

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**POLİMERİK NANOMALZEMELERİN KANSER
TANISINDA KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ceren TÜRKCAN KAYHAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 01.09.2016

Bornova-İZMİR

2016



Sayın Ceren TÜRKCAN KAYHAN tarafından Doktora tezi olarak sunulan 'Polimerik Nanomalzemelerin Kansere Tanısında Kullanılabilirliği'nin Araştırılması' başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.09.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza****Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sinan AKGÖL**

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN

.....

Üye: Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

.....

Üye : Doç. Dr. Özlem GÖKSEL

.....

Üye : Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

.....



ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Polimerik Nanomalzemelerin Kansere Tanısında Kullanılabilirliğinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

01/09/2016

Ceren TÜRKCAN KAYHAN



ÖZET**POLİMERİK NANOMALZEMELERİN KANSER TANISIN-
DA KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

TÜRKCAN KAYHAN, Ceren

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Eylül 2016, 138 sayfa

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi olarak ortaya çıkan, invazyon ve metastaz süreçleriyle birlikte vücudun diğer dokularına da yayılma eğilimi gösteren ölümcül bir hastalıktır. Kanser tedavisi edilebildiği durumlar da mevcuttur ancak teşhis süresi geciktiği zaman tedavi edilme imkanı oldukça zor olan, çoğunlukla da tedavi edilemeyen bir rahatsızlıktır. Bu nedenle kanserin erken teşhis edilmesi ve tedavi sürecinin titizlikle takip edilmesi gerekmektedir. Literatür araştırmalarında da kanserin her çeşidi için erken teşhis imkanı sağlayabilecek yöntemler geliştirilmeye çalışılmakta ve bu yöntemlerin uygulamaya geçebilmesi için validasyon, patentleme gibi ek işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında bir kanser biyobelirteci olarak kullanılan CA 125'in erken teşhisine ve hastalığın takibinde kullanımına yönelik olarak elektrokimyasal tayine dayalı, az maliyetli, hızlı, pratik bir yöntem geliştirmek için polimerik nanomalzeme geliştirilmesi, yöntemin optimize edilmesi ve geliştirilen yöntemin validasyonunun yapılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda polimerik nanomalzeme olarak p(HEMA) polimerik nanomalzemesi sentezlendi ve elektrokimyasal tayinde kullanılan elektrot yüzeyi ile sağlam bir bağ oluşturması amacıyla p(HEMA) polimerik nanomalzemesine aşılama yöntemi ile L-Sistein amino asidi kovalent olarak bağlandı. Aşılama sonrası elde edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi karakterize edildi. Karakterizasyon amacıyla; yüzey morfolojisini görüntülemek için cam yüzeyde ve altın yüzeyde SEM fotoğrafları elde edildi, boyutlarını belirlemek amacıyla Zeta-Size analizleri gerçekleştirildi, kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla FTIR analizleri gerçekleştirildi ve L-Sistein'in yapıya ne kadar katıldığını belirlemek amacıyla elementel analiz gerçekleştirildi. Karakterizasyonlar sonucunda 50 nm boyutlarında küresel morfolojide ve yapısında gram polimerik nanomalzeme başına 0,011 mmol L-Sistein içerdiği belirlendi. Karakterizasyon

sonrasında CA 125 tayin koşullarını optimize etmek amacıyla; polimerik nanomalzemenin elektrot yüzeyine bağlanma süresinin optimizasyonu, CA 125 antikorunun bağlanma süresinin optimizasyonu, CA 125 tayin süresinin optimizasyonu ve CA 125 tayin aralığının optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu optimizasyonlar sonucunda Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin optimum bağlanma süresi 2 saat, CA 125 antikorunun bağlanma süresi 1 saat, CA 125 tayin süresi 10 dk olarak belirlendi. CA 125 tayin aralığı için yapılan denemelerin sonucunda lineer tayin aralığı 5-400 U/mL olarak belirlendi, aralığın doğrusal olduğu F-testi ile doğrulandı. Tespit limiti (LOD) 1,87 U/mL olarak hesaplanırken tayin limiti (LOQ) 5,62 U/mL olarak belirlendi. Yapılan deneme ve hesaplamaların ardından tekrarlanabilirlik denemeleri amacıyla 5 kez çift tekrarlı olacak şekilde ölçümler tekrarlandı. Yapılan tekrarlar sonucunda gerçeklik için yapılan t testi $p=0,05$ ve serbestlik derecesi 4'e göre sonuçların gerçeklik değeri içerisinde yer aldığı belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemeleri sonucuna göre kesinlik değerini belirlemek amacıyla uygulanan Cochran testi ve Grubb testine göre sonuçlar %1 ve % 5 kritik değerlerine göre kesinlik aralığının içinde buldukları belirlendi. Yapılan istatistiksel hesaplamalar bakımından kesinlik ve gerçeklik değerleri içerisinde bulunduğu için sonuçların doğruluk aralığı içerisinde olduğu belirlendi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kısa tayin süresi, geniş tayin aralığı, yöntemin doğruluğuna göre günümüzde uygulanan CA 125 tayin yöntemlerine alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Kanser erken teşhisi, CA 125, Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzeme, Validasyon

ABSTRACT**RESEARCHING OF POLYMERIC NANOMATERIALS USABILITY IN CANCER DIAGNOSIS**

TÜRKCAN KAYHAN, Ceren

PhD, in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

September 2016, 138 pages

Cancer, which emerges as uncontrolled cell division, is a terminal disease that shows a tendency to extension also to other tissue with invasion and metastasis. There are some situation which are also treated to cancer however it is generally an incurable disease when diagnosis of it is late. Therefore, early diagnosis of cancer and keeping up meticulously with treatment process need to track very carefully. Methods of enable to early diagnosis for every kind of cancer are studied to develop in the literature research too and additional operations are needed validation and patenting for transferring to practice of these methods. Method improving is planned as a part of this thesis which have low cost, is pratic, fast, based upon using electrochemical diagnosis as following of disease and based upon early diagnosis of CA 125 which is used a cancer biomarker. Therefore improving of polimeric nanomaterials, optimization of methods and validation of improving methods are aimed. In accordance with this purpose, p(HEMA) polymeric nanomaterials were synthesized as polymeric nanomaterial and L-Cystein aminoacids were bonded covalently with grafting procedure on the purpose of composing a bond with electrode surface using electrochemical analysis. After the grafting procedure, obtaining Cys-graft-p(HEMA) polymeric nanomaterials were characterized. For the purpose of characterization; SEM photographs were obtained at gold and glass surfaces for scanning to surface morphology, Zeta-Size analysis were carried out for determining to polymeric nanomaterials dimension, FTIR analysis were carried out for determining chemical composition and elementary analysis were carried out for determining how much participate L-Cystein to structure. As a result of characterization, 50 nm dimension, spherical morphology and per gram polymeric materials contains 0.011 mmol L-Cystein

was determined. After the characterization with the purpose of optimization CA 125 determination condition; bonding time optimization to electrode surface of polymeric nanomaterials, optimization bonding time of CA 125 antibody, optimization determination time of CA 125 and optimization of CA 125 determination range were carried out. In consequence of this optimization; optimum bonding time of Cys-graft-p(HEMA) polymeric nanomaterials as 2 hours, bonding time of CA 125 antibody as 1 hour, determination time of CA 125 as 10 minutes were obtained. Linear determination range was determined 5-400 U/mL in consequence of doing experiment for CA 125 determination range, its linearity is validated with F-test. While determination limit (LOD) was calculated as 1.87 U/mL quantification limit (LOQ) was determined as 5.62 U/mL. After experiment and calculating assays were repeated as 5 times with double repeatly for repetability experiments. In consequence of doing repeatability, t-test was committed for reality according to $p=0.05$ and degree of freedom 4, results were determined to located in reality degree. As a result of repetability experiments on the purpose of determining precision degree according to Cochran and Grubb tests results were determined in precision degree according to 1 % and 5 % critic degrees. Results were determined in accuracy degree because it were in precision and reality degree according to be done statistical calculation.

In accordance with obtained results this methods are thought to use as alternative methods to applied CA 125 determining methods nowadays according to rapid determination time, extensive determination range, accuracy of methods.

Keywords: Cancer early diagnosis, CA 125, Cys-graft-p(HEMA) polymeric nanomaterials, Validation.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve öncesinde desteğini hep hissettiğim, her zaman çözüm odaklı olan sevgili danışmanım Prof. Dr. Sinan AKGÖL başta olmak üzere, fikirleri ve yapıcı eleştirileriyle bana örnek olan Prof. Dr. M. Nalan TÜZMEN'e, sensör çalışmalarının başından sonuna kadar her başım sıkıştığında yanına koşabildiğim, her zaman yardımcı olmak için zaman yaratan Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a, Biorege ailesine, aileme, emeği geçen herkese ve beni yüreklendirerek destek olan sevgili eşim Cenk KAYHAN'a teşekkürlerimle...

Tez çalışmamda TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Doktora Programı içerisinde yer alan Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında bursiyer olarak beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2014 FEN 022 no'lu proje olarak desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XXIII
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1.Hücre ve Hücre Döngüsü.....	3
2.1.1.Hücre çevriminin düzenlenmesi ve kontrolü	5
2.2.Kanser Oluşumu.....	7
2.2.1.Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler	7
2.2.2.Kanserin yayılması.....	8
2.2.3.Kanser oluşumunu etkileyen faktörler	9
2.2.4.Kanser istatistikleri ve kanser türleri	15
2.2.5.Ovaryum kanseri	17
2.3. Kanser Teşhis Yöntemleri.....	18
2.3.1.Kanser biyobelirteçleri.....	19
2.4.Sensörler.....	21
2.4.1.Elektrokimyasal yöntemeye dayalı sensörler	22
2.5.Polimerik Nanomalzemeler ve Tıpta Kullanımları.....	26
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. MATERYAL.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.1. Kimyasal maddeler.....	29
3.1.2. Cihaz ve sistemler	30
3.2. Metot	31
3.2.1. p(HEMA) polimerik nanomalzemenin sentezlenmesi	31
3.2.2. p(HEMA) polimerik nanomalzemesine L-Cys amino asidinin aşılama ile modifikasyonu	32
3.2.3. p(HEMA) ve Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemelerinin karakterizasyonları	33
3.2.4. Diferansiyel puls voltametri (dpv), döngüsel voltametri (cv) yöntemlerde kullanılan ferri-ferro çözeltisinin hazırlanışı ve çalışma elektrodu temizlik aşamaları	37
3.2.5. CA 125 tayini amacıyla sensör sistemi kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyonlar	43
3.2.6. Tekrarlanabilirlik.....	50
3.2.7. Seçimlilik	51
3.2.7. Depo kararlılığı	54
3.2.8. Gerçek antijen örnekleri ile denemeler	56
3.2.8. Yöntem validasyonu.....	56
4. BULGULAR.....	63
4.1. Cys-graft p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	63
4.1.2. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin ve Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapı analizi	64
4.1.3.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin zeta-size ile boyutunun belirlenmesi	65
4.1.4.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi	67
4.1.5.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz ile L-Sistein içeriğinin belirlenmesi	68

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.6.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin spesifik yüzey alanının hesaplanması	70
4.2. CA 125 Tayini Amacıyla Sensör Sistemi Kullanılarak Gerçekleştirilen Optimizasyonlar	71
4.2.1. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın elektrot yüzeyine bağlanma süresinin optimizasyonu.....	71
4.2.2. CA 125 antikorumun elektrot yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesine bağlanma süresinin optimizasyonu.....	72
4.2.3. CA 125'in etkileşim süresinin optimizasyonu.....	74
4.2.4. CA 125 tayin miktarının optimizasyonu.....	74
4.3.Tekrarlanabilirlik	77
4.4.Seçimlilik	78
4.5. Depo Kararlılığı	79
4.6.Gerçek Antijen Örnekleri ile Yapılan Denemeler	80
4.7.Yöntem Validasyonu	82
4.7.1.Doğrusallık.....	82
4.7.2. Tespit Limiti (LOD).....	86
4.7.3. Tayin Limiti (LOQ)	87
4.7.4. Doğruluk	87
4.7.5. Hassasiyet.....	91
5.SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	91
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	110



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Hücre döngüsünün gösterimi.....	4
2. 2. Hücre döngüsü kontrol noktaları	6
2. 3. Karsinogenez süreçleri.....	9
2. 4. Güneş ışınları sonucu gelişen süreç.....	14
2. 5. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri.....	16
2. 6. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri.....	16
2. 7. Ovaryumun kanserdeki evreleri.....	18
2. 8. Sensör bileşenleri	21
2. 9. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.....	22
2. 10. Voltametrik Çalışma Düzenegi.....	23
2. 11. Tez çalışmasında voltametri metoduna göre kullanılan ana çalışma prensibi	24
3. 1. Antijen ve antikorların stoklara ayrılmış hali	30
3. 2. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentez basamaklarının şematik gösterimi	31
3. 3. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentezlendiğindeki görüntüsü ve sentezinin şematik gösterimi.....	32
3. 4. p(HEMA) polimerik nanomalzemesine L-Sistein aşılama prosesinin şematik gösterimi	33
3. 5. Zeta-Size analizi için hazırlanan örneğin görüntüsü ve Zeta-Size Cihazı.....	34
3. 6. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın yüzeyde görüntüsünü elde etmek amacıyla yapılan hazırlık sonucu örneğin görüntüsü.....	35
3. 7. Ölçümler esnasında kullanılan ölçüm düzenegi	37
3. 8. Diferansiyel puls voltametrisi ölçüm bilgileri	38
3. 9. Döngüsel voltametri ölçüm bilgileri.....	39
3. 10. Keçe üzerinde alümina ile yapılan temizlik işlemi.....	41
3. 11. Mekanik temizlik için kullanılan alternatif bir cihaz.....	41
3. 12. Ultrasonik banyoda yapılan temizlik işlemi	42
3. 13. Döngüsel voltametri ile sülfürik asit temizliğinde kullanılan ölçüm bilgileri	42
3. 14 Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatıldığı hali	44

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3. 15. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyindeki şeklinin şematik gösterimi	44
3. 16. Aktivasyon amacıyla yapılan işlemin uygulanma aşaması.....	45
3. 17. EDC/NHS ile aktivasyon sonrası elektrot yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin kimyasal yapısının şematik gösterimi	46
3. 18. CA 125 antikorunun Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesine bağlandıktan sonra elektrot yüzeyinde tahmini yapısının şematik gösterimi	47
3. 19. BSA ile bloklama sonrasında elektrot yüzeyinde polimerik nanomalzemenin ve moleküllerin şematik gösterimi.....	48
3. 20. Standardı oluşturmak için CA 125 stoklarının hazırlık aşamaları	50
3. 21. Depo kararlılığı denemesi için elektrotların bekleme koşulları	55
3. 22. Depo kararlılığı denemesinin ölçüm düzeneği.....	55
4. 20. Sentezlenen p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin görüntüsü.....	63
4. 21. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin olası kimyasal yapısı	63
4. 22. p(HEMA) polimerik nanomalzemesine L-Sistein aşılama prosesi sonrasında elde edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin yapısının şematik gösterimi	64
4. 23. p(HEMA) ve Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesinin FTIR spektrum görüntüsü.....	65
4. 24. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin Zeta-Size analiz sonucu eşde edilen boyut grafiği	66
4. 25. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin Zeta-Size analiz sonucu	66
4. 26. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin SEM görüntüleri	67
4. 27. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın yüzey üzerindeki SEM görüntüleri.....	68
4. 28. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz sonucu	69
4. 29. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine bağlanmasının optimizasyonu ile elde edilen sonuç grafiği	72

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 30. CA 125 antikorunun elektrot yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesine bağlanma süresinin optimizasyonu ile elde edilen sonuç grafiği.....	73
4. 31. CA 125 etkileşim süresinin optimizasyonu ile elde edilen sonuç grafiği....	74
4. 32. CA 125 tayin aralığının belirlenmesi için elde edilen 11 farklı konsantrasyonu içeren sonuçlar	75
4. 33. CA 125 tayin miktarının optimizasyonu ile elde edilen sonuçlar.....	76
4. 34. CA 125 tayin miktarının optimizasyonu ile elde edilen sonuçlar.....	77
4. 35. Seçimlilik denemesi sonucu	78
4. 36. Seçimlilik denemesi sonucunun CA 125 miktarı olarak girişim etkisi	79
4. 37. Depo kararlılığı denemeleri sonucu elde edilen aktivitelerin % değerleri ..	80
4. 38. Gerçek örnekler ile yapılan deneme sonuçları.....	81
4. 39. CA 125 Konsantrasyonuna göre SPSS programı ile çizilen kalibrasyon grafiği.....	82



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2. 1. Mesleki maruziyet oluşturan kimyasallar, hedef organları ve kullanıldıkları sektörler	13
2. 2. Işın türleri ve oluşturduğu kanser türleri	15
2. 3. Yıllara ve cinsiyete göre toplam kanser insidansı	15
2. 4. Kanser türleri ve biyobelirteçleri	20
3. 1. Serum örneği içerisinde bulunan maddeler.....	51
4. 1. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz sonucu kükürt atomu içeri.....	69
4. 2. Miktarı bilinen antijen örnekleri ile yapılan deneme sonuçları	81
4. 3. Residüel standart sapma hesabı	83
4. 4. Yalın hata hesabına göre düzenlenen veriler	84
4. 5. Tekrarlanabilirlik test sonuçlarının ortalaması	88
4. 6. Tekrarlanabilirlik test sonuçlarının herhangi biri	88
4. 7. Laboratuvar içi varyans	89
4. 8. Tekrarlanabilirlik varyansı.....	89
4. 9. Tekrarlanabilirlik denemelerinin ortalamaları	90
4. 10. Mevcut yöntemler ile genel analiz.....	95



SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
p(HEMA)	Hidroksietil Metakrilat Polimerik Nanomalzemesi
HEMA	Hidroksietil Metakrilat
EGDMA	Etilenglikol Dimetakrilat
KPS	Potasyum Persülfat
PVA	Polivinil Alkol
FTIR	Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
KBr	Potasyum Bromür
MES	2-(N-morfolino)etane sülfonik asit
ARGEFAR İlaç Merkezi	İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi
BSA	Sığır Serum Albümin
-COOH	Karboksil Grubu
CV	Döngüsel Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
EDC	1-etil-3-(3-dimetil amino propil)-karbodiimid
NHS	N-Hidroksisüksinimid

CA 125	Kanser Antijen 125
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Potasyum hekzosiyanoferat (III)
K ₄ [Fe(CN) ₆]	Potasyum hekzosiyanoferat (II)
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Tayin Limiti
ECLIA	Enzim Bağlı Kemilüminesans İmmünoassay
ANOVA	Varyans Analiz Testi
SPSS	Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi



1. GİRİŞ

Tez çalışması kapsamında ovaryum kanserinde kanser biyobelirteci olarak kullanılan CA 125'i tayin edebilmek amacıyla polimerik nanomalzeme sentezi, karakterizasyonu ve tayini gerçekleştirebilmek için koşulların optimizasyonu amaçlandı. Bu amaç kapsamında polimerik nanomalzeme sentezlendi, karakterizasyonu yapıldı ve tanı için ölçüm yöntemi optimize edilerek validasyon parametreleri değerlendirildi.

CA 125 teşhisi amacıyla farklı yöntemler de literatürde yer almaktadır. Bunlardan bazılarında nanomalzemeler kullanılmasının yanı sıra bazı modifikasyonlar ile de materyallerin hazırlandığı görülmekte ve hepsinde CA 125 antikoru seçiciliği artırmak amacıyla elektrot yüzeyinde kullanılmaktadır.

2003 yılında yapılan bir çalışmada diferansiyel puls voltametri ve döngüsel voltametri metodu kullanılmaktadır. Bu çalışmada ölçüm amacıyla sisteme HRP (Horse radish peroksidaz) dahil edilerek yüzeyde antijenle spesifik etkileşime girebilmesi için CA 125 antikoru kullanılarak ve ölçüm amacıyla hazırlanan malzemenin hazırlık süresi 4 saat 40 dakikayı bulmaktadır. Tayin aralığı 2-14 U/mL olarak belirlenen çalışmanın tespit limiti 1,29 U/mL iken tayin süresi 40 dakikadır (Dai et al., 2003).

2006 yılında CA 125 tayini amacıyla geliştirilen bir başka yöntem ise diferansiyel puls voltametri ve döngüsel voltametri temeline dayanmaktadır. Altın nanopartiküller selüloz asetat ile bir araya getirilerek ölçüm HRP ile sağlanmaktadır ve yöntemin tayin aralığı 0-30 U/mL aralığında yer almaktadır. Tespit limiti 1,73 U/mL olan yöntemde 50 dakikada analiz işlemi gerçekleştirilebilmektedir (L. Wu et al., 2006).

2006 yılında yapılan bir başka çalışmada ise elektrot yüzeyinde tiyonin ile altın nanopartiküller kullanılarak diferansiyel puls voltametri ile ölçümler alınmaktadır. 40 saatte hazırlanan ölçüm materyali kullanılarak 30 dakika içerisinde ölçümler gerçekleştirilmiş ve tespit limiti 1,8 U/mL olarak belirlenirken tayin ara-

lığının 10-30 U/mL aralığında olduğu saptanmaktadır (Tang, Yuan and Chai, 2006).

2007 yılında elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise altın mikroküreler kullanılmış ve 62 saat gibi bir sürede altın mikrokürelerin hazırlığı tamamlanmaktadır. Tayin aralığı 4,5-36,5 olarak belirlenen çalışmada tespit limiti 1,3 U/mL olarak belirlenirken ölçüm süresi 30 dakika olarak saptanmaktadır (Fu, 2007).

2007 yılında yapılan bir başka çalışmada ise çözünür karbon nanofiberler kullanılarak HRP ile ölçüm işlemi diferansiyel puls voltametri ve döngüsel voltametri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. 3 saat içerisinde hazırlanan elektrot yüzey materyali ile 40 dakikada tayin işlemi gerçekleştirilirken tespit limiti (LOD) 1,8 U/mL olarak belirlenmiş ve tayin aralığı 2-75 U/mL olarak bulunmaktadır (Wu, Yan and Ju, 2007).

Chen ve arkadaşlarının yaptığı 2008 yılındaki çalışmada CA 125 tayini amacıyla yine elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılmış ve çalışmada kitosan Prussian Blue ile modifiye edilerek sistem geliştirilmektedir. Çalışmada 2 ayrı tayin aralığı yer almakta ve ilk aralık 2-40 U/mL ilken ikinci aralık 40-100 U/mL aralığında yer almaktadır. Çalışmada toplam 33 saatte malzeme hazırlığı yapılırken 40 dakika gibi bir süre tayin süresi olarak belirlenmekte ve çalışmanın tespit sınırı 0,71 U/mL olarak verilmektedir (Chen et al., 2008).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile 2009 yılında yapılan bir çalışmada CA 125 tayini için karbon nanotüpler bakır ile modifiye edilerek hazırlanmış ve yüzey altın nanopartiküller ile etkileştirilerek ölçüm materyali hazırlanmaktadır. Geliştirilen yöntemde malzemenin toplamda hazırlanma süresi 32,5 saati bulmakla birlikte 2 ayrı lineer tayin aralığı belirlenmektedir. Tayin aralığı 1-30 U/mL ile 30-150 U/mL arasını kapsamakta ve tespit limiti (LOD) 0,36 U/mL olarak belirlenirken tayin süresi 30 dk olarak verilmektedir (Chen et al., 2009).

2009 yılında yapılan bir başka çalışma daha hassas bir cihaz olan SPR (yüzey plazmon rezonans) ile gerçekleştirilmiş ve yapılan yüzey modifikasyonunun ardından direk yüzeye CA 125 antikorunun eklenmesi ile yüzey hazırlanarak, bu işlem 7 saat 38 dakika sürmektedir. Tayin aralığı 0,1-40 U/mL aralığında belirle-

nen çalışmada tayin süresi 5 dakika olarak belirlenirken yüzeyin yenilenme süresi 12 dakika olarak elde edilmektedir. Çalışmada tespit limiti (LOD) ise 0,1 U/mL olarak saptanmaktadır (Suwansa-ard et al., 2009).

2011 yılında yapılan bir çalışmada ise yüzey sisteminin ile modifiye edilerek glüteraldehit kullanılmakta ve 19 saat 14 dakikada hazırlanan yüzey ile yapılan ölçümlerde diferansiyel puls voltametri kullanılarak, tespit limiti (LOD) 0,1 U/mL olarak belirlenmiş ve tayin süresi 40 dakika olarak bulunmaktadır. Çalışmada tayin aralığı elde edilmeden ölçümler 0,1 U/mL, 1 U/mL, 10 U/mL ve 100 U/mL değerleri üzerinden yürütülmektedir (Das and Kelley, 2011).

2.LİTERATÜR ÖZETİ

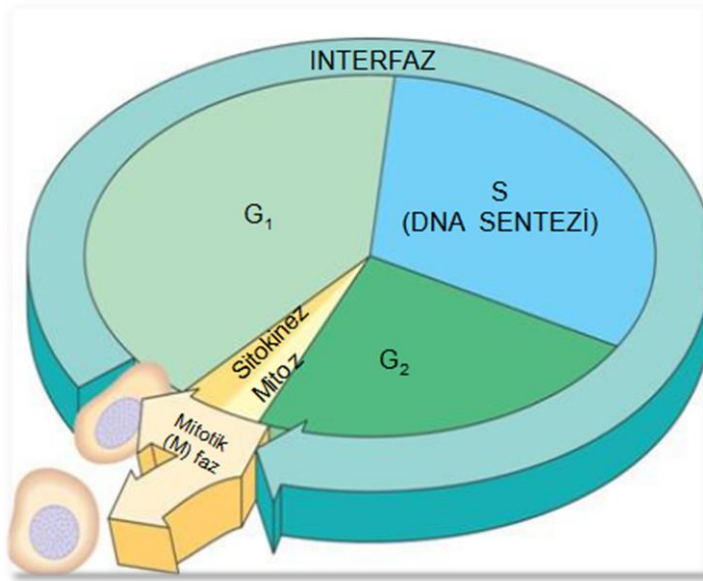
2.1.Hücre ve Hücre Döngüsü

Hücre, canlılığın en küçük yapıtaşı olarak bilinmesinin yanı sıra canlılığın devamı için de içerisinde gerçekleşen metabolik süreçler büyük önem taşımaktadır. Canlılığın temel kriterlerinden bir tanesi olan hücre bölünmesi ise hücrenin kendisi ile birebir aynı özellikleri taşıyan bir başka hücreyi daha oluşturmasıdır. Hücre bölünmesi olarak bilinen bu süreçte hücre ikiye bölünerek başlangıçtaki hali ile birebir aynı bilgiyi taşıyan iki tane hücre meydana getirmekte ve bölünme olayı canlılık boyunca uzunca bir süre devam etmektedir (Elledge, 2016; Yokuş ve Çakır, 2012).

Hücrelerin çoğalma işlemi hücre çevrimi olarak adlandırılan bir dizi işlem sonucu gerçekleşmektedir. Genetik materyal mitoz süresince kopyalanarak yeni oluşturulan kardeş hücrelere paylaşılır ve bu sürece de “Hücre çevrimi” denir (Blagosklonny and Pardee, 2002).

Hücre çevrimi önemli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin olduğu iki aşamaya bölünebilir: Bölünmenin görünür şekilde gerçekleştiği morfolojik açıdan M fazı (“mitoz”) ve DNA’nın kopyalandığı S fazı (“sentez”). Bu iki faz birbirinden G (GAP boşluk) fazlarıyla ayrılır. S fazından önce G1 fazı ve M fazından önce G2 fazı vardır. Bunlara ilaveten bir de hücrenin dinlenme evresi olarak geçen G₀ evresi bulunmaktadır. Hücre G1 evresindeyken S evresinde gerçekleşecek olan

DNA sentezi için hazırlık yapmaktadır bu nedenle premitotik evre olarak da anılmaktadır. G₂ evresi ise M evresinde gerçekleşecek olan Mitoz için hazırlık evresidir, bu nedenle premitotik evre olarak da anılmaktadır. G₀, G₁, G₂ ve S evreleri Mitoz bölünmenin ön basamağı olan interfaz evresi olarak bilinmektedirler. Mitoz ise kendi içerisinde Profaz, Metafaz, Anafaz ve Telofaz olarak 4 ayrı bölüme ayrılmıştır Bahsedilen bölümler **Şekil 2.1**'de görülmektedir (Lukas, Lukas and Bartek, 2004; Bartek and Lukas, 2007).



Şekil 2. 1. Hücre döngüsünün gösterimi (Cummings, 2005).

DNA sentezinin tamamlanması için yeterli ribonükleotidlerin sağlanması, yeni sentezlenen DNA'nın gözden geçirilerek düzeltilmesi, genetik materyalin birden fazla kopyalanmamasının sağlanması, mitotik iğ düzeneğinin uzamsal düzeninin çalışıyor olması, kromozomların paketlenmesi ve yoğunlaştırılması isinin optimum düzeyde yapılması, ve kardeş hücreler arasında hücre materyalinin eşit şekilde dağıtımının sağlanması sayılabilir. Ayrıca, hücre çevriminin hemen öncesinde ya da sonrasında, hücrenin tekrar bölünüp bölünmeyeceğini, bir farklılaşma ya da hücre ölümü programına girip girmeyeceğine belirlemek için çeşitli unsurlar etkileşime girerler. Bu nedenle, "hücre çevrimi" terimi sıklıkla temel, kendini kopyalama süreçlerinin yanı sıra mitoz öncesi ve sonrasını belirleyecek, birbirleriyle bağlantılı bir dizi süreci de kapsayacak şekilde kullanılır. Bunların arasında durağan bir aşamaya girmek için bölünmeyi durdurmak, yaşlanma ya da farklılaşma süreçlerine girmek ya da tekrar mitozla başlamak için durağan a-

madan çıkmak sayılabilmektedir (Blagosklonny and Pardee, 2002; Bartek and Lukas, 2007).

Hücre döngüsü sırasında;

1) DNA kopyalaması, gözden geçirmesi ve onarımında rol alan,

2)Kromozom ve kromatinin yeniden şekillendirilmesinde ve genomik bütünlüğün kontrolünde rol alan,

3)Hücre bölünmesinin mekaniğinde rol alan (sentrozomun ve mitotik iğın oluşumu ve çekirdek zarının eritilmesi dahil).

Yüzlerde hücrel protein bu süreçlerde koordineli bir biçimde sentezlenmektedir (Du and Pogoriler, 2006).

2.1.1. Hücre çevriminin düzenlenmesi ve kontrolü

Hücre çevrimi sırasında, bazı potansiyel problemler genomda hasara yol açabilir. Bu problemler üç ayrı aşamada ortaya çıkabilir:

(1) DNA kopyalanması sırasında, özellikle hücrenin DNA hasarına oluşmasına yol açabilecek stres koşulları altındaysa (ısınım, karsinojenlere maruz kalma, vb.);

(2) DNA kopyalaması bittikten sonra, hücre DNA sentez sistemini “kapatıldıktan” sonra; ve

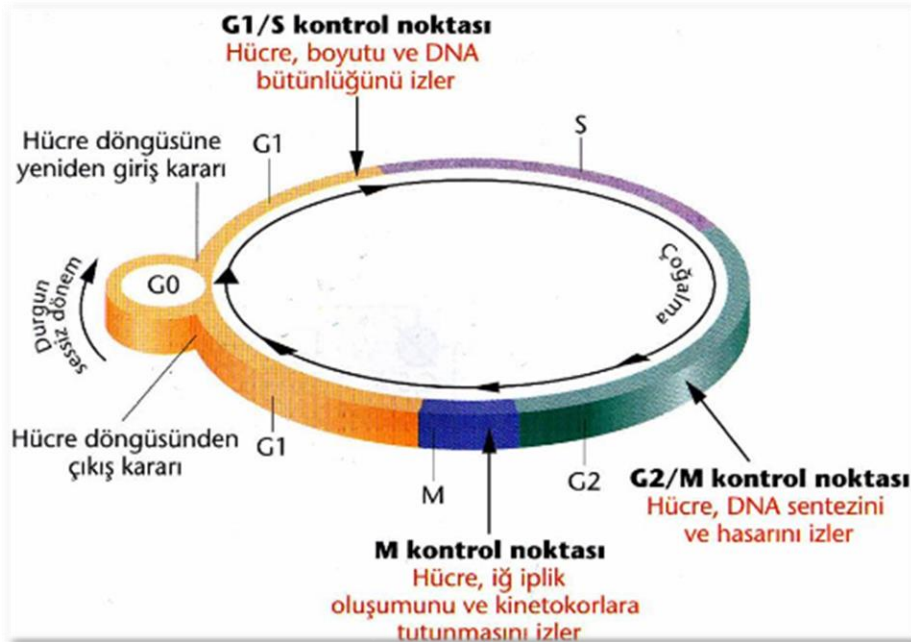
(3) M fazında, hücre gayet zor ve incelikli olan kromatidlerin eşit şekilde ayrılması isini yapması gerektiğinde.

Bu nedenle, hücrenin, tüm DNA ve kromozom bakımı işlemlerini başarıyla tamamlaması için gereken zamanı karşılayabilmesi için duraklamasını sağlamak son derece önemlidir. Bu duraksama işlemimin yapılmaması kanserin özellikleri olan genetik ve genomik kararsızlığa yol açabilir. Genetik kararsızlık, gen mutasyonu, silinmesi ya da rekombinasyonunun artmasıyla karakterize edilir (esas ola-

rak DNA onarımındaki hatalar nedeniyle). Genomik kararsızlık ise, kromozomların translokasyonuna, büyük kromozom parçalarının kaybı ya da ya da tekrarlanmasına ve anormal kromozom sayılarına (anöploidi) neden olabilir (Elledge, 2016).

DNA hasarının saptanması ile hücre çevriminin düzenlenmesini birleştiren sinyal basamaklarının bileşenleri olarak onlarca molekül tanımlanmıştır.

Bunlardan en bilineni tümör baskılayıcı p53 geninin ürünüdür. Doğrudan DNA hasarının çeşitli biçimlerinden (DNA'daki tek ya da çift iplik kopmaları gibi) sonra p53 özellikle etkinleştirilir ve hücre çevrimi ilerlemesinin birkaç inhibitörünün transkripsiyonunu, özellikle de G1/S ve G2/M geçişlerinde düzenler. Her evrede ayrı bir kontrol basamağı bulunmaktadır. G1 evresinde yeterli besin varlığı, DNA hasarı kontrol edilir, G2'de hücre büyüklüğü ve DNA hasarı kontrol edilir, M evresinde ise kromozomların iğ ipliklerine bağlanması kontrol edilmektedir (Greenblatt et al., 1994; Lakin and Jackson, 1999; Martinez et al., 1991). **Şekil 2.2**'de hücre döngüsü şematik olarak gösterilmektedir. Bir diğer iyi bilinen ise siklin bağımlı kinazlardır (CDK). Siklin bağımlı kinazlar kendi başlarına buldukları zaman inaktif formda olurlar ancak sikline bağlandıkları zaman aktif hale gelerek evre geçişlerinde kontrolü sağlarlar (Gu, Rosenblatt and Morgan, 1992) .



Şekil 2. 2. Hücre döngüsü kontrol noktaları

2.2. Kanser Oluşumu

Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Bu anomalilerden % 10-15'i kalıtsal ilse geriye kalan % 85-90'lık kısmın yaşam boyuna kişilerin maruz kaldığı kanserojenler sonucu DNA'sında meydana gelen değişiklikler sonucu oluştuğu bilinmektedir. Oluşan mutasyonlardan bazıları vücut hücrelerinde meydana gelen değişiklikler ise sadece kişiyi etkilemektedir. Ancak meydana gelen değişiklikler üreme hücrelerinde meydana gelmişse bu değişikliklerin kalıtımla birlikte çocuklara aktarılması söz konusudur. Özellikle yaşam boyu meydana gelen değişiklikler içerisinde en yaygın olarak görülenlerde bir tanesi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlardır. Normalde bu genler tümör oluşumunu engelleme ve süreci kontrol etme özelliğine sahipken mutasyon sonucunda bunu yapamaz hale gelirler ve meydana gelen kanserojenlere maruziyet sonrasında kanserin oluşum ihtimali süreç kontrolünde problemler olduğu için giderek artmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012; Bartek and Lukas, 2007).

2.2.1. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler

Onkogenler, kanser oluşumunu kolaylaştıran ve genetik materyalin yapısında ve işlevlerinde meydana gelen bozulmalara neden olarak bu işlemi gerçekleştiren genlere verilen addır. Onkogenler mutasyon veya başka bir karsinojenik ajana maruz kalma yoluyla aktif hale gelerek otozomal dominant etki göstermektedir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Onkogenler DNA'nın yapısında baz silinmeleri, inversiyon ve zincir kırıkları gibi değişimlere yol açarak mutasyon yoluyla işlev gören karsinojen ajanlardır. Bu değişiklikler sonucunda DNA replikasyonunda, gen transkripsiyonunda, aktivasyonunda veya translokasyonunda değişiklikler meydana gelir. Onkogenler tm bu değişiklikler DNA molekülünde bulunan pürin, pirimidin ve şeker molekülleri ile reaksiyona girerek veya kromozomun yapısında yer alan proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak gerçekleştirirler (Ekmekçi, Konaç ve Önen, 2008).

Sağlıklı hücrelerde çoğalmayı kontrol etmek ve çoğalmanın kontrollü gerçekleşmesi için görev yapan genlere tümör baskılayıcı genler denmektedir. Tümör baskılayıcı genler herhangi bir şekilde hasara maruz kalırlarsa bu durum hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olabilmektedir. Protoonkogenlerin aktif hale gelmesiyle hücre büyümesinde, farklılaşma aşamalarında ve çoğalmada meydana

gelen mutasyonlar sonucunda tümör gelişimi meydana gelmektedir. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ise hücre siklusu kontrol edilemez ve tümör gelişimi için uygun koşullar oluşur (Ekmekçi, Konaç ve Önen, 2008).

Onkogenlerin aktive olmaları ve tümör baskılayıcı genlerin inaktive olmaları sonucunda hücreler kontrolsüz çoğalmaya başlar, invazyon ve metastaz yeteneklerini de kazanarak hücreler malign özellik göstermektedir (Bartek and Lukas, 2007).

2.2.2. Kanserin yayılması

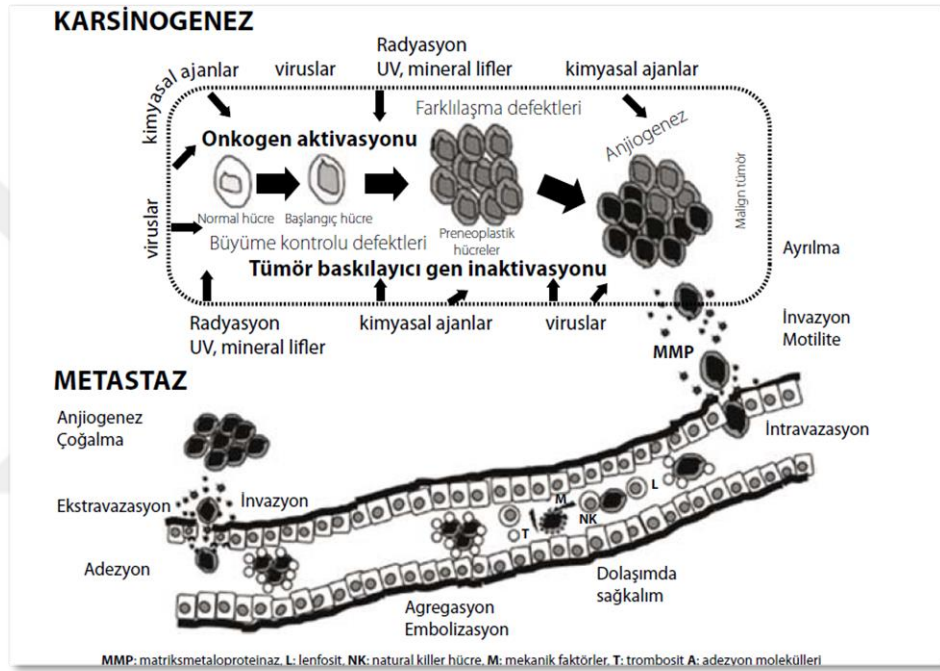
Kanser hastalığı onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar nedeniyle aktif hale geldikten sonra hücre döngüsünde meydana gelen kontrol basamaklarını aşabilmektedir. Bu basamaklarda DNA'nın hasarlı olup olmama durumları kontrol edilir ve hasarlı DNA bölümü tamir mekanizmaları ile tamir edilebilecekse tamir edilir, tamir edilemeyecekse hücre apoptoza sürüklenerek programlı hücre ölümü gerçekleşir. Kanserli hücrelerde ise böyle bir aşamada hücre apoptoza sürüklenmez ve hücre bölünmesi gerçekleşebilir veya hücre bölünmesinin başlamaması gereken, hücrenin dinlenme evresinde kalması gerektiği sinyali algılayamayan hücre kontrolsüz bir biçimde bölünmeye başlayabilir. Bu aşamalardan sonra kanserli hücre meydana gelir ve kontrolsüz çoğalma başlar (Duffy, 1992).

Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Hücrenin sağlıklı dokuları, hücreleri istila etmesi (invazyon) ve vücut dolaşımına katılarak başka sağlıklı dokulara yayılması (metastaz) gibi diğer malign özellikleri de kazanması gerekmektedir (Fidler, 1978).

Karsinogenez

Karsinogenez, kanserli dokuların oluşumundan itibaren hücrelerin belirli boyutlara ulaştıktan sonra başka dokulara yayılma (metastaz) ve onları istila etmesine (invazyon) verilen genel isimdir. Bu amaçla belirli bir boyutun üzerine çıkan kanserli hücreler buldukları konumdaki kan damarlarından difüzyon yoluyla beslenirler veya bir süre sonra besin bulma ihtiyacı ile damarlaşıma yoluyla besin-

lerini elde edebilirler. Belirli boyutlara ulaşan kanser hücreleri dokudan koparak kan damarını aşır dolaşıma katılır ve kendine konakçı bir doku seçerek bölünmesine burada devam eder. Bu şekilde yayılma eğilimi gösteren kanserli hücre bazı büyüme faktörlerini uyararak damarlaşıma sağlayıp kendine yeni besin yolları oluşturabilir (Lever and Sheer, 2010; Ekmekçi, Konaç ve Önen, 2008). **Şekil 2.3**'te karsinogenez, metastaz ve etkide bulunan karsinojenler şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2. 3. Karsinogenez süreçleri (İçli ve Akbulut, 2005).

2.2.3. Kanser oluşumunu etkileyen faktörler

Kanser multifaktöryel bir hastalık olduğu için kanseri tetikleyen tek neden yoktur (Preston and Williams, 2005). Bunlar genel olarak gruplandırılacak olursa; güneş ışığı, ultraviyole radyasyon, elektromanyetik radyasyon, iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel etmenlerin yanı sıra mesleki maruziyet, çevre kirliliği, tütün kullanımı, alkol kullanımı gibi kimyasal etmenlerle birlikte, bakteri veya virolojik olarak maruz kalınan biyolojik etmenler de sayılabilir. Genel olarak kansere neden olan etmenler sıralanırsa;

- Tütün
- Pasif İçicilik
- Kronik enfeksiyonlar
- Alkol alımı
- Üreme faktörleri, endojen hormonlar, ekzojen hormonlar
- Diyet, obezite ve fiziksel aktivite
- İyonlaştırıcı radyasyon
- Güneş ışığı, ultraviyole radyasyon
- Elektromanyetik radyasyon
- Mesleki maruziyet
- Çevre kirliliği
- Genetik duyarlılık (WHO, 2008; Greenblatt et al., 1994).

Tütün

Tütün kullanımı solunum yollarında yer alan organlar için bir tehlike oluşturmaktadır. Özellikle; akciğer, ağız boşluğu, geniz, sinüsler, yutak, gırtlak, yemek borusu gibi organlar kanser açısından tehlike altındadır. Tütün ürünleri kullanımını sonucu kanser riskinin % 30 arttığı belirtilmektedir.

Tütün dumanı içerisinde yer alan polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve nitrozaminler insanlarda en iyi bilinen kanserojen maddeler grubundadır. Nitrozamin belirgin olarak 60 farklı kanser türüne neden olabilmektedir. Kanserojen maddelere her sigara içildiği anda epitel hücreler maruz kalmaktadırlar ve gittikçe azalan metabolik detoksifikasyon sonucu moleküler lezyonlar oluşmaktadır ve hücreler onarım kabiliyetlerini zamanla kaybetmekte ve savunma mekanizmaları güçlerini yitirmektedir (Pfeifer et al., 2002; Alavanja et al., 2004; Moller, Knudsen and Loft, 2000).

Pasif içicilik

Tütün dumanında incelenen kimyasallar üzerinde yapılan araştırmalar sonucu solunum yolları kanserlerine yakalanma riskini oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Pasif içicilik sonucu hamile kadınlarda bebeğin gelişiminde anomalilere neden olmasının yanında akciğer kanserine yakalanma riskini de artırmaktadır (Alavanja et al., 2004).

Kronik Enfeksiyonlar

Dünyada kansere neden olan ajanların % 15-20'si enfeksiyon yapıcı ajanlara bağlanmaktadır. Bu oran düşük gelirli ülkelerde daha yüksek (% 26) yüksek gelirli ülkelerde ise (% 8) daha düşüktür. Enfeksiyon yapıcı ajanların tetiklediği kanser türleri arasında enfeksiyon faktörü olarak hepatit B virüsü (HPV), hepatit C virüsü (HCV) gibi ajanlar yer almaktadır. Bu ajanlar insanda sıklıkla servikal kanserler, lenfomalar, papilloma virüslerinin neden olduğu kanser türleri, hepatoselüler karsinomlar, lösemi ve Epstein-Barr virüsünün neden olduğu kanser türlerine yol açabilmektedir. Kansere neden olan ajanların telomer-telomerase sisteminde değişikliklere yol açarak, programlı hücre ölümü döngülerinde değişime yol açarak ve onkoproteini kodlayarak doğrudan rol oynadığı düşünülmektedir (Moller, Knudsen and Loft, 2000).

Bazı karsinojen ajanların da dolaylı bir rol oynayarak kronik iltihabı tetiklemektedir ve doku nekrozunu-yenilenmeyi tetiklemektedir. HIV virüsü de bağışıklık sistemini yavaşlatarak ve onkojenik enfeksiyonlara bağışıklığı azaltarak işlev görmektedir. Virüslerin neden olduğu kanser türleri ile ilişkili olarak geçtiğimiz yirmi yıl içinde çeşitli tedavi yöntemleri veya önleyici yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları antibiyotik tedavisi ve önleyici aşıları kapsamaktadır (Martin and Gutkind, 2008; Hausen, 1996; Ganem and Prince, 2004).

Alkol Alımı

Alkol kullanımının birkaç kanser türü ile ilişkisi bulunmaktadır. Bunlar yutak, gırtlak, yemek borusu, kolon, rektum, meme, karaciğer, ağız boşluğu gibi kanser türleridir.

WHO Küresel Hastalık Yüğü projesine göre alkol bağlantılı ölümlerin meydana getirdiği küresel yük (1.804.000 ölüm, ya da bütün ölümlerin %3,2'si) oldukça ciddidir (WHO, 2008).

Alkolün kanser etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olsa da genotoksik etkileri, östrojen seviyelerinde ortaya çıkan değişimler, başka karsinojenlere çözgen rolü görmesi, folat metabolizmasında meydana getirdiği değişimler ile kanseri tetiklediği düşünülmektedir (Poschl, 2004).

Üreme Faktörleri, Endojen Hormonlar, Ekzojen Hormonlar

Endojen cinsiyet steroidi kullanımı sonucu ve bu ilaçlara uzun süre maruz kalınma durumunda özellikle kadınlarda meme, endometrial veya over kanseri riskinin arttığı belirtilmiştir. Menapoz sonrası dönemde kadınlarda bu risk daha da artmaktadır (WHO, 2008).

Mesleki Maruziyet ve Çevre Kirliliği

Mesleki maruziyetle oluşan kanser türleri kişilerin çalıştıkları iş koşulları nedeniyle maruz kaldıkları metaller, gazlar, tehlikeli kimyasallar sonucu ortaya çıkan kanserlerdir. Bunun yanı sıra bir de çevre kirliliği sonucu fabrika ve fabrika benzeri çalışmalar yapan yerlerin kontrolsüzce çevreye bıraktığı kimyasal maddeler de kansere neden olmaktadır (Boffetta, Jourenkova and Gustavsson, 1997).

Özellikle soluk havasında yer alan uçucu kimyasal bileşikler nedeniyle ortaya çıkan maruziyet sonucunda akciğer kanseri gibi oldukça ağır seyreden kanser türlerini de tetikleyebilmektedir. Uçucu olmasa bile kanserojen olduğu bilinen asbest veya halk arasında amyant olarak bilinen mineralli taş mesleki maruziyet sonucu kansere neden olabilecek bir maddedir. Bunun gibi daha yüzlerce madde sayılabilmektedir (Stayner, Danhovic and Lemen, 1996; Caporaso et al., 1989). Aşağıda **Çizelge 2.1**'de Dünya Sağlık Örgütü tarafından hazırlanan rapora göre en sık karşılaşılan ve mesleki maruziyete yol açan kimyasalları, hangi kanser türüne neden oldukları ve kullanıldıkları sektör yer almaktadır (Moller, Knudsen and Loft, 2000).

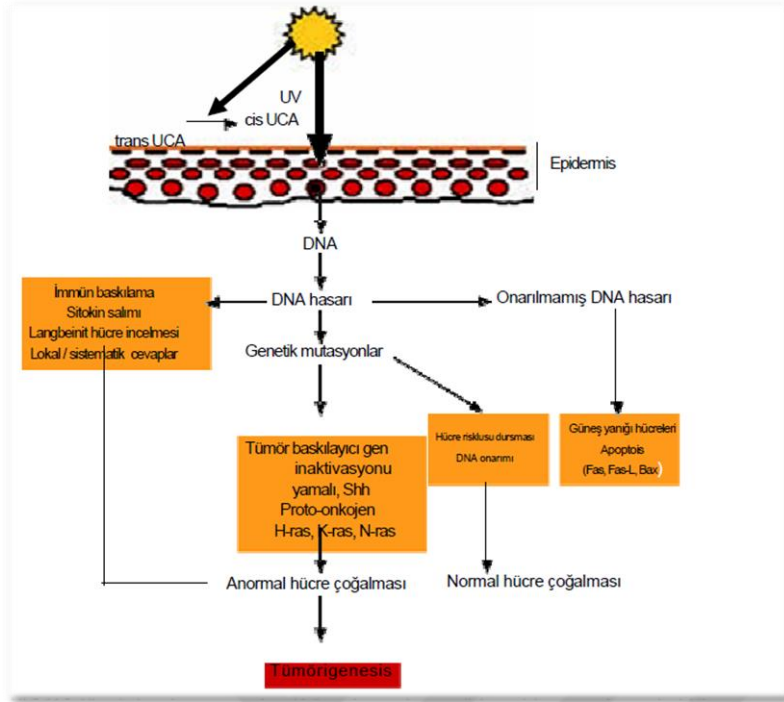
Çizelge 2. 1. Mesleki maruziyet oluşturan kimyasallar, hedef organları ve kullanıldıkları sektörler

Maruziyet	Hedef Organ	Ana Sanayi veya Kullanım
4-Aminobifenil	Mesane	Latik
Arsenik ve arsenik bileşikleri	Akciğer, cilt	Cam, metal, pestisit
Asbest	Akciğer, plevra	İzolasyon, inşaat
Benzen		Çözücü, yakıt
Benzidin	Mesane	Pigment
Berilyum ve berilyum bileşikleri	Akciğer	Hava-uzay, metal
Bis(klorometil)eter*	Akciğer	Kimyasal
1,3-Bütadiyen		Plastik, lastik
Klorometil metil eter*	Akciğer	Kimyasal
Kadmiyum ve kadmiyum bileşikleri.	Akciğer	Pigment, pil
Krom [VI] bileşikleri	Burun kavitesi, Akciğer	Metal kaplama, pigment
Kömür katranı zifti	Cilt, akciğer, mesane	İnşaat, elektrotlar
Kömür katranları	Cilt, Akciğer	Yakıt
Etilen oksit	Uygulanamaz**	Kimyasal, sterilizasyon
Formaldehit	Nazofarinks	Plastik, tekstil
Galyum arsenür	Uygulanamaz**	Yarı iletkenler
Mineral yağlar, işlem görmemiş veya az görmüş	Cilt	Yağlama
Hardal gazı (kükürt hardal)*	Farinks, akciğer	Harç gazı
2-Naftilamin*	Mesane	Pigment
Nikel bileşikleri	Burun kavitesi, akciğer	Metal, alaşım
Radon-222 ve bozunma ürünleri	Akciğer	Madencilik
Şiş yağları	Cilt	Yağlama, yakıt
Silikon kristalin	Akciğer	İnşaat, madencilik
Kurumlar	Cilt, akciğer	Pigment
Sülfürik asit içeren güçlü inorganik asit buharları	Larinks, akciğer	Kimyasal
Asbest fi içeren talk	Akciğer	Kağıt, boya
2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-diyoksin	Uygulanamaz**	Kimyasal
Vinil klorid	Karaciğer	Plastik
Talaş	Burun kavitesi	Kereste

İyonlaştırıcı, Ultraviyole Radyasyon, Elektromanyetik Radyasyon ve Güneş Işığının Etkisi

DNA hasarı sadece kimyasal maddelere veya biyolojik ajanlara maruz kalarak ortaya çıkmamaktadır. Bunların yanı sıra güneş ışınları, elektromanyetik radyasyon, iyonlaştırıcı ve ultraviyole radyasyona maruz kalma sonucunda da kanser oluşabilmektedir (Moller, Knudsen and Loft, 2000).

Güneş ışınlarının etkisi ile ultraviyole radyasyon ışınlarına maruz kalma durumuyla birlikte hücre DNA'sında meydana gelen farklılıklar DNA onarım mekanizmaları ile onarılmazsa ve tümör baskılayıcı genler tarafından süreç kontrol altına alınmaz ise kanser hücrede gelişerek hızla yayılmaya başlayabilir. Aşağıdaki **Şekil 2.4'**te güneş ışınlarına maruz kalma sonucu meydana gelebilecek durumlar anlatılmaktadır (Moller, Knudsen and Loft, 2000; Greenblatt et al., 1994).



Şekil 2. 4. Güneş ışınları sonucu gelişen süreç

Mobil cep telefonlarının yoğun kullanımı ile ortaya çıkabilecek kanser türleri araştırıldığı zaman, uzun süreli ve yoğun kullanım durumlarında paratiroid bezi tümörleri, akustik nöroma ve gliyoma ile risk artışı arasında bir bağlantı bulunmasına rağmen klinik bulgular değerlendirildiğinde belirgin bir bulguya rastlanamamıştır (WHO, 2008; Szmigielski, 1996).

İyonlaştırıcı radyasyonun da kanser üzerine etkileri vardır. İyonlaştırıcı radyasyona kişiler doğal kaynaklardan olduğu kadar insan yapımı kaynaklardan da maruz kalmaktadırlar. Meme kanseri, tiroid ve lösemi olmak üzere birçok kanser türüyle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Çernobil kazasının ardından 2065 yılına kadar binlerde kanser vakasının görüleceği düşünülmektedir (WHO, 2008; Greenblatt et al., 1994; Moller, Knudsen and Loft 2000). Aşağıda Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan raporda insan için karsinojenik olan ışın türleri **Çizelge 2.2**'de verilmektedir.

Çizelge 2. 2. Işın türleri ve oluşturduğu kanser türleri

Ajan veya madde	Kanser bölgesi/kanser
IARC Grup 1: İnsanlar için karsinojenik	
X-ışınları ve gama radyasyonu	Çeşitli – tüm bölgeler
Güneş radyasyonu	Deri
Radon-222 ve bozunma ürünleri	Akciğer
Radyum-224, -226, -228 ve bozunma ürünleri	Kemik
Toryum-232 bozunma ürünleri	Haemangiosarkoma da dahil akciğer kanseri ve lösemi
Radyoiodotlar (iyot-131 dahil)	Tiroid
Plütonyum-239 ve bozunma ürünleri (aerosoller)	Akciğer, karaciğer, kemik
Fosfor-32	Lösemi
Nötronlar	Çeşitli
Alfa (a) parçacık yayan radyonüklidler	Çeşitli
Beta (b) parçacık yayan radyonüklidler	Çeşitli
IARC Group 2A: İnsanlar için olası karsinojenik	
Ultraviyole lambaları ve şezlong kullanımı	Cilt
Ultraviyole radyasyon	Cilt

2.2.4. Kanser istatistikleri ve kanser türleri

Daha uzun ömür ve daha kaliteli yaşam için yapılan tüm çabalar sonucu artan uzun ömürle birlikte ne yazık ki kansere yakalanma ve ölüm oranları da gittikçe artmaktadır. Türkiye’de kanser vakalarında tüm dünyada olduğu gibi artış söz konusudur. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’nun yaptığı araştırmalara göre 2002 yılından bu yana kanserli kişi sayısı ciddi bir artış göstermektedir. **Çizelge 2.3**’te Sağlık Bakanlığı tarafından yıllara göre düzenlenmiş bir tablo yer almaktadır.

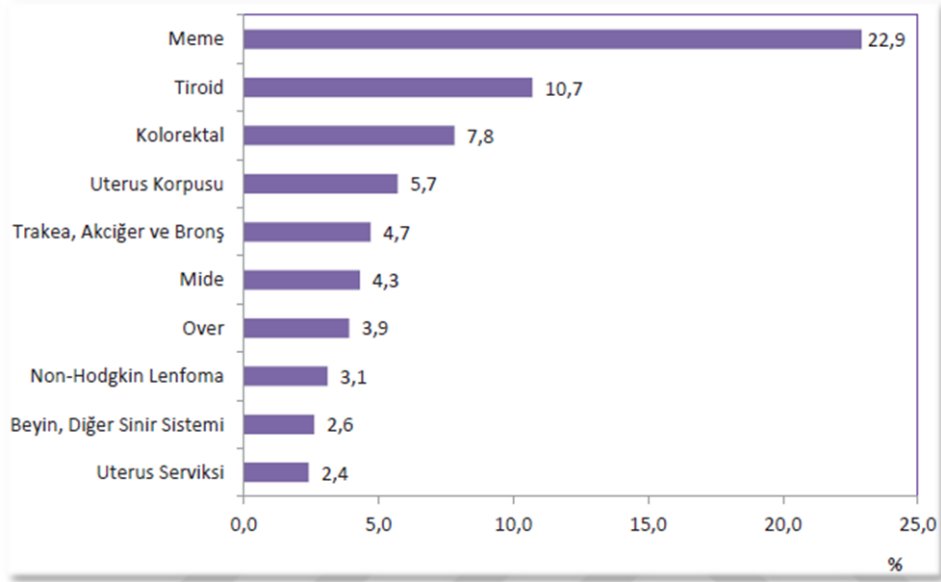
Çizelge 2. 3. Yıllara ve cinsiyete göre toplam kanser insidansı-100.000 kişide (T. C. Sağlık Bakanlığı)

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Erkek	154,2	168,7	236,3	246,5	256,4	279,0	280,5	269,7	261,4
Kadın	113,0	127,9	142,9	149,7	158,1	165,1	172,0	173,3	168,7
Toplam	133,5	148,3	189,6	198,1	207,3	222,0	226,3	221,5	215,1

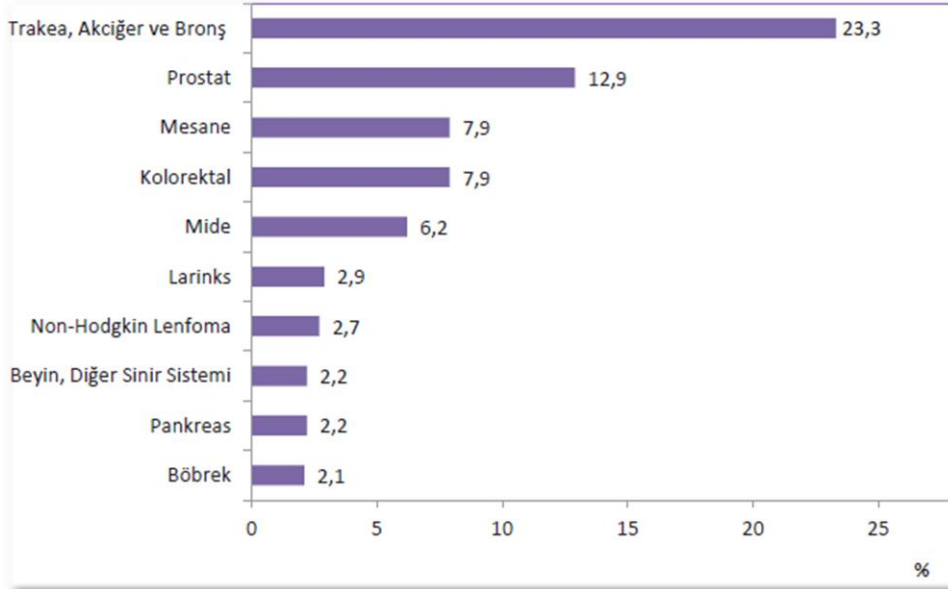
Kanser araştırmaları için Amerika’da kurulan bir kurumun belirttiği rakamlara göre 2012 yılında 8,2 milyon kişi kanserden ölürken, 2035 yılında bu rakamın 14,6 milyon olacağı düşünülmektedir (AACR Cancer Progress Report, 2014).

Kanser istatistiklerine göre artan vaka sayıları kanser türleriyle de ilişkilidir. Kadınlarda ve erkeklerde görülen kanser türleri vaka sayısına göre farklılık göstermektedir. Kadınlarda en sık görülen kanser türü me-

me kanseri iken erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseridir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2014). **Şekil 2.5**'te kadınlarda görülen kanser türleri yüzde olarak verilmektedir.



Şekil 2. 5. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2010).



Şekil 2. 6. Erkeklerde en sık görülen kanser türleri (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2010)

Şekil 2.6'da verildiği üzere erkeklerde en sık görülen kanser türü trake, akciğer ve bronş kanserini takiben prostat kanseridir. Kanser türleri görüldükleri

bölgelere göre isimlendirilmektedirler. Yaklaşık olarak 100 farklı kanser türü bulunmaktadır. Baş ve boyun, yemek borusu, mide, karaciğer, pankreas, safra kesesi, kolorektal, nazofarenks, akciğer, melanom olan-olmayan deri, meme, serviks, over, endometriyal, testis, böbrek, idrar kesesi, prostat, tiroid, sinir sistemi kanserinin yanı sıra, lenfoma ve lösemiler yaygın görülen kanser türlerindedir (WHO, 2008).

2.2.5. Ovaryum kanseri

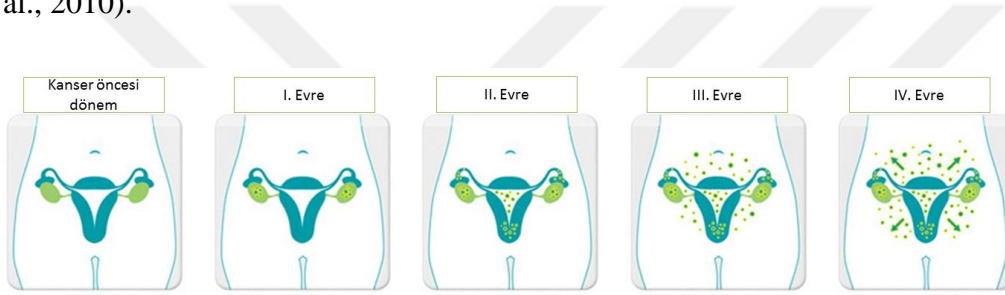
Over kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen 4. sıradaki kanser türüdür Kadın genital organ kanser türleri içerisinde en sık ölüme yol açan kanser türüdür. Her yıl 220 bin kadın over kanserine yakalanmaktadır (Jayson et al., 2014). Ölüm oranının yüksek olması erken teşhis edilememesinden kaynaklanmaktadır. İleri evrede tanı konulan hastalar için artık geri dönülmesi zor bir dönem başlamaktadır (Permuth-Wey et al., 2011). Hastalık 18 ay gibi kısa bir süre içerisinde 3. evreye kadar gelebilmektedir (Jayson et al., 2014).

Over kanseri nedenleri arasında yaş, yaşam stili, aile öyküsü, menstrual ve hormonal etkiler kapsamlı şekilde araştırılan ve bağlantılı bulunan bulgular içerisindedir (WHO, 2008). Yaşam boyu menstrual döngüdeki değişimler, gebelik sayısı, doğurganlık özellikleri, oral kontraseptif kullanımı gibi durumlar da over kanser riskini etkilemektedir. Örneğin; oral kontraseptif kullanımı ilk yıllarda % 40'a kadar koruyucu etki göstermektedir ve bu etki ilaç bırakıldıktan sonraki 15-20 yıl daha devam etmektedir. Ancak 10 yıldan uzun süre ilaç kullanımı over kanserine yatkınlığını öncekine göre artırabilmektedir. Bu tür yaşam stilleri veya hormonal etkilerin yanı sıra genetik olarak over kanseri oluşum sürecini etkileyen faktörler de vardır (Weil and Chen, 2011). BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu over kanseri nüksedebilmektedir. Over kanseri tanısı alan kadınların % 15'inde BRCA genlerinde mutasyon olduğu belirlenmiştir (Pal et al., 2005).

Hastalık kendini inatçı kasık ve karın ağrısının yanında karın çevresinde şişkinlik ile göstermektedir. Bu belirtilere ilave olarak yeme güçlüğü, çabuk doyma ve idrara sık çıkma ihtiyacı da belirtiler arasındadır. Belirtiler spesifik belirtiler olmadığı için genellikle bağırsak problemleri ile karıştırılabilmektedir. Bu belirtilerin görüldüğü kişilerde hastalık ilerlediği için (Evre III veya IV) tedavi şansı

düşmektedir. Over kanserinde en sık görülen tip yüksek dereceli seröz kanser türüdür. Hastalığın III. ve IV. Evresine gelmiş bir over kanseri % 95 ihtimalle seröz tiptir ve oldukça saldırgan bir kanser türüdür (Weil and Chen, 2011; (Colombo et al., 2010).

Şekil 2.7'de şematik olarak anlatıldığı üzere over kanseri 4 evreden oluşmaktadır. I.Evre'de kanser sadece ovaryumla sınırlıdır. II. Evre'de kanser ovariumun dışına taşarak kalça kemikleri ile sınırlandırılmış alanda yayılmaktadır. III. Evre'de kanser karın boşluğuna yayılmaktadır. IV. Evre'de ise kanser ovariumdan uzak olan diğer organlara sıçrayarak yayılmasına devam etmektedir (Colombo et al., 2010).



Şekil 2. 7. Ovaryumun kanserdeki evreleri (Ashton, J., 2016)

Hastalığın tedavi yöntemleri arasında cerrahi yöntem ve kemoterapi uygulanmaktadır. Ancak erken evre ve ileri evredeki hastalar için farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır (Marcus et al., 2014; (Jayson et al., 2014). Hastalık ileri evrelerde teşhis edilme problemi ile yüzyüze kaldığı için o aşamadan sonraki tedavi yöntemleri de yeterli değildir. Hastalığın teşhisi amacıyla kan testleri ile CA 125 tayini yapılmakta, ona ek olarak da ultrason ve tomografi (bilgisayarlı tomografi ve pozitron emisyon tomografisi) ile teşhis sonucu netleştirilmektedir (Jayson et al., 2014; Colombo et al., 2010; Marcus et al., 2014)

2.3. Kanser Teşhis Yöntemleri

Kanserin teşhis edilebilmesi için belirtiler göstermesi veya düzenli kontroller ile kişilerin biyokimyasal süreçlerini takip etmesi gerekmektedir. Kanserin teşhisini koymak amacıyla uygulanan yöntemler birçok kanser türü için ortak da olsa spesifik kanser türleri için uygulanan işlem basamakları içinde farklılıklar da vardır. Görüntüleme prosedürlerinden olan bilgisayarlı tomografi, ultrason, nükleer manyetik rezonans, nükleer tarama, X-ray gibi teşhis yöntemlerinin yanı sıra

biyopsi için iğne, endoskopi veya cerrahi girişimle elde edilen doku örneklerinin incelenmesi de yapılabilmektedir (Ramaswamy et al., 2001).

Standart yöntemlere ilave olarak kanser teşhisinde kanser türüne özgü kullanılan teşhis ve tanı yöntemleri aşağıda yer almaktadır:

Serviks kanserinde paptest en yaygın kullanılan testler içerisinde, bunun yanı sıra asetik asit, Lugol iyot testi, HPV testi ve sıvı bazlı sitoloji de uygulanarak inceleme yapılabilmektedir (Nanda et al., 2000; WHO 2008). **Meme kanserinde** mamogram taraması (X-ışınları) en yaygın kullanılan teşhis yöntemlerinden biridir (Alavanja et al., 2004; WHO 2008). **Kolorektal kanser** tanısında dışkıda gizli kana bakılarak kolonoskopi taraması yapılmaktadır (Walsh et al., 2003). **Prostat kanseri** tanısında prostat spesifik antijen (PSA) tayini yapılmaktadır (WHO, 2008). **Ovaryum kanserinin** teşhisinde CA 125 tayini ve transvajinal sonografi (TVS) yapılmaktadır (WHO, 2008; Baron et al., 2005).

Yukarıda bahsedilen testlere ilave olarak genetik tarama testleri yapılmaktadır. Prostat kanserinde ve ovaryum kanserinde tanı yöntemi olarak kullanıldığı üzere diğer kanser yöntemlerinde de kullanılan biyobelirteçler bulunmaktadır (Preston and Williams, 2005).

2.3.1.Kanser biyobelirteçleri

Karsinogenezis süreci yüzlerce proteinin, genin ve hücre yolaklarının yer aldığı karmaşık bir süreçtir ve bu süreçte işleyişi devam ettirebilmek için bazı metabolitler fazlaca sentezlenmektedir. Bu değişimlerden yola çıkarak miktarı artan veya azalan metabolitlerin izleri takip edilerek hassas bir şekilde ortaya çıkarılabilirler (J. Wu et al., 2007). İşte kanser biyobelirteçleri de kanser vakalarında hücre yüzeylerinde eksprese edilen veya dolaşımda yer alan, rahatsızlığın teşhisine bu sayede imkan tanıyan maddelerdir (Pandey, Demchenko and Stine, 2012).

Kanser biyobelirteçleri enzim, glikoprotein, reseptör, hücre yüzey molekülü, immun sistem molekülü ve hormon yapısında olabilir. Aşağıda **Çizelge 2.4**'te kanser türleri ve ilişkili olduğu biyobelirteçler verilmektedir (J. Wu et al., 2007).

Çizelge 2. 4. Kanser türleri ve biyobelirteçleri

Karaciğer kanseri	AFP,CEA
Kolorektal ve pankreatik kanser	CEA,CA19-9,CA24-2
Gastrik karsinoma	CA72-4,CEA,CA19-9
Özofagus karsinoma	SCC
Akciğer kanseri	CEA,CA19-9, SCC,CYFRA21-1,NSE
Göğüs kanseri	CA15-3,CA125,CEA
Ovaryum kanseri	CA125,AFP,hCG, CEA
Tropoblastik kanser	SCC,hCG
Prostat kanseri	F-PSA, PSA, PAP

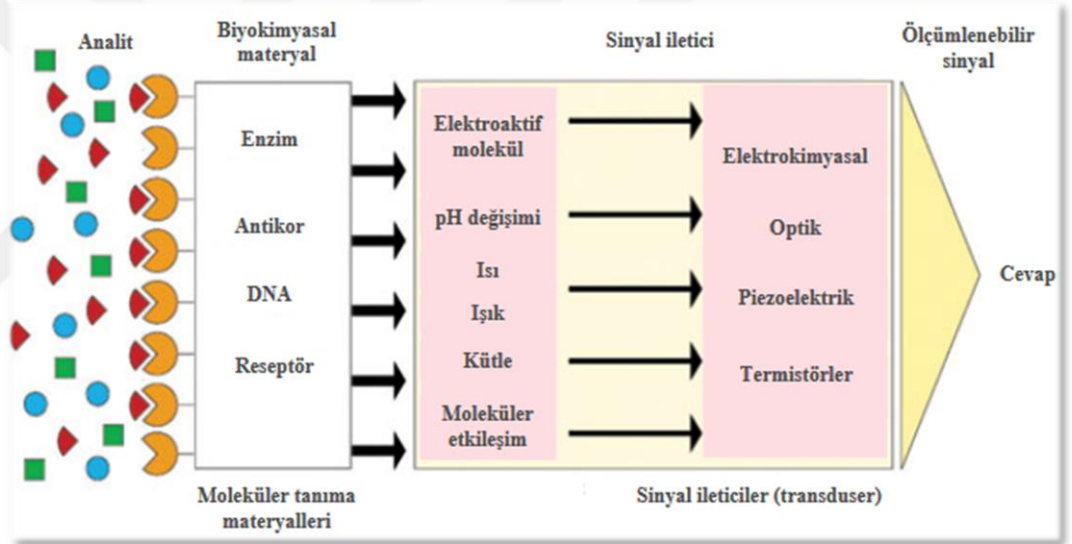
Kanser Antijen 125 (CA 125)

Kanser antijen 125, MUC 16 geni tarafından sentezlenen ve 200 ile 500 kDa arasında moleküler ağırlığı olan bir hücre membran glikoproteinidir (Baron et al., 2005). Bir mucin proteini olan CA 125 ilk olarak insan sütünden saflaştırılmış olup serin, prolin ve treonin amino asidi bakımından zengin bir yapıya sahiptir. Serin treonin bölümünden fosforillenen CA 125'in serin/treonin kinaz enzimi ile bağlantılı çalıştığı düşünülmektedir (Whitehouse, 2003).

Ovaryum kanserinde teşhis ve takip sürecinde kullanılan bir biyobelirteç olan kanser antijen 125'e literatürde karbohidrat antijen 125'de olarak da geçmektedir (Das and Kelley, 2011; Fu, 2007). CA 125'in serumdaki miktarı ovaryum kanseri için belirleyici olabilmektedir. 35 U/mL CA 125 miktarının altındaki değerler ovaryum kanseri olmayan kişileri ifade etmektedir. 35 U/mL'nin üzerindeki CA 125 değerleri çoğunlukla ovaryum kanseri olan kişileri ifade etmektedir ancak bazı durumlarda CA 125'in kandaki seviyeleri yükseldiği için yalancı pozitiflik söz konusu olabilmektedir. Kişilerin sigara içme öyküleri, menstrual döngüleri, menapoz dönemleri, hamilelik durumları da bu değerlerin değişmesinde etkilidir. Karaciğer, uterus, pelvis ve ovaryumda meydana gelen enfeksiyon durumlarında da miktarı yükselebilmektedir. Ancak hastalık evrelerindeki ilerleme veya kitlenin büyüklüğü ile kandaki miktarları birebir ilişkilidir. Bu nedenle yüksek hassasiyeti ve spesifikliğı olan bir biyobelirteçtir (Baron et al., 2005; Marcus et al., 2014).

2.4. Sensörler

Sensörler, analiz edilen madde ile seçimli bir şekilde etkileşime girerek bu etkileşim sonucunu anlaşılabilir bir sonuca dönüştüren aygıtlara verilen addır (Diltemiz et al., 2010). Sensörler ortamda varolan analit miktarı ile orantılı olacak şekilde sinyal oluştururlar. Bu sayede ortamdaki analitin miktarı tayin edilebilir. Sensör sistemlerinin ana olarak iki bileşeni vardır; birincisi analiti algılayıcı kısım (mediator) diğeri ise sinyali dönüştürerek anlamlı bir hale getiren kısım (transducer)'dır. Bu iki bileşende analizlenecek maddenin özelliğine ve dönüştürülecek anlamlı sinyalin özelliğine göre farklı özelliklere sahiptir (Lukas, Lukas and Bartek, 2004). Aşağıda **Şekil 2.8**'de sensörlerin genel çalışma prensibi aşağıda şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2. 8. Sensör bileşenleri (Sezgintürk, 2016)

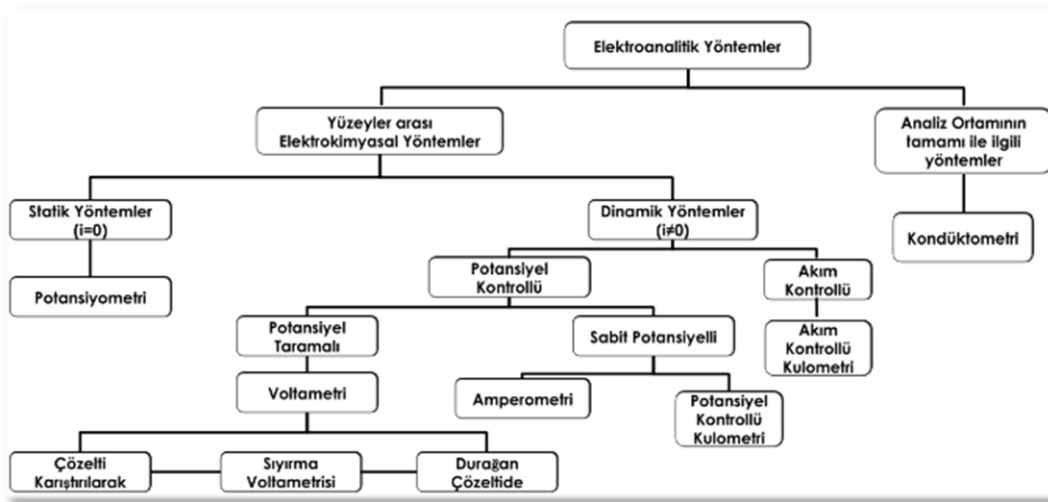
Analizlenecek maddenin türüne göre enzim sensörleri, mikrobiyal sensörler, immünosensörler, DNA sensörleri gibi gruplara da ayrılabilir. Enzim sensörleri; sensör sisteminin algılayıcı kısmına enzim immobilize ederek, enzimin substratı ile bir araya geldiği zaman meydana gelen reaksiyon sonucu miktarı azalan veya artan maddeleri tayin etmeye yarayan sensör çeşididir. Mikrobiyal sensörler algılayıcı kısımda canlı mikrobiyal hücrelerin yerleştirilmesiyle mikroorganizmaların metabolik süreçlerinden faydalanarak analitin sinyale dönüştürüldüğü sistemlerdir. İmmünosensörler algılayıcı kısımda bulunan antijen yardımıyla antikorun veya antikor yardımıyla antijenin tayin edildiği sistemlerdir. DNA sensörleri ise; algılayıcı kısımda DNA'yı tanıyabilecek moleküllerin kullanıldığı ve DNA

miktarını tayin etmeye yarayan sensör sistemleridir (Osibote et al., 2011; Windmiller and Wang, 2013; Lin, Wei and Mao, 2011).

Günümüzde çok çeşitli sensör sistemleri geliştirilmiştir. Sağlık, gıda, tarım, ilaç, kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Sensörlerin bu kadar geniş bir alanda kullanım bulmasının nedeni hızlı, pratik, ucuz, hassas olarak geliştirilebilmelerinden kaynaklanmaktadır. Sensörlerin analiti karmaşık ortamlardan tayin edecek kısımları analiti algılama şekline göre farklılıklar göstermektedir. İşte bu nedenle de bu kadar geniş sektör içerisinde kullanım imkanı bulmaktadır. Algılama şekillerine göre sensörler; elektrokimyasal, optik, termometrik, piezoelektrik ve manyetik özellikte olabilmektedir (Osibote et al., 2011).

2.4.1. Elektrokimyasal yöntemeye dayalı sensörler

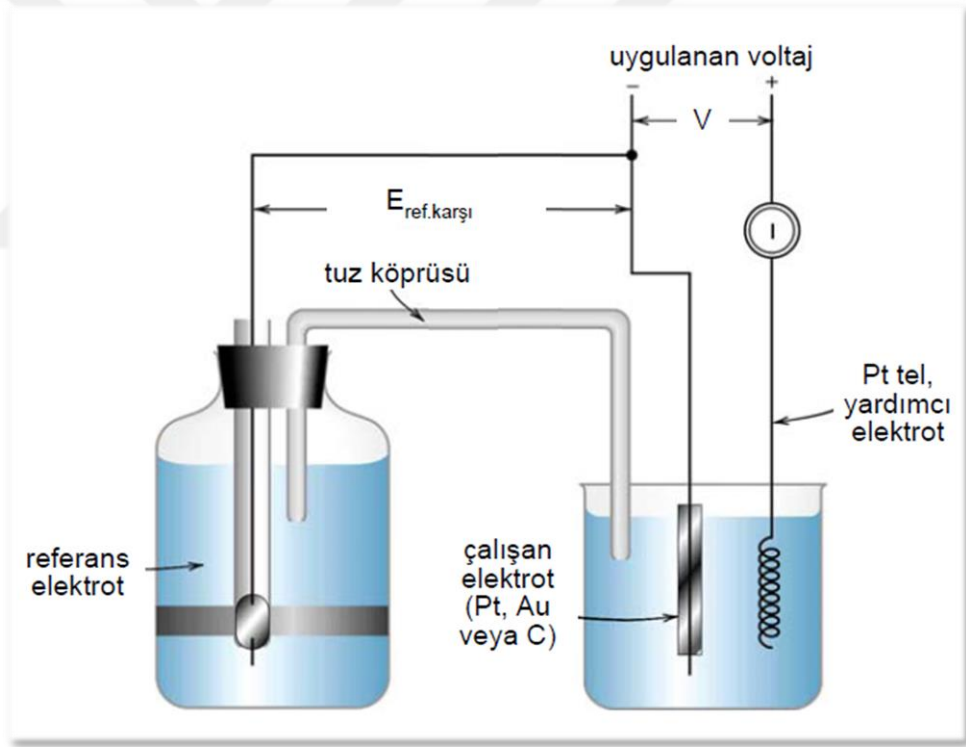
Elektrokimyasal sensörler ortamdaki analitlerin miktarlarının elektrokimyasal (akım, potansiyel veya yük olarak) anlamlı bir sinyale dönüştürüldüğü sistemlerdir ve reaksiyonların ara yüzeyde veya çözeltinin tamamında gerçekleşmesine göre iki ana gruba ayrılırlar. Ara yüzeyde tayinde dayalı yöntemlerin özellikle duyarlılığı oldukça yüksektir ve çok düşük konsantrasyonlarda tayine imkan verdiği için tercih edilmektedir (Wang, 2006). Aşağıda Şekil 2.9'da Elektroanalitik Yöntemler'in sınıflandırılması bulunmaktadır.



Şekil 2. 9. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması (Şener, 2015).

Voltametri

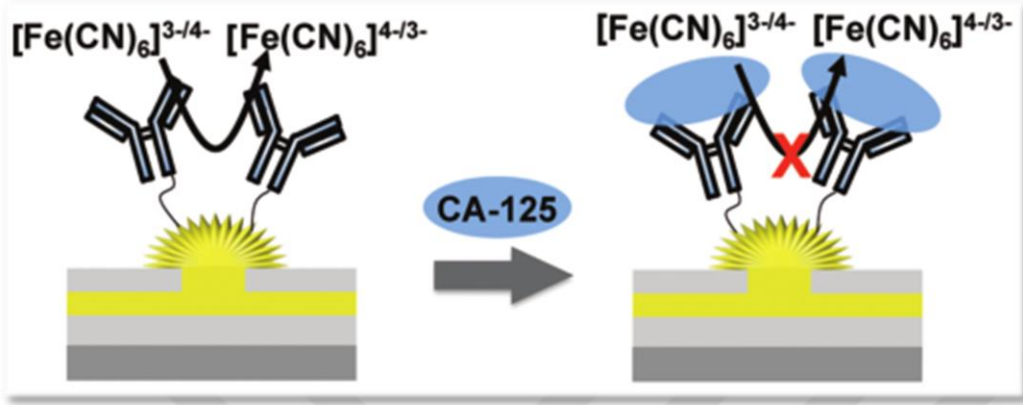
Karşılaştırma elektrodu (Referans elektrot) ve çalışma elektrodu kullanılarak elde edilen elektrokimyasal bir hücrede ölçülen akım yardımı ile analit miktarını tespit etmeye yarayan sensörlerdir. 2 elektrotlu ve 3 elektrotlu olmak üzere iki farklı şekli bulunmaktadır. Genellikle 3 elektrotlu sistemler günümüzde tercih edilmektedir. 3 elektrotlu sistemlerde ilave olarak yardımcı elektrot yer almaktadır. Çalışma elektrodu analizin yapılacağı çözeltiliye daldırılarak işlem yapılmaktadır, referans elektrot ise bir membran yardımıyla analitin bulunduğu çözeltiliden ayrılmıştır veya ayrı bir çözeltili içerisinde yer alır. Referans elektrodun iç kısmında yer alan çözeltili ile analitin bulunduğu çözeltili arasında meydana gelen gerilim farkından yola çıkarak analit miktarı tayin edilebilmektedir (Osibote et al., 2011).



Şekil 2. 10. Voltametrik Çalışma Düzenegi

Yukarıda Şekil 2.10'da voltametrik çalışma düzenegi yer almaktadır. Voltametri ortamda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarına bağlı olarak yüzeyde gerçekleşen değişimi sinyal olarak iletmeye yarayan bir yöntemdir. Voltametri yönteminde elektrot yüzeyine bir sinyal uygulanarak sinyale karşı ortamda meydana gelen redoks reaksiyonları sonucu oluşan akım ölçülmek-

tedir (Wang, 2006). Şekil 2.11’de voltametri metoduna göre kullanılan tayin metodu şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2. 11. Tez çalışmasında voltametri metoduna göre kullanılan ana çalışma prensibi (Das and Kelley, 2011).

Voltammetrik yöntemler içerisinde doğrusal taramalı, kare dalga, diferansiyel puls ve döngüsel voltametri yöntemleri kullanılmaktadır (Pandey, Demchenko and Stine, 2012; S. F. Wang, Du and Zou, 2002; Lin, Wei and Mao, 2011).

Döngüsel Voltametri

Döngüsel voltametri yönteminde küçük bir elektrot yüzeyine karıştırılmayan sistem içerisinde zamanla doğrusal olarak değişen bir potansiyel uygulanır ve ileri yöndeki tarama bitince geri yönde tarama yapılarak akım değerleri elde edilir. Genellikle redoks tepkimesinin başlamadığı bir potansiyel seçilir ve redoks reaksiyonunun sonlandığı noktaya kadar ileri ve geri olmak üzere tarama yapılarak potansiyel uygulanır. Döngüsel voltametri sayesinde tepkimelerin niteliği hakkında bilgi edinilir ve işlem sonunda elde edilen grafiklere voltammogram denir (Turner, Karube and Wilson, 1989).

Döngüsel voltametrimin başlıca kullanım alanı, elektrokimyasal işlemler hakkında kantitatif bilgiler sağlayan temel çalışmalardır. Bu yöntem, rutin kantitatif analizlerde kullanılmakla birlikte, özellikle organik ve metal-organik sistem-

lerde yükseltgenme-indirgenme işlemlerinin mekanizma ve hızının belirlenmesinde önemlidir.

Döngüsel voltametrizde tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızı ile değişmesi incelenir ve tepkimenin adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım tepkimelerine eşlik eden kimyasal tepkimelerin doğası incelenerek belirlenir (Turner, Karube and Wilson, 1989).

Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan pulsların başında ve sonundaki ölçümlerin farkı alınarak uygulanan bir yöntemdir. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Gözlenen akım yanıtı pik şeklinde olup, yüksekliği analitin derişimi ile doğru orantılıdır. Tersinir bir tepkimede pik potansiyeli, yarı tepkimenin standart potansiyeline yaklaşık eşittir (Turner, Karube and Wilson, 1989). Tez çalışması kapsamında ortamda bulunan demirin yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarına dayalı olarak analiz metodu geliştirildi. Elektrot yüzeyinden çözeltiliye uygulanan potansiyel ile birlikte demir elektron alarak indirgenme reaksiyonu gerçekleştirmektedir ve bu sayede elektrot yüzeyinde oluşan bu indirgenme tepkimesi sayesinde kimyasal değişim elektroanalitik bir değişime dönüştürülmekte ve bir voltammogram elde edilmektedir. **Şekil 2.11**'de gösterildiği üzere elektrot yüzeyine yapılan işlemler sonucunda elektrot yüzeyinde doluluk gerçekleşmektedir ve bu doluluk nedeniyle indirgenmek amacıyla elektron almaya gelen demir elektrot yüzeyine yaklaşmamakta veya daha az yaklaşabilmektedir. Bu sayede daha az demir elektron yakalayarak indirgenir ve sinyalde dolulukla ters orantılı olacak şekilde bir düşme yaşanır. Yani yüzeyde doluluk arttıkça elde edilen sinyaller daha düşük olmaktadır. Bu prensipten yola çıkarak yüzeyde yapılan bağlanma miktarları hakkında bilgi edinilmektedir (Das and Kelley, 2011).

2.5. Polimerik Nanomalzemeler ve Tıpta Kullanımları

Polimerik nanomalzemeler, polimerizasyon yöntemleri kullanılarak ortamda monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve monomer varlığında elde edilen uzun zincirli yapılardır (Genc and Pati, 2001). Doğadada örnekleri bulunan polimerlerin (nişasta, kitin gibi) hedefe uygun şekilde tasarlanması ile polimerik malzemeler kimyasal olarak da sentezlenebilmektedirler (Kumar et al., 2007). Polimerik malzemeler sadece nanoyapılarda değil membran, kriyojel, mikroküre şeklinde de sentezlenebilmektedir (Caka vd., 2016; Baydemir vd., 2009; Kocakulak vd., 1997).

Farklı formlarda sentezlenebilmeleri polimerik malzemelere çok geniş avantajlar sunmaktadır. Özellikle günümüzde gittikçe yaygınlaşan nanomalzemelere duyulan ilgi sayesinde polimerik nanomalzemeler medikal alanda geniş bir kullanıma sahiptir (Okutucu vd., 2016). Hastalıkların teşhis ve tedavisinin yanı sıra, görüntüleme tekniklerinde veya vücut sıvılarından bazı kimyasalların uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Uygun vd., 2012; Cambre and Sumerlin, 2011; J. Wu et al., 2007).

Literatürde yapılan çalışmalar içerisinde; kanda toksik özelliği olan ve buna maruz kalmış kişilerde metal giderimi amacıyla ekstrakorporal sistemlerde kullanılmak üzere sentezlenen polimerik malzemeler bulunmaktadır (Bayramoglu, 2003).

Radyoaktif olarak işaretlenen ve hayvanlara verilerek görüntüleme tekniklerinde kullanılan veya verilen ilacın etki edeceği bölgeye ulaşip ulaşmadığını test etmek amacıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Avcıbaşı vd., 2013).

Herhangi bir dokunun gördüğü işlevi doku hasar gördükten sonra da yerine getirebilmek için enzim immobilize edilerek doku mühendisliği uygulamalarına katkı koymak amacıyla sentezlenen ve karakterize edilen çalışmalar bulunmaktadır (Türkcan vd., 2014).

Manyetik nanomalzemeler sentezlenerek kanserli dokuların manyetik karakterinden faydalanarak hedefleme ile görüntüleme tekniklerinde veya hedefe ilaç gönderimi yapılabilen çalışmalarda da polimerik nanomalzemeler kullanılmaktadır (Barreto et al., 2011).

Kontrollü salım amacıyla etken madde veya ilacı içeren polimerik nanomalzemelerin kontrollü salımda kullanılmasıyla birlikte sık aralıklarla ilaç alımının önüne geçilebilmekte ve ilacın yaratacağı toksik etkiler bertaraf edilebilmektedir (Slowing et al., 2008).

Polimerik nanomalzemeler örneklerle anlatılan kullanım alanlarına ilave olarak teşhis alanında da kullanım bulmaktadır. Birçok hastalığın teşhisinde polimerik nanomalzemeler hedef analite afinite sağlayacak şekilde modifiye edilerek kullanım bulmasının yanı sıra moleküler baskılı polimerler de hedef analite özgü kuyucuklar içerdiği için seçici ve spesifik bir tanımaya imkan sağlamaktadır (Kwon et al., 2013; Diltemiz vd., 2009).

Kanser teşhisinde ise altın nanopartiküller ile bir araya getirilerek kullanılan polimerik nanomalzemelerin yanı sıra nanofiberler, polimerik membran yapıları gibi malzemeler de literatürde bulunmaktadır. Bu amaçla genellikle polimerik malzeme modifiye edilerek kanser biyobelirteci olarak bilinen antijenlerin antikorları polimerik nanomalzeme üzerine immobilize edilerek antijeni tayin etmesi amaçlanmaktadır (Lin, Wei and Mao, 2011) Bu şekilde immünosensör özelliği gösteren sistemler elektrokimyasal olarak tayin edilebilmenin yanı sıra, yüzey plazmon rezonans gibi daha komplike sistemler de kullanılarak tayin edilebilmektedir (L. Wu et al., 2006; Chen et al., 2008; Tang, Yuan and Chai, 2006; Altıntaş vd., 2011).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasal maddeler

Tez çalışmasının yürütülme sürecinde kullanılan kimyasal maddeler şunlardır:

Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentezinde kullanılan HEMA (2-Hidroksietilmetakrilat), EGDMA (Etilen glikol dimetakrilat), KPS (Potasyum per sülfat), PVA (Poli vinil alkol), aşılama prosesinde kullanılan L-Sistein, tampon olarak kullanılan MES (2-(N-Morfolino)etan-sülfonik asit, polimerik nanomalzemenin aktivasyon işleminde kullanılan EDC (1-etil-3-(3-dimetil amino propil)-karbodiimid) (5 G), NHS (N-Hidroksisüksinimid) (25 G), sensör çalışmalarında kullanılan çözeltinin hazırlanmasında kullanılan potasyum klorür (KCl), bloklama amacıyla kullanılan sığır serum albümin (BSA), uzun elektrot temizlik prosesinde kullanılan sülfirik asit (H_2SO_4) ve pirana çözeltisi hazırlamada kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Kanser Antijen 125 (5 kU) ve Kanser Antijen 125 antikoru Fitzgerald'dan temin edildi. Aşağıda stoklara bölünerek muhafaza edilen antijen ve antikörlerin görüntüsü **Şekil 3.1**'de yer almaktadır. Sensör çalışmalarında kullanılan çözeltinin hazırlanmasında kullanılan potasyum heksosiyanoferrat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ ve potasyum heksosiyanoferrat (II) trihidrat $K_4[Fe(CN)_6]$, tamponlama amacıyla kullanılan potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) Merck firmasından temin edildi. Elektrot temizlik prosesinde kullanılan alümina (0,05 mikron) Basi Firmasından temin edildi. Gerçek antijen örnekleri ve serum örnekleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi aracılığı ile temin edilen serum ve antijen örnekleridir. Polimerik nanomalzemenin yıkama işlemlerinde ve temizleme prosedürü için kullanılan etanol Teksoll Kimya'dan temin edildi. Tamponların hazırlama işlemlerinde distile su kullanıldı ve elektrot yıkama işlemlerinde ultra saf su cihazından elde edilen ultra saf su kullanıldı.



Şekil 3. 1. Antijen ve antikorların stoklara ayrılmış hali

3.1.2. Cihaz ve sistemler

Tez çalışmalarının yürütülmesi sürecinde kullanılan cihaz ve sistemler şunlardır:

Sensör cihazı olarak tüm ölçümlerin alındığı cihaz olan PalmSens potansiyostat (The Netherlands), çalışma elektrodu olan altın elektrot (1,6 mm çaplı), referans elektrot olan Ag/AgCl (iç çözeltisi 3 M KCl içeren), karşıt elektrot olan platin tel (Basi Bioanalytical System Inc., USA)'den temin edildi. Polimerik nanomalzemenin sentezlenmesinde kullanılan çalkalamalı su banyosu (Mammert, Wise Bath), polimerik nanomalzemenin hazırlanma aşamasında kullanılan ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Wisd Laboratory Instrument) ve çoklu manyetik karıştırıcı (Wisd Laboratory Instrument), sentezlendikten sonra polimerik nanomalzemelerin yıkama işlemleri için mikrosantrifüj (Eppendorf Mini Spin Plus), kurutma işlemleri için etüv Hereaus (Function Line), hazırlanan çözeltilerin tam dağılmasını sağlamak için vorteks (Dragon Lab MX-F), tamponların hazırlanma işlemleri için pH metre Neomet İSTEK (pH 240-L), tartım işlemleri için 0,1 mg duyarlı terazi (Kern ABS), çalışma öncesi polimeri homojen olarak dağıtmak için sonik banyo

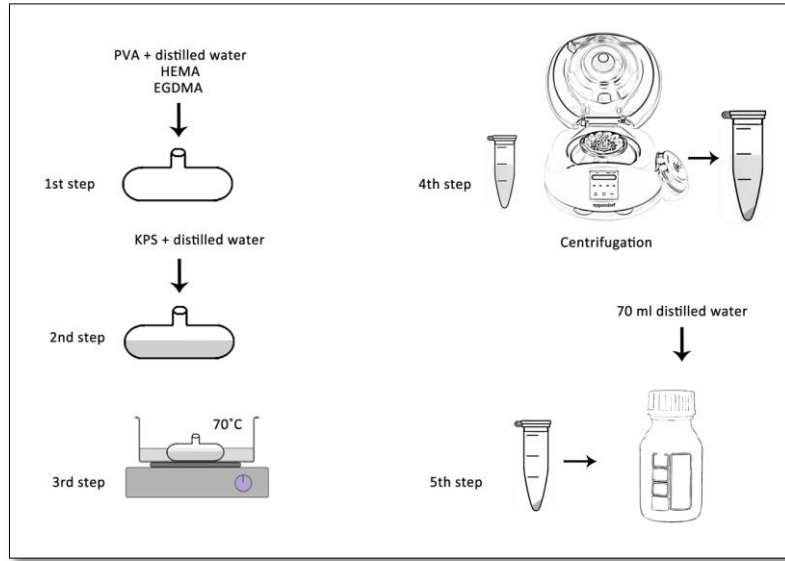
(Bandelin Sonorex RK255H), aktivasyon aşamasında elektrotla aktivasyon ajanlarının temas ederek karışması amacıyla çalkalayıcı (IKA KS 125 Basic) kullanıldı.

Sentezlenen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskobu SEM Jeol JSM 7600 F (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi) kullanıldı. Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer 100 FTIR, E. Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü) ve Zeta boyut ölçüm cihazı (Malvern Instruments Nanoseries Zeta Sizer) Ege Üniversitesi ARGEFAR İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi) kullanıldı. Elementel analiz amacıyla CHNS-932 (LECO) Elementel Analiz cihazı (Malatya İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi) kullanıldı.

3.2. Metot

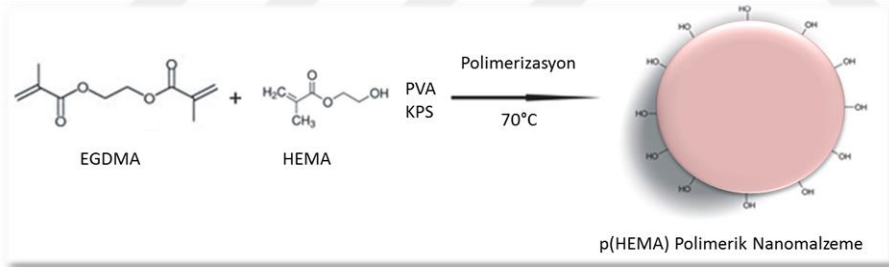
3.2.1. p(HEMA) polimerik nanomalzemenin sentezlenmesi

p(HEMA) polimerik nanomalzeme, sürfaktansız emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanılarak sentezlendi. Şekil 3.2’de gösterildiği üzere p(HEMA) polimerik nanomalzemenin sentezlenmesi amacıyla yassı balon tipli özel üretim cam reaktör kullanıldı. Polimerik nanomalzemenin hazırlanması için stabilizatör olarak



Şekil 3. 2. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentez basamaklarının şematik gösterimi

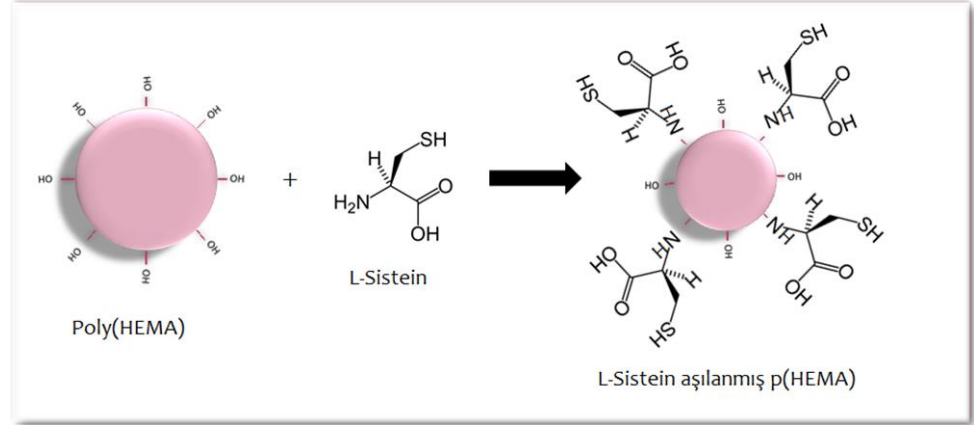
0,275 gram polivinil alkol (PVA, d:1,269 g/mL) alınarak 25 mL saf suda ısıtıcıli karıştırıcı yardımıyla ısıtılarak çözüldü. Reaktöre, hazırlanan PVA çözeltisinden alınarak üzerine 0,6 mL 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA, d:1,074 g/mL) monomeri ve 0,3 mL etilenglikoldimetakrilat (EGDMA, d:1,051 g/mL) çapraz bağlayıcısı ilave edildi ve 30 saniye mekanik olarak çalkalandı. Potasyum persülfattan (KPS) 0,0198 gram tartılarak 45 mL saf suda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak çözüldü ve reaktöre ilave edildi. Azot gazından geçirilerek reaktör 70°C'deki çalkalamalı su banyosunda 100 rpm'lik bir hızda doğrusal yönde çalkalandı ve 1 saat sonunda polimerizasyonun gerçekleştiği renk takibi ile gözlemlendi. Reaktör dış kısmından çeşme suyu ile soğutulduktan sonra p(HEMA) polimerik nanomalzeme 14100 g'de 20 dakika süreyle santrifüjlenerek çöktürüldü. Çöken polimerik nanomalzeme etanol (% 99,8) ve distile su ile yıkanarak polimerizasyona katılmayan maddelerden arındırıldı. Yıkama işleminin ardından p(HEMA) polimerik nanomalzeme etüvde 37°C'de kurutularak aşılama prosesi için buzdolabında + 4°C'de saklandı (Türkcan, Akgöl ve Denizli, 2013). **Şekil 3.3**'te polimerik nanomalzemenin sentezlenme aşaması ve sonrasında elde edileceği düşünülen yapısı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3. 3. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentezlendiğindeki görüntüsü ve sentezinin şematik gösterimi

3.2.2. p(HEMA) polimerik nanomalzemesine L-Cys amino asidinin aşılama ile modifikasyonu

Aşılama prosesinde kullanılmak üzere etüvde kurutulan polimerik nanomalzeme hassas terazide tartılarak 20 g p(HEMA) bir reaktöre alındı ve üzerine katalizör olarak 1,4 g NaH ve 50 cm³ tetrahidrofuranda çözülmüş 3 g L-Cys bulunan karışım içerisine ilave edildi. Aşılama tepkimesi 24 saat süre boyunca 40°C'de bu karışım karıştırılarak gerçekleştirildi (Akgöl vd., 2001). **Şekil 3. 4** 'te aşılama prosesi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3. 4. p(HEMA) polimerik nanomalzemesine L-Sistein aşılama prosesinin şematik gösterimi

24 saatin sonunda karışım alınarak 14100 g'de santrifüjlendi. Aşılama prosesinden kalan kimyasal kirliliği gidermek amacıyla etanol (% 99,8) ve distile su ile yıkandı. Yıkama amacıyla ependorf içerisinde polimerik nanomalzeme üzerine bir miktar etanol veya distile su eklendikten sonra ultrasonik banyo yardımıyla nanomalzemenin tam dağılması sağlanarak tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve santrifüj sonrası üst faz atılarak sıradaki yıkama işlemi bir önceki yıkama işleminde etanol kullanıldıysa distile su ile yapıldı. Yıkama işlemleri bittiği zaman Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi daha sonra istenilen konsantrasyonda hazırlanabilmesi amacıyla etüvde 37 °C'de kurutularak buzdolabında kuru olarak 4°C'de saklandı (Dişbudak vd., 2002).

3.2.3. p(HEMA) ve Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemelerinin karakterizasyonları

Polimerik nanomalzemelerin karakterizasyonunu yapmak amacıyla FTIR, Zeta-Size, SEM ve Elementel Analiz cihazları kullanıldı. Bunlara ilave olarak spesifik yüzey alanı hesaplamaları yapıldı. Polimerik nanomalzemelerin kimyasal kompozisyonu hakkında yorum yapabilmek amacıyla FTIR analizi, boyutunu belirlemek amacıyla Zeta-Size analizi, morfolojik görüntülerini elde etmek amacıyla SEM analizi ve L-Sistein amino asidinin p(HEMA) polimerik nanomalzemesine katılıp katılmadığını belirlemek amacıyla elementel analiz gerçekleştirildi (Öztürk, Akgöl ve Denizli, 2008).

p(HEMA) ve Cys-graft-p(HEMA) polimerik Nanomalzemelerinin Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektroskopisi (FTIR) ile Yapı Analizi

Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisinde analiz yapabilmek amacıyla p(HEMA) ve Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemeleri kuru formda kullanılarak KBr ile karıştırılmaktadırlar. Her iki polimerik nanomalzemenin ayrı ayrı analizleri gerçekleştirildi ki aralarında farklı olan L-Sistein amino asidinin Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinde varlığı belirlenebilsin. Cihaz üzerinde bulunan kuru yüzeye, hazırlanan polimerik nanomalzemeler yerleştirilerek FTIR cihazında analizleri gerçekleştirildi ve bağ yapıları hakkında fikir yürütülerek yapıya aşılama prosesi ile katıldığı düşünülen L-Sistein amino asidinin gerçekten yapıya katılıp katılmadığı yorumlandı (Öztürk vd., 2008).

Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesinin Zeta-Size ile Partikül Boyutunun Belirlenmesi

Sümfaktansız emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlendikten sonra boyut analizini yapmak amacıyla Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi distile su içerisinde seyreltilerek ultra sonik banyoda tamamen dağıtıldı. Şekil 3.5 'te dağıtma işleminden sonra polimerik nanomalzemenin tüpteki görüntüsü ve ölçüm işleminde kullanılan Zeta-Size cihazı görülmektedir.

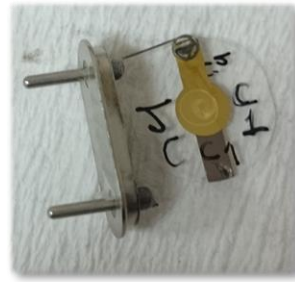


Şekil 3. 5. Zeta-Size analizi için hazırlanan örneğin görüntüsü ve Zeta-Size Cihazı

Bunun yapılmasının nedeni ise agregat oluşturarak polimerik nanomalzemelerin sahip olduğundan daha büyük boyutlarda sonuç elde edilmemesidir. Homojen bir şekilde dağıtılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin AR-GEFAR İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi'nde Zeta-Size (Malvern Instruments Nanoseries Zeta Sizer) cihazı kullanılarak boyut analizi gerçekleştirildi (Karakoc vd., 2009)

Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemenin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Görüntülenmesi

Kuru formda buzdolabında 4°C'de saklanan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinden bir miktar seyreltik süspansiyon hazırlanarak ultrasonik banyo yardımıyla homojen bir şekilde dağıtılması sağlandı. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinden 10 µL alınarak önceden hazırlanan kesilmiş lam üzerine damlatılarak etüvde 1 gün boyunca 37°C'de kuruması sağlandı. Aynı prosedür Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın yüzey üzerindeki görüntülerinin de elde edilmesi amacıyla altın yüzey üzerinde de kurutularak tekrarlandı. Örnek hazırlama işlemi literatürdeki hazırlama yöntemi ufak modifikasyonlarla değiştirilerek uygulandı. **Şekil 3.6'**da Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın yüzeye damlatıldıktan sonra analize götürmeden önceki hali görülmektedir.



Şekil 3. 6. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın yüzeyde görüntüsünü elde etmek amacıyla yapılan hazırlık sonucu örneğin görüntüsü

Örnekler Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Taramalı Elektron Mikroskobu SEM (Jeol JSM 7600 F) kullanılarak gerçekleştirildi. Polimerik malzemenin yalıtkan karakteri göz önünde bulundurularak iletkenliği arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapı-

olarak görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda farklı büyütme oranlarında polimerik nanomalzemelerin 25 ve 100000 büyütme oranlarında elde edilen görüntüleri ışığında Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sahip olduğu morfolojik özellikleri ve partikül boyutu belirlenerek elektrot yüzeyinde kullanılabilirlik açısından değerlendirildi (Çakmak, Gümüşderelioğlu ve Denizli, 2009).

Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemenin Elementel Analiz ile İncelenmesi

Kuru haliyle buzdolabında 4°C’de muhafaza edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinden bir miktar ependorf içerisine alınarak ağzı sıkıca parafilmle kapatıldıktan sonra kargo ile Malatya İnönü Üniversitesi Bilimsel ve teknolojik Araştırma Merkezi’ne gönderildi. Elementel analizde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin içerdiği karbon, hidrojen ve kükürt atomlarının oksijenle yakıldıktan sonra miktarlarının toplam madde miktarına oranı belirlenmektedir. Bu analiz yönteminde 1,227 mg Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinden kullanıldı ve analiz sonucundaki bilgiler ışığında polimerik nanomalzemenin içerdiği L-Sistein’in gram nanomalzeme başına mmol olarak miktarı hesaplandı (Yavuz vd., 2007).

Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemenin Spesifik Yüzey Alanı Hesaplamaları

Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin spesifik yüzey alanı hesaplamaları için karakterizasyonlar sonucu elde edilen boyut verileri de kullanılarak teorik olarak polimerik nanomalzemenin spesifik yüzey alanı hesaplamaları aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı.

Yüzey alanı(m²/g) = N.YA/gram polimer (Kuru kütle)

$$N = 6 \times 10^{10} \times S / \pi \times \rho_s \times d^3$$

N: 1 mL süspansiyondaki partikül sayısı

YA: Kürenin yüzey alanı (4.π.r²)

Gram polimer mL’deki polimerin gram cinsinden miktarıdır.

r = Partikülün yarıçapı

S = 10 (yüzde katı miktarı)

p_s = Polimerin yoğunluğu (mL'deki polimer tartılarak hesaplanır)

d = Partikül çapı (mikrometre)

π = 3,14

3.2.4. Diferansiyel puls voltametri (dpv), döngüsel voltametri (cv) yöntemlerinde kullanılan ferri-ferro çözeltisinin hazırlanışı ve çalışma elektrodu temizlik aşamaları

Kanser erken teşhisi için elektrokimyasal immunosensör geliştirilmesi amacıyla yapılan bu tez çalışmasında elektrokimyasal yöntem olarak diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) yöntemleri kullanıldı. Kullanılan bu yöntemlerin uygulama işlemi sırasında kullanılan düzenek aşağıda **Şekil 3.6**'da gösterilmektedir. Uygulanan yöntemlerde elektrokimyasal tayin amacıyla ferri-ferro çözeltisi hazırlandı. Denemelere başlamadan önce ve her deneme sonunda elektrotlar temizlik prosedürü ile temizlendi. **Şekil 3.7**'de ölçümler sırasında kullanılan ölçüm düzeneği ve elektrotların duruşu görülmektedir.



Şekil 3. 7. Ölçümler esnasında kullanılan ölçüm düzeneği

Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Diferansiyel puls voltametrisinde 3 elektrotlu sistemde referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu, yardımcı elektrot olarak platin tel, çalışma elektrodu olarak altın elektrot kullanıldı. Ölçümler -0,4 ile 0,8 volt potansiyel aralığında, saniyede 0,05 volt uygulama hızında gerçekleştirildi. Yöntemi geliştirmek için literatürde verilen ölçüm aralığı modifiye edildi. Çalışmalarda her işlem öncesi elektrotun temiz olduğunu anlamak için ölçüm alınarak çalışmalara başlandı. Elektrotlarda herhangi bir kirlilik söz konusu ise elektrotlar temizlenerek ve temiz olduğundan emin oluncaya kadar denemeler başlatılmadı (Tang, Yuan and Chai, 2006; Fu, 2007). Yapılan tüm diferansiyel puls voltametri ölçümleri manuel olarak 3 tekrarlı alındı. **Şekil 3.8**'de diferansiyel puls voltametrisinde ölçümlerin gerçekleştirildiği ölçüm kriterleri yer almaktadır.

Differential Pulse settings		
t equilibration	3	s
E begin	-0.4	V
E end	0.8	V
E step	0.01	V
E pulse	0.001	V
t pulse	0.1	s
Scan rate	0.05	V/s

Şekil 3. 8. Diferansiyel puls voltametri ölçüm bilgileri

Döngüsel Voltametri (CV)

Döngüsel voltametri yönteminde yine aynı şekilde 3 elektrotlu sistem kullanılarak aynı potansiyel aralığı olan -0,4 ile 0,8 volt potansiyel aralığında saniyede 0,05 volt uygulayacak şekilde 3 döngü alınarak ölçüm yöntemi gerçekleştirildi. Döngüsel voltametri metodu sonucunda elde edilen voltammogramlar ile yüzey hakkında fikir elde edildi (Tang, Yuan and Chai, 2006; Fu, 2007). **Şekil 3.9**'da döngüsel voltametride kullanılan ölçüm kriterleri yer almaktadır. Yapılan tüm döngüsel voltametri ölçümleri 3 tekrarlı olacak şekilde alındı.

Cyclic Voltammetry settings		
t equilibration	3	s
E begin	-0.4	V
E vertex1	-0.4	V
E vertex2	0.8	V
E step	0.01	V
Scan rate	0.05	V/s
Number of scans	3	

Şekil 3. 9. Döngüsel voltametri ölçüm bilgileri

Ferri-Ferro Çözeltisinin Hazırlanışı

Tüm çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanan ferri-ferro çözeltisinin kullanılma amacı çözelti içerisinde yer alan demirin indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonundan faydalanarak yüzeyin doluluğu hakkında bilgi edinmektir. Yüze-ye polimerik nanomalzeme bağlanma aşamalarıyla başlayarak bağlanan madde miktarı arttıkça çözelti içerisindeki demirin elektrotun iletken kısmına ulaşması zorlaşmaktadır. Bu prensip ışığında yüzeydeki bağlanma miktarları azalan iletkenliğe bağlı olarak azalan sinyal miktarından hesaplanabilmektedir.

Ferri ferro çözeltisini hazırlarken kullanılan potasyum heksosiyanoferrat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ ve potasyum heksosiyanoferrat (II) trihidrat $K_4[Fe(CN)_6]$ ışıktan etkilendiği için çözelti amberli şişeye aktarılanaya kadar karanlık ortamda gerçekleştirilmektedir. 745 mg KCl (0,1 M), 680,5 mg KH_2PO_4 tartıldıktan sonra 211,2 mg $K_4[Fe(CN)_6]$, 165 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) hassas terazi yardımıyla tartılarak 100 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. Ardından amberli şişe içerisinde dış kısmı alüminyum folyo ile kaplanarak oda sıcaklığında saklandı. Ölçümler esnasında kullanılan hücrenin dış kısmı alüminyum folyo ile kaplanarak çözeltinin mümkün olduğu kadar ışıktan korunması sağlandı. Çözelti ölçümler sırasında ışıktan etkilendiği için sıklıkla yenilendi ve taze olan çözelti ile ölçümler gerçekleştirildi (Fu, 2007).

Çalışma Elektrodu (Altın Elektrot) Temizlik Aşamaları

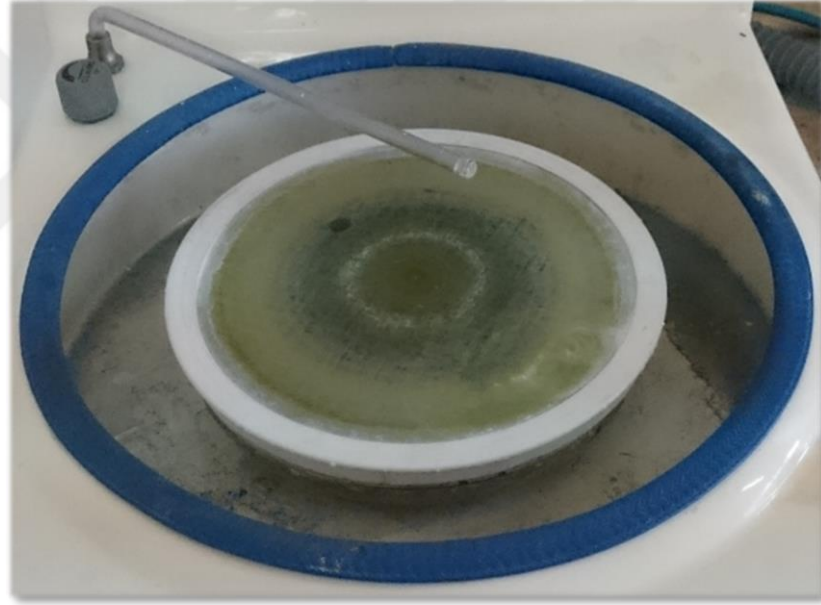
Çalışma elektrodunu iyi temizlemek aslında bir çalışmanın en önemli basamaklarından bir tanesidir. Çünkü iyi temizlenmeyen bir elektrot yüzeyindeki kirlilik sebebinin neden kaynaklandığı bilinemeyeceği için deneme sürecinde uygulanan tüm işlem basamaklarında kirlilik girişim etkisi gösterebilir, elektrot yüzeyine eklenen herhangi bir kimyasal ile tepkimeye neden olabilir. O nedenle bir denemeye başlamadan önce elektrodun temiz olduğundan emin olmak oldukça önemlidir.

Elektrot temizliği amacıyla uygulanan birkaç aşama vardır. Bunların kolay ve pratik olanları uygulanarak elektrot yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edildikten sonra eğer ihtiyaç görülürse diğer temizlik aşamalarına geçilmektedir. Bu şekilde aşamalarla temizlik prosedürü açıklanırsa;

1. Aşama: Alümina ile keçe yüzeyinde uygulanan temizlik prosedürünü kapsamaktadır. Keçe üzerine bir miktar alümina eklenerek elektrot yüzeyi alümina ile temas ettirilerek dairesel hareketlerle birkaç dakika olacak şekilde keçe yüzeyine sürtülerek fiziksel olarak temizlenmektedir. **Şekil 3.10**'da ise alümina keçe ile yapılan temizlik düzeneği görülmektedir. İşlem sonrasında alınan DPV ve CV ölçümleri sonucunda temiz elektrot sinyaline göre sinyalde bir azalma meydana gelmiş ise işlem tekrarlanabilir veya diğer temizlik aşamasına geçilir (Fu, 2007; Songurtekin vd., 2013). Mekanik olarak temizleme yapan bazı cihazlar da bulunmaktadır. Aşağıda **Şekil 3.11**'de mekanik olarak temizleme yapan cihaz görülmektedir. Cihazın orta kısmında yer alan diskin üst kısmındaki çubuğa tutturulan elektrot disk gibi dönerek yüzeye temas etmekte ve temizleme işleminin gerçekleşmesi sağlanmaktadır.



Şekil 3. 10. Keçe üzerinde alümina ile yapılan temizlik işlemi



Şekil 3. 11. Mekanik temizlik için kullanılan alternatif bir cihaz

2. Aşama: Çalışma elektrodu 1:1 etanol su içeren karışım içerisine daldırılarak ultrasonik banyo içerisinde 10 dakika bekletilir. Bazen bu sürenin yeterli gelmediği düşünülürse bekletme süresi uzatılabilir. Alınan ölçümler neticesinde elektrot temizliği hala gerçekleşmemişse 3. Aşamaya geçilerek daha farklı bir yöntemle elektrot temizlenir (Songurtekin vd., 2013). Şekil 3.12’de ultrasonik banyo kullanılarak yapılan temizlik işlemi esnasında kullanılan düzenek görülmektedir.



Şekil 3. 12. Ultrasonik banyoda yapılan temizlik işlemi

3. Aşama: 0,5 M sülfürik asit (H_2SO_4) çözeltisi içerisinde 0 volt ile 1,5 volt arasında potansiyel uygulanarak döngüsel voltametri yöntemi ile yüzeydeki kirlilik kimyasal bir müdahale ile giderilmektedir. Sık aralıklarla işlem tekrarlanırsa yüzeyde aşınmalar meydana gelebilmektedir. O nedenle sülfürik asit ile temizleme aşamasına gelmeden elektrotları temizleyebilmek oldukça önemlidir (Fischer et al., 2009). Şekil 3.13'te sülfürik asit ile yapılan temizleme işlemi sırasında kullanılan ölçüm kriterleri bulunmaktadır.

Cyclic Voltammetry settings		
t equilibration	3	s
E begin	0.0	V
E vertex1	0.0	V
E vertex2	1.5	V
E step	0.01	V
Scan rate	0.05	V/s
Number of scans	15	

Şekil 3. 13. Döngüsel voltametri ile sülfürik asit temizliğinde kullanılan ölçüm bilgileri

4. Aşama: Tüm yapılan işlemlere rağmen elektrot yüzeyinde hala kirlilik varsa aşındırma yöntemi ile pirana çözeltisi kullanılarak temizlik yapılmaktadır.

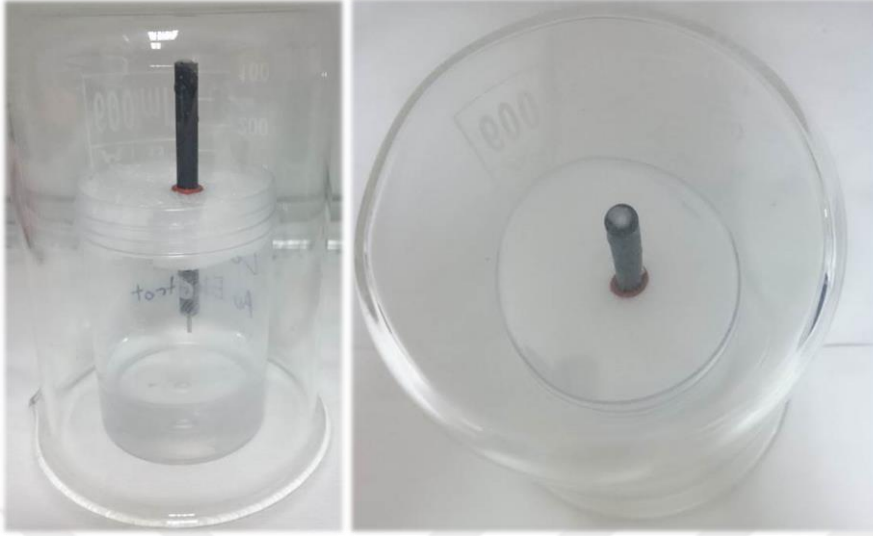
Pirana çözültisi % 70 sülfirik asit ve %30 hidrojen peroksitten (H_2O_2) oluşmaktadır. Çok kuvvetli aşındırıcı özelliği olan bu çözelti içerisinde elektrot birkaç saniye daldırılarak çıkarılmaktadır. Bu işlem birkaç kez tekrarlanır. Çok tercih edilmemesinde fayda vardır, yüzeyde de aşınmalara neden olabilmektedir (Fischer et al., 2009).

3.2.5. CA 125 tayini amacıyla sensör sistemi kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyonlar

Optimizasyonlar sırasında yapılan ölçümler tek elektrot ile çalışılan dönemlerde minimum 3 tekrarlı, çift elektrot ile çalışıldığı dönemlerde ise minimum çift tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Tayin aralığının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda ve tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise 10 tekrara kadar çalışmalar bol tekrarlı gerçekleştirildi.

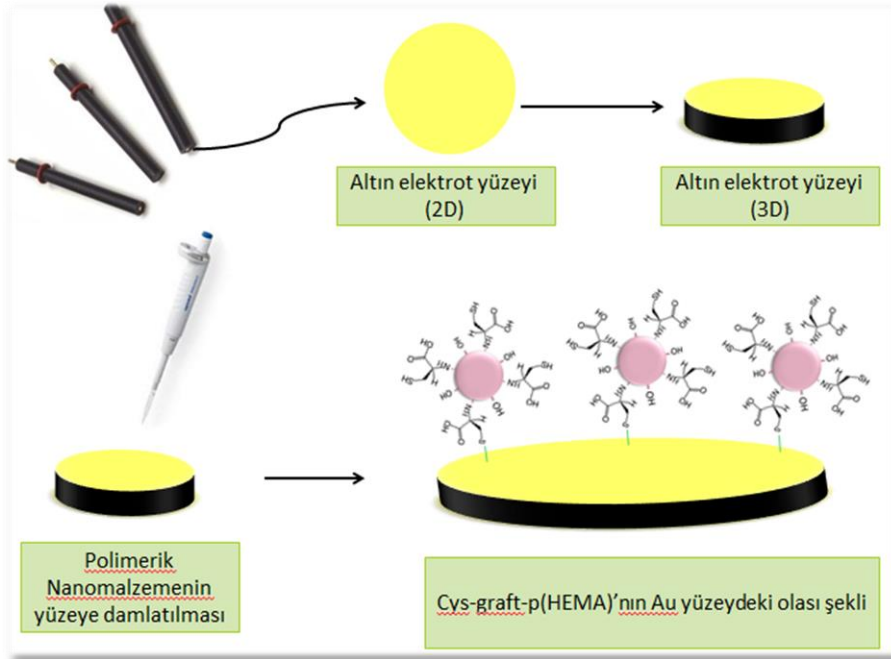
Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın elektrot yüzeyine bağlanma süresinin optimizasyonu

Sentezlenen ve karakterizasyonları yapılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine bağlanma koşullarının optimizasyonu amacıyla süspansiyon haline getirilen 40 mg/mL derişimdeki polimerik nanomalzeme ultrasonik banyoda homojen bir şekilde dağıtılırken altın elektrotların temizlik işlemi sonrasında boş formlarının diferansiyel puls voltametri ve döngüsel voltametri yöntemleri kullanılarak ölçümleri alındı (Yang et al., 2001). Homojen şekilde dağıtılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi 5 μ L hacminde olacak şekilde elektrot yüzeyine damlatıldı ve oda sıcaklığında 30, 60, 90, 120 ve 360 dakika bekletildi. **Şekil 3.14**'te elektrot yüzeyine polimerik nanomalzeme damlatıldıktan sonraki görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 3. 14 Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatıldığı hali

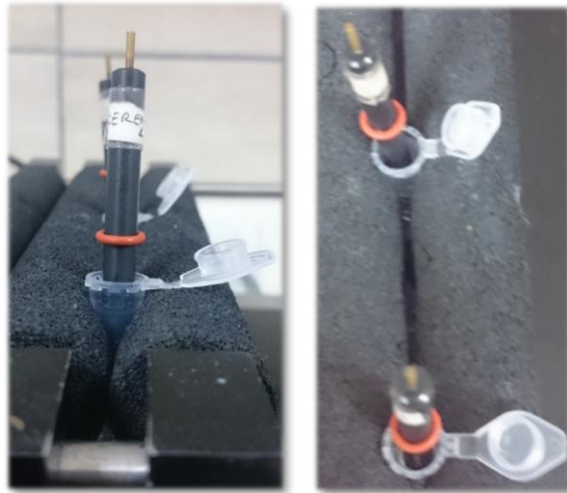
Bekleme süresinin sonucunda diferansiyel puls voltametri (DPV) ve dönüşel voltametri (CV) ile ölçümler yapılarak elektrot yüzeyinde meydana gelen değişimler sonucunda elde edilen voltammogramların pik akım yükseklikleri belirlenerek hesaplamalar yapıldı. Şekil 3.15'te elektrot yüzeyine yapılan işlemlerin şematik olarak gösterimi yer almaktadır.



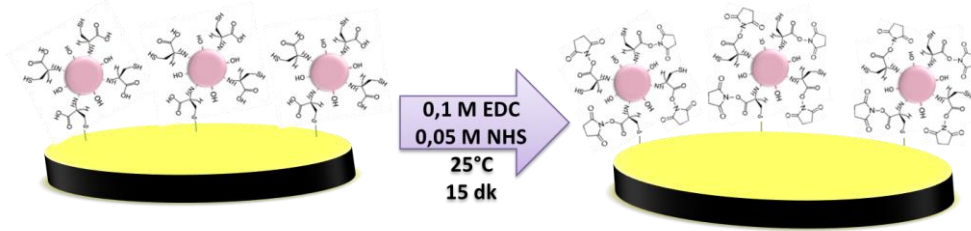
Şekil 3. 15. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyindeki şeklinin şematik gösterimi

Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesinde Bulunan Karboksil (-COOH) gruplarının EDC/NHS ile Aktivasyonu

Elektrot yüzeyine optimum sürede bağlanan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin bağlanmasından sonra polimerik malzemeye CA 125 antikorunun bağlanma koşullarını optimize etmeden önce polimer yüzeyinde bulunan karboksil (-COOH) gruplarının aktivasyonu amacıyla EDC (1-etil-3-(3-dimetil amino propil)-karbodiimid), NHS (N-Hidroksisüksinimid) ile yüzey aktive edildi. Bu amaçla 9,6 mg EDC (0,1 M) hassas terazide tartılarak bir ependorf içerisinde aktarıldı ve ardından 2,9 mg NHS (0,05 M) hassas terazide tartılarak EDC'nin aktarıldığı ependorfa eklendi. EDC ve NHS'nin bulunduğu ependorf içerisine 10 mM pH 6 MES tamponundan 500 µL eklenerek vorteks yardımıyla kimyasalların tamamen çözülmesi sağlandı. Bu işlem sonucunda ependorf içerisine elektrot daldırılarak çalkalayıcıda 15 dakika oda sıcaklığında 500 rpm'de çalkalandı (Akın, vd., 2012). Aktivasyon işlemi olarak anlatılan prosedür uygulanan her deneme sırasında polimerik nanomalzeme elektrot yüzeyine bağlandıktan sonra uygulanarak CA 125 antikorunun polimerik nanomalzemeye kovalent bağlanması sağlandı. **Şekil 3.16**'da yüzey aktivasyonu amacıyla yapılan işlemin uygulama sırasındaki hali gösterilmektedir. **Şekil 3.17**'de ise uygulama sonrasında polimerik nanomalzeme yüzeyinde meydana gelen değişiklikler şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.16. Aktivasyon amacıyla yapılan işlemin uygulanma aşaması

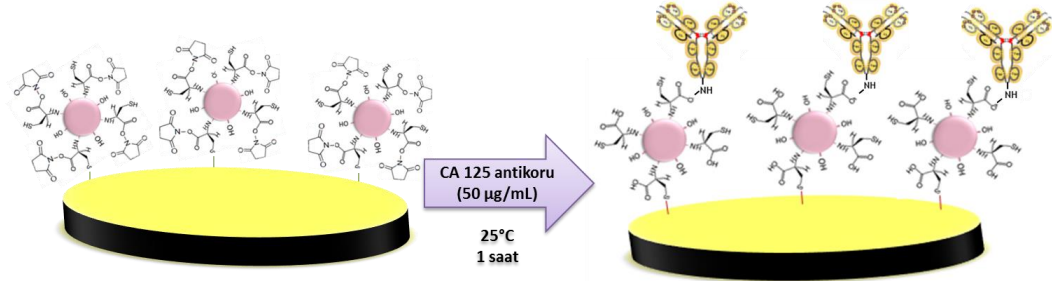


Şekil 3. 17. EDC/NHS ile aktivasyon sonrası elektrot yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin kimyasal yapısının şematik gösterimi

CA 125 Antikorumun Elektrot Yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesine Bağlanma Süresinin Optimizasyonu

CA 125 antikorumun bağlanma süresini optimizasyonu amacıyla her deneme öncesinde ve sonrasında alümina ile elektrot temizliği yapıldı ve boş elektrotun diferansiyel puls voltametri (DPV) ve Döngüsel voltametri (CV) ile ölçümleri alındı. CA 125 antikorumun bağlanma süresini optimize etmek için denemeye başlarken Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesini altın elektrot yüzeyine bağlamak için 40 mg/mL'lik polimerik malzeme ultrasonik banyoda homojen olacak şekilde dağıtıldıktan sonra elektrot yüzeyine 5 µL damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında optimum bağlanma süresi olan 2 saat süreyle bekletildi (Li et al., 2007). Bekleme süresinin ardından ferri-ferro çözeltisi içerisinde 3 elektrotlu sistem kullanılarak diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümleri alındı. Polimerik nanomalzemenin elektrot yüzeyine bağlandığı belirlendikten sonra yüzeyi aktive etmek için 9,6 mg EDC ve 2,9 mg NHS tartılarak 10 mM pH 6 MES tamponu içerisinde vorteks yardımıyla çözüldü ve elektrot ependorf içerisine daldırılarak oda sıcaklığında 15 dakika çalkalayıcı yardımıyla aktivasyon ajanları ile muamele etmesi sağlandı. İşlem sonunda elektrot yüzeyleri ultra saf su ile yıkandıktan sonra CA 125 antikorumdan (50 µg/mL) 10 µL elektrot yüzeyine damlatılarak oda sıcaklığında 30, 60, 90 ve 120 dakika gibi farklı sürelerde CA 125 antikoru elektrot yüzeyine bağlanan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile muamele edildi. İşlem sürelerinin ardından diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındı. Elde edilen voltammogramlar kullanılarak pik akım yükseklikleri belirlenerek

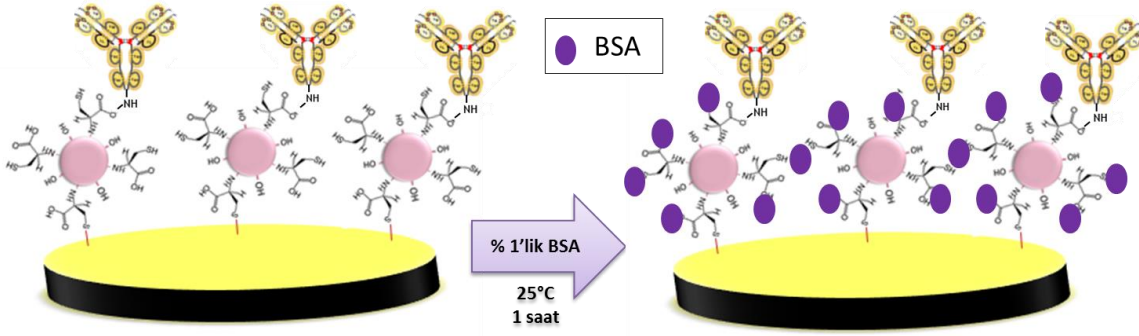
hesaplamalar yapıldı. **Şekil 3.18**'de polimerik nanomalzeme CA 125 antikoru-
nun bağlanmasının şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 3. 18. CA 125 antikorusunun Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesine bağlan-
dıktan sonra elektrot yüzeyinde tahmini yapısının şematik gösterimi

BSA Bloklama Yöntemi ile Non-Spesifik Etkileşimlerin Giderilmesi

CA 125 antikor bağlanma süresinin optimize edilmesinin ardından antijen ile ilgili optimizasyonları yapmadan önce işlem prosedürüne bloklama işlemi dahil edildi. Elektrot yüzeyine uygulanan işlemler sonucunda reaksiyona girmeden kalan kimyasal grupların CA 125 ile etkileşimlerini (non-spesifik etkileşim sonucu oluşan sinyalin etkisini) ortadan kaldırmak için BSA (Sığır serum albümin) ile bloklama yapılarak sadece CA 125 antijeni ile etkileşecek olan CA 125 antikorusunun aktif bölgelerinin açıkta kalması amaçlandı. Bu sayede CA 125, CA 125 antikorusunda kendisi için bağlanma bölgeleri olan bölgelere bağlanarak spesifik bir etkileşimle tayin edilebilmektedir. BSA ile bloklama amacıyla % 1'lik BSA çözeltisi 0,1 M pH 7,4 Fosfat tamponu içerisinde çözülerek işlem için önceden hazırlandı ve buzdolabında 4°C'de saklandı. Denemeler sırasında CA 125 antikoru ile yüzey etkileşimi yapıldıktan ve ölçümler tamamlandıktan sonra altın elektrot yüzeyi ultra saf su ile yıkandıktan sonra %1'lik BSA çözeltisi 10 µL olarak elektrot yüzeyine damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildi (Jia et al., 2012). Bekleme süresinin ardından diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındı ve pik akım yükseklikleri belirlendi (Das and Kelley, 2011; Suwansa-ard et al., 2009). **Şekil 3.19**'da bloklama işleminin yapılışı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3. 19. BSA ile bloklama sonrasında elektrot yüzeyinde polimerik nanomalzemenin ve moleküllerin şematik gösterimi

CA 125'in Etkileşim Süresinin Optimizasyonu

Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentezlenip karakterizasyonu yapıldıktan sonra gerçekleştirilen optimizasyon denemeleri sonucu elde edilen işlem sıralaması basamaklarla gösterilirse;

1. Elektrot temizliği (Alümina ile 15-30 dk)
2. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatılması (40 mg/mL, 5 µL, 25 °C, 2 saat)
3. Yüzeyin aktive edilmesi (EDC ve NHS) (25 °C, 15 dk)
4. CA 125 antikorunun damlatılması (50 µg/mL, 10 µL, 25 °C, 1 saat)
5. BSA ile bloklama (%1'lik, 25 °C, 1 saat)

Her deneme öncesinde bu işlem basamakları tekrarlandı ve CA 125 bağlanma süresinin optimizasyonu amacıyla BSA ile bloklama işlemi yapıldıktan sonra diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçüm alındıktan ve pik akım yükseklikleri belirlendikten sonra elektrot yüzeyi ultra saf su ile yıkandı (Jia et al., 2012; Yang et al., 2001; Akın, vd., 2012). Elektrot yüzeyine 50 U/mL CA 125'ten 5 µL damlatıldıktan sonra 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin sonunda diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındı ve pik akım yükseklikleri belirlenerek hesaplamalar ile optimum bağlanma süresi belirlendi.

CA 125 Tayin Miktarının Optimizasyonu

CA 125 tayin miktarını optimize etmek için tez çalışmasının başından itibaren optimize edilen diğer parametreler sonucu elde edilen işlem prosedürü basamaklarla gösterilecek olursa;

1. Elektrot temizliği (Alümina ile 15-30 dk)
2. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatılması (4,55 mg/mL, 5 µL, 25 °C, 2 saat)
3. Yüzeyin aktive edilmesi (EDC ve NHS) (25 °C, 15 dk)
4. CA 125 antikorunun damlatılması (50 µg/mL, 10 µL, 25 °C, 1 saat)
5. BSA ile bloklama (%1'lik, 25 °C, 1 saat)
6. CA 125 (5 µL, 25 °C)

CA 125 tayin miktarının optimizasyonu amacıyla yukarıda belirtilen işlem basamakları her deneme öncesinde gerçekleştirildikten sonra diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alınarak pik akım yükseklikleri belirlendi (Jia et al., 2012; Yang et al., 2001; Akın, vd., 2012). Bu işlem sonrasında elektrot yüzeyine CA 125'ten 5 µL damlatılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Denemede optimizasyon amacıyla kullanılan CA 125 konsantrasyonları 5, 10, 30, 60 100, 120, 150, 180, 250, 400 ve 1000 U/mL'dir. Belirtilen konsantrasyonlardaki CA 125 elektrot yüzeyine uygulandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek bağlanmayan antijenin yüzeyden uzaklaştırılması amacı ile ultra saf su ile yüzey yıkandı. Yıkama işleminin ardından diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alındı. Ölçümler sonucunda elde edilen voltammogramlar kullanılarak pik akım yükseklikleri belirlendi ve hesaplamalar yapıldı. Aşağıda **Şekil 3.20**'de denemeler öncesinde standart olarak kullanılan CA 125 örneklerini stok olarak hazırlanma aşaması görülmektedir.



Şekil 3. 10. Standardı oluşturmak için CA 125 stoklarının hazırlık aşamaları

3.2.6. Tekrarlanabilirlik

Tezde kullanılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin miktarı, etkileşim süresi, CA 125 antikorunun etkileşim süresi, CA 125 etkileşim süresi ve miktarı optimize edildi. Optimizasyon denemelerinin tamamlanmasıyla birlikte işlem basamakları şu şekildedir;

1. Elektrot temizliği (Alümina ile 15-30 dk)
2. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatılması (4,55 mg/mL, 5 μ L, 25 °C, 2 saat)
3. Yüzeyin aktive edilmesi (EDC ve NHS) (25 °C, 15 dk)
4. CA 125 antikorunun damlatılması (50 μ g/mL, 10 μ L, 25 °C, 1 saat)
5. BSA ile bloklama (%1'lik, 25 °C, 1 saat)
6. CA 125 (50 U/mL, 5 μ L, 25 °C, 10 dk)

Tekrarlanabilirlik denemelerini gerçekleştirmek amacıyla her deneme öncesinde yukarıda belirtilen prosedür uygulandıktan sonra diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alınarak pik akım yükseklikleri belirlendi ve hesaplamalar yapıldı (Jia et al., 2012; Yang et al., 2001; Akın, vd., 2012). CA 125 tayin aralığında elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak grafiğin denkleminde tekrarlanabilirlik denemeleri sonucunda elde edilen pik akım yükseklikleri antijen miktarı (U/mL) olarak hesaplandı.

3.2.7. Seçimlilik

Seçimlilik denemesinin yapılma amacı kanda bulunan diğer moleküllerin girişim etkisi ile sinyalde değişikliğe neden olup olmadığını araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada tayin edilmek istenen moleküle benzer yapıda olan veya girişim etkisinin en çok olabileceği moleküller tercih edilmektedir. Bu tez kapsamında tayin edilmeye çalışılan molekül olan CA 125 bir antijendir. Tayin işlemleri kan örneklerinde gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle seçimlilik denemesi amacıyla kanda bol miktarda bulunan bir molekül olan glukoz ve T-hücre tanınmasında kullanılan CD 5 (antijen olduğu için) tercih edildi, literatürde de seçimlilik denemesi için antijen tercih edilen çalışmalar yer almaktadır (Fu, 2007; Kaplan vd., 2001). Seçimlilik denemesi için rutin prosedür BSA bloklama basamağına kadar bire bir uygulandı. BSA bloklama aşamında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilen ECLIA testi için cihaz kalibrasyonunda kullanılan içerisinde CA 125 bulunmayan serum örneği ile bloklama yapıldı. Bloklamanın serum örneği ile yapılmasının amacı kanda girişim etkisi olabilecek tek maddenin BSA olmamasıdır. Kanda CA 125 haricinde birçok molekül bulunduğu için yöntemin tüm bu moleküllerin girişim etkisine karşı hazırlıklı olması gerekmektedir. Serum örneği içerisinde bulunan maddelerin yer aldığı tablo aşağıda **Çizelge 3.1**'de bulunmaktadır.

Çizelge 3. 1. Serum örneği içerisinde bulunan maddeler

Serumda bulunan Maddeler	Bulunduğu Miktar	Minimum	Maksimum	Birim
C4	18,5	15,5	21,5	mg/dL
Lipaz	49	43	55	U/L
LDH	164	144	184	U/L
Seruloplazmin	19,9	16,7	23,1	mg/dL
Alfa-1 Anti	100	84	116	mg/dL

Haptoglobin	86	72,2	99,8	mg/dL
Pankreatik A	40	36	44	U/L
Albümin	3,3	2,9	3,7	g/dL
ALT	51	45	57	U/L
AST	46	40	52	U/L
Üre	39	35	43	mg/dL
Total kolesterol	94	84	104	mg/dL
Total protein	5,1	4,7	5,5	g/dL
Transferin	203	179	227	mg/dL
Lamda Hafif Zin- cir	107	89	125	mg/dL
Fosfor	3,78	3,4	4,16	mg/dL
GGT	52	46	58	U/L
Glukoz	102	92	112	mg/dL
Amilaz	81	71	91	U/L
Kalsiyum	8,9	8,18	9,62	mg/dL
Laktik Asit	15,59	13,79	17,39	mg/dL
Kreatinin	1,11	0,97	1,25	mg/dL
Klorür	76,9	72,3	81,5	mEq/L
Potasyum	3,7	3,48	3,92	mEq/L
Sodyum	113	107	119	mEq/L

Magnezyum	2	1,84	2,16	mg/dL
Asid Fosfataz	24,5	20,5	28,5	U/L
Lityum	0,93	0,85	1,01	mEq/L
Demir	110	96	124	µg/dL
Trigliserid	104	94	114	mg/dL
Ürik asit	4,9	4,3	5,5	mg/dL
Total bilirubin	1,02	0,9	1,14	mg/dL
Direkt bilirubin	1,03	0,87	1,19	mg/dL
ALP (Alkalen Foz-fataz)	90	80	100	U/L
HDL	31	26	36	mg/dL
LDL	61	51	71	mg/dL
Pseudokolinesteraz	6020	5300	6740	U/L
Prealbümin	19,4	16,2	22,6	mg/dL
Kappa hafif zincir	191	161	221	mg/dL
Apolipoprotein-A1	110	92	128	mg/dL
Apolipoprotein-B	47	39	55	mg/dL
CK-MB	43,1	36,3	49,9	U/L
Ansature demir bağlama	219	189	249	µg/dL
CRP	0,79	0,69	0,89	mg/dL

CK	152	134	170	IU/L
Sensitif CRP	0,92	0,83	1,02	mg/dL
C3	102	86	118	mg/dL

Seçimlilik denemesi aşamasında serumla bloklama aşaması 10 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındıktan sonra pik akım yükseklikleri belirlendi ve seçimlilik denemesini gerçekleştirmek için elektrot yüzeyine %1'lik Glukoz ve bir diğer denemede % 1'lik CD 5 5 μ L olacak şekilde damlatıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındı ve pik akım yükseklikleri belirlendi. Bu işlem sonunda hesaplamalar yapıldı ve CA 125 yerine girişim etkisini belirlemek amacıyla CA 125 kalibrasyon grafiğinden U/mL olarak miktarları belirlendi.

3.2.7. Depo kararlılığı

Optimizasyon sonucu elde edilen sonuçlar ışığında aşağıda yer alan işlem basamakları sırasıyla uygulandı.

1. Elektrot temizliği (Alümina ile 15-30 dk)
2. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatılması (4,55 mg/mL, 5 μ L, 25 °C, 2 saat)
3. Yüzeyin aktive edilmesi (EDC ve NHS) (25 °C, 15 dk)
4. CA 125 antikorunun damlatılması (50 μ g/mL, 10 μ L, 25 °C, 1 saat)
5. BSA ile bloklama (%1'lik, 25 °C, 1 saat)

Bloklama işlemi sonrasında 0,1 M pH 7,4 Fosfat tamponu içerisinde hazırlanan elektrotlar 1 hafta ve 20 gün süre ile bekletilerek süre sonunda diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındı. Ölçüm sonuçlarına göre elektrot aktivitesinde herhangi bir düşme olup olmadığı önceki veriler ile kıyaslandı. Kıyaslamalar Daha önce elde edilen tayin miktarları üzerinden yüzde (%) kıyaslama olarak yapıldı. Denemeleri gerçekleştirmek amacıyla hazırlanan elektrotların bekleme koşulları **Şekil 3.21**'de görülmektedir.



Şekil 3. 21. Depo kararlılığı denemesi için elektrotların bekleme koşulları
(0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde, 7-20 gün)

Depo kararlılığı denemesinin sonlanmasının ardından yapılan ölçümler için kullanılan düzenek aşağıda **Şekil 3.22**'de gösterilmektedir.



Şekil 3. 32. Depo kararlılığı denemesinin ölçüm düzenegi

3.2.8. Gerçek antijen örnekleri ile denemeler

Gerçek antijen örneği olarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilen ECLIA testinde standart olarak kullanılan örnekler ile denemeler gerçekleştirildi. Denemedeki genel prosedür basamaklarıyla aşağıdaki gibidir;

1. Elektrot temizliği (Alümina ile 15-30 dk)
2. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine damlatılması (2,275 mg/mL, 5 µL, 25 °C, 2 saat)
3. Yüzeyin aktive edilmesi (EDC ve NHS) (25 °C, 15 dk)
4. CA 125 antikorunun damlatılması (50 µg/mL, 10 µL, 25 °C, 1 saat)
5. Serum örneği ile bloklama (25 °C, 1 saat)
6. Gerçek antijen örnekleri (30, 50, 70 U/mL, 5 µL, 25 °C, 10 dk)

İşlemler sonucunda ultra saf su kullanılarak elektrot yüzeyindeki etkileşime girmeyen antijen molekülleri uzaklaştırıldıktan sonra diferansiyel puls voltametri (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) ile ölçümler alındı ve pik akım yükseklikleri belirlendi. Hesaplamaları yapmak için CA 125 kalibrasyon grafiğinde yer alan denklemden faydalanarak örneklerin deneme sonucunda tayin edilen U/mL konsantrasyonları belirlendi.

3.2.8. Yöntem validasyonu

Validasyon terimi geçerli kılma anlamında olup geliştirilen bir metodun performans kriterlerinin değerlendirilerek uygunluğunun ve geçerliliğinin değerlendirildiği bir çalışma türüdür. Validasyon yapılmadan önce çalışmanın planlanması oldukça büyük önem teşkil etmektedir. Çalışmanın yapılma amacı, elde edilecek sonuçların kalitatif ve kantitatif olma değeri, metodun tayin etmesi gereken aralık, başka laboratuvarların sonuçları ile kıyaslama imkanı, çevresel koşullar ve finansal gereklilikler gibi parametrelerin değerlendirilerek çalışmaya o şekilde başlaması önemlidir. Validasyon amacıyla incelenmesi gereken parametreler; doğrusalık, gerçeklik, seçicilik, kesinlik, tayin limiti ve tespit limitidir (Yılmaz, 2013).

Doğrusallık

En az iki tekrarlı ölçüm olmak üzere minimum 3 farklı noktadan oluşan analit miktarına göre çizilen kalibrasyon eğrisine bağlı olarak elde edilen bir değerdir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi ile en alt nokta ile en üst nokta belirlenmektedir. Sonuçlar grafik olarak verilerek lineer regresyon katsayısı ve korelasyon katsayısı ile eğrinin doğrusal olup olmadığı belirlenmektedir. Korelasyon katsayısı belirlendikten sonra ANOVA tablosundan F değeri ile elde edilen hesapsal F değeri kıyaslanarak eğrinin doğrusallığı hakkında fikir elde edilmektedir (ISO 11095, 1996).

Tez çalışması kapsamında elde edilen tayin miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan deneme sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Hesaplamaları yapabilmek amacıyla çalışılan tüm konsantrasyonlar SPSS (15.0) programı ile yazıldı ve deneme sonucunda elde edilen sonuçlar da aynı şekilde yazıldı. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak gerçekte o konsantrasyona karşılık elde edilmesi gereken sinyal değerleri belirlendi.

$$S_1^2 = \frac{\sum(y-yt)^2}{N-2}$$

$$S_2^2 = \frac{\sum(a-b)^2}{NK-2}$$

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

yt= Grafiğin denkleminde elde edilen x değerine karşılık gelen varsayılan y değeri

N= Toplam ölçüm sayısı (10 konsantrasyon için 2 tekrardan toplam 20 ölçüm)

a=Ölçülen konsantrasyonun ilk tekrar değeri

b= Ölçülen konsantrasyonun ikinci tekrar değeri

K= Tekrar sayısı (Çalışmalar 2 tekrarlı yürütüldü)

Hesaplamalar sonucu elde edilen F değerinin ANOVA tablosunda belirtilen F değerinden küçük veya büyük olmasına göre doğrusallık terimi yorumlandı.

Tespit Limiti (LOD)

Tespit Limit (LOD) körün ve sıfırın dışında tespit edilebilen en düşük miktar olarak açıklanmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda çalışılması gereken durumlarda hesaplanması gereken bir değerdir (ISO/TS 13530, 2009). Hesaplamak için 3 farklı metot bulunmaktadır;

- Kör örneklerin sonuçları kullanılarak standart sapmaları üzerinden
- Metodun standart sapması üzerinden
- Gürültü üzerinden yapılabilmektedir (Yılmaz, 2013).

Tez çalışmasında literatürde de sıklıkla kullanılan gürültü üzerinden hesaplamalar yapıldı.

$$LOD = C/S/N \times 3$$

C= En düşük örneğin konsantrasyonu

S=Sinyal değeri

N= Gürültü değeri

Yukarıdaki hesaplama yöntemi kullanılarak hesaplamalar yapıldı ve tespit limiti olan LOD değeri belirlendi.

Tayin Limiti (LOQ)

Tayin limiti ölçülebilen en düşük analiz konsantrasyonunu ifade etmektedir. ISO/TS 13530'da belirtildiği üzere % 33 maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik katsayısı olan 3 katsayısı kullanılarak hesaplanmaktadır (ISO/TS 13530, 2009).

$$LOQ = LOD \times k$$

LOD = Tespit limiti

k= Maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik katsayısı

Doğruluk

Doğruluk parametresi iki farklı bileşenden oluşmaktadır ve bunlardan bir tanesi gerçeklik bir diğeri ise kesinliktir. Bir analiz sonucunun doğru olabilmesi için

gerçek ve kesin olması gerekmektedir. O nedenle öncelikle gerçeklik ve kesinlik parametrelerinin hesaplanması gerekmektedir (Yılmaz, 2013).

Gerçeklik

Gerçeklik testinin yapılabilmesi için gerçek değeri bilinen örnek ile tekrarlı ölçümler alınması gerekmektedir. Sertifikalı referans materyal kullanılarak referans materyalin yeni geliştirilen yöntem ile tekrarlı alınan ölçümleri arasındaki standart sapma hesabı ile t-testi uygulanır ve sonuç bu şekilde değerlendirilir (Yılmaz, 2013).

t-testine göre;

$$t = \frac{(X_{CRM} - X_{bulunan}) \sqrt{n}}{S}$$

X_{CRM} = Sertifikalı referans değer

$X_{bulunan}$ = Tekrarlanabilirlik koşulları altında yapılan tekrarlı ölçümlerin ortalaması

n = Tekrar sayısı

S = Standart sapma

Yukarıdaki veriler ışığında ölçüm verileri kullanılarak t değeri hesaplanır ve çıkan sonuç t-testi tablosundan 0,05 tkritik değeri ile karşılaştırılarak düzeltme gerekliliği değerlendirilir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik denemesinde referans değeri 50 U/mL olan CA 125 ile 5 tekrarlı denemeler gerçekleştirildi. Bu denemelerin sonuçları açıklanan t-testine göre değerlendirildi.

Kesinlik

Kesinlik değeri ölçüm sonuçlarını birbirine olan yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Kesinlik ölçümü iki ayrı parametre olan tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik olarak hesaplanabilmektedir. Tekrarlanabilirlik aynı laboratuvar, aynı ekipman ve aynı kişi tarafından yapılan ölçümleri kapsarken tekrar üretilebilirlik farklı laboratuvar, farklı ekipman ve farklı kişiler tarafından yapılan analizleri kapsamaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında ölçümler aynı kişi tarafından aynı laboratuvarda ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirildiği için tekrarlanabilirlik denemeleri üzerinden hesaplamalar yapıldı.

Hesaplamalarda iki farklı test kullanıldı. Bunlardan bir tanesi Cochran Testi, diğeri ise Grubb Testidir. Cochran Testi en büyük varyans ile varyans değerleri arasındaki ilişkiye dayanarak yapılan hesaplamalara dayanmaktadır. Grubb Testi ise normal dağılım içerisinde sapan verilerin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Cochran Testi

Tekrarlanabilirlik varyansı;

$$y = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n y_k$$

n = Tekrar sayısı

y = Test sonuçları ortalaması

y_k = Test sonuçlarının herhangi biri

Laboratuvar içi varyans;

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - y)^2}$$

Tekrarlanabilirlik varyansı;

$$Sr^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n-1)S^2}{\sum_{i=1}^p (n-1)}$$

p = Tekrar edilen gün sayısı

Yukarıda verilen denklemler ışığında hesaplamalar yapılır ve varyans değerleri hesaplanır.

$$C = \frac{S_{max}^2}{\sum_{t=1}^p St^2}$$

St = varyansların her biri

Smax = En yüksek sapma

Hesaplamalar sonucunda elde edilen C değeri Cochran tablosunda yer alan % 1 ve % 5 kritik değerlerindeki değer ile kıyaslandı ve sonuç yorumlandı.

Grubb Testi

$$X = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p Xi$$

X_i = Sırasıyla değerler

X = Değerlerin ortalaması

p = Denemelerin yapıldığı gün sayısı

$$S = \sqrt{\frac{1}{p-1} + \sum_{i=1}^p (Xi - X)^2}$$

S = Standart sapma

$$Gp = \frac{(Xp - X)}{S}$$

X_p = En büyük değer

$$G_l = \frac{(X - X_l)}{S}$$

X_l =En küçük değer

Yukarıda verilen denklemlere göre yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen G_p ve G_l değerleri Grubb testi tablosundan yola çıkarak % 1 ve % 5 kritik değeri ile kıyaslandı ve sonuç yorumlandı.

Hassasiyet (Duyarlılık)

Hassasiyet değeri bir cihazın veya yöntemin duyarlılığıdır. Yani küçük konsantrasyon değişimlerine bile yöntemin cevap verme değeridir. Bu nedenle hassasiyet belirlenen kalibrasyon grafiğinin eğimidir.

4. BULGULAR

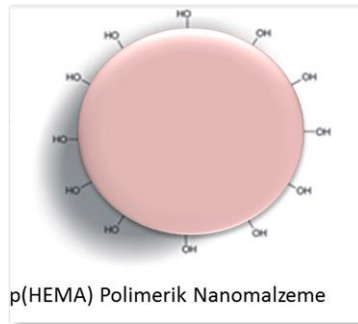
4.1. Cys-graft p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Süpfaktansız emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlenen p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin sentez sonrası reaktör içerisindeki hali aşağıdaki gibidir. **Şekil 4.1**'de sentezlenen polimerik nanomalzemenin fotoğrafı bulunmaktadır.



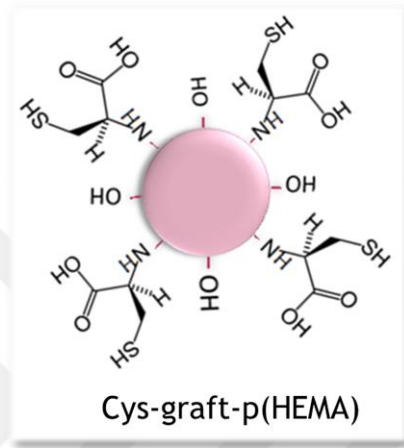
Şekil 4. 20. Sentezlenen p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin görüntüsü.

Sentezlenen p(HEMA) polimerik malzemesinin süpfaktansız emülsiyon polimerizasyonu sonrası olası yapısı aşağıda gösterilmektedir. **Şekil 4.2**'de polimerik nanomalzemenin sentez sonrası olası kimyasal kompozisyonu şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 4. 21. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin olası kimyasal yapısı

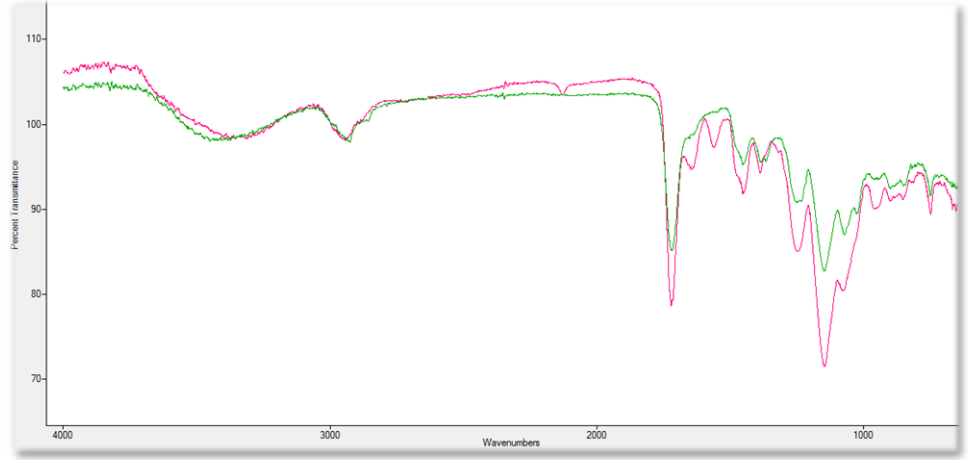
Sentezlenen p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elde edilmesinin ardından uygulanan aşılama prosedürü sonrasında elde edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin olası yapısı aşağıda gösterilmektedir. **Şekil 4.3**'te aşılama işlemi sonrası elde edilen polimerik nanomalzemenin olası yapısı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 4. 22. p(HEMA) polimerik nanomalzemesine L-Sistein aşılama prosesi sonrasında elde edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin yapısının şematik gösterimi

4.1.2. p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin ve Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapı analizi

Sümfaktansız emülsiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlenen p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin ve aşılama prosesi sonrasında elde edilen ve tüm denemelerde kullanılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin yapısının belirlenmesi amacıyla FTIR analizi kullanıldı. **Şekil 4.4**'te yeşil spektrum p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin, pembe spektrum ise Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin FTIR spektrumu olarak yer almaktadır.



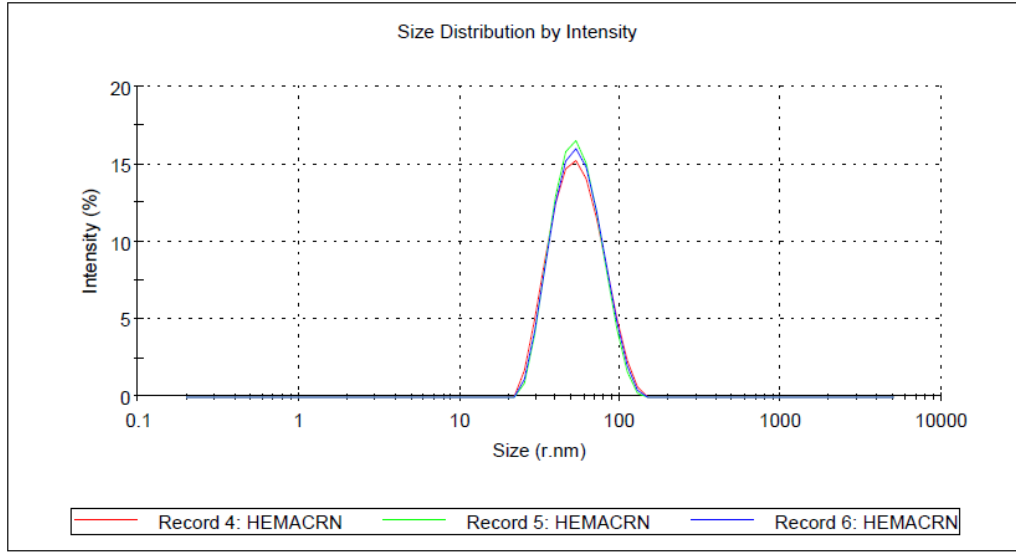
Şekil 4. 23. p(HEMA) ve Cys-graft-p(HEMA) Polimerik Nanomalzemesinin FTIR spektrum görüntüsü.

Görüldüğü gibi p(HEMA) nanopolimerinin 3500 cm^{-1} 'de -OH bağları, 3000 cm^{-1} 'de CH alkil bağları, 1718 cm^{-1} 'de C=O bağları ve 1500 cm^{-1} C=C bağları görülmektedir. 1566 cm^{-1} 'de pembe spektrumda görüldüğü üzere yeni oluşan omuzların yapıya aşılama ile katılan L-Sistein amino asidine ait olan H-N bağlarına ait olduğu düşünülmektedir. L-Sistein amino asidine ait olduğu düşünülen spesifik bant 970 cm^{-1} ve 1130 cm^{-1} 'de S-H grubuna ait olan titreşim bantlarının olduğu öngörülmektedir (Türkcan, Akgöl ve Denizli, 2013; Andaç, Say ve Denizli, 2004).

Spektrumdan görüldüğü üzere p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin başarıyla sentezlendiği görülmektedir. Aşılama prosesi ile L-Sistein amino asidinin yapıya başarılı bir şekilde katıldığı spektrumlara bakılarak söylenebilmektedir.

4.1.3.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin zeta-size ile boyutunun belirlenmesi

Sentezlenen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin Zeta-Size ile gerçekleştirilen boyut analiz sonucu aşağıda **Şekil 4.5**'te ve **Şekil 4.6**'da görülmektedir.



Şekil 4. 24. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin Zeta-Size analiz sonucu eşde edilen boyut grafiği

Results		Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm)
Z-Average (r.nm): 50.70	Peak 1:	56.57	100.0	19.43
Pdl: 0.109	Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.957	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality	D(50):			

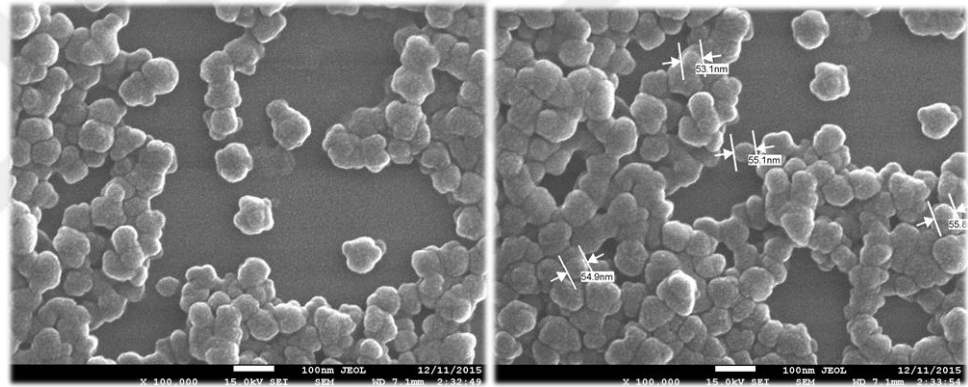
Şekil 4. 25. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin Zeta-Size analiz sonucu

Analiz sonucu elde edilen boyut ölçümleri ile SEM fotoğraflarında elde edilen boyutlar birbiri ile uyumluluk göstermektedir. Zeta-Size analizinden görüldüğü üzere sentezlenen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin boyutları ortalama olarak 50,7 nm civarındadır. Analiz sonucundan anlaşılacağı üzere birbirine oldukça yakın boyutlarda polimerik nanomalzeme elde edildiği görülmektedir ve boyutları da oldukça küçüktür. Sensör sistemlerinde kullanılan polimerik malzemelerin eş boyutlu olması oldukça büyük önem taşımaktadır. Çünkü çok küçük yüzeyler üzerine makro boyutlarda yapılan müdahaleler ile yüzeylerin hazırlanmaları gerçekleştiği için boyutlarda olan farklılıklar neticesinde işlem sırasında yapılan küçük müdahalelerdeki en ufak farklılıklar sinyallerde maksimum değişikliklere neden olabilmektedir. O nedenle eş boyutlu polimerik nanomalzemeler

ile çalışmak bu anlamda eş çalışma koşullarını daha da mümkün hale getirmektedir.

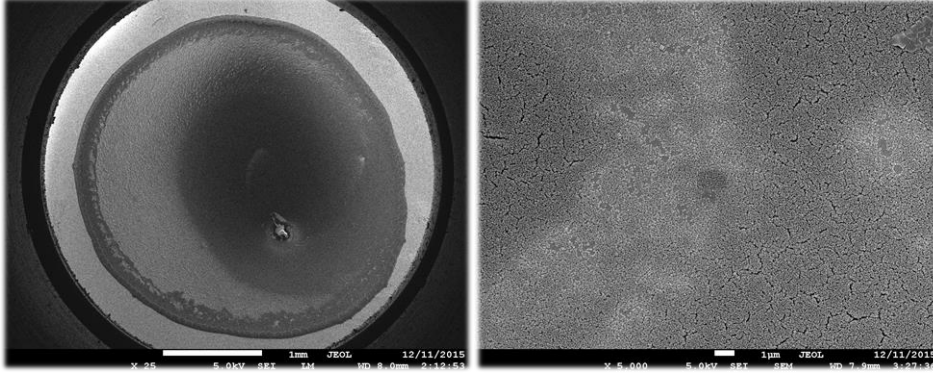
4.1.4.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi

Sentezlenen ve aşılama prosesi ile hazırlanan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemelerinin hem cam yüzeydeki hem de altın yüzeydeki yüzey morfolojisini ve genel yapısını görüntüleyebilmek amacıyla SEM (taramalı elektron mikroskop) fotoğrafları ile incelendi. Polimerik nanomalzemenin farklı büyütmelerdeki SEM fotoğrafları aşağıda Şekil 4.7’de görülmektedir.



Şekil 4. 26. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin SEM görüntüleri

Görüntüler 100000 kat büyütmeyle elde edilen görüntülerdir ve görüldüğü üzere küresel yapıda, eş boyutludur. Hazırlama yönteminden kaynaklı olarak ag-regatlaşma olmadan ve oldukça seyreltik çözelti kullanılarak hazırlanan polimerik nanomalzemelerin neredeyse tek tek görüntülenmesi sağlandı. Elde edilen görüntülerde polimerik malzemenin boyutları Zeta-Size ile uyumluluk göstermektedir. Şekil 4.8’de polimerik nanomalzemenin altın yüzeydeki şeklini görmek amacıyla elde edilen fotoğrafları yer almaktadır.

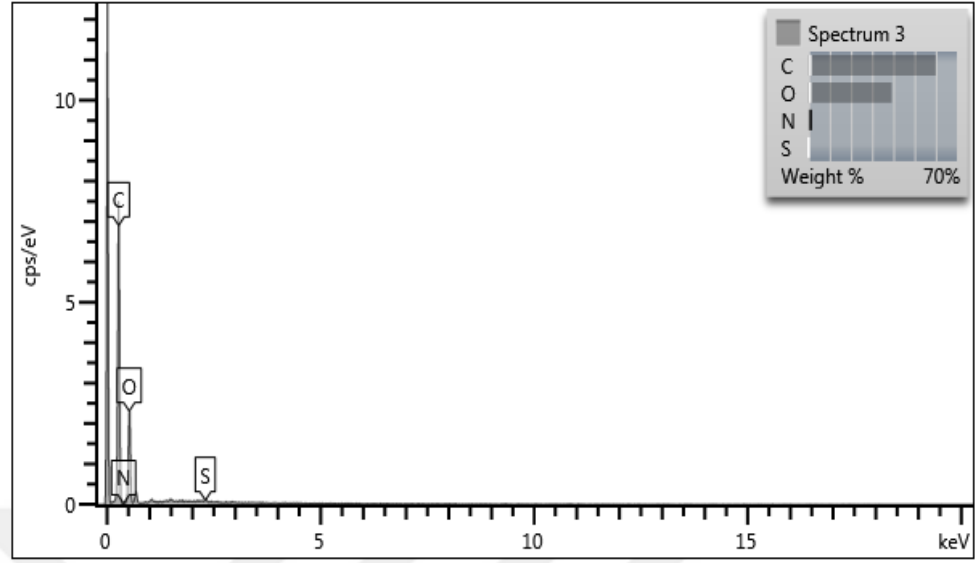


Şekil 4. 27. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın yüzey üzerindeki SEM görüntüleri

Altın yüzey üzerinde elde edilen görüntüler 25 ve 5000'lik büyütmelemlerde elde edilen görüntülerdir. Görüntülere bakıldığı zaman altın elektrot yüzeyinde de bu şekilde yerleşim gösteren polimerik nanomalzemenin eş ve küçük boyutlu olması tekrarlanabilirliği yüksek ve sahip olduğu küçük boyutuna bağlı olarak geniş yüzey alanı sayesinde antijen tayininde ölçüm aralığının geniş olacağını düşündürmektedir.

4.1.5.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz ile L-Sistein içeriğinin belirlenmesi

Elementel analiz amacıyla Malatya İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'ne gönderilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz sonucu aşağıda **Şekil 4.9'** da görülmektedir.



Şekil 4. 28. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz sonucu

Çizelge 4. 1. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elementel analiz sonucu kükürt atomu içeriği

Numune Kodu	%C	%H	%S
Kullanılan Örnek Miktarı (1.227mg)	54.58	7.553	0.132

Elementel analiz sonucunda elde edilen sonuçlardan yola çıkarak Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin yapısına L-Sistein amino asidinin katıldığı söylenebilmektedir. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin içerdiği L-Sistein içeriği Çizelge 4.1’de yer alan analiz sonucu, sistein amino asidinin moleküler kütlesi ve analizde kullanılan örnek miktarından yola çıkılarak hesaplandı.

Sistein 1 tane kükürt atomu içerdiği düşünülürse ve elementel analizde 1,227 mg polimerik nanomalzeme kullanıldığına göre bu polimerik nanomalzemenin % 0,132’si kükürt olduğuna göre 1,227 mg örnekte 0,0016 mg kükürt bulunmaktadır. (0,0016 mg=0,0000016 g)

Sisteinin moleküler ağırlığı 121,16 g/mol’dür.

$n = m/MA$ yola çıkılırsa; $0,0000016 \text{ g}/121,16 \text{ g/mol}$ 'den

$$n = 1,32 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

Toplam işlemde kullanılan madde miktarına mol miktarı bölüdüğü zaman gram polimerin ne kadar kükürlü molekül içerdiği bulunabilmektedir. ($1,227 \text{ mg} = 0,001227 \text{ g}$)

$$1,32 \times 10^{-8} \text{ mol}/0,001227 \text{ g} = 0,000011 \text{ mol/g}$$

Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi toplamda **0,0011 mmol/g L-Sistein** içermektedir.

4.1.6.Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin spesifik yüzey alanının hesaplanması

Yüzey alanı(m^2/g) = N.YA/gram polimer (Kuru kütle)

$$r = 28,3 \text{ nm} = 28,3 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$YA = 4 \times 3,14 \times (28,3 \times 10^{-9})^2$$

$$YA = 1,006 \times 10^{-14} \text{ m}^2$$

Çalışmada kullanılan polimerik nanomalzemenin konsantrasyonu $4,55 \text{ mg/mL}$ olduğu için mL 'de **0,00455 gram** polimer vardır.

$$S = 10 \text{ (yüzde katı miktarı)}$$

$$p_s = 991,1 \text{ mg/mL} = 0,991 \text{ g/mL}$$

$$d = 56,6 \text{ nm} = 0,0566 \text{ } \mu\text{m}$$

$$\pi = 3,14$$

$$N = 6 \times 10^{10} \times 10 / 3,14 \times 0,991 \times (0,0566)^3$$

$$N = 6 \times 10^{11} / 3,14 \times 0,991 \times 0,00018$$

$$N = 6 \times 10^{11} / 5,6 \times 10^{-4}$$

$$N = 1,07 \times 10^{15}$$

$$\text{Yüzey Alanı} = 1,07 \times 10^{15} \times 1,006 \times 10^{-14} / 0,00455$$

$$\text{Yüzey Alanı} = 2365,76 \text{ m}^2/\text{g}$$

Çalışmalarda 4,55 mg/mL'lik polimerik nanomalzeme 5 µL olarak kullanıldı. mL'sinde 4,55 mg (0,00455 g) polimerik malzeme varsa 5 µL'sinde $2,275 \times 10^{-5}$ g polimerik malzeme vardır. 1 g polimerik nanomalzeme 2365,76 m² ise $2,275 \times 10^{-5}$ g polimerik nanomalzeme 0,0538 m²'dir. Çalışmalarda kullanılan elektrotların çapı 1,6 mm'dir. Polimerik nanomalzemenin sahip olduğu geniş yüzey alanı sayesinde 1,6 mm'lik alanda **53,8 mm²** olarak kullanım imkanı bulunmaktadır.

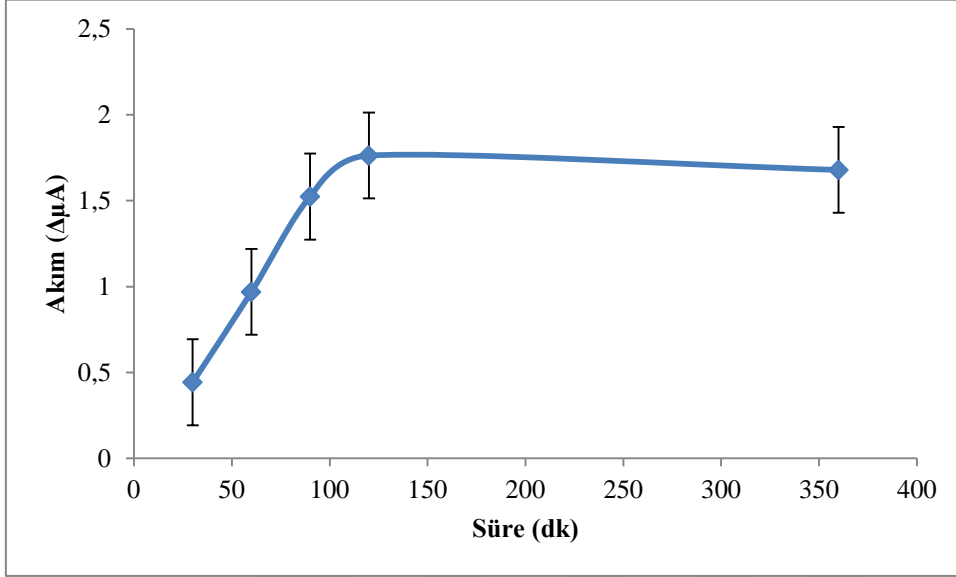
4.2. CA 125 Tayini Amacıyla Sensör Sistemi Kullanılarak Gerçekleştirilen Optimizasyonlar

CA 125 tayini amacıyla gerçekleştirilen optimizasyonların sonuçları aşağıda başlıklar halinde sonuç grafikleri ile birlikte belirtildi. Optimizasyonlarda diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanılarak alınan ölçümlerin sonuçlarında elde edilen voltammogramlar baz alınarak pik akım yükseklikleri belirlendi ve elektrot üzerinde yapılan optimizasyon parametresinin pik akım yüksekliği ve bir önceki uygulanan işlemin pik akım yüksekliğinin farkı alınarak delta pik akım yüksekliği (µA) hesaplandı. Hesaplanan pik akım yükseklikleri optimizasyon parametresine karşı grafiğe geçirildi ve bu işlem sonucunda optimum değere karar verildi (Wu et al., 2006; Tang, Yuan and Chai, 2006).

4.2.1. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın elektrot yüzeyine bağlanma süresinin optimizasyonu

Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin altın elektrot ile etkileşim süresini optimize etmek amacıyla gerçekleştirilen deneme sonucunda elde edilen voltammogramlar kullanılarak hesaplanan pik akım yüksekliklerinin etkileşim

süresine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen optimizasyon grafiği aşağıda **Şekil 4.10**'da yer almaktadır.



Şekil 4. 29. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin elektrot yüzeyine bağlanmasının optimizasyonu ile elde edilen sonuç grafiği

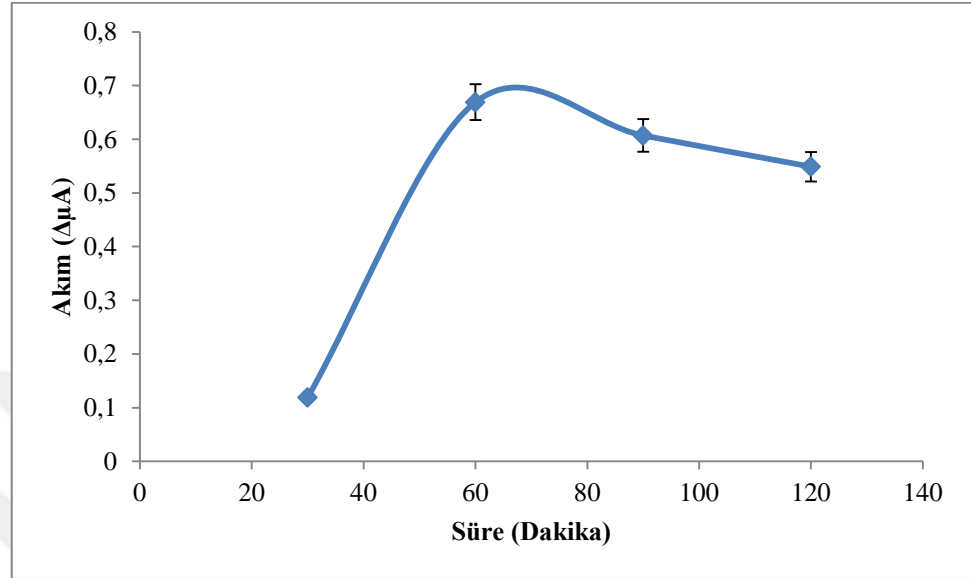
(40 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzeme, 5 μL, 25°C, 30-60-90-120-360 dk deneme süresi)

Optimizasyon grafiğinin sonucuna bakılarak Cys-graft-p(HEMA) etkileşim süresi için optimum süre 120 dk (2 saat) olarak belirlendi. Denemeler sırasında edinilen deneyime göre 2 saat süreden daha uzun beklemesinin bağlanma miktarına daha iyi bir katkı sunmayacağı tahmin edilmekteydi. Çünkü elektrot yüzeyine uygulanan polimerik nanomalzeme miktarı 5 μL olduğu için ister istemez belirli bir süre sonunda elektrot yüzeyinde kuruma yaptığı için daha fazla beklemesinin anlamlı olmayacağı öngörülmekteydi. Deneme sonucu da bu gözlemi doğrular niteliktedir. Bu aşamadan sonraki optimizasyonlarda polimerik nanomalzemenin etkileşim süresi 2 saat olarak uygulandı.

4.2.2. CA 125 antikorunun elektrot yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesine bağlanma süresinin optimizasyonu

Bağlanma süresi optimize edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin ardından 50 μg/mL olarak denemede kullanılan CA 125 antikorunun bağlanma süresi optimize edildi. Yapılan optimizasyon çalışmasının sonunda elde

voltammogramlardan belirlenen pik akım yüksekliklerinin etkileşim süresine karşı çizilen grafiği Şekil 4.11’de görülmektedir.



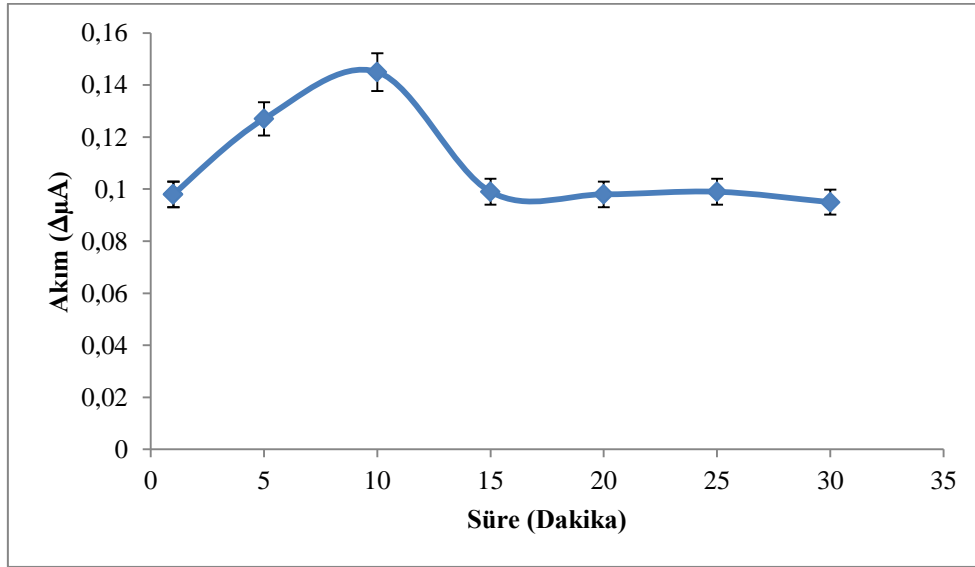
Şekil 4. 30. CA 125 antikorunun elektrot yüzeyinde Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesine bağlanma süresinin optimizasyonu ile elde edilen sonuç grafiği

(5µL 40 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C’de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50µg/mL 10µL antikor, 25°C, 30-60-90-120 dk)

Yapılan optimizasyon sonucu CA 125 antikorunun bağlanma süresi 1 saat olarak belirlendi. Antikor bağlanma süresinin optimizasyonunun ardından tüm denemelerde CA 125 antikorunun bağlanma süresi 1 saat olarak uygulandı. Sisteme CA 125 antikorunu da dahil edildiği için antijen ve antikor arasında spesifik etkileşimlerin yoğunlukta olacağı düşünülmektedir ve bu sayede yöntem olarak seçiciliği yüksek bir yöntem geliştirileceği düşünülmektedir. Bu amaçla çıkılan deney planında CA 125 antikorunun optimizasyon süresi önem arz etmektedir ve bulunan süre, öncesinde polimerik nanomalzemenin EDC/NHS ile aktivasyonu yapıldığı için uygun olduğu düşünülmektedir. Polimerik nanomalzeme yüzeyine bağlanan NHS kararsız yapısı sayesinde ortamda daha afinitesi yüksek olan CA 125 antikorunun amino grubu üzerinden NHS’nin ayrıldığı yere bağlanmayı tercih edeceği düşünülmektedir (Ekiz vd., 2014; Diltemiz vd., 2010)

4.2.3. CA 125'in etkileşim süresinin optimizasyonu

CA 125 antikorunun etkileşim süresinin optimize edilmesinin ardından CA 125'in tayin süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemede elde edilen voltammogramların pik akım yükseklikleri hesaplanarak, etkileşim sürelerine karşı hesaplanan pik akım yüksekliklerinin grafiklendirilmiş hali **Şekil 4.12**'de verildi.



Şekil 4. 31. CA 125 etkileşim süresinin optimizasyonu ile elde edilen sonuç grafiği

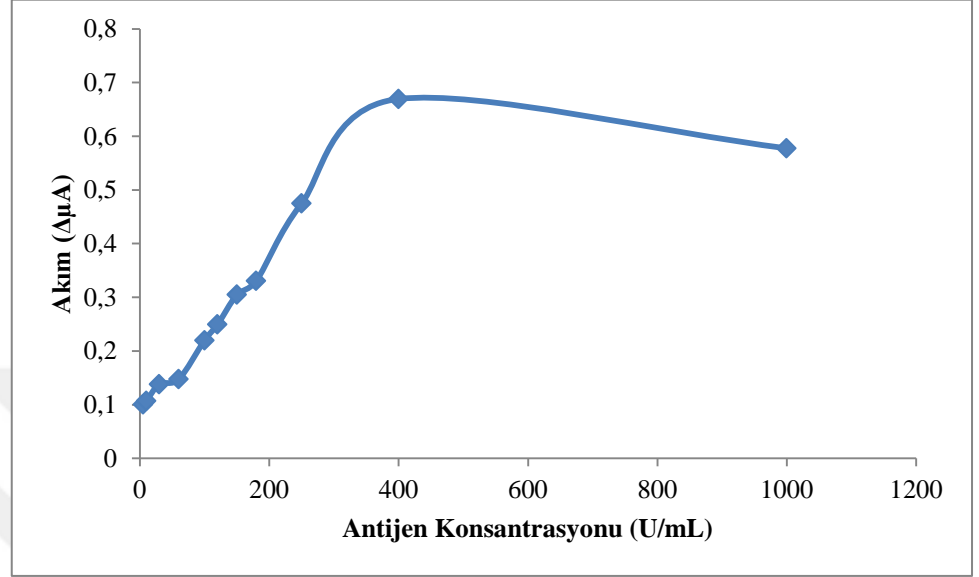
(5μL 40 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C'de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50μg/mL 10μL antikor 25°C'de 1 saat bekletme, % 1'lik BSA ile blok-lama, 50U/mL 5μL Antijen, 25°C, 1-5-10-15-20-25-30 dk)

Grafiğe göre elde edilen optimum CA125 tayin süresi 10 dk olarak belirlendi. Belirlenen süre düşünüldüğünde yöntemin oldukça kısa bir sürede tayine imkan tanıyacağı düşünülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda genellikle 30-40 dakika gibi sürelerin optimum etkileşim süresi olarak belirlendiği düşünülürse elde edilen optimum süreye göre tayin süresi 3-4 kat kısaldığı görülmektedir (Wu, Yan, ve Ju, 2007; Tang, Yuan and Chai, 2006).

4.2.4. CA 125 tayin miktarının optimizasyonu

CA 125 tayin süresinin optimizasyonu sonucunda optimum sürenin belirlenmesinin ardından CA 125 tayin miktarının optimizasyonu amacıyla 11 farklı konsantrasyonda çalışılan CA 125 konsantrasyonlarına karşı ölçümler sonucu elde

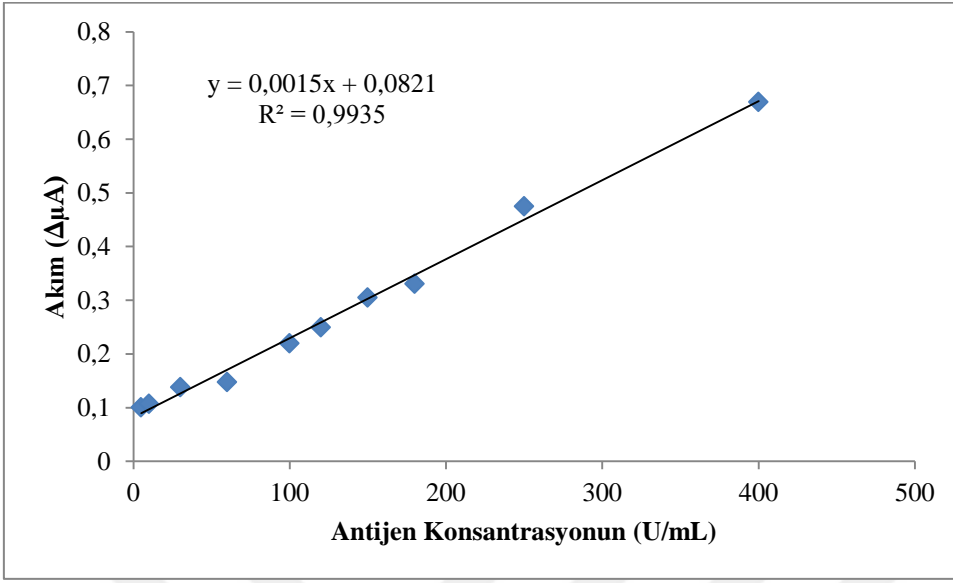
edilen voltammogramlardaki pik akım yükseklikleri kullanılarak hesaplanan delta pik akım yükseklik değerleri **Şekil 4.13**'te grafiklendirildi.



Şekil 4. 32. CA 125 tayin aralığının belirlenmesi için elde edilen 11 farklı konsantrasyonu içeren sonuçlar

(5μL 4,55 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C'de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50μg/mL 10μL antikor 25°C'de 1 saat bekleme, % 1'lik BSA ile bloklama, 5μL Antijen, 25°C'de 10 dk bekleme, 5-10-30-60-100-120-150-180-250-400-1000 U/mL'lik antijen örnekleri)

Yukarıdaki grafiğe bakıldığında elde edilen sonuçlar ışığında 1000 U/mL'lik CA 125 antijen konsantrasyonunda polimerik nanomalzemenin doyumluğa ulaştığı düşünülmektedir. Bu nedenle tayin aralığına 1000 U/mL değeri dahil edilmeden **Şekil 4. 14**'te görüldüğü gibi tayin aralığı elde edildi.



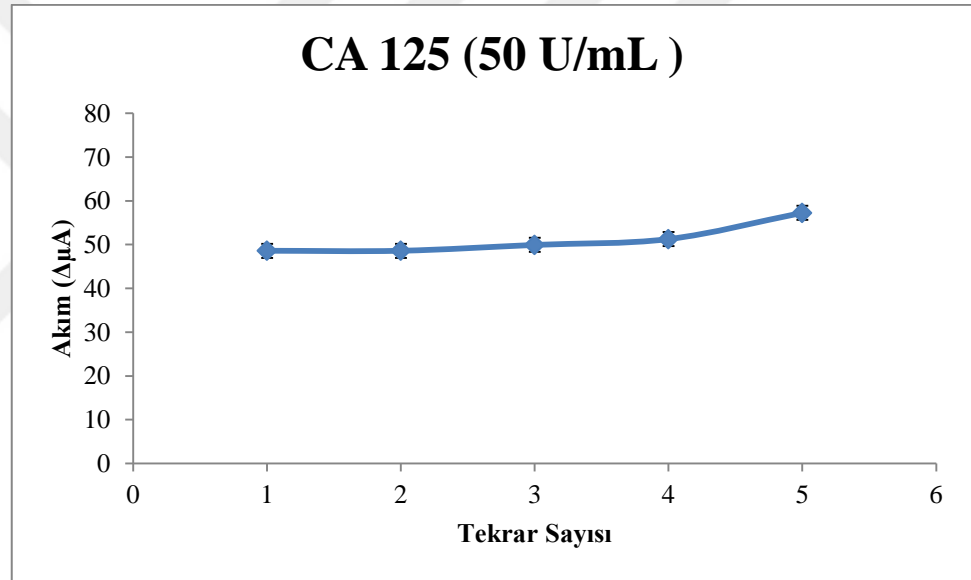
Şekil 4. 33. CA 125 tayin miktarının optimizasyonu ile elde edilen sonuçlar

(5μL 4,55 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C'de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50μg/mL 10μL antikor 25°C'de 1 saat bekleme, % 1'lik BSA ile bloklama, 5μL Antijen, 25°C'de 10 dk bekleme, 5-10-30-60-100-120-150-180-250-400 U/mL'lik antijen örnekleri)

Elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman tayin aralığı 5-400 U/mL arasındaki değerleri lineer olarak ifade edebilmektedir. Tayin aralığının oldukça geniş bir skalayı kapsadığı görülmektedir. Hastalık için kritik bir değer olan 35 U/mL değeri tayin aralığının içerisinde yer aldığı için sağlıklı ve hastalık şüphesi taşıyan kişilerin bu yöntem kullanılarak doğru bir şekilde ayırt edilebileceği düşünülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığı zaman SPR kullanılarak yapılan bir çalışma örnek olarak gösterilirse 0,1- 40 U/mL aralığı lineer tayin aralığı olarak belirtilmiştir (Suwansa-ard et al., 2009). Bir başka çalışmada impedans spektroskopisi kullanılarak yapılan çalışmada CA 125 tayin aralığı 0,1-30 U/mL olarak belirtilmiştir (Chen et al., 2009). Amperometrik immunosensör olarak geliştirilen bir başka yöntemde ise CA 125 tayin aralığı 2-75 U/mL olarak belirtilmiştir (L. Wu, Yan, ve Ju, 2007). Bu çalışmalar düşünüldüğü zaman elde edilen sonuçlar ışığında tayin aralığının literatürdeki çalışmalara kıyasla geniş olduğu düşünülmektedir. Bu da çalışmaya sağlıklı ve hastalık şüphesi olan kişileri daha iyi ayırt edebilme imkanı sunmaktadır.

4.3. Tekrarlanabilirlik

Yöntemin optimizasyonlarının tamamlanmasının ardından yöntemin tekrarlanabilirlik açısından da değerlendirmesini yapabilmek amacıyla gerçekleştirilen deneme sonucunda elde edilen değerler **Şekil 4.15**'te grafik olarak verildi. Grafik olarak verileri düzenlemek için elde edilen pik akım yükseklik değerleri tayin aralığı belli olan CA 125 kalibrasyon grafiği denkleminden konsantrasyona dönüştürülerek grafiğe geçirildi.



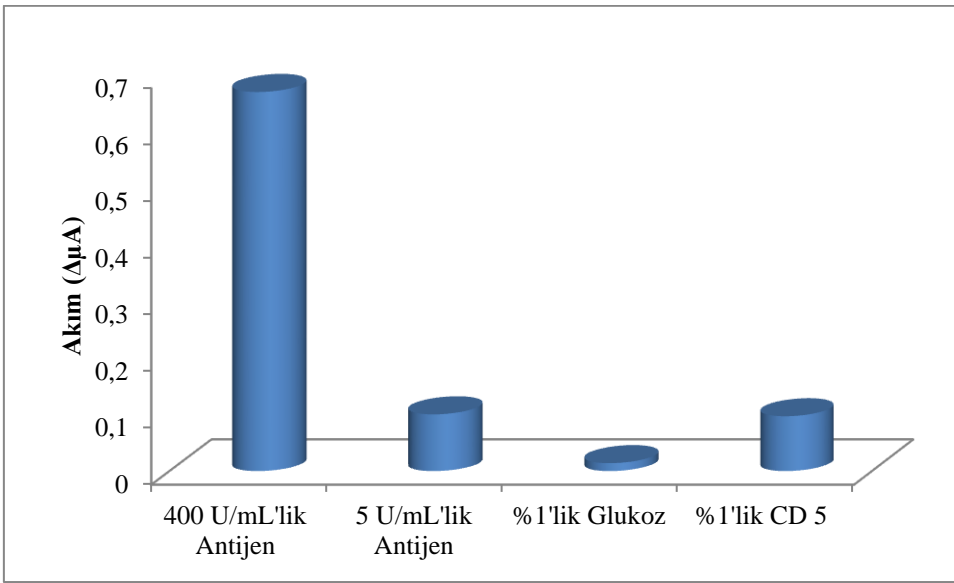
Şekil 4. 34. CA 125 tayin miktarının optimizasyonu ile elde edilen sonuçlar

(5μL 4,55 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C'de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50μg/mL 10μL antikor 25°C'de 1 saat bekleme, % 1'lik BSA ile bloklama, 50 U/mL 5μL Antijen, 25°C'de 10 dk)

50 U/mL olarak tekrarları gerçekleştirilen CA 125 konsantrasyonları ölçüm sonuçlarına göre sırasıyla 48,6 U/mL, 48,6 U/mL, 49,93 U/mL, 51,26 U/mL ve 57,26 U/mL olarak hesaplandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde gerçek değer ile aralarında belirgin bir fark olmadığı ve bu nedenle yöntemin doğru tayine olanak tanıdığı düşünülmektedir. Tekrarlanabilirlik denemesinin istatistiksel olarak sonucunun değerlendirilmesi validasyon kısmında yer almaktadır.

4.4. Seçimlilik

Seçimlilik denemesi kanda bulunan diğer moleküllerin girişim yapma riski düşünülerek gerçekleştirildiği için yöntem geliştirilmesi sonucunda elde edilen CA 125 tayin aralığında yer alan en düşük ve en yüksek konsantrasyonların oluşturduğu pik akım yükseklikleri ve girişim için denenen glukoz ve CD 5 için ölçümler sonucu elde edilen pik akım yükseklikleri düşünülerek aynı grafikte **Şekil 4.16'**da değerlendirildi.



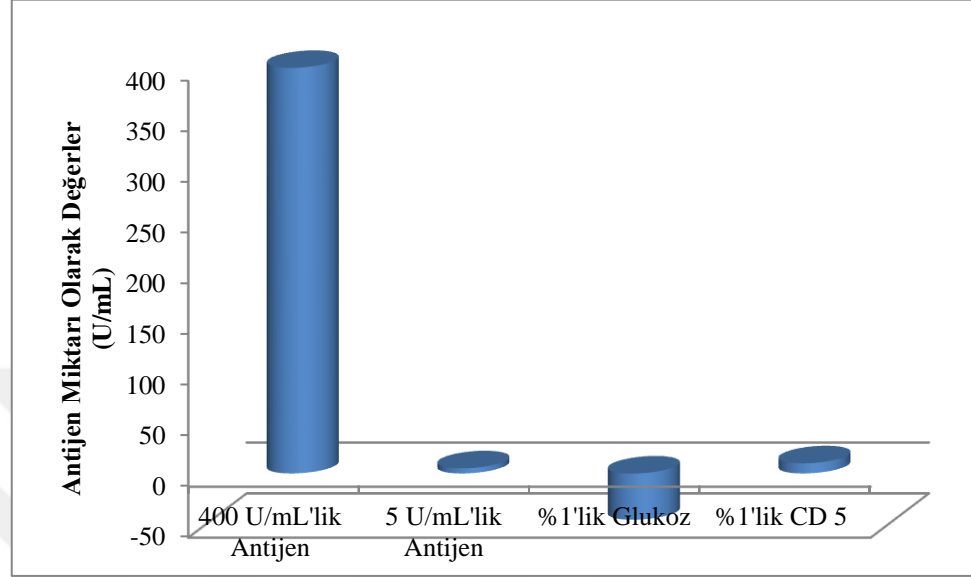
Şekil 4. 35. Seçimlilik denemesi sonucu

(5µL 4,55 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C'de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50µg/mL 10µL antikor 25°C'de 1 saat bekletme, serum örneği ile bloklama, % 1'lik Glukoz - CD 5, 25°C'de 10 dk)

Sonuçlara bakıldığı zaman % 1'lik glukoz örneğinin herhangi bir girişim etkisi olmadığı düşünülmektedir. CD 5 antijeni ise en düşük konsantrasyon kadarlık bir etkisinin ancak olabileceği düşünülmektedir. Bu değer ise sağlıklı kişiler ile hastalık şüphesi olan kişileri ayırt etmeyi engelleyecek düzeyde olmadığı görülmektedir.

Seçimlilik sonuçlarında elde edilen pik akım yükseklikleri tayin aralığı grafiğindeki kalibrasyon denklemi kullanılarak konsantrasyon olarak girişim etkisi-

nin ne kadar olacağı düşünülerek hesaplandı ve Şekil 4.17’de grafiği yer almaktadır.



Şekil 4. 36. Seçimlilik denemesi sonucunun CA 125 miktarı olarak girişim etkisi

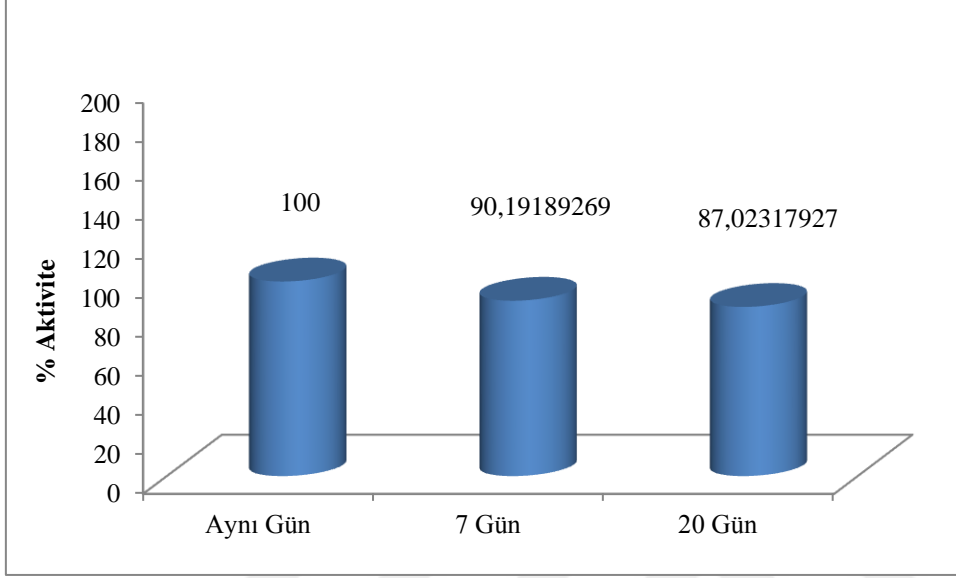
(5µL 4,55 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C’de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50µg/mL 10µL antikor 25°C’de 1 saat bekletme, serum örneği ile bloklama, % 1’lik Glukoz - CD 5, 25°C’de 10 dk)

Sonuçlara bakıldığı zaman seçimlilik denemesinde kullanılan % 1’lik glukozun herhangi bir girişim etkisinin olmadığı ve % 1’lik CD 5’in en düşük konsantrasyon olan 5 U/mL’lik CA 125 kadar girişim yapabileceği görülmektedir.

4.5. Depo Kararlılığı

Depo kararlılığı denemelerinin sonuçlarını elde etmek amacıyla bekletilen elektrotların yüzeyine 50 U/mL’lik CA 125’ten 5 µL damlatıldıktan sonra ölçümlerin sonucunda elde edilen pik akım yüksekliklerinden yola çıkılarak hesaplamalar gerçekleştirildi. Elde edilen standart grafiğinde 50 U/mL’lik CA 125 için grafik denklemi ($y = 0,0015x + 0,0821$) kullanılarak 0,1571 olarak elde edilmesi gereken pik akım yükseklik farkı belirlendi. Bu değer depo kararlılığı denemesi ile gerçekleştirilen 7 gün sonucunda ölçülen 0,1725 ve 20 gün sonunda ölçülen 0,177 değerleri ile kıyaslandı ve aktivitenin sırasıyla % 90,2 ve % 87,0 düzeyinde devam ettiği belirlendi. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda elde edilen grafik

Şekil 4.18’de yer almaktadır. Grafiğe gerçek değerle kıyaslama yapılabilmesi açısından olması gereken değerlerin % olarak aktivitesi ve elde edilen ölçümlerin % olarak aktiviteyi belirlendi.



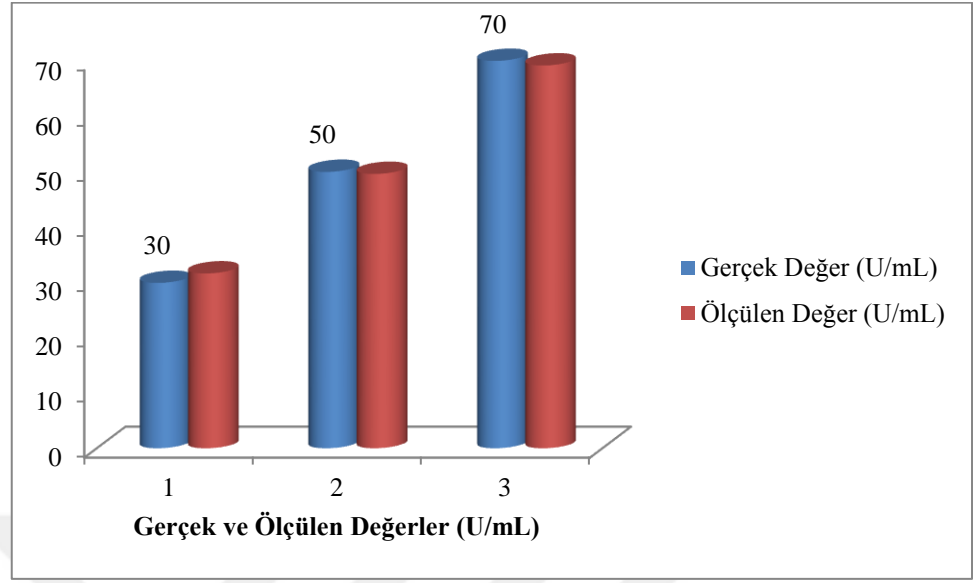
Şekil 4. 37. Depo kararlılığı denemeleri sonucu elde edilen aktiviteyi % değerleri

(5µL 4,55 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C’de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50µg/mL 10µL antikor 25°C’de 1 saat bekletme, % 1’lik BSA ile bloklama, 50 U/mL 5µL Antijen, 25°C’de 10 dk)

Elde edilen sonuca bakıldığı zaman hazırlanan elektrotların kaybettiği aktivite miktarının düşük olduğu ve tayine imkan sağlayacağı düşünülmektedir. Bu sayede önceden hazırlanan elektrotlar sayesinde işlem süresi 10 dk gibi kısa bir zaman dilimine inebilmektedir. Tayinlerin bir yandan yapılmasıyla aynı gün içerisinde sonraki günlerde kullanılmak için elektrotların hazırlanması ile planlı bir şekilde CA 125 tayininin yapılabileceği düşünülmektedir.

4.6.Gerçek Antijen Örnekleri ile Yapılan Denemeler

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde ECLIA testinde standart olarak kullanılan örnekler ile yapılan denemelerde elde edilen sonuçların tayin aralığı kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak ölçülen konsantrasyon değerlerine dönüştürüldüğü sonuçları içeren Şekil 4.19’da örneklerin gerçek değerleri ve ölçüm sonuçlarına göre bulunan değerleri yer almaktadır.



Şekil 4. 38. Gerçek örnekler ile yapılan deneme sonuçları

(5 μ L 2,275 mg/mL Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile 2 saat 25°C'de bekleme, EDC-NHS ile aktivasyon, 50 μ g/mL 10 μ L antikor 25°C'de 1 saat bekletme, serum örneği ile bloklama, 30-50-70 U/mL 5 μ L Antijen, 25°C'de 10 dk)

Sonuçlara göre 30 U/mL'lik gerçek değer ölçüm sonucuna göre 31,7 U/mL olarak, 50 U/mL'lik örneğin ölçüm sonucu 49,6 U/mL olarak, 70 U/mL'lik örneğin ölçüm sonucu değeri 69,1 U/mL olarak belirlendi. Sonuçlara bakıldığı zaman bulunan değerler gerçek değerlerine oldukça yakın olarak tayin edilebildiği düşünülmektedir. Aşağıda **Çizelge 4.2**'de gerçek antijen değerleri ile ölçülen sonuçlar, hata miktarları ve buna bağlı olarak hesaplanan % hata oranları belirtildi.

Çizelge 4. 2. Miktarı bilinen antijen örnekleri ile yapılan deneme sonuçları

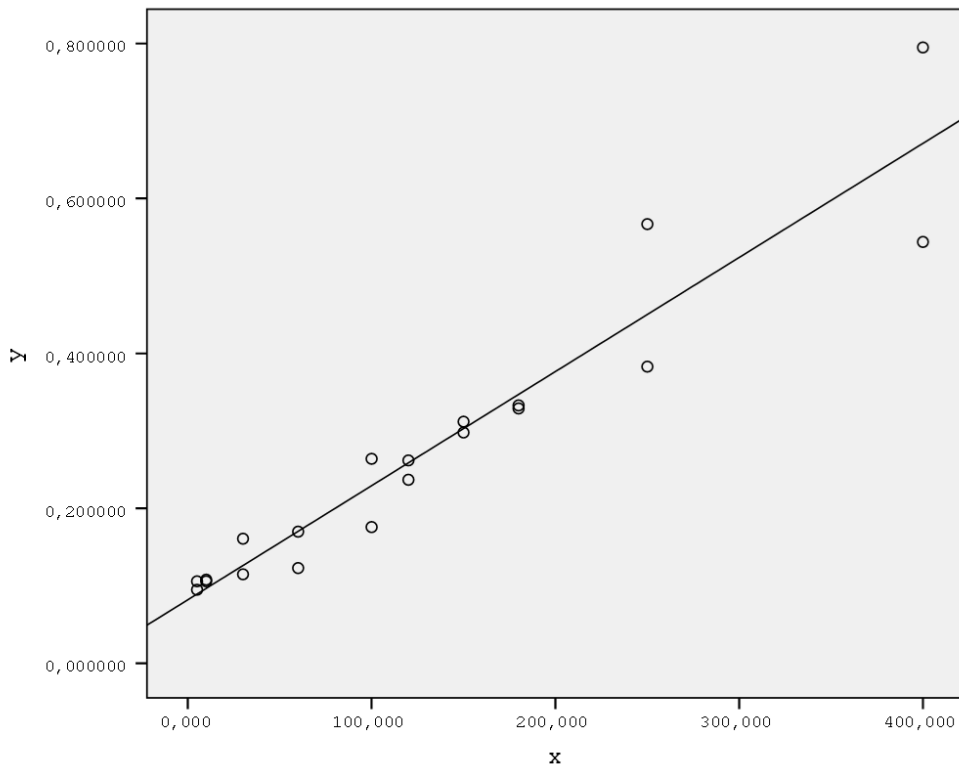
Bilinen Antijen Miktarları (U/mL)	Ölçülen Miktarlar (U/mL)	Hata Miktarı (U/mL)	% Hata
30	31,703	+ 1,703	5,6
50	49,634	- 0,366	0,7
70	69,175	- 0,825	1,18

% hata oranlarına bakıldığı zaman literatürde verilen çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir. Literatürde % 6,8 ile % 0,2 arasında hata oranları verilen çalışmalar yer almaktadır (L. Wu, Yan, ve Ju, 2007).

4.7.Yöntem Validasyonu

4.7.1.Doğrusallık

Doğrusallık amacıyla kullanılan veriler ışığında SPSS programı ile elde edilen kalibrasyon grafiği aşağıda Şekil 4. 20' de bulunmaktadır.



Şekil 4. 39. CA 125 Konsantrasyonuna göre SPSS programı ile çizilen kalibrasyon grafiği

(X eksenini CA 125 konsantrasyonu, Y eksenini metot ile elde edilen delta pik akım yüksekliklerini belirtmektedir)

Metot kısmında verilen ve aşağıda yazılan formüldeki verileri elde etmek için hesaplamalar yapıldığı zaman aşağıda yer alan Çizelge 4.3'teki veriler elde edildi.

$$S_1^2 = \frac{\sum(y-yt)^2}{N-2}$$

Çizelge 4. 3. Residüel standart sapma hesabı

X	Y	Varsayılan Y	Standart Sapma (y-yt)	(Standart Sapma) ² (y-yt) ²
5	0.095	0.089	0.01	3.192E-05
5	0.106	0.089	0.017	0.000
10	0.106	0.097	0.009	8.612E-05
10	0.108	0.097	0.011	0.000
30	0.115	0.126	-0.011	0.000
30	0.161	0.126	0.035	0.001
60	0.123	0.170	-0.047	0.002
60	0.17	0.170	-0.000	1.296E-07
100	0.264	0.229	0.035	0.001
100	0.176	0.229	-0.053	0.003
120	0.237	0.259	-0.022	0.000
120	0.262	0.259	0.003	1.069E-05
150	0.298	0.303	-0.005	2.421E-05
150	0.312	0.303	0.009	8.245E-05

180	0.329	0.347	-0.018	0.000
180	0.333	0.347	-0.014	0.000
250	0.383	0.450	-0.067	0.005
250	0.567	0.450	0.117	0.014
400	0.544	0.671	-0.127	0.016
400	0.795	0.671	0.124	0.015
			Toplam $\Sigma(y - yt)^2$	0.059

Doğrusallık hesabını yapabilmek için metot kısmında verilen ikinci formül aşağıda yazmaktadır.

$$S_2^2 = \frac{\Sigma(a-b)^2}{NK-2}$$

Metot kısmında anlatılan yöntemle göre yapılan hesaplamalar aşağıda **Çizelge 4.4**'te şeklinde gösterildi.

Çizelge 4. 4. Yalın hata hesabına göre düzenlenen veriler

X	Y	a-b	(a-b)²
5	0.095	-0.011	0.000
5	0.106		
10	0.106	-0.002	4E-06
10	0.108		
30	0.115	-0.046	0.002

30	0.161		
60	0.123	-0.047	0.002
60	0.17		
100	0.264	0.088	0.008
100	0.176		
120	0.237	-0.025	0.000
120	0.262		
150	0.298	-0.014	0.000
150	0.312		
180	0.329	-0.004	0.000
180	0.333		
250	0.383	-0.184	0.034
250	0.567		
400	0.544	-0.251	0.063
400	0.795	Toplam	0.11

Çizelgelerde en alt satırda verilen toplam olarak yazan değerler aşağıdaki tabloda S_1 ve S_2 'yi vermektedir.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Buna göre hesaplama yapılırsa $S_1^2 = \frac{0.058926833}{20-2}$

$$S_1^2 = 0,003273713$$

$$S_2^2 = \frac{0.109888}{(20 \times 2) - 20}$$

$$S_2^2 = 0,0054944$$

$$F = \frac{0,003273713}{0,0054944}$$

$$F = 0,596$$

$F_{18;20} = 2,15$ (ANOVA testine göre tablo değeri)

Hesapsal değer tablo değerinden küçük olduğu için elde edilen verilerle çizilen grafiğin doğrusal olduğu belirlendi.

3.7.2. Tespit Limiti (LOD)

Tespit limiti hesaplamalarını gerçekleştirmek üzere bir önceki doğrusallık hesabını yapabilmek için elde edilen tablo değerleri kullanıldı. Metot kısmında verilen formül aşağıda bulunmaktadır.

$$LOD = C/S/N \times 3$$

C değeri denemelerde kullanılan en küçük konsantrasyon değeridir. S değeri ise 5 U/mL konsantrasyon için kalibrasyon grafiğinden belirlenen varsayılan y değeri olan 0,08935 değeridir. N değeri ise varsayılan Y değerinden meydana gelen sapmaların ortalamasıdır.

$$LOD = 5/0,08935/0,01115 \times 3$$

$$LOD = 1,872 \text{ U/mL}$$

Tespit limiti literatürdeki çalışmalarda da hesaplanan bir değerdir ve amperometrik immünosensör kullanılan bir çalışmada 1,87 U/mL olarak bulunan çalışmaların yanı sıra karbon nanotüpler kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal bir başka yöntemde 0,36 U/mL olarak, altın nanopartikül kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal bir başka yöntemde 1,73 U/mL olarak belirlenmiştir (Wu et al., 2006; Chen et al., 2009; Wu et al., 2007). Literatür verilerine bakıldığı zaman tez çalışması sonucu elde edilen değerler literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4.7.3. Tayin Limiti (LOQ)

Tayin limiti hesaplamalarını gerçekleştirmek amacıyla bir tespit limiti hesaplama sonucunun kullanılması ile sonuç elde edildi. Metot kısmında da belirtildiği üzere maksimum kabul edilebilir bağıl belirsizlik katsayısı olarak % 33,3 belirsizlik kabul edilerek katsayı 3 olarak kabul edildi.

$$\text{LOQ} = \text{LOD} \times k$$

$$\text{LOQ} = 1,8719 \times 3$$

$$\text{LOQ} = 5,616 \text{ U/mL}$$

4.7.4. Doğruluk

Doğruluk değeri metot kısmında da açıklandığı üzere 2 parametreden oluşmaktadır. Bunlardan biri gerçeklik diğeri ise kesinlik değeridir.

Gerçeklik

Gerçeklik değeri hesaplamaları için uygulanan tekrarlanabilirlik çalışması 5 tekrarlı olarak yapıldı ve referans değer 50 U/mL olarak denemeler gerçekleştirildi.

t-testine göre;

$$t = \frac{(X_{\text{bulunan}} - X_{\text{CRM}}) \sqrt{n}}{S}$$

$$X_{\text{CRM}} = 50 \text{ U/mL}$$

$$X_{\text{bulunan}} = 51,133$$

$$n = 5$$

$$S = 1,134$$

$$t = \frac{(51,133 - 50) \sqrt{5}}{1,134}$$

$$t = 2,235$$

t testi tablo değeri $p=0,05$ 'te serbestlik derecesi 4 olduğu için 2,776'dır. Hesaplanan değer tablo değerinin altında kaldığı için yöntemin ölçüm sonuçlarının gerçek olduğu söylenebilmektedir.

Kesinlik

Metot kısmında açıklandığı üzere iki farklı test kullanılarak kesinlik hesaplamaları yapıldı.

Cochrane Testi'ne göre;

5 farklı gün içerisinde çift tekrarlı olarak çalışılan 50 U/mL'lik CA 125 örneklerinin geliştirilen ölçüm yöntemine göre elde edilen sonuçlara göre hesaplamalar yapıldı.

n = Tekrar sayısı (2)

y = Test sonuçları ortalaması

Çizelge 4. 5. Tekrarlanabilirlik test sonuçlarının ortalaması

48,6	48,6	49,933	51,267	57,267
------	------	--------	--------	--------

yk = Test sonuçlarının herhangi biri

Çizelge 4. 6. Tekrarlanabilirlik test sonuçlarının herhangi biri

42,256	53,88	46,767	66,170	52,711
54,944	43,32	53,099	36,363	61,822

Laboratuvar içi varyans;

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (yk - y)^2}$$

Çizelge 4. 7. Laboratuvar içi varyans

8,972	7,467	4,478	21,077	6,442
-------	-------	-------	--------	-------

Tekrarlanabilirlik varyansı;

$$Sr^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n-1)S^2}{\sum_{i=1}^p (n-1)}$$

Çalışmadaki günlük tekrar sayısı 2 olduğu için $Sr^2 = S^2$

p = Tekrar edilen gün sayısı

Çizelge 4. 8. Tekrarlanabilirlik varyansı

80,501	55,757	20,054	444,247	41,502
--------	--------	--------	---------	--------

Yukarıda verilen denklemler ışığında hesaplamalar yapılır ve varyans değerleri hesaplanır.

$$C = \frac{Smax^2}{\sum_{t=1}^p St^2}$$

St = varyansların her biri

Smax = En yüksek sapma

C değeri **Çizelge 4.8**'deki en büyük değer Smax yerine yazılarak ve payda da tüm tekrarlanabilirlik varyansları toplanarak bölüm işlemi yapılarak hesaplandı.

C = 0,692 olarak hesaplandı. Cochran Testi'nin tablo değerinde (n=2 tekrar sayısı, p=5 gün) % 1 ve % 5 kritik değerleri sırasıyla 0,928 ve 0,841'dir. Görüldüğü üzere hesaplanan değer tablo değerlerinden küçük olduğu için yöntem hem kesinlik sınırı içinde hem de tekrarlanabilir olarak kabul edilmektedir.

Grubb Testi'ne göre;

5 farklı gün içerisinde çift tekrarlı olarak çalışılan 50 U/mL'lik CA 125 örneklerinin geliştirilen ölçüm yöntemine göre elde edilen sonuçlara göre hesaplamalar yapıldı.

$$X = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p X_i$$

X_i = Sırasıyla değerler

X = Değerlerin ortalaması

p = Denemelerin yapıldığı gün sayısı

Çizelge 4. 9. Tekrarlanabilirlik denemelerinin ortalamaları

48,6	48,6	49,933	51,267	57,267
------	------	--------	--------	--------

$$X = 51,133$$

$$S = 3,602$$

$$X_p = 57,27$$

$$X_l = 48,6$$

$$G_p = \frac{(57,27 - 51,133)}{3,602}$$

$$G_l = \frac{(51,133 - 48,6)}{3,602}$$

$$G_p = 1,703$$

$$G_I = 0,703$$

Grubb tablosuna göre ($p=5$) % 1 ve % 5 kritik değerleri sırasıyla 1,764 ve 1,715'tir. Hesaplanan G_p (maksimumlara göre) ve G_I (minimumlara göre) değerleri tablo değerlerinden küçük olduğu için yöntemin kesinlik sınırı içerisinde olduğu söylenebilmektedir.

4.7.5. Hassasiyet

Hassasiyet değeri metot kısmında belirtildiği gibi analit miktarında meydana gelen değişime karşı sinyalde meydana gelen değişimleri ifade etmektedir. Kalibrasyon hassasiyeti tayin aralığı optimizasyon denemesinde oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğimi hassasiyet değeridir.

Kalibrasyon grafiği eğimi olan 0,0015 değeri çalışmanın hassasiyet değeridir.

5. SONUÇLAR VE TARTIşMA

Tez kapsamında sentezlenen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi karakterizasyonları yapılarak CA 125 tayini amacıyla sensör sistemi ile kombine edilerek kullanıldı. Elde edilen polimerik nanomalzemenin yapılan karakterizasyonlar ışığında SEM analizi sonucu eş boyutlu, küresel morfolojide, boyutları Zeta-size sonucuna göre 50 nm civarında olduğu belirlenirken aşılama prosesi ile yapıya sonradan katılmak istenen L-Sistein amino asidinin yapıdaki varlığı FTIR analizleri ile nitel olarak doğrulandı ve elementel analiz sonucuna göre gram polimerik nanomalzeme başına 0,0011 mmol L-Sistein içerdiği belirlendi. Elde edilen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin karakterizasyonlar sonucunda sergilediği özellikler neticesinde tayin amacıyla yöntem geliştirmede kullanılabilceği düşünülmektedir.

Sentezlenerek karakterizasyonu yapılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin ovaryum kanseri tanısında ve tanı konan hastaların tedavi süreçlerinin takibinde kullanılmak üzere CA 125 tayini amacıyla sensör sistemi ile birlikte kullanılması için bazı parametreler optimize edildi. Optimizasyon amacıyla

polimerik nanomalzemenin bağlanma süresi, antikorun bağlanma süresi, antijenin tayin süresi ve antijenin tayin miktarı optimize edildi (Jayson et al., 2014).

Sensör sistemleri bilindiği üzere mediyatör ve dönüştürücü olarak iki bileşenden oluşmaktadır (Lukas, Lukas and Bartek, 2004). Tez çalışması kapsamında tayin edilecek olan analiti (CA 125) tanıma göre Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ile birlikte elektrot yüzeyinde yapılan işlemler sonucu elde edilen yapıya aittir. Bu yapıyı da ana olarak oluşturan bileşen Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi ve onun yüzeyinde yer alacak olan ve immünosensör sisteminin elde edilmesinde ana bileşen olarak görev yapan CA 125 antikorudur. Yöntemde CA 125 antikorunu yer aldığı için yöntem immünosensör temelli bir yöntemdir (Fu, 2007). Bu bilgiler ışığında optimizasyon çalışmaları öncelikli olarak Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin bağlanma süresi ile başladı ve optimum süre olarak 2 saatin bulunmasıyla adım adım ve her adımdaki işlemde emin olarak devam ettirildi. Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesinin bağlanma süresinin optimizasyonunun ardından tanıyıcı olarak yüzeye bağlanacak olan CA 125 antikorunun bağlanma süresi optimize edilmeden önce onun bağlanmasından emin olmak amacıyla elektrot yüzeyinde yer alan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi aktivasyon işlemi ile CA 125 antikorunu kovalent bağlayacak hale getirildi. Aktivasyon amacıyla literatürde de sıklıkla kullanılan EDC/NHS aktivasyonu seçildi (Akın, vd., 2012). İşlem sonucunda CA 125 antikorunun bağlanma süresi optimize edilerek 1 saat olarak süre belirlendi. Bu işlem sonunda elde edilen yapı spesifik olmayan etkileşimlere açık olduğu için bu etkileşimlerin giderilerek yüzeyin sadece CA 125 antijenini tanıma özelliğini belirleyebilmek amacıyla sisteme BSA ile bloklama prosedürü eklendi ve literatürde belirtildiği üzere % 1'lik BSA ile 1 saat bloklama işlemi yapıldı. İşlem sonucunda hazırlanan yapı optimizasyonları yapılarak antijeni tanıma için hazır hale getirildi. CA 125'i tayin etmek amacıyla öncelikle süre optimizasyonu yapılarak 10 dakika gibi kısa bir süre optimum olarak belirlendi ve ardından CA 125 tayin aralığı optimize edildi (Das and Kelley, 2011; Suwansa-ard et al., 2009).

CA 125 tayin aralığının optimizasyonu oldukça önemli bir parametredir. Çünkü bu aralığın hastalıklı ve sağlıklı kişileri ayırt edebilecek özelliklerde olması gerekmektedir. Yapılan ön denemeler sonucunda hastalıklı ve sağlıklı kişileri tayin edemeyen bir yöntem söz konusu ise bu aralığın değiştirilebilmesi, aşağılara çekilebilmesi veya artırılabilmesi için sadece antijen miktarının değiştirilerek op-

timizasyonun yapılması yeterli kalmamaktadır. Bu amaç doğrultusunda başlangıçta kullanılan polimerik nanomalzemenin miktarında değişiklik yapılsa da tayin aralığı istenen değerlere getirilebilmekte veya yaklaştırılabilmektedir. Yüzeyde doluluk miktarı arttıkça yüzey hassasiyetini yitirdiği için küçük miktarları veya çok büyük miktarları ayırt edemez hale gelmektedir. O nedenle tez çalışması kapsamında başlangıçta optimizasyonlar boyunca kullanılan polimerik nanomalzeme miktarı tayin aralığının belirlenmesi aşamasında yapılan ön denemeler ışığında değiştirilerek 40 mg/mL ike 4,55 mg/mL olarak optimize edildi. Bu değişikliğin ardından CA 125 tayin aralığı 5-400 U/mL olarak belirlendi. Belirlenen bu değer CA 125 tayini ve takibi yapılan hastalar için kritik değer olan 35 U/mL'nin altında ve üstündeki kişileri ayırt etmede ve takip etmede kullanılabilir niteliklere sahiptir (Baron et al., 2005; Marcus et al., 2014).

Yapılan optimizasyonların ardından yöntemin tekrarlanabilirliği, seçimliliği ve depo kararlılığı gibi özelliklerini de belirlemek amacıyla çalışmaya denemeler eklendi ve tekrarlanabilirlik denemeleri 5 ayrı gün hazırlanan elektrotlar kullanılarak gerçekleştirildi (Jia et al., 2012; Yang et al., 2001). Denemeler sonucunda yöntemin tekrar üretilebilir olduğu sonucuna varıldı. Seçimlilik denemesi amacıyla glukoz ve CD 5 tercih edildi ve her ikisi için de hesaplanan girişim yapabilecek değerler tayin aralığındaki en küçük konsantrasyon ile yakınlık gösterdiği için yöntem girişim etkilerinin olmadığı sonucuna varıldı. Depo kararlılığı denemeleri 7 gün sonucunda % 90,2 ve 20 gün sonunda % 87,0 olarak aktivitenin devam ettiği belirlendi.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm çalışmalar yeni bir yöntem geliştirilmesi ve mevcut yöntemlere göre pratik, kısa süreli, hassas, doğru, ucuz ve uygulanabilir olması önemliydi. Bu amaçla yöntem validasyonu yapıldı ve validasyon parametrelerini değerlendirmek amacıyla elde edilen veriler ışığında tayin aralığının doğrusallığını değerlendirmek için F-testi, doğruluğunu değerlendirmek için doğruluk kriteri olan gerçekliği değerlendirmek amacıyla t-testi, yine doğruluk kriteri olan kesinliği değerlendirmek için Cochran ve Grubb testleri uygulandı. Yapılan tüm testler ışığında geliştirilen yöntemin kesinlik, gerçeklik ve bunlara bağlı olarak doğruluk aralığında olduğu ve tayin aralığının doğrusal olduğu belirlendi (Yılmaz, 2013). Bunlara ilave olarak hesaplanan tespit ve tayin limitleri sırasıyla 1,87 U/mL ve 5,62 U/mL olarak belirlendi.

Ovaryum kanserinin teşhisine imkan tanıyan yöntemlerin daha küçük analiz cihazlarına dönüştürülmesi gerekliliği giderek daha da belirgin hale gelmektedir. Çünkü ovaryum kanseri erken evrelerde tayin edilebilen bir rahatsızlık değildir genellikle tespit edildiği zaman III. veya IV. evreye kadar ilerlemiş olan bir hastalıktır. Hastalığın belirtileri bağırsak problemleri ile karıştırılabildiği için ve göze çarpıcı bir belirtisi olmadığı için hastalık erken dönemlerde tespit edilememektedir. Bu nedenle tespit edildiği noktada birçok kişi için artık geç kalınmış olmaktadır (Permuth-Wey et al., 2011; Jayson et al., 2014).

Günümüzde tıp fakültelerinde kullanılan yöntemler hassas, doğru ancak işlem süresi uzun süren ve pahalı yöntemlerdir. Kişilerin kendi imkanları ile evde uygulayabilecekleri yöntemler değildir. O nedenle tıpkı glukometre cihazlarında olduğu gibi küçük portatif bir cihaz geliştirilerek hastaların dönem dönem kontrollerini yapmaları sağlanabilir. Glukometre cihazları bilindiği üzere şeker hastalarının rutin kontrolleri için can kurtarıcı özelliktedir. Hastaneye gitmek zorunda kalmadan kendi ev ortamlarında cihazı kullanarak kandaki şeker düzeylerini hastalar belirleyerek insülin miktarlarını doktoralarının tavsiyelerine göre ayarlayabilmektedirler. Glukometre cihazları da iç düzenek olarak elektrokimyasal çalışma prensibi ile çalışan cihazlardır bu nedenle bu kadar portatif boyutlara getirilebilmişlerdir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntem elektrokimyasal bir tayin metodu olan diferansiyel puls voltametrisine dayanmaktadır. Yapılan tüm çalışmalar kapsamında geliştirilen yöntemin günümüz tayin yöntemlerinden biri olan ve rutin analizlerde kullanılan ECLIA testine göre daha ucuz ve pratik olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle mevcut yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir niteliktedir. Glukometre cihazlarında olduğu gibi portatif bir hale getirilerek bayanların kendi ev ortamlarında uygulayabileceği ve durumları hakkında bilgi sahibi olabilecekleri bir sistemdir. Bu sayede hasta olmayan kişiler belirli aralıklarla durumlarını kontrol edebilirken ovaryum kanseri teşhisi konmuş hastalarda takiplerini gerçekleştirebileceklerdir. Çünkü CA 125 miktarı hastalığın evreleri, kitlenin büyüklüğü ile yakından ilişkilidir (Baron et al., 2005; Marcus et al., 2014).

Tüm bunların yanı sıra geliştirilen yöntemde kullanılan Cys-graft-p(HEMA) polimerik nanomalzemesi tüm karakterizasyonları yapıldığı ve yöntem onun üzerinden oturtulduğu için yeni antijenlerin, kanser biyobelirteçlerinin tayininde kul-

lanılabileceği düşünülmektedir. Bu sayede tek polimerik nanomalzeme ile birçok kanser türü ile ilişkili olabilecek biyobelirteçler için kolay, pratik, ucuz ve doğru bir yöntem geliştirilebilecektir.

Çizelge 4. 10. Mevcut yöntemler ile genel analiz

	Kullanılan yöntem	Kullanılan malzeme	Tayın aralığı U/mL	LOD U/mL	Tayin süresi (dk)	Hazırlama süresi
(Chen et al., 2009)	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	Karbonnanotüp Cu ile modifiye Altın np	1-30 30-150	0,36	30	32.5 saat
(Chen et al., 2008)	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	Kitosan Polidialildimetil Amonyum Prussian blue	2-40 40-100	0,71	40	33 saat
(Dai et al., 2003)	Diferansiyel Puls Voltametri-si (DPV) Döngüsel Voltametri (CV)	HRP-CA 125 antikoru	2-14	1,29	40	4 saat 40 dk
(Das and Kelle y)	Diferansiyel Puls Voltametri-si (DPV)	Sisteamin Glutaraldehit	0,1/1/10/100	0,1	40	19 saat 14 dk

2011)						
(Fu 2007)	Elektrokimyasal İmpedans Spekt- roskopi (EIS)	Altın mikrokü- reler	4,5-36,5	1,3	30	62 saat
(Suw ansa- ard et al., 2009)	Yüzey Plasmon Rezonans (SPR)	Yüzey modifi- kasyonu ve Ca 125 antikorü	0,1-40	0,1	5-12	7 saat 38 dk
(Tang , Yuan and Chai 2006)	Diferansiyel Puls Voltametri- si (DPV)	Thionin ve altın np	10-30	1,8	30	40 saat
(L. Wu et., 2006)	Diferansiyel Puls Voltametri- si (DPV) Döngüsel Vol- tametri (CV)	Altın np selüloz asetat ile HRP	0-30	1,73	50	-
(L. Wu, Yan, and Ju 2007)	Diferansiyel Puls Voltametri- si (DPV) Döngüsel Vol- tametri (CV)	Çözünür karbon nanofiber- HRP	2-75	1,8	40	3 saat
Bizim geliş- tirdi-	Diferansiyel Puls Voltametri-	Cys-graft- p(HEMA) na- nomalzemesi-	5-400	1,87	10	4 saat 25 dk

ğimiz yön- tem	si (DPV) Döngüsel Vol- tametri (CV)	CA 125 antikoru				
----------------------	---	-----------------	--	--	--	--

Yukarıda **Çizelge 4.10**'da belirtildiği üzere literatürdeki yöntemler genel olarak birbiri ile kıyaslandığında SPR ile geliştirilen yöntemde tayin süresi oldukça kısadır ve bir diğer yöntem olan çözünür karbon nanofiberin kullanıldığı yöntemde hazırlık aşamasının kısalığı ve tayin aralığının genişliği ile dikkat çekmektedir. Ancak her iki yöntem göz önünde bulundurularak tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntem kıyaslandığında tayin süresinin kısalığı ve çok geniş tayin aralığı sunmasından dolayı daha kullanışlı olduğu görülmektedir. Bu avantajlarının yanı sıra pratik, hassas, doğru, az maliyetli ve kullanışlı bir yöntem olduğu da düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akgöl, S. ve Denizli, A., 2009. “New Generation Polymeric Nanospheres for Lysozyme Adsorption”. *Polymer*: 10–16.
- Akgöl, S., Kaçar, S., Özkara, S., Yavuz, H., Denizli, A. ve Arica, M. Y., 2001, Immobilization of catalase via adsorption onto L-histidine grafted functional pHEMA based membrane, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 15(4-6): 197–206 s.
- Akın M., Bongartz R., Walter J.G., Demirkol D., Stahl F., Timur S. and Scheper T., 2012, PAMAM-functionalized water soluble quantum dots for cancer cell targeting, *J. Mater. Chem.*, 22, 11529-11536 s.
- Alavanja, M., Baron, J. A., Brownson, R. C., Buffler, P. A., DeMarini, D. M., Djordjevic, M. V., Doll, R., Fontham, E. T. H., Gao, Y. T., Gray, N., Gupta, P. C., Hackshaw, A., Hecht, S. S., Husgafvel-Pursiainen, K., M, E., Peto, R., Phillips, D. H., Samet, J. M., Stoner, G., Thun, M. J., Trédaniel, J., Vineis, P., Wichmann, H. E., Wu, A. H. and Zaridze, D., 2004, Tobacco smoke and involuntary smoking, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 83: 1–1413 pp.
- Altintas, Z., Uludag, Y., Gurbuz, Y. and Tothill, I. E., 2011, Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker carcinoembryonic antigen, *Talanta* 86(1): 377–83 s.
- American Association for Cancer Research. AACR Cancer Progress Report 2014, *Clin Cancer Res* 2014;20(Supplement 1):112 pp.
- Andaç, M., Say, R. ve Denizli, A., 2004, Molecular recognition based cadmium removal from human plasma.” *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 811(2): 119–26 s.
- Ashton J, Different Stages of Ovarian Cancer <http://www.drjenniferashton.com/ovarian-cancer-staging/> (Erişim tarihi: 30 Haziran 2016)
- Avcıbaşı, U., Demiroğlu, H., Ediz, M., Akalin, H. A., Özçalışkan, E., Şenay, H. Türkcan, C., Özcan, Y., Akgöl, S. ve Avcıbaşı, N., 2013, Radiolabeling of new generation magnetic poly(HEMA-MAPA) nanoparticles with ¹³¹I and preliminary investigation of its radiopharmaceutical potential using albino Wistar rats, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 56(14): 708–16 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baron, A.T., Boardman, C. H., Lafky, J. M., Rademaker, A., Liu, D., Fishman, D., Podratz, K. C. and Maihle, N. J., 2005, Soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) [corrected] and cancer antigen 125 (CA125) as screening and diagnostic tests for epithelial ovarian cancer, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14(2): 306–18 pp.
- Barreto, C. H., Santiago, V. R., Mazzetto, S. E., Denardin, J. C., Lavín, R., Mele, G., Ribeiro, M. E. N. P., Vieira, I. G. P., Gonçalves, T., Ricardo, N. M. P. S. and Fechine, P. B., 2011, Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy”. *Journal of Nanoparticle Research* 13: 6545–53 pp.
- Bartek, J. and Lukas, J., 2007, DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation”. *Current Opinion in Cell Biology* 19(2): 238–45 pp.
- Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I. Y. ve Denizli, A., 2009, Supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles, *Reactive and Functional Polymers* 69(1): 36–42 s.
- Bayramoglu, G., 2003, Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system”. *Biochemical Engineering Journal* 14(2): 117–26 s.
- Blagosklonny, M. V. and Pardee, A. B., 2002, The restriction point of the cell cycle, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 1(2): 103–10 pp.
- Boffetta, P., Jourenkova, N. and Gustavsson, P., 1997, Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer causes & control: CCC* 8(3): 444–72 pp.
- Caka, M., Türkcan, C., Uygun, D. A., Uygun, M., Akgöl, S. ve Denizli, A., Controlled Release Of Curcumin From P(HEMA-MAPA) Membranes, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 1-6 s.
- Cambre, J. N. and Sumerlin, B. S., 2011, Biomedical applications of boronic acid polymers, *Polymer* 52(21): 4631–43 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caporaso, N., Hayes, R. B., Dosemeci, M., Hoover, R., Ayesh, R., Hetzel, M. and Idle, J., 1989, Lung Cancer Risk , Occupational Exposure , and the Debrisoquine Metabolic Phenotype, *Cancer Research* 49: 3675–79 pp.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Min, L., Li, W., Xu, Y. and Nai L., 2008, A new antibody immobilization technique based on organic polymers protected Prussian blue nanoparticles and gold colloidal nanoparticles for amperometric immunosensors, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 135(1): 236–44 pp.
- Chen, S., Yuan, R., Chai, Y., Min, L., Li, W. and Xu, Y., 2009, Electrochemical sensing platform based on tris(2,2-bipyridyl)cobalt(III) and multiwall carbon nanotubes-Nafion composite for immunoassay of carcinoma antigen-125, *Electrochimica Acta* 54: 7242–47 pp.
- Colombo, N., Peiretti, M., Parma, G., Lapresa, M., Mancari, R., Carinelli, S., Sessa, C. and Castiglione, M., 2010, Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology* 21(SUPPL. 5): 23–30.
- Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M. ve Denizli A., 2009, Biofunctionalization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with protein A: Characterization and cellular interactions, *Reactive and Functional Polymers* 69(8): 586–93 s.
- Dai, Z., Yan, F., Chen, J. and Ju, H., 2003, This strategy on Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase for Determination of Carcinoma Antigen-125 reagentless immunosensors was proposed, *October* 75(20): 5429–34 pp.
- Das, J., and Kelley, S. O., 2011, Protein detection using arrayed microsensor chips: Tuning sensor footprint to achieve ultrasensitive readout of CA-125 in serum and whole blood, *Analytical Chemistry* 83(4): 1167–72 pp.
- Dişbudak, A., Bektaş, S., Patır S., Genç Ö. ve Denizli A., 2002, Cysteine-metal affinity chromatography: determination of heavy metal adsorption properties". *Separation and Purification Technology* 26(2-3): 273–81 s.
- Diltemiz, S. E., Hür, D., Ersöz, A., Denizli, A. ve Say, R., 2009, Designing of MIP based QCM sensor having thymine recognition sites based on biomimicking DNA approach, *Biosensors & bioelectronics* 25(3): 599–603 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Diltemiz S. E., Özcan A. A. ve Yalçınkaya Ö., 2010, Development Of Sensor Based On Reflectometric Interference Spectroscopy For Determination of TNF-A, *Applied Sciences and Engineering*, 11 (2) : 141-147.
- Du, W. ve Pogoriler, J., 2006, Retinoblastoma family genes, *Oncogene* 25(38): 5190–5200 pp.
- Duffy, M. J. 1992, The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis, *Clinical & Experimental Metastasis* 10(3): 145–55 pp.
- Ekiz Kanik, F., Ag, D., Selecı, M., Barlas, F. B., Kesik, M., Hizalan, G., Akpınar, H., Timur, S. ve Toppare, L., 2014, A novel DAD type and folic acid conjugated fluorescent monomer as a targeting probe for imaging of folate receptor overexpressed cells, *Biotechnology Progress* 30(4): 952–59 s.
- Ekmekçi, A., Konaç, E. ve Önen, H. İ., 2008, Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık, *Marmara Medical Journal* 21(3): 282–95 s.
- Elledge, S. J. and Elledge, S. J., 2016, Cell Cycle Checkpoints : Preventing an Identity Crisis, 274(5293): 1664–72 pp.
- Erol Şener, Elektrokimyasal analiz yöntemleri
http://home.anadolu.edu.tr/~erolsener/Anadolu_Site/Ders_Notlar_files/Analitik2-2015.pdf (Erişim tarihi: 30 Haziran 2016)
- Fidler, I. J., 1978, Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis, *Cancer* (September): 2651–60 pp.
- Fenstermacher, D., Phelan, C. M. and Sellers, T. A., 2011, Inherited Variants in Mitochondrial Biogenesis Genes May Influence Epithelial Ovarian Cancer Risk, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 20(6): 1131–45 pp.
- Fischer, L. M., Tenje, M., Heiskanen, A. R., Masuda, N., Castillo, J., Bentien, A., Émneus, J., Jakobsen, M. H. and Boisen, A., 2009, Gold cleaning methods for electrochemical detection applications, *Microelectronic Engineering* 86(4-6): 1282–85 pp.
- Fu, X. H., 2007, Electrochemical immunoassay for carbohydrate antigen-125 based on polythionine and gold hollow microspheres modified glassy carbon electrodes, *Electroanalysis* 19(17): 1831–39 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ganem, D. and Prince, A. M., 2004, Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences, *The New England Journal of Medicine* 350(11): 1118–29 pp.
- Genc, M. E. R. ve Pati, L., 2001, Adsorption of Heavy-Metal Ions on Poly (ethylene imine)- Immobilized Poly (methyl methacrylate) Microspheres, *Polymer*: 197–205 pp.
- Greenblatt, M. S., 1994, Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis, *Perspectives in Cancer Research*, 54:4855–78 pp.
- Gu, Y., Rosenblatt, J. and Morgan, D. O., 1992, Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15, *The EMBO journal* 11(11): 3995–4005 pp.
- Hausen, H. Z., 1996, Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 122(1): 3–13 pp.
- ISO 11095:1996, Linear calibration using referance materials.
- ISO/TS 13530:2009, Water quality: Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis
- İçli, F. ve Akbulut, H., *Onkolojiye Giriş. İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi*; 2005:2007-2014.
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. and Ledermann, J. A., 2014, Ovarian cancer, *The Lancet* 384(9951): 1376–88 pp.
- Jia, Y. F., Gao, C. Y., He, J., Feng, D. F., Xing, K. L., Wu, M., Liu, Y., Cai, W. S. and Feng, X. Z., 2012, Unlabeled multi tumor marker detection system based on bioinitiated light addressable potentiometric sensor, *The Analyst* 137(16): 3806–13 pp.
- Kaplan, D., Smith, D., Meyerson, H., Pecora, N. and Lewandowska, K., 2001, CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-Barr virus transformation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(24): 13850–53 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karakoc, V., Yilmaz, E., Türkmen, D., Oztürk, N., Akgöl, S. ve Denizli, A., 2009, Selective separation of human serum albumin with copper(II) chelated poly(hydroxyethyl methacrylate) based nanoparticles, *International journal of biological macromolecules* 45(2): 188–93 s.
- Kocakulak, M., Denizli, A., Rad, Y. ve Pişkin, E., 1997, New sorbent for bilirubin removal from human plasma: Cibacron Blue F3GA-immobilized poly(EGDMA-HEMA) microbeads, *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 693(2): 271–76 s.
- Kumar, A. S., Galaev, I. and Mattiasson, B., 2007, Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications”. *Progress in Polymer Science* 32(10): 1205–37 pp.
- Kwon, T., Park, J., Lee, G., Nam, K., Huh, Y. M. Lee, S. W., Yang, J., Lee, C. Y. and Eom, K., 2013, Carbon nanotube-patterned surface-based recognition of carcinoembryonic antigens in tumor cells for cancer diagnosis, *Journal of Physical Chemistry Letters* 4(7): 1126–30 pp.
- Lakin, N. D. and Jackson, S. P., 1999, Regulation of p53 in response to DNA damage, *Oncogene* 18(53): 7644–55 pp.
- Lever, E. and Sheer, D., 2010, The role of nuclear organization in cancer, *The Journal of pathology* 220(September): 114–25.
- Li, L. J., Yu, L. B., Chen, Q. F., Cheng, H., Wu, F. M., Wu, J. L. and Kong, H. X., 2007, Determination of Ferulic Acid Based on L-Cysteine Self-assembled Modified Gold Electrode Coupling Irreversible Biamperometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 35(7): 933–37 pp.
- Lin, J., Wei, Z. and Mao, C., 2011, A label-free immunosensor based on modified mesoporous silica for simultaneous determination of tumor markers, *Biosensors and Bioelectronics* 29(1): 40–45 pp.
- Lukas, J., Lukas, C. and Bartek, J., 2004, Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time, *DNA Repair* 3(8-9): 997–1007 pp.
- Marcus, C. S., Maxwell, G. L., Darcy, K. M., Hamilton, C. and McGuire, W. P., 2014, Current approaches and challenges in managing and monitoring treatment response in ovarian cancer, *Journal of Cancer* 5: 25–30 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martin, D. and Gutkind, J. S., 2008, Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer, *Oncogene* 27 Suppl 2(S2): 31–42 pp.
- Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J. and Levine, A. J., 1991, Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein, *Genes and Development*, 5:151–59 pp.
- Moller, P., Knudsen, L. E. and Loft, S., 2000, The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1(9): 1005–15 pp.
- Nanda, K., McCrory, D. C., Myers, E. R., Bastian, L. A., Hasselblad, V., Hickey, J. D. and Matchar, D. B., 2000, Accuracy of the Papanicolaou Test in Screening for and Follow-up of Cervical Cytologic Abnormalities, *Annals of Internal Medicine* 132(10): 810 pp.
- Okutucu, B., Vurmaz, D., Tuncal, A., Türkcan, C., Aktaş, D. ve Akgöl, S., 2016, Boronate affinity nanoparticles for nucleoside separation Boronate affinity nanoparticles for nucleoside separation, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 1401(April): 1–6 s.
- Osibote, E., Noah, N., Sadik, O., McGee, D. and Ogunlesi, M., 2011, Electrochemical sensors, MTT and immunofluorescence assays for monitoring the proliferation effects of cissus populnea extracts on Sertoli cells, *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 9(12): 65 pp.
- Öztürk, N., Tabak, A., Akgöl, S. ve Denizli, A., 2008, Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite–cysteine (Bent–Cys) microcomposite affinity sorbents, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 322(1-3): 148–54 s.
- Pal, T., Permeth-Wey, J., Betts, J. A., Krischer, J. P., Fiorica, J., Arango, H., La-Polla, J., Hoffman, M., Martino, M. A., Wakeley, K., Wilbanks, G., Nicosia, S., Cantor, A. and Sutphen, R., 2005, BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases, *Cancer* 104(12): 2807–16 pp.
- Pandey, B., Demchenko, A. V. and Stine, K. J., 2012, Nanoporous gold as a solid support for protein immobilization and development of an electrochemical immunoassay for prostate specific antigen and carcinoembryonic antigen, *Microchimica Acta* 179(1-2): 71–81 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pearson Education, Inc., 2005, publishing as Benjamin Cummings PowerPoint Lectures for Biology, Seventh Edition Neil Campbell and Jane Reece.

Permuth-Wey, J., Chen, Y. A., Tsai, Y. Y., Chen, Z., Qu, X., Lancaster, J. M., Stockwell, H., Dagne, G., Iversen, E., Risch, H., Barnholtz-Sloan, J., Cunningham, J. M., Vierkant, R. A., Fridley, B. L., Sutphen, R., McLaughlin, J., Narod, S. A., Goode, E. L., Schildkraut, J. M. Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S. and Hainaut, P., 2002, Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers, *Oncogene* 21(48): 7435–51 pp.

Pfeifer, G. P., Denissenko, F. P., Olivier M., Tretyakova, N., Hechy, S. S. and Hainaut, P., 2002, Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers, *Oncogene* 21(48): 7435–51 pp.

Poschl, G., 2004, Alcohol and Cancer, *Alcohol and Alcoholism* 39(3): 155–65 pp.

Preston, R. J. and Williams, S. S., 2005, DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard, *Critical reviews in toxicology* 35(8-9): 673–83 pp.

Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C. H., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J. P., Poggio, T., Gerald, W., Loda, M., Lander, E. S. and Golub, T. R., 2001, Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26): 15149–54 pp.

Mustafa Kemal Sezgintürk, *Biyosensörler*
<http://kckk2011.nku.edu.tr/dosyalar/BiyosensorMKKemalSezginturk.pdf>
 (Erişim tarihi: 30 Haziran 2016)

Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W. and Lin, W. S. Y., 2008, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers, *Advanced drug delivery reviews* 60: 1278–88 pp.

Songurtekin, D., Yalcinkaya, E. E., Ag, D., Seleci, M., Demirkol, D. O. ve Timur, S., 2013. Histidine modified montmorillonite: Laccase immobilization and application to flow injection analysis of phenols, *Applied Clay Science* 86: 64–69 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stayner, L. T., Danhovic, D. H. and Lemen, R. A., 1996, Occupational exposure to chrysotile asbestos and cancer risk: A review of the amphibole hypothesis, *American Journal of Public Health* 86(2): 179–86 pp.
- Suwansa-ard, S., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P., Wongkittisuksa, B., Limsakul, C. and Thavarungkul, P., 2009, Comparison of surface plasmon resonance and capacitive immunosensors for cancer antigen 125 detection in human serum samples, *Biosens Bioelectron* 24(12): 3436–41 pp.
- Szmigielski, S., 1996, Cancer morbidity in subjects occupationally exposed to high frequency (radiofrequency and microwave) electromagnetic radiation, *Science of the Total Environment* 180(1): 9–17 pp.
- Tang, D., Yuan, R. and Chai, Y., 2006, Electrochemical immuno-bioanalysis for carcinoma antigen 125 based on thionine and gold nanoparticles-modified carbon paste interface, *Analytica Chimica Acta* 564(2): 158–65 pp.
- Turner, A. P.F, Karube, I. and Wilson, G. S., 1989, Biosensors in Fundamental Applications, *Oxford Science Publication*, 1-66 pp.
- Türkcan, C., Akgöl S. ve Denizli, A., 2013, Silanized polymeric nanoparticles for DNA isolation”. *Materials Science and Engineering C* 33(8): 4498–4503 s.
- Türkcan, C., Uygun, D. A., Akgöl, S. ve Denizli, A., 2013, Reactive red 120 and NI(II) derived poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles for urease adsorption, *Journal of Applied Polymer Science* 131(2): 1–7 s.
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık İstatistikleri Yıllığı-2014
- Uygun, D. A., Senay, R. H., Turkcan, C., Akgol, S. ve Denizli, A., 2012, Metal-chelating nanopolymers for antibody purification from human plasma, *Appl Biochem Biotechnol* 168(6): 1528–39 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Walsh, J. M. E., Terdiman, J. P., Morson, B., Morson, B. C., Bond, J. H., Marshall, J. B., Bond, J. H., Greenlee, R. T., Winawer, S. J., Rex, D. K., Smith, R. A., Rembacken, B. J., Saitoh, Y., Mandel, J. S., Mandel, J. S., Hardcastle, J. D., Scholefield, J. H., Kronborg, O., Jorgensen, O. D., Mandel, J. S., Allison J. E., Young G. P., Pignone, M., Lang, C. A., Church, T. R., Ransohoff, D. F., Winawer, S. J., Anderson, M. L., Zubarik, R., Allison, J. E., Ahlquist, D. A., Lieberman, D. A., Prorok, P. C., Atkin, W. S., Thiis-Evensen, E., Hoff, G., Selby, J. V., Newcomb, P. A., Muller, A. D., Kavanagh, A. M., Rex, D. K., Schertz, R. D., Cash, B. D., Wallace, M. B., Schoenfeld, P., Levin, T.R., Atkin, W. S., Zarchy., T. M., Read, T. E., Schoen, R. E., Wallace, M. B., Imperiale, T. F., Rex, D. K., Schoen, R. E., Lemmel, G. T., Lieberman, D. A., Winawer, S. J., Winawer, S. J., Citarda, F., Nelson, D. B., Winawer, S. J., Zauber, A. G., Rex, D. K., Avidan, B., Hixson, L. J., Rex, Bensen, S., Winawer, S. J., Berry, D. P., Rasmussen, M., Verne, J. E., Levin, T. R., Kim, L. S., Kewenter, J., Blakeborough, A., Johnson, C. D., Rex D. K., Law, R. L., Strom, E., Winawer, S. J., Hara, A. K., Rex, D. K., Fenlon, H. M., Fletcher, J. G., Hara A. K., Yee, J., Cotton, P. B., Pescatore, P., Miao, Y. M., Spinzi, G., Zalis, M. E., Akerkar, G. A., Sonnenberg, A., Fearon, E. R., Sidransky, D., Traverso, G., Ahlquist, D. A., Dong, S. M. and Traverso G., 2003, Colorectal Cancer Screening, *JAMA* 289(10): 1288 pp.
- Wang, J. 2006. Electroanalysis, *Analytical Electrochemistry*, 1-3.
- Wang, S. F., Du, D. and Zou, Q. C., 2002, Electrochemical behavior of epinephrine at L-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode, *Talanta* 57(4): 687–92 pp.
- Weil, M. and Chen, A., 2011, NIH Public Access, *Current Problems in Cancer* 35(1): 7–50 pp.
- Whitehouse, C., 2003, Current Status of the Molecular Characterization of the Ovarian Cancer Antigen CA125 and Implications for Its Use in Clinical Screening*1, *Gynecologic Oncology* 88(1): S152–57 pp.
- WHO., 2008, Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu Dünya Kanser Raporu 2008.
- Windmiller, J. R. and Wang, J., 2013, Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review, *Electroanalysis* 25(1): 29–46 pp.
- Wu, J., Fu, Z., Yan, F. and Ju, H., 2007, Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26(7): 679–88 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, L., Chen, J., Du, D. and Ju, H., 2006, Electrochemical immunoassay for CA125 based on cellulose acetate stabilized antigen/colloidal gold nanoparticles membrane, *Electrochimica Acta* 51(7): 1208–14 pp.
- Wu, J., Yan, F. and Ju, H., 2007, An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber, *Journal of Immunological Methods* 322: 12–19 pp.
- Yang, W., Justin G. J., Brynn H. D., Gooding, J. J. and Hibbert, D. B., 2001. “Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of l-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 516(1-2): 10–16 pp.
- Yavuz, H., Karakoç, V., Türkmen, D., Say, R. ve Denizli, A., 2007, Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *International journal of biological macromolecules* 41(1): 8–15 s.
- Yılmaz, A., 2013, Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu, Türklab Rehber.
- Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü., 2012, Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 1(2): 7–18 s.

ÖZGEÇMİŞ

Ad : Ceren

Soyad : TÜRKCAN KAYHAN

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Tarihi : 03.10.1987

Adres : 1021 Sok. C 98 Blok Güneş Apt. Daire: 15 Evka-4 Bornova/İZMİR

e-posta adresi : cerenturkcan87@gmail.com

Cep Telefonu : 0505 663 32 61

EĞİTİM BİLGİLERİ

Atatürk Lisesi (Süper Lise-Amasya) (2001-2002)

Ziya Gökalp Lisesi (Süper Lise-Diyarbakır) (2002-2004)

Çok Programlı Lise (Isparta Senirkent) (2004-2005)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2006-2010)

Lisans Diploma Çalışması: Albümin Nanopartiküllerin Hazırlanması ve İlaç Taşıma Sistemlerinde Kullanılması-2010.

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (2011-2012)

Yüksek Lisans Tez Çalışması: DNA İzolasyonu İçin Pseudospesifik Nanoyapılar, 2011.

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANMIŞ/KABUL
EDİLEN MAKALELER

1. Metal-Chelating Nanopolymers for Antibody Purification from Human Plasma, Uygun D., Senay R.H., Turkcan C., Akol S., Denizli A., *Appl Biotech Biotechnol*, Eylül 2012- Cilt 168, Sayı 6, 1528-1539.
2. Silanized Polymeric Nanoparticles For Dna Isolation, Turkcan, C., Akgol, S., Denizli, A., *Material Sciende and Engineering C*, Mayıs 2013- Cilt 33, Sayı 8, 4498-4503.
3. Reactive red 120 and NI(II) derived poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles for urease adsorption, Turkcan C., Uygun D., Akgol S., and Denizli, A., *Journal of Applied Polymer Science*, Ağustos 2013-Cilt 131, Sayı 2, 1-7.
4. Estrone Spesific Molecularly Imprinted Polymeric Nanospheres: Synthesis, Characterization And Applications In Electrochemical Sensor, Senay R.H., Turkcan C., Canavar P.E., Congur G., Akgol S. and Erdem A., *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, Ağustos 2013-Cilt 16 Sayı 7, 503-510.
5. Synthesis and biodistribution of novel magnetic-poly (HEMA–APH) nanopolymer Radiolabeled with iodine-131 and investigation its fate in vivo for cancer therapy, Avcıbaşı U., Avcıbaşı N., Akalın H. A., Ediz M., Demiroğlu H., Gümüşer F. G., Özçalışkan E., Türkcan C., Uygun D., Akgöl S., *Journal of Nanoparticle Research*, Eylül 2013- 15, 2021.
6. Radiolabeling Of New Generation Magnetic-Poly(HEMA-MAPA) Nanoparticles With ¹³¹I And Investigation Of Its Radiopharmaceutical Potential Using Albino Wistar Rats, Uğur Avcıbaşı*, Hasan Demiroğlu, Melis Ediz, Hilmi Arkut Akalın, Emir Özçalışkan, Hilal Şenay, Ceren Türkcan, Yeşim Özcan, Sinan Akgöl and Nesibe Avcıbaşı, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, Ağustos 2013- Cilt 56, Sayı 14, 708-716.
7. Investigation of Radiopharmaceutical Potential of Magnetic Poly(HEMA-APH) Nanoparticles Radiolabeled with Iodine-131 on Experimental Animals, Avcıbaşı U., Avcıbaşı N., Akalın H. A., Ediz M., Demiroğlu H., Gümüşer F. G., Özçalışkan E., Türkcan C., Uygun D., Akgöl S., *European Journal of Nuclear Medicine And Molecular Imaging*, Ekim 2013, Cilt 40, 320.

8. Boronat Affinity Nanoparticles for Nucleoside Separation, Okutucu, B., Vurmaz, D., Tuncal, Turkcan, C., A., Akgol, S., *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, Haziran 2014, doi:10.3109/21691401.2014.948550
9. Preparation And Characterization Of Silanized Poly(HEMA) Nanoparticles For Recognition Of Sugars, Kuru, C.I., Turkcan, C., Uygun, M., Okutucu, B., Akgol, S., *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, Kasım 2014, doi:10.3109/21691401.2014.984302
10. Boronat Affinity Nanoparticles For RNA Isolation, Toprak A., Gorgun C., Kuru C. I., Turkcan C., Uygun M., Akgol S., *Material Science and Engineering C*, 1 Mayıs 2015-Cilt 40, 251-256.
11. Controlled Release Of Curcumin From P(HEMA-MAPA) Membranes, Müşerref Caka, Ceren Türkcan, Deniz Aktaş Uygun, Murat Uygun, Sinan Akgöl, Adil Denizli, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 1-6, DOI:10.3109/21691401.2016.1160913.
12. Development of a novel nano-sized carrier system for aerosol drug delivery (EGE University translational pulmonology research group), Ceren Turkcan Kayhan, Raziye Hilal Senay, Esra Feyzioglu, Fulden Zeynep Ural, Ozlem Goksel, Tuncay Goksel, Suleyman Gulcemal, Munevver Erdinc, Sinan Akgol, *European Respiratory Journal*, 46, 59, DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA2134 Published 1 September 2015
13. Synthesis and characterization of cryogel structures for isolation of EPSs from *Botryococcus braunii*, Irem Cemre Turu, Ceren Turkcan-Kayhan, Aslihan Kazan, Ece Yildiz-Ozturk, Sinan Akgol, Ozlem Yesil-Celiktas, *Carbohydrate Polymers*, 5 October 2016, 150, 378-384pp, doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.027.