

***İN VİTRO* DİYAGNOSTİK SİSTEMLERDE
KULLANILMAK ÜZERE YENİ NESİL ELEKTROTLARIN
TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ**

**DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEW GENERATION
ELECTRODES FOR USE IN *İN VİTRO* DIAGNOSTIC
SYSTEMS**

SOHEIL MALEKGHASEMI

PROF. DR. SERDAR ABACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Sevgili Aileme ...

ÖZET

***İN VİTRO* DİYAGNOSTİK SİSTEMLERDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ NESİL ELEKTROTLARIN TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ**

Soheil MALEKGHASEMI

Doktora, BİYOMÜHENDİSLİK Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar ABACI

Eş Danışman: Prof. Dr. Nagihan UĞURLU

Aralık 2020, 128 sayfa

Bu çalışmada, in vitro diyagnostik sistem uygulamaları için altın ve elmas benzeri karbon (DLC) ince film özelliklerine sahip elektrotların ilk kez üretilmesi amaçlanmıştır. Çok fonksiyonlu yüzey ve yığın özelliklerine sahip, iletken altın nanoağ bağlı elmas benzeri karbon nanofilm (CGN-DLC) elektrotların hazırlanması için kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) yöntemi kullanılmıştır. Geliştirilen nanofilmlerin nispeten yüksek bir sp^3 karbon dağılımına, $1,4 \times 10^3 \text{ S.cm}^{-1}$ elektrik iletkenliğine ve 1,42 eV ve 3,87 eV optik bant aralıklarına sahip oldukları bulunmuştur. Azalan tam yansıma-fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) analizleri, DLC yüzeyinde karboksilik asit fonksiyonel gruplarının varlığını ortaya çıkarmıştır. CGN-DLC nanofilmlerinin kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesinde yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), X-ışını kırınımı (XRD), RAMAN spektroskopisi, dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EİS) kullanılmıştır. TEM ve SEM analizleri, CGN-DLC nanofilmlerini üretmek için trisodyum sitrat ve altın nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde kullanıldığını göstermiştir. XRD spektrumundan, altın nanoağ yapısına ait Au (111), Au (200), Au (220) ve Au (311) pikleri ve DLC

yapısına ait C (002), C (032) ve C (111) pikleri belirlenmiştir. RAMAN spektroskopisi elmas benzeri karbon yapının D ve G bandı piklerini sırasıyla $1388,6 \text{ cm}^{-1}$ ve $1568,0 \text{ cm}^{-1}$ konumlarında göstermiştir. DLC filminin sp^3 içeriği de yaklaşık % 30 bulunmuştur. CV ve EİS, CGN-DLC nanofilmlerinin biyosensör uygulamalarında etkili modifiye edici ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Sunulan tez kapsamında, zararlı kimyasallar veya fiziksel yöntemler kullanılmadan CGN-DLC nanofilmlerinin elde edilmesi için sürdürülebilir bir yöntem gösterilmiştir. CGN-DLC nanofilm performansını değerlendirmek için, sentezlenen nanofilm kalem grafit elektrot (PGE) üzerine modifiye edilmiş ve prostat kanseri biyobelirteci olan miRNA-410-5p'nin hassas ve seçici olarak elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan biyosensör platform üzerinde herhangi bir amplifikasyon ve/veya etiketleme işlemi kullanılmamıştır. Hazırlanan biyosensör platformu, 0,3 fM ile 100 fM doğrusal aralığı ve 0,27 fM'lik bir tayin sınırı (LOD) ile diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemi kullanılarak hedef miRNA'ları saptamıştır. Sonuç olarak, sentezlenen CGN-DLC nanofilminin biyo/sensörler, fotovoltailer, transistörler, amplifikatörler, enerji depolama unsurları ve biyomedikal gibi geniş uygulama alanlarında kullanılması gelecek çalışmalarda beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Elmas benzeri karbon, altın nanoağ, kendiliğinden düzenlenme, ince film, elektrot, elektrokimyasal biosensör, miRNA.

ABSTRACT

DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEW GENERATION ELECTRODES FOR USE IN *IN VITRO* DIAGNOSTIC SYSTEMS.

Soheil MALEKGHASEMI

Doctor of Philosophy, Department of BIOENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Serdar ABACI

Co- Supervisor: Prof. Dr. Nagihan UGURLU

December 2020, 128 pages

This study aims to fabricate electrodes with properties of both gold and diamond-like carbon (DLC) thin films for in vitro diagnostic system applications for the first time. A specific self-assembly method was used to prepare conductive gold nanonetwork bonded diamond-like carbon nanofilm (CGN-DLC) electrodes with multifunctional surface and bulk properties. The nanofilms possessed a relatively high sp³ carbon fraction, a high electrical conductivity ($1,4 \times 10^3 \text{ S.cm}^{-1}$) and optical band gaps of 1,42 eV and 3,87 eV. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) revealed the presence of carboxylic acid functional groups on the DLC surface. High-resolution transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), RAMAN spectroscopy, cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to help qualitative and quantitative assessing of CGN-DLC nanofilms. TEM and SEM analyzes demonstrated the successful use of trisodium citrate and gold nanoparticles to

produce CGN-DLC nanofilms. The XRD spectrum indicated the Au (111), Au (200), Au (220) and Au (311) peaks of the gold nanonetwork and the C (002), C (032) and C (111) peaks of the DLC structure. The RAMAN spectroscopy demonstrated the D and G band peaks of the diamond-like carbon structure at 1388.6 cm^{-1} and 1568.0 cm^{-1} , respectively. The sp^3 content of DLC film was found approximately 30 %, as well. CV and EIS demonstrated that CGN-DLC nanofilms can be used as effective electrodes in biosensor applications. In the presented thesis, a sustainable method is shown for obtaining CGN-DLC nanofilms without using harmful chemicals or physical methods. To evaluate the performance of CGN-DLC nanofilm, it was coated on a pencil graphite electrode (PGE) and used in an electrochemical biosensor for the sensitive detection of miR-NA-410-5p as a prostate cancer biomarker. No amplification and/or labeling process was used on this biosensor platform. The prepared biosensor platform was detected target miRNAs using differential pulse voltammetry (DPV) method with a linear range of 0.3 fM to 100 fM and a detection limit (LOD) of 0.27 fM. As such, the CGN-DLC nanofilm is expected to find wide application areas such as bio/sensors, photovoltaics, transistors, amplifiers, energy storage elements and biomedical.

Keywords: Diamond like carbon, gold Nanonetwork, self-assembly, thin film, electrode, electrochemical biosensor, miRNA.

TEŞEKKÜR

lisansüstü eğitim ve çalışmalarına kollarını açan Türkiye Cumhuriyeti ve kurucusu Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e,

Doktora eğitimim boyunca hoşgörü ve sabrını benden esirgemeyen ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Serdar ABACI'ya,

Tez çalışmalarım sırasında gösterdiği büyük ilgi ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Nagihan UĞURLU'ya,

17466 nolu proje ile çalışmayı destekleyen Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne,

Tez çalışmam süresince fikirleriyle çalışmalarına yön veren sayın hocalarım Prof. Dr. Nurullah ÇAĞIL, Doç. Dr. Filiz KURALAY, ve Dr. Öğr. Üyesi Cengiz UZUN'a,

Birlikte çalışırken çok şey öğrendiğim, çalıştığımız dönem içerisinde vermiş oldukları desteklerden ve yardımlarından dolayı Dr. Tayfun VURAL ve Dr. Öznur AKBAL VURAL'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK) çalışma arkadaşlarım; Dr. Öznur AKBAL VURAL, Dr. Cem Bayram, Dr. Gülçin BOLAT, Dr. Yeşim Tuğçe YAMAN, Dr. Esra Elif AYDIN DEDE, Neval Dicle SUNGUR, Ömer ARSLAN, ve Esin YILMAZ'a,

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışma arkadaşlarım; Dr. Ebru ERDAL, Veteriner Hekimler Barış BATUR ve Burak UZUNÖZ'e,

Son olarak tüm hayatım boyunca beni karşılıksız destekleyen güvenen, eğitimime devam etmem için beni cesaretlendiren ve bugünkü bulunduğum noktaya gelmemi sağlayan canım anneme, babama ve sevgili kardeşime,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. IVD Cihazların Küresel ve Türkiye Piyasa Araştırması	4
2.2. IVD Sistemler.....	5
2.2.1. Biyosensörler	6
2.2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler	7
2.2.2.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)	8
2.2.2.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV).....	9
2.2.2.3. Doğrusal Tarama Voltametri (LSV)	11
2.2.2.4. Kare Dalga Voltametri (SWV).....	12
2.2.2.5. Sıyırma Voltametri (SV)	13
2.3. Elmas benzeri Karbon Nanofilmler	14
2.4. Grafen ve Grafen benzeri Malzemeler.....	16
2.5. Altın Nanoparçacıklar.....	17
2.6. miRNA'ların Tayini ve Klinik Uygulamaları.....	18
2.6.1. miRNA Türleri ve Patolojilerdeki Fonksiyonları ve Rollerini.....	19
2.6.2. Prostat Kanseri.....	21
2.6.3. miRNA'lar için Geleneksel Tayin Yöntemleri	22
2.6.3.1. Elektrokimyasal Yaklaşımlar	23
2.7. Karakterizasyon Tekniklerinin Çalışma Prensipleri.....	26
2.7.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	26

2.7.2. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	27
2.7.3. Raman Spektroskopisi	28
2.7.4. X-ışını Difraktometri (XRD).....	29
2.7.5. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM).....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	32
3.1. Kimyasal Malzemeler	32
3.2. İletken Altın Nanoağ bağlı Elmas Benzeri Karbon Nanofilm'lerin Hazırlanması.....	32
3.2.1. Altın Nanoparçacıkların (AuNP'lar) Sentez Yöntemleri	33
3.2.2. CGN-DLC Nanofilmin Sentez Yöntemi.....	34
3.2.3. CGN-DLC Nanofilmin Sentez Mekanizması	35
3.3. Karakterizasyon Teknikleri.....	36
3.3.1. Dinamik Işık Saçılma (DLS)	36
3.3.2. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	36
3.3.3. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	37
3.3.4. Raman Spektroskopisi Analizleri	37
3.3.5. X-ışını Difraktometri (XRD) Analizi	37
3.3.6. Ultraviyole-Görünür (UV-Vis) Analizi	37
3.3.7. Elektron Mikroskopi Analizleri	37
3.3.8. CGN-DLC Nanofilmin Kalınlık Ölçümü	38
3.3.9. CGN-DLC Nanofilmlerinin Elektriksel Özellikleri.....	38
3.3.10. CGN-DLC Nanofilmlerinin Elektrokimyasal Analizi.....	39
3.4. miRNA Tayini için Elektrokimyasal Biyosensörün Geliştirilmesi.....	39
3.4.1. Kalem Grafit Elektrodun CGN-DLC Nanofilm ile Modifikasyonu	39
3.4.2. Yakalayıcı DNA Prob İmmobilizasyonu	40
3.4.3. miRNA-410-5p Hibridizasyonu	41
3.4.4. Serum Örneğinde ve Redoks Prob Solüsyonunda Elektrokimyasal Ölçümler	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Sentezlenen AuNP'lerin Boyut Analizi	42
4.2. Sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin	43
4.2.1. FTIR Analizi.....	43

4.2.2. XPS Analizi	45
4.2.3. Raman Spektroskopisi Çalışmaları	49
4.2.4. XRD Ölçümleri.....	50
4.2.5. Optik Bant Aralığı Tahmini	52
4.2.6. Elektron Mikroskop Analizleri	54
4.2.7. CGN-DLC Nanofilmin Kalınlık Ölçümü	60
4.2.8. CGN-DLC Nanofilmlerinin Elektriksel Özellikleri.....	62
4.3. miRNA Tayini için Tasarlanan Biyosensörün Elektrokimyasal Analizi ...	63
4.3.1. Hazırlanan CGN-DLC/PGE'nin Elektrokimyasal Karakterizasyonu .	63
4.3.2. Geliştirilen Biyosensörün miRNA ile Etkileşiminin İncelenmesi	65
4.3.3. miRNA Tayini için Geliştirilen Biyosensörün Diğer Elektrokimyasal Biyosensörler ile Karşılaştırılması	68
4.3.4. Geliştirilen Biyosensörün Tekrar Üretilebilirlik ve Kararlılık Çalışmaları	72
4.3.5. Geliştirilen Biyosensörün Seçicilik Çalışması	72
4.3.6. Geliştirilen Biyosensörün Gerçek Örnek Çalışması	73
5. YORUM	75
6. KAYNAKLAR	79
EKLER	95
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	95
EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	96
EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	97
ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Avrupa IVD piyasası gelirleri [20].....	5
Şekil 2.2. Biyosensör sistemlerinin prensibi	6
Şekil 2.3. (a) tek bir genel doğrusal voltaj taraması, (b) 2 mmol/L redoks probu ve 5 mmol/L KCl içeren bir PBS (pH 7,4, 0,05 mol/L) solüsyonunda farklı konsantrasyonlarda blaNDM-1 plazmid DNA'nın varlığında elektrokimyasal biyosensörlerin dönüşümlü voltamogramları, (c) modifiye edilmiş fabrikasyon prosesleriyle yapılan farklı elektrokimyasal biyosensörlerin 50 mV/s'lik bir tarama hızında dönüşümlü voltamogram taramaları, (a) PBS'de Au elektrot; (b) Au elektrot; (c) LNA; (d) MCH/LNA; (e) etkileşen maddeler/MCH/LNA; ve (f) PBS çözeltisi içinde bir blaNDM-1 / MCH / LNA ile modifiye edilmiş elektrot [58]. LNA: kilitli nükleik asit, MCH: 6-merkapt-1-hekzanol.....	9
Şekil 2.4. DPV'de (a) uyarma sinyalinin dalga şekli ve (b) akımlar arasındaki farktan elde edilen voltamogram ($\Delta i = E(t_2) - E(t_1)$).	11
Şekil 2.5. Tek yönlü gerilim taramasından elde edilen doğrusal tarama voltamogramı. 12	
Şekil 2.6. Kare dalga voltametri de gerilimin zamanla nasıl değiştiğinin şematik olarak gösterimi.	12
Şekil 2.7. Anodik sıyırma voltametrisi ile kadmiyum ve kurşunun kantitatif tayini.	14
Şekil 2.8. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresinin çalışma prensibi.	26
Şekil 2.9. XPS ve Fotoelektrik Etkinin temel prensibi.....	28
Şekil 2.10. Raman spektrometresinin ana bileşenlerinin şeması.	29
Şekil 2.11. X-ışını difraktometre cihazının şematik gösterimi.	30
Şekil 2.12. Temel TEM bileşenlerinin şematik gösterimi.	31
Şekil 3.1. CGN-DLC Nanofilmlerin sentez aşamaları.	34
Şekil 3.2. (a) Altın nanopartiküllerin sentez mekanizması, (b) elde edilen AuNP çözeltisinden CGN-DLC nanofilmlerin oluşum mekanizması.....	35
Şekil 3.3. CGN-DLC modifiye PGE'nin üretim sürecinin şematik gösterimi. CGN-DLC nanofilm kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile hazırlanmıştır; CGN-DLC filminin kompakt formu yüzey aktif madde kullanılarak hazırlanmıştır; ve daha sonra CGN-DLC filmi, PGE yüzeyine aktarılmıştır.	40
Şekil 4.1. II.yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin TEM görüntüsü.	43

Şekil 4.2. CGN-DLC nanofilmin FTIR spektrumu. Tek, iki ve üç-fonon bölgeleri elmas kristallerine aittir ve karşılaştırmak amacıyla eklenmiştir.....	44
Şekil 4.3. (a) Sentezlenmiş CGN-DLC ince filmin XPS genel tarama spektrumu. CGN-DLC ince filmlerinin yüksek çözünürlüklü C1s (b), O1s (c) ve Au4f (d) XPS spektrumları.....	48
Şekil 4.4. CGN-DLC nanofilmlerinin Raman spektrumu.	50
Şekil 4.5. Cam slayt (a) ve cam üzerine kaplanmış CGN-DLC naofilmlerin (b) XRD desenleri.....	51
Şekil 4.6. CGN-DLC nanofilmlerinin (a) UV-VIS absorpsiyon spektrumu (b) ve Tauc grafiği.	54
Şekil 4.7. (a-d) Sentezlenmiş CGN-DLC nanofilmin, (e) nanofilmin enine-kesitsel ve (f) Alüminyum folyo üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilminin SEM görüntüleri. (g-k) Filtre kağıdı üzerine kaplanmış nanofilmlerin EDX spektrumları, bileşimi ve haritalamaları.....	57
Şekil 4.8. CGN-DLC nanofilmlerinin sentezini değerlendirmek için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi. (a-e) Altın (Au) nanoparçacıkların sinterlenmesi ve çekirdeklenmesi münhasıran elmas benzeri karbon (DLC) nanofilminde meydana gelir.....	60
Şekil 4.9. Gwyddion programı kullanarak alüminyum folyo üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilmlerin kalınlık ölçümü.	61
Şekil 4.10. CGN-DLC nanofilminin akım-gerilim (I-V) karakteristik eğrisi.....	62
Şekil 4.11. CGN-DLC nanofilm modifikasyonu ile PGE elektrotun elektrokimyasal analizi. 5 mM [Fe (CN) $_6$] ^{3-/4-} (oran 1: 1) içeren 0,1M KCl solüsyonunda PGE ve CGN-DLC ile modifiye edilmiş PGE'nin CV (a) ve EİS (b) analizleri.....	65
Şekil 4.12. PGE, CGN-DLC/PGE, DNA/CGN-DLC/PGE ve miRNA/DNA/CGN-DLC/PGE elektrotlarının 5 mM [Fe (CN) $_6$] ^{3-/4-} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki voltamogramları.	66
Şekil 4.13. (A) DNA/ CGN-DLC/ PGE'nin farklı hedef miR-410 konsantrasyonları ile hibridizasyondan sonraki DPV'leri: (a) 0 fM, (b) 0,3 fM, (c) 3 fM, (d) 10 fM, (e) 30 fM, (f) 50 fM, (g) 100 fM. (B) Doğrusal kalibrasyon eğrisi (n=3, % 95 güven düzeyi).	68
Şekil 4.14. Hedef miRNA-410'un, hedef dışı miRNA-192 ve miRNA-200c'ye karşı seçicilik çalışması.	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kanser patobiyojisinde dolaşımdaki miRNA'ların fonksiyonu ve rolleri.	20
Çizelge 2.2. miRNA tayin yöntemlerinin başlıca avantajları ve dezavantajları.....	22
Çizelge 4.1. Sentezlenen AuNP'lerin boyut dağılımları ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) (n=3)	42
Çizelge 4.2. Filtre kağıdının XPS analizi.	45
Çizelge 4.3. CGN-DLC kaplı filtre kağıdı ve doğal CGN-DLC nanofilminin XPS analizi.	46
Çizelge 4.4. DLC filmlerin literatürdeki elektriksel direnci ve iletkenlikleri.	63
Çizelge 4.5. Herhangi bir amplifikasyon stratejisi kullanmadan miRNA tayini için geliştirilen farklı biyosensörlerin karşılaştırılması.	69
Çizelge 4.6. Amplifikasyon stratejileri kullanılarak miRNA tayini için önerilen farklı elektrokimyasal biyosensörlerle karşılaştırılması.....	70
Çizelge 4.7. miRNA tayini için farklı tayin yöntemlerinin karşılaştırılması.....	71
Çizelge 4.8. miRNA 410'un periferel serum ortamındaki geri kazanım çalışması.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	Absorbans
C	Işık hızı
$C60$	Bukminsterfuleren
d	Film kalınlığı
E	Enerji
E_g	Optik bant aralığı
$h\nu$	Gelen foton enerjisi
I	İletilen ışık
I_0	Gelen ışık
α	Absorpsiyon Katsayısı
λ	Fotonun dalga boyu
Ω	Ohm

Kısaltmalar

3DFC	Üç Boyutlu Yapı İskeletli Karbon
AuNP	Altın Nanoparçacık
CGN	İletken Altın Nanoağ
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
DLC	Elmas Benzeri Karbon
DLC	Dinamik Işık Saçılma
ECR-CVD	Elektron Siklotron Rezonans Plazma Kimyasal Buhar Biriktirme
FCVA	Filtrelenmiş Katodik Vakum Ark

FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GMD	Geçiş Metali Dikalkogenit
GNt	Grafen Nanotabakalar
GQD	Grafen Kuantum Noktaları
GR	Grafen
HPPMS	Yüksek Güçlü Darbeli Magnetron Püskürtme
HUVEC	İnsan Umbilikal Damar Endotel Hücreleri
IB	Doğrudan İyon Demeti
IBAD	İyon Demeti Destekli Biriktirme
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
IVD	<i>in vitro</i> Diyagnostik
LED	Işık Yayan Diyot
LFIA	Yanal Akışlı İmmünoanaliz
Me	Metal katkılı
PECVD	Plazma Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar Biriktirme
PIII	Plazma Daldırma İyon İmplantasyonu
PLD	Darbeli Lazer Birikimi
POC	Hasta Başı
PSA	Prostata Spesifik Antijen
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
RFMS	Radyo Frekans Magnetron Püskürtme
rGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
SERS	Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans

TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopisi
XPS	X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
XRD	X-ışını Difraktometri

1. GİRİŞ

Sağlık yatırımları son yıllarda önemli ölçüde artmaya devam etmektedir [1,2]. Böyle bir yatırım, iyileştirilmiş vektör kontrolü ile birlikte, tedavi ve yan etkinin azaltılması için yeni uygun maliyetli ve geçerli ilaç geliştirme buluşu tarafından sağlanan büyük hastalıklarla savaşmaya da odaklanmaktadır. Ayrıca, sağlık hizmetleri olarak prognozu ve hastalık evrelerini belirleme, tedaviyi izleme ve yayılmayı değerlendirmede gerekli olan teşhis alet talebi artmaktadır [3].

Moleküler tabanlı teşhis, hastalığın önlenmesi, tanımlanması ve tedavisi için kritik öneme sahiptir. Mevcut laboratuvar analizleri tüm hastalıkların % 70'inden fazlasında doğru tanıyı desteklemekte ve ilaç tedavisinin sürekli izlenmesine yardımcı olmaktadır [4]. Bu nedenle laboratuvardaki geleneksel tanı sistemi klinikte ve yerel genel uygulamada hayati bir bileşen olarak bilinmektedir. Ancak, klasik teşhis teknolojileri, emek-yoğun, zaman alıcı, pahalı ve iyi yetişmiş operatörler gerektiren karmaşık örnek saflaştırma ve karmaşık enstrümanlara dayandıkları için genişletilmiş test gereksinimini karşılamak için tamamen uygun değildir. Endüstri için temel zorluklardan biri hızlı, nispeten doğru, kullanımı kolay ve ucuz cihazların geliştirmesidir. Sonuç olarak, bu tür zorluklar sadece sağlık hizmetinin maliyetini ve ondan kaynaklı rahatsızlığını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda teşhis sonucu elde edilmeden hastaların tıbbi sistemden ayrılmasına neden olmaktadır [5]. Minimum laboratuvar ekipmanı ve operasyon eğitimi gerektiren daha hızlı ve daha doğru teşhis testleri, kaynak kısıtlı ülkelerde sağlık hizmetlerinin genişletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır [6].

Laboratuvar teşhisindeki gelişmiş verimliliğe ek olarak, doğrudan hasta yatağında, ayakta tedavi kliniklerinde veya kaza noktalarında, hasta başı (POC) sistemleri olarak adlandırılan merkezi olmayan bir teşhis yönünde eğilim olmuştur [7]. Yerinde veya minimum numune hazırlığı klinik örneklerin taşınması ve hazırlanmasından kaynaklanan gecikmeleri sınırlamaktadır. Böylece, daha kısa geri dönüş süresi hızlı klinik karar almaya yol açar ve ölümcül sonuçlara yol açmasını engeller. Ayrıca, örnek analizinde daha önceden bilgi sahibi olmak gerekmediği için hastalar minimum eğitim ile evde sağlık sonuçlarını kontrol etmek amacıyla gereken testleri yapabilirler [8].

İlk POC cihazı, idrar proteinini ölçmek için 1957'de geliştirilen bir idrar ölçüm çubuğu testidir [9]. Diyabetik izleme için glikoz ölçüm cihazları ve gebelik testleri için yanal akış cihazları şu anda POC moleküler tanısında en yaygın kullanılan cihazlardır. Bunlar POC testlerinin harika örnekleridir. Ancak, oldukça hassas ve yüksek verimli kantitatif ölçümler gerekliyse, bu cihazlar yeterli performansı gösteremeyebilirler.

Son yıllarda, bu gereksinimleri karşılamak için bazı teknolojiler ortaya çıkmıştır. Örneğin 1980'lerde önerilen yanal akışlı immünoanaliz (LFIA) cihazları, tasarım basitlikleri nedeniyle büyük ölçüde popülerliğini sürdürmektedir.

Plotz ve Singer, 1956'da LFIA için teknik temelin elde edildiği lateks aglütinasyon testini icat ettiler [10] ve aynı zamanda plaka bazlı immünoanaliz sistemleride geliştiriliyordu. Ayrıca, radyoimmünoanaliz, 1950'lerde Berson ve Yalow tarafından tasarlandı [11]. Radyoizotopları enzimlerle değiştiren, reaksiyon sürelerini kısaltan ve bir radyoimmünoanalizden daha yüksek özgüllük sağlayan enzim immünoanaliz, 1960'larda geliştirilmiştir. LFIA'nın temel ilkeleri 1980'lerde geliştirilmeye devam etmiş ve sonraki yıllarda sıkı bir şekilde oluşturuldu [12,13]. O zamandan beri, teknolojinin çeşitli yönlerinde en az 500 patent daha kaydedildi. Ayrıca, Becton Dickinson & Co. ve Unilever ve Carter Wallace gibi şirketler tarafından birkaç patent daha geliştirildi.

Katı faz hızlı test teknolojisinin erken gelişimini sağlayan en önemli uygulama, tıbbi teşhis amaçlı idrar testine olan tarihsel ilgiyi sürekli olarak sembolize eden insan gebelik testi idi. Bu özel test uygulaması, 1970'lerde büyük ölçüde Vaitukaitis ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalardan türetilen antikör üretim teknolojilerindeki gelişmeler sonucunda büyük adımlar attı [14–16]. Bununla birlikte, *in vitro* diyagnostik (IVD) cihazlar olarak adlandırılan tanı kitlerin bileşenlerinin birçoğu (nitroselüloz membran, antikör üretim ve işlem ekipmanı gibi teknolojiler) 1990'larda geliştirilmiştir ancak bileşenlerinin bir diğer kısmı yani algılama yüzeyi (ince film teknolojisi) hala önemli derecede etkili ve yeni gelişmelere ihtiyaç duymaktadır. İnce filmler, IVD sistemlerinin numune alma, biyolojik tanıma, amplifikasyon, transdüksiyon ve elektronik sinyal işleme alanlarında kullanıldıkları için önem taşımaktadırlar.

Sunulan tezin amacı, *in vitro* diyagnostik sistem uygulaması için basit ve etkili sentez yöntemi ile akıllı bir yüzeyin tasarlanması, üretilmesi ve daha sonra miRNA tayininde elektrokimyasal biyosensör olarak performansının değerlendirilmesine dayanmaktadır. Bunun için, iletken altın nanoağ bağlı elmas benzeri karbon (CGN-DLC) nanofilmden oluşan yeni akıllı hibrit yüzeyler araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, herhangi bir cihaz, vakum işleme ve zararlı kimyasallar kullanmadan esnek elektrotlar üretmek için ölçeklenebilir bir proses sağladığını göstermiştir. CGN-DLC nanofilmlerin kimyasal karakterizasyonu, DLC yüzeylerinde karboksilik asit fonksiyonel grupların mevcut olduğunu göstermiştir. Üretilen CGN-DLC nanofilmler elektrokimyasal biyo/sensörler, fotovoltailer, transistörler, amplifikatörler, enerji depolama elemanları ve biyomedikal gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

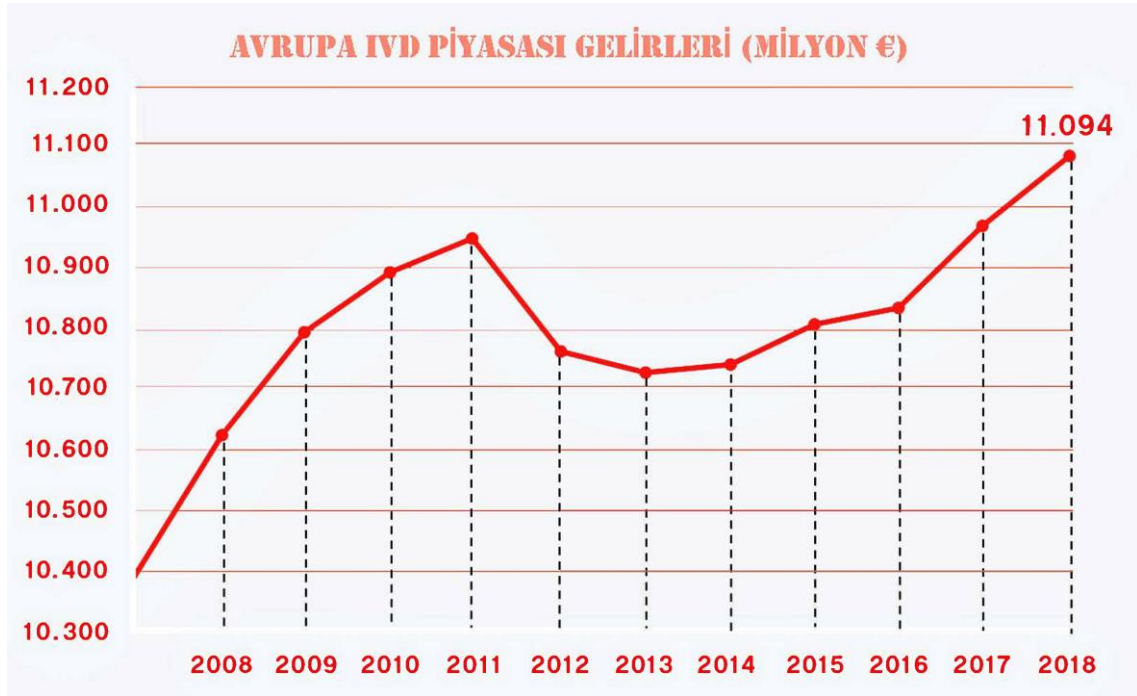
2.1. IVD Cihazların Küresel ve Türkiye Piyasa Araştırması

Biyomedikal cihazların alt grubunda yer alan test kitleri uygulamaları sağlık alanında oldukça önem taşımaktadır. İmmünoensör, enzim, termal, piezoelektrik, doku, DNA, ve kağıt tabanlı biyosensörler gibi test kitlerinin çeşitli türleri bir çok alanda uygulanmaktadır. Test kitlerinin uygulanmasını sağlayan popüler alanlardan bazıları gıda ve fermantasyon endüstrisi, metabolik mühendisliği, tıp ve sağlık alanları, floresan teknolojisi, bitki biyolojisi sektörü, savunma ve deniz uygulamalarıdır. Entegre biyosensörlerde, kablosuz iletişimde ve güç toplama tekniklerindeki son gelişmeler, araştırmacıları yeni bir hasta başı testi (POC) teşhis cihazlarının üretilmesine yönlendirmiştir. Ayrıca, teknolojideki ilerlemeler, insanların çeşitli tıbbi durumlar için kendi kendine test yapmalarını sağlamaktadır. Evde kullanılan tıbbi test kitleri, bir hastalığın teşhisinde, izlemesinde ve iyileştirmesinde yardımcı olmaktadır [17,18].

Küresel endüstri analistlerinin yayınladığı duyuruya göre IVD için Global pazarının, yeni teknolojilerin ortaya çıkması, şeker hastalığı gibi sağlık konularını yönetme ihtiyacının artması ve yeni uygulama alanından gelen güçlü talebin yol açtığı 2027 yılına kadar 85,8 milyar ABD dolarına ulaşması beklenmektedir. Bunun yanı sıra, % 4,4'lük bir yıllık bileşik büyüme oranı (CAGR) sergileyeceği öngörülmektedir [19].

2019'teki Avrupa IVD piyasası istatistik raporuna göre Avrupa'daki en büyük beş IVD pazarından üçü - Fransa, İspanya ve İngiltere 2018'de hafif ve orta büyüme göstermiş ve AB-28 artı Avrupa Serbest Ticaret Birliği (EFTA) genel harcamaları % 1,2 artışla 11.094 milyon € 'ya ulaşmıştır. Euro dışı para birimlerinin değerindeki değişiklikler, özellikle sterlin değerindeki değer kaybı dikkate alınır, Avrupa IVD piyasasının Euro değerindeki 2017'den 2018'e genel değişim % + 1,3'tür (Şekil 2.1). Türkiye gayri safi yurtiçi hasılası 652.520 (milyon €), toplam sağlık harcamaları 27.701 (milyon €) ve IVD harcamaları 645 (milyon €) olarak kaydedilmiştir ve geçen yıllara göre % 32,5 artış göstermiştir [20]. T.C. Kalkınma Bakanlığı'nın Tıbbi Cihazlar ve Tıbbi Malzeme Çalışma grubunun onuncu raporuna göre günümüzdeki kullanım sorunları, eksiklikler, beklentiler dikkate alınarak ve muhtemel kısıtlar da göz önünde bulundurularak

(regülasyonlar, güvenlik, üretilebilirlik/yapılabilirlik) IVD diyagnostic platform, tek kullanımlık tanı çiplerinin ve taşınabilir diyagnostik kitlerin hazırlanması, geliştirilmesi beklenen kritik tıbbi cihazlar arasındadır. Bu raporda sonuç olarak, tüm bu gelişmeler göz önüne alındığında IVD diyagnostic platform ve tek kullanımlık tanı çipleri Türkiye’de üretim şansı olduğu düşünülen tıbbi ekipmanlar, cihaz grupları, setler ve/veya ekipman parçaları arasında yer almaktadır.



Şekil 2.1. Avrupa IVD piyasası gelirleri [20].

Sağlık teknolojilerindeki gelişmeler çok büyük bir hızla ilerlemektedir. Bu teknolojilere ulaşarak üretebilmek ve ihraç edebilmek kapasitelerine sahip olmak hem ülke ekonomisi açısından hem de yaşam kalitesinin artırılması açısından önemli adımlar olarak belirtilmektedir.

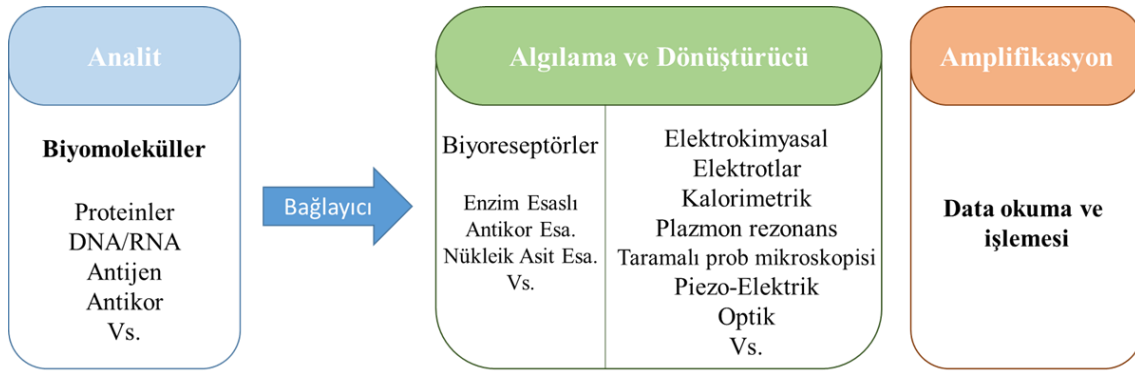
2.2. IVD Sistemler

İn vitro diyagnostikler günümüzün sağlık hizmetlerinin önemli bir parçasıdır. IVD'ler hastalığı teşhis etmek, izlemek, taramak ve değerlendirmek için kullanılır, böylece bir hastaya ilişkin mevcut tıbbi bilgilere katkıda bulunur. Daha erken ve daha hedefli tedavilere izin vererek, IVD'ler hastanedeki kalışların ve iyileşmelerin azaltılmasına

yardımcı olarak daha sağlıklı nüfuslar, düşük maliyetler ve uzun vadede ekonomik büyüme ile sonuçlanır.

2.2.1. Biyosensörler

Biyosensörler genellikle üç farklı bölümden oluşmaktadır: (1) hassas biyolojik elementler veya biyoreseptörler (dokular, mikroorganizmalar, hücre reseptörleri, enzimler, antikolar, nükleik asitler vb.); (2) analit ile biyoreseptör arasındaki etkileşimden kaynaklanan sinyali ölçülebilen ve nicelendirilebilen bir sinyale dönüştüren dönüştürücü elemanı (fizyokimyasal, optik, piezoelektrik, vb.); ve (3) sonuçların görüntülenmesinden sorumlu olan elektronikler veya sinyal işlemcileri. Biyosensörlerin prensibi şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Biyosensör sistemlerinin prensibi

Analit moleküllerinin femtomolar (fM) veya pikomolar (pM) konsantrasyonlarını dahi tespit edebilen yüksek hassasiyete sahip biyosensörler, sadece glikoz izleme ve klinik teşhis gibi biyomedikal uygulamalarda değil, aynı zamanda tarım ve gıda endüstrilerinde ve çevresel izleme için de büyük önem taşımaktadır [21–25]. Yeni yaklaşımların geliştirilmesi ve yüksek hassasiyete, doğruluğa ve düşük maliyete sahip verimli POC test cihazları sağlık sektöründe acil bir ihtiyaç haline dönüşmüştür [26–28]. Ek olarak, *in vivo* biyosensörler, yüksek hassasiyet, seçicilik ve biyoyumluluk ile canlı hücrelerdeki hedef analitlerin uzun süreli izlenmesini sağladıklarından dikkat çekmiştir [29,30]. Özellikle, biyosensör araştırması, nabız, kalp hızı, kan basıncı, vücut hareketleri, kan oksijen seviyesi, glikoz, kolesterol, antikolar, nükleik asitler, proteinler, kanser hücreleri, gıda ürünlerinde toksinler ve içme suyunda ağır metaller dâhil olmak üzere çok çeşitli algılama

yeteneklerini kapsadığı için önemli bir alan olarak kabul edilmektedir [31–33]. Kolorimetrik, potansiyometrik, elektrokimyasal, floresan biyosensörler ve Raman spektroskopisi tabanlı platformlar dâhil olmak üzere çok sayıda yaklaşım araştırılmıştır. Diğer tespit yöntemleriyle karşılaştırıldığında, elektrokimyasal ve flüoresans bazlı yaklaşımlar, farklı analitlerin izlenmesini, hızlı tepki-geri kazanım sürelerini ve çok düşük tespit sınırlarını sağlayan çok daha ucuz, kolay ve son derece hassas tespit yöntemleri sunmaktadır [34–37]. 1985 yılında bukminsterfuleren (**C60**) moleküllerinin keşfinden sonra, nanoteknoloji alanı, nano ölçekli malzemeler aynı malzemelerin yığın haline göre benzersiz kimyasal ve fiziksel özellikler gösterdiğinden, 1-100 nm ölçeğinde yeni materyaller ve cihazlar geliştirmeye odaklanmıştır [38,39]. Sıfır boyutlu (**0D**) nanoparçacıklar (metalik ve yarı iletken nanopartiküller gibi), tek boyutlu (**1D**) nano yapılar (nanoteller, nanorodlar, nanotüpler) ve iki boyutlu (**2D**) nano yapılar (grafen nanotabakalar, GNt), geçiş metali dikalkogenitler (GMD) dahil olmak üzere çok çeşitli nano ölçekli malzemeler geliştirilmiştir [40–43]. Son yirmi yılda, bu nano ölçekli malzemeler ışık yayan diyotlar, bellek cihazları, iletişim cihazları, manyetik diskler, güneş pilleri, piller, yakıt hücreleri, süper kapasitörler ve katalizörler gibi birçok uygulamada kullanılmıştır. Ayrıca, önemli ölçüde geliştirilmiş duyarlılığa sahip biyosensörlerin geliştirilmesi için çeşitli prob biyomolekülleri ile arayüzleme çalışmaları yapılmıştır [44–48]. Bu nanomalzemelerin boyutu ve benzersiz fiziksel özellikleri nedeniyle, son derece küçük boyutlara ve büyük ölçüde iyileştirilmiş performansa sahip biyosensörlerin geliştirilmesi mümkündür, bu da biyotıp ve sağlık hizmetleri için yeni nesil biyosensörlerin geliştirilmesi ve ticarileştirilmesinde yeni fırsatlar sunmaktadır [49].

2.2.2. Elektrokimyasal Biyosensörler

IUPAC, bir elektrokimyasal biyosensörü, bir elektrokimyasal transdüksiyon elemanı ile doğrudan uzamsal temas halinde tutulan bir biyolojik tanıma elemanı (biyokimyasal reseptör) kullanarak seçici kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgi sağlayabilen bağımsız bir entegre cihaz olarak tanımlar [50]. Elektrokimyasal sensörler ise, analit konsantrasyonu ile orantılı bir elektrik sinyali üreten sistemlerdir. Elektrokimyasal sensör sistemleri genellikle bir referans elektrot, bir karşıt veya yardımcı elektrot ve ayrıca algılama veya redoks elektrodu olarak da bilinen bir çalışma elektrodundan oluşur. Yaygın olarak Ag/AgCl (3 M KCl)'den yapılan referans elektrodu, bilinen ve kararlı bir potansiyeli korumak için reaksiyon bölgesinden uzakta tutulur. Çalışma elektrot,

biyokimyasal reaksiyonda transdüksiyon elemanı olarak hizmet ederken, karşıt elektrot, elektrolitik çözeltiye bir bağlantı kurularak çalışma elektroduna bir akım uygulayabilir. Bu elektrotlar hem iletken hem de kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Bu nedenle, analite bağlı olarak platin, altın, karbon (örn. grafit) ve silikon bileşikleri yaygın olarak kullanılmaktadır [51,52].

Tipik olarak (biyo-) elektrokimyada, araştırılan reaksiyon ya potansiyometrik (açık devre potansiyelindeki ölçüm değişimleri), amperometrik (elektroaktif türlerin azaltılması veya oksidasyonuna bağlı ölçüm akımları) veya impedimetrik (elektrot yüzeyinde biyolojik tabakaların hareketsiz hale getirilmesi üzerine sistemin empedansının ölçülmesi) olarak ölçülebilir [51,53–55].

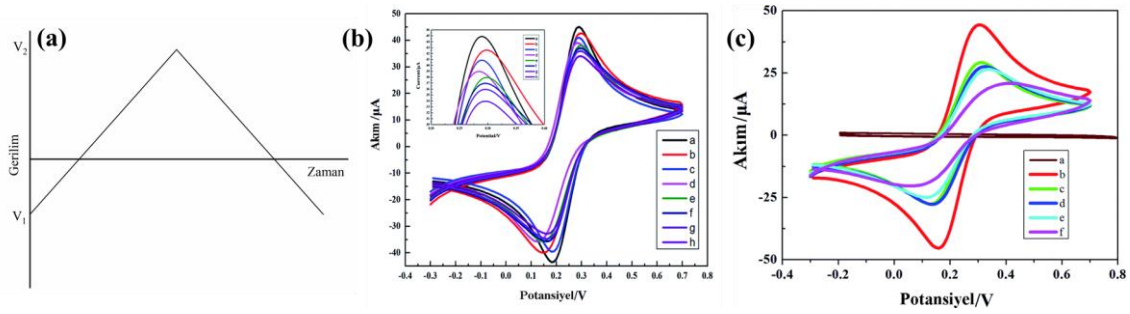
Reaksiyonlar genellikle sadece elektrot yüzeyinin yakınında gerçekleştiğinden, elektrotlar elektrokimyasal biyosensörlerin performansında çok önemli bir rol oynar. Elektrotların işlevi, kullanılan malzemesi, yüzey modifikasyonu ve boyutu, platformun tespit yeteneğini büyük ölçüde etkiler.

Elektrokimyasal biyosensörlerin uygulamalarında nicel analiz yöntemleri olarak dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV), doğrusal tarama voltametri (LSV), kare dalga voltametri (SWV) ve sıyırma voltametri (SV) gibi çeşitli voltametrik yöntemler kullanılmaktadır [56].

2.2.2.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri elektrokimyasal çalışmalarda en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir ve analit çözeltilerinin redoks potansiyeli ve elektrokimyasal reaksiyon hızları (örneğin kimyasal hız sabiti) hakkında bilgi elde etmek için kullanılır. Bu yöntemde gerilim sabit bir hızda iki değer arasında taranır, bununla birlikte, gerilim V_2 'ye (bitiş gerilim) ulaştığında tarama tersine çevrilir ve gerilim, Şekil 2.3a'da gösterildiği gibi V_1 'e (başlangıç gerilim) geri taranır. Tarama hızı, $(V_2 - V_1) / (t_2 - t_1)$ kritik bir faktördür, çünkü taramanın süresi, bir kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için yeterli zaman sağlamalıdır. Bu nedenle, tarama hızının değiştirilmesi karşılıklı olarak farklı sonuçlar verir [57]. Gerilim, referans elektrot ile çalışma elektrot arasında ölçülürken; akım, çalışma elektrot ile karşıt elektrot arasında ölçülür. Elde edilen ölçümler, voltamogram olarak da bilinen,

akıma karşı gerilim şeklinde çizilir. Belirli bir bileşik için voltamogramın şekli yalnızca tarama hızına ve elektrot yüzeyine değil, aynı zamanda katalizör konsantrasyonuna da bağlı olabilir (Şekil 2.3b). Örneğin, belirli bir tarama hızında reaksiyona özgü enzimlerin konsantrasyonunun artırılması, katalize edilmemiş reaksiyona kıyasla daha yüksek bir akımla sonuçlanacaktır. Ayrıca, elektrokimyasal biyosensör uygulamalarında daha duyarlı ve daha seçici ölçümlerin yapılabilmesi için elektrot modifikasyon stratejileri kullanılır (Şekil 2.3c).



Şekil 2.3. (a) tek bir genel doğrusal voltaj taraması, (b) 2 mmol/L redoks probu ve 5 mmol/L KCl içeren bir PBS (pH 7,4, 0,05 mol/L) solüsyonunda farklı konsantrasyonlarda blaNDM⁻¹ plazmid DNA'nın varlığında elektrokimyasal biyosensörlerin dönüşümlü voltamogramları, (c) modifiye edilmiş fabrikasyon prosesleriyle yapılan farklı elektrokimyasal biyosensörlerin 50 mV/s'lik bir tarama hızında dönüşümlü voltamogram taramaları, (a) PBS'de Au elektrot; (b) Au elektrot; (c) LNA; (d) MCH/LNA; (e) etkileşen maddeler/MCH/LNA; ve (f) PBS çözeltisi içinde bir blaNDM-1 / MCH / LNA ile modifiye edilmiş elektrot [58]. LNA: kilitli nükleik asit, MCH: 6-merkapt-1-hekzanol

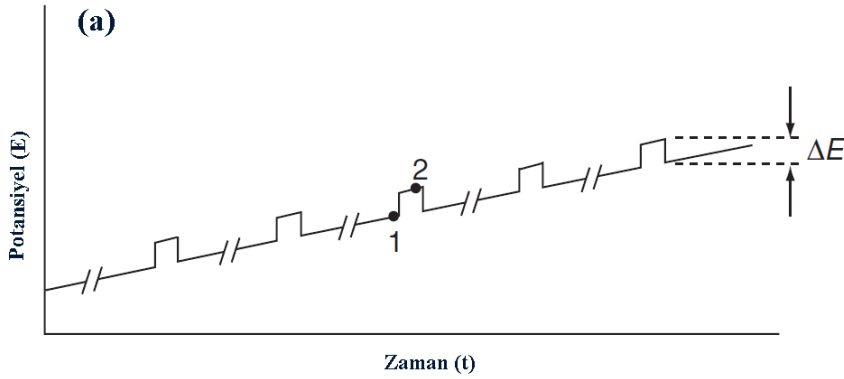
2.2.2.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

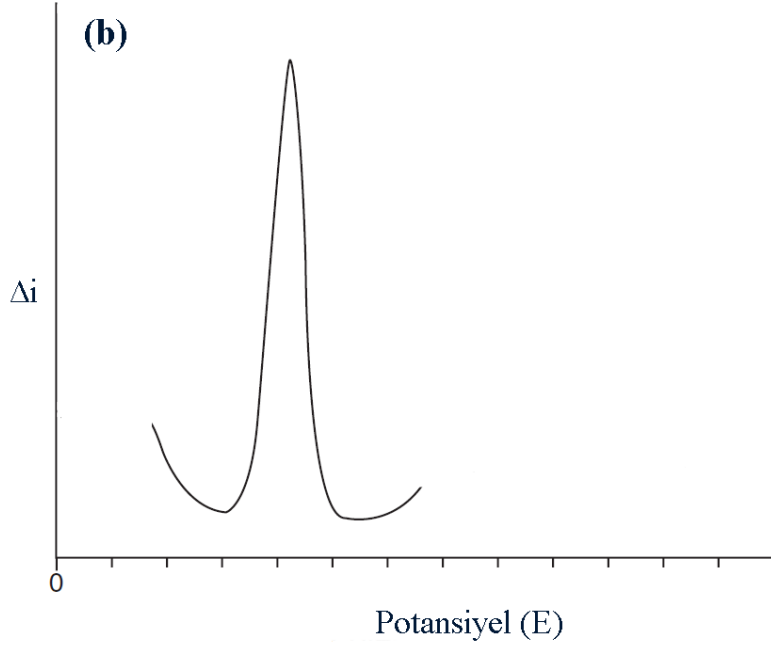
Voltametrik ölçümlerde puls voltametri Barker ve Jenkin tarafından düşük tayin limitlerine ulaşmak amacıyla önerilmiştir [59]. Böylelikle, faradaik ve faradaik olmayan akımlar arasındaki oranı önemli ölçüde artırarak, tayin limitlerini 10⁻⁸ M seviyesine kadar düşürülmesi sağlanmıştır. DPV, organik ve inorganik numunelerin eser miktardaki tayinleri için son derece kullanışlı bir tekniktir. Bu teknikte doğrusal olarak artmakta olan gerilim üzerine sabit büyüklükte gönderilen puls (dE/dt), belli zaman aralıklarında çalışma elektroduna uygulanır (Şekil 2.4a). Bu teknikte akım, puls başlangıcından hemen

önce ve puls bitişinin sonuna doğru yani şarj akımının sıfıra yaklaştığında olmak üzere iki kez ölçülür. Akımlar arasındaki fark, $\Delta i = E(t_2) - E(t_1)$ puls olarak verilmekte ve gerilime karşı grafiğe geçirildiğinde bir voltamogram elde edilmektedir (Şekil 2.4b). Voltamogramlardaki pik yüksekliği direk olarak çalışılan analitin derişimi ile doğru orantılıdır (Denklem 2.1).

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad (2.1)$$

Burada i akım (A), n elektron sayısı, F faraday sabiti (96485 C / mol), A elektrot alanı (cm^2), C indirgenbilir/yükseltgenbilir özellikteki analitin başlangıç konsantrasyonu (mol/cm^3), D difüzyon katsayısı (cm^2/s), t saniye cinsinden süre ve $\sigma = \exp[(nf/RT)(\Delta E/2)]$. ΔE puls genişliğidir.

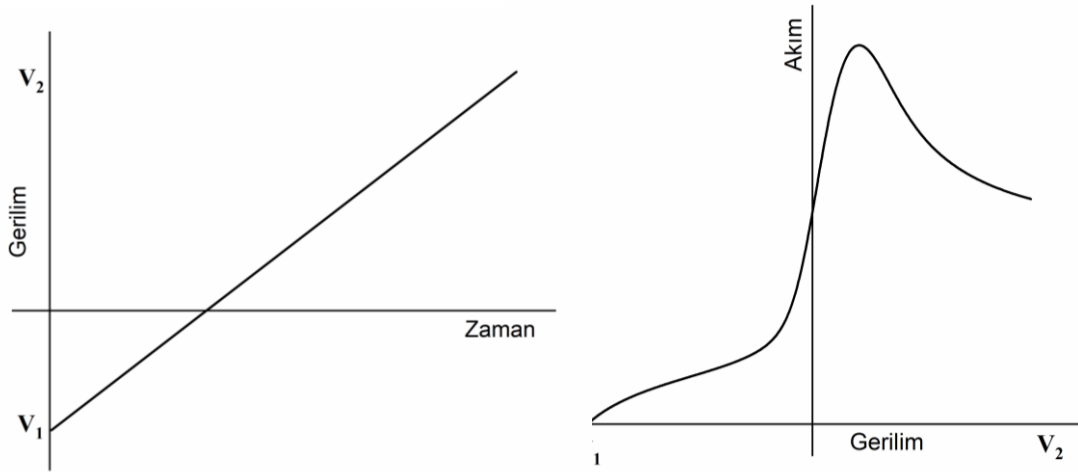




Şekil 2.4. DPV’de (a) uyarma sinyalinin dalga şekli ve (b) akımlar arasındaki farktan elde edilen voltamogram ($\Delta i = E(t_2) - E(t_1)$).

2.2.2.3. Doğrusal Tarama Voltametri (LSV)

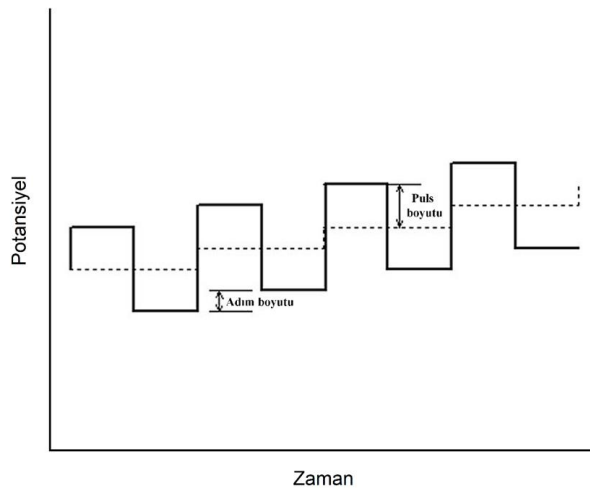
Doğrusal tarama voltametri (LSV) temel bir potansiyostatik tarama yöntemidir. Tek segmentli bir dönüşümlü voltametrisine eşdeğerdir. LSV’de, çalışma elektrot potansiyeli, son ve başlangıç değerleri arasında doğrusal olarak taranır ve akım, zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülür (Şekil 2.5). Bir LSV deneyinden elde edilen en yaygın çıktı, voltamogram adı verilen akıma karşı potansiyeldir. LSV, elektrokimyasal sistemler hakkında hem kalitatif hem de kantitatif bilgi sağlar. Hızlı ve güvenilir bir karakterizasyon aracı olarak kullanılır. LSV genellikle kataliz de dahil olmak üzere elektron transfer reaksiyonlarının kinetiğini incelemek için kullanılır ve organik ve inorganik sentezde, sensör ve biyolojik sistem değerlendirmesinde ve tersinirlik ve difüzyon katsayısı belirleme gibi elektron transfer reaksiyonlarının temel fiziksel mekaniğinde kullanılmak üzere genişletilmiştir.



Şekil 2.5. Tek yönlü gerilim taramasından elde edilen doğrusal tarama voltamogramı.

2.2.2.4. Kare Dalga Voltametri (SWV)

Kare dalga voltametri (SWV), hem nicel analiz hem de kimyasal reaksiyonların mekanizmasının, kinetiğinin ve termodinamiğinin incelenmesi için kullanılır. SWV, bir örneğe uygulanan merdiven şeklindeki gerilim serisiyle başlar. Merdiven dalga biçimine bir kare dalga eklenir, böylece gerilim her adımda aniden sıçradığında, kare dalga atlama ile çakışır. Adımın ortasında kare dalga kutupları tersine çevirir. Bu tekrarlanan merdiven artı kare dalga serisi, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi örneğe uygulanan karakteristik bir gerilim dizisi oluşturur.



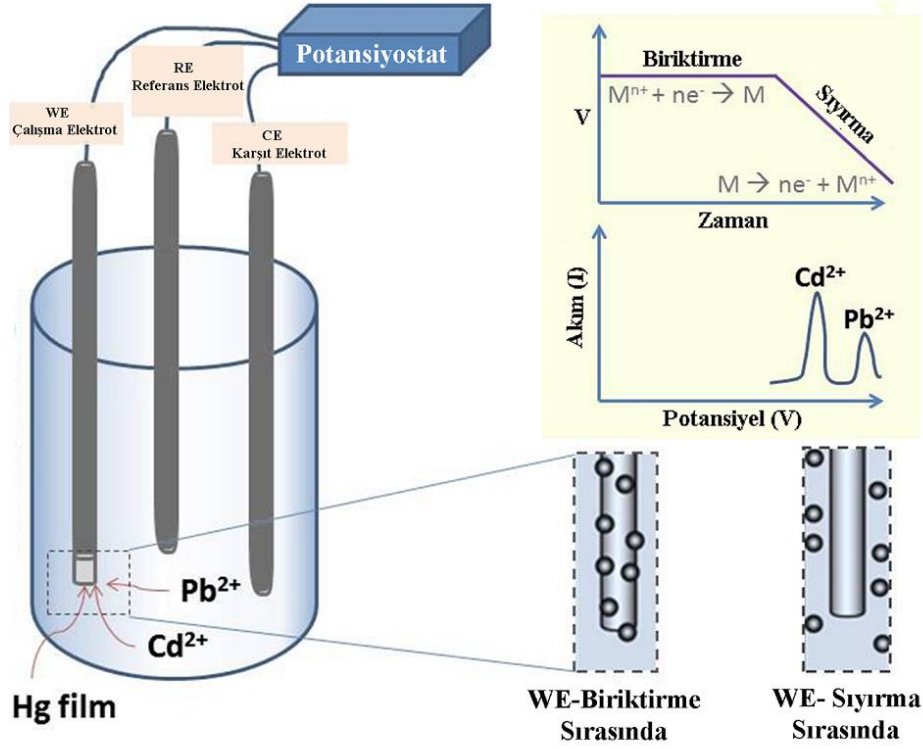
Şekil 2.6. Kare dalga voltametri geriliminin zamanla nasıl değiştiğinin şematik olarak gösterimi.

Tarama sırasında akım, ileri pulsun sonunda ve ters pulsun sonunda kaydedilir, yani döngü başına iki kez örneklenir. Akımı örneklemek için pulsun sonuna kadar beklemek, şarj akımının karışmasını önler. Kare dalga voltametrisi deneylerinde uygulanan frekans, f , genellikle yaklaşık 1 ile 125 Hz arasındadır. Böylesine yüksek bir f , kare dalga voltametrisinin genellikle diğer puls temelli yöntemlerden çok daha hızlı olduğu anlamına gelir [60].

Son yıllarda, SWV kullanımı, hassas elektrokimyasal sensörlerin ve biyosensörlerin üretiminde temel bir unsur olmuştur. Bir sensörün etkinliği, analite karşı cevabın ne kadar hassas ve seçici olduğu ile doğru orantılıdır. Bu cevap, SWV gibi daha hassas bir elektrokimyasal teknik uygulanarak artırılabilir [61].

2.2.2.5. Sıyırma Voltametrisi (SV)

Sıyırma voltametrisi, çeşitli analitik uygulamaların iz element analizinde kolaylıkla ve başarıyla kullanılmıştır. Minimum numune hazırlığıyla, bu elektrokimyasal teknik rutin olarak mükemmel hassasiyet ve seçicilikle 10^{-5} ila 10^{-12} M arasındaki eser bileşenleri belirleme ve nicel olarak analiz etme yeteneğine sahiptir. Sıyırma voltametrisi, ilk adımın bir kimyasal türün çalışma elektrodu yüzeyine elektrolitik biriktirilmesinin ardından yüzeyden sıyırılması ve analitin nicel analizinin gerçekleştirilmesinden oluşan iki aşamalı bir tekniktir. Bu ön-deriştirme aşaması, anodik veya katodik bir işlemi içerebilir. Sıyırma voltametrisinin en yaygın kullanımı, bir metal iyonik türünün çözeltiden bir cıva elektroduna indirgenerek bir amalgam oluşumuna neden olduğu katodik bir işlemi içerir. İkinci adım, elektroda, amalgam veya filmdeki çeşitli türlerin elektrolitik çözünmesine veya sıyırılmasına neden olan karakteristik potansiyellerde gerilim taramasından oluşur. SV'de sıyırma aşaması, potansiyel bir taramanın uygulanmasını ve akımın potansiyele karşı ölçülmesini içerir (Şekil 2.7) [62].



Şekil 2.7. Anodik sıyırma voltametriyi ile kadmiyum ve kurşunun kantitatif tayini.

2.3. Elmas benzeri Karbon Nanofilmler

Karbon, çok yönlü özelliklere sahip birçok allotropu ile doğada büyüleyici bir elementtir. Elmaslar, grafit, grafen, karbon nanotüpler, fullerenler vb. karbon atomlarından yapılırlar, ancak farklı yapılar ve bağlar onları benzersiz kılar [63–65]. Elmas, benzersiz özelliklere sahip kristalin bir karbon allotropudur. Elmas, herhangi bir yığın malzemeye kıyasla en yüksek sertliğe ve termal iletkenliğe sahiptir. Bu özellikler, atomları ve kristal yapısı içindeki güçlü kovalent bağdan kaynaklanır. Bununla birlikte, elmas oda sıcaklığında ve atmosfer basıncında sentezlenemez [66].

Laboratuvarda sentezlemek için, Dünya'nın mantosunda 140 ile 190 kilometre derinliklerdeki ortamın sağlanması gerekir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, laboratuvar ortamında sentezlenebilen ve aynı zamanda doğal elmasların bazı özelliklerine sahip elmas benzeri malzemeler geliştirilir. Elmas benzeri malzemenin kimyasal bağları, yani çoğunlukla sp³ durumları doğal elmas ile uyumludur. Kimyasal bağlanmadaki bu yakınlık nedeniyle, elmas benzeri malzeme, doğal elmas ile karşılaştırıldığında kimyasal inertlik, sertlik, termal kararlılık, termal iletkenlik vb.

durumunda yakın benzerlik gösterir. Elmas benzeri veya grafit benzeri, doğal elmasların veya grafitin benzersiz özelliklerinden bazılarını sergileyen ve laboratuvar ortamında sentezlenebilen farklı amorf karbon formlarına atıfta bulunan terimlerdir. Elmas benzeri karbon veya DLC, sp^2 bağlı karbon atomlarının sp^3 bağlı karbon kümelerine bir karışımı olan amorf bir hidrojenlenmiş karbondur [67,68]. DLC atomik yapısında, hidrojen, % 0-50 arasında bir atomik konsantrasyonuna sahip olabilir. DLC kısaltması, ilk kez doğal elmasın benzersiz özelliklerinden bazılarını sergileyen amorf karbon filmleri sentezleyen Aisenberg ve Chabot tarafından kullanıldı [69].

DLC filminin öne çıkan niteliği, özelliklerinin sp^2 - sp^3 bağlı karbon atomlarının konsantrasyonuna ve hidrojen konsantrasyonuna göre ayarlanabilmesidir. Oda sıcaklığında biriktirme olasılığı nedeniyle, vakum ortamıyla uyumlu olan hemen hemen tüm malzemeler DLC filmler ile kaplanabilir. DLC'nin benzersiz ve ayarlanabilir özellikleri, malzeme sertliği, düşük sürtünme ve yüksek aşınma direnci, kimyasal inertlik, optik şeffaflık (görünür ışık - kızılötesi ışık), termal iletkenlik, elektriksel direnç ve radyasyon direncidir [66]. DLC filmler, enerjiden otomobil endüstrisine ve sensörlerden biyomedikal ürünlere kadar birçok alanda umut verici yeni uygulamalar gösteren elmas ve grafit özelliklerinin bir kombinasyonuna sahiptir [70–74].

DLC filmler, kimyasal buhar biriktirme (CVD) ve fiziksel buhar biriktirme (PVD) yöntemleriyle hazırlanmaktadır. Fiziksel süreçler arasında filtrelenmiş katodik vakum ark (FCVA), doğrudan iyon demeti (IB) ve iyon demeti destekli biriktirme (IBAD), darbeli lazer birikimi (PLD), plazma daldırma iyon implantasyonu (PIII) ve DC ve radyo frekansı (RF) püskürtme teknikleri ve kimyasal işlemler arasında elektron siklotron rezonans plazma kimyasal buhar biriktirme (ECR-CVD) ve plazma güçlendirilmiş kimyasal buhar biriktirme (PECVD) teknikleri bulunmaktadır [75–80].

Bununla birlikte, DLC'nin uygulanmasındaki en büyük sınırlama, substrattan soyulmasına yol açan yüksek iç strestir. Ayrıca, DLC'nin sp^3 bağları yaklaşık 300 °C'de sp^2 bağına dönüştüğü için çok zayıf bir termal stabiliteye sahiptir [81–83]. DLC filmlerin bu dezavantajları, flor, azot ve bor gibi farklı kimyasal elementlerle veya silikon, oksijen vb. bileşiklerle doping edilerek daha da azaltılabilir. Böylece kimyasal bağları kristal elmasla uyumlu olan ve elmas benzeri nanokompozit (DLN) olarak adlandırılan yeni bir amorf hidrojenlenmiş karbon sınıfı oluşur [81,84,85].

Metal katkılı DLC (Me-DLC) filmler, amorf bir karbon matrisine gömülü metalik nanoparçacıklar içerir. Me-DLC, pratikte dopant malzeme olarak ametal DLC'ye göre yaygın olarak kullanılmaktadır. Metalin DLC'nin karbon ağına katkılanması, grafitizasyonu, substrata yapışmasını, sınırlı yağlamasını, aşınma direncini, elektrik, alan emisyonunu ve mekanik özellikleri artırır. Genellikle, karbür ve karbür olmayan elemanlar DLC'ye katkılanır. Karbür grubu (Ti, W, V ve Cr, vb.), karbür oluşturmak için DLC'nin karbon ağı ile kimyasal olarak reaksiyona girer [86–91]. Halbuki, karbür olmayan grup (Au, Pt, Cu ve Pd, vb.) kimyasal olarak (reaktif olmayan) DLC'nin karbon ağı ile reaksiyona girmez [92–96]. Literatüre göre, Nobel metalleri (yani Au) DLC ağ yapısının sp^3 konsantrasyonunu azaltır (sp^2 konsantrasyonunu artırır) ve böylece elektron sürüklenme devinirliğini artırır ve sonuçta DLC'nin elektrik iletkenliğini geliştirir [97].

Sonuç olarak, grafen ve grafit, DLC filmlerinin sentezinde kullanılan iyi bilinen iki karbon öncüsüdür. Alternatif olarak, sitrik asit ve tuzdan türetilmiş formu, sodyum sitrat gibi diğer karbon kaynakları, üç boyutlu yapı iskeletli karbonun (3DFC), iki boyutlu grafitik mezoporöz karbonun, GO, ve grafen kuantum noktalarının (GQD) sentezlenmesi için kullanılabilir [98–102]. Bu nedenle, sonraki bölümler grafen ve altın nanoparçacıkların önemi konusunda tartışılacaktır.

2.4. Grafen ve Grafen benzeri Malzemeler

Grafenin (GR) yığın grafitten ilk izolasyonundan ve 2004 yılında Geim ve Novoselov tarafından gerçekleştirilen karakterizasyon işlemlerinden bu yana, yoğun araştırma çabaları 2D grafen nanomalzemelerine ve bunların potansiyel uygulamalarına yönelmektedir [103–107]. GR, benzersiz elektriksel, optik, mekanik ve termal özellikler sergileyen atom kalınlığına sahip bir 2D karbon tabakasıdır [108]. GR nanotabakalar, dünyadaki bol grafitten kolayca pul pul dökülebilir (exfoliate) ve allotropik olarak fullerenler ve karbon nanotüpler olarak kabul edilir. GR, tek katlı, birkaç katlı veya çok katlı nanotabakalar, gerilebilir ultra ince filmler, kağıtlar, nanoşeritler ve köpükler halinde kolayca işlenebilir [109–114]. Sonuç olarak, grafen bazlı malzemeler (GBM'ler), yığın-heterojunksiyona ve boyaya duyarlı güneş pilleri, enerji depolama cihazları, elektronik cilt ve dokunmatik ekranlı cihazları, alan etkili transistörleri, ışık yayan diyotları

(LED'ler), gaz ve kimyasal sensörleri, nanotıp, ilaç salımı dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalar için araştırılmıştır [115–123].

GR ve çeşitli oksijen fonksiyonel grupları (hidroksil, karboksil ve epoksi fonksiyonel grupları) içeren grafen oksit (GO) gibi oksitlenmiş türevleri, biyosensörlerde potansiyel kullanım için ortaya çıkmıştır [124]. Bu fonksiyonel grupların varlığı, GO tabakalarını güçlü bir şekilde hidrofilik hale getirir ve bunlara dayanan sensörlerin performansını arttırmak için soy metaller, metal oksitler, yarı iletken nanopartiküller, kuantum noktaları (QD'ler) ve nanokümelere (NK'ler) dahil olmak üzere çeşitli inorganik nanopartiküllerin entegrasyonuna izin verir [125,126]. Ayrıca indirgenmiş GO (rGO), elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi için yararlı olup ve yüksek kusur yoğunluğu nedeniyle CVD yöntemi ile sentezlenen grafene kıyasla yüksek elektrokimyasal aktivite ile sonuçlanır [127]. Grafen nanokompozitlerin hiyerarşik birbirine bağlı üç boyutlu yapıları, farklı biyomolekül tiplerinin difüzyonunu kolaylaştırır ve biyosensör performansını optimize etmek için biyokatalitik işlevlerini korur [128–130]. Mükemmel biyoyumluluk, yüksek yüzey alanı ve biyomoleküllerle bölge seçici konjugasyonu nedeniyle, polimerler ve metal nanoparçacıklar ile dekore edilmiş grafen bazlı hibritler, biyosensasyon için araştırılmıştır [125,131,132].

2.5. Altın Nanoparçacıklar

Son çalışmalar nanomalzemelerin nanobilim ve nanoteknolojinin ilerlemesindeki önemli rollerini göstermiştir. Nano ölçekli yapılar, küçük moleküllere veya yığın malzemelere kıyasla, yüksek spesifik yüzey alanı, elektrik performansı, manyetizma, optik ve katalitik özellik gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikler nedeniyle büyük ilgi görmüştür [133,134]. Özellikle altın nanoparçacıklar (AuNP'ler), biyolojik tayin alanında yaygın olarak kullanılan iyi biyoyumluluk, mükemmel iletkenlik, etkili kataliz, yüksek yoğunluk ve yüksek yüzey/hacim oranı gibi özelliklere sahiptir [135–140].

En kararlı metal nanoparçacıklarından biri olan AuNP'ler biyosensör alanında önemli bir rol oynamaktadır. AuNP'ler, biyomoleküllerin aktivitesini bozmadan tiol (Au-S) ve amin (Au-N) gruplar vasıtasıyla DNA ve proteinler gibi biyomoleküller ile kolayca modifiye edilebilir. Optik biyosensörlerde AuNP'ler, floresans, kemilüminesans, yüzey plazmon rezonansı (SPR), yüzeyde güçlendirilmiş raman spektroskopisi (SERS) yöntemi ve diğer

optik tespit yöntemlerin algılama hassasiyetini geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [141–144]. Ancak, optik saptamalar genellikle floresan spektrometreler, SPR/SERS cihazları gibi pahalı enstrümanlar gerektirir ve bu da biyolojik tayin maliyetini artırır.

Optik olmayan biyosensörlerde AuNP'ler esas olarak piezoelektrik, elektrokimyasal ve ICP-MS biyosensörlerinde kullanılır. Piezoelektrik biyosensörlerde, AuNP'ler genellikle kütle değişimini ve tespit hassasiyetini artırmak için yüksek yoğunluktan yararlanan etiketler olarak işlev görür [145,146]. Elektrokimyasal biyosensörlerde, AuNP'ler genellikle tespitin hassasiyetini, seçiciliğini ve stabilitesini geliştirmek amacıyla immobilizasyon platformu, elektrokatalizör veya elektron göç artırıcı olarak kullanılır [147–149]. Son yıllarda, ICP-MS teknolojisine dayanan biyolojik saptamada AuNP'ler de rapor edilmiştir. Optik biyosensörlere benzer şekilde, optik olmayan biyosensörlerin performansları AuNP'lerin sinyal amplifikasyonuna dayanarak etkili bir şekilde geliştirilir. Optik olmayan tespit cihazları basit olmakla birlikte, tespit prosedürleri klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmayan optik biyosensörlerinki kadar otomatik ve hızlı değildir [150–153].

Elektrokimyasal biyosensörler yüksek hassasiyet, düşük maliyetli, uygun minyatürleştirme ve kullanım rahatlığının avantajlarını göstermektedir. AuNP'ler, iletkenliği arttırmak için sensör yüzeyini modifiye ederek, biyomoleküllerin immobilizasyonunu arttırarak ve elektrokimyasal reaksiyonları katalize ederek elektrokimyasal biyosensörlerin duyarlılığını ve özgüllüğünü geliştirmede önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, AuNP'ler elektrokimyasal indikatörler olarak da kullanılmaktadır [154–163].

2.6. miRNA'ların Tayini ve Klinik Uygulamaları

1993 yılında mikroRNA'ların keşfi, insan genlerinin % 30'unu kontrol ettikleri ve birçok hastalıkta deregüle oldukları ortaya çıkana kadar önemli bir olay olarak görülmemiştir [164]. O zamandan beri, mikroRNA'ların tespiti için değerli platformların tasarımındaki bilimsel ilerlemeler hızla artmaktadır. miRNA'lar, yaklaşık 18-25 nükleotit içeren küçük, protein kodlamayan endojen RNA sınıfına aittir. Uzunlukları yaklaşık olarak normal bir PCR primerinin boyutuna eşit gelmekte ve genellikle bir numunedan ekstrakte edilen

toplam RNA'nın yaklaşık % 0,01'ini içermektedir [165–167]. miRNA'ların önemli amacı, hedef mRNA'lara tamamlayıcı bağlanma yoluyla kritik gen ekspresyonunu düzenleme yeteneğine dayanmaktadır [167,168]. Genlerin ekspresyonunun yetersiz kontrol edilmesi durumunda miRNA, hedef yıkılmasını, translasyonel represyonunu, gen susturulmasını veya mRNA'nın sürekli olarak ölmesi ve yenilenmesi sürecini etkileyebilmektedir [166]. Bu nedenle, miRNA'ların anormal ekspresyonu, hücre çoğalması, stres yanıtı, farklılaşma, hücre apoptozu ve enflamasyon gibi çok sayıda bozukluk ve malignite göstergesi olan hücre döngüleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle miRNA'lar son yıllarda araştırma odağı olan bir biyobelirteçler sınıfı haline gelmiştir [169].

miRNA'ların küçük boyut ve vücut sıvılarında çok düşük miktarda bulunmaları nedeniyle hastalıkların erken teşhisinde ciddi bir sorun hale gelmişlerdir. Biyo-elektrokimyasal tayin sistemleri POC cihazlarına entegre edilebilmeleri ve geliştirilen testlerin basitliği ile birlikte hassas ve seçici sonuçlar elde edebildiğinden, miRNA'ların tayini için uygun bir yaklaşım haline gelmişlerdir.

2.6.1. miRNA Türleri ve Patolojilerdeki Fonksiyonları ve Roller

Bugüne kadar, farklı miRNA hedeflerinin kökenini vurgulayan çok sayıda (ve sürekli büyüyen) bilimsel yayınlar mevcuttur. miRNA'lar, plazma, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında tanımlanmıştır [170]. Ancak trombositler [171], hücreler (mikro veziküller ve ekzomlar gibi) [172], RNA bağlayıcı proteinler ve lipoproteinler ile ilişkili oldukları da çalışmalarda gösterilmiştir [173]. Dolaşımdaki miRNA'lar, RNazların etkisine karşı doğal olarak kararlı oldukları ve aşırı sıcaklık, uzun süreli depolama veya yüksek pH dahil olmak üzere çeşitli işlemler altında bile iyi tepki gösterdikleri bildirilmiştir [173]. Tüm bu avantajlar, dolaşımdaki miRNA'ların çeşitli hastalıkların erken teşhisinde özellikle kanser teşhisi ve prognozunda etkili biyobelirteçler olarak kullanımlarını sağlamaktadır. Çizelge 2.1, alıcı (recipient) hücrelerdeki kanser hücrelerinden salgılanan dolaşımdaki miRNA'ların tümör oluşumu rolünü göstermektedir.

Çizelge 2.1. Kanser patobiyolojisinde dolaşımdaki miRNA'ların fonksiyonu ve rolleri.

Salgılanan miRNA'lar	Taşıma sistemi	Donör hücreler	Alıcı hücreler	Hedefler	Ana fonksiyon	Ref.
miR-105	Ekzozomlar	Meme kanseri hücreleri	Endotel hücreleri	Sıkı bağlantı proteini ZO-1	Metastazı İlerletme	[174]
miR-16	Ekzozomlar	Mezenkimal kök hücreler	SVEC hücreleri	VEGF	Anjiyogenez Baskılama	[175]
miR-1	Hücre dışı veziküller	Kanser kök hücresi benzeri glioblastom hücreleri	Glioblastom hücreleri	Annexin A2	Malign karakteri bastırma	[176]
miR-210	Ekzozomlar	Hipoksik lösemi hücreleri	Endotel hücreleri	-	Tüp oluşumunu geliştirme	[177]
miR-223	Ekzozomlar	IL-4 ile aktive edilen makrofajlar	Meme kanseri hücreleri	Miyosit arttırıcı faktör 2c (Mef2c)	Hücre invazyonunu ilerletme	[178]
miR-9	Mikroveziküller	H1299, MDA435, Panc1, SF-539, HM7 insan tümör hücre hatları	Endotel hücreleri	Sitokin sinyal baskılayıcı 5 (SOCS5)	Hücre göçünü ve tümör anjiyogenezini ilerletme	[179]
miR-150	Mikroveziküller	Monositler	Endotel hücreleri	-	Anjiyogenez ilerletme	[180]
miR-223	Mikroveziküller	Trombositler	Endotel hücreleri	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü	Apoptozu ilerletme	[181]
miR-150	Mikroveziküller	Monositler	HMEC-1	C-myb	Hücre göçünü ilerletme	[182]

Dolaşımdaki anormal miRNA seviyeleri akciğer kanseri [183,184], meme kanseri [185–187], prostat kanseri, kolorektal kanseri [188,189], gastrik kanseri [190,191], karaciğer kanseri [192,193], hematolojik kanseri [194,195], astrositomlar [196], özofagus kanseri [197], yumurtalık kanseri [198], geleneksel böbrek hücresi kanseri (cRCC) [199], osteosarkom [200], papiller tiroid karsinomu (PTC) [201], servikal kanseri [202], pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) [203] ve safra yolu kanseri (BTC) [204] gibi kanserlerde değerlendirilmiştir.

2.6.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PC) dünya çapında erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biridir. Ayrıca, PC yavaş yavaş dünyada erkeklerde kanserle ilişkili ölümlerin beşinci önde gelen nedeni haline gelmiştir [205]. Tümör metastaz öncesi erken teşhis ve tedavi, hastanın sağkalımını iyileştirmek için çok önemlidir. PC için diyagnostik testler geniş çapta incelenmiş ve prostat spesifik antijen (PSA) deneyi gibi biyobelirteç analizinden, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi radyolojik görüntüleme biyopsiye kadar araştırılmıştır.

Mitchell ve arkadaşları (2008), dolaşımdaki miRNA'ların PC için potansiyel diyagnostik belirteçleri olarak kullanıldığını bildiren ilk kişilerdir [206]. Bu çalışmada, bir PC ksenograft faresinin plazmasında tümör kaynaklı miRNA'ların tespit edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca, insan prostat örneklerindeki ekspresyonlarına ve sağlıklı kontrol plazmasındaki yokluğuna dayanan birkaç miRNA adayını, metastatik PC hastalarının ve sağlıklı kontrol bireylerinin serumundaki ekspresyonları araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, miR-141'in PC serumunda yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur. Bu yüksek seviyeler, serum PSA seviyeleri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve % 60 duyarlılık ve % 100 özgüllük gösterdikleri için ileri prostat kanseri olan bireyleri tanımlamak için kullanılabilir biyobelirteç olduğu potansiyelini ortaya koymuştur [206]. Başka bir çalışmada, önceden seçilmiş onkojenik miR-26a, miR-195 ve miR-let7i'nin başlangıçta dokuda upregüle edildiği doğrulanmış ve daha sonra, PC hastalarının serumunda, iyi huylu prostat hiperplazisi olanlara kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak, bu çalışma miR-141 düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiş ve miR-141 düzeylerinin güvenilir test için çok düşük olduğu iddia edilmiştir [207]. Brase ve

arkadaşları tarafından yapılan bir araştırma, dolaşımdaki miR-375 ve miR-141'in yüksek riskli PC'ler için en umut verici biyobelirteçler olduğunu da göstermiştir. Bu miRNA'ların her ikisinin de prostat doku örneklerinde önemli ölçüde upregüle edildiği gözlenmiştir [208]. Wang ve arkadaşları, prostat kanseri hücreleri tarafından salgılanan dolaşımdaki miR-410-5p'nin, argonaute-2 proteini yardımıyla dendritik hücrelere (DC'ler) girdiğini keşfetmişlerdir. Çalışmada, kanser hücresi antijenlerinin DC'leri miR-410-3p üretmeye stimüle ettiğini bulunmuştur. miR-410-3p, miR-410'dan türetilmiş miR-410-5p'nin yakalayıcı bir karşılığıdır. Ayrıca, MiR-410-5p, miR-410-3p'yi baz eşleştirme yoluyla degrade ettiğini ve böylece tümör anjiyogenezini baskılama ve tümör büyümesini ilerletme işlevini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır [209]. Bu bulgunun doğrulanmasında Zhang ve arkadaşları, miR-410-3p'nin PTEN / AKT / mTOR sinyal yolunu upregüle ederek prostat kanseri ilerlemesini engellediğini ortaya koymuşlar [210]. Ayrıca, Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışma sonuçları, dolaşımdaki miRNA-410-5p seviyesinin PC hastalarında sağlıklı veya kanser olmayan hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir [211].

2.6.3. miRNA'lar için Geleneksel Tayin Yöntemleri

MiRNA'ların tayininde, northern blot analizi, ters transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), floresans in situ hibridizasyon (FISH), transkriptomun derin sekanslanması (RNAseq) ve mikrodiziler gibi birçok teknik kullanılır. Bu teknikler, avantajları ve dezavantajları ile birlikte, Çizelge 2.2'de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. miRNA tayin yöntemlerinin başlıca avantajları ve dezavantajları.

Teknikler	Avantajlar	Dezavantajlar	Ref.
Northern blot analizi	<ul style="list-style-type: none"> • Yeni miRNA'ları keşfedebilme; • Yeni tespit testlerinin validasyonu; 	<ul style="list-style-type: none"> •Düşük hassasiyet (nmol aralığında tayin limiti) •Zaman alıcı (genellikle tamamlanması günler alır) •Tehlikeli radyoaktif etiketlerin kullanımı 	[166,170, 212–215]

qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Hassas ve kesin yöntem; • Çoklu analiz sağlar 	<ul style="list-style-type: none"> • miRNA öncüleri ve olgun miRNA'lar arasında ayırım yapılmasının sınırları; • Uzman personel gerektirir • Pahalı reaktifler ve ekipman • PCR'ın verimliliğini etkileyen çok düşük erime sıcaklığı gerektirir 	[166,169, 170,213,2 14]
FISH	<ul style="list-style-type: none"> • mRNA ve miRNA'ların eşzamanlı kantifikasyonu 	<ul style="list-style-type: none"> • Düşük hassasiyet • Karmaşık iş akışı • Çoklu analiz için uygulanmaz 	[212]
RNAseq	<ul style="list-style-type: none"> • Paralel analizler için yüksek verimli teknoloji; • Tüm miRNA'ların ekspresyonunu ayrıntılı bir şekilde araştırabilme; • Yeni miRNA'ların keşfi için güvenilir uygulama 	<ul style="list-style-type: none"> • Altyapı gereksinimleri • Sonuçların elde edilmesi için haftalara kadar uzun süre gereklidir • Büyük miktarda (ng-µg) kullanılır • Maliyetli 	[166,167, 169,213,2 15,216]
Mikrodiziler (elektrokimyasal olmayan yaklaşım)	<ul style="list-style-type: none"> • Eş zamanlı analiz; • Yüksek örnek sayısı; • Büyük veri elde etmek; • Basit; • Düşük numune hacmi; • Ucuz 	<ul style="list-style-type: none"> • miRNA'ların miktar tayininde gerekli hassasiyeti sağlayamayan niteliksel teknik • Daha fazla deneysel validasyon gerekiyor 	[166,169, 220,170,2 12– 215,217– 219]

2.6.3.1. Elektrokimyasal Yaklaşımlar

Geleneksel tayin yöntemlerinin dezavantajları, araştırmacıları POC cihazlarının taleplerini karşılayacak yenilikçi stratejiler bulmaya yöneltmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ideal bir POC cihazının ASSURED kriterlerini yerine getirmesi gereken

bir dizi kriter oluşturmuştur. Kısaltma, A — uygun fiyatlı, S — hassas, S — seçici, U — kullanıcı dostu, R - hızlı ve sağlam, E — ekipmansız ve D — son kullanıcılara sunulabilir anlamına gelmektedir [221,222]. Bu nedenle, basitliği, düşük fiyatı ve minyatürleştirme olasılığı nedeniyle, elektrokimyasal biyosensörler gelecekteki POC cihazları için iyi adaylar olarak bilinmektedir.

Hassasiyet ve seçicilik kriterleri miRNA tayin çalışmalarının çoğunun odak noktasıdır. Vücut sıvılarındaki düşük miRNA konsantrasyonları (normalde <1 pM) [223] ve düşük hücrel miRNA konsantrasyonları (hücre başına yaklaşık 1000 molekül) [224] nedeniyle, elektrokimyasal biyosensörler ile gerekli ultra yüksek hassasiyeti elde etmek için sinyal amplifikasyonu gerekmektedir.

Sinyal amplifikasyon için en yaygın stratejilerden biri, hazırlanan yüzeyin ilk veya son modifikasyon aşamalarında farklı nanomalzemelerin (metalik nanopartiküller ve nanokümler [225–227], MWCNT [228], grafen [229]) kullanılmasına dayanmaktadır. Başka bir strateji ise enzim amplifikasyon tekniklerine dayanmaktadır. Bu durumda, enzimler, hibridizasyon işlemi çoklu elektrokimyasal aktif saptanabilir moleküle dönüştürebilen etiketler ile gerçekleştirirler. Hibridizasyon zinciri reaksiyonu (HCR) ve döner-daire (rolling-circle) amplifikasyonu (RCA) gibi amplifikasyon stratejileri de klasik elektrokimyasal biyosensörlere yenilikçi bir katkı olarak çok iyi hassasiyetlere ulaşmalarını sağlamaktadır [230–233]. Ayrıca, duyarlılığı artırmak için genellikle iki veya birkaç amplifikasyon yönteminin kombinasyonu kullanılmaktadır. Ancak, sinyal amplifikasyon stratejileri, testin basitliği ve süresi gibi ideal bir POC cihazının diğer kriterlerini sağlayamamaktadır. Amplifikasyon prosedürlerinin çoğu bazen pahalı kimyasal etiketler ve/veya bazen karmaşık amplifikasyon aşamaları gerektirmektedir. Ayrıca, bağlı olmayan etiketin sorunlu olarak çıkarılması, pozitif sinyalleri (yanlış negatif sonuçlar) gizleyen yüksek arka plan sinyali ve/veya seçici olmayan reaksiyonlar (yanlış pozitif sonuçlar) ek sınırlamalardır [234,235].

Wang W., miRNA-21'i hassas bir şekilde tayin etmek için altın nanopartiküller (AuNP'ler)/poli (metilen mavisi) (PMB) ile modifiye edilmiş elektrot üretmiştir [236]. Bu çalışmada PMB film, camsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde elektropolimerizasyon

ile sentezlenmiştir. AuNP'ler, PMB/GCE yüzeyine immobilize edilmiştir ve böylece Au-S bağları yoluyla SH- fonksiyon gurubu içeren prob DNA'nın elektrot yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen hibridizasyondan kaynaklanan DPV'deki sinyal değişikliği ile hedef miRNA tayini gerçekleştirilmiştir. DPV pik akım değişikliği (ΔI), 100 fM - 1 nM aralığında konsantrasyonun logaritması ile iyi bir doğrusal ilişki göstermiş ve LOD'si 30 fM olarak belirlenmiştir [236].

Low ve arkadaşları, tükürükteki miR-21 biyobelirtecinin elektrokimyasal tayini (DPV) için bir kavram kanıtlama olarak (Proof-of-Concept) akıllı telefon tabanlı biyosensör sistemi geliştirmişler. rGO/Au ile modifiye edilmiş elektrot üzerinde miR-21 hedefi ile ssDNA probu arasındaki hibridizasyon, miR-21 hedef konsantrasyonundaki artışla birlikte DPV pik akımında düşüşe neden olmuştur. Akıllı telefon tabanlı biyosensör sistemi, 1 pM tayin sınırı ile 100 μ M ile 1 pM konsantrasyon aralığında miR-21 tespiti için ticari potansiyostat cihazı ile karşılaştırılabilir performans göstermiştir [237].

Zouari ve arkadaşları, hedef miRNA-21 ile hibridize olan iki sentetik DNA probunun kullanımını içeren sandviç tipi hibridizasyon biyoplatformu üretmişlerdir. Tiyol fonksiyonel grubuna sahip prob, rGO ve AuNP'ler den oluşan hibrit bir nanomateryal ile modifiye edilmiş tek kullanımlık karbon elektrotlar üzerinde tiyol kimyası yoluyla immobilize edilmiştir. Optimize koşullar altında, geliştirilen biyosensör, DPV tekniğini kullanarak 10 fM ile 2 pM arasında doğrusal bir aralık ve 5 fM'lik bir LOD ile sentetik hedef miRNA-21'in tayini için üstün özellikler sağlamıştır [238].

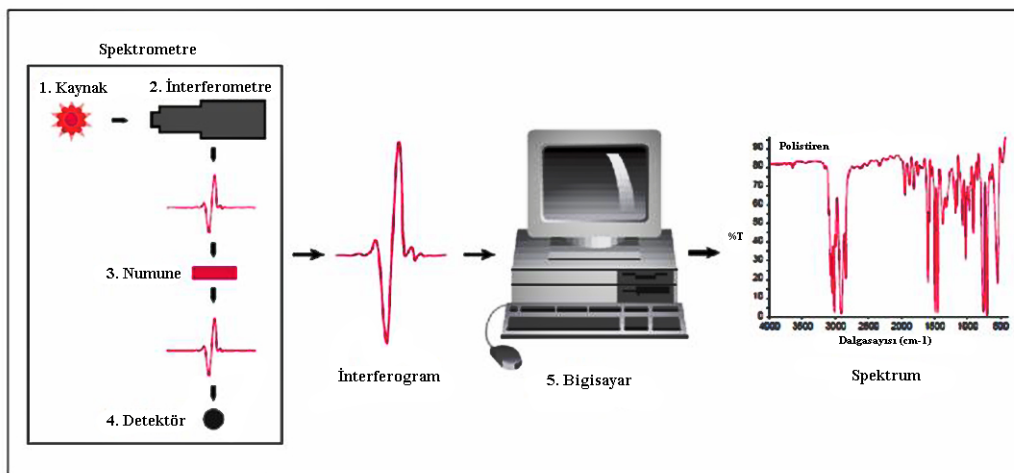
Hastalık teşhisinde (kanser, metabolik, nörolojik veya kardiyak bozukluklar gibi) miRNA uygulamalarının sayısı arttıkça, biyoalgılama sistemlerini POC uygulamasına entegre edilebilecek yeni tekniklerin geliştirilmesinde büyük bir ilerleme kaydedilmesi gerekmektedir. Son zamanlarda nanomateryalleri elektrokimyasal biyosensörlerde modifiye edici ajan olarak kullanma eğilimi, hassasiyet, seçicilik ve doğrusal çalışma aralığında iyileşmelerle sonuçlanmaktadır [239]. Ancak, bu tür biyosensörlerin ticarileştirilmesi daha fazla dikkat gerektirmektedir, çünkü bu algılama platformları hızlı ve taşınabilir cihazlara uygulanmasında düşük verimlilik ile karşılaşabilmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların tayini için klinik açıdan önemli olan POC cihazlarının uzun

sürekli depolamayı ve kararlılığını arttırmakla birlikte taşınabilirliği basitleştirme çabalarını merkezileştirmektedir.

2.7. Karakterizasyon Tekniklerinin Çalışma Prensipleri

2.7.1. Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

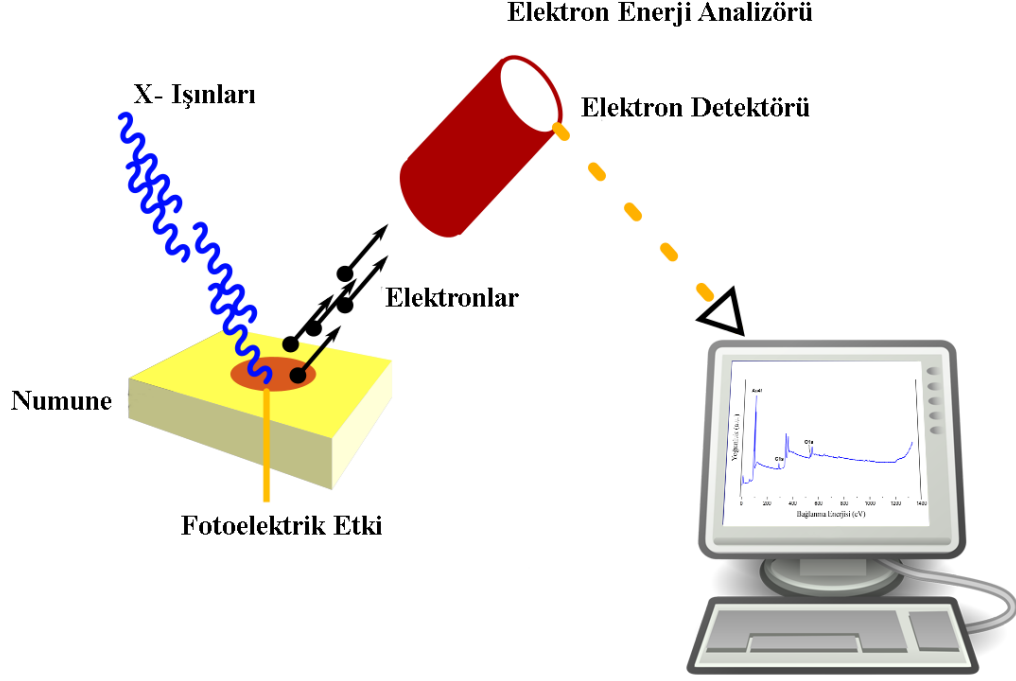
Kızılötesi (IR) spektrumları, IR bölgesindeki madde ve elektromanyetik alanlar arasındaki etkileşimlerin incelenmesini içerir. Bu spektral bölgede, EM dalgaları moleküler titreşimlerle birleşir. Moleküller, IR radyasyonunu emerek daha yüksek bir titreşim durumuna uyarılır. IR frekansı absorbe edildiğinde aslında molekül ile belirli bir frekansta etkileşime girer. Bu nedenle IR spektroskopisi, numunenin kimyasal bileşimi hakkında parmak izi bilgisi sağlayan çok güçlü bir tekniktir. IR Spektroskopisi kullanılarak elyaf numunelerinin hem kalitatif hem de kantitatif analizi gerçekleştirilebilir. FTIR, Fourier dönüşümü ilkesine göre çalışır (Şekil 2.8). İnterferogram, FTIR spektroskopisinde deneysel olarak belirlenir. Spektrum, geçirgenlik değerlerine karşı karşılık gelen dalga sayısına göre çizilir. Bu dönüşüm otomatik olarak gerçekleştirilir ve kızılötesi spektroskopi, pozitif bir tanımlama (kalitatif analiz) ile sonuçlanır ve spektrumdaki piklerin boyutu, mevcut malzeme miktarının doğrudan bir göstergesidir. Modern yazılımla kızılötesi, kantitatif analiz için mükemmel bir araçtır. Örnekler doğrudan örnek penceresine monte edilir ve veriler toplanır. Spektrumlar daha sonra blank'a göre düzeltilir ve ardından grafiği çizilir [240].



Şekil 2.8. Fourier dönüştürümlü kızılötesi spektrometresinin çalışma prensibi.

2.7.2. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), malzeme bilimi, kimya ve kimya mühendisliği alanlarında yüzey kimyasını, bağ yapısını ve yüzeylerin/arayüzlerin bileşimini değerlendirmek için en yaygın kullanılan tekniktir. Araştırmalarıyla 1981'de Nobel Fizik Ödülü'nü kazanan Kai Siegbahn, 1960'larda XPS'yi geliştirmiştir. XPS, yüzeyde hangi kimyasal elementlerin bulunduğunu ve bu elementler arasında var olan kimyasal bağın doğasını ortaya çıkarır. Hidrojen ve helyum dışındaki tüm elementleri tespit edebilir. X-ışınları genellikle monokromlanmış olmasına rağmen, XPS için, ışıkla atılan elektronlar 200-2000 eV foton enerjisinin "yumuşak" X-ışınlarıdır (Al X-ışınlarının enerjisi 1486,3 eV'dir). Bu, yayılan fotoelektronların bir detektör tarafından ölçülen belirli bir kinetik enerjiye (E_k) sahip olduğu anlamına gelir. XPS için analiz hücresinin, adsorbe edilmiş gazı numune yüzeyinden çıkarmak ve elektronların detektöre ulaşmalarını sağlamak için ultra yüksek vakum (UHV) koşullarında çalıştırılması gerekir. XPS cihazının ana bölmesindeki çalışma basıncı $\sim 1 \times 10^{-9}$ mbar'dır. Bir numuneyi analiz etmek için, dedektöre ulaşan elektron sayısını en üst düzeye çıkarmak için X-ışını tabancasının pozisyonunun X, Y ve Z yönlerine göre optimize edilmesi gerekir. Mümkün olan maksimum sayım sayısına ulaşmak, sinyal-gürültü oranını azaltacak ve veri içindeki hatayı en aza indirecektir. Numunede bulunan elementleri değerlendirmek için bir SURVEY taraması yapılır, ardından ilgi alanları üzerinde daha yüksek çözünürlüklü taramalar yapılabilir [241]. XPS analizleri için şematik kurulum Şekil 2.9'da gösterilmektedir.



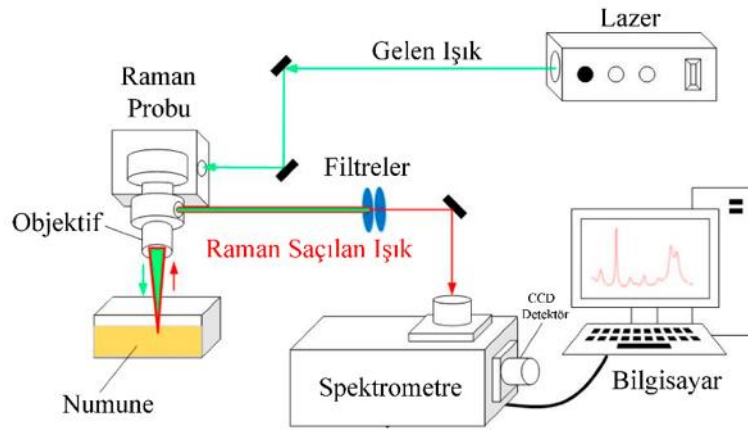
Şekil 2.9. XPS ve Fotoelektrik Etkinin temel prensibi.

2.7.3. Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi bir saçılma tekniğidir. Raman Etkisine dayanır, yani saçılan radyasyonun küçük bir kısmının frekansı, monokromatik gelen radyasyonun frekansından farklıdır. Gelen radyasyonun titreşen moleküller ile etkileşimi yoluyla esnek olmayan saçılmasına dayanır. Moleküler titreşimleri araştırır. Işık bir gaz, sıvı veya katıdaki moleküllerle etkileşime girdiğinde, fotonların büyük çoğunluğu, gelen fotonlarla aynı enerjide dağılır. Bu, elastik saçılma veya Rayleigh saçılması olarak tanımlanır. Bu fotonların küçük bir kısmı, 10 milyonda yaklaşık 1 foton, gelen fotonundan farklı bir frekansta saçılır. Bu sürece esnek olmayan saçılma veya Raman etkisi denir. Bir Raman spektrumu dalgaboyuna karşı yoğunluk kayması olarak sunulur (Şekil 2.10). Raman spektrumları $4000-10 \text{ cm}^{-1}$ aralığında kaydedilebilir. Bununla birlikte, organik moleküllerin Raman aktif normal titreşim modları $4000-400 \Delta\text{cm}^{-1}$ aralığında meydana gelir [242].

Dipol momentlerdeki değişikliklere bakan FTIR Spektroskopisinin aksine, Raman moleküler bağların polarize edilebilirliğindeki değişikliklere bakar. Işığın bir molekülle

etkileşimi elektron bulutunun deformasyonuna neden olabilir. Bu deformasyon, polarize edilebilirlikte bir değişiklik olarak bilinir. Moleküler bağlar, polarize edilebilirlikte bir değişikliğin meydana geldiği ve Raman aktif modlarına yol açan özel enerji geçişlerine sahiptir. Örnek olarak, karbon-karbon, sülfür-sülfür ve nitrojen-nitrojen bağları gibi homonükleer atomlar arasında bağlar içeren moleküller, fotonlar onlarla etkileşime girdiğinde polarize edilebilirlikte bir değişikliğe uğrar. Bunlar, Raman aktif spektral bantlarına yol açan, ancak FTIR'de görülmeyecek veya görülmesi zor olan bağ örnekleridir.



Şekil 2.10. Raman spektrometresinin ana bileşenlerinin şeması.

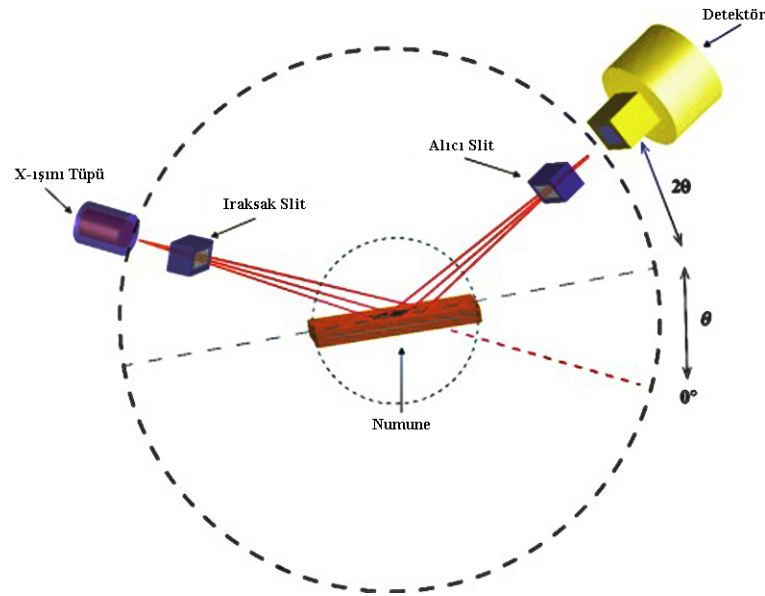
2.7.4. X-ışını Difraktometri (XRD)

Wilhelm Conrad Roentgen tarafından 1895 yılında X-ışınlarının keşfi, tüm bilimsel disiplinlerde önemli yeniliklere izin vererek yeni tıbbi ve teknik uygulamaların geliştirilmesini mümkün kılmıştır. X ışını kırınımı, monokromatik X ışınlarının ve bir kristalin numunenin yapıcı müdahalesine dayanır. X ışınları, dalgaboyu 10^{-3} -10 nm arasında olan yüksek enerjili elektromanyetik dalgalardır. X ışınlarının üretimi genellikle kapalı tüpler, dönen anotlar veya senkrotron radyasyon kaynaklarının kullanılmasıyla elde edilir. Bir tungsten filamentinin vakumda ısıtılmasıyla üretilen elektronlar, yüksek potansiyelli bir alan boyunca hızlandırılır ve daha sonra X ışınları yayan bir hedefe yönlendirilir. Gelen elektronlar, X ışınlarının oluşmasına neden olur. X-ışını fotonları maddeye ulaştığında, farklı soğurma ve saçılma etkilerine yol açan birkaç tür etkileşim gerçekleşebilir. Rayleigh saçılması olarak da adlandırılan elastik bir saçılma fotonlar ve atom çekirdeğini çevreleyen elektronlar arasında meydana gelir. Sonuç olarak, ışınlanmış

bir hacmin tüm atomlarına çarpan X-ışını fotonları her yöne dağılır. Bununla birlikte, bir kristal yapının periyodik doğası nedeniyle, yapıcı veya yıkıcı saçılmış radyasyon ortaya çıkar ve malzemelerin kristal yapısını araştırmak için çalışılabilen karakteristik kırınım olaylarına yol açar. Yöntemin prensibi, X ışınlarının periyodik atom düzlemleri tarafından kırınımına ve kırınımlı sinyalin açısı veya enerji çözümlü tespitine dayanmaktadır (Şekil 2.11). XRD fenomeninin geometrik yorumu (yapıcı girişimler) W.L. Bragg tarafından sunulmuştur. Bragg yasası aşağıda verilmiştir.

$$2n = 2d \sin \theta$$

burada n kırınım mertebesidir, λ gelen ışının nm cinsinden dalga boyu, d nm cinsinden kafes aralığı ve θ kırınım ışınının açısıdır [243].

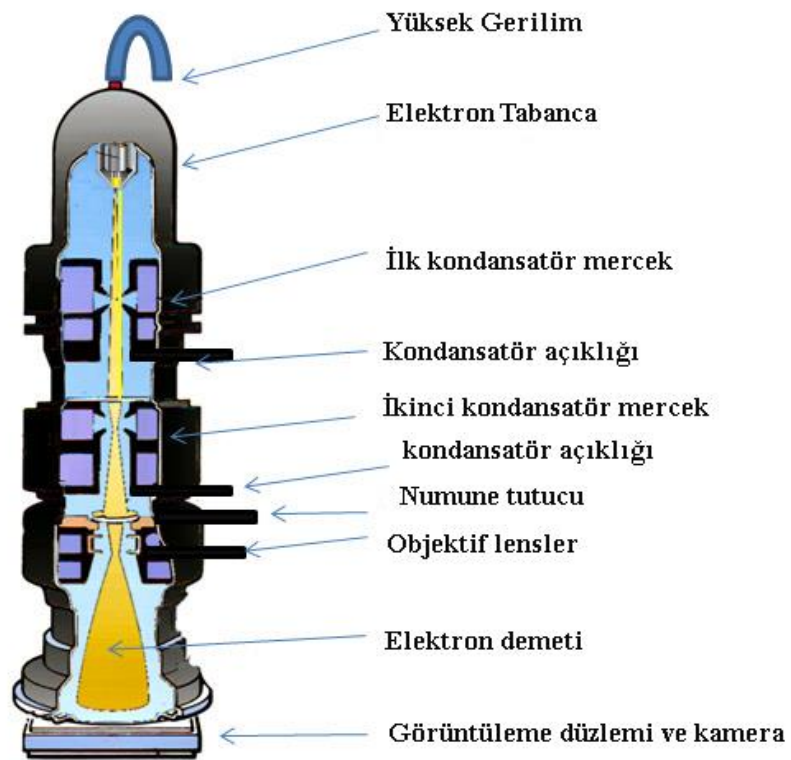


Şekil 2.11. X-ışını difraktometre cihazının şematik gösterimi.

2.7.5. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), elektron mikroskobu ve optik mikroskobun analoglarının orijinal şeklidir. Işık mikroskobu ile ulaşılamayan $\sim 0,1$ nm'lik bir çözünürlüğe ulaşabilir. Elektron ışını numuneden geçer ve numunenin iç yapısını görüntüler şeklinde analiz eder. Elektron, zayıf nüfuz etme kabiliyetine sahiptir ve kalın numunede emilir. Bu nedenle, numunenin kalınlığı birkaç yüz Angstrom'dan (10^{-10} m) fazla olmamalıdır. TEM üç temel sisteme sahiptir: (1) elektron ışını üreten bir elektron

tabancası ve ışını nesneye (numune) odaklayan kondansatör sistemi, (2) gerçek ve oldukça büyütülmüş bir görüntü oluşturmak için numuneden geçen elektronları odaklayan objektif lens, hareketli numune kızıağı, objektif, ara ve projektör lenslerinden oluşan görüntü üretme sistemi ve (3) elektron görüntüsünü insan gözünün algılayabileceği bir biçime dönüştüren görüntü kayıt sistemi. Görüntü kayıt sistemi genellikle görüntüyü görüntülemek ve odaklamak için bir floresan ekrandan ve kalıcı kayıtlar için bir dijital CCD kameradan oluşur. Ayrıca, pompalar ve bunlarla ilgili ölçüm, valflerden ve güç kaynaklarından oluşan bir vakum sistemi gereklidir (Şekil 2.12) [244].



Şekil 2.12. Temel TEM bileşenlerinin şematik gösterimi.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Hydroxylamine, nitrik asit, hidroklorik asit, Altın (III) klorür hidrat (HAuCl_4), trisodyum sitrat, Whatman® Grade 1, İndiyum kalay oksit kaplı PET (ITP-PET), fosfat tamponlu salin (PBS), EDTA, NaCl, Tris-HCl ve periferik serum Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Analar Analitik firmasından $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, Fischer Scientific'den $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve Merck'ten potasyum klorür (KCl) temin edilerek, EİS çalışmalarında redoks çiftini hazırlamak için kullanılmıştır. Gerçekleştirilen tüm sentez aşamalarında steril malzemeler kullanılmış olup bunun için cam eşyalar, kral suyu ile ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$, 3:1 v/v) temizlenmiş, distile su içinde durulanmış ve kullanılmadan önce etüvde kurutulmuştur. Çözelti hazırlamalar ve seyreltmeler için deiyonize su (direnci 18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$) kullanılmıştır.

Tüm sentetik oligonükleotidler, yani DNA probu (miRNA 410-5p sekansına komplementer) ve hedef (target) miRNA 410-5p, hedef dışı (non-target) miRNA 192 ve hedefdışı miRNA 200c Ella Biotech'ten (Türkiye) satın alındı. Deneylerde kullanılan oligonükleotidler aşağıdaki dizilere sahiptir:

- DNA probe: 5'-CGA ACT CAT CAC AGA CAA CCT- Tiyol SH-3'
- Hedef miRNA 410-5p: 5'-AGG UUG UCU GUG AUG AGU UCG-3'
- Hedef dışı miRNA 200c: 5'-UAA UAC UGC CGG GUA AUG AUG GA-3'
- Hedef dışı miRNA 192: 5'-CUG ACC UAU GAA UUG ACA GCC-3'

3.2. İletken Altın Nanoağ bağlı Elmas Benzeri Karbon Nanofilm'lerin Hazırlanması

İletken altın nanoağ bağlı elmas benzeri karbon nanofilm'lerin (CGN-DLC'lerin) sentez yöntemi iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama altın nanoparçacıkların (AuNP'ların) hazırlanmasını içerirken ikinci aşama tez amacına uygun hazırlanan AuNP'ların sinterlenmiş altın nanoağ bağlı elmas benzeri karbon nanofilmlerine dönüşmelerini içermektedir. Aşağıda AuNP'ların sentezinde kullanılan üç farklı yöntem açıklanmaktadır.

3.2.1. Altın Nanoparçacıkların (AuNP'lar) Sentez Yöntemleri

Altın nanopartikül sentezi için üç farklı yöntem denendi ve uygun boyuta sahip AuNP'lerin sentezine olanak sağlayan yöntem deneylerin devamı için seçildi.

a) I. Yöntem

160 mL distile su 90 °C'ye kadar ısıtılmış, ardından 1,6 mL % 1,0 HAuCl₄ eklenmiş ve 96 °C'ye ısıtılmaya devam edilmiştir. Daha sonra, 1 dk boyunca 5,6 mL % 1,0 sitrik asit eklenmiş ve elde edilen karışım, 15 dakika boyunca 96 °C'de karıştırılmıştır. Bu süre boyunca, çözeltinin rengi, açık sarıdan koyu kırmızıya doğru yavaş yavaş değişmiştir; AuNP çözeltisi oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur. Daha sonra, 400 mL AuNP çözeltisi 1 saat, 4 °C'de bekletilmiş ve daha sonra 20 dk boyunca 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Alt kısımdaki kırmızı renkli çökelek toplanmış ve 10 mL 1,0 mM SDS çözeltisi içinde dağıtılmıştır. AuNP çözeltisinde büyük partiküllerden kurtulmak için 0,22 µm selüloz filtreden geçirilmiş ve bir sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır [245].

b) II. Yöntem

1,0 mL 12,7 mM kloroaurik asit çözeltisi 49 mL DIUF H₂O'ya ilave edilmiştir. Yapıya geri soğutucu takılmış ve tüm aparat bir ısıtıcı plaka üzerine yerleştirilmiştir ve kaynama noktasına ulaşana kadar sabit karıştırma altında ısıtılmıştır. Ardından karışıma 0,94 mL 38,8 mM trisodyum sitrat çözeltisi eklenmiştir. Ekleme işleminin hemen ardından çözelti rengi ilk 30 sn içinde maviye ardından 150 sn içinde kırmızıya dönmüştür. Sentez sırasında sitrat iyonların altın(III)'leri indirgemesi ile altın nanopartiküllerin büyüklüğündeki artışa bağlı olarak renk değişimi gerçekleşmiştir. Kaynatma işlemi 5 dk devam ettirilip ardından çözelti oda ısısında soğutulmuştur. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C'de karanlıkta saklanmıştır [246].

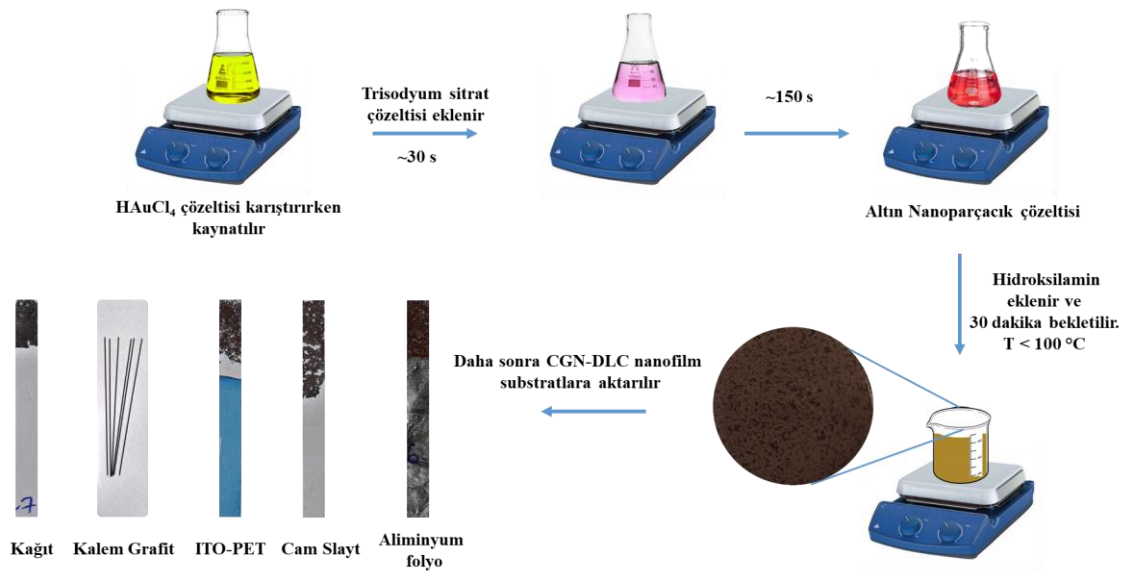
c) III. Yöntem

100 mL % 0,01 HAuCl₄ çözeltisi deiyonize su ile hazırlanmış ve kaynama noktasına gelene kadar sabit karıştırma altında ısıtılmıştır. Çözeltiye 4,5 mL % 1 trisodyum sitrat eklenmiştir. Çözelti ilk 20s içinde maviye ve 60 saniye sonra

şarap kırmızısına dönüşmüştür. Kaynatma işlemi 10 dakika daha sürdürülmüş ardından oda ısısında koloidal çözeltisi 15 dk daha karıştırılmıştır. Elde edilen AuNP çözeltisi, 4 °C'de saklanmıştır [247].

3.2.2. CGN-DLC Nanofilmin Sentez Yöntemi

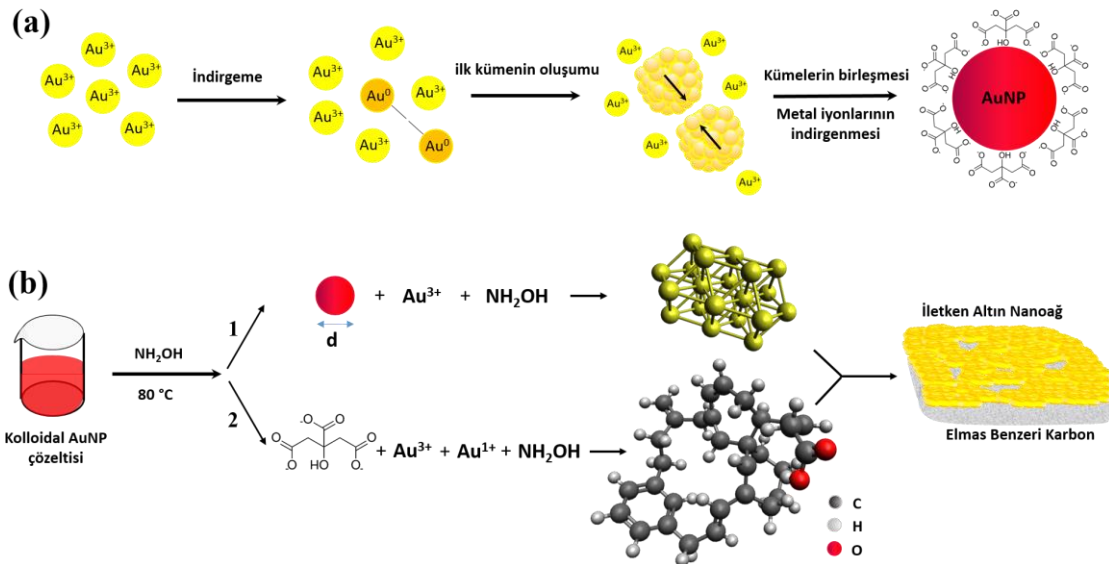
Bu aşamada trisodyum sitrat karbon öncüsü olarak ilk defa literatürde elmas benzeri karbon nanoyapıların oluşturulması için kullanılmıştır. CGN-DLC nanofilmler kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile hazırlanmıştır. Bunun için, 1.aşamada sentezlenen AuNP çözeltisi ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde seyrek Hydroxylamine ile 30 dakika boyunca muamele edilmiştir ($T < 100$ °C). Bu koşullar altında, sitrat kaplı AuNP'ların altın NP kısımları sinterlenerek iletken altın nanoağ yapısını ve sitrat bağlı kısımları birbiri ile bağ yaparak elmas benzeri karbon yapılarını oluşturmuştur. Tepkime bittikten sonra çözelti yüzeyinde bulunan çift tabakalı CGN-DLC nanofilmler kağıt, kalem grafit elektrot, PET, alümiyum folyo ve cam slayt yüzeylerine kaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. CGN-DLC Nanofilmlerin sentez aşamaları.

3.2.3. CGN-DLC Nanofilmin Sentez Mekanizması

Daha önce bahsedildiği gibi, çift katmanlı CGN-DLC nanofilmi, yüksek iletken altın nanoağ ve elmas benzeri karbon filminden oluşmuştur. Bu aşamada bu iki katmanın oluşum mekanizması tartışılacaktır. Tez kapsamında hazırlanan koloidal AuNP çözeltisi, altın iyonları (örneğin Au^{1+} ve Au^{3+}) ve sitrat kaplı AuNP'leri içermektedir. NH_2OH , Au^{3+} iyonlarını termodinamik olarak indirgeyerek koloidal Au nanopartiküllerinin (15 ± 1.7 nm) (Şekil 3.2a) ve yığın metal oluşumunu sağlamıştır. Ek olarak, reaksiyon hızı çözeltideki AuNP'ler tarafından önemli ölçüde hızlandırılmıştır (Şekil 3.2b-1) [248–250]. İletken altın nanoağlar oluşumu ile eş zamanlı olarak Au^{3+} ve Au^{1+} iyonları, NH_2OH ve sitrat varlığında koloidal AuNP çözeltisinin karmaşık benzanülasyonlarını desteklemiştir. Siklo katma ve yeniden düzenleme içeren bu reaksiyonda, aynı anda birkaç C–C bağı oluşmuş ve tek bir basamakta düzenleştirme meydana gelmiştir. Bu reaksiyonların temel bir özelliği, altının (I) ve altının (III), negatif karbonil oksijen gibi düşük nükleofilikliğe sahip fonksiyonel gruplara nükleofilik materyallerin eklenmesini artırma konusundaki benzersiz yeteneğidir. İlginç bir şekilde, bu reaksiyon koşulları altında oksim oluşumu ve hidroksilamin hidroklorür varlığı için herhangi bir kanıt bulunmamıştır. Bunun yerine, 80 °C'de 30 dakika sonra düzenleştirme ürünü (CGN-DLC) elde edilmiştir (Şekil 3.2b-2) [251,252].



Şekil 3.2. (a) Altın nanopartiküllerin sentez mekanizması, (b) elde edilen AuNP çözeltisinden CGN-DLC nanofilmlerin oluşum mekanizması.

3.3. Karakterizasyon Teknikleri

3.3.1. Dinamik Işık Saçılma (DLS)

Zeta Sizer (Malvern Instruments, Model 3000, HSA İngiltere) cihazı, sentezlenen AuNP'lerin ortalama partikül büyüklüğü dağılımını bulmak için kullanılmıştır. Bu cihaz, parçacık boyutunu belirlemek için dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi prensibine dayanmaktadır.

DLS, süspansiyondaki nanoboyuttaki partiküllerin boyut dağılım profilini belirlemek için kullanılabilir bir tekniktir. DLS'nin tipik uygulamaları, sıvı içinde dağılmış veya çözülmüş parçacıkların, emülsiyonların veya moleküllerin karakterizasyonuna dayanmaktadır. Süspansiyondaki partiküllerin veya moleküllerin Brown hareketi, lazer ışığının farklı yoğunluklarda dağılmasına neden olmaktadır. Bu yoğunluk dalgalanmalarının analizi, Stokes-Einstein ilişkisini kullanarak Brown hareketinin hızını ve dolayısıyla parçacık boyutunu vermektedir.

Analiz, ultrasaf suya (18,2 MΩ cm dirençli) karşı 25 °C'de gerçekleştirilmiş ve elektroforetik mobilite ölçümleri için nanopartikül çözeltisi ultrasaf suyla seyreltilmiştir (1:10 v/v).

3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Sentezlenen nanofilmin kimyasal özellikleri azalan tam yansıma-fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR, Nicolet TM ISTM 50 spektrometresi, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar, 4000 cm⁻¹ ile 600 cm⁻¹'den 4'lük bir çözünürlükle kaydedilmiştir. Bu karakterizasyon yöntemi, moleküler bağ karakterizasyonu yaparak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel grupları, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik yada alifatik olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

3.3.3. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Nanofilmlerin yüzey kimyasal bileşimlerinin analizi, Al K-Alpha kaynak tabancasının 1.4 kV odak gerilimi, 6 mA ışın akımı ve 400 µm spot boyutunda çalıştırıldığı X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS, Thermo Fisher Scientific K-alfa-Monochromated yüksek performanslı XPS Spektrometresi) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan karakterizasyon yönteminin amacı, CGN-DLC nanofilm ile kaplanmış yüzeylerinde Au, C, O, ve N elementlerinin ve Au-C, C-C/C=C, C-O, O-C-C/C-OH, ve C=O bağlarının var olup olmadığını, konsantrasyonlarının azalıp azalmadığını, veya artmış olup olmadığını göstermesine dayanmaktadır.

3.3.4. Raman Spektroskopisi Analizleri

Witec Alpha300S tarama yakın alan optik mikroskop sisteminin Raman mikroskopi modu (uyarma dalga boyu; 532nm, lazer gücü; 10 mW), Raman çalışmaları için kullanılmıştır. Spektrumlar -100 cm^{-1} ile 3000 cm^{-1} aralığında kaydedilmiştir.

3.3.5. X-ışını Difraktometri (XRD) Analizi

Sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin kristal yapısı ve faz sayısı, X-ışını difraktometrisi (XRD, PANalytical X'Pert Pro MPD, Çok Amaçlı Difraktometre, monokromatize Cu Ka radyasyon kaynağı $\lambda = 1,540598 \text{ \AA}$) ile analiz edilmiştir. XRD analizinde, nanofilmler amorf yapısı nedeniyle cam slayt üzerine kaplanmıştır.

3.3.6. Ultraviyole-Görünür (UV-Vis) Analizi

CGN-DLC nanofilmlerinin optik özellikleri ve bant boşlukları UV-Vis spektroskopisi ile incelenmiş ve hesaplanmıştır. Optik çalışmalar için UV-Vis-NIR spektrofotometre (Shimadzu UV-3600) kullanılmıştır.

3.3.7. Elektron Mikroskopi Analizleri

Nanofilmlerin morfoloji karakterizasyonu için yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskobu (HR-TEM, JEOL JEM 1220) ve odaklanmış iyon ışını tarama elektron

mikroskobu (FIB-SEM, TESCAN, GAIA 3) kullanılmıştır. SEM analizi için kağıt üzerine kaplanan nanofilmler kullanılmıştır. Numuneler, çift taraflı bantlar ile alüminyum stablara yapıştırılmış ve kaplama sistemi (Leica ACE 600 model Au/Pd/C) kullanılarak 5 nm kalınlığında altın ile kaplanmıştır. TEM analizi içinde orjinal sentezlenen nanofilmler kullanılmıştır.

3.3.8. CGN-DLC Nanofilmin Kalınlık Ölçümü

Sentezlenen nanofilmlerin kalınlığı Gwyddion yazılımı kullanılarak ölçülmüştür. Açık kaynaklı Gwyddion, yaklaşık 80 farklı dosya formatını (örn. SPM verileri) analiz etmek için kullanılabilen çoklu platform yazılımıdır. Bu çalışmada SEM verileri yazılıma yüklenir ve varsayılan maskeler kullanılır. Nanofilm kalınlığını ölçmek için aşağıdaki adımlar yapılmalıdır. İlk olarak, SEM verilerinden en iyi sonucu elde etmek için, yüklenen görüntü önceden işlenmelidir. Önışleme adımı, verilerin ortalama düzlem çıkarma (mean plane subtraction) ile seviyelendirilmesini, fasetlerin yukarı doğru bakmasını (facets point upward) sağlamak için verilerin seviyelendirilmesini, yükseklik medyanını eşleştirerek (matching height median) satırları düzeltmeyi ve veri işlemindeki yatay izleri (strokes) düzeltmeyi içerir. İkincisi, verilerin profilini elde etmek için araçlardan (tools) ekstrakt profili seçilir. Profil grafiğinde, yüzey ve biriken alan arasındaki yükseklik farkı nanofilmin kalınlığını gösterir. Üçüncü olarak, elde edilen profillerdeki gürültüyü gidermek için veri işlemindeki filtre seçeneği kullanılmalıdır. Son olarak, filtrelenmiş profil grafiği önce düzleştirilir ve ardından grafik bölgesindeki "fit critical dimension" komutu kullanılarak kritik boyutlar eklenir. Bu çalışmada SEM aracılığıyla elde edilen verilerin kalınlığını ölçmek için kenar yüksekliği-sol (edge height-left) kullanılmıştır.

3.3.9. CGN-DLC Nanofilmlerinin Elektriksel Özellikleri

Bir elektrik devresinde kullanılmak üzere CGN-DLC nanofilminin çalışması, akım-voltaj karakteristiği (I-V eğrisi, 6430 Keithley alt-femtoamper uzak kaynak ölçer) ile analiz edilmiştir. Ayrıca, nanofilmlerin direnci oda sıcaklığında dört noktalı prob yöntemi ile ölçülmüştür.

3.3.10. CGN-DLC Nanofilmlerinin Elektrokimyasal Analizi

Tüm elektrokimyasal çalışmalar, üç elektrot konfigürasyonu kullanılarak CH Instruments (CHI660C model potansiyostat / galvanostat) ile gerçekleştirilmiştir. Bu konfigürasyonda çalışma elektrotu olarak CGN-DLC/PGE, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M KCl) elektrodu kullanılmıştır.

3.4. miRNA Tayini için Elektrokimyasal Biyosensörün Geliştirilmesi

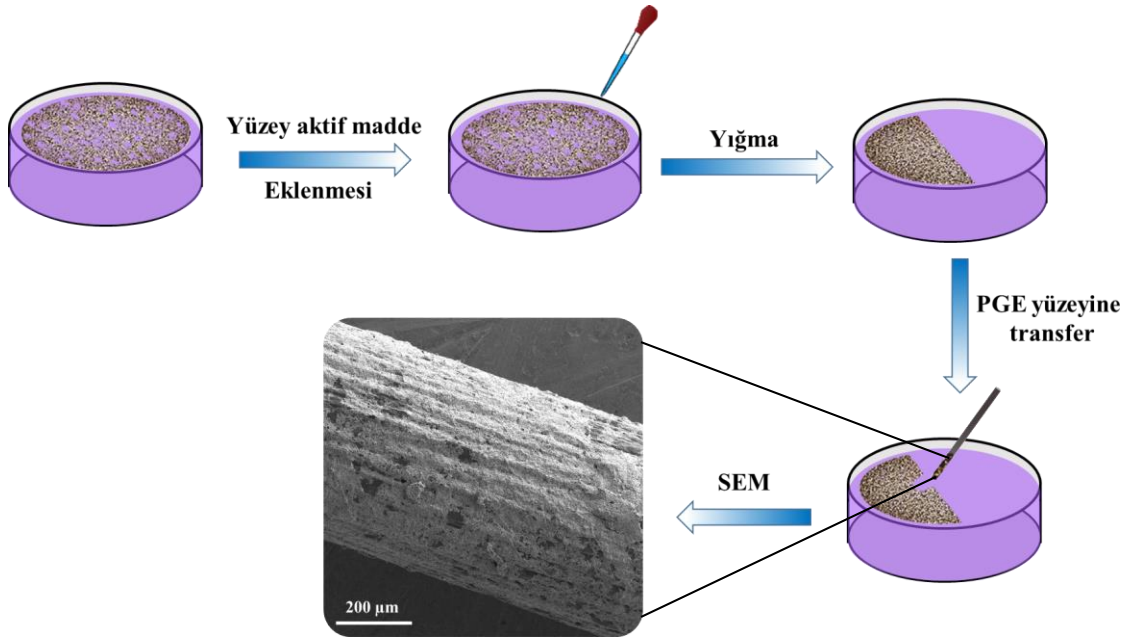
Biyosensör tabanlı miRNA tayini için validasyon çalışmaları, eşlenik (yakalayıcı) oligonükleotit problemleri ile miRNA'ların hibridizasyonuna dayanmaktadır [253]. Hibridizasyon işlemi, bir nükleik asidin mevcut sinyalindeki veya kapasitans, akım ve direnç gibi elektrokimyasal parametrelerdeki varyasyonlardan kaynaklanan değişiklik yoluyla ayırt edilmektedir [254–257].

Sunulan tez çalışmasında, prostat kanseri biyobelirteci olan miR-410-5p'nin tayini için elektrokimyasal biyosensör platformu olarak kalem grafit elektrodu (PGE) ve algılama yüzeyi olarak CGN-DLC nanofilmler kullanılmıştır. Sunulan biyosensör platformunda gerçekleşen hibridizasyon işlemindeki üretilen sinyalin güçlendirilmesi için herhangi bir amplifikasyon işlemi **uygulanmamıştır**. Hedef miR-410-5p'nin seçicilik analizi, miRNA 200c ve miRNA 192 varlığında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, periferik serum örneğinde hedef miR-410-5p'nin geri kazanım çalışması gerçekleştirilmiştir. Üretilen elektrokimyasal biyosensör platformunun tekrar üretilebilirlik ve kararlılık analizleri de gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Kalem Grafit Elektrodun CGN-DLC Nanofilm ile Modifikasyonu

Modifiye PGE, kendiliğinden düzenlenme yoluyla sentezlenen CGN-DLC iletken nanofilmin grafit uçların üzerine aktarılmasıyla hazırlanmıştır (Şekil 3.3). 3.2. bölümünde belirtildiği gibi CGN-DLC nanofilm sentezlendikten ve çözelti üzerinde yüzdürüldükten sonra, çözeltinin yüzey gerilimini azaltmak için eser miktarda yüzey aktif madde (surfactant) kullanılmıştır [258]. Bu işlem sonucunda çözelti yüzeyinde yüzey gerilimi gradyanı oluşması nedeniyle hazırlanan CGN-DLC nanofilm ters yönde hareket ettirilmiş ve sonunda sıkıştırılmış bir iletken nanofilm elde edilmiştir. Daha sonra grafit uçlar, yüzen filmin olmadığı taraftaki çözeltiye daldırılmış ve yavaş yavaş yüzen filmin alt

kısmına yerleştirilmiştir. Sonra grafit uçlar, CGN-DLC nanofilme 45 °'lik bir açıyla yaklaştırılmış ve yavaşça elektrot yüzeyine kaplanması sağlanmıştır. CGN-DLC nanofilmler PGE yüzeyine kaplandıktan sonra 30 dk. boyunca oda sıcaklığında kurutulmaları için bekletilmiştir. Ayrıca kaplama optimizasyon çalışmaları sonucunda kaplanan ikinci ve üçüncü katmanlar yüzey homojenliğini etkilemekte ve elde edilen elektrokimyasal sonuçları değiştirmektedir.



Şekil 3.3. CGN-DLC modifiye PGE'nin üretim sürecinin şematik gösterimi. CGN-DLC nanofilm kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile hazırlanmıştır; CGN-DLC filminin kompakt formu yüzey aktif madde kullanılarak hazırlanmıştır; ve daha sonra CGN-DLC filmi, PGE yüzeyine aktarılmıştır.

3.4.2. Yakalayıcı DNA Prob İmmobilizasyonu

Oligonükleotitlerin stok çözeltileri, Tris-EDTA (10 mM: 1 mM) tampon çözeltisi (pH 8.0) içerisinde hazırlanmış ve daha sonra 20 mM NaCl içeren pH 7.0 PBS ile seyreltilmiştir. Önceden aktive edilmiş CGN-DLC modifiye PGE'ler, 100 µL 1 µM tiyol ile modifiye yakalayıcı probu (SH-DNA) içeren PCR tüplerine daldırılmış ve bir sa boyunca bekletilmiş, ardından Au-S bağının oluşturulmasıyla SH-DNA elektrot üzerinde

(DNA/ CGN-DLC/PGE) immobilize edilmiştir. Son olarak elektrot PBS ile yıkanmış ve kurutulmuştur.

3.4.3. miRNA-410-5p Hibridizasyonu

Hibridizasyon, oda sıcaklığında 30 dk boyunca 100 µL miRNA-410 hedef (miRNA) içeren PCR tüplerinde DNA/CGN-DLC/PGE'lerin inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (miRNA/DNA/CGN-DLC/PGE).

3.4.4. Serum Örneğinde ve Redoks Prob Solüsyonunda Elektrokimyasal Ölçümler

Tüm elektrokimyasal ölçümler, çalışma elektrodu olarak PGE, referans elektrodu olarak doymuş kalomel elektrot (SCE) ve karşıt elektrodu olarak Pt elektrot içeren üçlü elektrot sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon amacıyla kullanılan dönüşümlü voltametri (CV), 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 0,1 M KCl çözeltisi içeren 0,1 M PBS (pH 7,4) içinde -0,5 V ile +0,85 V (SCE'ye karşı) aralığında, 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ tarama hızı ile gerçekleştirilmiştir. DNA probun immobilizasyonu ve miR-410 hedefi ile hibridizasyon işlemi, 50 mV puls yüksekliği, 0,05 s puls genişliği altında -0,2 ile 0,5 V potansiyel aralığı içinde kaydedilen DPV kullanılarak incelenmiştir. Hedef miRNA'nın konsantrasyonu, CGN-DLC filmin DPV oksidasyon pik akım değişikliği (ΔI_p) ile ölçülmüştür ($\Delta I_p = I(\text{miRNA/DNA/CGN-DLC/PGE}) - I(\text{DNA/CGN-DLC/PGE})$).

Daha kompleks bir matris ortamında miRNA'ların tayini için PBS ile seyreltilmiş periferik serum numunesi (1:1 v/v) kullanılmıştır. Periferik serumda iki farklı miRNA-410 konsantrasyonu için geri kazanım (recovery) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması iki ana başlık altında özetlenmiştir, bu bağlamda i) iki katmanlı iletken altın nanoağ bağlı elmas benzeri karbon (CGN-DLC) nanofilmlerin kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile sentezlenmesi ve fizikokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve ii) yenilikçi elektrot modifiye edici ajanı olarak elektrokimyasal biyosensörde miRNA-410 tayini için kullanılmıştır.

4.1. Sentezlenen AuNP'lerin Boyut Analizi

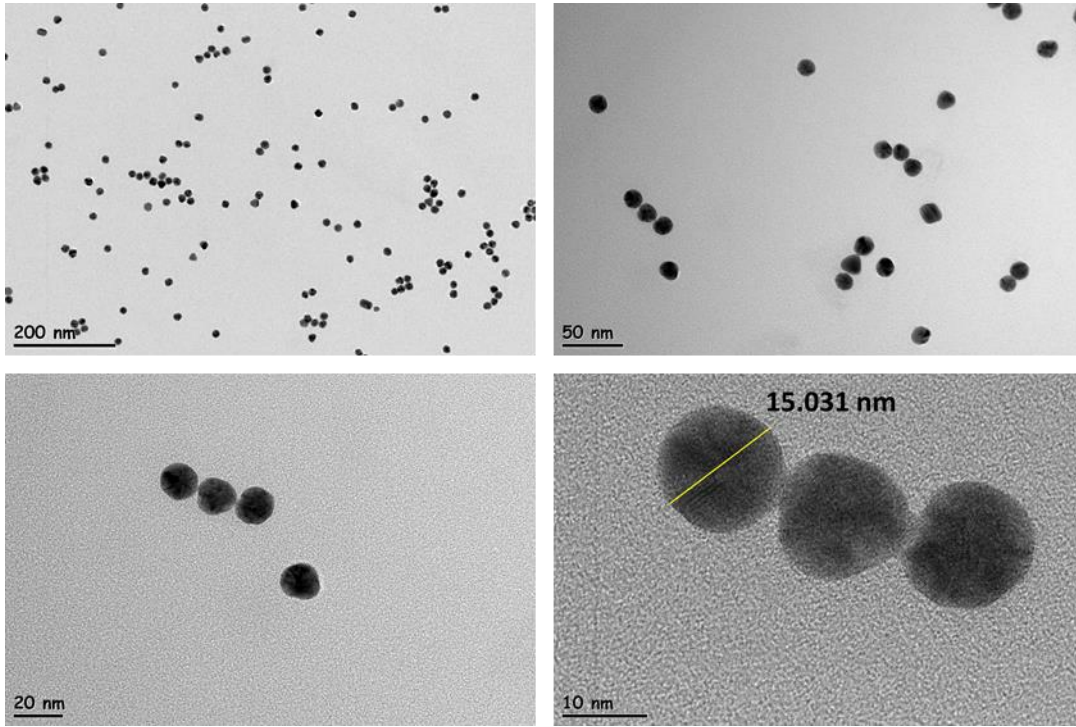
Tez kapsamında, AuNP'ler, üç farklı yöntem ile sentezlenmiş ve optimize edilmiştir (Çizelge 4.1). DLS yönteminde parametre değişikliklerinin ortalama nanopartikül çapına etkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.1. Sentezlenen AuNP'lerin boyut dağılımları ve çoklu dağılım indeksleri (PDI) (n=3)

AuNP'lerin sentez Yöntemi	Boyut (nm)	PDI
I. Yöntem	53 ± 2,3	0,136 ± 0,011
II. Yöntem	15 ± 1,7	0,113 ± 0,019
III. Yöntem	87 ± 1,1	0,169 ± 0,015

Üç farklı yöntem ile sentezlenen AuNP'ler, CGN-DLC nanofilm sentezinde kullanılmışlardır. Sentezlenen nanofilmlerin direnci daha sonra iki problu multimetre kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemde kağıtlar 1×1 cm² boyutlarında kesilmiş ve her örnekten 6 kere ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümler sonucunda II.yöntem ile sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin diğer yöntemlere göre daha düşük levha direncine ($R_{s1} = 25,5 \pm 2,3$, $R_{s2} = 12,1 \pm 1,7$, $R_{s3} = 40 \pm 1,5 \Omega/\square$) sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre II.yöntem ile elde edilen AuNP'ler, CGN-DLC nanofilmlerin sentezi için seçilmiştir.

II.yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin daha detaylı analizlerin için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi yapılmıştır (Şekil 4.1).

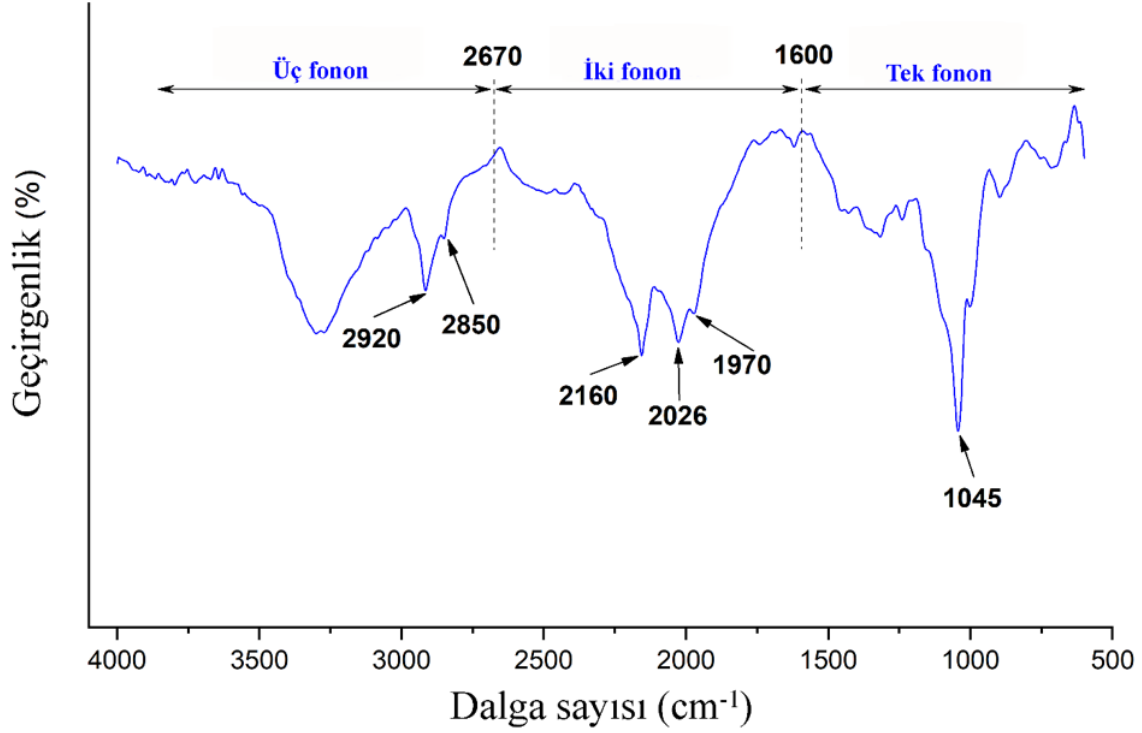


Şekil 4.1. II.yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin TEM görüntüsü.

4.2. Sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin

4.2.1. FTIR Analizi

Kendiliğinden düzenlenme yöntem ile sentezlenen CGN-DLC nanofilmler hiç bir yüzeye kaplanmadan uygun koşullarda küçük levhalar şeklinde kurutulmaları sağlanmıştır. Elde edilen natif CGN-DLC levhaların moleküler bağ karakterizasyonunu değerlendirmek için kızılötesi spektroskopi (IR) yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.2'de CGN-DLC nanofilmlerine ait 4000 cm^{-1} ile 600 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki IR spektrumu gösterilmiştir.



Şekil 4.2. CGN-DLC nanofilmin FTIR spektrumu. Tek, iki ve üç-fonon bölgeleri elmas kristallerine aittir ve karşılaştırmak amacıyla eklenmiştir.

Elmas, dipol momentine sahip olmayan tamamen kovalent bir kristaldir. Bu nedenle ideal elmas lateksi, tek-fonon (One-phonon) spektral bölgedeki ışığı absorplamaz. Mükemmel elmasların içsel absorpsiyonu sadece iki ve üç-fonon (Two and Three-phonon) bölgelerinde görülür. Bu absorpsiyon, kristallere iyonik olarak bağlı tek-fonon bandındakinden yaklaşık iki kat daha büyüktür. Bu nedenle, çoğu elmasta lateks kusurlarının neden olduğu zayıf tek-fonon absorpsiyonu da görülür [259].

Elmas Brillouin bölgesinin kritik noktalarındaki fononların enerjileri olarak bilinen tek-fonon dağılım eğrileri (~ 800 ile 1410 cm^{-1}) ve yoğunluk durumları mükemmel elmas, grafit ve **elmas benzeri karbonda** bulunabilir. İki-fonon (2665 ile $\sim 1332 \text{ cm}^{-1}$) ve üç-fonon (~ 4000 ile 2665 cm^{-1}) bölgeleri, elmasa özgü özellikler içerir [260–264]. Bu özellikler, kızılötesi enerjiye maruz kaldığında elmas lateksinin karbon-karbon bağlarının titreşiminden kaynaklanır [265].

1000 ve 700 cm^{-1} arasındaki pikler, bazı olefinik gruplarda ve aromatik halkalarda düzlem dışı C-H bükülüm titreşimlerine karşılık gelir. 1000 ve 1300 cm^{-1} arasındaki bantlar, sp^2 karbon üzerinde C-O gerilme titreşimi olarak tahsis edilir. 1618 cm^{-1} 'deki bant, sp^2 hibridleştirilmiş karbonun C = C gerilme titreşimi ile ilişkilidir. 2160 cm^{-1} , 2030 cm^{-1} ve 1975 cm^{-1} 'deki ana piklerin tümü <110> simetri yönündeki fononlara karşılık gelir [266]. 2800-3000 cm^{-1} bölgesindeki baskın absorpsiyon, CH_2 ve CH_3 gruplarının (sp^3) C-H simetrik ve asimetrik gerilmesinin göstergesidir [267]. Yaklaşık 3300 cm^{-1} merkezli geniş bant, bir karboksilik asitten kaynaklanan hidroksil gruplarının ve/veya örnek yüzeyinde fiziksel olarak adsorbe edilmiş suyun O-H gerilmesine karşılık gelir.

4.2.2. XPS Analizi

XPS, yüzey kimyasal bileşimlerini belirlemek için en yaygın kullanılan tekniktir. XPS, yüzeylerdeki elementlerin kimyasal durumunu, atomik bileşimini ve oksidasyon durumlarını belirleyebilir.

XPS biriken nanofilmlerinin kompozisyonunu belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sentezlenen CGN-DLC nanofilm filtre kağıd üzerine kaplanmıştır. Çizelge 4.2, filtre kağıdın C ve O elementlerinin stokiyometrisini ve atomik konsantrasyonlarının bileşimini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Filtre kağıdının XPS analizi.

Numune	Atom konsantrasyonu (%)		Atomik konsantrasyonun bileşimi (%)				
	C	O	C1s			O1s	
			C-C/C-H	C-O	O-C-O	C-OH	C-O
Filtre kağıt	59,13	40,87	18,37	61,18	20,44	68,36	31,63

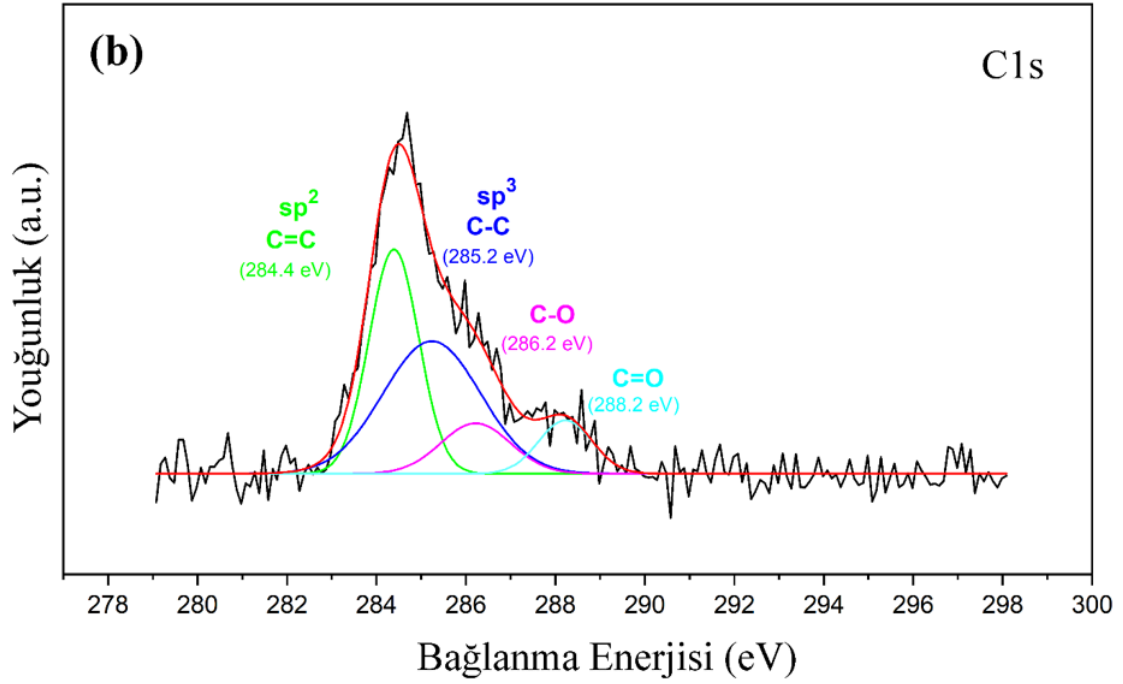
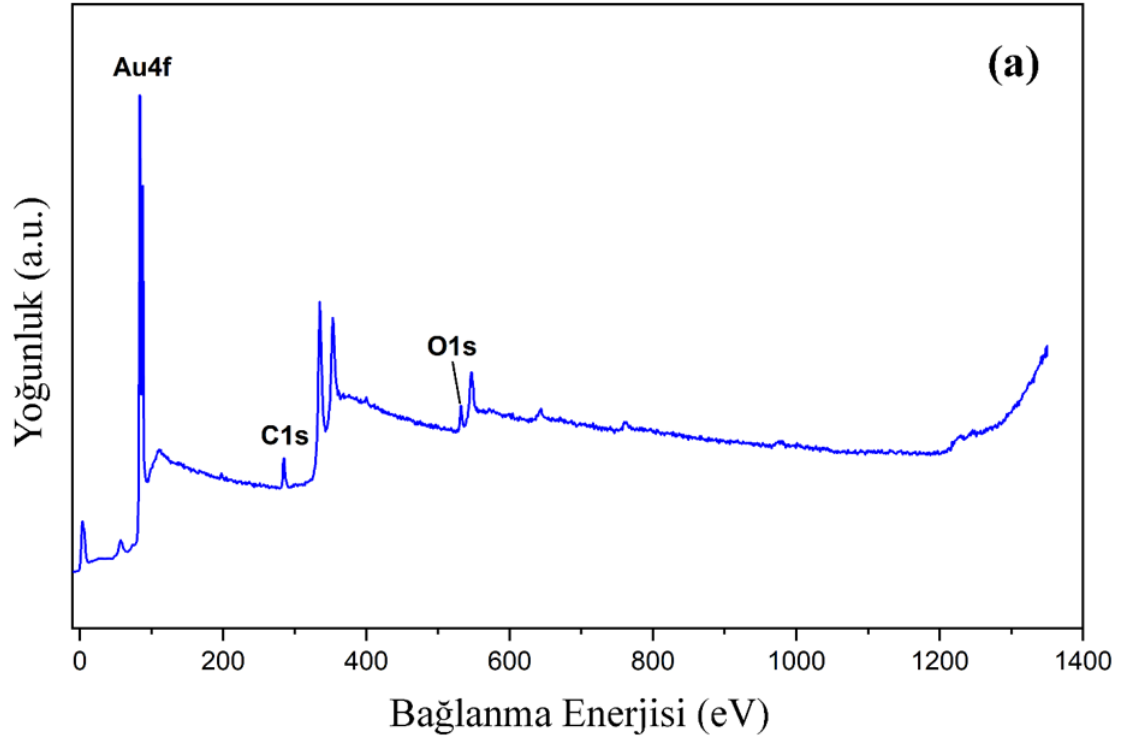
Çizelge 4.3, hem CGN-DLC nanofilm kaplı filtre kağıdında hem de doğal (hiç bir yüzeye kaplanmamış) CGN-DLC nanofilmlerindeki Au, C ve O elementlerinin stokiyometrisini ve atomik konsantrasyonlarının bileşimini göstermektedir.

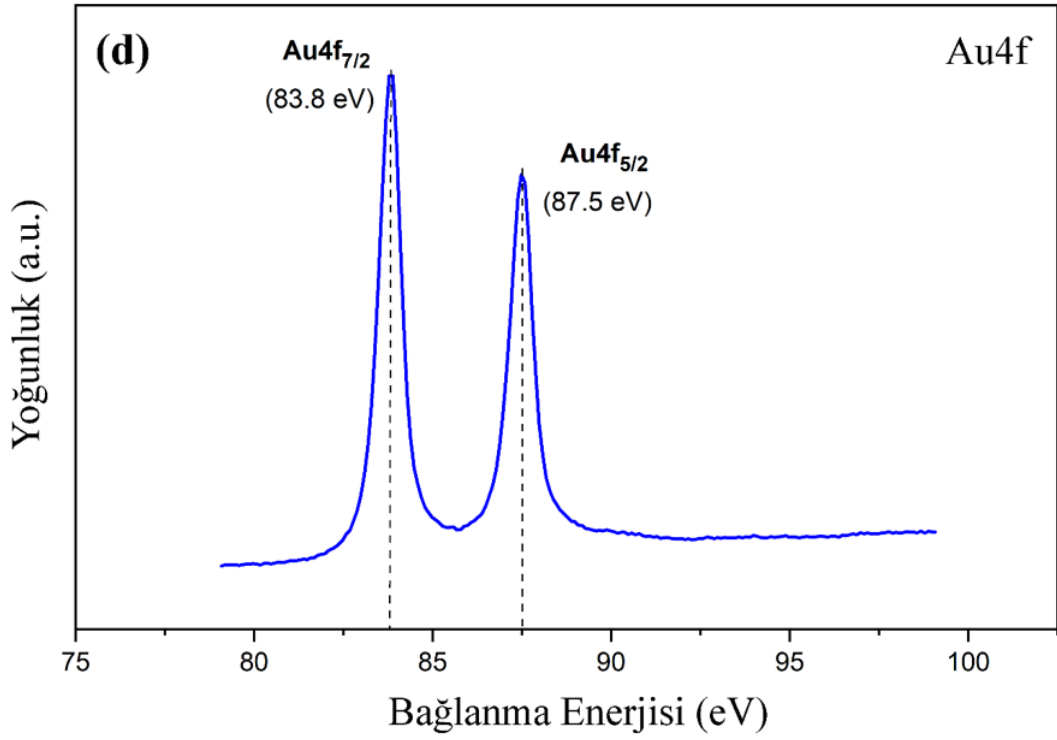
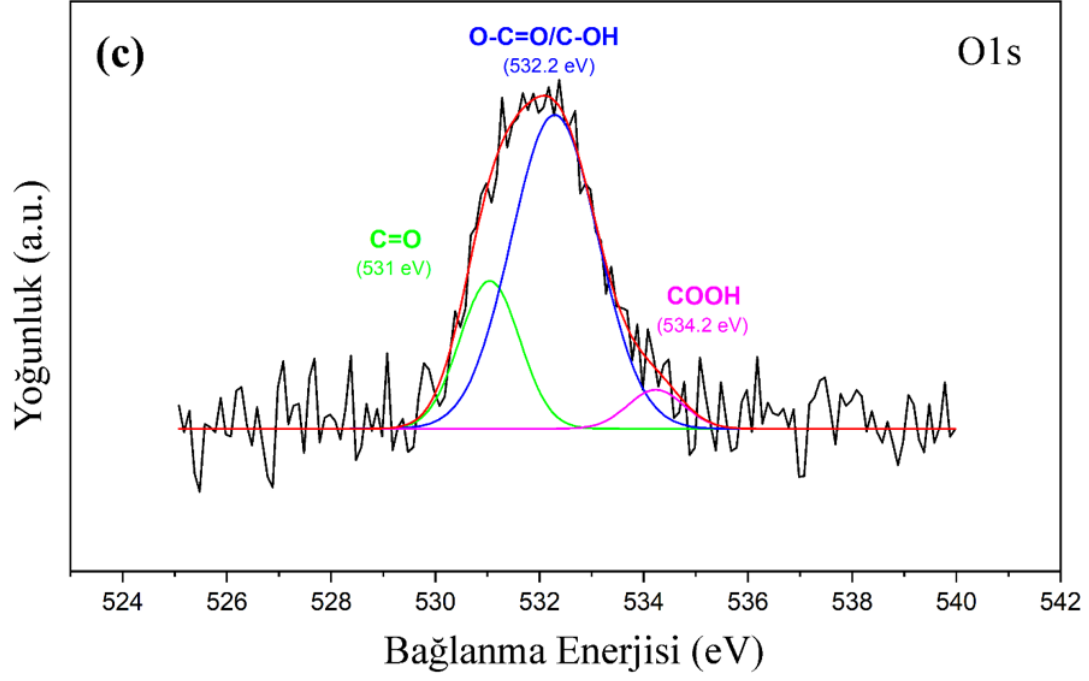
Çizelge 4.3. CGN-DLC kaplı filtre kağıdı ve doğal CGN-DLC nanofilminin XPS analizi.

Numune	A.K.* (%)			Atomik konsantrasyonun bileşimi (%)								
				C1s					O1s			
	Au	C	O	sp ²	sp ³	C-O	O-C-O/ C=O	O-C=O	C=O	C-OH/ O-C=O	C-O	
kaplanmış filtre kağıt	17,9	49,2	32,9	28,2	9,5	44,4	16,4	1,5	21,8	46,4	31,8	
Doğal CGN-DLC	34,7	48	17,3	36,6	42,4	11,6	-	9,4	23,1	71,2	5,7	

*: Atom konsantrasyonu

Şekil 4.3a, herhangi bir yüzey üzerinde kaplama olmaksızın doğal CGN-DLC ince filmin XPS genel spektrumunu göstermektedir. Spektrum, ince filmde Au, C ve O elementlerinin varlığını ortaya koymaktadır. Şekil 4.3b'de gösterildiği gibi, C1s dört tepe noktasına (pik) bölünmüştür. 284,39, 285,23, 286,21 ve 288,22 eV'de bulunan pikler, sırasıyla sp² hibridize karbon, sp³ hibridize karbon, C-O türleri ve C=O türlerine karşılık gelmektedir. sp² ve sp³ piklerinin entegre alanlarını karşılaştırarak, sp³/sp² oranı 1,16 bulunmuş ve bu da sp³ karbon tipinin baskın olduğunu göstermiştir [268–270]. O1s spektrumunda (Şekil 4.3c), 532,29 eV'deki büyük pik, esterlerde ve karboksilik anhidritlerde karbonil oksijen atomlarına ve hidroksillerde veya eterlerde oksijen atomlarına karşılık gelen hem O–C=O hem de C–OH bağlarının varlığını ortaya çıkarmıştır. 531,04 ve 534,23 eV merkezli diğer pikler, sırasıyla karbonil gruplarında C=O ve karboksil gruplarında oksijene karşılık gelmiştir [271–273]. Au4f spektrumlarının ayrışımı, sabit bir yoğunluk oranında (1,28), 3,7 eV'lik bir ayırmaya sahip iki spin-yörüngeye bölünmüş Au4f_{7/2} ve Au4f_{5/2} bileşenlerini kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekik 4.3d) [272,274].





Şekil 4.3. (a) Sentezlenmiş CGN-DLC ince filmin XPS genel tarama spektrumu. CGN-DLC ince filmlerinin yüksek çözünürlüklü C1s (b), O1s (c) ve Au4f (d) XPS spektrumları.

4.2.3. Raman Spektroskopisi Çalışmaları

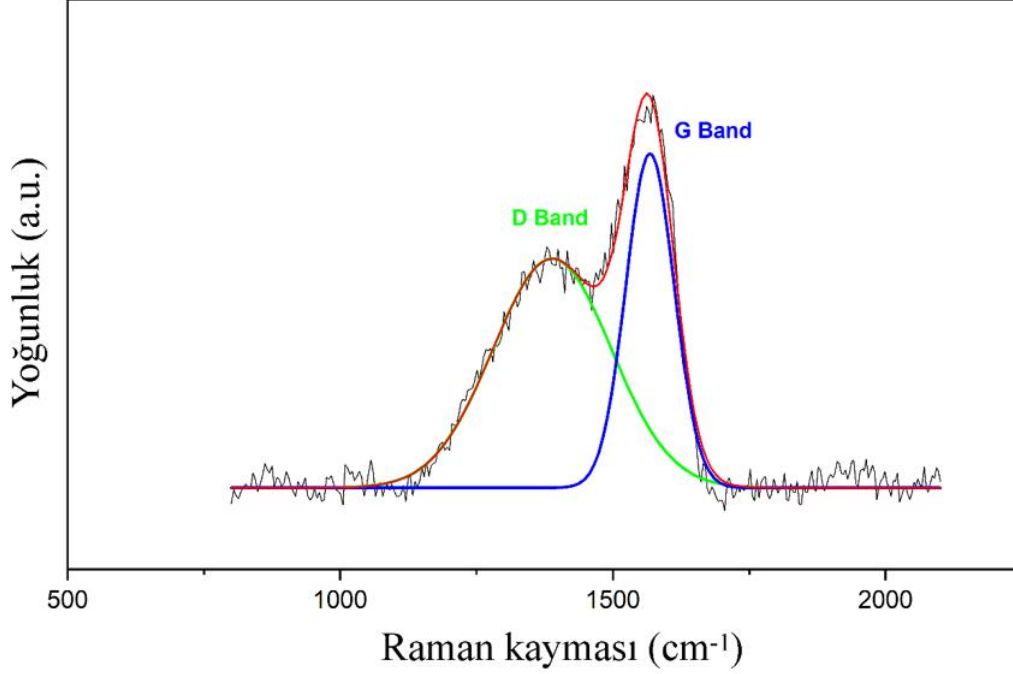
Raman spektrumları, karbon bazlı filmlerin ayrıntılı bağlanma yapısını ve alan büyüklüklerini araştırmak için çok etkili bir yöntemdir. Şekil 4.4, CGN-DLC nanofilmlerinin görünür Raman spektrumunu göstermektedir. Spektrum, a-C:H'nin özelliklerini oluşturan iki ana piki göstermektedir [275]. 1388,6 cm⁻¹'de D pik konumu ve 1568,0 cm⁻¹'de G pik konumu, Raman spektrumuna Gaussian fonksiyonu kullanan bir eğri uydurma yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. D ve G bantlarının yarı maksimumundaki (FWHM) tam genişlik sırasıyla 255,5 ve 104,36 cm⁻¹ olarak belirlenmiştir. İki bandın pik yoğunluklarının (I_D / I_G) oranı 1,68 olarak bulunmuştur ve bu XPS analizinden elde edilen verilerle tutarlıdır (Şekil 4.4).

Raman spektrumundaki D ve G bantları farklı titreşim modlarından kaynaklanır. D bandı, sp³ elektronik konfigürasyonu olan elmas benzeri karbonun A1g modundan, G bandı ise sp² elektronik konfigürasyonu olan E2g karbon titreşiminden kaynaklanır [276,277]. Raman spektrumundan gözlemlendiği gibi, elde edilen G Pik (1568 cm⁻¹) 1525 ile 1600 cm⁻¹ aralığında bulunmaktadır. G-bandı piki için düşük dalga boyu, filmlerde yüksek sp³ içeriğini gösteren sp² bağlama durumunda düşük karbon içeriğine atanır [278–280]. Hidrojenlenmiş amorf karbon için, hidrojen atomları C = C gruplarını sp³ bağlı CH-CH gruplarına doyurarak karbon ağını değiştirir [276]. a-C:H filmleri için G pik konumunun H içeriğine bağımlılığı, filmlerdeki yüksek hidrojen içeriğinin G pikinin alt dalga sayılarına doğru kaymasını sağladığını göstermiştir. Başka bir deyişle, filmlerdeki yüksek hidrojen içeriği, yüksek oranda sp³ hibridizasyon durumlarını ifade eder.

a-C:H filmlerinde Raman G pik pozisyonundaki dağılım, karbon malzemelerde sp³ ve sp² fraksiyonlarının oranını tahmin etmek için bir olanak sağlar. Singha ve arkadaşları tüm verilerin ortalamasını almış ve 1525 ve 1580 cm⁻¹ arasındaki veri noktalarını aşağıdaki denklemi kullanarak(fitting) ampirik bir ilişki elde etmişlerdir:

$$sp^3 \text{ içerik miktarı} = 0,24 - 48,9 (\omega_G - 0,1580)$$

Bu denklemde ω_G , mikrometre biriminin tersi biriminde alınmıştır [281]. Kantitatif analiz, sentezlenen nanofilmlerdeki sp^3 içeriğinin yaklaşık % 30 olduğunu gösterdi.



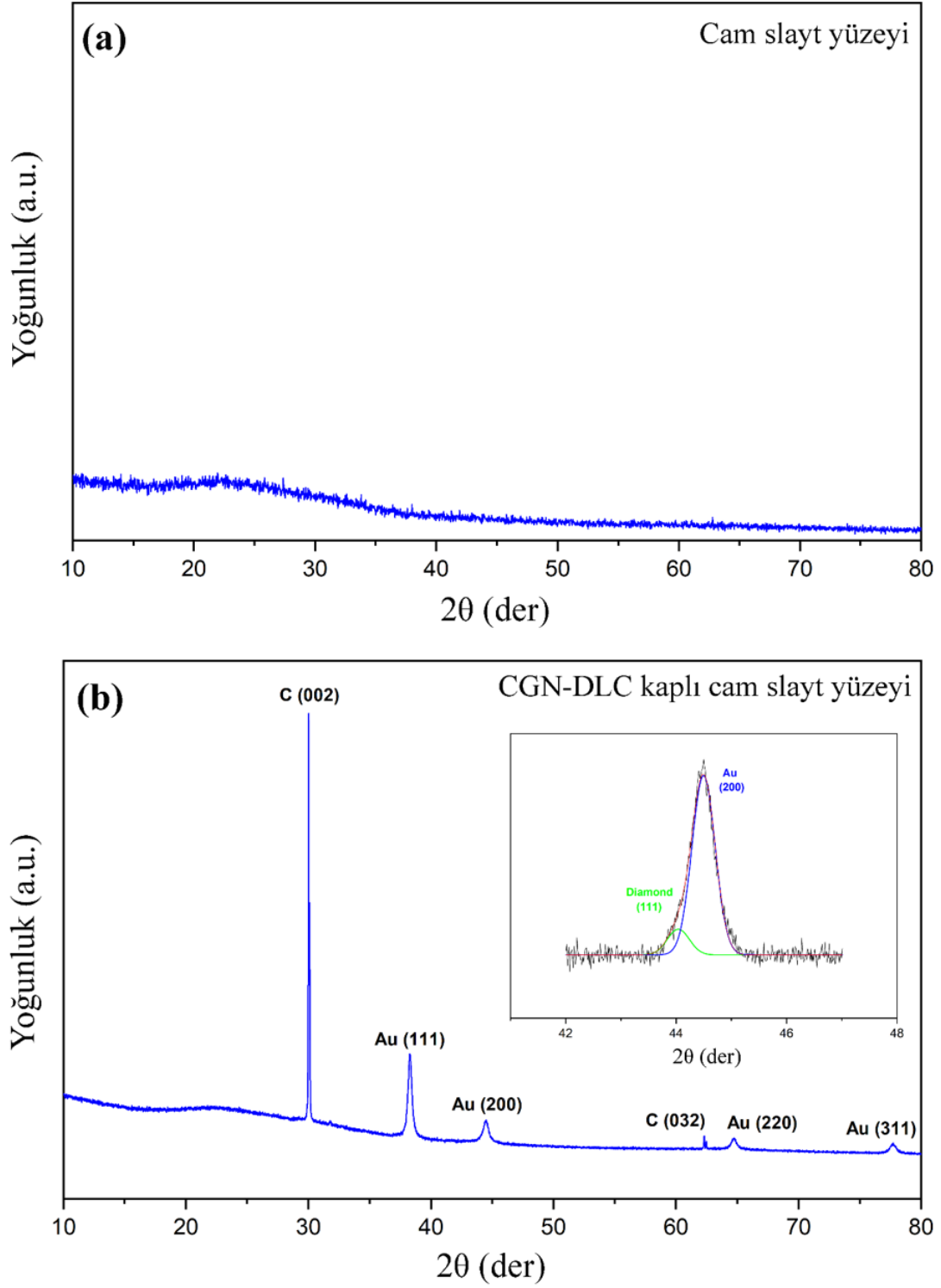
Şekil 4.4. CGN-DLC nanofilmlerinin Raman spektrumu.

4.2.4. XRD Ölçümleri

CGR-DLC nanofilmlerinin kristal yönlerini ve faz sayısını belirlemek için XRD tekniği gerçekleştirilmiştir. XRD analizi için sentezlenmiş nanofilmler cam lam üzerine kaplanmış ve CGN-DLC nanofilmin 2θ 'deki tek kırınım piki, $20-80^\circ$ aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.5).

Şekil 4.5b'deki XRD spektrumundan görüldüğü gibi, Au (111), Au (200), Au (220) ve Au (311) 'e kaydedilmiş dört pik, sırasıyla $2\theta = 38,24^\circ$, $44,43^\circ$, $64,65^\circ$, ve $77,63^\circ$ 'e karşılık gelmektedir (JCPDS dosya numarası: 611625). Ayrıca, elmas benzeri materyalin (DLC) XRD paterni, $0,297$ nm ara katman aralığına (d_{002}) karşılık gelen $2\theta = 30^\circ$ 'de bir kırınım piki göstermektedir. CGN-DLC'nin XRD desenleri, cam slayt substrata karşılık gelen 23° civarında bariz bir geniş pik göstermiştir (Şekil 4.5a). XRD desenleri, DLC'de (002) ve (032) grafitisel (karbon) ve (111) elmas düzlemleri olarak

endekslenebilen $2\theta = 30^\circ$, $62,3^\circ$, ve $44,03^\circ$ civarında üç kırınım pikini açıkça göstermiştir [282,283].



Şekil 4.5. Cam slayt (a) ve cam üzerine kaplanmış CGN-DLC naofilmlerin (b) XRD desenleri.

4.2.5. Optik Bant Aralığı Tahmini

Beer-Lambert'in yasasına göre, absorpsiyon katsayısı, α , denklem (4.1) kullanılarak hesaplanabilir:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\alpha d} \quad (4.1)$$

Burada d film kalınlığı, I ve I_0 sırasıyla iletilen ışık ve gelen ışığın yoğunluğu ve α absorpsiyon katsayısıdır. Her iki tarafın logaritması alınır ve daha sonra denklem 4.1 α 'ya göre hesaplanır:

$$\alpha = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \frac{1}{\log(e) d} \quad (4.2)$$

Absorbans, A , $\log\left(\frac{I_0}{I}\right)$ 'e eşit olduğundan, denklem 4.2 aşağıdaki gibi yeniden yazılabilir:

$$\alpha = 2,303 \frac{A}{d} \quad (4.3)$$

SEM veri analizine (4.2.7) göre filtre kağıt kalınlığı ile üzerine kaplanmış nanofilm kalınlığı birlikte yaklaşık 180 μm bulunmuştur, bu nedenle denklem 4.3 şu şekilde yazılabilir:

$$\alpha = 0,004 A \text{ (cm}^{-1}\text{)} \quad (4.4)$$

Şekil 4.6a, hazırlanan CGN-DLC nanofilmlerinin absorpsiyonunu göstermektedir. En sık amorf malzemelerde, optik bant aralığı (E_g) denklem (4.5) tarafından verilen Tauc ilişkisi kullanılarak elde edilir:

$$(\alpha h\nu)^{1/2} = C (h\nu - E_g) \quad (4.5)$$

burada C sabittir ve $h\nu$ gelen foton enerjisidir. Dalga boyundan enerjiyi (E) hesaplamak için max planck denklemi (4.6) kullanıldı.

$$E = h\nu \quad (4.6)$$

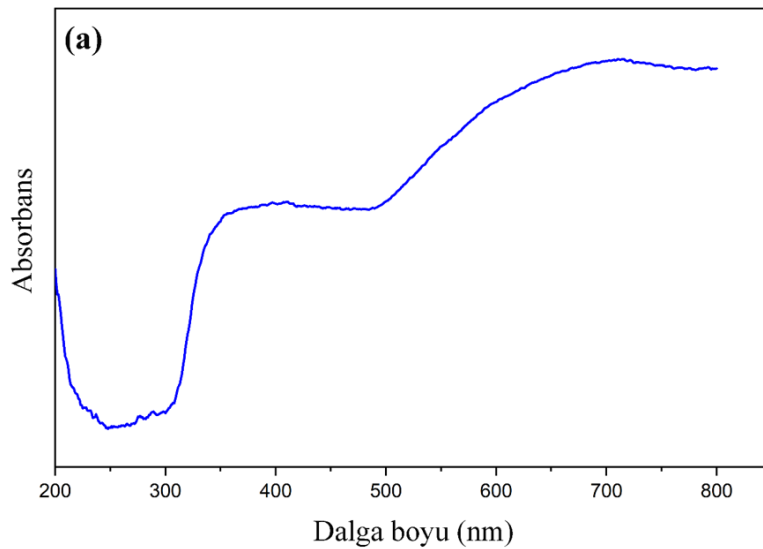
Burada h , planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34} \text{ js}$) ve ν , uyarıcı fotonunun sıklığıdır. ν 'yu başka bir denklemde kullanarak şöyle yazılabilir:

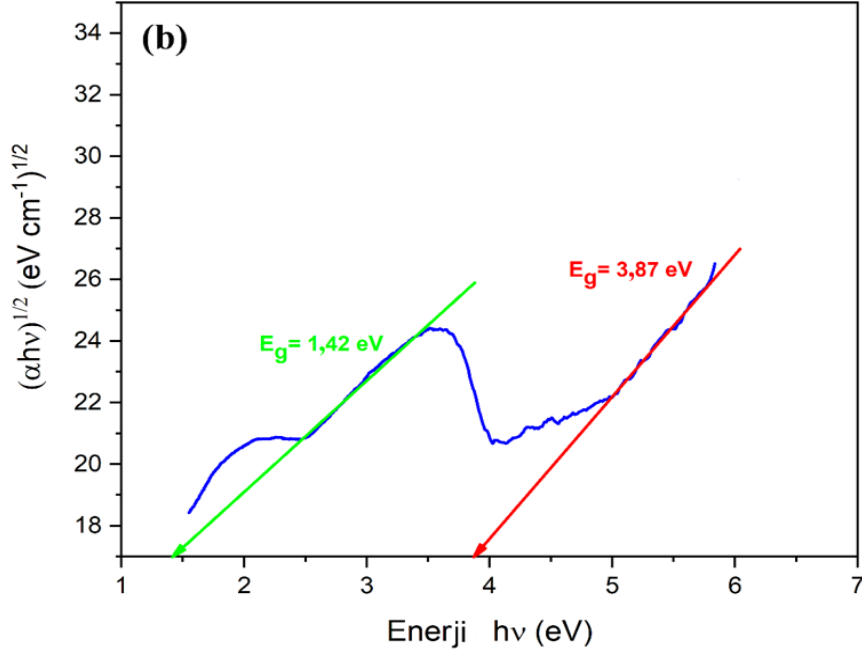
$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (4.7)$$

Burada C , ışık hızı ($2,999 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$) ve λ , uyarıcı fotonun dalga boyudur. Denklem 4.7'yi 4.6'ya koyarak aşağıdaki denklem elde edilir:

$$E = \frac{19,85 \times 10^{-26} \text{ (jm)}}{\lambda} \quad \text{veya} \quad E = \frac{1240 \text{ (eV nm)}}{\lambda}$$

Optik bant aralığı, $(\alpha h\nu)^{1/2}$ ve $h\nu$ grafiğinin doğrusal kısmının $h\nu$ ekseninin kesişim noktasına ekstrapolasyonu ile tahmin edilebilir. Şekil 4.6b, sırasıyla 1,42 eV ve 3,87 eV olarak bulunan CGN-DLC nanofilminin bant boşluklarının değerlerini göstermektedir. 1,42 eV'deki bant aralığının değeri, altın nanoağının DLC filmine bağlanmasını önermektedir. 3,87 eV'de, hidrojenlenmiş amorf karbon filmin (a-C:H) konjuge aromatik halka sistemine karşılık gelen başka bir bant aralığı değeri, büyük olasılıkla oksijen içeren grupların altın ağı ile bağ oluşumuna katılması nedeniyle gözlemlenmiştir.





Şekil 4.6. CGN-DLC nanofilmlerinin (a) UV-VIS absorpsiyon spektrumu (b) ve Tauc grafiği.

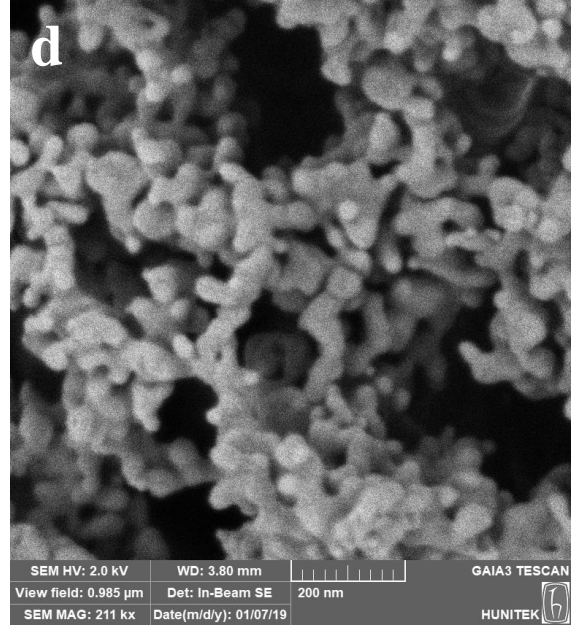
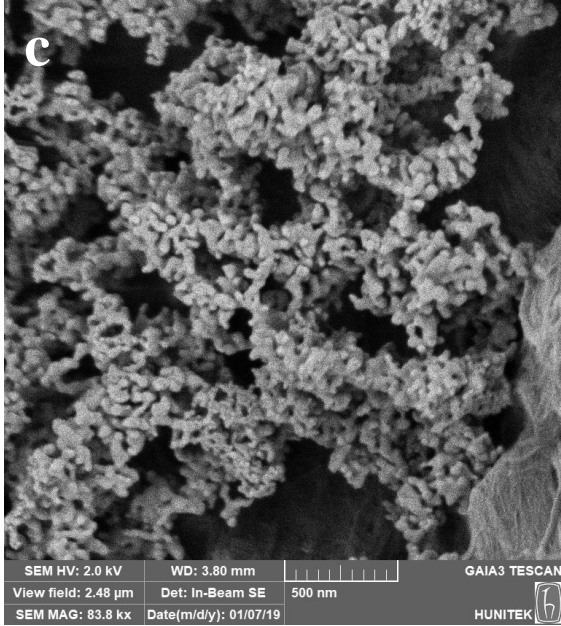
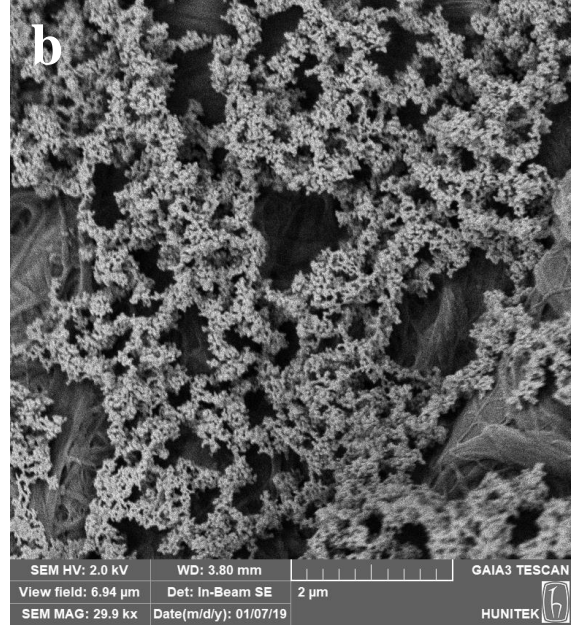
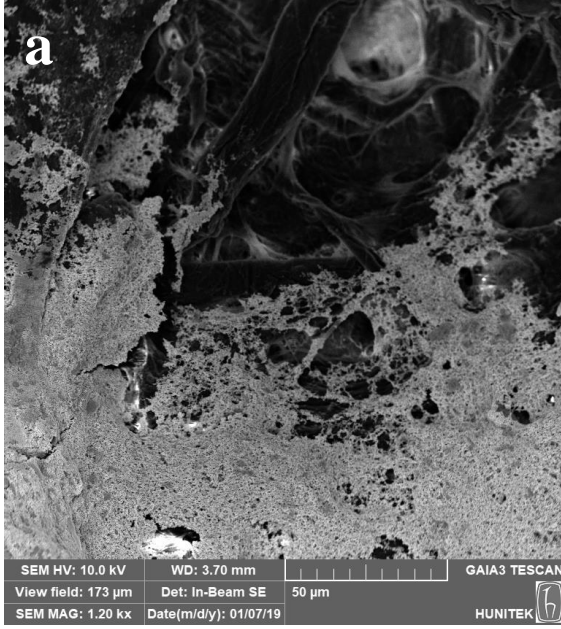
4.2.6. Elektron Mikroskop Analizleri

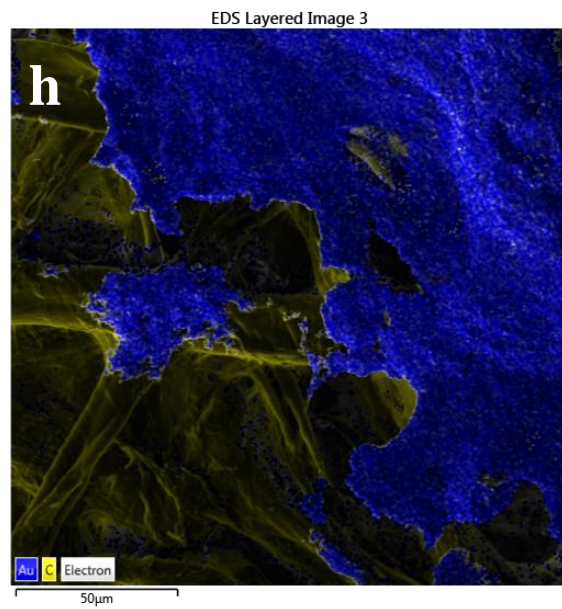
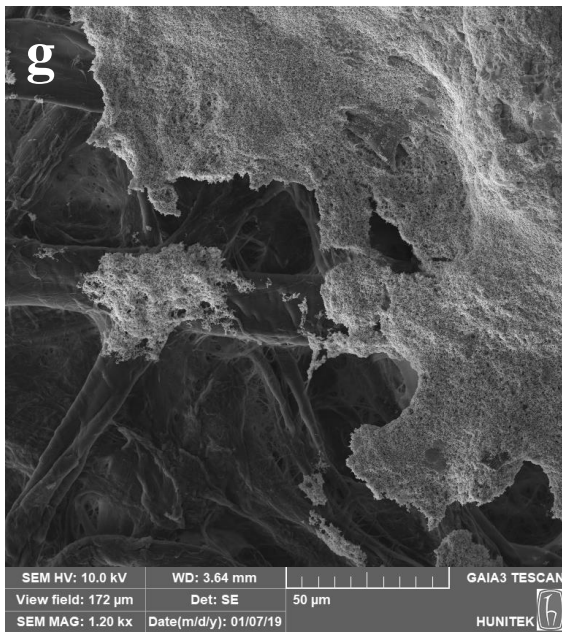
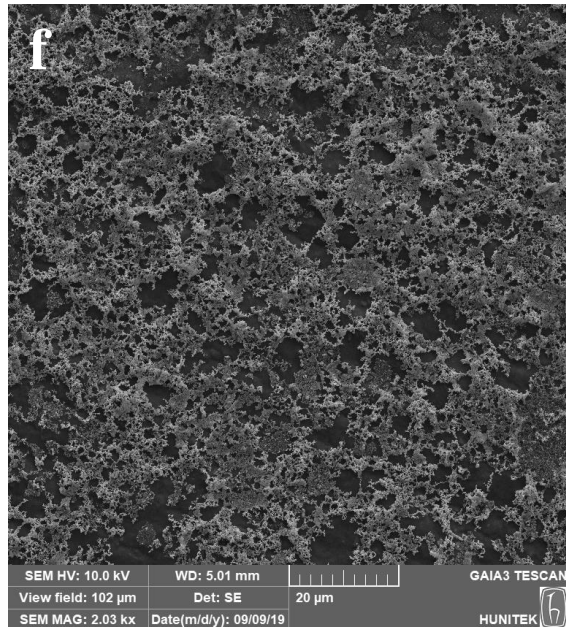
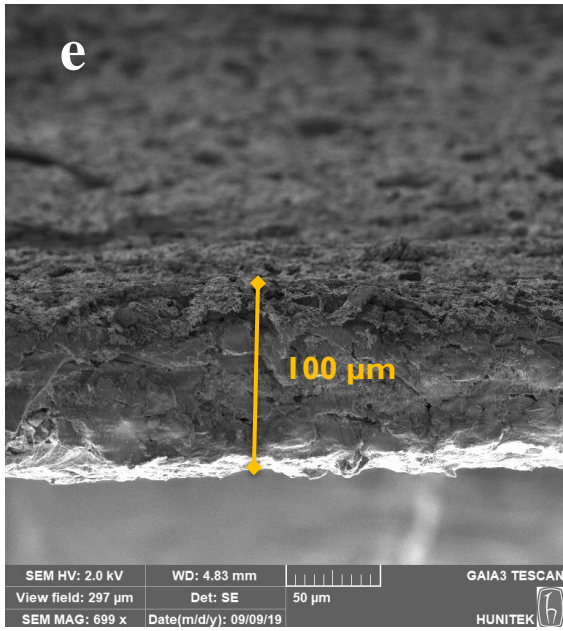
Kendiliğinden düzenlenme tekniği ile sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin SEM analizleri filtre kağıt üzerine kaplanarak ve HR-TEM analizleri ise her hangi bir yüzeye kaplanmadan natif şeklinde incelenmiştir.

Şekil 4.7a-d, filtre kağıdı substratı üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilminin yüzey morfolojisini göstermektedir. CGN-DLC nanofilmlerinin filtre kağıdının pürüzlü yüzeyi üzerinde iyi bir şekilde kaplandığı ve film elektrotları için önemli olan iyi bir şekilde kaplandığı gözlenmiştir. Sentezlenen nanofilmlerin dalgalı yüzeyi (rough surface), filtre kağıdının orijinal yüzeyinin dalgalı olmasından kaynaklıdır. Kaplamadan sonra, filtre kağıdın yüzeyindeki mikro delikler ve boşluklar düzgün CGN-DLC nanofilmleri ile kaplanmıştır.

Şekil 4.7e ve 4.7f, sentezlenen CGN-DLC nanofilminin enine-kesitsel SEM görüntülerini ve alüminyum folyo substrat üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilminin morfolojisini göstermektedir. Şekil 4.7g-k, filtre kağıdı üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilmlerinin

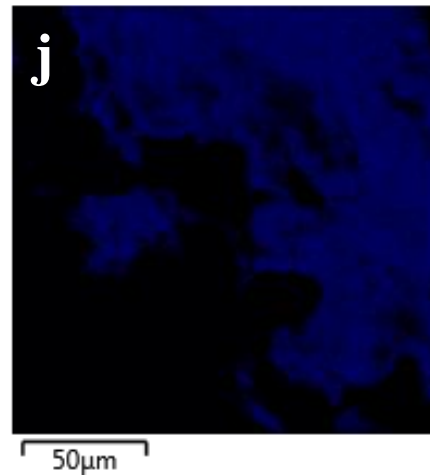
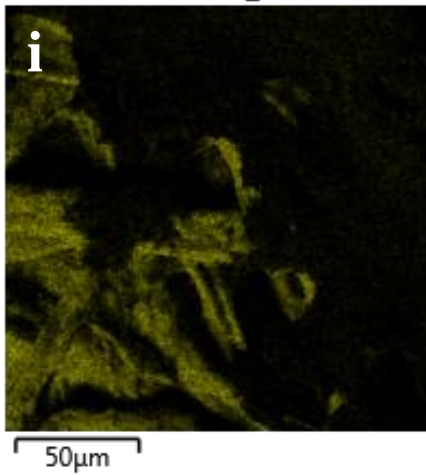
EDX analizini göstermektedir. Analiz Au, C ve O elementlerinin varlığını ve atomik konsantrasyonlarını, ayrıca, bu elementlere ait haritalanmaları ortaya koymaktadır.

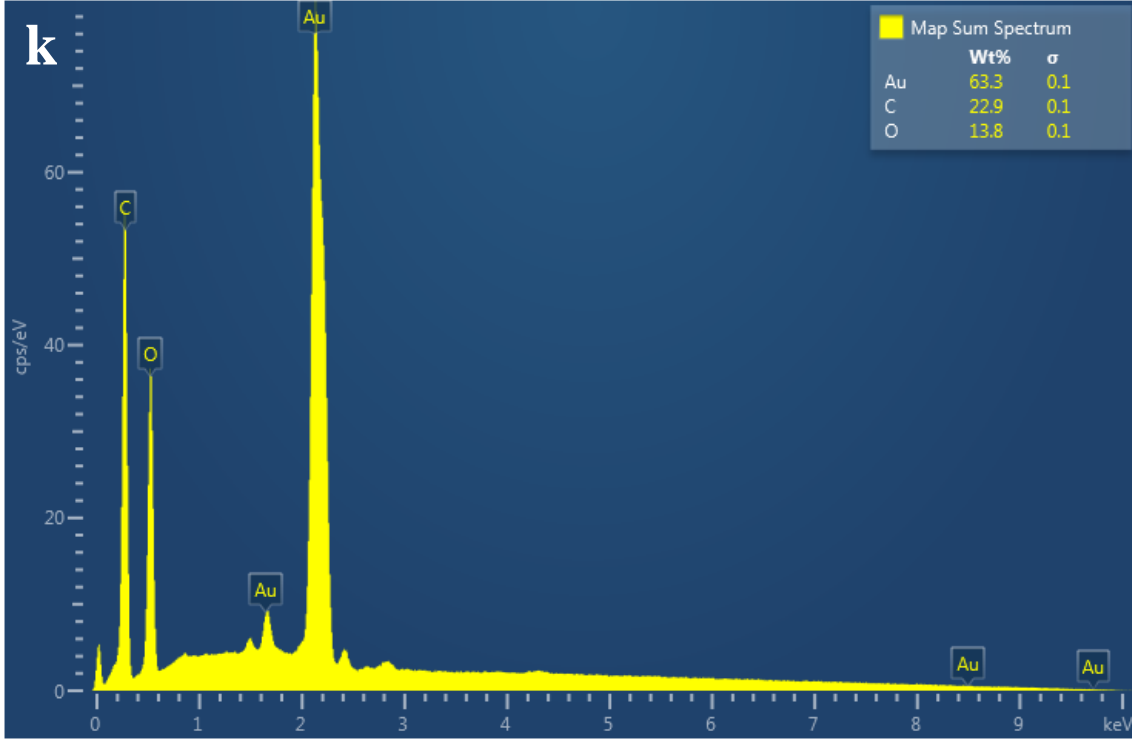




C Kα1_2

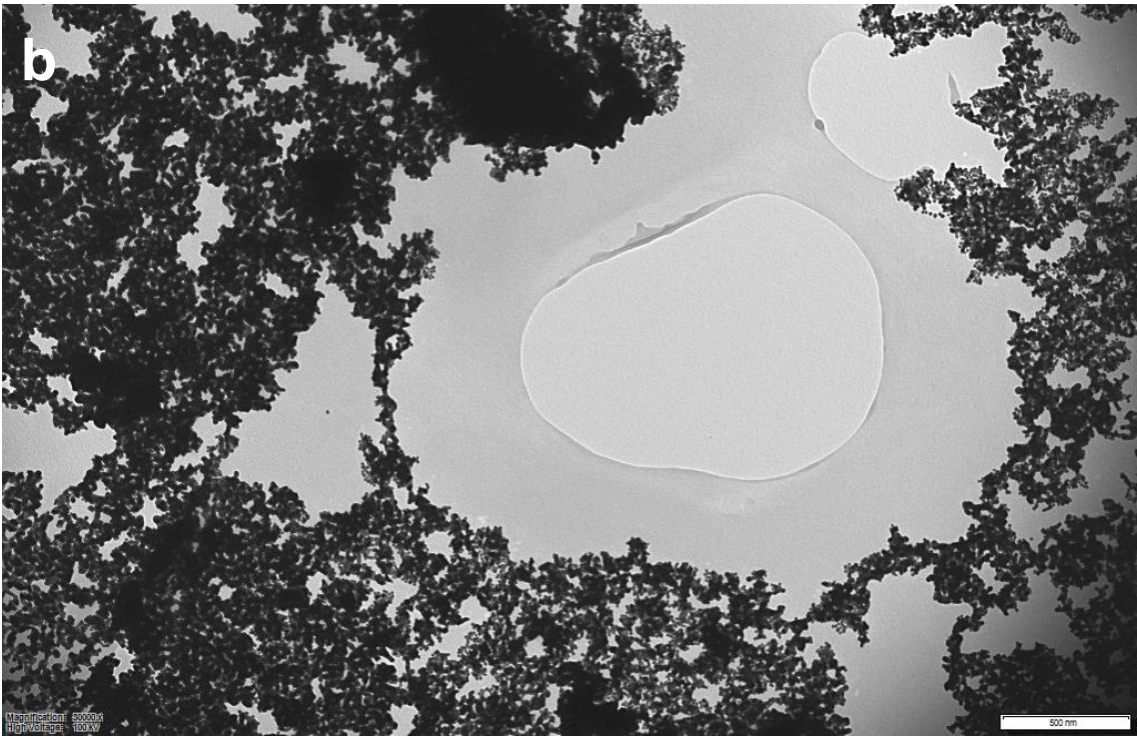
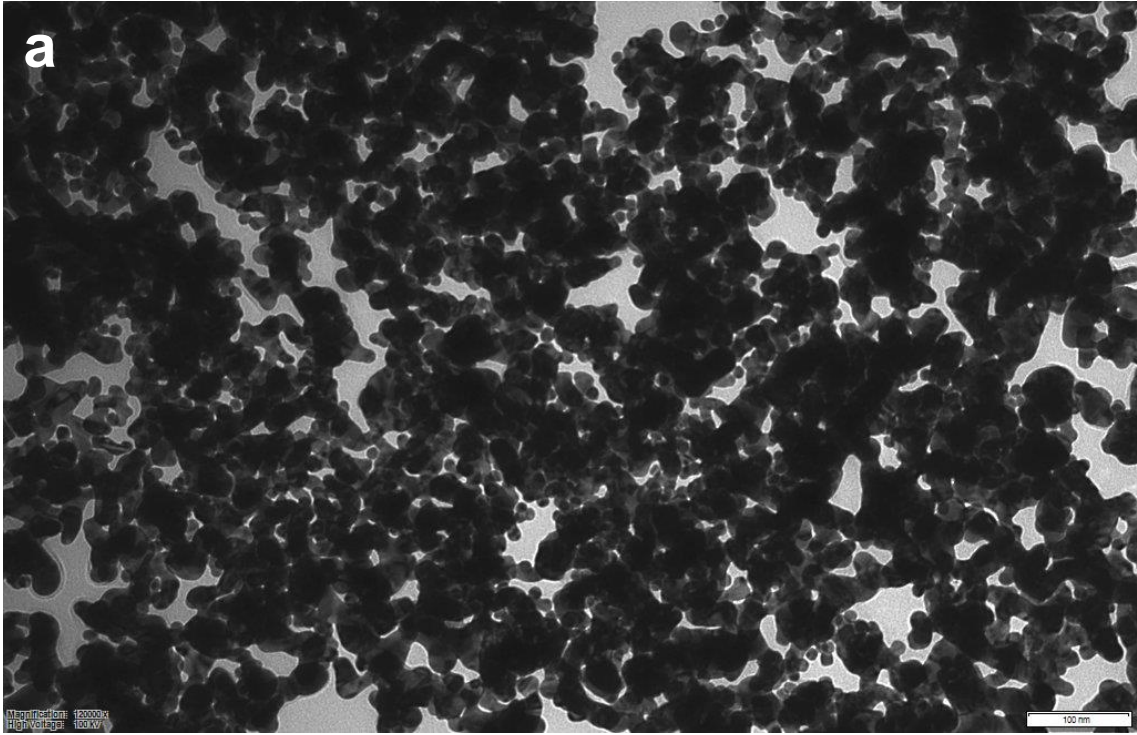
Au Mα1

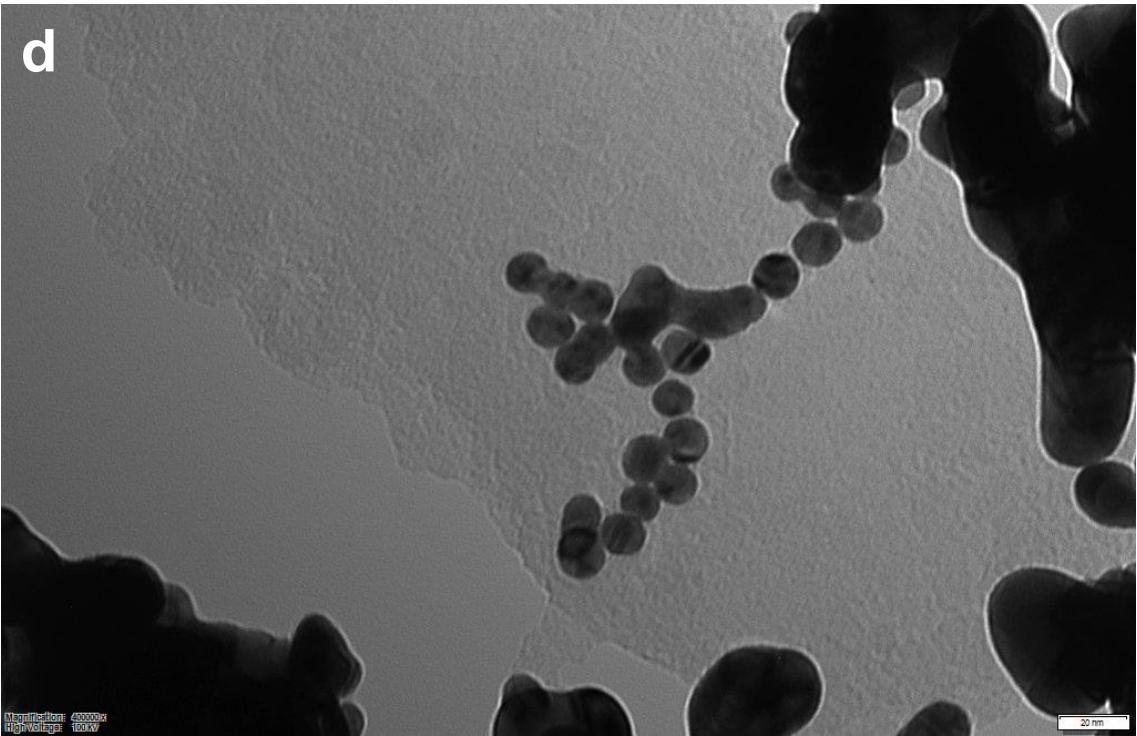
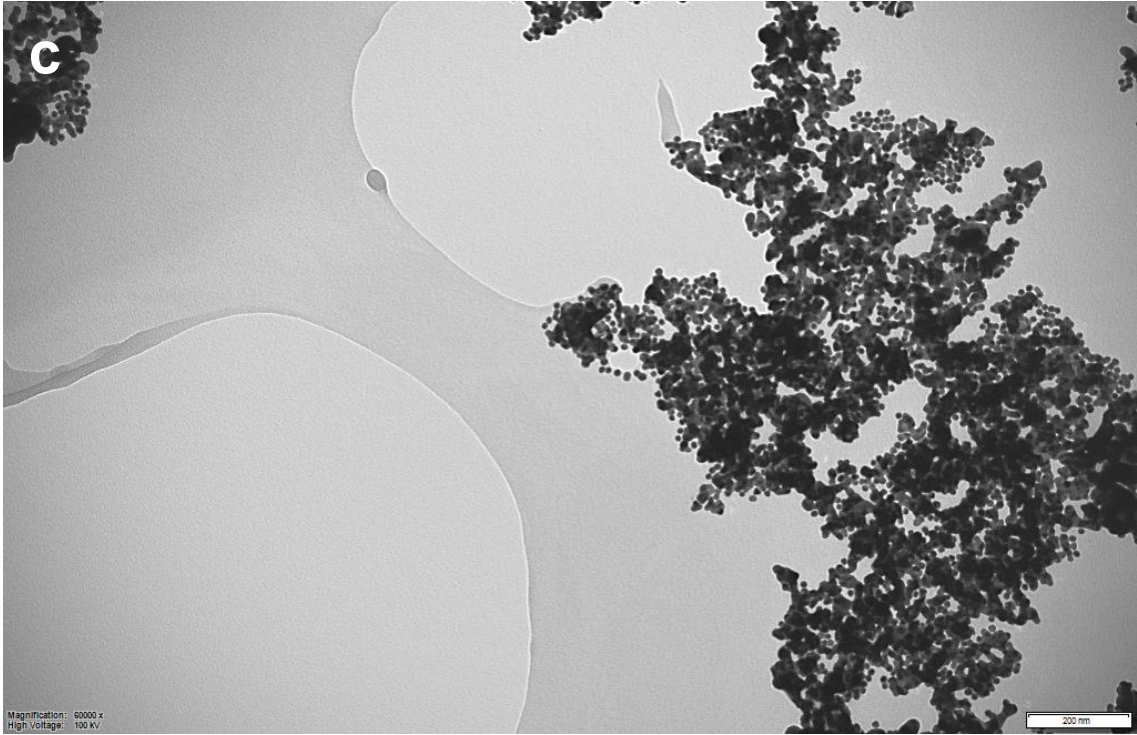


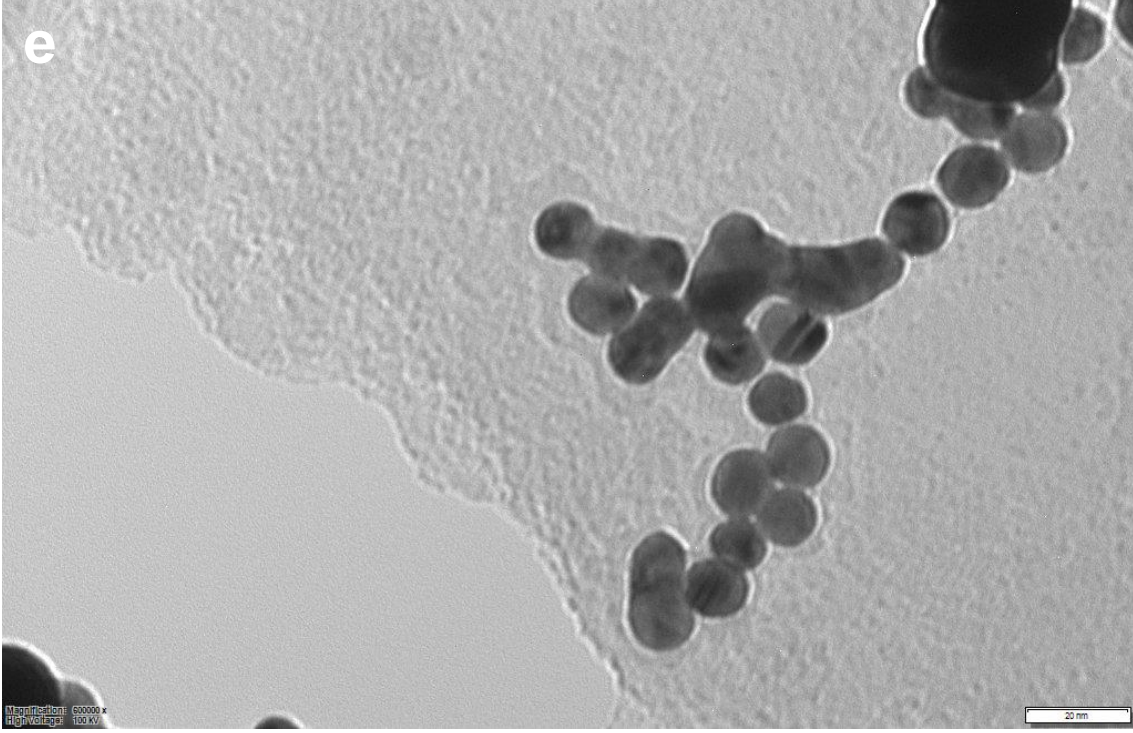


Şekil 4.7. (a-d) Sentezlenmiş CGN-DLC nanofilmin, (e) nanofilmin enine-kesitsel ve (f) Alüminyum folyo üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilminin SEM görüntüleri. (g-k) Filtre kağıdı üzerine kaplanmış nanofilmlerin EDX spektrumları, bileşimi ve haritalamaları.

CGN-DLC nanofilmler, Formvar filme ile kaplanmış bir ızgara (TEM grid) üzerine küçük bir nozul yoluyla aktarılmıştır. Şekil 4.8a-c'deki DLC filmlerindeki siyah ağ veya bulut benzeri yapılar, sinterlenmiş Au nanopartiküllerinin oluşumunu ortaya koymaktadır. Altın nanoağlar yalnızca DLC filmlerin üzerinde gözlemlendi, bu da DLC'nin Au nanopartiküllerinin sinterlenip çekirdeklenebildiği bir substrat olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Şekil 4.8c). Au nanopartiküllerin DLC filmleri üzerinde sinterlenmesinin sınırlı olmadığı gözlemlenmiş ve elde edilen anizotropik nanoparçacıklar 100 nm'den daha büyük ölçülmüştür (Şekil 4.8c-e).



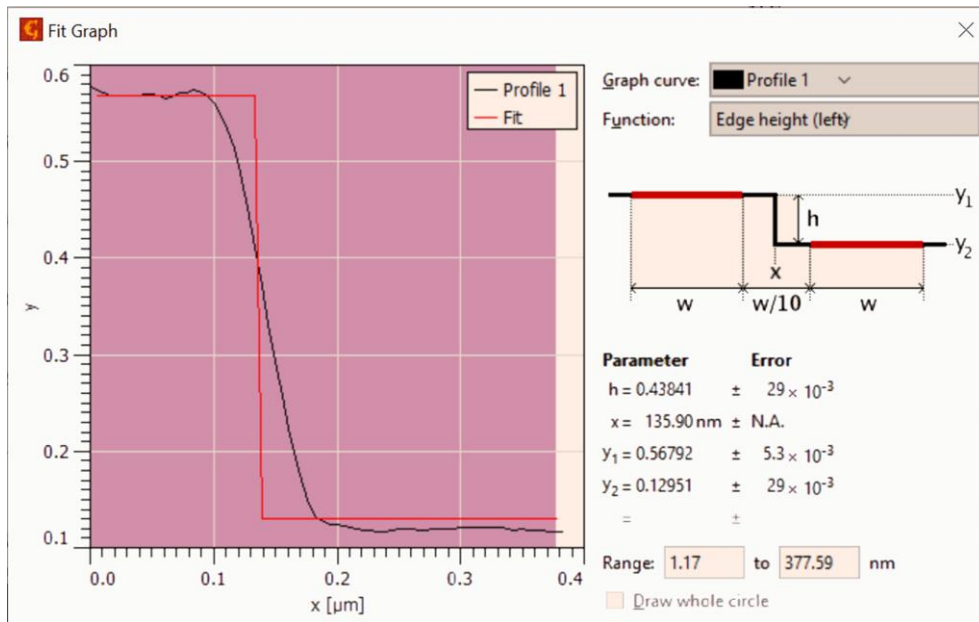
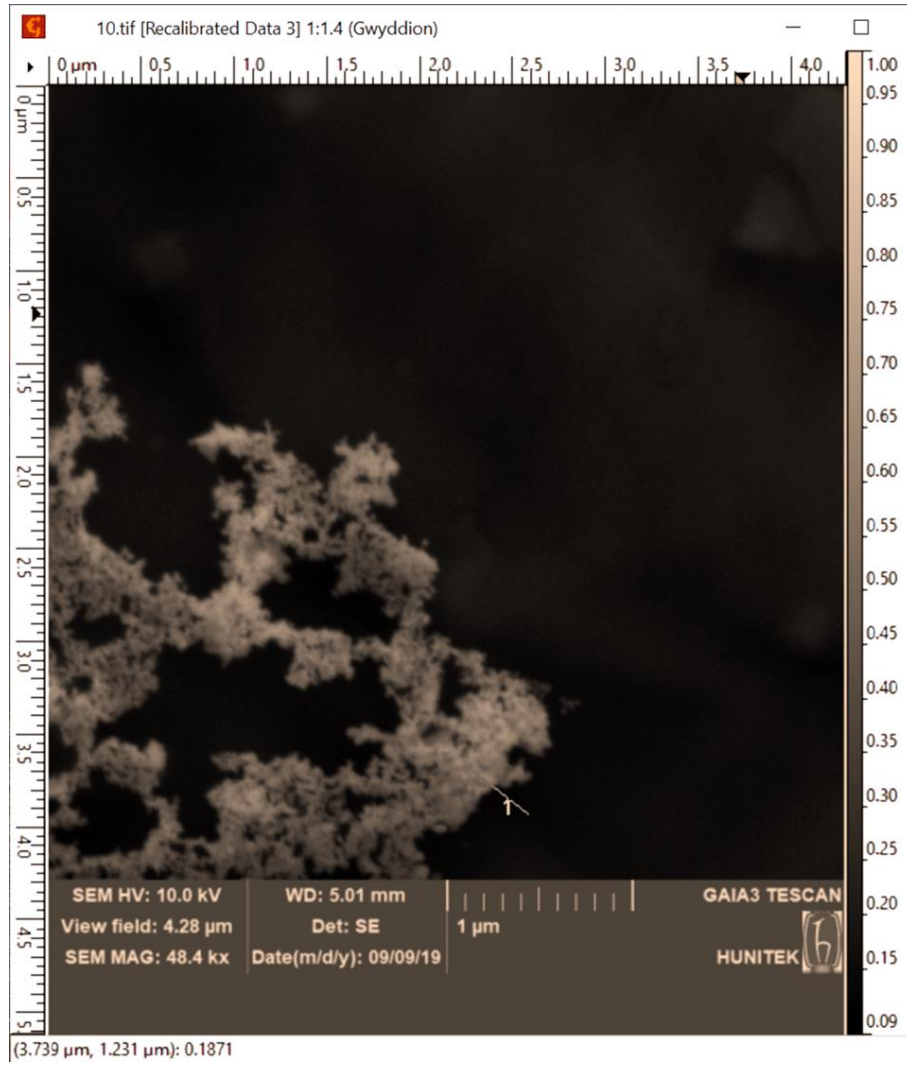




Şekil 4.8. CGN-DLC nanofilmlerinin sentezini değerlendirmek için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi. (a-e) Altın (Au) nanoparçacıkların sinterlenmesi ve çekirdeklenmesi münhasıran elmas benzeri karbon (DLC) nanofilminde meydana gelir.

4.2.7. CGN-DLC Nanofilmin Kalınlık Ölçümü

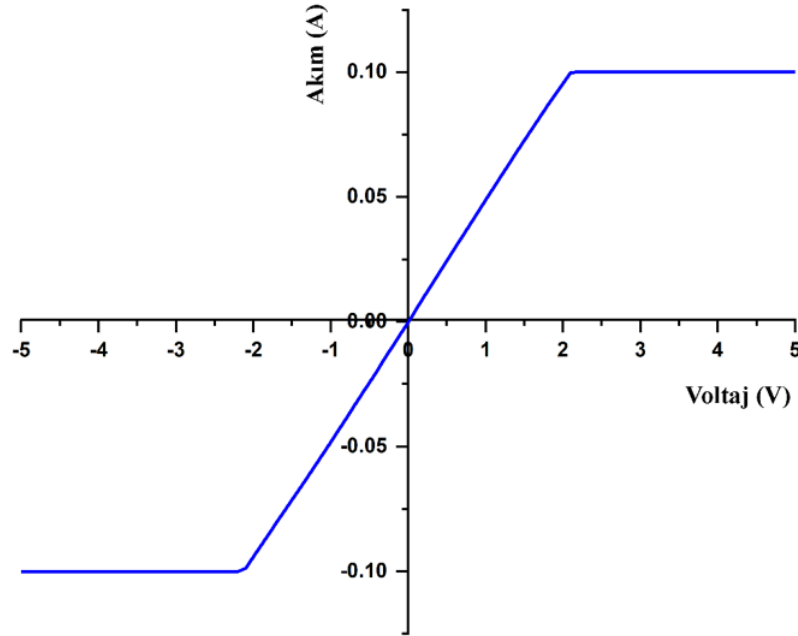
Gwyddion programı, alüminyum folyo yüzeyine kaplanmış olan CGN-DLC nanofilmin kalınlığını ölçmek için uygulanmıştır. Kaplanmış CGN-DLC nanofilminin kalınlığının yaklaşık 438 ± 22 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Gwyddion programı kullanarak alüminyum folyo üzerine kaplanmış CGN-DLC nanofilmlerin kalınlık ölçümü.

4.2.8. CGN-DLC Nanofilmlerinin Elektriksel Özellikleri

Sunulan tez çalışmasının bu aşamasında CGN-DLC nanofilmler filtre kâğıdı substratı üzerine kaplanmıştır. Nanofilmlerin 438 nm kalınlığındaki elektriksel özellikleri incelenmiştir. Şekil 4.10, potansiyel olarak -5 ile +5 V aralığında CGN-DLC filmin I-V eğrisini göstermektedir. Eğriden görülebileceği gibi, sentezlenmiş nanofilm doğrusal I-V karakteristik eğrisini göstermektedir. Bu eğri direnç elemanını tanımlar veya elektrotların omik özelliğini belirtir, yani direnç elemanına herhangi bir voltaj değeri uygulandığında, ortaya çıkan akım doğrudan I-V karakteristiklerinden elde edilebilir. Doğrusal ilişkide direnç eğimin tersine eşit olduğu için sentezlenmiş nanofilmlerin direnci $18,23 \pm 2,4 \Omega/\square$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. CGN-DLC nanofilminin akım-gerilim (I-V) karakteristik eğrisi.

Ayrıca, çift katmanlı CGN-DLC nanofilmlerinin Hall etki ölçümleri dört noktalı prob ile yapılmıştır. Üst (altın nanonağ) ve aşağı (elmas benzeri karbon) katmanlarının taşıyıcı tipi sırasıyla n-tipi ve p-tipi olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre sentezlenen çift tabakalı nanofilmin taşıyıcı konsantrasyonu (delik yoğunluğu), elektriksel devinirliği ve öz direnci, n-tipi için sırasıyla $6,42 \times 10^{19} \text{ (cm}^{-3}\text{)}$, $135,22 \text{ (cm}^2\text{/V.sn)}$, ve $7,19 \times 10^{-4} \text{ (}\Omega\text{.cm)}$ ve p-tipi için sırasıyla $2,57 \times 10^{19} \text{ (cm}^{-3}\text{)}$, $346 \text{ (cm}^2\text{/V.sn)}$, ve $7,03 \times 10^{-4} \text{ (}\Omega\text{.cm)}$ olarak bulunmuştur. Literatür araştırması sonucunda, katkısız (undoped) ve metal katkılı DLC

filmlerin elektriksel özdirençlerinin sırasıyla 1 ile 10^{16} $\Omega \cdot \text{cm}$ ve 10^{-3} ile 10^5 $\Omega \cdot \text{cm}$ arasında olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu nedenle, CGN-DLC'nin elde edilen elektriksel iletkenliği ($1,4 \times 10^3$ $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$), metal katkılı DLC elektrotlarında gözlemlenenlerle karşılaştırılabilir.

Çizelge 4.4. DLC filmlerin literatürdeki elektriksel direnci ve iletkenlikleri.

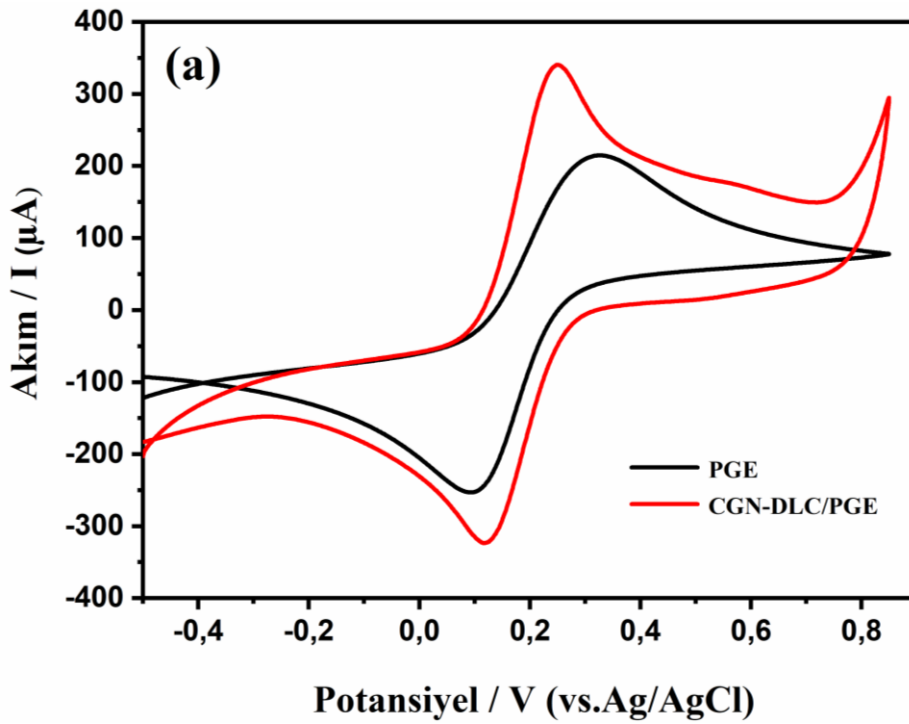
Sentez Yöntemi	Özdirenç ($\Omega \cdot \text{cm}$)	Elektron devinirliği (cm^2/V)	İletkenlik (S/cm)	Referans
Farklı CVD ve PVD Yöntemler (derleme)	$10^2 - 10^{16}$	$10^{-11} - 10^{-12}$	$10^{-2} - 10^{-16}$	[284]
RFMS	$1,2 \times 10^5$	-	$8,3 \times 10^{-6}$	[285]
RF-PECVD	1×10^5	-	10^{-5}	[286]
RFMS	9×10^2	-	$1,1 \times 10^{-3}$	[287]
Plazma	2×10^2	-	5×10^{-3}	[288]
RF-PECVD	$1,29 \times 10^2$	-	$7,75 \times 10^{-3}$	[289]
Kapasitif Eşleşmiş Plazma-CVD	$0,7 \times 10^2$	-	$1,4 \times 10^{-2}$	[290]
HPPMS- PBII	$5,42 \times 10^{-1}$	-	1,84	[291]
PECVD	10^{-2}	-	10^2	[292]
FCVA	6×10^{-3}	-	$1,66 \times 10^2$	[293]
PVD/PECVD	$1,6 \times 10^{-3}$	-	$6,25 \times 10^2$	[294]
Kendiliğinden Düzenlenme	$7,19 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$	Tez Çalışması

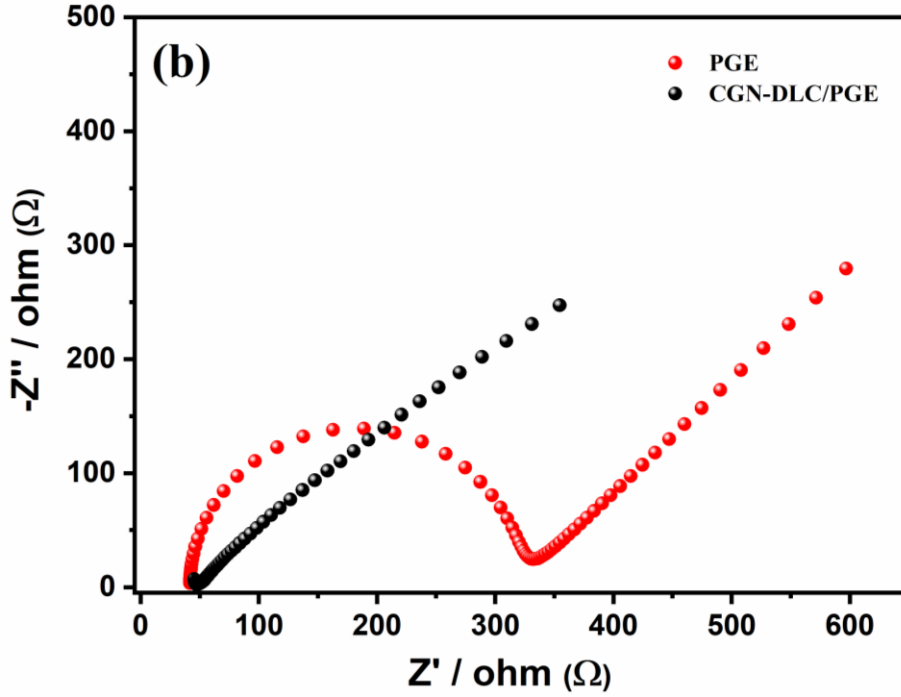
4.3. miRNA Tayini için Tasarlanan Biyosensörün Elektrokimyasal Analizi

4.3.1. Hazırlanan CGN-DLC/PGE'nin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

CGN-DLC ile modifiye edilmiş PGE'yi karakterize etmek için dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılmış, elektrodun adım adım modifikasyonu ise DPV ölçümleri alınarak değerlendirilmiştir. Ölçümler, 5 mM ferrosiyanür/ferrisiyanür ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) redoks prob içeren 0,1 M KCl ortamında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11a'da gösterildiği gibi, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 'in elektrot yüzeyine

mükemmel elektron transfer kinetiğinden dolayı PGE'de maksimum akım değerine sahip 0,249 V (yükseltgenme pik potansiyeli (EPa)) ve 0,116 V (indirgenme potansiyeli (EPc)) değerinde bir çift redoks piki gözlemlenmiştir. Üretilen elektrotların anodik pik akımı (I_{pa}) ve katodik pik akımı (I_{pc}) sırasıyla 362,6 μ A ve 307,1 μ A olarak bulunmuştur. PGE'ler CGN-DLC ile modifiye edildiğinde ise akım değeri artmıştır. Bu artış elektron transfer hızını destekleyen yüzeyde biriktirilmiş nanofilmin yüksek iletkenliğine dayandırılabilir. Ayrıca, CGN-DLC nanofilm, PGE yüzey alanını arttırmış ve böylece daha fazla DNA probu immobilizasyonuna olanak sağlayarak sinyali güçlendirmiştir [295]. Şekil 4.11b, Nyquist grafiğinin X eksenindeki gerçek empedans (Z') ve Y eksenindeki hayali empedans ($-Z''$) ile CGN-DLC/PGE elektrodunun EİS profilini göstermektedir. Veriler tipik bir eşdeğer devre ile fit edilmiş (Randles devresi) ve PGE ve CGN-DLC/PGE'nin yük transfer direnç (R_{ct}) değerleri sırasıyla $300 \pm 24 \Omega$ ($n=3$) ve $6,14 \pm 1,7 \Omega$ ($n=3$) olarak belirlenmiştir.





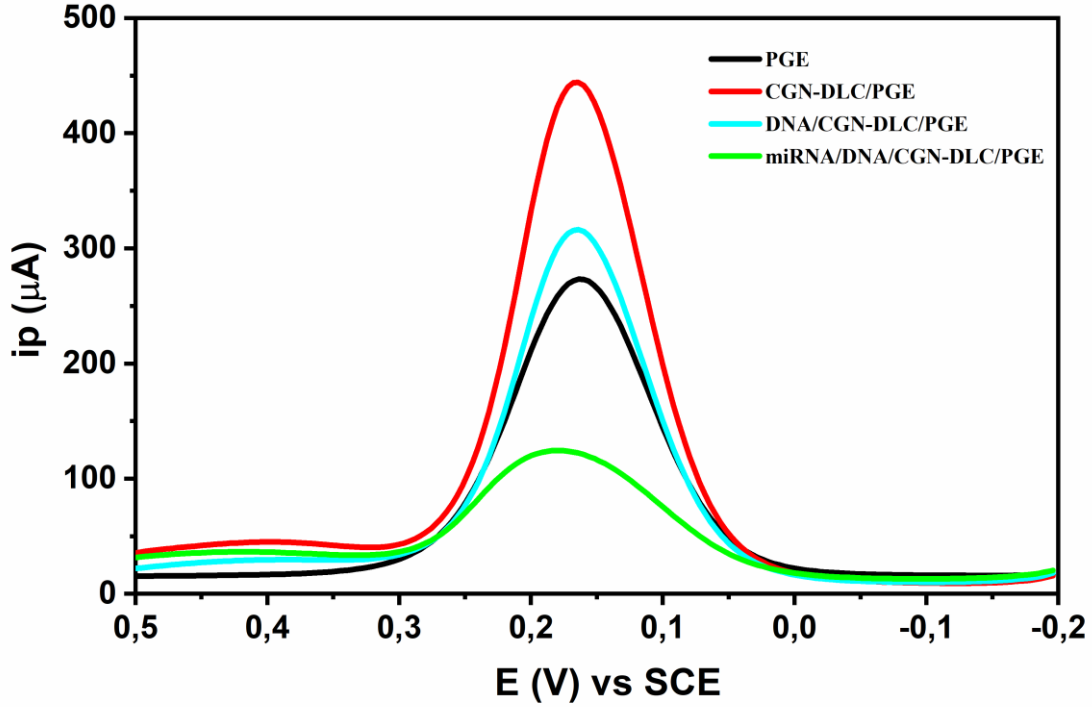
Şekil 4.11. CGN-DLC nanofilm modifikasyonu ile PGE elektrotun elektrokimyasal analizi. 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (oran 1: 1) içeren 0,1M KCl solüsyonunda PGE ve CGN-DLC ile modifiye edilmiş PGE'nin CV (a) ve EİS (b) analizleri.

Birbiri ile uyumlu olarak elde edilen CV ve EİS sonuçları, biyosensörün başarılı bir şekilde üretildiğini göstermektedir.

4.3.2. Geliştirilen Biyosensörün miRNA ile Etkileşiminin İncelenmesi

Şekil 4.12, PGE'nin adım adım modifikasyonunun DPV analizini göstermektedir. Ölçümler, 5 mM ferrosiyanyür/ferrisiyanyür ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) redoks prob içeren 0,1 M KCl ortamında gerçekleştirilmiştir. Kaydedilen voltamogramlar, CGN-DLC nanofilm ile modifiye edilmiş elektrodun redoks pik akımında artışa neden olduğu ayrıca, CV ve EİS sonuçlarıyla iyi bir uyum içinde olduğunu göstermektedir. DPV pik akım değeri, DNA probunun elektrot yüzeyine immobilize edilmesinden sonra büyük ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, negatif yüklü redoks probu ile negatif yüklü fosfat grubuna sahip prob DNA arasındaki elektrostatik itme sonucu oluşan elektron transferi kısıtlanmasından ileri gelmektedir [296]. Böylece, DNA probunun elektrot üzerinde başarılı bir şekilde immobilize edilebildiğini de kanıtlamaktadır. Ayrıca, sonuçlar, pik akımlarının DNA prob ile 30 fM hedef miRNA-410'nun hibridizasyon işleminden sonra

daha da azaldığını göstermektedir. Sinyaldeki bu azalma, DNA-RNA hibritlerinin fosfat iskeleti ile redoks prob çözeltisi arasındaki elektrostatik itme kuvvetine dayanmaktadır [297].

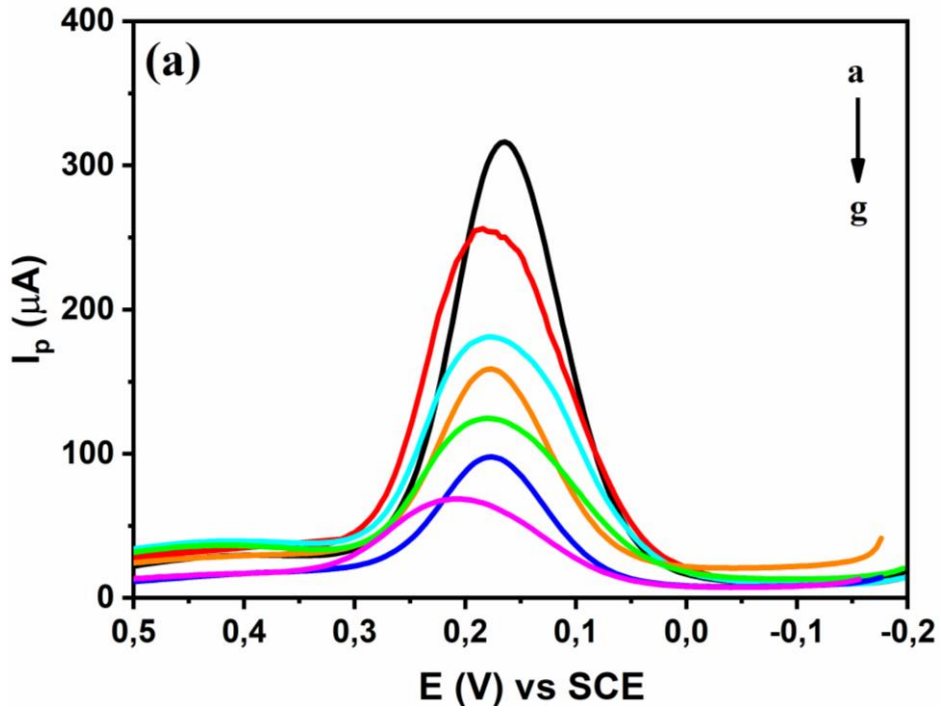


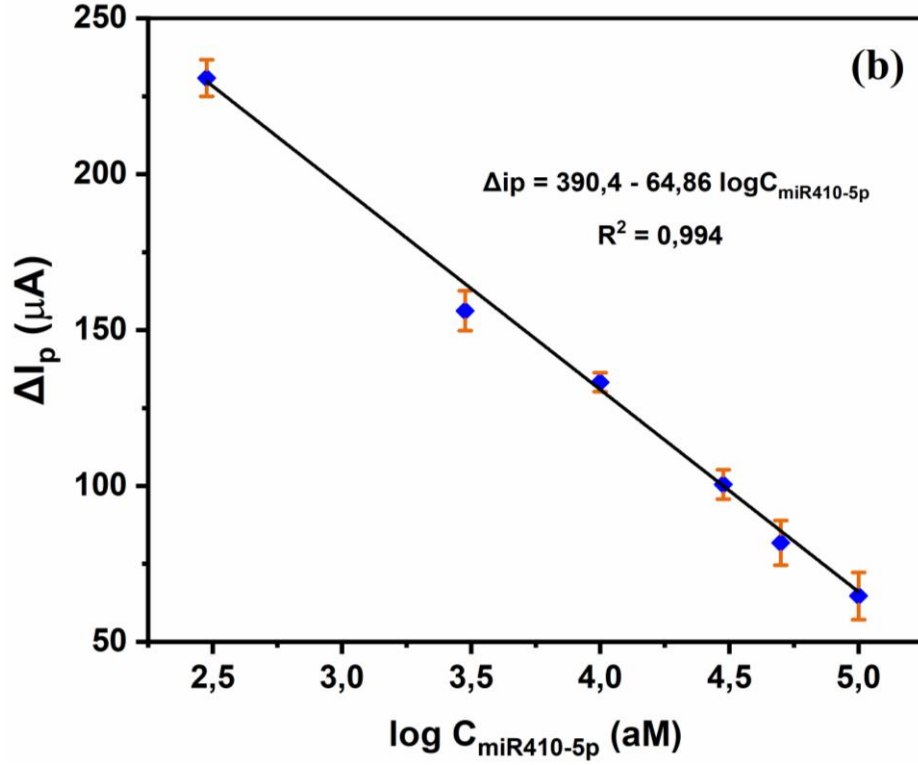
Şekil 4.12. PGE, CGN-DLC/PGE, DNA/CGN-DLC/PGE ve miRNA/DNA/CGN-DLC/PGE elektrotlarının 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki voltamogramları.

CGN-DLC temelli geliştirilen biyosensörün analitik performansı, Şekil 4.13'a'da gösterildiği gibi hedef miR-410'un farklı konsantrasyonlarının tayini için incelenmiştir. Geliştirilen biyosensör, 0,3 fM ile 100 fM konsantrasyon aralığında doğrusal sinyal azalışı göstermiştir. DPV sonuçları, geliştirilen biyosensörün, artan hedef konsantrasyonlarında orantılı olarak azalmış sinyal yanıtları ile miR-410 hedefini başarıyla tespit ettiğini göstermiştir. Hedef miR-410 konsantrasyonu arttıkça, redoks problemlerinin $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ difüzyonunun girişimine bağlı olarak DPV pik akımı azalmıştır. DPV sonuçlarını daha iyi göstermek için, pik akım değişikliği, miRNA/DNA/CGN-DLC/PGE'nin akım sinyalinin DNA/CGN-DLC/PGE'nin akım sinyalinden çıkarılmasıyla elde edilmiş ve pik akım değişikliği ile sonuçlandırılmıştır.

Şekil 4.13b miR-410 hedef konsantrasyonunun logaritmasına karşı pik akım değişiminin kalibrasyon eğrisini göstermektedir. Geliştirilen biyosensörün, 0,994 korelasyon katsayısı ile geniş bir derişim aralığında (0,3 ile 100 fM) iyi doğrusal ilişki sergilediği gösterilmiştir. Tayin sınırı;

(LOD), $3 \times \frac{s}{m}$ (s: DNA/CGN-DLC/PGE sinyalinin standart sapması (n=3); m: doğrusal kalibrasyon eğrisinin eğimi) denkleminde 0,27 fM olarak elde edilmiştir.





Şekil 4.13. (A) DNA/ CGN-DLC/ PGE'nin farklı hedef miR-410 konsantrasyonları ile hibridizasyondan sonraki DPV'leri: (a) 0 fM, (b) 0,3 fM, (c) 3 fM, (d) 10 fM, (e) 30 fM, (f) 50 fM, (g) 100 fM. (B) Doğrusal kalibrasyon eğrisi (n=3, % 95 güven düzeyi).

Tez kapsamında önerilen biyosensörün performansı literatürde yayınlanan miRNA tayininde kullanılan diğer elektrokimyasal biyosensörlerle karşılaştırılmıştır.

4.3.3. miRNA Tayini için Geliştirilen Biyosensörün Diğer Elektrokimyasal Biyosensörler ile Karşılaştırılması

Çizelge 4.5, geliştirilen biyosensörün performansını, herhangi bir amplifikasyon stratejisi kullanmadan yakın zamanda yayınlanan (2017-2020) diğer elektrokimyasal biyosensörler ile karşılaştırmaktadır. Çizelge 4.5'ten de görülebileceği gibi, geliştirilen biyosensör en düşük LOD değerleri arasında yer almaktadır ve buda önerilen biyosensörün miRNA tayininde iyi bir performans sergilediğinin göstergesidir. Çizelge 4.6 ve çizelge 4.7, sırasıyla amplifikasyon stratejileri ve farklı tayin yöntemleri kullanılarak miRNA biyosensörlerinin analitik özelliklerini göstermektedir. Görülebileceği gibi, geliştirilen biyosensörün LOD değeri, Zhang ve ark. [298], Cui ve ark. [299], ve Tian ve ark. [300] tarafından bildirilen ve tersine çoklu problemlerin ve seçici

nükleazların kullanılmasını gerektiren sensörler haricinde, miRNA biyosensörlerin kullandığı sinyal amplifikasyon stratejileri ve farklı tayin yöntemlerine kıyasla düşük LOD değeri sergilemektedir.

Çizelge 4.5. Herhangi bir amplifikasyon stratejisi kullanmadan miRNA tayini için geliştirilen farklı biyosensörlerin karşılaştırılması.

miRN A	Yüzey	Yöntem	Çalışma aralığı	LOD	Ref/Yıl
miRNA-410	AuNP-PNT/PGE	EİS	10 fM - 300 pM	3,90 fM	[301] (2020)
miRNA-21	AuNP @ PMB	DPV	100 fM - 1 nM	30 fM	[236] (2020)
miRNA-21	rGO/Au kompozit ile modifiye edilmiş CE	DPV	1 pM - 100 µM	1 pM	[237] (2020)
miRNA-21	rGO/AuNP'ler ile modifiye edilmiş SPCE	DPV	10 fM - 2 pM	5 fM	[238] (2020)
miRNA-375	Nanodendritik altın /grafen	DPV	0,43 pM – 1,13 nM	0,34 nM	[302] (2019)
miRNA-21	Altın/Kitosan/origami-ssDNA	EİS/CV	0,1 pM – 10,0 nM	79,8 fM	[303] (2019)
miRNA-21	CP/SA/AuPtBNPs/CGO kaplı FTO	DPV	1 fM - 1 µM	1 fM	[304] (2019)
miRNA-21	Au@NPFe ₂ O ₃ NC	CC	100 fM – 1,0 µM	100 fM	[305] (2017)
miRNA-103	AuNPs/GCEs	SWV	100 fM - 5 nM	100 fM	[306] (2017)
miRNA-137	ERGO + AuNWs/SPCE	DPV	5,0 – 750,0 fM	1,7 fM	[307] (2017)
miRNA-410	CGN-DLC/PGE	DPV	0,3 – 100 fM	0,27 fM	TEZ Çalışması

AuNP: altın nanoparçacık; **PNT**: peptid nanotüp; **PMB**: Poli (metilen mavisi); **rGO**: indirgenmiş grafen oksit; **CE**: karbon elektrot; **SPCE**: perde baskılı karbon elektrot; **CP**: yakalayıcı prob; **SA**: streptavidin; **AuPtBNPs**: altın platin bimetalik nanopartiküller; **CGO**: karboksilatlı grafen oksit; **FTO**: flor kalay oksit; **Au@NPFe₂O₃NC**: altın yüklü nanogözenekli demir oksit nanoküpler; **ERGO**: elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit; **EİS**: elektrokimyasal empedans spektroskopisi; **CC**: kronokoulometri; **DPV**: diferansiyel puls voltametri.

Çizelge 4.6. Amplifikasyon stratejileri kullanılarak miRNA tayini için önerilen farklı elektrokimyasal biyosensörlerle karşılaştırılması.

Amplif. Stratejisi	Yüzey	Yöntem	Çalışma aralığı	LOD	Ref/Yıl
DSN	AuNPs+AgNPs@ GCE	LSV	1 fM to 1 pM	0,62 fM	[308] (2020)
CHA	PNAs/GE	SWV	10 fM to 5 nM (miR-21) 50 fM to 50 nM (miR-155)	2,49 fM (miRNA21) 11,63 fM (miRNA155)	[309] (2020)
Fc-SH	PCA/Fc-SH/ AuNPs/rGO/SPCE	DPV	18 fM–2,0 pM	5 fM	[310] (2020)
HCR	cDNA/MCH/H1/H2/miR-21/GE	EİS	10 fM–50 pM	4,63 fM	[311] (2020)
CHA	SH-TP/MCH/AuE	DPV	1 fM-1 nM	0,46 fM	[312] (2020)
HCR	MCH/Y-DNA/GE	EİS	1 fM - 10 pM	0,3334 fM	[313] (2019)
DNS+HRP	DNA/MCH/GE	AC	0,1 fM - 100 pM	43,3 aM	[298] (2019)
TB	SS-RNA prob/AuNS/GCE	DPV	100 aM - 1 nM	78 aM	[300] (2018)
HCR	DNA/GE	CC	30 pM - 7 nM	11 pM	[314] (2018)
MoS ₂ -Thi	MoS ₂ -Thi-AuNPs/GCE	SWV	1,0 pM – 10,0 nM	0,26 pM	[315] (2017)
SA-ALP	B-P2/T/MCH/SH-P1/AuNPs/PGE	DPV	200 pM - 388 nM	100 pM	[316] (2017)

DSN: dublekse özgü nükleaz; **AgNPs:** gümüş nanoparçacıklar, **GCE:** camı karbon elektrot; **CHA:** katalize u şeklinde düzenleme; **PNAs:** peptit nükleik asitler; **GE:** altın elektrot; **Fc-SH:** 6-ferrosenil heksantiol; **PCA:** piren karboksilik asit; **HCR:** hibridizasyon zincir reaksiyonu; **MCH:** ortoborik asit 6-Merkapto-1-heksanol; **H1 ve H2:** hairpin problemleri; **AuE=GE:** altın elektrot; **SH-TP:** tiollanmış prob; **TB:** toluidin mavisi; **AuNS:** altın nanopartiküller üstünörgüler; **MoS₂:** molibden disülfür; **Thi:** Thionin; **SA-ALP:** streptavidin-alkalin fosfataz; **B-P2:** biyotinlenmiş prob 2; **T:** hedef miRNA; **SWV:** kare dalga voltametri; **AC:** amperometrik akım; **LSV:** doğrusal süpürme voltametri.

Çizelge 4.7. miRNA tayini için farklı tayin yöntemlerinin karşılaştırılması.

Amplifik. Stratejisi	Yöntem	Çalışma aralığı	LOD	Ref/Yıl
HCR	HR-ICPMS	200 fM - 2 nM	13 fM	[317] (2020)
-	SPR	1,0 fM - 10 nM	0,3 fM	[318] (2020)
-	eSPR	1,0 fM - 10 nM	0,56 fM	[319] (2020)
ISDPR+DNA-AuNPs nanokompozit	ECL	0,01 fM – 0,01 nM	3,2 aM	[299] (2019)
DSN+RCA	Floresan	0,3 fM - 1 nM	0,3 fM	[320] (2019)
-	SERS	100 aM - 1 µM	2-4 fM	[321] (2019)
DSN+RCA	Floresan	100 fM – 1,0 pM	33,4 fM	[322] (2018)
AuNP ve AgNP'ler arasında rezonans enerji transferi	kolorimetrik	0,5 nM - 1 µM	0,6 nM	[323] (2018)
DSN	SERS	5 fM - 20 pM	5 fM	[324] (2018)
CHA	Floresan	0 - 200 nM	0,2971 nM	[325] (2018)
Poly T-CuNPs	Floresan	20 pM - 1 nM	20 pM	[326] (2018)
Stre-GNRs	SPR	0,1 - 100 pM	0,045 pM	[327] (2017)
GO-AuNPs	SPR	0,1 pM – 2,0 nM	0,1 fM	[328] (2017)
DSN	Floresan	1 pM - 10 µM	1,03 pM	[329] (2017)

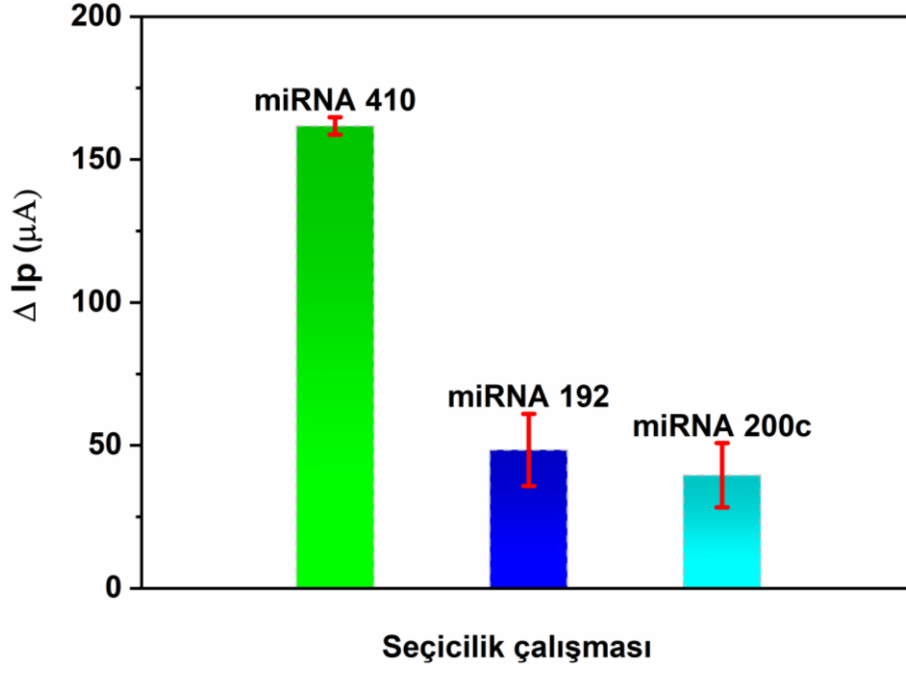
HR-ICPMS: yüksek çözünürlüklü endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometresi; **eSPR:** elektrokimyasal yüzey plazmon rezonansı; **ISDPR:** izotermal dizi yer değiştirme polimeraz reaksiyonu; **ECL:** elektrojenlenmiş kemilüminesans; **SERS:** yüzeyde güçlendirilmiş raman saçılımı; **Poly T-CuNPs:** Poli (timin) içeren bakır nanopartiküller; **Stre-GNRs:** streptavidin fonksiyonelleştirilmiş altın nanorodlar.

4.3.4. Geliştirilen Biyosensörün Tekrar Üretilirlik ve Kararlılık Çalışmaları

Hazırlanan biyosensörün gün-içi tekrar üretilebilirliği ve uzun süreli kararlılığı da araştırılmıştır. Gün-içi tekrarlanabilirliği değerlendirmek için, aynı deney setinde hazırlanmış üç farklı modifiye elektrot 10 fM hedef miRNA-410'u ölçmek için kullanılmıştır (% 95 güven düzeyinde). Elde edilen sonuçlar, akımdaki farkın önemli ölçüde değişmediğini ve hesaplanan bağıl standart sapmanın (RSD) % 4,5 olduğunu, bu da fabrikasyon yönteminin tekrarlanabilirliğini göstermiştir. Uzun süreli kararlılık çalışmaları için, elektrotlar bir desikatörde 4 °C'de iki hafta süreyle saklanmıştır. Her hafta, 10 fM hedef miRNA-410 için üç elektrot test edilmiştir. On beş gün sonra, elektrotların mevcut yanıtı, başlangıç akım değerinin yaklaşık % 94,2'sini korumuştur.

4.3.5. Geliştirilen Biyosensörün Seçicilik Çalışması

Seçicilik, bir miRNA biyosensörünün performansını değerlendirmede çok önemli bir faktördür. Şekil 4.14, DNA/CGN-DLC ile modifiye edilmiş PGE'nin hedef miR-410, hedef dışı miR-192 ve miR-200c ile hibridize edildiği seçicilik testi sonucunu göstermektedir. miRNA-192 ve miRNA-200c'nin her ikisinin de kanserlerle ilişkili olarak upregüle edildiği gösterilmiştir; miRNA-192, mide kanseri [330,331], özofagus kanseri [331], meme kanseri [332] ve karaciğer kanserinde [333] ve miRNA-200c mide [334] ve özofagus [335] kanserlerine ek olarak, pankreas kanseri [336], prostat kanseri [337] ve kolon kanserinde [338]. DNA probunun hedef miR-410 ile hibridizasyonunun ve seçici olarak bağlanması bir sonucu olarak yüksek sinyal yanıtı ile sonuçlandı, ayrıca, hem miR-192 hem de miR-200c ile hibridizasyonun sonrasında ise pik akım yanıtları arasında sadece küçük bir fark olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, hedef miRNA-410 hibridizasyonu sonucunda kaydedilen akım farkı, hedef dışı miRNA'ların elektrokimyasal sinyalinden çok daha yüksek olduğu için hazırlanan biyosensörün yüksek seçiciliği ortaya konmuştur.



Şekil 4.14. Hedef miRNA-410'un, hedef dışı miRNA-192 ve miRNA-200c'ye karşı seçicilik çalışması.

4.3.6. Geliştirilen Biyosensörün Gerçek Örnek Çalışması

Daha önce de bahsedildiği gibi miRNA'lar biyolojik sıvılarda düşük derişimlerde bulunabilirler. Serum, elektrolit içeren pıhtılaşma faktörleri dışında esas olarak plazma ile aynı içeriğe sahip olan tam kandan pıhtı ajanlarının eliminasyonundan sonra kalan sıvıdır [339]. Bu nedenle, seçiciliği artırmak ve spesifik olmayan etkileşimleri veya plazmada girişim yapan türlerin varlığını azaltmak için literatürde karşılaşıldığı gibi gerçek örnek matrisi olarak periferik serum kullanılmıştır [340,341]. Bu amaçla, iki farklı derişimde hazırlanan miRNA-410 serum ortamına eklenmiş ve DNA probu immobilize edilmiş CGN-DLC/PGE ile hibridize edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. miRNA 410'un periferik serum ortamındaki geri kazanım çalışması

Eklenen miRNA 410	Ölçülen miRNA 410	Geri kazanım (%)	RSD (% , n=3)
0,30 fM	0,31 fM	102,2	3,58
3,00 pM	2,89 pM	96,22	2,96

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, serumdaki her miRNA-410 konsantrasyonu için geri kazanım yüzdesi, düşük RSD (% 5'ten az) ile yüksek kantitatif verimde (% 96'dan fazla) elde edilmiştir. Bu sonuç, elektrokimyasal biyosensör platformunun miRNA tayini için karmaşık matris ortamında kullanılabilceğini göstermiştir.

Elektrostatik etkileşimler spesifik olmayan bir etkileşime ve özellikle gerçek numuneler kullanılarak yüksek arka plan gürültüsüne yol açabilmektedir. Gelecekteki çalışmalarda spesifik olmayan etkileşimleri engelleyen stratejilerin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

5. YORUM

Sunulan doktora tez çalışması kapsamında *in vitro* diyagnostik sistemlerinin tasarımına yönelik hem altın hem de grafit sel malzemelerinin üstün özelliklerinden yararlanılarak literatürde ilk defa iletken altın nanoağ bağı elmas benzeri karbon (CGN-DLC) nanofilmler biyosensör elektrotları olarak sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. CGN-DLC nanofilmleri, hem kütle hem de yüzey özelliklerinin gereksinimlerini karşılamak için özel sentez koşulları kullanılarak hazırlanmıştır. Tez kapsamında önerilen sentez yöntemi ile elde edilen filmlerde sp^2 'den daha fazla sp^3 karbon içeriği ve mevcut altın ağı, elektrot iletkenliğinin artmasında ve yüzey oksijen içeren fonksiyonel grupların oluşumunda önemli faktörler olarak rol almışlardır. Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen **sonuçlar** aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

- Çalışmanın ilk aşamasında kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile hazırlanan CGN-DLC nanofilmlerin kimyasal karakterizasyonu FT-IR, XPS, RAMAN spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Filmlerin kristal yapısı ve faz sayısı XRD, optik özellikleri ve bant aralıkları UV-Vis spektroskopisi ile araştırılmıştır. Elektriksel ve elektrokimyasal özellikleri ise sırasıyla dört noktalı prob ve potansiyostat/galvanostat ile ortaya konmuştur. Son olarak ise, morfolojik karakterizasyon FIB-SEM ve HR-TEM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Morfolojik incelemeler sonucunda nanofilmlerin oldukça porozlu yüzeye ve çift katmanlı yapıya sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda altın nanoağ ve elmas benzeri karbon kompozit yapıların başarıyla sentezlenebildiği doğrulanmıştır.
- Boyutları $15 \pm 1,7$ nm'ye sahip trisodyum sitrat kaplı altın nanopartiküller, CGN-DLC nanofilmlerin sentezi için seçilmiştir. Sentezlenen nanofilmin FTIR spektroskopi analiz sonuçları, elmas latisine ait iki-fonon ve üç-fonon bölgelerini göstermiştir. Üç-fonon bölgesi elmas benzeri filmin hidrojenlenmiş amorf karbon (sp^3 , a-C: H) yapıda olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca, tek-fonon bölgesi sp^2

hibridize karbon bileşenlerine ait olduğunu ve iki-fonon bölgesi elmas latisine ait özgü özelliğini göstermiştir.

- XPS ve RAMAN, FTIR sonuçlarını desteklemeye ek olarak, sp^3/sp^2 karbon oranının XPS için 0,6 ve RAMAN için 0,68 olarak bulunduğunu ve sp^3 karbon tipinin daha baskın olduğunu göstermiştir. RAMAN spektroskopisi sonuçlarına göre elmas benzeri karbon yapının D ve G bandı pikleri sırasıyla $1388,6 \text{ cm}^{-1}$ ve $1568,0 \text{ cm}^{-1}$ konumlarında bulunmuştur. Ayrıca, kantitatif analizler sonucunda sentezlenen nanofilmlerdeki sp^3 içeriği yaklaşık % 30 olarak bulunmuştur. XRD sonuçları, sentezlenen CGN-DLC nanofilmlere ait altın (Au) ve kristal ve amorf yapıda olan grafitisel bileşenlerin kırınım piklerini göstermektedir.
- Sentezlenen nanofilmlerin optik bant aralık hesaplaması sonucunda, yapıya ait 1,43 eV ve 5,1 eV'de bulunan iki farklı bant boşluğu sırasıyla altın nanoağların DLC filmlerine bağlanmalarını ve hidrojenlenmiş amorf karbon filmin (DLC) konjuge aromatik halka sistemini göstermektedir.
- I-V grafik sonuçlarına göre nanofilmlere herhangi bir voltaj değeri uygulandığında, ortaya çıkan akım doğrudan I-V karakteristiklerinden elde edilebilir. Grafik eğiminden elde edilen sonuçlar nanofilmlerin direncini $18,23 \pm 2,4 \Omega/\square$ olarak göstermiştir. Ayrıca, yapılan dört-noktalı prob analiz sonucun çift katmanlı CGN-DLC nanofilmlerin altın nanoağ ve elmas benzeri karbon katmanlarının taşıyıcı tipi sırasıyla n-tipi ve p-tipi olarak belirlenmiştir. Taşıyıcı konsantrasyonu, elektriksel devinirliği ve öz direnci, n-tipi için sırasıyla $6,42 \times 10^{19} \text{ (cm}^{-3}\text{)}$, $135,22 \text{ (cm}^2\text{/V.sn)}$, ve $7,19 \times 10^{-4} \text{ (}\Omega\text{.cm)}$ ve p-tipi için sırasıyla $2,57 \times 10^{19} \text{ (cm}^{-3}\text{)}$, $346 \text{ (cm}^2\text{/V.sn)}$, ve $7,03 \times 10^{-4} \text{ (}\Omega\text{.cm)}$ olarak bulunmuştur.
- Elektrokimyasal analiz bölümünde üretilen CGN-DLC modifiye elektrotların etkin oluşumu dönüşümlü voltamogram (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) teknikleri ile kanıtlanmıştır. CGN-DLC modifiye PGE'nin pik ayrımı (ΔE_p) ve akım oranı (I_{pa} / I_{pc}) sırasıyla 133 mV ve 1,18 olarak bulunmuştur.

- Tez kapsamında hazırlanan CGN-DLC/PGE, prostat kanserinde biyobelirteç olarak tanımlanan dolaşımdaki miRNA-410-5p'nin elektrokimyasal tayini için kullanılmıştır. Geliştirilen biyoalgılama sistemi, 0,3 fM ile 100 fM ($R^2 = 0,994$) konsantrasyon aralığında miRNA-410-5p'nin tayini için iyi bir doğrusallık göstermiştir. Ayrıca, geliştirilen sensör sistemi ile 0,27 fM'lik bir LOD değeri hesaplanmıştır.

Tezin **literatüre** katkıları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

- DLC filmler genelde yüksek sıcaklık ve basınçta sentezlenmektedir. Bu nedenle sentezlenen filmlerde sıcaklığa veya basınca bağlı defektler bulunup seçici yüzeylere kaplanabilmektedir. Fakat sunulan özgün sentez yöntemi sayesinde herhangi bir basınç uygulanmadan, düşük sıcaklıkta hazırlanan CGN-DLC nanofilmler istenilen yüzeylere özellikle filtre kağıt gibi esnek substratlara kaplanabilmektedir.
- DLC filmler sp^2/sp^3 fraksiyonlarından oluşmaktadır ve bu yapıların elektriksel iletkenlik özellikleri sp^2 karbon oranına bağlı olup grafitik özelliğinin (sp^2) artması ile iletkenlik özellikleri de artmaktadır. Sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin sp^3 oranı sp^2 karbon oranına göre daha fazla olup malzemeye yüksek sertlik ve yoğunluk katmakta ve düşük elektriksel iletkenlik özellikleri altın nanoağlar ile telafi edilmektedir.
- Literatür taramaları sonucunda sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerin metal katkılı DLC filmlerden daha düşük elektriksel özdirence sahip oldukları gözlenmiştir.
- CGN-DLC nanofilmlerin sentezinde herhangi bir grafit temelli malzeme (grafit, karbon nanotüpler, grafen ve aktif karbon gibi) kullanmadan elmas benzeri yapılar elde edilmektedir. Elde edilen çift katmanlı CGN-DLC nanofilmler her iki yüzey tarafından istenilen substratlara kaplanabilmektedir. Ayrıca, DLC yapının ilk defa literatürde belirgin bir şekilde HR-TEM görüntüleri elde edilmiştir.

- Geliştirilen elektrokimyasal biyosensör, herhangi bir amplifikasyon ve/veya etiketleme işlemi gerektirmeden miRNA-410-5p'nin tayini için yüksek hassasiyete sahip iyi bir performans sergilemiştir. Hazırlanan biyosensör ile, literatürde bildirilen diğer elektrokimyasal biyosensörlerin performansı ile karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen tüm çalışmalar dikkate alındığında, sentezlenen CGN-DLC nanofilmlerinin elektrokimyasal biyosensörlerde hassas ve seçici elektrot olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Gelecekteki çalışmalarda tez kapsamında kullanılan özgün sentez yönteminin mekanizmasının ortaya çıkarılması ve üretilen CGN-DLC nanofilmlerinin elektrokimyasal mikroakışkan sistemde elektrot olarak kullanılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] A.Y. Chang, K. Cowling, A.E. Micah, A. Chapin, C.S. Chen, G. Ikilezi, N. Sadat, G. Tsakalos, J. Wu, T. Younker, Y. Zhao, B.S. Zlavog, C. Abbafati, A.E. Ahmed, K. Alam, V. Alipour, S.M. Aljunid, M.J. Almalki, N. Alvis-Guzman, W. Ammar, C.L. Andrei, M. Anjomshoa, C.A.T. Antonio, J. Arabloo, O. Aremu, M. Ausloos, L. Avila-Burgos, A. Awasthi, M.A. Ayanore, S. Azari, N. Azzopardi-Muscat, M. Bagherzadeh, T.W. Bärnighausen, B.T. Baune, M. Bayati, Y.B. Belay, Y.A. Belay, H. Belete, D.A. Berbada, A.E. Berman, M. Beuran, A. Bijani, R. Busse, L. Cahuana-Hurtado, L.A. Cámara, F. Catalá-López, B.G. Chauhan, M.M. Constantin, C.S. Crowe, A. Cucu, K. Dalal, J.W. De Neve, S. Deiparine, F.M. Demeke, H.P. Do, M. Dubey, M. El Tantawi, S. Eskandarieh, R. Esmaeili, M. Fakhar, A.A. Fazaeli, F. Fischer, N.A. Foigt, T. Fukumoto, N. Fullman, A. Galan, A. Gamkrelidze, K.E. Gezae, A. Ghajar, A. Ghashghaee, K. Goginashvili, A. Haakenstad, H. Haghparast Bidgoli, S. Hamidi, H.L. Harb, E. Hasanpoor, H.Y. Hassen, S.I. Hay, D. Hendrie, A. Henok, I. Heredia-Pi, C. Herteliu, C.L. Hoang, M.K. Hole, E. Homaie Rad, N. Hossain, M. Hosseinzadeh, S. Hostiuc, O.S. Ilesanmi, S.S.N. Irvani, M. Jakovljevic, A. Jalali, S.L. James, J.B. Jonas, M. Jürisson, R. Kadel, B. Karami Matin, A. Kasaeian, H.K. Kasaye, M.W. Kassaw, A. Kazemi Karyani, R. Khabiri, J. Khan, M.N. Khan, Y.H. Khang, A. Kisa, K. Kissimova-Skarbek, S. Kohler, A. Koyanagi, K.J. Krohn, R. Leung, L.L. Lim, S. Lorkowski, A. Majeed, R. Malekzadeh, M. Mansourian, L.G. Mantovani, B.B. Massenburg, M. McKee, V. Mehta, A. Meretoja, T.J. Meretoja, N. Milevska Kostova, T.R. Miller, E.M. Mirrakhimov, B. Mohajer, A. Mohammad Darwesh, S. Mohammed, F. Mohebi, A.H. Mokdad, S.D. Morrison, S.M. Mousavi, S. Muthupandian, A.J. Nagarajan, V. Nangia, I. Negoi, C.T. Nguyen, H.L.T. Nguyen, S.H. Nguyen, S. Nosratnejad, O. Oladimeji, S. Olgiati, J.O. Olusanya, O.E. Onwujekwe, S.S. Otstavnov, A. Pana, D.M. Pereira, B. Piroozi, S.I. Prada, M. Qorbani, M. Rabiee, N. Rabiee, A. Rafiei, F. Rahim, V. Rahimi-Movaghar, U. Ram, C.L. Ranabhat, A. Ranta, D.L. Rawaf, S. Rawaf, S. Rezaei, E.M. Roro, A. Rostami, S. Rubino, M. Salahshoor, A.M. Samy, J. Sanabria, J.V. Santos, M.M. Santric Milicevic, B.P. Sao Jose, M. Savic, F. Schwendicke, S.G. Sepanlou, M. Sepehrimanesh, A. Sheikh, M.G. Shrima, S. Sisay, S. Soltani, M. Soofi, V. Srinivasan, R. Tabarés-Seisdedos, A. Torre, M.R. Tovani-Palone, B.X. Tran, K.B. Tran, E.A. Undurraga, P.R. Valdez, J.F.M. van Boven, V. Vargas, Y. Veisani, F.S. Violante, S.K. Vladimirov, V. Vlassov, S. Vollmer, G.T. Vu, C.D.A. Wolfe, N. Yonemoto, M.Z. Younis, M. Yousefifard, S. Bin Zaman, A. Zangeneh, E.A. Zegeye, A. Ziapour, A. Chew, C.J.L. Murray, J.L. Dieleman, Past, Present, and Future of Global Health Financing: A Review of Development Assistance, Government, out-of-Pocket, and Other Private Spending on Health for 195 Countries, 1995–2050, Lancet Publishing Group, 2019.
- [2] P.K. Drain, E.P. Hyle, F. Noubary, K.A. Freedberg, D. Wilson, W.R. Bishai, W. Rodriguez, I. V. Bassett, *Lancet Infect. Dis.* 14 (2014) 239–249.
- [3] J.N. Nkengasong, P. Nsubuga, O. Nwanyanwu, G.M. Gershby-Damet, G. Roscigno, M. Bulterys, B. Schoub, K.M. DeCock, D. Bix, *Am. J. Clin. Pathol.* 134 (2010) 368–373.
- [4] P.B. Luppá, C. Müller, A. Schlichtiger, H. Schlebusch, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 887–898.

- [5] S. Rosen, M.P. Fox, *PLoS Med.* 8 (2011).
- [6] K.J. Land, S. Smith, R.W. Peeling, in: *Pap. Diagnostics*, Springer International Publishing, 2019, pp. 1–21.
- [7] I. V. Jani, T.F. Peter, *N. Engl. J. Med.* 368 (2013) 2319–2324.
- [8] A.P. Dhawan, W.J. Heetderks, M. Pavel, S. Acharya, M. Akay, A. Mairal, B. Wheeler, C.C. Dacso, T. Sunder, N. Lovell, M. Gerber, M. Shah, S.G. Senthilvel, M.D. Wang, B. Bhargava, *IEEE J. Transl. Eng. Heal. Med.* 3 (2015).
- [9] A.H. FREE, E.C. ADAMS, M.L. KERCHER, H.M. FREE, M.H. COOK, *Clin. Chem.* 3 (1957) 163–168.
- [10] J.M. Singer, C.M. Plotz, *Am. J. Med.* 21 (1956) 888–892.
- [11] S.A. BERSON, R.S. YALOW, *J. Clin. Invest.* 38 (1959) 1996–2016.
- [12] R.L. Campbell, D.B. Wagner, J.P. O’Connell, *Solid Phase Assay with Visual Readout*, 1987.
- [13] R.W. Rosenstein, T.G. Bloomster, *Solid Phase Assay Employing Capillary Flow*, 1989.
- [14] A.C. Lerario, J.G. Pierce, J.L. Vaitukaiti, *Endocr. Res. Commun.* 5 (1978) 43–55.
- [15] S. Birken, E.G. Armstrongs, M.A. Gawinowicz Kolks, L.A. Cole, G.M. Agosto, A. Krichevsky, J.L. Vaitukaitis, R.E. Canfield, *Endocrinology* 123 (1988) 572–583.
- [16] A. Moody, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002) 66–78.
- [17] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, *Front. Chem.* 2 (2014) 63.
- [18] P. Mehrotra, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159.
- [19] *In Vitro Diagnostics (IVD) Market Insights, 2020-2027: Market Size & Share, Trends, Opportunities, Players, and More*, n.d.
- [20] MedTech Institution, *European IVD Market Statistics Report 2019*, 2019.
- [21] S.K. Metkar, K. Girigoswami, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17 (2019) 271–283.
- [22] M.N. Velasco-Garcia, T. Mottram, *Biosyst. Eng.* 84 (2003) 1–12.
- [23] M.S. Thakur, K. V. Ragavan, *J. Food Sci. Technol.* 50 (2013) 625–641.
- [24] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. De Alda, M.P. Marco, D. Barceló, *Talanta* 65 (2005) 291–297.
- [25] S. Su, S. Chen, C. Fan, *Green Energy Environ.* 3 (2018) 97–106.
- [26] V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, *Anal. Chem.* 84 (2012) 487–515.
- [27] E. Singh, H.S. Nalwa, *Nanomaterial-Based Flexible and Multifunctional Sensors*, 2018.
- [28] S.O. Kelley, C.A. Mirkin, D.R. Walt, R.F. Ismagilov, M. Toner, E.H. Sargent, *Nat. Nanotechnol.* 9 (2014) 969–980.
- [29] Q. Liu, C. Wu, H. Cai, N. Hu, J. Zhou, P. Wang, *Chem. Rev.* 114 (2014) 6423–6461.

- [30] G. Rong, S.R. Corrie, H.A. Clark, *ACS Sensors* 2 (2017) 327–338.
- [31] X. Huang, Y. Liu, B. Yung, Y. Xiong, X. Chen, *ACS Nano* 11 (2017) 5238–5292.
- [32] L.T. Bereza-Malcolm, G. Mann, A.E. Franks, *ACS Synth. Biol.* 4 (2015) 535–546.
- [33] Y. Du, S. Dong, *Anal. Chem.* 89 (2017) 189–215.
- [34] J.N. Tiwari, V. Vij, K.C. Kemp, K.S. Kim, *ACS Nano* 10 (2016) 46–80.
- [35] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, *Biosens. Bioelectron.* 103 (2018) 113–129.
- [36] H. Zhang, H. Zhang, A. Aldabahi, X. Zuo, C. Fan, X. Mi, *Biosens. Bioelectron.* 89 (2017) 96–106.
- [37] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, *Anal. Chem.* 87 (2015) 230–249.
- [38] H.S. Nalwa, *Nanostructured Materials and Nanotechnology: Concise Edition*, 2001.
- [39] H.S. Nalwa, *Choice Rev. Online* 1–10 (2005) 42-2552a-42-2552a.
- [40] C.M. Cobley, J. Chen, E.C. Cho, L. V. Wang, Y. Xia, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 44–56.
- [41] S.K. Sun, H.F. Wang, X.P. Yan, *Acc. Chem. Res.* 51 (2018) 1131–1143.
- [42] S. Nandini, S. Nalini, M.B.M. Reddy, G.S. Suresh, J.S. Melo, P. Niranjana, J. Sanetuntikul, S. Shanmugam, *Bioelectrochemistry* 110 (2016) 79–90.
- [43] C. Tan, X. Cao, X.J. Wu, Q. He, J. Yang, X. Zhang, J. Chen, W. Zhao, S. Han, G.H. Nam, M. Sindoro, H. Zhang, *Chem. Rev.* 117 (2017) 6225–6331.
- [44] E. Singh, K.S. Kim, G.Y. Yeom, H.S. Nalwa, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 3223–3245.
- [45] E. Singh, K.S. Kim, G.Y. Yeom, H.S. Nalwa, *RSC Adv.* 7 (2017) 28234–28290.
- [46] E. Singh, P. Singh, K.S. Kim, G.Y. Yeom, H.S. Nalwa, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 11061–11105.
- [47] R. Singh, E. Singh, H.S. Nalwa, *RSC Adv.* 7 (2017) 48597–48630.
- [48] N.P. Dasgupta, J. Sun, C. Liu, S. Brittman, S.C. Andrews, J. Lim, H. Gao, R. Yan, P. Yang, *Adv. Mater.* 26 (2014) 2137–2184.
- [49] T.R. Fadel, D.F. Farrell, L.E. Friedersdorf, M.H. Griep, M.D. Hoover, M.A. Meador, M. Meyyappan, *ACS Sensors* 1 (2016) 207–216.
- [50] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Anal. Lett.* 34 (2001) 635–659.
- [51] A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 441–456.
- [52] M. Ben Ali, Y. Korpan, M. Gonchar, A. El'skaya, M.A. Maaref, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 575–581.
- [53] V.M. Mirsky, M. Riepl, O.S. Wolfbeis, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 977–989.
- [54] A. Guiseppi-Elie, L. Lingerfelt, *Top. Curr. Chem.* 260 (2005) 161–186.
- [55] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Anal. Lett.* 34 (2001) 635–659.
- [56] P. Chandra, *Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis*, 2016.

- [57] B. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*, 2007.
- [58] L. Zhang, J. Wang, F. Liu, Y. Xiong, Z. Liu, D. Jiang, Y. Li, D. Tu, Y. Wang, X. Pu, *RSC Adv.* 7 (2017) 12576–12585.
- [59] G.C. Barker, I.L. Jenkins, *Analyst* 77 (1952) 685–695.
- [60] V. Mirceski, S. Skrzypek, L. Stojanov, *ChemTexts* 4 (2018).
- [61] A. Chen, B. Shah, *Anal. Methods* 5 (2013) 2158–2173.
- [62] M. Honeychurch, in: *Encycl. Anal. Sci. Second Ed.*, Elsevier Inc., 2004, pp. 272–277.
- [63] S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56–58.
- [64] T. Pichler, *Nat. Mater.* 6 (2007) 332–333.
- [65] A.K. Geim, K.S. Novoselov, *Nat. Mater.* 6 (2007) 183–191.
- [66] J. Robertson, *Mater. Sci. Eng. R Reports* 37 (2002) 129–281.
- [67] A.C. Ferrari, J. Robertson, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 362 (2004) 2477–2512.
- [68] D. Haddock, T. Parker, C. Spindloe, M. Tolley, in: *J. Phys. Conf. Ser.*, 2016.
- [69] S. Aisenberg, R. Chabot, *Carbon N. Y.* 10 (1972) 356.
- [70] C.S. Park, S.G. Choi, J.N. Jang, M.P. Hong, K.H. Kwon, H.H. Park, *Surf. Coatings Technol.* 231 (2013) 131–134.
- [71] M. Yunhui, T. Dehua, W. Xicheng, L. Qinghua, in: *Adv. Tribol.*, Springer Berlin Heidelberg, 2009, pp. 915–919.
- [72] J. Andersson, R.A. Erck, A. Erdemir, *Wear* 254 (2003) 1070–1075.
- [73] A. Erdemir, C. Donnet, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 39 (2006).
- [74] M.I. De Barros Bouchet, J.M. Martin, J. Avila, M. Kano, K. Yoshida, T. Tsuruda, S. Bai, Y. Higuchi, N. Ozawa, M. Kubo, M.C. Asensio, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13.
- [75] S. Aisenberg, R. Chabot, *J. Appl. Phys.* 42 (1971) 2953–2958.
- [76] S. Kumar, D. Sarangi, P.N. Dixit, O.S. Panwar, R. Bhattacharyya, *Thin Solid Films* 346 (1999) 130–137.
- [77] A.A. Onoprienko, V. V. Artamonov, I.B. Yanchuk, *Surf. Coatings Technol.* 200 (2006) 4174–4178.
- [78] G. Lazar, *J. Phys. Condens. Matter* 13 (2001) 3011–3021.
- [79] P.J. Fallon, V.S. Veerasamy, C.A. Davis, J. Robertson, G.A.J. Amaratunga, W.I. Milne, J. Koskinen, *Phys. Rev. B* 48 (1993) 4777–4782.
- [80] J. Haverkamp, R.M. Mayo, M.A. Bourham, J. Narayan, C. Jin, G. Duscher, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 3627–3634.
- [81] S. Flege, R. Hatada, A. Hanauer, W. Ensinger, T. Morimura, K. Baba, *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2017 (2017).
- [82] K.C. Walter, M. Nastasi, C. Munson, *Surf. Coatings Technol.* 93 (1997) 287–291.
- [83] D. Neerinck, P. Persoone, M. Sercu, A. Goel, C. Venkatraman, D. Kester, C. Halter, P. Swab, D. Bray, *Thin Solid Films* 317 (1998) 402–404.

- [84] J.C. Sánchez-López, A. Fernández, in: *Tribol. Diamond-Like Carbon Film. Fundam. Appl.*, Springer US, 2008, pp. 311–328.
- [85] A. Markwitz, J. Leveneur, P. Gupta, K. Suschke, J. Futter, M. Rondeau, *J. Nanomater.* 2015 (2015).
- [86] M. Jelinek, T. Kocourek, J. Zemek, J. Mikšovský, Š. Kubinová, J. Remsa, J. Kopeček, K. Jurek, *Mater. Sci. Eng. C* 46 (2015) 381–386.
- [87] X. Shia, L. Guo, Y. Bai, L. Qiao, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 7238–7244.
- [88] D. Bootkul, N. Saenphinit, B. Supsermpol, C. Aramwit, S. Intarasiri, *Appl. Surf. Sci.* 310 (2014) 293–299.
- [89] J.Y. Jao, S. Han, L.S. Chang, Y.C. Chen, C.L. Chang, H.C. Shih, *Diam. Relat. Mater.* 18 (2009) 368–373.
- [90] G. Gassner, P.H. Mayrhofer, J. Patscheider, C. Mitterer, *Thin Solid Films* 515 (2007) 5411–5417.
- [91] P. V. Badiger, V. Desai, M.R. Ramesh, S. Joladarashi, H. Gourkar, *Mater. Res. Express* 6 (2019).
- [92] R. Paul, R. Bhar, A.K. Pal, *Mater. Res. Bull.* 45 (2010) 576–583.
- [93] C.A.G.S. Oliveira, M.F. Stein, E. Saito, H. Zanin, L.S. Vieira, L. Raniero, V.J. Trava-Airoldi, A.O. Lobo, F.R. Marciano, *Diam. Relat. Mater.* 53 (2015) 40–44.
- [94] J.Y. Jao, S. Han, C.C. Yen, Y.C. Liu, L.S. Chang, C.L. Chang, H.C. Shih, *Diam. Relat. Mater.* 20 (2011) 123–129.
- [95] Y. Yu, J. Zhang, *Solid State Sci.* 11 (2009) 1929–1932.
- [96] H. Hofsäss, H. Binder, T. Klumpp, E. Recknagel, *Diam. Relat. Mater.* 3 (1994) 137–142.
- [97] M.I. Khan, M. Sabir, *Mater. Res. Express* 6 (2019).
- [98] Y. Dong, J. Shao, C. Chen, H. Li, R. Wang, Y. Chi, X. Lin, G. Chen, *Carbon N. Y.* 50 (2012) 4738–4743.
- [99] B. Yang, J. Chen, S. Lei, R. Guo, H. Li, S. Shi, X. Yan, *Adv. Energy Mater.* 8 (2018) 1702409.
- [100] Q. Wang, Y.F. Nie, X.Y. Chen, Z.H. Xiao, Z.J. Zhang, *Electrochim. Acta* 200 (2016) 247–258.
- [101] J. Qi, L. Jiang, Q. Tang, S. Zhu, S. Wang, B. Yi, G. Sun, *Carbon N. Y.* 50 (2012) 2824–2831.
- [102] J. Qi, L. Jiang, S. Wang, G. Sun, *Appl. Catal. B Environ.* 107 (2011) 95–103.
- [103] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A.A. Firsov, *Science* (80-.). 306 (2004) 666–669.
- [104] C. Cheng, S. Li, A. Thomas, N.A. Kotov, R. Haag, *Chem. Rev.* 117 (2017) 1826–1914.
- [105] A.K. Geim, K.S. Novoselov, in: *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals*, World Scientific Publishing Co., 2009, pp. 11–19.
- [106] Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J.W. Suk, J.R. Potts, R.S. Ruoff, *Adv. Mater.* 22 (2010) 3906–3924.

- [107] P. Avouris, C. Dimitrakopoulos, *Mater. Today* 15 (2012) 86–97.
- [108] H.Y. Mao, S. Laurent, W. Chen, O. Akhavan, M. Imani, A.A. Ashkarran, M. Mahmoudi, *Chem. Rev.* 113 (2013) 3407–3424.
- [109] J.C. Meyer, A.K. Geim, M.I. Katsnelson, K.S. Novoselov, T.J. Booth, S. Roth, *Nature* 446 (2007) 60–63.
- [110] Y. Xu, H. Bai, G. Lu, C. Li, G. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5856–5857.
- [111] H. Chen, M.B. Müller, K.J. Gilmore, G.G. Wallace, D. Li, *Adv. Mater.* 20 (2008) 3557–3561.
- [112] C. Hu, J. Xue, L. Dong, Y. Jiang, X. Wang, L. Qu, L. Dai, *ACS Nano* 10 (2016) 1325–1332.
- [113] Q. Xi, X. Chen, D.G. Evans, W. Yang, *Langmuir* 28 (2012) 9885–9892.
- [114] X. Li, X. Wang, L. Zhang, S. Lee, H. Dai, *Science* (80-.). 319 (2008) 1229–1232.
- [115] E. Singh, H.S. Nalwa, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 6237–6278.
- [116] E. Singh, H.S. Nalwa, *Sci. Adv. Mater.* 7 (2015) 1863–1912.
- [117] W. Lv, Z. Li, Y. Deng, Q.H. Yang, F. Kang, *Energy Storage Mater.* 2 (2016) 107–138.
- [118] U. Khan, T.H. Kim, H. Ryu, W. Seung, S.W. Kim, *Adv. Mater.* 29 (2017) 1603544.
- [119] F. Schwierz, *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 487–496.
- [120] E. Singh, M. Meyyappan, H.S. Nalwa, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 34544–34586.
- [121] D. Iannazzo, A. Pistone, M. Salamò, S. Galvagno, R. Romeo, S. V. Giofrè, C. Branca, G. Visalli, A. Di Pietro, *Int. J. Pharm.* 518 (2017) 185–192.
- [122] V. Kumar, K.H. Kim, J.W. Park, J. Hong, S. Kumar, *Chem. Eng. J.* 315 (2017) 210–232.
- [123] T.H. Han, Y. Lee, M.R. Choi, S.H. Woo, S.H. Bae, B.H. Hong, J.H. Ahn, T.W. Lee, *Nat. Photonics* 6 (2012) 105–110.
- [124] D. Chen, H. Feng, J. Li, *Chem. Rev.* 112 (2012) 6027–6053.
- [125] P.T. Yin, S. Shah, M. Chhowalla, K.B. Lee, *Chem. Rev.* 115 (2015) 2483–2531.
- [126] X. Zhao, P. Zhang, Y. Chen, Z. Su, G. Wei, *Nanoscale* 7 (2015) 5080–5093.
- [127] L. Qiu, D. Li, H.M. Cheng, *ACS Nano* 12 (2018) 5085–5092.
- [128] S. Nardecchia, D. Carriazo, M.L. Ferrer, M.C. Gutiérrez, F. Del Monte, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 794–830.
- [129] F. Liu, Y. Piao, J.S. Choi, T.S. Seo, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 387–392.
- [130] J. Liu, S. Fu, B. Yuan, Y. Li, Z. Deng, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 7279–7281.
- [131] M. Wang, X. Duan, Y. Xu, X. Duan, *ACS Nano* 10 (2016) 7231–7247.
- [132] W.K. Chee, H.N. Lim, N.M. Huang, I. Harrison, *RSC Adv.* 5 (2015) 68014–68051.
- [133] B. Dubertret, M. Calame, A.J. Libchaber, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 365–370.
- [134] H. Imahori, S. Fukuzumi, *Adv. Mater.* 13 (2001) 1197–1199.

- [135] A. Gole, C. Dash, V. Ramakrishnan, S.R. Sainkar, A.B. Mandale, M. Rao, M. Sastry, *Langmuir* 17 (2001) 1674–1679.
- [136] J.X. Liu, N. Bao, X. Luo, S.N. Ding, *ACS Omega* 3 (2018) 8595–8604.
- [137] C.R. Raj, B.K. Jena, *Chem. Commun.* (2005) 2005–2007.
- [138] M. Brust, D. Bethell, C.J. Kiely, D.J. Schiffrin, *Langmuir* 14 (1998) 5425–5429.
- [139] W.P. Halperin, *Rev. Mod. Phys.* 58 (1986) 533–606.
- [140] Y. Li, H.J. Schluesener, S. Xu, *Gold Bull.* 43 (2010) 29–41.
- [141] L. Andrew Lyon, M.D. Musick, M.J. Natan, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5177–5183.
- [142] A. Zengin, U. Tamer, T. Caykara, *Anal. Chim. Acta* 817 (2014) 33–41.
- [143] Z.F. Zhang, H. Cui, C.Z. Lai, L.J. Liu, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3324–3329.
- [144] S. Mayilo, M.A. Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T.A. Klar, A. Nichtl, K. Kürzinger, F.D. Stefani, J. Feldmann, *Nano Lett.* 9 (2009) 4558–4563.
- [145] X.C. Zhou, S.J. O’Shea, S.F.Y. Li, *Chem. Commun.* (2000) 953–954.
- [146] L. Lin, H. qiu Zhao, J. ru Li, J. an Tang, M. xing Duan, L. Jiang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274 (2000) 817–820.
- [147] S. Andreescu, L.A. Luck, *Anal. Biochem.* 375 (2008) 282–290.
- [148] S. Bharathi, M. Nogami, in: *Analyst*, The Royal Society of Chemistry, 2001, pp. 1919–1922.
- [149] Q. Xu, C. Mao, N.N. Liu, J.J. Zhu, J. Sheng, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 768–773.
- [150] A. Kowalczyk, B. Wagner, M. Karbarz, A.M. Nowicka, *Sensors Actuators, B Chem.* 208 (2015) 220–227.
- [151] M. Matczuk, S.S. Aleksenko, F.M. Matysik, M. Jarosz, A.R. Timerbaev, *Electrophoresis* 36 (2015) 1158–1163.
- [152] S. Hu, S. Zhang, Z. Hu, Z. Xing, X. Zhang, *Anal. Chem.* 79 (2007) 923–929.
- [153] Y. Zhang, B. Chen, M. He, B. Yang, J. Zhang, B. Hu, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8082–8089.
- [154] A.M. López-Marzo, R. Hoyos-De-La-Torre, E. Baldrich, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4010–4018.
- [155] X. Qin, A. Xu, L. Liu, W. Deng, C. Chen, Y. Tan, Y. Fu, Q. Xie, S. Yao, *Chem. Commun.* 51 (2015) 8540–8543.
- [156] X. Wang, D. Du, H. Dong, S. Song, K. Koh, H. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 375–381.
- [157] E. Heydari-Bafrooei, N.S. Shamszadeh, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 284–292.
- [158] W. Wang, C. Ma, Y. Li, B. Liu, L. Tan, *Appl. Surf. Sci.* 433 (2018) 847–854.
- [159] L. Shi, X. Rong, Y. Wang, S. Ding, W. Tang, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 41–48.
- [160] M. Hasanzadeh, P. Babaie, A. Mokhtarzadeh, N. Hajizadeh, S. Mahboob, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 422–430.

- [161] S. Yu, Y. Wang, L.P. Jiang, S. Bi, J.J. Zhu, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4544–4551.
- [162] X. Zheng, L. Li, K. Cui, Y. Zhang, L. Zhang, S. Ge, J. Yu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 3333–3340.
- [163] X. Cao, J. Xu, J. Xia, F. Zhang, Z. Wang, *Sensors Actuators, B Chem.* 255 (2018) 2136–2142.
- [164] G.S. Mack, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 631–638.
- [165] H. Cai, H. Zhou, Y. Miao, N. Li, L. Zhao, L. Jia, *Lab. Investig.* 97 (2017) 530–542.
- [166] M. Azimzadeh, M. Rahaie, N. Nasirizadeh, M. Daneshpour, H. Naderi-Manesh, *Nanomedicine Res. J.* 2 (2017) 36–48.
- [167] R.M. Graybill, R.C. Bailey, *Anal. Chem.* 88 (2016) 431–450.
- [168] J. V. Carter, N.J. Galbraith, D. Yang, J.F. Burton, S.P. Walker, S. Galandiuk, *Br. J. Cancer* 116 (2017) 762–774.
- [169] P. Svoboda, *FEBS Lett.* 589 (2015) 1694–1701.
- [170] R.M. Graybill, R.C. Bailey, *Anal. Chem.* 88 (2016) 431–450.
- [171] A.J. Mitchell, W.D. Gray, S.S. Hayek, Y.A. Ko, S. Thomas, K. Rooney, M. Awad, J.D. Roback, A. Quyyumi, C.D. Searles, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–11.
- [172] R. Nedaeinia, M. Manian, M.H. Jazayeri, M. Ranjbar, R. Salehi, M. Sharifi, F. Mohaghegh, M. Goli, S.H. Jahednia, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan, *Cancer Gene Ther.* 24 (2017) 48–56.
- [173] R. Tavallaie, S.R.M. De Almeida, J.J. Gooding, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 7 (2015) 580–592.
- [174] W. Zhou, M.Y. Fong, Y. Min, G. Somlo, L. Liu, M.R. Palomares, Y. Yu, A. Chow, S.T.F. O'Connor, A.R. Chin, Y. Yen, Y. Wang, E.G. Marcusson, P. Chu, J. Wu, X. Wu, A.X. Li, Z. Li, H. Gao, X. Ren, M.P. Boldin, P.C. Lin, S.E. Wang, *Cancer Cell* 25 (2014) 501–515.
- [175] J.K. Lee, S.R. Park, B.K. Jung, Y.K. Jeon, Y.S. Lee, M.K. Kim, Y.G. Kim, J.Y. Jang, C.W. Kim, *PLoS One* 8 (2013) e84256.
- [176] A. Bronisz, Y. Wang, M.O. Nowicki, P. Peruzzi, K.I. Ansari, D. Ogawa, L. Balaj, G. De Rienzo, M. Mineo, I. Nakano, M.C. Ostrowski, F. Hochberg, R. Weissleder, S.E. Lawler, E.A. Chiocca, J. Godlewski, *Cancer Res.* 74 (2014) 738–750.
- [177] H. Tadokoro, T. Umezu, K. Ohyashiki, T. Hirano, J.H. Ohyashiki, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 34343–34351.
- [178] M. Yang, J. Chen, F. Su, B. Yu, F. Su, L. Lin, Y. Liu, J.D. Huang, E. Song, *Mol. Cancer* 10 (2011) 1–13.
- [179] G. Zhuang, X. Wu, Z. Jiang, I. Kasman, J. Yao, Y. Guan, J. Oeh, Z. Modrusan, C. Bais, D. Sampath, N. Ferrara, *EMBO J.* 31 (2012) 3513–3523.
- [180] J. Li, Y. Zhang, Y. Liu, X. Dai, W. Li, X. Cai, Y. Yin, Q. Wang, Y. Xue, C. Wang, D. Li, D. Hou, X. Jiang, J. Zhang, K. Zen, X. Chen, C.Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 23586–23596.
- [181] S.J. Pan, S.K. Zhan, B.G. Pei, Q.F. Sun, L.G. Bian, B.M. Sun, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 25 (2012) 871–881.

- [182] Y. Zhang, D. Liu, X. Chen, J. Li, L. Li, Z. Bian, F. Sun, J. Lu, Y. Yin, X. Cai, Q. Sun, K. Wang, Y. Ba, Q. Wang, D. Wang, J. Yang, P. Liu, T. Xu, Q. Yan, J. Zhang, K. Zen, C.Y. Zhang, *Mol. Cell* 39 (2010) 133–144.
- [183] N.H.H. Heegaard, A.J. Schetter, J.A. Welsh, M. Yoneda, E.D. Bowman, C.C. Harris, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 1378–1386.
- [184] V.N. Aushev, I.B. Zborovskaya, K.K. Laktionov, N. Girard, M.P. Cros, Z. Herceg, V. Krutovskikh, *PLoS One* 8 (2013) e78649.
- [185] R.C. Zeng, W. Zhang, X.Q. Yan, Z.Q. Ye, E.D. Chen, D.P. Huang, X.H. Zhang, G.L. Huang, *Med. Oncol.* 30 (2013).
- [186] P.Y. Wang, H.T. Gong, B.F. Li, C.L. Lv, H.T. Wang, H.H. Zhou, X.X. Li, S.Y. Xie, B.F. Jiang, *Oncol. Lett.* 6 (2013) 1681–1686.
- [187] S. Zearo, E. Kim, Y. Zhu, J.T. Zhao, S.B. Sidhu, B.G. Robinson, P.S.H. Soon, *BMC Cancer* 14 (2014) 1–7.
- [188] J. Wang, S.K. Huang, M. Zhao, M. Yang, J.L. Zhong, Y.Y. Gu, H. Peng, Y.Q. Che, C.Z. Huang, *PLoS One* 9 (2014) e87451.
- [189] P. Menéndez, D. Padilla, P. Villarejo, T. Palomino, P. Nieto, J.M. Menéndez, J.A. Rodríguez-Montes, *J. Surg. Oncol.* 108 (2013) 369–373.
- [190] M. Tsujiura, S. Komatsu, D. Ichikawa, A. Shiozaki, H. Konishi, H. Takeshita, R. Morimura, H. Nagata, T. Kawaguchi, S. Hirajima, T. Arita, H. Fujiwara, K. Okamoto, E. Otsuji, *Gastric Cancer* 18 (2015) 271–279.
- [191] C. Zhu, C. Ren, J. Han, Y. Ding, J. Du, N. Dai, J. Dai, H. Ma, Z. Hu, H. Shen, Y. Xu, G. Jin, *Br. J. Cancer* 110 (2014) 2291–2299.
- [192] Y. Fu, X. Wei, C. Tang, J. Li, R. Liu, A. Shen, Z. Wu, *Oncol. Lett.* 6 (2013) 1811–1815.
- [193] B.G. Giray, G. Emekdas, S. Tezcan, M. Ulger, M.S. Serin, O. Sezgin, E. Altintas, E.N. Tiftik, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 4513–4519.
- [194] W. Chen, H. Wang, H. Chen, S. Liu, H. Lu, D. Kong, X. Huang, Q. Kong, Z. Lu, *Eur. J. Haematol.* 92 (2014) 407–412.
- [195] K. Jones, J.P. Nourse, C. Keane, A. Bhatnagar, M.K. Gandhi, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 253–264.
- [196] C. Yang, C. Wang, X. Chen, S. Chen, Y. Zhang, F. Zhi, J. Wang, L. Li, X. Zhou, N. Li, H. Pan, J. Zhang, K. Zen, C.Y. Zhang, C. Zhang, *Int. J. Cancer* 132 (2013) 116–127.
- [197] S. Komatsu, D. Ichikawa, H. Takeshita, M. Tsujiura, R. Morimura, H. Nagata, T. Kosuga, D. Iitaka, H. Konishi, A. Shiozaki, H. Fujiwara, K. Okamoto, E. Otsuji, *Br. J. Cancer* 105 (2011) 104–111.
- [198] H. Zheng, L. Zhang, Y. Zhao, D. Yang, F. Song, Y. Wen, Q. Hao, Z. Hu, W. Zhang, K. Chen, *PLoS One* 8 (2013) e77853.
- [199] A. Zhao, G. Li, M. Péoc'h, C. Genin, M. Gigante, *Exp. Mol. Pathol.* 94 (2013) 115–120.
- [200] L. Ouyang, P. Liu, S. Yang, S. Ye, W. Xu, X. Liu, *Med. Oncol.* 30 (2013).
- [201] S. Yu, Y. Liu, J. Wang, Z. Guo, Q. Zhang, F. Yu, Y. Zhang, K. Huang, Y. Li, E.

- Song, X.L. Zheng, H. Xiao, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 2084–2092.
- [202] J. Yu, Y. Wang, R. Dong, X. Huang, S. Ding, H. Qiu, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138 (2012) 671–674.
- [203] A.L. Carlsen, M.T. Joergensen, S. Knudsen, O.B.S. De Muckadell, N.H.H. Heegaard, *Pancreas* 42 (2013) 1107–1113.
- [204] T. Kishimoto, H. Eguchi, H. Nagano, S. Kobayashi, H. Akita, N. Hama, H. Wada, K. Kawamoto, A. Tomokuni, Y. Tomimaru, K. Umeshita, Y. Doki, M. Mori, *Cancer Sci.* 104 (2013) 1626–1631.
- [205] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424.
- [206] P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O’Briant, A. Allen, D.W. Lin, N. Urban, C.W. Drescher, B.S. Knudsen, D.L. Stirewalt, R. Gentleman, R.L. Vessella, P.S. Nelson, D.B. Martin, M. Tewari, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10513–10518.
- [207] R. Mahn, L.C. Heukamp, S. Rogenhofer, A. Von Ruecker, S.C. Müller, J. Ellinger, *Urology* 77 (2011) 1265.e9-1265.e16.
- [208] J.C. Brase, M. Johannes, T. Schlomm, A. Haese, T. Steuber, T. Beissbarth, R. Kuner, H. Sültmann, *Int. J. Cancer* 128 (2011) 608–616.
- [209] J. Wang, H. Ye, D. Zhang, K. Cheng, Y. Hu, X. Yu, L. Lu, J. Hu, C. Zuo, B. Qian, Y. Yu, S. Liu, G. Liu, C. Mao, S. Liu, *Theranostics* 7 (2017) 1407–1421.
- [210] Y. Zhang, D. Zhang, J. Lv, S. Wang, Q. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503 (2018) 2459–2465.
- [211] J. Wang, H. Ye, D. Zhang, Y. Hu, X. Yu, L. Wang, C. Zuo, Y. Yu, G. Xu, S. Liu, *Cancer Cell Int.* 16 (2016) 12.
- [212] E.A. Hunt, D. Broyles, T. Head, S.K. Deo, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 8 (2015) 217–237.
- [213] M. Keshavarz, M. Behpour, H.A. Rafiee-Pour, *RSC Adv.* 5 (2015) 35651–35660.
- [214] C. Yongqiang, L. Zhengping, W. Yucong, F. Yongshan, *Prog. Chem.* 22 (2010) 1509–1517.
- [215] Y. Shen, F. Tian, Z. Chen, R. Li, Q. Ge, Z. Lu, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 322–331.
- [216] J. Faccini, J.B. Ruidavets, P. Cordelier, F. Martins, J.J. Maoret, V. Bongard, J. Ferrières, J. Roncalli, M. Elbaz, C. Vindis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10.
- [217] G. Cheng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81 (2015) 75–93.
- [218] A. Chiadò, C. Novara, A. Lamberti, F. Geobaldo, F. Giorgis, P. Rivolo, *Anal. Chem.* 88 (2016) 9554–9563.
- [219] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, *Science* (80-.). 270 (1995) 467–470.
- [220] E. Berezikov, G. Van Tetering, M. Verheul, J. Van De Belt, L. Van Laake, J. Vos, R. Verloop, M. Van De Wetering, V. Guryev, S. Takada, A.J. Van Zonneveld, H. Mano, R. Plasterk, E. Cuppen, *Genome Res.* 16 (2006) 1289–1298.

- [221] H.L.L. Yu, A. Maslova, I.M. Hsing, *ChemElectroChem* 4 (2017) 795–805.
- [222] G. Wu, M.H. Zaman, *Bull. World Health Organ.* 90 (2012) 914–920.
- [223] W. Zhou, X. Gao, D. Liu, X. Chen, *Chem. Rev.* 115 (2015) 10575–10636.
- [224] E. Hamidi-Asl, I. Palchetti, E. Hasheminejad, M. Mascini, *Talanta* 115 (2013) 74–83.
- [225] S. Azzouzi, W.C. Mak, K. Kor, A.P.F. Turner, M. Ben Ali, V. Beni, *Biosens. Bioelectron.* 92 (2017) 154–161.
- [226] P. Jolly, M.R. Batistuti, A. Miodek, P. Zhuravski, M. Mulato, M.A. Lindsay, P. Estrela, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–10.
- [227] F.F. Cheng, T.T. He, H.T. Miao, J.J. Shi, L.P. Jiang, J.J. Zhu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 2979–2985.
- [228] F. Li, J. Peng, Q. Zheng, X. Guo, H. Tang, S. Yao, *Anal. Chem.* 87 (2015) 4806–4813.
- [229] X. Wu, Y. Chai, P. Zhang, R. Yuan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 713–720.
- [230] S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, *Compr. Anal. Chem.* 77 (2017) 179–205.
- [231] J. Zhang, D.Z. Wu, S.X. Cai, M. Chen, Y.K. Xia, F. Wu, J.H. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 452–457.
- [232] C. Ye, M.Q. Wang, Z.F. Gao, Y. Zhang, J.L. Lei, H.Q. Luo, N.B. Li, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11444–11449.
- [233] P. Miao, B. Wang, F. Meng, J. Yin, Y. Tang, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 602–607.
- [234] R.J. Heaton, A.W. Peterson, R.M. Georgiadis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3701–3704.
- [235] S.J. Wood, *Microchem. J.* 47 (1993) 330–337.
- [236] W. Wang, *Int. J. Electrochem. Sci.* 15 (2020) 4631–4639.
- [237] S. Shin Low, Y. Pan, D. Ji, Y. Li, Y. Lu, Y. He, Q. Chen, Q. Liu, *Sensors Actuators, B Chem.* 308 (2020) 127718.
- [238] M. Zouari, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, N. Raouafi, *Anal. Chim. Acta* 1104 (2020) 188–198.
- [239] R.M. Graybill, R.C. Bailey, *Anal. Chem.* 88 (2016) 431–450.
- [240] A.A. Ismail, F.R. van de Voort, J. Sedman, *Tech. Instrum. Anal. Chem.* 18 (1997) 93–139.
- [241] G. Greczynski, L. Hultman, *Prog. Mater. Sci.* 107 (2020) 100591.
- [242] G.S. Bumbrah, R.M. Sharma, *Egypt. J. Forensic Sci.* 6 (2016) 209–215.
- [243] J. Epp, in: *Mater. Charact. Using Nondestruct. Eval. Methods*, Woodhead Publishing, 2016, pp. 81–124.
- [244] M. Kannan, in: 2018, pp. 93–101.
- [245] C. Hu, X. Bai, Y. Wang, W. Jin, X. Zhang, S. Hu, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3745–

- 3750.
- [246] S. Kumar, J. Aaron, K. Sokolov, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 314–320.
- [247] X. Mao, Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, L. Zeng, G. Liu, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1660–1668.
- [248] K.R. Brown, L.A. Lyon, A.P. Fox, B.D. Reiss, M.J. Natan, *Chem. Mater.* 12 (2000) 314–323.
- [249] M.D. Musick, D.J. Peña, S.L. Botsko, T.M. McEvoy, J.N. Richardson, M.J. Natan, *Langmuir* 15 (1999) 844–849.
- [250] K.R. Brown, M.J. Natan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun* 14 (1996) 2881–2885.
- [251] B. S. Takale, M. Bao, Y. Yamamoto, in: *PATAI'S Chem. Funct. Groups*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014, pp. 1–52.
- [252] G. Dyker, W. Stirner, G. Henkel, M. Köckerling, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 7457–7458.
- [253] A.K.L. Teo, C. Le Lim, Z. Gao, *Electrochim. Acta* 126 (2014) 19–30.
- [254] E.A. Lusi, M. Passamano, P. Guarascio, A. Scarpa, L. Schiavo, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2819–2822.
- [255] Z. Gao, H. Deng, W. Shen, Y. Ren, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1624–1630.
- [256] Y. Ren, H. Deng, W. Shen, Z. Gao, *Anal. Chem.* 85 (2013) 4784–4789.
- [257] W. Shen, H. Deng, Y. Ren, Z. Gao, *Biosens. Bioelectron.* 44 (2013) 171–176.
- [258] M.J. Rosen, X.Y. Hua, *J. Colloid Interface Sci.* 139 (1990) 397–407.
- [259] A.M. Zaitsev, A.M. Zaitsev, in: *Opt. Prop. Diam.*, Springer Berlin Heidelberg, 2001, pp. 19–68.
- [260] J.L. Warren, J.L. Yarnell, G. Dolling, R.A. Cowley, *Phys. Rev.* 158 (1967) 805–808.
- [261] P. Bou, *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 2991.
- [262] J.L. Yarnell, J.L. Warren, R.G. Wenzel, *Phys. Rev. Lett.* 13 (1964) 13–15.
- [263] M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, in: 1982, pp. 3–57.
- [264] J.C.A. and P.K. Robert E. Clausing, Linda L. Horton, *Diamond and Diamond-like Carbon Films and Coatings*, 1991.
- [265] A.M. Zaitsev, *Optical Properties of Diamond: A Data Handbook*, Springer, 2001.
- [266] R.P. Mildren, in: R.P. Mildren, Rabeau James R (Eds.), *Opt. Eng. Diam.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013, pp. 1–34.
- [267] P. Couderc, Y. Catherine, *Thin Solid Films* 146 (1987) 93–107.
- [268] F. Zhao, A. Afandi, R.B. Jackman, *Appl. Phys. Lett.* 106 (2015) 102108.
- [269] W. Zhuang, H. Li, W. Li, X. Fan, J. He, Z. Cai, W. Fu, G. Zhang, S. Wan, M. Zhu, *Appl. Surf. Sci.* 478 (2019) 661–679.
- [270] M. Panda, G. Mangamma, R. Krishnan, K.K. Madapu, D.N.G. Krishna, S. Dash, A.K. Tyagi, *RSC Adv.* 6 (2016) 6016–6028.
- [271] X. Yue, S. Huang, Y. Jin, P.K. Shen, *Catal. Sci. Technol.* 7 (2017) 2228–2235.

- [272] M. Panda, R. Krishnan, N.G. Krishna, S. Amirthapandian, P. Magudapathy, M. Kamruddin, *Ceram. Int.* 45 (2019) 8847–8855.
- [273] N. Triroj, R. Saensak, S. Porntheeraphat, B. Paosawatyanong, V. Amornkitbamrung, *Anal. Chem.* 92 (2020) 3650–3657.
- [274] A.J. Young, M. Sauer, G.M.D.M. Rubio, A. Sato, A. Foelske, C.J. Serpell, J.M. Chin, M.R. Reithofer, *Nanoscale* 11 (2019) 8327–8333.
- [275] A.C. Ferrari, J. Robertson, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 362 (2004) 2477–2512.
- [276] A. Ferrari, J. Robertson, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 61 (2000) 14095–14107.
- [277] J. Robertson, *Mater. Sci. Eng. R Reports* 37 (2002) 129–281.
- [278] D.S. Knight, W.B. White, *J. Mater. Res.* 4 (1989) 385–393.
- [279] R. Diamant, E. Jimenez, E. Haro-Poniatowski, L. Ponce, M. Fernandez-Guasti, J.C. Alonso, *Diam. Relat. Mater.* 8 (1999) 1277–1284.
- [280] G. Nurk, J. Eskusson, R. Jaaniso, E. Lust, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 421–434.
- [281] A. Singha, A. Ghosh, A. Roy, N.R. Ray, *J. Appl. Phys.* 100 (2006) 044910.
- [282] J. Fayos, *J. Solid State Chem.* 148 (1999) 278–285.
- [283] S. Drewniak, R. Muzyka, A. Stolarczyk, T. Pustelny, M. Kotyczka-Morańska, M. Setkiewicz, *Sensors (Switzerland)* 16 (2016) 103.
- [284] A. Grill, *Thin Solid Films* 355 (1999) 189–193.
- [285] M.I. Khan, M. Sabir, *Mater. Res. Express* 6 (2019).
- [286] F.M. Wang, M.W. Chen, Q.B. Lai, *Thin Solid Films* 518 (2010) 3332–3336.
- [287] K.A. Khan, M.I. Khan, *Mater. Res. Express* 6 (2019).
- [288] S. Flege, R. Hatada, M. Hoefling, A. Hanauer, A. Abel, K. Baba, W. Ensinger, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 365 (2015) 357–361.
- [289] N. Triroj, R. Saensak, S. Porntheeraphat, B. Paosawatyanong, V. Amornkitbamrung, *Anal. Chem.* 92 (2020) 3650–3657.
- [290] R. Dey, S. Dolai, S. Hussain, R. Bhar, A.K. Pal, *Diam. Relat. Mater.* 82 (2018) 70–78.
- [291] S. Nakao, T. Kimura, T. Suyama, K. Azuma, *Diam. Relat. Mater.* 77 (2017) 122–130.
- [292] M. Tsuchiya, K. Murakami, K. Magara, K. Nakamura, H. Ohashi, K. Tokuda, T. Takami, H. Ogasawara, Y. Enta, Y. Suzuki, S. Ando, H. Nakazawa, *Jpn. J. Appl. Phys.* 55 (2016) 065502.
- [293] Y.H. Lin, H. Da Lin, C.K. Liu, M.W. Huang, Y.C. Chen, J.R. Chen, H.C. Shih, *Thin Solid Films* 518 (2009) 1503–1507.
- [294] Y.J. Jo, T.F. Zhang, M.J. Son, K.H. Kim, *Appl. Surf. Sci.* 433 (2018) 1184–1191.
- [295] H. Yin, Y. Zhou, H. Zhang, X. Meng, S. Ai, *Biosens. Bioelectron.* 33 (2012) 247–

253.

- [296] M. Cho, S. Lee, S.Y. Han, J.Y. Park, M.A. Rahman, Y.B. Shim, C. Ban, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e75–e75.
- [297] S. Han, W. Liu, S. Yang, R. Wang, *ACS Omega* 4 (2019) 11025–11031.
- [298] H. Zhang, M. Fan, J. Jiang, Q. Shen, C. Cai, J. Shen, *Anal. Chim. Acta* 1064 (2019) 33–39.
- [299] A. Cui, J. Zhang, W. Bai, H. Sun, L. Bao, F. Ma, Y. Li, *Biosens. Bioelectron.* 144 (2019) 111664.
- [300] L. Tian, K. Qian, J. Qi, Q. Liu, C. Yao, W. Song, Y. Wang, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 564–570.
- [301] Y.T. Yaman, O.A. Vural, G. Bolat, S. Abaci, *Sensors Actuators, B Chem.* 320 (2020) 128343.
- [302] Y. Song, T. Xu, L.P. Xu, X. Zhang, *Chem. Commun.* 55 (2019) 1742–1745.
- [303] S. Han, W. Liu, S. Yang, R. Wang, *ACS Omega* 4 (2019) 11025–11031.
- [304] A. Bharti, N. Agnihotri, N. Prabhakar, *Microchim. Acta* 186 (2019) 1–11.
- [305] M. Kamal Masud, M.N. Islam, M.H. Haque, S. Tanaka, V. Gopalan, G. Alici, N.T. Nguyen, A.K. Lam, M.S.A. Hossain, Y. Yamauchi, M.J.A. Shiddiky, *Chem. Commun.* 53 (2017) 8231–8234.
- [306] H.V. Tran, N.D. Nguyen, B. Piro, L.T. Tran, *Anal. Methods* 9 (2017) 2696–2702.
- [307] M. Azimzadeh, N. Nasirizadeh, M. Rahaie, H. Naderi-Manesh, *RSC Adv.* 7 (2017) 55709–55719.
- [308] M. Wang, W. Chen, L. Tang, R. Yan, P. Miao, *Anal. Chim. Acta* 1107 (2020) 23–29.
- [309] P. Fu, S. Xing, M. Xu, Y. Zhao, C. Zhao, *Sensors Actuators, B Chem.* 305 (2020) 127545.
- [310] M. Zouari, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, N. Raouafi, *Microchim. Acta* 187 (2020) 1–11.
- [311] T. Meng, D. Zhao, H. Ye, Y. Feng, H. Wang, Y. Zhang, *J. Colloid Interface Sci.* 578 (2020) 164–170.
- [312] R. Ren, Q. Bi, R. Yuan, Y. Xiang, *Sensors Actuators, B Chem.* 304 (2020) 127068.
- [313] L. Zhou, Y. Wang, C. Yang, H. Xu, J. Luo, W. Zhang, X. Tang, S. Yang, W. Fu, K. Chang, M. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 657–663.
- [314] M. Liang, M. Pan, J. Hu, F. Wang, X. Liu, *ChemElectroChem* 5 (2018) 1380–1386.
- [315] D. Zhu, W. Liu, D. Zhao, Q. Hao, J. Li, J. Huang, J. Shi, J. Chao, S. Su, L. Wang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 35597–35603.
- [316] J. Mandli, H. Mohammadi, A. Amine, *Bioelectrochemistry* 116 (2017) 17–23.
- [317] J. Hu, J. Hu, Z. Li, H. Zhang, R. Liu, Y. Lv, *Anal. Chem.* 92 (2020) 8523–8529.
- [318] M.L. Mujica, Y. Zhang, F. Bédioui, F. Gutiérrez, G. Rivas, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 3539–3546.

- [319] J.A. Ribeiro, M.G.F. Sales, C.M. Pereira, *Sensors Actuators, B Chem.* 316 (2020) 128129.
- [320] T. Fan, Y. Mao, F. Liu, W. Zhang, J.S. Lin, J. Yin, Y. Tan, X. Huang, Y. Jiang, *Talanta* 200 (2019) 480–486.
- [321] W.H. Kim, J.U. Lee, S. Song, S. Kim, Y.J. Choi, S.J. Sim, *Analyst* 144 (2019) 1768–1776.
- [322] X. Miao, Z. Cheng, H. Ma, Z. Li, N. Xue, P. Wang, *Anal. Chem.* 90 (2018) 1098–1103.
- [323] Y.S. Borghei, M. Hosseini, M.R. Ganjali, H. Ju, *Microchim. Acta* 185 (2018) 1–9.
- [324] D. Ma, C. Huang, J. Zheng, J. Tang, J. Li, J. Yang, R. Yang, *Biosens. Bioelectron.* 101 (2018) 167–173.
- [325] H. Kim, S. Kang, K.S. Park, H.G. Park, *Sensors Actuators, B Chem.* 260 (2018) 140–145.
- [326] F. Xu, L. Luo, H. Shi, X. He, Y. Lei, J. Tang, D. He, Z. Qiao, K. Wang, *Anal. Chim. Acta* 1010 (2018) 54–61.
- [327] K. Hao, Y. He, H. Lu, S. Pu, Y. Zhang, H. Dong, X. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 954 (2017) 114–120.
- [328] Q. Li, Q. Wang, X. Yang, K. Wang, H. Zhang, W. Nie, *Talanta* 174 (2017) 521–526.
- [329] K. Zhang, K. Wang, X. Zhu, F. Xu, M. Xie, *Biosens. Bioelectron.* 87 (2017) 358–364.
- [330] A. Movahedpour, N. Ahmadi, Y. Ghasemi, A. Savardashtaki, Z. Shabaninejad, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 16316–16329.
- [331] L. Jamali, R. Tofigh, S. Tutunchi, G. Panahi, F. Borhani, S. Akhavan, P. Nourmohammadi, S.M.H. Ghaderian, M. Rasouli, H. Mirzaei, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 8538–8550.
- [332] E.K.O. Ng, R. Li, V.Y. Shin, H.C. Jin, C.P.H. Leung, E.S.K. Ma, R. Pang, D. Chua, K.M. Chu, W.L. Law, S.Y.K. Law, R.T.P. Poon, A. Kwong, *PLoS One* 8 (2013) e53141.
- [333] Y. Jin, Y.S. Wong, B.K.P. Goh, C.Y. Chan, P.C. Cheow, P.K.H. Chow, T.K.H. Lim, G.B.B. Goh, T.L. Krishnamoorthy, R. Kumar, T.P. Ng, S.S. Chong, H.H. Tan, A.Y.F. Chung, L.L.P.J. Ooi, J.P.E. Chang, C.K. Tan, C.G.L. Lee, *Sci. Rep.* 9 (2019).
- [334] M. Valladares-Ayerbes, M. Reboredo, V. Medina-Villaamil, P. Iglesias-Díaz, M.J. Lorenzo-Patiño, M. Haz, I. Santamarina, M. Blanco, J. Fernández-Tajes, M. Quindós, A. Carral, A. Figueroa, L.M. Antón-Aparicio, L. Calvo, *J. Transl. Med.* 10 (2012) 186.
- [335] K. Tanaka, H. Miyata, M. Yamasaki, K. Sugimura, S. Takahashi, Y. Kurokawa, K. Nakajima, S. Takiguchi, M. Mori, Y. Doki, *Ann. Surg. Oncol.* 20 (2013) 607–615.
- [336] W.H. yu. Paik, B.J. u. Song, H.W. o. Kim, H.R. e. Kim, J.H. yeo. Hwang, *Korean J. Gastroenterol.* 66 (2015) 215–220.

- [337] R. Shi, H. Xiao, T. Yang, L. Chang, Y. Tian, B. Wu, H. Xu, *Front. Med.* 8 (2014) 456–463.
- [338] J. V. Carter, S.J. O'Brien, J.F. Burton, B.G. Oxford, V. Stephen, J. Hallion, C. Bishop, N.J. Galbraith, M.R. Eichenberger, H. Sarojini, E. Hattab, S. Galandiuk, *Oncol. Lett.* 18 (2019) 3994–4007.
- [339] L.L. Aylward, in: J. Nriagu (Ed.), *Encycl. Environ. Heal.*, Second Edi, Elsevier, Oxford, 2019, pp. 376–385.
- [340] X. Wu, Y. Chai, P. Zhang, R. Yuan, *Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 713–720.
- [341] C. Yang, K. Shi, B. Dou, Y. Xiang, Y. Chai, R. Yuan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 1188–1193.

EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : SOHEIL MALEKGHASEMİ
Doğum yeri : IRAN-TEBRİZ
Doğum tarihi : 1983
Medeni hali :
Yazışma adresi :
Telefon :
Elektronik posta adresi :
Yabancı dili

EĞİTİM DURUMU

Lisans : İslami Azad Üniversitesi, Matematik Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyomühendislik ABD

YAYINLAR

- 1- Aygun Yusifova¹, Murat Ilhan Atagun, Nagihan Ugurlu, **Soheil Malekghasemi**, Almila Senat, Cemal Demirlek, Özcan Erel. “Retinal fundus imaging in bipolar disorder: a pilot study,” Psychiatry and Clinical Neurosciences (2020).
- 2- Zehra Yazar Aydın, **Soheil Malekghasemi**, and Serdar Abaci. “Underpotential co-deposition of ternary Cu-Te-Se semiconductor nanofilm on both flexible and rigid substrates,” Applied Surface Science 470 (2019): 658-667.
- 3- Oznur Akbal, Tayfun Vural, **Soheil Malekghasemi**, Betül Bozdoğan and Emir Baki Denkbas, “Saponin loaded montmorillonite-human serum albumin nanocomposites as drug delivery system in colorectal cancer therapy,” Applied Clay Science 166 (2018): 214-222.

4- Soheil Malekghasemi, Enver Kahveci, and Memed Duman, “Rapid and alternative fabrication method for microfluidic paper based analytical devices,” *Talanta*, 159 (2016) 401–411.

5- Didem Aksoy Körpe, **Soheil Malekghasemi**, Ugur Aydın, and Memed Duman, “Fabrication of monodispersive nanoscale alginate–chitosan core–shell particulate systems for controlled release studies,” *Journal of nanoparticle research* 16.12 (2014): 2754.

