

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER TEŞHİSİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS TEMELLİ  
BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**TOLGAHAN DURMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

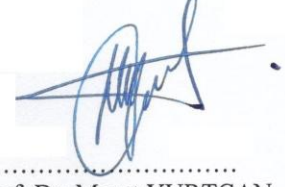
**KİMYA ANA BİLİM DALI**

**Danışman: PROF. DR. HÜLYA YAĞAR**

**EDİRNE, 2016**

Kabul ve onay sayfası

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



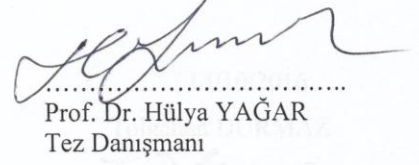
.....  
Prof. Dr. Murat YURTCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



.....  
Prof. Dr. Mesut KAÇAN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



.....  
Prof. Dr. Hülya YAĞAR  
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

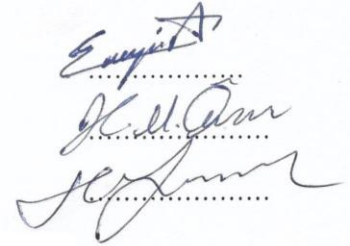
Jüri Üyeleri:

İmza

Yrd. Doç. Dr. Engin ASAV

Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

Prof. Dr. Hülya YAĞAR (Danışman)



Tarih: 14/10/2016

**TEZ DOĞRULUK BEYANI**  
**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYAYÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**DOĞRULUK BEYANI**

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

14/10/2016

Tolgahan DURMAZ

*T. Durmaz*

Yüksek Lisans Tezi

Kanser Teşhisine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Temelli Biyosensör Geliştirilmesi

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

## ÖZET

Kanser biyobelirteçleri, onkolojik rahatsızlıklarda buldukları dokuda yüksek miktarda üretilirler ve kana yüksek miktarlarda karışırlar. Biyobelirteçlerin kandaki miktarlarının tespiti kanserin erken teşhisi ve tedavisinin izlenmesinde önemli rol oynar. Trombospondin-1 (THBS1 veya TSP1) hücre-hücre ve matriks-hücre etkileşimlerini yönlendiren bir glikoproteindir. Literatürde pek çok kanser türüyle ilişkilendirilse de, Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI)'nin Erken Tanı Araştırma Ağı'nda (EDRN) belirtildiği üzere prostat kanserinin erken tanısında daha belirgin özellikler göstermektedir. THBS1'in kanser biyobelirteci olarak kabulü ile ilgili devam eden çalışmalarda faz-2 klinik deneme aşamasına gelinmiştir. Bu tez kapsamında, elektrokimyasal impedans spektroskopisine (EIS) dayalı Trombospondin biyosensörü geliştirildi. Trombospondin-1'e spesifik antikor (Anti-THBS1), altın elektrot yüzeyine 6-merkaptohexanol, epiklorohidrin, etanolamin kullanılarak kovalent olarak immobilize edildi. Hazırlanan biyosensör 50-300 ng/mL tayin aralığında ve 1 saat tayin süresinde THBS1 tayininde başarıyla kullanıldı.

**Yıl** : 2016

**Safya Sayısı** : 63

**Anahtar Kelimeler** : Trombospondin-1, SAM, Biyobelirteç, Biyosensör, Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Master Thesis

Biosensor Development based on Electrochemical Impedance for Cancer Diagnosis

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

## **ABSTRACT**

Cancer biomarkers are mixed with blood by being produced in large amounts in the tissue during the oncological diseases. The determination of their amounts in the blood plays important role in early diagnosis and treatment monitoring of cancer. Thrombospondin-1 (THBS1 or TSP1) is a glycoprotein that leads cell-cell and matrix-cell interactions. Even though it is associated with a lot of type cancer in literature, it indicates more typical characteristics in early diagnosis of prostate cancer, as mentioned in Early Detection Research Network (EDRN) of National Cancer Institute (NCI). The on-going studies interested in the consideration of THBS1 biosensor based on electrochemical impedance spectroscopy was developed. Anti-THBS1, which is specific antibody to THBS1, was covalently immobilized onto gold electrode surface by using 6-mercapto-1-hexanol, epichlorohydrin and ethanolamine. The constructed biosensor was successfully used in the detection range between 0-300 ng/mL and detection time of 1 hour for THBS1 analysis.

**Year** : 2016

**Number of Pages** : 63

**Keywords** : Thrombospondin-1, SAM, Biomarker, Biosensor, Electrochemical Impedance Spektroskopy

## TEŞEKKÜR

Bütün hayatım boyunca ve bu tez sürecinde beni sürekli olarak destekleyen ve yardımlarını hiç esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü borç bilirim. Trakya Üniversitesi'nde son 4 yılımda, benimle tüm bilgisini ve sevgisini paylaşan aynı zamanda tez danışmanım olan Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a tüm desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Bu tezin oluşumunda büyük payı olan, bilgi birikimini içtenlikle paylaşan hocam Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a teşekkür ederim. Tez süresince bana sürekli destek olan ve yardım eden Yüksek Kimyager F. Gülnaz GÜLER'e teşekkür ederim.

Tolgahan DURMAZ

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>i</b>
<b>SEMBOLLER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>BÖLÜM 1</b> .....	<b>1</b>
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2</b> .....	<b>3</b>
<b>KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Biyosensörlerin Tanımlanması ve Biyosensörlere Genel Bakış</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılmaları</b> .....	<b>4</b>
2.2.1. Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması .....	5
2.2.2. Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması .....	5
2.2.3. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması .....	6
<b>2.3. Biyosensörlerin Bileşenleri</b> .....	<b>6</b>
2.3.1. Biyokomponentler (Biyoreseptör) .....	6
2.3.2. Transdüserler (Sinyal Dönüştürücüler) .....	6
2.3.3. Biyokomponent İmmobilizasyonu .....	7
2.3.3.1. Adsorpsiyon .....	7
2.3.3.2. Tutuklama .....	7

2.3.3.3. Çapraz Bağlama .....	8
2.3.3.4. Kovalent Bağlama .....	9
<b>2.4. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri .....</b>	<b>12</b>
2.4.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi .....	12
2.4.2. Döngüsel Voltammetri .....	16
<b>2.5. Kanser Biyobelirteçleri (Biyomarker).....</b>	<b>18</b>
2.5.1. Biyobelirteçlerin Özellikleri .....	20
2.5.2. Biyobelirteçlerin Kullanım Alanları .....	21
2.5.2.1. Teşhis .....	21
2.5.2.2. Risk Değerlendirmesi.....	21
2.5.2.3. Süreç ve Tedavi Tahmini .....	21
2.5.2.4. Farmakodinamik ve Farmakokinetik .....	22
2.5.2.5. Tedaviye Verilen Yanıtın İzlenmesi .....	22
2.5.2.6. Nüksetme .....	23
2.5.2.7. Geliştirilen İlaçların İzlenmesi .....	23
2.5.3. Biyobelirteç Arayışı .....	23
2.5.4. Gelecekteki Yönelimler .....	25
<b>2.6. Trombospondin-1 (THBS1 veya TSP1) .....</b>	<b>25</b>
<b>BÖLÜM 3.....</b>	<b>28</b>
<b>MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Materyal .....</b>	<b>28</b>
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	28
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz Ekipmanı .....	28
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı.....	29
<b>3.2. Yöntem .....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Elektrot Temizliği .....	29



3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi ve Ölçüm Sistemi.....	30
3.2.3. Hesaplamalar.....	31
3.2.3.1. Eşdeğer Devre Modeli Çizimi.....	31
3.2.3.2. Yük transfer direncinin ( $R_{ct}$ ) hesaplanması.....	32
3.2.4. Trombospondin-1 Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanması .....	33
3.2.5. Trombospondin-1 Biyosensörünün İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu .....	36
3.2.5.1. 6-Merkaptohekzanol (6-MHL) Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	36
3.2.5.2. Epiklorohidrin (EPI) Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	36
3.2.5.3. Etanolamin (EA) Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	36
3.2.5.4. Glutaraldehit (GA) Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	37
3.2.5.5. Anti-Trombospondin-1 Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	37
3.2.5.6. Trombospondin-1 Süresinin Optimizasyonu .....	37
3.2.6. Trombospondin-1 Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları	38
3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı .....	38
3.2.6.2. Tekrar Üretilirlik .....	38
3.2.6.3. Yapay Serumda Uygulama .....	38
<b>BÖLÜM 4.....</b>	<b>39</b>
<b>SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Trombospondin-1 (THBS-1) Biyosensörü ile İlgili Elde Edilen Veriler .....</b>	<b>39</b>
4.1.1. THBS-1 Biyosensörünün Hazırlanış Basamaklarına İlişkin Veriler .....	39
<b>4.2. Trombospondin-1 Biyosensörü Optimizasyonuna İlişkin Sonuçlar .....</b>	<b>42</b>
4.2.1. 6-MHL Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	42
4.2.2. EPI Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	43
4.2.3. EA Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	45
4.2.4. GA Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	46

4.2.5. Anti-THBS-1 Konsantrasyonunun Optimizasyonu .....	48
4.2.6. THBS-1 Süresinin Optimizasyonu.....	49
<b>4.3. Trombospondin-1 Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon</b>	
<b>Çalışmaları.....</b>	<b>51</b>
4.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı .....	51
4.3.2. Tekrar Üretilirlik .....	54
4.3.3. Yapay Serumda Uygulama .....	55
4.3.4. Son Değerlendirme.....	56
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>63</b>

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<b>THBS1(TSP1)</b>	: Trombospondin-1
<b>Anti-THBS1</b>	: Anti-Trombospondin-1
<b>EPI</b>	: Epiklorohidrin
<b>EA</b>	: Etanolamin
<b>GA</b>	: Glutaraldehit
<b>6-MHL</b>	: 6-Merkaptohekzanol
<b>SAM</b>	: Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
<b>Rct</b>	: Yük Transfer Direnci
<b>CV</b>	: Döngüsel Voltammetri
<b>EIS</b>	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
<b>SPR</b>	: Yüzey Plazmon Rezonansı
<b>CPE</b>	: Yük Transfer Direnci
<b>AFM</b>	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
<b>SCE</b>	: Doygun Kalomel Elektrot

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensör bileşen sistemi.....	4
Şekil 2.2. İmmobilizasyon Yöntemleri .....	7
Şekil 2.3. Epiklorhidrinin dekstran moleküllerini çapraz bağlama mekanizması .....	9
Şekil 2.4. SAM in şematik gösterimi .....	10
Şekil 2.5. Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları (A) Altın yüzeye alkan tiyollerin oluşturduğu ve (B) hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksan ile elde edilen SAM yapısının modellenmesi .....	11
Şekil 2.6. İmpedans Denklemi .....	13
Şekil 2.7. İmpedans Eğrisinin Grafikselsel İfadesi .....	13
Şekil 2.8. İmpedans Elemanlarının Matematiksel Tanımları.....	14
Şekil 2.9. İmpedans Devresinin Grafikselsel İfadesi .....	15
Şekil 2.10. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel.....	16
Şekil 2.11. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram .....	17
Şekil 2.12. Antikor-antijen ilişkisi .....	20
Şekil 2.13. Trombospondin-1 Proteini.....	26
Şekil 2.14. EDRN web sitesindeki THBS1'in genel özellikleri.....	27
Şekil 3.1. Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri.....	31
Şekil 3.2. Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı.....	32
Şekil 3.3. THBS-1 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi .....	33
Şekil 4.1. THBS-1 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları.....	40

<b>Şekil 4.2.</b> THBS-1 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltammogramları .....	40
<b>Şekil 4.3.</b> 6-MHL konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği .....	42
<b>Şekil 4.4.</b> EPI konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği .....	44
<b>Şekil 4.5.</b> EA konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği .....	45
<b>Şekil 4.6.</b> GA konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği .....	47
<b>Şekil 4.7.</b> Anti-THBS-1 konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği ..	48
<b>Şekil 4.8.</b> THBS-1 inkübasyon sürelerine bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği .....	50
<b>Şekil 4.9.</b> THBS-1 biyosensörünün döngüsel voltammogramları .....	52
<b>Şekil 4.10.</b> THBS-1 biyosensörünün elektrokimyasal impedans spektrumları .....	52
<b>Şekil 4.11.</b> Optimize THBS-1 biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği .....	53
<b>Şekil 4.12.</b> THBS-1 biyosensörünün yapay serum analizi .....	55
<b>Şekil 4.13.</b> THBS-1 biyosensörünün yapay serum analizi sonucu çizilen kalibrasyon grafiği .....	56

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Biyosensör sistemini oluşturan bileşenler .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> Günümüzde kullanılan biyobelirteçler .....	19
<b>Tablo 4.1.</b> Bütün immobilizasyon basamakları için hesaplanan yük transfer direnci değerleri.....	39
<b>Tablo 4.2.</b> 6-MHL konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan $R_{ct}$ değerleri.....	43
<b>Tablo 4.3.</b> EPI konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan $R_{ct}$ değerleri.....	44
<b>Tablo 4.4.</b> EA konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan $R_{ct}$ değerleri.....	46
<b>Tablo 4.5.</b> GA konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan $R_{ct}$ değerleri .....	47
<b>Tablo 4.6.</b> Anti-THBS-1 konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan $R_{ct}$ değerleri ....	48
<b>Tablo 4.7.</b> THBS-1 inkübasyon sürelerine bağlı olarak hesaplanan $R_{ct}$ değerleri .....	50
<b>Tablo 4.8.</b> THBS-1 biyosensörü için tekrar üretilebilirlik sonuçları.....	54
<b>Tablo 4.9.</b> THBS-1 biyosensörünün optimum immobilizasyon değerleri .....	57

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurların neden olduğu, hücrelerin kontrolsüz biçimde bölünerek çoğalmaya başladığı ve sonunda oluşan tümörün vücudun diğer bölgelerine yayılarak, normal doku ve organların işlevini etkilediği hastalıktır. Kanser gelişmesine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli kontrolsüz çoğalmasıdır.

Kanserin, 200 farklı çeşidi bulunmaktadır ve batı dünyasında ölümlerin yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2014'te yayınladığı rapora göre, dünyada her yıl 14 milyon kişiye kanser teşhisi konulmaktadır. Dahası bu rakamın 2025'te 19 milyon kişi, 2035'te ise 24 milyon kişi olması beklenilmektedir. 2002 yılında ülkemizde kanserden ölümler tüm ölümlerin % 12'sini oluşturmaktayken bu oran 2009'da % 21'e çıkmıştır [1]. Günümüzde kanserin erken teşhisi için radyolojik ve patolojik incelemeler büyük önem arz etmektedir ve bu tetkikler; zahmetli, zaman alan ve pahalı ekipman ile kimyasallara gerek duymaktadır.

Kanser biyobelirteci seviyelerinin serum, idrar ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında ölçülmesi ve sürekli kontrolü bu yöntemlere yardımcı olabilecek potansiyele sahiptir. Risk gruplarının biyobelirteç seviyelerinin belirli periyotlarla ölçülmesi, kanser oluşumunun başlangıçta teşhis edilmesine olanak sağlar [2]. Bu bağlamda yeni biyobelirteçlerin bulunması ve bu biyobelirteçlere özgü hızlı, doğru, duyarlı ve tutarlı tayin sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu tezde kanser biyobelirteci olarak seçilen THBS1 proteininin tayininde kullanılmak üzere elektrokimyasal esaslı bir THBS1 biyosensörü geliştirilmiş ve bu biyosensörün uygulamalarına yer verilmiştir.



## BÖLÜM 2

### KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 2.1. Biyosensörlerin Tanımlanması ve Biyosensörlere Genel Bakış

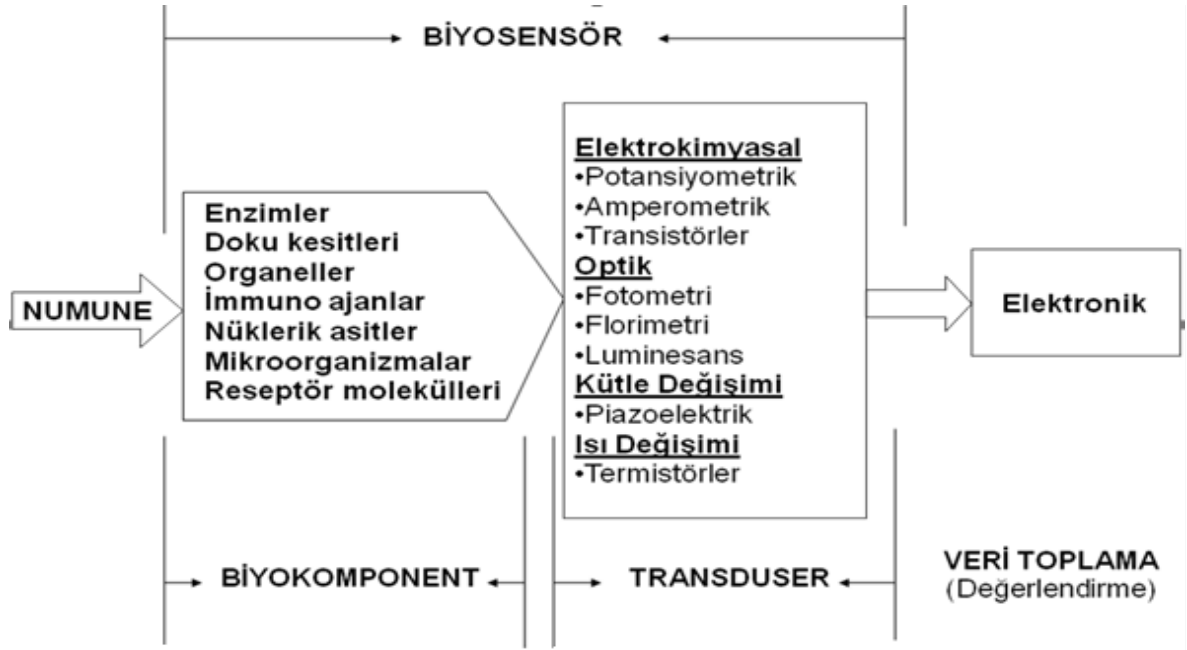
Biyosensörler, analiz edilecek numune ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu numune ile etkileşimi sonucu ortaya çıkardığı sinyalin, bir dedektör yardımı ile elektrokimyasal, optik veya termal cevaplar halinde tayin edilmesine olanak sağlayan yapılardır. Bu analizler kalitatif veya kantitatif olarak ölçülebilir [3,4].

Biyosensörlerin tarihi, 1950'li yılların ortalarında, L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) kanın O<sub>2</sub> miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, glukozoksidaz enzimini O<sub>2</sub> elektroduna immobilize ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşturmuşlardır. Bu sistem, biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) ve fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirerek geniş spektrumlu bir analiz sistemi oluşturmuştur [4].

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu sinyal iletici sistem yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır.

Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikolar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan

elektrokimyasal, termal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir transduser seçilmelidir. Transduser ve biyokomponent birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir(Şekil 2.1.) [5].



Şekil 2.1. Biyosensör bileşen sistemi [5]

## 2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılmaları

Günümüzde biyosensörler; biyokomponent ve transduser olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içermektedir. Bunlar Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Biyosensör sistemini oluşturan bileşenler [6]

<b>Analiz Edilecek Madde Türü</b>	<b>Biyolojik Tanıma Bölgesi</b>	<b>Sinyal İletici Sistem (Transduser)</b>
Metabolitler	Enzimler	<u>Elektrokimyasal Esaslı</u>
Kanser biyobelirteçleri	Antikorlar	○ Amperometri
Metaller	Hücre-doku kesitleri	○ Potansiyometri
Hormonlar	Mikroorganizmalar	○ Yarı iletken esaslı
Koenzimler	Nükleik asitler	<u>Optik esaslı</u>
Aktivatör-İnhibitör	Aptamerler	○ Fotometri esaslı
Allerjenler	Lipidler	○ Fluorometri esaslı
Antijen	Hücre organelleri	○ Biyoluminesans
Nükleik asit	Reseptörler	<u>Piezoelektrik</u>
Mikroorganizmalar		○ Mikrokantileverlar
Virüsler		○ Kuartz kristal mikrobals

### **2.2.1. Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler [6];

- a) Biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörler)
- b) Biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör-ligand gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörler)

### **2.2.2. Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler [6];

- a) Elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometrik, Potansiyometrik, İmpedimetrik)
- b) Optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Flourometri, Biyoluminesans)
- c) Piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kuartz kristal mikrobalsan, Mikrokantileverlar)
- d) Kalorimetri esaslı biyosensörler

### **2.2.3. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre;

- a) Enzim temelli biyosensörler
- b) Hücre temelli biyosensörler
- c) DNA temelli biyosensörler
- d) Antikor/Antijen temelli biyosensörler(İmmünosensörler)

## **2.3. Biyosensörlerin Bileşenleri**

### **2.3.1. Biyokomponentler (Biyoreseptör)**

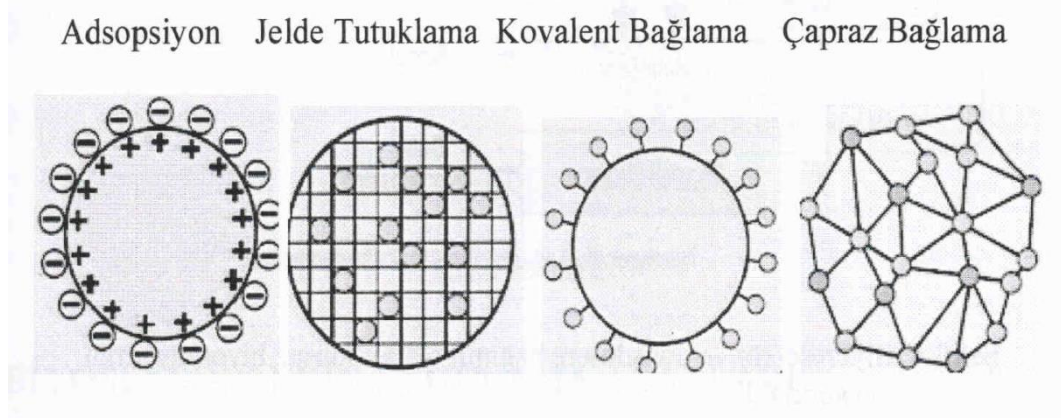
Biyosensörlerin ana hattını oluşturan biyokomponentler yaygın olarak reseptör molekül diye de adlandırılırlar. En çok kullanılanları enzimler ve antikorlardır. Enzim-substrat ve antikor-antijen arasındaki ilişkinin ilk adımı analitlerin tayin edilecek proteinlere bağlanmasıdır. Bunlar gibi bir bağlanma ya da dönüşüm reaksiyonu yaratıp bir sinyal oluşturabilecek birçok biyolojik aktif materyal 'biyokomponent' olarak kullanılabilir. Enzimler, mikroorganizmalar, organaller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler bazı biyokomponentlere örnektirler [6].

### **2.3.2. Transdüserler (Sinyal Dönüştürücüler)**

Transdüserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Transdüserler biyokimyasal reaksiyona göre seçilirler. Elektrodlar, amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılırlar. Optik sensörlerde hedef ışık, piezoelektrik sensörlerde ise hedef kristalin salınım rezonansının kütle yükleniminin değişmesidir. Bunların dışında transistörler ve termistörler de sinyal dönüştürücü olarak kullanılır [7].

### 2.3.3. Biyokomponent İmmobilizasyonu

Biyokomponentlerin, sinyal dönüştürücüler üzerinde immobilizasyonu fiziksel veya kimyasal bağlanma yöntemleri ile gerçekleştirilir (Şekil 2.2). Fiziksel immobilizasyonlara örnek olarak adsorpsiyon, polimer matrikste tutuklanma vb. yöntemler verilebilir. Kimyasal immobilizasyon yöntemlerine ise kovalent bağlanma, çapraz bağlama vb. yöntemler örnek verilebilir. [6]



Şekil 2.2. İmmobilizasyon Yöntemleri [6]

#### 2.3.3.1. Adsorpsiyon

Biyokomponentin, sinyal dönüştürücü yüzeyine hidrojen bağları, tuz köprüleri, Van der Waals kuvvetleri gibi non-kovalent etkileşimler ile immobilizasyon prensibine dayanır. Kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, polimerik aromatik reçineler, kollajen, cam hipoksiapatit gibi kimyasallardır.

#### 2.3.3.2. Tutuklama

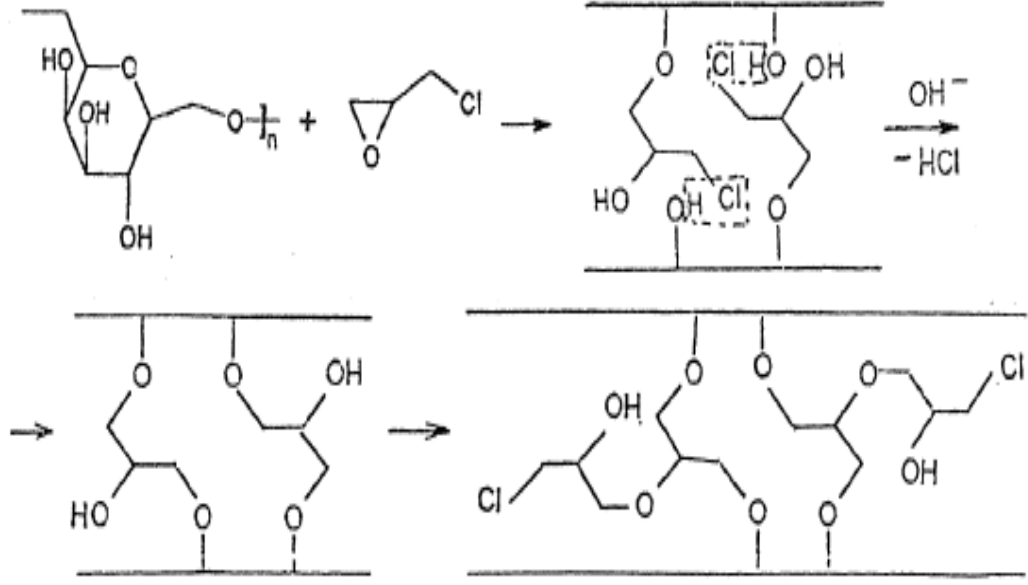
Biyokomponentler, doğal veya sentetik jel matrikslerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak immobilize edilebilirler. Jel matriks tutuklamada kullanılan başlıca kimyasallar; akrilamid polimerleri, nişasta, jelatin bazlı tabakalar, kalsiyum alijanat jelleri, polivinil klorür gibi materyallerdir.

### 2.3.3.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama işlemi, iki veya daha fazla molekülün kovalent olarak bağlanmasıdır. Bu işlemde genellikle iki veya daha fazla reaktif fonksiyonel gruba sahip kimyasallar kullanılır (aminler, slfidriller vb.). En çok kullanılan çapraz bağlayıcılar glutaraldehit, epiklorohidrin, heksametilen diizosiyanat ve 1,5 dinitro-2,4 diflorobenzen gibi bifonksiyonel bileşiklerdir. Bu bağlanma sonucu biyotanıma materyalinin sabitlenmesi sağlanır ve reaksiyon tabakasından sızması engellenir.

#### **Epiklorohidrin ile apraz Bağlama:**

Epiklorohidrin ( $C_3H_5ClO$ ) ya da 3-kloropropilen, oksit kloroform benzeri bir kokuya sahip, tahriş edici renksiz bir sıvıdır. Hava ile teması sonucu patlayıcı özellik gösterebilir ve yanması sonucunda zehirli gazlar açığa çıkarır. Epiklorohidrin, yapısı itibariyle hem epoksit halkasından hem de kolay ayrılan grup olarak kullanılabilen klorür üzerinden reaksiyon verebilir. Bu sebeple birden fazla  $-OH$  grubu içeren bileşiklerle birlikte çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilir. Şekil 2.3'te desktran ile verdiği reaksiyon gösterilmektedir [8].



**Şekil 2.3.** Epiklorhidrinin dekstran moleküllerini çapraz bağlama mekanizması [8]

#### **Glutaraldehit ile Çapraz Bağlama:**

Her iki ucunda birer aldehit grubu barındıran beş karbonlu bir reaktif olan glutaraldehit, aminler ile reaksiyona girerek bir Schiff bazı oluşturur. Bir ucundan elektrot yüzeyindeki amin grupları ile bir ucundan ise proteinlerdeki N terminale bağlanarak bu iki yapıyı birbirine bağlayabilir [9].

#### **2.3.3.4. Kovalent Bağlama**

Kovalent bağın oluşması için, bağlanacak olan biyokomponentin veya bağlanma yüzeyinin üzerinde reaktif grupların (-COOH, -SH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -C=O vb.) bulunması gereklidir.

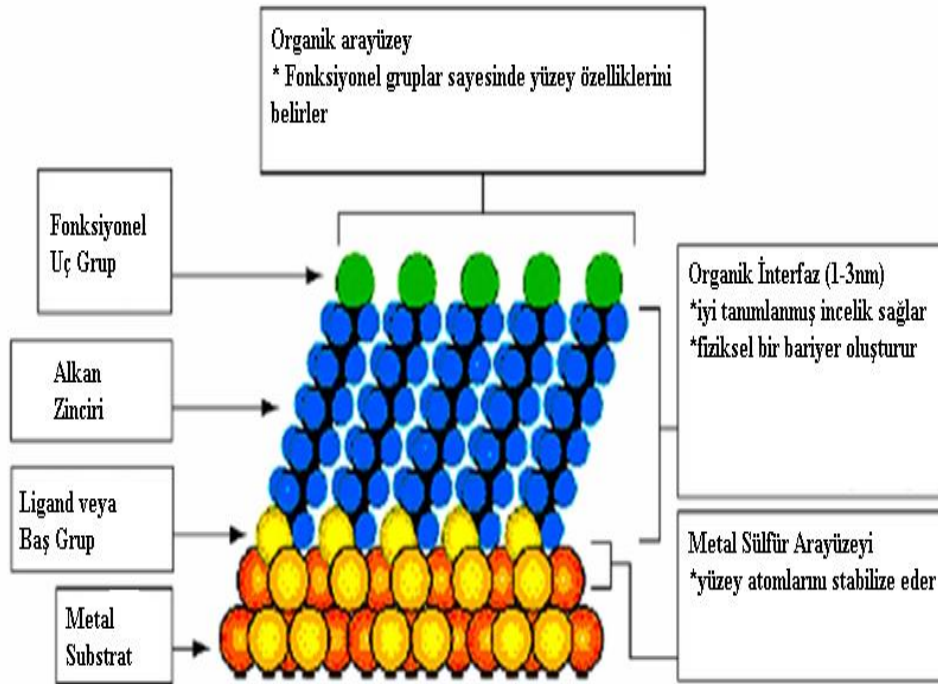
Biyokomponentler aktifleştirilmiş iletici yüzeyine bağlanabileceği gibi daha önceden hazırlanmış immobilize bir film sistemi ile de ileticiye bağlanabilir.

Biyokomponentin kovalent bağlanması ile pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç kazanılır ve biyosensör daha sağlam bir yapı kazanarak dayanıklı hale getirilebilir [10].

## Enzimlerin kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) yöntemiyle immobilizasyonu

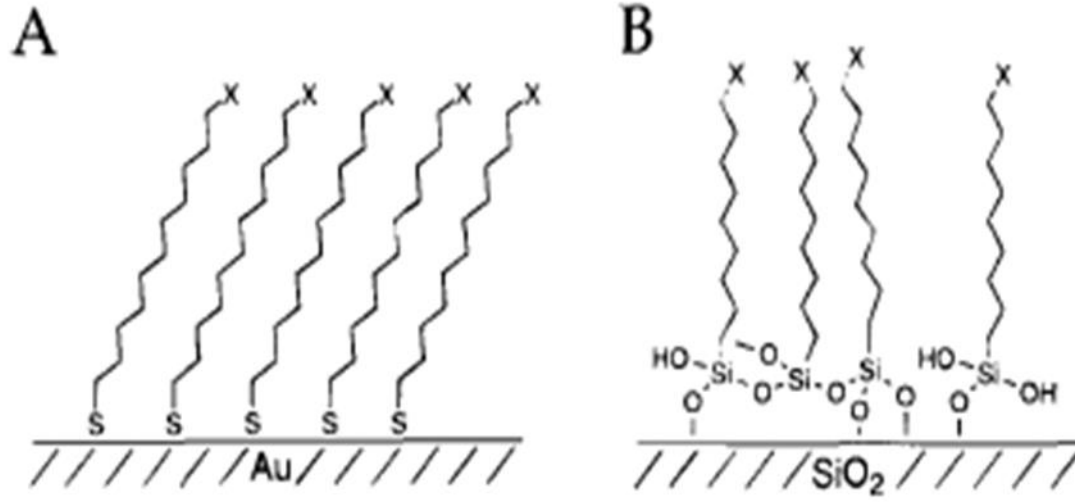
SAM oluşumu metal yüzey ve seçilen organik molekülün baş grubu arasında meydana gelen güçlü kemisorbsiyon ile oluşmaktadır [10]. Alkil zincirleri arasındaki hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri sonucunda çok iyi organize olmuş ve elektrot yüzeyine çok sıkı paketlenmiş bir tek tabaka elde edilir. Elektrot yüzeyindeki SAM, çözelti içindeki elektroaktif türler ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi için kinetik bir bariyer olarak tanımlanır. SAM yönteminin diğer metotlara göre avantajlarının başında uygun moleküllerin seçilerek tabaka kalınlığının kolaylıkla kontrol edilebilmesidir [11]. SAM ve bu tabakaların bazı özellikleri Şekil 2.4’de şematik olarak gösterilmiştir. Tek tabakanın oluşumunu ve paketlenme yoğunluğunu; substratın doğası, pürüzsüzlüğü, çözgen, adsorbatın (tutunan) doğası, adsorbatın tutunma süresi, sıcaklık ve adsorbat konsantrasyonu gibi pek çok parametre etkiler [12].

SAM oluşumunda nispeten pürüzsüz metal yüzeylerinde (altın, gümüş, bakır, platin ve nikel) tiyolat veya sülfür molekülleri; metal oksit yüzeylerinde ( $Al/Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ ,  $PtO$ ,  $TiO_2$  ve  $ZrO_2$ ) alkan silan molekülleri kullanılır. Şekil 2.5’de farklı yüzeylerdeki tek tabaka oluşumları gösterilmiştir [13].



Şekil 2.4. SAM'in şematik gösterimi [12]





**Şekil 2.5.** Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları (A) Altın yüzeye alkan tiyollerin oluşturduğu ve (B) hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksan ile elde edilen SAM yapısının modellenmesi [13]

Elektrot yüzeyine SAM yapılarının immobilizasyonu genelde elektrotun adsorblanacak maddenin seyreltik (10-100 mM) çözeltisi içerisinde 12 saat ve üzerinde daldırılmasıyla gerçekleştirilir. Bu daldırılma süreci boyunca, elektrot yüzeyine SAM yapılarının adsorpsiyon kinetiği genellikle iki adımla tarif edilir. İlk bir saat içerisinde, film tabakası sonunda % 80–90 olacak şekilde hızlı bir şekilde kalınlaşır. Bunun devamında ise daha yavaş bir süreç başlar ve 10 ila 20 saat arasında hem kalınlık hem de yüzeyin kuruması denge değerine ulaşır [12, 13].

SAM kullanımının çok önemli avantajları vardır:

Elektrot yüzeyine biyomoleküllerin bağlanması için ya direkt kimyasal bağlar kullanılır ya da polimerik destekler kullanılarak enkapsülasyon yapılır.

1. Düzenli yapının, iğne deliği boşlukların ve stabil tek tabakanın oluşması kolaydır.
2. SAM yüzey ile sağlanan mikro çevre benzeri membran biyomolekül immobilizasyonu için uygundur.
3. Çeşitli fonksiyonel gruplar ile SAM'da ki baş grupların dizaynının esnekliği isteğe göre hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin elde edilmesini sağlar.
4. SAM üzerinde immobilizasyon için çok az miktarda biyomolekül (tek tabaka oluşturmak için gerekli) gereklidir.

5. Çok olağanüstü durumlarda moleküler düzeyde bilgi edinmek örneğin protein adsorpsiyonu, DNA hibridizasyonu, antijen-antikor ilişkisi vs. için AFM gibi yüzey duyarlı teknikler kullanılır.
6. +0.8 V ile -1.4 V arasında SCE'ye karşı uygulanan potansiyelde stabil olduğunu göstermektedir ki bu durum onu pek çok elektrokimyasal enzim elektrotu uygulaması için uyumlu hale getirir [12].

Bu avantajlarının yanı sıra SAM oluşturulmasını sınırlandıran önemli etmenler de vardır. Bunlar:

1. Bazı SAM tabakaların kimyasal stabiliteyi çok iyi olmadığından tabakanın deneme esnasında izlenen yoldan etkilenerek kimyasal oksitlenmeye uğraması,
2. Tek tabakanın elektriksel alanının etkisi ve termal desorpsiyonu,
3. Hidrofobik SAM yüzeyi yüksek yüzey enerjisiyle çok sayıda kontaminantı yüzeyde biriktirdiğinden istenmeyen safsızlıkların adsorplanmasıdır [11].

## **2.4. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri**

### **2.4.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi**

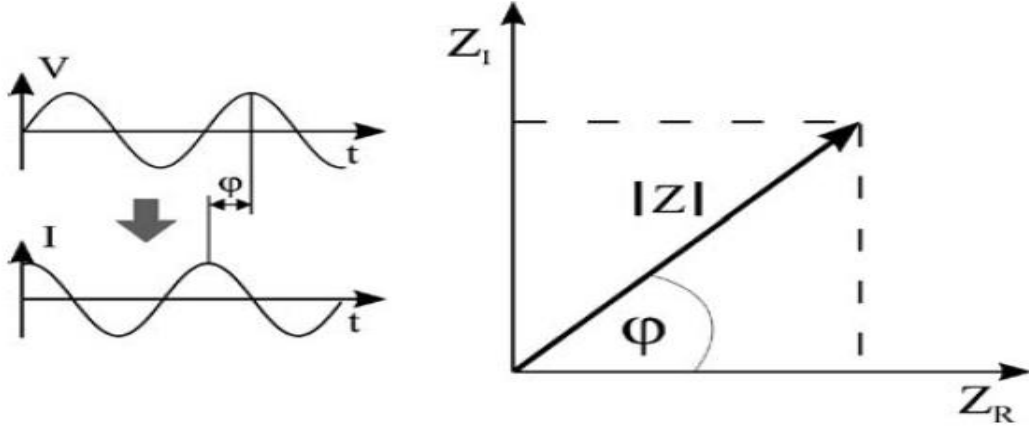
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmek için kullanılan etkili ve kullanışlı bir metottür. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük aktarımı ve membran/çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda sıkça kullanılmaktadır. Biyosensörlerin hazırlanma aşamalarının ve biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif tayini için çok uygundur. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesi yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen yüzey modifikasyonları da takip edilebildiği için oldukça avantajlı bir yöntemdir [14].

Bir sistemin impedansı genellikle küçük genlikli potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. İmpedans için; potansiyel-zaman fonksiyonunun  $V(t)$  akım-zaman  $I(t)$  fonksiyonuna bölümüdür.  $V_0$  ve  $I_0$  maksimum değer ulaştıklarında,  $f$ ; frekans,  $t$ ; zaman,  $\phi$  potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır.  $Y$  ise kompleks iletkenlik veya admittans'tır [14].

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi f t)}{I_0 \sin(2\pi f t + \phi)} = \frac{1}{Y}$$

Şekil 2.6 İmpedans Denklemi [14]

İmpedans kompleks bir değerdir; çünkü akım sadece genlik açısından farklılık göstermekle kalmaz, potansiyel-zaman fonksiyonuyla kıyaslandığında faz kayması da gösterir. Bu yüzden değer ya  $|Z|$  ve faz kayması  $\phi$  ya da reel  $Z_R$  ve imgesel  $Z_I$  olarak tanımlanabilir. Bu durum Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir. Bode grafiği ( $\log f$ ’nin fonksiyonu olarak  $\log Z$  ve  $\phi$ ) veya  $Z_R$  ve  $Z_I$ ’nin olduğu Nyquist grafiği şeklinde belirtilebilir.



Şekil 2.7. İmpedans Eğrisinin Grafikselle İfadesi [14]

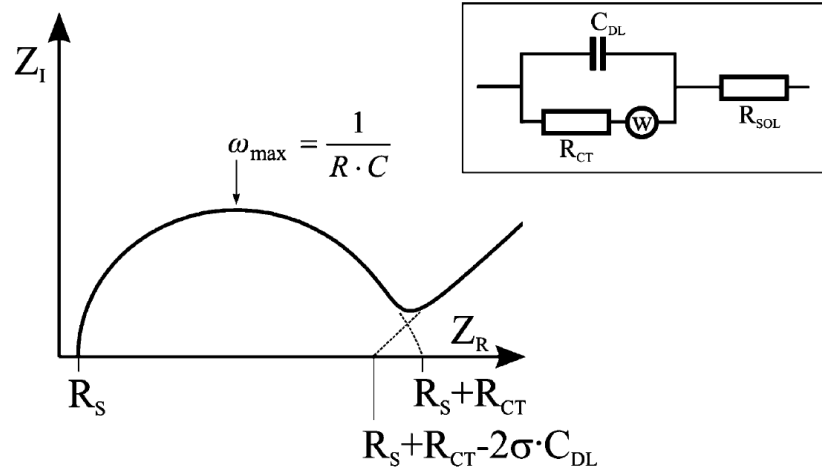
İmpedansın tek bir frekans dışında farklı frekanslarının tayin edilebilmesi sebebi ile “impedans spektroskopisi” adını alır. Bu farklı frekanslar sayesinde; yüzeylerin, tabakaların veya membranların üzerinde gerçekleşen değişimler hakkında bilgi alınabilir. Bu bilgilere ulaşım için çoğunlukla eşdeğer devre sistemleri kullanılarak analizler yapılır. Genellikle direnç ve kapasitans oluşturan bu devre ile sistemin farklı fizikokimyasal özellikleri de görülür. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partiyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda direnç veya kapasitansdaki değişimler çözeltinin bir fonksiyonu olarak tanımlanabilir. Böylece impedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki kurulabilir [15,16].

EIS’de, elektrolit çözelti sistemin tek bileşeni olarak incelendiğinde; impedansı açıklamak için 4 unsur kullanılır. Bunlar, ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg İmpedans’tır. Bu unsurlar Şekil 2.8’de verilmiştir.

İmpedans elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans bağımlılığı
$R$	$Z=R$	$0^\circ$	Hayır
$C$	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	$90^\circ$	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha}$	$0-90^\circ$	Evet
$W$ (infinite)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$ $\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left( \frac{1}{\sqrt{D_0 c_0}} + \frac{1}{\sqrt{D_R c_R}} \right)$	$45^\circ$	Evet

Şekil 2.8. İmpedans Elemanlarının Matematiksel Tanımları [15]

Eşdeğer devreler, deneysel impedans verilerini seri veya paralel düzenlenmiş ideal impedans unsurlarla yaklaşık olarak belirlemek için kullanılır. Çoğu elektrokimyasal sistem bu prosedüre göre analiz edilir. Bir elektrolitle bir elektrodun temasta olduğu bir sistem -Randles devresi- çözelti direnci,  $R_s$ , yük transfer direnci,  $R_{ct}$ , çift tabaka kapasitans  $C_{dl}$  ve Warburg impedans Şekil 2.9’da gösterilen Nyquist grafiğinde  $R_s$  ve  $R_{ct}$  değerleri kolaylıkla belirlenebilir. Çift tabaka kapasitansı ise yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekanstan hesaplanabilir [17].



Şekil 2.9. İmpedans Devresinin Grafiksel İfadesi [15]

Biyolojik bir materyali karakterize etmek için elektrotlar sisteme uygulanmalı böylece elektrokimyasal hücre elde edilmelidir. AC potansiyel uygulanması ile birlikte, akım tüm sistem elemanlarını dolaşmaya başlayacaktır. Ölçülen impedans, bu elemanların bireysel katkılarının bir özettir.

- Biyolojik bir materyalin impedansı ya belirli bir analitin konsantrasyonunun fonksiyonu ya da zamanın bir fonksiyonudur. Her iki durumda da her iki elektrodun impedansı, ölçülecek impedansa kıyasla küçük olmalıdır. Bu da geniş yüzey alanları kullanarak sağlanabilir. Ayrıca, çözeltiden kaynaklanabilecek biyolojik materyalin nonspesifik bağlanmalarından kaçınılmalıdır, çünkü bu durum ara yüzey impedansı arttırır.
- Çalışma elektroduna biyolojik bileşen immobilize edilir ve analitle ilişkisi tayin edilir. Bu tipik bir biyosensör uygulamasıdır. Burada duyar elektrodun impedansı aslında tüm impedansı kontrol eder. Bu yüzden, karşıt elektrodun impedansı belirgin şekilde küçük olmalıdır. Bu da duyar elektroda göre en az 10 kat daha büyük (alan) elektrot kullanılarak sağlanabilir [15, 18].

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörler dört ana sınıfta incelenebilirler;

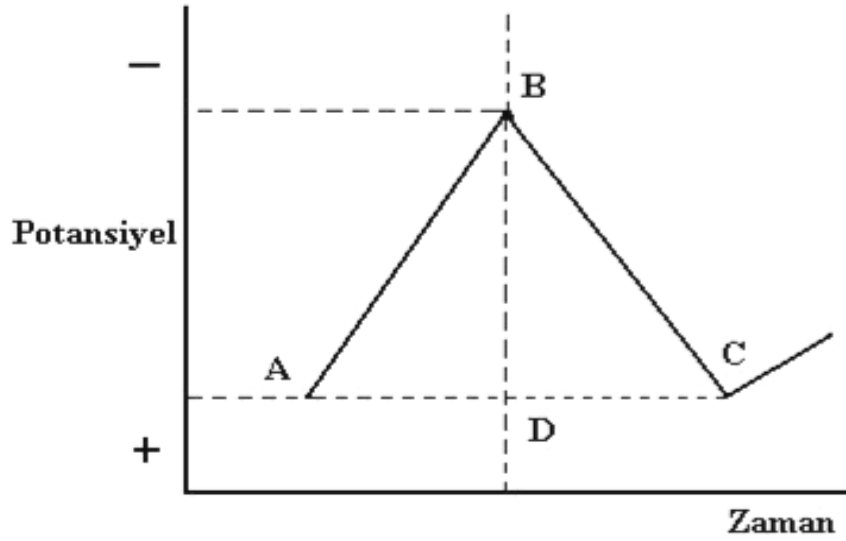
- ✓ Enzim temelli impedimetrik biyosensörler
- ✓ İmmünokimya temelli impedimetrik biyosensörler
- ✓ Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler

- ✓ Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler

Bu çalışmada immünokimya temelli impedimetrik biyosensörler ile çalışılmıştır.

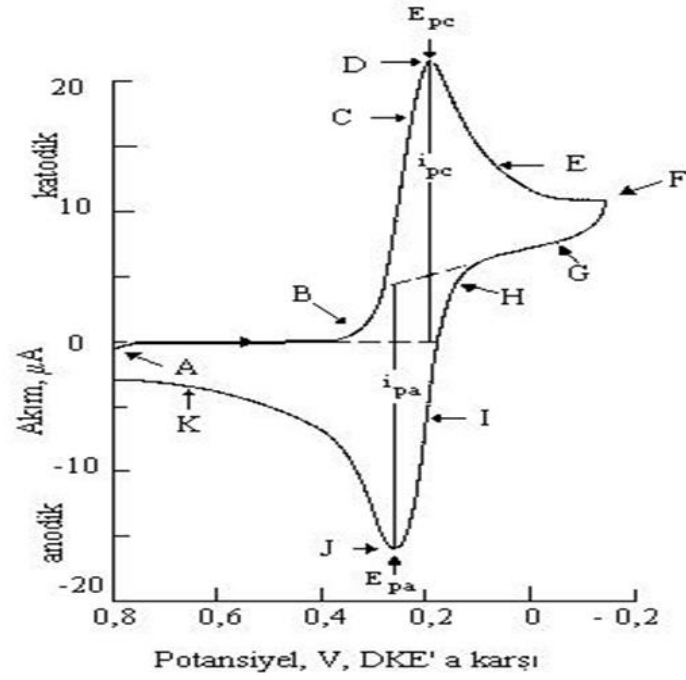
#### 2.4.2. Döngüsel Voltammetri

Döngüsel voltammetride (Cyclic Voltammetry, CV), karıştırılmayan bir çözeltide küçük durgun bir elektrodun akım cevabı üçgen dalga şekilli bir potansiyel (Şekil 2.10) ile uyarılır [19].



Şekil 2.10. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel [19]

Döngüsel voltammetride belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır sonra tarama yönü ters çevrilir ve potansiyel orijinal değerine getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynıdır. Bu uyarma çevrimi birkaç kez tekrarlanır. Ters yöndeki potansiyellere döndürme potansiyelleri denir. Döndürme potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü negatif veya pozitif olabilir. Bu da numunenin bileşimine bağlıdır. Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında Şekil 2.11'deki gibi bir voltammogram elde edilir.



**Şekil 2.11.** Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram [19]

Bu eğri şöyle yorumlanır; gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B'den D'ye kadar olan bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F'de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde konsantrasyonu azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır [19].

## 2.5. Kanser Biyobelirteçleri (Biyomarker)

Biyobelirteçler, karsinogenez süreci sırasındaki kilometre taşlarıdır. Biyobelirteçler, dikkatle tanımlandıkları ve akıllıca seçildikleri takdirde, risk değerlendirmesi ve kanser tanısı için bir fırsat penceresi açarak, kişiselleştirilmiş önleme ve tedaviye doğru gidişi hızlandırabilirler. Doğru biyobelirteçlerin bulunmasındaki anahtar, klinik açıdan yorumlanmış iyi karakterize edilmiş numunelerin, klinik sorulara yanıt verecek doğru çalışma tasarımlarının ve ilişkin tayinlerle veri analizlerinin seçiminde yatar [20].

Uluslararası Kanser Enstitüsüne göre “Kan ve diğer vücut sıvıları normal veya anormal süreçlerde ya da bir hastalık durumunda dokularda bulunan biyolojik bir molekül olarak tanımlanır. Bir biyobelirteç vücudun bir hastalık veya durumunda, tedaviye nasıl yanıt verdiğini takip etmek için kullanılır. Ayrıca biyobelirteçlere, moleküler işaretleyici ve imza molekül de denir. [21]

Bununla birlikte, bu tanımlar geniştir ve halk tarafından anlaşılması kolay olmayabilir. Biyobelirteçler, vücut sıvılarında kanser gibi patolojik bir durumun sinyalini veren anormal bir seviyede bulunan; DNA, RNA, proteinler ve metabolitler dahil miktarı ölçülebilir moleküllerdir. Bir biyobelirteç, kötü huylu tümör tarafından salgılanan bir molekül olabilir ya da vücudun kanserin varlığına karşı özgün bir yanıtı olabilir. Gen diziliminde ya da ifadesindeki ve protein yapısında ve işlevindeki değişiklikler, her tür kanserle ve bunların çeşitli gelişim aşamalarında ilerleyişiyle ilişkilendirilmiştir. Gen ifadesindeki ve protein ifadesi ya da modifikasyonundaki değişimler kanseri saptamak, prognozu belirlemek ve hastalığın ilerlemesiyle terapötik yanıtı izlemek için kullanılır [20, 22].

İnsan vücudu bir denge hali olan homeostazı korumak için çeşitli metabolizmal yollarını çalıştırır. Karsinogenez durumlarında bu denge bozulur ve vücudumuzdaki düzenleyici sistemlerden bazıları çalışmaz. İşte bu gibi durumlarda dokulardaki aşağıda verilen biyolojik moleküller birer biyobelirteç adayı olabilir.

- a) DNA
- b) RNA
- c) Proteinler



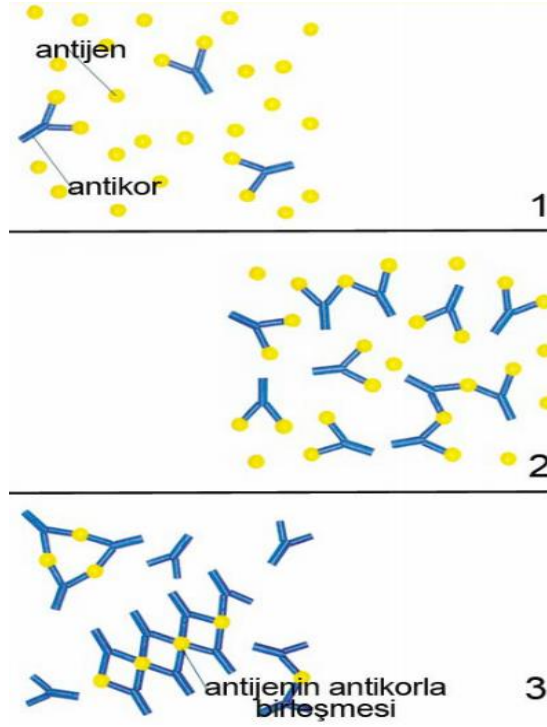
- d) Enzimler
- e) Metabolitler
- f) Hormonlar
- g) Reseptörler
- h) Karbonhidratlar

Bu biyolojik moleküllerin yapılarındaki değişiklikler, artmaları, azalmaları, aldıkları cevaplara bağlı olarak biyobelirteç olarak kullanımları söz konusudur. Aşağıdaki Tablo 2.2’de kanser biyobelirteci olarak kullanılan bazı moleküllerin listesi verilmiştir [20].

**Tablo 2. 2.** Günümüzde kullanılan biyobelirteçler [23]

<b>Günümüzde kullanılan protein ve gen bazlı bazı biyobelirteçler</b>	
<b>Biyobelirteç Adı</b>	<b>Kanser Tipi</b>
AFP	Karaciğer kanseri
BCR-ABL	Kronik ilik lösemisi
BRCA1/BRCA2	Göğüs, Yumurtalık Kanseri
BRAF V600E	Cilt, Kolon Kanseri
CA-125	Yumurtalık Kanseri
CA 19.9	Pankreas Kanseri
CEA	Kolon Kanseri
EGFR	Küçük olmayan hücreli akciğer kanseri
HER-2	Meme kanseri
KIT	Sindirim sistemi stromal kanseri
PSA	Prostat Kanseri
S100	Cilt kanseri
VEGF	Meme Kanseri

Bu moleküllerin tayininde kullanılan analitik teknikler, Şekil 2.13’de görüldüğü gibi antikor ve antijenin bir immün cevap oluşturması üzere spesifik bir şekilde birbirini tanıması esasına dayanır [23].



Şekil 2.12. Antikor-antijen ilişkisi [17]

### 2.5.1. Biyobelirteçlerin Özellikleri

İdeal bir biyobelirteç şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Hassasiyeti yüksek olmalı.
- Tüm hastalık boyunca kesinliği sabit olmalı.
- Yüksek spesifitede olmalı, (+) (-) hata payı minimize olmalı.
- Hastalığın erken teşhisinde kesin cevap vermeli.
- Komplike medikal prosedürlere gerek kalmadan belirleyici olmalı.
- Tarama için kullanılacak yöntem de uygun maliyete sahip olmalı.

Bu özelliklere sahip olan ideal bir biyobelirteç tıpta ve in vitro deneylerde kullanılabilir [23].

## **2.5.2. Biyobelirteçlerin Kullanım Alanları**

### **2.5.2.1. Teşhis**

Kanser biyobelirteçleri, ayrıca spesifik teşhislerde de kullanışlıdır. Özellikle, tümörlerin primer veya metastatik kaynaklı olup olmadığını belirleme gibi durumlarda önemlidirler. Bu ayrımın yapılması ile araştırmacılar, ikincil bölgede bulunanlara karşı, birincil tümör bölgelerinde bulunan hücrelerdeki kromozomal değişiklikleri görüntüleyebilirler. Değişiklikler eşleşirse, ikincil tümör metastatik olarak tespit edilebilir; buna karşın değişiklikler farklı ise ikincil tümör, farklı bir primer tümör olarak tespit edilebilir [24].

### **2.5.2.2. Risk Değerlendirmesi**

Genetik mutasyonlar ya da epigenetik değişiklikler ile ilgili olan kanser biyobelirteçleri, genellikle bireylerin kanser türlerini, ne kadar zamandır var olduklarını kantitatif bir biçimde sunmayı amaçlar. Potansiyel akıllı kanser biyobelirteçlerinin kayda değer örnekleri; kolorektal, yemek borusu, karaciğer ve pankreas kanserine sebep olan gen mutasyonları içerenler için KRAS, p53, EGFR, erbB2; meme ve yumurtalık kanserine sebep olan genler için BRCA1 ve BRCA2; Baskılayıcı tümörlerinin oluşumuna sebep olan genlerin anormal metilasyonu ile oluşan mutasyonlar (beyin kanseri) için p16, CDKN2B ve p14ARF; hipermetilasyonun sebep olduğu gırtlak kanseri için MYOD1, CDH1 ve CDH13; ve hipermetilasyonun sebep olduğu ağız kanseri için p16, p14 ve RB1'dir [25].

### **2.5.2.3. Süreç ve Tedavi Tahmini**

Kanser alanında biyobelirteçlerin başka bir kullanımı da, kanser türü teşhis edildikten sonra gerçekleşecek hastalığın prognozu içindir. Biyobelirteçler burada, belirlenmiş bir kanserin hem saldırganlığına hem de seçilmiş bir tedaviye nasıl yanıt vereceğinin belirlenmesinde yararlı olabilirler. Bunun nedeni kısmen, özel biyobelirteçler sergileyen tümörlerin, bu tümörlerin tanımına veya durumuna bağlı tedavilere duyarlı olabilmesidir [25].

#### **2.5.2.4. Farmakodinamik ve Farmakokinetik**

Kanser biyobelirteçleri ayrıca, bir kişinin kanseri için en etkili tedavi rejimini belirlemek için kullanılır. Çünkü kişilerin genetik yapısındaki farklılıklar, insanların metabolizması ve ilaçların kimyasal yapısına verdikleri cevapları etkiler. Bazı durumlarda, bazı ilaçların metabolizmasının azalması, ilaçların yüksek düzeylerde vücutta birikmesi ile vücutta tehlikeli durumlar yaratabilir. Bu nedenle, kanser tedavisinde, özellikle de ilaç dozajlama kararlarında biyobelirteçlerle taramadan yararlanılmalıdır. Bir örnek, enzim tiyopürin-metil transferaz (TPMPT) kodlayan bir gen dir [26].

#### **2.5.2.5. Tedaviye Verilen Yanıtın İzlenmesi**

Kanser biyobelirteçleri ayrıca, bir tedavinin zamanla ne kadar iyi çalıştığına izlenmesinde yararlıdır. Günümüzde birçok araştırmada, hastaların tedavi sürecinin incelenmesinde BT ve MRI gibi pahalı tekniklerin yerine, daha ucuz maliyete sahip biyobelirteçler kullanılmaktadır.

Dikkat çeken bir biyobelirteç örneği, kötü huylu melanoma tedavisinin izlenmesinde kullanılan S100-beta proteini olarak verilebilir. Böyle melanomalar, deride pigment hücrelerini oluşturan melanositler olarak bulunurlar ve kanser hücrelerinin sayısına bağlı olarak yüksek konsantrasyonda S100 beta proteini üretirler. Tedaviye cevap, bireylerin kanı içerisindeki S100-beta'nın düşük konsantrasyonu ile ilişkilidir [27].

Benzer şekilde, ek laboratuvar çalışmaları, apoptoza uğrayan tümör hücrelerinde de sitokrom c, nükleozomlar, sitokeratin-18 ve E-kaderin gibi komponentlerin salındığını gösterdi. Çalışmalar, makromoleküller ve diğerlerinin kanser tedavisi sırasında dolaşımında bulunmasının, tedavinin izlenmesinde önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir.

### 2.5.2.6. Nüksetme

Kanser biyobelirteçleri ayrıca, kanser nüksünde tahmin ve izlemede kullanılabilir. Oncotype DX göğüs kanseri tahlili, göğüs kanseri nüksetme olasılığını öngörmek için kullanılan HER-2 biyobelirtecine bağımlı bir testtir. Bu test, hormon tedavisi ile tedavi edilecek erken evre olan kadınlar için (Evre 1 ve 2) tasarlanmıştır. Oncotype DX, tümör biyopsisi sırasında alınan hücrelerde, 21 gene bir panelde bakar. Testin sonuçları, 10 yılda tekrarlama olasılığını gösteren bir nüks puanı şeklinde alınır [28].

### 2.5.2.7. Geliştirilen İlaçların İzlenmesi

Kanser teşhisinde kullanımlarına ilave olarak, biyobelirteçlerin genellikle kanser ilaç keşfinde de kullanımları mevcuttur. Örneğin, 1960 yılında, araştırmacılar kronik miyeloid lösemisine sahip hastaların çoğunda, Philadelphia kromozomu olarak adlandırılan kromozom 9 ve 22’de belirli bir genetik anormallik keşfetti. Bu iki kromozom bir araya geldiğinde, BCR-ABL olarak bilinen kansere neden olan bir gen oluşturur. Böyle hastalarda, bu gen lösemi fizyolojik belirtileri tüm prensibi başlangıç noktası olarak işlev görür. Uzun yıllar boyunca, BCR-ABL lösemisinin belirli bir alt tipini derecelendirmek için biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, ilaç geliştiricileri sonunda bu proteini inhibe eden güçlü bir ilaç olan ve belirgin olarak Philadelphia kromozomu içeren hücrelerde azalmasını sağlayan Imatinib ilacını geliştirdiler [28].

### 2.5.3. Biyobelirteç Arayışı

40’den fazla laboratuvar ve 300’den fazla araştırmacıdan oluşan bir konsorsiyum olan ABD Ulusal Kanser Enstitüsü Erken Yakalama Araştırma Ağı biyobelirteçlerin geliştirilmesi, değerlendirilmesi ve onaylanması için beş aşamalı yaklaşım olarak bilinen rehber ilkeler belirlemiştir. Bu rehber ilkeler biyobelirteçlerin klinik uygulamalara geçişini kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Buradaki beş aşama kanserde risk değerlendirmesi ve erken yakalamada klinik kullanımı amaçlanan biyobelirteçlerin onaylanması için ilkeler ve inceleme tasarımı temelleri sağlamaktadır [29].

Bunlardan “keşif adımı” olarak da geçen ilki, potansiyel olarak uygun biyobelirteçlerin belirlenmesi aşamasıdır. Bu aşamada normal hücre ile tümörlü hücrelerin protein ekspresyonları karşılaştırılarak baskılanmış ya da yok edilmiş oldukları

tespit edilir. İkinci aşama “doğrulama” aşamasıdır. Bu aşamada ilk basamakta elde edilen çıplak protein alınarak diğer bir örnekten elde edilmeye çalışılır. Üçüncü aşamada dokulardan elde edilen biyobelirteçlerin kanser teşhis etme kapasiteleri ölçülür. Dördüncü aşamaya gelindiğinde biyobelirtecin kanseri erken teşhis edip edemediği ölçülür. Bu ölçümlerin spesifikliğı ve tekrar edilebilirliğı oldukça önemlidir. Ve son aşama olarak biyobelirtecin insanlar üzerinde işe yarayıp yaramadığı test edilir [29, 30].

Kanser biyobelirteci testleri bağlamında, bir biyobelirtecin duyarlılığı, biyobelirteç için pozitif çıkan vaka öznelerinin (hastalığı teyit edilmiş olan bireyler) oranına atıfta bulunmaktadır. Seçicilik (özgüllük) biyobelirteç için negatif çıkan kontrol öznelerinin (hasta olmayan bireyler) oranına atıfta bulunmaktadır [29]. İdeal bir biyobelirteç testinin duyarlılığı ve seçiciliğı %100 olacaktır; yani, kanserli olan her bireyin testi pozitif, kanser olmayan her bireyin testi negatif olacaktır. Duyarlılık ne kadar düşükse, kanserli bireylerin saptanamama sıklığı o kadar fazla olur. Seçicilik ne kadar düşükse, kanser olmayan bireylerin testinin pozitif çıkması sıklığı o kadar fazla olur. Şu andaki mevcut biyobelirteçlerin hiç biri % 100 seçiciliğe ve duyarlılığa erişememiştir. Örneğın, şu anda prostat kanserinin tanımlanmasında en iyi serum biyobelirteci olan prostata özgü antijenin (PSA) duyarlılığı yüksek (% 90’dan fazla) fakat seçiciliğı düşüktür (yaklaşık % 25); bu da saptanabilir bir prostat kanseri olmayan erkeklere biyopsi yapılması sonucunu vermektedir [31]. Meme kanserine yönelik serum tümör biyobelirteci CA15.3’ün duyarlılığı sadece % 23 ve seçiciliğı % 69’dur ve sadece ileri meme kanseri ya da tekrarlamasına yönelik terapilerin izlenmesinde yararlıdır [32]. Sık kullanılan diğer terimler, testi pozitif olan bir kişinin kanser olma olasılığı olan pozitif tahmin değeri ve testi negatif olan bir kişinin kanser olmama olasılığı olan negatif tahmin değeri. Pozitif tahmin değeri ve daha düşük bir derecede, negatif tahmin değeri taranan popülasyonda hastalığın prevalansından etkilenir. Verimli bir duyarlılık ve seçicilik için, prevalans ne kadar yüksekse, pozitif tahmin değeri o kadar yüksek olacaktır. Erken Yakalama Araştırma Ağı, yukarıda tartışılan tanısal performans kriterleri ve mevcut bakım uygulamasına kıyasla artan yararlar, maliyet ve hastalarla bakıcılar tarafından benimsenme gibi başka unsurlar temelinde belirli bir kanser türü için biyobelirteç hattı oluşturur [33]. Aday biyobelirteçler bir kez tanımlandıktan sonra, erken yakalama, tanı ya da prognoz gibi, hedeflenen klinik amaca ulaşabileceğini doğrulamak için, Erken Yakalama Araştırma Ağı tarafından toplanan numune referans kümelerine tabi tutulur.

Hedeflenen amaç için önceden belirlenen kriterler karşılanıyorsa, belirteçler bir sonraki aşamaya geçerler [29].

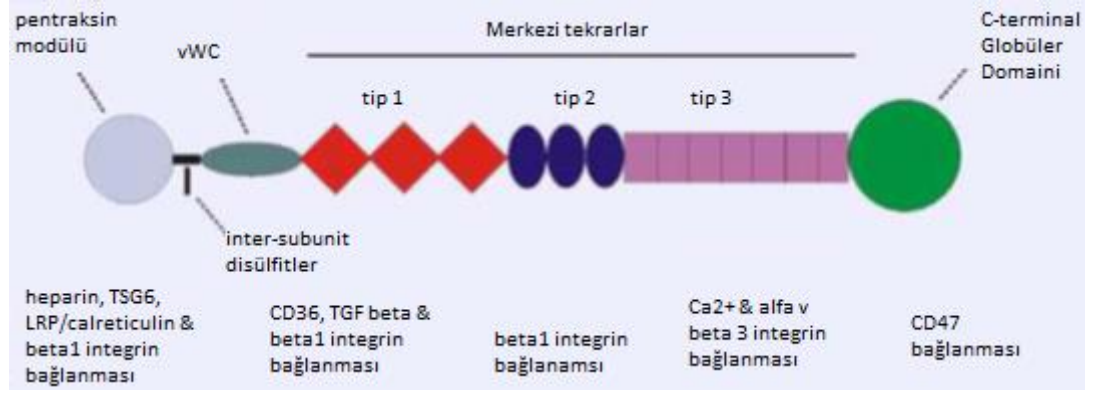
#### **2.5.4. Gelecekteki Yönelimler**

Tek bir biyobelirtecin erken yakalamada yararlı olabilecek kadar duyarlılığı ve seçiciliği olmayabileceği için, muhtemelen tek bir tanısal belirteçten daha iyi sonuç verecek şekilde markerlerin çoğullanmasına ilgi duyulmaktadır (yani eş zamanlı kullanılmak üzere bir belirteçler paneli oluşturulması). Diyagnostik şirketleri bazı biyobelirteçlerin tek bir platformda analizine olanak sağlayan esnek teknoloji platformları geliştirmektedir [33]. Bu çoğul platformlar bir protein ya da nükleik asit biyobelirteçleri panelini eşzamanlı olarak analiz etmek üzere tasarlanmaktadır. Bu çoğullama yaklaşımı numunelerin zaman alan elle işlenmesi sorununu ortadan kaldırmakta, analizlerin daha hızlı, daha verimli ve daha kolay yapılmasını sağlamakta ve gerçek zamanlı veri eldesine ve etkili numune karşılaştırmasına olanak sağlamaktadır.

Biyochip teknolojisindeki bir başka önemli yenilik, serum proteinlerinin ifadesinin ticari enzim bağlantılı immünosorbent tayanlarıyla kıyaslanabilir, bir biyobelirtecin düzeyini saptamak için antikorların kullanıldığı mikro akışkanlı chip bazlı immün tayindir. Bununla birlikte, tayan koşullarının optimize edilmesinde çoğullama zorlu bir iş olabilmektedir ve halen böylesi çok boyutlu ve yüksek hacimli verilerin incelenmesinde etkili araçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Sürekli bir dikkat ve destek, açık çapraz disiplinli, çok kuruluşlu işbirliği ile kanseri erken yakalamada doğru ve yararlı olacak biyobelirteçlerin bulunması ve geliştirilmesinin önündeki sorunlar ve kanser riski azalacak ve uzun zamandır beklenen, yeni daha az invaziv olan araçlar klinik kullanıma sokulacaktır.

#### **2.6. Trombospondin-1 (THBS1 veya TSP1)**

Trombospondin-1,'in prekürsörü 1170 amino asit içeren 129 412 Dalton'luk bir proteindir. Katlanmış protein yapısı, disülfid bağları içeren bir homotrimerdir. Bu proteinin işlevsel hali, 12 Asparajin'e bağlı mono, bi-, tri- veya tetramer kompleks oligosakkarid içeren; moleküler ağırlığı 150-180 kDa arası değişen bir glikoproteindir [30].



**Şekil 2.13.** Trombospondin-1 Proteini [30]

THBS1, embriyolojik gelişme sırasında birçok dokuda eksprese edilir fakat sağlıklı bir yetişkinde belirli bir miktarda eksprese edilir. THBS1, alfa platelet granüllerinde en çok bulunan proteindir fakat normal plazma seviyeleri oldukça düşüktür. Sağlıklı bir insanın kan plazmasında genellikle 100-200 ng/mL seviyesinde bulunurlar. Diğer hücre türlerinde; yaralanma, doku yenilenmesi, aterosklerotik zedelenmeler ve tümör oluşumu gibi durumlarda ekspresyonu artar [30].

THBS1, ekstrasellüler matrikse anlık olarak salgılanır fakat buradan hızlı bir şekilde fibroblast ve endotelial hücrelere gönderilir. Trombospondin-1, megakaryositlerde ve plateletlerde bol miktarda bulunur ancak esas olarak kan damarlarının subendotelial matriksinde sürekli olarak eksprese edilir [31].

THBS1, fibrinojen, fibronektin, laminin, tip 5 kollajen ve alfa-V/beta1 integrinlere bağlanarak vücut mekanizmalarında yer almaktadır. Platelet agregasyonunda, anjiyogenezde ve tümörjenezde rol oynamaktadır [32].

Uluslararası Kanser Enstitüsü, Erken Yakalama Ağı'nda belirtildiği üzere, THBS1 prostat kanseri hastalığı olan hastalarda yüksektir. THBS1, kanser pre-diagnostik çalışmaları klinik faz 2'dedir ve hala devam etmektedir. Kandaki THBS1 düzeylerinin ölçümü ile gereksiz biyopsilerin sayısının azalması ve teşhisin konulması amaçlanmaktadır [33].





# Early Detection Research Network

Biomarkers: the key to early detection

DCP Division of Cancer Prevention

[Log in](#)

- Home
- About EDNRN
- Biomarkers
- Protocols
- Science Data
- Publications
- Resources
- Specimens

- Network Consulting Team
- Informatics
- Collaborative Groups
- Public, Patients, Advocates
- Funding Opportunities
- Sites
- Member Directory
- Committees

You are here: [Home](#) / [Biomarkers](#) / THBS1

## THBS1

- Basics
- Organs
- Studies
- Publications
- Resources
- Biomuta

The following organs have data associated with this biomarker...

Prostate

### Overview

Blood protein markers that provide more accurate or earlier diagnosis of prostate cancer should have a positive impact on prostate cancer treatment and management. Experimental evidence shows that thrombospondin-1 levels are elevated in patients with benign prostatic disease and repressed in patients with prostate cancer. Thrombospondin-1 levels do not correlate with prostate-specific antigen (PSA) levels and differentiate benign from malignant disease with 79% sensitivity and 81% specificity. The measurement of thrombospondin-1 could be used to assist the decision to obtain a biopsy in men with suspected prostate cancer, which could lead to a reduction in the number of unnecessary prostatic biopsies.

ATTRIBUTES	
Phase:	Two
QA State:	Accepted

Şekil 2.14. EDNRN web sitesindeki THBS1'in genel özellikleri [38]

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan biyobelirteç Trombospondin-1 (THBS-1) human ve bu biyobelirtece özgü sentezlenen Anti-Trombospondin-1 (Anti-THBS-1), Glutaraldehit (% 25), 6-merkaptohexanol, epiklorohidrin, etanolamin, potasyum ferrisiyanat ve potasyum ferrosiyanat kimyasalları Sigma-Aldrich Co. LLC (Amerika Birleşik Devletleri)'den temin edilmiştir. Potasyumklorür, Di-potasyum hidrojen fosfat, Sodyum hidrojen fosfat, Etanol (Absolute % 99) Merck KGaA (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Tüm sarf malzemeler Interlab Lab. Ürün Sanayi ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Kullanılan çözeltiler deneyler esnasında taze olarak hazırlanmıştır. Biyobelirteçler ve antikolar istenilen konsantrasyonlarda hazırlanarak -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

##### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz Ekipmanı

Çalışma elektrodu olarak 2.01 mm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip altın elektrot, referans elektrot olarak KCl ile doygunlaşmış 3 M Ag/AgCl elektrot ve yardımcı elektrot olarak ise 10 mm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Tüm elektrotlar BASI, Warwickshire, UK firmasından temin edilmiştir. Ölçümler ise döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments,

Warminster, USA) bir bilgisayara bağılı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında yapılmıştır.

Deneylerde Biyokimya araştırma laboratuvarında bulunan ultrasonik su banyosu (WiseClean DAIHAN), hassas terazi (Precisa XB 220A), mikropipetler (Eppendorff mikropipet), manyetik karıştırıcı (Biosan MSH 300), pH-metre (Jenco pH metre 6173) kullanıldı.

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

**50 mM Fosfat Tamponu (pH=7.0):** 3.549 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılır, destile su ile 500 mL'ye tamamlanır. 3.4015 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartılır, destile su ile 500 mL'ye tamamlanır. Bu iki çözelti pH 7.0 olacak şekilde karıştırılır.

**5 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ :** 0.4116 g tartılır, fosfat tamponu ile 250 mL'ye tamamlanır.

**5 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ :** 0.5280 g tartılır, fosfat tamponu ile 250 mL'ye tamamlanır.

**0.1 M KCl:** 3.7275 g tartılır, 500 mL'ye  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1:1) çözeltisi ile tamamlanır.

**0.4 M NaOH:** 1.6 gr tartılarak, saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

**% 2.5'luk Glutaraldehit:** % 25'lik çözeltisinden 5  $\mu\text{L}$  alınarak, fosfat tamponu ile 100  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanır.

**0.5 M Etanolamin:** 23.68 M'lık çözeltisinden 21.11  $\mu\text{L}$  alınarak, fosfat tamponu ile 1 mL'ye tamamlanır.

**% 20'lik Epiklorohidrin:** Ana stoktan 200  $\mu\text{L}$  alınarak, 0.4 M NaOH çözeltisi ile 1 mL'ye tamamlanır.

**20 mM 6-Merkaptohekzanol:** 500 mM'lık ana stoktan 600  $\mu\text{L}$  alınarak, etanol ile (% 99'luk) 15 mL'ye tamamlanır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Elektrot Temizliği

Au çalışma elektrodu her kullanımdan önce fiziksel olarak ve gerekli durumlarda kimyasal olarak temizlenir. Temizlik aşamaları aşağıdaki gibidir.

### **Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile Günlük Elektrot Temizliği**

Elektrotlar her çalışma öncesinde ve sonrasında bu işlem ile temizlenir. Yarım spatül alümina (<50 nm) kadife yüzey üzerine alınır ve üzerine 2 damla ultra saf su eklenir. Au elektrot ilk 20 saniye daireler çizilerek ve geri kalan 100 saniye ‘8’ hareketi çizilerek yüzeye uygulanır. Saf su ile yıkanan elektrot, 5 dakika boyunca ultra saf su içerisinde sonikatörde inkübe edilir. Tekrar saf su ile yıkanan Au elektrot etanol ile yıkanır. Daha sonrasında etanol içerisinde sonikatörde 6 dakika boyunca inkübe edilir. Sonrasında elektrot bol saf su ile yıkanır ve argon gazı ile kurutulur. Elektrodun “yalın” olarak EIS ölçümü yapılarak temizlik kontrol edilir.

### **Elektrokimyasal Temizlik**

Elektrotlar, 50 mM 10 mL’lik HCl çözeltisi ile Döngüsel Voltammetri yöntemi kullanılarak temizlenir. Yöntem parametreleri şu şekildedir; Scan Limit 1 -500 mV, Scan Limit 2 1500 mV, Scan Rate 100 mV/s, Cycles :10

Bu temizlik sonrası elektrotlar bol saf su ile yıkanır ve ultra saf su içerisinde sonikatörde 5 dk inkübe edilir.

### **3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi ve Ölçüm Sistemi**

Geliştirilen biyosensör sisteminde uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu yapmak için döngüsel voltammetriden (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. CV için potansiyel aralığı -0.5 & 1.0 V olarak seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5.0 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltammetredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10 000-0.05 Hz aralığındadır.

Antikoron elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki aşama biyobelirteçlerin elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlamaktır. İmmobilizasyon sonrası standart THBS-1 konsantrasyonu (50 ng/mL) elektrot yüzeyine mikropipet ile her defasında 5 µL olacak şekilde ilave yapılmıştır. Her inkübasyon periyodundan sonra elektrot yüzeyinde bağlanmamış biyobelirteçleri uzaklaştırmak için elektrot ultra saf su ile yıkanarak ve Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup> redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede CV ve

EIS ölçümleri alınmıştır. Her ölçüm öncesinde ve sonrasında elektrotlar ultra saf su ile temizlenip, argon gazı ile kurutulmuştur.

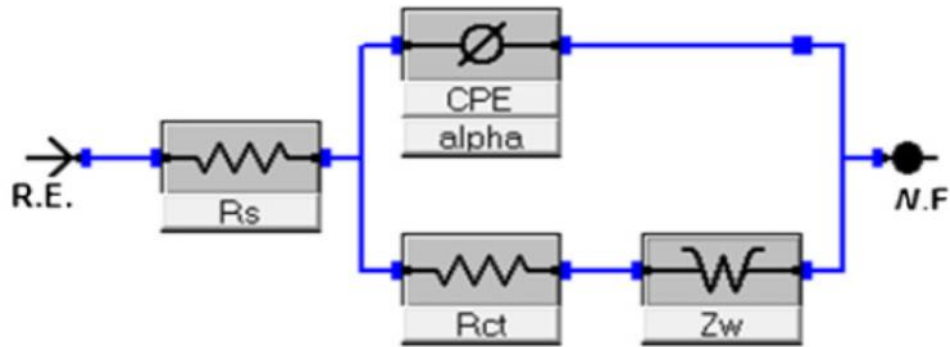
### 3.2.3. Hesaplamalar

İmmobilizasyon basamaklarının kontrolü ve THBS-1 tayininin gerçekleştirilmesi için impedans (alternatif akıma karşı direnç) yöntemini kullanıldığından elde edilen Nyquist eğrilerinin bir eş-değer devre vasıtası ile anlamlı sayısal değerlere dönüştürülmesi gerekmektedir.

#### 3.2.3.1. Eşdeğer Devre Modeli Çizimi

Hesaplanacak sayısal değerlerden tayin için en önemli olanı aynı zamanda yaklaşık olarak Nyquist eğrisinin de çap değerine tekabül eden elektrot yüzeyine olan “yük transfer direnci ( $R_{ct}$ )” ifadesidir. Yapılan çalışmalar ve literatürlerde yer alan makaleler yük transfer direnci ile yüzeydeki madde miktarı arasında doğru orantı bulunduğunu göstermektedir [34].

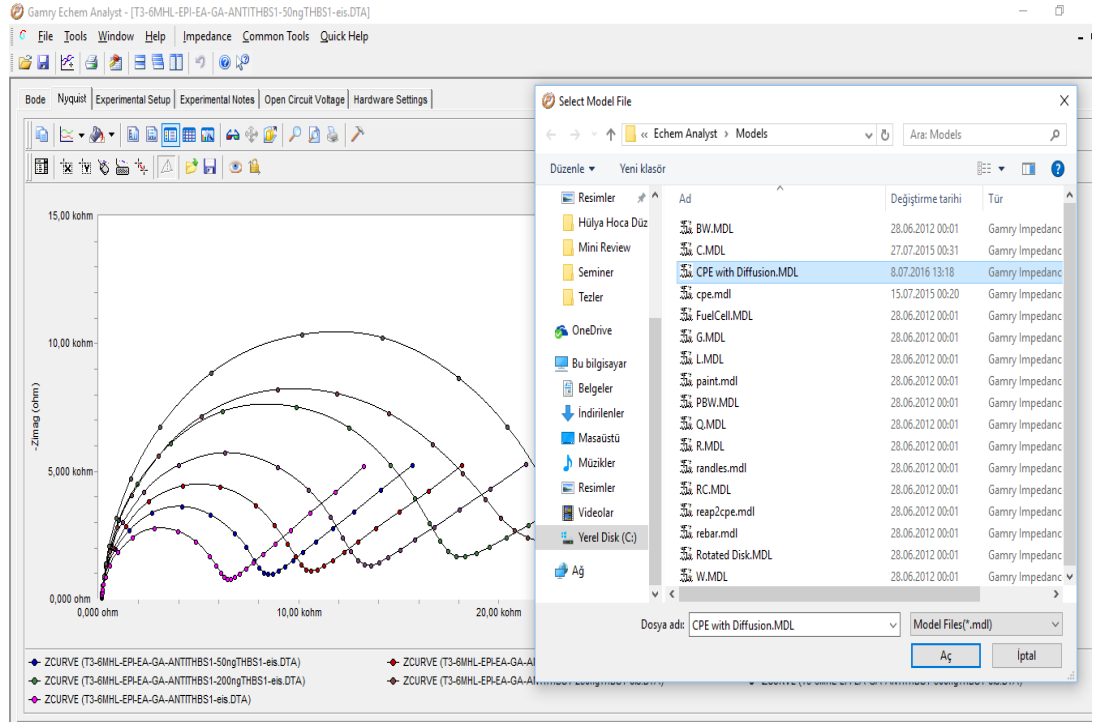
Bu çalışmada Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elektrot yüzeyine uygun eşdeğer devre modeli çizilmiş ve yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Nyquist eğrilerinin sayısal değerlere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Şekil 3.1 üzerinde bulunan  $R_s$  Çözelti Direncini,  $Z_w$  Warburg İmpedansını, CPE-alpha sabit faz elemanı kapasitansı,  $R_{ct}$  ise yük transfer direncini göstermektedir.



Şekil 3. 1. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre modeli

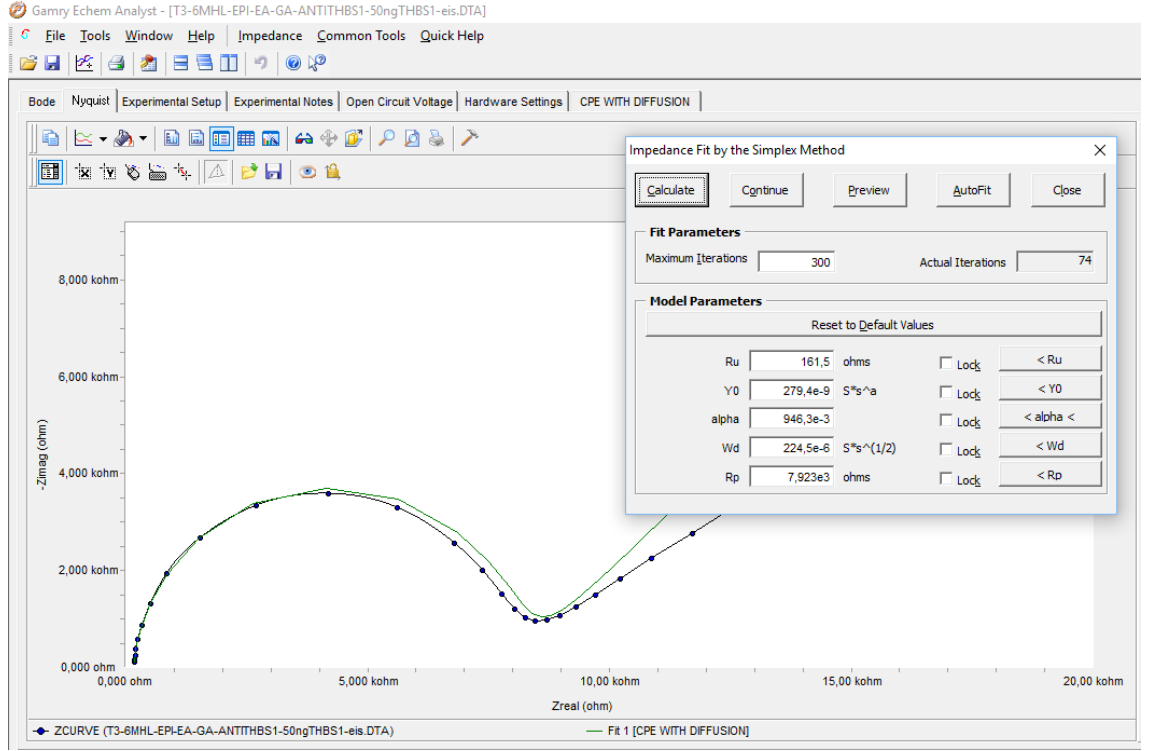
### 3.2.3.2. Yük transfer direncinin ( $R_{ct}$ ) hesaplanması

Değeri hesaplanması istenilen Nyquist diyagramı Gambry Analyst® yazılımında açılır. Sonra bu yazılımın üst menüsündeki impedans sekmesinden bir “Fit A Model (Simplex Method)” seçilir. Burada açılan daha önceden hesaplama yöntemi belirlenmiş devre sistemlerinden bu çalışmaya uygun olan “CPE with Diffusion” devresi seçilir (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri

Uygun devre sistemi seçildikten sonra açılan hesaplama ekranındaki değerlerin sıfırlanması için “reset to default values” düğmesine basılır (Şekil 3.3). Son olarak da hesaplama yapılması için aynı ekran üzerinde bulunan “calculate” düğmesine basılır. Ortaya çıkan hesaplama eğrisi, deneysel çalışmalar sonucu elde edilen Nyquist eğrisine uyana kadar “calculate” düğmesine basılmaya devam edilir.



**Şekil 3.3.** Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı

Son olarak hesaplama ekranında bulunan ve yük transfer direncine karşılık gelen  $R_p$  değerleri her bir Nyquist eğrisi için kaydedilir.

Yük transfer direnci değerleri ( $R_p$  veya  $R_{ct}$ ) ile yüzeye bağlanan madde miktarı arasında doğru orantı olduğu yapılan önceki çalışmalar ile kanıtlandığından dolayı hesaplanan bu  $R_p$  değerleri bu aşamadan sonraki tüm kantitatif tayinlerde kullanılmıştır [34, 35].

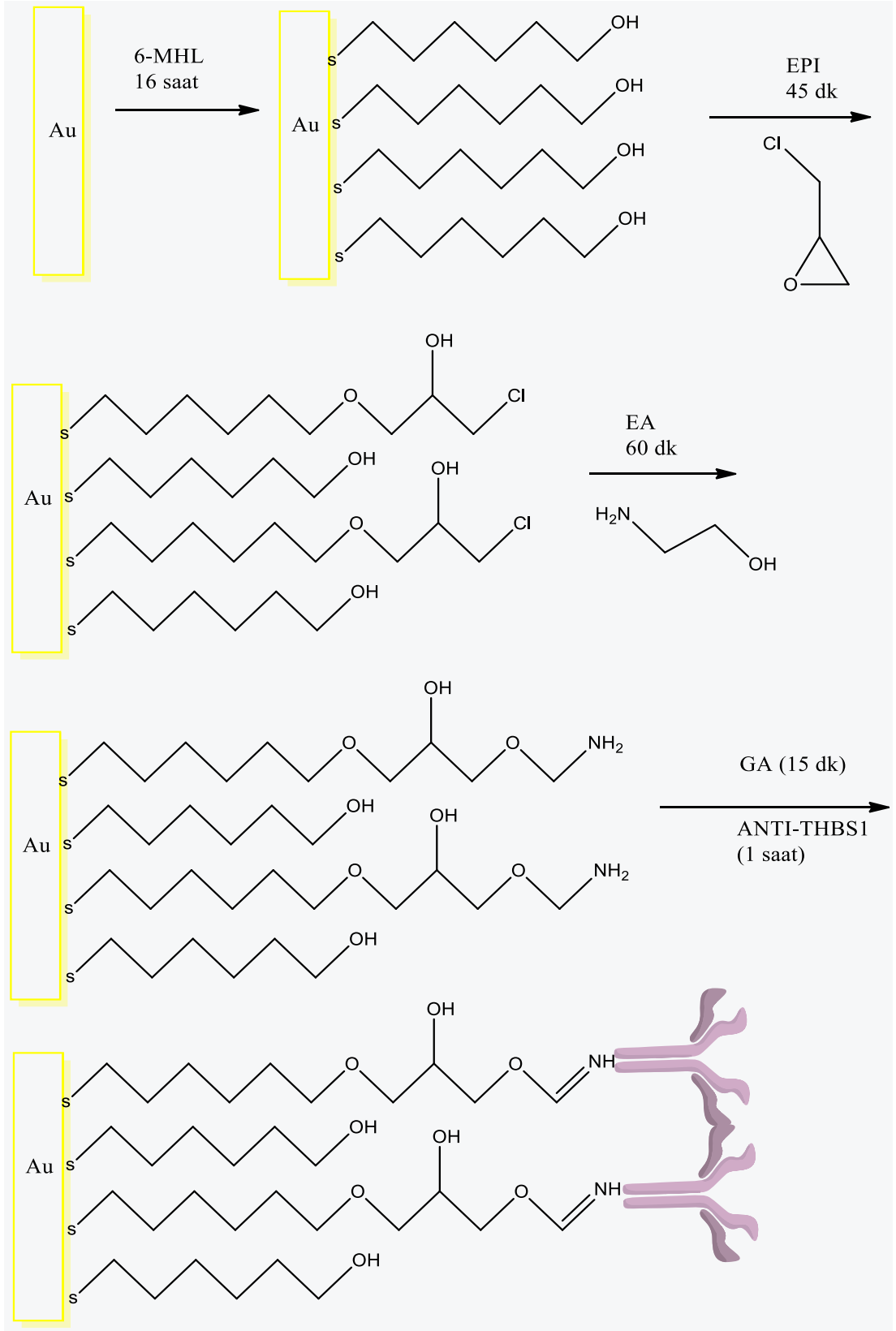
### 3.2.4. Trombospondin-1 Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanması

Öncelikle temiz Altın (Au) elektrot, kendiliğinden oluşan tek tabakaların (SAM) meydana gelmesi için etanolde çözülmüş 20.0 mM 6-Merkaptoheksanol (6-MHL) içerisine daldırılarak 16 saat inkübe edildi. Sonrasında bağlanmamış 6-MHL birimlerini uzaklaştırmak için elektrot etanol ve bidistile su ile yıkandı. 6-merkaptoheksanol'ün elektroda bağlanmayan fonksiyonel ucundaki hidroksil gruplarını aktifleştirmek amacıyla 0.4 M NaOH içerisinde hazırlanmış % 20'lik Epiklorohidrin çözeltisi elektrot yüzeyine 5  $\mu$ L damlatılarak 45 dk bekletildi. Epiklorohidrinin 6-merkaptoheksanole bağlanmamış klor ucunu daha işlevsel hale getirmek için 100 mM pH=7.0 fosfat tamponunda

hazırlanmış 0.5 M Etanolamin çözeltisinin 5 µL'si elektrot yüzeyine damlatıldı ve 1 saat bekletildi. Etanolamin bağlanmayı hidroksil ucundan gerçekleştirdiğinden dolayı amin ucu açıkta kalır. Bu amin grubunu antikor ile çapraz bağlamak için 100 mM pH= 7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış % 1.25'lik glutaraldehit çözeltisinin 5 µL'si elektrot yüzeyine damlatıldı ve 15 dk bekletildi. Sonrasında 50 ng/mL konsantrasyonundaki Trombospondin-1'e spesifik antikor çözeltisinin 5 µL'si elektrot yüzeyine damlatıldı ve 60 dk inkübe edildi. Son olarak Trombospondin-1'in 50.0 ng/mL konsantrasyonundaki çözeltisinin 5 µL'si porsiyonlar halinde eklendi ve her bir ekleme için bir saat bekletildi. Bu basamakların her birinde hem inkübasyon sonrası hem de damlatmalar öncesinde elektrot önce bidistile su ile sonrasında da ultra saf su ile yıkandı. Her bir adımda döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri alındı ve eş değer devre modeline göre  $R_{ct}$  değerleri hesaplandı.

İmmobilizasyon aşamaları ve elektrot yüzeyi şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Bu immobilizasyon yönteminin başlangıcında bulunan 6-merkaptotetrazole ait hidroksil grubunun epiklorohidrin ile aktivasyonu ve sonrasındaki eter oluşumu Barldrich ve ark. tarafından merkaptotetanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir [36]. Ayrıca aynı çalışmada epiklorohidrin basamağını takip eden basamakta yer değiştirme tepkimesi için kitosan kullanılmıştır [36]. Bu çalışmada ise daha önceden Asav E. tarafından gerçekleştirilen reaksiyon tekrarlanmıştır [42,43]. Burada epiklorohidrin üzerinde bulunan klor, etanolaminin hidroksil grubu ile yer değiştirme tepkimesi verir ve aşağıda gösterildiği gibi bir eter oluşur. Sonrasında ise etanolaminin amin grubu glutaraldehit üzerinde bulunan aldehit gruplarından biri ile etkileşerek Schiff bazı oluşturur. Glutaraldehitin diğer aldehit grubu antikor üzerinde bulunan aminoasitlerle etkileşerek Schiff bazı oluşturur. Böylelikle kovalent bağlanmalar gerçekleşmiş ve antikor elektrot yüzeyine tutturulmuş olur.





Şekil 3.4. THBS-1 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi

### **3.2.5. Trombospondin-1 Biyosensörünün İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu**

#### **3.2.5.1. 6-Merkaptohekzanol (6-MHL) Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

Elektrot yüzeyinde kararlı ve dayanıklı SAM (Self Assembly Monolayer) oluşturmak için 6-MHL'ün çeşitli konsantrasyonları ile çalışılmıştır. 6-MHL'ün **2 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM'lık** konsantrasyonları hazırlanarak biyosensör sisteminde denenmiştir. Bulunan Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ve THBS-1 konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu çalışmada, konsantrasyonların biyosensöre etkisinin gözlenebilmesi için % 20'lik Epiklorohidrin, 0.5 M Etanolamin, % 1.25'lik Glutaraldehit, 50 ng/5 $\mu$ L Anti-THBS-1 ve 50 ng/mL THBS-1 sabit olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5.2. Epiklorohidrin (EPI) Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

6-MHL'ün uçlarına bağlanarak onları aktif hale getirmesi amaçlanan epiklorohidrinin optimum konsantrasyonun belirlenme çalışması yapılmıştır. EPI'nin, **% 5, % 10, % 15 ve % 20'lik** konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Bulunan Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ve THBS-1 konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu çalışmada, konsantrasyonların biyosensöre etkisinin gözlenebilmesi için 10 mM 6-MHL, 0.5 M Etanolamin, % 1.25'lik Glutaraldehit, 50 ng/5 $\mu$ L Anti-THBS-1 ve 50 ng/mL THBS-1 sabit olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5.3. Etanolamin (EA) Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

Epiklorohidrinin uçlarına bağlanacak optimum etanolamin konsantrasyonun belirlenmesi için çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan etanolamin çözeltileri kullanılmıştır. Etanolaminin, **0.5 M, 1 M ve 2 M'lık** konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Bulunan Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ve THBS-1 konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu çalışmada, konsantrasyonların biyosensöre etkisinin gözlenebilmesi için 10 mM 6-MHL, % 15 Epiklorohidrin, % 1.25'lik Glutaraldehit, 50 ng/5 $\mu$ L Anti-THBS-1 ve 50 ng/mL THBS-1 sabit olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5.4. Glutaraldehit (GA) Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

Amin gruplarının aktifleştirilmesi için kullanılan glutaraldehit miktarının belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyon çalışması yapıldı ve **% 1.0, % 1.25 ve % 1.5'lük** Glutaraldehit konsantrasyonları denendi. Bulunan Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ve THBS-1 konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu çalışmada, konsantrasyonların biyosensöre etkisinin gözlenebilmesi için 10 mM 6-MHL, % 15 Epiklorohidrin, 1 M Etanolamin, 50 ng/5 $\mu$ L Anti-THBS-1 ve 50 ng/mL THBS-1 sabit olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5.5. Anti-Trombospondin-1 Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

Biyosensör sistemine bağlanacak uygun antikor miktarının belirlenmesi amacı ile Anti-THBS-1'in çeşitli konsantrasyonları ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. Anti-THBS-1'in, **25 ng/5 $\mu$ L, 50 ng/5 $\mu$ L ve 100 ng/5 $\mu$ L'lik** konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlanmıştır. Bulunan Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ve THBS-1 konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu çalışmada, konsantrasyonların biyosensöre etkisinin gözlenebilmesi için 10 mM 6-MHL, % 15 Epiklorohidrin, 1 M Etanolamin, % 1.25'lik Glutaraldehit ve 50 ng/mL THBS-1 sabit olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5.6. Trombospondin-1 Süresinin Optimizasyonu**

Trombospondin-1'in biyosensör sistemine bağlanmasının süreye bağlı değişimleri karşılaştırılmıştır. Trombospondin-1, **30 dk, 45 dk, 60 dk ve 90 dk'lık** inkübasyon sürelerindeki bağlanma etkileri ölçülmüştür. Bulunan Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ve THBS-1 konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu çalışmada, konsantrasyonların biyosensöre etkisinin gözlenebilmesi için 10 mM 6-MHL, % 15 Epiklorohidrin, 1 M Etanolamin, % 1.25'lik Glutaraldehit ve 50 ng/5 $\mu$ L Anti-THBS-1 sabit olarak kullanılmıştır.

### **3.2.6. Trombospondin-1 Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı**

Optimize edilen her bir immobilizasyon basamağı kullanılarak hazırlanan biyosensör için belirlenen tayin aralığı 50-300 ng/mL'dir. Bu çalışmada biyosensör, 10 mM 6-MHL (16 saat), % 15'lik EPI (45 dk), 1 M EA (1 sa), % 1.25 GA (15 dk) ve 50 ng/5µL Anti-THBS-1 kullanılarak hazırlanmıştır.

#### **3.2.6.2. Tekrar Üretilirlik**

Optimize edilen her bir immobilizasyon basamağı kullanılarak dokuz farklı biyosensör hazırlanmıştır ve 50-300 ng/mL THBS-1 tayin aralığında ölçümler alınmıştır. Bu çalışmada biyosensör, 10 mM 6-MHL (16 saat), % 15'lik EPI (45 dk), 1 M EA (1 sa), % 1.25 GA (15 dk) ve 50ng/5µL Anti-THBS-1 kullanılarak hazırlanmıştır.

#### **3.2.6.3. Yapay Serumda Uygulama**

Yapay serum örneği ile antijen-antikor etkileşimlerinin serum içerisindeki tuzlardan ve diğer biyomoleküllerden etkilenip etkilenmeyeceği incelenmiştir. THBS-1 ve Anti-THBS-1 için bütün seyreltmeler Sigma-Aldrich Firması'ndan satın alınan yapay serum ile yapılmıştır. Bu şekilde optimize şartlarda olan biyosensör için CV ve EIS ölçümleri alınarak yapay serumun etkisine bakılmıştır.

## BÖLÜM 4

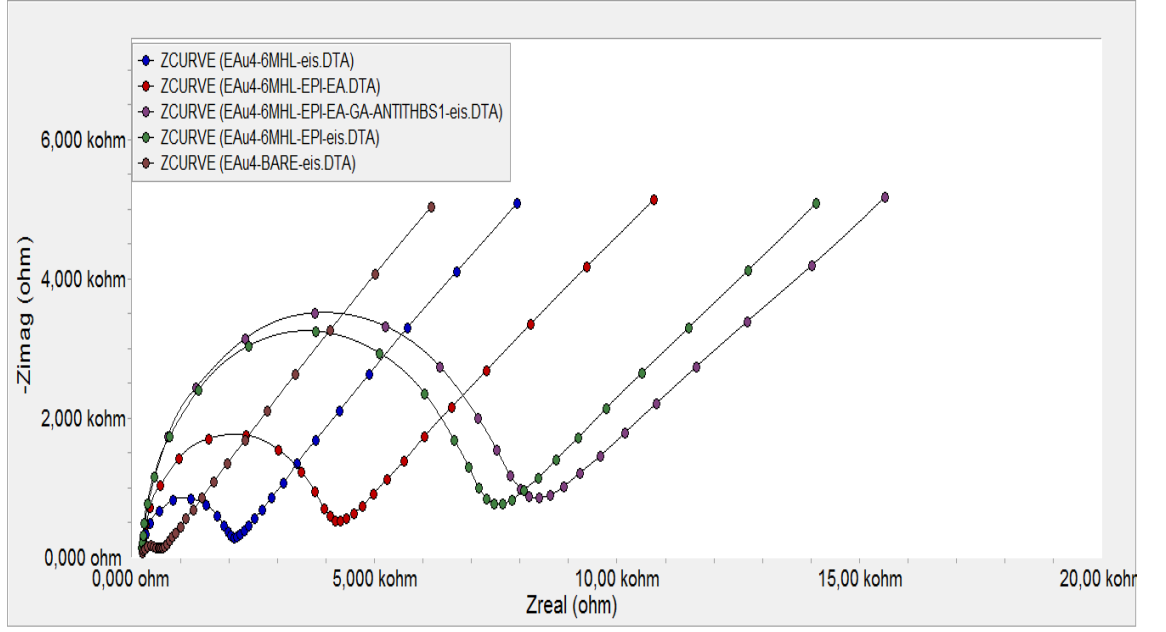
### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 4.1. Trombospondin-1 (THBS-1) Biyosensörü ile İlgili Elde Edilen Veriler

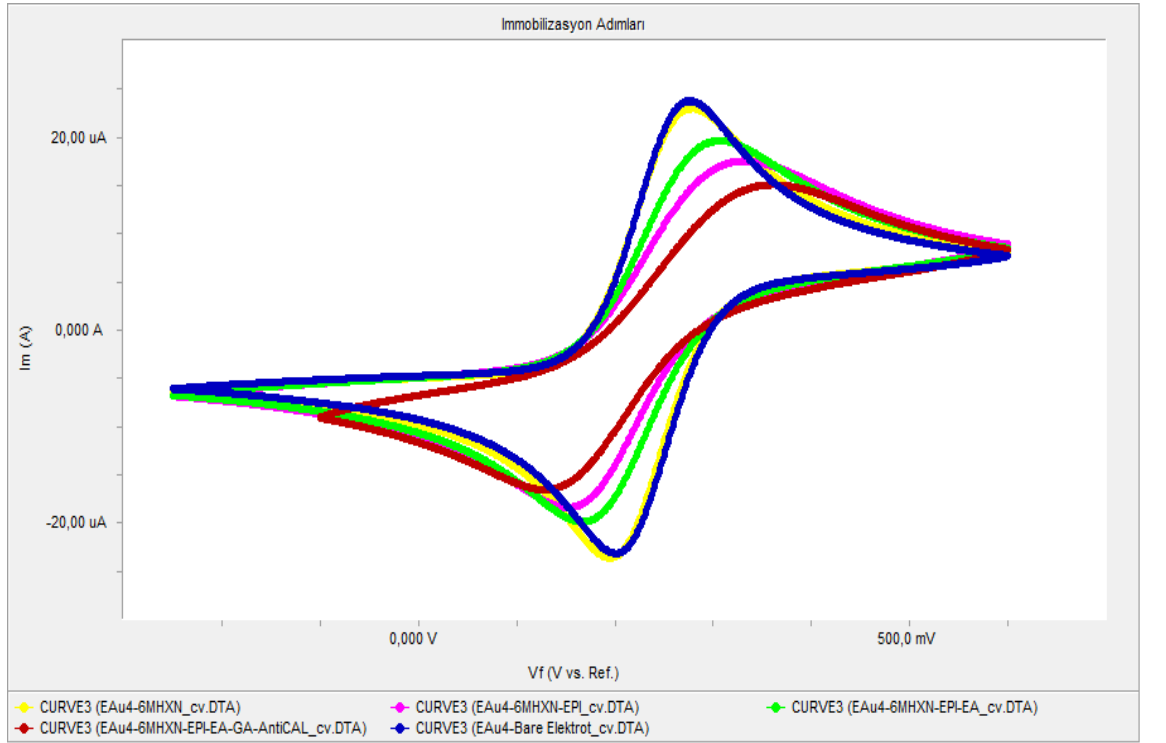
##### 4.1.1. THBS-1 Biyosensörünün Hazırlanış Basamaklarına İlişkin Veriler

Trombospondin-1 biyosensörü için yapılan immobilizasyon basamaklarına ait EIS spektrumları ve döngüsel voltammogramları Şekil 4.1’de ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Ayrıca her bir immobilizasyon basamağının yük transfer direnç değişimleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Burada:

1. Yalın Au elektrot yüzeyi Au-Bare elektrot,
2. 6-MHL ile modifiye edilmiş Au elektrot yüzeyi Au-6-MHL
3. EPI ile aktifleştirilmiş modifiye elektrot yüzeyi Au-6-MHL-EPI
4. Etanolamin bağlanmış aktif yüzey Au-6-MHL-EPI-EA
5. Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış elektrot yüzeyi Au-6-MHL-EPI-EA-GA
6. Antikor bağlı elektrot yüzeyi Au-6-MHL-EPI-EA-GA-Anti-THBS-1 şeklinde gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** THBS-1 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



**Şekil 4.2.** THBS-1 biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltammogramları

**Tablo 4.1.** Bütün immobilizasyon basamakları için hesaplanan yük transfer direnci değerleri

Elektrot Yüzeyi	R <sub>ct</sub> (kohm)
Au-Yalın elektrot	0.3850
Au-6MHL	1.789
Au-6MHL-EPI	6.979
Au-6MHL-EPI-EA	3.839
Au-6MHL-EPI-EA-GA-ANTI_THBS1	7.739

Nyquist diyagramları ve hesaplanan R<sub>ct</sub> değerleri göz önünde bulundurulduğunda, SAM oluşumu sonucu elektrot yüzeyinin direncinin arttığı görülmektedir. Bunun nedeni; elektrot yüzeyindeki 6-MHL moleküllerinin redoks probunun elektrot yüzeyine difüzyonunu engellemesidir [42].

6-MHL'ün hidroksil uçları ile epiklorohidrin bağlandığında, Cl<sup>-</sup> ucu açıkta kalır. Epiklorohidrin, 0.4 M NaOH içerisinde hazırlandığı için Cl<sup>-</sup> atomu negatif olarak yüklenir ve negatif yüklü ferrisiyanatı iterek elektrot yüzeyine difüze olmasını engeller. Bu da direnci arttırarak R<sub>ct</sub> değerini arttırır. Döngüsel voltammetri ile bağlanma bariz şekilde belirtilmiştir.

Etanolaminin, epiklorohidrine bağlanması açık klor ucundan gerçekleşir ve amin ucu boşta kalır. Etanolamin, pH= 7.0 tamponunda çözüldüğünde pozitif yüklenir. Bu yüklenme sonucu negatif yüklü ferrisiyanat yüzeye çekilir ve daha çok difüze olur. Bunun sonucu olarak iletkenlik artar. Bu nedenle R<sub>ct</sub> değeri düşer. Döngüsel voltammetrideki eğrilerde ise artış gözlemlenir.

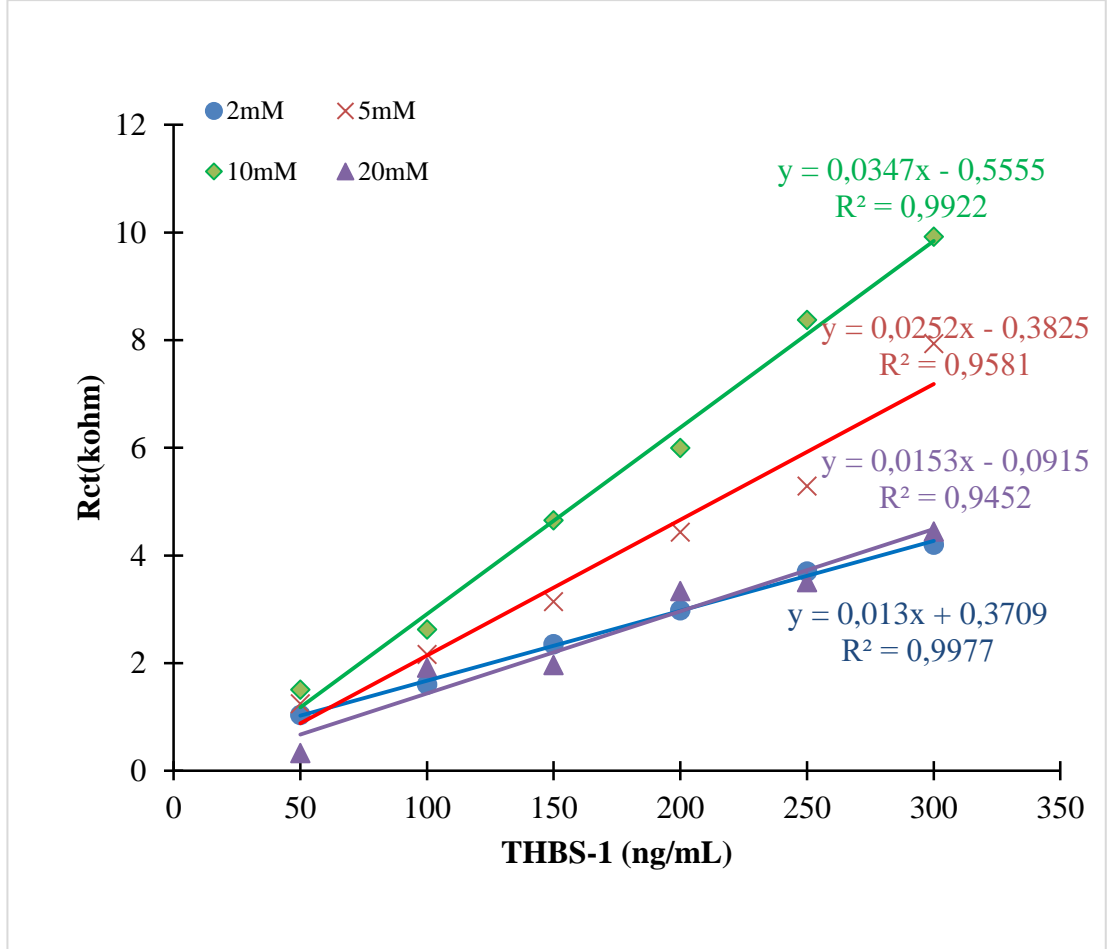
Yüzeye Anti-THBS-1 bağlanması sonucu elektron geçirgenliği azalır ve iletkenlik düşer. Bunun nedeni; bu proteinin oldukça hacimli olması ve çoğu protein gibi iletken olmayışı olabilir. Yüzey difüzyonunu düşürür ve R<sub>ct</sub> değerini arttırır. Bu durum döngüsel voltammetride de bariz olarak görülmektedir.

THBS-1 proteini yüzeye her bağlandığında ise direnç daha fazla artar. Bunun nedeni proteinin oldukça büyük olması ve iletken olmayışıdır. Her ilavede R<sub>ct</sub> değerinin arttığı görülmektedir.

## 4.2. Trombospondin-1 Biyosensörü Optimizasyonuna İlişkin Sonuçlar

### 4.2.1. 6-MHL Konsantrasyonunun Optimizasyonu

6-MHL'ün konsantrasyon çalışmasında 2 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 mM'lık çözeltileri ile çalışılmıştır. Bu biyosensörlerde elde edilen bulgular kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.3'de ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. 6-MHL konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği



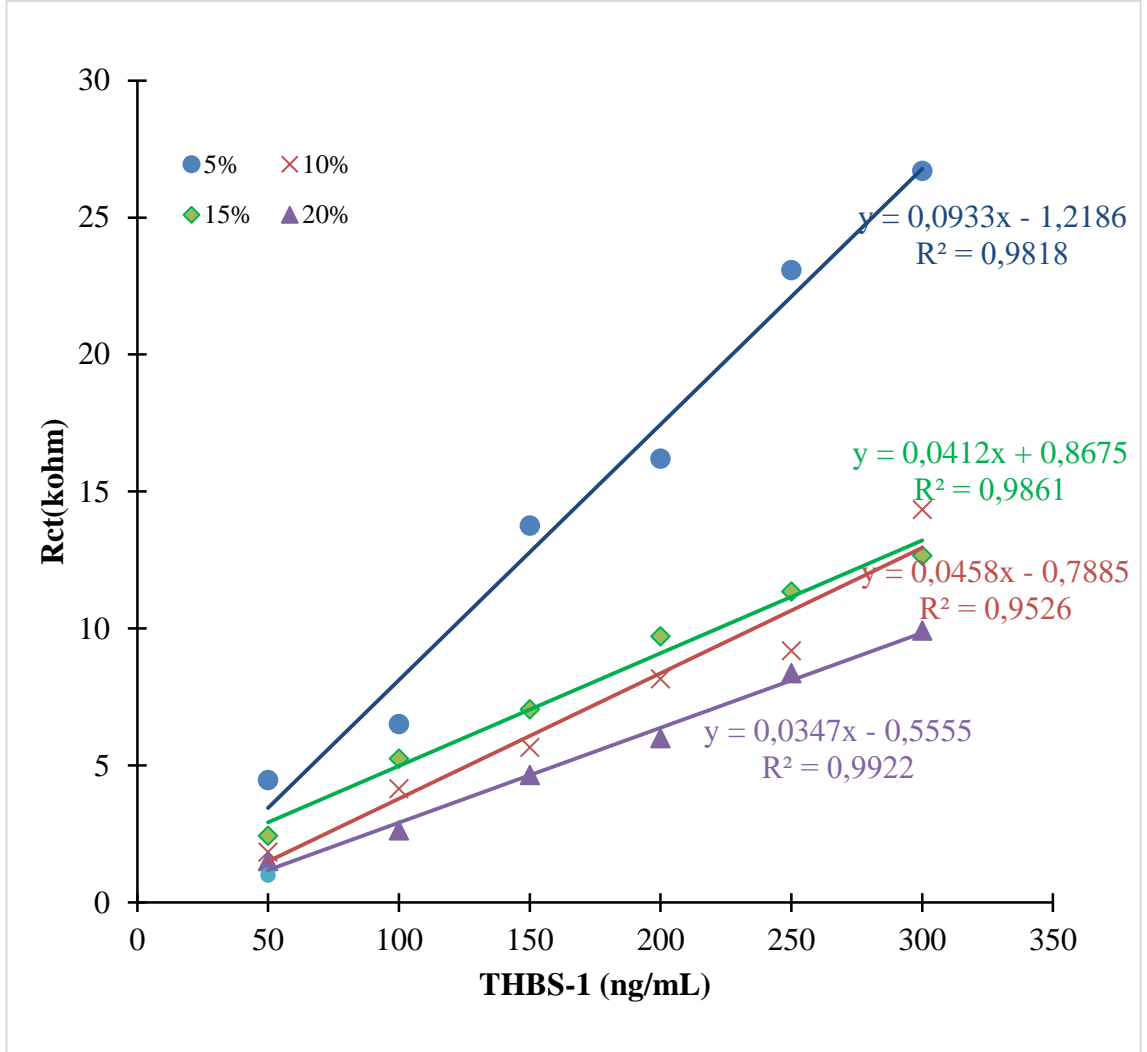
**Tablo 4.2.** 6-MHL konsantrasyonlarına bağı olarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri

<b>6-MHL Kons. (mM)</b>	<b>Doğrusallık Katsayısı (<math>R^2</math>)</b>	<b>Doğru Denklemi</b>
2 mM	0.9977	$y = 0.013x + 0.3709$
5 mM	0.9581	$y = 0.0252x - 0.3825$
10 mM	0.9922	$y = 0.0347x - 0.5555$
20 mM	0.9452	$y = 0.0153x - 0.0915$

20 mM’lık 6MHL kullanıldığında, çalışılan diğer konsantrasyonlara göre daha düşük doğrusallık katsayısı ( $R^2= 0.9452$ ) belirlenmiştir. Yüksek MHL kullandığında SAM’in yüzeye yoğun olarak bağlanması ve üzerine yapılan immobilizasyon basamaklarının daha çok Antikor bağlamasına sebebiyet vermesi beklenir. Ancak THBS1’in molekül ağırlığının yüksek olması (129, 412 kDa) nedeniyle sterik engel oluşturmuş olabilir ve bu nedenle 20 mM’lık 6MHL kullanıldığında düzensiz bağlanmalar olmuş olabilir. 2 mM, 5mM ve 10 mM’lık 6MHL çözeltileriyle yapılan biyosensörlerin doğru denklemleri ise sıralı olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar arasında en yüksek  $R_{ct}$  değerine ve doğrusallık katsayısına sahip olan **10 mM’lık 6MHL** ile çalışmalara devam edilmiştir.

#### **4.2.2. EPI Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

EPI’nin konsantrasyon çalışmasında % 5, % 10, % 15 ve % 20’lik EPI çözeltileri ile çalışılmıştır. Bu biyosensörlerde elde edilen bulgular kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.4’de ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. EPI konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği

Tablo 4.3. EPI konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri

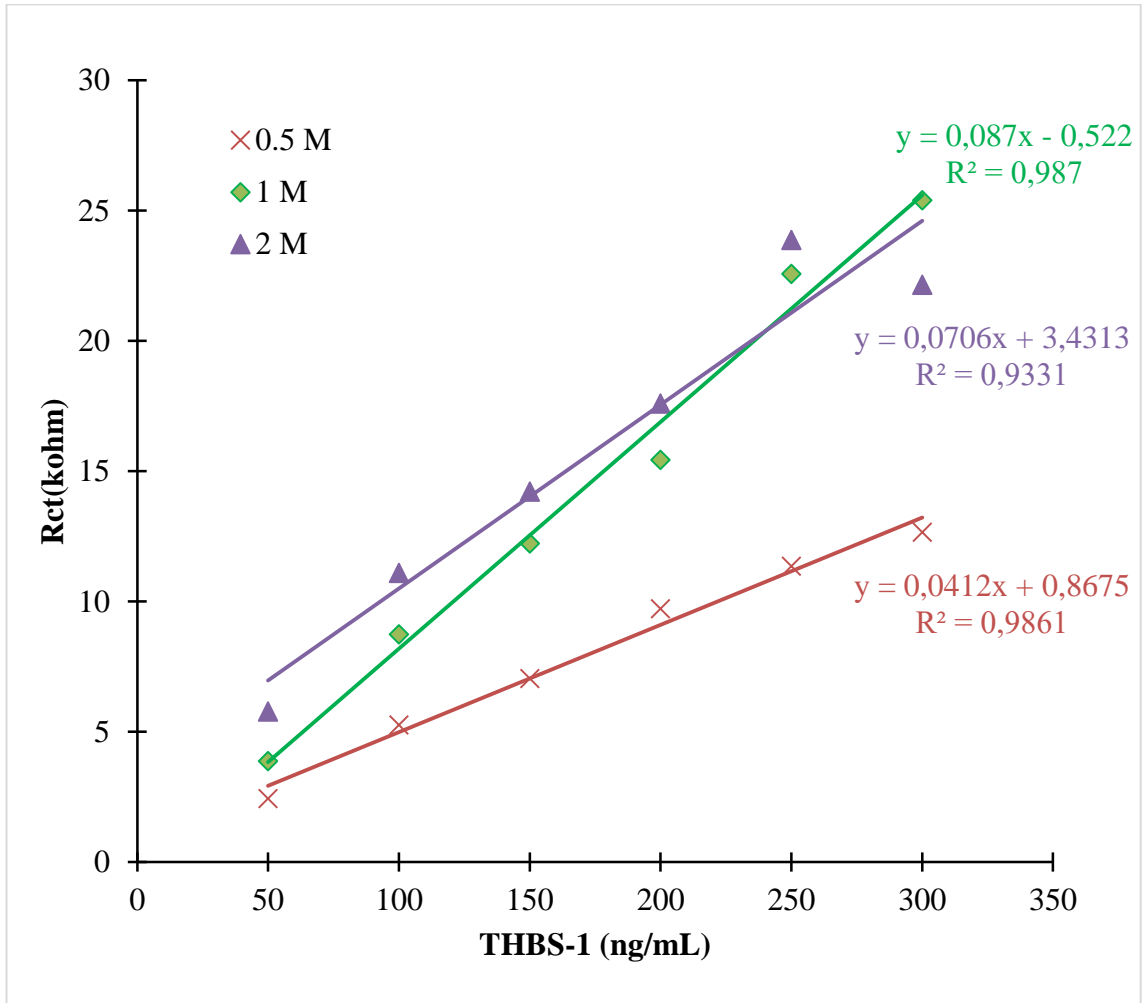
EPI Konsantrasyonu (%)	Doğrusallık Katsayısı ( $R^2$ )	Doğru Denklemi
5	0.9818	$y = 0.0933x - 1.2186$
10	0.9526	$y = 0.0458x - 0.7885$
15	0.9861	$y = 0.0412x + 0.8675$
20	0.9922	$y = 0.0347x - 0.5555$

6-MHL konsantrasyonu ile oluşacak optimum SAM elde edildikten sonra, EPI konsantrasyonunun artışı ile diğer immobilizasyon basamaklarının ve antikor

bağlanmasının artması beklenir. Düşük konsantrasyonlardaki çalışmalarda düzenli ve uygun bir yapı elde edilememiştir ve doğrusallık katsayıları diğerlerine göre daha düşüktür. %15 ve %20 gibi yüksek konsantrasyonlarda ise daha düzenli bir yapı elde edilmiştir ve yük transfer dirençleri daha düzenli olarak artmıştır. %20'lik EPI çalışmasında konsantrasyon arttıkça yapıda bozulmalar artmıştır ve daha düşük yük transfer dirençleri vermiştir. Doğrusallık katsayıları ve  $R_{ct}$  değerlerine bakıldığında % **15'lik EPI konsantrasyonu** optimum değer olarak seçilmiştir.

#### 4.2.3. EA Konsantrasyonunun Optimizasyonu

EA'nın konsantrasyon çalışmasında 0.5 M, 1 M ve 2 M'lik EA çözeltileri ile çalışılmıştır. Bu biyosensörlerde elde edilen bulgular kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.5'de ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri Tablo 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. EA konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği

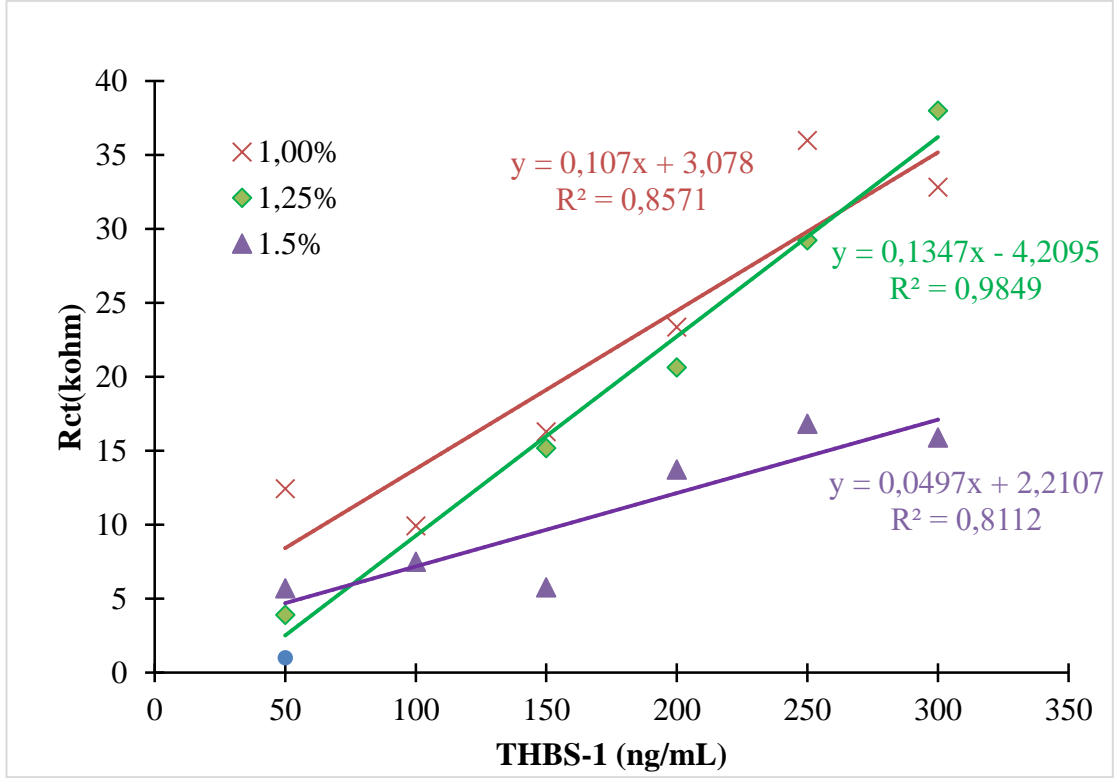
**Tablo 4.4.** EA konsantrasyonlarına bağı olarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri

<b>EA Konsantrasyonu (M)</b>	<b>Doğrusallık Katsayısı (<math>R^2</math>)</b>	<b>Doğru Denklemi</b>
0.5	0.9861	$y = 0.0412x + 0.8675$
1	0.987	$y = 0.087x - 0.522$
2	0.9331	$y = 0.0706x + 3.4313$

Yapılan iki optimizasyondan sonra, EPI bağı aktif uçlar EA ile muamele edildi. EA miktarının artması daha fazla antikor bağlanmasını sağlayacaktır.  $R_{ct}$  değerlerinden görüldüğü gibi 0.5 M'lık EA'e göre 1 M ve 2 M'lık EA kullanımı  $R_{ct}$  değerlerini arttırmıştır. Fakat doğru denklemlerinde eğimler incelendiğinde; 1 M'lık EA konsantrasyonu daha düzgün bir yüzey oluşturması sebebi ile çalışmalarda kullanılmak üzere **1 M'lık EA** konsantrasyonu seçilmiştir.

#### **4.2.4. GA Konsantrasyonunun Optimizasyonu**

GA'nın konsantrasyon çalışmasında % 1, % 1.25 ve % 1.5'lik GA çözeltileri ile çalışılmıştır. Bu biyosensörlerde elde edilen bulgular kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.6'da ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri Tablo 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. GA konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği

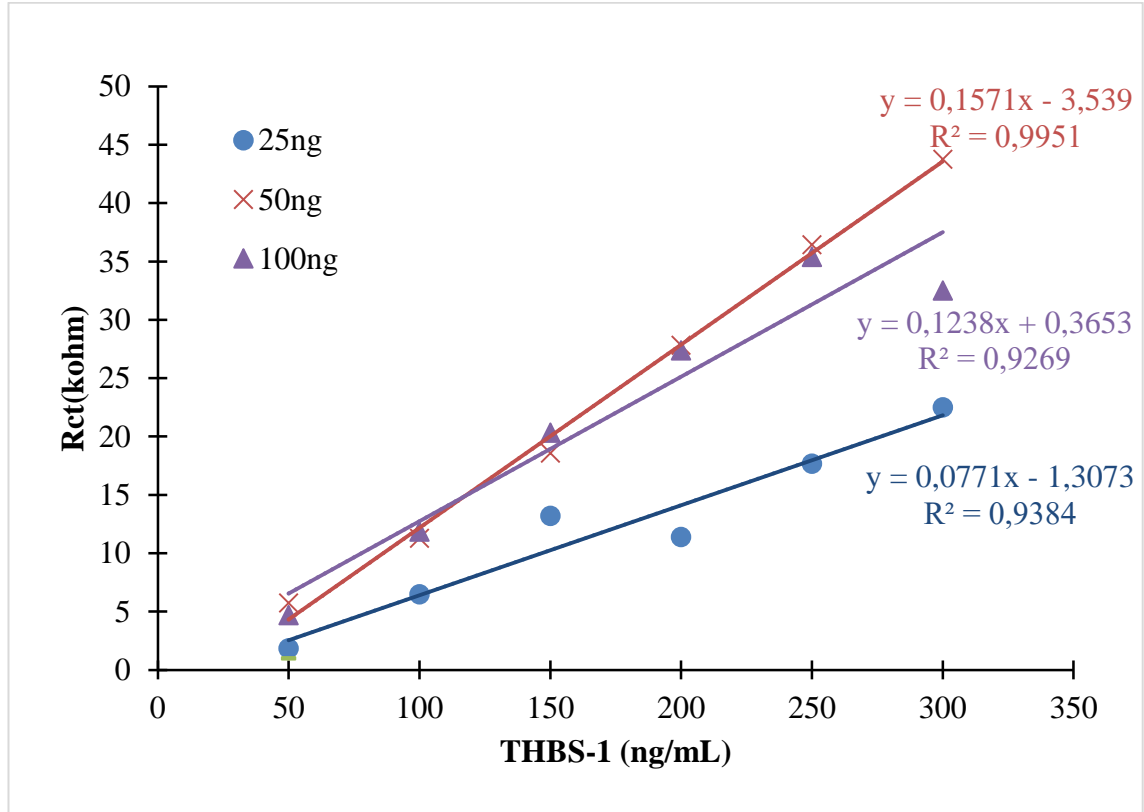
Tablo 4.5. GA konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri

GA Konsantrasyonu (%)	Doğrusallık Katsayısı ( $R^2$ )	Doğru Denklemi
1	0.8571	$y = 0.107x + 3.078$
1.25	0.9849	$y = 0.1347x - 4.2095$
1.5	0.8112	$y = 0.0497x + 2.2107$

Glutaraldehit ile çapraz bağlama işleminde; glutaraldehit'in iyi bağlanmasına bağlı olarak antikorun antijene bağlanması da artacaktır. Eğer az miktarda glutaraldehit kullanılırsa da antikorun antijen bağlama kapasitesi de düşer. Glutaraldehit konsantrasyonu arttıkça elektrot yüzeyine daha fazla antikor bağlanabilir. Fakat konsantrasyon çok arttığında biyosensöre bağlanan protein sayısı artacağından SAM'in zarar görmesi kaçınılmazdır. Sonuçlar incelendiğinde; doğru denklemlerinin eğimlerine ve doğrusallık katsayılarına bakılarak **% 1.25'lik GA konsantrasyonunun en iyi olduğu** belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalara bu konsantrasyonla devam edilmiştir.

#### 4.2.5. Anti-THBS-1 Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Anti-THBS-1'in konsantrasyon çalışmasında 25 ng/5 $\mu$ L, 50 ng/5 $\mu$ L ve 100 ng/5 $\mu$ L'lik Anti-THBS-1 çözeltileri ile çalışılmıştır. Bu biyosensörlerde elde edilen bulgular kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.7'de ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Anti-THBS-1 konsantrasyonlarına bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği

Tablo 4.6. Anti-THBS-1 konsantrasyonlarına bağlı olarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri

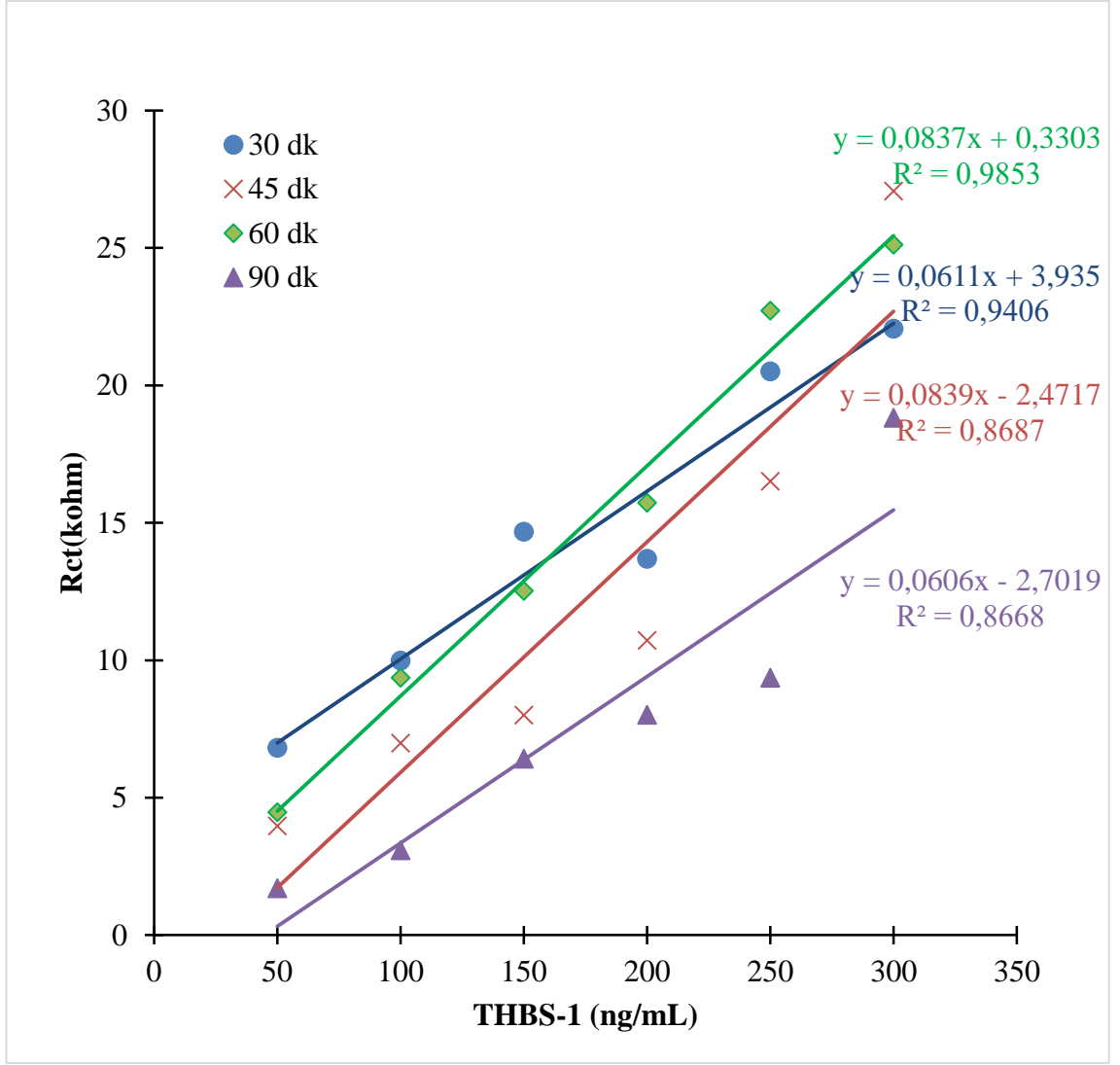
Anti-THBS1 Konsantrasyonları	Doğrusallık Katsayıları ( $R^2$ )	Doğru Denklemleri
25 ng/5 $\mu$ L	0.9384	$y = 0.0771x - 1.3073$
50 ng/5 $\mu$ L	0.9951	$y = 0.1571x - 3.539$
100 ng/5 $\mu$ L	0.9269	$y = 0.1238x + 0.3653$

Elektrot üzerinde dayanıklı bir SAM ve immobilizasyon hattı oluşturulduğunda daha fazla antikor ve antijen bağlanması beklenir ve yüzeyde bozulma görülmemesi

gerekir. Antikor konsantrasyonun artışına bağlı olarak daha fazla antijen bağlanır fakat THBS1 gibi büyük bir proteini daha çok bağladıkça hacminden ve sterik engellerden dolayı yüzeyde bozulmalar görülebilir. Bu sebeple 100 ng/5µL Anti-THBS1'in artan konsantrasyonlarında yüzeyde bozulmalar oluşmuş olabilir. Daha az Anti-THBS1 bağlanmasına sebep veren 25 ng/5µL'lik konsantrasyonda ise daha az ve düzensiz bağlanmalar olmuş olabilir. Optimizasyonlarda kullandığımız 50 ng/5µL'lik Anti-THBS1 konsantrasyonunda elde edilen hem doğru denklemlerinin eğimleri hem de doğrusallık katsayılarından dolayı daha sonraki çalışmalara **50 ng/5µL Anti-THBS1** ile devam edilmiştir.

#### **4.2.6. THBS-1 Süresinin Optimizasyonu**

THBS-1'in süre optimizasyonu çalışmasında 50 ng/mL'lik THBS-1'in inkübasyon süreleri 30 dk, 45 dk, 60 dk ve 90 dk olarak çalışılmıştır. Bu biyosensörlerde elde edilen bulgular kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.8'de ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri Tablo 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. THBS-1 inkübasyon sürelerine bağlı olarak çizilen kalibrasyon grafiği

Tablo 4.7. THBS-1 inkübasyon sürelerine bağlı olarak hesaplanan R<sub>ct</sub> değerleri

THBS1 İnkübasyon Süreleri	Doğrusallık Katsayıları (R <sup>2</sup> )	Doğru Denklemleri
30 dk	0.9406	$y = 0.0611x + 3,935$
45 dk	0.8687	$y = 0.0839x - 2,4717$
60 dk	0.9853	$y = 0.0837x + 0,3303$
90 dk	0.8668	$y = 0.0606x - 2,7019$



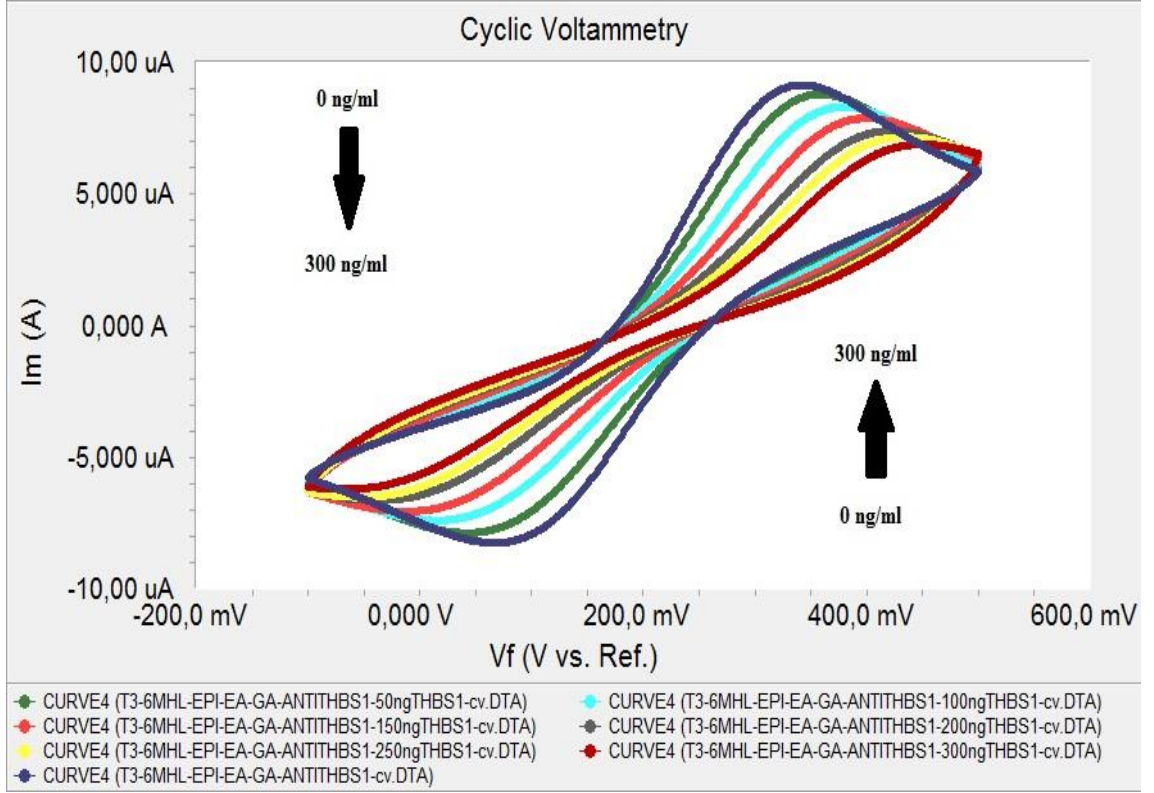
Antijenin elektrot yüzeyinde kalma süresi arttıkça antikor tarafından bağlanmasının artması beklenir. 30 ve 45 dk gibi düşük sürelerde daha az ve düzensiz antijen bağlanması beklenir. Ancak çok uzun sürelerde de sterik engellerin artmasından ve daha çok protein bağlanması ile SAM'in çökmesinden dolayı yüzeyde istenmeyen bozulmalar görülebilir. Doğrusallık katsayılarına ve  $R_{ct}$  değerlerine bakıldığında en iyi kalibrasyon eğrisini veren '60 dk' lık süre THBS1 inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir.

### **4.3. Trombospondin-1 Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları**

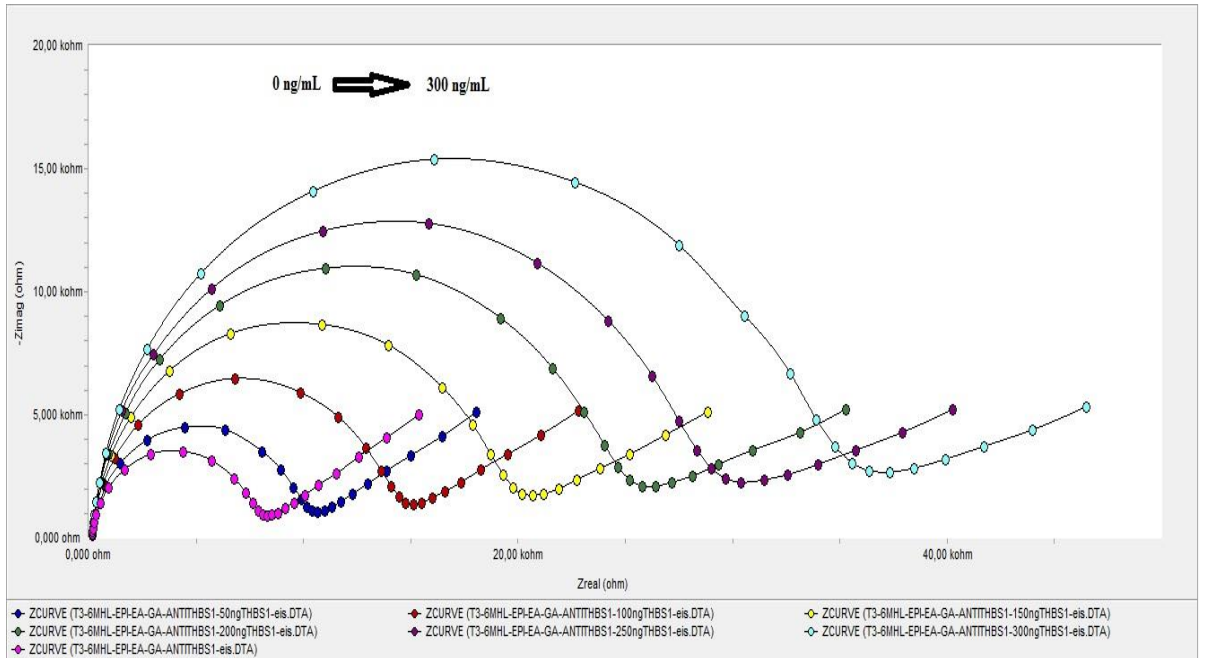
#### **4.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı**

Trombospondin-1'in tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimizasyonu sonrası, optimum koşullarda hazırlanan biyosensör için doğrusal tayin aralığı çalışması yapılmıştır. Geliştirilen biyosensör ile ilgili elde edilen döngüsel voltammogramlar Şekil 4.9'da ve impedans spektrumları Şekil 4.9'da ve bu spektrumlar göz önünde bulundurularak yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen  $R_{ct}$  değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

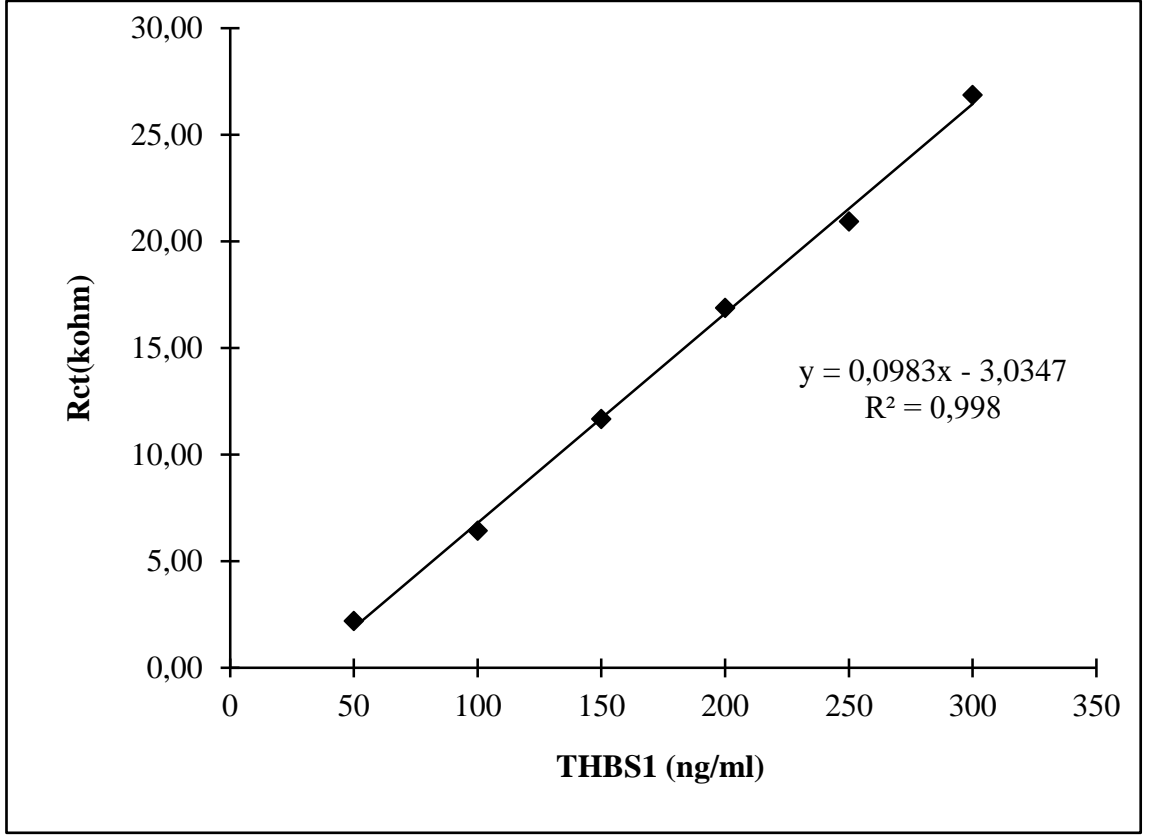
Bu çalışmalar 50-300 ng/mL tayin aralığında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.9. THBS-1 biyosensörünün döngüsel voltammogramları



Şekil 4.10. THBS-1 biyosensörünün elektrokimyasal impedans spektrumları



Şekil 4.11. Optimize THBS-1 biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği

İnsan kanında genellikle 100-200 ng/ml arasında THBS1 bulunmaktadır. Bu değerler kişiye göre değişiklik göstermektedir. Literatürlerdeki bilgilere göre onkolojik rahatsızlığı bulunan insanlarda bu değer in kanda 200 ng/ml'nin üzerine çıktığı belirtilmiştir [35]. THBS1'in, onkolojik rahatsızlıklar üzerindeki etkisi bu konuda çalışan laboratuvarlarda araştırılmaya devam edilmektedir. Pre-diagnosis için kullanılması düşünülen protein şu anda faz 2 aşamasında bulunmaktadır. THBS1 için ticari olarak ELISA testleri satılmaktadır ancak 1 saat gibi kısa bir sürede ve oldukça duyarlı olarak THBS1 tayini yapılması bu biyosensörün avantajlarıdır.

### 4.3.2. Tekrar Üretilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak hazırlanan dokuz farklı biyosensör ile 50-300 ng/mL THBS-1 aralığı için ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerine ilişkin doğrusallık katsayısı ( $R^2$ ), doğru denklemi ve tayin aralığı değerleri Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

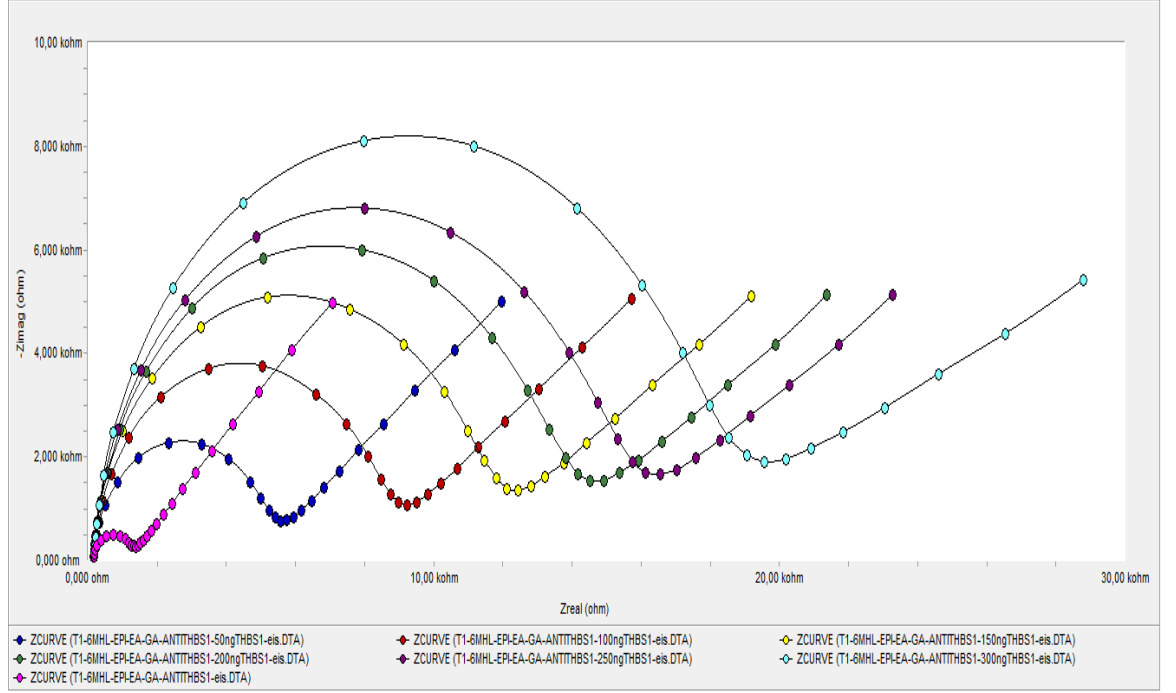
**Tablo 4.8.** THBS-1 biyosensörü için tekrar üretilebilirlik sonuçları

Biyosensör Numarası	Doğrusallık Katsayıları ( $R^2$ )	Doğru Denklemleri	Tayin Aralıkları (ng/ml)
1	0.9942	$y = 0.0543x - 0.887$	50-300
2	0.9893	$y = 0.0539x - 1.051$	50-300
3	0.9903	$y = 0.646x - 2.1004$	50-300
4	0.9856	$y = 0.0579x - 1.7103$	50-300
5	0.9813	$y = 0.0627x - 0.5314$	50-300
6	0.9978	$y = 0.0802x - 2.5169$	50-300
7	0.9882	$y = 0.0709x - 1.773$	50-300
8	0.998	$y = 0.0983x - 3.0347$	50-300
9	0.9858	$y = 0.056x + 0.4477$	50-300

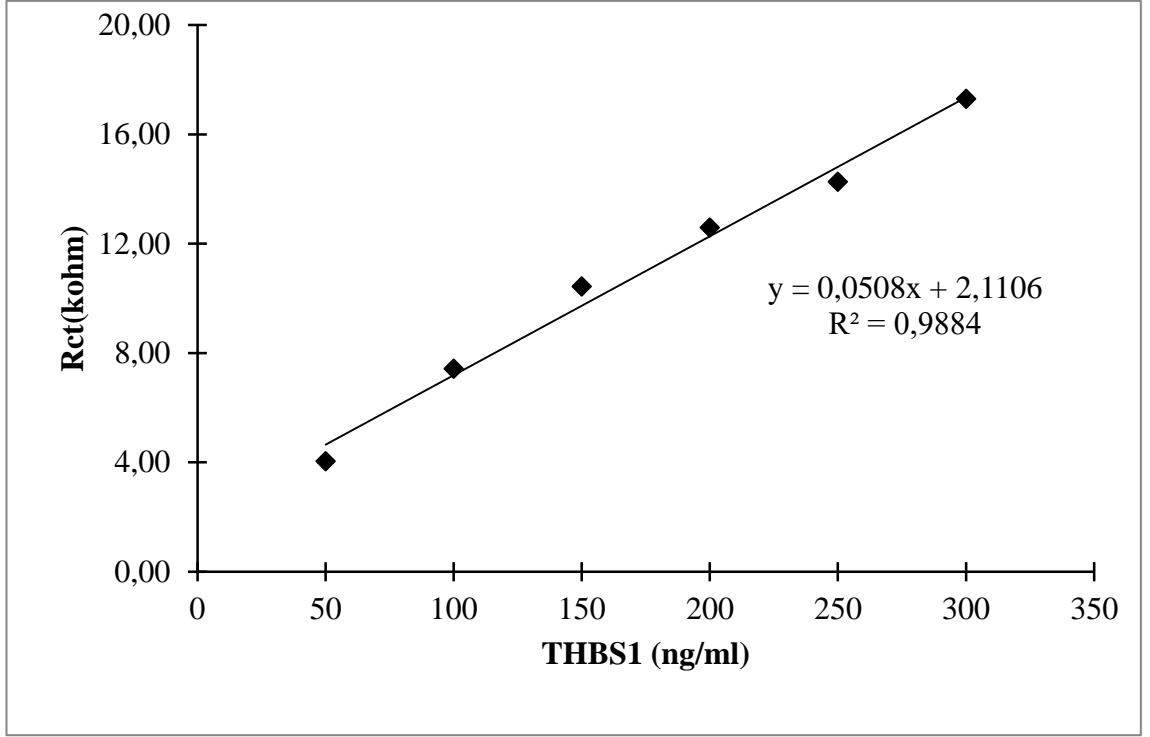
Optimize edilmiş değerler ile üretilmiş dokuz farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları, doğru denklemleri ve tayin aralıkları yukarıdaki Tablo 4.8'de verilmiştir. Doğru denklemleri arasındaki uyum ve doğrusallık katsayılarının yakınlığı arasındaki uyum bu tez kapsamında üretilen THBS1 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik başarısının oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

### 4.3.3. Yapay Serumda Uygulama

Optimize koşullarda hazırlanmış biyosensöre ait impedans diyagramları Şekil 4.12’de ve bu diyagramlar kullanılarak hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ile yapay serumda hazırlanmış THBS-1 konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. THBS-1 biyosensörünün yapay serum analizi



**Şekil 4.13.** THBS-1 biyosensörünün yapay serum analizi sonucu çizilen kalibrasyon grafiği

Yapay serumda hazırlanmış THBS1 porsiyonlarının, elektrokimyasal impedans grafiğinde de görüldüğü üzere, serumda bulunan diğer proteinler ve moleküllerin biyosensörün ölçümüne çok az bir girişim yaparak doğrusallık değerini bir miktar azalttığı görülmüştür. Bunun sebebi yapay serum içerisinde bulunan diğer proteinlerin ve diğer materyallerin girişimi olabilir. Bu sonuç, geliştirilen biyosensörün gerçek serum örneklerinde kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

#### 4.3.4. Son Değerlendirme

Karakterize edilen THBS1 biyosensör sistemi için seçilen optimum immobilizasyon basamakları Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.9.** THBS-1 biyosensörünün optimum immobilizasyon değerleri

<b>İmmobilizasyon Adımları</b>	<b>Optimum Değer</b>
6-MHL konsantrasyonu	10.0 mM
EPI konsantrasyonu	% 15
Etanolamin konsantrasyonu	1.0 M
Glutaraldehit konsantrasyonu	% 1.25
Anti-THBS-1 konsantrasyonu	50 ng/5 $\mu$ L

Geliştirilen THBS-1 biyosensörü için tayin aralığı 50-300 ng/mL olarak bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada THBS-1 biyobelirtecinin tayinine yönelik hızlı, ucuz, kolay uygulanabilen, duyarlı ve tutarlı sonuçlar veren impedimetrik esaslı bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu biyosensör sistemi hasta bireylerin plazma biyobelirteç düzeylerini kapsayan bir tayin aralığına sahiptir. Bu biyosensör ile prostat kanseri başta olmak üzere farklı kanser vakalarında gereksiz biyopsilerden kurtulup erken teşhis ve tedavisinin izlenmesi söz konusu olabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. *American Association for Cancer Research*, AACR Cancer Progress Report, Clin Cancer Res, 20 (Supplement 1) SI-S112, (2014).
2. M.S. Pepe, R. Etzioni, Z. Feng, J.D. Potter, M.L. Thompson, M. Winglet, Y. Yasui, *Phases of biomarker development for early detection of cancer*, Journal of the National Cancer Institute, 93(14), 1054-1061, (2001).
3. Y. Bulut, *Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış*, 6<sup>th</sup> International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), Elazığ, (2011).
4. J. Wang, *Electrochemical glucose biosensors*, Chemical Reviews, 108(2), 814-825, (2008).
5. E. Dinçkaya, A. Telefoncu, *Biyosensörler*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, (1999).
6. A. Telefoncu, *Biyosensörlere Genel Bakış ve Biyosensör Uygulamalarında Son Gelişmeler*, Ege Üniversitesi Biyosensör Yaz Okulu Kitabı, İzmir, (2008).
7. A.P.F. Turner, *Biosensors: sense and sensibility*, Chemical Society Reviews, 42(8), 3184-3196, (2013).
8. A. Güner, Ö. Akman, Z.M.O. Rzaev, *Crosslinking of dextran with some selective Cl-, P-and N-containing functional substances in aqueous solutions*, Reactive and Functional Polymers, 47(1), 55-65, (2001).
9. I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*, Biotechniques, 37(5), 790-806, (2004).



10. C.D. Bain, J. Evall, G.M. Whitesides, *Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent*, Journal of the American Chemical Society, 111(18), 7155-7164, (1989).
11. Th. Wink, S.J. van Zuilen, A. Bult, W.P. van Bennekom *Self-assembled monolayers for biosensors*, Analyst, 122(4), 43R-50R, (1997).
12. N.K. Chaki, K. Vijayamohanan, *Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications*, Biosensors & Bioelectronics, 17, 1–12, (2002).
13. D. Chen, J. Li. *Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers*, Surface Science Reports, 61(11), 445-463, (2006).
14. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*, Sensors and Actuators, B4, 239-304, (1983).
15. M. E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical impedance spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA, (2008).
16. J. R. Macdonald, *Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes*, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 223(1-2), 25-50, (1987).
17. *Serolojik Testler, Laboratuvar Hizmetleri*, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Ankara, (2014).
18. I. Rubinstein, *Physical Electrochemistry: Science and Technology*, Vol. 7. CRC Press, USA (1995).
19. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks/Cole, USA, (1997).
20. I.E. Tothill, *Biosensors for Cancer Markers Diagnosis*, Seminars in Cell & Developmental Biology, Vol. 20. No. 1. Academic Press, USA, (2009).
21. <https://www.cancer.gov>, National Cancer Institute Web Site, (17.10.2016 tarihi itibariyle mevcut).
22. A. Rasooly, J. James, *Development of biosensors for cancer clinical testing*, Biosensors and Bioelectronics, 21(10), 1851-1858, (2006).

23. E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, *Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics*, *Talanta*, 132 162-174, (2015).
24. P.P. Leong, W.M. Koch, A. Reed, D. Eisele, D. Sidransky, J. Jen, *Distinguishing Second Primary Tumors From Lung Metastases in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, *Journal of the National Cancer Institute*, 90(13), 972-977, (1998).
25. M. Verma, M. Upender, *Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 60(1), 9-18, (2006).
26. N. Karas-Kuzelicki, I. M. Rascan, *Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond*, *Pharmacogenomics*, 10(8) 1309-1322, (2009).
27. F. Frérart, P. Sonveau, G. Rath, A. Meqor, N. Chalier, B.F. Jordan, J. Saliez, A. Noel, C. Dessy, B. Gallez, O. Feron *Clinical Cancer Research*, An Official Journal of the American Association for Cancer Research, USA, (2008).
28. G. Henze, R. Dummer, H.I. Joiler-Jemelka, R. Böni, G. Burg *Serum S100—a marker for disease monitoring in metastatic melanoma*, *Dermatology*, 194(3), 208-212, (1997).
29. M. Mascini, S. Tombelli, *Biosensors for biomarkers in medical diagnostics*, *Biomarkers*, 13(7-8), 637-657, (2008).
30. A.S. Steven, K. Brown, A. Ellinton, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gau, S.I. Gutman, D.F. Hayes, B. Korte, J.L. Landers, D. Larson, F. Ligler, A. Majumdar, M. Mascini, D. Nolte, Z. Rozenszweig, J. Wang, D. Wilson, *Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics*, *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1932-1942, (2006).
31. G.L. Perkins, E.D. Slater, G.K. Sanders, J.G. Prichard *Serum tumor markers*, *American Family Physician*, 68(6) 1075-1088, (2003).
32. A.N. Bhatt, R. Mathur, A. Farooque, A. Verma, B.S. Dwarakanath *Cancer biomarkers-Current perspectives*, *Indian Journal Medical Resource*, 132, 129-149, (2010).

33. B. Vogelstein, K.W. Kinzler, *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill Professional, USA, (2002).
34. C.F. Basil, Y. Zhao, K. Zavaglia, P. Jin, M.C. Panelli, S. Voiculescu, S. Mandruzzato, H.M. Lee, B. Seliger, R.S. Freedman, P.R. Taylor, N. Hu, P. Zanovello, F.M. Marincola, E. Wang *Common cancer biomarkers*, Cancer Research, 66(6), 2953-2961, (2006).
35. D.D. Roberts, *THBS1 (Thrombospondin-1)*, Atlas Genetic Oncology, 9(3), 231-233, (2005).
36. M.P. Wu, C.Y. Chou, *Angiogenesis, Thrombospondin-1 and Cervical Carcinogenesis*, Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 44(2) 128-138, (2005).
37. K.M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, N. Bouck, *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1*, Science-New York Then Washington, 1582-1582, (1994).
38. <https://www.edrn.nci.nih.gov/biomarkers>, National Cancer Institute Early Detection Research Network Web Site, (2016).
39. Z.O. Uygun, M.K. Sezgintürk., *A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth*, Analytica Chimica Acta, 706(2), 343-348, (2011).
40. M.Ç. Canbaz, M.K. Sezgintürk (Danışman), *Bir Meme Kanseri Biyobelirteçi Olan HER3 Analizi İçin Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi*, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, (2013).
41. E. Baldrich, O. Laczka, Fco. J. Del Campo, F.X. Munoz, *Gold immunofunctionalisation via self-assembled monolayers: Study of critical parameters and comparative performance for protein and bacteria detection*, Journal of Immunological Methods, 336(2), 203-212, (2008).
42. E. Asav, *Bazı Kanser Biyomarkerlerinin tayinine yönelik biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi*, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2014).

43. H.M. Özcan, K. Yıldız, C. Çakar, T. Aydın, E. Asav, A. Sağıroğlu, M.K. Sezgintürk, *Ultrasensitive impedimetric biosensor fabricated by a new immobilization technique for parathyroid hormone*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 176(5), 1251-1262, (2015).

## ÖZGEÇMİŞ

09.05.1991'de Almanya Münih'te doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 2005 yılında Çatalca Anadolu Lisesi'ne başladım ve 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım ve 2013 yılında mezun oldum. 2013 yılının Güz Döneminde Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.

2015 yılının Kasım ayında Koçak Farma firmasının AR-GE Biyoteknoloji Bölümünde 'Araştırmacı' olarak çalışmaya başladım. Hala bu firmada 'İnsulin Lispro Saflaştırma Sorumlusu' olarak çalışmaya devam etmekteyim.