



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BÜYÜME HORMONU TAYİNİNE YÖNELİK
YATAY AKIŞ İMMÜNOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Eda GÜMÜŞ

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

**Haziran- 2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Eda GÜMÜŞ tarafından hazırlanan “Büyüme Hormonu Tayinine Yönelik Yatay Akış İmmünoensör Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 26/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

.....

Danışman

Doç. Dr. Erhan ZOR

.....

Üye

Prof. Dr. Haluk BİNGÖL

.....

Üye

Prof. Dr. Mustafa ÖZMEN

.....

Üye

Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdagül KUMCU
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Eda GÜMÜŞ

Tarih:04/07/2024

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BÜYÜME HORMONU TAYİNİNE YÖNELİK YATAY AKIŞ İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Eda GÜMÜŞ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Erhan ZOR

2024, 111 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Erhan ZOR
Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ
Prof. Dr. Haluk BİNGÖL
Prof. Dr. Mustafa ÖZMEN
Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF

Teknolojinin gelişmesiyle biyosensörlerin son yıllardaki farklı alanda kullanımı çeşitlilik kazanmıştır. Verilere hızlı ve kolay ulaşmak amacıyla geliştirilen biyosensörlerin günlük hayatımızda kolaylıklar sağladığı ortadadır. Biyosensör teknolojisi içerisinde karşımıza çıkan yatay akış immünoensörler (LFA) tıp, çevre, gıda, biyomedikal, eczacılık gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bu sistemlerin kullanılmasında kolay ulaşılabilir olmaları, uzman gerektirmemeleri ve maliyetlerinin düşük olması gibi sebepler etkilidir. Yatay akış testleri kısa sürede sonuç vermeleriyle, sağlık kuruluşuna başvurmadan, evde bakım hizmetleri diye adlandırılan ilk tanı aşamasında büyük katkılar sağlamaktadır. Yatay akış immünoensörlerle hormonların, proteinlerin, nükleik asitlerin ve daha birçok biyobelirtecin tayini yapılabilmektedir. Bu tez çalışmasında insan hayatında büyüme ve gelişmede önemli metabolik faaliyetlerde rol oynayan büyüme hormonunun tayinine yönelik yatay akış immünoensör geliştirilmiştir. 191 amino asitten oluşan bir peptid olan büyüme hormonunun kandaki değerinin takibi çocukluk ve yetişkinlikte oldukça önemlidir. Büyüme hormonunun insan vücudunda az veya çok salgılanması cücelik, devlik, akromegali gibi hastalıkları beraberinde getirmektedir. Bu yüzden büyüme hormonunun kandaki miktarının teşhisi ve takibinin yapılabilmesi amacıyla LFA test kiti elde edilmiştir. Yapılan çalışmada LFA sisteminin temel bileşenleri olan membran, numune pedi ve konjugasyon pedinin optimizasyonları yapılmıştır. Elde edilen sensörle büyüme hormonuna yönelik kalitatif ve kantitatif tayin yapılmıştır. Tasarlanan sensörün büyüme hormonu için LOD değeri 8,38 ng/mL ve LOQ değeri 25,40 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra geliştirilen sensörün hassasiyet değeri 5,37 mV/ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Geliştirilen LFA sisteminin kısa (2 saat, 24 saat) ve uzun dönem (6 ay) kararlılık çalışmalarında test cevabının 6 ay sonunda bile stabil kaldığı gözlenmiştir. Geliştirilen LFA test kitinin bu alanda standart metot olarak kabul edilen ELISA yöntemiyle doğrulama testi yapılmıştır. Ticari yapay serum örneklerinde gerçekleştirilen ELISA yöntemiyle elde edilen geri kazanım değerleri %77,19 - %100,20 arasında bulunurken, LFA doğrulama testlerinde ise bu değer %79,00 - %109,34 aralığında bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen LFA sisteminin büyüme hormonunun kalitatif tayininin yanı sıra kantitatif analizi için de kullanılabilceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Akromegali, Biyobelirteç, Büyüme hormonu, Kağıt tabanlı sensörler, Yatay akış testleri

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DEVELOPMENT OF LATERAL FLOW IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF GROWTH HORMONE

Eda GÜMÜŞ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN CHEMISTRY

Advisor: Associate Professor Erhan ZOR

2024, 111 Pages

Jury

Associate Prof. Dr. Erhan ZOR
Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ
Prof. Dr. Haluk BİNGÖL
Prof. Dr. Mustafa ÖZMEN
Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF

The use of biosensors in different areas has diversified in recent years with the development of technology. It is obvious that biosensors developed to access data quickly and easily provide convenience in our daily life. Lateral flow immunosensors (LFA), which we encounter within biosensor technology, are used in many areas such as medicine, environment, food, biomedical and pharmacy. The reasons for using these systems are that they are easily accessible, do not require an expert, and are low in cost. Lateral flow tests provide results in a short time and make great contributions to the initial diagnosis phase, called home care services, without resorting to a healthcare institution. Hormones, proteins, nucleic acids and many other biomarkers can be determined with LFA. In this thesis, a lateral flow immunosensor was developed for the determination of growth hormone, which plays an important role in metabolic activities in human growth and development. Monitoring the blood level of growth hormone, a peptide consisting of 191 amino acids, is very important in childhood and adulthood. Too much or too little secretion of growth hormone in the human body causes diseases such as dwarfism, gigantism and acromegaly. Therefore, an LFA test kit was obtained to determine and monitor the amount of growth hormone in the blood. In the study, optimizations were made on the membrane, sample pad and conjugation pad, which are the basic components of the LFA system. Qualitative and quantitative determination of growth hormone was made with the obtained sensor. The LOD value of the designed sensor for growth hormone was calculated as 8.38 ng/mL and the LOQ value was 25.40 ng/mL. In addition, the sensitivity value of the developed sensor was found to be 5.37 mV/ng mL⁻¹. In short (2 hours, 24 hours) and long term (6 months) stability studies of the developed LFA system, it was observed that the test response remained stable even after 6 months. The developed LFA test kit was tested for verification using the ELISA method, which is considered the standard method in this field. While the recovery values obtained by the ELISA method performed on commercial artificial serum samples were found to be between 77.19% and 100.20%, this value was found to be between 79.00% and 109.34% in the LFA verification tests. These results showed that the developed LFA system can be used for quantitative as well as qualitative determination of growth hormone.

Keywords: Acromegaly, Biomarker, Growth hormone, Paper-based sensors, Lateral flow tests

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, bu zorlu süreçte desteğini her daim yanımda hissettiğim, akademik gelişme sürecimde karşılaştığım tüm sorunlarda her zaman engin tecrübeleriyle yolumu aydınlatan saygı ve sevgi duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Erhan ZOR'a teşekkürü bir borç bilirim. Bu akademik süreçte kıymetli tecrübelerini, bilgi birikimini benimle paylaşan akademik olarak edindiğim tecrübelerde büyük katkısı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Haluk BİNGÖL'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ hocama değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca tez savunma sınavı jürisi hocalarım Prof. Dr. Ahmet Özgür SAF ve Prof. Dr. Mustafa ÖZMEN hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora sürecinde mesai arkadaşlığı yaptığım ve desteklerini her daim yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Tuğba Selcen ATALAY KALSEN'e ve Öğr. Gör. Fuat ASLAN'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (2217MER03004) tarafından kısmen desteklenmiştir. Desteğinden dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora sürecinde de yanımda olup, desteklerini sonsuz hissettiğim, canım anneme, babama, ablama, enişteme ve biricik yeğenlerim Defne ve Çınar'a çok teşekkür ederim.

Eda GÜMÜŞ
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	2
1.1.1. Kağıt Tabanlı Biyosensörler	3
1.1.2. Yatay Akış Testlerinin Tayin Yöntemleri	9
1.1.3. LFA Sisteminin Avantaj ve Dezavantajları	11
1.2. Büyüme Hormonu (BH)	12
1.2.1. BH Düzensizliğinin Neden Olduğu Hastalıklar.....	14
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.2. Kullanılan Cihazlar	24
3.3. Nanopartikül (AuNP) Sentezi	25
3.4. Numune Pedi Yıkanması	26
3.5. Konjugasyon Basamağı	27
3.6. ELISA Testi	28
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Nanopartikül (AuNP) Karakterizasyonu	30
4.1.1. FESEM Görüntüleme	30
4.1.2. Nanopartikül Boyutu Ölçümü.....	32
4.1.3. Spektrofotometrik Ölçümler	33
4.2. Numune Pedi Karakterizasyonu	34
4.3. Konjugasyon Pedi Karakterizasyonu	36
4.4. Membran Karakterizasyonu	40
4.5. LFA Sisteminde Yatak Hacmi (Boşluk/Ölü Hacim) Hesaplaması.....	41
4.6. Numune Pedi, Cam Elyaf ve Membran Optimizasyonu.....	42
4.6.1. Tampon Çözeltisindeki Sükroz Optimizasyonu	44
4.6.2. Membran Optimizasyonu	45

4.7. Kalitatif Tayin Çalışmaları	49
4.7.1. Kontrol Çizgisi Optimizasyonu	50
4.7.2. Numune Padi, Cam Elyaf ve Membran Optimizasyonun Test ve Kontrol Çizgilerine Etkisi	56
4.7.3. Topaklanma (agregasyon) testi	61
4.7.4. pH'ın Kalitatif Tayine Etkisi	68
4.7.5. Antikorun Kalitatif Tayine Etkisi	70
4.8. Kantitatif Tayin Çalışmaları	72
4.8.1. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı Değeri (TAS, LOQ)	75
4.8.2. ELISA Testi Sonuçları	77
4.8.3. Kararlılık Çalışmaları	79
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
5.1. Sonuçlar	81
5.2. Öneriler	83
6. KAYNAKLAR	85
EKLER	94

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

σ	Standart sapma
m	Kalibrasyon eğrisinin eğimi
λ	Dalgaboyu

Kısaltmalar

PAD	Kağıt tabanlı analitik cihaz (Paper-based analytical device)
POC	Yerinde tanı teknolojileri, (point-of-care)
BH	Büyüme hormonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
μ PAD	Mikroakışkan biyosensörleri
LFA	Yatay akış testleri
SERS	Yüzeyi Geliştirilmiş Raman spektroskopisi
GHRH	Büyüme hormonu salgılayan hormon
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
ITT	İnsülin Tolerans Testi
GTT	Glikoz Tolerans Testi
SPCE	Ekran baskılı karbon elektrotları
LOD, TS	Teşhis Sınırı
GCE	Camsı karbon elektrot
HBH	İnsan büyüme hormonu
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
SPRi	Yüzey plazmon rezonans görüntüleme
PTH LH	Paratiroid hormon benzeri hormon
AuNP	Altın nanopartikül
BSA	Bovine serum albümin
BİTAM	Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
FESEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
STEM	Taramalı geçirimli elektron mikroskobu
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	Phosphate Buffer Saline + Tween-20)
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektrometresi
m-BH	Monoklonal anti-büyüme hormon antikoru
p-BH	Poliklonal anti-büyüme hormon antikoru
LOQ,TAS	Tayin Alt Sınırı Değeri
BSS	Bağıl standart sapma (Relative standard deviation)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Biyosensörün genel yapısı ve çalışma prensibi (Srinivasan & Tung, 2015)....	3
Şekil 1.2. Kağıt tabanlı biyosensörler (Hoang vd., 2021)	4
Şekil 1.3. μ PAD'in şematik gösterimi (Li vd., 2016; Sriram vd., 2017)	5
Şekil 1.4. Genel bir yatay akış testi ve temel bileşenleri (Nuntawong vd., 2022).....	6
Şekil 1.5. Sandwich tip LFA sistemlerinin genel yapısı (Quesada-González & Merkoçi, 2015).....	8
Şekil 1.6. Yarışmalı tip LFA sistemlerinin genel yapısı (Quesada-González & Merkoçi, 2015).....	9
Şekil 1.7. 2010-2019 yılları arasındaki LFA tespit yöntemlerinin genel dağılımı (Di Nardo vd., 2021)	11
Şekil 1.8. LFA sistemlerinin avantaj ve dezavantajları (Kaya vd., 2014; Torul, 2016). 12	
Şekil 1.9. BH'nin salgılanmasının genel mekanizması ve biyokimyasal fonksiyonları (C.Guyton, 2017)	13
Şekil 1.10. BH miktarı anomali hastalıkları a) Cücelik (Dwarfizm) ve Devlik (Gigantizm) Hastalığı (Web_Sayfası, 2018) b) Akromegali Vakası (Krug vd., 2016) c) Akromegali Vakası (Hao Liu vd., 2018) d) Akromegali Vakası (Ong & Sy, 2017) e) Akromegali Vakası (Abdullah vd., 2017).....	16
Şekil 1.11. BH düzensizliklerinde a) ITT testi ve b) GTT testi akış şemaları (Aldallal, 2018; Polidori vd., 2020)	17
Şekil 2.1. Sıçan büyüme hormonunun impedimetrik tespitinin kavramsal gösterimi ve elektrokimyasal.....	19
Şekil 2.2.a) BH konsantrasyonuna karşı 450 nm'deki absorbanslar, b) BH tespiti için geliştirilmiş sandviç tip manyeto-immünoanaliz sisteminin doğrusal aralığı (Ramanaviciene vd., 2022)	20
Şekil 2.3. Rekombinant BH'nin tespitinin şematik gösterimi SPRi ve Nano-SPRi (Vance vd., 2016)	21
Şekil 2.4. a) Serum TSH konsantrasyonunun belirlenmesi için kalibrasyon grafiği, b) LFA test şeritlerinin fotoğrafı (Znoyko vd., 2020).....	22
Şekil 2.5. LC tabanlı biyosensörün IGF-I tespitinin şematik gösterimi, Cam yüzeyi modifikasyonunun aşamaları a) Piranha çözeltisi, b) DMOAP, c) APTES/DMOAP karışımı, d) GA/APTES/DMOAP karışımı, e) Ab_{IGF-I} , f) Ag_{IGF-I} siz hazırlanmış hücrenin şeması ve polarize optik mikroskop görüntüsü, g) Ag_{IGF-I} li hazırlanmış bir hücrenin şeması ve polarize optik mikroskop görüntüsü (J. Chen vd., 2022).....	23
Şekil 3.1. AuNP sentezine ait sentez sırasında gözlenen renk dönüşümleri	26
Şekil 3.2. Numune pedinin yıkanmasına ait işlem basamakları	27
Şekil 3.3. Antikor- AuNP konjugasyon aşamaları	27
Şekil 3.4. ELISA testi basamakları.....	28
Şekil 4.1. a-c) 0,15 mM $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ile elde edilen AuNP'ye ait STEM görüntüleri sırasıyla 200kx, 500kx ve 1000kx, d-f) 0,30 mM $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ile elde edilen AuNP'ye ait STEM görüntüleri sırasıyla 200kx, 500kx ve 1000kx.....	30
Şekil 4.2. 0,15 mM $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ile elde edilen AuNP'ye ait boyut dağılım grafiği... 31	
Şekil 4.3. 0,30 mM $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ile elde edilen AuNP'ye ait boyut dağılım grafiği... 31	
Şekil 4.4. 0,15 mM $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ile elde edilen AuNP'lerin normalleştirilmiş yoğunluk dağılımına ait grafik.....	32
Şekil 4.5. 0,15 mM $HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ile elde edilen AuNP'lerin kümülatif yoğunluk dağılımına ait grafik.....	33

Şekil 4.6. 0,15 mM H _{AuCl₄} H ₂ O ile elde edilen AuNP sulu çözeltisinin UV-Vis spektrumu.....	34
Şekil 4.7. 0,30 mM H _{AuCl₄} H ₂ O ile elde edilen AuNP sulu çözeltisinin UV-Vis spektrumu.....	34
Şekil 4.8. Yıkanmamış numune pedine ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx.....	35
Şekil 4.9. Yıkanmış numune pedine ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx.....	35
Şekil 4.10. Yıkanmamış cam elyafa ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx.....	36
Şekil 4.11. Yıkanmış cam elyafa ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx.....	37
Şekil 4.12. Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafa ait FESEM görüntüleri, a) 10kx, b) 20kx, c) 50kx, d) 100kx.....	37
Şekil 4.13. a., c.-j) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafa ait EDX haritalandırması, b) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafa ait EDX dağılım spektrumu.....	38
Şekil 4.14. Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafın yürütme sonrası FESEM görüntüleri, a) 10kx, b) 20kx, c) 50kx, d) 100kx.....	39
Şekil 4.15. a), c.-j) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafın yürütme sonrası EDX haritalandırması b) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafın yürütme sonrası EDX dağılım spektrumu.....	40
Şekil 4.16. a) Boş membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, a') Boş membrana ait enine kesit görüntüsü, b) %0,5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, b') %0,5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, c) %1 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, c') %1 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, d) %2 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, d') %2 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, e) %3 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, e') %3 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, f) %4 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, f') %4 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, g) %5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, g') %5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü.....	41
Şekil 4.17. İmmünotampon çözeltisi ile yıkamanın numune pedi ve cam elyaf üzerine etkisi,.....	44
Şekil 4.18. Tampon çözeltisindeki sükröz ve membran optimizasyonu denemeleri, a) %5 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, b) %5 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran, c) %10 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, d) %10 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran, e) %15 sükröz borat tamponu yıkanmamış membran, f) %15 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran, g) %20 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, h) %20 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran.....	45
Şekil 4.19. Membran denemeleri a) Saf su ile yıkanmış membran, b) PBS ile yıkanmış membran, c) %1 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran d) %2 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran, e) %3 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran, f) %4 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran, g) %5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran.....	46

Şekil 4.20. %0,5 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20 ve e) %0,100 Tween-20	47
Şekil 4.21. %1 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20 ve e) %0,100 Tween-20	47
Şekil 4.22. %2 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20 ve e) %0,100 Tween-20	48
Şekil 4.23. %3 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20, e) %0,100 Tween-20	48
Şekil 4.24. %4 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20, e) %0,100 Tween-20	48
Şekil 4.25. %5 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20, e) %0,100 Tween-20	49
Şekil 4.26. Genel LFA tasarımı	50
Şekil 4.27. Kontrol çizgisi optimizasyon çalışmaları (Etil alkol kullanımı öncesi)	50
Şekil 4.28. Kontrol çizgisi optimizasyon çalışmaları (Etil alkol kullanımı sonrası)	51
Şekil 4.29. Farklı yazdırma parametreleri kullanılarak elde edilen kontrol çizgileri	52
Şekil 4.30. Kontrol çizgisi optimizasyonunda farklı parametrelerde yazdırma çeşitlerine karşı elde edilen kolorimetrik okuyucu ile ölçülen sinyal şiddetleri	53
Şekil 4.31. Farklı tampon ve farklı konjugasyon çözeltileri kullanılarak elde edilen kontrol çizgileri	54
Şekil 4.32. Kontrol çizgisi optimizasyonunda kontrol çizgisi ve konjugasyonunda uygulanan farklı parametrelerin kolorimetrik okuyucu ile ölçülen sinyal şiddeti	54
Şekil 4.33. Farklı kontrol çizgisi çalışmaları (Tween-20 kullanımı)	55
Şekil 4.34. Farklı kontrol çizgisi çalışmaları (Triton X-100 kullanımı)	56
Şekil 4.35. Yıkanmış membran, yıkanmamış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'larda PBS, 100 ng/mL ve 300 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri	57
Şekil 4.36. Yıkanmamış membran, yıkanmış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'larda saf su, PBS, 10 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri	59
Şekil 4.37. Yıkanmamış membran ve yıkanmamış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'da 100 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri	59
Şekil 4.38. Yıkanmış membran, yıkanmış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'larda 100 ng/mL BH ve PBS çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri	60
Şekil 4.39. Altın agregasyon testi. Farklı derişimlerde hazırlanan (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL) poliklonal anti-BH antikoruna içeren çözeltilere ait görüntüler	61
Şekil 4.40. Altın agregasyon testi. Farklı derişimlerde hazırlanan (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL) poliklonal anti-BH antikoruna içeren çözeltilere %10'luk NaCl eklenmesi sonrası meydana gelen derişimlere ait görüntüler	62
Şekil 4.41. Saf AuNP, 0 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerinin ve 0 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	63
Şekil 4.42. Saf AuNP, 10 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerinin ve 10 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	63
Şekil 4.43. Saf AuNP, 25 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerinin ve 25 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	64
Şekil 4.44. Saf AuNP, 50 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerinin ve 50 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	64

Şekil 4.45. Saf AuNP, 100 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 100 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	65
Şekil 4.46. Saf AuNP, 150 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 150 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	65
Şekil 4.47. Saf AuNP, 200 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 200 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri	66
Şekil 4.48. Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltilerinin UV ölçümleri (EK 2’de verilmiştir)	66
Şekil 4.49. Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi ilavesi sonrası elde edilen UV ölçümleri (EK 3’te verilmiştir).....	67
Şekil 4.50. Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltileri ve NaCl çözeltisi ilavesi sonrası elde edilen tüm çözeltilerin UV ölçümleri (EK 4’te verilmiştir)	67
Şekil 4.51. 530 nm’deki absorbans değerinin 580 nm’deki absorbans değerinden çıkarılmasıyla elde edilen çubuk grafikler (Ambrosi vd., 2009; Parolo vd., 2020).....	68
Şekil 4.52. 1. ve 2. konjugasyonda 100 ng/mL BH çözeltisini yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri.....	69
Şekil 4.53. Farklı pH değerlerinde (pH 6,0; 7,0; 7,4; 8,0) BH’nin yürütülmesi sonucu elde edilen LFA’lar	70
Şekil 4.54. Yıkanmış membran ve yıkanmış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA’da 100 ng/mL BH yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri (Konjugasyonda farklı analit kullanılan LFA sistemi).....	71
Şekil 4.55. 100 ng/mL BH ile elde edilen test ve kontrol çizgileri	72
Şekil 4.56. Elde edilen LFA’larda sırasıyla soldan sağa; PBS, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL 100 ng/mL ve 300 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri.....	73
Şekil 4.57. Kolorimetrik okuyucuya ait yazılımın ekran görüntüsü.....	74
Şekil 4.58. Farklı konsantrasyonlarda (0 ng/mL (PBS), 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) değerlerinde hazırlanan BH çözeltilerinin kolorimetrik okuyucu ile elde edilen test ve kontrol çizgilerine ait sinyal şiddetlerinin ekran görüntülerinin grafik gösterimi	74
Şekil 4.59. Farklı BH konsantrasyonlarında (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) test çizgisinde elde edilen sinyal şiddetleri	75
Şekil 4.60. Farklı konsantrasyonlarda (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) BH çözeltisi ile yürütülen LFA'ların kolorimetrik okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddetindeki değişim.....	76
Şekil 4.61. Farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 ng/mL) büyüme hormonu çözeltisi ile yürütülen LFA'ların kolorimetrik okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddetindeki elde edilen lineer eğri ve denklemi	76
Şekil 4.62. ELISA standart kalibrasyon grafiği ve denklemi	77
Şekil 4.63. BH-LFA konsantrasyon grafiği.....	78
Şekil 4.64. ELISA standart kalibrasyon grafiği (0 ng/mL, 0,312 ng/mL 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL) ve BH-LFA konsantrasyon (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL 100 ng/mL) grafiği.....	78
Şekil 4.65. Lineer çalışma aralığında belirlenen konsantrasyon değerinde (100 ng/mL) kısa ve uzun dönem kararlık çalışmalarında elde edilen LFA'lara ait görüntüler, a) Kısa dönem (2saat), b) Kısa dönem (24 saat), c) Uzun dönem (6 ay).....	80

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1. Kontrol çizgisi miktarları (Etil alkol kullanımı öncesi)	50
Çizelge 4.2. Kontrol çizgisi miktarları (Etil alkol kullanımı sonrası)	51
Çizelge 4.3. Farklı yazdırma parametrelerinde kullanılan kontrol çizgisi miktarları.....	52
Çizelge 4.4. Tampon çözeltisi denemelerinde kullanılan test ve kontrol çizgileri.....	53
Çizelge 4.5. Tampon çözeltisi denemelerinde kullanılan konjugasyon miktarları.....	54
Çizelge 4.6. İmmünotamponla yıkamanın etkisinde kullanılan konjugasyon miktarları.....	56
Çizelge 4.7. Test ve kontrol çizgisi miktarları.....	57
Çizelge 4.8. AuNP pH optimizasyonunda kullanılan konjugasyon miktarları.....	69
Çizelge 4.9. AuNP pH optimizasyonunda kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları.....	69
Çizelge 4.10. 4.6.5. Antikorun kalitatif tayine etkisinde kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları.....	71
Çizelge 4.11. Kalitatif tayin için kullanılan konjugasyon miktarları	72
Çizelge 4.12. Kalitatif tayin için kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları.....	72
Çizelge 4.13. Kantitatif tayinde kullanılan konjugasyon miktarları.....	73
Çizelge 4.14. Kantitatif tayinde kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları.....	73
Çizelge 4.15. Geliştirilen BH-LFA'da farklı konsantrasyonlarda yapılan yürütmeler sonucu elde edilen geri kazanım değerleri.....	79
Çizelge 4.16. Farklı konsantrasyonlardaki BH'nin ELISA testi ile elde edilen geri kazanım değerleri.....	79
Çizelge 4.17. BH tayinine yönelik geliştirilen LFA test kitinin kısa dönem kararlılık sonuçları.....	80
Çizelge 4.18. BH tayinine yönelik geliştirilen LFA test kitinin uzun dönem kararlılık sonuçları.....	80

1. GİRİŞ

Son yıllarda özellikle nanoteknolojideki gelişmelerden dolayı, "hasta yanı tanı (Point-of-Care: POC)" kitlerinin bir grubunu oluşturan kağıt tabanlı analitik aygıt (paper-based analytical device, PAD) çalışmalarına ilişkin çalışmalarda hızlı bir artış kaydedilmiştir. POC tanı kitlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. POC tanı kitleri standart testlere kıyasla daha hızlı, basit ve maliyeti düşüktür. Bu özelliklerinden dolayı sınırlı kaynaklara erişimi olan toplumlarda son derece kullanışlı bir niteliğe sahiptir (Hu vd., 2014; Ju vd., 2016). Optik değişime dayalı PAD sistemleri içerisinde yatay akış testleri (LFA) yaygın olarak kullanılmakta olup bu sisteme dayalı olarak geliştirilen tanı kitlerinin ticarileşme potansiyeli son derece yüksektir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA) gibi geleneksel yöntemlerle yapılan analizlere kıyasla POC tanı testlerinin çeşitli avantajları mevcuttur. Hasta başı tanı testleri kolay uygulamaları, küçük, taşınabilir, tek kullanımlık ve hızlı sonuç veren raporlama sistemine sahip olmalarının yanı sıra işlevlerini eğitilmiş kişiye ihtiyaç duymadan evde, hastane ya da ambulansla verebilen sistemler olmalarından dolayı da etkili tedavi için gerekli ön müdahaleyi sağlayabilme imkânı sunabilmektedir (Ding vd., 2015; Jung vd., 2015).

Çağımızın en gelişmiş teknolojik ve bilimsel kaynaklarından yararlanarak, hastalığı daha ortaya çıkmadan yalnızca tedavi etmekle kalmaz, aynı zamanda hastalığın ortaya çıkmasını da tamamen engelleyebiliriz. Doktorlar gibi sağlık profesyonellerinin ve hatta kendimizin hassas sağlık hizmetimizi hızla takip etmeye olanak tanıyan bir teşhis sistemi hayal ettiğimizde, sağlık profesyonellerinin bu sistemle en iyi tedavi yöntemlerini belirleyebileceklerini öngörebiliriz (Gambhir vd., 2018). Aynı zamanda, bu sistem fizyolojik bir değişikliğin habercisi olan biyobelirteçlerin izlenmesine de olanak tanıdığından sadece tedavi amaçlı değil bazı özel ve önemli durumlar için de test özelliği taşımakta olup önem arz etmektedir. Genetikten korunmaya, teşhis ve tedavi sürecinden yönetimine kadar tüm süreci kapsayan ve son yıllarda Harvard Üniversitesi (Pesheva, 2021), Stanford Üniversitesi (Richter, 2015), Kaliforniya üniversitesi (UCLA, 2021) gibi dünyanın en prestijli üniversitelerinin tıp fakültelerinin gündemindedir. Bu kurumlar yatırımlarında önemli bir yer tutan hassas sağlık, bireyin kendi hastalıklarını önleme ve takip etme yetkisine/olanağına sahip olması açısından toplumun ve sağlık sisteminin geleneklerini değiştirebilir (Gambhir vd., 2018). Özellikle, bu becerinin bireylere

kazandırılması sinsi ve belirtisiz bir şekilde ilerleyebilen hastalıkların erken tanısında etkili olmasından dolayı son yıllarda başlıca araştırma konusu olmaktadır.

Tanı kitleri genellikle hastalık belirtileri sonrasında tanı koymak için kullanılırken, etkili bir tedavinin takibinde veya yüksek riskli grupların belirti göstermeyen muhtemel hastalıklarının takibi için kullanılmaktadır. Bundan dolayı, tanı kitlerinin sağlık hizmeti sisteminde önemli bir yeri varken, toplumsal olarak halk sağlığı konusunda da kritik öneme sahiptir. Örneğin, tedavi edilebilir olmasına rağmen erken teşhis probleminden dolayı sıtma hastalığı Afrika'da her 45 saniyede bir çocuğun, yıllık ise 1 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır (Hu vd., 2014). Gelişmiş tanı teknolojilerinden olan PCR ve ELISA gibi testler, gelişmiş ülkelerde uygulama alanı bulsa da bu testler eğitilmiş personele ihtiyaç duymaktadır. Bununla birlikte, yüksek yatırım maliyetleri, sarf malzemelerinin sürekli gereksinimi ve laboratuvar alt yapısının gereksinimi gibi parametrelere de bağlı olması, bu teknolojilerin gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir.

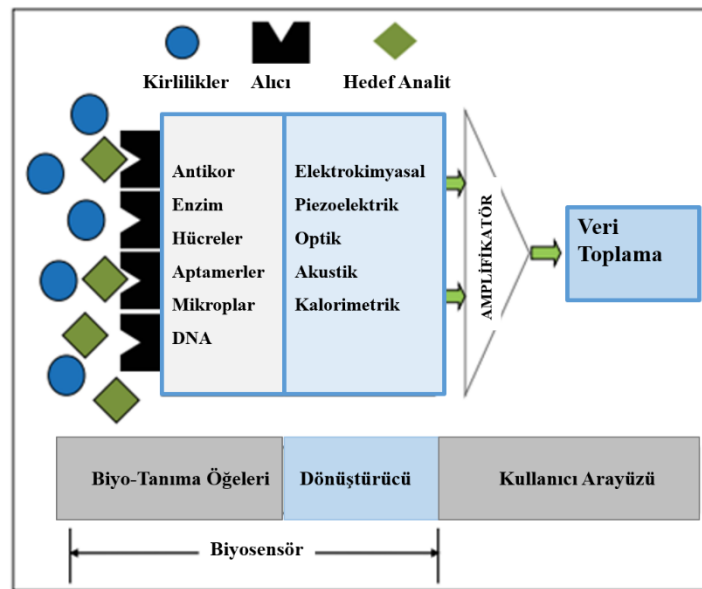
Sağlık hizmeti sistemleri hastayı ilk olarak hastalık ortaya çıkmadan önce değil ortaya çıktıktan sonra odağına alır. Ancak, çağımızın en gelişmiş teknolojik ve bilimsel kaynaklarından yararlanarak bir hastalık daha ortaya çıkmadan yalnızca tedavi etmekle kalınmaz, aynı zamanda ortaya çıkması da tamamen engellenebilir. Bu kapsamda, fizyolojik bir değişikliğin habercisi olan biyobelirteçlerin izlenmesi bir hastalığın erken teşhisi ve hastalık seyrinin takibi için test özelliği taşımakta olup önem arz etmektedir. Bunlardan biri olan, vücutta birden fazla metabolik aktiviteye eşlik eden büyüme hormonu (BH) biyobelirtecinin tayini ve takibi önemlidir. Çünkü bu biyobelirtecin miktarının kanda bulunma aralığındaki sapmalar Akromegali ve Dwarfizm gibi büyüme ile ilgili sağlık sorunlarına sebep olmaktadır ve bu yüzden erken teşhis ve tedavi süreci için kandaki bulunma değerlerinin takip edilmesi gerekmektedir. Bu önemi ele alındığında, bu tez çalışması kapsamında önemli metabolik faaliyetlerde etkin yeri olan BH'nin tayini için bir biyosensör çeşidi olan LFA sistemi geliştirilmiştir.

1.1. Biyosensörler

Biyo-tanım elemanı ve dönüştürücüden oluşan algılama cihazları biyosensörler olarak tanımlanmaktadır. Analite özgü olan bir biyo-tanım elemanı ile analit arasındaki etkileşim sonucu meydana gelen fizikokimyasal özelliklerdeki değişimler sayesinde tanımlama gerçekleşmektedir. Fizikokimyasal özellik olarak optik, termal, elektriksel ve termodinamik özelliklerdeki değişiklikler bir dönüştürücü tarafından elektrik sinyaline

dönüştürülmektedir. Şekil 1.1’de biyosensörlerin genel yapısı ve çalışma prensipleri gösterilmiştir. Biyolojik tanıma malzemeleri olarak enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar, dokular, organeller, DNA ve RNA’lar gösterilebilir (Ding vd., 2015).

Biyosensörler, kaynakların sınırlı olması durumunda hastalık teşhisi, tedavisi ve takibi olmak üzere medikal uygulamalarda, çevre uygulamalarında çevre kirleticilerinin tespiti ve izlenmesinde, gıda güvenliği gibi uygulamalarda ve hayatımızda birçok alanda yaygın kullanım alanlarına sahiptirler. Bunun sebebi olarak da kolay kullanılmalrı, ekonomik olmaları, hızlı yanıt verebilmeleri, uzman gerektirmeden uygulanabiliyor olmaları ve kolay taşınabiliyor olmaları gösterilmektedir (Tang vd., 2022). Diğer biyosensör sistemlerine kıyasla kağıt tabanlı sensörlerin biyoyoumluluk, hafiflik, düşük maliyet, esneklik ve yüzey-hacim oranlarının büyüklüğü gibi avantajları vardır (Lee vd., 2018; Tirgil, 2022).



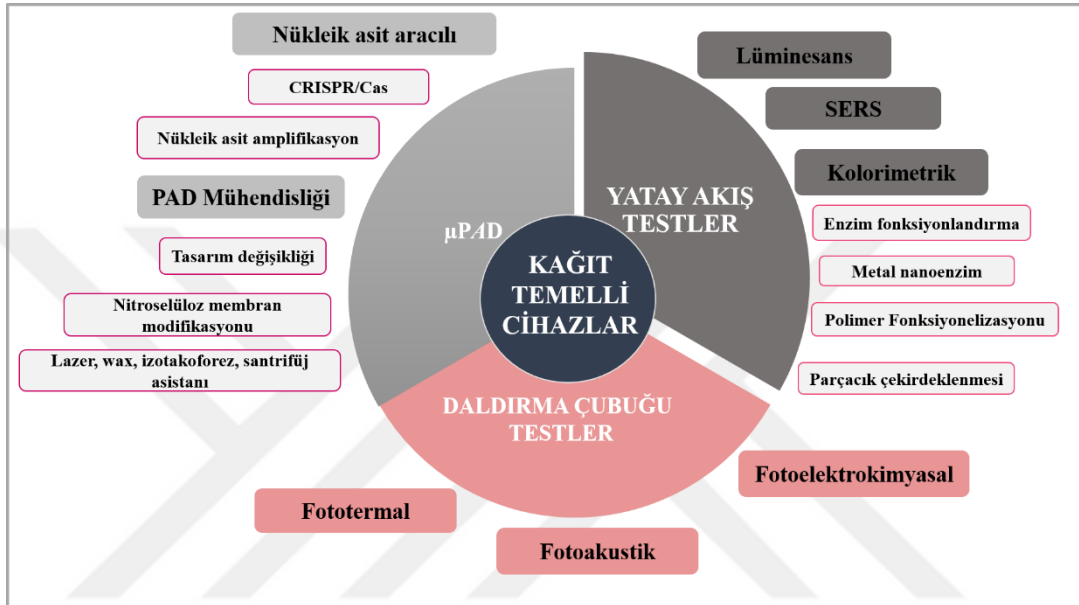
Şekil 1.1. Biyosensörün genel yapısı ve çalışma prensibi (Srinivasan & Tung, 2015)

1.1.1. Kağıt Tabanlı Biyosensörler

POC uygulamalarında kağıt tabanlı analitik cihazlara (PED) diğer sensörlerde kullanılan materyaller (silikon, cam veya plastik vb.) ile kıyaslandığında ucuz olmaları, üretimlerinin kolay olması algılama kabiliyetlerinin yüksek olması gibi özellikleri bakımından giderek artan bir ilgi oluştuğu gözlenmektedir. Bunun yanı sıra saklama ve imha koşullarının kolaylığı da dikkat çekmektedir. Bu özelliklerine ek olarak kağıtların gözenekli yapısı, hidrofilitiklik gibi karakteristik özellikleri sayesinde herhangi bir takviye

güç kullanmaksızın kılcal hareketliliğini sağlamaya yardımcı olmaktadır (Ghasemi vd., 2023; Q. H. Nguyen & Kim, 2020).

Kağıt tabanlı biyosensörler daldırma çubuğu testi, mikro akışkan biyosensörleri (μ PAD) ve yatay akış testleri (LFA) olarak gruplandırılmaktadır. Kağıt tabanlı biyosensörlere ait gruplandırma şeması Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Bu biyosensörlerin çalışma prensiplerine göre birden çok çeşidi bulunmaktadır.



Şekil 1.2. Kağıt tabanlı biyosensörler (Hoang vd., 2021)

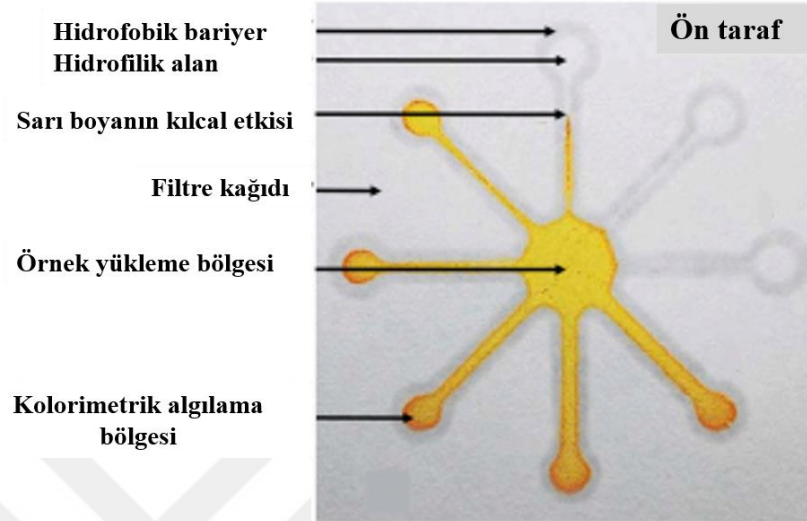
1.1.1.1. Daldırma Çubuğu Testi

Kağıt tabanlı biyosensörlerin bir çeşidi olan daldırma çubuğu testleri kalitatif tayin yapan hareketsizleştirilmiş mekanizmalardan oluşan basit teşhis araçlarıdır. Daldırma çubuğu testleri basit olmalarından dolayı ticari kullanımları oldukça yaygındır. Ancak kantitatif tayinlerdeki yetersizliği bu yöntemin dezavantajını oluşturmaktadır (Bambang Kuswandi & Ensafi, 2019).

1.1.1.2. Mikroakışkan Sistemler

Kantitatif ve çoklu analit algılamada kullanılan μ PAD sistemlerde iki bölge bulunmaktadır. Bu bölgelerden ilki olan hidrofilik kanallarda kılcal hareketle reaktif maddeler akış sağlarken, ikinci bölge diye adlandırılan hidrofobik bariyerler ise bu akışa engel olmaktadır. μ PAD'in genel yapısı Şekil 1.3'te gösterilmektedir. μ PAD'lerde reaktif maddenin yüzeyde yatay olarak hareket ettiği tasarımlar 2 boyutlu olarak ifade edilirken, 3 boyutlu konfigürasyonda, numune hem yatay (x-y düzlemi) hem de kağıt boyunca dikey

olarak (z yönü) hareket etmektedir. 3 boyutlu konfigürasyon çok adımlı deneyler için algılama sensörlerinin performansını artıran bir avantaj sağlamaktadır (Ghasemi vd., 2023).



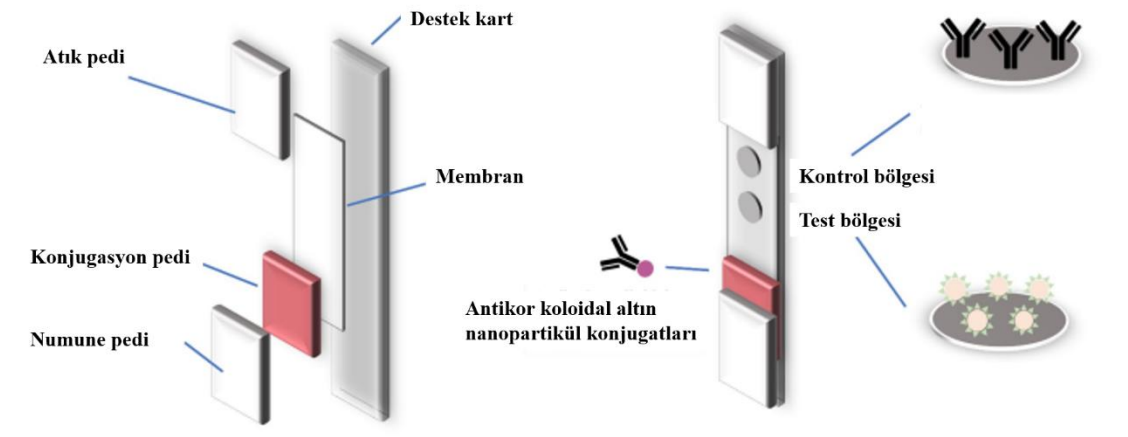
Şekil 1.3. µPAD'in şematik gösterimi (Li vd., 2016; Sriram vd., 2017)

1.1.1.3. Yatay Akış Testleri (LFA)

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Deliverable*) kriterlerini sağlayan (uygun fiyatlı, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, sağlam, ekipman gerektirmeyen ve teslim edilebilir) (Kettler vd., 2004) yatay akış sistemleri, son zamanlarda yapılan düzenleme ile REASSURED (*Real-time connectivity, Ease of specimen collection, Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free or simple, and Deliverable to end-users*) (gerçek zamanlı bağlanabilirlik, numune toplama kolaylığı, uygun fiyatlı, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipman gerektirmeyen ve çevre dostu ve son kullanıcılara teslim edilebilir) halini almıştır (Land vd., 2019). POC teknolojisinde yanıl akış testleri, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Urusov vd., 2019). LFA'lar ELISA, klasik kromatografi gibi yöntemlerin yüksek doğruluk vermelerine rağmen laboratuvar ekipmanlarının bulunmadığı yerlerde tahlil sürelerinin kısalığı sebebiyle oldukça avantajlıdır (Nuntawong vd., 2022).

Genel olarak bir yatay akış platformu dört temel birimden oluşmaktadır. Bu kısımlar Şekil 1.4'te ifade edilmektedir. Numune pedi, analitin damlatıldığı kısımdır, test ve kontrol çizgilerinin bulunduğu kısım nitroselüloz membran, konjugasyon pedi ise

nanopartiküllerle antikorların konjugasyonunun sağlandığı yapıyı oluşturmaktadır. Atık pedi ise fazla analitin toplandığı kısımdır (Parolo vd., 2020).



Şekil 1.4. Genel bir yatay akış testi ve temel bileşenleri (Nuntawong vd., 2022)

Numune Pedi: Numunenin uygulandığı, analitin testin diğer bölgelerine aktarıldığı ve testi başlatan bileşendir (Nuntawong vd., 2022). Numune pedinin en önemli görevi numuneyi konjugasyon pedine homojen bir şekilde dağıtmak ve numunenin konjugasyon pedine doğru yönelimini sağlamaktır (Koczula & Gallotta, 2016). Numune pedi genel olarak selülozdan yapılır, ancak cam elyaftan yapılan küçük pedler de mevcuttur (Alam vd., 2021; Nuntawong vd., 2022; Tsai vd., 2019). Bu malzemelerin ticari olarak temin edilebilen selüloz lifleri ve dokuma ağları olmak üzere iki türü vardır. Selüloz liflerinden yapılan numune pedleri $250 \mu\text{m}$ 'den daha kalın, büyük yatak hacimli ($\geq 25 \mu\text{L}/\text{cm}^2$), ucuz ve tampon çözeltilerine karşı daha yüksek toleransa sahiptirler. Islak olduklarında kullanım için daha zayıf karakter göstermeleri bu malzemelerin dezavantajları olarak gösterilmektedir. Dokuma ağlardan yapılan numune pedleri iyi bir gerilme direncine sahiptirler. Yatak hacimleri oldukça düşüktür ve numune hacmi $1-2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ dir. Diğer gözenekli yapılarla kıyaslandığında maliyeti yüksektir (Millipore, 2013; Parolo vd., 2020). Bazı durumlarda akış hızını, konjugasyon pedinde numunenin tutulma süresini, test ve kontrol çizgilerindeki seçiciliği artırmak amacıyla numune tampon, protein veya viskozite artırıcı madde ile ön işleme tabi tutulmaktadır (Nuntawong vd., 2022).

Atık (Adsorban) Pedi: Bu ped sistemdeki fazla sıvının tutulduğu alandır. Test sisteminin en son kısmına yerleştirilen bu pedin asıl amacı numune sıvısının fazlasını zardan geçirdikten sonra test ve kontrol bölgelerinde test hassasiyetini artırarak en son artan sıvıyı toplamaktır. Test hassasiyeti belli bir noktaya kadar emici pedin kalınlığı ve

uzunluğu ayarlanarak artırılabilir. Atık pedlerinin ana materyalleri olarak genellikle selüloz filtreler kullanılmaktadır (Koczula & Gallotta, 2016; Sukumaran vd., 2021).

Konjugasyon (Eşlenik) Pedi: Etiketli biyotanıma moleküllerinin dağıtıldığı yerdir. Konjugasyon pedi sıvı numune ile temas ettiğinde numuneyi dağıtma özelliği olan malzemelerden yapılmalıdır ve test boyunca etiketli konjugat stabil kalmalıdır. Etiketli konjugatın hazırlanma aşamasındaki eksiklikler test hassasiyetini olumsuz etkilemektedir (Sajid vd., 2015). İdeal bir konjugasyon pedinde spesifik olmayan bağlanmaların en az olması ve kararlı bir akış karakteri gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Millipore, 2013). Konjugasyon pedi olarak 100-500 µm kalınlığa sahip cam elyaflar en çok tercih edilen malzemeler olmakla birlikte selüloz ve polyester malzemelere de rastlamak mümkündür (Parolo vd., 2020).

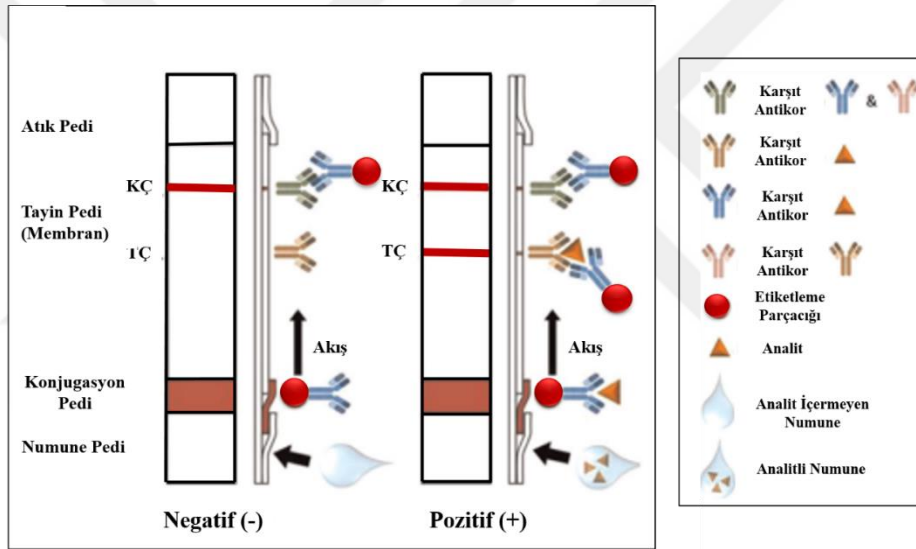
Membran : Test ve kontrol çizgilerinin konumlandırıldığı nitroselüloz yapılardan elde edilen membran, LFA testlerinin hassasiyetlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Genellikle farklı özelliklerde değişik gözeneklere sahip nitroselüloz membranlar bulunmaktadır (Sajid vd., 2015). Nitroselüloz membran gözenekleri 0,050 ile 12 µm arasında değişmektedir. Etkili bir membran seçimi yapılırken membran gözeneğinden daha çok sıvının zar şeridine gitmesi ve zarın şeridini tamamen doldurması için gereken süre olan kapiler akış süresi dikkate alınmaktadır. Bunun sebebi olarak da gözeneklerin üretim sırasında eşit olarak dağıtılmaması gösterilmektedir (Koczula & Gallotta, 2016).

LFA sistemlerinde kalitatif ve kantitatif tayin yapılırken sistemin farklı tanımlama prensipleri bulunmaktadır. Genel olarak bilinen tanımlama yöntemleri ise sandviç model (konvansiyonel model; standart model) LFA ve yarışmalı model LFA'dır.

1.1.1.3.1 Sandviç Model (Konvansiyonel Model; Standart Model) LFA

Sandviç model LFA proteinler, virüsler, hastalık bakterileri gibi büyük molekül (>1 kDa) analitlerin tespitinde kullanılan yöntemdir. Genel olarak sandviç tipi bir LFA'da birden fazla antijenik bölgeye sahip ve aynı anda iki farklı antikoru bağlayabilen moleküllerle çalışılmaktadır (Parolo vd., 2020; Zhang vd., 2021). Sandviç modelde numunedeki analit konjugasyon pedindeki renkli etiketleme materyali konjugasyon pedinde bulunan antikora bağlanır ve analit-antikor-renk molekülü kompleksi meydana gelir ve bu kompleks membran üzerinde yol alır. Daha sonra test çizgisine gelindiğinde analite seçici diğer antikolarla bağlanarak test çizgisinde gözle görülür bir renk gözlenir. Böylece test bölgesinde bağlanmanın gerçekleşmesi sebebiyle oluşan renkli çizgi, testin

pozitif olarak adlandırılmasını sağlamaktadır. Negatif testlerde ise numune içerisinde aranan analit olmadığı için konjugasyon pedindeki seçici antikora bağlanma olmayacağından test çizgisi bölgesine ulaşan numune test çizgisinde bağlanma gerçekleştiremeyecek ve test çizgisinde renk (sinyal) gözlenmeyecektir. Her iki durumda da testin geçerliliğini kanıtlamak amacıyla kontrol bölgesindeki konjugasyon pedindeki antikora spesifik antikor olduğu için o bölgede kontrol çizgisi yanacaktır. Kontrol çizgisi aynı zamanda numunenin o bölgeye ulaştığını sağlamak ve testin geçerliliğini kontrol etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Özetle sandviç tip LFA sisteminde pozitif sonuçlarda membran yüzeyinde test ve kontrol çizgilerinde sinyal görülürken (çift çizgi), negatif numunelerde kontrol çizgisinde sinyal olurken test çizgisinde renk (sinyal) gözlenmeyecektir (Kaya vd., 2014). Sandviç model LFA Şekil 1.5’te ifade edilmektedir.

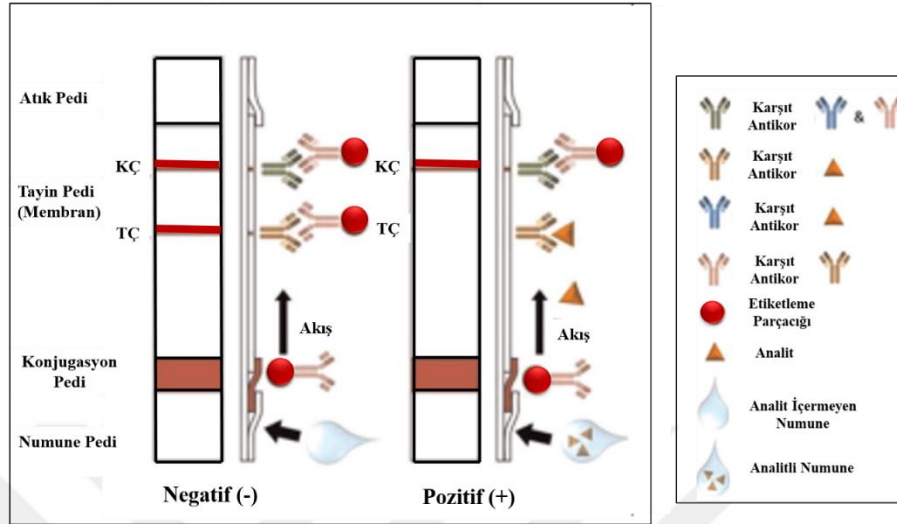


Şekil 1.5. Sandviç tip LFA sistemlerinin genel yapısı (Quesada-González & Merkoçi, 2015)

1.1.1.3.2 Yarışmalı Model LFA

LFA sistemlerinde kullanılan bir model olan yarışmalı modelde ise tek antijenik determinanta sahip küçük molekül kütleli (<1 kDa) analitlerin tespiti yapılmaktadır. Küçük moleküllerin aynı anda iki antikora bağlanamama gibi özelliklerinden dolayı bu modelde iki farklı antikor kullanılmaktadır (Kaya vd., 2014; Parolo vd., 2020). Bu modelde sandviç modelin aksine test çizgisinde renk değişiminin olmaması yani test çizgisinde sinyal olmaması (tek çizgi) pozitif sonucu ifade ederken hem test hem de kontrol çizgilerinin aynı zamanda renklenmesi (çift çizgi) negatif sonucu göstermektedir

(Bahadır & Sezgintürk, 2016). Yarışmalı model LFA'ya ait genel tasarım Şekil 1.6'da gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Yarışmalı tip LFA sistemlerinin genel yapısı (Quesada-González & Merkoçi, 2015)

1.1.2. Yatay Akış Testlerinin Tayin Yöntemleri

Yatay akış testlerini tayin yöntemlerine göre genel olarak optik LFA, termal LFA, manyetik LFA ve elektrokimyasal LFA olarak gruplandırılmaktadır (V. T. Nguyen vd., 2020). Bunlar da tayin yönteminin çeşidine göre kendi aralarında alt gruplara ayrılmaktadır.

1.1.2.1. Optik LFA

Optik tabanlı biyosensörler ucuz ve basit olarak bilinen, kalitatif analizlerde yanıt verebilen ancak kantitatif analizlerde optik dedektör gerektiren sensörlerdir (Quesada-González & Merkoçi, 2017). Kolorimetrik, floresans, SERS, kemilüminesans gibi çeşitleri bulunmaktadır (V. T. Nguyen vd., 2020). Bu tez çalışmasında da optik LFA olan kolorimetrik LFA çalışması yapılmıştır.

1.1.2.1.1 Floresans LFA

Florometrik LFA sistemleri düşük tespit limitlerine sahip sistemlerdir. Floresans LFA'larda raporlayıcı olarak organik floresan etiketler kullanılmaktadır. Organik floresan etiketler, güçlü optik ve floresans özelliklerinin yanı sıra biyouyumluluk ve düşük maliyet gibi avantajlara da sahiptir. Kolorimetrik sistemlerde kullanılan nanopartiküllerle kıyaslandığında düşük tayin limitleri bu sistemlere avantaj

sağlamaktadır (Zeng vd., 2018). Düşük teşhis sınırı (LOD) değerlerinde yapılan tespitlerde floresans emisyonun tespiti hassas olduğu için bu LFA yöntemi kullanılmaktadır. Fakat bu sistemin de yalın gözle gözlenememe ve cihaz gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Gong vd., 2017; Mak vd., 2016; Schmidt vd., 2021).

1.1.2.1.2 SERS LFA

SERS teknolojisi, Raman haberci molekülleri ile substrat yüzeylerinin etkileşimine dayanmaktadır (Sharma vd., 2012). SERS LFA sistemleri geleneksel AuNP tabanlı LFA sistemlerinin hassasiyetlerinin düşük olmasından dolayı yüksek hassasiyette sonuçlar elde etmek amacıyla geliştirilen sistemlerdir. İz analizinde güçlü bir araç olan SERS tekniği, hassasiyet tespit yeteneği ve parmak izi tanıma özelliği yüksek bir tekniktir (Fu vd., 2016). SERS LFA sistemleri ile birçok testin hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır. SERS sistemi kullanılarak biyomoleküllerin tayin sınırlarının düşmesi ve hassasiyetin artması sağlanmaktadır (Yadav vd., 2021). Fakat hala bazı düşük konsantrasyonlu numunelerde ultra duyarlı algılama yapılamamaktadır (G. Li vd., 2022).

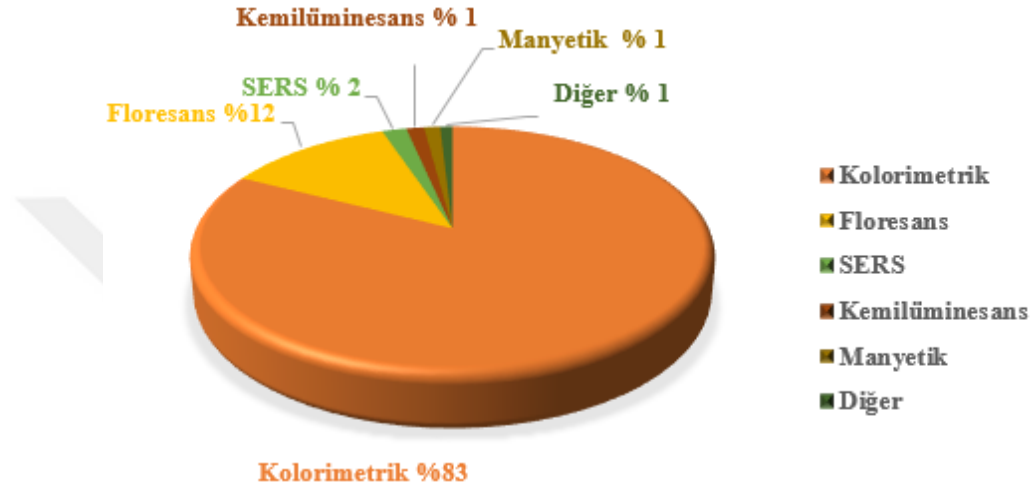
SERS LFA sisteminde sinyal raporlayıcıları olarak geleneksel AuNP'lerin yerine SERS tabanlı SERS nano etiketleri kullanılır (Khlebtsov vd., 2019). SERS etiketlerinin diğer sinyal etiketlerine göre yüksek hassasiyet, stabilite, SERS spektrumlarının eşsiz olması ve kolorimetrik nanopartikülleri kullanarak hazırlanmalarından dolayı ikili sinyal hem kolorimetrik hem de SERS sinyalleri üretebilme gibi özellikleri vardır (G. Li vd., 2022). SERS aktif nanomalzemeler olarak NP'ler, 1D nanoyapılar, 2D nanoyapılar ve 3D nanoyapılar kullanılmaktadır (Wang vd., 2022).

1.1.2.1.3 Kolorimetrik LFA

Kolorimetrik LFA'lar kolay ve basit olmalarından dolayı farklı uygulama alanlarında kullanılmaktadırlar. Kolorimetrik LFA sistemleri genel olarak biyomolekül (Choi vd., 2016), metal partiküller (Srinivasan vd., 2023) veya pestisit tayininde (Wu vd., 2022) kullanılmaktadır. Genel olarak kimyasal veya enzimatik reaksiyonlar sonucu meydana gelen renk değişimi yalın gözle kolorimetrik algılama yapılmaktadır (Hoang vd., 2021).

Son yıllarda kullanılan okuyucu sistemleri LFA sistemlerinde kantitatif analiz yapılmasına, verilerin saklanmasına, iletilmesine, verilerin dijitalleşmesiyle sonuçların

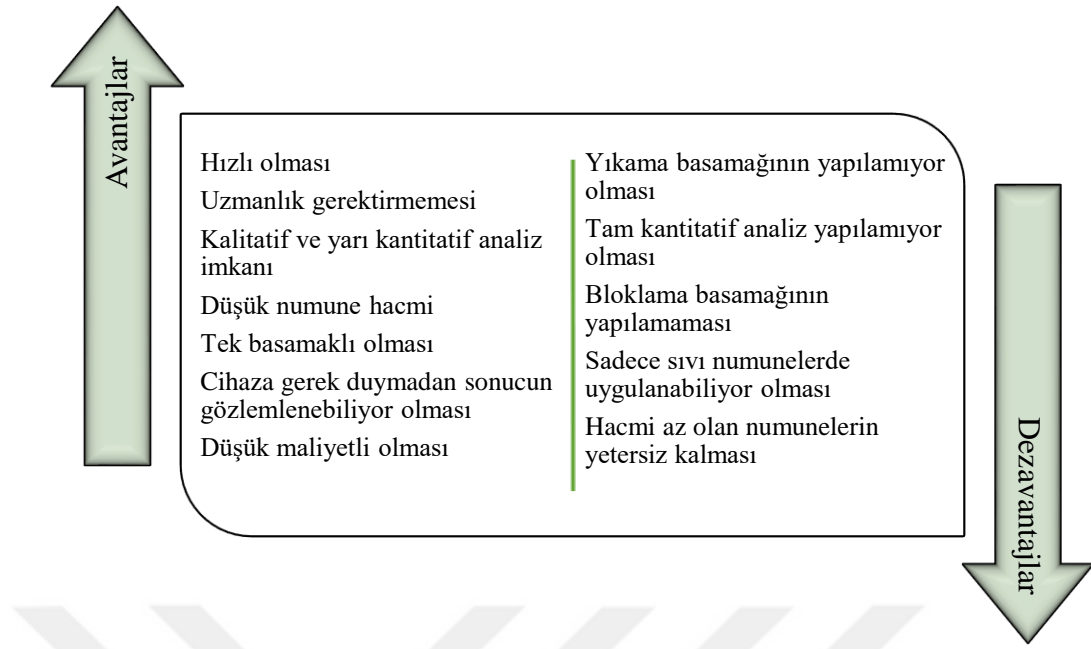
yorumlanmasında oluşabilecek hataları en aza indirmede faydalar sağlamaktadır (Yamada vd., 2017). Özellikle son yıllarda akıllı telefonlarla entegre sistemlerin elde edilmesi de buna olanak sağlamaktadır. 2010 -2019 yılları arasında yapılan bir çalışmanın verilerine bakıldığında kolorimetrik algılama 2010'da %93,7 iken 2019 yılında %78,1'e düştüğü ancak 2019'da kolorimetrik algılamanın ortalama %82,5 ile yaygın kullanılan yöntem olduğu gözlenmiştir (Di Nardo vd., 2021).



Şekil 1.7. 2010-2019 yılları arasındaki LFA tespit yöntemlerinin genel dağılımı (Di Nardo vd., 2021)

1.1.3. LFA Sisteminin Avantaj ve Dezavantajları

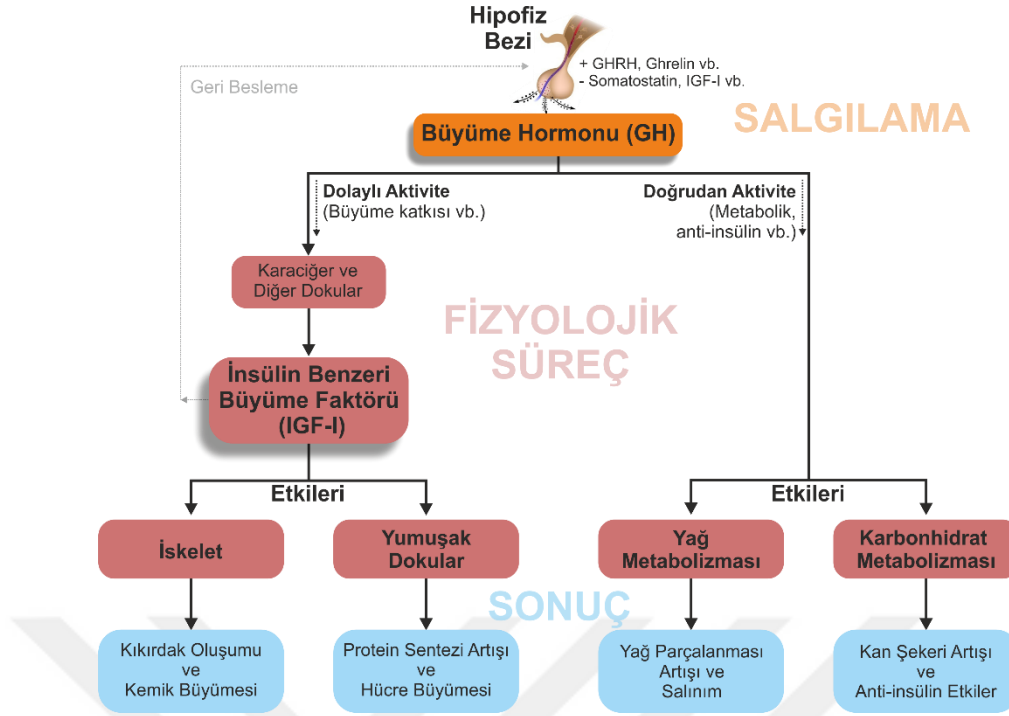
LFA'lar birçok alanda hızlı, kolay, ucuz ve taşınabiliyor olmalarından dolayı ihtiyaç anında kullanılan bakım noktası uygulaması olarak tercih edilmektedir. Depolama koşullarının uygunluğu, ek bir ekipman gerektirmeden sonuçların değerlendirilebiliyor olması nedeniyle uzman personele gerek olmaması ve bu sayede kalifiye iş gücünü en aza indirmesi bakımından da gelişmekte olan ülkelerde birincil taramalar için uygun sistemlerdir (Koczula & Gallotta, 2016; Nuntawong vd., 2022). LFA'lara ait avantaj ve dezavantajlar Şekil 1.8'de sunulmuştur.



Şekil 1.8. LFA sistemlerinin avantaj ve dezavantajları (Kaya vd., 2014; Torul, 2016)

1.2. Büyüme Hormonu (BH)

İnsan yaşamı boyunca büyüme ve gelişmede temel bir unsur olarak önemli bir rol oynayan BH, 191 amino asitten oluşan bir peptittir (Guevara-Aguirre vd., 2018; Ramanaviciene vd., 2012). Vücutta salgılandığı hipofiz bezinin hormonal içeriğinin yaklaşık %10'unu teşkil eden BH'nin salgılanma mekanizması hormonal, nöral ve metabolik faktörleri içeren karmaşık bir sisteme sahiptir. Her ne kadar BH salgılanmasına farklı biyokimyasal türlerin (ghrelin, galanin, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-I) vb.) etkisi olsa da, BH'nin salgılanması büyük oranda ön hipofizde üretilen iki farklı hormon tarafından kontrol edilmektedir (Guevara-Aguirre vd., 2018). Bu hormonlardan ilki büyüme hormonu salgılayan hormon (GHRH), BH'nin sentezi ve salgılanmasını sağlarken, somatostatin olarak adlandırılan ikincisi ise salgılatıcı ilk hormona yanıt olarak BH salgılanmasını inhibe edici görev yapmaktadır (Carter vd., 2002). Bu hormonların etkisinin sonucu kana aktarılan BH'nin plazma seviyeleri cinsiyet ve yaşa göre farklılık gösterirken, tüm bireylerde uyku öncesi ve sonrası zamanlarda çok farklı değerlere ulaşabilmektedir. Pulsatil değişimin olduğu bu noktada BH pikleri uyku ile ilişkili olarak gece zirve yaparken, bu artışlar dışındaki günlük zaman diliminde bazal seviyesine gerileyebilmektedir (Boguszewski, 2021; Gabreanu, 2018).



Şekil 1.9. BH'nin salgılanmasının genel mekanizması ve biyokimyasal fonksiyonları (C.Guyton, 2017)

Salgılanan BH'nin vücuttaki doğrudan ve dolaylı aktivitelerine ilişkin biyokimyasal etkileri de genel hatlarıyla Şekil 1.9'da şematize edilmiştir. BH, yağ ve karbonhidrat mekanizmasında yağ yıkımını ve salınımı, kan şekeri ve diğer anti-insülin etkilerinin artırılması gibi fonksiyonel görevleriyle metabolik faaliyetleri doğrudan etkileyebilmektedir. Diğer taraftan, dolaylı olarak etki ettiği asıl ve önemli metabolik faaliyetlerde ise BH'nin karaciğer ve diğer dokulara aktarılarak IGF-I'in oluşumunu aktive etmesiyle bilinir (C.Guyton, 2017). BH'nin büyüme ve gelişmedeki asıl rolünü yerine getirmesini sağlayan IGF-I molekülü 7647 Da ağırlığında bir polipeptittir. BH'nin dolaylı etkilerindeki anabolik ve mitojenik özelliklerinde etkili bir rol oynayan IGF-I'in vücuttaki miktarının büyük miktarı (>%80) BH aktivasyonu sonucu karaciğerde sentezlenmektedir. IGF-I kemik vb dokularda da sentezlenir, ancak biyolojik aktivitesi sadece sentezlendiği dokuyla sınırlı kalmaktadır (Erdağ, 2012). Serum numunelerinde serbest IGF-I değeri kadınlar için 375 ng/mL, erkekler için 292 ng/mL ortalama referans değere sahip olup, yaşa göre azalan değere sahiptir (Svensson vd., 1997).

BH sonucu salgılanan IGF-I'in, başta kıkırdak oluşumu ve iskelet sistemi büyümesinin tetiklenmesi olmak üzere vücutta protein sentezini artırarak hücre büyümesini sağlamak gibi metabolik görevleri bulunmaktadır (C.Guyton, 2017). Dolayısıyla, insan vücudunun büyümesi ve gelişimi için vazgeçilmez peptitlerden olan BH ve IGF-I'nin varlığı, ileri yaşlarda insan sağlığının sürdürülebilmesi noktasında da

önemlidir (Guevara-Aguirre vd., 2018). Örneğin, çocukların büyüme süreçlerinde gerekli olan birçok protein yapısının sentezi doğrudan BH salgılanmasıyla ilişkilirken, yetişkin bireylerde ise BH metabolizma düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Höybye & Christiansen, 2015). BH ve IGF-I seviyeleri ergenlik döneminde yüksek seviyelere çıkar ve daha sonra ilerleyen yaşlarda giderek azalır (Ashpole vd., 2015). Bir insandaki kemik gelişiminin tamamlandığı 20-30'lu yaşlara kadar gerçekleşen değişimler bir denge halinde BH ve IGF-I salgılanmasıyla yürütülür (Ohlsson vd., 1998). Bunlara ek olarak, diğer birçok hormonun (tiroid hormonu, glukokortikoidler ve seks steroidleri vb) kemik mineralizasyonu üzerinde önemli etkileri de bulunmaktadır (Drinkwater vd., 2010). Ancak, BH söz konusu mekanizmalarla büyüme plağı ve kemik büyümesini doğrudan uyardığı için bu oluşumlar BH ile IGF-I tarafından kontrol edilmektedir (Ohlsson vd., 1998). Sonuç olarak, bir endokrin ve otokrin/parakrin tarzında hareket eden BH ve IGF-I polipeptitleri iskelet büyümesini kontrol eden ana eksene sahiptir (Haspolat ve Karakaya, 2018). Ayrıca, bu hormonların beyin fonksiyonlarında önemli bir yere sahip olduğu da bilinmektedir (Donahue vd., 2006).

1.2.1. BH Düzensizliğinin Neden Olduğu Hastalıklar

BH salgılanmasındaki düzensizlikler sonucu plazmada gerekenden eksik veya fazla miktarda BH bulunması fizyoloji üzerine son derece etkilidir. Her ne kadar BH eksikliğinin veya fazlalığının vücutta neden olduğu hastalıklar, bir bütün içerisinde değerlendirilebilir nitelikte olsa da BH'nin vücuttaki aktivitelerine göre aşağıdaki gibi genelleştirilebilir.

1.2.1.1. BH'nin Doğrudan Aktivitesinden Dolayı

BH miktarındaki farklılıklar, doğrudan veya dolaylı aktiviteleriyle ilişkili biyokimyasal mekanizmalarından kaynaklı olarak vücutta birden çok fonksiyonel değişiklikler meydana getirebilmektedir (Kopchick vd., 2020). BH eksikliğinin çeşitli yaşlarda farklı sorunlar oluşturma potansiyeli bulunmakla birlikte, fiziksel etkileri büyüme geriliğine yol açtığından çocuklarda çok daha şiddetli bir şekilde ortaya çıkabilmektedir (Juan Treviño vd., 2009). BH'nin doğrudan aktivitesindeki biyokimyasal fonksiyonları nedeniyle, BH eksikliği bulunan erken süt dönemindeki çocuklarda hipoglisemi atakları görülebilmekte, buna bağlı olarak da zekâ geriliği veya ölümlü vakalar gözlenebilmektedir (Growth Hormone Research Society, 2011). BH eksikliği olgularında yağ kütlesinin artması ve diğer vücut kütlesinin azalması (özellikle de

kaslarda) bulguları da bulunmaktadır (Salvatori, 2020; Tzanela vd., 2010). Ayrıca, ağır BH eksikliği olan yetişkin bireylerde ise belirtileri daha zor anlaşılrsa da, kemik kütlesi ve güç kaybıyla birlikte kardiyovasküler riskin oluştuğu da gözlenmiştir (Isgaard vd., 2015). Genellikle, hipofiz tümörlerinden kaynaklanan BH fazlalığı ise uzun süre regüle edilmediği zamanlarda doğrudan etkisi nedeniyle glukoz intoleransına neden olabilmektedir (Kopchick vd., 2020). Sonuç olarak, hem eksikliğinin hem de fazlalığının oluşturduğu doğrudan problemler nedeniyle potansiyel BH salgılanmasındaki düzensizlikleri tespit etmek önemlidir.

1.2.1.2. BH'nin Dolaylı Aktivitesinden Dolayı

Birçok organda var olan BH'nin doğrudan aktivitelerinin neden olduğu yukarıdaki hastalıkların yanı sıra dolaylı aktiviteye bağlı yani ikincil etkilerinin ise IGF-I üzerinden olduğu bilinmektedir (Sigalos & Pastuszak, 2018). Büyümeyi sağlayan ve düzenleyen IGF-I ile birlikte BH miktarındaki anomalilerin akril yumuşak doku büyümesine ve metabolik fonksiyonlara olan etkileri yıllar içinde sinsi bir şekilde meydana gelebilmektedir (Gascoin-Lachambre vd., 2011). Genellikle semptomların ileri aşamalarda ortaya çıkmasından dolayı tanı koymada geç kalınan hastalarda, bulunduğu yaşa ve bulgulara göre kandaki basal BH ve IGF-I miktarları ve anomalilere bağlı olarak Dwarfizm (cücelik hastalığı), Gigantizm (devlik hastalığı) ve Akromegali (Şekil 1.10) olarak tanımlanan farklı nitelikte fizyolojik hastalıklar görülebilmektedir (Lu vd., 2019). Genetik olmayan ve hipofiz tümörlerinden dolayı BH salgılanmasının azlığından kaynaklanarak ortaya çıkan BH eksikliği, çocuk yaşlarda ortaya çıktığı ve tedavi edilmediği takdirde Dwarfizm hastalığına (Şekil 1.10.a) yol açmaktadır. Bu hastalarda, salgılanan BH eksikliğinin yanı sıra BH'nin dolaylı etki mekanizmasından kaynaklı olarak IGF-I eksikliğinin de oluşması kemik gelişimini engelleyen önemli bir unsur olarak da değerlendirilmektedir (Murray vd., 2016; J. Treviño vd., 2009) Diğer taraftan, BH fazlalığı ise görüldüğü yaşa göre farklı sonuçlara ve hastalıklara neden olabilmektedir. BH ve buna dayalı IGF-I fazlalığı çocuklarda ortaya çıktığında, Gigantizm (Şekil 1.10.b) adı verilen ve ileri yaşlarda hareket zorluğuna neden olan aşırı fizyolojik bozukluklarla sonuçlanmaktadır. BH fazlalığı yetişkinlerde görüldüğünde ise, fizyolojik olarak kemik dokuları oluşumu tamamlandığı için genellikle akromegali adı verilen kıkırdak ve yumuşak dokulardaki fizyolojik bozukluklara (Şekil 1.10.b-e) neden olmaktadır (J. Chen vd., 2022; Juan Treviño vd., 2009). Yani, Gigantizm ve Akromegali

hastalıklarının kökeni aynı olmakla birlikte (BH ve IGF-I fazlalığı) sadece görüldüğü yaşa göre neden olduğu fizyolojik sonuçlardan dolayı farklı tanımlanmaktadır.



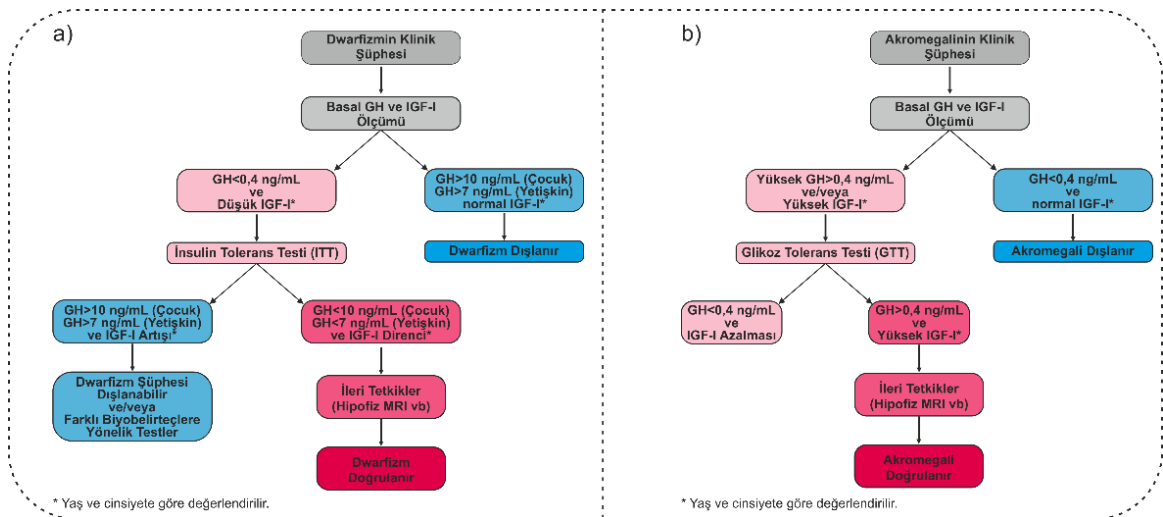
Şekil 1.10. BH miktarı anomali hastalıkları **a)** Cücelik (Dwarfizm) ve Devlik (Gigantizm) Hastalığı (Web_Sayfası, 2018) **b)** Akromegali Vakası (Krug vd., 2016) **c)** Akromegali Vakası (Hao Liu vd., 2018) **d)** Akromegali Vakası (Ong & Sy, 2017) **e)** Akromegali Vakası (Abdullah vd., 2017)

İnsülin Tolerans Testi (ITT): Dwarfizm gibi hastalıklara neden olan BH eksikliğinde kullanılan testtir. BH salgılanmasını tetikleyici bileşenlerin kullanıldığı ITT, BH eksikliğine yönelik değerlendirmelerde ticari olarak altın standart olarak kabul edilmektedir (Gasco vd., 2021). Sağlıklı bireylerde vücuttaki BH miktarının insülin verilmesiyle artmasına dayanmaktadır. Şekil 1.11.a'da görülebileceği gibi, ITT uygulamasına karar verilen düşük BH miktarına ($< 0,4$ ng/mL) sahip hastalara uygulanan insülin sonrası BH miktarının yetişkinlerde 7 ng/mL, çocuklarda ise 10 ng/mL çıkması ile BH eksikliğinden kaynaklı Dwarfizm hastalığı dışlanır (Savage ve Bang, 2012). Test esnasında kontrol amaçlı IGF-I'in yanı sıra glikoz seviyeleri de gözlenmektedir (Svensson vd., 1997). Hem BH hem de IGF-I'deki değişimler ele alınarak yapılan değerlendirmeler sonucu ortaya çıkabilecek aksi durumlarda ilave testlere ya da ileri tetkiklere geçilir (Iwayama vd., 2021).

Glikoz Tolerans Testi (GTT): Akromegali gibi hastalıklarda yüksek BH miktarının gözlenmesinin ardından uygulanan testtir. BH salınımını baskılamak amacıyla metabolizmaya katılan maddelerin ardından BH ve IGF-I miktarlarındaki değişimler değerlendirilmektedir. Söz konusu baskılayıcı maddeler verildikten sonra yüksek değerde olan BH ve IGF-I miktarlarındaki değişimler ele alınır. Sağlıklı bireylerde vücuttaki BH miktarı, glikoz verilmesiyle azalırken, BH salgılayan adenomlarda bu baskılanma ya

olmamaktadır ya da yetersizdir. Vücudun vermiş olduğu bu yanıtsızlık akromegali tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (Çelik, 2015). Akromegali şüphesi bulunan hastalarda ölçülen bazal BH ve yaş ve cinsiyete göre belirlenmiş IGF-I düzeyi referans değerlerden yüksek ise tanıda bir gecelik açlık sonrası 75-100 g glikoz verilerek yapılmaktadır. Glikoz verilmesi öncesi ve sonrası belirli aralıklarla alınan numunelerdeki BH ve IGF-I miktarları referans değerle karşılaştırılmaktadır. Eğer bakılan en düşük BH düzeyi 0,4 ng/mL'den düşük ise akromegali dışlanır. Ancak ölçülen en düşük BH düzeyi 0,4 ng/mL'den büyük ise akromegali tanısı doğrulanır (Aldallal, 2018). Takip edilen BH değerlerinin yanı sıra doğrulayıcı nitelikte olan IGF-I seviyeleri de takip edilmektedir (Şekil 1.11). EK 1'de Şekil 1.11 ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Sonuç olarak, Dwarfizm ve Akromegali gibi hastalıklara neden olan BH düzensizliklerinden şüpheli hastaların ön kontrol tanısında olduğu kadar bu tolerans testleri süresince de BH ve IGF-I'nin seviyelerinin belirlenmesi literatürde de vurgulandığı gibi son derece büyük bir öneme sahiptir (Akırov vd., 2021; Boguszewski, 2021.; Lu vd., 2019; Tidblad, 2022). Tüm bu durumlardan dolayı BH seviyeleri hakkında bilgi sağlayabilecek yerinde tanı sisteminin elde edilmesi bu tez çalışmasının konusunu oluşturmuştur.

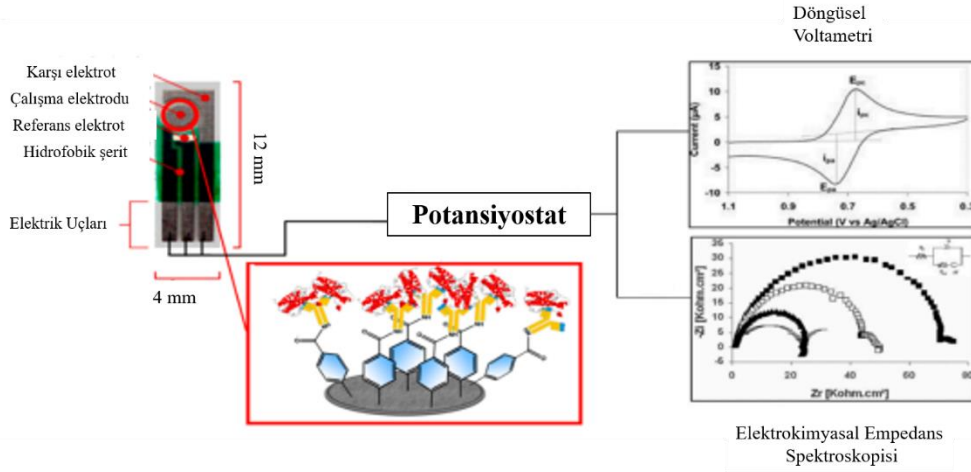
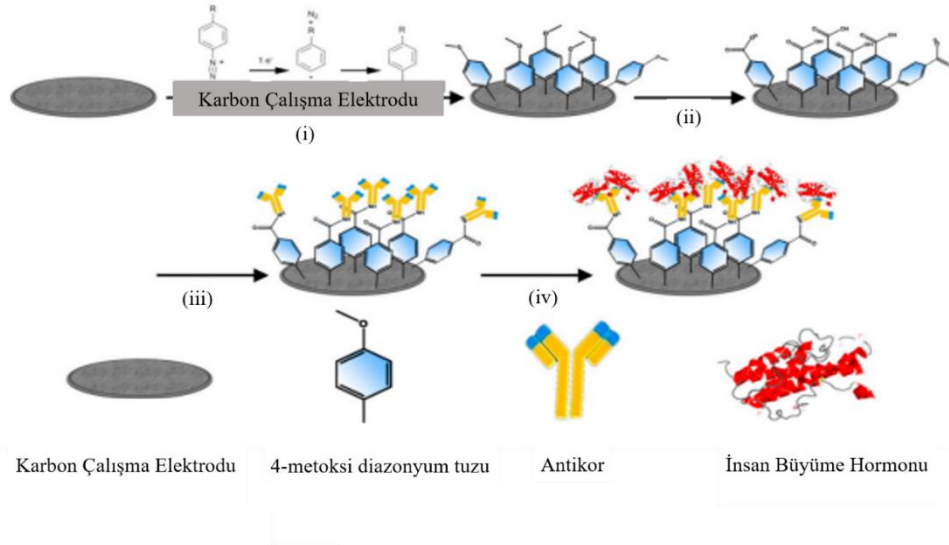


Şekil 1.11. BH düzensizliklerinde **a)** ITT testi ve **b)** GTT testi akış şemaları (Aldallal, 2018; Polidori vd., 2020)

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

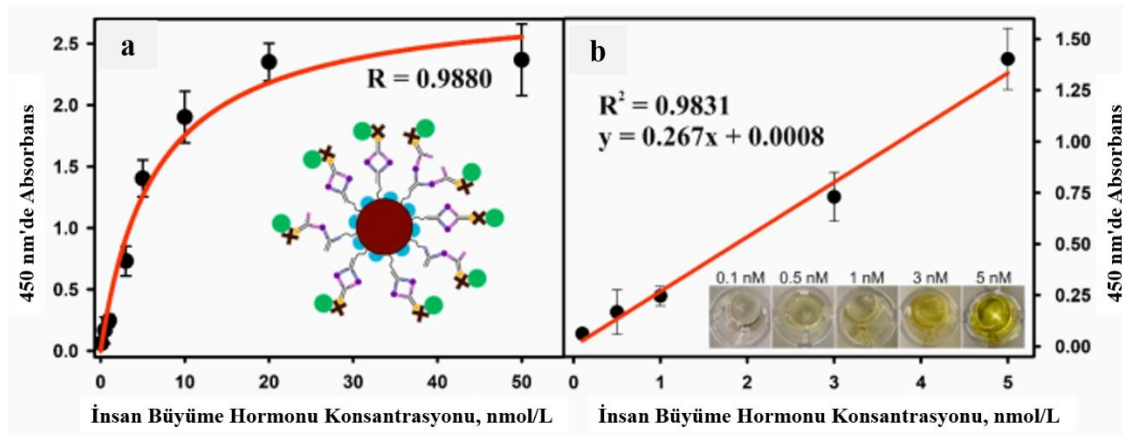
Fizyolojik sıvılarda BH seviyesinin belirlenmesi, seçici ve spesifik bir tekniğin eldesi, düzenli klinik testler için çok önemlidir. BH analizi için kullanılan geleneksel yöntemler arasında, biyo-tahlil, reseptör tahlili, bağışıklık tahlili amacıyla kütle spektrometrisi içeren sıvı ya da gaz kromatografisi, radyoimmünoassay, floresan rezonans enerji transferi, ELISA teknikleri sayılabilir (Bohlooli vd., 2021; Reed vd., 2002). Ancak, bu yöntemlerin uzun zaman alması, yüksek maliyet gerektirmesi, karmaşık kullanım mekanizmaları gibi dezavantajları bu hormonun tayin ve tespitinde hızlı, basit ve düşük tayin limitlerine inilebilen bir yöntem geliştirilmesinin önünü açmıştır (Chen vd., 2022). Bu tayinlerin dezavantajlarından yola çıkarak oluşturulan biyosensör mantığı bu alanlarda yapılacak olan çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bunun için analizlerde antijen ve antikor arasındaki etkileşimin seçicilik ve yüksek duyarlılığından faydalanarak hem biyolojik hem de tıbbi ölçümlerde immünosensör testleri kullanılmıştır (Girard ve Mousseau, 1999; Karir vd., 1999; Langkamp vd., 2008; Moura vd., 2004; Rezaei vd., 2009). BH analizi için kullanılan sensörlere örnek olarak, elektrokimyasal (Hennessey vd., 2009; Kurtinaitiene vd., 2008), piezoelektrik (Xu vd., 2011), yüzey plazmon rezonansı (SPR) ve elipsometri (Balevicius vd., 2011), empedans spektroskopisi (Ramanavicius vd., 2010; Rezaei vd., 2009) ve atomik kuvvet mikroskopisi (Ramanaviciene vd., 2006) gibi sensörler gösterilebilir (Ramanaviciene vd., 2012).

N.Li vd., (2019) BH'nin yüksek hassasiyette tayini için ekran baskılı karbon elektrotları (SPCE'ler) kullanarak tek kullanımlık bir immünosensör geliştirmişlerdir. Bağlayıcı olarak diazonyum bazlı katman SPCE yüzeyine elektrokimyasal olarak yerleştirmiş ve algılama amaçlı monoklonal BH (m-BH) antikorlarını kullanmışlardır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemiyle az miktarda numune hacmi kullanarak (20 µL) pikomolar hassasiyetinde BH tespiti yapmışlardır. Elde edilen immünosensörü biyolojik numularda (tam kan ve serum örneklerinde) test etmişlerdir. Elde edilen sensörle 10 pg/mL ile 100 pg/mL arasındaki doğrusal aralıkla 5 pg/mL BH tespit edildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonucu tasarlanan sensörün çalışma mekanizması ve elde edilen veriler Şekil 2.1'de gösterilmektedir (N. Li vd., 2019).



Şekil 2.1. Sıçan büyüme hormonunun impedimetrik tespitinin kavramsal gösterimi ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri (N. Li vd., 2019).

Ramanaviciene vd., (2022) sandviç model kolorimetrik manyeto-immünoensör geliştirmişlerdir. BH tayini yapmak amacıyla monoklonal insan büyüme hormonunun antikorları (anti-hBH) ile modifiye edilmiş MNP-Au'ları kullanmışlardır. Elde edilen sensörün LOD değeri 0,082 nmol/L olarak bulunmuştur ve klinik olarak da anlamlı bir doğrusal aralık (0,1-5,0 nmol/L, $R^2=0,9831$) elde etmişlerdir. Bu değerlere ait grafikler Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Elde etmiş oldukları immünoensörle insan büyüme hormonunun serumdaki varlığını ve konsantrasyonunu belirlediklerini belirtmişlerdir (Ramanaviciene vd., 2022).



Şekil 2.2.a) BH konsantrasyonuna karşı 450 nm'deki absorbanlar, **b)** BH tespiti için geliştirilmiş sandviç tip manyeto-immünoanaliz sisteminin doğrusal aralığı (Ramanaviciene vd., 2022)

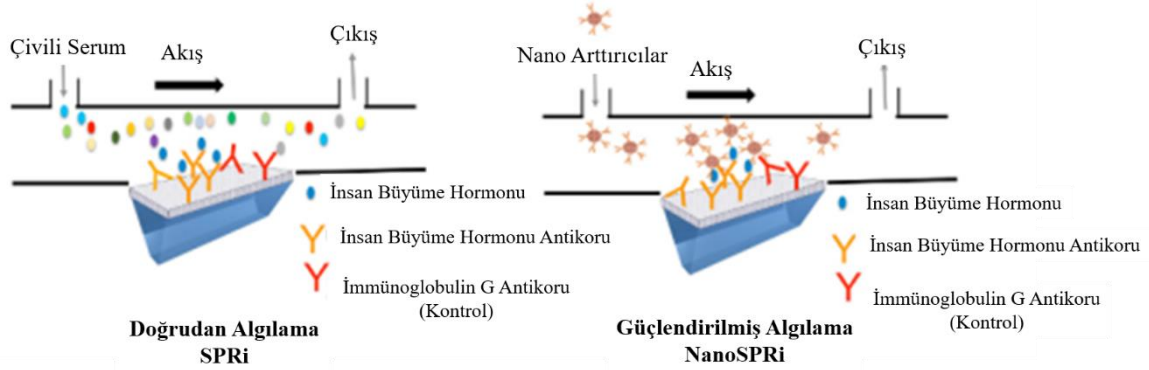
Allafchian vd., (2018) yapmış oldukları çalışmada elektrokimyasal immünobiyosensör tasarlamışlardır. Bunun için camı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde çiçek benzeri fenil alanin peptid nanoyapılar kullanmışlardır. Bu elektrokimyasal biyosensör ile HBH, 1–100 pg/mL lineer bir tayin aralığı sergilediği belirtilmiştir. LOD değeri 0,38 pg/mL olarak bulunan biyosensörün aktifliğini test etmek amacıyla farklı BH konsantrasyonlarındaki insan serumu numuneleri toplanarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi metodu kullanılarak gerçek numunelerdeki etkinliğinin de sağlandığı belirtilmiştir (Allafchian vd., 2018).

Belén González-Guerrero vd., (2016) bimodal dalga kılavuzu interferometresi yöntemini kullanarak idrarda klinik olarak BH seviyelerini ölçen ultra hassas ve hızlı tespit performansı gösteren bir biyosensör tasarlamışlardır. Etiketsiz olarak tasarlanan biyosensörün LOD değerinin 0,30 pg/mL olduğu belirtilmiştir (Belén González-Guerrero vd., 2016).

Bohlooli vd., (2021) ferrik oksit nanopartikülleri ile modifiye edilmiş GCE kullanarak HBH tespiti için moleküler baskılı elektrokimyasal sensör tasarlamışlardır. LOD değeri $0,6 \times 10^{-10}$ g/cm³ bulunan sensör, $1,0 \times 10^{-10}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ g/cm³ HBH ($R^2=0,9588$) arasında doğrusal bir aralık göstermiştir. Yapılan çalışma ile insan plazma örneğinde moleküler baskılanmış polimer (MIP)/Fe₃O₄/GCE'nin kullanımıyla tayin yapılabileceği belirtilmiştir (Bohlooli vd., 2021).

Vance vd., (2016) yaptıkları çalışmada insan serumuna eklenen BH ölçümü için doğrudan (SPRi) ve güçlendirilmiş yüzey plazmon rezonans görüntülemenin (NanoSPRi), tanısal potansiyelini araştırmışlar ve elde ettikleri sonuçları ELISA ile kıyaslamışlardır. LOD değerleri sırasıyla NanoSPRi, SPRi ve ELISA için 0,0092 ng/mL,

1 ng/mL ve 3,61 ng/mL olarak bulunduğu belirtilmiştir. Şekil 2.3'te rekombinant BH tespiti için uygulanan SPRi ve Nano-SPRi yöntemleri şematik olarak ifade edilmiştir (Vance vd., 2016).



Şekil 2.3. Rekombinant BH'nin tespitinin şematik gösterimi SPRi ve Nano-SPRi (Vance vd., 2016)

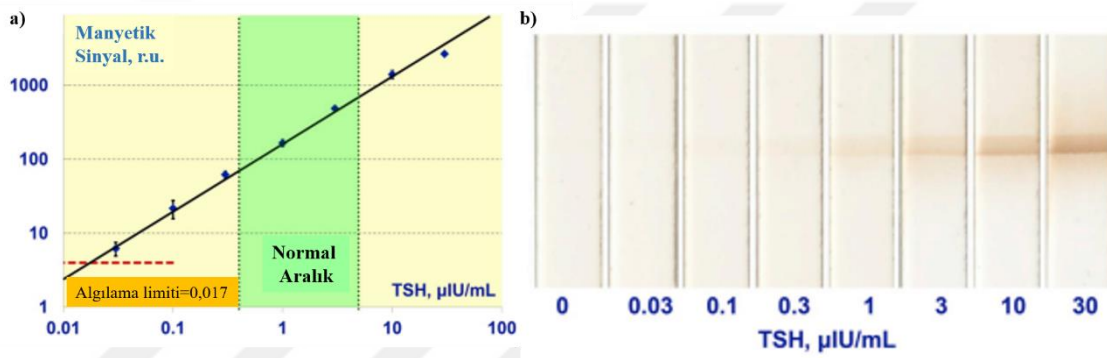
Crespi vd., (2017) yaptığı bir çalışma ile somatostatinin mevcut merkezi sinir sisteminin nörotransmisyon oranlarının olduğu yeri etkilediğini, bağırsak yolunda aktif olduğunu ve farelerde santral somatostatin benzeri immünoaktivitenin önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir. Somatostatinin analizi genel olarak radyoimmünoassay yöntemlerle yapılmaktadır. Bu çalışmada elektrokimyasal yöntem kullanılarak, karbon bazlı sensörlerle uygulanan voltametri olarak işlenmiş karbon fiber mikro elektrotları kullanmışlardır. Epidermal büyüme faktörü özellikle SRIF sinyali gibi dokularda BH'nin etkisi incelenmiştir (Crespi, 2017).

Yatay akış immüno-kromatik testler birçok alanda kullanılmaktadır. Literatürde hormon tespitine yönelik bir çalışma Chamorro-Garcia vd., (2016) tarafından paratiroid hormon benzeri hormonu (PTH LH), saptamak ve ölçmek insan hücre hattının (HaCaT, LA-N-1, SKN-AS) lizatlarında ve kültür ortamında PTH LH'nin saptanması için altın nanopartikülleri (AuNP) kullanarak hızlı ve kolay bir yatay akış immün testi geliştirilmiştir. Yapılan çalışmanın PTH LH üretiminde yer alan mekanizmaların yanı sıra teşhis için gelecekteki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için yararlı bir gelişme olacağı düşünülmektedir (Chamorro-Garcia vd., 2016).

Hormon tayinine yönelik başka bir yatay akış immüno-sensör çalışması da Goux vd., (2023) tarafından yapılmıştır. Yumurtalık rezervinin kantitatif bir belirteci olan Anti-Müllerian Hormon tayini için evropiyum (III) şelat bazlı bir tek adımlı yanal akışlı floresan bir immüno-sensör geliştirmişlerdir. Etiket malzemesi olarak floresan evropiyum

şelat nanopartiküllerin kullanılması kolloidal altın nanopartiküllerden 300 kat daha hassas sonuç elde edildiği belirtilmiştir (Natarajan vd., 2022). Yapılan çalışma ile analitik çalışma aralığı 0,41–15,6 ng/mL olan ve analitik duyarlılığı LOD değeri 0,41 ng/mL olan bir sensör tasarladıklarını belirtmişlerdir (Goux vd., 2023).

Znoyko vd., (2020), Tiroid uyarıcı hormon (TSH)'nin kantitatif tespiti için süper paramanyetik nanoetiketlere dayanan bir yanal akış immünolojik test elde etmişlerdir. Tiroid bezi fonksiyonunun ilk değerlendirmesinde ilk basamak belirteci olan TSH'nin 25 dakikadan daha kısa sürede tayin yapabilen bu sensörün LOD değerinin 0,017 $\mu\text{IU/mL}$ olarak bulunduğu belirtilmektedir. Tasarlanan çalışmaya ait veriler Şekil 2.4'te gösterilmektedir (Znoyko vd., 2020).

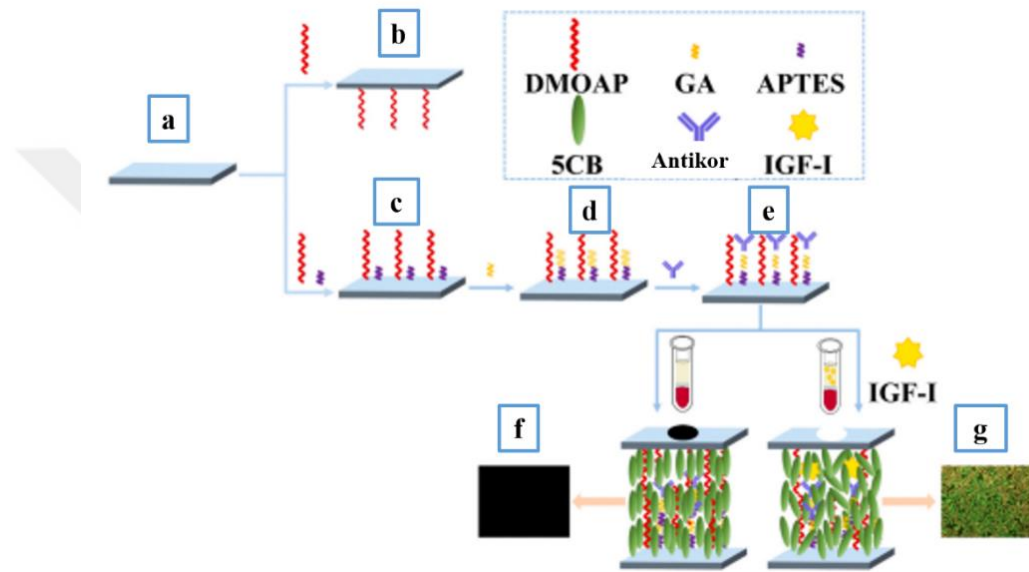


Şekil 2.4. a) Serum TSH konsantrasyonunun belirlenmesi için kalibrasyon grafiği, b) LFA test şeritlerinin fotoğrafı (Znoyko vd., 2020)

Kim vd., (2021) insan serumunda, insanın zihinsel ve fiziksel sağlığıyla yüksek ilişkisi olan bir stres hormonu olarak bilinen kortizolün tespiti için taşınabilir kemilüminesans bazlı yanal akış platformunu geliştirmişlerdir. Kortizol için gözlemlenen doğrusal aralıkta (0,78–12,5 $\mu\text{g/dL}$ $R^2 = 0,99$) LOD değerini 0,342 $\mu\text{g/dL}$ olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir (Kim vd., 2021).

J. Chen vd., (2022) büyüme hormonu ile ilişkili bozuklukların ve hastalıkların tanı ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir polipeptit hormon olarak kullanılan IGF-I'in tespiti için sıvı kristalin çift kırılımını temel alan etiketsiz bir optik immünolojik test tasarlamışlardır. İnsan serumunda IGF-I'in tayini için 4-siyano-4-pentilbifenilin (5CB) nematik sıvı kristallerine (LC'ler) dayanan etiketsiz bir optik biyosensör tasarlamışlardır. Tanıma elemanı olarak IGF-I antikorunu (AbIGF-I), glutaraldehit (GA) ve (3-aminopropil) trimetoksisilandan (APTES) oluşan bir çapraz bağlayıcı yoluyla modifiye edilmiş cam yüzey üzerine immobilize edilerek, antikor (AbIGF-I) ile antijen (AgIGF-I)

arasındaki spesifik tanıma ve bağlanma sayısına bağlı olarak LC filminin, çapraz polarizör altında sergilediği kademeli değişimi gözlemlemiştirler (Şekil 2.5). Optimize edilmiş koşullar altında, tasarlanan LC tabanlı biyosensör, 1,0 ng/mL LOD değeri ve 10,0–2000,0 ng/mL doğrusal aralığı ($R^2 = 0,989$) ile IGF-I'e karşı hassasiyetin yüksek olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda bu çalışmanın klinik tanıda BH ile IGF-I arasındaki bağlantıyla ilgili hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için de faydalı olacağı belirtilmektedir (J. Chen vd., 2022).



Şekil 2.5. LC tabanlı biyosensörün IGF-I tespitinin şematik gösterimi, Cam yüzeyi modifikasyonunun aşamaları **a)** Piranha çözeltisi, **b)** DMOAP, **c)** APTES/DMOAP karışımı, **d)** GA/APTES/DMOAP karışımı, **e)** Ab_{IGF-I} . **f)** $AgIGF-I$ 'siz hazırlanmış hücrenin şeması ve polarize optik mikroskop görüntüsü, **g)** $AgIGF-I$ 'li hazırlanmış bir hücrenin şeması ve polarize optik mikroskop görüntüsü (J. Chen vd., 2022)

Gerçekleştirilen literatür araştırması BH tespitine yönelik farklı tekniklerin kullanıldığı sensör çalışmalarının güncel bir nitelik taşıdığını ortaya koymaktadır. Ancak, söz konusu çalışmalardan herhangi birinde hasta veya uzman hekim tarafından kullanılacak POC testine yönelik bir tanı kiti henüz tasarlanmamıştır. Literatürde farklı hormon tayinine yönelik de birçok kit tasarımı bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, BH tayini yapmak amacıyla yerinde ön kontrol veya tespit sağlayabilecek bir POC tanı kiti tasarlanmasına yönelik bir çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında BH için tasarlanan sensörlerin LOD değerleri 0,00038 ng/mL ve 0,30 pg/mL arasında değişim göstermektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen LFA sistemi ile 0-300 ng/mL aralığında tayin ve tespitinin yapılabildiği bir LFA geliştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında yatay akış test sisteminde kullanılan temel bileşenler nitroselüloz membran (HF090MC100), atık pedi/numune pedi (CFSP001700) ve konjugasyon pedi olan cam elyaf (GFPC000800) Millipore firmasından temin edilmiştir. Kalitatif ve kantitatif tayin için gerekli olan hormonlardan büyüme hormonu Sigma Aldrich (H5916) ve Abcam (Ab-280333, Ab-51232) firmalarından, poliklonal anti-büyüme hormonu antikoru (p-BH) Abcam, Cloud-Clone ve Elabscience firmalarından, monoklonal anti-büyüme hormonu antikoru (m-BH) ve ikincil antikor olarak kullanılan tavşana karşı keçi antikorları ise Abcam, Cloud-Clone firmalarından temin edilmiştir. Nanopartikül sentezinde $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar), trisodyum sitrat (Merck) kullanılmıştır. Yatay akış test kitinin eldesinde kullanılan ana bileşenlerden olan membran, numune ve atık pedlerinin ve konjugasyonda kullanılan cam elyafın yıkanması ve konjugasyonunda kullanılan tampon çözeltiler için fosfat tampon çözeltisi (phosphate buffer saline, PBS) tablet Sigma ve borat tamponu için kullanılan borik asit ve sodyum tetraborat Merck firmasından temin edilmiştir. Aynı zamanda yıkama ve konjugasyonda kullanılan sükroz Merck, Tween-20 Merck ve Triton X-100 Sigma firmalarından temin edilerek kullanılmıştır. Ayrıca konjugasyon, yıkama ve bloklama işlemlerinde kullanılmak üzere sığır serum albümin (bovin serum albümin, BSA) de Merck firmasından temin edilmiştir. Doğrulama testinde kullanılan BH ELISA kiti ise Cloud-Clone (SEA044Hu) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

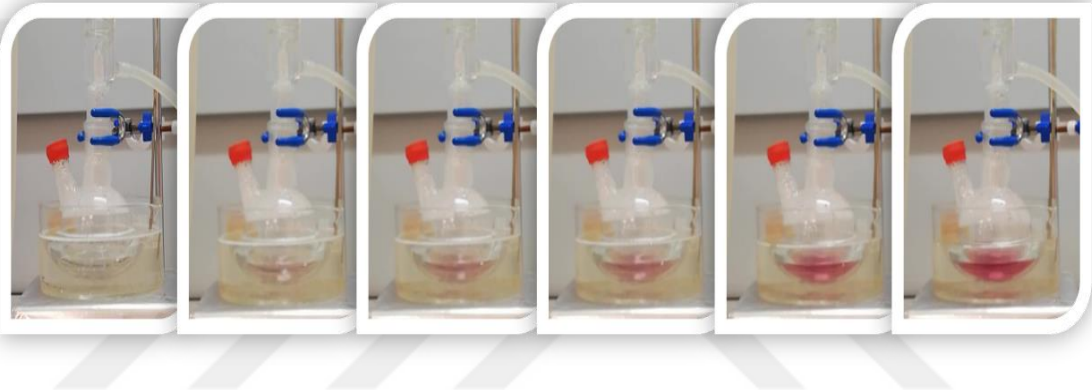
Nanopartiküllerin (AuNP) karakterizasyonu için Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki (BİTAM) Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) (ZEISS GeminiSEM 500) cihazının taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) dedektörü kullanılmıştır. Yine aynı cihazla LFA test kitinde kullanılan numune pedi, membran ve cam elyafın topografik ve morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla elektron mikroskobu yardımıyla karakterizasyonları yapılmıştır. Aynı zamanda BİTAM'daki nanopartikül boyutu ölçüm cihazıyla (Micrimeritics -Nanoplus3) nanopartiküllerin boyut analizi yapılmıştır. Nanopartiküllerin absorbans değerleri Ultraviyole, Görünür Bölge ve Yakın Kızılötesi Spektrometresi (UV-Vis-NIR) (Shimadzu) cihazı ile ölçümleri alınmıştır. Kullanılacak olan antikorun en az

miktarının bulunması için yapılan topaklanma testinde, yine aynı cihazla farklı derişimlerde hazırlanan antikor-AuNP çözeltilerinin topaklanma öncesi ve sonrası absorbands değerleri ve maksimum dalga boyu değerleri ölçülmüştür. Numune pedi, cam elyaf ve membran kurutma basamaklarında etüv (Nüve FN 055) ve vakumlu etüv (CLS Scientific CLVO - 64T ve Vacucell Eco Line) kullanılmıştır. Konjugasyon aşamasında (Nüve NF 800) santrifüj cihazı kullanılmıştır. Yatay akış testlerinin kontrol ve test çizgilerindeki antikorların ekimi laboratuvarımızda bulunan numune püskürtme cihazı (Camag, Linomat 5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon aşamalarında termal karıştırıcı (Biosan TS-100C) ve membran yıkamalarında inkübatör karıştırıcı (Unimax 1010 Heidolp) kullanılmıştır. Elde edilen test kitinin kalitatif ve kantitatif tayinlerini yapmak ve test sinyallerinin şiddetini ölçmek amacıyla yine kendi laboratuvarımızda bulunan kolorimetrik okuyucu (ESEQuant LR3) cihazı kullanılmıştır. ELISA testleri sonuçları (Thermo Scientific Multiskan SkyHigh Mikroplaka Spektrofotometresi) ELISA okuyucu ile okunmuştur.

3.3. Nanopartikül (AuNP) Sentezi

Yatay akış testlerinde etiket malzemesi olarak birçok nanomalzeme kullanılmaktadır. Bu nanomalzemeler arasında genel olarak kullanılan nanopartiküllerin başında AuNP'ler gelmektedir (Sajid vd., 2015). Literatürde yatay akış testlerinde kullanılan AuNP'lerden boyutu 40 nm olanların uygun parçacık boyutu, antikor konjugasyonunda daha az sterik engel oluşturduğu belirtilmektedir (Christopher vd., 2005; Nuntawong vd., 2022). Bu kapsamda çalışmalarda genel olarak Turkevich metodu ile sentezlenen ve yaklaşık 40 nm boyutlu AuNP'ler kullanılmıştır. AuNP sentezi için klasik Turkevich metoduyla (Turkevich vd., 1951) farklı derişimlerde hazırlanan $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ çözeltileri kullanılarak farklı boyutlarda AuNP'ler sentezlenmiştir. Yatay akış immünosensörlerde ideal olduğu ifade edilen 40 nm boyutlu AuNP sentezlemek amacıyla sentez çalışmalarında optimizasyon yapılmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerle elde edilen AuNP çözeltilerine ait karakterizasyon çalışmaları yapılmış olup hedeflenen AuNP'ler elde edilmiştir. Sentez için 51 mM $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 150 μL alınıp 50 mL saf suya ilave edilmiştir. Çözelti kaynaya kadar geri soğutucu altında ısıtmaya devam edilmiştir. Kaynama başladıktan birkaç dakika sonra ortama 88 mM trisodyum sitrat (TSC) çözeltisinden 1,25 mL alınarak hızlı bir şekilde ilave edilmiştir. Isıtıcı kapatılarak renk dönüşümü takip edilmiştir. Klasik AuNP çözeltisinden farklı olarak daha açık pembe renkli çözelti elde edilene kadar 300 rpm'de karıştırma işlemine

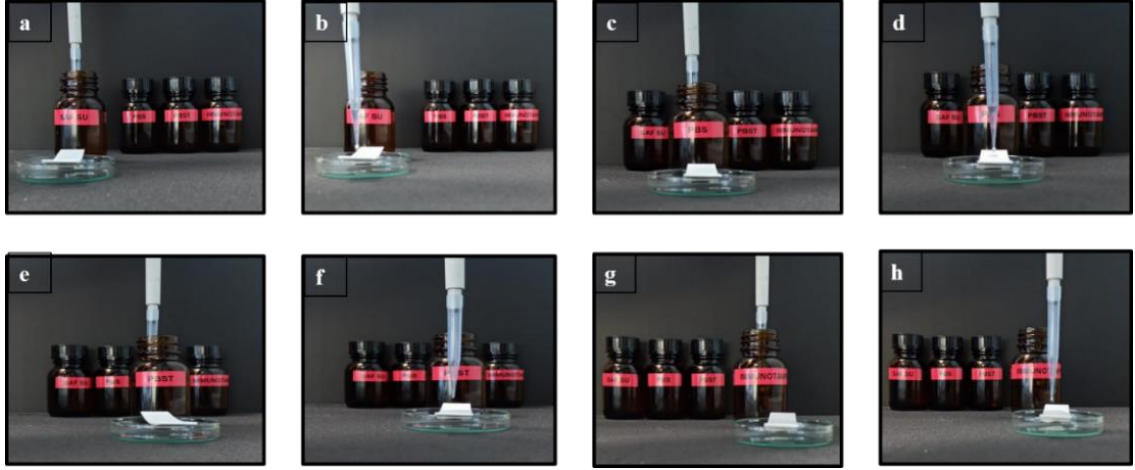
devam edilmiştir. Ortama eklenen $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ derişiminin, özellikle AuNP'lerin boyutunu etkilemesinden dolayı, sistemdeki madde kaybını en aza indirmek ve tekrarlanabilirlik sağlayabilmek amacıyla sentez çalışmaları geri soğutucu altında yapılmıştır. Senteze ait renk dönüşümleri Şekil 3.1'de de gösterildiği üzere başlangıçta şeffafa yakın çok açık sarı olan çözelti rengi sıcaklığın artmasıyla açık pembe ve zamanla (yaklaşık olarak 20 dakika sonra) literatürde de 20-40 nm arası sentezlenen AuNP rengi olarak ifade edilen kırmızımsı pembe (Sukumaran vd., 2021) renge dönüşmektedir (Şekil 3.1). Sentezlenen nanopartiküller alüminyum folyo ile sarılı bir şekilde +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. AuNP sentezine ait sentez sırasında gözlenen renk dönüşümleri

3.4. Numune Padi Yıkaması

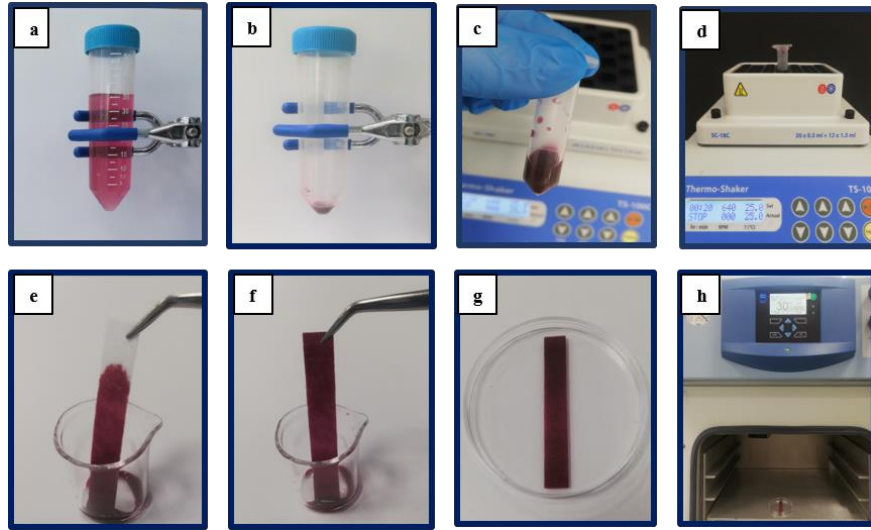
Test kiti oluşumundan önce numune pedine ön hazırlık işlemi uygulanmaktadır. Ön işlem olarak numune pedi immünotampon (PBS + Tween-20 + %3 BSA) çözeltisiyle yıkanmıştır. Numune pedine ait yıkama basamakları Şekil 3.2'de gösterildiği şekilde yapılmıştır. Numune pedinin her iki yüzeyi de ayrı ayrı sırasıyla önce saf su, PBS, PBST (PBS + Tween-20) ve immünotampon (PBST + BSA) çözeltileriyle yıkandıktan sonra 37 °C'de 2 saat süreyle etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan numune pedleri daha sonra kullanılmak üzere kapalı bir ortamda muhafaza edilmektedir.



Şekil 3.2. Numune pedinin yıkanmasına ait işlem basamakları

3.5. Konjugasyon Basamağı

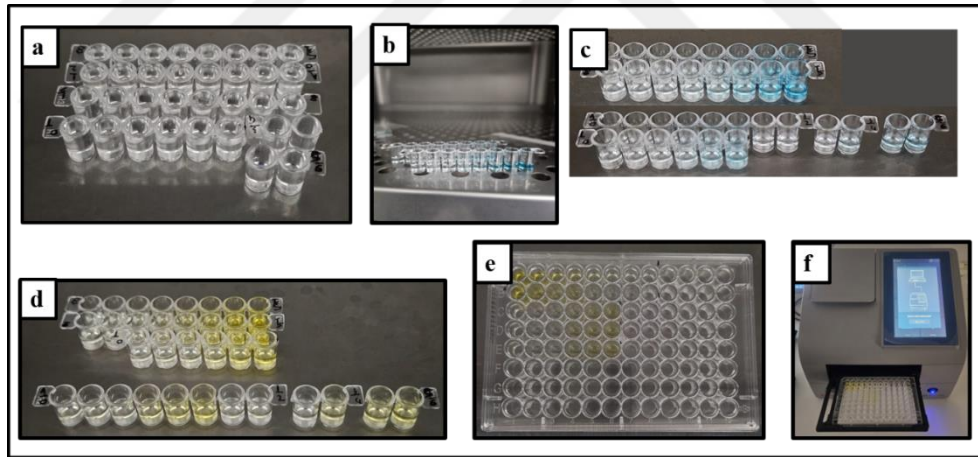
Konjugasyon aşamasında AuNP ve antikor konjugasyonu sağlanmıştır. Bunun için AuNP çözeltisi 40 dakika 9000 rpm’de santrifüj edildikten sonra elde edilen çökelti üzerine her bir optimizasyonda farklı olmak üzere farklı miktarlarda antikor eklenip 4 °C’de 20 dakika 640 rpm’de soğutmalı karıştırıcıda karıştırma işlemi yapılmıştır. Ortama borat tamponunun ilavesinden sonra 4 °C’de 20 dakika boyunca 640 rpm’de karıştırmaya devam edilmiştir. Elde edilen çözeltiliye %10 sükröz içeren borat tamponu ilave edilip yıkama işlemi Şekil 3.3.e-f’de gösterildiği gibi yapılmıştır. Antikorla konjuge edilmiş AuNP çözeltisiyle yıkanmış cam elyaf 50 mbar vakum altında 30 °C’de 1 saat süreyle vakumlu etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan cam elyaf test kitinde kullanılmak üzere kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Antikor- AuNP konjugasyon aşamaları

3.6. ELISA Testi

Tez çalışmasında elde edilen BH tayinine yönelik test kitinin doğruluğunun belirlenmesi amacıyla standart metot olarak bilinen ELISA testi kullanılmıştır. ELISA testi sonucu ile elde edilen veriler LFA test kitiyle elde edilen verilerle kıyaslamak amacıyla kullanılmıştır. Bunun için 5 farklı konsantrasyondaki (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL ve 100 ng/mL) BH çözeltisinin üç tekrarlı (n=3) olarak ELISA testi hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir. BH ELISA kitinin çalışma aralığı 0,156 – 10 ng/mL olduğu için BH çözeltilerinin derişimleri 10 kat seyreltilerek analiz yapılmıştır. Daha sonra elde edilen sonuçlar tekrar 10 ile çarpılarak değerlendirilmiştir. ELISA testinin işlem basamaklarına ait fotoğraflar Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Test için öncelikle ELISA standart numunesinin 0,312 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL derişimlerinde farklı çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra LFA çalışmasında kullanılan hedef analit (BH) çözeltisinin 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL 100 ng/mL konsantrasyonlarında çözeltileri 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltilerden 100 µL alınarak 37 °C'de 1 saat inkübasyon yapılmıştır.



Şekil 3.4. ELISA testi basamakları

İnkübasyon sonrası saptama Reaktifi A'dan 100 µL eklenmiş ve tekrar 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 350 µL yıkama çözeltisi kullanarak 3 defa yıkama işlemi yapılmıştır. 100 µL hazırlanmış Saptama Reaktifi B eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 350 µL yıkama çözeltisi kullanarak bu sefer 5 defa yıkama işlemi yapılmıştır. 90 µL substrat solüsyonu eklenerek 37 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra şeffaf olan çözelti renkleri Şekil 3.4.b ve Şekil 3.4.c'de olduğu gibi mavi renk almıştır. Daha sonra mevcut çözelti üzerine 50 µL durdurma

solüsyonu eklenmiş ve mavi olan çözelti renkleri Şekil 3.4.d ve Şekil 3.4.f'de de gösterildiği gibi sarıya dönmüştür. Elde edilen çözeltilerin absorbanları 450 nm'de ELISA okuyucu (Thermo Scientific Multiskan SkyHigh Mikroplaka Spektrofotometresi) ile okunmuştur.

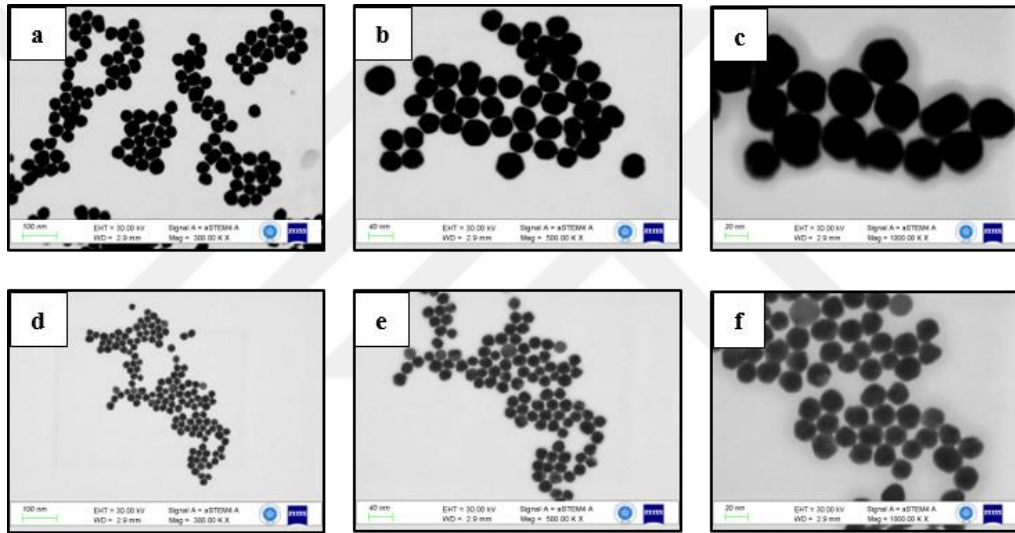


4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Nanopartikül (AuNP) Karakterizasyonu

4.1.1. FESEM Görüntüleme

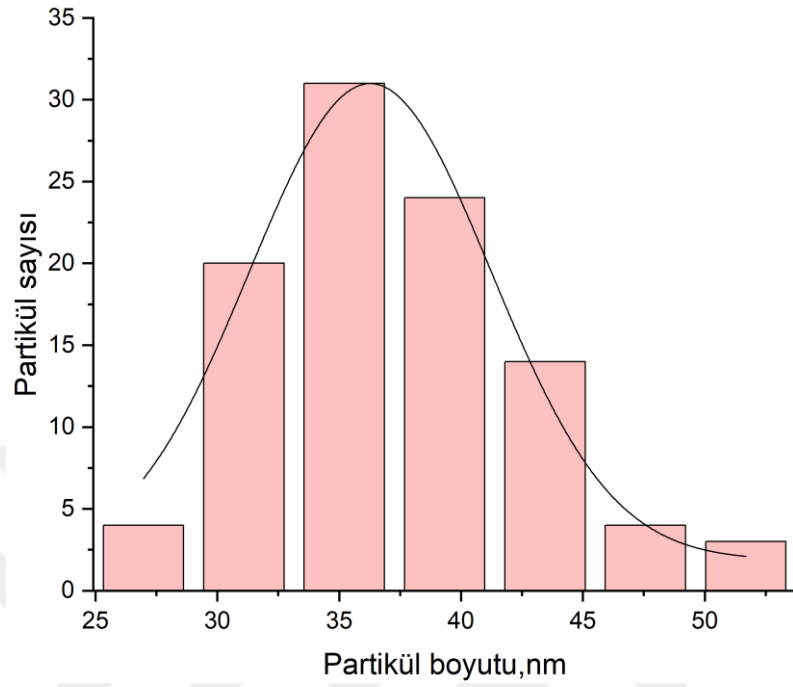
Sentezlenen nanopartiküllerin FESEM (STEM dedektörü) ile farklı büyütme ölçeklerindeki görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.1.a-c'de 0,15 mM $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak elde edilen AuNP'lerin sırasıyla 100 nm, 40 nm ve 20 nm ölçeğindeki görüntüleri sunulmuştur. Şekil 4.1.d-f 'de ise 0,30 mM $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak elde edilen AuNP'lere ait 100 nm, 40 nm ve 20 nm ölçeğindeki STEM görüntüleri sırasıyla sunulmuştur.



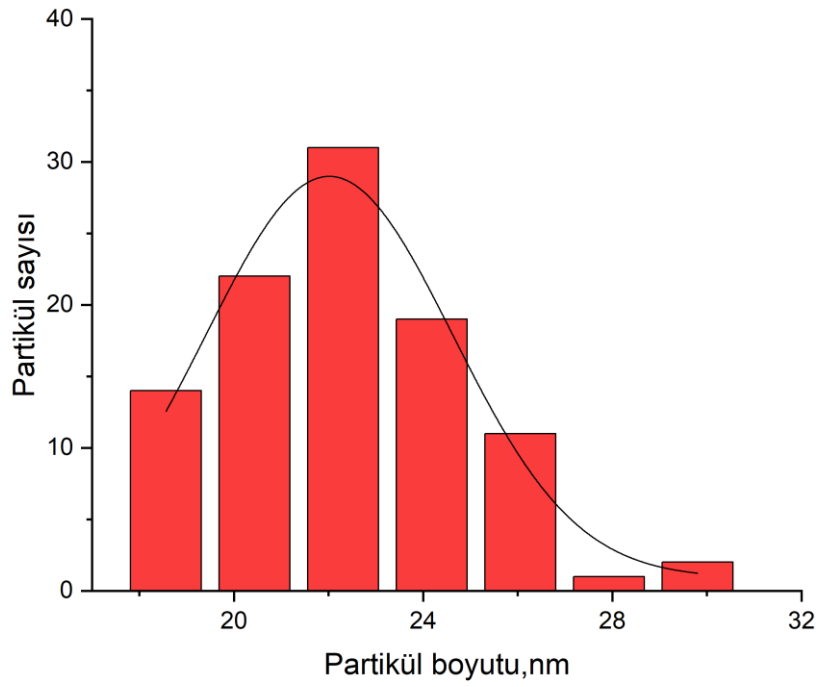
Şekil 4.1. a-c) 0,15 mM $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ile elde edilen AuNP'ye ait STEM görüntüleri sırasıyla 200kx, 500kx ve 1000kx, d-f) 0,30 mM $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ile elde edilen AuNP'ye ait STEM görüntüleri sırasıyla 200kx, 500kx ve 1000kx

Sentezlenen tüm AuNP'lerin FESEM görüntüleri incelendiğinde partiküllerin kendine özgü karakteristik küresel yapıda oldukları ve FESEM ölçeğinde noktadan noktaya alınan ölçümler sonucu ortalama 20 nm ve 40 nm civarında oldukları ön değerlendirme aşamasında anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve doğrulanması amacıyla Image J programı kullanılarak boyut dağılımı yapılmıştır. Şekil 4.2'de verilen boyut dağılım grafiği ile Şekil 4.1.a-c'de STEM görüntüleri verilen nanopartiküllerin sonuçları verilmektedir. Elde edilen nanopartiküllerin boyut dağılımı ortalama 39,5 nm olarak hesaplanmıştır. Bu da hedeflenen boyutta nanopartikül sentezinin gerçekleştirildiğini göstermektedir. Şekil 4.1.d-f'de STEM görüntüleri verilen

nanopartiküllerin boyut dağılım histogramı ise Şekil 4.3'te sunulmuştur. Elde edilen veriler incelendiğinde ortalama 23 nm boyutunda AuNP'ler elde edildiği gözlenmiştir.



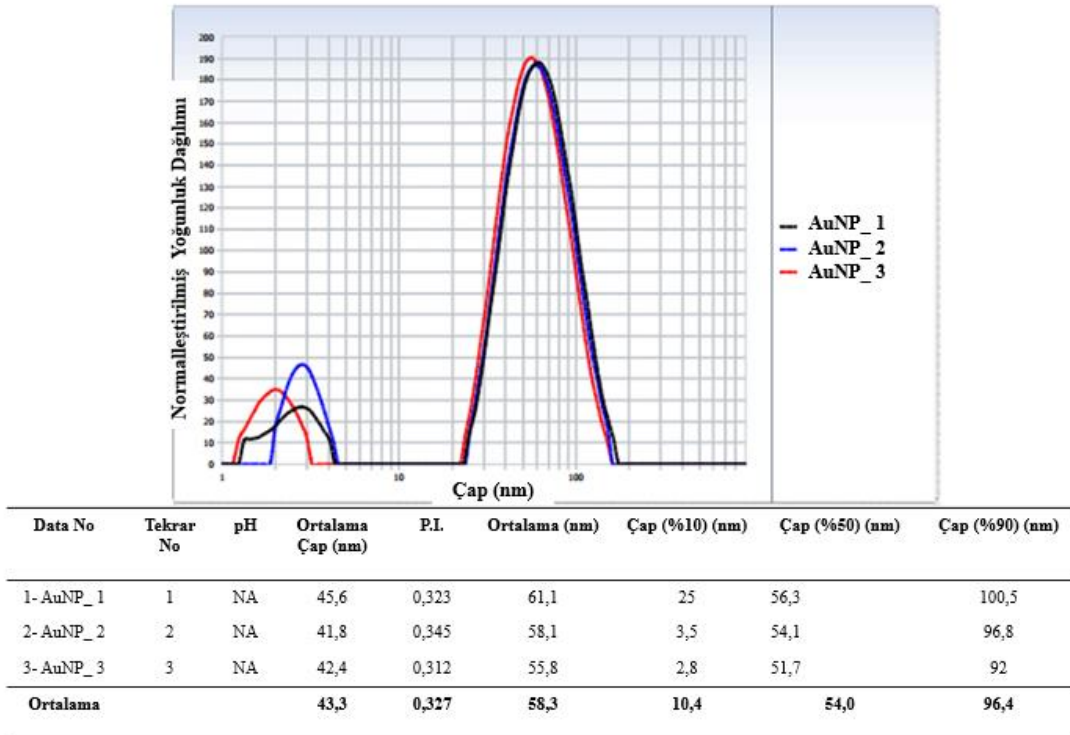
Şekil 4.2. 0,15 mM HAuCl₄·xH₂O ile elde edilen AuNP'ye ait boyut dağılım grafiği



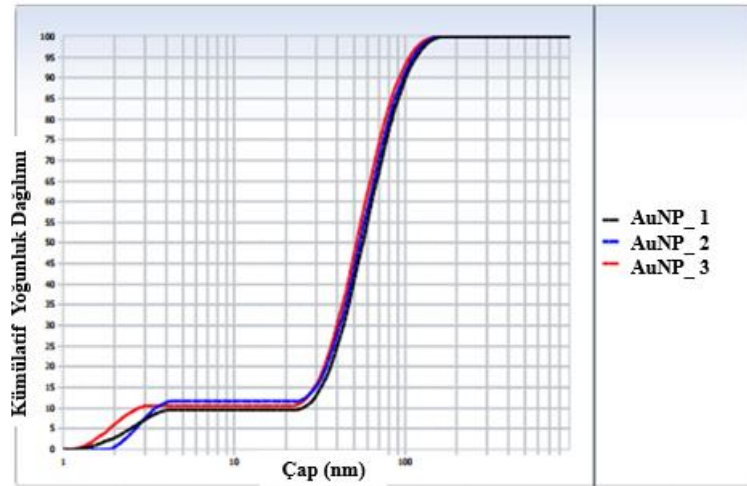
Şekil 4.3. 0,30 mM HAuCl₄·xH₂O ile elde edilen AuNP'ye ait boyut dağılım grafiği

4.1.2. Nanopartikül Boyutu Ölçümü

Partikül boyut dağılımı sonuçlarının doğruluğunu teyit etmek amacıyla nanopartikül ölçer cihazı ile yapılan ölçüm sonuçlarıyla veriler kıyaslanmış ve elde edilen sonuçlarda da 0,15 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen AuNP'lerin boyut dağılımı elde edilen verilerle orantılı çıkmıştır. Nanopartikül ölçer cihazı ile alınan veriler Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te sırasıyla normalleştirilmiş yoğunluk dağılımı ve kümülatif yoğunluk dağılımı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.4. 0,15 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen AuNP'lerin normalleştirilmiş yoğunluk dağılımına ait grafik

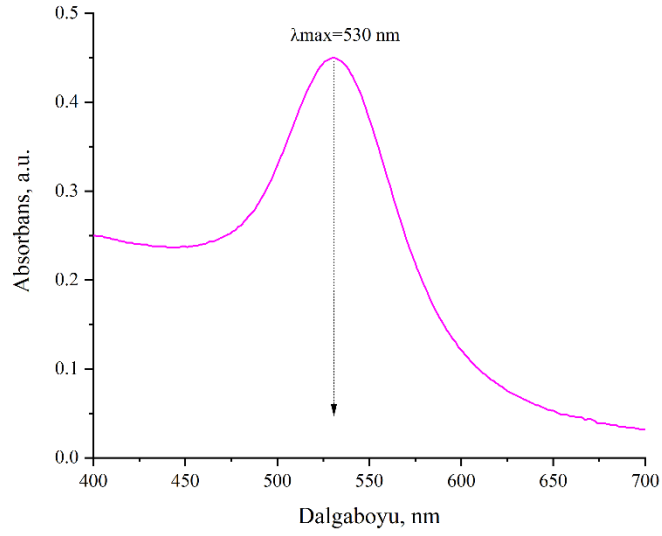


Data No	Tekrar No	pH	Ortalama Çap (nm)	P.I.	Ortalama (nm)	Çap (%10) (nm)	Çap (%50) (nm)	Çap (%90) (nm)
1- AuNP_1	1	NA	45,6	0,323	61,1	25	56,3	100,5
2- AuNP_2	2	NA	41,8	0,345	58,1	3,5	54,1	96,8
3- AuNP_3	3	NA	42,4	0,312	55,8	2,8	51,7	92
Ortalama			43,3	0,327	58,3	10,4	54,0	96,4

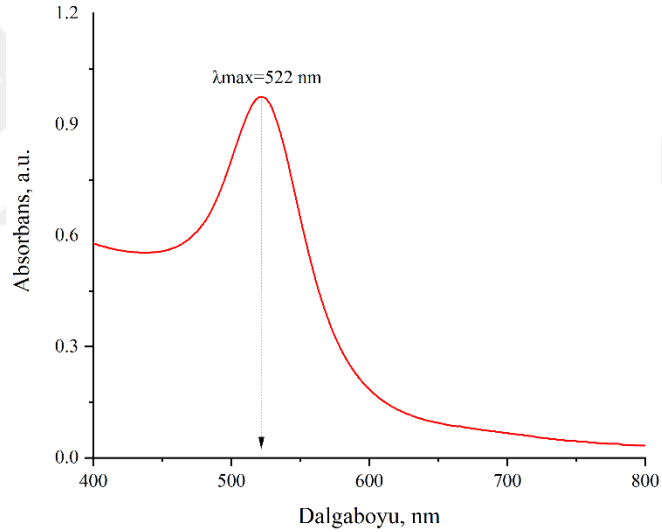
Şekil 4.5. 0,15 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen AuNP'lerin kümülatif yoğunluk dağılımına ait grafik

4.1.3. Spektrofotometrik Ölçümler

Sentezlenen AuNP'lerin spektroskopik karakterizasyonları UV-Vis NIR cihazı ile yapılmış olup 0,15 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen yaklaşık 40 nm boyutunda elde edilen AuNP'lerin maksimum absorbans değerinin 530 nm olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Elde edilen verilerin literatürle uyumlu olduğu kaydedilmiştir (X. Chen vd., 2022). Şekil 4.7'de ise 0,30 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen AuNP'lerin absorbans değerleri verilmiştir. Maksimum absorbans değeri 522 nm olarak ölçülmüştür. Nanopartiküllerin boyutlarının büyümesiyle maksimum absorbans değerlerinin sağa kaydığı yani dalgaboyu değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Yaklaşık 20 nm boyutundaki maksimum absorbans değerinin 522 nm'den 40 nm boyutundaki nanopartiküllerde 530 nm'ye kaydığı gözlenmiştir. Çünkü küresel olan altın nanopartiküllerin optik özellikleri büyük ölçüde nanopartiküllerin çapına bağlıdır. Boyutları küçük olan nanopartiküller öncelikle ışığı emer ve 520 nm civarında tepe noktası oluştururken, boyut büyüdükçe büyük küresel yapıya sahip altın nanopartiküller artan saçılma sergileyerek genişleyen ve daha uzun dalga boylarına doğru kayan pikler göstermektedir (kırmızıya kayma). Yani büyük boyutlu küreler daha fazla ışık saçmaktadır çünkü bu nanoparçacıklar hem daha büyük optik kesitlere sahiptirler hem de saçılmalarının toplam sönmeye oranları fazladır (WebSayfası2, 2024).



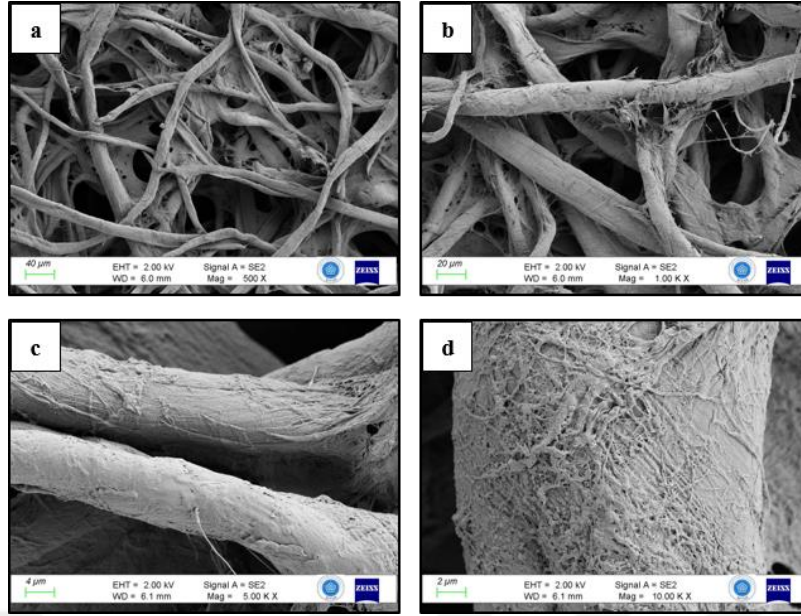
Şekil 4.6. 0,15 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen AuNP sulu çözeltisinin UV-Vis spektrumu



Şekil 4.7. 0,30 mM HAuCl₄xH₂O ile elde edilen AuNP sulu çözeltisinin UV-Vis spektrumu

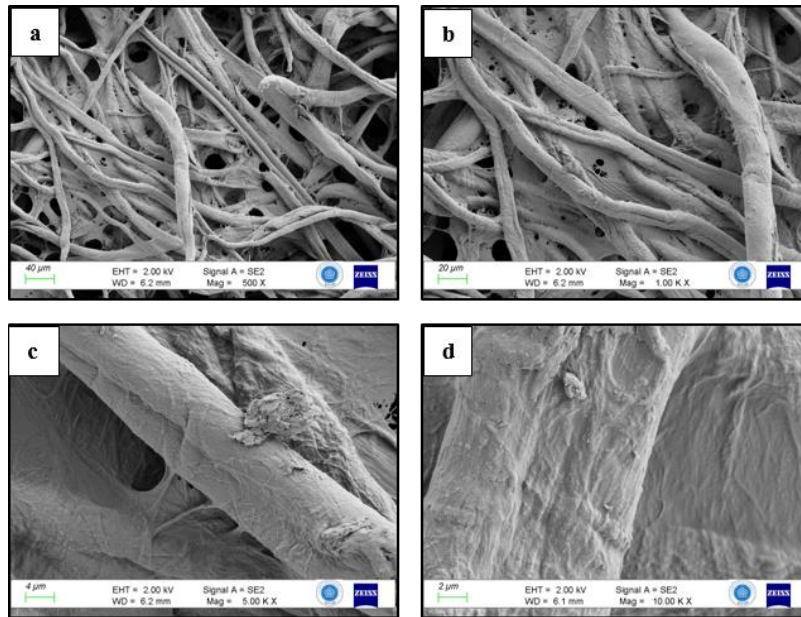
4.2. Numune Padi Karakterizasyonu

LFA sistemlerinde hedef analitin tespitini yapmak amacıyla numunenin damlatıldığı numune pedinin optimizasyonu oldukça önemlidir. Bunun için test kitinde analitin tespiti öncesi LFA bileşenlerine belirli ön işlemler yapılmaktadır. Şekil 4.8’de herhangi bir ön işlem yapılmamış numune pedine ait FESEM görüntüleri sunulmuştur. Sırasıyla 40 μm , 20 μm , 4 μm ve 2 μm ölçeğindeki fiber yapılarının yüzey morfolojileri incelenmiştir.



Şekil 4.8. Yıkılmamış numune pedine ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx

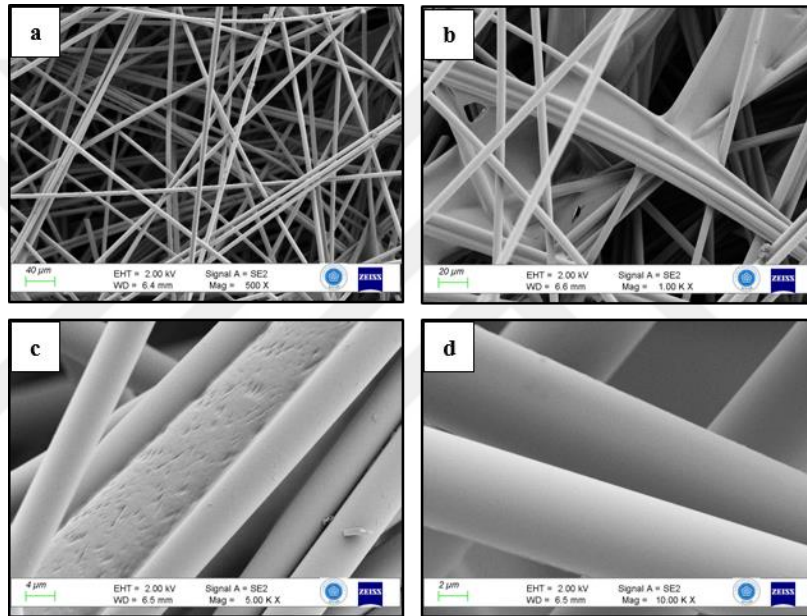
İmmünotampon çözeltisiyle yıkama işlemi sonrası numune pedinde meydana gelen morfolojik değişimi gözlemleyebilmek amacıyla da Şekil 4.9’da gösterilen FESEM görüntüleri alınmıştır. Yıkama işlemi öncesi elde edilen görüntülerle kıyaslandığında yıkama işlemi sonrası fiber aralarının gözeneklerin daha da kapalı hale geldiği gözlenmiştir. Bunun sebebinin yıkama çözeltisinde kullanılan immünotampon çözeltisi içerisindeki BSA ve PBS tamponundaki tuzdan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Yıkılmış numune pedine ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx

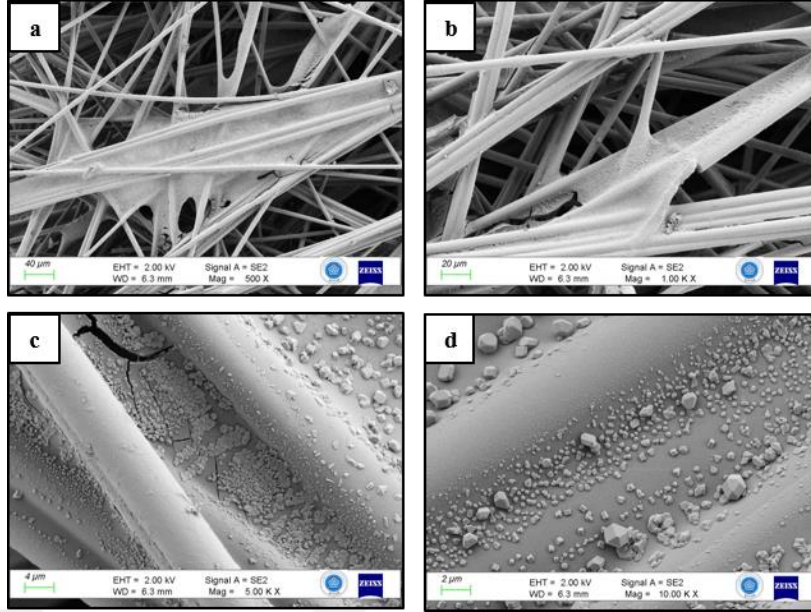
4.3. Konjugasyon Padi Karakterizasyonu

LFA sistemlerinin diğere önemli basamaklarından biri de konjugasyon aşamasıdır. Konjugasyon aşamasında antikorla AuNP'lerin konjugasyonu için önceden immünotampon çözeltisi ile yıkanmış ve 37 °C'de 2 saat süreyle etüvde kurutulmuş olan konjugasyon pedi (cam elyaf) kullanılmıştır. Konjugasyona hazır hale gelen cam elyaf kapalı ortamda muhafaza edilmiştir. Şekil 4.10'da herhangi bir ön yıkama işlemi yapılmamış cam elyafa ait farklı büyütmelerdeki (40 µm, 20 µm, 4 µm, 2 µm ölçeğindeki) FESEM görüntüleri sunulmuştur. Görüntülerden de anlaşılacağı üzere herhangi bir işlem yapılmamış cam elyafların yüzeyleri temizdir.



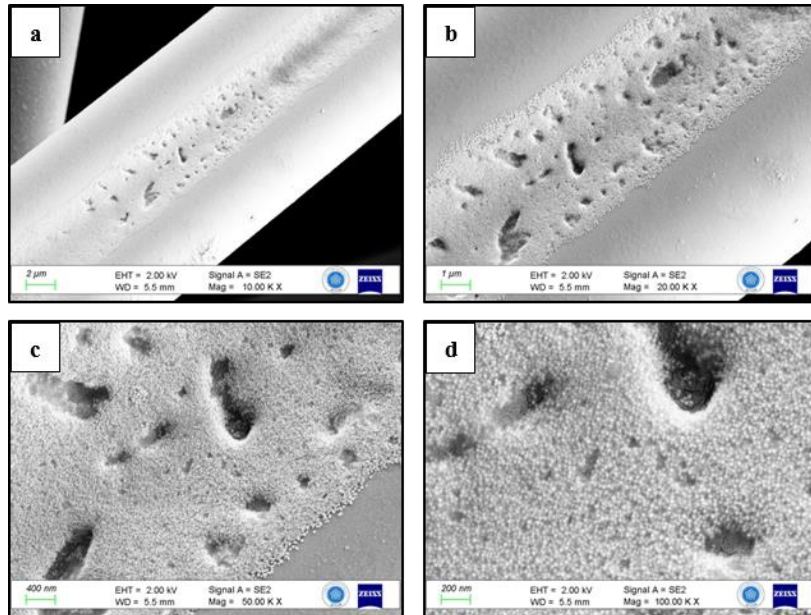
Şekil 4.10. Yıkanmamış cam elyafa ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 100x, c) 50x, d) 10x

İmmünotampon çözeltisi ile yıkama işlemi sonrası alınan görüntüler (Şekil 4.11) ise Şekil 4.10'daki görüntülerle kıyaslandığında cam elyaflar arasında partiküllerin varlığı gözlenmiştir. Yıkama işlemi yapılmamış cam elyafların aksine fiber yüzeylerinde biriken bu partiküllerin yıkama aşamasında kullanılan BSA ve PBS tamponundan kaynaklanan katı formlar olduğu düşünülmektedir.



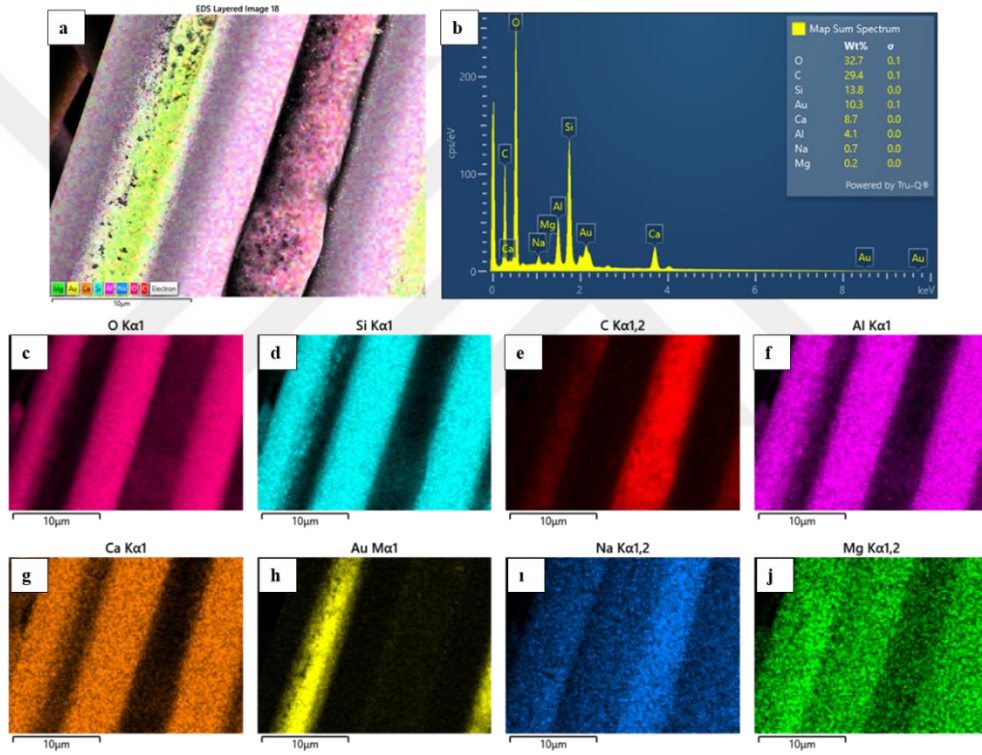
Şekil 4.11. Yıkamış cam elyafa ait FESEM görüntüleri, a) 500x, b) 1kx, c) 5kx, d) 10kx

Konjugasyon aşamasından sonra elde edilen cam elyafların AuNP'lerle konjuge olup olmadığını anlamak amacıyla konjuge edilmiş cam elyafların yürütme basamağı öncesi FESEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen görüntülerde AuNP'lerin çoğunlukla fiberler arasında olmak üzere fiber yüzeylerinde de toplandığı gözlenmiştir. Konjuge edilmiş cam elyafların 2 µm, 1 µm, 400 nm, 200 nm ölçeğindeki büyütmelerdeki FESEM görüntüleri Şekil 4.12.a-d'de gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafa ait FESEM görüntüleri, a) 10kx, b) 20kx, c) 50kx, d) 100kx

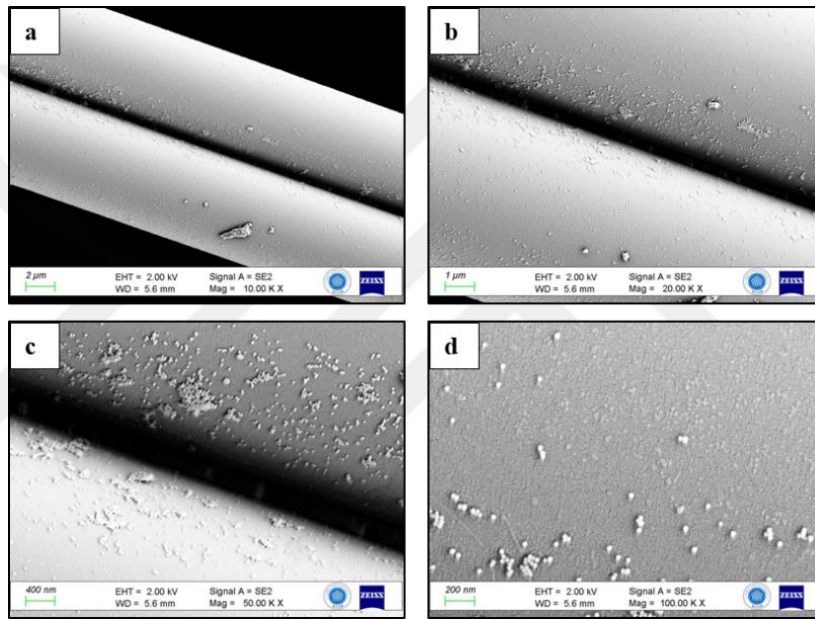
Konjugasyon aşamasındaki cam elyafa bulunan altın miktarını ve değişimini gözlemlemek amacıyla Enerji Dağılım X-Işını Spektroskopisi (EDX) analizi yapılmıştır. Cam elyaftaki yürütme öncesi ve yürütme sonrası madde miktarında meydana gelen değişimler kalitatif ve kantitatif olarak gözlemlenmiştir. Bu amaçla 10 μm 'lik bir alanda yapılan EDX haritalamasında silisyum (Si), karbon (C), oksijen (O), alüminyum (Al), kalsiyum (Ca), sodyum (Na), magnezyum (Mg), altın (Au) elementlerinin varlığı kalitatif olarak kanıtlanmıştır. Haritalamanın elementel dağılımı incelendiğinde AuNP'lerin genellikle fiberler arasında yoğun olmakla birlikte fiber yüzeylerine de dağıldığı görülmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. a., c.-j) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafa ait EDX haritalandırması, **b)** Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafa ait EDX dağılım spektrumu

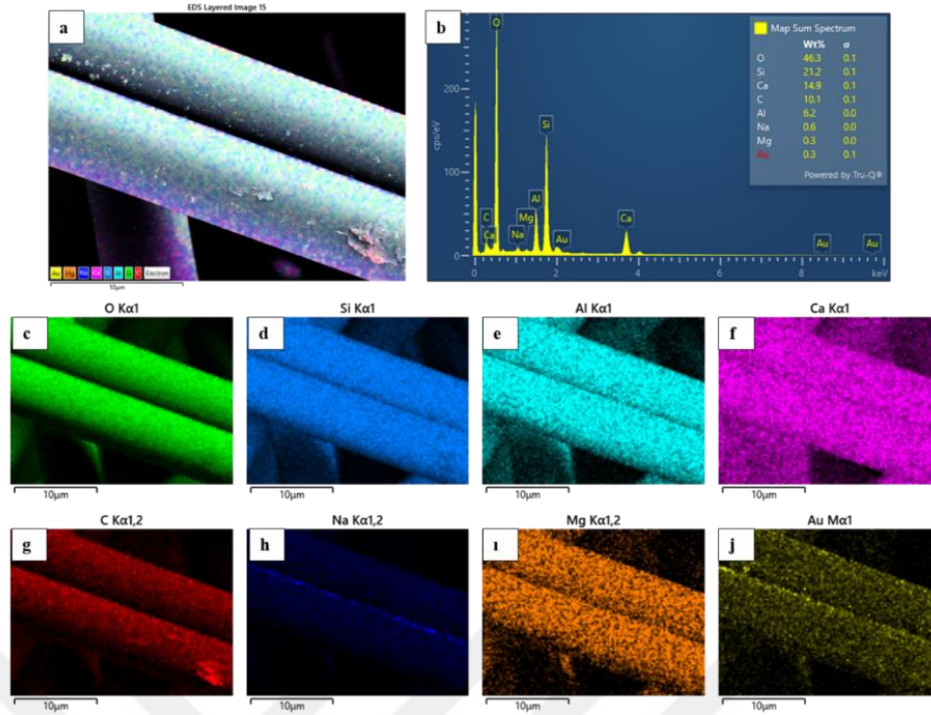
Konjugasyon sonrası elde edilen cam elyafa ait EDX spektrumu Şekil 4.13. b'de gösterilmektedir. Literatürde yapılan cam elyaf EDX spektrum sonuçlarına bakıldığında Si, O, C, Mg, Na, Al elementlerinin cam elyafın kendi bileşiminde olduğu teyit edilmiştir (Saribiyik & Gurbuz, 2021). Altının ise konjugasyonda eklenen AuNP'den geldiği anlaşılmaktadır. Elde edilen spektrum sonuçlarından konjugasyon sonrası ve yürütme öncesi cam elyaftaki Au miktarının kütlece % 10,3 olduğu belirlenmiştir.

Konjugasyon aşamasından sonra yürütme öncesi ve yürütme sonrası cam elyaftaki topografik ve morfolojik değişimleri gözlemek amacıyla yapılan karakterizasyon çalışmaları kapsamında alınan FESEM görüntüleri Şekil 4.14'te gösterilmektedir. Yürütme sonrası antikorlarla konjuge olmuş altın nanopartiküllerin yüzeylerden ve özellikle de toplanmış oldukları fiber aralarından ayrıldığı gözlenmiştir. Yürütme aşamasında ortamdaki altınların görevlerini yerine getirdiği ve konjugasyon basamağında cam elyafta bulunan nanoparçacıkların testin çalışması esnasında test ve kontrol çizgisi bölgelerine taşındığı ve o bölgelerde meydana gelen pembe renk değişimine sebep olduklarını göstermiştir.



Şekil 4.14. Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyaftın yürütme sonrası FESEM görüntüleri, **a)**10kx, **b)** 20kx, **c)** 50kx, **d)** 100kx

Yürütme sonrası, cam elyaftı terk eden AuNP miktarını anlamak amacıyla EDX haritalama ve spektrum analizleri yapılmıştır. Bu amaçla yapılan EDX haritalamasına ait sonuçlar Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



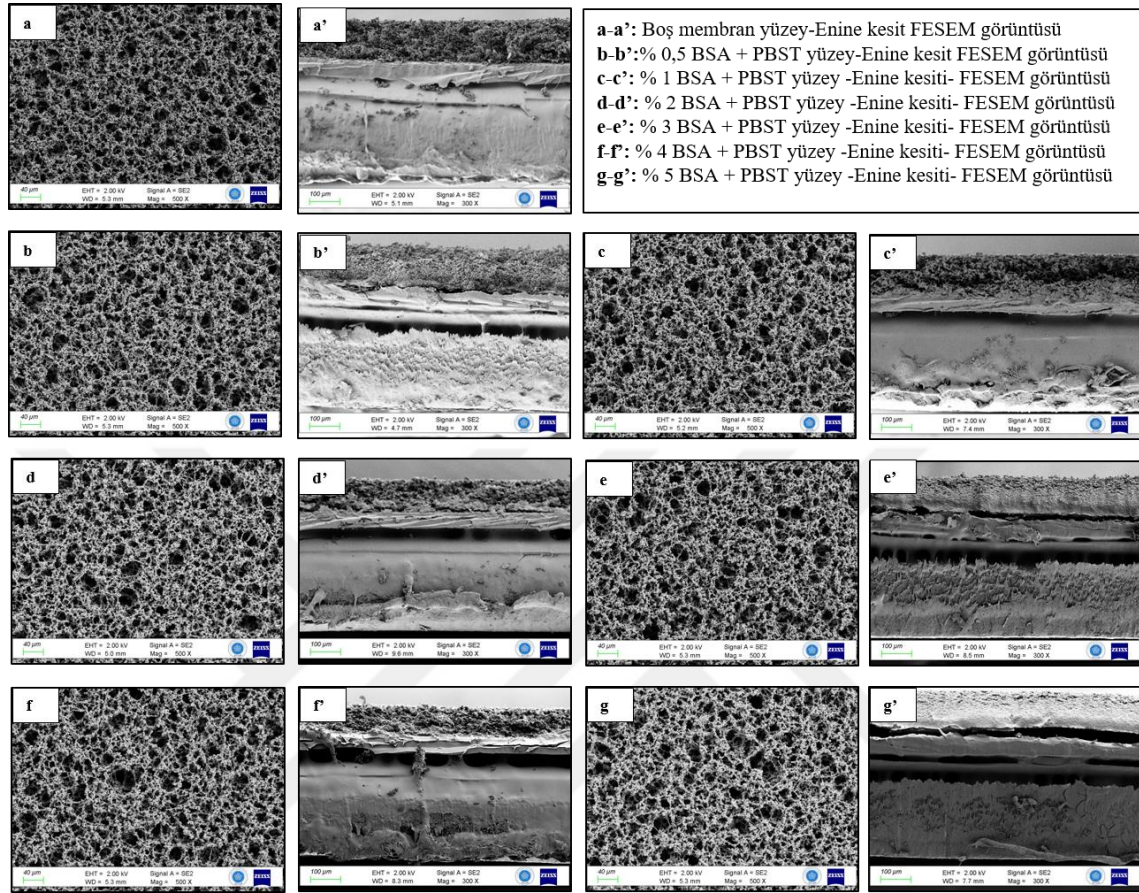
Şekil 4.15. a), c.-j) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafın yürütme sonrası EDX haritalandırması b) Antikor- AuNP konjugasyon sonucunda elde edilen cam elyafın yürütme sonrası EDX dağılım spektrumu

Yürütme sonrası elde edilen cam elyafa ait EDX spektrumu Şekil 4.15.b’de sunulmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde yürütme öncesi kütlece %değeri 10,3 olan altının kütlece değerinin %0,3’e düştüğü belirlenmiştir. Altın elementi yüzdesindeki bu azalışın yürütme sonrası cam elyafı terk eden AuNP’lerden kaynaklandığı anlaşılmıştır.

4.4. Membran Karakterizasyonu

Membran yüzeyinin karakterizasyonunu yapmak ve yıkama aşamalarındaki BSA miktarının membran yüzeyine etkisini araştırmak amacıyla farklı oranlarda BSA ile yıkanmış ve yıkanmamış membranların elektron mikroskopuyla yüzey morfolojisi incelenmiştir. Bunun için membranlar sırasıyla %0,5, %1, %2, %3, %4 ve %5 BSA içeren immünotampon çözeltileriyle yıkanmış ve 37 °C’de 2 saat süreyle etüvde kurumaya bırakılmıştır. Yıkanmış membranlardaki değişimi gözlemlemek amacıyla referans olarak işlem yapılmamış (immünotampon ile yıkanmamış boş membran) membran kullanılmıştır. Her bir membranın hem yüzey hem de enine kesit FESEM görüntülemeleri yapılmıştır. Şekil 4.16’daki FESEM görüntülerinden anlaşıldığı üzere yüzey görüntülerinde herhangi bir farklılık bulunmamaktadır. Yüzey morfolojisinde nitroselüloz membranın klasik gözenekli yapısı gözlenmiştir (Hasan, 2019). Ancak enine

kesit görüntülerinde immünotampon çözeltisi ile yıkanan membran üst yüzeyinin yüzeyden ayrıldığı gözlemlenirken boş membranda böyle bir durum gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.16. a) Boş membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, a') Boş membrana ait enine kesit görüntüsü, b) %0,5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, b') %0,5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, c) % 1 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, c') % 1 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, d) %2 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, d') % 2 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, e) %3 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, e') %3 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, f) %4 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, f') %4 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü, g) %5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait yüzey FESEM görüntüsü, g') %5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membrana ait enine kesit görüntüsü

4.5. LFA Sisteminde Yatak Hacmi (Boşluk/Ölü Hacim) Hesaplaması

Yatay akış test kitlerinde hedef analitin numune pedine eklenmesinden sonra membran yüzeyindeki yürüyüşünde yatak hacmi veya boşluk/ölü hacim diye belirtilen parametre oldukça önemlidir. Yatak hacmi, test kiti içerisinde bulunan havanın hacmidir yani membranı ıslatmak için gereken toplam sıvı hacmini hesaplamak için

kullanılmaktadır. Yatak hacmi Eşitlik 1’de ifade edilen formülle hesaplanmaktadır (Millipore, 2013; Parolo vd., 2020).

$$Yatak\ Hacmi = Toplam\ ped\ hacmi \times \%Gözeneklilik \quad (1)$$

Eşitlik 1 kullanılarak bu çalışmada kullanılan kitin membran yatak hacmi (6 cm uzunluğunda, 5 mm genişliğinde, 0,0185 cm kalınlığında ve %70 gözenekliliğe sahip olan kit için) 38,85 μ L olarak bulunmuştur. Ancak yatak hacmi özellikle atık pedinin kullanılmadığı durumlarda önem arz etmektedir (Millipore, 2013; Parolo vd., 2020). Bu tez çalışmasında LFA tasarımında atık pedi kullanıldığı için yatak hacmi dikkate alınmamıştır. Literatürde analit çözeltisinin ideal miktarı olarak belirlenen 200 μ L değeri, 7 mm kalınlığındaki test kiti için önerilmiştir (Millipore, 2013). Bu çalışmada kullanılan kitin genişliğinin de 5 mm kalınlığında olmasından dolayı literatürde önerilen bu miktar kullanılarak çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

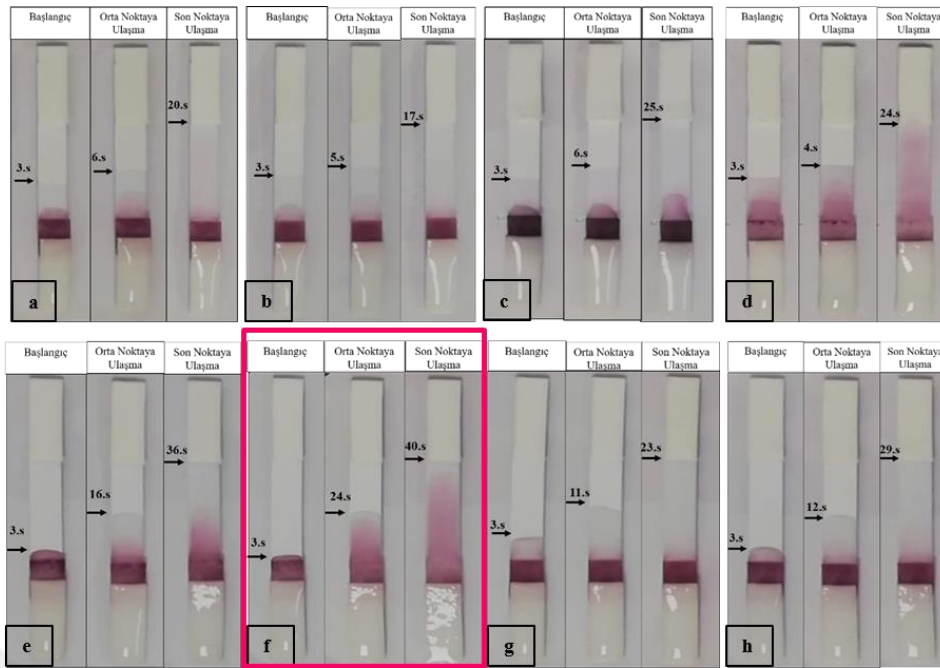
4.6. Numune Padi, Cam Elyaf ve Membran Optimizasyonu

Numune pedine damlatılan analitin etkisiyle konjugasyon pedindeki AuNP’lerin yatay akış platformlarındaki akış hızı incelenmiştir. Bunun için belirli parametrelerde çalışmalar yapıp AuNP’nin membran yüzeyinde ilk 3 saniyede ulaştığı bölge, orta noktaya gelme hızı ve son noktaya ulaşma hızı (saniye cinsinden) değerlerine bakılarak kullanılacak optimum koşullar belirlenmiştir.

Şekil 4.17’de membran yüzeyine herhangi bir işlem yapılmamış olmakla birlikte, konjugasyonda kullanılan cam elyafa ve numune pedine immünotampon ile yıkamanın etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.17.a’daki cam elyaf ve numune pedi de yıkanmamıştır. Şekil 4.17.b’de ise membranın yüzeyine herhangi bir işlem yapılmadan cam elyaf yıkanmamış ancak numune pedi %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Diğer parametreler aynı tutularak yapılan değerlendirmede numune pedine yıkamanın etkisine bakıldığında ilk, orta ve son noktaya ulaşma sürelerinin hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Şekil 4.17.c’de cam elyaf ve numune pedi %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmış olup membran yıkanmamıştır. Şekil 4.17.d’de ise numune pedine ve membrana herhangi bir işlem yapılmamış olup cam elyaf %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Elde edilen kitlerin aynı noktalara ulaşma sürelerine bakılmıştır. Şekil 4.17.b ve Şekil 4.17.c’ye bakıldığında yıkanmış numune

pediyle yapılan denemede yıkanmış cam elyaf ile yapılan deneme yıkanmamış cam elyaf ile yapılan denemeden daha uzun sürede karşıya ulaşmıştır. Böylece yapılan çalışma sonucu numune pedi ve cam elyafın immünotampon çözeltisi ile yıkanarak kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.17.e-h'de ise membrana yıkama işlemleri yapılmış olup diğer parametreler değiştirilmiştir. Şekil 4.17.e'de cam elyaf ve membran %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmış olup numune pedi yıkanmamıştır. Şekil 4.17.f'de ise tüm bileşenler %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır.

Bundan sonraki aşamada yıkanmanın membran üzerine etkisini incelemek amacıyla yıkanmış numune pedi, yıkanmış cam elyaf kullanılarak yıkanmış ve yıkanmamış iki parametre kıyaslanmıştır. Şekil 4.17.c ve Şekil 4.17.f'ye bakıldığında her ikisinde de cam elyaf ve numune pedi %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Membran yüzeyi ise Şekil 4.17.c'de yıkanmamış ancak Şekil 4.17.f'de %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Karşıya ulaşma sürelerine bakıldığında tüm parametreler yıkanarak elde edilen sistemde karşıya ulaşma süresi 40 saniyeyi bulurken yıkanmamış membranda ise 25 saniye gibi kısa sürede gerçekleşmektedir. Ancak yatay akış testlerinde istenilen analitin test ve kontrol çizgilerini atlayarak etkileşimi sağlamayacağı düşünüldüğü için akış hızının bu kadar hızlı olması da istenilmemektedir. Aynı zamanda Şekil 4.17.f'de yani tüm parametreler yıkanarak özellikle yıkanmış membranda konjugasyon pedindeki AuNP'lerin membran yüzeyinde dağılarak ilerlediği ve karşı noktaya ulaştığı görülürken Şekil 4.17.c'de böyle bir durum söz konusu değildir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında çalışmalar boyunca membran yüzeyinin, numune pedinin ve cam elyafın immünotampon çözeltisi ile yıkanarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.17. İmmünotampon çözeltisi ile yıkamanın numune pedi ve cam elyaf üzerine etkisi, **a)** Yıkanmamış cam elyaf, yıkanmamış membran, yıkanmamış numune pedi, **b)** Yıkanmamış cam elyaf, yıkanmamış membran, yıkanmış numune pedi, **c)** Yıkanmış cam elyaf, yıkanmamış membran, yıkanmış numune pedi, **d)** Yıkanmış cam elyaf, yıkanmamış membran, yıkanmamış numune pedi, **e)** Yıkanmış cam elyaf, yıkanmış membran, yıkanmamış numune pedi, **f)** Yıkanmış cam elyaf, yıkanmış membran, yıkanmış numune pedi, **g)** Yıkanmamış cam elyaf, yıkanmış membran, yıkanmamış numune pedi, **h)** Yıkanmamış cam elyaf, yıkanmış membran, yıkanmış numune pedi

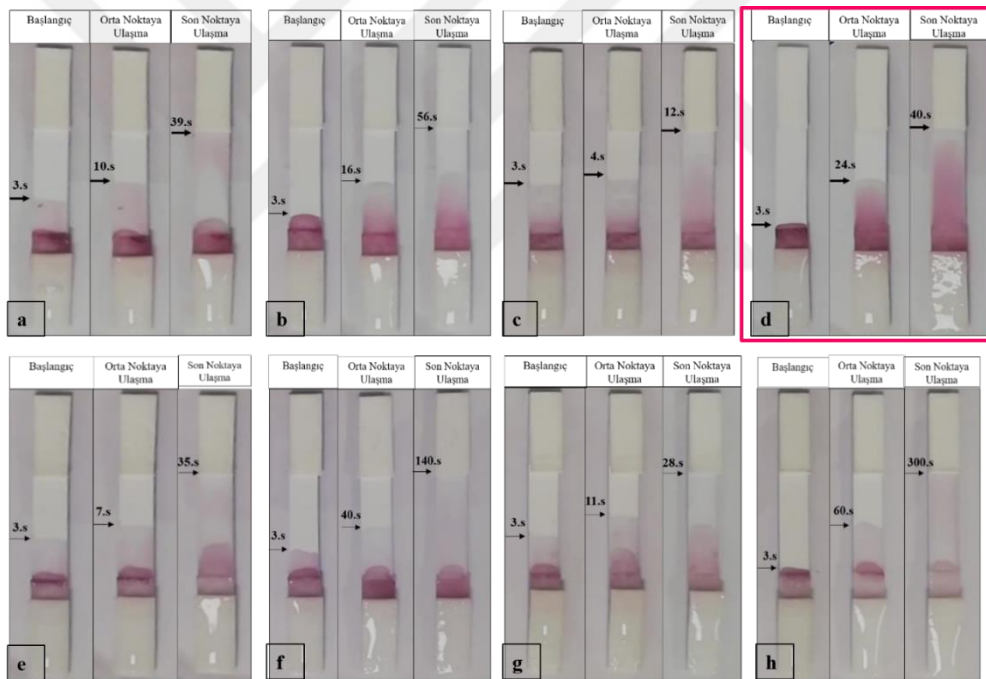
4.6.1. Tampon Çözeltilisindeki Sükroz Optimizasyonu

Konjugasyon aşamalarında borat tamponu içerisinde kullanılan sükroz çözeltisinin yüzdesinin konjugasyona etkisini araştırmak amacıyla %5, %10, %15 ve %20 oranlarda sükroz içeren borat tamponunun optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sükroz etkisini araştırırken aynı zamanda membran optimizasyonu da göz önünde bulundurulmuş ve immünotampon çözeltisiyle yıkanmış membran ve hiçbir işlem uygulanmamış membranlar kullanılmıştır. Şekil 4.18.a-h'de farklı parametrelerdeki çalışmalara ait AuNP'lerin ilk, orta ve son noktaya ulaşma süreleri gösterilmektedir.

Şekil 4.18.a ve Şekil 4.18.b'de %5 sükroz içeren borat tamponu kullanılarak konjugasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup, Şekil 4.18.b'deki membran immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Şekil 4.18.c ve Şekil 4.18.d'de %10 sükroz içeren borat tamponu kullanılmış olup Şekil 4.18.d'deki membran immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Şekil 4.18.e ve Şekil 4.18.f'de %15 sükroz içeren borat tamponu kullanılarak konjugasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup, Şekil 4.18.f'deki membran immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Şekil 4.18.g ve Şekil 4.18.h'de ise %20 sükroz içeren borat

tamponu kullanılarak konjugasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup, Şekil 4.18.h'deki membran immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır.

Yapılan çalışmada bütün parametreler incelendiğinde membran yüzeyinin immünotampon çözeltisiyle yıkanmasının analitin hızlı bir şekilde akıp gitmesini engellemiş olmakla birlikte nanopartiküllerin akışını olumlu yönde etkilediği görülmüştür. İmmünotampon çözeltisiyle yıkanmış membranların sükröz yüzdesi değerlendirildiğinde ise sükröz yüzdesi arttıkça özellikle %10'dan sonra yürüme hızının yavaşladığı ve nanopartiküllerin yüzeyde dağılımının zorlaştığı fark edilmiştir. Şekil 4.18.b,d,f,h'deki sonuçlara bakılarak ideal süre ve yüzeydeki yürüme parametresi değerlendirildiğinde %10 sükröz içeren borat tamponunun ideal bir sonuç verdiği gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda %10 sükröz içeren borat tamponu ile çalışmalara devam edilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

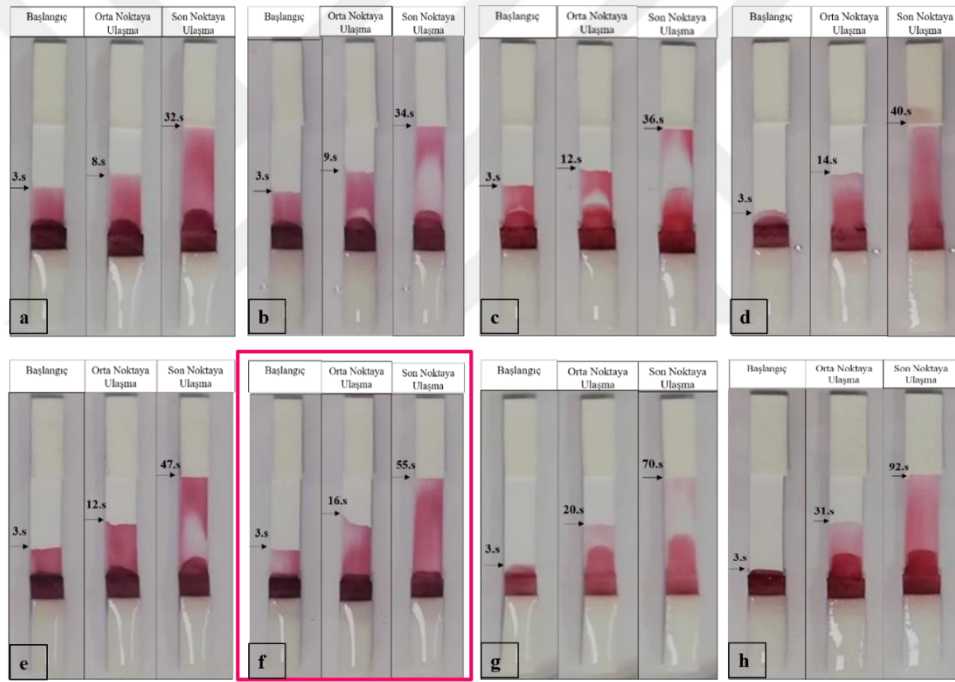


Şekil 4.18. Tampon çözeltisindeki sükröz ve membran optimizasyonu denemeleri, **a)** %5 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, **b)** %5 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran, **c)** %10 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, **d)** %10 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran, **e)** %15 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, **f)** %15 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran, **g)** %20 sükröz borat tamponu, yıkanmamış membran, **h)** %20 sükröz borat tamponu, yıkanmış membran.

4.6.2. Membran Optimizasyonu

Yapılan optimizasyonlar sonucu yıkanmış membran kullanılmasına karar verilmiş olup, membran denemelerinde başlangıçta literatürde genellikle en çok tercih edilen yıkama yüzdesi olan %5 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkamalar yapılmıştır.

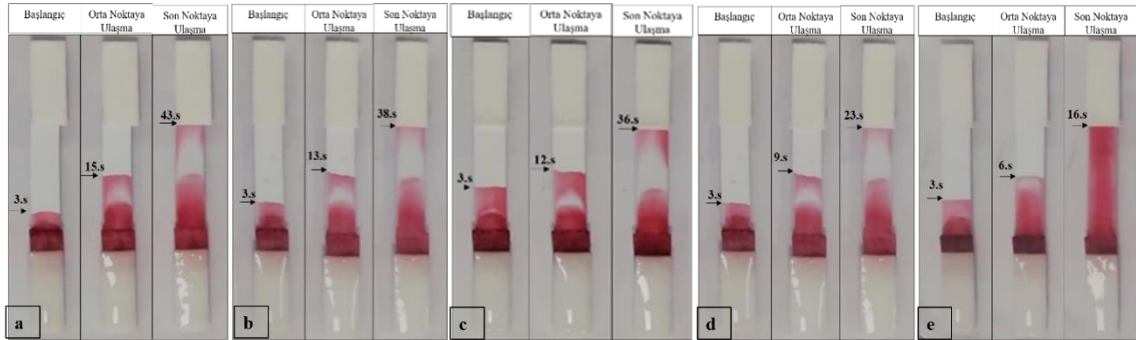
Ancak membran optimizasyonunu sağlamak amacıyla immünotampon çözeltisinde kullanılacak BSA oranını belirlemek ve BSA'nın yürüme hızına etkisini araştırmak amacıyla membran yüzeyi farklı oranlarda BSA içeren immünotampon çözeltileriyle yıkanmıştır. Bu kapsamda membran yüzeyi saf su, PBS, %0,5'lik BSA, %1'lik BSA, %2'lik BSA, %3'lük BSA, %4'lük BSA ve %5'lik BSA içeren immünotampon çözeltileri ile yıkanmıştır ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.19.a-g'de gösterilmiştir. Membran optimizasyonuna ait çalışmalar incelendiğinde artan BSA oranının membran yüzeyindeki nanopartiküllerin hareketini kısıtladığı ve akış süresini uzattığı görülmektedir. %0,5 BSA kullanılarak hazırlanan immünotampon ile yapılan yıkama çalışmaları %5 BSA kullanılarak hazırlanan immünotampon çözeltisi ile yapılan çalışmayla kıyaslandığında her artan BSA miktarıyla sürelerin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.19. Membran denemeleri **a)** Saf su ile yıkanmış membran, **b)** PBS ile yıkanmış membran, **c)** %1 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran **d)** %2 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran, **e)** %3 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran, **f)** %4 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran, **g)** %5 BSA içeren immünotampon ile yıkanmış membran

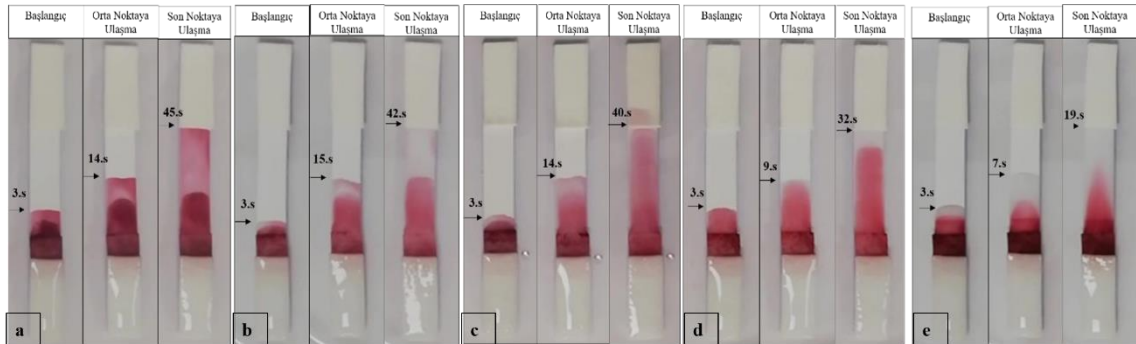
Tez çalışmasında membran optimizasyonunda araştırılması gereken diğer bir parametre de Tween-20 oranlarının yürüme hızına etkisi olmuştur. Her bir BSA yüzdesiyle farklı oranlardaki Tween-20 miktarlarının yürüme hızına olan etkisi incelenmiştir. Sırasıyla %0,01, %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,100 oranlarındaki Tween-20 miktarları kullanılarak çalışılmıştır. Şekil 4.20.a-e'de sırasıyla %0,01, %0,025,

%0,050, %0,075 ve %0,100 oranlarındaki Tween-20 içeren ve %0,5 BSA ile yıkanmış membranda yürütme çalışmalarına ait sonuçlar ifade edilmektedir.



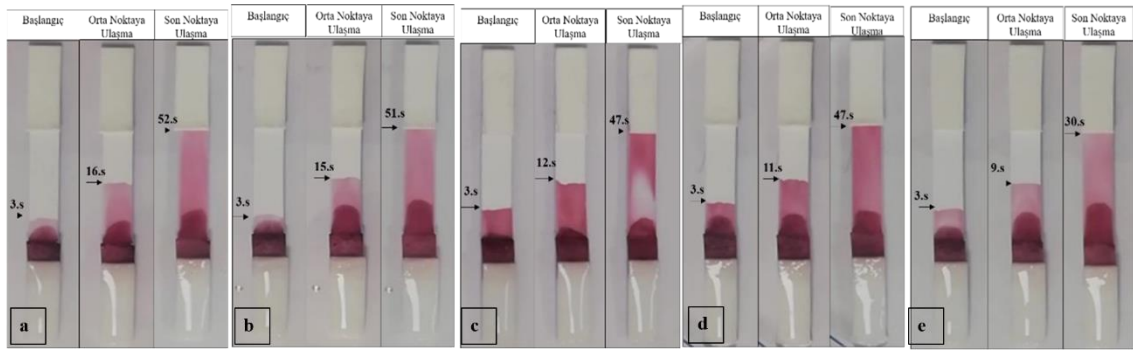
Şekil 4.20. %0,5 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20 ve e) %0,100 Tween-20

Şekil 4.21'de %1 BSA ile yıkanmış membran ve sırasıyla %0,01, %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,100 oranlarındaki Tween-20 kullanımına ait çalışmaların sonuçları ifade edilmektedir. Şekil 4.21.a.'da %1 BSA ve %0,01 Tween-20, Şekil 4.21.b.'de %1 BSA ve %0,025 Tween-20, Şekil 4.21.c.'de %1 BSA ve %0,050 Tween-20, Şekil 4.21.d.'de %1 BSA %0,075 Tween-20 ve Şekil 4.21.e.'de ise %1 BSA ve %0,100 Tween-20 oranlarına ait çalışmalar gösterilmektedir.

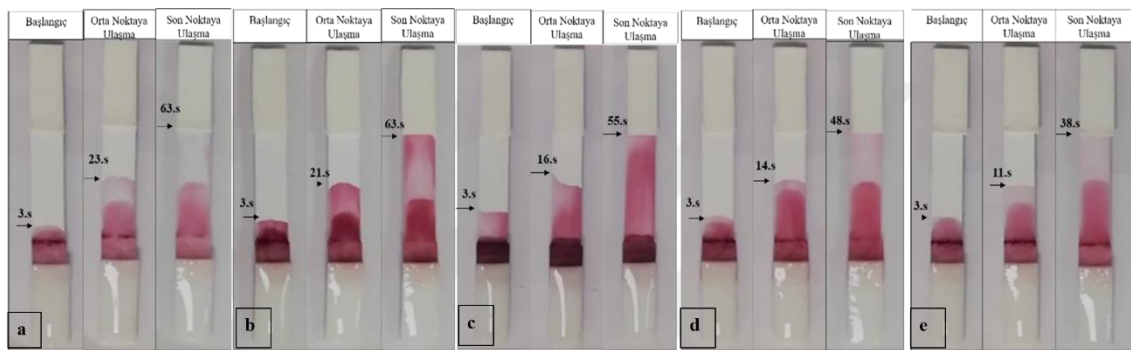


Şekil 4.21. %1 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20 ve e) %0,100 Tween-20

Diğer bir parametrede ise %2 BSA ile yıkanmış membranda sırasıyla %0,01, %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,100 oranlarındaki Tween-20 oranları denenmiştir. Bu değerlendirmelere ait sonuçlar Şekil 4.22 a-e'de gösterilmektedir. Şekil 4.23. a-e'de ise %3 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmış membran kullanılarak farklı oranlardaki (%0,01, %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,100) Tween-20 oranlarında yapılan çalışmalar gösterilmektedir.

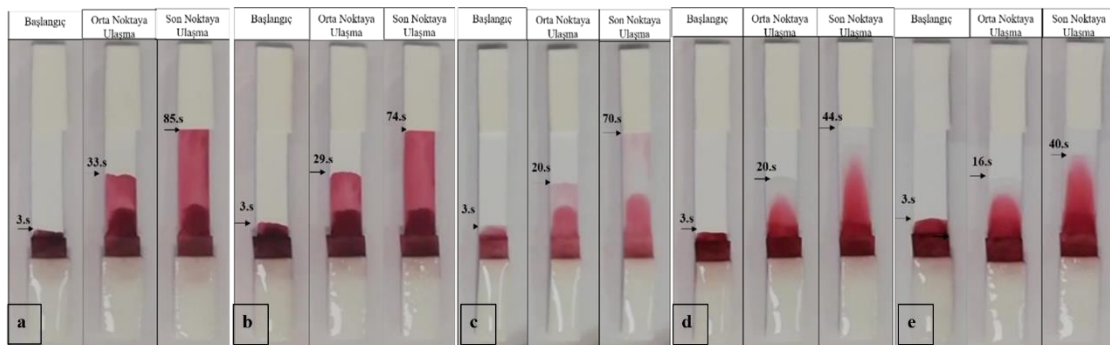


Şekil 4.22. %2 BSA ile yıkanmış membran **a)** %0,01 Tween-20, **b)** %0,025 Tween-20, **c)** %0,050 Tween-20, **d)** %0,075 Tween-20 ve **e)** %0,100 Tween-20



Şekil 4.23. %3 BSA ile yıkanmış membran **a)** %0,01 Tween-20, **b)** %0,025 Tween-20, **c)** %0,050 Tween-20, **d)** %0,075 Tween-20, **e)** %0,100 Tween-20

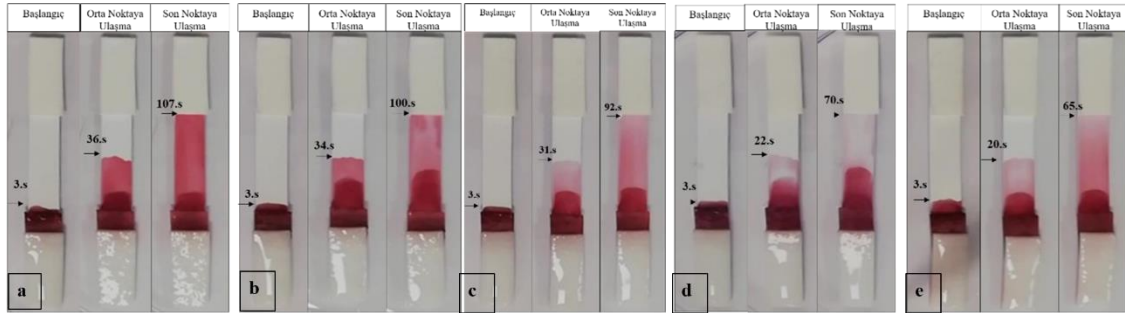
BSA oranı artırılarak yapılan çalışmalarda %4 BSA ile yıkanmış membranda yine aynı oranlardaki (%0,01, %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,100) Tween-20'ler kullanılarak elde edilen veriler Şekil 4.24.a-e'de sunulmuştur.



Şekil 4.24. %4 BSA ile yıkanmış membran **a)** %0,01 Tween-20, **b)** %0,025 Tween-20, **c)** %0,050 Tween-20, **d)** %0,075 Tween-20, **e)** %0,100 Tween-20

Şekil 4.25'te ise %5 BSA ile yıkanmış membran ve sırasıyla %0,01, %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,100 oranlarındaki Tween-20'ye ait çalışmalar ifade edilmektedir.

Şekil 4.25.a' da %5 BSA ve %0,01 Tween-20, Şekil 4.25.b'de %5 BSA ve %0,025 Tween-20, Şekil 4.25.c'de %5 BSA ve %0,050 Tween-20, Şekil 4.25.d'de %5 BSA, %0,075 Tween-20 ve Şekil 4.25.e.'de ise %5 BSA ve %0,100 Tween-20 oranlarına ait çalışmalar gösterilmektedir.

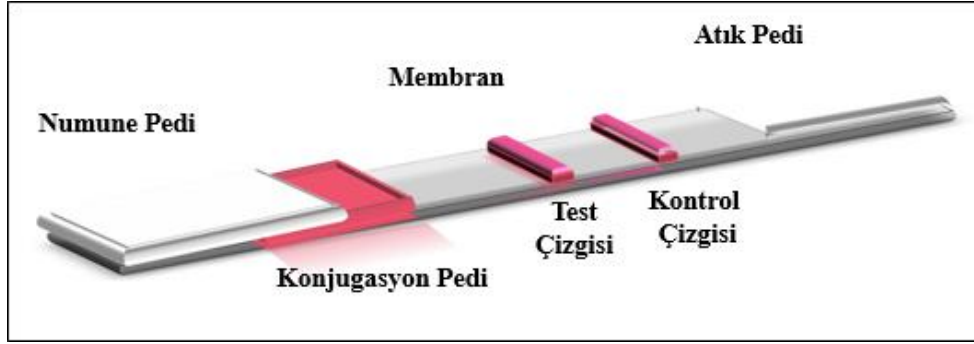


Şekil 4.25. %5 BSA ile yıkanmış membran a) %0,01 Tween-20, b) %0,025 Tween-20, c) %0,050 Tween-20, d) %0,075 Tween-20, e) %0,100 Tween-20

Optimizasyonlar sonucu test kitinde yürütmelerin süreleri incelendiğinde Tween-20 oranı arttıkça nanopartiküllerin membran yüzeyindeki yürüme süreleri azalmıştır. Tween-20 oranının artması ile yürüme süresinin ters orantılı olarak hareket ettiği gözlenmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda membran yüzeyinde akış süresi ve konjugasyon pedindeki AuNP'lerin yüzeyde dağılıma oranlarına bakıldığında en ideal koşulun %3 BSA ve %0,050 Tween-20 içeren immünotampon çözeltisi olduğu gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu parametrelerle devam edilmiştir.

4.7. Kalitatif Tayin Çalışmaları

Şekil 4.26'da gösterildiği gibi LFA tasarımı 4 temel bileşenden oluşmaktadır. LFA sisteminde kalitatif ve kantitatif tayinin yapılabilmesi için yani test ve kontrol çizgilerinin elde edilmesi için gerekli olan membran, konjugasyon pedi, numune pedine ait optimizasyonlar yapıldıktan sonra elde edilen verilerle BH tayinine yönelik LFA test kitinin başarılı bir şekilde çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. Tez çalışmasında hedef analit olan BH'nin kalitatif ve kantitatif tayini için yapılan optimizasyonlar ise aşağıda detaylı bir şekilde sunulmuştur.



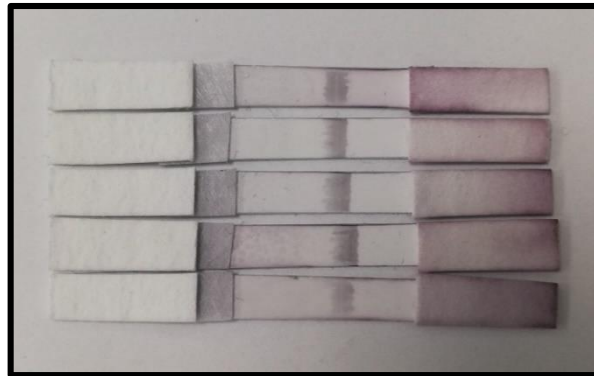
Şekil 4.26. Genel LFA tasarımı

4.7.1. Kontrol Çizgisi Optimizasyonu

Kontrol çizgisi optimizasyonu için membran yüzeyine yazdırılan antikor miktarı ve yazdırma işlemindeki çizgilerin homojen dağılması için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda en belirgin kontrol çizgisi eldesi için farklı miktarlarda antikorlarla çalışılmıştır. Konjugasyonda 20 mL AuNP 9000 rpm'de 40 dk santrifüj yapılmıştır. Üzerine 100 μ L borat tamponu daha sonra 100 μ L %1 BSA içeren borat tamponu ve 2,5 μ L m-BH antikor eklenmiştir. 20 dakika 25 °C ve 640 rpm'de soğutmalı çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 100 μ L %10 sükröz içeren borat tamponu eklenmiştir. Çizelge 4.1'de kontrol çizgisi çalışmalarında kullanılan miktarlar gösterilmektedir. Belirtilen miktarlarda antikorlar kullanarak elde edilen kontrol çizgileri Şekil 4.27'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol çizgisi miktarları (Etil alkol kullanımı öncesi)

Kontrol Çizgisi	
Antikor miktarı	3 μ L ikincil antikor (Keçi-Tavşan)
PBS	10 μ L
Membran uzunluğu	4,5 cm



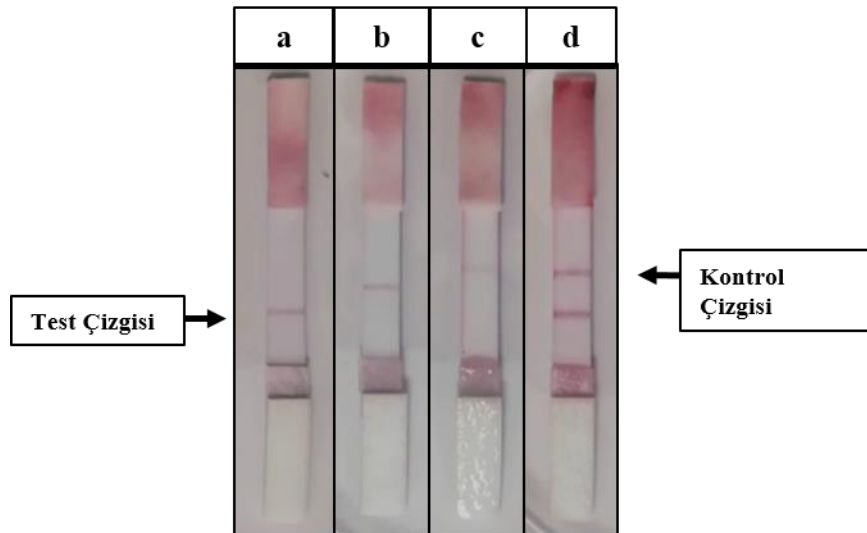
Şekil 4.27. Kontrol çizgisi optimizasyon çalışmaları (Etil alkol kullanımı öncesi)

Yazdırma sırasında kontrol çizgisi bölgesindeki antikorun gereğinden fazla dağıldığı görülmüştür. Geleneksel kontrol çizgisi görüntüsünden uzak kontrol çizgisi görüntüsünü yok etmek ve daha çizgisel forma sahip bir görüntü elde etmek için yapılan literatür araştırması sonucu antikor çözeltisine %1-10 oranında alkol (etil alkol, izopropil alkol veya metil alkol) (Millipore, 2013) eklenmesine karar verilmiştir. Bu tez çalışmasında test ve kontrol çizgilerinin membran yüzeyine yazdırılmasında etil alkol kullanımına karar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol çizgisi miktarları (Etil alkol kullanımı sonrası)

Kontrol Çizgisi	
Antikor miktarı	3 μ L ikincil antikor (Keçi-Tavşan)
PBS	10 μ L
Etil alkol	2 μ L
Membran uzunluğu	4,5 cm

Çizelge 4.2’de ifade edilen miktarlardaki kontrol çizgileri LFA sisteminde kullanılacak olan membranda farklı bölgelere yazdırılarak kontrol çizgisindeki şiddetindeki değerlerine göre çizgi yerine karar verilmiştir. Şekil 4.28.a’da kontrol çizgisi antikoru test çizgisi bölgesine, Şekil 4.28.b’de kontrol çizgisi antikoru test çizgisi ve kontrol çizgisinin orta bölmesine, Şekil 4.28.c’de kontrol çizgisi antikoru, kontrol çizgisi bölmesine ve en son olarak da Şekil 4.28.d’de kontrol çizgisi antikoru hem test çizgisi bölmesine ve hem de kontrol çizgisi bölmesine yazdırılmıştır.

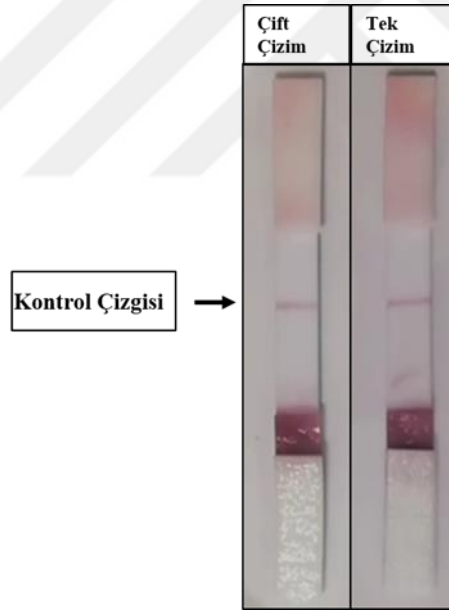


Şekil 4.28. Kontrol çizgisi optimizasyon çalışmaları (Etil alkol kullanımı sonrası)

Sonuçlar incelendiğinde kontrol çizgisi bölgesi olarak konjugasyon pedine en uzak ve atık pedine yakın olan bölgedeki kontrol çizgisi şiddetinin en belirgin ve en ideal olduğu bölgeye karar verilmiştir. Ayrıca kullanılan yaklaşık %10'luk etil alkol ile de daha homojen ve daha düzgün çizgiler elde edildiği gözlenmiştir. Yazdırma parameterlerinin belirlenmesinde yapılan başka bir optimizasyon denemesinde ise kontrol çizgisi yazdırmasında yazdırma işleminin çift atım ile mi tek seferde mi yapılması gerektiğine karar verilmiştir. Bunun için Çizelge 4.3'te gösterilen miktarlar kullanılarak Şekil 4.29'da çizgiler elde edilmiştir.

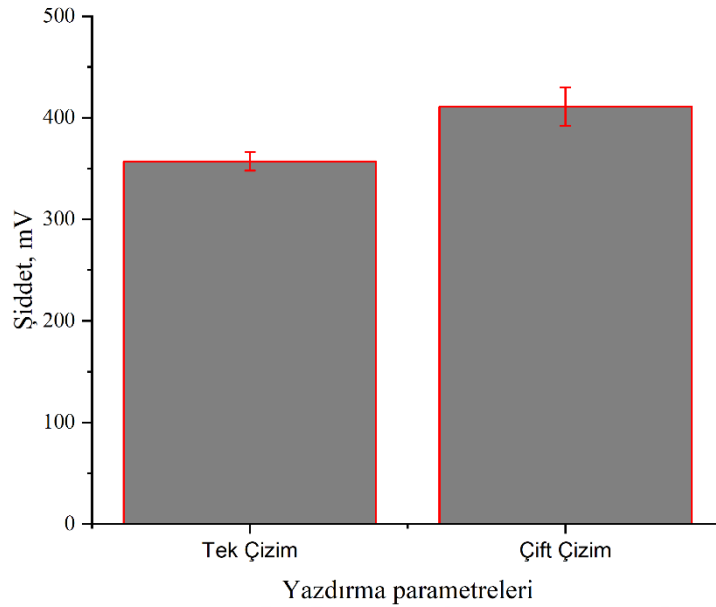
Çizelge 4.3. Farklı yazdırma parametrelerinde kullanılan kontrol çizgisi miktarları

Kontrol Çizgisi	Çift Çizim	Tek Çizim
Antikor miktarı	3 µL (ikincil antikor/keçi-tavşan)	3 µL ikincil antikor (keçi-tavşan)
PBS	10 µL	10 µL
Etil alkol	2 µL	2 µL
Membran uzunluğu	4,5 cm	4,5 cm



Şekil 4.29. Farklı yazdırma parametreleri kullanılarak elde edilen kontrol çizgileri

Elde edilen kontrol çizgilerinin sinyal şiddetleri kolorimetrik okuyucu cihazıyla okunmuş ve elde edilen veriler Şekil 4.30'da sunulmuştur.



Şekil 4.30. Kontrol çizgisi optimizasyonunda farklı parametrelerde yazdırma çeşitlerine karşı elde edilen kolorimetrik okuyucu ile ölçülen sinyal şiddetleri

Yazdırma optimizasyonunda çift çizimle elde edilen sinyal şiddetinin fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak iki değer arasında büyük bir fark gözlenmemiştir. Yazdırma aşamasında antikorun etkinliğinin azalmaması ve zaman kaybı olmaması açısından bu çalışmada tek seferde yazdırma ile antikorların membran yüzeyine yazdırılması gerçekleştirilmiştir. Kontrol çizgisi optimizasyonunda antikorların membrana yazdırılması sırasında PBS ve borat tamponundaki dağılımlarının hassasiyete etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda bu parametrelerde konjugasyonda alkol kullanımının da sinyal şiddetine olan etkisi araştırılmıştır.

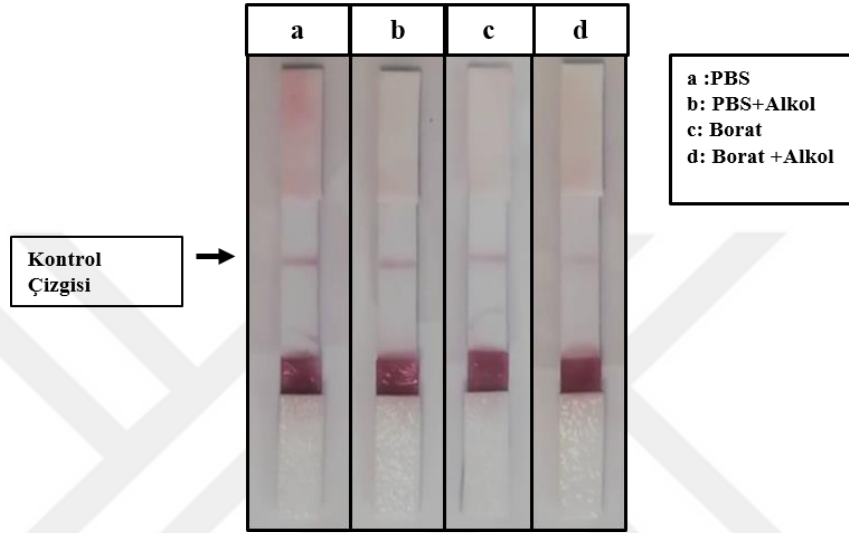
Çizelge 4.4. Tampon çözeltisi denemelerinde kullanılan test ve kontrol çizgileri

Kontrol Çizgisi	PBS	Borat Tamponu
Antikor miktarı	5 µL ikincil antikor (keçi-tavşan)	5 µL ikincil antikor (keçi-tavşan)
Tampon	9 µL	9 µL
Etil alkol	1 µL	1 µL
Membran uzunluğu	4,5 cm	4,5 cm

Çizelge 4.4'te belirtilen miktarlarda hazırlanan test çizgilerinin yanı sıra bu parametrelerde iki farklı konjugasyonda ortama etil alkolün eklenmesiyle alkolün konjugasyona etkisi incelenmiştir. Bunun için hazırlanan konjugasyon çözeltileri ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5 ve Şekil 4.31'de gösterilmektedir.

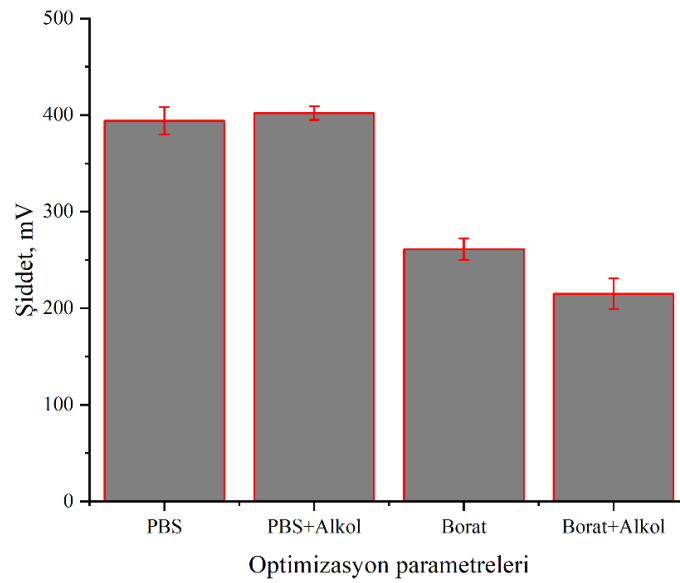
Çizelge 4.5. Tampon çözeltisi denemelerinde kullanılan konjugasyon miktarları

Konjugasyon	1. Konjugasyon	2. Konjugasyon
AuNP miktarı	10 mL	10 mL
Antikor miktarı (m-BH)	1,25 µL	1,25 µL
Borat tamponu	50 µL	50 µL
Borat tamponu %1 BSA	50 µL	50 µL
Borat tamponu %10 sükröz	100 µL	100 µL
Etil Alkol	15 µL	-



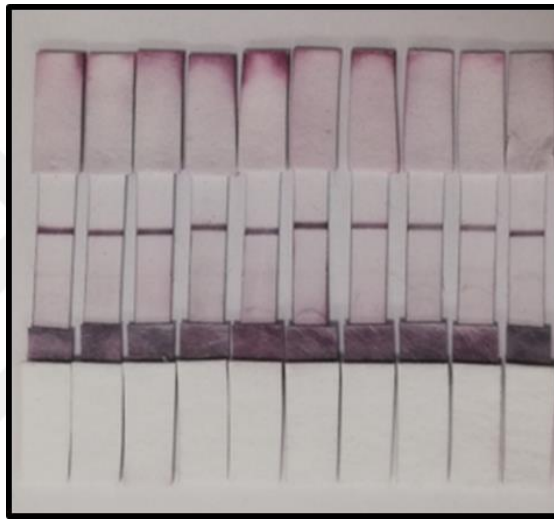
Şekil 4.31. Farklı tampon ve farklı konjugasyon çözeltileri kullanılarak elde edilen kontrol çizgileri

Elde edilen LFA sistemlerindeki testlerin sinyal şiddetleri kolorimetrik okuyucu cihazıyla ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.32’de sunulmuştur.



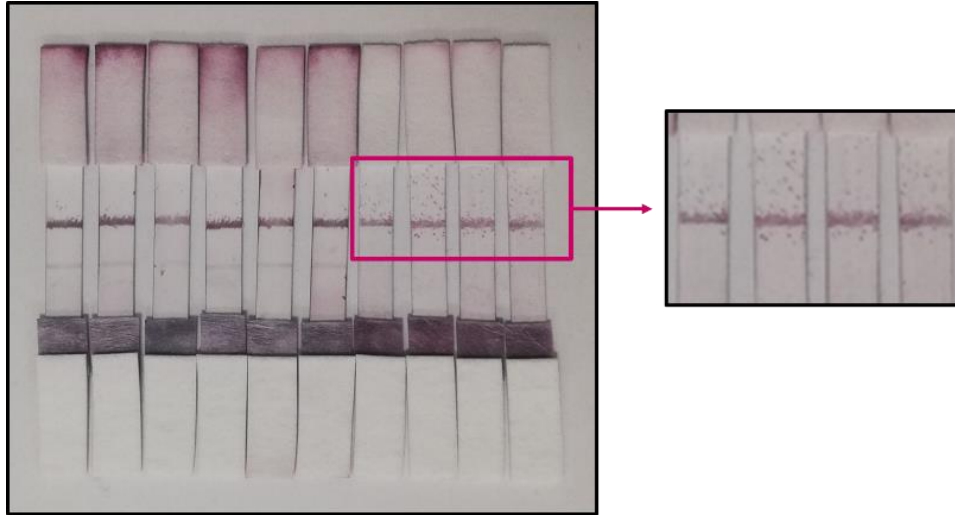
Şekil 4.32. Kontrol çizgisi optimizasyonunda kontrol çizgisi ve konjugasyonunda uygulanan farklı parametrelerin kolorimetrik okuyucu ile ölçülen sinyal şiddeti

Grafikte verilen değerler incelendiğinde yazdırma sırasında antikor çözeltisinin PBS çözeltisi ile hazırlanmasıyla elde edilen sinyal şiddetinin borat tamponuyla elde edilen değerden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Konjugasyonda alkol kullanımının kontrol çizgisi şiddetine olan etkisi incelendiğinde ise sonucun PBS kullanımıyla elde edilen değer ile arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Bu veriler doğrultusunda kontrol çizgisi yazdırma aşamalarında PBS tamponunda hazırlanan ikincil antikorun kullanılmasına karar verilmiştir. Kontrol çizgisi optimizasyonunda kontrol çizgisinin yeri ve kullanılacak tampon çözeltilerine karar verildikten sonra farklı çalışmalar sonucu elde edilen ideal kontrol çizgilerine ait fotoğraflar Şekil 4.33'te sunulmuştur.



Şekil 4.33. Farklı kontrol çizgisi çalışmaları (Tween-20 kullanımı)

LFA sistemlerinde yüzey aktif madde olarak birden çok sürfektan kullanılmaktadır. Bunların başında Tween-20, Triton X-100 gibi yüzey aktif maddeler gelmektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda Tween-20 kullanılmıştır. Hassasiyeti artırmak amacıyla Tween-20 (%0,05) ile aynı oranda Triton X-100 (%0,05) denenmiştir. Tween-20 kullanılarak elde edilen çizgiler Şekil 4.33'de Triton X-100 kullanılarak elde edilen çizgiler ise Şekil 4.34'te gösterilmiştir. Şekil 4.34'ten de görüldüğü üzere Triton X-100 kullanılarak yapılan çalışmada Triton X-100 ortamdaki şırınga kaynaklı (püskürtme esnasında) hataları da tüm ayrıntılarıyla ortaya çıkarmıştır. Bu kapsamda bu tez çalışmasında yüzey aktif madde olarak Tween-20 kullanılmasına karar verilmiş ve çalışmalara Tween-20 ile devam edilmiştir.



Şekil 4.34. Farklı kontrol çizgisi çalışmaları (Triton X-100 kullanımı)

4.7.2. Numune Padi, Cam Elyaf ve Membran Optimizasyonun Test ve Kontrol Çizgilerine Etkisi

Optimizasyonu yapılan ana bileşenlere elde edilen optimum parametrelerin test ve kontrol çizgilerine olan etkilerini araştırmak amacıyla yapılan denemeler aşağıda ifade edilmiştir. Çizelge 4.6’da belirtildiği gibi 10 mL AuNP alınarak 9000 rpm’de 40 dakika santrifüj edildikten sonra çökelti (yaklaşık 0,2 mL) alınarak çökeltiye 1,25 µL m-BH antikoru eklenmiş, 20 dakika +4 °C’de 640 rpm’de soğutmalı karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra ortama 150 µL borat tamponu (pH 9,2) ve 50 µL %1 BSA içeren borat tamponu eklenmiş ve 20 dakika daha +4 °C’de 640 rpm’de soğutmalı karıştırıcıda karıştırmaya devam edilmiştir. Çözeltiye en son 50 µL %10 süktroz içeren borat tamponu eklenerek elde edilen çözeltiye cam elyaf daldırılarak konjugasyon işlemi tamamlanmıştır. Yıkanan cam elyaf 50 mbar vakum altında 30 °C’de 1 saat vakumlu etüvde kurumaya bırakılmıştır.

Çizelge 4.6. İmmünotamponla yıkamanın etkisinde kullanılan konjugasyon miktarları

Konjugasyon	
AuNP miktarı	10 mL
Antikor miktarı (m-BH)	1,25 µL
Borat tamponu	150 µL
Borat tamponu %1 BSA	50 µL
Borat tamponu %10 süktroz	50 µL

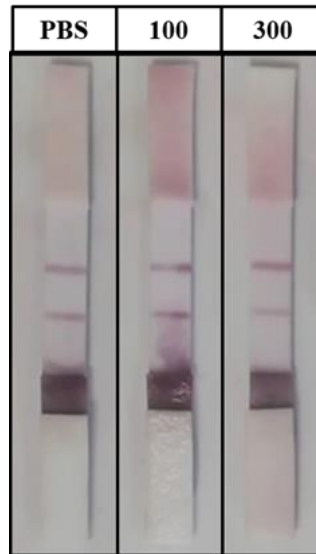
Test ve kontrol çizgilerinin yazdırılması için kullanılan membrana Çizelge 4.7’de belirtilen miktarlarda test ve kontrol çizgisi çözeltileri yazdırılmıştır. Test çizgisi için 5

μL m-BH, 9 μL PBS ve 1 μL etil alkol kullanılarak hazırlanan çözelti şırınga yardımıyla 9 cm uzunluğundaki membran yüzeyine yazdırılmıştır. Kontrol çizgisi için 5 μL ikincil antikor (keçiye karşı tavşan), 9 μL PBS ve 1 μL etil alkol kullanılarak hazırlanan çözelti şırınga yardımıyla membran yüzeyine yazdırılmıştır. Yazdırma işlemi yapılan membran, %3 BSA içeren immünotampon çözeltisi kullanılarak inkübatör karıştırıcıda 500 rpm'de 15 dakika karıştırılarak 37 °C'de 2 saat etüvde kurutulmuştur. Kurutulan membran +4 °C'de kapalı bir şekilde 24 saat muhafaza edildikten sonra bu süre sonunda kullanılmaya başlanmıştır.

Çizelge 4.7. Test ve kontrol çizgisi miktarları

Çizgiler	Test Çizgisi	Kontrol Çizgisi
Antikor miktarı/çeşidi	5 μL m-BH	5 μL ikincil antikor (keçi-tavşan)
PBS	9 μL	9 μL
Etil alkol	1 μL	1 μL
Membran uzunluğu	9 cm	9 cm

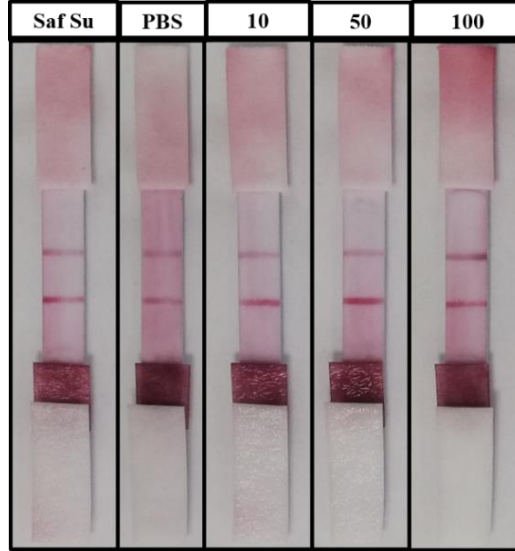
Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de ifade edilen miktarlar kullanılarak yapılan denemelerde kullanılan membran ve konjugasyon materyallerinin yıkama parametreleri değiştirilmiştir. Şekil 4.35'te gösterilen sonuçlarda kullanılan membran %3 BSA içeren immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Diğer parametrelerden farklı olarak konjugasyonda kullanılan cam elyaf herhangi bir ön yıkama işlemi yapılmadan direk konjugasyon çözeltisiyle yıkanmış 30 °C'de 50 mbar basınç altında vakumlu etüvde 1 saat kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 4.35. Yıkanmış membran, yıkanmamış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'larda PBS, 100 ng/mL ve 300 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri

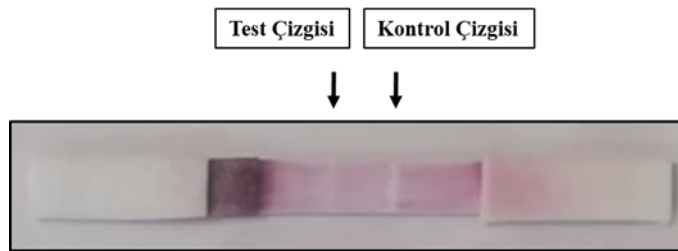
Test kitinde hassasiyet ve seçiciliğin sağlanması için membran ve cam elyafa uygulanan yıkama parametreleri oldukça önemlidir. Bu kapsamda sisteme yıkamanın etkisini araştırmak amacıyla ortamda analitin olmadığı tampon çözeltisi (sadece PBS) LFA sisteminde yürütülmüş ve pozitif sonuç alınmıştır. Analit olmamasından dolayı bu durum yanlış pozitif olarak adlandırılmaktadır. Sensör performansını değerlendirmek amacıyla ortama 100 ng/mL BH çözeltisi eklenmiş ve daha sonra derişim daha da artırılarak 300 ng/mL BH çözeltisi eklenmiştir. 100 ng/mL ve 300 ng/mL BH çözeltilerinin eklenmesiyle yapılan yürütmelerde test bölgesindeki sinyal şiddetlerinde bir değişiklik gözlenememiştir. Yani Şekil 4.35'te de görüldüğü üzere yıkanmış membran ve herhangi bir ön işleme tabi tutulmamış cam elyaftan elde edilen sonuçlarda tüm LFA sistemlerinde test ve kontrol çizgileri elde edilmiş fakat elde edilen sensörün test hassasiyeti bulunmamaktadır. Ortamda hedef analit (BH) yokken bile pozitif sonuç verdiği ve aranan analit derişimlerinde orantılı bir test şiddeti vermediği gözlenmiştir.

Bu amaçla yapılan başka bir optimizasyon çalışmasında ise membrana herhangi bir ön işlem yapılmamış olup, cam elyaf immünotampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Şekil 4.36'da gösterildiği gibi elde edilen LFA kitlerinde ortamda hedef analit yokken sadece saf su ve PBS yürütüldüğünde yanlış pozitif diye adlandırılan durumla yine karşılaşmıştır. 100 ng/mL'nin üzeri çalışmaların aksine bu sefer daha düşük derişimlerde (10 ng/mL, 50 ng/mL) çalışılmıştır. Diğer analit konsantrasyonlarında da test şiddetlerinde orantılı bir şiddet gözlenememiştir. Yani hangi konsantrasyonda çalışılırsa çalışılsın test çizgisinde elde edilen sinyalin şiddeti hemen hemen hepsinde aynıdır. LFA sistemlerinde seçicilik ve hassasiyetin sağlanabilmesi ve doğru sonuç alabilmek için yıkama parametrelerinin doğru belirlenmiş olması gerekmektedir. Bu amaçla bu sistemlerde BSA gibi bloklayıcı ajanın kullanılmasıyla spesifik olmayan etkileşimleri en aza indirip sensör performansını artırmak amaçlanmaktadır (Parolo vd., 2020).



Şekil 4.36. Yıkanmamış membran, yıkanmış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA’larda saf su, PBS, 10 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri

Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7’deki ifade edilen değerler kullanılarak yapılan denemelerde membran ve cam elyafa uygulanan yıkama parametreleri değiştirilmiştir. Şekil 4.37’de gösterilen LFA’da membran ve konjugasyonda kullanılan cam elyafa herhangi bir ön yıkama işlemi yapılmadan deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında test ve kontrol çizgilerinin olduğu bölgelerde pembe rengin aksine beyaz renkli çizgiler elde edilmiştir. Literatürde “Hayalet Çizgi” (Ghost Line) diye adlandırılan bu olay bir antikorun hareketsiz hale getirildiği beyaz bir nokta ve onu çevreleyen kırmızı bir arka planın varlığı olarak ifade edilmektedir. LFA sistemlerinde bu durumun ortaya çıkmasının sebebi olarak da test çizgisi üzerinde konjugatı iten yüksek konsantrasyondaki yakalama antikorunun olması ileri sürülmektedir (Seele vd., 2023). Ortamda herhangi bir bloklayıcı ajanın olmaması, membran ve cam elyafın BSA ile bloklanmaması sonucu test çizgisindeki antikor miktarının fazla gelmesine sebep olmuştur.



Şekil 4.37. Yıkanmamış membran ve yıkanmamış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA’da 100 ng/mL BH çözeltilisinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri

İmmünotampon çözeltisinin kullanılmasının önemini anlaşılması üzerine yapılan çalışmada Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'deki miktarlar kullanılarak bu sefer membran ve cam elyaf %3 BSA içeren immüno tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Elde edilen LFA sisteminde PBS ve 100 ng/mL konsantrasyonundaki hedef analit BH çözeltileri yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.38'de gösterilmektedir.



Şekil 4.38. Yıkanmış membran, yıkanmış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'larda 100 ng/mL BH ve PBS çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri

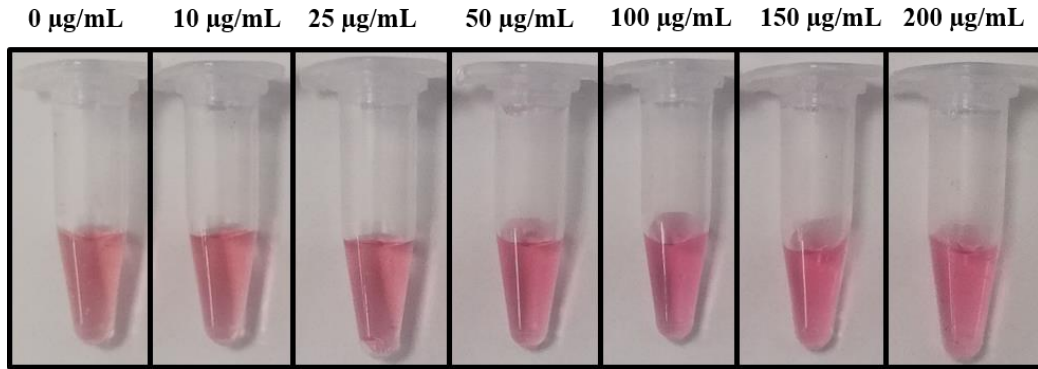
BSA kullanılarak yıkanmış membranlarda istenilen bloklama işlemleri yapılmış olup test ve kontrol çizgileri PBS ve 100 ng/mL değerlerinde kısmen farklı elde edilmiştir. Ancak ortamdaki BSA fazlalığı ve altın nanopartiküllerin boyutlarının büyüklüğünden dolayı agregasyon gözlenmiş ve pembe renkteki altınlar agregasyon sonucu test bölgelerinde koyu gri renk oluşturmuştur. Diğer parametrelerde agregasyon ile ilgili herhangi bir sorun yaşanmazken cam elyafın yıkanması halinde ortamdaki BSA miktarının artışı agregasyonu beraberinde getirmiştir. Agregasyon sorununu çözmek amacıyla literatürde de ifade edildiği gibi konjugasyon aşamasında ortamdaki tampon çözelti pH'sını kullanılan antikorun izoelektrik noktasında ± 1 oranında seçmek gerektiği yani izoelektrik noktasının sıfır olduğu noktaya yakın olması gerektiği anlaşılmıştır (Millipore, 2013). LFA sisteminde konjugasyon aşamasında kullanılan antikorun pH'sının 7,2 olmasından dolayı pH'sı 9,2 olan borat tamponunun pH'sı 7,4'e çekilerek bundan sonraki çalışmalarda bu değerden devam edilmiştir. Yıkama optimizasyonu çalışmalarının test ve kontrol çizgilerine etkisine bakıldığında membran, cam elyaf ve numune pedinin yıkanarak kullanılmasının test hassasiyeti ve test sonucunu olumlu yönde

etkilediği görülmüştür. Bundan sonraki tüm çalışmalarda bu parametrelerde devam edilmiştir.

4.7.3. Topaklanma (agregasyon) testi

Kolloidal süspansiyonlar (AuNP) termodinamik olarak kararsız ve topaklanma eğiliminde olduğundan, kontrolleri önem arz etmektedir. Nanopartiküllerin toplanmasını önlemek amacıyla onları negatif veya pozitif yüklü küçük moleküllerle kaplayarak elektrostatik olarak stabil hale getirmek bilinen yaygın bir yöntemdir. Ortamda yeterince iyonik gücün bulunduğu sulu çözeltilerde elektrostatik itme sonucu stabiliteyi sağlamak amacıyla tuz kullanarak agregasyon yapılmaktadır (Pamies vd., 2014). Topaklanma testi olarak bilinen bu testte de en temel amaç AuNP'lerin konjugasyonu için gereken minimum antikor miktarının bulunmasıdır. Bu testin çalışma prensibi de AuNP'lerin yüzeylerinin tamamen antikorlarla fonksiyonlandırıldığı anlamak amacıyla NaCl kullanılmasıdır.

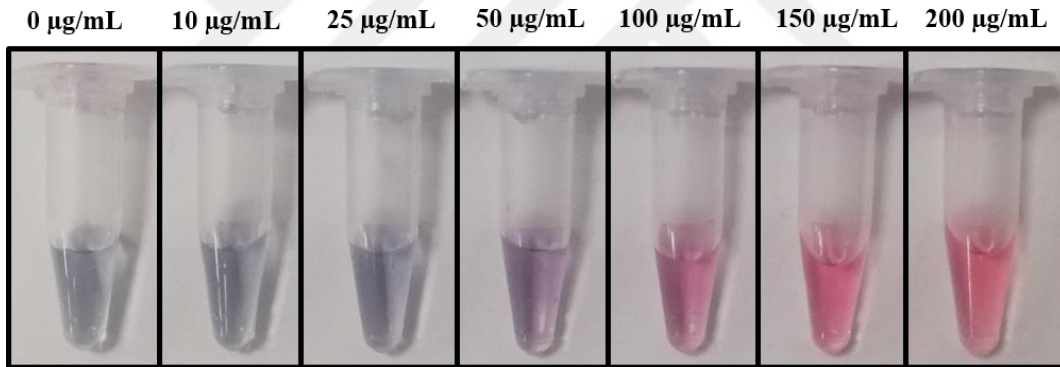
Agregasyon testi için her bir ependorfa 150 μ L AuNP çözeltisi alınarak üzerlerine borat tamponu ile hazırlanan farklı derişimlerde (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μ g/mL) anti-BH antikor çözeltilerinden 10'ar μ L eklenerek 600 rpm'de termal karıştırıcıda 20 dakika karışmaya bırakılmıştır. Elde edilen çözeltilere ait resimler Şekil 4.39'da gösterilmiştir.



Şekil 4.39. Altın agregasyon testi. Farklı derişimlerde hazırlanan (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μ g/mL) poliklonal anti-BH antikorlu çözeltilere ait görüntüler

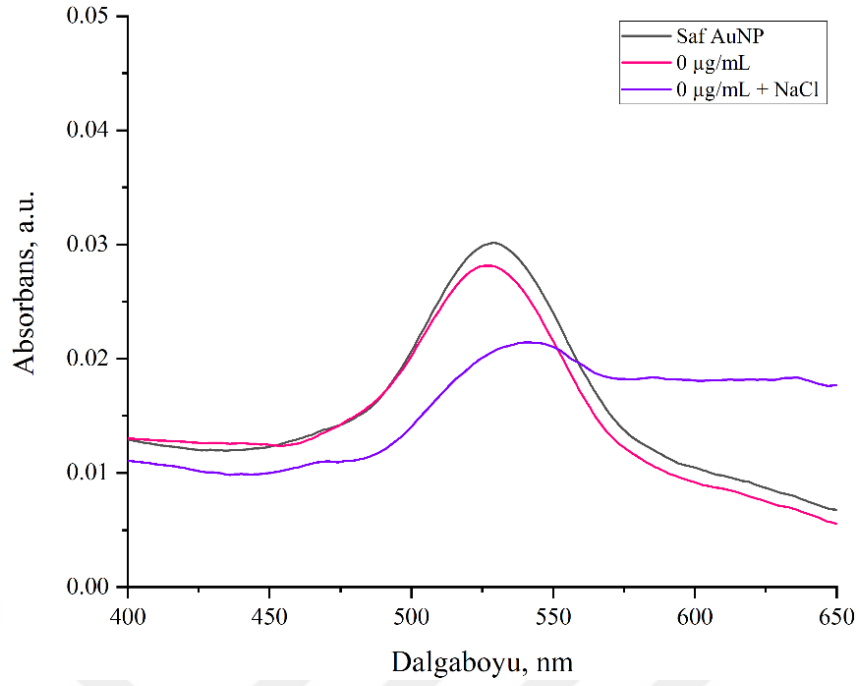
Elde edilen her bir çözeltiliye kütlece %10'luk NaCl çözeltisinden 20 μ L eklendikten sonra termal karıştırıcı yardımıyla 10 dakika daha karıştırma işlemi yapılmıştır. Ortama NaCl ilavesinden sonra AuNP'deki derişimler kontrol edilmiştir. Antikorla konjuge olmamış nanopartiküller NaCl ile agregasyona sebep olmaktadır. 0 μ g/mL, 10 μ g/mL ve 25 μ g/mL derişimlerindeki antikor çözeltisi ilave edilen AuNP

çözeltilerinin NaCl ilavesinden sonraki değişimlerine bakıldığında pembe olan çözelti renklerinin laciverte dönüştüğü, 50 µg/mL derişiminde antikor çözeltisi ilave edilen AuNP çözelti renginin ise mor renk aldığı gözlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde belirtilen derişim aralıklarında kullanılan antikor miktarlarında topaklanmanın gözlemlendiği ve çalışma için uygun aralık olmadığı anlaşılmıştır. 100 µg/mL derişimindeki antikor çözeltisi ilave edilen AuNP çözeltisinde ise rengin çok belirgin olmamakla birlikte hafif bir mor renge dönüştüğü gözlenmiştir. 150 µg/mL ve 200 µg/mL derişimlerdeki antikor çözeltisi ilave edilen AuNP çözeltilerinde ise herhangi bir renk dönüşümü gözlenmemiş olup nanopartikül yüzeylerinin antikorlar tarafından çevrelendiği ve NaCl ilavesinden sonra herhangi bir topaklanmanın olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada 150 µg/mL derişimindeki antikor çözeltisi ilave edilen AuNP çözeltisinin derişimi (yani 18 kat seyreltilmiş) antikor çözeltisinin derişimi ideal miktar olarak belirlenmiş ve çalışmalarda bu değer kullanılmıştır. NaCl ilavesinden sonra çözeltilerde meydana gelen renk dönüşümüne ait resimler Şekil 4.40'da gösterilmiştir

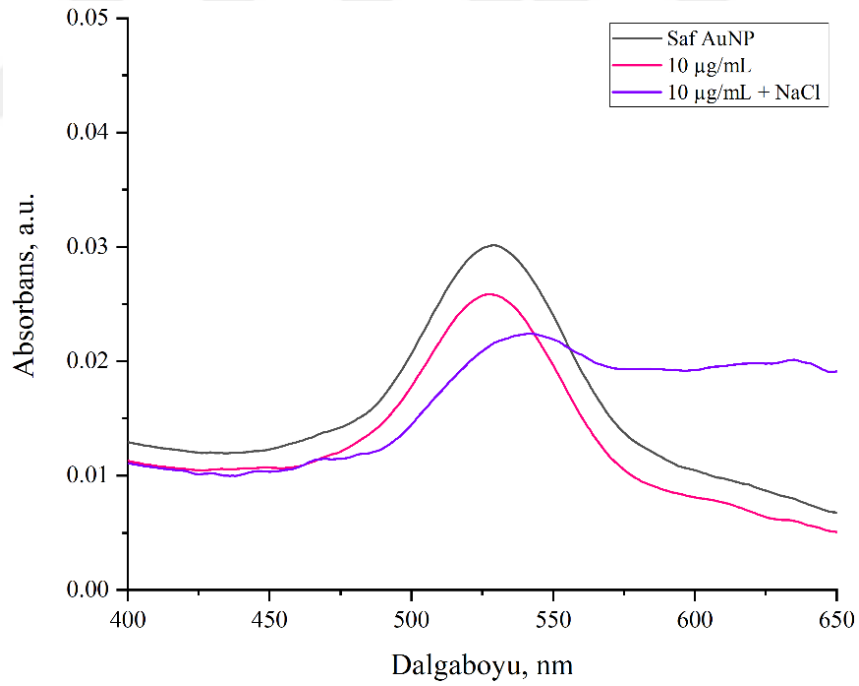


Şekil 4.40. Altın agregasyon testi. Farklı derişimlerde hazırlanan (0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL) poliklonal anti-BH antikorlu içeren çözeltilere %10'luk NaCl eklenmesi sonrası meydana gelen değişimlere ait görüntüler

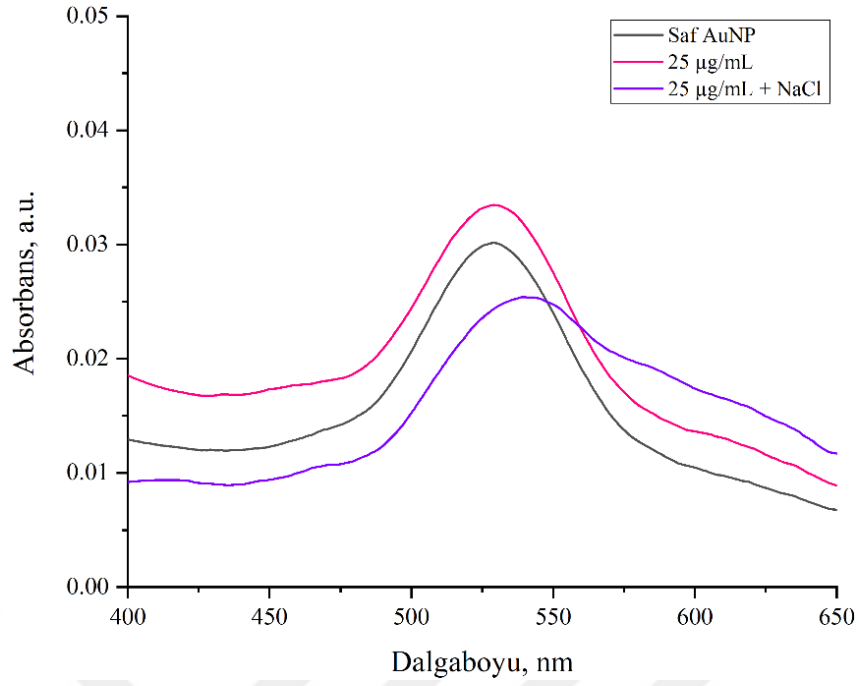
Agregasyon testinde kullanılan çözeltilerin her birinin ortama NaCl ilavesi öncesi ve sonrası UV ölçümleri alınmış ve elde edilen veriler Şekil 4.41 - Şekil 4.50'de sunulmuştur.



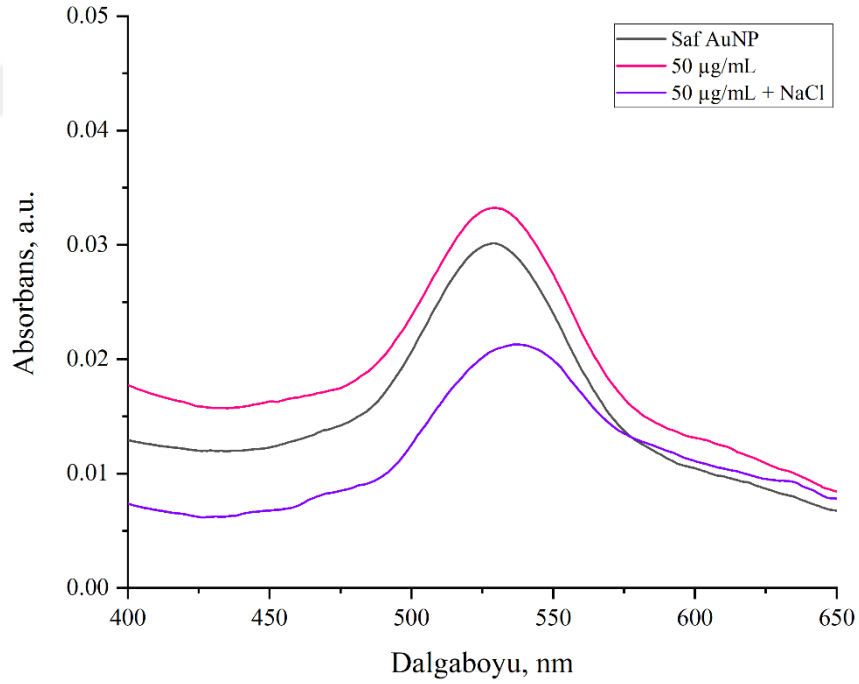
Şekil 4.41. Saf AuNP, 0 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 0 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



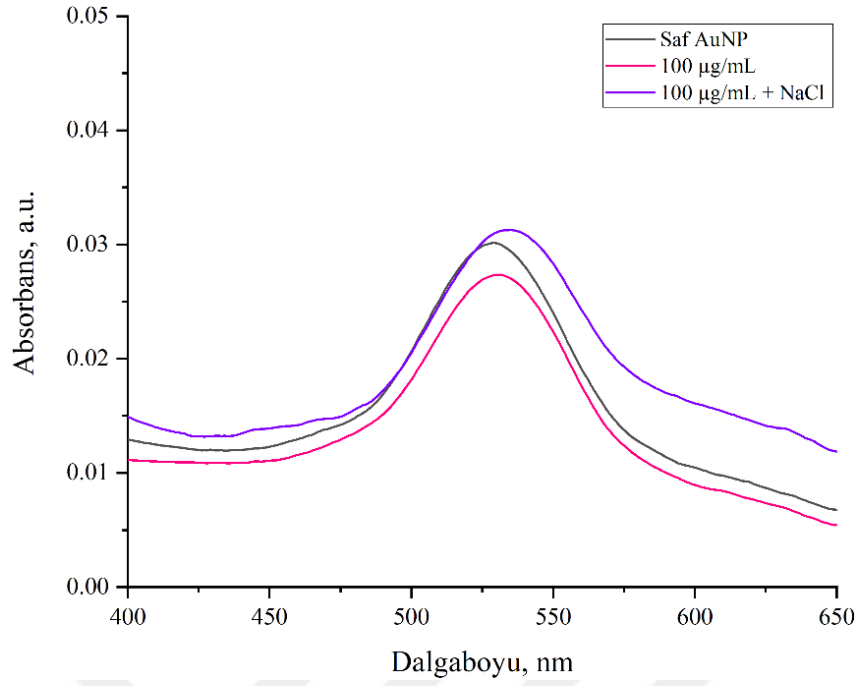
Şekil 4.42. Saf AuNP, 10 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 10 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



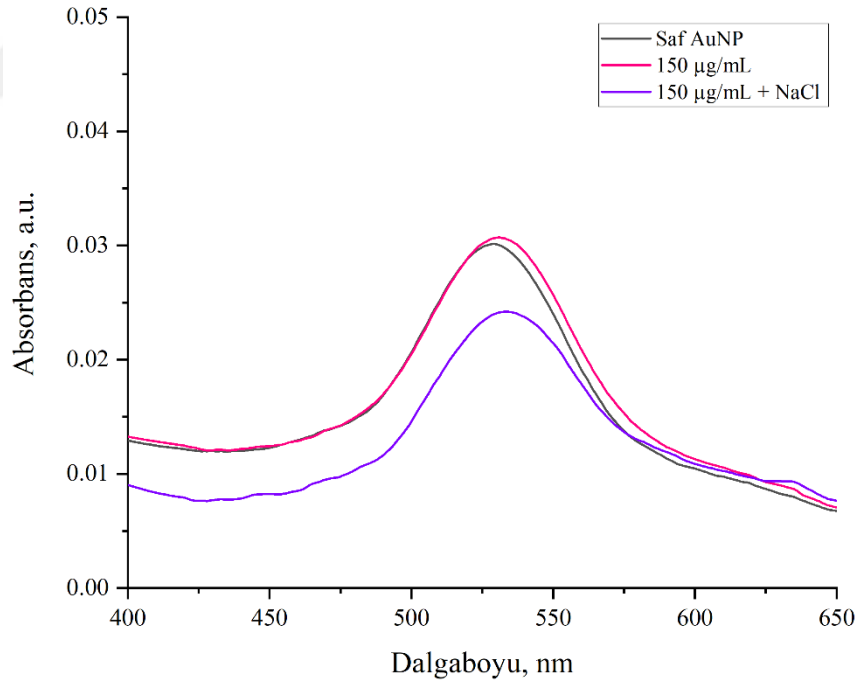
Şekil 4.43. Saf AuNP, 25 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 25 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



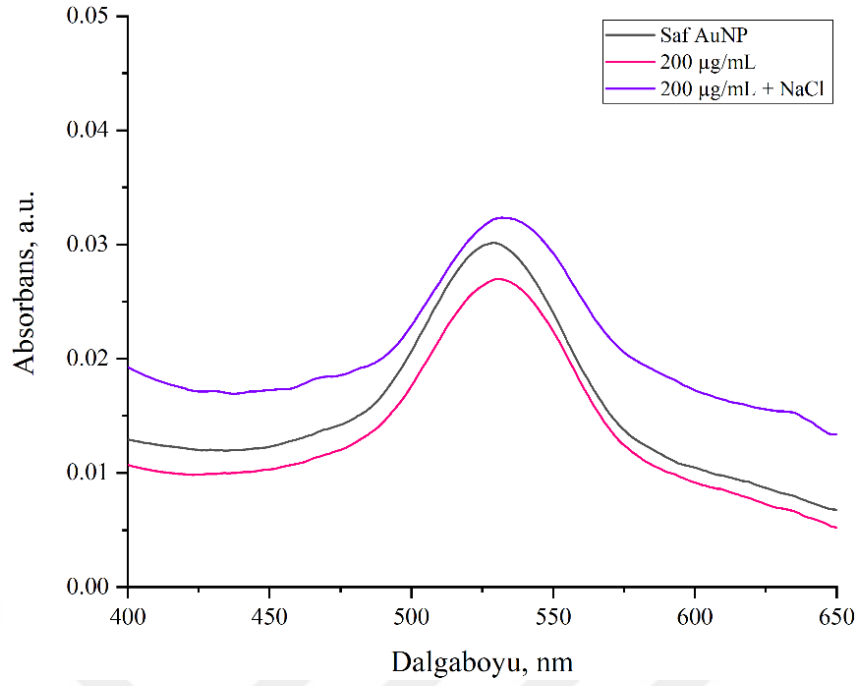
Şekil 4.44. Saf AuNP, 50 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 50 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



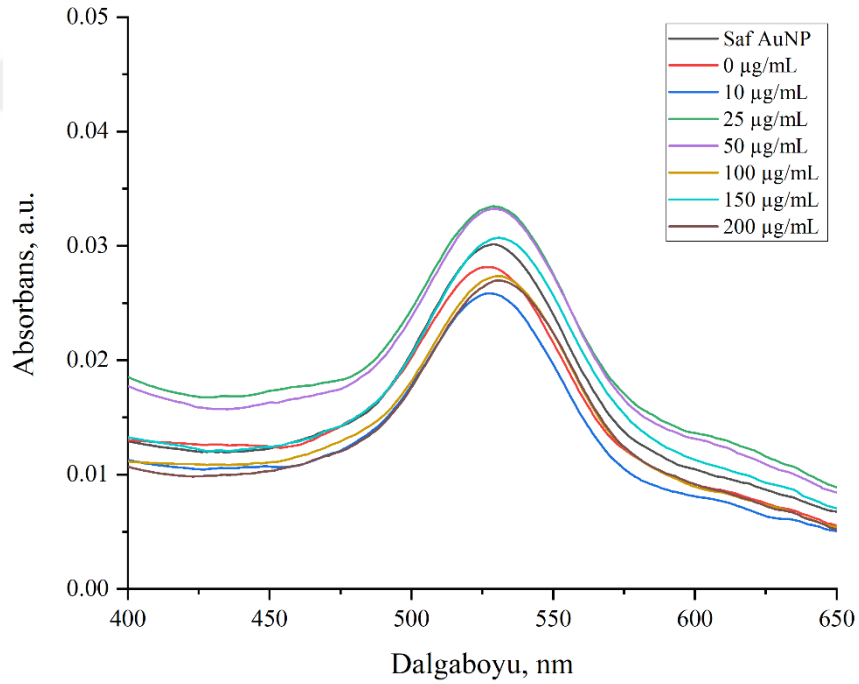
Şekil 4.45. Saf AuNP, 100 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 100 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



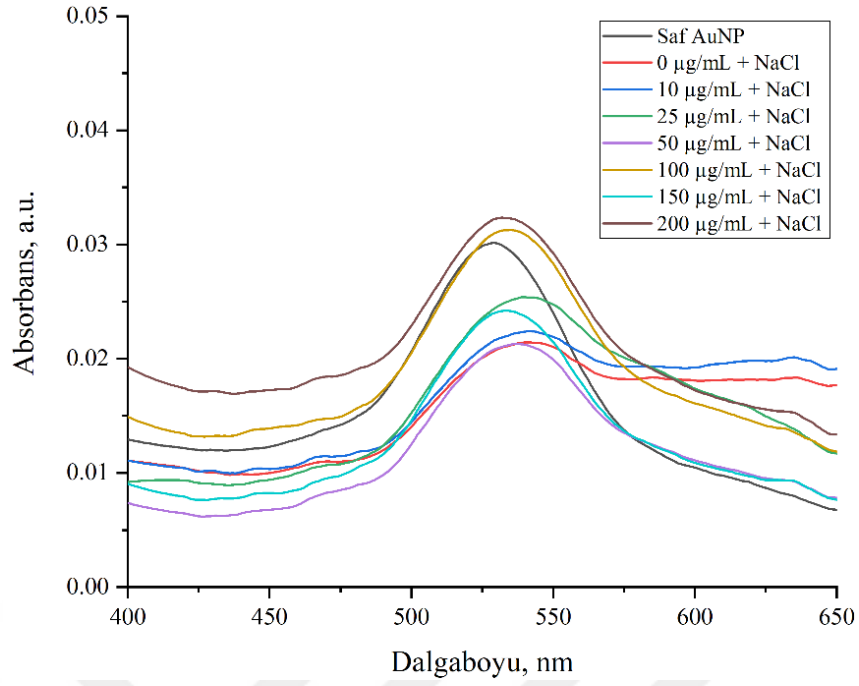
Şekil 4.46. Saf AuNP, 150 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 150 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



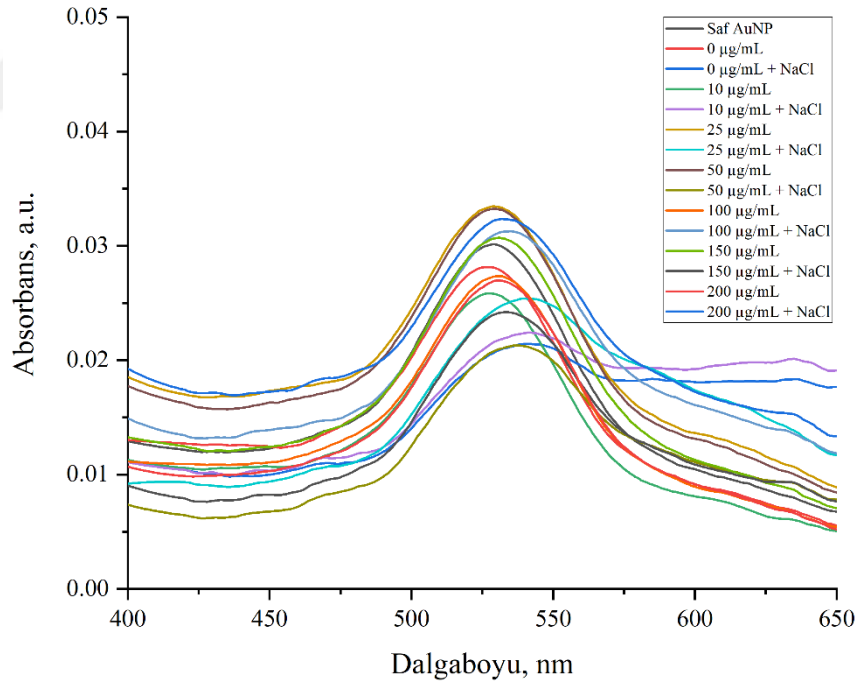
Şekil 4.47. Saf AuNP, 200 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisinin ve 200 µg/mL BH antikor-AuNP çözeltisine NaCl çözeltisi eklendikten sonraki UV ölçümleri



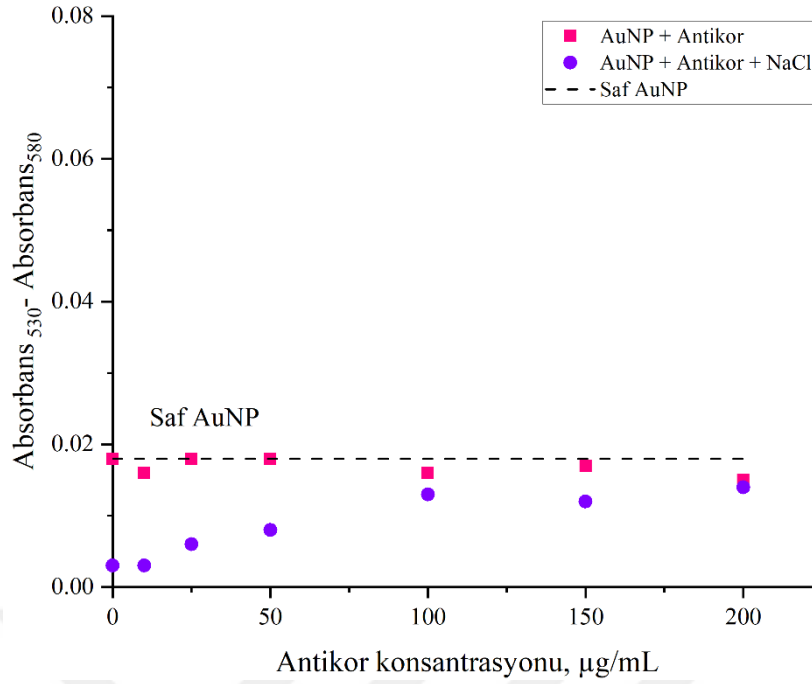
Şekil 4.48. Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltilerinin UV ölçümleri (EK 2’de verilmiştir)



Şekil 4.49. Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi ilavesi sonrası elde edilen UV ölçümleri (EK 3'te verilmiştir)



Şekil 4.50. Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltileri ve NaCl çözeltisi ilavesi sonrası elde edilen tüm çözeltilerin UV ölçümleri (EK 4'te verilmiştir)



Şekil 4.51. 530 nm'deki absorbans değerinin 580 nm'deki absorbans değerinden çıkarılmasıyla elde edilen çubuk grafikler (Ambrosi vd., 2009; Parolo vd., 2020)

Grafiklerde de gösterildiği üzere (Şekil 4.41 - Şekil 4.45) NaCl ilavesi sonrası UV değerlerinin 0 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL derişimlerinde arttığı, yani maksimum absorbans pikinin sağa doğru kaydığı gözlenmiştir. 150 µg/mL ve 200 µg/mL değerlerinde (Şekil 4.46 ve Şekil 4.47) ise dalgaboyunun değişmediği gözlenmiştir. Altın nanoparçacıkların optik özellikleri, parçacıklar toplandığında, her parçacık yüzeyinin yakınındaki iletim elektronları lokalize olduğunda ve komşu parçacıklar arasında paylaşıldığında değişmektedir. Bu durumda yüzey plazmon rezonansının enerjisi düşer, soğurma saçılma tepe noktaları daha uzun dalga boylarına doğru kaymasına sebep olmaktadır. Agregasyon meydana geldiğinde, AuNP'ler kararsızlaştığı için kararlı partiküllerin ortamda azalmasının sonucu olarak daha uzun dalga boylarında ikincil bir tepe meydana gelecektir. Ortama eklenen NaCl ile karboksil grupları protonlanır, zeta potansiyelleri azalır bu da nanopartiküllerin agregasyonuna sebep olmaktadır (WebSayfası2, 2024).

4.7.4. pH'ın Kalitatif Tayine Etkisi

BH'nin kalitatif tayin optimizasyon çalışmalarında LFA test kitinde seçiciliği artırmak amacıyla literatürde konjugasyonda kullanılan 40 nm boyutlu AuNP'ler için en ideal çalışma pH'sının 8 olduğu ve ortam pH'sının potasyum karbonat kullanarak ayarlanması gerektiği belirtilmiştir (Sukumaran vd., 2021). Bu yaklaşımdan yola çıkarak

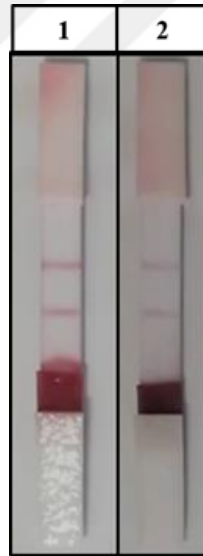
10 mL AuNP'nin pH'sı, 1 M potasyum karbonat ile 8,0'a ayarlanmış ve daha sonra Çizelge 4.8 konjugasyon 2'de ifade edilen ölçülerle yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.52'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. AuNP pH optimizasyonunda kullanılan konjugasyon miktarları

Konjugasyon	1. Konjugasyon	2. Konjugasyon
AuNP miktarı	10 mL (pH 6,5)	10 mL (pH 8,0)
Antikor miktarı ve çeşidi	3 µL poliklonal BH	3 µL p-BH
Borat tamponu % 1 BSA	20 µL	20 µL
Borat tamponu % 10 sükröz	100 µL	100 µL

Çizelge 4.9. AuNP pH optimizasyonunda kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları

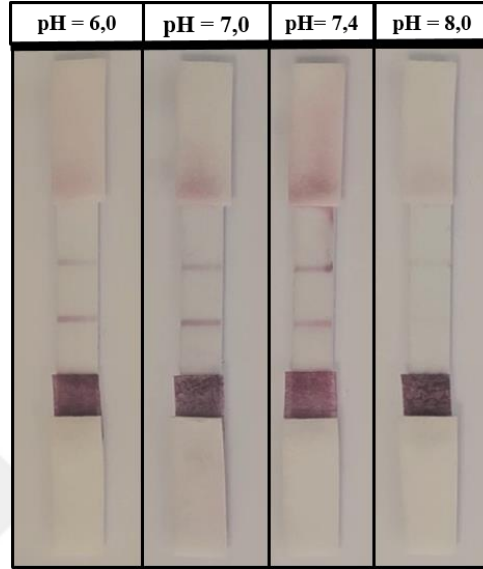
Çizgiler	Test Çizgisi	Kontrol Çizgisi
Antikor miktarı ve çeşidi	4 µL m-BH	4 µL ikincil antikor (keçi-tavşan)
PBS	4 µL	4 µL
Etil alkol	1 µL	1 µL
Membran uzunluğu	4,5 cm	4,5 cm



Şekil 4.52. 1. ve 2. konjugasyonda 100 ng/mL BH çözeltisini yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri

Şekil 4.52'de görüldüğü gibi AuNP'lere pH ayarı yapıldıktan sonra elde edilen veriler incelendiğinde pH'sı 8'e ayarlanan nanopartikül çözeltisi ile elde edilen test ve kontrol çizgilerinin şiddetleri pH ayarı yapılmadan önce elde edilen çizgilerden daha azdır. AuNP'lere konjugasyon öncesi herhangi pH ayarı yapılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Başka bir pH çalışması da yürütülen BH analit çözeltisinin optimum çalışma

pH'sını bulmak amacıyla yapılmıştır. Hazırlanan LFA testlerinde farklı pH değerlerinde (pH 6,0; 7,0; 7,4; 8,0) BH'nin PBS içerisinde çözeltileri hazırlanmış ve LFA test kitlerinde yürütme işlemi yapılmıştır. Elde edilen test kitlerine ait analit yürütme sonrası görüntü Şekil 4.53'te gösterilmektedir.



Şekil 4.53. Farklı pH değerlerinde (pH 6,0; 7,0; 7,4; 8,0) BH'nin yürütülmesi sonucu elde edilen LFA'lar

Şekil 4.53'te farklı pH çalışmaları sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri gösterilmiştir. pH 6,0, pH 7,0 ve pH 7,4 değerlerinde LFA sistemlerinde belirgin bir şekilde test çizgileri gözlenmiştir. Bu değerlerdeki kontrol çizgilerine bakıldığında ise en belirgin test çizgisi pH 7,4 değerinde gözlenmektedir. pH 8,0 değerinde ise test ve kontrol çizgileri belli belirsiz gözlenmektedir. pH 8,0 değerinde diğer pH değerlerinden farklı olarak agregasyon kaynaklı renk değişimi gözlenmiştir. Aynı durum konjugasyon aşamasında da gözlenmiştir ve o aşamada da pH ayarlaması yapılmıştır. Optimum pH değeri test ve kontrol çizgilerinin en belirgin olduğu pH 7,4 değeri olarak belirlenmiştir. Bu değer ticari kan serumunun pH değerine yakın olması açısından da önem arz etmektedir.

4.7.5. Antikorum Kalitatif Tayine Etkisi

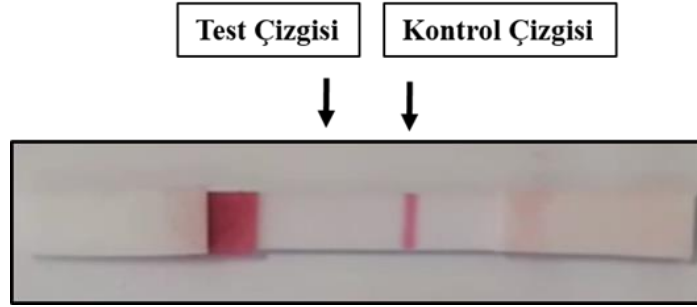
%3 BSA içeren immünotampon çözeltisiyle yıkanmış membran ile Çizelge 4.10'da ifade edilen miktarlar kullanılarak LFA sisteminde farklı bir hormona ait konjugasyon çalışması yapılmıştır. Konjugasyonda 10 mL AuNP (yaklaşık 40 nm) 9000 rpm'de 40 dk santrifüj yapıldı. Üzerine 50 µL borat tamponu, daha sonra 50 µL %1 BSA

borat tamponu 1,25 μL poliklonal farklı bir antikor eklenmiştir. 20 dakika 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de termal karıştırma yapıldı. 100 μL %10 sükröz borat tampon çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen test kitinde 200 μL 100 ng/mL BH analiti yürütülmüştür.

Çizelge 4.10. 4.6.5. Antikorum kalitatif tayine etkisinde kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları

Çizgiler	Test Çizgisi	Kontrol Çizgisi
Antikor miktarı ve çeşidi	5 μL m-BH	5 μL ikincil antikor (keçi-tavşan)
PBS	9 μL	9 μL
Etil alkol	1 μL	1 μL
Membran uzunluğu	9 cm	9 cm

Konjugasyonda anti-BH antikorunu harici farklı bir antikor kullanılarak aynı parametrelerde pozitif sonuç alınıp alınmadığı yani yanlış pozitif durumu incelenmiştir. Şekil 4.54'te görüldüğü gibi elde edilen LFA kitinde 200 μL 100 ng/mL BH yürütülmesi sonucu sistemde yalnızca kontrol çizgisi bölgesinde tek çizgi gözlenmiş test çizgisi bölgesinde herhangi bir çizgi oluşmamıştır. Yani LFA sistemindeki karşılığı olarak test sonucu negatiftir. Ters durumlar da (konjugasyonda BH, test bölgesinde farklı bir antikor) denenmiş fakat farklı bir sonuç alınamamıştır. Yapılan bu çalışma ile antikorun sandviç kompleks oluşumuna etkisinin önemi anlaşılmıştır.



Şekil 4.54. Yıkanmış membran ve yıkanmış cam elyaf kullanılarak elde edilen LFA'da 100 ng/mL BH yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri (Konjugasyonda farklı analit kullanılan LFA sistemi)

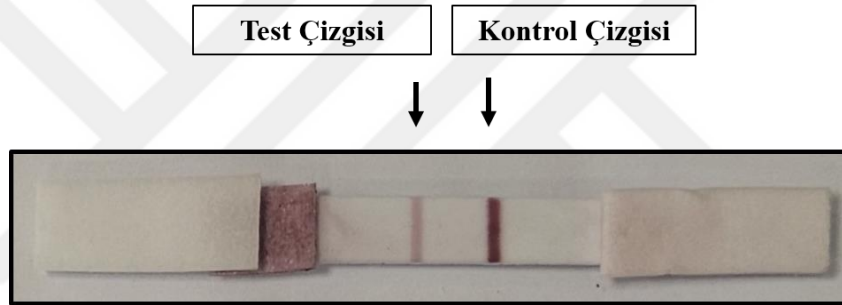
BH varlığını tespit etmek amacıyla optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum koşullar belirlenmiş, LFA test kiti oluşturulmuş ve kalitatif tayin gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12'de verilen değerler kullanılarak elde edilen LFA test kitine ait örnek görüntü Şekil 4.55'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Kalitatif tayin için kullanılan konjugasyon miktarları

Konjugasyon	
AuNP miktarı	10 mL
Antikor miktarı ve çeşidi	3 µL p-BH
Borat tamponu %1 BSA	2 µL
Borat tamponu %10 sükröz	30 µL

Çizelge 4.12. Kalitatif tayin için kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları

Çizgiler	Test Çizgisi	Kontrol Çizgisi
Antikor miktarı/çeşidi	4 µL m-BH	4 µL ikincil antikor (keçi-tavşan)
PBS	4 µL	4 µL
Etil alkol	1 µL	1 µL
Membran uzunluğu	4,5 cm	4,5 cm



Şekil 4.55. 100 ng/mL BH ile elde edilen test ve kontrol çizgileri

4.8. Kantitatif Tayin Çalışmaları

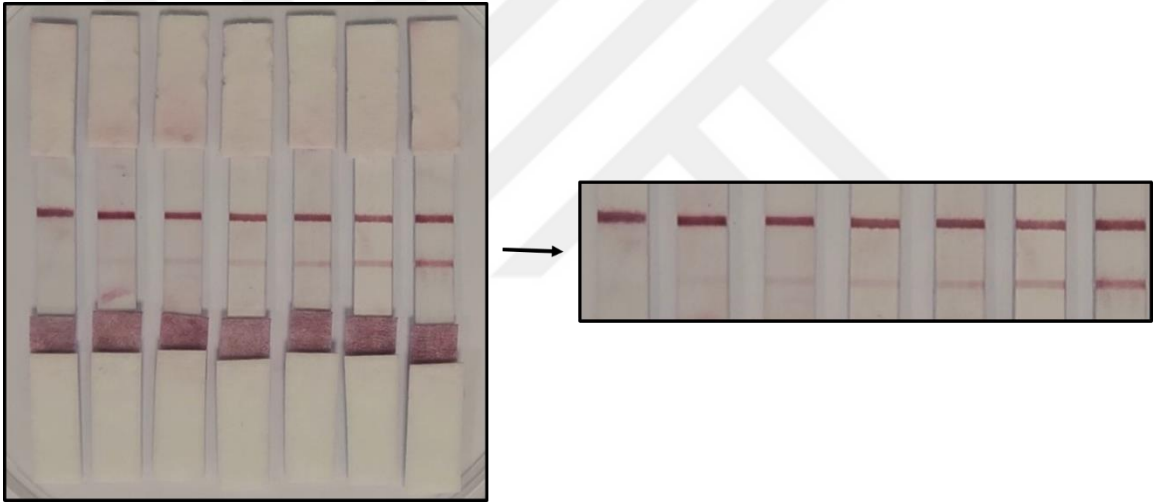
BH'nin kalitatif olarak tayininden sonra kantitatif tayinini yapabilmek amacıyla da çalışmalar yapılmıştır. Bunun için 0-300 ng/mL aralığında hazırlanan farklı konsantrasyonlarda BH çözeltileriyle çalışılmıştır. Optimizasyon parametreleri sonucu elde edilen sayısal veriler ve koşullar kullanılarak nihai çalışma parametreleri belirlenmiş ve konsantrasyon taraması için çalışmalar yapılmıştır. Bunun için Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'te verilen değerler kullanılarak farklı konsantrasyonlarda 0 ng/mL (PBS), 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL 100 ng/mL ve 300 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgilerine ait çıplak gözle gözlenen LFA sistemleri Şekil 4.56'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.13. Kantitatif tayinde kullanılan konjugasyon miktarları

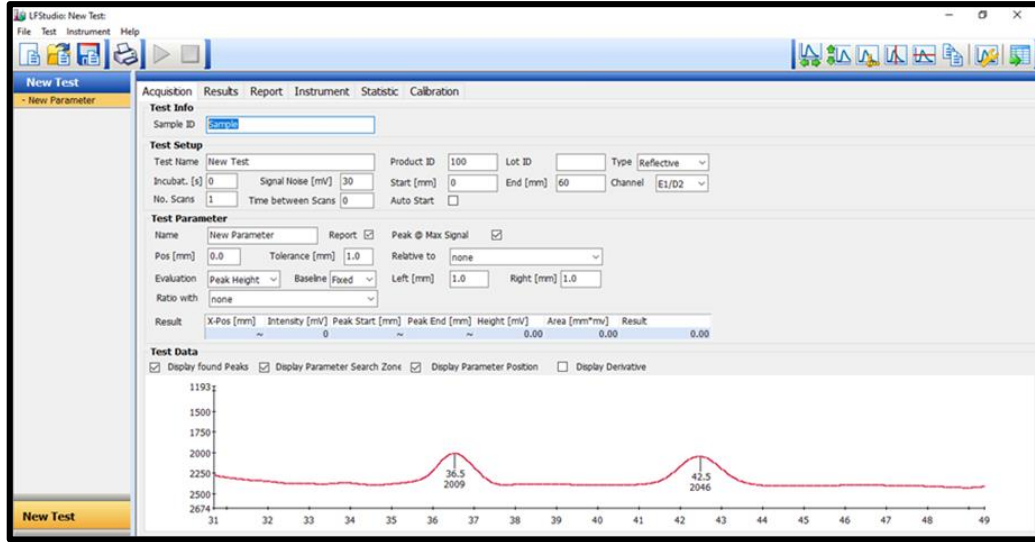
Konjugasyon	
AuNP miktarı	10 mL
Antikor miktarı ve çeşidi	3 µL p-BH
Borat tamponu %1 BSA	2 µL
Borat tamponu %10 sükröz	30 µL

Çizelge 4.14. Kantitatif tayinde kullanılan test ve kontrol çizgisi miktarları

Çizgiler	Test Çizgisi	Kontrol Çizgisi
Antikor miktarı/çeşidi	4 µL m-BH	4 µL ikincil antikor (keçi-tavşan)
PBS	4 µL	4 µL
Etil alkol	1 µL	1 µL
Membran uzunluğu	4,5 cm	4,5 cm

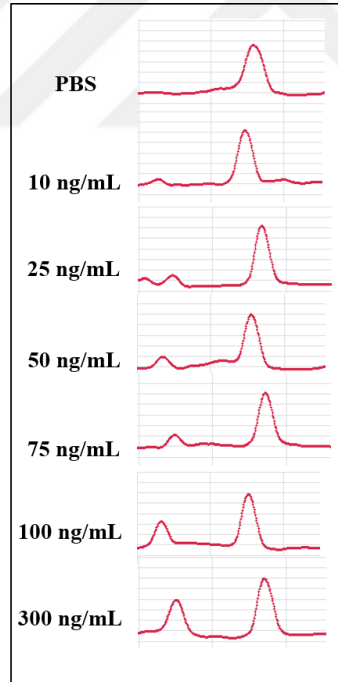
**Şekil 4.56.** Elde edilen LFA'larda sırasıyla soldan sağa; PBS, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL BH çözeltilerinin yürütülmesi sonucu elde edilen test ve kontrol çizgileri

Şekil 4.56'da görüldüğü gibi BH konsantrasyonu arttıkça test çizgisindeki çizgi şiddetinin de arttığı çıplak gözle görülmektedir. Elde edilen LFA sistemlerindeki test ve kontrol çizgilerindeki çizgi şiddetleri kolorimetrik okuyucu ile Şekil 4.57'de gösterilen program ile ölçülmüştür.

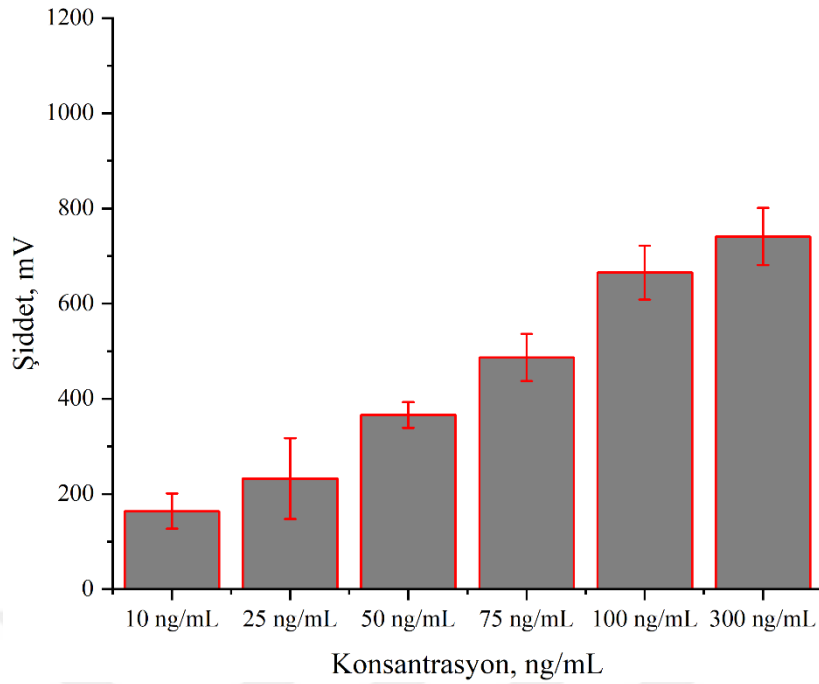


Şekil 4.57. Kolorimetrik okuyucuya ait yazılımın ekran görüntüsü

Elde edilen dataların artan şiddetlerine göre elde edilmiş sinyal grafiklerinin ekran görüntülerinin grafik gösterimi ve konsantrasyonlara karşı çizilen sinyal şiddetleri Şekil 4.58 ve Şekil 4.59’da gösterilmektedir.



Şekil 4.58. Farklı konsantrasyonlarda (0 ng/mL (PBS), 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) değerlerinde hazırlanan BH çözeltilerinin kolorimetrik okuyucu ile elde edilen test ve kontrol çizgilerine ait sinyal şiddetlerinin ekran görüntülerinin grafik gösterimi



Şekil 4.59. Farklı BH konsantrasyonlarında (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) test çizgisinde elde edilen sinyal şiddetleri

4.8.1. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı Değeri (TAS, LOQ)

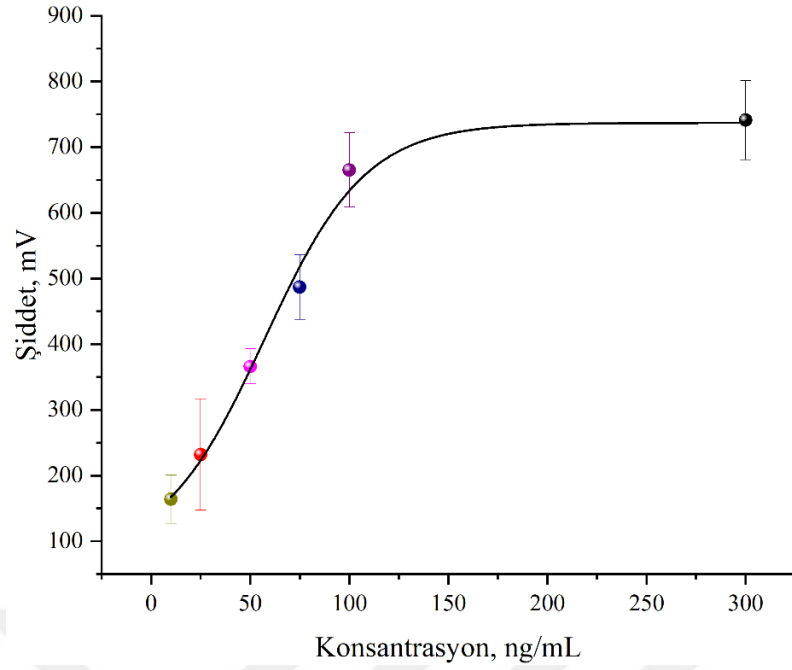
Kantitatif olarak elde edilen verilerden LFA kiti için teşhis sınırının ve tespit alt limitinin hesaplanması için Eşitlik 2 ve 3'te ifade edilen formüller kullanılmıştır (Engin vd, 2017).

$$TS = \frac{3.3 \times \sigma}{m} \quad (2)$$

Buradaki eşitlikte “m” kalibrasyon eğrisinin eğimini “σ” ise standart sapmayı ifade etmektedir. (“σ” değeri kesişim değerinin (y-intercept) standart sapması kullanılarak hesaplanmıştır.)

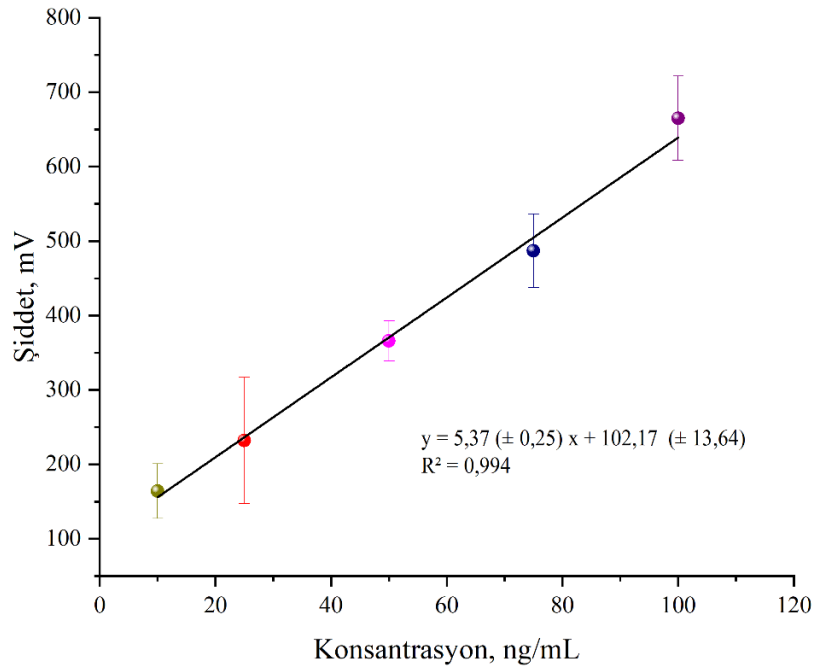
$$TAS = \frac{\Phi \times \sigma}{m} \quad (3)$$

Eşitlik 2'deki σ: cevabın standart sapmasını, m: kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade etmektedir. Şekil 4.59'da gösterilen test çizgisi bölgesindeki şiddetin konsantrasyonla bağlantısını vermek amacıyla çizilen grafik Şekil 4.60'da gösterilmektedir.



Şekil 4.60. Farklı konsantrasyonlarda (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) BH çözeltisi ile yürütülen LFA'ların kolorimetrik okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddetindeki değişim

Şekil 4.60'a göre 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL ve 100 ng/mL konsantrasyon aralığındaki lineer artışa bakıldığında $R^2 = 0,994$ olduğu bölge için elde edilen grafik Şekil 4.61'de verilmektedir.

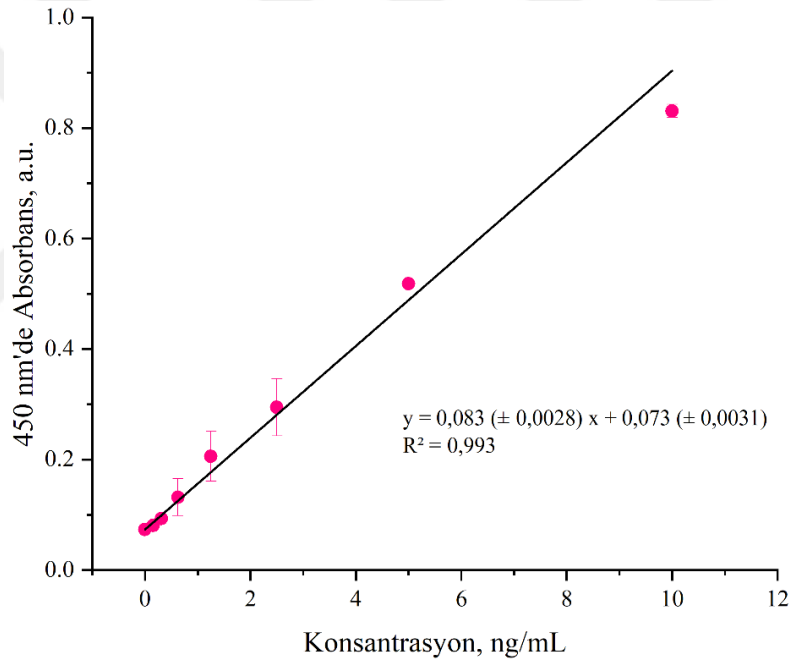


Şekil 4.61. Farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 ng/mL) büyüme hormonu çözeltisi ile yürütülen LFA'ların kolorimetrik okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddetindeki elde edilen lineer eğri ve denklemi

Şekil 4.61' de gösterilen grafikteki değerler kullanılarak büyüme hormonu için elde edilen BH-LFA test kitinin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla Eşitlik 2 ve Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlik 2 ve Eşitlik 3 kullanılarak LOD değeri 8,38 ng/mL ve LOQ değeri 25,40 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra geliştirilen sensörün hassasiyet değeri $5,37 \text{ mV/ng mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

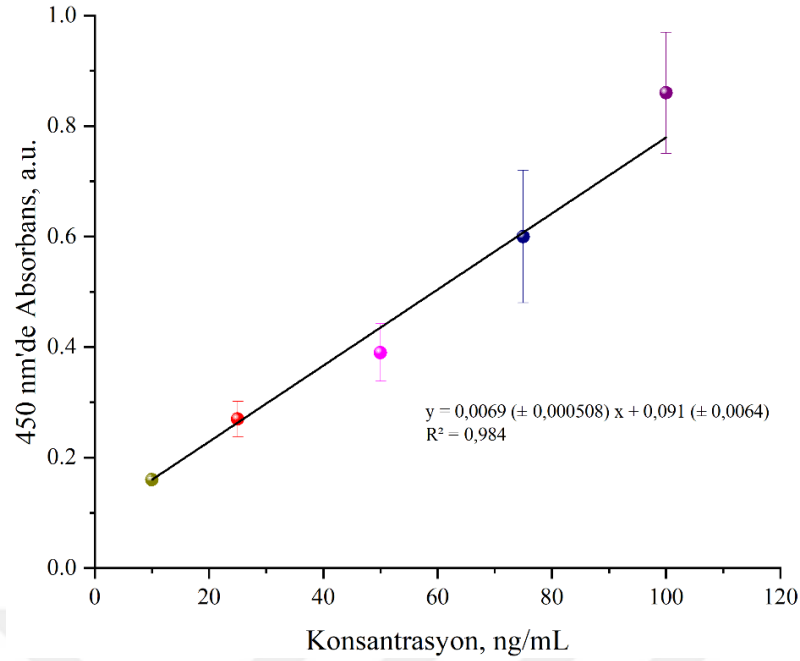
4.8.2. ELISA Testi Sonuçları

ELISA testi için tarafımızdan temin edilen ELISA standart numunesinin 0 ng/mL, 0,312 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL derişimlerinde hazırlanan çözeltilerinin 450 nm'de ELISA okuyucu ile elde edilen değerlerinin kalibrasyon grafiği Şekil 4.62'de gösterilmiştir.



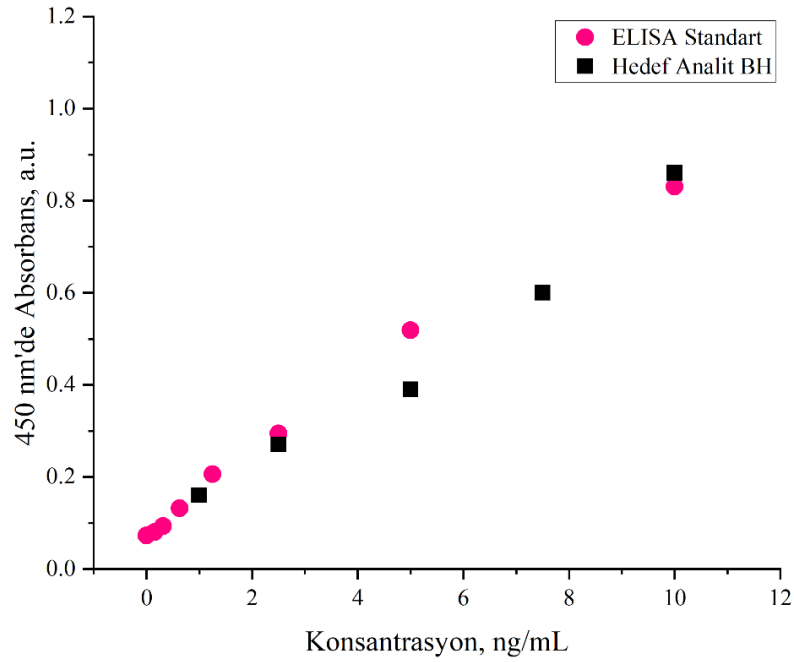
Şekil 4.62. ELISA standart kalibrasyon grafiği ve denklemini

LFA çalışmasında kullanılan hedef analit çözeltilisinin 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL ve 100 ng/mL konsantrasyonlarında çözeltileri 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. ELISA okuyucu ile elde edilen değerler Şekil 4.63'te sunulmuştur.



Şekil 4.63. BH-LFA konsantrasyon grafiği

ELISA standart çözeltilerinin ELISA okuyucu ile elde edilen değerleri ve LFA'da kullanılmak üzere hazırlanan çözeltilerin değerleri aynı grafik üzerinde Şekil 4.64'te gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde kullanılan değerlerin birbirleriyle uyumluluk gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.64. ELISA standart kalibrasyon grafiği (0 ng/mL, 0,312 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL) ve BH-LFA konsantrasyon (10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL) grafiği

Çizelge 4.15. Geliştirilen BH-LFA'da farklı konsantrasyonlarda yapılan yürütmeler sonucu elde edilen geri kazanım değerleri

Numune	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	Geri Kazanım (%)
1	10 ng/mL	9,40 ± 8,21	94,00
2	25 ng/mL	21,69 ± 5,69	86,76
3	50 ng/mL	41,56 ± 6,69	83,12
4	75 ng/mL	59,25 ± 5,43	79,00
5	100 ng/mL	109,34 ± 10,62	109,34

Geliştirilen BH-LFA ile BH tayinine yönelik sonuçlar Çizelge 4.15'te gösterilmektedir. Geri kazanım değerlerine bakıldığında geri kazanım değerleri 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL ve 100 ng/mL, için sırasıyla %94,00, %86,76, %83,12, %79,00 ve %109,34 olarak hesaplanmıştır.

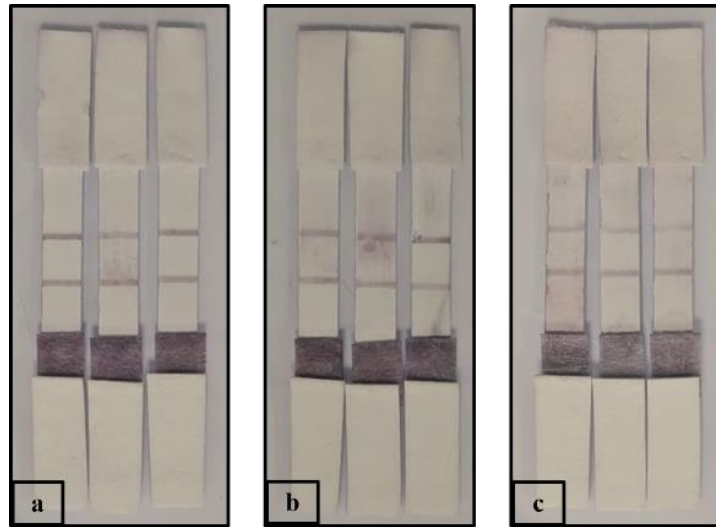
Çizelge 4.16. Farklı konsantrasyonlardaki BH'nin ELISA testi ile elde edilen geri kazanım değerleri

Numune	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	Geri Kazanım (%)
1	10 ng/mL	10,02 ± 0,59	100,20
2	25 ng/mL	24,28 ± 3,80	97,12
3	50 ng/mL	38,60 ± 6,28	77,19
4	75 ng/mL	63,05 ± 15,01	84,07
5	100 ng/mL	95,37 ± 13,32	95,37

Çizelge 4.16'da gösterilen referans metot ELISA ile yapılan yapay serum örneklerinde BH analizi sonuçlarına bakıldığında, ELISA için geri kazanım değerleri 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL ve 100 ng/mL, için sırasıyla %100,20, %97,12, %77,19, %84,07 ve %95,37 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen geri kazanım değerleri tasarlanan LFA test kitinin BH tayini için uygun olduğu ve kantitatif analiz için başarılı bir şekilde kullanılabilineceğini göstermektedir (Engin vd, 2017).

4.8.3. Kararlılık Çalışmaları

LFA testlerinde kararlılık testin geçerliliğinin kanıtlanması için önemli bir parametre olmasından dolayı elde edilen BH-LFA sisteminde kısa (2saat, 24 saat) ve uzun dönem (6 ay) kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan LFA'lar alüminyum folyo içerisinde kapalı bir şekilde oda sıcaklığında saklanmıştır. Çalışmada tüm kitlerde aynı konsantrasyon değerinde (100 ng/mL) BH çözeltisi yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.65'te gösterilmiştir.



Şekil 4.65. Linear çalışma aralığında belirlenen konsantrasyon değerinde (100 ng/mL) kısa ve uzun dönem kararlık çalışmalarında elde edilen LFA'lara ait görüntüler, **a)** Kısa dönem (2saat), **b)** Kısa dönem (24 saat), **c)** Uzun dönem (6 ay)

Çizelge 4.17. BH tayinine yönelik geliştirilen LFA test kitinin kısa dönem kararlılık sonuçları

Numune	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	BSS (%)
2 saat	100 ng/mL	118,59 ± 5,83	4,92
24 saat	100 ng/mL	104,31 ± 5,89	5,65

Çizelge 4.18. BH tayinine yönelik geliştirilen LFA test kitinin uzun dönem kararlılık sonuçları

Numune	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)	BSS (%)
6 ay	100 ng/mL	109,47 ± 14,90	13,61

Kalibrasyon grafiğine göre elde edilen sonuçlar, standart sapmaları ve yüzde bağlı standart sapmaları (%BSS) Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18'de sunulmuştur. Kısa dönem kararlık çalışmalarında 4,92 (2 saat için) ve 5,65 (24 saat için) %BSS değerleri elde edilmiştir. Uzun dönem kararlılık cevaplarındaki bu değer ise %13,61'dir. %BSS değeri her ne kadar zamanla artsa da test cevaplarında önemli bir değişim gözlenmemekle birlikte alınan test cevapları birbirlerine yakındır. Uzun dönem kararlılıktaki test sinyalindeki düşüşün test kitinin saklama koşullarının ticari bir kitte olduğu kadar profesyonel bir aşama içermemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, literatürde biyolojik numunelerde %BSS'nin 10-15 oranında konsantrasyon düzeylerindeki değişim olması kabul edilebilir bir değer olarak ifade edilmektedir (Engin vd, 2017). Dolayısıyla, elde edilen test kitlerinin karanlık ortamda uzun dönemde (6 ay) kadar kullanılabilirliğinin olduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında büyüme ve gelişmede büyük önem taşıyan büyüme hormonu (BH) tayinine yönelik hızlı sonuç alınabilen bir bakım noktası kiti olan LFA sistemi elde edilmiştir. Bu sayede uzman personele gerek duymadan, hızlı, uygulaması kolay yaklaşık 10 dakika gibi kısa sürede yanıt verebilen bir BH sensör elde edilmiştir. Sensör tasarımı için gerekli olan temel bileşenlerin optimizasyon aşamaları yapılmış ideal koşullar belirlenmiştir. Çalışmaya konjugasyon aşamasında kullanılacak olan AuNP'lerin sentezi ve karakterizasyonu ile başlanmıştır. Turkevich yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin boyut stabilitesini sağlamak amacıyla geri soğutucu altında sentez yapılmış, elde edilen nanopartiküllerin STEM görüntüleri alınmış ve Image J programı yardımıyla partikül boyutları hesaplanmıştır. Image J programıyla yapılan hesaplamalar sonucu nanopartiküllerin ortalama boyutu 39,5 nm olarak bulunmuştur. Çalışmanın başlangıcında hedeflenen yaklaşık 40 nm boyutlu nanopartikül kullanımına yönelik hedef gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçları teyit etmek amacıyla hizmet alımıyla partikül boyut ölçüm cihazıyla nanopartiküllerin boyutları ölçümü yaptırılmıştır. Nanopartikül cihazıyla elde edilen sonuçlara da bakıldığında normalleştirilmiş yoğunluk dağılımı 43,3 nm olarak ölçülmüştür.

Spektroskopik karakterizasyon aşamasında ise alınan UV ölçümlerinde AuNP'ler 530 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiği gözlenmiştir. Literatürde Turkevich metoduyla elde edilen 15-20 nm boyutundaki AuNP'lerin bordomsu renginin aksine 40 nm boyundaki nanopartiküllerin kırmızımsı pembe renge çözültü elde edilmiştir. UV ölçümlerinde yaklaşık 20 nm boyutundaki nanopartiküllerin 522 nm'de absorpsiyon gösterdiği gözlenirken boyut büyüdükçe dalgaboyu değerinin arttığı gözlenmiştir.

LFA kitinin oluşum aşamalarında birden çok parametrenin optimizasyonu gerekmektedir. Bunun için LFA'da 4 temel bileşen olan membran, konjugasyon, numune ve atık pedlerinin optimizasyonları yapılmıştır. Her bir bileşene ayrı ayrı optimizasyon yapılmış ve en ideal test kiti elde etmek için en optimum parametreler belirlenmiştir. İlk olarak numune pedine, konjugasyon pedine ve membrana LFA kiti oluşumundan önce herhangi bir ön işlem (immünotampon çözeltisi ile yıkama) yapılmasının gerekliliği araştırılmış ve her bir bileşen için immünotampon çözeltisi ile yıkama yapılmasına karar verilmiştir. Bunun için numune pedine damlatılan analitin konjugasyon pedindeki AuNP'leri membran yüzeyinde nasıl dağıttığı ve test kiti boyunca karşıya ulaşma

sürelerine bakılmıştır. Yıkama işlemine karar verdikten sonra immünotampon çözeltisi içerisindeki (BSA ve Tween-20) bileşenlerin miktarlarına karar verilmiştir. Membran yüzeyi blokması için farklı derişimlerde BSA içeren immünotampon çözeltileri hazırlanmıştır. %0,5 BSA , %1 BSA , %2 BSA %3 BSA, %4 BSA ve %5 BSA kullanılarak membran yıkamaları yapılmıştır. Tween-20 optimizasyonu için de her bir BSA yüzdesinde ayrı ayrı %0,100, %0,075 %0,050 %0,025 ve %0,010 Tween-20 içeren immünotampon çözeltileri hazırlanmış ve yapılan yürütme sonrası yıkama işlemi için en ideal yıkama çözeltisi oranlarının %0,050 Tween-20 ve %3 BSA içeren fosfat tamponu olduğu gözlenmiştir.

Membran yüzeyinde yapılan optimizasyonlar sonucu düzgün ve homojen bir şekilde test ve kontrol çizgileri çizilmiş olup, optimum test ve kontrol çizgisi miktarları sırasıyla 4 µL – 4 µL olduğu gözlenmiştir. Test ve kontrol çizgilerine antikorların yazdırılması esnasında antikorun yüzeye dağılmaması ve çizginin düzgün ve homojen olması için antikor çözeltisine yaklaşık %10 oranında etil alkol eklenmiştir. Böylece test ve kontrol çizgisi bölgelerinde düzgün ve homojen çizgiler elde edilmiştir.

Test ve kontrol çizgisi optimizasyonu yapılan membranlar, yaklaşık olarak 5 mm genişliğinde kesilerek kullanılmıştır. BH tespiti için yapılan test kitiyle kalitatif (var/yok) analizi yapılmış olup, 100 ng/mL BH varlığında kalitatif tayin başarılı bir şekilde yapılmıştır. Kalitatif olarak elde edilen BH-LFA test kitinde analitin farklı pH'lerde (6,0; 7,0; 7,4 ve 8,0) çözeltileri hazırlanarak yürütme işlemi yapılmıştır. Elde edilen LFA'larda test ve kontrol çizgilerindeki sonuçlar değerlendirildiğinde pH 7,4 değerinin en ideal olduğu anlaşılmıştır. Kalitatif tayinin yanı sıra kantitatif olarak da kolorimetrik okuyucu yardımıyla 0-300 ng/mL aralığında şiddet veren bir hızlı tanı kiti elde edilmiştir. Farklı derişimlerde hazırlanan BH çözeltileri (0 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL ve 300 ng/mL) test kitinde yürütülerek yarı kantitatif BH tayini yapılabilirliği kanıtlanmıştır. Test kitindeki test çizgilerinin yalın gözle görülen renk şiddetindeki artışın BH miktarı ile doğru orantılı olması ve bu sonucun kolorimetrik okuyucu ile de onaylanmış olması BH'nin kantitatif analizinin de başarılı bir şekilde yapıldığının göstergesidir.

Kantitatif analizler sonucu elde edilen sonuçlardan BH için tayin tespit sınırı LOD değeri 8,38 ng/mL ve LOQ değeri 25,40 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra geliştirilen sensörün hassasiyet değeri 5,37 mV/ng mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Kısa ve uzun dönem kararlılık testleri de yapılan test kitlerinde 6 ayda bile test sinyallerinin büyük değişim göstermediği gözlenmiştir. Son olarak elde edilen test kitinin

ELISA testi sonuçları ile kıyaslaması yapılmış ve ELISA için geri kazanım değerleri 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL ve 100 ng/mL için sırasıyla %100, 20, %97, 12, %77,19, %84,07 ve %95,37 olarak hesaplanırken geliştirilen BH-LFA ile geri kazanım değerleri %79 - %109,34 arasında bulunmuştur.

5.2. Öneriler

LFA sistemlerinde test kitinin düzgün ve doğru çalışabilmesi birden çok parametreye bağlıdır. Bunun için yapılan tez çalışmasında hızlı tanı kitini oluşturan her bir bileşenin optimizasyonu yapılmıştır. Bunun için çalışmalar sırasında karşılaşılan zorluklar ve bu konudaki öneriler aşağıda sunulmuştur.

➤ AuNP sentezinde elde edilen nanopartiküllerin boyutlarının stabilitesi için çalışmanın geri soğutucu altında yapılması önerilir. Aksi takdirde atmosfer ortamında kaynama esnasında meydana gelen madde kaybı partikül boyutunu değiştirmektedir.

➤ Elde edilen AuNP'lerde boyut büyük olmasından kaynaklı (yaklaşık 40 nm) boyutundaki agregasyon gözlenmektedir. Bu yüzden sentezlenen çözeltinin 15 gün içerisinde kullanılması önerilir.

➤ İmmünotampon çözeltisi beklediğinde sararma gibi problemlere sebebiyet vermesinden dolayı çözeltinin taze hazırlanması ve en fazla 1 hafta içerisinde kullanılıp bitirilmesi önerilir.

➤ Konjugasyon aşamasında agregasyonu önlemek amacıyla kullanılan tampon çözeltisi pH'sının antikor pH'sına yakın olmasına dikkat edilmelidir.

➤ Yıkama işlemi yapılmış membran kapalı bir ortamda muhafaza edilmelidir.

➤ Membran yüzeyine test ve kontrol çizgilerinde yazdırılmak üzere kullanılan antikor çözeltilerine eklenecek olan alkol (yaklaşık %10) çizgilerdeki dağılmayı engelleyerek çizgi kalınlıklarının kontrol edilmesini sağlamaktadır.

➤ Test ve kontrol çizgilerini yazdırmak için kullanılan şırınga her kullanımdan sonra saf su, etil alkol ve asetonla en az 3'er kez olmak üzere yıkanmalıdır. Yıkandıktan sonra kuru bir şekilde bırakılması gerekmektedir. Şırınga içerisindeki silikon başlık deforme olduğunda şırınga çözeltiyi akıtmaktadır.

➤ Test kitleri giyotin ile kesilirken bir önceki kesimden kalan membran kalıntıları test kitinin düzgün kesilmemesine ve membran yüzeyinde deformasyona sebep olmaktadır. Bunun için giyotinin bıçaklarının her kullanımdan önce saf su, alkol ve aseton

ile temizlenmesi önerilir. Ayrıca test kitlerinin her seferinde aynı ölçekte kesilmesi için cetvel kullanılması önerilir.

➤ Membran yüzeyinde yürütme yapılırken hızlı eklenen çözelti, konjugasyon pedinin daha çok numune pedine yakın olan diğer tarafından ortamı terk etmektedir. Bu da konjugasyon pedindeki konjuge edilmiş antikorların test bölgesine ulaşmasını engellemekte ve ortamı numune pedi tarafından terk etmesine sebep olmaktadır. Bunun için hedef analit çözeltisinin numune pedine yavaş yavaş belli bir periyotta enjekte edilmesi önerilir.

➤ Yürütme işleminde çözeltinin fazlası atık pedinde toplanmaktadır. Atık pedinin yetersiz kaldığı durumlarda ortamdaki fazla sıvıyı almak amacıyla fazladan atık pedi kullanılabilir.

➤ LFA kitindeki yanlış olumlu (false pozitif) diye adlandırılan durumun yaşanmaması için membran bloklamasının (BSA gibi proteinlerle) çok iyi yapılması gerekmektedir. Ancak burada da bloklama yaparken asıl test çizgisini BSA gibi bloklayıcıların gölgelemediğinden de emin olmak gerekmektedir.

➤ Test ve kontrol çizgisine yazdırılacak olan antikorların sinyal şiddetine olan etkilerinde antikor konsantrasyonlarının da önemli birer parametre olduğu unutulmamalıdır. Bunun için test ve kontrol çizgilerindeki antikorların derişim hesabı yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abdullah, N. R. A., Jason, W. L. C., & Nasruddin, A. B. (2017). Pachydermoperiostosis: a rare mimicker of acromegaly. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports*, 2017. <https://doi.org/10.1530/edm-17-0029>
- Akirov, A., Masri-Iraqi, H., Dotan, I., & Shimon, I. (2021). The biochemical diagnosis of acromegaly. *Journal of Clinical Medicine*, 10(5), 1–8. <https://doi.org/10.3390/jcm10051147>
- Alam, N., Tong, L., He, Z., Tang, R., Ahsan, L., & Ni, Y. (2021). Improving the sensitivity of cellulose fiber-based lateral flow assay by incorporating a water-dissolvable polyvinyl alcohol dam. *Cellulose*, 28(13), 8641–8651. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04083-3>
- Aldallal, S. (2018). Acromegaly: A challenging condition to diagnose. *International Journal of General Medicine*, 11, 337–343. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S169611>
- Allafchian, A. R., Moini, E., & Mirahmadi-Zare, S. Z. (2018). Flower-Like Self-Assembly of Diphenylalanine for Electrochemical Human Growth Hormone Biosensor. *IEEE Sensors Journal*, 18(21), 8979–8985. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2018.2869071>
- Ambrosi, A., Airò, F., & Merkoçi, A. (2009). Enhanced Gold Nanoparticle Based ELISA for a Breast Cancer Biomarker. *Analytical Chemistry*, 82(3), 1151–1156. <https://doi.org/10.1021/AC902492C>
- Ashpole, N. M., Sanders, J. E., Hodges, E. L., Yan, H., & Sonntag, W. E. (2015). Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. *Experimental Gerontology*, 68, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.10.002>
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286–306. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2016.06.006>
- Balevicius, Z., Ramanaviciene, A., Baleviciute, I., Makaraviciute, A., Mikoliunaite, L., & Ramanavicius, A. (2011). Evaluation of intact- and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 160(1), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.08.029>
- Bambang Kuswandi, A., & Ensafi, A. A. (2019). *Paper-Based Biosensors : Trending Topic in Clinical Diagnostics Developments and Commercialization*. <https://doi.org/10.1149/2.0092003JES>
- Belén González-Guerrero, A., Maldonado, J., Dante, S., Grajales, D., & Lechuga, L. M. (2016). *Direct and label-free detection of the human growth hormone in urine by an ultrasensitive bimodal waveguide biosensor*. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600154>
- Boguszewski, M. C. S. (2021). Growth hormone deficiency and replacement in children. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 22(1), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09604-2>
- Bohlooli, S., Kia, S., Bohlooli, S., & Sariri, R. (2021). Development of molecularly imprinted polymer on ferric oxide nanoparticles modified electrode as electrochemical sensor for detection of human growth hormone. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00706-021-02877-6>
- C.Guyton, J. E. H. A. (2017). Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*. Güneş Tıp Kitabevleri.
- Carter, C. S., Ramsey, M. M., & Sonntag, W. E. (2002). A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan. *Trends in Genetics*, 18(6), 295–

301. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02696-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02696-3)
- Çelik, Ü. (2015). *Akromegali Hastalarında, Büyüme Hormonu Ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 Düzeyleri İle Metabolik Sendrom Komponentleri Ve Kardiyovasküler Risk Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa*
- Chamorro-Garcia, A., de la Escosura-Muñiz, A., Espinoza-Castañeda, M., Rodriguez-Hernandez, C. J., de Torres, C., & Merkoçi, A. (2016). Detection of parathyroid hormone-like hormone in cancer cell cultures by gold nanoparticle-based lateral flow immunoassays. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(1), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.012>
- Chen, J., Liu, Z., Yang, R., Liu, M., Yao, J., Zhang, M., Li, N., Yuan, Z., Jin, M., & Shui, L. (2022). A label-free optical immunoassay based on birefringence of liquid crystal for insulin-like growth factor-I sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *352*(October 2021), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131028>
- Chen, X., Ding, L., Huang, X., & Xiong, Y. (2022). Tailoring noble metal nanoparticle designs to enable sensitive lateral flow immunoassay. *Theranostics*, *12*(2), 574–602. <https://doi.org/10.7150/THNO.67184>
- Choi, J. R., Hu, J., Feng, S., Wan Abas, W. A. B., Pinguan-Murphy, B., & Xu, F. (2016). Sensitive biomolecule detection in lateral flow assay with a portable temperature–humidity control device. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.12.005>
- Christopher, P., Robinson, N., & Shaw, M. K. (2005). Antibody-Label Conjugates in Lateral-Flow Assays. *Drugs of Abuse*, 87–98. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-951-6_5
- Crespi, F. (2017). Central [CNS] and peripheral [gastric tissue] selective monitoring of somatostatin (SRIF) with micro-sensor and voltammetry in rats: Influence of growth factors (GH, EGF). *Biosensors*, *7*(4). <https://doi.org/10.3390/bios7040053>
- Di Nardo, F., Chiarello, M., Cavalera, S., Baggiani, C., & Anfossi, L. (2021). Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. *Sensors*, *21*(15). <https://doi.org/10.3390/s21155185>
- Donahue, C. P., Kosik, K. S., & Shors, T. J. (2006). Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(15), 6031–6036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507776103>
- Drinkwater, B. L., Nilson, K., Chesnut, C. H. I., Bremner, W. J., Shainholtz, S., & Southworth, M. B. (2010). *Bone Mineral Content of Amenorrheic and Eumenorrheic Athletes*. *311*(5), 277–281. <https://doi.org/10.1056/NEJM198408023110501>
- Engin vd, (2017). “Analitik Yöntem Geçerliliği”. *Türk Farmakope Dergisi*. 74–92.
- Erdağ, E. (2012). Büyüme Hormonu Eksikliğinin Derecesini Ve Tedaviye Alınacak Yanıtı Öngörmede Bazal Igf-1 Ve Igf Bp-3 Değerlerinin Önemi. *Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara*
- Fu, X., Cheng, Z., Yu, J., Choo, P., Chen, L., & Choo, J. (2016). A SERS-based lateral flow assay biosensor for highly sensitive detection of HIV-1 DNA. *Biosensors & bioelectronics*, *78*, 530–537. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.11.099>
- Gabreanu, G. R. (2018). An update on the diagnosis of growth hormone deficiency. *Discoveries*, *6*(1), e82. <https://doi.org/10.15190/d.2018.2>
- Gambhir, S. S., Ge, T. J., Vermesh, O., & Spitler, R. (2018). Toward achieving precision health. *Science Translational Medicine*, *10*(430). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao3612>
- Gasco, V., Ferrero, A., Bisceglia, A., Prencipe, N., Cambria, V., Bioletto, F., Ghigo, E.,

- MacCario, M., & Grotto, S. (2021). The Cut-off Limits of Growth Hormone Response to the Insulin Tolerance Test Related to Body Mass Index for the Diagnosis of Adult Growth Hormone Deficiency. *Neuroendocrinology*, *111*(5), 442–450. <https://doi.org/10.1159/000508103>
- Gascoin-Lachambre, G., Brauner, R., Duche, L., & Chalumeau, M. (2011). Pituitary stalk interruption syndrome: Diagnostic delay and sensitivity of the auxological criteria of the growth hormone research society. *PLoS ONE*, *6*(1), 16367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016367>
- Ghasemi, F., Fahimi-Kashani, N., Bigdeli, A., Alshatteri, A. H., Abbasi-Moayed, S., Al-Jaf, S. H., Merry, M. Y., Omer, K. M., & Hormozi-Nezhad, M. R. (2023). Paper-based optical nanosensors – A review. *Analytica Chimica Acta* (C. 1238, s. 340640). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340640>
- Girard, M., & Mousseau, N. (1999). Analysis of human growth hormone by hydrophobic interaction HPLC. Method development, validation, and comparative selectivity to reversed phase HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *22*(8), 1103–1116. <https://doi.org/10.1081/JLC-100101720>
- Gong, X., Cai, J., Zhang, B., Zhao, Q., Piao, J., Peng, W., Gao, W., Zhou, D., Zhao, M., & Chang, J. (2017). A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips. *Journal of Materials Chemistry B*, *5*(26), 5079–5091. <https://doi.org/10.1039/C7TB01049D>
- Goux, H. J., Vu, B. V., Wasden, K., Alpadi, K., Kumar, A., Kalra, B., Savjani, G., Brosamer, K., Kourentzi, K., & Willson, R. C. (2023). Development of a quantitative fluorescence lateral flow immunoassay (LFIA) prototype for point-of-need detection of anti-Müllerian hormone. *Practical Laboratory Medicine*, *35*(April), e00314. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2023.e00314>
- Growth Hormone Research Society. (2011). Consensus Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Growth Hormone (GH) Deficiency in Childhood and Adolescence: Summary Statement of the GH Research Society. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* (C. 14, Sayı 4). <https://doi.org/10.1515/jpem.2001.14.4.377>
- Guevara-Aguirre, J., Guevara, A., Palacios, I., Pérez, M., Prócel, P., & Terán, E. (2018). GH and GHR signaling in human disease. *Growth Hormone and IGF Research*, *38*(December 2017), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2017.12.006>
- Hao Liu, Z., Li, K., Ding, Y. S., Qiu, J. X., Meng, S. S., Momin, M., Liu, S. C., Yi, T. C., & Li, J. P. (2018). Normalization of plasma growth hormone alleviated malignant ventricular tachycardia in acromegaly. *Journal of geriatric cardiology : JGC*, *15*(8), 547–550. <https://doi.org/10.11909/J.ISSN.1671-5411.2018.08.003>
- Hasan, İ. (2019). *Escherichia Coli Ve Salmonella Enteritidis Tayinine Yönelik Yatay Akış Analiz Sistemi Geliştirilmesi*. Hacettepe Üniversitesi.
- Haspolat, Y. K. (2021). *Büyüme hormonunun kemik metabolizması üzerine etkileri* (Sayı May 2018).
- Hennessey, H., Afara, N., Omanovic, S., & Padjen, A. L. (2009). Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. *Analytica Chimica Acta*, *643*(1–2), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.009>
- Hoang, T. X., Phan, L. M. T., Vo, T. A. T., & Cho, S. (2021). Advanced signal-amplification strategies for paper-based analytical devices: A comprehensive review. *Biomedicine* (C. 9, Sayı 5). <https://doi.org/10.3390/biomedicine9050540>
- Höybye, C., & Christiansen, J. S. (2015). Growth hormone replacement in adults -current standards and new perspectives. *Best Practice and Research: Clinical*

- Endocrinology and Metabolism*, 29(1), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.09.006>
- Hu, J., Wang, S. Q., Wang, L., Li, F., Pingguan-Murphy, B., Lu, T. J., & Xu, F. (2014). Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 585–597. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2013.10.075>
- Isgaard, J., Arcopinto, M., Karason, K., & Cittadini, A. (2015). GH and the cardiovascular system: an update on a topic at heart. *Endocrine*, 48(1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0327-6>
- Iwayama, H., Kitagawa, S., Sada, J., Miyamoto, R., Hayakawa, T., Kuroyanagi, Y., Muto, T., Kurahashi, H., Ohashi, W., Takagi, J., & Okumura, A. (2021). Insulin-like growth factor-1 level is a poor diagnostic indicator of growth hormone deficiency. *Scientific Reports*, 11(1), 16159. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95632-0>
- Ju, Q., Noor, M. O., & Krull, U. J. (2016). Paper-based biodetection using luminescent nanoparticles. *Analyst*, 141(10), 2838–2860. <https://doi.org/10.1039/C6AN00129G>
- Jung, W., Han, J., Choi, J. W., & Ahn, C. H. (2015). Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. *Microelectronic Engineering*, 132, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2014.09.024>
- Karir, T. K., Mirapurkar, S. M., Jyotsana, N., & Sivaprasad, N. (1999). Radioiodination of recombinant human growth hormone and its use in radioimmunoassay. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (C. 240, Sayı 1). <https://doi.org/10.1007/BF02349176>
- Kaya, E., Akata, I., Bakırcı, S., Dereli, D., Küçüküven, E., & Yılmaz, İ. (2014). İmmünokromatografik Kart Testlerin Çalışma Prensipli Ve Üretim Teknikleri, Working Principle and Production Techniques of the Immunochromatographic Card Tests. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi Duzce Medical Journal*, 16(3), 45–53.
- Kettler, H., White, K., Hawkes, S. J., for Research, U. B. S. P., & in Tropical Diseases, T. (2004). *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections : key findings and recommendations / Hannah Kettler, Karen White, Sarah Hawkes* (s. TDR/STI/IDE/04.1). <https://iris.who.int/handle/10665/68990>
- Khlebtsov, B. N., Bratashov, D. N., Byzova, N. A., Dzantiev, B. B., & Khlebtsov, N. G. (2019). SERS-based lateral flow immunoassay of troponin I by using gap-enhanced Raman tags. *Nano Research*, 12(2), 413–420. <https://doi.org/10.1007/S12274-018-2232-4>
- Kim, H. T., Jin, E., & Lee, M. H. (2021). Portable chemiluminescence-based lateral flow assay platform for the detection of cortisol in human serum. *Biosensors*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/bios11060191>
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Kopchick, J. J., Berryman, D. E., Puri, V., Lee, K. Y., & Jorgensen, J. O. L. (2020). The effects of growth hormone on adipose tissue: old observations, new mechanisms. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(3), 135–146. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0280-9>
- Krug, S., Boch, M., Rexin, P., Pfestroff, A., Gress, T., Michl, P., & Rinke, A. (2016). Acromegaly in a patient with a pulmonary neuroendocrine tumor: Case report and review of current literature. *BMC Research Notes*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2132-1>
- Kurtinaitiene, B., Ambrozaite, D., Laurinavicius, V., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2008). Amperometric immunosensor for diagnosis of BLV infection. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(10), 1547–1554.

- <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.014>
- Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X. S., Ramsay, A. R., & Peeling, R. W. (2019). REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature Microbiology*, 4(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>
- Langkamp, M., Weber, K., & Ranke, M. B. (2008). Human growth hormone measurement by means of a sensitive ELISA of whole blood spots on filter paper. *Growth Hormone and IGF Research*, 18(6), 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2008.04.007>
- Lee, V. B. C., Mohd-Naim, N. F., Tamiya, E., & Ahmed, M. U. (2018). Trends in Paper-based Electrochemical Biosensors: From Design to Application. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 34(1), 7–18. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.34.7>
- Li, G., Niu, P., Ge, S., Cao, D., & Sun, A. (2022). SERS Based Lateral Flow Assay for Rapid and Ultrasensitive Quantification of Dual Laryngeal Squamous Cell Carcinoma-Related miRNA Biomarkers in Human Serum Using Pd-Au Core-Shell Nanorods and Catalytic Hairpin Assembly. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.813007>
- Li, N., Chow, A. M., Ganesh, H. V. S., Ratnam, M., Brown, I. R., & Kerman, K. (2019). Diazonium-modified screen-printed electrodes for immunosensing growth hormone in blood samples. *Biosensors*. <https://doi.org/10.3390/bios9030088>
- Li, Z., Yang, J., Zhu, L., & Tang, W. (2016). Fabrication of paper micro-devices with wax jetting. *RSC Advances*, 6(22), 17921–17928. <https://doi.org/10.1039/C5RA26255K>
- Lu, M., Flanagan, J. U., Langley, R. J., Hay, M. P., & Perry, J. K. (2019). Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0036-y>
- Mak, W. C., Beni, V., & Turner, A. P. F. (2016). Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.017>
- Millipore, M. (2013). *Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development*.
- Moura, J. F., DeLacerda, L., Sandrini, R., Borba, F. M., Castelo, D. N., Sade, E. R., Sella, S., Minozzo, J. C., Calfe, L. G., & Figueiredo, B. C. (2004). ELISA for determination of human growth hormone: Recognition of helix 4 epitopes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (C. 2004, Sayı 3). <https://doi.org/10.1155/S1110724304308090>
- Murray, P. G., Dattani, M. T., & Clayton, P. E. (2016). Controversies in the diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. *Archives of Disease in Childhood*, 101(1), 96–100. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-307228>
- Natarajan, S., Saatçi, E., & Joseph, J. (2022). Development and Evaluation of Europium-Based Quantitative Lateral Flow Immunoassay for the Chronic Kidney Disease Marker Cystatin-C. *Journal of Fluorescence*, 32(2), 419–426. <https://doi.org/10.1007/s10895-021-02886-y>
- Nguyen, Q. H., & Kim, M. Il. (2020). Nanomaterial-mediated paper-based biosensors for colorimetric pathogen detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116038. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2020.116038>
- Nguyen, V. T., Song, S., Park, S., & Joo, C. (2020). Recent advances in high-sensitivity

- detection methods for paper-based lateral-flow assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 152, 112015. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112015>
- Nuntawong, P., Putalun, W., Tanaka, H., Morimoto, S., & Sakamoto, S. (2022). Lateral flow immunoassay for small-molecules detection in phytoproducts: a review. *Journal of Natural Medicines*, 76(3), 521–545. <https://doi.org/10.1007/s11418-022-01605-6>
- Ohlsson, C., Bengtsson, B.-Å., Isaksson, O. G. P., Andreassen, T. T., & Słooweg, M. C. (1998). *Growth Hormone and Bone**. <https://academic.oup.com/edrv/article/19/1/55/2530792>
- Ong, N., & Sy, R. A. (2017). “Overgrowth: Missing a Tumor” Acromegaly without Imaging Evidence of Pituitary Adenoma and No Ectopic Source: A Case Report. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies*, 32(2), 173. <https://asean-endocrinejournal.org/index.php/JAFES/article/view/419>
- Pamies, R., Cifre, J. G. H., Espín, V. F., Collado-González, M., Baños, F. G. D., & De La Torre, J. G. (2014). Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(4). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2376-4>
- Parolo, C., Sena-Torralba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P., Cinti, S., Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2020). Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols*, 15(12), 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>
- Pesheva, E. (2021). *Precision-Driven Health Equity*.
- Polidori, N., Castorani, V., Mohn, A., & Chiarelli, F. (2020). Deciphering short stature in children. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*, 25(2), 69–79. <https://doi.org/10.6065/APEM.2040064.032>
- Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2015). Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.050>
- Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2017). Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 92(June 2016), 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.062>
- Ramanaviciene, A., German, N., Kausaite-Minkstimiene, A., Voronovic, J., Kirlyte, J., & Ramanavicius, A. (2012). Comparative study of surface plasmon resonance, electrochemical and electroassisted chemiluminescence methods based immunosensor for the determination of antibodies against human growth hormone. *Biosensors and Bioelectronics*, 36(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.036>
- Ramanaviciene, A., Popov, A., Baliunaite, E., Brasiunas, B., Kausaite-Minkstimiene, A., Tamer, U., Kirdaite, G., Bernotiene, E., & Mobasher, A. (2022). Magneto-Immunoassay for the Detection and Quantification of Human Growth Hormone. *Biosensors*, 12(2), 65. <https://doi.org/10.3390/bios12020065>
- Ramanaviciene, A., Snitka, V., Mieliauskiene, R., Kazlauskas, R., & Ramanavicius, A. (2006). AFM study of complement system assembly initiated by antigen-antibody complex. *Central European Journal of Chemistry*, 4(1), 194–206. <https://doi.org/10.1007/s11532-005-0015-8>
- Ramanavicius, A., Finkelsteinas, A., Cesiulis, H., & Ramanaviciene, A. (2010). Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor. *Bioelectrochemistry*, 79(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.09.013>

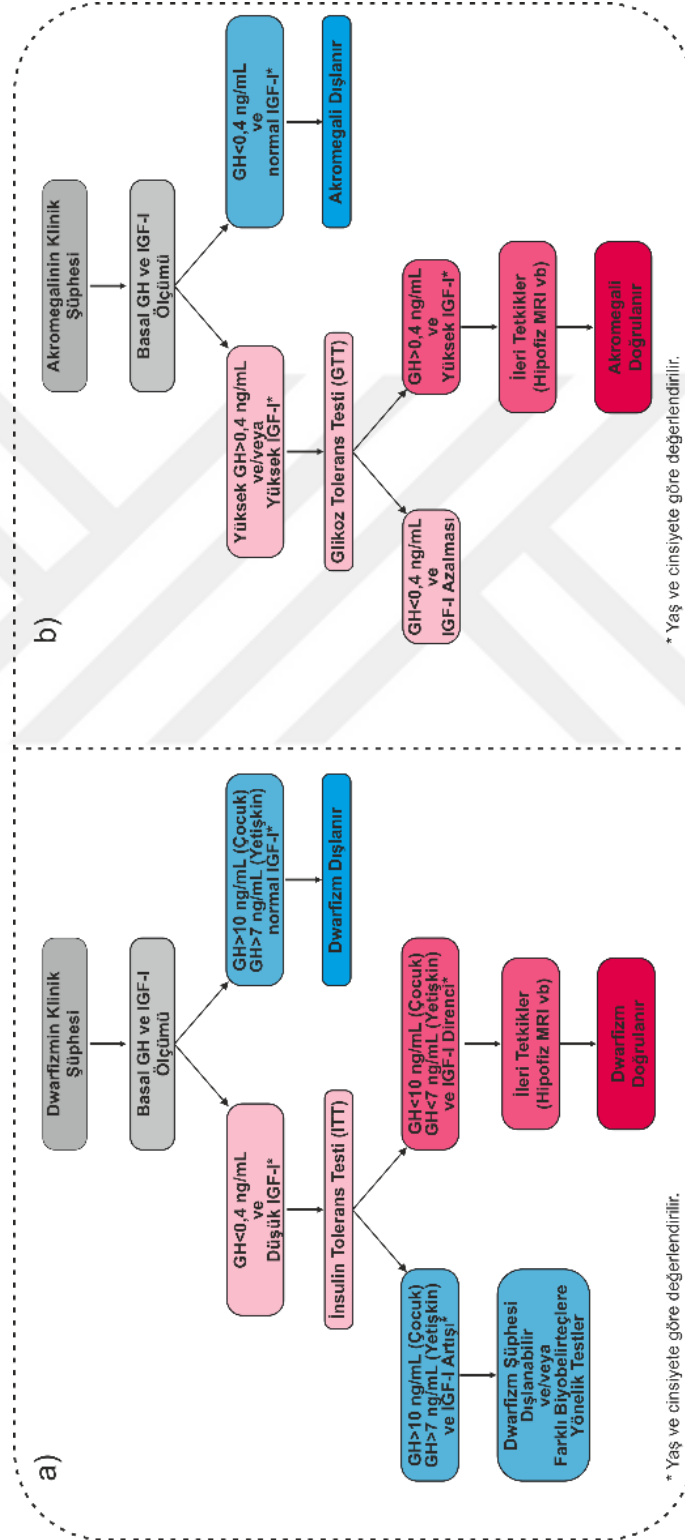
- Reed, G. F., Lynn, F., & Meade, B. D. (2002). Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1235–1239. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1235-1239.2002>
- Rezaei, B., Khayamian, T., Majidi, N., & Rahmani, H. (2009). Immobilization of specific monoclonal antibody on Au nanoparticles for hGH detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(2), 395–399. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2009.07.026>
- Richter, R. (2015). *Precision health: Predicting and preventing disease — not just treating it*.
- Sajid, M., Kawde, A. N., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), 689–705. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2014.09.001>
- Salvatori, R. (2015). Growth hormone deficiency in patients with obesity. *Endocrine*, 49(2), 304–306. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0571-4>
- Saribiyik, A., & Gurbuz, G. (2021). Effects of glass fiber reinforced polymer pipe waste powder usage on concrete properties. *Revista de la Construcción*, 20(3), 463–478. <https://doi.org/10.7764/RDLC.20.3.463>
- Savage, M. O., & Bang, P. (2012). The variability of responses to growth hormone therapy in children with short stature. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(Suppl 2), S178-84. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.104034>
- Schmidt, C., Borchering, H., Thiele, T., Schedler, U., Werner, F., Rödiger, S., Roggenbuck, D., & Schierack, P. (2021). Fluorescence-encoded poly(methyl methacrylate) nanoparticles for a lateral flow assay detecting IgM autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Analytical Biochemistry*, 633(June). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114389>
- Seele, P. P., Dyan, B., Skepu, A., Maserumule, C., & Sibuyi, N. R. S. (2023). Development of Gold-Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassays for Rapid Detection of TB ESAT-6 and CFP-10. *Biosensors*, 13(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/bios13030354>
- Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A. I., Ringe, E., & Van Duyne, R. P. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15(1–2), 16–25. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70017-2)
- Sigalos, J. T., & Pastuszak, A. W. (2018). The Safety and Efficacy of Growth Hormone Secretagogues. *Sexual Medicine Reviews*, 6(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2017.02.004>
- Srinivasan, B., & Tung, S. (2015). Development and Applications of Portable Biosensors. *Journal of Laboratory Automation*, 20(4), 365–389. <https://doi.org/10.1177/2211068215581349>
- Srinivasan, S., Ranganathan, V., McConnell, E. M., Murari, B. M., & DeRosa, M. C. (2023). Aptamer-based colorimetric and lateral flow assay approaches for the detection of toxic metal ions, thallium(i) and lead(ii). *RSC Advances*, 13(29), 20040–20049. <https://doi.org/10.1039/D3RA01658G>
- Sriram, G., Bhat, M. P., Patil, P., Uthappa, U. T., Jung, H. Y., Altalhi, T., Kumeria, T., Aminabhavi, T. M., Pai, R. K., Madhuprasad, & Kurkuri, M. D. (2017). Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93, 212–227. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.06.005>
- Sukumaran, A., Thomas, T., Thomas, R., Thomas, R. E., Paul, J. K., & Vasudevan, D. M. (2021). Development and Troubleshooting in Lateral Flow Immunochromatography Assays. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 36(2),

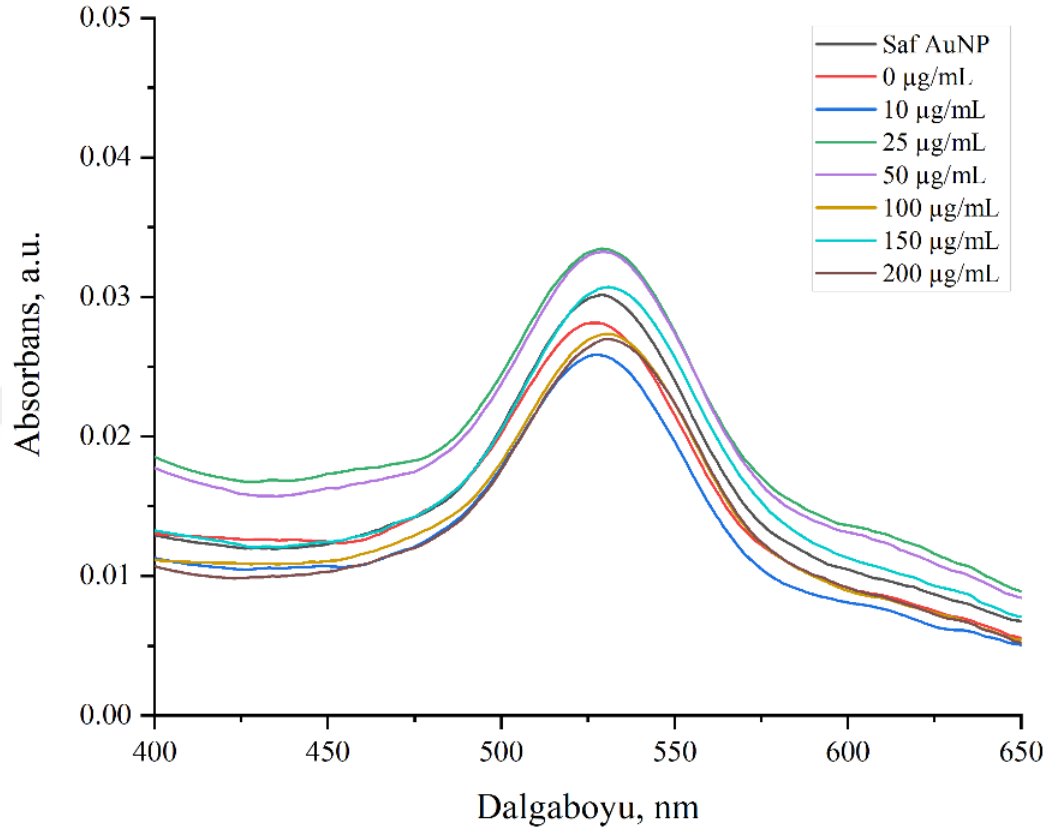
- 208–212. <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00887-5>
- Svensson, J., Johannsson, G., & Bengtsson, B. Å. (1997). Insulin-like growth factor-I in growth hormone-deficient adults: Relationship to population-based normal values, body composition and insulin tolerance test. *Clinical Endocrinology (C. 46, Sayı 5)*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1997.1851001.x>
- Tang, R., Xie, M. Y., Li, M., Cao, L., Feng, S., Li, Z., & Xu, F. (2022). Nitrocellulose Membrane for Paper-based BiosensorN. *Applied Materials Today*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101305>
- Tidblad, A. (2022). The history, physiology and treatment safety of growth hormone. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 111(2), 215–224. <https://doi.org/10.1111/apa.15948>
- Tirgil, N. Y. (2022). Paper-Based Biosensor System for Fast and Sensitive Phenolic Compounds Detection. *J. Sci. Eng*, 5(1), 13–21. <https://doi.org/10.34088/kojose.887169>
- Torul, H. (2016). Kağıt Tabanlı Mikro Akışkan Çiplerin Geliştirilmesi; Kan Matriksinde Glikoz Ve Kanser Biyobelirteç Tayini. *Doktora Tezi Analitik Kimya Anabilim Dalı Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Treviño, J., Calle, A., Rodríguez-Frade, J. M., Mellado, M., & Lechuga, L. M. (2009). Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay. *Talanta*, 78(3), 1011–1016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.012>
- Treviño, Juan, Calle, A., Rodríguez-Frade, J. M., Mellado, M., & Lechuga, L. M. (2009). Surface plasmon resonance immunoassay analysis of pituitary hormones in urine and serum samples. *Clinica Chimica Acta*, 403(1–2), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.01.015>
- Tsai, T. T., Huang, T. H., Ho, N. Y. J., Chen, Y. P., Chen, C. A., & Chen, C. F. (2019). Development of a multiplex and sensitive lateral flow immunoassay for the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Scientific Reports*, 9(1), 2–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52051-6>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(0), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Tzanela, M., Zianni, D., Bilariki, K., Vezalis, A., Gavalas, N., Szabo, A., Drimala, P., Vassiliadi, D., & Vassilopoulos, C. (2010). The effect of body mass index on the diagnosis of GH deficiency in patients at risk due to a pituitary insult. *European Journal of Endocrinology*, 162(1), 29–35. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0390>
- UCLA. (2021). *What is Precision Health?* <https://www.uclahealth.org/precision-health/what-is-precision-health> [Ziyaret Tarihi: 4 Haziran 2024].
- Urusov, A. E., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2019). Towards Lateral Flow Quantitative Assays: Detection Approaches. *Biosensors 2019, Vol. 9, Page 89*, 9(3), 89. <https://doi.org/10.3390/BIOS9030089>
- Vance, S., Zeidan, E., Henrich, V. C., & Sandros, M. G. (2016). Comparative Analysis of Human Growth Hormone in Serum Using SPRi, Nano-SPRi and ELISA Assays. *J. Vis. Exp*, 107, 53508. <https://doi.org/10.3791/53508>
- Wang, Z., Zhao, J., Xu, X., Guo, L., Xu, L., Sun, M., Hu, S., Kuang, H., Xu, C., Li, A., Wang, Z., Xu, X., Guo, L., Xu, L., Sun, M., Kuang, H., Xu, C., Zhao, J., Hu, S., & Li, A. (2022). An Overview for the Nanoparticles-Based Quantitative Lateral Flow Assay. *Small Methods*, 6(1), 2101143. <https://doi.org/10.1002/SMTD.202101143>
- Web_Sayfası. (2018). *Dwarfism And Gigantism; Scientific Views On The Causes(Tallest And Shortest Man)* — Steemit.

- <https://steemit.com/steemstem/@anikys3reasure/dwarfism-and-gigantism-scientific-views-on-the-causes-tallest-and-shortest-man> [Ziyaret Tarihi: 24 Mayıs 2024].
- WebSayfası2. (2024). *Gold Nanoparticles: Optical Properties – nanoComposix*. <https://nanocomposix.com/pages/gold-nanoparticles-optical-properties>[Ziyaret Tarihi: 26 Mayıs 2024].
- Wu, K. H., Huang, W. C., Chang, S. C., & Shyu, R. H. (2022). Colloidal silver-based lateral flow immunoassay for detection of profenofos pesticide residue in vegetables. *RSC Advances*, *12*(21), 13035–13044. <https://doi.org/10.1039/D2RA01654K>
- Xu, T., Miao, J., Wang, Z., Yu, L., & Li, C. M. (2011). Micro-piezoelectric immunoassay chip for simultaneous detection of Hepatitis B virus and α -fetoprotein. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *151*(2), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.08.013>
- Yadav, S., Sadique, M. A., Ranjan, P., Kumar, N., Singhal, A., Srivastava, A. K., & Khan, R. (2021). Sers based lateral flow immunoassay for point-of-care detection of sars-cov-2 in clinical samples. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(4), 2974–2995. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00102>
- Yamada, K., Shibata, H., Suzuki, K., & Citterio, D. (2017). Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. *Lab on a Chip*, *17*(7), 1206–1249. <https://doi.org/10.1039/C6LC01577H>
- Zeng, H., Zhang, D., Zhai, X., Wang, S., & Liu, Q. (2018). Enhancing the immunofluorescent sensitivity for detection of Acidovorax citrulli using fluorescein isothiocyanate labeled antigen and antibody. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *410*(1), 71–77. <https://doi.org/10.1007/S00216-017-0690-2>
- Zhang, Q., Fang, L., Jia, B., Long, N., Shi, L., & Zhou, L. (2021). Trends in Analytical Chemistry Optical lateral flow test strip biosensors for pesticides : Recent advances and future trends. *Trends in Analytical Chemistry*, *144*, 116427. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116427>
- Znoyko, S. L., Orlov, A. V., Bragina, V. A., Nikitin, M. P., & Nikitin, P. I. (2020). Nanomagnetic lateral flow assay for high-precision quantification of diagnostically relevant concentrations of serum TSH. *Talanta*, *216*(March), 120961. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120961>

EKLER

EK-1 BH düzensizliklerinde **a)** ITT testi ve **b)** GTT testi akış şemaları (Aldallal, 2018; Polidori et al., 2020)



EK-2 Farklı derişimlerdeki BH antikor-AuNP çözeltilerinin UV ölçümleri

EK-3 Farklı derişimlerdeki BH antikör-AuNP çözeltilerine NaCl çözeltisi ilavesi sonrası elde edilen UV ölçümleri

