



Araştırma Makalesi /Research Article

Nanopolimer Tabanlı Hidrojen Peroksit Biyosensörünün Validasyon ve Verifikasyonu

Validation and Verification of Nanopolymer Based Hydrogen Peroxide Biosensor

Umut Kökbaş¹, Levent Kayrın², Abdullah Tuli³

¹Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Biyokimya AD, Nevşehir

²Girne Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Girne KKTC

³Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Adana

Öz

Amaç: Hidrojen peroksit tayini metabolizmadaki serbest radikallerin ve bu serbest radikallerin etkilerinin anlaşılabilmesi için önemli bir parametredir. Oksidatif hasarın bir göstergesi olarak hidrojen peroksit düzeyi kullanılabilir. Serbest radikal oluşumu DNA hasarı ve kanser gibi ekileri olduğundan dolayı ölçümü son dönemlerle büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmada hidrojen peroksit tayini için halihazırda kullanılmakta olan yöntem ile nanopolimer tabanlı biyosensörün istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hidrojen peroksit tayini için bioelektrokimyasal sensör sistemi kullanılmıştır.

Bulgular: Validasyon ve verifikasyon çalışmalarında biyosensörün tekrarlanabilirlik denemelerinde 3 mM hidrojen peroksit ile yapılan ölçümlerde ortalama 2,99 olarak bulunmuştur. Biyosensörün raf ömrünün 43 gün olduğu bulunmuştur. Titrimetrik yöntemle yapılan karşılaştırma çalışmalarında korelasyon bulunmuştur.

Sonuç: Enzimatik olarak geliştirdiğimiz elektrokimyasal metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metod parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Validasyon, verifikasyon, biyosensör

Abstract

Objective: Determination of hydrogen peroxide is an important parameter for understanding free radicals in metabolism and the effects of these free radicals. The level of hydrogen peroxide can be used as an indicator of oxidative damage. Since free radical formation has effects such as DNA damage and cancer, its measurement has gained great importance in recent years. In this study, a statistical comparison of the currently used method for the determination of hydrogen peroxide and the nanopolymer-based biosensor was made.

Material and Methods: A bioelectrochemical sensor system was used for the determination of hydrogen peroxide.

Results: In the reproducibility trials of the biosensor in the validation and verification studies, the average was found to be 2.99 in the measurements made with 3 mM hydrogen peroxide. The shelf life of the biosensor was found to be 43 days. Correlation was found in the comparison studies performed with the titrimetric method.

Conclusion: It is a validation study in which the method parameters are determined and examined in order to determine the conformity of the electrochemical method we developed enzymatically to the relevant performance criteria.

Key Words: Validation, verification, biosensor

İletişim adresi/Address for Correspondence:

Umut Kökbaş <http://orcid.org/0000-0003-4028-3458>
Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Biyokimya AD, Nevşehir
E-mail: umutkokbas@gmail.com

Levent Kayrın <https://orcid.org/0000-0002-8751-3129>

Abdullah Tuli <https://orcid.org/0000-0002-6475-1087>

GİRİŞ

Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ile biyolojik materyallerin birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek spesifikliğı ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı bileştirilmiştir. Çok sayıda biyoorganik molekül ve bazı inorganik moleküllerin analizinde kullanmak amacı ile pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmosötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır¹.

İlk biyosensör sistemi L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O₂ duyar amperometrik bir elektrotla ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında ise O₂ duyar amperometrik elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glukoz biyosensörüdür. Bu gelişmenin ardından yıllar içinde pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör teknolojisi o kadar hızlı gelişmektedir ki; IUPAC tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonu 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı biyosensör tanımı biyomikrochipin gelişimi ile daha şimdiden geçerliliğini yitirmiştir¹.

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu transduser yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikolar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir transduser seçilmelidir. Transduser ve biyokomponent birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir¹.

Metabolizmada oksidatif stresin bir belirteci olarak hidrojen peroksit tayininin mevcut yöntemlere göre daha hızlı ölçüm yapılabilen biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemin validasyon ve verifikasyon çalışmaları yapılmıştır.

Validasyon, belirli bir kullanım amacına yönelik belirli şartların yerine getirildiğinin inceleme ve objektif deliller yoluyla doğrulanmasıdır. Verifikasyon ise bir sistemin

belirlenen kriterle uygunluğunun objektif kanıtlarla doğrulanmasıdır.

Metodun doğruluğı, tekrarlanabilirliğı, raf ömrü ve yöntem karşılaştırması çalışmaları yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Validasyon ve verifikasyonu yapılan biyosensör sisteminde enzim tabanlı elektrobiyokimyasal hidrojen peroksit sensörü kullanıldı².

Karşılaştırma çalışmaları için titrimetrik yöntem kullanılmıştır³.

BULGULAR

Tekrarlanabilirlik denemeleri

Tekrarlanabilirlik denemelerinde biyosensörün ölçüm sınırları içerisinde bulunan 3mM derişimde hidrojen peroksit çözeltisi kullanılarak biyosensörde 10 defa arka arkaya ölçüm alındı. Denemeler sonunda peroksit için elde edilen bulgular sırasıyla Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Nanopolimer tabanlı peroksidaz biyosensörü için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	\bar{x}	S.S	V.K (%)
H ₂ O ₂ (mM)	2,75	2,89	3,16	3,16	2,85	3,16	2,85	3,18	2,93	3,06	2,99	±0,16	5,331

Tablodan da görüldüğü gibi geliştirilen biyosensör birbirine yakın ölçüm sonuçları vermiş ve standart sapma ile varyasyon katsayısı kabul edilebilir aralıkta bulunmuştur.

Raf Ömrü Denemeleri

Biyosensör elektrodu hazırlandıktan sonra her gün 1 mM, 3 mM ve 5 mM derişimlerinde hidrojen peroksit çözeltileriyle ölçüm alındıktan sonra standart eğri çizildi ve elde edilen akım değerleri karşılaştırıldı. Akım değerleri ilk ölçümün %80'inin altına düşene kadar tekrar edildi. 43. Günden sonra %80 akım değerinin altına inmiştir.

Yöntem Karşılaştırma Denemeleri

Hidrojen peroksit tayini çalışmalarında karşılaştırma yapmak için titrimetrik olarak hidrojen peroksit tayini yapıldı ve biyosensör verileri ile karşılaştırıldı.

Veriler karşılaştırıldığında iki yöntem arasında korelasyon olduğu görüldü.

TARTIŞMA

Hidrojen peroksit tayini için birçok yöntem bulunmaktadır. Analiz yöntemlerinde hız, kolay kullanım gibi özellikler tercih sebebi olmaktadır. Biyosensörler bu özelliklere uygun olduklarından dolayı son dönemlerde ilgi odağı olmuştur^{5,6}.

Yaptığımız çalışmada biyosensörün özellikleri göz önünde bulundurulduğunda yakın dönemde laboratuvarında yer alacağını düşünmekteyiz.

Validasyon ve verifikasyon çalışmalarını yaptığımız hidrojen peroksit çalışmalarında gözlemlenen deneysel sonuçlara baktığımızda sistemin başarılı olduğu görülmüştür^{7,8}.

Etik Onay: -

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek: Yok

Ethical Approval: -

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Support: None

KAYNAKLAR

1. Kökbaş U., Kayrın L., Tuli A., Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2013;22(4):499-513.
2. Kokbas U., Sanna B., Alparslan MM., Kartlasım K., Tuli A., Kayrın L. A new biosensor for rapid determining of oxidant agent hydrogen peroxide. The Febs Journal 2016; 283(S1):403. <https://doi.org/10.1111/febs.13808>.
3. Gimeno MP., Mayoral MC., Andrés JM., A potentiometric titration for H₂O₂ determination in the presence of organic compounds. Analytical Methods, 2013;5(6):1510-1514. <https://doi.org/10.1039/C3AY26329K>.
4. Kökbaş U., Günay, T., Özçağışkan, E., Akgöl, S., & Akvılmaz, E. A new biosensor based on peroxidase enzyme immobilized in nanopolymeric (poly-HEMA-MAC) for hydrogen peroxide detection. 9th International Electrochemistry Meeting, 2011;332
5. Şemsi R., Kökbaş U., Arslan B., Dinçel AS., Ergünel E., Kayrın L. The Saliva Cortisol and Amylase Levels Related With Stress Response Compared by Different Analytical Methods. Applied Biochemistry and Biotechnology. 9th International Electrochemistry Meeting. 2021;332.
6. Kökbaş U., Şemsi R., Arslan B., Dinçel AS., Ergünel E., Kayrın L., Genç erişkin bireylerde tükürük ürik asit düzeylerinin biyosensör yöntemi ile değerlendirilmesi. Cukurova Medical Journal, 2020;45(3):1137-1143. <https://doi.org/10.17826/cumj.732682>
7. Sargent RG., Verification and validation of simulation models. In 2008 Winter Simulation Conference. IEEE. 2018;157-169. <https://doi.org/10.1109/WSC.201056791>.
8. Huckaba CE., Keyes FG., The accuracy of estimation of hydrogen peroxide by potassium permanganate titration. Journal of the American Chemical Society, 1948;70(4):1640-44. <https://doi.org/10.1021/ja>.