lerin yüzey modifikasyonlarının da mümkün olması onların performanslarını artıran diğer önemli bir etkidir. Ayrıca SPE'ler ile gelecekte katı elektrotlarla yaşanan yüzey hafıza etkisi ve temizliği gibi çok büyük problemler ortadan kalkmaktadır. Tüm bu avantajların yanı sıra SPE'ler ile ilgili en önemli dezavantaj; örnekte bulunabilecek ve yalıtkan mürekkeplerin çözünmesine yol açabilecek organik çözümlerin varlığında yaşanabilecek problemlerdir. Bu mürekkeplerin çözünmesinin LOD ve hassasiyette düşmeye neden olduğu rapor edilmiştir.⁶⁰⁻⁶² İlgili literatürde tipik bir SP elektrodun modifikasyon ve ölçüm adımlarının basitleştirilmiş bir şeması verilmiştir.⁶³

Perde Baskı Elektrotların Kanser Biyobelirteçlerinin Tespitinde Kullanımları

En agresif prognoza sahip kanser türlerinden pankreas kanserinin biyobelirteçlerinden biri olan CA19-9 için, düşük maliyetli perde baskı teknolojisi kullanılarak birbiri içine geçiş (interdigitated) perde baskı elektrot temelli bir biyosensör geliştirilmiştir.⁶⁴ CA19-9 pankreas kanserinin erken tanısında kullanılan yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein yapısında bir karbohidrat antijendir.⁶⁵ Karbon-nano anyonlar ve grafen oksit ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine anti-CA19-9 antikorları immobilize edilerek biyosensör hazırlanmıştır.⁶⁶ Karbon nano-anyonlarla modifikasyonun, sadece grafen oksit ile yapılan modifikasyona nazaran, biyosensörün analitik performansını önemli düzeyde artırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca tek kullanımlık elektrodun esnek yapılı karakteri de çalışma kolaylığı sağlamıştır. Geliştirilen bu tek-kullanımlık biyosensörün 0,12 U/mL CA19-9 tayin limitinin ve yüksek tekrar üretilebilirliğinin olduğu tespit edilmiştir.

Bilindiği üzere, meme kanseri kadınlarda en önemli ve yaygın hastalılardan bir tanesi olup onkolojik açıdan da bu önemini sürdürmektedir.⁶⁷ HER2-ECD sağlıklı bireylerde serum düzeyi 15 ng/mL'nin altında seyreden ve hastalığın izlenmesinde ve erken tanısında önemli hale gelen protein yapılı bir meme kanseri biyobelirteçidir.^{68,69} Bu sebepten dolayı, meme kanserinin önemli biyobelirteçleri olan HER-2'nin ekstrasellüler domaini (HER2-ECD) için SPE temelli bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Bu sistemde karbon perde baskı elektrot altın nanopartiküller ve karbon nanotüplerle modifiye edilmiş ve

antikor-antijen etkileşimi alkalen fosfataz ile işaretli ikinci antikordaki enzimatik reaksiyonla tespit edilerek HER2-ECD analizlenmiştir. Enzimatik olarak oluşturulan metalik gümüş tarafından meydana gelen elektrokimyasal sinyal doğrusal tarama voltametri ile takip edilmiştir. Bu biyosensör ile 7,5-50 ng/mL doğrusal aralığında ve 0,16 ng/mL LOD değeri ile ilgili biyobelirtecin tayininin yapılabildiği rapor edilmiştir.⁷⁰

Meme kanserinin yukarıda bahsedilen öneminden dolayı erken tanıya yönelik çok farklı biyosensör sistemleri geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesinde, meme kanserinin önemli risk faktörlerinden sayılan östrojen reseptör alfa (ER α) için bir biyosensör geliştirilmiştir. ER α 66,2 kDa ağırlığında, östrojen-aracılı meme bezi büyüme ve farklılaşmasından sorumlu bir protein olup, endokrin terapiye cevabın takip edilmesinde de önemli bir prediktif belirteç olarak bilinmektedir.⁷¹ 30 yılı aşkın bir süredir ER α 'nın meme kanserinde biyobelirteç olarak kullanımı, FDA tarafından da onaylanmış analiz için belirli teknolojilerin temel alındığı, devam etmektedir.⁷² ER α 'nın bu öneminden dolayı analizi için farklı biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak geliştirilen bir sistemde ER α 'nın tiyollemiş bir spesifik aptameri altın SPE üzerine immobilize edilmiştir. Yüzeyle immobilize edilen bu tek zincirli aptamer ile hedef proteinin (ER α) bağlanması sonucu biyosensör yüzeyinin değişen elektrokimyasal karakteri diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanılarak takip edilmiştir. Geliştirilen bu sistemle ER α için 0,001 ng/mL LOD değeri saptanmış ve toplam ölçüm süresinin ise 10 dakika olduğu bildirilmiştir. Kanserli meme kanseri dokularının hem geliştirilen aptasensör ile hem de referans yöntem ELISA ile analizlendiği ve elde edilen sonuçların oldukça uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte aptasensörün +4 °C'de 60 günlük depolama süresi sonunda başlangıç aktivitesinin %95'ini koruduğu da rapor edilmiştir.⁷²

KÂĞIT TEMELLİ SİSTEMLER VE UYGULAMALARI

Lateral akış test strip teknolojisi, lateral akış immüno-kromatografik assay (LFA) olarak da bilinir, düşük maliyetli, hızlı ev testlerinin, hasta başı ve saha analizleri için diyagnostiklerin geliştirilmesi için büyük önem arz etmektedir. Gözenekli kağıt substratların kullanıldığı bu tip ölçüm sistemlerinin göreceli sofistike algılama prensipleri olsa da sadece tek bir damla örneğin strip üzerine damlatılması ve birkaç dakika içinde cevap alınması ve ayrıca kullanıcı dostu olmaları bu testleri ticari açıdan vazgeçilmez hale getirmiştir. LFA'ların en iyi bilinen başarılı testi 1980'lerde

geliştirilmiş ve ticari hale getirilmiş olan evde kullanıma uygun olan gebelik testleridir. LFA'ların bu alanda kullanımının ardından, tıp, veteriner, gıda endüstrisi ve çevre bilimlerinde birçok farklı amaç için çok yaygın kullanılmaya başlandı. Basitlikleri, taşınabilir olmaları, düşük maliyetleri ve hasta başı analizlere uygunluk gibi birçok avantajlarından dolayı küresel pazarda rakipsiz durumdadırlar. Lateral flow akış testlerin genel bir şeması Şekil 3'te verilmiştir.⁷³ Esnek ve basit LFA teknolojisi üzerine kurulan kâğıt temelli mikroakışkan analitik aygıtlar sayesinde birçok analitin aynı anda analizine imkân veren yeni nesil hasta başı diyagnostiklerin hayatımıza girmesi de mümkün olmuştur.^{74,75} LFA'ların tek yönlü akışına nazaran kâğıt temelli mikroakışkanlar 2 ve hatta 3 boyutlu akış imkân vererek çoklu analizlere olanak sağlamaktadırlar.⁷⁶ Algılamanın yanı sıra tek bir parça kâğıt üzerinde ayırma, saflaştırma ve deriştirme gibi diğer önemli işlemsel birimler de entegre edilebilmektedir. Geleneksel kâğıt temelli analitik sistemler, çoğunlukla kalitatif veya yarı-kantitatif ve gözleme dayalı sonuçlar vermektedir. Bu yüzden geleneksel tayin, kullanım kolaylığı açısından gözleme dayanmaktadır. Bununla birlikte analiz doğruluğunun artırılmasına yönelik çok sayıda modifikasyon da yapılmıştır.

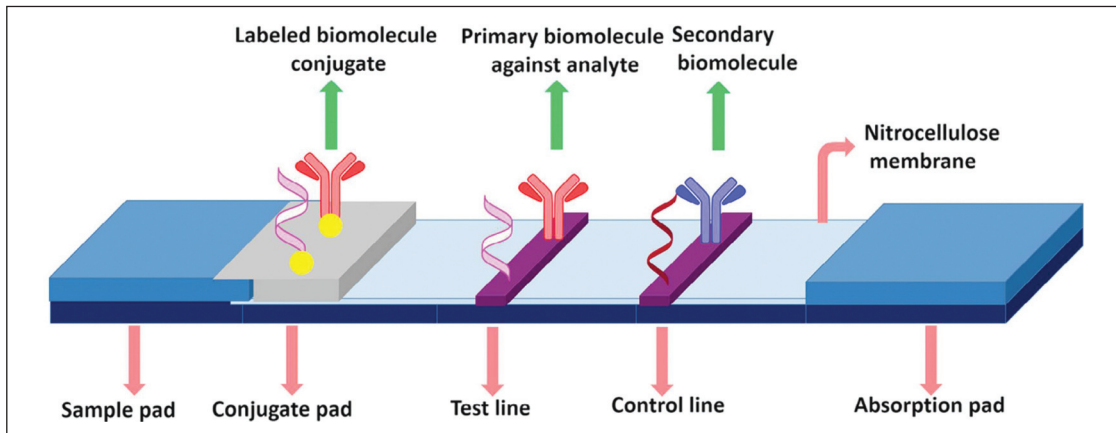
Kantitatif analiz yapılan kâğıt temelli sensörlerde kolorimetri, kemilüminesans (elektrokemilüminesans), iletkenlik, floresans, yüzey plasmon rezonans ve elektrokimyasal gibi deteksiyon sistemleri kullanılmaktadır. Bu metotlar içinde elektrokimyasal esaslı sistemler iyi karakterize edilmiş ve çok sıklıkla kullanılmaktadırlar. Elektrokimyasal sistemlerin taşınabilir analizörler ile yüksek hassasiyet ve seçicilik sunması, onları ticari açıdan da önemli bir konuma taşımıştır. Kâğıt, gözenekli ka-

rakteri, sıvı emme oranı ve farklı analitlere karşı fiber yüzey afinitesi gibi özelliklerinden dolayı en çok kullanılan elektrot malzemesi olmuştur.⁷⁷ Kâğıt temelli malzemelerin farklı materyalleri onların boyut, akış hızı, kalınlık, gözenek boyutu gibi özelliklerinin de farklı ve ayarlanabilir olmasını mümkün kılmaktadır. Dolayısıyla hedef analitin özelliklerine bağlı olarak kullanılacak kâğıdın da özellikleri ayarlanabilmekte ve hassasiyetin artırılması adına kullanılacak kâğıdın seçimi çok önemli hale gelmektedir. Tablo 1'de sıklıkla kullanılan bazı kâğıt türleri ve hedef analitleri verilmiştir.⁷⁷

Farklı amaçlar için farklı kâğıtlar kullanılabilirdiği gibi bu kâğıt elektrotlar için elektrokimyasal analizler kapsamında kullanılmak üzere değişik birçok fabrikasyon tekniği de başarıyla uygulanabilmektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle elektrokimyasal tayinlerde kullanılan kâğıt temelli elektrotların üretiminde wax yazıcıların kullanıldığı ve klinik örneklerden, gıda ve çevre örneklerine kadar çok farklı alanda kullanıldıkları anlaşılmaktadır. Lazer yazıcıların klinik örneklerde dopamin ve glukozun elektrokimyasal analizlerinde kullanıldığı rapor edilmiştir. Bunların yanı sıra perde baskı ve fotolitografi tekniklerinin kullanımıyla da tek-kullanımlık kâğıt temelli biyosensörlerin üretildiği ve ferrisiyanür ve insan koryonik gonadotropin analizlerinde kullanıldıkları bildirilmiştir. Bu tekniklerin yanısıra farklı metotlar kullanılarak da kâğıt elektrotların üretilmesi mümkündür. Tablo 2'de farklı üretim tekniklerinin gösterildiği bir tablo verilmiştir.⁷⁷

Kâğıt Temelli Elektrotların Kanser Biyobelirteçlerinin Tespitinde Kullanımları

Ge ve ark. tarafından en saldırgan insan kronik miyeloid lösemi hücre serilerinden biri olan K-562 hücresinin tayini



ŞEKİL 3: Lateral akışlı testlerin genel üretim şeması.⁷³

TABLO 1: Elektrokimyasal analizlerde kullanılan bazı kullan-at sistemlerin kâğıt türleri.⁷⁷

No	Kâğıt substrat	Hedef	Elektrokimyasal analiz tipi
1	Whatman RC60 rejener membran filtresi	Brom, iyot, klor	DV
2	Whatman No.1 filtre kâğıdı	CEA ve CA 125	DPV
3	Whatman kromatografi kâğıdı 3 mm	Staphylococcus aureus	DPV
4	Nitroselüloz membran	Asetaminofen	DV ve DPV
5	180 gsm ofis kâğıdı	Toplam ve glikolize hemoglobin	EIS
6	Kuşe kâğıt	Bisfenol A	LSV
7	Labor (67g/m ²) kâğıt filtre	Fosfat	DV ve KA
8	PVDF membran filtre	Beyaz kan hücreleri	DV ve DPV
9	Filtre kâğıtları (nitelikli, 102,15 mm)	Glukoz	DV ve KA
10	Selüloz asetat filtre kâğıdı	Küçük moleküller	DV ve A
11	Selüloz ester karışımı	Nitrit	DV

DV: Döngüsel Voltametri, LSV: Linear Sweep Voltametri, DPV: Diferansiyel Puls Voltametri, EIS: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi, KA: Kronoamperometrik, A: Amperometri.

TABLO 2: Whatman 1 filtre kâğıdı temelli, farklı yöntemlerle üretilmiş biyosensörler ve hedef analitleri.⁷⁷

No.	Fabrikasyon Tekniği	Tespit Metodu	Hedef	Örnek Tipi	Uygulama
1	Plotting	Kalorimetrik	Protein ve glukoz	Üre	Tanı
2	Fleksografik baskı	Kalorimetrik	SP DNA	Sentetik örnek	Tanı
3	Pen in wax	Kalorimetrik	Glukoz	Sentetik örnek	Tanı
4	Fotolitografi	Elektrokimyasal	İKG	İnsan Serumu	Tanı
5	Lazer yazıcı	Elektrokimyasal	Dopamin	İnsan Serumu	Tanı
6	Lazer yazıcı	Elektrokimyasal	Glukoz	İnsan kanı	Tanı
7	Wax yazıcı	Elektrokimyasal	K-562 hücre	Klinik örnekler	Tanı
8	Wax yazıcı	Elektrokimyasal	CEA ve CA125	İnsan serum	Tanı
9	Wax yazıcı	Elektrokimyasal	CEA	Klinik serum	Tanı
10	Wax yazıcı	Elektrokimyasal	HPV	DNA örnekleri	Tanı
11	Wax yazıcı	Elektrokimyasal	Ketamin	İçecekler	Yiyecek
12	Wax yazıcı	Elektrokimyasal	Kurşun ve Kadmiyum	Çamur ve deniz suyu	Çevresel
13	Film baskısı	Elektrokimyasal	Ferrisiyanür	Sentetik örnek	-

SP: *Salmonella typhimurium*, İKG:İnsan koryonik gonadotropin.

için kâğıt temelli elektrokimyasal bir hasta başı analiz sistemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada, kâğıt çalışma elektrodu altın nanopartikül ve grafen ile modifiye edilerek biyoyoumluluğu ve iletkenliği yüksek bir biyoalgılama yüzeyi elde edilmiştir.⁷⁸ Bu sistemde elektrokimyasal çalışma aralığının genişletilmesi amacıyla bir iyonik sıvı da kullanılmıştır. İyonik sıvının sadece elektron transfer yeteneğini artırmadığı aynı zamanda Konkanavalin A ile hücrelerin konjügasyonu için etkili bir ara yüzey sağladığı da bildirilmiştir. Sandviç-tip çalışma prensibine dayanan bu sistemde; önce K-562 hücreleri hazırlanan kâğıt temelli

çalışma elektrodu yüzeyine (ConA/IL/3D AuNPs@GN/PWE) bağlanır. Ardından Konkanavalin A ile etiketlenmiş dendritik PdAg nanopartikülleri ile K-562 hücreleri etkileşerek bağlanma meydana gelir. Bu sistemde dendritik PdAg nanopartiküler katalist olarak görev yaparlar. Dendritik PdAg nanopartiküler, katalist olarak; forbol 12-miristat-13-asetat'ın K-562 hücrelerinin stimülasyonu ile oluşan H₂O₂'in tiyoinin'i yükseltmesini hızlandırmaktadırlar. Böylelikle, elde edilen akım cevabı PdAg nanopartiküllerin miktarına ve H₂O₂'in konsantrasyonuna bağlıdır ki bu da hücrelerden salınan miktarı göster-

mektedir. Geliştirilen bu biyosensör ile optimum deneysel koşullarda her hücreden salınan H_2O_2 miktarının $1,5 \times 10^{-14}$ mol olduğu ve K-562 hücrelerine ilişkin doğrusal tayin aralığının ve LOD değerinin, sırasıyla, 1×10^3 - 1×10^6 hücre/mL ve 200 hücre/mL olduğu belirlenmiştir.⁷⁸

Altın nanoçubuklar ile modifiye edilmiş kâğıt temelli elektrotların kullanıldığı başka bir çalışmada ikili sinyal artırma stratejisi ile yüksek hassasiyette ve seçimlilikte karsinoembriyonik antijen (CEA) ve kanser antijen 125 (CA125) tayinleri için bir elektrokimyasal cihaz geliştirilmiştir.⁷⁹ Bu sistemde Pb^{2+} ve Cd^{2+} metal iyonlarıyla kaplı sığır serum albümini-nanoküreleri etiket olarak kullanılmıştır. Aynı anda iki farklı kanser belirtecinin yüksek spesifiklikte tayininin, kullanılan bu iki farklı metal iyonu ile kaplı nanoküreler sayesinde mümkün olduğu rapor edilmiştir. Metal iyonlarının diferansiyel puls voltametri ile ön-birikirtmeye gerek kalmadan doğrudan analizlenebildiği ve elde edilen ayrı voltametik piklerin her bir sandviç tip immünoreaksiyon ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir. Piklerin pozisyon ve büyüklüğünün, antijenin kimliğini ve miktarını da yansıttığı, CEA için 0,08 pg/mL ve CA125 için 0,06 mU/mL LOD değerlerinin bulunduğu gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada, karsinoembriyonik antijen (CEA) ve prostat-spesifik antijen (PSA) analizi için mikroakışkan kâğıt temelli, enzimsiz bir biyosensör dizayn edilmiştir.⁸⁰ Sensör materyali olarak altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş kâğıt çalışma elektrodu kullanılmıştır. Siklodekstrin ile fonksiyonelleştirilmiş altın nanopartiküller ($CD@AuNPs$) enzim taklidi yapmakta ve ikincil anti-kor/peptidin yüklenmesi için hazırlanmış ve kullanılmışlardır. Bir örnek bölgesinde, CEA varlığında, sandviç immunoreaksiyonu vasıtasıyla $CD@AuNPs$ 'ler kâğıt çalışma elektrodu yüzeyine çıkarlar, ardından, bir kaskat kataliz reaksiyonu yoluyla o-fenilendiaminin elektrokimyasal sinyali hızlandırılır. Diğer örnek bölgesinde ise, PSA içeren başka bir örneğin uygulanmasıyla peptit parçalanması meydana gelir ki bu da, $CD@AuNPs$ 'lerin yüzeyden serbest kalmasına sebep olur ve ardından elektrokimyasal sinyal değişimi ölçülerek PSA tayini gerçekleştirilir. Geliştirilen bu biyosensörle CEA ve PSA'nın klinik olarak yüksek hassasiyette, geniş doğrusal tayin aralığında ve düşük LOD değerleri ile tayin edilebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca bu sistemin hasta başı analizler için ümit vaat eden bir uygulama olabileceği de bildirilmiştir.

ÇİP TEMELLİ SİSTEMLER VE UYGULAMALARI

Dünya gelişen teknolojiyle beraber her geçen gün farklı sağlık problemleriyle karşı karşıya kalmaktadır. Yukarı-

daki bölümlerde de belirtildiği gibi biyosensör sistemleri gelişen bu teknolojiye paralel olarak gereksinimleri karşılayabilecek en önemli endüstriyel alan olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyosensörlerin bu özellikleri tabii ki tesadüfi değil, onların, insanlığın tüm gereksinimlerini sağlayabilecek değişimlere ayak uydurabilecek multidisipliner bir bilimsel alan olmaları ile ilgilidir. Özellikle sağlık alanında hem erken tanıya imkân tanıyacak hem de hassas biyosensör sistemlerine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Bununla birlikte sağlık alanında güvenilir kullanıma imkan verebilecek en güçlü adaylar ise çip temelli sistemlere dayalı biyosensörler olarak görülmektedir. Bununla birlikte, ucuz maliyetli ve her kesimden kullanıcıya hitap edebilecek bir sistemin, mikroakışkan teknolojileriyle donatılmış ve basitleştirilmiş olması gerekliliği de göz ardı edilmemelidir. Biyosensörler ile mikroakışkan teknolojilerin evliliği, çağımız hastalıklarının hassas, ekonomik ve erken tanısına olanak tanıyacak entegre sistemleri hayatımıza sokmuştur. Çip temelli tek kullanımlık elektrotlar genellikle mikroakışkan teknolojileriyle entegre hale getirilmiş 10^{-6} - 10^{-18} L gibi çok düşük hacimlerde örneğe gereksinim duyan biyoanalitik analiz aygıtları şeklinde üretilmektedirler.⁸¹ Mikroakışkan kanalların boyutları genellikle 10 μ m düzeylerinde olacak şekildedir. Bununla birlikte bu tür sistemlerde hem çok küçük boyutlarda mikroakışkan kanallar hem de çok küçük hacimlerde örnekler söz konusu olduğu için, sıvının kanalda hareketine ilişkin; viskozite, yüzey gerilimi, difüzyon vb. birçok parametrenin değerlendirilmesi gerekmektedir. Böyle bir durumda geliştirilecek aygıtın özelliklerini belirleyen en önemli faktörler; laminar akış, difüzyon, akışa direnç, yüzey alanı/hacim oranı ve yüzey gerilimidir.⁸² Mikroakışkan kanal teknolojisi kapiler elektroforez gibi kimyasal ayırma işlemleri için de son derece elverişli olmakla birlikte, çip teknoloji ise entegrasyonu "mikroelektromekanik sistemler (MEMS)" olarak bilinen ve minyatürize aygıtların fabrikasyonunu mümkün kılan yeni bir teknoloji alanını da ortaya çıkarmıştır. Tipik bir MEMS temelli çip, kanallar, valfler, karıştırıcı ve pompalardan oluşmaktadır. Bu tür sistemlerde genellikle, sıvının akışının pnömatik basınçla sağlandığı mikroakışkan kanallar bulunmaktadır.⁸³ Sürekli akış kanallı mikroakışkan çipler nanolitre düzeylerinin altında örnek hacmi ile çalışmaya imkân tanıdıklarından dolayı birçok farklı kimyasal ve biyokimyasal ayırma uygulaması için tercih edilmektedirler. Özellikle, örnek ön-işlemeden analize kadar tüm adımların tek bir çip üzerinde gerçekleştirilebildiği "mikro total analiz sistemleri (μ -TAS)" her geçen gün birçok alanda daha da önemli bir hale gelmektedir.⁸⁴ Damla mikroakışkan sistemleri yüksek iş/ürün hacmi sağlamaları dolayısıyla iyi bilinmektedirler.

Çünkü her bir damla ayrı bir kimyasal reaksiyonun gerçekleştirilebileceği bir deney tüpü gibi işlev görmektedir. En önemli avantajları PCR gibi yüksek hassasiyette biyoassaylerin üretilmesine imkân tanımalarıdır.⁸⁵ Mikrokanallar içinde mikro-damla oluşturmak için elektrik alanı, mikro-enjektörler veya iğneler kullanılabilir. Dijital mikroakışkan sistemlerde her bir elektrot üzerine bir potansiyel uygulanır ve böylelikle damlaların dağılması, karıştırılması ve ayrılması sağlanır. Dijital mikroakışkan sistemler bir ya da iki tabaka üzerinde oluşturularak kullanılabilir. Dijital mikroakışkan sistemler sayesinde pikolitre seviyesinde örnek ile çalışmak mümkündür. Kâğıt temelli mikroakışkan sistemler açık kanallar içerdiğinden bu tür sistemler, kanal mikroakışkanlarının, kanalların kapatılmasıyla ayrılması gereken çip fabrikasyonları için uygundur. Kâğıt temelli mikroakışkan çipler, düşük maliyet, kolay üretim, esneklik, kullan-at özellik ve kapiler güçler ile örnek sıvının kanal içinde herhangi bir itici güç olmadan kolay hareketi gibi faktörler sebebiyle hem endüstriyel hem de bilimsel araştırma alanlarında çok tercih edilmektedirler. Kâğıt temelli mikroakışkan çiplerin bu avantajları, özellikle ekonomik kaynakları kısıtlı olan ülkeler için hastalıkların teşhisinde kullanılacak hasta başı analiz sistemlerinin (POC) üretilmesi için araştırmacıları teşvik etmektedir.

Çip Temelli Sistemlerin Kanser Biyobelirteçlerinin Tespitinde Kullanımları

Kronik miyeloid lösemi (CML) için önemli bir genetik belirteç olan BCR-ABL1 genlerinin doğrudan hücre toplam RNA ekstraktından kolorimetrik analizinde kullanılmak üzere multifonksiyonel bir mikroçip geliştirilmiştir.⁸⁶ Çipin tamamının fabrikasyon işlemlerinin hem basit hem de maliyet açısından oldukça verimli olduğu rapor edilmiştir. Çipin bu özelliğinden dolayı, genel bir entegre analizörden oluşmuş POC sistemi için kullan-at tarzda uygulama için elverişli olduğu düşünülmektedir. Geliştirilen çip, 10 µL'lik örnek hacmi ile tayine imkan vermiştir. Bununla birlikte mineral yağ içeren karışmayan tamponların ilavesiyle bu hacmin 50 nL gibi daha da düşük seviyelere düşürülebileceği de belirtilmiştir. Burada geliştirilen çipe uygun bir mekanik pompanın dizaynı ve entegrasyonu ile POC'lerde kullanılacak minyatürize bir sistemin elde edilme potansiyeli de bulunmaktadır. CML tanısı için altın standart RT-qPCR temelli iyi bilinen yöntem dayanmaktadır ve bu yöntemle tek bir örneğin analizinin maliyeti 20 Avro'yu bulmaktadır. Ancak geliştirilen çip ile tek bir örneğin kolorimetrik analizi 0,2-1 avro aralığındadır. Bu son derece makul maliyetinin yanı sıra; yüksek hassasiyet, kısa sürede yüksek doğrulukta

cevap elde etme, minyatürizasyona uygunluk gibi birçok avantaj da sunmuştur. Geliştirilen çip vaka çalışmalarında da kullanılarak oldukça başarılı sonuçların elde edildiği bildirilmiştir.

Gürbüz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; bir-biri içine geçmiş kapasitif biyosensörlerden oluşmuş bir çip-üstü-laboratuvar sistemi POC ile entegre edilerek portatif analizör geliştirilmiş ve bu analizör çoklu kanser (serum amiloid A, interlökin-6, TNF-α, fibrinojen) ve kardiyovasküler hastalıkların (B-tip natriüretik peptid, fibrinojen, troponin-I) biyobelirteçlerinin tayininde kullanılmıştır.⁸⁷

Geliştirilen prototip, kapasitif biyosensörlerin taşıyan bir kartuş, kapasitif yanıtı okuyacak elde taşınabilen tarzda entegre bir elektronik birim ve biyobelirteçlerin konsantrasyonlarını önceki veri bankalarını da kullanarak hesaplayacak bir veri analiz yazılımından oluşmaktadır. Kapasitif biyosensörlerin her biri dairesel tarzda üretilmiş ve tek ve çoklu antikorlar bu elektrotlar üzerine immobilize edilmiştir. Ölçümün prensibi, spesifik antijenlerin antikorlarına bağlanması sonucu yüzeyde meydana gelen kapasitans değişiminin belirlenmesine dayandırılmıştır. Geliştirilen çiplerin optimum koşullarda saklandığında 3 aylık raf ömrünün olduğu ve 30 dakikadan daha az sürede cevap verdiği bildirilmiştir. Gerçek hasta kanlarıyla yapılan çalışmalarda (2-5 µL örnek kan kullanılarak) geliştirilen sistemin yüksek hassasiyette ve doğrulukta analize imkân verdiği belirlenmiştir.

Kronik miyeloid lösemi (CML)'nin erken tanısı için geliştirilen başka bir çip temelli biyosensör sisteminde bu hastalığa spesifik bir DNA parçasının impedimetrik tayini temel alınmıştır. Çipin üretimi, karboksil modifiye-çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT), indiyum-kalay oksit (ITO) kaplı cam substrat üzerine elektroforetik biriktirilmesiyle gerçekleştirilmiştir.⁸⁸ MWCNT yüzeyine CML-spesifik amino modifiye-DNA probu iyi bilinen EDC/NHS kimyası ile immobilize edilmiş ve ardından sıvı akışının kontrolü için, yüzey, poli(dimetilsiloksan) mikrokanal ile kapatılmıştır. Bu bütünleşmiş minyatürize sistemde, immobilize prob örnekten gelecek, kendisinin komplementeri DNA parçası ile hibritleşir ve böylelikle arayüzey yük transfer direnci ölçülerek hedef DNA'nın kantitatif analizi yapılır. Örnekte komplementer DNA parçasının bulunması elektriksel iletkenlikte önemli düzeyde düşüşe neden olur. Belirlenen optimum koşullarda mikroakışkan çip ile 1 fM ile 1 µM aralığında ve 60 saniye gibi kısa bir sürede DNA tayini yapılabildiği rapor edilmiştir. Üretilen biyoçipin tekrar üretilebilirlik ve depo kararlılığı gibi özelliklerinin de oldukça iyi olduğu bildirilmiştir.

İNDİYUM-KALAY OKSİT (ITO) TEMELLİ SİSTEMLER VE UYGULAMALARI

ITO, biyosensörler, televizyon ekranları, dokunmatik ekranlı tablet, telefon vb. sistemler gibi birçok farklı teknolojik alanda kullanılan en önemli şeffaf iletken oksit (TCO) filmlerden bir tanesidir.⁸⁹ ITO'nun bu denli talep gören kullanımının altında yatan en önemli özellikleri; şeffaf ve iyi elektriksel iletkenliğe sahip olmalarıdır. İlk TCO çalışması Badeker tarafından 1907 yılında yayımlanmıştır.⁹⁰ Aradan geçen 1 asırdan fazla zaman içerisinde TCO'lar nispeten yeni hayatımıza girmeye başlamıştır. İki temel özellik: iyi elektriksel iletkenlik ve düşük ışık absorpsiyon, onları birçok alanda kullanıma teşvik etmiştir. En önemli TCO yapılarından bir tanesi ITO'tur. $In_2O_3:Sn^1(In_2O_3-SnO_2)$ şeklinde hazırlanmaktadır. ITO birçok teknoloji alanında çok yoğun kullanılsa da, günün birinde tükenme ihtimali de bir gerçektir. Çünkü ITO'nun ulaşılabilir durumu indiyum'un dünyada bulunma miktarıyla orantılı olacaktır. Dolayısıyla gelecek uygulamalar için farklı TCO arayışları da devam etmektedir. ITO filmleri genellikle indiyum (III) oksit ve kalay (V) oksit çözeltilerinin 9:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilirler. Özel tekniklerle (manyetik alanda sıçratma, iyon demeti sıçratma, elektron demeti buharlaştırma vb.), cam, polietilenterefitalat (PET) vb taşıyıcı substratlar üzerine yapılan ITO ince filmi, şeffaf ve renksizdir. Bununla birlikte, kimyasal biriktirme yöntemi ile hazırlanan ITO ince filmler yöntemin basit ve ucuz olmasından dolayı daha çok tercih edilmektedirler.⁹¹

ITO temelli materyaller, iyi optik geçirgenlik, geniş çalışma aralığı, yüksek elektriksel iletkenlik ve substrat adezyonu, düşük kapasitif akım ve kararlı elektrokimyasal/fiziksel özelliklerinde dolayı biyosensör uygulamalarında tek kullanımlık çalışma elektrotu materyali olarak çok sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.⁸⁹ Bu özellikleri onları daha çok elektrokimyasal temelli biyosensörlerde çalışma elektrotu olarak daha da popüler hale getirmiştir. Bu bağlamda cam ya da PET üzerine ince film şeklinde kaplanmış ITO temelli elektrotlar, altın, platin veya camsı karbon gibi geleneksel katı elektrotlara kıyasla çok daha üstün özelliklere sahiptir. Bu üstünlükler yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir.⁹²⁻⁹⁶ ITO temelli kullan-at elektrotlara dayalı geliştirilen biyosensörler gıda, klinik tanı ve çevre analizlerine yönelik birçok alanda kullanılmışlardır.⁸⁹ Son yıllarda geliştirilen ITO temelli biyosensörlerin çalışma prensipleri daha çok elektrokemilüminesans, elektrokimyasal ve optik transduserlere dayanmaktadır. Bu sistemlerde ITO yüzeyin modifikasyonu için silanizasyon, elektroforetik ve elektrokimyasal biriktirme, polimerizasyon ve adsorpsiyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu modifi-

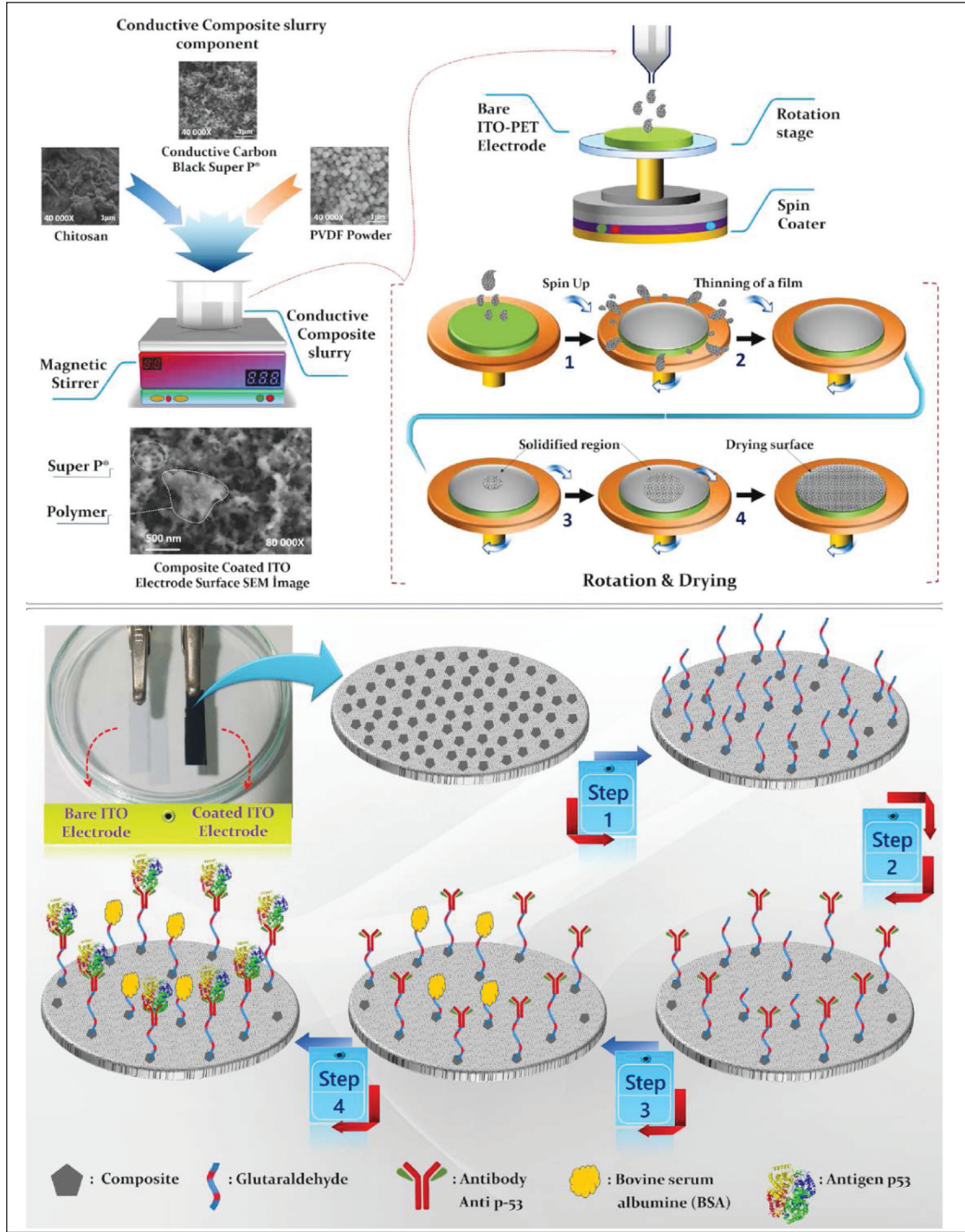
kasyon yöntemlerinin yanı sıra elektrokimyasal karakteristiklerin daha da iyileştirilmesi ve yüzey alanının artırılması gibi amaçlar için nanopartiküller de (altın nanopartiküller, karbon nanotüpler, grafen, PAMAM vb) ITO temelli biyosensörlerin üretilmesinde sıklıkla kullanılmışlardır.⁹⁷⁻¹⁰⁰

ITO Temelli Sistemlerin Kanser Biyobelirteçlerinin Tanısında Kullanımları

Protein p53, hücre büyümesinin kontrolünde ve DNA tamir prosesinde önemli bir role sahip proteindir. P53 proteinin yapısında konformasyonel değişimlere sebep olan gen mutasyonlarının p53 fonksiyonunun ortadan kalkmasına ve devamında da tümör oluşumuna yol açabildiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, p53 kolorektal ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinde önemli bir biyobelirteç olabilme potansiyeline de sahiptir. Bu yüzden p53'ün insan serumunda doğru analiz edilebilmesi çok önemlidir. Bu amaç doğrultusunda, kullan-at ITO-PET temelli, kitosan/karbon süper P kompozit materyalinin yüzey modifikasyonu için kullanıldığı bir p53 immünosensör rapor edilmiştir.¹⁰¹ Kitosan antikor immobilizasyonu için iyi bir polimer olmakla birlikte sudaki zayıf çözünürlüğü ve iletkenliği genelde problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden bu çalışmada kitosan, karbon süper P ile kompozit haline getirilerek suyla daha iyi karışan ve iletkenliği artırılmış bir malzeme elde edilmiştir. Bu kompozit materyal ITO yüzeyine spin kaplama yöntemiyle kaplanmıştır. Anti-p53 antikorları glutaraldehit ile kitosana immobilize edilerek biyosensör hazırlanmıştır. Glutaraldehit'in bifonksiyonel -CHO grupları kitosanın -NH₂ grupları ile etkileşerek kovalent immobilizasyon gerçekleştirmektedir. Bu adımlara ilişkin şema Şekil 4'te verilmiştir.

Geliştirilen bu sistemle, optimum hazırlanma ve deneysel koşullar altında 0,01-2 pg/mL aralığında doğrusal p53 tayininin gerçekleştirilebildiği ve LOD'nin ise 3 fg/mL olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra geliştirilen bu tek kullanımlık ITO temelli biyosensörün yüksek hassasiyet ve kararlılıkta olduğu tekrarlanabilirliğinin de mükemmel olduğu elde edilen sonuçlardan anlaşılmaktadır. Ayrıca, biyosensör gerçek insan serum örneklerine de uygulanarak p53 analizleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

CDH22 (Cadherin-like protein 22) kadherin süper ailesinin bir üyesi olup hücre-hücre adezyonunda ve metastazda rol oynamaktadır.¹⁰² CDH22'nin hipermetilasyonunun meme kanserinde bağımsız bir prognostik biyobelirteç olduğu bildirilmiştir.¹⁰³ CDH22'nin aşırı ekspresyonunun kolorektal ve meme kanserlerinde ve düşük ekspresyonun da metastatik melanomada gözlemlendiği



ŞEKİL 4: KITOSAN/karbon süper P ile modifiye edilmiş ITO-PET temelli p53 biyosensörünün hazırlanma aşamalarına ilişkin özet şema.¹⁰¹

rapor edilmiştir.^{84,104} CDH22'nin insan serumunda hassas tayini amacıyla geliştirilen bir biyosensörde ITO yüzeyi immobilizasyon matrisi olarak bir fırça polimer ile kaplanmıştır. Fırça polimerin uçlarında bulunan reaktif epoksi grupları, antikorun amino grupları ile etkileşerek

antikorun (anti-CDH22) immobilizasyonunu mümkün kılmışlardır.¹⁰⁵ Bu sistemde ayrıca politiyofenin yüzey iletkenliğine pozitif yönde katkı yaptığı da bildirilmiştir. Geliştirilen biyosensörün ölçüm prensibi, tek kullanımlık ITO temelli elektrot yüzeyine bağlanan insan seru-

munda bulunan CDH22'nin elektron transfer direncini arttırması ve bu artışın CDH22 ile ilişkilendirilmesine dayandırılmıştır. Geliştirilen biyosensörün tüm fabrikasyon adımları EIS, CV, SEM, AFM, FTIR gibi metotlarla incelenerek doğrulanmıştır. Tek kullanımlık ITO temelli biyosensörün CDH22 için doğrusal tayin aralığının 0,01-3 pg/mL ve LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla, 3,2 fg/mL ve 10,7 fg/mL olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte 7 hafta boyunca kararlılığını koruduğu, tekrar üretilebilirlik (RSD %1,88) ve tekrarlanabilirlik (RSD %3,83) karakterlerinin de mükemmel olduğu anlaşılmaktadır. Hazırlanan biyosensör tek kullanımlık olmasına rağmen, uygun yöntemlerle bir kez rejenere edildikten sonra da herhangi bir aktivite kaybı olmadan tekrar kullanılabilmesi gösterilmiştir. 5 farklı insan serumu ile yapılan testlerde de oldukça uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

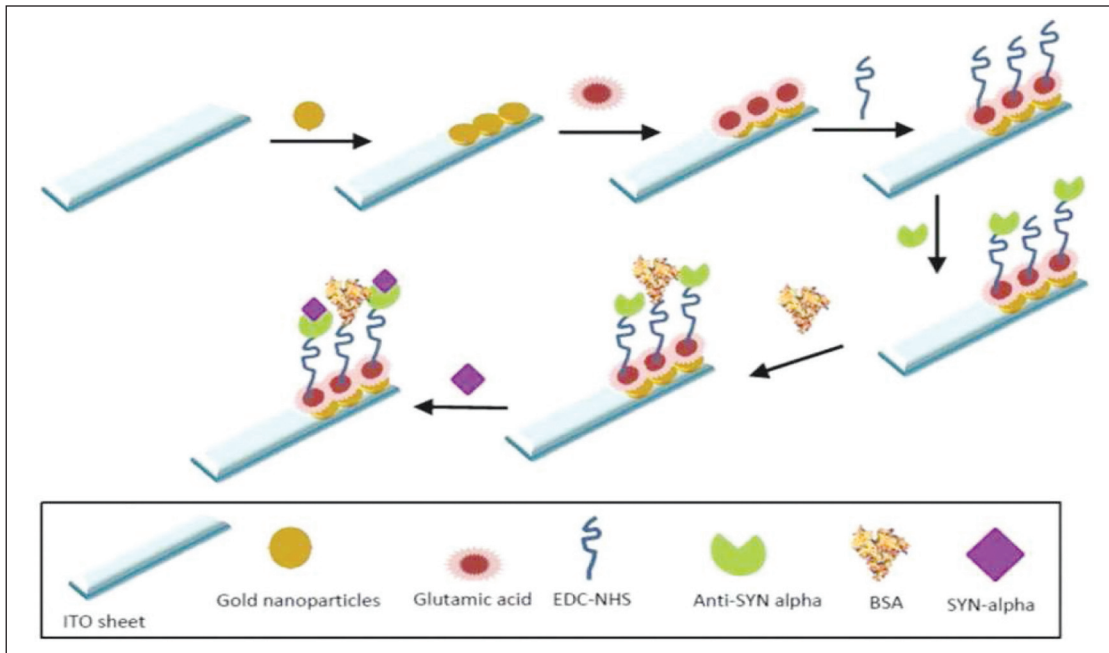
Parkinson hastalığının en önemli belirteç proteinlerinden bir tanesi alfa-sinüklein (SYN) proteindir. Bu proteinin beyin-omurilik sıvısındaki miktarının doğru tespit edilebilmesi Parkinson hastalığının prognoz ve diagnosisunda oldukça faydalı bir parametredir. Alfa-sinüklein tayini için, altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş ITO yüzeyinin poliglutamik asidin, elektropolimerizasyon ile kaplandığı tek kullanımlık bir nörobiyosensör rapor edilmiştir.¹⁰⁶ Poliglutamik asidin karboksil uçları, iyi bilinen EDC/NHS kimyası ile aktifleştirilmiş ve ardından anti-alfa-sinükleinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Anti-alfa-sinükleinin immobilizasyon adımlarını gösteren bir şekil, Şekil 5'te verilmiştir.

Geliştirilen nörobiyosensör sisteminin SYN için doğrusal tayin aralığının 4-2000 pg/mL aralığında olduğu rapor edilmiştir. Bu aralık (500 kat) geleneksel katı elektrotlarla benzer çalışmalarda elde edileenden çok daha geniş bir doğrusallıktadır. Sistemin LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,135 pg/mL ve 0,45 pg/mL olduğu hesaplanmıştır. Nörobiyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışması, 20 tek kullanımlık elektrot ile 100 pg/mL'lik SYN standart çözeltisinin analizlenmesi ile yapılmış ve korelasyon katsayısı ve standart sapma değerleri sırasıyla %4,43 ve 5,69 pg/mL olarak bulunmuştur. Bu değerler analitik açıdan uygun ve kabul edilebilir sınırlar içerisindedir. Geliştirilen biyosensör hem sağlıklı hem de Parkinson hastalarının beyin-omurilik sıvılarında SYN analizine uygulanmış ve mükemmel sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 6).

GENEL DEĞERLENDİRME

Yaşadığımız bu çağda insanlığın hem kültürel hem de teknolojik anlamda akıl almaz bir hızla değiştiğinin canlı birer şahidi durumundayız. Bilimsel araştırmalar teknolojik yenilikleri ortaya çıkarırken, teknolojik yenilikler de bilimsel araştırmaların daha da ilerletilmesi adına önemli bir motivasyon kaynağı olmaktadır. Yaşanan bu ilerleme-



ŞEKİL 5: Anti-alfa-sinüklein'in ITO yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin şema.⁸⁸

Table 3 Determination of alpha-SYN concentrations in CSF samples with the developed neurobiosensor system

	CSF number	Content of alpha-SYN in the CSF (pg mL ⁻¹)	The addition content (pg mL ⁻¹)	The detection content (pg mL ⁻¹ , n = 3)	RSD (% , n = 3)	Recovery (%)
Healthy individuals	1	942	25	999.17/990.70/943.22	3.084	101.1
			500	1457.7/1425/1415.9	1.534	99.4
	2	497.9	25	515.5/533.1 /500.5	3.161	98.7
			500	1000.3 /992 /1021	1.486	100.6
	3	403.5	25	415.5 /422.3/417.7	0.816	104
			500	915/918.1/909.4	0.51	102
	4	102	25	137.2/145/148.2	3.967	116
			500	590/585.5/584	0.566	99.6
Patients with Parkinson's disease	1	2555	25	2540.5/2512.3/2440	2.075	96.81
			500	3222/3119/3005.5	3.475	101.98
	2	3947.7	25	3950.5/3922 /3888.8	0.787	98.68
			500	4623.8 /4502 /4871.7	4.037	104.9
	3	3726	25	3666.6 /3730.5/3741	1.084	98.98
			500	4410/4333.8/4179	2.732	101.93
	4	3993.5	25	4010.5/4000.7/3954.2	0.754	99.26
			500	4663/4557.7/4605.5	1.144	102.56

ŞEKİL 6: Geliştirilen ITO temelli biyosensör ile sağlıklı ve Parkinson hastası bireylerde SYN tayini.¹⁰⁶

ler analitik tekniklerin de metamorfozuna yol açmaktadır. Aslında bu metamorfoz bilimin ve teknolojinin de doğal bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Sahneye çıktıkları 1950'li yıllarda çok daha basit konfigürasyonlara sahip olan oksijen elektrodu ile üretilen biyosensörlerden, günümüzde deri altına yerleştirilebilen, uydu bağlantısı ile veri akışının sağlandığı minyatürize ve ileri teknolojiye sahip biyoalgılama sistemlerine ulaşmış durumdayız. Analiz yöntemlerindeki bu gelişmelerin en önemli diğer bir itici gücü de aslında hastalıkların metabolik karakterizasyonları hakkında çok daha fazla bilgiye sahip olmamızdır. Bu bilgi vasıtasıyla, hem teşhiste hem de tedavide farklı alternatifleri kullanmak, geliştirmek ve günlük hayatımıza geçirmek mümkün hale gelmiştir. Özellikle modern tekniklerle gerçekleştirilen kanser araştırmalarından elde edilen önemli bilgiler ışığında farklı kanser türlerinin erken tanısı için yeni, etkili ve hassas biyosensör sistemleri geliştirilebilmiştir. Bunların çoğu araştırma amaçlı yapılmış olsa da, bir kısmı ticarileştirilmiş ve klinik biyokimya laboratuvarlarında, hasta başı analizlerde, sahada ve bireysel amaçlı kullanımla hayatımıza girmiştir. Yukarıdaki kısımlarda da detaylı bir şekilde anlatıldığı üzere biyosensörlerin en önemli bileşenleri, biyoreseptörün immobilize edildiği çalışma elektrotudur. Yeterince elektriksel iletken olabilen birçok malzeme çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır. Özellikle elektrokimyasal biyosensörler alanında oldukça sık kullanılmış, camsı karbon, altın ya da platin gibi katı elektrotlar birçok dezavantajından dolayı artık özellikle biyosensör araştırmalarında tercih edilmemektedirler. Bu tür katı elektrotların en önemli dezavantajları tekrar kullanımda, aynı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip bir yüzey elde etmenin oldukça zor

oluşudur. Elektrot yüzeyinde özellikle kovalent modifikasyonların yapıldığı bir proseste, bu durum çok daha önemli hale gelebilmektedir. Çünkü kovalent modifikasyon genellikle elektrot materyali üzerinden gerçekleştirildiği için yüzeyde geri dönüşü olmayan kimyasal izler bırakabilmektedir. Bu da herhangi bir temizlik işlemiyle giderilememektedir. Daha da önemlisi bu etki, geliştirilmesi planlanan biyosensörün tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğine de mutlaka olumsuz bir şekilde yansımaktadır. Bu husus tek kullanımlık elektrotlarda değerlendirildiğinde, bu tür elektrotların neden ticarileştirilebilme potansiyelinin yüksek olduğunu da gözler önüne sermektedir. Çünkü bu tür kullan-at elektrotların kolay hazırlanma proseslerine sahip olmaları, genellikle yüzey temizliği gibi ön işleme ihtiyaç duymamaları sebebiyle ticarileştirmeye en uygun elektrot olmalarını sağlamıştır. Zaten ticari biyosensörler incelendiğinde hemen tamamının kullan-at temelli sistemler olduğu da anlaşılmaktadır. Katı elektrotların maliyetleri de tek kullanımlık elektrot materyalleri ile karşılaştırılamayacak kadar yüksektir. Katı elektrotlarla üretilen biyosensör sistemlerindeki önemli diğer dezavantaj da, özellikle immünosensörlerde karşılaşılan, dar doğrusal tayin aralığıdır. Çoğu zaman 10-100 aralığında değişen dar tayin aralıkları ile karşılaşılmaktadır. Oysaki tek kullanımlık elektrotlar ile hazırlanan biyosensörlerde 2000-5000 kat aralığında doğrusal analize imkân verebilen sistemler rapor edilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi geliştirilen tüm sistemlerin hedef analitlerine karşı çok yüksek hassasiyette ve doğrulukta analize imkân verdiği, bununla birlikte tüm sistemler ile oldukça düşük LOD ve LOQ değerlerine ulaşılabildiği de anlaşılmaktadır. Gele-

neksel katı elektrotlarla elde edilemeyecek bir diğer kazanım ise kullan-at elektrotlar ile minyatürize sistemlerin çok daha kolay entegre edilebilmesi ve böylelikle portatif

analiz sistemlerinin geliştirilebilmesi imkanındır. Bu gibi durumlar özellikle ekonomik imkânları ve yetişmiş insan gücünün kısıtlı olduğu ülkeler için hayati öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

1. Sonuç MN, Sezgintürk MK. Ultrasensitive electrochemical detection of cancer associated biomarker HER3 based on anti-HER3 biosensor. *Talanta*. 2014;120:355-61. doi: 10.1016/j.talanta.2013.11.090
2. Elshafey R, Tavares AC, Sijaj M, Zourob M. 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*. 2013;50:143-9. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.063.
3. Lin CW, Wei KC, Liao SS, Huang CY, Sun CL, Wu PJ, et al. A reusable magnetic graphene oxide-modified biosensor for vascular endothelial growth factor detection in cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron*. 2015;67:431-7. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.080.
4. Wang Z, Liu N, Ma Z. Platinum porous nanoparticles hybrid with metal ions as probes for simultaneous detection of multiplex cancer biomarkers. *Biosens Bioelectron*. 2014;53:324-9. doi: 10.1016/j.bios.2013.10.009.
5. Yang L, Zhao H, Fan S, Deng S, Lv Q, Lin J, et al. Label-free electrochemical immunosensor based on gold-silicon carbide nanocomposites for sensitive detection of human chorionic gonadotrophin. *Biosens Bioelectron*. 2014;57:199-206. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.019.
6. Rezaei B, Majidi N, Rahmani H, Khayamian T. Electrochemical impedimetric immunosensor for insulin like growth factor-1 using specific monoclonal antibody-nanogold modified electrode. *Biosens Bioelectron*. 2011;26(5):2130-4. doi: 10.1016/j.bios.2010.09.020.
7. Salimi A, Kavosi B, Fathi F, Hallaj R. Highly sensitive immunosensing of prostate-specific antigen based on ionic liquid-carbon nanotubes modified electrode: application as cancer biomarker for prostate biopsies. *Biosens Bioelectron*. 2013;42:439-46. doi: 10.1016/j.bios.2012.10.053.
8. Lu W, Cao X, Tao L, Ge J, Dong J, Qian W. A novel label-free amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen based on Ag nanoparticle decorated infinite coordination polymer fibres. *Biosens Bioelectron*. 2014;57:219-25. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.027.
9. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Selective and ultrasensitive electrochemical immunosensing of NSE cancer biomarker in human serum using epoxy-substituted poly (pyrrole) polymer modified disposable ITO electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020;306:127613. DOI:10.1016/j.snb.2019.127613.
10. Aydın EB, Sezgintürk MK. An impedimetric immunosensor for highly sensitive detection of IL-8 in human serum and saliva samples: a new surface modification method by 6-phosphonohexanoic acid for biosensing applications. *Anal Biochem*. 2018;554:44-52. doi: 10.1016/j.ab.2018.05.030.
11. Simsek CS, Teke M, Sezgintürk MK. An ITO based disposable biosensor for ultrasensitive analysis of retinol binding protein. *Electroanalysis*. 2014;26(2):328-39. <https://doi.org/10.1002/elan.201300443>.
12. Sonuç Karaboğa MN, Sezgintürk MK. Determination of C-reactive protein by PAMAM decorated ITO based disposable biosensing system: a new immunosensor design from an old molecule. *Talanta*. 2018;186:162-8. doi: 10.1016/j.talanta.2018.04.051.
13. Demirbakan B, Kemal Sezgintürk M. A novel ultrasensitive immunosensor based on disposable graphite paper electrodes for troponin T detection in cardiovascular disease. *Talanta*. 2020;213:120779. doi: 10.1016/j.talanta.2020.120779.
14. Aydın M, Aydın EB, Sezgintürk MK. A highly selective poly(thiophene)-graft-poly(methacrylamide) polymer modified ITO electrode for neuron specific enolase detection in human serum. *Macromol Biosci*. 2019;19(8):e1900109. doi: 10.1002/mabi.201900109.
15. Sonuç Karaboga MN, Sezgintürk MK. Analysis of Tau-441 protein in clinical samples using rGO/AuNP nanocomposite-supported disposable impedimetric neuro-biosensing platform: Towards Alzheimer's disease detection. *Talanta*. 2020;219:121257. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121257.
16. Özcan B, Sezgintürk MK. Highly sensitive and cost-effective ITO-based immunosensor system modified by 11-CUTMS: Analysis of SOX2 protein in real human serum. *Int J Biol Macromol*. 2019;130:245-52. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.112.
17. Demirbakan B, Sezgintürk MK. A novel electrochemical immunosensor based on disposable ITO-PET electrodes for sensitive detection of PAK 2 antigen. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2019;848:113304. doi: 10.1016/j.jelechem.2019.113304.
18. Özcan B, Sezgintürk MK. A novel and disposable GP- based impedimetric biosensor using electropolymerization process with PGA for highly sensitive determination of leptin: early diagnosis of childhood obesity. *Talanta*. 2021;225:121985. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121985.
19. Sonuç Karaboğa MN, Sezgintürk MK. A nano-composite based regenerative neuro biosensor sensitive to Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 in cerebrospinal fluid and saliva. *Bioelectrochemistry*. 2021;138:107734. doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107734.
20. Demirbakan B, Kemal Sezgintürk M. An impedimetric biosensor system based on disposable graphite paper electrodes: detection of ST2 as a potential biomarker for cardiovascular disease in human serum. *Anal Chim Acta*. 2021;1144:43-52. doi: 10.1016/j.aca.2020.12.001.
21. Uludag I, Sezgintürk MK. An ultrasensitive electrochemical immunosensor platform based on disposable ITO electrode modified by 3-CPTMS for early detection of parathyroid hormone. *Turkish Journal of Chemistry*. 2019;43(6):1697-710. DOI:10.3906/kim-1909-44.
22. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Highly selective and sensitive sandwich immunosensor platform modified with MUA-capped GNPs for detection of spike Receptor Binding Domain protein: A precious marker of COVID 19 infection. *Sens Actuators B Chem*. 2021;345:130355. doi: 10.1016/j.snb.2021.130355.
23. Ince B, Sezgintürk MK. A high sensitive and cost-effective disposable biosensor for adiponectin determination in real human serum samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021;328:129051. Doi: 10.1016/j.snb.2020.129051.
24. Özcan B, Sezgintürk MK. Highly sensitive and single-use biosensing system based on a gp electrode for analysis of adiponectin, an obesity biomarker. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(8):3658-68. doi: 10.1021/acsbmaterials.1c00094.
25. Tarimeri N, Sezgintürk MK. A high sensitive, reproducible and disposable immunosensor for analysis of SOX2. *Electroanalysis*. 2020;32(5):1065-74. <https://doi.org/10.1002/elan.201900557>.

26. Uludağ İ, Sezgintürk MK. A direct and simple immobilization route for immunosensors by CNBr activation for covalent attachment of anti-leptin: obesity diagnosis point of view. *3 Biotech.* 2022;12(1):33. doi: 10.1007/s13205-021-03096-w.
27. Adams RN. Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry.* 1958;30(9):1576. <https://doi.org/10.1021/ac60141a600>.
28. Švancara I, Vyřas K, Kalcher K, Walcarius A, Wang J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis.* 2009;21(1):7-28. <https://doi.org/10.1002/elan.200804340>.
29. Kalcher K, Kauffmann JM, Wang J, Švancara I, Vyřas K, Neuhold C, et al. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: a review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis.* 1995;7(1):5-22. <https://doi.org/10.1002/elan.1140070103>.
30. Jashari G, Svancara I, Sýs M. Characterisation of carbon paste electrodes bulk-modified with surfactants for measurements in nonaqueous media. *Electrochimica Acta.* 2022;140047. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140047>.
31. Karimi-Maleh H, Arotiba OA. Simultaneous determination of cholesterol, ascorbic acid and uric acid as three essential biological compounds at a carbon paste electrode modified with copper oxide decorated reduced graphene oxide nanocomposite and ionic liquid. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2020;560:208-12. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.10.007>.
32. Li G, Wan C, Ji Z, Wu K. An electrochemical sensor for Cd²⁺ based on the inducing adsorption ability of I-. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2007;124(1):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.11.033>.
33. Stefan RI, Bairu SG. Monocrystalline diamond paste-based electrodes and their applications for the determination of Fe(II) in vitamins. *Anal Chem.* 2003;75(20):5394-8. doi: 10.1021/ac026300b.
34. Miranda-Hernandez M, Rincon ME, Gonzalez I. Characterization of carbon-fullerene-silicone oil composite paste electrodes. *Carbon.* 2005;43(9):1961-7. DOI:10.1016/j.carbon.2005.03.004.
35. He JB, Lin XQ, Pan J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis.* 2005;17(18):1681-6. DOI:10.1002/elan.200503274.
36. Rivas GE, Rubianes ME, Pedano ME, Ferreyra NE, Luque GE, Rodríguez ME, et al. Carbon nanotubes paste electrodes. A new alternative for the development of electrochemical sensors. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis.* 2007;19(7-8):823-31. DOI:10.1002/elan.200603778.
37. Adams RN. Carbon paste electrodes: a review. *Review of Polarography (Kyoto, Japan).* 1963;11:71-8.
38. Okada T, Takahashi F, Jin J, Tatsumi H. Electrochemical Properties of Carbon Paste Electrodes Modified with Fluorinated Materials. *Electrochemistry.* 2021;89:100-3. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.20-65150>.
39. Grygar T, Marken F, Schröder U, Scholz F. Electrochemical analysis of solids. Collection of Czechoslovak Chemical Communications. 2002;67(2):163-208. DOI:10.1135/cccc20020163.
40. Sanghavi BJ, Srivastava AK. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode. *Electrochimica Acta.* 2010;55(28):8638-48. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.07.093>.
41. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A, et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018;362:k3519. doi: 10.1136/bmj.k3519.
42. Shamspur T, Biniiaz Z, Mostafavi A, Torkzadeh-Mahani M, Mohamadi M. An electrochemical immunosensor based on poly (thionine)-modified carbon paste electrode for the determination of prostate specific antigen. *IEEE Sensors Journal.* 2018;18(12):4861-8. DOI: 10.1109/JSEN.2018.2832083.
43. -Hasanzadeh M, Shadjou N. Electrochemical nanobiosensing in whole blood: recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2016;80:167-76. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.018>.
44. Diaconu I, Cristea C, Hârceagă V, Marrazza G, Berindan-Neagoe I, Săndulescu R. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. *Clin Chim Acta.* 2013;425:128-38. doi: 10.1016/j.cca.2013.07.017.
45. Wang W, Li S, Zhang G, He J, Ma Z. Electrochemical immunoassay for breast cancer markers CA153 determination based on carbon nanotubes modified electrode *International Journal of Electrochemical Science.* 2017;12(11):10791-9. doi: 10.20964/2017.11.41.
46. Sarasqueta AF, Forte G, Corver WE, de Miranda NF, Ruano D, van Eijk R, et al Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:277. doi: 10.1186/1471-2407-13-277.
47. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):295-308. doi: 10.1038/nrc2109. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2007;7(7):563.
48. Gugoasa LA, Stefan-van Staden RI, Al-Ogaidi AJM, Stanciu-Gavan C, van Staden JF, Rosu MC, et al. Molecular recognition of colon cancer biomarkers: P53, KRAS and CEA in whole blood samples. *Journal of the Electrochemical Society.* 2017;164(9):B443-B7. DOI:10.1149/2.1191709jes.
49. David IG, Popa DE, Buleandra M. Pencil graphite electrodes: a versatile tool in electroanalysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1905968>.
50. Vural T, Yaman YT, Ozturk S, Abaci S, Denkbaz EB. Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2018;510:318-26. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.09.079>.
51. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(11):460-5. doi: 10.1016/j.tibs.2012.08.003.
52. Quiat D, Olson EN. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest.* 2013;123(1):11-8. doi: 10.1172/JCI62876.
53. Dickey LL, Hanley TM, Huffaker TB, Ramstead AG, O'Connell RM, Lane TE. MicroRNA 155 and viral-induced neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2017;308:17-24. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.01.016.
54. Qiu L, Tan EK, Zeng L. microRNAs and neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2015;888:85-105. doi: 10.1007/978-3-319-22671-2_6.
55. Fabris L, Ceder Y, Chinnaiyan AM, Jenster GW, Sorensen KD, Tomlins S, et al. The potential of MicroRNAs as prostate cancer biomarkers. *Eur Urol.* 2016;70(2):312-22. doi: 10.1016/j.eururo.2015.12.054.
56. Li J, Tan S, Kooger R, Zhang C, Zhang Y. MicroRNAs as novel biological targets for detection and regulation. *Chemical Society Reviews.* 2014;43(2):506-17. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3CS60312A>.
57. Yammouri G, Mandli J, Mohammadi H, Amine A. Development of an electrochemical label-free biosensor for microRNA-125a detection using pencil graphite electrode modified with different carbon nanomaterials. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2017;806:75-81. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.10.012>.
58. Mandli J, Mohammadi H, Amine A. Electrochemical DNA sandwich biosensor based on enzyme amplified microRNA-21 detection and gold nanoparticles. *Bioelectrochemistry.* 2017;116:17-23. doi: 10.1016/j.bioelechem.2017.03.002.

59. Usmani A, Shoro AA, Memon Z, Hussain M, Rehman R. Diagnostic, prognostic and predictive value of MicroRNA-21 in breast cancer patients, their daughters and healthy individuals. *Am J Cancer Res.* 2015;5(8):2484-90.
60. Taleat Z, Khoshroo A, Mazloum-Ardakani M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review. *Microchimica Acta.* 2014;181(9-10):865-91. DOI:10.1007/s00604-014-1181-1.
61. Del Carlo M, Di Marcello M, Perugini M, Ponzielli V, Sergi M, Mascini M, et al. Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbon detection. *Microchimica Acta.* 2008;163(3-4):163-9. DOI:10.1007/s00604-008-0009-2.
62. Wisitsoraat A, Pakapongpan S, Sriprachubwong C, Phokharatkul D, Sritongkham P, Lomas T, et al. Graphene-PEDOT: PSS on screen printed carbon electrode for enzymatic biosensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2013;704:208-13. DOI:10.1016/j.jelechem.2013.07.012.
63. Ibáñez-Redín G, Wilson D, Gonçalves D, Oliveira ON Jr. Low-cost screen-printed electrodes based on electrochemically reduced graphene oxide-carbon black nanocomposites for dopamine, epinephrine and paracetamol detection. *J Colloid Interface Sci.* 2018;515:101-8. doi: 10.1016/j.jcis.2017.12.085.
64. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(4):252-71. doi: 10.3322/caac.21235.
65. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33(3):266-70. doi: 10.1016/j.ejso.2006.10.004.
66. Ibáñez-Redín G, Furuta RHM, Wilson D, Shimizu FM, Materon EM, Arantes LMRB, et al. Screen-printed interdigitated electrodes modified with nanostructured carbon nano-onion films for detecting the cancer biomarker CA19-9. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;99:1502-8. doi: 10.1016/j.msec.2019.02.065.
67. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.
68. Mittal S, Kaur H, Gautam N, Mantha AK. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens Bioelectron.* 2017;88:217-31. doi: 10.1016/j.bios.2016.08.028.
69. Hasanzadeh M, Shadjou N, de la Guardia M. Early stage screening of breast cancer using electrochemical biomarker detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2017;91:67-76. DOI: 10.1016/j.trac.2017.04.006.
70. Freitas M, Nouws HP, Delerue-Matos C. Electrochemical sensing platforms for HER2-ECD breast cancer biomarker detection. *Electroanalysis.* 2019;31(1):121-8.
71. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(5):335-44. doi: 10.1186/bcr78.
72. AHIRWAR R, DALAL A, SHARMA JG, YADAV BK, NAHAR P, KUMAR A, et al. An aptasensor for rapid and sensitive detection of estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116(1):227-33. doi: 10.1002/bit.26819.
73. Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2016;82:286-306. DOI:10.1016/j.trac.2016.06.006.
74. Wong R, Tse H. *Lateral Flow Immunoassay.* 1st ed. New York: Springer Science & Business Media; 2008.
75. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM. Devices (uPADs)-are a new platform designed for ASSURED. *Anal Chem.* 2010;82:3-10.
76. Liu B, Du D, Hua X, Yu XY, Lin Y. Paper-based electrochemical biosensors: from test strips to paper-based microfluidics. *Electroanalysis.* 2014;26(6):1214-23. DOI:10.1002/elan.201400036.
77. Lee VBC, Mohd-Naim NF, Tamiya E, Ahmed MU. Trends in paper-based electrochemical biosensors: from design to application. *Anal Sci.* 2018;34(1):7-18. doi: 10.2116/analsci.34.7.
78. Ge S, Zhang L, Zhang Y, Liu H, Huang J, Yan M, et al. Electrochemical K-562 cells sensor based on origami paper device for point-of-care testing. *Talanta.* 2015;145:12-9. doi: 10.1016/j.talanta.2015.05.008
79. Ma C, Li W, Kong Q, Yang H, Bian Z, Song X, et al. 3D origami electrochemical immunodevice for sensitive point-of-care testing based on dual-signal amplification strategy. *Biosens Bioelectron.* 2015;63:7-13. doi: 10.1016/j.bios.2014.07.014.
80. Zheng X, Li L, Cui K, Zhang Y, Zhang L, Ge S, et al. Ultrasensitive enzyme-free biosensor by coupling cyclodextrin functionalized Au nanoparticles and high-performance Au-paper electrode. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2018;10(4):3333-40. https://doi.org/10.1021/acssami.7b17037.
81. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature.* 2006;442(7101):368-73. doi: 10.1038/nature05058.
82. Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:261-86. doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.
83. Chen S, Shamsi MH. Biosensors-on-chip: a topical review. *Journal of Micromechanics and Microengineering.* 2017;27(8):083001.
84. Brivio M, Verboom W, Reinhoudt DN. Miniaturized continuous flow reaction vessels: influence on chemical reactions. *Lab Chip.* 2006;6(3):329-44. doi: 10.1039/b510856j.
85. Guo MT, Rotem A, Heyman JA, Weitz DA. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a Chip.* 2012;12(12):2146-55.
86. Alves PU, Vinhas R, Fernandes AR, Birol SZ, Trabzon L, Bernacka-Wojcik I, et al. Multifunctional microfluidic chip for optical nanoprobe based RNA detection - application to Chronic Myeloid Leukemia. *Sci Rep.* 2018;8(1):381. doi: 10.1038/s41598-017-18725-9.
87. Ceylan O, Mishra GK, Yazici M, Qureshi A, Niazi JH, Gurbuz Y. A handheld point-of-care biosensor device for detection of multiple cancer and cardiac disease biomarkers using interdigitated capacitive arrays. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst.* 2018;12(6):1440-9. doi: 10.1109/TBCAS.2018.2870297.
88. Ghreera AS, Pandey CM, Malhotra BD. Multiwalled carbon nanotube modified microfluidic-based biosensor chip for nucleic acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2018;266:329-36. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.118.
89. Aydın EB, Sezgintürk MK. Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2017;97:309-15. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.021.
90. Badeker K. Electrical conductivity and thermo-electromotive force of some metallic compounds. *Ann Phys.* 1907;22:749.
91. Khondoker MAH, Yang SY, Mun SC, Kim J. Flexible and conductive ITO electrode made on cellulose film by spin-coating. *Synthetic Metals.* 2012;162(21-22):1972-6. DOI:10.1016/j.synthmet.2012.09.005.
92. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Highly sensitive electrochemical immunosensor based on polythiophene polymer with densely populated carboxyl groups as immobilization matrix for detection of interleukin 1 β in human serum and saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2018;270:18-27. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.014.

93. Aydın EB, Sezgintürk MK. A disposable and ultrasensitive ITO based biosensor modified by 6-phosphonoheptanoic acid for electrochemical sensing of IL-1 β in human serum and saliva. *Anal Chim Acta*. 2018;1039:41-50. doi: 10.1016/j.aca.2018.07.055.
94. Sonuç Karaboğa MN, Sezgintürk MK. A novel silanization agent based single used biosensing system: Detection of C-reactive protein as a potential Alzheimer's disease blood biomarker. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;154:227-35. doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.016.
95. Özcan B, Sezgintürk MK. A novel label free immunosensor based on single-use ITO-PET electrodes for detection MAGE1 protein. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2017;792:31-8. doi: 10.1016/j.jelechem.2017.03.036.
96. Demirbakan B, Sezgintürk MK. A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1. *Talanta*. 2017;169:163-9. doi: 10.1016/j.talanta.2017.03.07.
97. Sonuç Karaboğa MN, Şimşek ÇS, Sezgintürk MK. AuNPs modified, disposable, ITO based biosensor: Early diagnosis of heat shock protein 70. *Biosens Bioelectron*. 2016;84:22-9. doi: 10.1016/j.bios.2015.08.044.
98. Singh C, Srivastava S, Ali MA, Gupta TK, Sumana G, Srivastava A, et al. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013;185:258-64. DOI: 10.1016/j.snb.2013.04.040.
99. Penu R, Obreja AC, Patroi D, Diaconu M, Radu GL. Graphene and gold nanoparticles based reagentless biodevice for phenolic endocrine disruptors monitoring. *Microchemical Journal*. 2015;121:130-5. DOI: 10.1016/j.microc.2015.03.002.
100. Ballesteros CA, Cancino J, Marangoni VS, Zucolotto V. Nanostructured Fe₃O₄ satellite gold nanoparticles to improve biomolecular detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;198:377-83. DOI:10.1016/j.snb.2014.03.079.
101. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Electrochemical immunosensor based on chitosan/conductive carbon black composite modified disposable ITO electrode: an analytical platform for p53 detection. *Biosens Bioelectron*. 2018;121:80-9. doi: 10.1016/j.bios.2018.09.008.
102. Kelly NJ, Varga JFA, Specker EJ, Romeo CM, Coomber BL, Uniacke J. Hypoxia activates cadherin-22 synthesis via eIF4E2 to drive cancer cell migration, invasion and adhesion. *Oncogene*. 2018;37(5):651-62. doi: 10.1038/onc.2017.372.
103. Martín-Sánchez E, Mendaza S, Ulazia-Garmendia A, Monreal-Santesteban I, Córdoba A, Vicente-García F, et al. CDH22 hypermethylation is an independent prognostic biomarker in breast cancer. *Clinical Epigenetics*. 2017;9(1):7. DOI:10.1186/s13148-016-0309-z.
104. Piche B, Khosravi S, Martinka M, Ho V, Li G. CDH22 expression is reduced in metastatic melanoma. *Am J Cancer Res*. 2011;1(2):233-9.
105. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Ultrasensitive determination of cadherin-like protein 22 with a label-free electrochemical immunosensor using brush type poly (thiophene-g-glycidylmethacrylate) modified disposable ITO electrode. *Talanta*. 2019;200:387-97. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.082>.
106. Karaboğa MNS, Sezgintürk MK. Cerebrospinal fluid levels of alpha-synuclein measured using a poly-glutamic acid-modified gold nanoparticle-doped disposable neuro-biosensor system. *Analyst*. 2019;144(2):611-21. DOI:10.1039/c8an01279b.