

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI KANSER BİYOMARKERLARININ TAYİNİNE YÖNELİK
BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ**

ENGİN ASAV

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

PROF. DR. AYTEN SAĞIROĞLU
DOÇ. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK

EDİRNE, 2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK
İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

.....

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

.....

Doç.Dr. İlhan ERDOĞAN

.....

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

.....

Yrd. Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

.....

Tarih: 05/03/2014

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA DOKTORA 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.

Engin ASAV

05 / 03 / 2014

Doktora Tezi

Bazı Kanser Biyomarkerlarının Tayinine Yönelik Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Kanser biyomarkerları, kanser hücrelerinde yüksek miktarlarda sentezlenip kana karıştığından kanserin erken teşhisinde görüntüleme ve patolojik yöntemlere yardımcı olur.

Siklooksigenaz-II (COX-II), pankreas, kolon, özafagus ve meme gibi pek çok dokudaki katı tümör oluşumunda hücre içi ekspresyonu artan bir enzimdir. Siklooksigenaz-II'ye spesifik antikor, 12-merkaptododekanoik asit, PAMAM, EDC/NHS çifti gibi kimyasallar kullanılarak kovalent immobilizasyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilize edildi. Geliştirilen biyosensör ile siklooksigenaz-II, 1 saat gibi bir tayin süresinde 50-250 pg/mL konsantrasyonu aralığında tayin edilebilmiştir.

Kalretinin ise özellikle kötü huylu mezotelyoma gibi akciğer tümörlerinde, ameloblastoma gibi neoplazma tümörlerinde ve nöroblastoma gibi beyin tümörlerinde sentezinin fazlaşmasından dolayı serum ve beyin-omurilik sıvısında seviyeleri artan kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. Kalretinine spesifik antikor; 6-merkaptohexanol, epiklorohidrin, etanolamin gibi kimyasallar kullanılarak kovalent immobilizasyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilize edildi. Geliştirilen biyosensör ile kalretinin, 1 saat gibi bir tayin süresinde 1-5 ng/mL konsantrasyonu aralığında tayin edilebilmiştir.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 116

Anahtar kelimeler: Kalretinin, siklooksigenaz-II, kanser biyomarkerları, biyosensör, SAM

Doctorate Thesis

Development of biosensor systems for determination of some cancer biomarkers

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

Cancer biomarkers help radiological and pathological monitoring in early diagnosis of cancer, which are highly expressed in cancer cells and leak to blood stream.

Cyclooxygenase-II is an enzyme whose expression is increased in the cell at the formation of solid tumors in many tissues such as pancreas, colon, esophagus and breast. A novel biosensor system was developed for detection of Cyclooxygenase-II by immobilisation of antibody specific to Cyclooxygenase-II onto electrode surface via covalent immobilisation techniques by using mercaptododecanoic acid, PAMAM, and EDC/NHS couple. This biosensor system had detection time “one hour” and detection range “50-250 pg/mL” cyclooxygenase concentration.

Calretinin is a calcium binding protein, whose levels in blood and cerebrospinal fluid are increased, since its expression is increased lung tumors such as Malignant mesothelioma, neoplastic tumors such as ameloblastoma, brain tumors such as neuroblastoma. A novel biosensor system was developed for detection of Calretinin by immobilisation of antibody specific to Calretinin onto electrode surface via covalent immobilisation techniques by using mercaptohexanol, epichlorohydrin, and ethanolamin. This biosensor system had detection time “one hour” and detection range “1-5 ng/mL” calretinin concentration.

Year : 2014

Number of pages : 116

Keywords : calretinin, cyclooxygenase-II, cancer biomarkers, biosensors, SAM

TEŞEKÜRLER

Doktora eğitimim süresince tecrübesiyle beni yönlendiren, tezimin her aşamasında sorularımı yanıtıız bırakmayan tez danışmanlarım Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU ve Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e, Trakya Üniversitesi öğretim elemanlarından Arş. Gör. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a, Öğr. Gör. Hatice PALÜZAR'a, tezim süresince çalışmalarımı sürdürebilmem için desteklerini gördüğüm Kırklareli Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Mustafa AYKAÇ'a, Sağlık Yüksekokulu Müdürü Doç. Dr. Serpil AKÖZCAN'a

Tez çalışmam boyunca yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Namık Kemal Üniversitesi Biyosensör çalışma grubundan arkadaşlarım Öğr. Gör. Munteha Nur SONUÇ, Dokt. Öğr. Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK, Yük. Kim. Çetin CANBAZ'a

Hayatımın her döneminde bana gösterdikleri sabırları ve bu süreçte de yanımda oldukları için canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, TÜBAP 2012/126 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKÜRLER.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SEMBOLLER ve KISALTMALAR.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	3
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Biyosensörlere Genel Bakış.....	3
2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	5
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.....	5
2.3. Antikor/Antijen Temelli Biyosensörlerde (İmmüno-sensörler) İmmobilizasyon Yöntemleri.....	6
2.3.1. Adsorbsiyon.....	7
2.3.2. Tutuklama.....	7
2.3.3. Çapraz Bağlama.....	7
2.3.3.1. Epiklorohidrin ile çapraz bağlama.....	7
2.3.3.1. Glutaraldehit ile çapraz bağlama.....	9

2.3.4. Kovalent bağlama.....	9
2.4. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri.....	12
2.4.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi	12
2.4.2. Döngüsel voltammetri.....	16
2.4.3. Kronoamperometri (CA).....	18
2.5. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler	18
2.5.1. Enzim Temelli İmpedimetrik Biyosensörler.....	19
2.5.2. İmmunokimya temelli impedimetrik biyosensörler.....	20
2.5.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler	27
2.5.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler.....	29
2.6. Kanserin Moleküler Özellikleri	30
2.2. Kanser Biyomarkerları (Biyobelirteçleri)	31
2.2.1. Kanser biyomarkerlarının tayinine yönelik biyosensör sistemleri.....	34
2.2.2. Siklooksijenaz-II	35
2.2.3. Kalretinin.....	37
BÖLÜM 3	40
MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Materyal	40
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	40
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	41
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	41
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Elektrot Temizliği	42
3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensipleri ve Ölçüm Sistemi.....	43
3.2.3. Hesaplama Yöntemi	43
3.2.3.1. Eş Değer Devre Modeli Çizimi.....	43
3.2.3.2. Yük transfer direncinin (R_{ct}) hesaplanması.....	44
3.2.4. Siklooksijenaz Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı.....	46
3.2.5. Siklooksijenaz Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu	48
3.2.5.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu.....	48

3.2.5.2. EDC/NHS konsantrasyonlarının optimizasyonu.....	48
3.2.5.3. PAMAM dendrimerinin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi.....	48
3.2.5.4. Optimum Anti-COX-II konsantrasyonunun belirlenmesi.....	49
3.2.5.5. Optimum Anti-COX-II inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	49
3.2.6. Siklooksigenaz Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu.....	50
3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı	50
3.2.6.2. Tekrar üretilebilirlik	50
3.2.6.3. Yapay serumda Uygulama	50
3.2.7. Kalretinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı.....	50
3.2.8. Kalretinin Biyosensörü İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu.....	53
3.2.8.1. 6-Merkaptohekzanol Konsantrasyonunun optimizasyonu	53
3.2.8.2. Epiklorohidrin (EPI) Konsantrasyonunun optimizasyonu	53
3.2.8.3. Epiklorohidrin (EPI) inkübasyon süresinin optimizasyonu	53
3.2.8.4. Etanolamin Konsantrasyonunun optimizasyonu.....	54
3.2.8.5. Etanolamin inkübasyon süresinin optimizasyonu	54
3.2.8.6. Glutaraldehit konsantrasyonunun optimizasyonu	54
3.2.8.7. Anti-Kalretinin (Anti-CAL) konsantrasyonunun optimizasyonu	55
3.2.8.8. Anti-Kalretinin (Anti-CAL) inkübasyon süresinin optimizasyonu.....	55
3.2.9. Kalretinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	56
3.2.9.1. Doğrusal Tayin Aralığı	56
3.2.9.2. Tekrar üretilebilirlik	56
3.2.9.3. Yapay Serumda Uygulama	56
BÖLÜM 4	57
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	57
4.1. COX-II Biyosensörü İle Elde Edilen Bulgular	57
4.1.1. COX-II Biyosensörünün hazırlanış basamaklarına ilişkin bulgular	57
4.1.2. COX-II Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.....	62
4.1.2.1. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	62
4.1.2.2. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	63

4.1.2.3. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	64
4.1.2.4. Anti-COX-II konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	66
4.1.2.5. Anti-COX-II inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	67
4.1.2. COX-II Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	69
4.1.3.1 Doğrusal Tayin Aralığı	69
4.1.3.2 Tekrar üretilebilirlik	70
4.1.3.3 Yapay Serumda Uygulama	71
4.2. Kalretinin (CAL) Biyosensörü İle Elde Edilen Bulgular	72
4.2.1. CAL Biyosensörünün hazırlanmış basamaklarına ilişkin bulgular.....	72
4.2.2. CAL Biyosensörü Optimizasyonuna İlişkin Bulgular	75
4.2.2.1. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	75
4.2.2.2. Epiklorohidrin (EPI) konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	76
4.2.2.3 Epiklorohidrin (EPI) inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	78
4.2.2.4. Etanolamin Konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	79
4.2.2.5. Etanolamin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	80
4.2.2.6. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	81
4.2.2.7. Anti-Kalretinin (Anti-CAL) konsantrasyonunun optimizasyonu	83
4.2.2.8. Anti-CAL inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	84
4.2.3. Kalretinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları.....	85
4.2.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı	85
4.2.3.2 Tekrar üretilebilirlik	87
4.2.3.3 Yapay Serumda Uygulama	88
BÖLÜM 6	92
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	100

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

COX-II	: Siklooksigenaz-II
CAL	: Kalretinin
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
NHS	: N-Hidroksisuksinimit
PAMAM	: Poli(amido amin)
12-MDDA	: 12-Merkaptododekanoik asit
6-MHL	: 6-Merkaptoheksanol
EPI	: Epiklorohidrin
EtA	: Etanolamin
GA	: Glutaraldehit
SAM	: Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
R_{ct}	: Yük transfer direnci
CV	: Döngüsel voltametri
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
QCM	: Kuartz kristal mikrobals
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonansı
CALB2	: Kalbindin-2
CPE	: Sabit faz elemanı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil:2.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	4
Şekil 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	6
Şekil 2.3. Epiklorhidrinin dekstran moleküllerini çapraz bağlama mekanizması	8
Şekil 2.4. SAM in şematik gösterimi	10
Şekil 2.6. İmpedans'ın potansiyel-zaman ve akım-zaman büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi	13
Şekil 2.7. Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli.....	15
Şekil 2.8. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel.....	16
Şekil 2.9. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram.....	17
Şekil 2.10. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi. 18	
Şekil 2.11. Bir antikör ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları.....	22
Şekil 2.12a. Çoklu protein tabakaları immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi	23
Şekil 2.12b. Artan VEGF konsantrasyonlarına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumları.....	24
Şekil 2.13. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi	25
Şekil 2.14. HER-3 biyosensörünün immobilizasyon şeması	26
Şekil 2.15. Tek frekansta alınan HER-3 ölçümü	26
Şekil 2.16. Li ve ark. yaptığı immobilizasyonu sisteminin şematik gösterimi	28
Şekil 2.17. COX-II enziminin üç boyutlu yapısı	36
Şekil 2.18. COX-II enziminin hücre içi konumu ve katalitik aktivitesi	36
Şekil 2.19. Kalretininin “ele” benzeyen üç boyutlu yapısı ve kalsiyumu bağlaması	38
Şekil 2.20. Epitelyal mezotelyoma içeren bir dokuda yapılmış kalretinin boyaması.....	39
Şekil 3.1. Gambry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre modeli....	44
Şekil 3.2. Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri.....	45
Şekil 3.3. Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı.....	45
Şekil 3.4. Anti-COX-II immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi.....	47

Şekil 4.1. Bazı immobilizasyon basamaklarından sonra elektrot yüzeyindeki değişimi gösteren Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri	58
Şekil 4.2a. COX-II biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları.....	59
Şekil 4.2b. COX-II biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltammogramları	59
Şekil 4.3. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevaplarına etkisi	62
Şekil 4.4. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	63
Şekil 4.5. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	65
Şekil 4.6. Anti-COX-II konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	66
Şekil 4.7. Anti-COX-II inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	68
Şekil 4.8a. Doğrusal tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri	69
Şekil 4.8b. COX-II biyosensörünün kalibrasyon grafiği	70
Şekil 4.9a. Yapay Serumda uygulama çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri.....	71
Şekil 4.9b. Yapay Serumda uygulama çalışmalarında elde edilen kalibrasyon grafiği..	72
Şekil 4.10a. CAL biyosensörünün immobilizasyon basamakları EIS spektrumları.....	73
Şekil 4.10b. CAL biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltammogramlar	73
Şekil 4.11. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	75
Şekil 4.12. EPI konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	77
Şekil 4.13. EPI inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	78
Şekil 4.14. Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	79
Şekil 4.15. Etanolamin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	80
Şekil 4.16. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	82
Şekil 4.17. Anti-CAL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	83
Şekil 4.18. Anti-CAL inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	84
Şekil 4.19a. Doğrusal tayin aralığında elde edilen döngüsel voltammogramlar	86
Şekil 4.19b. Doğrusal tayin aralığı çalışmalarında elde edilen impedans spektrumları .	86
Şekil 4.20. CAL biyosensörünün standart kalibrasyon grafiği	87
Şekil 4.21a. Yapay Serum uygulamalarında elde edilen Nyquist diyagramları	89
Şekil 4.21b. Yapay serum uygulamalarının standart grafiği	89

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Biyosensör bileşenlerinin içeriği.....	4
Tablo 2.2. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları	14
Tablo 2.3. Literatürlerde bulunan önemli kanser biyobelirteçleri, bulunduğu kanser türleri ve bazı tayin yöntemleri	32
Tablo 2.4. Bazı kanser biyobelirteçlerinin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri ve çalışma prensipleri	35
Tablo 4.1. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan yük transfer direnci değerleri.....	60
Tablo 4.2. 12-MDDA konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	62
Tablo 4.3. EDC/NHS konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	64
Tablo 4.4. PAMAM konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.....	65
Tablo 4.5. Anti-COX-II konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	67
Tablo 4.6. Anti-COX-II konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	68
Tablo 4.7. COX-II biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	71
Tablo 4.8. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan yük transfer direnci değerleri.....	74
Tablo 4.9. 6-MHL konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.....	76
Tablo 4.10. EPI konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.....	77
Tablo 4.11. EPI inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.....	78
Tablo 4.12. Etanolamin konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	79

Tablo 4.13. Etanolamin inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	81
Tablo 4.14. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	82
Tablo 4.15. Anti-CAL konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	83
Tablo 4.16. Anti-CAL inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri	85
Tablo 4.17. Kalretinin biyosensörü için tekrar üretilebilirlik sonuçları	88
Tablo 4.18a. COX-II biyosensörü için elde edilen optimum değerler	90
Tablo 4.18b. CAL biyosensörü için elde edilen optimum değerler	90

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Genel kullanımda insan kanseri olarak adlandırılmasına rağmen aslında 200 farklı çeşidi bulunmakta ve batı dünyasında ölümlerin yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra dünya nüfusunun 1/3'ü hayatının bir bölümünde kanser tedavisi görmektedir. Almanya gibi tipik bir batı endüstri ülkesinde her yıl 400.000'den fazla kişi kansere yakalanmakta, yaklaşık 200.000 civarı kişi de bu sebepten ölmektedir. Günümüzde kanserin erken teşhisi için radyolojik incelemeler ve patolojik incelemeler büyük önem arz etmekle beraber zahmetli, zaman alan ve pahalı ekipmanlar ile kimyasallara gerek duyan yöntemlerdir.

Kanser biyobelirteçi seviyelerinin serum, idrar ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında ölçülmesi ve sürekli kontrolü bu yöntemlere yardımcı olabilecek potansiyele sahiptir. Risk gruplarının belirli periyotlarda biyobelirteç seviyelerinin ölçülmesi, kanser oluşumunun başlangıçta teşhis edilmesine olanak sağlar. Bu bağlamda yeni biyobelirteçlerin bulunması ve bu biyobelirteçlere özgü hızlı, doğru, duyarlı ve tutarlı tayin sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada tayin etmeye çalıştığımız kalretinin (CAL) ve siklooksigenaz-II(COX-II), farklı tümör hücrelerinde sentezleri arttığı için serumda seviyeleri artan biyobelirteçlerdir. Tayinleri büyük önem arz etmesine karşın siklooksigenaz-II ve kalretinin tayini ile ilgili literatürde bulunan makale sayısı fazla değildir. Bu çalışmada literatürdeki açığı kapatmak için bu iki biyobelirteç (biyomarker) seçilmiştir.

Bu çalışmada kalretinin ve siklooksigenaz-II tayinine yönelik hızlı, ucuz kimyasallarla yapılan, kolay uygulanabilen, duyarlı ve tutarlı biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kalretinin tayinine yönelik geliştirdiğimiz biyosensörde gerçekleştirdiğimiz immobilizasyon adımları, kovalent immobilizasyona yeni bir yaklaşım getirmiş olup çoğunluğu ilk kez bu çalışmada yapılmıştır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

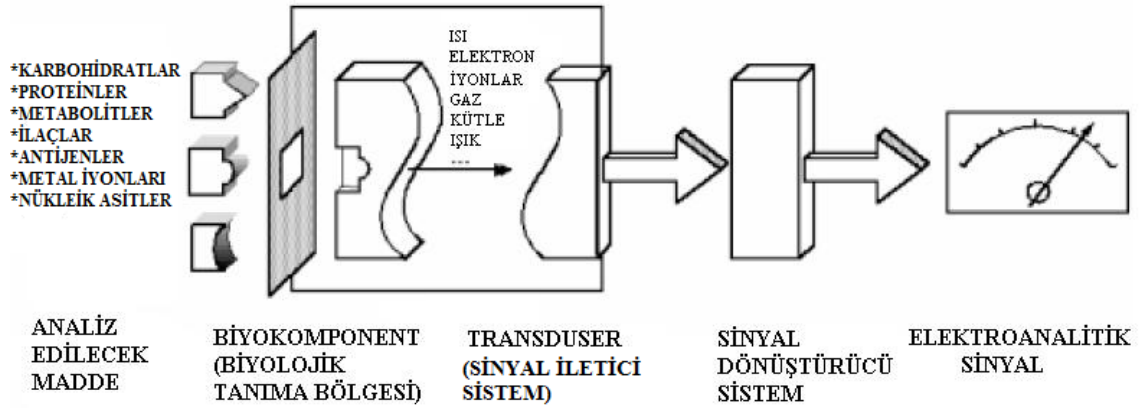
2.1. Biyosensörlere Genel Bakış

Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ile biyolojik materyallerin birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek spesifikliğı ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı birleştirilmiştir. Çok sayıda biyokimyasal molekülün ve bazı inorganik moleküllerin analizinde kullanmak amacı ile pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmosötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır [1].

İlk biyosensör sistemi L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O₂ duyar amperometrik bir elektrotla, ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında ise O₂ duyar amperometrik elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glukoz biyosensörüdür [2]. Bu gelişmenin ardından yıllar içinde pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör teknolojisi o kadar hızlı gelişmektedir ki; IUPAC tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonu 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı biyosensör tanımı biyomikroçiplerin gelişimi ile daha şimdiden geçerliliğini yitirmiştir [1].

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, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz

edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir transduser seçilmelidir. Transduser ve biyokomponent birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir [1,3]. Şekil 2.1.'de bir biosensör sisteminin birimleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil:2.1. Biosensör bileşenlerinin şematik gösterimi [4]

Günümüzde biosensörler; biyokomponent (ya da biyolojik tanıma bölgesi) ve transduser olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içermektedir. Bunların en önemli olanları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Biosensör bileşenlerinin içeriği

Analiz Edilecek Madde Türü	Biyolojik Tanıma Bölgesi	Sinyal İletici Sistem (Transduser)
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 mikrobaleans

2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

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 [5]:

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

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

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır [5]:

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

2.2.3. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre [5]:

1. Enzim temelli biyosensörler
2. Hücre temelli biyosensörler
3. DNA temelli biyosensörler
4. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immunosensörler)

2.3. Antikor/Antijen Temelli Biyosensörlerde (İmmüno-sensörler) İmmobilizasyon Yöntemleri

Analizlenmesi hedeflenen örneğe uygun biyokomponent ve transduser seçildikten sonra bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transduser yüzeyine immobilize edilmelidir [4].

İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler şöyledir:

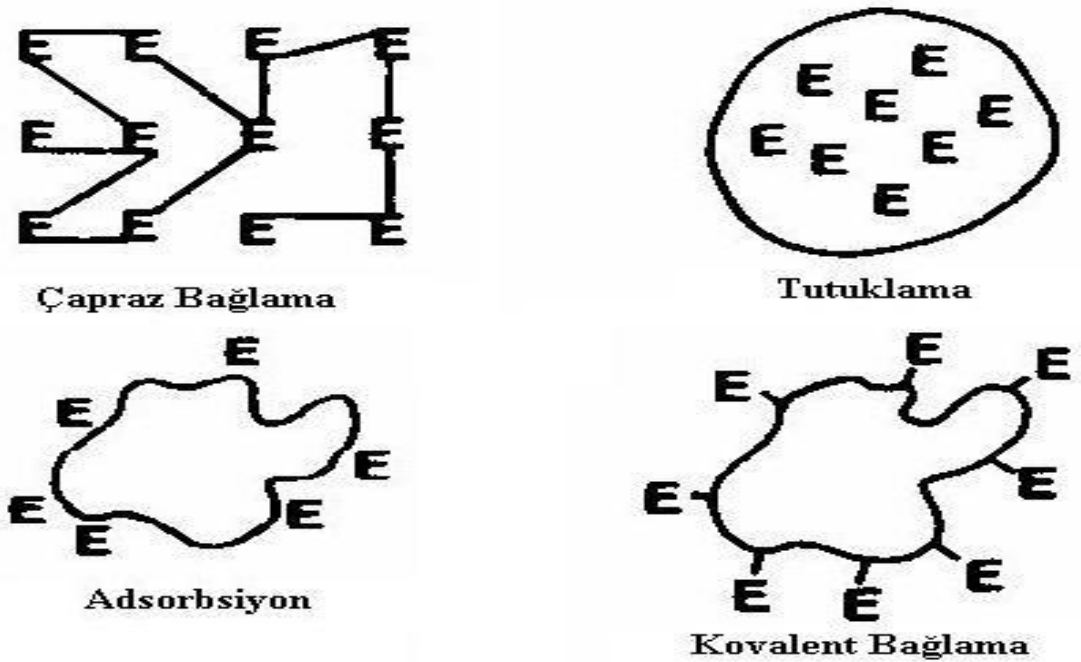
I. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)

II. Kovalent Bağlama

III. Tutuklama

IV. Çapraz Bağlama

Bu immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

Biyosensörün ömrü immobilizasyon işlemiyle biyokomponentin transduser yüzeyinde aktivite kaybı olmaksızın ne kadar süre tutulabildiğine bağlı olduğundan, biyokomponentin uzun süre yüzeyden ayrılmasını engellemelidir. Antikor immobilizasyonunda antijen bağlanma merkezi immobilizasyon esnasında zarar görmemeli ya da antijen bağlanmasında sterik engel nedeniyle düşüş olmamasına dikkat edilmelidir [6].

2.3.1. Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyokomponentin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Walls kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorbsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir [6].

2.3.2. Tutuklama

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrikslerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilebilirler. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür [6].

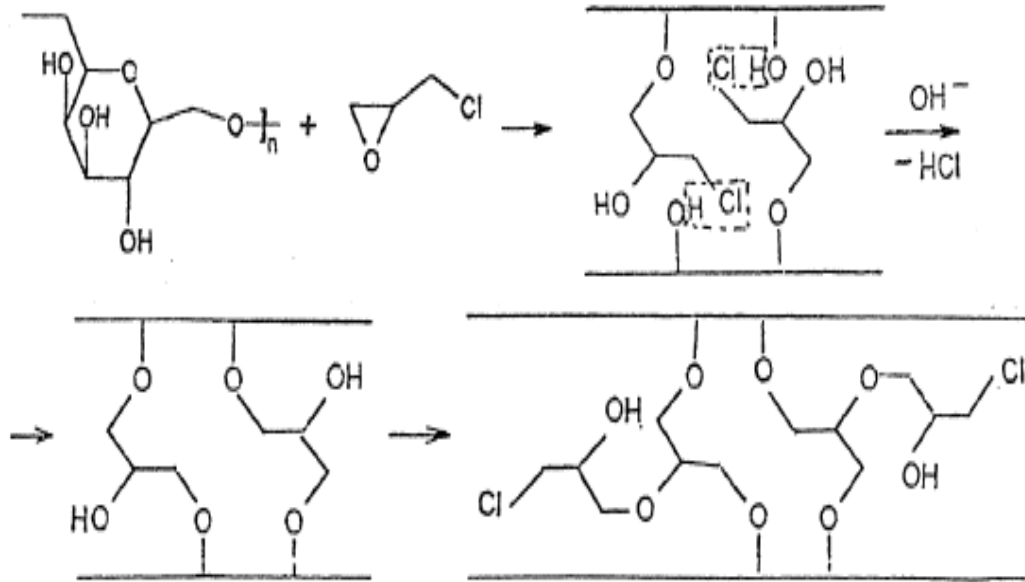
2.3.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama; küçük molekülü bi- veya multi-fonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyokomponent ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama ajanı glutaraldehitir. Glutaraldehit dışında epiklorohidrin, heksametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, bisdiazobenzidin-2,2- disülfonikası gibi kimyasallarda çapraz bağlamada kullanılabilir [6].

2.3.3.1. Epiklorohidrin ile çapraz bağlama

Epiklorohidrin (C_3H_5ClO) diğer bir adıyla 3-kloropropilen oksit kloroform benzeri bir kokuya sahip, tahriş edici renksiz bir sıvıdır. Hava ile oluşturduğu gaz karışımı patlayıcı özelliğe sahiptir ve yanması sonucu fosgen ($OCCl_2$), HCl ve CO gibi zehirli gazlar açığa çıkar. Bileşik alüminyum, çinko gibi metal iyonlarına, anhidro metal halojenürlere, alkol içeren bileşiklere ve kuvvetli asit ve bazlara karşı oldukça reaktiftir [7]. Epiklorohidrin hem epoksit halkasından hem de klorür üzerinden reaksiyon verebilir. Bu özelliğinden dolayı özellikle birden fazla hidroksil grubu içeren bileşiklere (dekstran, polietilenglikoller gibi) karşı çapraz bağlayıcı bir ajan olarak kullanılabilir [8].

Dekstranla oluşturduğu çapraz bağlama işleminde öncelikle epoksi halkası açılır ve elektrofil kısım dekstran molekülleri üzerinde bulunan hidroksil grubuna saldırarak buraya bağlanır. Diğer uçta bulunan klor ise başka bir dekstranın hidroksil grubunun H^+ ile zayıf etkileşim içine girer. Ortama baz ilave edilmesi ile HCl ortamdandır. Böylelikle iki dekstran molekülü birbirine bağlanmış olur. Epoksit halkasının açılması sırasında epoksit oksijeni ortamdandır proton alarak hidroksil formuna dönüşür. Bu hidroksil grubu başka bir epiklorohidrin molekülünün bir ucuyla bağ yapar ve bu epiklorohidrinin diğer bir ucuna da başka bir dekstran molekülü bağlanır. Böylelikle üç dekstran molekülü birbirine çapraz olarak bağlanmış olur. Epiklorohidrinin dekstran ile yaptığı çapraz bağlama reaksiyonunun mekanizması Şekil 2.3.'te gösterilmiştir [9,10].



Şekil 2.3. Epiklorohidrinin dekstran moleküllerini çapraz bağlama mekanizması

Bu tepkime merkptoalkoller ile de benzer bir mekanizma yoluyla ilerlemektedir. Bu tepkimenin daha hızlı gerçekleşmesi için baz olarak NaOH kullanılır. NaOH kullanımı ile merkptoalkoller üzerindeki hidroksil grupları sodyum alkoksi haline gelir ve klorürün uzaklaşıp epiklorohidrinin bağlanması için uygun hale geçer. Sonrasında da etanolamin gibi hidroksil içeren başka bir bileşik eklenmesiyle klorür ortamdandır HCl şeklinde uzaklaşır. Böylelikle merkptoalkoller ile hidroksil içeren başka bileşikler çapraz bağlanmış olur [11].

2.3.3.1. Glutaraldehit ile çapraz bağlama

Çapraz bağlama reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılan glutaraldehit yapı olarak her iki ucunda da birer aldehit grubu içeren beş karbonlu bifonksiyonel bir reaktiftir. Sahip olduğu aldehit gruplarından dolayı amin grupları ile etkileşerek Schiff bazı oluşturabilir. Bir ucundan proteinler ile diğer ucundan ise elektrot yüzeyindeki amin grubu içeren başka bir molekül ile Schiff bazı oluşturarak bu iki yapıyı birbirine çapraz bağlar [12].

2.3.4. Kovalent bağlama

Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı takdirde, kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) gibi çeşitli manipülasyonlarla yüzeyde reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyokomponenti içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir.

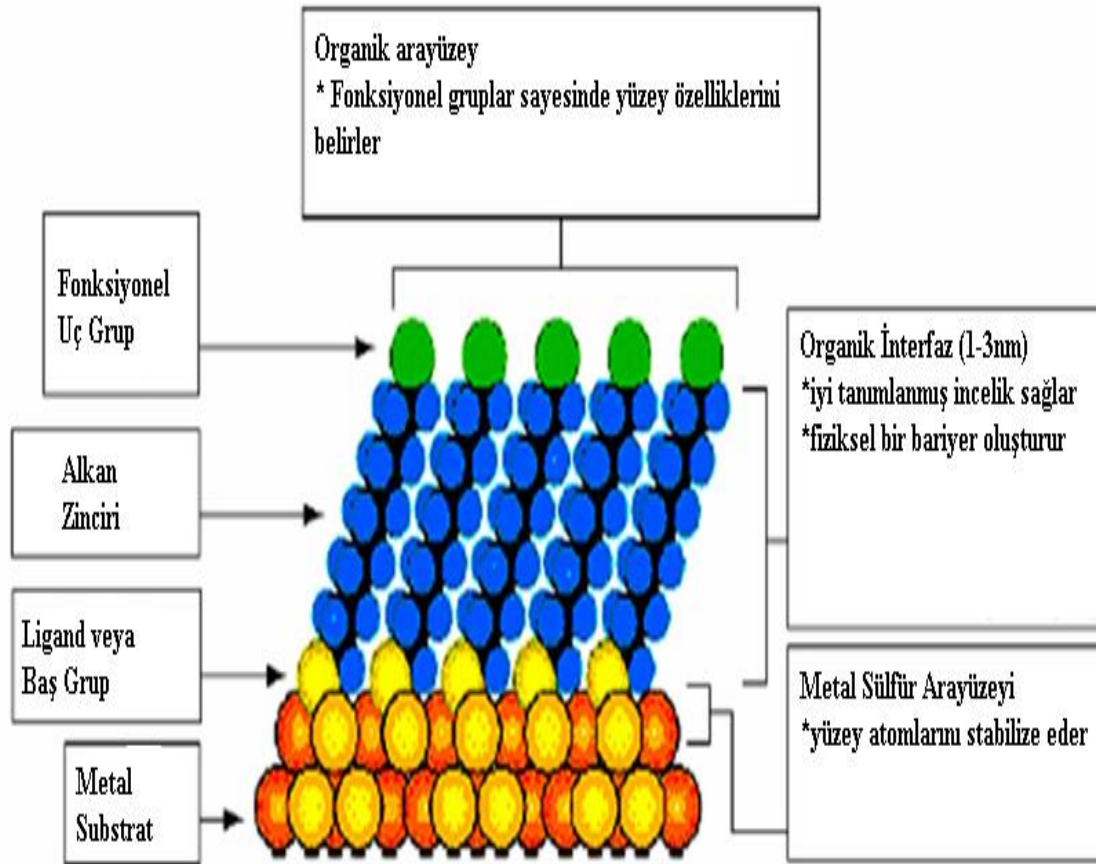
Biyokomponentlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir [6].

2.3.4.1. Enzimlerin kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) yöntemiyle immobilizasyonu

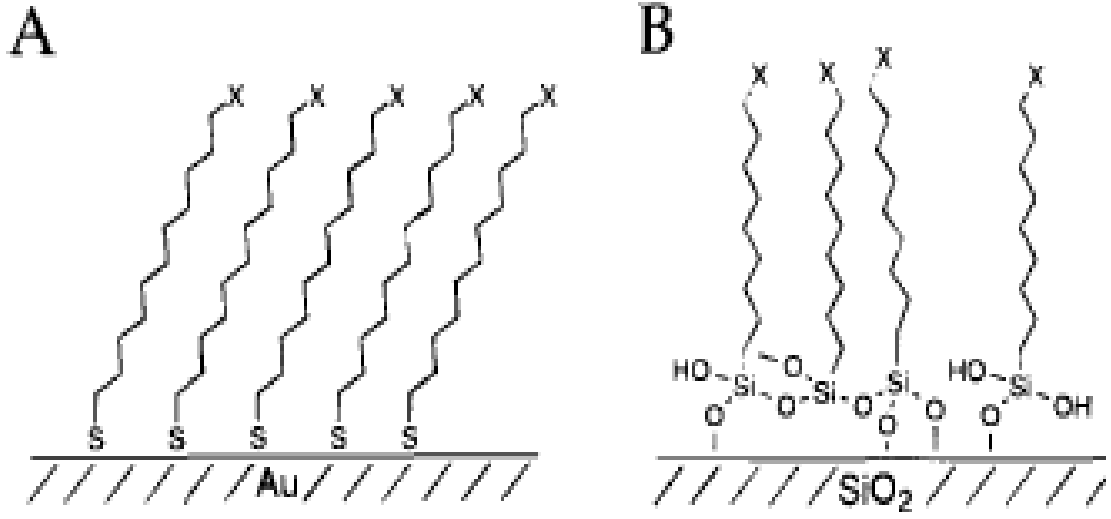
SAM oluşumu metal yüzey ve seçilen organik molekülün baş grubu arasında meydana gelen güçlü kemisorbsiyon ile oluşmaktadır [13,14]. Alkil zincirleri arasındaki hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri sonucunda çok iyi organize olmuş ve elektrot yüzeyine çok sıkı paketlenmiş bir tek tabaka elde edilir. 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 [15]. SAM ve bu tabakaların bazı özellikleri Şekil 2.4'te şematik olarak gösterilmiştir. Tek tabakanın oluşumunu ve paketlenme yoğunluğunu; substratın

doğası, pürüzsüzlüğü, çözgen, adsorbatın (tutunan) doğası, absorbatın tutunma süresi, sıcaklık ve adsorbat konsantrasyonu gibi pek çok parametre etkiler [16].

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 [17]. Şekil 2.5.'te farklı yüzeylerdeki tek tabaka oluşumları gösterilmiştir.



Şekil 2.4. SAM in şematik gösterimi [17]



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 [18].

Elektrot yüzeyine SAM yapıların immobilizasyonu genelde elektrotun adsorblanacak maddenin seyreltik (10-100mM) 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 [16,17].

SAM kullanımının çok önemli avantajları vardır:

1. Elektrot yüzeyine biyomoleküllerin bağlanması için ya direkt kimyasal bağlar kullanılır veya polimerik destekler kullanılarak enkapsülasyon yapılır.
2. Düzenli yapının, iğne deliği boşlukların ve stabil tek tabakanın oluşması kolaydır.
3. SAM yüzey ile sağlanan mikro çevre benzeri membran biyomolekül immobilizasyonu için uygundur.
4. Çeşitli fonksiyonel gruplar ile SAM'da ki baş grupların dizaynının esnekliği isteğe göre hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin elde edilmesini sağlar.

5. SAM üzerinde immobilizasyon için çok az miktarda biyomolekül (tek tabaka oluşturmak için gerekli) gereklidir.
6. Çok olağanüstü durumlarda moleküler düzeyde bilgi edinmek örneğin protein adsorpsiyonu, DNA hibridizasyonu, antijen-antikor ilişkisi vs. için AFM gibi yüzey duyarlı teknikler kullanılır.
7. +0.8V ile -1.4V arasında SCE'ye karşı uygulanan potansiyelde stabil olduğunu göstermektedir ki bu durum onu pek çok elektrokimyasal enzim elektrotu uygulaması için uyumlu hale getirir [16].

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 [15].

2.4. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri

2.4.1. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

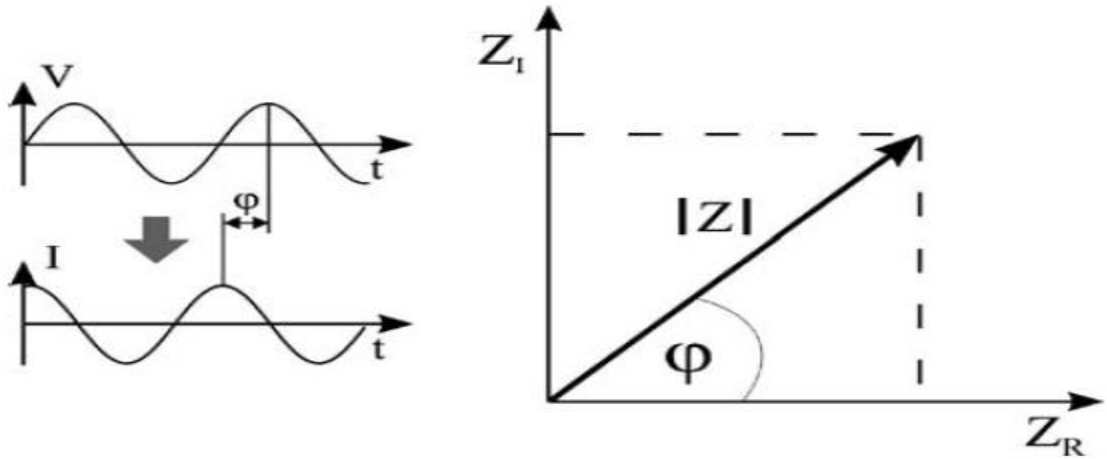
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Elektrokimyasal dielektrik spektroskopi, EIS) sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir yöntemdir. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük aktarımı ve membran/çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda çok sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda ise biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. EIS'nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin

belirlenmesinin yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır [19].

Bir sistemin impedansı genellikle küçük genlikli bir potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. Bu tanımdan yola çıkarak impedans; potansiyel-zaman fonksiyonun $V(t)$ akım-zaman $I(t)$ fonksiyonuna bölümüdür. V_0 ve I_0 maksimum değere ulaştıklarında, f ; frekans, t ; zaman, ϕ potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır. Y ise kompleks iletkenliktir.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi f t)}{I_0 \sin(2\pi f t + \phi)} = \frac{1}{Y} \quad (1.1)$$

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 ϕ ya da reel Z_R ve imgesel Z_I olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.6. İmpedans'ın potansiyel-zaman ve akım-zaman büyüklüklerine bağlı matematiksel gösterimi

Bu durum, Şekil 2.6.'da gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir: Bode grafiği ($\log f$ 'nin fonksiyonu olarak $\log Z$ ve ϕ) veya Z_R ve Z_I 'nin olduğu Nyquist grafiği şeklindedir.

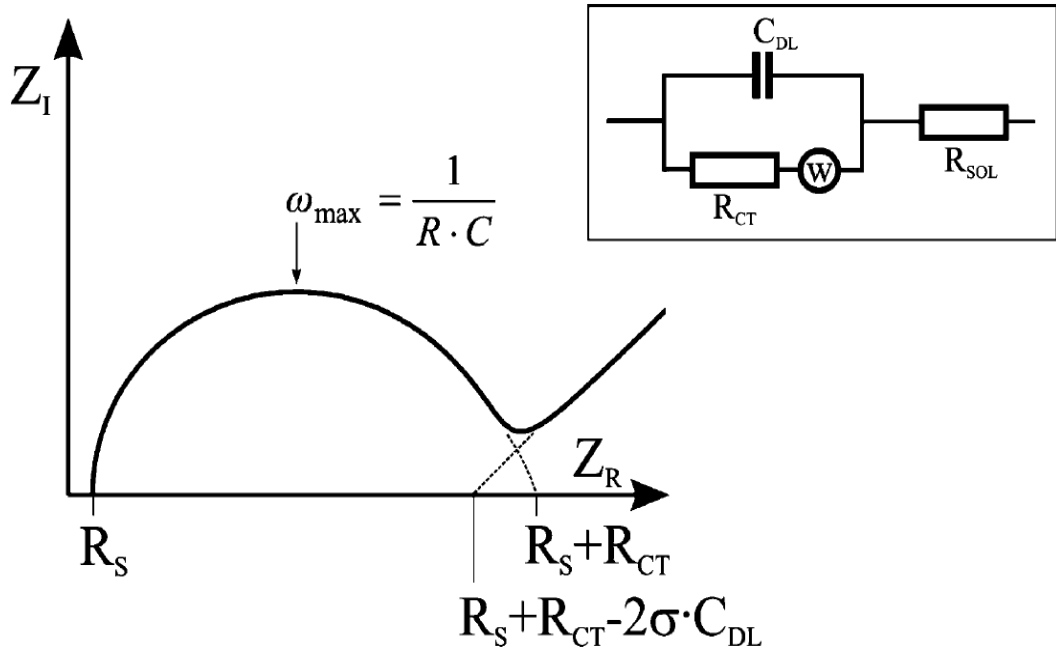
İmpedans “spektroskopisi” adı, impedansın tek bir frekanstan ziyade farklı frekansları tayin edebilme gerçeğinden türemiştir. Bu sayede bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların veya membranların değişimi, difüzyon prosesleri ve bunların karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır. Bu bilgilere ulaşmak için, impedans spektrumu genellikle eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle direnç ve kapasitanstan oluşan bu devre incelenen sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini açıklar. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partiyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda bir impedans elementinin –direnç veya kapasitans- değişimi çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Bazı durumlarda, tüm impedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki kurmak mümkündür [20, 21, 22].

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde, elektrolit çözeltisi sistemin tek bileşeni olarak incelendiğinde, impedans davranışı açıklamak için 4 unsur kullanılır: ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg impedans. Bu unsurlar ve tanımlamalarının özeti Tablo 2.2’ de verilmiştir.

Tablo 2.2. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları

İmpedans elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans bağımlılığı
R	$Z=R$	0°	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	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°	Evet

Eşdeğer devreler, deneysel impedans verilerini seri ve/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 (W)'dir. Şekil 2.7.' de gösterilen Nyquist grafiğinde R_s ve R_{ct} değerleri kolaylıkla belirlenebilir. Çift tabaka kapasitansı ise yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekanstan hesaplanabilir.



Şekil 2.7. Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli

Biyolojik bir materyali (antikor, enzim vb. gibi) karakterize etmek için, elektrotlar sisteme uygulanarak bir elektrokimyasal hücre elde edilmelidir. AC potansiyel uygulanması ile birlikte, çalışma elektrodu, biyolojik materyal, çözelti ve karşı elektrot gibi akım tüm sistem elemanlarını dolaşmaya başlayacaktır. Ölçülen impedans, esasen bu elemanların bireysel katkılarının bir özetidir.

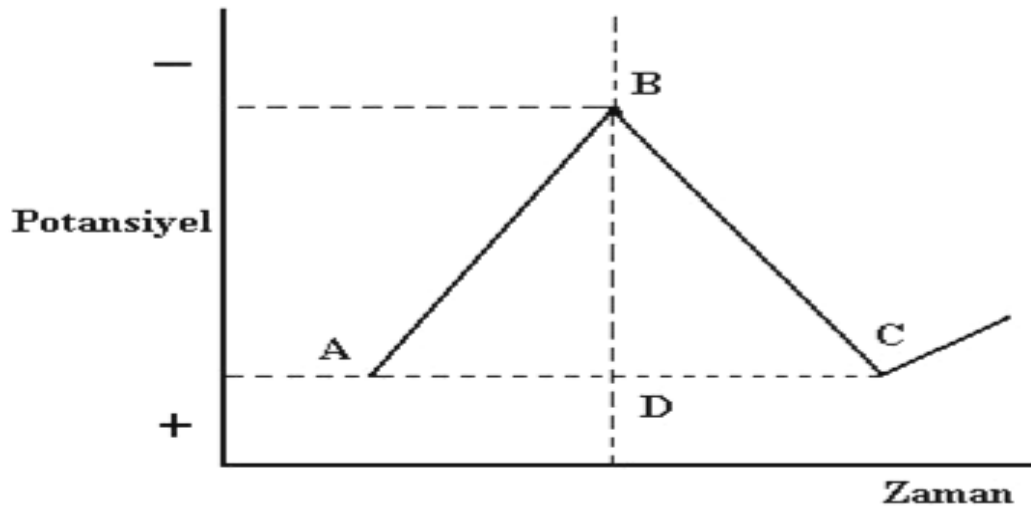
a) Biyolojik bir materyalin impedansı ya belirli bir analitin konsantrasyonunun fonksiyonu ya da zamanın bir fonksiyonudur. Her iki durumda da her iki elektrodun impedansı, ölçülecek impedansa kıyasla küçük olmalıdır. Bu da geniş yüzey alanları kullanılarak sağlanabilir. Ayrıca, çözülden kaynaklanabilecek biyolojik materyalin

nonspesifik bağlanmalarından kaçınılmalıdır, çünkü bu durum ara yüzey impedansı artırır.

b) Çalışma elektroduna biyolojik bileşen immobilize edilir ve analitle ilişkisi tayin edilir. Bu, tipik bir biyosensör uygulamasıdır. Burada duyar elektrotun impedansı (yani biyolojik materyalle modifiye edilmiş çalışma elektrodu) 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 [23,24].

2.4.2. Döngüsel voltammetri

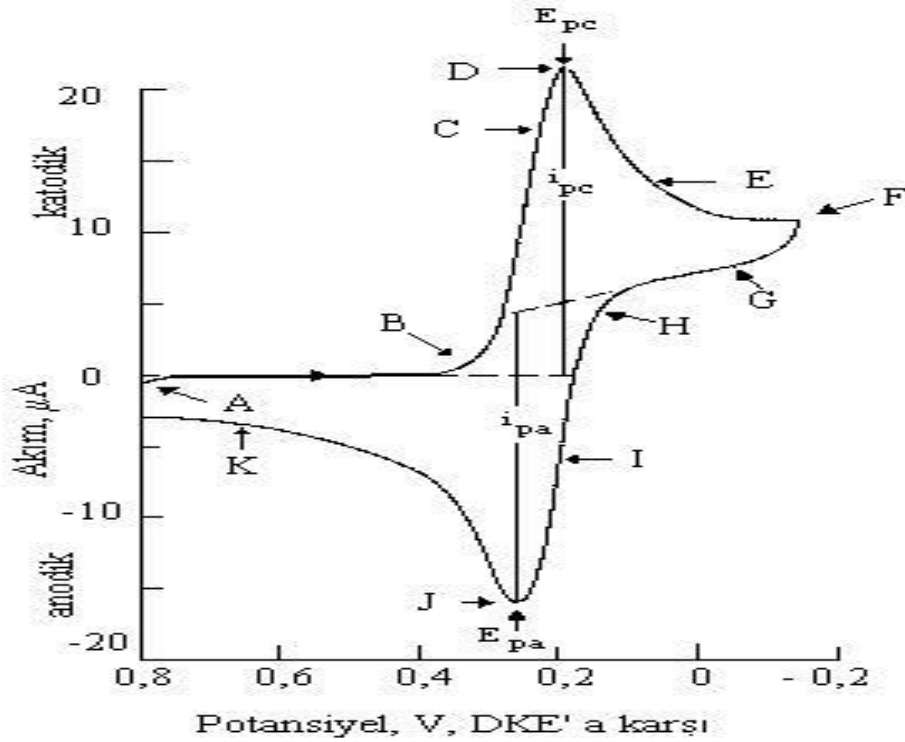
Döngüsel voltammetride (Cyclic Voltammetry, CV), karıştırılmayan bir çözeltide küçük durgun bir elektrodun akım cevabı üçgen dalga şekilli bir potansiyel (Şekil 2.8.) ile uyarılır [25].



Şekil 2.8. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel

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 2.9.'daki gibi bir voltammogram elde edilir.



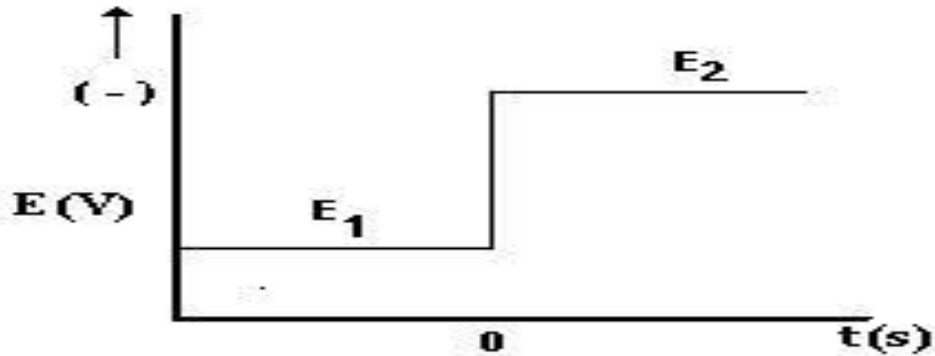
Şekil 2.9. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram [25].

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 ki 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 sifıra gider ve sonra da anodik

olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlığında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır [25].

2.4.3. Kronoamperometri (CA)

Kronoamperometride çalışma elektrodunun potansiyeli aniden değiştirilir ve durgun ortamda akım–zaman ilişkisi gözlenir. Kronoamperometride çözeltiliye daldırılan çalışma elektroduna uygulanan potansiyel–zaman grafiği Şekil 2.10.'da gösterildiği gibidir. Önce çalışma elektroduna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E_2 'ye değiştirilir. E_2 potansiyeli, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde seçilir.



Şekil 2.10. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi [25].

2.5. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler

Bütün elektrokimyasal biyosensörlerde olduğu gibi, impedimetrik biyosensörler de biyomoleküllerin kondüktif (veya yarı kondüktif) bir transduser yüzeyiyle etkileşimini esas alan biyoelektronik cihazlardır. Ölçüm prosesleri, reseptör biyomolekül ile analit arasında oluşan algılama yüzeyinin, elektronik transduserin elektriksel özelliklerini direkt veya indirekt şekilde değiştirmesine dayanır. Antijen-antikor veya DNA-DNA etkileşimleri gibi sınırlı katalitik aktiviteye sahip bileşiklerin

analizi için geliştirilen EIS temelli biyosensörlerin sayısı yabancı kaynaklarda her geçen gün daha da artmaktadır. Prosesler için farklı analitik çözümler sunabilen EIS; son yıllarda çok sayıda kimyasal ve fiziksel prosesin çalışılmasında kullanılan çok etkili bir yöntem haline gelmiştir. Bunun yanı sıra membran özelliklerinin belirlenmesi, biyosensör karakterizasyon ve fabrikasyonu gibi bilimsel araştırmalar için de etkili bir teknik olan EIS ile gerçekleştirilebilmektedir. Enzim-substrat etkileşimlerinin etkileri ve kataliz reaksiyonu fazla gözlenmemesine rağmen, antijen-antijen, reseptör-hormon, DNA-DNA, protein-protein, protein-DNA, RNA-protein, RNA-RNA, DNA-ilaç gibi afinite etkileşimlerinden sonra elektrot yüzeyinde meydana gelen yük transfer değişimleri EIS ile çok etkili bir şekilde izlenebilir. Çeşitli spesifik ve hassas ölçümler , elektrot materyaline (metaller, metal oksitler, camsı karbonlar, yarı iletkenler) elektrot geometrisine (klasik elektrot düzenlenmesi veya çoklu elektrotlar), analite (proteinler, antikolar, nükleik asitler vs) veya kullanılan amplifikasyon protokolüne (label-free tabakasız, enzim işaretli protein tabakalar, iletken polimer filmler nanopartiküller vs.) göre sınıflandırılabilir [26-30].

2.5.1. Enzim Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

İmpedans spektroskopisi, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektriksel özelliklerinin ölçülmesi için etkin bir yöntemdir. Ancak geniş bir frekans aralığında bütün impedans spektrumunun taranması zaman alıcıdır. Bundan dolayı impedimetrik teknikler, enzim temelli bir biyosensörün karakterizasyonu için kullanılmaktadır [30].

Enzim sensörleri içerisinde amperometrik elektrotlar en çok ilgi çeken transdüserlerdir. Bununla birlikte, bir enzimin dönüşümünden (turnover) dolayı redoks-aktif bileşiğinde meydana gelen değişim, yük aktarım direnciyle belirlenebilir. Bu durum, glukoz oksidazın ve mediatör olarak benzokinonun kullanıldığı glukoz tayini çalışmalarında gösterilmiştir [31].

Ho ve ark. serumdaki üre ve kreatinin miktarının belirlenmesi için kullan-at bir biyosensör sistemi geliştirmişlerdir. Bu çalışma kullanılan pH değişimlerine duyarlı poli (metilvinil eter)/maleik anhidrit polimerinin yüzeyden ayrılması sonucunda yük transfer direncinin artması esasına dayanmaktadır. Kreatinin ve ürenin enzimatik dönüşümü ile ortam pH'sı değişeceğinden R_{ct} 'deki artış izlenirken bu moleküllerin tayini de gerçekleştirilebilir [32].

İmpedans spektroskopisiyle, substrat ve enzim inhibitörlerinin tayini yapılmakla birlikte enzimin kendi aktivitesi de analiz edilebilmektedir. Bu duruma ilginç bir yaklaşım, parçalanabilir polimer filmlerin kullanılmasıdır. Bu polimerler elektrot üzerine kaplanırlar ve biyokatalitik reaksiyon vasıtasıyla polimer parçalanma ya polimer zinciri üzerinde enzimin direkt etkisiyle ya da enzimatik dönüşüm sonucu oluşan ürünün indirekt etkisiyle oluşur. Parçalanmaya başlayan filmin kalınlığı impedans ölçümleriyle kolaylıkla takip edilir. Bu yöntem; üre, glukoz, kimotripsin veya lipaz gibi enzimlerin tayininde gösterilmiştir. İmpedansın kullanıldığı bir diğer yol, elektrot yüzeyindeki lipit tabakasına “sinyalizasyon” proteinin katılması ve spesifik analitle etkileşimi sonucu konformasyonel değişiminin değerlendirilmesine dayanır [30, 33, 34].

Jelatin kaplanmış altın elektrot yüzeyindeki proteolitik aktivite değişiminin sebep olduğu impedans farklanmalarının ölçüldüğü, kollegenaz tayini için bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu sistemde, tabaka kritik bir kalınlığa ulaştığında, tabakanın enzim tarafından degradasyonu ile oluşan impedans hızla artar. Protein yıkımı ile impedansta oluşan farklanma, elektrot yüzeyinden jelatin tabakasının ayrılma hızı ile orantılıdır. Potansiyostatın cevap süresi çözeltinin karıştırılması ile düşürülebilmektedir ve bu biyosensör sisteminin kollagenaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanışlı bir yöntem olduğu gözlenmektedir. Ancak sensör yüzeyine kaplanmış jelatinin biyosensör tarafından saptanma yeteneği elektrolitlerin varlığında ciddi bir şekilde azalmaktadır [30, 35, 36].

2.5.2. İmmunokimya temelli impedimetrik biyosensörler

İmpedimetrik immünosensörlerin geliştirilmesinde itici güç, basit ekipmanların kullanıldığı tanı sistemlerine olan talep ve potansiyel moleküler etiketleme yapılmadan direkt olarak analit üzerinden yapılan analizlerdir. İmmünsensörler genellikle iki immobilizasyon stratejisi ile hazırlanır; a) ilgili antijeni bağlayan antikörlerin veya reseptörlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu b) antijenin kendisinin immobilizasyonu. Her iki durumda da, bağlanma olayı elektriksel yüzey özelliklerinin değişimiyle sonuçlanacak olmasına rağmen, ikinci durumda (antijen immobilizasyonunda) antikörlerin yüksek molekül ağırlıkları ve düşük dielektrik katsayılarından ötürü daha büyük değişimler açığa çıkarabilir ki bu impedimetrik olarak çok daha etkili bir şekilde izlenebilir [37,38,39].

Spesifik etkileşimlere benzer yollarla kapasitansı etkileyen non-spesifik bağlanmaların etkisinin önüne geçmek için, ölçümlere diferensiyel bir mod önerilmiştir. Antikorlar bağlanma özellikleri korunarak Langmuir-Blodgett filmlerine birleştirilebilir ve oldukça düzenli algılama yapıları elde edilebilir. İnterleukin-6 için, epoksisilan işlevselleştirilmesi kullanılarak veya interferon- γ için SAM modifikasyonu ile antikor immobilizasyonunda oldukça hassas kapasitif ölçümler gerçekleştirilmiştir [28,29,30].

Bunun yanı sıra, direnç temelli sensörler de geliştirilmiştir. Örneğin, insan meme tümörü ilişkili glikoprotein, spesifik antikorların altın yüzeye SAM ile immobilizasyonu sonucunda belirlenmiştir. Komplementer antijenin bağlanması, yük transfer direncinin (R_{ct}) değişmesine sebep olur. Direnç temelli ölçüm yöntemleri, reseptör-ligand etkileşimleri, patojen mikroorganizmaların belirlenmesi ve tat-koku moleküllerinin tayin edilmesinde de kullanılır. İmmün analizler için bir diğer sistem, çok ince platin tabakaların kullanıldığı ve impedans model analizlerinin temel alınıp iletkenlik değişimlerinin değerlendirildiği sistemlerdir. Polipirol gibi iletken polimerler kullanılarak algılama biriminin immobilizasyonunda özel yaklaşımlar sergilenmesi, söz konusu immünosensörlerin hassasiyetini iyileştirilebilir. Polimerik ağın iletkenliği, bağlanma olaylarının oluşturduğu konformasyonel değişikliklerden güçlü bir şekilde etkilendiği için alınan cevap yükselir. Ayrıca biyotinli polipirol filmler, biyotinli antikorların avidin ile immobilizasyonunda kullanılmıştır [40, 41, 42].

Direkt olarak ölçüme olanak tanıdıklarından, işaretleme yapılmadığından, hızlı olduklarından ve çoklu analiz sistemlerine olanak sağladığından dolayı, affinite bağlama esaslı immünosensörler ile her geçen gün daha çok çalışılmaktadır. Son yıllarda, birçok yeni immün temelli impedimetrik biyosensör tasarımına ilişkin çalışma yayınlanmıştır.

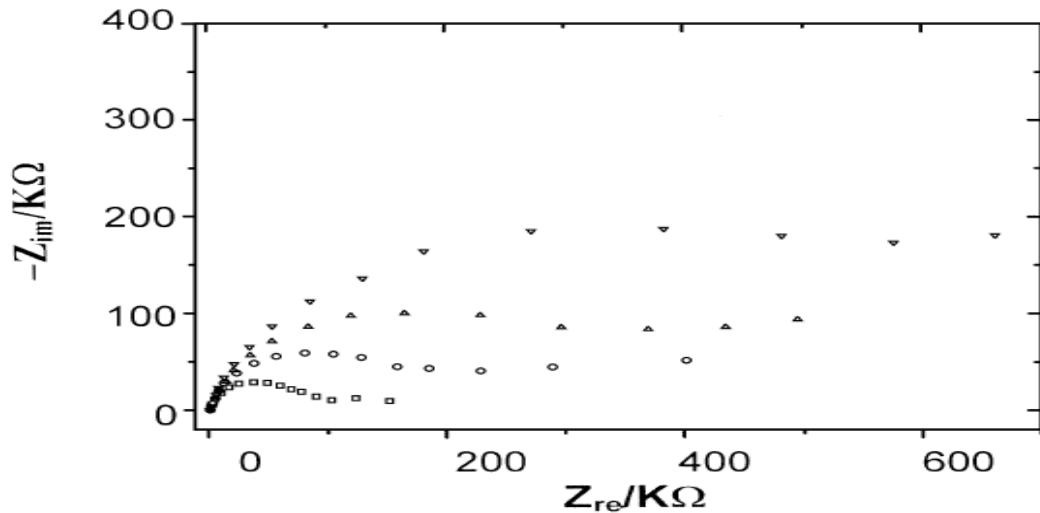
Aşağıda EIS temelli bazı immünosensör örnekleri açıklanmıştır:

Ma ve ark. insan meme kanserine ilişkin glikoproteininin tayinine yönelik bir impedans immünosensörü çalışması yayınlamışlardır. Bu çalışmada antikor, altın elektrot yüzeyine kendiliğinden adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir. Elektrokimyasal karakteristiklerdeki değişim, spesifik antijen bağlandığı sürece gerçekleşmiştir. Nyquist eğrisindeki yarım daireden hesaplanan yük transfer direnci, kararlı bir antijen-antikor kompleksi oluştuğundan dolayı artmıştır [40].

İletken polimerler de biyomoleküllerin immobilizasyonu için iyi birer matrikstir. Sargent ve ark., iletken polipirol (PPy) film üzerindeki antikor-antijen (Ab-Ag)

etkileşimlerinin mekanizmasını araştırmışlardır. Heterojen polimerik arayüzey içerisindeki yük oluşumunun ve taşınımının teorisi, antikor-antijen bağlanması sırasında oluşan yük transferi açıklamak için öne sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre, antikor immobilize edilmiş iletken polimer temelli elektrotlarda elde edilen yük transferi, dört adımda ortaya çıkar: (1) iyonların elektroda difüzyonu (2) porlu PPy/membran arayüzeyinde yük transferi, (3) polimer PPy membran boyunca göç (4) Antijenin PPy arayüzeyinde adsorpsiyonu veya desorpsiyonu. Dördüncü adımdaki adsorpsiyon ve dezorpsiyon süreci, hız sınırlayıcı adımdır. Bu adım uygun elektriksel potansiyel seçimi ile kontrol edilebilir. Bu da antikor-antijen etkileşiminin, uygulanan potansiyelden büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir [43,44].

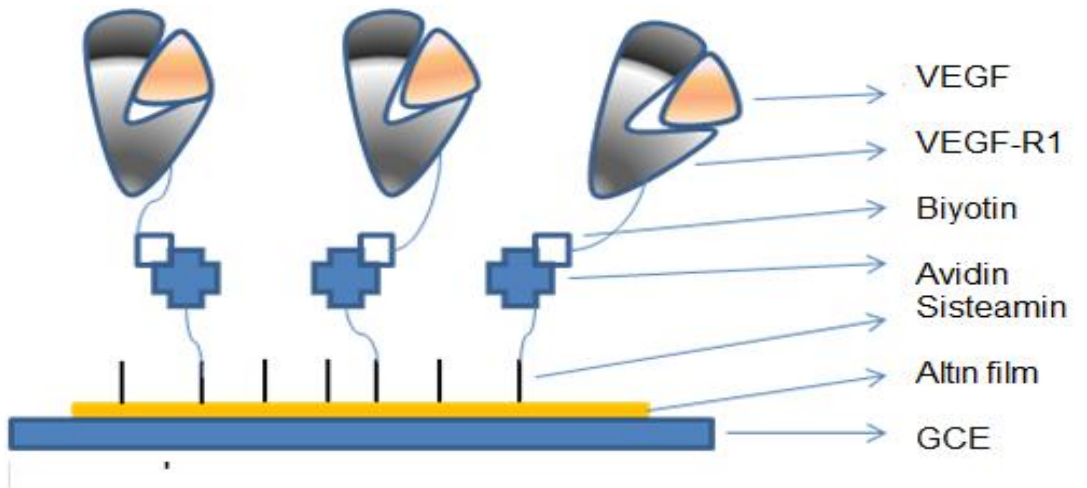
Elektrobiriktirme ile oluşturulmuş biyotinli polipirol filmler de, impedimetrik immunosensörler için bir immobilizasyon matrisi olarak tanımlanmıştır. Ouerghi ve ark. biyotinlenmiş antikor (anti Human IgG) iletken polimer üzerindeki serbest biyotin gruplarına avidin vasıtasıyla bağlanır. Şekil 2.11.'de gösterildiği gibi, Nyquist eğrilerindeki ikinci yarım daire çapı, özellikle de konsantrasyon bağımlı impedans ölçümlerinde tercih edilen düşük frekanslarda, artan antijen konsantrasyonu ile artmıştır. Bu immobilizasyon yöntemi tekrarlanabilir ve kararlı bir sisteme olanak sağlamaktadır. Biyosensörün doğrusal aralığı 10-80 ng/mL antijen ve dedeksiyon limiti 10 pg/mL'dir [45].



Şekil 2.11. Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları [45]

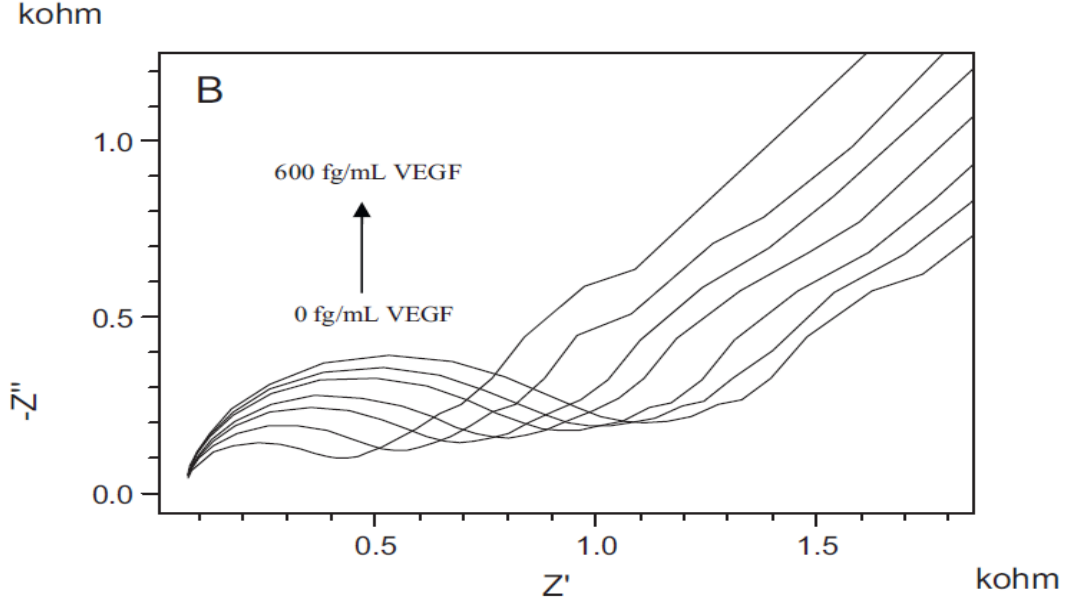
Başka bir polipirol immobilizasyon matriksi kullanılan çalışma da, Geoffrey ve ark. tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada impedans temelli reaktif biyoafinite biyosensörü geliştirmiştir. Antikor yüklenmiş polipirol filmlerde, düşük frekanslarda polaronik iletim ve yüksek frekanslarda elektriksel iletim olmak üzere iki tane yük transfer prosesi gözlenmiştir. Affinite reaksiyonu Bode eğrisinde hiçbir farklılaşmaya sebep olmamıştır. Ancak, Redoks döngüsü (-0,1'den -0,9'a ve -0,9'dan -0,1'e) olduğunda, pik polaronik faz açısı olarak gözlenen muhtemel bir bağlanmaya bağlı cevap oluşur. Bu sonuç, bağlanma sonrasında protein etrafındaki polimer zincirin tekrardan sıralanmasına dayandırılmaktadır [46].

Sezgintürk ve ark., redoks probu varlığında protein çoklu tabakaları redoks impedans spektroskopisi ile araştırılmışlardır (Şekil 2.12a.). Bu çalışmada, özellikle meme kanseri biyobelirteçi olarak değerlendirilebilen, vaskular endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tayini gerçekleştirilmiştir. Tabaka-üstü-tabaka oluşturma yöntemiyle hazırlanan çoklu tabaka film, bir altın tabaka üzerinde biyotin işaretli antikor (bio-Ab) ile avidinden oluşmuştur. Çoklu tabakaların adım adım oluşumu sırasında impedans spektrumundaki belirgin bir farklanma gözlenmiştir. Sensör yüzeyine ilave edilen her tabaka, kendi elektriksel özelliklerine bağlı olarak elektron transfer rezistansını değiştirmektedir. Bu adımların sonunda biyo-reseptörün ve onun ligandının (VEGF) bağlanması R_{ct} değerini artırdığı Şekil 2.12b.'de gösterilmiştir [47].



Şekil 2.12a. Çoklu protein tabakaları immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi [47].

Böyle bir sistemde artan VEGF derişimlerine karşı elde edilen Nyquist diyagramları Şekil 2.12b.'de gösterilmiştir.

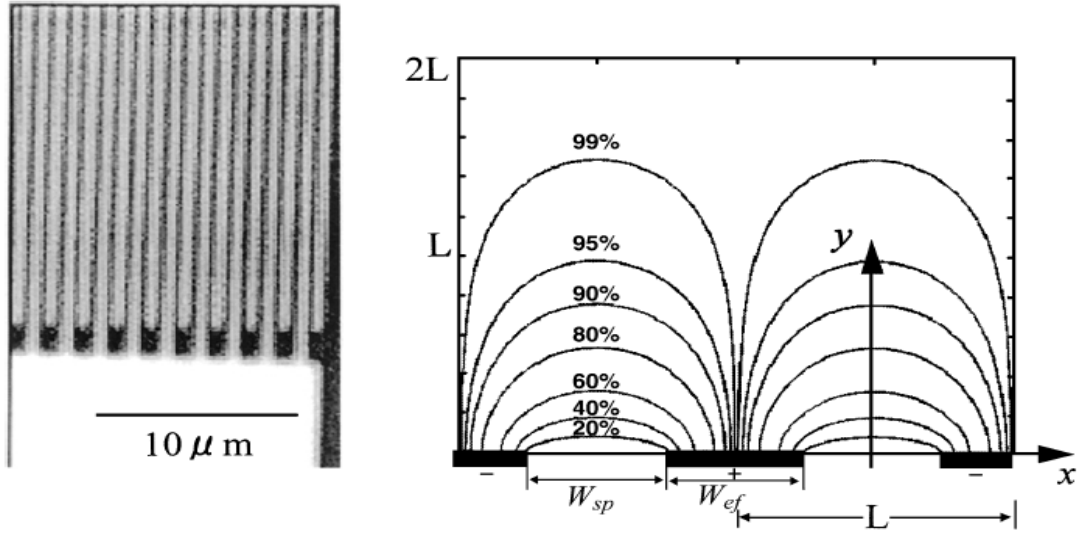


Şekil 2.12b. Artan VEGF konsantrasyonlarına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumları [47]

İmpedans spektroskopisi, ISFET cihazlarının gözenekli yüzeyleri üzerindeki biyomateryal tabakalarının yapısını karakterize etmek ve oyuk ara yüzeyindeki antijen-antikor etkileşimlerini açıklamak için de kullanılır. ISFET cihazlarının oyuk ara yüzeyleri üzerindeki protein tabakalarının kalınlığını karakterize edebilme yeteneği impedans spektroskopisinin sadece yapısal karakterizasyonlara olanak sağlamadığını, aynı zamanda ISFET oyukları üzerinde gerçekleşen biyo algılama olaylarını ölçen ve saptayan bir analitik yöntem olduğunu göstermektedir [48].

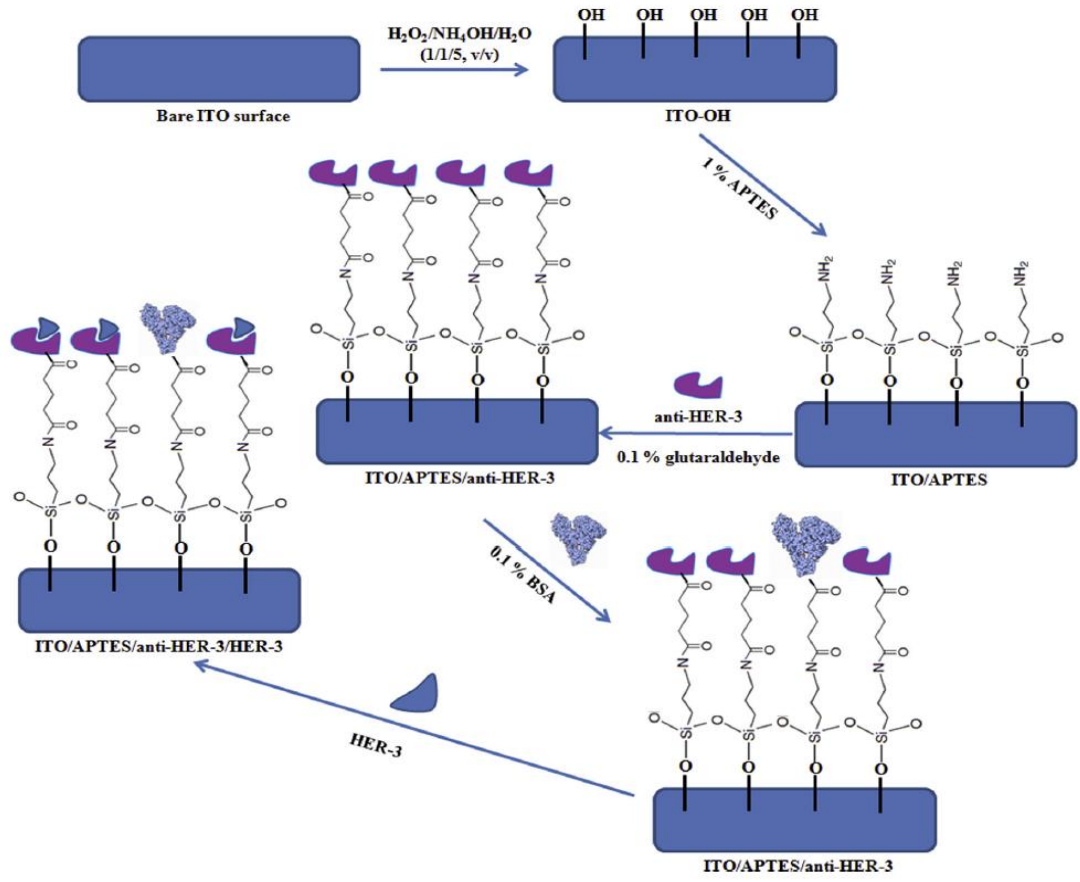
Nano boyutlarda sensör geliştirmek, impedimetrik biyosensörlerin cevap performansını arttırabilir. Van Gerven ve ark. nano boyutta kenetlenmiş (interdigitated) elektrot dizileri (array) ile impedimetrik biyosensörler geliştirmişlerdir (Şekil 2.13.). Bu sistemde 500 nm'den 250 nm'ye kadar değişen elektrot genişliği ve boşlukları elde edilmiştir. Nano boyutlardaki elektrotlar, yüzeyden sadece 100 nm yukarıdaki bir alanı tararlar. Bundan dolayı diğer elektrotlara kıyasla duyarlılıkları daha fazladır. Bu etki teorikte, kenetlenmiş elektrotlar arasındaki elektriksel alanın hesaplanması ile değerlendirilebilir. Örneğin genişliği ve aralıkları 250 nm olan elektrotlar için akımın %

80'i yüzeyden 250 nm daha yüksek olmayan bir tabakaya yayılır. Farklı KCl çözeltilerindeki model ve karakterizasyon çalışmaları, impedansın tamamının yüzeye yakın bir bölge için hesaplandığını ve çözelti karakteristiklerinin sinyalde gözükmediğini göstermiştir. Biyomoleküler yapıların, affinite bağlanmalarının impedans ile saptanması için, glukoz oksidaz, silanlanmış bir yüzeye bağlanmıştır [49].

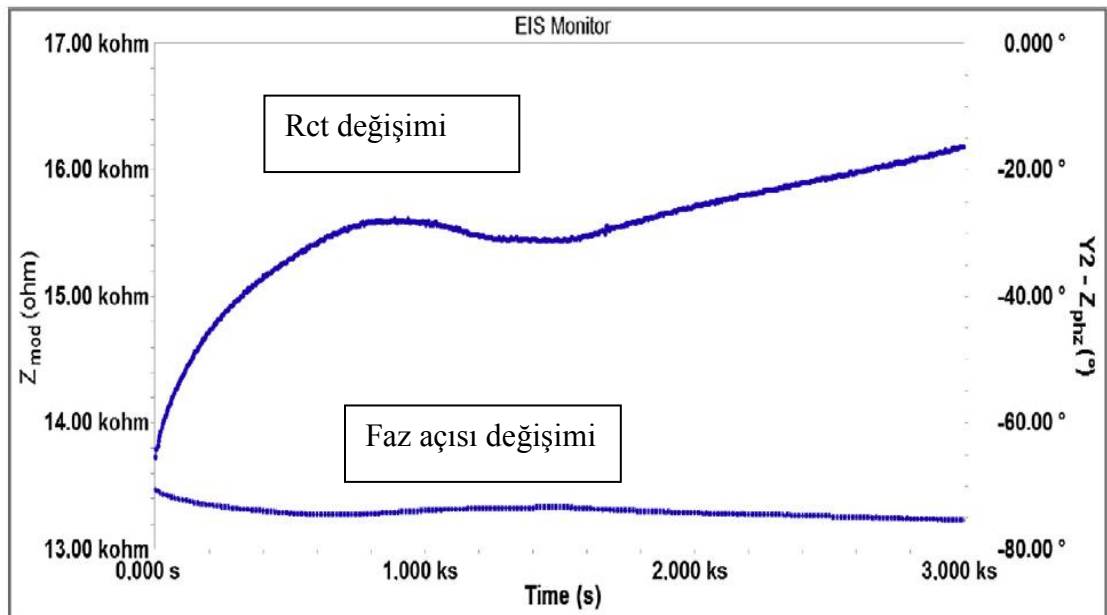


Şekil 2.13. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi [49]

Canbaz ve Sezgintürk, APTES [3-aminopropiltriethoksisilan] ile bir ince film tabakası oluşturarak HER-3 antijenine spesifik antikoru, ITO elektrot yüzeyine Şekil 2.14.'te gösterildiği gibi immobilize etmişlerdir. Geliştirdikleri biyosensör ile impedimetrik yöntemleri kullanarak HER-3 antijenini 50-200 fg/mL seviyelerinde tayin edebilmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada Şekil 2.15.'te gösterildiği gibi tek frekansta kronoimpedimetrik ölçümler alınmıştır. Burada R_{ct} ve faz açısının zamanla değişimi takip edilerek, Anti-HER3/HER3 bağlanması incelenmiştir. Şekil 2.15.'te de görüldüğü gibi antikor antijen bağlanması faz açısında büyük bir değişime neden olmazken, R_{ct} değerininin zamanla artmasına sebep olmuştur. Sonuç olarak tek frekansta impedans ölçümü, biyosensör yüzeyinde gerçekleşen zaman-bağımlı yavaş değişimlerin incelenmesinde kullanılan bir yöntem olma potansiyeline sahiptir [50]



Şekil 2.14. HER-3 biyosensörünün immobilizasyon şeması [50]



Şekil 2.15. Tek frekansta alınan HER-3 ölçümü

Biyolojik reseptörlerin biyosensörlerde kullanımının, biyolojik maddelerin düşük kararlılığı, küçük antijenleri için antikor oluşturulmasının zorlukları ve düşük kimyasal-termal kararlılıklar gibi iyi bilinen sınırlayıcı faktörleri vardır. Bundan dolayı doğal reseptörleri taklit edebilen, yapay reseptörlerin geliştirilmesine yönelik yeni eğilimler ortaya çıkmaya başlamıştır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) kararlı ve dirençli, ekstrem basınç, sıcaklık, pH altında veya organik çözücüler içerisinde kolaylıkla uygulanabilen materyallerdir. Kimyasal yapılarından ötürü, farklı formatlarda tekrar üretilebilirler ve farklı çevresel koşullarda uzun zaman kararlı kalabilirler. Kromatografik ayırmalarda kullanılmalarının yanı sıra, sensör uygulamalarına dair de ilginç çalışmalar mevcuttur. İnce yüzey filmleri özellikle bağlanma olayının impedimetrik transdüksiyonuna çok uygundur. Bu sayede, hücre ve virüslerde olduğu gibi organik moleküller için de kapasitif (sığasal) sensörler geliştirilmiştir. Ayrıca ucuzdurlar ve katı (kuru) halde saklanabilirler. MIPs sadece pestisit, aminoasit, steroid ve şekerler gibi organik moleküller için değil; hücre ve proteinler için de sentezlenebilirler [51]. Panasyuk-Delanet ve ark., 2001 yılında yaptıkları MIPs temelli bir çalışmada herbisit olan “desimetrini” kalıp olarak kullanmışlardır. UV ışığa maruz kalan benzofenonun ışığı adsorblamış tabakası, yüzeye yakın bölgede radikal polimerizasyonunu başlatır. Elektrotların, desimetrini spesifik bir şekilde tanıyan ve bağlayan MIPs ile kaplanması, elektrodun kapasitansında düşmelere sebep olur. Terbumeton veya atrazin eklendiğinde kapasitansta küçük bir düşme varken, metribuzin eklendiğinde desimetrininkine benzer bir düşüş gözlenir. Kalıp polimerizasyonu da denilen moleküler baskılama, ümit vaadeden ve pahalı olmayan bir alternatif yöntemdir. Ancak analitlerin ince MIPs içerisine yavaş difüzyonu, yavaş reaksiyon kinetiğinin oluşmasına sebep olur [52].

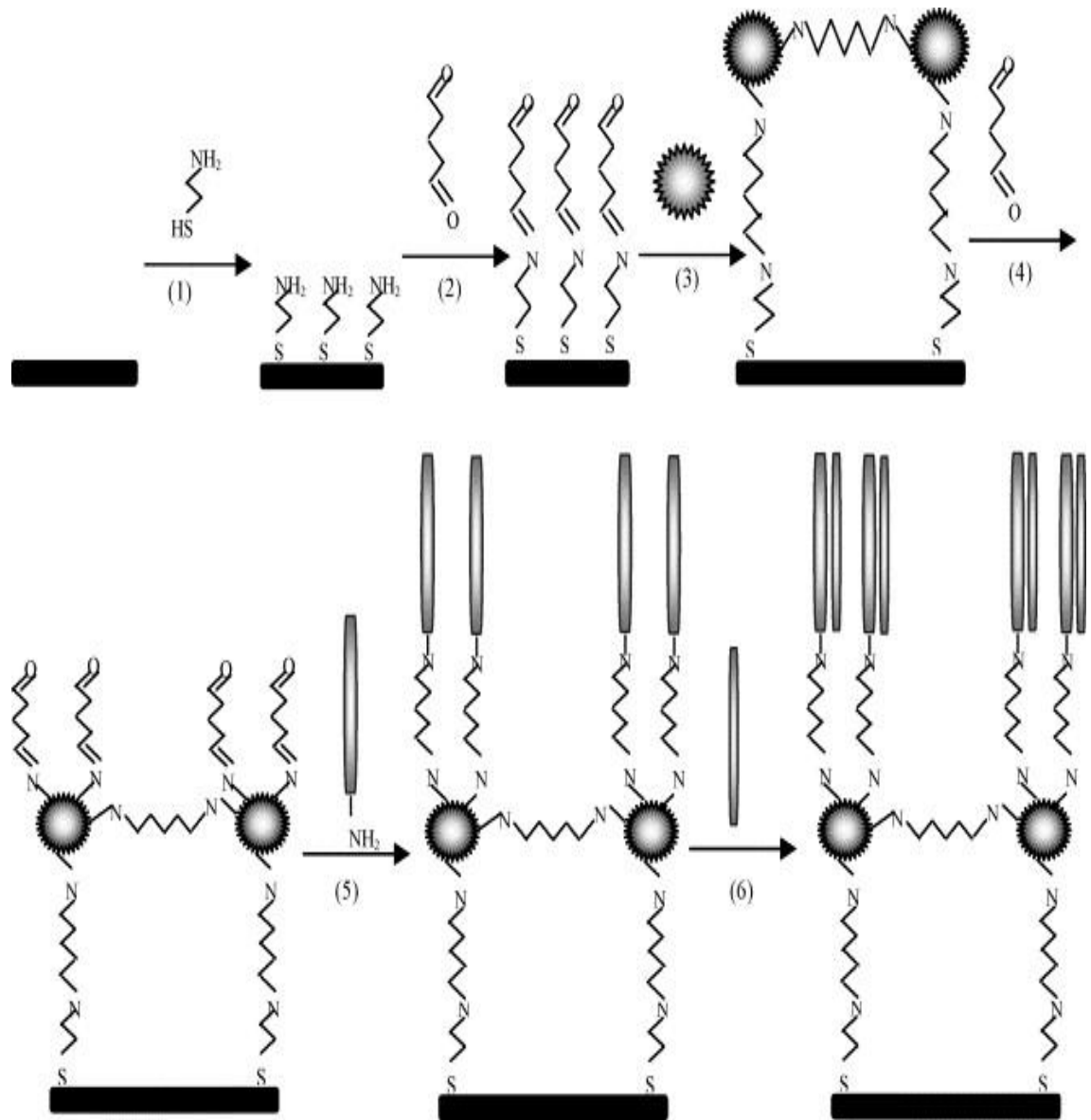
2.5.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler

Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörlerde, hedef molekül bir DNA ise onun eşlenik baz dizisi; ilaç, zehir, protein vs. gibi başka bir molekül ise ona özgü sentezlenen aptamer elektrot yüzeyine çeşitli immobilizasyon teknikleri ile bağlanır [53].

Deng ve ark. geliştirdikleri biyosensör sistemi ile Dang Hummasına sebep olan vektörü 10^{-12} - 10^{-6} M aralığında impedimetrik yöntemleri kullanarak tayin edebilmişlerdir. Bu çalışmada alüminyum oksit membranının her iki tarafını da Pt elektrot

ile kaplayıp, vektör DNA'sının eşlenik baz dizisini bu yüzeye bağlayarak biyosensör sistemini oluşturmuşlardır [54].

Yüzeyde SAM tabakası oluşturularak eşlenik DNA'nın yüzeye bağlanmasıyla geliştirilmiş biyosensör örnekleri de mevcuttur. Li ve ark. geliştirdikleri biyosensör sisteminde, sisteamin ile Au elektrot yüzeyinde SAM oluşturup, PAMAM ile yüzey alanını genişletilerek eşlenik DNA'yı immobilize etmişlerdir (Şekil 2.16.). Bu biyosensör sistemi ile impedimetrik yöntemleri kullanarak, hedef DNA'yı 10^{-11} - 10^{-8} M aralığında tayin edebilmişlerdir [55].



Şekil 2.16. Li ve ark. yaptığı immobilizasyonu sisteminin şematik gösterimi [55].

Elektrot yüzeyinde tek iplikli veya çift iplikli DNA'nın bulunması durumunda, farklı moleküler yapılar, farklı spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir. Bu durum, oligonükleotit konsantrasyonunun ve baz çifti uyumsuzluklarının impedimetrik yöntemle belirlenmesinin temelini oluşturmaktadır. Özellikle DNA tayininde, hibridizasyon boyunca meydana gelen yük birikimi, redoks aktif bir maddenin dönüşümünü gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Bu tür biyosensörlerde hassasiyeti arttırmak için sinyal yükseltici bir molekül kullanılabilir. Prob DNA'nın yüzey konsantrasyonu, sensör performansında önemli bir etkiye sahiptir. Performans, dendrimerlerin kullanılmasıyla da kuvvetli bir şekilde artırılabilir. Polielektrolit ile modifiye edilen screen-printed elektrotların da bu çalışmalar için bir alternatif olduğu ve tanıyıcı moleküller olarak ss-PCR ürünleri ile birlikte kullanıldığı da gösterilmiştir. Bu alanda, kapasitif ölçümlerin, direnç temelli metotlara göre daha düşük hassasiyette olduğu bulunmuştur [56, 57].

2.5.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler

Maddelerin biyolojik etkilerini geniş bir alanda gözlemek ve spesifik analitlerin tayini için hücre temelli analizlerde son zamanlarda hızlı bir artış vardır. Herhangi bir hücre ya da mikroorganizma durumunda, tüm biyolojik sistemin cevabını rapor edebilecek parametrelere ihtiyaç duyulur. İmpedans bu parametrelerden biridir; çünkü metabolik aktivite, yüzeydeki hücre adezyonu, potansiyel ilaçlardan alınan yanıt ve sitotoksitite testlerinin indirekt analizinde kullanılabilir [58,59]. Hücre kültüründe veya tek bir hücreye ait çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, insan kolon kanseri HT-29 hücre şeklinin apoptosis uyarımlı değişiklikleri de bu şekilde araştırılmıştır [60].

İmpedans, sadece yüzeyde sabit hücreler hakkında bilgi edinmek için değil aynı zamanda çözeltideki hücrelerin sayısını belirlemek için de kullanılır. Bu yöntemin yoğun bir şekilde, mikrobiyolojide bakterilerin tanımlanmasında, sayımında ve belirlenmesinde kullanıldığı rapor edilmiştir. İmpedans ayrıca, spesifik bakteriyal hücreler, antikolar ve bakteriyofajlar için de kullanılabilir. İmpedimetrik analiz lösemi hücrelerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır [61, 62, 63].

2.6. Kanserin Moleküler Özellikleri

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için “asi” olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna neden olur. Böylesi bir kitle uzun bir süre belirti göstermeyebilir. Fakat kitlenin büyümesi ile birlikte dokunun fizyolojik işlevleri de bozulur. Bu bozunma, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda belirtiyeye ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır. Kanserin hedeflediği genetik programlar insan genomuna dağılmış genlerde yazılıdır. İnsan DNA’sının 23.000 kadar gen içerdiği düşünülmektedir. Bu genlerin 3.000-5.000 kadarı kanserde regülasyonu bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. İşlevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde, anormal bir protein üretimine ya da bir proteinin hiç sentezlenmemesine sebep olabilir [64, 65, 66].

Çoğu kanser sadece tek bir hücreden ya da az sayıda hücreden doğar ve gelişir. Bir hücre kansere dönüşmek için onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmelidir. Bu süreç “asi” hücrelerden oluşan bir klonun oluşumuna yol açar. Eğer organizma bu farklılaşmayı tolere ederse ve rahatsız edilmeden kalırsa, çoğalmaya devam edebilir. Böylesi bozulmuş bir süreçte, sadece en uygun ve en saldırgan hücreler hayatta kalacak ve daha örgütsüz olan hücrelerin yerini alacaktır. Tümörler bu şekilde zararlı hale gelirler. Bu aynı zamanda kanser tedavisinin bu denli zor olmasının da nedenidir: hastalara kanser hücrelerini etkin olarak öldüren bir ilaç verildiğinde, hayatta kalan az sayıdaki hücre, kendilerini ilaca karşı dirençli kılan değişiklikler geçirmiş olanlardır. Geride kalan bu ufak hücre grubu kanserin başlangıçtaki biçiminden daha kötü bir biçimde dönmesi için yeterli olabilir [66].

Tümörün yayılması, çoğu zaman kanser hücrelerinin anjiyogenezi yani tümör büyümesine yönelik yeni, küçük kan damarlarının sentezini artırması ile tümöre oksijen

ve besin sağlması sonucu kolaylaşır. DNA diziliminde mutasyon meydana geldiğinde kanser başlayabilir. Bu mutasyonlar tek bir baz değişikliği ile olabilir ve bu durumda bir kodonu tanımlayan üç bazdan biri değişmiş olur ve bir proteine farklı bir aminoasitin yerleştirilmesine yol açar. Bazı durumlarda bu aminoasit değişimi söz konusu proteinin aktivitesini değiştirmek için yeterlidir. Çok sayıda bazın etkilendiği diğer tür mutasyonlarda ise genomdan birkaç gen içeren bir DNA parçası kopar ya da bir baz dizisi genom içerisine eklenir. Her iki durumda da genom üzerinde yeni genler oluşarak yeni ve anormal proteinlerin sentezine yol açar. Büyüklükleri ne olursa olsun böylesi değişiklikler “genetik değişimler” ya da “mutasyonlar” olarak adlandırılır. Bu değişiklikler kanserli hücrelerin DNA diziliminin saptanmasıyla belirlenebilir. Genom üzerinde düzeltmeye ve kopyalanmaya “kapalı” olan DNA (intron) alanları ve kopyalanabilir, okunabilir ve RNA ile proteinleri üretmek için kullanılabilir “açık” DNA (ekzon) alanları vardır. Dolayısıyla hücrelerin programını değiştirmesinin DNA mutasyonu dışındaki bir yolu ise ya açık alanlardaki genleri kapatmak, ya da kapalı alanlardakileri açmak için genel paketlemeyi değiştirmektir. Bu gibi değişiklikler sadece DNA diziliminin saptanması ile belirlenmez. DNA'nın okunabilirliğini ve DNA'ya erişilebilirliği düzenleyen kimyasal modifikasyonların da analizi gerekmektedir. Bunlar *epigenetik değişiklikler* olarak adlandırılmaktadır.

Hücreler, içsel farklılıklarına karşın, hücre çoğalmasını ve ölümünü kontrol eden temel süreçlerin gerçekleştirilmesinde ortak planlar doğrultusunda hareket ederler. Bunun bir sonucu olarak, birçok kanserde, organın yeri ya da hastalığın nedenine bağlı olmaksızın, bazı onkogenler ve tümör baskılayıcıların değiştiği sıklıkla görülür. Bu genlerin ürünleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını kontrol etmek üzere birlikte çalışan öğeler ağının bir parçasıdır. [64, 66, 67].

2.2. Kanser Biyomarkerları (Biyobelirteçleri)

Protein temelli kanser biyobelirteçleri büyük çoğunluğu hücre ve dokular içerisindeki doğal proseslerde oluşan, biyokimyasal reaksiyonların sağlıklı bir şekilde yürümesini sağlayan ve metabolik düzenleyici olarak görev yapan çoğu protein veya glikoprotein yapıdaki moleküllerdir. Bu bağlamda çeşitli hormonlar, büyüme faktörleri, iyon bağlayıcı proteinler, hücre içi enzimler, çeşitli doku spesifik antijenler kanser biyobelirteçi olarak adlandırılabilir. Kanser biyobelirteçleri, kanser hücrelerinde yüksek

miktarlarda sentezlenip kana karıştığından kanserin erken teşhisinde görüntüleme ve patolojik yöntemlere yardımcı olurlar [68].

Kanser biyobelirteci seviyelerinin serum, idrar ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında ölçülmesi ve sürekli kontrolü bu yöntemlere yardımcı olabilecek potansiyele sahiptir. Risk gruplarının belirli periyotlarda biyobelirteç seviyelerinin ölçülmesi, kanser oluşumunun başlangıçta teşhis edilmesine olanak sağlar. Görüntüleme maliyetini en aza indirebilmek ve faydayı en yüksek düzeyde tutabilmek için biyobelirteçlerin fizyolojik sıvılarda ölçümü büyük önem arz etmektedir. Literatürlerde bulunan önemli kanser biyobelirteçleri, bulunduğu kanser türleri ve bazı tayin yöntemleri Tablo 2.3.'te gösterilmiştir [66,67,68].

Tablo 2.3. Literatürlerde bulunan önemli kanser biyobelirteçleri, bulunduğu kanser türleri ve bazı tayin yöntemleri [67,47,69,70]

Kanser Biyomarkeri	Tümör dokusu	Tayin Yöntemi
Prostat spesifik antijen (PSA)	Prostat	İmmunoassay
Alfa-fetoprotein (AFP)	Karaciğer	immünoassay
Kanser Antijeni-125 (CA125)	Yumurtalık ve Follop tüpler	immünoassay
Kanser Antijeni-15-3 (CA15-3)	Meme	ELISA
Kanser Antijeni-19-9 (CA19-9)	Mesane ve pankreas	ELISA
BRCA-1 ve BRCA-2	Meme	RT-PCR
karsinoembronik antijen (CEA)	kolorektum	ELISA
İnsan Koriyonik gonadotropin (hCG)	Yumurtalık ve testis	ELISA
Tiroglobulin (Tg)	Tiroid bezi	ELISA
Isı şok Proteinleri (HSPs)	Mide-barsak, rahim, prostat, mesane, serviks	ELISA
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	Meme	Biyosensör
Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)	Endotelial doku	ELISA
Siklooksigenaz	Pankreas, meme, özafagus	ELISA
Kalretinin	Akciğer zarı ve beyin	immunoassay

Kanser biyobelirteci teknolojisi, oldukça üretken, kullanım alanları yeniliğe açık teknolojiler içeren bir alandır. Buna karşın biyomarkerların keşfinden kullanılabilirliğine kadar geçen süre oldukça yavaş ve dolayısıyla bir biyomarkerın kanser teşhisinde kullanılabilirliğine kadar geçen süre oldukça uzundur. Bunun yanı sıra sınırlı sayıda biyomarker kanser teşhisinde kullanılabilmektedir. Bir biyomarkerın laboratuvarında belirlenip klinik ortamda kanser tayininde kullanılmasına kadar geçen süre beş farklı adımdan oluşmaktadır.

Bunlardan “keşif adımı” olarak da geçen ilki, potansiyel olarak uygun biyomarkerların 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 biyomarkerların kanser teşhis etme kapasiteleri ölçülür. Dördüncü aşamaya gelindiğinde biyomarkerın kanseri erken teşhis edip edemediği ölçülür. Bu ölçümlerin spesifikliğı ve tekrar edilebilirliğı oldukça önemlidir. Ve son aşama olarak biyomarkerın insanlar üzerinde işe yarayıp yaramadığı test edilir [69, 70, 71].

Kanser biyobelirteçleri kanserin biyokimyasal belirleyicileridir. Enzimler, hücre yüzeyi antijenleri ve hormonlar gibi sitoplâzma proteinleri kanser biyomarkerları olabilirler. Klinik uygulamalarda, belirteç terimi plazma, vücut sıvıları, katı tümörler, tümör hücreleri, lenf nodları ve kemik iliğinde tayin edilebilen bir molekülü tanımlamaktadır. Bazı kanser biyomarkerları sadece bir kanser tipine spesifik iken bazıları birçok kanser türünde ortaya çıkabilen moleküllerdir. Tümör hücreleri tarafından üretilen antijenler de spesifik kanser biyomarkerları arasında bulunurlar ve bu hücreler, normal hücrelerden antijenik olarak farklılaştırılabilirler. Tümör hücrelerinin herhangi bir proteini potansiyel bir antijen olabilir. Bu antijenler spesifik olarak teşhis, tanının belirlenmesi, tedavinin şekillenmesi ve izlenmesi gibi çok önemli noktalarda kullanılabilirler [69,70].

Kanser izlenmesi, semptomlardan dolayı medikal bulguların gözlenmediğı bireylere uygulanan sistematik testleri kapsamaktadır. Kanserden ölüm riski kanserin yayılımı ve fazın derecesinin artmasına paralel olarak artmaktadır. Kanser izlenmesinin amacı onu erken dönemde yani belirtiler henüz gözlenmemişken belirlemektir. Bu

aşamadaki problem, çoğu kanser izleme testi kısmen yetersiz olması ve kanserin varlığının belirlenmesinden önce metastaz yapmış olabilmesidir. Kanser izleme testleri arasındaki hassasiyet farklılık göstermektedir. % 100 hassas bir test yöntemi izlenen popülasyondaki tüm kanserleri belirlemektedir. Hassasiyetin derecesinin hesaplanması beklenen kanser türlerinin oranına bağlıdır. Bu hesabı yaparken kanser türünün iyi belirlenmiş olması şarttır. [70].

İzlenmenin avantaj ve dezavantajları çok ciddi bir şekilde tartışılmalıdır ve bu durum kanser türleri ve testlerine göre oldukça farklılık göstermektedir. Bu noktada hemen tüm kanser izleme testleri için 3 temel problem göze çarpmaktadır; bunlar gecikme zamanı, periyot ve seçim eğilimidir. Bu faktörlerin tümü, bir kanserin ölümcüllüğünün azaltılmasında kullanılan bir metodun izlenmesinin etkinliğini bozmaktadır.

Bir biyomarker için en önemli iki özellik seçiciliği ve hassasiyetidir. Hassasiyet, kanser hastalarının tümünü kapsayan bir parametredir. Seçicilik parametresi ise kanserli hastayı sağlıklı hastadan ayıran ve tüm insanları kapsayan bir parametredir. İdeal bir biyomarker, yüksek bir hassasiyete ve seçiciliğe sahip olmalıdır [71,72]. Bu çalışmada siklooksigenaz-II (COX-II) ve Kalretinin (CAL) biyobelirteçleri kullanılarak hassas ve seçici bir biyosensör sistemleri geliştirilmesi planlanmıştır.

2.2.1. Kanser biyomarkerlerinin tayinine yönelik biyosensör sistemleri

Kanser biyobelirteçlerinin, kanserin erken teşhisi için önemli ve ümit vaadeden biyomoleküller olduğu ortaya çıktığından bu yana; biyomarkere özgü hızlı, doğru, duyarlı ve tutarlı tayin sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle ELISA, western-blotlama ve immünoassay gibi geleneksel protein tayin yöntemleri ile denemeler yapılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler hassas tutarlı ve nispeten duyarlı olmalarına karşın pahalı ekipman ile kimyasallara gerek duyan ve zaman alan tekniklerdir. Transduser sistemlerinde yaşanan önemli teknolojik gelişmeler ve affinite ile immobilizasyon tekniklerinin artması sonucunda biyosensörler kanser biyobelirteçlerinin tayini için önemli cihazlar haline geldi. Hala hazırda kanser biyobelirteçlerinin tayin edildiği pek çok çalışmada kısa zaman aralıklarında duyarlı ve tekrarlanabilir ölçümler alınabilmiştir. Bu çalışmalarda genellikle elektrokimyasal impedans spektroskopisi, yüzey plazmon rezonansı (SPR), kuartz kristal mikrobals

(QCM) ve voltammetrik teknikler gibi elektrot yüzeyinin karakteri hakkında sinyaller veren yöntemler kullanılmıştır. Literatürlerde yer alan ve bazı kanser biyobelirteçlerinin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri Tablo 2.4.'te gösterilmiştir [71, 73, 74].

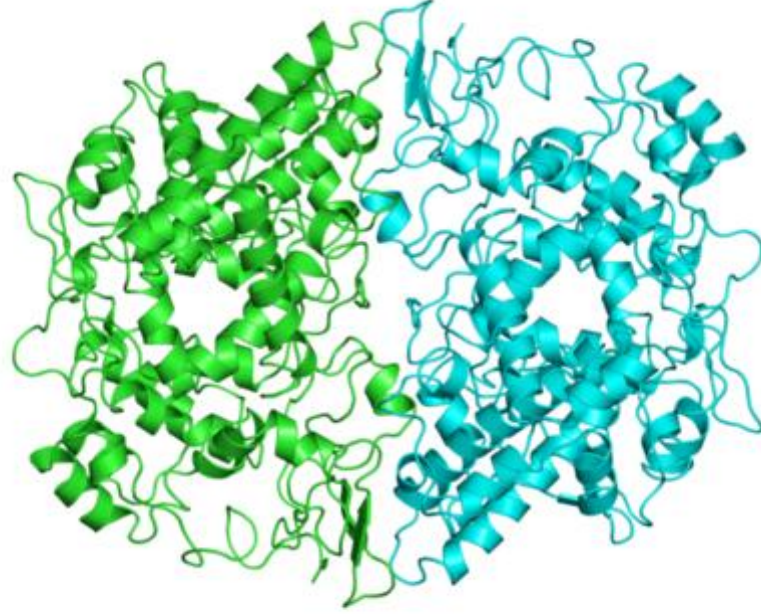
Tablo 2.4. Bazı kanser biyobelirteçlerinin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemleri ve çalışma prensipleri [73,75]

Kanser Biyobelirteçi	Biyosensör çalışma prensibi	Tayin sınırı
Prostat spesifik antijen (PSA)	İmpedans	0,25 ng/L
	Optik	0,15 ng/L
	mikrokantilever	0,2 ng/L
Alfa-fetoprotein (AFP)	amperometri	5 ng/L
Kanser Antijeni-125 (CA125)	amperometri	1,29 U/mL
Kanser Antijeni-15-3 (CA15-3)	potansiyometri	5 U/mL
Kanser Antijeni-19-9 (CA19-9)	amperometri	-
Ferritin	SPR	0,1 ng/L
	QCM	-
karsinoembriyonik antijen (CEA)	amperometri	0,4 ng/L
	kemilüminesans	-
İnsan Koriyonik gonadotropin (hCG)	fluoresans	5 U/mL
	QCM	-
kardiyak troponin	SPR	-
Siklooksigenaz-II	spektroelektrokimya (döngüsel voltammetri)	95 ng/mL

2.2.2. Siklooksigenaz-II

1991 yılında Simmons ve ark. tarafından keşfedilen Siklooksigenaz-II (COX-II, Şekil 2.17.) diğer bir adıyla prostoglandin endoperoksit sentaz-2, metabolizmada araşidonik asidi prostoglandinlere dönüştürür [76]. Prostoglandinler enflamasyon durumunda sentezlenen ve ağrının hissedilmesini sağlayan maddelerdir. COX-II enflamasyona ve ağrıya sebep olacak durumlarla kolaylıkla indüklenebilir (uyarılabilir) ve hücre içersindeki miktarı (ekspresyonu) artabilir (Şekil 2.18.). Yapılan deneysel

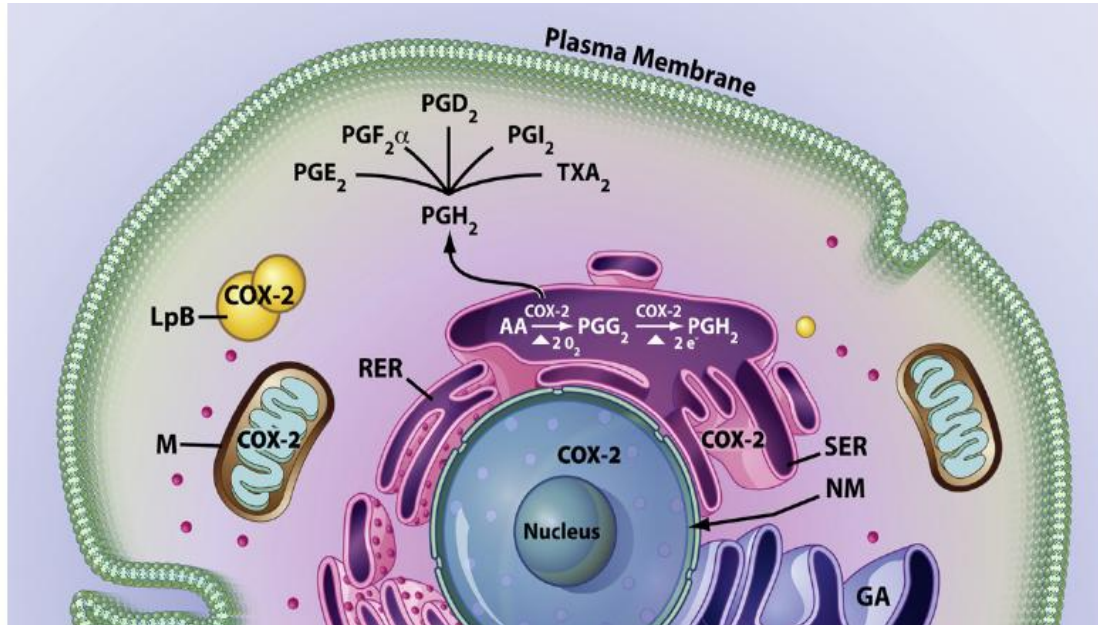
çalışmalar ve klinik bulgular prostat, pankreas, kolon, özafagus ve meme gibi pek çok dokudaki katı tümör oluşumunda hücre içi COX-II enzimi ekspresyonunun arttığını göstermektedir [77].



PDB

6cox

Şekil 2.17. COX-II enziminin üç boyutlu yapısı (PDB No: 6COX)



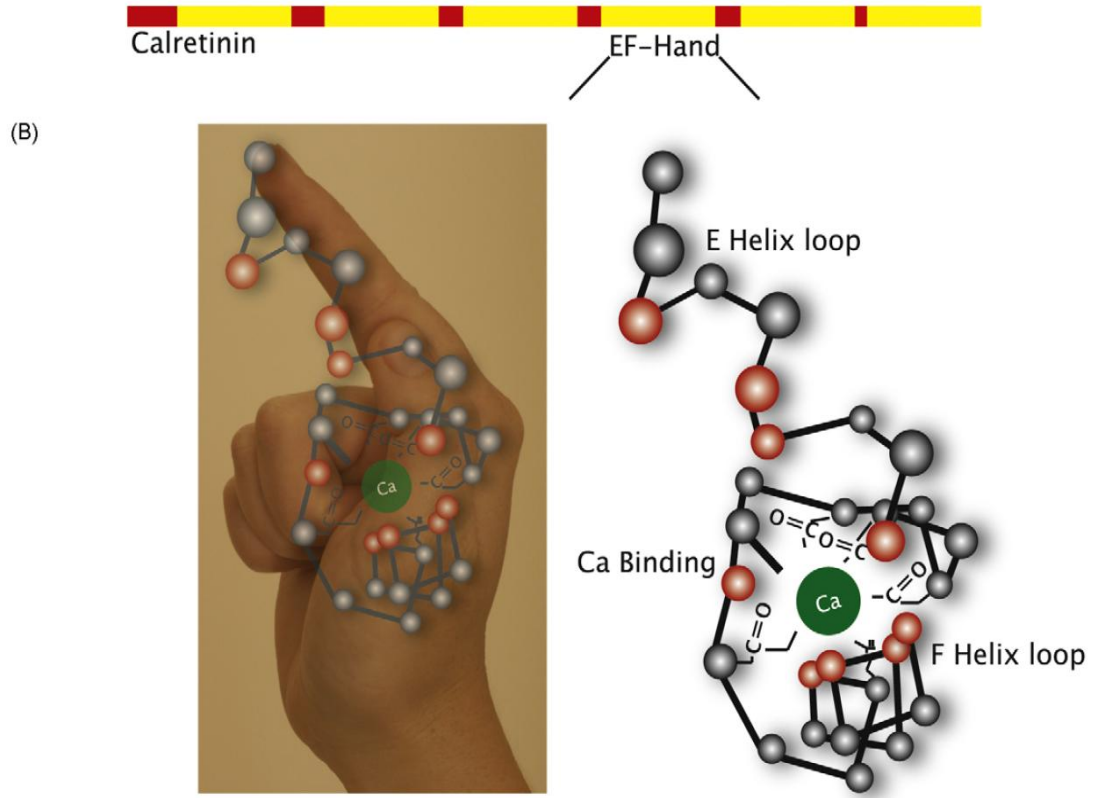
Şekil 2.18. COX-II enziminin hücre içi konumu ve katalitik aktivitesi [78]

Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber kataliz sırasında oluşan süperoksit ve peroksitlerin DNA hasarına sebep olduğu ve COX-II'nin ekspresyonundaki artışın tümör sinyal ağını ve transkripsiyonel mekanizmaları aktive ettiği düşünülmektedir. Örneğin bağ dokusu hücrelerinde COX-II artışı büyüme faktörlerinin, anjiogenik proteinlerin, kemokinlerin salınımını uyarır. Bu moleküller tümörün aynı dokuda yayılmasını sağlar. Ayrıca yapılan pek çok çalışma, COX-II'nin artışının epitelyal-mezenkimal geçişi ve e-kaderin ekspresyonu yolu ile metastazı arttırdığını göstermektedir. COX-II'nin tümör dokusunda meydana gelen hücre hasarından dolayı fizyolojik sınırlarda miktarının arttığı rapor edilmiştir. [78,79].

Literatürlerde COX-II tayinine yönelik sadece iki biyosensör sistemi bulunmaktadır. Noah ve ark. tarafından geliştirilen SPR temelli biyosensör sisteminde, Au SPR çipi yüzeyinde SAM oluşturularak, COX-II'ye spesifik antikor immobilize edilmiş ve COX-II biyomarkerını $3,64 \times 10^{-4}$ - $3,64 \times 10^2$ ng/mL konsantrasyon aralığında tayin edebilmişlerdir [80]. Omole ve ark. geliştirdiği biyosensör sisteminde ise Au elektrot yüzeyinde merkaptopropiyonik asit ile SAM oluşturularak Anti-COX-II elektrot yüzeyine immobilize edilmiş ve COX-II biyomarkerının $0,1$ - $0,5$ µg/mL konsantrasyon aralığında tayin edebilmişlerdir [75].

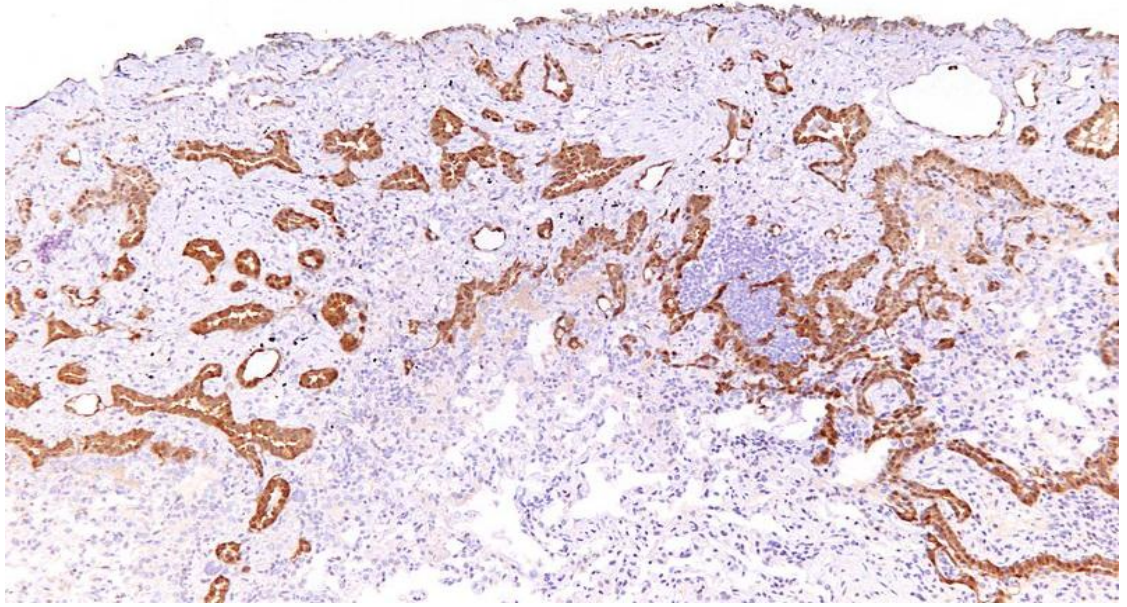
2.2.3. Kalretinin

Kalsiyum minerali; gen ifadesi, sinaptik geçişler, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümü gibi önemli hücre işlevlerini etkileyen bir hücre içi habercidir. Kalbindin-2 olarak da bilinen kalretinin, kalsiyum sinyal yolağında görev alan vitamin-D bağımlı kalsiyum bağlayıcı 29 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Kalretinin, insanlarda CALB2 geni tarafından kodlanır. Kalretinin ilk kez John Rogers tarafından 1987 yılında fare beyninden izole edilerek incelenmiş ve günümüzde pek çok immünohistokimyasal çalışmada kullanılmaktadır [81]. İnsanda 271 aminoasit içeren Kalretinin proteininin üç boyutlu motifleri ve kalsiyumu bağlama mekanizmaları son yıllarda yapılan çalışmalar ile aydınlatılmıştır. Kalretininin “ele” benzeyen üç boyutlu yapısı ve kalsiyumu bağlaması şematik olarak Şekil 2.19.'de gösterilmiştir [82, 83].



Şekil 2.19. Kalretininin “ele” benzeyen üç boyutlu yapısı ve kalsiyumu bağlaması [82]

Kalretinin genellikle retina, bazı işitme elemanları ve omuriliğin granül hücreleri gibi nöron kökenli hücrelerde, saç granül hücrelerinde ve nöronlarda bolca sentezlenen bir proteindir. Sağlıklı bir insanda serum kalretinin düzeyleri 0,1-0,3 ng/mL; Epitelyal mezotelyoma hastalarında ise 0,8-2,5 ng/mL’dir. Epitelyal mezotelyoma gibi akciğer tümörlerinde, ameloblastoma gibi odontogenic tümörler ve nöroblastoma gibi beyin tümörlerinde sentezinin fazlalaşmasından dolayı serum ve beyin-omurilik sıvısındaki seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Bu özelliğinden dolayı immünohistokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve taranılan belirteçlerden biri olmuştur [82,84,85]. Epitelyal mezotelyoma içeren bir dokuda yapılmış kalretinin boyaması Şekil 2.20’de gösterilmiştir. Kanseri türlerinin dışında, barsak hareketini sağlayan gangliyonlardaki bozukluk olarak tanımlanan Hirschsprung hastalığı ve nörodejenaratif genetik bir bozukluk olan Huntington hastalığında da serumda seviyeleri artar [86].



Şekil 2.20. Epitelyal mezotelyoma içeren bir dokuda yapılmış kalretinin boyaması [87]

Kalretinin önemli bir biyobelirteç olmasına rağmen literatürde çoğunlukla patolojik incelemelerde yer alan immünohistokimyasal çalışmalar bulunmaktadır. Literatürde yer alan kalretinin kantitatif tayininin yapıldığı nadir çalışmalardan birisi Raiko ve ark. tarafından geliştirilen ELISA yöntemidir. Bu yöntemle mezotelyoma hastalarının kan plazmalarında kalretinin biyomarkerını 0,12-8,97 ng/mL konsantrasyon aralığında tayin edebilmişlerdir [88]. Ayrıca hala hazırda Uscn Life Science Inc. Şirketi tarafından piyasada sunulmuş ticari bir kalretinin tayin kiti bulunmaktadır [89].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan biyomarkerlar Siklooksigenaz-II [Cyclooxygenase 2 human ≥ 70 % (SDS-PAGE)] ve kalretinin ile bu biyomarkere özgü sentezlenmiş Anti-Siklooksigenaz-II (Monoklonal Anti-COX-II antibody produced in Mouse) ve Anti-kalretinin gibi antikorlar; poliamido amin (PAMAM dendrimeri, etilendiamine çekirdekli, jenerasyon 2.0 çözeltisi), 1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimit metiodit (EDC), N-Hidroksisüksinimit (NHS, % 98), 12-Merkaptododekanoik asit (12-MDDA, % 96), Glutaraldehit (% 25), 6-merkaptohexanol, epiklorohidrin, potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat, etanolamin gibi kimyasallar Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)'den temin edildi. KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, Etanol (Absolute-% 99.9) Merck KGaA (Darmstadt, Almanya)'dan temin edildi.

Kullanılan tüm sarf malzemeler Interlab Lab. Ürün. San ve Tic. A.Ş'den temin edildi. İmmobilizasyon aşamasında kullanılan tüm çözeltiler, deneyler esnasında taze olarak hazırlanmış ve tüketilmiştir. Biyomarkerlar ve antikorlar istenilen konsantrasyonlarda porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklanmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma elektrodu olarak 2.01mm^2 yüzey alanına sahip altın elektrot, referans elektrot olarak KCl ile doyunlaşmış 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 bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında alınmıştır.

Elektrot yüzeylerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, Namık Kemal Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarında yaptırılmıştır.

Deneylerde Biyokimya araştırma laboratuvarında bulunan ultrasonik su banyosu (Wise Clean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland), mikropipetler (20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L eppendorff mikropipet), manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer MSH 300), pH metre (Jenco pH metre (6173 pH), made in China for USA) kullanıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

50 mM fosfat tamponu (pH:7,0): 7,800 g NaH_2PO_4 tartılır destile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. 2,177 g K_2HPO_4 tartılır, destile su ile 250 ml'ye tamamlanır. Bu iki çözeltiden NaH_2PO_4 'ten 803 ml, K_2HPO_4 'ten 197 ml alınarak pH: 7,5 olacak şekilde karıştırılarak tampon hazırlandı.

% 2,5'lik glutaraldehit: 5 μ l % 25'lik glutaraldehit üzerine 45 μ l 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ilave edilir.

7,5 mM 12-MDDA: 3,1 mg tartılıp, 10 mL Absolut etanolde çözülür.

0,1 M EDC: 5,94 mg EDC tartılıp, 200 μ L 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

0,05 M NHS: 2,88 mg EDC tartılıp, 200 μ L 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

% 2,0 PAMAM: Anastoktan (% 20'lik) 5 μ L çekilip 45 μ L 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

5,0 mM NaBH₄: 2,1 mg NaBH₄ tartılıp, 500 µL 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

5,0 mM K₃[Fe(CN)₆]: 0,810 g K₃[Fe(CN)₆] tartılıp 500 mL 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

5,0 mM K₄[Fe(CN)₆]: 0,8920 g K₄[Fe(CN)₆] tartılıp 500 mL 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

1,0 M KCl: 3,72 mg KCl tartılıp, 500 mL 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

5,0 mM 6-MHL: Anastoktan (7,11 M) 7 µL çekilip, 10 mL Absolut etanolde çözülür.

% 10 EPI: Anastoktan 100 µL çekilip, 900 µL 0,4 NaOH içerisinde çözülür.

1,0 M Etanolamin: Anastoktan (23,7M) 42 µL çekilip, 958 µL 50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda çözülür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrot Temizliği

Öncelikle Au elektrot fiziksel ve kimyasal olarak temizlenir. Temizlik aşamaları aşağıdaki gibidir:

I. Bir miktar Gamma alümina tozu (Aluminyum oksit) alınarak kadife yüzey (elektrot yüzeyinin çizilmemesi için) üzerine alınır. Alümina üzerine birkaç damla bidistile su damlatılıp, temiz bir spatül ucuyla alümina pelte kıvamına gelene değin karıştırılır. Daha sonra Au elektrot pelte kıvamındaki alümina üzerine yavaş bir şekilde ve aynı yönde gezdirilir. Böylelikle yüzeydeki tabaka ve/veya başka bir kirlilik mekanik olarak giderilmiş olur.

II. Au elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için on dakika etanol (% 99,9) içerisinde sonikatörde bekletilir. Tekrardan ultra saf suyla durulanıp saf argon gazı ile kurutulur.

3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensipleri ve Ölçüm Sistemi

Geliştirilen her iki biyosensör sisteminde de 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 $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki 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 COX-II konsantrasyonu (50 pg/mL) ve CAL konsantrasyonundan (1 ng/mL) elektrot yüzeyine mikropipet ile her defasında 5µL olacak şekilde ilave yapılmıştır. Her inkübasyon periyodundan sonra elektrot yüzeyinde bağlanmamış biyobelirteçleri uzaklaştırmak için elektrot ultra saf su ile yıkanarak ve $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Her ölçüm öncesinde ve sonrasında elektrotlar ultrasaf su ile temizlenip, argon gazı ile kurutulmuştur.

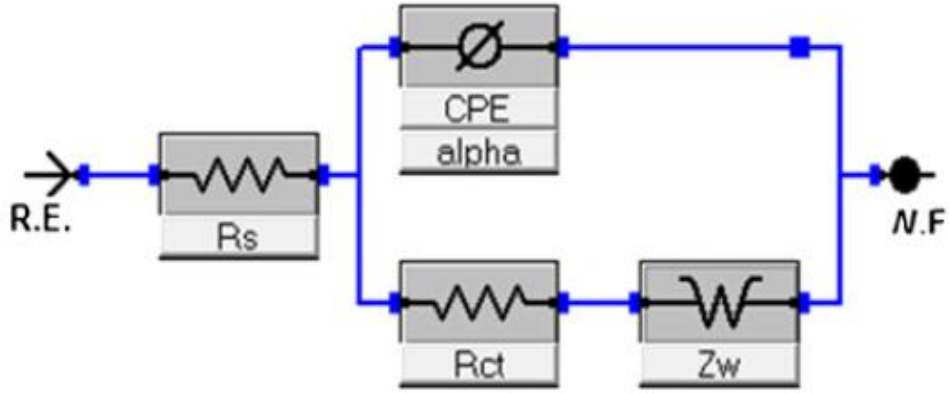
3.2.3. Hesaplama Yöntemi

İmmobilizasyon basamaklarının kontrolü ve COX-II 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. Eş Değer 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 [47].

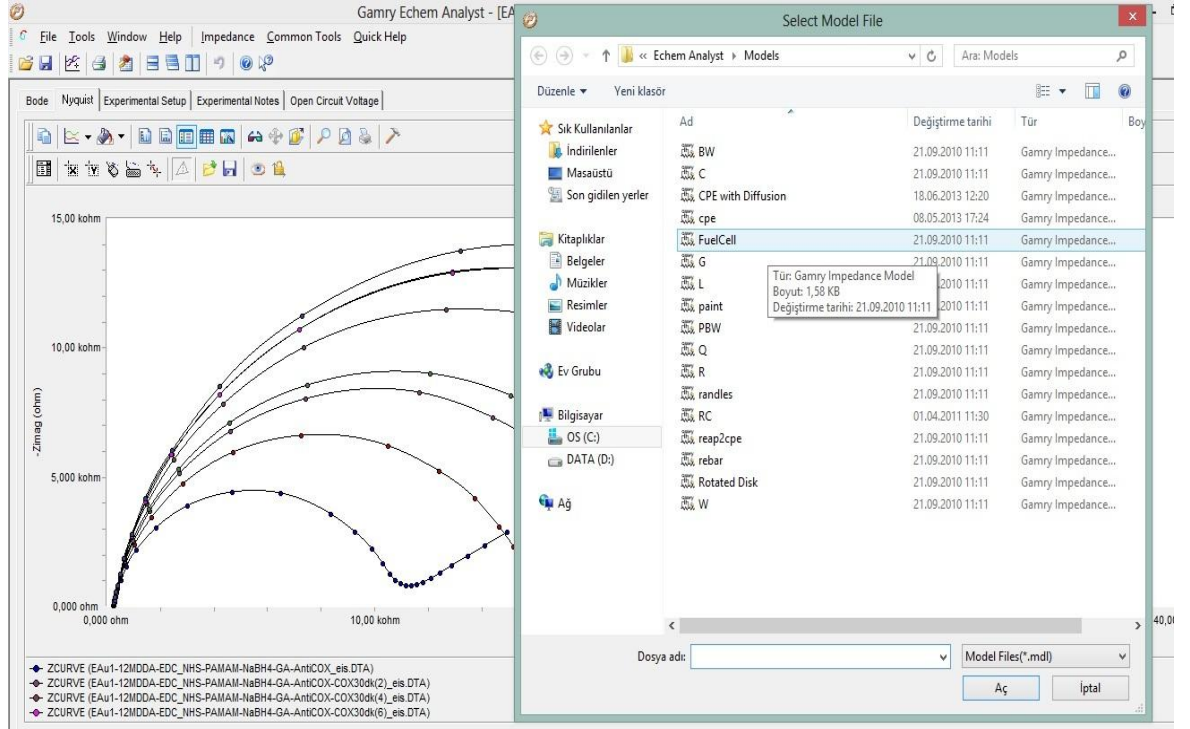
Bu çalışmada Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elektrot yüzeyine uygun eşdeğer devre modeli çizilmiş ve yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Nyquist eğrilerinin sayısal değerlere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. 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

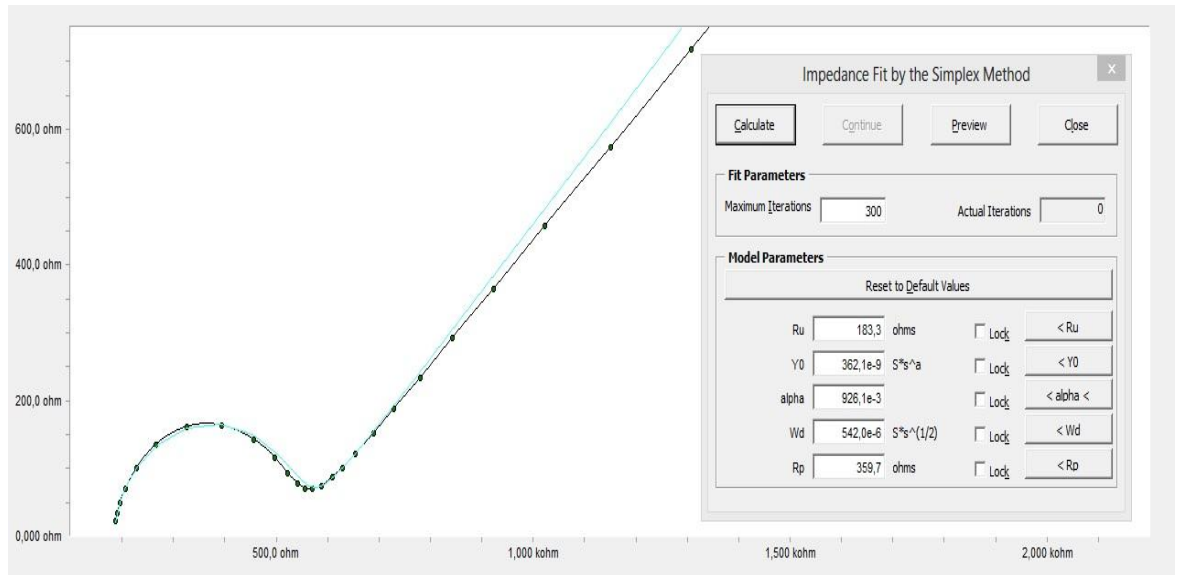
3.2.3.2. Yük transfer direncinin (R_{ct}) hesaplanması

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. Gamry 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.



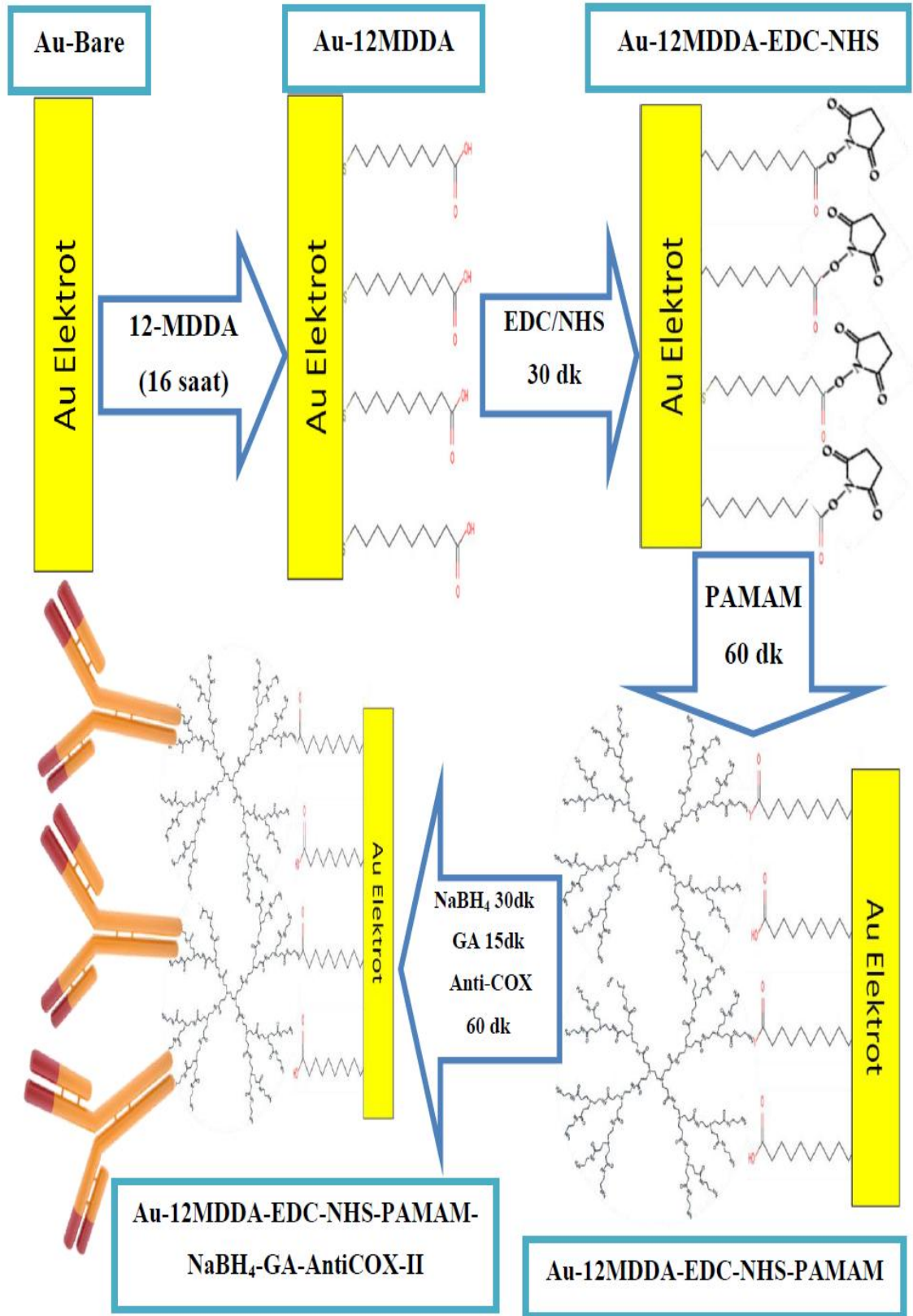
Şekil 3.3. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı

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 [47,66].

3.2.4. Siklooksigenaz Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı

Temiz yalın altın elektrot 5,0 mM lık 12-MDDA çözeltisi (% 99,9'luk etanolde hazırlanmış) içine daldırılarak, SAM oluşumunun gerçekleşmesi için 16 saat bekletildi. 12 MDDA bağlı elektrot yüzeyine hazırlanan 0,1 M EDC ve 0,05 M NHS çözeltilerinin (0,1 M ve pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış) karışımından 10 μ L damlatma yoluyla eklendi ve 30 dakika karanlık ve nemli ortamda bekletildi. EDC-NHS ile aktifleştirilmiş elektrot yüzeyine % 2,0'lik PAMAM çözeltisinden (0,1 M ve pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış) 5 μ L eklendi ve 60 dakika karanlık ve nemli ortamda bekletildi. Sonra PAMAM üzerinde bulunan çift bağların indirgenmesi için elektrot yüzeyine 5,0 mM NaBH_4 çözeltisinden (0,1 M ve pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış) 5 μ L damlatma yoluyla eklendi ve 30 dakika karanlık ve nemli ortamda bekletildi. Çapraz bağlama yapmak amacıyla % 1.25 lik gluteraldehit çözeltisinden (0,1 M ve pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış) 5 μ L damlatma yoluyla eklendi ve 15 dakika karanlık ve nemli ortamda bekletildi. Son olarak 0,1 $\mu\text{g/mL}$ Anti-COX-II antikorunun 5 μ L'lik porsiyonu elektrot yüzeyine damlatıldı ve 60 dakika karanlık ve nemli ortamda bekletildi.



Şekil 3.4. Anti-COX-II immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi

3.2.5. Siklooksigenaz Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

3.2.5.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu

Elektrot yüzeyinde tek tip, kararlı ve dayanıklı SAM (kendiliğinden oluşan tek tabakalar) tabakası oluşturmak amacıyla 12-Merkaptododekanoik asitin optimum konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı. Bu bağlamda 12-Merkaptododekanoik asitin **1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM ve 10 mM** olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmalarda SAM tabakasının immobilizasyona etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için EDC-NHS (0,1 M-0,05 M), PAMAM (% 2,0), NABH₄ (5,0 mM), Anti-COX-II (1,0 µg/mL) ve COX-II (50 pg/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.2. EDC/NHS konsantrasyonlarının optimizasyonu

EDC/NHS elektrot yüzeyinde oluşturulan SAM tabakasının karboksil uçlarını aktifleştirmede kullanılan bir kovalent bağlama çiftidir. Konsantrasyonu optimize edilmiş 12-MDDA'nın karboksil uçlarını aktifleştirecek yeterli miktardaki EDC/NHS çiftinin belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyon çalışması yapıldı. Bunun için her iki maddenin birbirine oranı sabit tutularak **0,05 M-0,025 M; 0,075 M-0,0375 M; 0,1 M-0,05 M; 0,15 M-0,075 M ve 0,2 M-0,1 M** konsantrasyonlarında EDC/NHS çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmalarda EDC/NHS konsantrasyonlarının immobilizasyona etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 12-MDDA (7,5 mM), PAMAM (% 2,0), NABH₄ (5,0 mM), Anti-COX-II (1,0 µg/mL)ve COX-II (50 pg/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.3. PAMAM dendrimerinin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi

PAMAM dendrimeri (gen. 2,0) 16 tane fonksiyonel amin ucu bulunan ve daha fazla protein immobilizasyonunun gerçekleşmesi için gerekli bir moleküldür. Bu çalışmada, Anti-COX-II'nin immobilizasyon verimini arttırmak ve dolayısıyla daha duyarlı tayinler yapabilmek amacıyla PAMAM dendrimerinin konsantrasyonunun optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için her iki maddenin birbirine oranı sabit tutularak **% 0,5; % 1,0; % 2,0 ve % 4,0** konsantrasyonlarında PAMAM dendrimeri çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmalarda PAMAM

konsantrasyonunun immobilizasyona etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M-0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), Anti-COX-II (1,0 µg/mL) ve COX-II (50 pg/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.4. Optimum Anti-COX-II konsantrasyonunun belirlenmesi

Anti-COX-II tayin edeceğimiz kanser biyomarkerı olan COX-II'ye spesifik olarak sentezlenen monoklonal antikordur. Daha duyarlı ve tekrarlanabilir tayin sonuçları elde edebilmek için optimize edilmiş immobilizasyon basamaklarından sonra bağlayabildiğimiz optimum antikor miktarının belirlenmesi gerekli olduğundan optimum Anti-COX-II konsantrasyonu çalışması yapıldı. Bu bağlamda **0,1 ng/µL; 0,25 ng/µL; 1,0 µg/mL** ve **2,0 µg/mL** konsantrasyonlarında Anti-COX-II porsiyonları kullanılarak farklı biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmalarda Anti-COX-II konsantrasyonunun immobilizasyona ve COX-II tayinine etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M- 0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), PAMAM (% 2,0) ve COX-II (50 pg/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.5. Optimum Anti-COX-II inkübasyon süresinin belirlenmesi

Kovalent immobilizasyonda proteinin aktif tabaka ile etkileşme süresi bağlanma miktarını, oluşan bağın dayanıklılığını ve proteinin yüzeydeki oryantasyonunu (yerleşimini) etkiler. Gerekli olan tüm immobilizasyon aşamalarındaki moleküllerin miktarları ve Anti-COX-II antikorunun miktarı optimize edildikten sonra daha duyarlı ve doğrusal sonuçlar elde edebilmek için antikor inkübasyon süresi de optimize edildi. Bu amaç doğrultusunda optimum koşullarda hazırlanan [12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M-0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), PAMAM (% 2,0) ve COX-II (50 pg/mL)] biyosensörler aynı Anti-COX-II (1,0 µg/mL) konsantrasyonu ile **30 dk., 45 dk** ve **60 dk.** olacak şekilde farklı zaman periyotlarında inkübe edildiler

3.2.6. Siklooksigenaz Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu

3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M-0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), PAMAM (% 2,0) ve Anti-COX-II (1,0 µg/mL) (60 dk)] hazırlanan biyosensör ile COX-II (50 pg/mL) biyomarkeri için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

3.2.6.2. Tekrar üretilebilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M-0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), PAMAM (% 2,0) ve Anti-COX-II (1,0 µg/mL) (60 dk)] hazırlanan beş farklı biyosensör ile doğrusal tayin aralığında ölçümler alındı ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği denendi.

3.2.6.3. Yapay serumda Uygulama

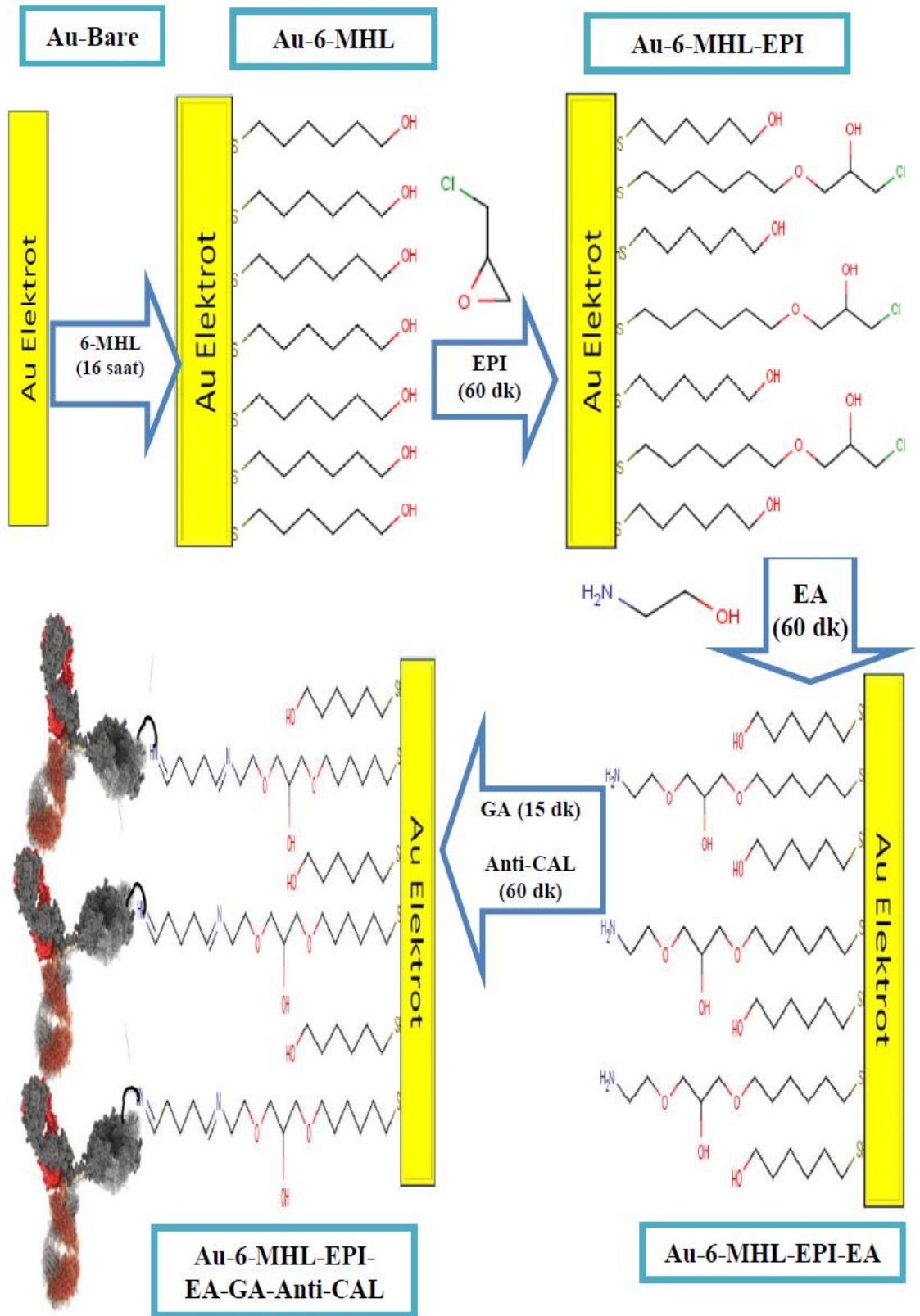
Yapay serum örneği ile antijen-antikor etkileşimlerinin serum içerisindeki tuzlardan etkilenip etkilenmeyeceği incelenmiştir. Yapay serum için, 4,5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1,6 mM MgCl₂, 4,7 mM (D+)-glukoz, 2,5 mM üre, % 0,1 BSA ve 145 mM NaCl'nin bulunduğu bir çözelti hazırlanmıştır. Anti-COX-II ve COX-II için yapılan bütün seyreltmeler hazırlanan yapay serum çözeltisi ile yapılmıştır. Bu şekilde optimize şartlarda olan biyosensör için CV ve EIS ölçümleri alınarak yapay serumun etkisine bakılmıştır.

3.2.7. Kalretinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı

Öncelikle temiz Altın (Au) elektrot, kendiliğinden oluşan tek tabakaların (SAM) meydana gelmesi için etanolde çözülmüş 5,0 mM Merkптоhekzanol (6-MHL) içerisine daldırılarak 16 saat inkübe edildi. Sonrasında bağlanmamış 6-MHL birimlerini uzaklaştırmak için elektrot etanol ve bidistile su ile yıkandı. Merkптоhekzanolün elektroda bağlanmayan fonksiyonel ucundaki hidroksil gruplarını aktive etmek için 0,4 M NaOH içerisinde hazırlanmış % 10'luk Epiklorohidrin çözeltisi elektrot yüzeyine 5µL damlatılarak 60 dk. bekletildi. Epiklorohidrinin merkптоhekzanole bağlanmamış klor ucunu daha işlevsel hale getirmek için 100 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda

hazırlanmış 1,0 M Etanolamin çözeltisinin 5 µL'si elektrot yüzeyine damlatıldı ve 60 dk. 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 10 µg/mL konsantrasyonundaki Kalretinine spesifik antikor çözeltisinin 5 µL'si elektrot yüzeyine damlatıldı ve 60 dk. inkübe edildi. Son olarak kalretinin 5,0 ng/mL konsantrasyonundaki çözeltisinin 5µL'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 voltammetri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri alındı ve eş değer devre modeline göre R_{ct} değerleri hesaplandı.

İmmobilizasyon aşamaları ve elektrot yüzeyi şematik olarak Şekil 3.5.'te gösterilmiştir. Bu immobilizasyon yönteminin başlangıcında bulunan merkaptohexanole ait hidroksil grubunun epiklorohidrin ile aktivasyonu ve sonrasındaki eter oluşumu Barldrich ve ark. tarafından merkaptoetanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir [11]. Ayrıca aynı çalışmada epiklorohidrin basamağını takip eden basamakta yer değiştirme tepkimesi için kitosan kullanılmıştır [11]. Bu çalışmada ise epiklorohidrin sonrasında kullanılan etanolamin bağlaması daha evvelden denenmemiş bir yöntem olup, literatürlerde yer almamaktadır. 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 3.5. CAL biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi

3.2.8. Kalretinin Biyosensörü İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu

3.2.8.1. 6-Merkaptohekzanol Konsantrasyonunun optimizasyonu

Elektrot yüzeyinde tek tip, kararlı ve dayanıklı SAM tabakası oluşturmak amacıyla 6-MHL'nin optimum konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı. Bunun için 6-MHL'nin **1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM ve 10 mM** olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ve COX-II konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda 6-MHL konsantrasyonunun immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için EPI (% 10), etanolamin (1,0 M), glutaraldehit (% 1,25), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL) konsantrasyonları glutaraldehit (15dk.), epiklorohidrin (60 dk.) ile etanolamin inkübasyon süresi (60 dk.) sabit tutulmuştur.

3.2.8.2. Epiklorohidrin (EPI) Konsantrasyonunun optimizasyonu

6-MHL'ün hidroksil uçlarına bağlanacak yeterli epiklorohidrin miktarının belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyon çalışması yapıldı. Bunun için epiklorohidrinin **% 1,0; % 2,5; % 5,0 ve % 10'luk** konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda epiklorohidrin konsantrasyonunun immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlenebilmesi için 6-MHL (5 mM), etanolamin (1,0 M), glutaraldehit (% 1,25), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL) konsantrasyonları ve glutaraldehit (15 dk.), epiklorohidrin (60 dk.) ile etanolamin inkübasyon süresi (60 dk.) sabit tutulmuştur.

3.2.8.3. Epiklorohidrin (EPI) inkübasyon süresinin optimizasyonu

Epiklorohidrin ile 6-MHL arasındaki reaksiyonun optimum süresini belirlemek amacıyla % 10'luk epiklorohidrin çözeltisi için **30 dk., 60 dk. ve 90 dk.** inkübasyon sürelerinde biyosensörler hazırlandı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda epiklorohidrin inkübasyon süresinin immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlenebilmesi için EPI (%10),

etanolamin (1,0 M), glutaraldehit (%1,25), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL) konsantrasyonları ve etanolamin ile Glutaraldehit (15dk.) inkübasyon süresi (60 dk.) sabit tutulmuştur.

3.2.8.4. Etanolamin Konsantrasyonunun optimizasyonu

Epiklorohidrinin klorür uçlarına bağlanacak yeterli etanolamin miktarının belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyon çalışması yapıldı. Bu bağlamda etanolaminin **0,5 M; 1,0 M** ve **2,0 M** konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda etanolamin konsantrasyonunun immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlenebilmesi için 6-MHL (5 mM), epiklorohidrin (% 10), glutaraldehit (% 1,25), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL) konsantrasyonları ve glutaraldehit (15dk.), epiklorohidrin (60 dk.) ile etanolamin inkübasyon süresi (60 dk.) sabit tutulmuştur.

3.2.8.5. Etanolamin inkübasyon süresinin optimizasyonu

Epiklorohidrin ile etanolamin arasındaki reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Bu bağlamda etanolaminin bağlanma reaksiyonu **30 dk., 60 dk.** ve **90 dk.** inkübasyon süreleri için biyosensörler hazırlandı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda Etanolamin inkübasyon süresinin immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlenebilmesi için 6-MHL (5 mM), epiklorohidrin (% 10), etanolamin (1,0 M), glutaraldehit (% 1,25), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL) konsantrasyonları ve epiklorohidrin ile Glutaraldehit (15dk.) inkübasyon süresi (60 dk.) sabit tutulmuştur.

3.2.8.6. Glutaraldehit konsantrasyonunun optimizasyonu

Amin gruplarının aktifleştirilmesi için kullanılan glutaraldehit miktarının belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyon çalışması yapıldı. Bu bağlamda glutaraldehitin **% 0,5; % 1,25** ve **% 2,5'lük** yuzdelerinde çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak

hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda glutaraldehit konsantrasyonunun immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 6-MHL (5 mM), epiklorohidrin (% 10), etanolamin (1,0 M), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL) konsantrasyonları ve epiklorohidrin (60 dk.), glutaraldehit (15 dk.) ile etanolamin (60 dk.) inkübasyon süresi sabit tutulmuştur.

3.2.8.7. Anti-Kalretinin (Anti-CAL) konsantrasyonunun optimizasyonu

En iyi biyosensör cevabının elde edilebilmesi amacıyla Anti-CAL miktarının belirlenmesi amacıyla optimum konsantrasyon çalışması yapıldı. Bu bağlamda Anti-Kalretinin antikorunun 0,1 µg/mL; 1,0 µg/mL ve 10 µg/mL olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda Anti-CAL konsantrasyonunun immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 6-MHL (5 mM), epiklorohidrin (% 10), etanolamin (1,0 M) ve CAL (1 ng/mL), glutaraldehit (% 1,25) konsantrasyonları ve epiklorohidrin (60 dk.), glutaraldehit (15 dk.) ile etanolamin (60 dk.) inkübasyon süresi sabit tutulmuştur.

3.2.8.8. Anti-Kalretinin (Anti-CAL) inkübasyon süresinin optimizasyonu

Optimizasyonun çalışmalarının son aşamasında, Anti-CAL immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresi belirlendi. Bu bağlamda Anti-CAL bağlanma reaksiyonu için **30, 60 ve 90 dk.** inkübasyon süreleri uygulanarak biyosensörler hazırlandı. Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ve CAL konsantrasyonu kullanılarak her bir biyosensör için kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu çalışmalarda, Anti-CAL inkübasyon süresinin immobilizasyona ve CAL tayinine etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 6-MHL (5 mM), epiklorohidrin (% 10), etanolamin (1,0 M), Anti-CAL (10 µg/mL) ve CAL (1 ng/mL), glutaraldehit (% 1,25) konsantrasyonları ve epiklorohidrin (60dk.), glutaraldehit (15 dk.) ile etanolamin (60 dk.) inkübasyon süresi sabit tutulmuştur.

3.2.9. Kalretinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.9.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Her bir immobilizasyon basamağı için optimum koşullarda hazırlanan biyosensör ile kalretinin markeri için tayin aralığı 1-5 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda 6-MHL (5 mM), epiklorohidrin (% 10), etanolamin (1,0 M), Anti-CAL (10 µg/mL) ve glutaraldehit (% 1,25) konsantrasyonlarında ve inkübasyon süreleri epiklorohidrin (60dk.), glutaraldehit (15 dk.), Anti-CAL (60 dk.) ile etanolamin (60 dk) olacak şekilde biyosensör hazırlanmıştır.

3.2.9.2. Tekrar üretilebilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak hazırlanan yedi farklı biyosensör ile 1-5 ng/mL kalretinin aralığı için ölçümler alınmıştır. Bu çalışmalarda 6-MHL (5mM), epiklorohidrin (% 10), etanolamin (1,0 M), Anti-CAL (10 µg/mL)ve CAL (1 ng/mL), glutaraldehit (% 1,25) konsantrasyonlarında ve inkübasyon süreleri epiklorohidrin (60dk.), glutaraldehit (15 dk.), Anti-CAL (60 dk.) ile etanolamin (60 dk.) olacak şekilde biyosensör hazırlanmıştır.

3.2.9.3. Yapay Serumda Uygulama

Yapay serum örneği ile antijen-antikör etkileşimlerinin serum içerisindeki tuzlardan ve diğer biyomoleküllerden etkilenip etkilenmeyeceği incelenmiştir. Yapay serum için, 4,5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1,6 mM MgCl₂, 4,7 mM (D+)-glukoz, 2,5 mM üre, % 0,1 BSA ve 145 mM NaCl'nin bulunduğu bir çözelti hazırlanmıştır. Anti-CAL ve CAL için yapılan bütün seyreltmeler hazırlanan yapay serum çözeltisi ile yapılmıştır. Bu şekilde optimize şartlarda olan biyosensör için CV ve EIS ölçümleri alınarak yapay serumun etkisine bakılmıştır.

BÖLÜM 4

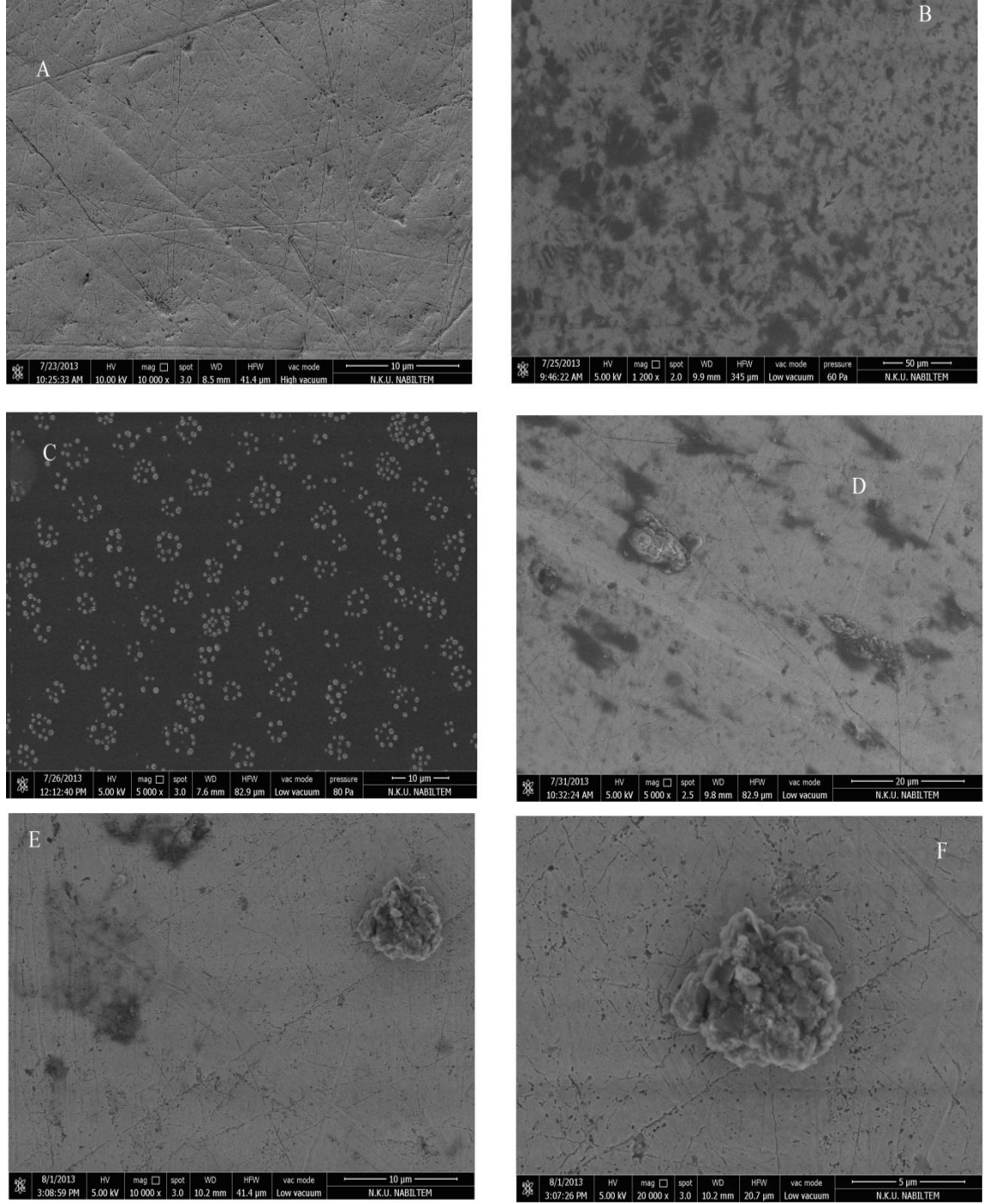
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. COX-II Biyosensörü İle Elde Edilen Bulgular

4.1.1. COX-II Biyosensörünün hazırlanış basamaklarına ilişkin bulgular

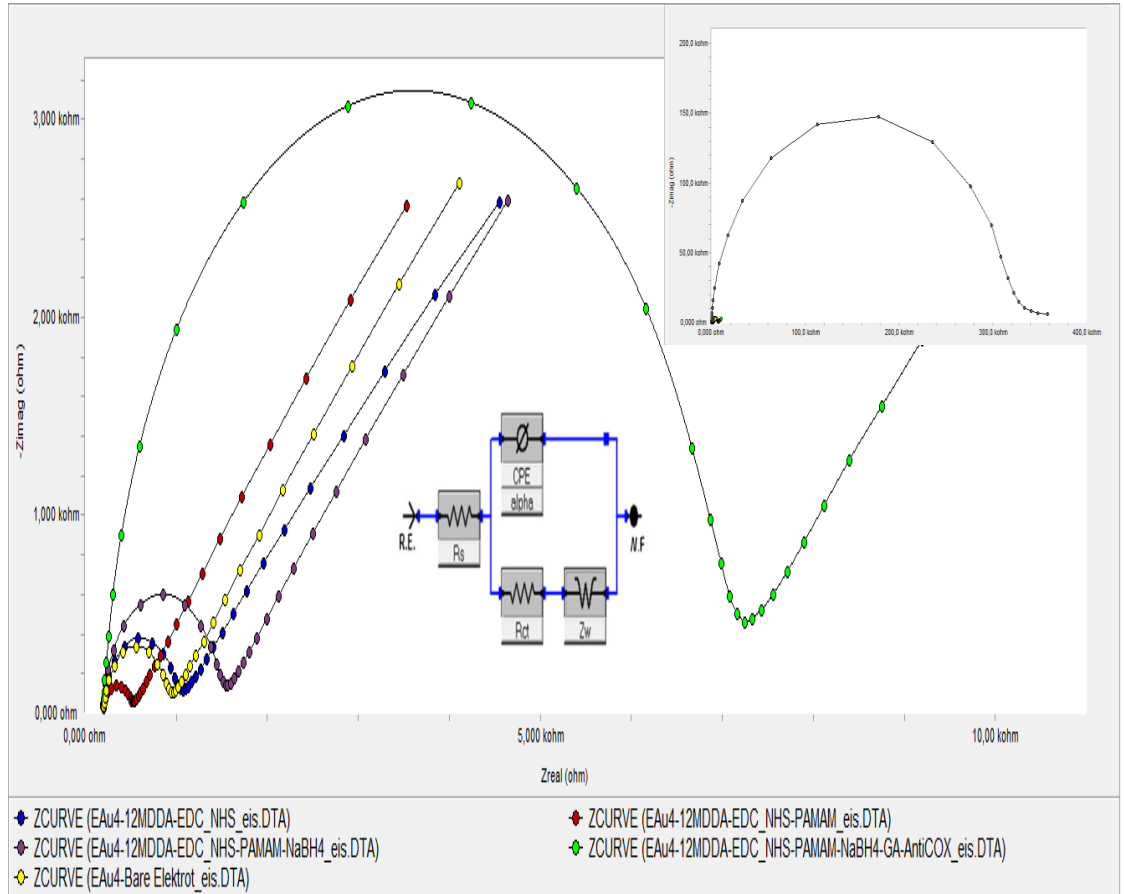
COX-II biyosensörünün her bir immobilizasyon basamağı için alınan taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Ayrıca her bir immobilizasyon basamağından sonra oluşan elektrot yüzeyleri için elde edilen EIS spektrumları ve döngüsel voltammogramlar Şekil 4.2a. ve 4.2b.'de gösterilmiştir. Burada:

1. Yalın Au elektrot yüzeyi: Au-Bare-elektrot,
2. 12-MDDA ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyi: Au-12MDDA,
3. EDC-NHS ile aktive edilmiş modifiye elektrot yüzeyi: Au-12MDDA-EDC-NHS,
4. PAMAM bağlanmış aktif elektrot yüzeyi: Au-12MDDA-EDC-NHS-PAMAM,
5. NaBH₄ indirgeme sonrası elektrot yüzeyi:
Au-12MDDA-EDC-NHS-PAMAM-NaBH₄
6. Glutaraldehit çapraz bağlaması sonrası elektrot yüzeyi:
Au-12MDDA-EDC-NHS-PAMAM-NaBH₄-GA
7. Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi:
Au-12MDDA-EDC-NHS-PAMAM-NaBH₄-GA-Anti-COX-II olarak ifade edilmiştir.

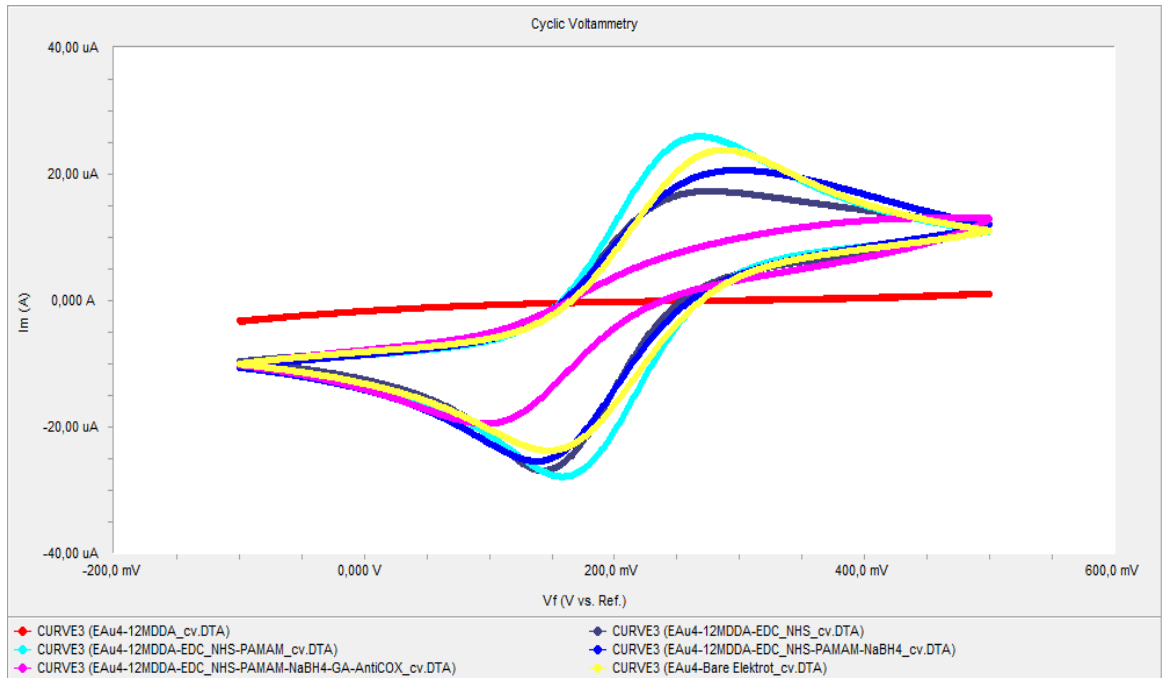


Şekil 4.1. Bazı immobilizasyon basamaklarından sonra elektrot yüzeyindeki değişimi gösteren Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

A: yalın Au elektrot, B: Au₁₂-MDDA, C: Au-12MDDA-EDC_{NHS}-PAMAM, D: Au-12MDDA-EDC_{NHS}-PAMAM-NaBH₄-GA-Anti-COX-II, E: Au-12MDDA-EDC_{NHS}-PAMAM-NaBH₄-GA-Anti-COX-II-COXII (10.000 büyütme), F: Au-12MDDA-EDC_{NHS}-PAMAM-NaBH₄-GA-Anti-COX-II-COXII (20.000 büyütme),



Şekil 4.2a. COX-II biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



Şekil 4.2b. COX-II biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltammogramları

Her bir immobilizasyon basamağı için elde edilen EIS spektrumları kullanılarak hesaplanan yük transfer direnci (R_{ct}) değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan yük transfer direnci değerleri

Elektrot Yüzeyi	R_{ct} (kohm)
Au-Bare	0.713
Au-12MDDA	327.11
Au-12MDDA-EDC/NHS	0.873
Au-12MDDA-EDC/NHS-PAMAM	0.337
Au-12MDDA-EDC/NHS-PAMAM- $NaBH_4$	1.318
Au-12MDDA-EDC/NHS-PAMAM- $NaBH_4$ -GA-AntiCOX2	6.875

Elde edilen değerler Au elektroda 12-MDDA bağlanması ile elektrodun yüzey direncinin arttığı gözlenmektedir. Bu durumun öncelikli sebebi yüzeye bağlanan 12 karbonlu merkaptododekanoik asidin yüzeye olan elektron transferini engelleyerek yüzeyi daha yalıtkan kılmasıdır. Bununla birlikte 12-MDDA üzerinde bulunan karboksil grupları, ölçüm sisteminde bulunan negatif yüklü elektrolit ferri siyanatın elektrot yüzeyine geçmesini engellemesi de yük transfer direncini bu kadar artmasına sebep olmuştur. Elde edilen döngüsel voltammogramlara bakıldığında Au elektrot yüzeyine 12-MDDA bağlanması ile voltammogramlardaki karakteristik piklerin kaybolduğu gözlenmektedir. Bunun sebebi olarak yüzeyin yalıtkan hale gelmesi yüzeyde dönüşen elektrolit miktarını azalttığından ölçülen akım miktarı da azalar. Bu akım azalması redoks probunun hassasiyet sınırlarından aşağıda olduğunda piklerin oluşmadığı gözlenmektedir.

Tablodan da görüldüğü üzere 12-MDDA'da bulunan karboksil uçlarını aktifleştirmek için kullanılan EDC-NHS çifti elektrot yüzeyinin yük transfer direnci değerini 1,0 kohm değerinden daha aşağılara çekebilmiştir. Bunun sebebi karboksil grubu aktifleştğinde oluşan ara ürün pozitif yüklüdür ve redoks probunu elektrot yüzeyine doğru çeker. Bunun sonucu olarak yüzeye daha fazla redoks probu ulaşır ve dönüşüme uğrar. Elektrot yüzeyine daha fazla yük ulaşması yük transfer direncinin de

düştüğünü gösterir ki bu sonuç grafikten de gözlemlenebilir. Ayrıca daha fazla elektrolitin dönüşüme uğraması ölçülen akımın artmasına sebep olacağından döngüsel voltammogramlarda redoks probuna ait karakteristik indirgenme ve yükseltgenme pikleri gözlenmeye başlar.

pH:7,0 değerinde PAMAM üzerinde bulunan amin grupları protonlanmış halde (NH_3^+) formunda bulunur. Yüzeyde daha fazla pozitif yükün bulunması ve PAMAM üzerinde bulunan karbonil grupları ferrisiyanatın ve elektronların yüzeye daha hızlı taşınmasını sağlar. Bunun sonucu olarak da aktifleşmiş 12-MDDA'ya PAMAM bağlandığında R_{ct} değerinde azalma gözlenir. Aynı şekilde yük transfer direnci az olduğunda ölçülen akım artacağından döngüsel voltammogramlardaki piklerde artış gözlenir. Döngüsel voltammogramlardaki artış Şekil 4.1b.'de, R_{ct} değerlerindeki düşüş ise Şekil 4.1a. ve Tablo 4.1.'de açıkça gözlenmektedir.

PAMAM üzerinde bulunan karbonil gruplarının sonraki adım olan çapraz bağlama aşamasında girişim yapma ihtimalinden dolayı NaBH_4 ve LiBH_4 gibi bir indirgen ile indirgenmesi gerekmektedir. Bu indirgeme işlemi sonrasında elektronların yüzeye transferi zorlaştığından dolayı R_{ct} değeri artar. Aynı şekilde yük transfer direnci arttığında ölçülen akım azalacağından döngüsel voltammogramlardaki piklerde azalma gözlenir. Döngüsel voltammogramlardaki azalma Şekil 4.1b.'de, R_{ct} değerlerindeki artış ise Şekil 4.1a. ve Tablo 4.1.'de açıkça gözlenmektedir.

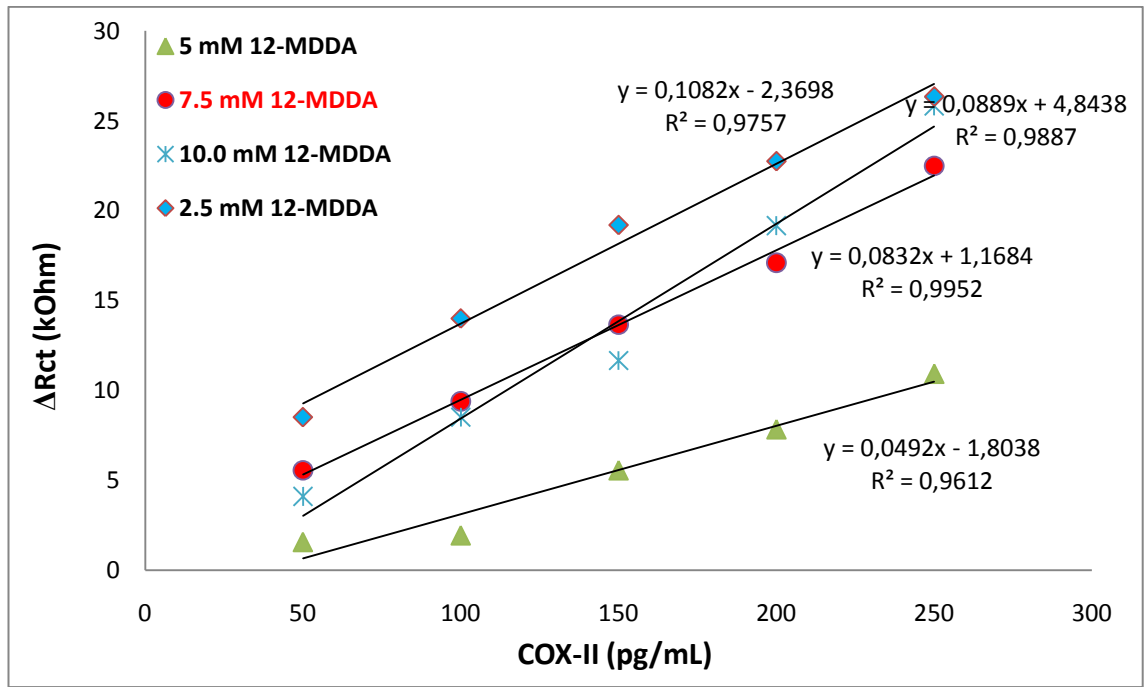
Yüzeye Anti-COX-II gibi iletken olmayan bir protein bağlandığında yüzeyin elektron geçirgenliği azalır. Çünkü proteinler oluşturduğumuz immobilizasyon hattına nazaran daha büyük moleküllerdir ve elektrot yüzeyine ferrisiyanat transferini büyük ölçüde bloke ederler. Sonuç olarak EIS spektrumları için R_{ct} değerinde büyük bir artış, döngüsel voltammogramlarda ise pik yüksekliği değerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Yüzeye COX-II antijeni bağlandığında ise elektronların yüzeye ulaşması daha da zorlaşır. Her COX-II ilavesinde bu engelleme işlemi artarak devam eder. Sonuç olarak her ilave sonrası, alınan impedans spektrumlarında R_{ct} değerlerinin arttığı ve döngüsel voltammogramlarda ise pik yüksekliklerinin azaldığı gözlenmiştir.

4.1.2. COX-II Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.2.1. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

12-Merkaptododekanoik asitin 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM ve 10 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak hazırlanan biyosensörlere ait Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile COX-II konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3.'te ve elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevaplarına etkisi

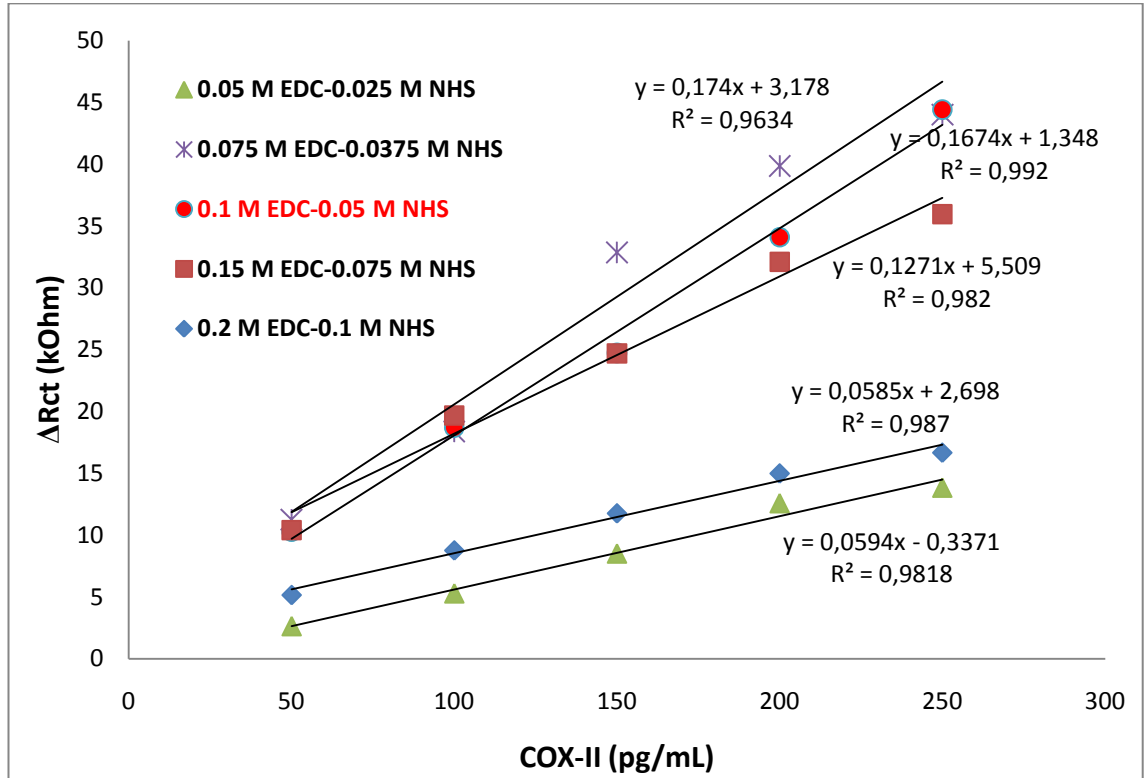
Tablo 4.2. 12-MDDA konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

12-MDDA konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
2,5 mM	0,9757	$y=0,1082x-2,3698$
5,0 mM	0,9612	$y=0,0492x-1,8038$
7,5 mM	0,9952	$y=0,0832x+1,1684$
10 mM	0,9887	$y=0,0889x+4,8438$

Elde edilen kalibrasyon eğrilerine ve yük transfer direnci değerlerine bakıldığında düşük konsantrasyonlarda 12-MDDA kullanıldığında yüzeyde daha az SAM tabakası oluşacağından immobilize edilen antikor miktarı da azalır. Bunun sonucu olarak antijen bağlama kapasitesi düşmesiyle beraber kalibrasyon grafiklerinde doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Sonuç olarak kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında “7,5 mM” optimum 12-MDDA konsantrasyonu olarak belirlendi. 10 mM ve 5,0mM 12-MDDA konsantrasyonlarında R_{ct} ve eğim değerleri yüksek olsa da yeterince doğrusal sonuçlar elde edilemediği grafiklerden de gözlenmektedir.

4.1.2.2. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

EDC/NHS çiftinin 0,05M-0,025M; 0,075M-0,0375M; 0,1M-0,05M; 0,15M-0,075M ve 0,2M-0,1M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak hazırlanan biyosensörlere ait Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile COX-II konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4.’te ve elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.3.’te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

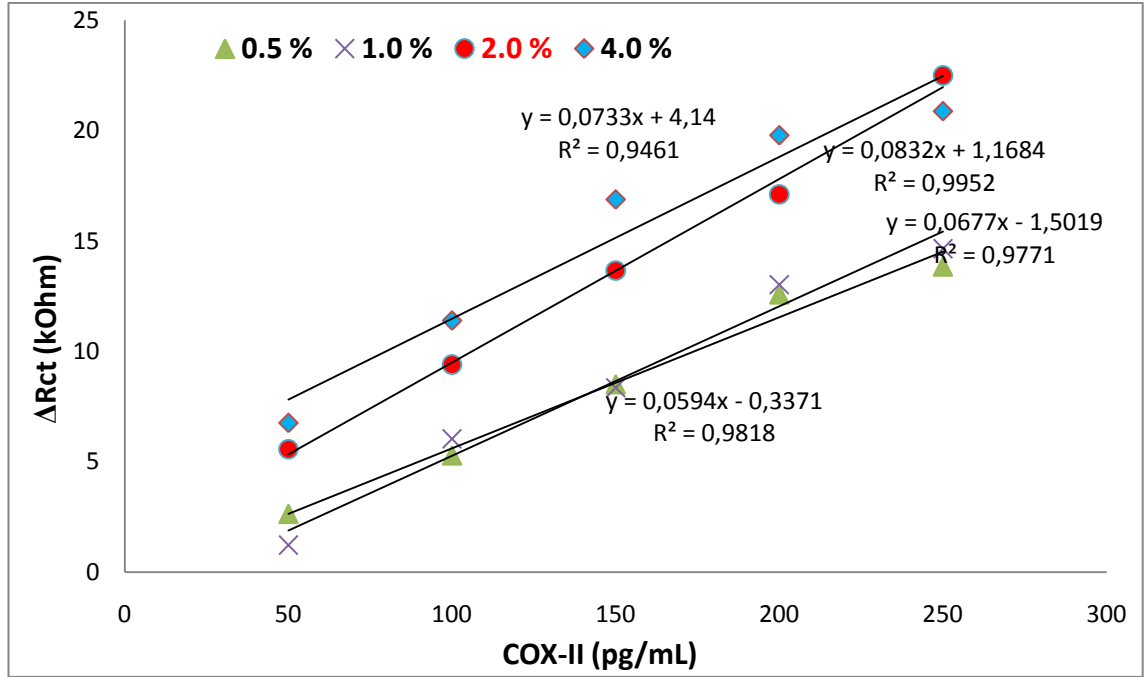
Tablo 4.3. EDC/NHS konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

EDC/NHS Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
0,05 M / 0,025 M	0,9818	$y=0,0594x-0,3371$
0,075 M / 0,0375 M	0,9634	$y=0,174x+3,178$
0,10 M / 0,05 M	0,9920	$y=0,1674x+1,348$
0,15 M / 0,075 M	0,9820	$y=0,1271x+5,509$
0,20 M / 0,15 M	0,9870	$y=0,0585x+2,698$

Yüksek konsantrasyonlarda EDC/NHS kullanılması daha fazla aktif karboksil ucu elde edilmesini sağlar dolayısıyla yüzeye daha fazla PAMAM bağlanır. Bunun sonucu olarak daha fazla antikor bağlandığından, ΔR_{ct} farklanmalarının yüksek olması beklenir. Fakat 0,15 M/0,075 M ve 0,20 M/0,15 M EDC/NHS konsantrasyonlarında yüzeye daha fazla antikor bağlanması SAM tabakasının bu yükü taşıyamamasına ve akabinde tabakaların bozulmasına sebep olabilir. Ayrıca yüksek oranda aktivasyon biyoaktif tabakanın daha kompleks bir yapıda oluşmasına sebep olabilir. Bunun sonucu olarak yüksek konsantrasyonlarda doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Düşük EDC/NHS konsantrasyonlarında ise yüzeye yeterince antikor bağlanmadığından eğim değerleri düzgün olsa da COX-II tayininde doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Sonuç olarak kalibrasyon eğrilerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında **“0,1 M & 0,05 M”** optimum EDC/NHS konsantrasyonları olarak belirlendi.

4.1.2.3. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

% 0,5; % 1,0; % 2,0 ve % 4,0 konsantrasyonlarında PAMAM dendrimeri çözeltileri kullanılarak hazırlanan biyosensörlere ait Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile COX-II konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5.'te ve elde edilen doğruların, doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.4. PAMAM konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

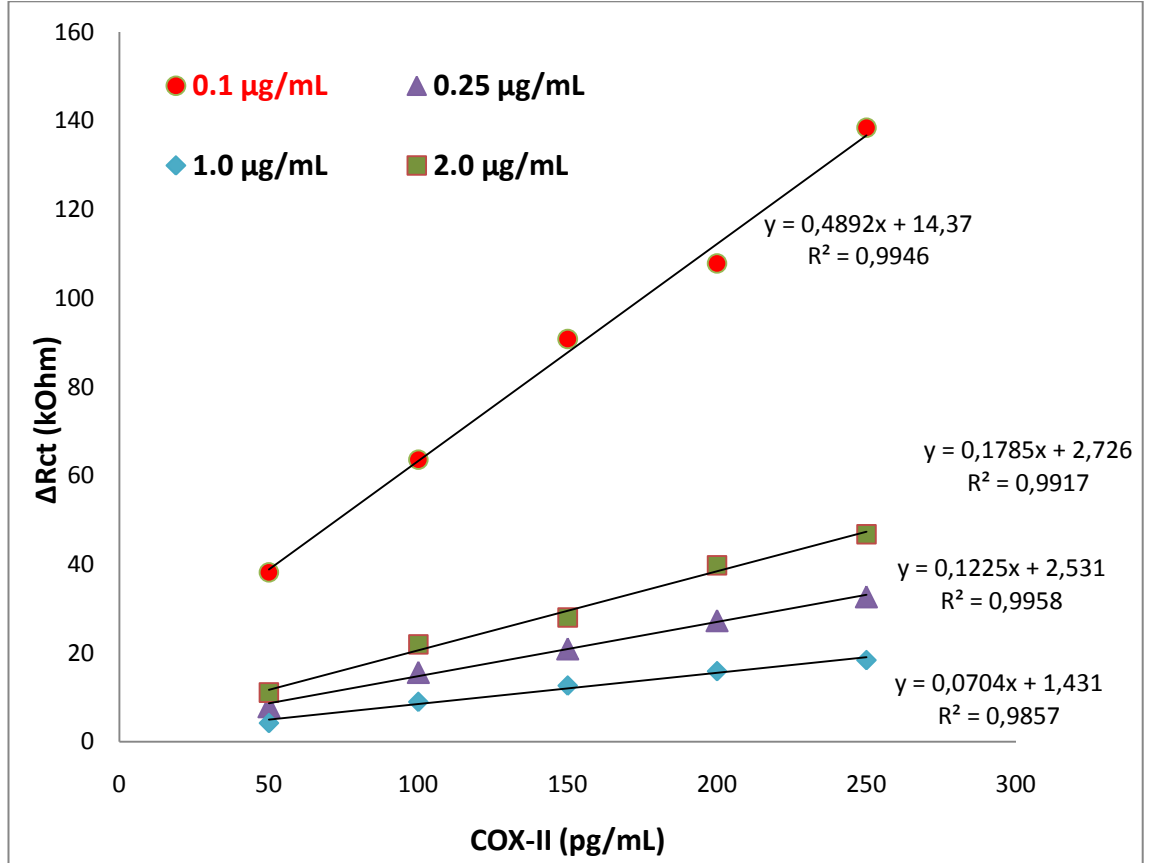
PAMAM Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
% 0,5	0,9818	$y=0,0594x-0,3371$
% 1,0	0,9771	$y=0,0677x-1,5019$
% 2,0	0,9952	$y=0,0832x+1,1684$
% 4,0	0,9461	$y=0,0733x+4,14$

PAMAM konsantrasyonu arttıkça, aktifleştirilmiş uçlara daha fazla PAMAM molekülü bağlanır ve antikorun immobilizasyonu için daha fazla fonksiyonel uç elde edilir. Böylelikle daha fazla antikor elektrot yüzeyine immobilize edilebilmiştir. Fakat % 4,0'lık PAMAM kullanıldığında yüzeyde meydana gelen muhtemel deformasyonlar ve oryantasyon problemlerinden dolayı COX-II tayininde doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Ayrıca yüksek PAMAM konsantrasyonunda daha kompleks bir yapı oluşturduğundan; istenmeyen çapraz bağlar, spesifik olmayan etkileşimler ve difüzyon problemleri de gözlenebilir. Bunlar doğrusallığı ve sinyal düzeyini olumsuz bir şekilde etkileyen durumlardır. % 1,0 ve % 0,5'lik PAMAM konsantrasyonlarında ise

muhtemelen daha az antikor immobilize edildiği için COX-II konsantrasyonlarına karşılık gelen ΔR_{ct} farklanmaları düşük çıkmıştır. Sonuç olarak kalibrasyon eğrilerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında “% 2,0” optimum PAMAM konsantrasyonu olarak belirlendi.

4.1.2.4. Anti-COX-II konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

0,1 ng/ μ L; 0,25 ng/ μ L; 1,0 μ g/mL ve 2,0 μ g/mL konsantrasyonlarında Anti-COX-II porsiyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlere ait Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile COX-II konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6.’da ve elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.5.’te gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Anti-COX-II konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

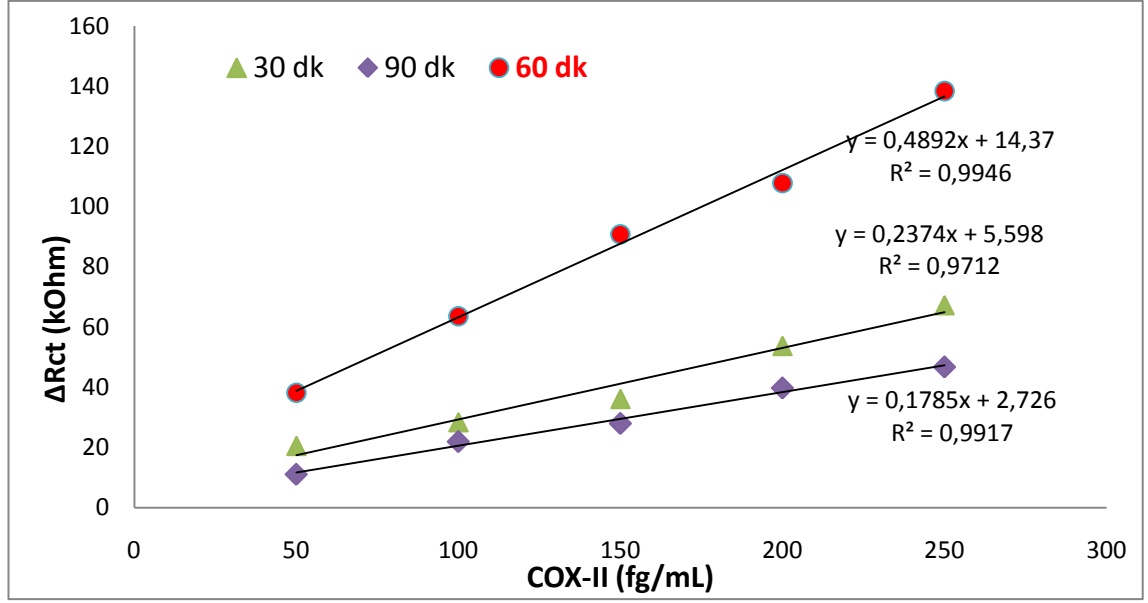
Tablo 4.5. Anti-COX-II konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Anti-COX-II Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
0,1 $\mu\text{g/mL}$	0,9946	$y=0,4892x + 14,37$
0,25 $\mu\text{g/mL}$	0,9958	$y=0,1225x + 2,531$
1,0 $\mu\text{g/mL}$	0,9857	$y=0,0704x + 1,431$
2,0 $\mu\text{g/mL}$	0,9917	$y=0,1785x + 2,726$

İmmobilize edilecek antikor miktarı arttıkça, yüzeye yük transferi azaldığından antikora ait Nyquist eğrisinin R_{ct} değeri yüksek olur. Ayrıca antikor konsantrasyonu arttıkça daha fazla antijen bağlama kapasitesi ortaya çıkar ki bundan dolayı tüm kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayısı değerleri mutlak değere yakın olur. Fakat yüzeye daha fazla protein bağlanması SAM tabakasının yükünün artmasına ve bunu sonucu olarak immobilizasyon tabakalarında deformasyon ve çökmelere sebep olabilir. Ayrıca antikor miktarı arttıkça bağlanmalar çok sıkışık olabileceğinden antikorun yerleşimi ve doğru bir şekilde oryantasyonu da zorlaşır. Bu sebeplerden dolayı antikor miktarı artmasına karşın, yüzey taşıma kapasitesi dolduğundan yüksek antikor konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ve ΔR_{ct} farklanması değerleri düşük çıkmıştır. Sonuç olarak kalibrasyon eğrilerinin eğim, doğrusallık ve ΔR_{ct} değerlerine bakıldığında “**0,1 $\mu\text{g/mL}$ ”** optimum Anti-COX-II konsantrasyonu olarak belirlendi.

4.1.2.5. Anti-COX-II inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

0,1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki Anti-COX-II porsiyonununun 30, 60 ve 90 dk gibi farklı sürelerde inkübe edilmesiyle hazırlanan biyosensörlere ait Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile COX-II konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.7.’de ve elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.6.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Anti-COX-II inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.6. Anti-COX-II konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Anti-COX-II inkübasyon süresi (dk)	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
30	0,9712	$y=0,2374x + 5,598$
90	0,9917	$y=0,1785x + 2,726$
60	0,9946	$y=0,4892x + 14,37$

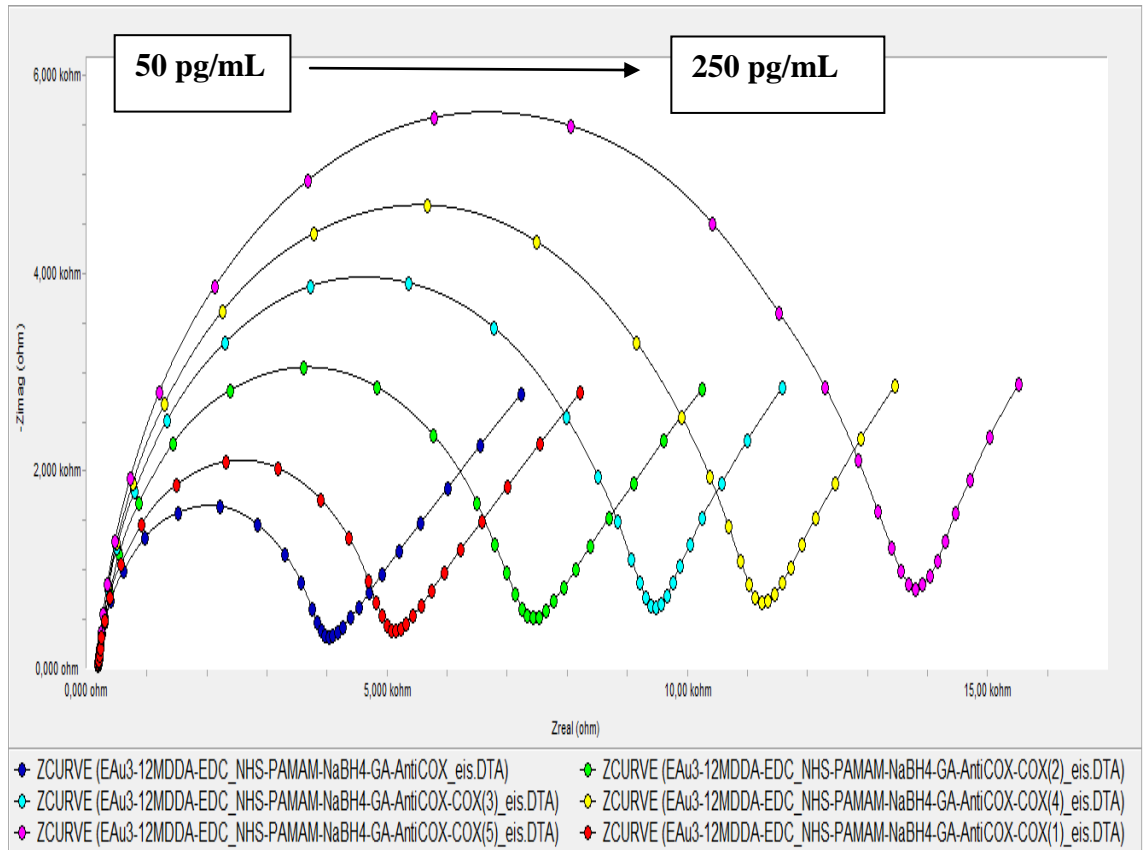
Antikorun glutaraldehit ile bağlanması kimyasal bir süreç olduğundan reaksiyon süresi önemlidir. Antikor konsantrasyonu sabit tutulup reaksiyon süresi arttıkça yüzeye bağlanan antikor miktarı artacağından antijen kapasitesi de artar. Fakat immobilizasyon daha küçük bir alanda gerçekleşeceğinden antikorların yüzeye doğru bir şekilde yerleşmeleri gerçekleşemez. Ayrıca inkübasyon süresinin uzaması bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli olan çözücünün daha fazla buharlaşmasına da sebep olur. Bu sebeplerden dolayı 90 dk inkübasyon süresi ile hazırlanan biyosensörün standart grafiğinin doğrusallığı düzgün olmasına karşın COX-II konsantrasyonlarına karşılık gelen ΔR_{ct} farklanma değerleri ve doğrunun eğimi düşük çıkmıştır. 30 dk inkübasyon süresi ile hazırlanan biyosensörde ise reaksiyon süresi yeterince antikorun yüzeye bağlanması için yeterli olmamıştır. Bunun sonucu olarak antijen bağlama

kapasitesi azaldığından ΔR_{ct} farklanma değerleri ve doğrunun eğimi düşük çıkmıştır. Sonuç olarak kalibrasyon eğrilerinin eğim, doğrusallık ve ΔR_{ct} değerlerine bakıldığında **“60 dk.”** optimum Anti-COX-II inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. Bulunan bu optimum değer literatürlerde yer alan benzer türdeki çalışmalarla da uyumludur [90,91].

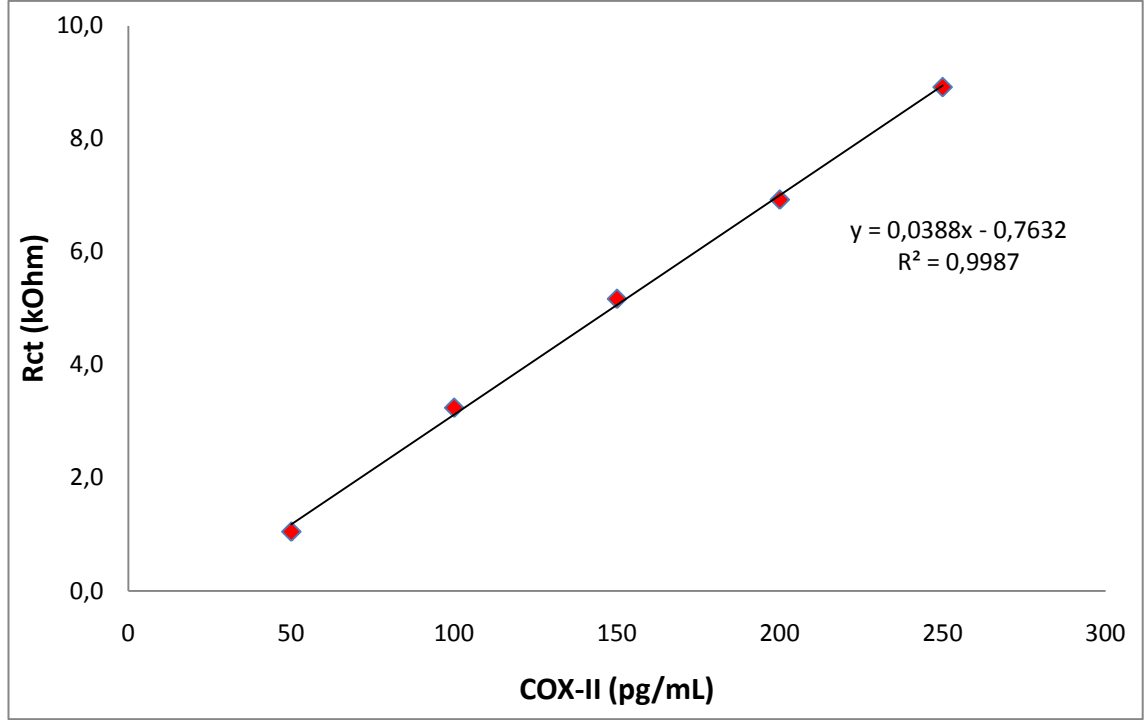
4.1.2. COX-II Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.3.1 Doğrusal Tayin Aralığı

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M-0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), PAMAM (% 2,0) ve Anti-COX-II (1,0 µg/mL) (60 dk)] hazırlanan biyosensör ile doğrusal tayin aralığını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu biyosensör ile elde edilen Nyquist eğrileri (Şekil 4.8a.) ve bu eğriler kullanılarak hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile COX-II konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8b.’de gösterilmiştir. Bu çalışmalarda **50-250 pg/mL** COX-II aralığı tayin aralığı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8a. Doğrusal tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.8b. COX-II biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Literatürlerde yer alan ve benzer bir yöntemle oluşturulmuş diğer iki COX-II biyosensörüne bakıldığında, tayin aralıklarının Omole ve ark. geliştirdiği spektroeletrokimyasal biyosensörde: 0,1-0,5 µg/mL [75]; Noah ve ark. geliştirdiği SPR temelli immünosensörde ise: $7,46 \times 10^{-4}$ - $7,46 \times 10^2$ ng/mL [80] olduğu rapor edilmiştir. Geliştirdiğimiz COX-II biyosensörü, Omole ve ark. tarafından geliştirilen biyosensöre kıyasla daha duyarlıdır ve daha doğrusal bir kalibrasyon eğrisine sahiptir. Ayrıca geliştirdiğimiz biyosensör, Noah ve ark. geliştirdiği biyosensöre kıyasla daha ucuz cihazlarla ve kimyasallarla tayin olanağı sağlamaktadır.

4.1.3.2 Tekrar üretilebilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak [12-MDDA (7,5 mM), EDC/NHS (0,1 M – 0,05 M), NABH₄ (5,0 mM), PAMAM (% 2,0) ve Anti-COX-II (0,1 µg/mL) (60 dk.)] hazırlanan beş farklı biyosensör ile 50–250 pg/mL aralığı için ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerine ilişkin doğrusallık katsayısı (R^2), doğru denklemi ve tayin aralığı değerleri Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.

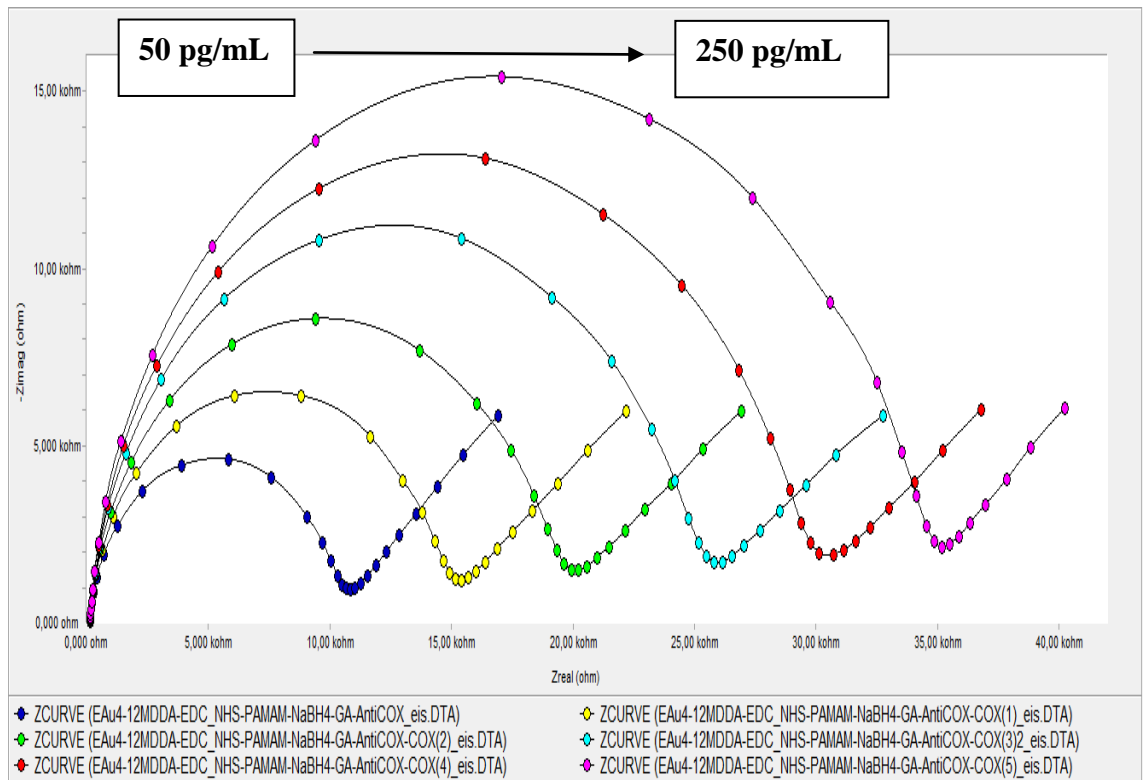
Tablo 4.7. COX-II biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensör Numarası	Doğrusallık Katsayısı (R ²)	Doğru Denklemi	Tayin Aralığı (pg/mL)
1	0,9913	y=0,1441x + 3,118	50-250
2	0,992	y=0,1674x + 1,348	50-250
3	0,9987	y=0,0388x - 0,7632	50-250
4	0,9946	y=0,4892x + 14,37	50-250
5	0,9933	y = 0,0129x - 0,2827	50-250

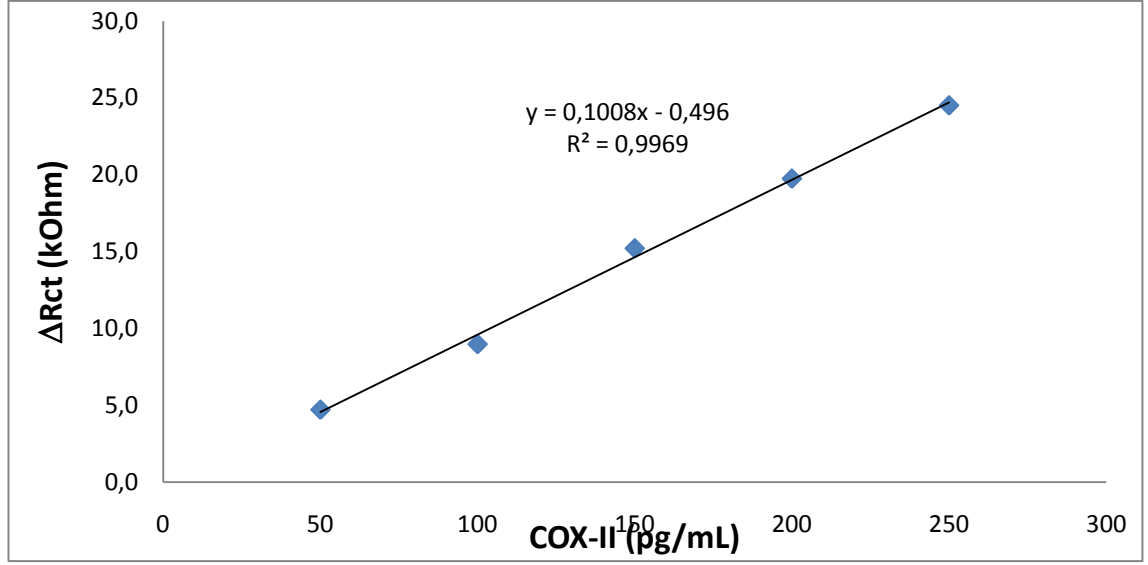
Literatürde yer alan diğer iki biyosensörde de tekrar üretilebilirliğe ilişkin veri bulunmadığından dolayı kıyaslama yapılamamaktadır.

4.1.3.3 Yapay Serumda Uygulama

Optimize edilmiş koşullarda hazırlanan biyosensörlere ait impedans diyagramları Şekil 4.9a'da ve bu diyagramlar kullanılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile COX-II (yapay serumda hazırlanmış) konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.9b.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9a. Yapay Serumda uygulama çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.9b. Yapay Serumda uygulama çalışmalarında elde edilen kalibrasyon grafiği

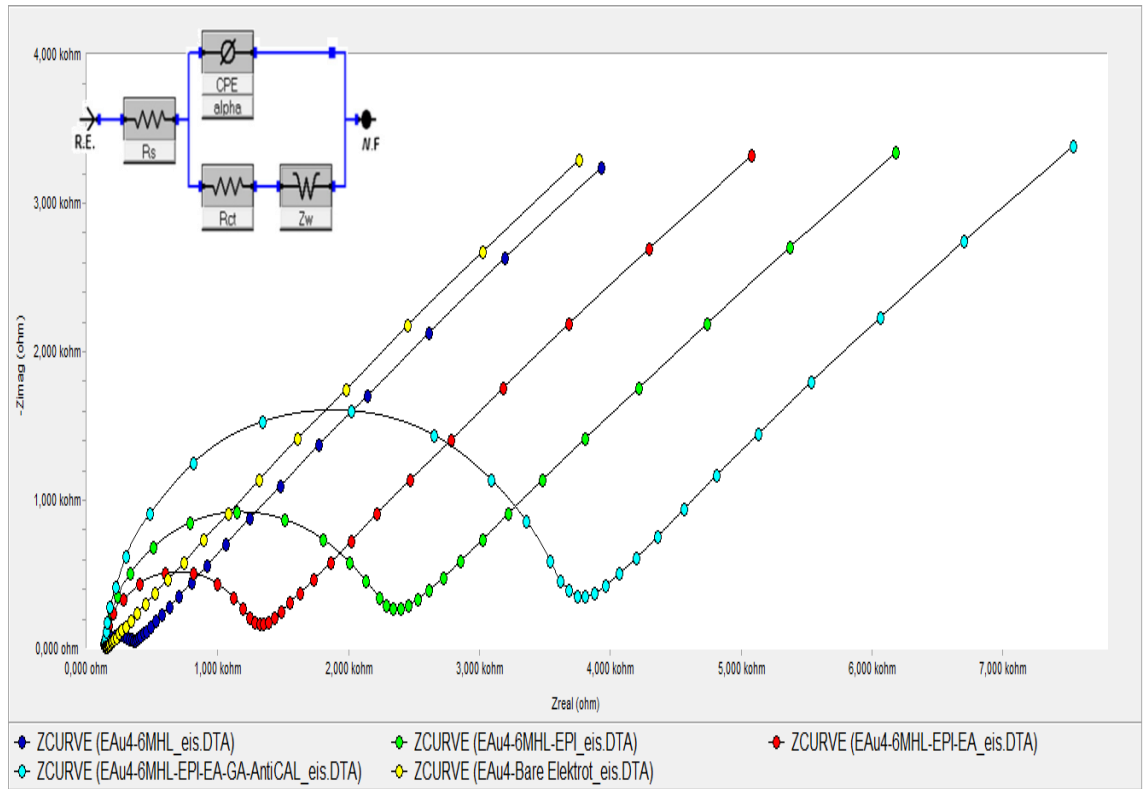
Yapay serumda hazırlanmış COX-II porsiyonlarının kalibrasyon grafiğine ve impedans grafiğine bakıldığında, serumda bulunan tuzların ve diğer önemli bazı biyomoleküllerin ölçümlere girişim yapmadığı görülmektedir. Bu sebepten ötürü geliştirilen biyosensör, gerçek serum örneklerinde de COX-II tayinini hassas ve spesifik bir şekilde yapabilme potansiyeline sahiptir.

4.2. Kalretinin (CAL) Biyosensörü İle Elde Edilen Bulgular

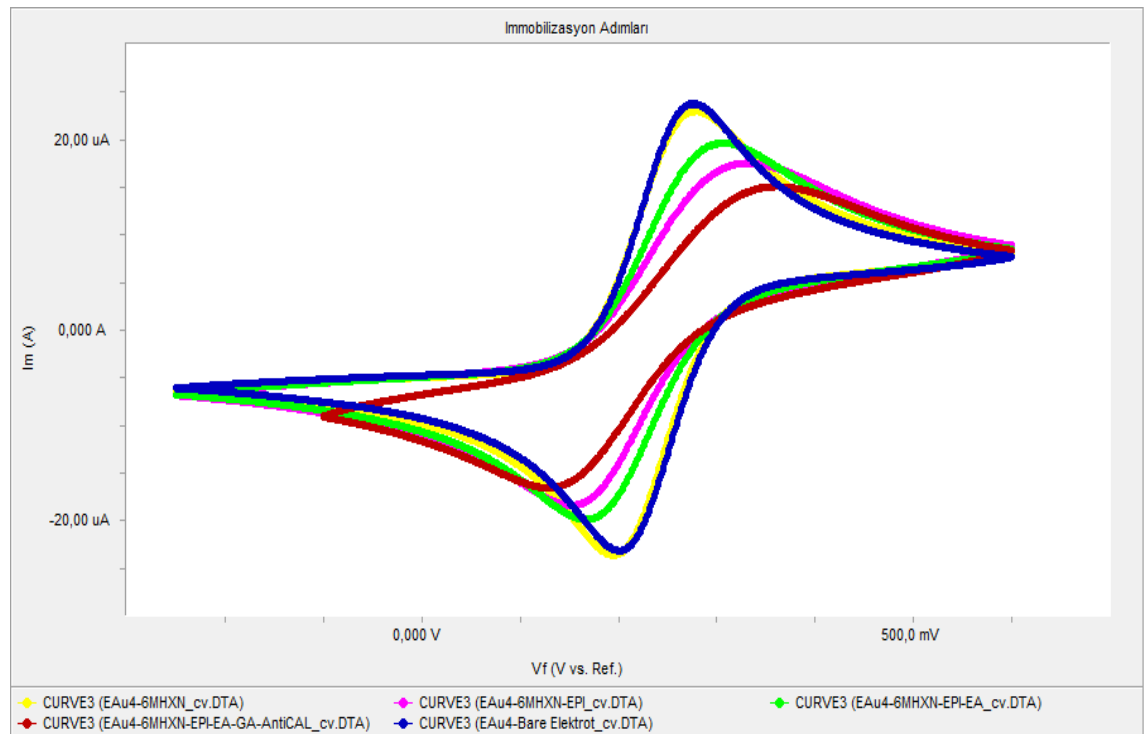
4.2.1. CAL Biyosensörünün hazırlanmış basamaklarına ilişkin bulgular

CAL biyosensörü için her bir immobilizasyon basamağına ait elektrot yüzeyleri için elde edilen EIS spektrumları ve döngüsel voltammogramlar Şekil 4.10a. ve 4.10b.'de gösterilmiştir. Ayrıca her bir immobilizasyon basamağı için yük transfer direncindeki değişim Tablo 4.8.'de gösterilmiştir. Burada:

1. Yalın Au elektrot yüzeyi: Au-Bare-elektrot,
2. 6-Merkaptoheksanol ile modifiye edilmiş Au elektrot yüzeyi: Au-6-MHL,
3. Epiklorohidrin ile aktive edilmiş modifiye elektrot yüzeyi: Au-6-MHL-EPI
4. Etanolamin bağlanmış aktif elektrot yüzeyi: Au-6-MHL-EPI-EA
5. Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış elektrot yüzeyi: Au-6-MHL-EPI-EA-GA
6. Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi:
Au-6-MHL-EPI-EA-GA-Anti-CAL



Şekil 4.10a. CAL biyosensörünün immobilizasyon basamakları EIS spektrumları



Şekil 4.10b. CAL biyosensörünün immobilizasyon basamaklarına ait döngüsel voltammogramlar

Tablo 4.8. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan yük transfer direnci değerleri

Elektrot Yüzeyi	R_{ct} (kohm)
Au-Yalın elektrot	0,141
Au-6-MHL	0,220
Au-6-MHL-EPI	2,124
Au-6-MHL-EPI-EA	1,132
Au-6-MHL-EPI-EA-GA-Anti-CAL	3,486

Elde edilen Nyquist diyagramlarına ve hesaplanan R_{ct} değerlerine bakıldığında yüzeyde 6-MHL ile SAM tabakası oluşturulduğu zaman elektrot yüzeyinin iletkenliğinin azaldığı gözlenmektedir. Bu durum, yüzeye bağlanan 6-MHL moleküllerinin redoks probunun elektrot yüzeyine difüzyonunu engellemesinden kaynaklanmaktadır. 6-MHL, 12-MDDA'dan daha az karbon sayısına sahip olduğundan ve negatif yüklü karboksil grubu yerine yüksüz hidroksil grubu içerdiğinden dolayı redoks probunun elektrot yüzeyine difüzyonunu daha az engeller. Dolayısıyla yük transfer direnci değeri 12-MDDA'daki kadar yüksek değildir. 6-MHL'nın elektrot yüzeyinde oluşturduğu yüzey direnci fazla olmadığından dolayı döngüsel voltammetrideki pik yükseklikleri de belirgin bir şekilde azalmamıştır.

6-MHL hidroksil uçlarına epiklorohidrin bağlandığında Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi Cl⁻ ucu açıkta kalır. Epiklorohidrin NaOH içerisinde hazırlandığında Cl⁻ atomu kısmen negatif yüklü hale geçer ve negatif yüklü ferrisiyanatın elektrostatik itmesinden dolayı elektrot yüzeyine ulaşmasını engeller. Bu durum da yük transfer direncini artıran bir olgu olarak sonuçlara yansır. Ayrıca yüzeye daha az redoks probu difüze olması ölçülen akımın azalmasına, dolayısıyla da redoks probuna ait karakteristik pik yüksekliklerinin düşmesine sebep olur.

Etanolamin, epiklorohidrinin klor ucuna bağlandığında reaksiyon hidroksil ucundan gerçekleşir ve amin ucu boşta kalır. Etanolamin, ekleme öncesi pH 7,0 tamponunda çözüldüğünde amin ucu pozitif yüklenir. Bu pozitif yük negatif yüklü ferrisiyanatın yüzeye çekilmesini ve daha fazla molekülün akım oluşturmasını sağlar. Bu durum EIS ölçümlerinde hesaplanan R_{ct} değerinin azalmasına ve döngüsel voltammogramlarda ise pik yüksekliklerinin artmasına sebep olur.

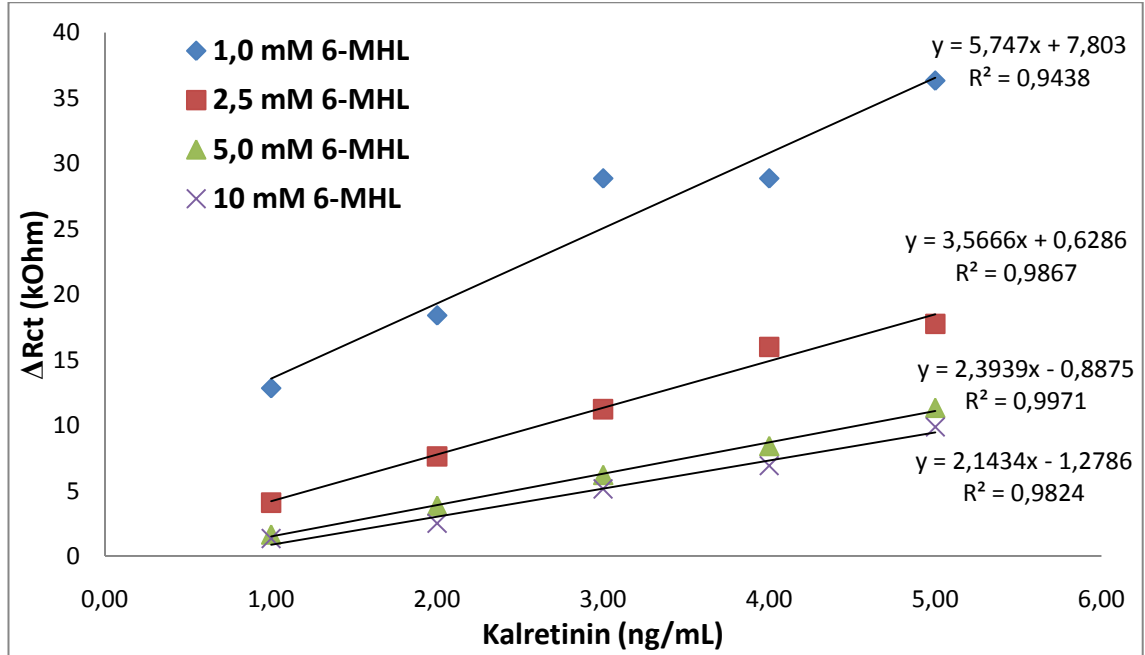
Yüzeye Anti-CAL gibi iletken olmayan bir protein bağlandığında yüzeyin elektron geçirgenliği azalır. Çünkü proteinler oldukça büyük ve nispeten yalıtkan moleküllerdir ve elektrot yüzeyine ferrisiyanat difüzyonunu büyük ölçüde bloke ederler. Sonuç olarak EIS spektrumları için R_{ct} değerinde büyük bir artış, döngüsel voltammogramlarda ise pik yüksekliği değerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Yüzeye CAL bağlandığında elektronların yüzeye ulaşması daha da zorlaşır. Her CAL ilavesinde bu engelleme işlemi artarak devam eder. Sonuç olarak her ilave sonrası, alınan impedans spektrumlarında R_{ct} değerlerinin arttığı ve döngüsel voltammogramlarda ise pik yüksekliklerinin azaldığı gözlenmiştir.

4.2.2. CAL Biyosensörü Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.2.1. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

6-MHL'in 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM ve 10 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen ait Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.11. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

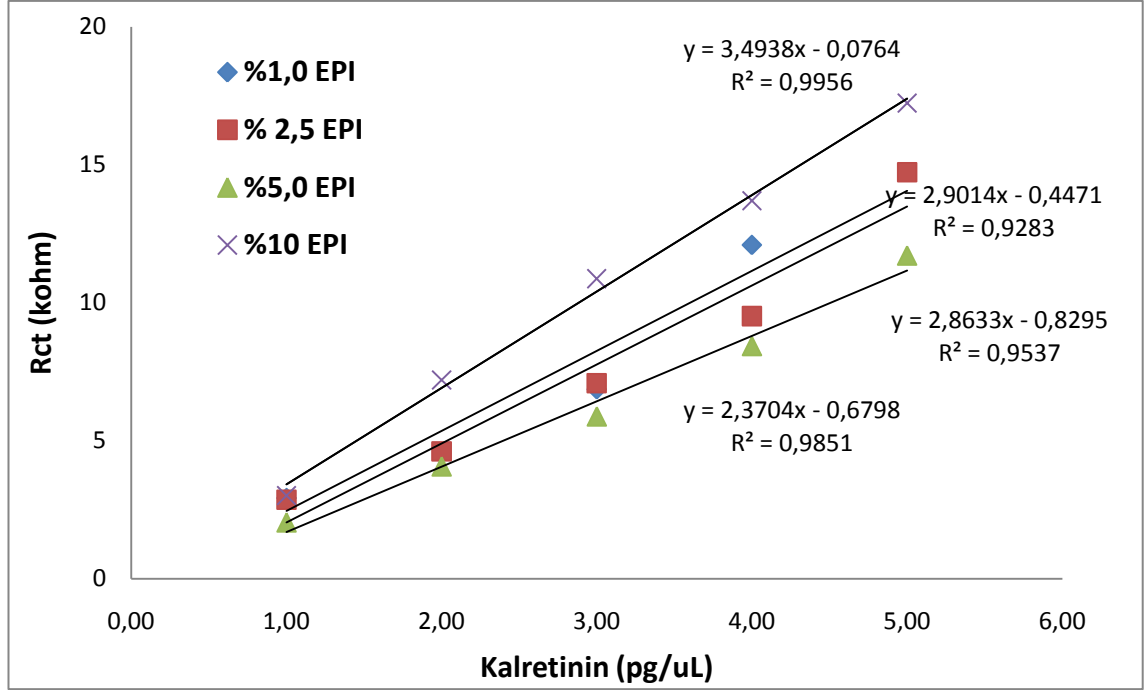
Tablo 4.9. 6-MHL konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

6-MHL Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
1,0 mM	0,9438	$y=5,747x + 7,803$
2,5 mM	0,9867	$y=3,567x + 0,6286$
5,0 mM	0,9971	$y=2,3939x - 0,8875$
10 mM	0,9824	$y=2,1434x - 1,2786$

Elde edilen kalibrasyon eğrilerine ve yük transfer direnci değerlerine bakıldığında düşük konsantrasyonlarda 6-MHL kullanıldığında yüzeyde oluşan SAM tabakasının yeterli düzeyde anti-CAL immobilizasyonuna imkan tanımadığı gözlenmektedir. Bununla birlikte, antikor oryantasyonu ve yönelimleri kolaylaşsa da yüzey deformasyonları ve tabakanın antikor taşıyabilme yeteneğini azalır. Bundan dolayı antijen bağlama kapasitesi azalır ve kalibrasyon eğrilerinde doğrusallıktan sapmalar gözlenir. Sonuç olarak kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum 6-MHL konsantrasyonu “**5,0 mM**” olarak belirlendi.

4.2.2.2. Epiklorohidrin (EPI) konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

% 1,0; % 2,5; % 5,0 ve % 10'luk olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki EPI çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.12. EPI konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

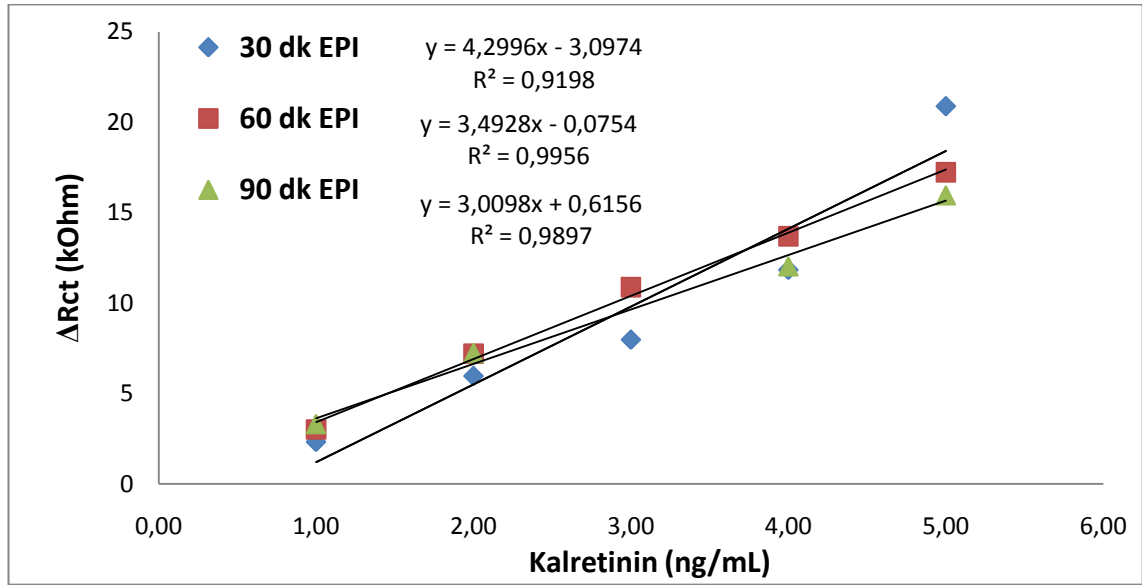
Tablo 4.10. EPI konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

EPI Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R ²)	Doğru Denklemi
% 1,0	0,9283	y = 2,9014x - 0,4471
% 2,5	0,9537	y = 2,8633x - 0,8295
% 5,0	0,9851	y = 2,3704x - 0,6798
% 10	0,9956	y = 3,4938x - 0,0764

Oluşacak optimum SAM tabakası elde edildikten sonra EPI konsantrasyonunun artması, yüzeye bağlanacak olan antikor miktarını arttıracığından antijen bağlama kapasitesi de artacaktır. Daha düşük EPI konsantrasyonlarında antijen bağlama kapasitesinin azalması, doğrusallıktan sapmalara, daha düşük R_{ct} değerlerinin gözlenmesine ve kalibrasyon grafiğinin eğiminin azalmasına sebep olmaktadır. Sonuç olarak Kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum EPI konsantrasyonu “% 10” olarak belirlendi. Bu değer literatürde yer alan Baldrich ve ark. tarafından yapılan çalışma ile de tutarlıdır [11].

4.2.2.3 Epiklorohidrin (EPI) inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

% 10'luk EPI çözeltisi için 30, 60 ve 90 dk. inkübasyon süresi uygulanarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden yararlanılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.13.'te gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. EPI inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.11. EPI inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

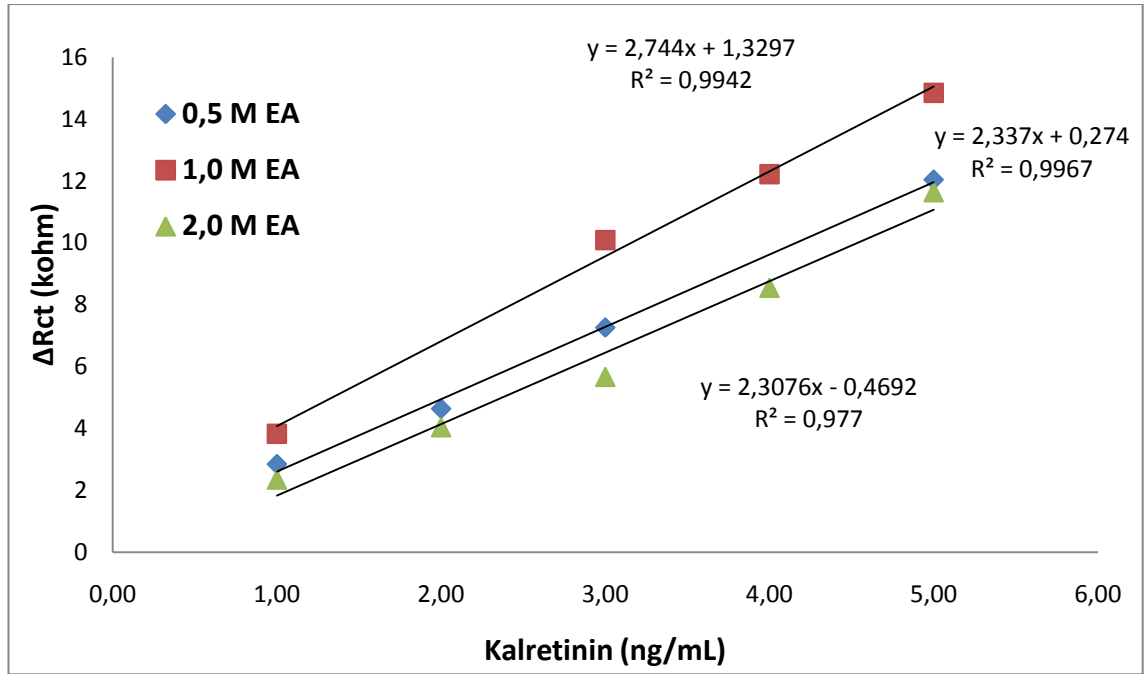
EPI inkübasyon süresi (dk.)	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
30	0,9198	$y = 4,2996x - 3,0974$
60	0,9956	$y = 3,5222x - 0,1048$
90	0,9851	$y = 3,0098x + 0,6156$

EPI inkübasyon süresinin artması, bağlanma reaksiyonu için gerekli olan çözücünün buharlaşmasına sebep olduğundan reaksiyon verimi azalır ve daha az anti-CAL bağlanır. Düşük EPI inkübasyon süresinde ise yeterince aktif uç oluşmaz ve anti-CAL bağlanma oranı azalır. Bunların sonucu olarak da biyosensörün antijen bağlama kapasitesi azalır ve kalibrasyon grafiklerinde doğrusallıktan sapmalar gözlenir.

Kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum EPI inkübasyon süresi “60 dk.” olarak belirlendi.

4.2.2.4. Etanolamin Konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

0,5 M, 1,0 M ve 2,0 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki etanolamin çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.14.’te gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.12.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Etanolamin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

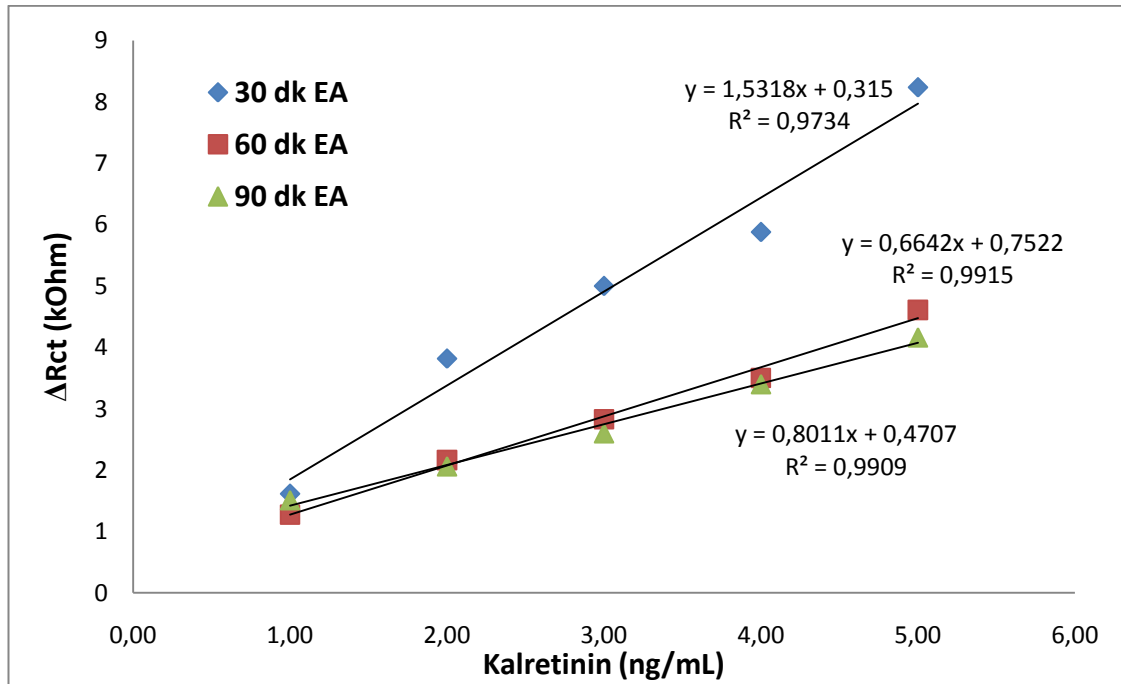
Tablo 4.12. Etanolamin konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Etanolamin konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
0,5 M	0,9967	$y = 2,337x - 0,274$
1,0 M	0,9942	$y = 2,744x + 1,3297$
2,0 M	0,9770	$y = 2,3076x - 0,4692$

Etanolamin miktarının artması yüzeye bağlanan antikör miktarını da arttırması beklenir. Fakat yüzeyde birbirine yakın etanolamin birimlerinin bulunması, istenmeyen karşılıklı amin köprülerinin kurulmasına sebep olabilir. Yani iki etanolamin molekülü birbirine yakın bir halde bulunursa glutaraldehit ile bağlanabilir. Bu durum daha az Anti-CAL bağlanmasına ve biyosensörün duyarlılığının düşmesine sebep olabilir. Bu sebepten yüzey transfer direnci değerleri ve doğrusallık katsayısı da düşer. Düşük etanolamin konsantrasyonlarda ise glutaraldehitin bağlanacağı yeterince amin ucu oluşmaz ve anti-CAL bağlanma oranı azalır. Sonuç olarak kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum etanolamin konsantrasyonu “1,0 M” olarak belirlendi.

4.2.2.5. Etanolamin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

1,0 M etanolamin çözeltisi için 30, 60 ve 90 dk olacak şekilde farklı inkübasyon süresi uygulanan biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.15.’te gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.13.’te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Etanolamin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

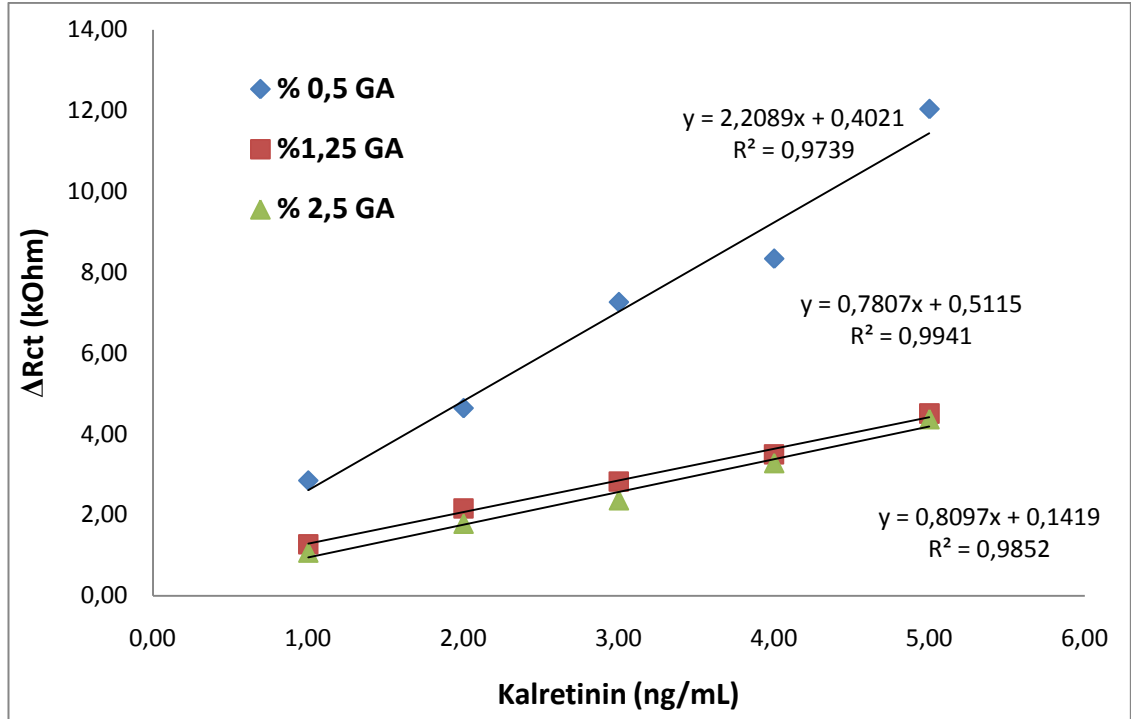
Tablo 4.13. Etanolamin inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Etanolamin inkübasyon süresi (dk)	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
30	0,9734	$y= 1,5318x + 0,315$
60	0,9909	$y= 0,8011x + 0,4707$
90	0,9915	$y= 0,6642x + 0,7522$

Burada inkübasyon süresinin artması, glutaraldehit ile amin köprü bağları oluşma ihtimalini yükseltir. Bundan dolayı etanolamin 90 dk. inkübe edildiğinde doğrusallıktan sapmalar gözlenir. Inkübasyon süresi azaltıldığında ise amin köprü bağları daha az oluştuğundan daha çok anti-CAL immobilize edilebilir. Fakat inkübasyon süresinin azalması ile daha az etanolamin bağlanacağından yüzey alanı daralır. Yüzey alanının daralması anti-CAL oryantasyonunu ve yerleşimini zorlaştırır. Bu sebeplerden dolayı doğrusallıktan daha büyük sapmalar gözlenir. Kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum etanolamin inkübasyon süresi “**60 dk.**” olarak belirlendi.

4.2.2.6. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

% 0,5; % 1,25 ve % 2,5 olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki glutaraldehit çözeltileri kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.16.’da gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.14.’te gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

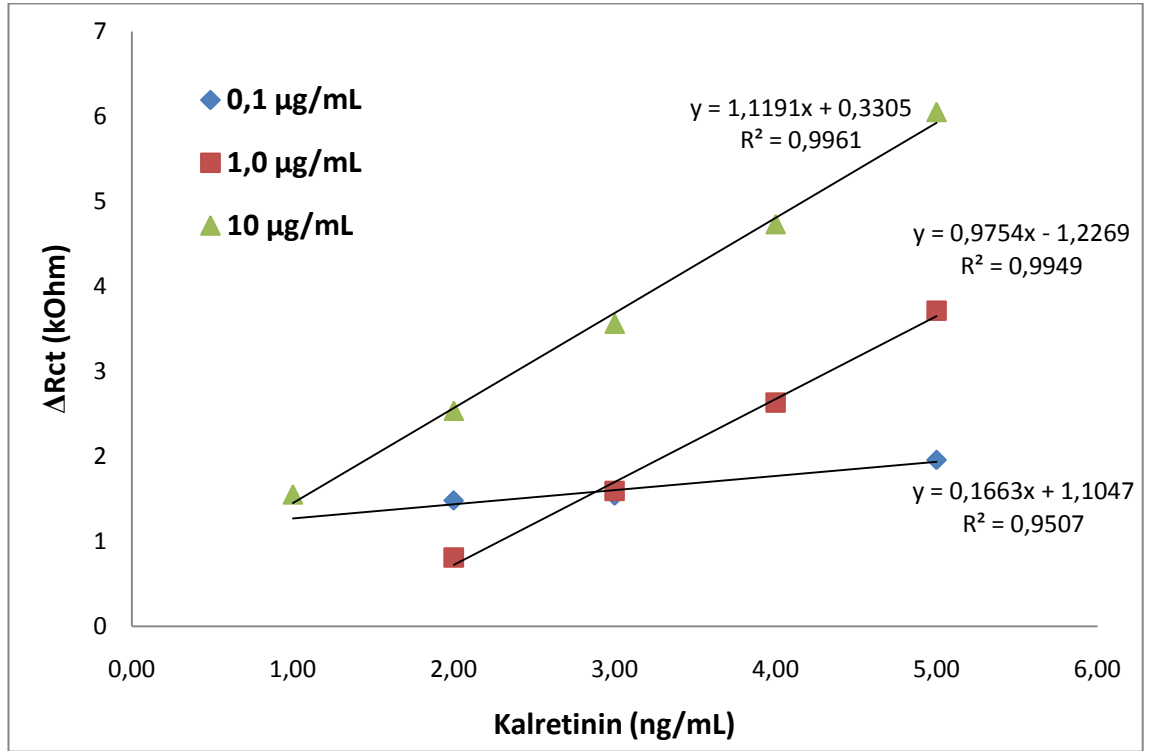
Tablo 4.14. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Glutaraldehit konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
% 0,5	0,9739	$y = 2,2089x + 0,4021$
% 1,25	0,9941	$y = 0,7807x + 0,5115$
% 2,5	0,9852	$y = 0,8097x + 0,1419$

Antikor bağlama adımından bir önceki adım olduğundan çapraz bağlama adımı immobilizasyonun en önemli adımlarından biridir. Çapraz bağlama işlemi ne kadar düzgün yapılırsa o antikor-protein bağlanması o kadar kolaylaşır. Fakat glutaraldehit miktarı arttıkça glutaraldehitin immobilizasyon hattına verdiği zarar da artar. Bunun sonucu olarak daha dayanıksız immobilizasyon hattı oluşur ve R_{ct} değerleri düşer. Glutaraldehit miktarı azaldığında ise yüzeye bağlanan antikor miktarı azaldığından biyosensörün antijen bağlama kapasitesi düşer ve doğrusallıktan sapmalar gözlenir. Sonuç olarak kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum glutaraldehit konsantrasyonu “% 1,25” olarak belirlendi.

4.2.2.7. Anti-Kalretinin (Anti-CAL) konsantrasyonunun optimizasyonu

0,1 µg/mL, 1,0 µg/mL ve 10 µg/mL olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki Anti-CAL porsiyonları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.15.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Anti-CAL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

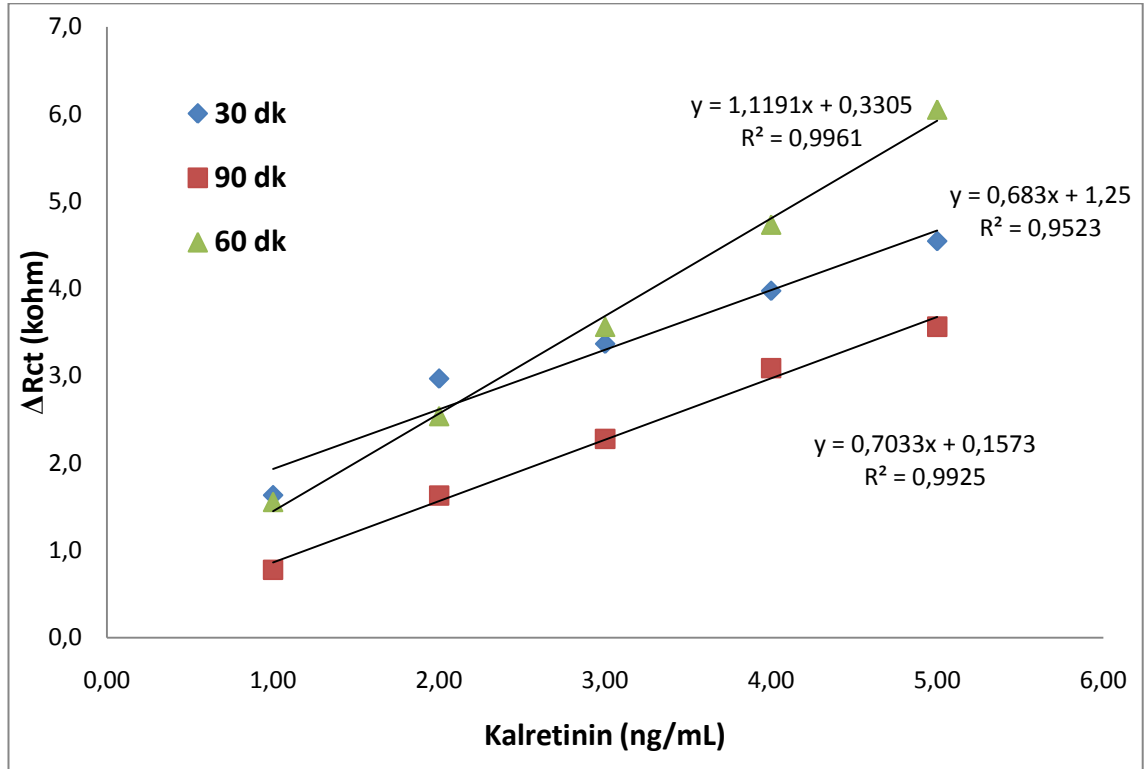
Tablo 4.15. Anti-CAL konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Anti-CAL konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
0,1 µg/mL	0,9507	$y = 0,1163x + 1,1047$
1,0 µg/mL	0,9949	$y = 0,9754x + 1,2269$
10 µg/mL	0,9961	$y = 1,1191x + 0,3305$

Yüzeyde dayanıklı bir SAM tabakası ve immobilizasyon hattı oluşturulduğunda yüzeye daha fazla antikor ve antijen bağlandığı zaman bozulmalar gözlenmez. Bunun sonucu olarak da doğrusallıktan sapmalar oluşmaz. Daha fazla Anti-CAL bağlandığında antijen bağlama kapasitesi de artacağından ΔR_{ct} değerleri ve doğrusallık katsayıları da yüksek çıkar. Bundan dolayı düşük konsantrasyonlardaki Anti-CAL içeren biyosensörlerde doğrusallık ve eğim değerleri düşük çıkmıştır. Sonuç olarak kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum Anti-CAL konsantrasyonu “10 $\mu\text{g/mL}$ ” olarak belirlendi.

4.2.2.8. Anti-CAL inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

10 $\mu\text{g/mL}$ Anti-CAL porsiyonu için “30 dk., 60 dk. ve 90 dk.” inkübasyon süresi uygulanarak biyosensörler hazırlandı. Bu biyosensörler ile elde edilen Nyquist eğrilerinden yola çıkılarak hesaplanan R_{ct} değerleri ile CAL konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.16’da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Anti-CAL inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.16. Anti-CAL inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri

Anti-CAL inkübasyon süresi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
30 dk	0,9523	$y= 0,683x + 1,25$
60 dk	0,9961	$y= 1,1191x + 0,3305$
90 dk	0,9925	$y= 0,7033x + 0,1573$

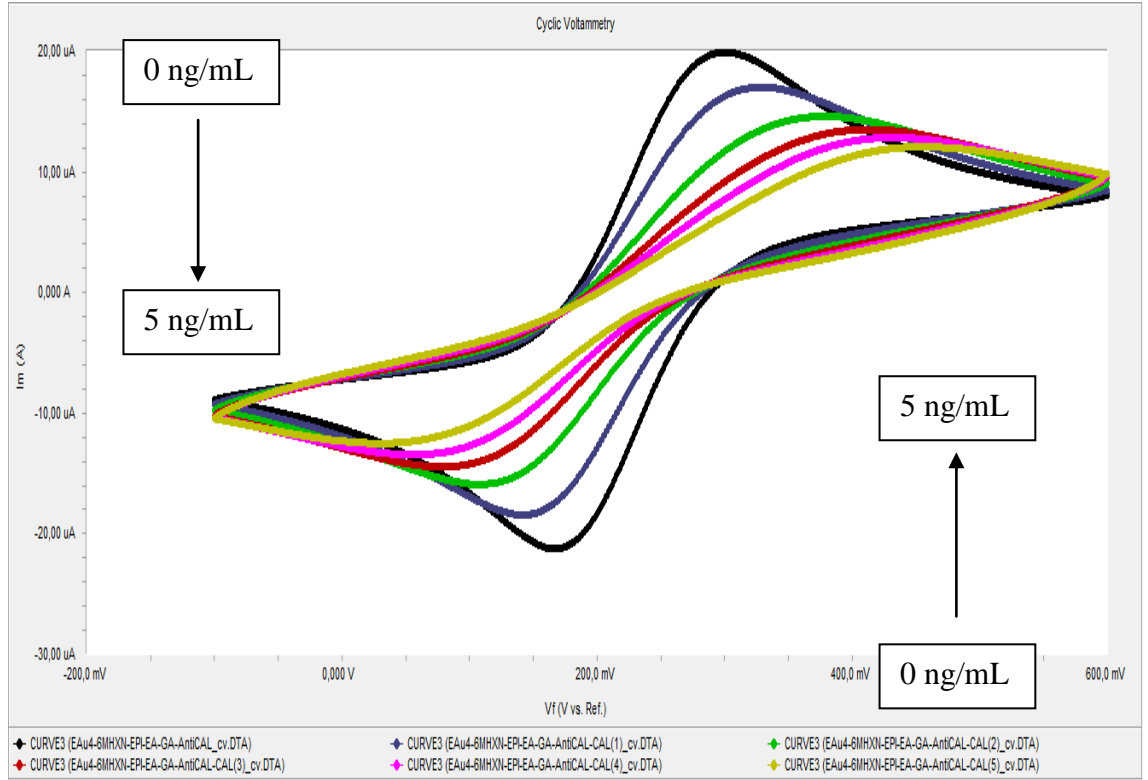
Antikorun bağlanma süresi arttığında Anti-CAL bağlanma miktarı da artar; fakat oryantasyon problemleri oluşacağından ya da yoğun immobilizasyon oranından dolayı CAL bağlanmasında sterik engeller artacağından yüzeyin CAL bağlama kapasitesi düşer. Bunun sonucu olarak da ΔR_{ct} değerlerinde azalma ve kalibrasyon grafiğinde doğrusallıktan sapmalar gözlenir. Sonuç olarak Anti-CAL Kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında optimum Anti-CAL inkübasyon süresi “60 dk” olarak belirlendi.

4.2.3. Kalretinin Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmaları

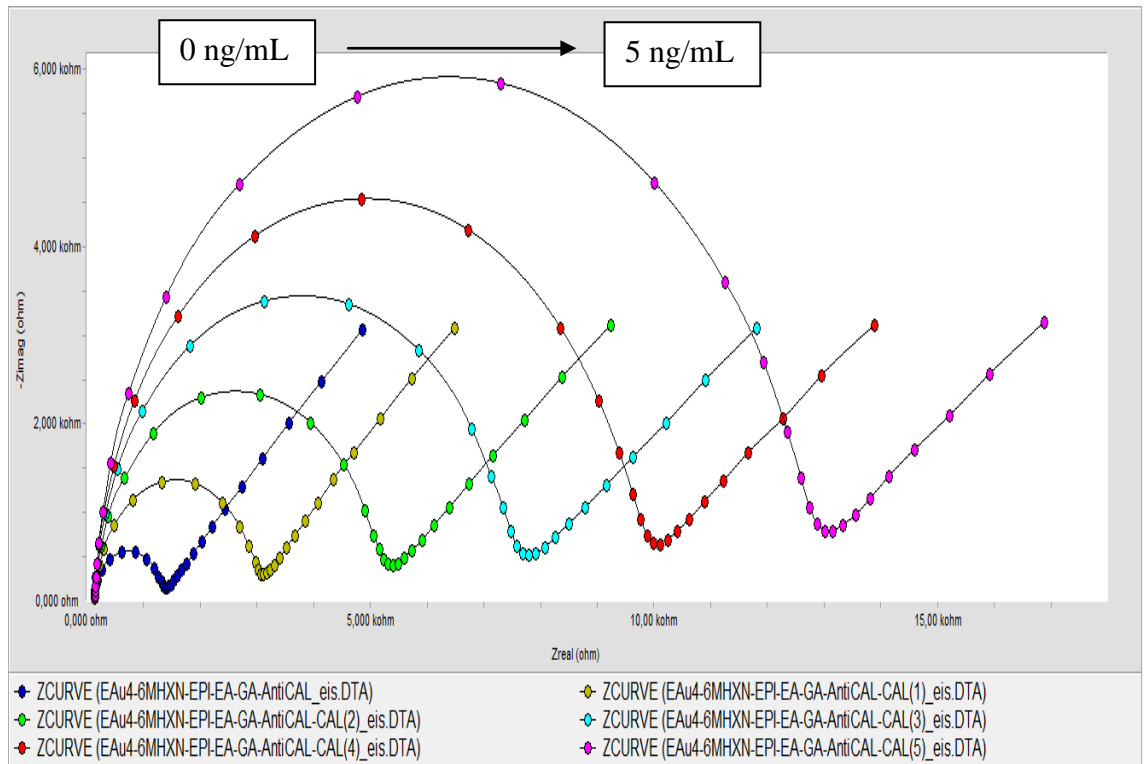
4.2.3.1. Doğrusal Tayin Aralığı

CAL tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra optimumu koşullarda hazırlanan CAL için doğrusal tayin aralığı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör ile elde edilen döngüsel voltammogramlar 4.19a.’da ve impedans spektrumları Şekil 4.19b.’de ve bu spektrumlardan yola çıkılarak hesaplanan yük transfer direnci (R_{ct}) değerleri ile CAL konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.20.’de gösterilmiştir.

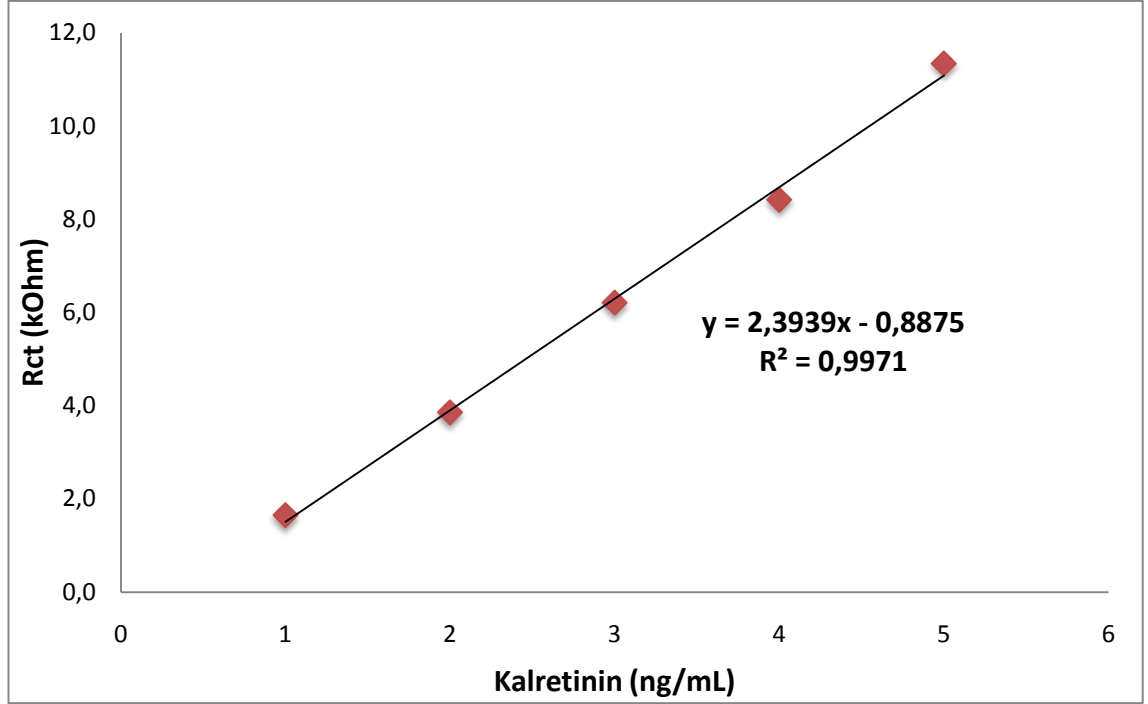
Bu çalışmalar sonucunda geliştirilen biyosensör ile 1-5 ng/mL aralığında CAL tayini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.19a. Doğrusal tayin aralığında elde edilen döngüsel voltammogramlar



Şekil 4.19b. Doğrusal tayin aralığı çalışmalarında elde edilen impedans spektrumları



Şekil 4.20. CAL biyosensörünün standart kalibrasyon grafiği

1-5 ng/mL tayin aralığı hastalıklı insan plazmasında bulunan CAL konsantrasyonunu da kapsamaktadır. Literatürlerde yer alan kalretinin biyosensörü bulunmadığından dolayı kıyaslama sadece Western-Blot ve ELISA yöntemleri ile yapılabilir. Tayin aralığının 0.12-8.97 ng/mL saptandığı Raiko ve arkadaşlarının ELISA çalışmasında calretinin tayinini altı saatte gerçekleşmektedir [88]. Ticari olarak satılan kalretinin ELISA kiti (Uscn Life Science Inc.) ile ise 0.313-3,13 ng/mL aralığında tayin yapılabilmekte ve analiz süresi 4 saat 30 dakikayı bulmaktadır [89]. Geliştirdiğimiz kalretinin biyosensörü, geleneksel yöntemlerle yarışacak bir tayin aralığına ve 1 saat gibi diğerlerine kıyasla çok düşük bir tayin süresine sahiptir.

4.2.3.2 Tekrar üretilebilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak hazırlanan yedi farklı biyosensör ile 1-5 ng/mL kalretinin aralığı için ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerine ilişkin doğrusallık katsayısı (R^2), doğru denklemi ve tayin aralığı değerleri Tablo 4.17.'de gösterilmiştir.

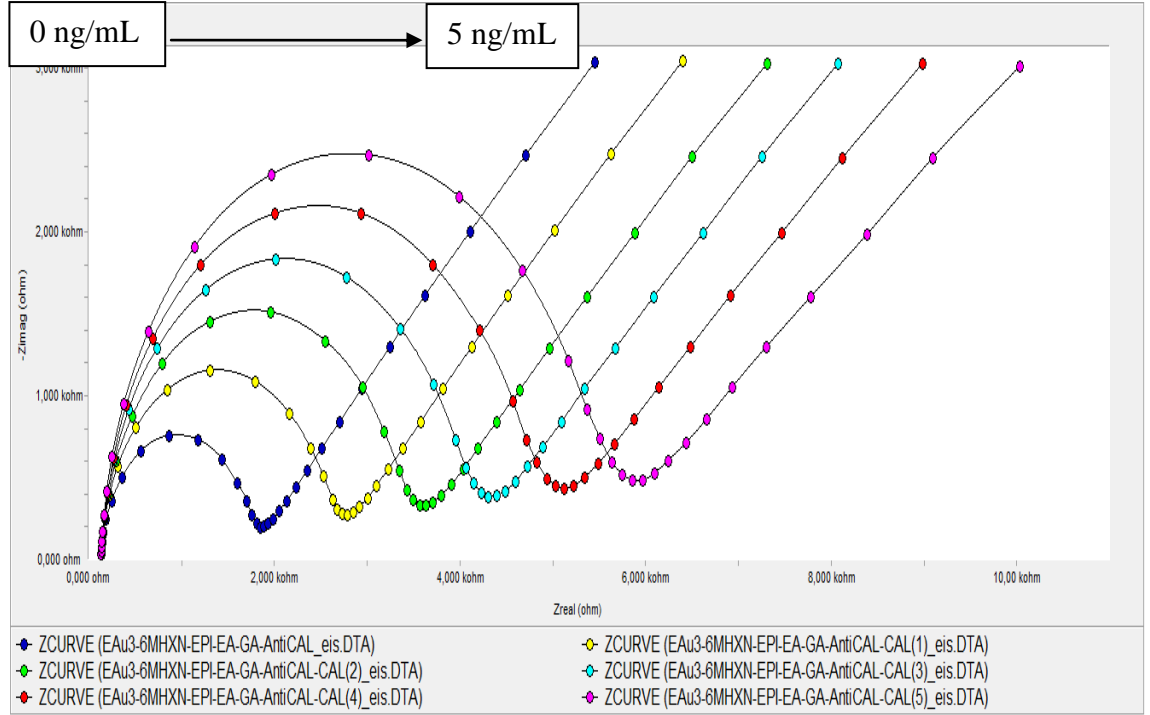
Tablo 4.17. Kalretinin biyosensörü için tekrar üretilebilirlik sonuçları

Biyosensör Numarası	Doğrusallık katsayısı (R²)	Doğru denklemi (y=mx+n)	Tayin (ng/mL)	Aralığı
1	0,9961	y=1,1191x+0,3305	1 – 5	
2	0,9923	y=1,4028x +0,0918	1 – 5	
3	0,9921	y=1,741x-0,6163	1 – 5	
4	0,9961	y=2,1026x-0,7948	1 – 5	
5	0,9971	y=2,3939x-0,8875	1 – 5	
6	0,9950	y=2,0236x-0,7332	1 – 5	
7	0,9910	y=1,2856x-0,4056	1 – 5	

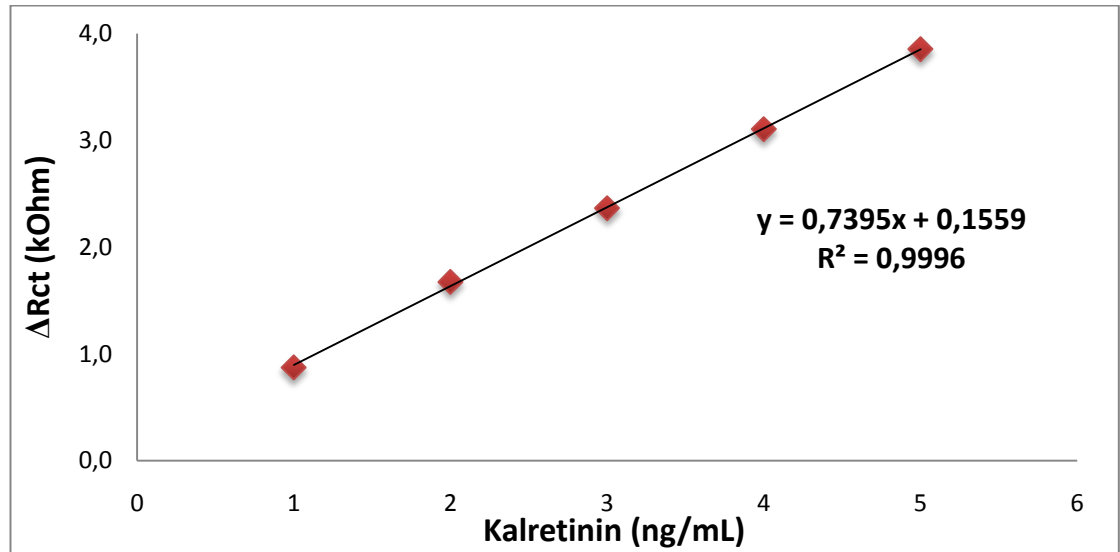
Tablo 4.17.'de de görüldüğü gibi hazırlanan yedi farklı CAL biyosensörü ile benzer eğim ve doğrusallık katsayısı değerleri elde edilebilmiştir. Bu da immobilizasyon yöntemimizin doğruluğunu ve tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

4.2.3.3 Yapay Serumda Uygulama

Optimize edilmiş koşullarda hazırlanan biyosensörlere ait impedans diyagramları Şekil 4.21a.'da ve bu diyagramlar kullanılarak hesaplanan R_{ct} değerlerine ile CAL (yapay serumda hazırlanmış) konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.21b.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21a. Yapay Serum uygulamalarında elde edilen Nyquist diyagramları



Şekil 4.21b. Yapay serum uygulamalarının standart grafiği

Yapay serumda hazırlanmış CAL porsiyonlarının kalibrasyon grafiğine ve impedans grafiğine bakıldığında, serumda bulunan tuzların ve diğer önemli bazı biyomoleküllerin ölçümlere girişim yapmadığı görülmektedir. Bu sebepten ötürü geliştirilen biyosensör, CAL tayinini gerçek serum örneklerinde de hassas ve spesifik olarak gerçekleştirebilme potansiyeline sahiptir.

Her iki biyosensör sisteminin immobilizasyon basamakları için elde edilen optimum değerler Tablo 4.18a'da ve Tablo 4.18b.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.18a. COX-II biyosensörü için elde edilen optimum değerler

İmmobilizasyon Adımları	Optimum Değer
12-MDDA konsantrasyonu	7,5 mM
EDC/NHS konsantrasyonu	0,1 M-0,05 M
PAMAM konsantrasyonu	% 2,0
Anti-COX-II konsantrasyonu	0,1 µg/mL
Anti-COX-II inkübasyon süresi	60 dk.

Tablo 4.18b. CAL biyosensörü için elde edilen optimum değerler

İmmobilizasyon Adımları	Optimum Değer
6-MHL konsantrasyonu	5,0 mM
EPI konsantrasyonu	% 10
EPI inkübasyon süresi	60 dk.
Etanolamin konsantrasyonu	1,0 M
Etanolamin inkübasyon süresi	60 dk
Glutaraldehit konsantrasyonu	% 1,25
Anti-COX-II konsantrasyonu	10 µg/mL
Anti-COX-II inkübasyon süresi	60 dk.

Tayin aralıkları ise geliştirilen CAL biyosensörü için 1,0-5,0 ng/mL; COX-II biyosensörü için 50-250 pg/mL olarak bulunmuştur. Bu tayin aralıkları, geliştirilen biyosensörün literatürlerde yer alan diğer biyosensörlere kıyasla daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

COX-II tayinine yönelik biyosensörde, önceden literatürde yer alan immobilizasyon stratejilerinden yola çıkılarak Anti-COX-II immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fakat CAL tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde uyguladığımız epiklorohidrin-etanolamin adımı, elektrot yüzeyinde oluşturulan kovalent immobilizasyona yeni bir yaklaşım getirmiş olup ilk kez bu çalışmada yapılmıştır.

Burada epiklorohidrinin hidroksil gruplarını çapraz bağlama özelliğini kullanarak 6-merkaptohexanol ile etanolamin molekülü çapraz bağlanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada CAL ve COX-II biyomarkerlarının tayinine yönelik hızlı, ucuz kimyasallarla yapılan, kolay uygulanabilen, duyarlı ve tutarlı biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör sistemleri, literatürlerde yer alan geleneksel yöntemlere ve diğer biyosensörlere kıyasla daha duyarlı, ucuz kimyasal ve cihazlarla gerçekleştirilmelerinin yanı sıra daha kısa bir tayin süresine sahiptir. Bununla birlikte her iki biyosensör sistemi de hasta bireylerin serum biyomarker düzeylerini kapsayan bir tayin aralığına sahiptir.

BÖLÜM 5

KAYNAKLAR

1. E. Dinçkaya, A. Telefoncu, *Biyosensörler*, (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 1999).
2. I. von Lucadou, G. Luft, W. Preidel, G. J. Richter, *The electrocatalytic glucose sensor*, Horm. Metab. Res. Suppl. 20, 41-43, (1988).
3. P. N. Bartlett, A.E.G Cass, *Biosensors*, (Oxford University Press, Oxford, 1990).
4. J. D. Newman, L. J. Tigwell, P. J. Warner, A. P. F. Turner, *Biosensors: boldly going into the new millennium*, Sensor Review 21, 268 – 271, (2001).
5. R. Comeaux, P. Novotny, *Biosensors: Properties, Materials and Applications*, (Nova Science Publishers Inc., A.B.D 2009).
6. Raj Mohan Joshi, *Biosensors*, (Isha Books, Hindistan, 2006).
7. J. W. Daniel, J. C. Gage, *The determination of epichlorohydrin in air*, Analyst, 81, 594-598, (1956).
8. A. Güner, Ö. Akman, Z. M. O. Rzaevi, *Crosslinking of dextran with some selective Cl-, P- and N-containing functional substances in aqueous solutions*, Reactive & Functional Polymers 47, 55–65, (2001).
9. H. K. Can, B. Kırıcı Denizli, A. Güner, Z. M. O. Rzaevi, *Effect of functional crosslinking agents on preparation and swelling properties of dextran hydrogels*, Carbohydrate Polymers 59, 51–56, (2005).
10. S. Zalipsky, *Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules*, Advanced Drug Delivery Reviews, 16,157-162, (1995).
11. E. Baldrich, O. Laczka, F.J. Del Campo, F. X. Muñoz, *Gold immunofunctionalisation via self-assembled monolayers: Study of critical parameters and comparative performance for protein and bacteria detection*, J. of Immunological Methods 336, 203–212, (2008).

12. 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, 790-802, (2004).
13. A. Ulman, *An Introduction to Ultra thin Organic Films: From Langmuir-Blogett to Self-Assembly*, (Academic Press Inc, New York, 1991).
14. 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*, J. Am. Chem. Soc. 111, 7155 – 7164, (1989).
15. T. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult, W. P. van Bennekom, *Self-assembled Monolayers for Biosensors*, Analyst, 122, 43–50, (1997).
16. N.K. Chaki, K. Vijayamohanan, *Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications*, Biosens. & Bioelec. 17, 1–12, (2002).
17. D. Chen, L. Jinghong, *Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers*, Surface Science Reports 61, 445–46, (2006).
18. M. Mrksich, M.G. Whitesides, *Using self-assembled monolayers to understand the made surfaces with proteins and cells interactions of man-made surfaces with proteins and cells*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 24, 2555-2578, (1996)
19. M. E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, (John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA, 2008).
20. 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, 25-50, (1987).
21. I. Rubinstein, *Physical electrochemistry Principles, Methods and Applications*, (CRC Press, New York., 1995).
22. E. Barsoukov and J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
23. W. Moritz, J. Szeponik, F. Lisdat, A. Friebe, S. Krause, R. Hintsche, F. Scheller, *Diversiform applications of LaF3 for chemical semiconductor sensors*, Sens Actuators B 7, 497-500, (2001).

24. A. Friebe, F. Lisdat, W. Moritz, *Polymer Membranes on Chemical Semiconductor Devices-Their Electrical Influence on Sensor Characterization*, Sens Mater, 5, 65-82, (1993)
25. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, (Brooks/Cole, A.B.D, 1997)
26. E. Katz, I. Willner, *Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications*” Electroanalysis, 15, 913-947, (2003).
27. J.G. Guan, Y.Q. Miao, Q.J. Zhang, *Impedimetric biosensors*, Bioscience and Bioengineering, 97, 219-225, (2004).
28. J.S., D. Pourmand, *Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges*, Electroanalysis, 19, 1239- 1257, (2007).
29. C. Berggren, G. Johansson, *Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system*, Analytical Chemistry, 69, 3651-3657 (1997).
30. Ç. Sayıklı Şimşek, M. K. Sezgintürk (Danışman) *Meme Kanseri Biyomarkerleri İçin Elektrokimyasal Biyosensör Sistemleri*, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, (2013).
31. R.K. Shervedani, A.H. Mehrjardi, N. Zamiri, **A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor**, Bioelectrochemistry, 69, 201-208, (2006).
32. C.J. Mc Neil, D. Athey, M. Ball, H. Wo, S. Krause, R.D. Armstrong, J.D. Wright, K. Rawson, *Electrochemical sensor for measurement of urea and creatinine in serum based on AC impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer transformation*, Analytical Chemistry, 67, 3928-3935, (1995).
33. M. Cortina, M.J. Esplandiu, S. Alegret, M. Valle, *Urea impedimetric biosensor based on polymer degradation onto interdigitated electrodes*, Sensors and Actuators B: Chemicals, 118, 84-89, (2006).
34. J.J. Gooding, E.A. Hall, *Practical and theoretical evaluation of an alternative geometry enzyme electrode*, Biosensors and Bioelectronics, 11, 1031-1040, (1996).

35. C. Sumner, S. Krause, A. Sabot, K. Turner, C.J. McNeil, *Biosensor based on enzyme-catalysed degradation of thin polymer films*, Biosensors and Bioelectronics, 16, 709-714, (2001).
36. A.G.E Saum., R.H. Cumming, F.J. Rowell, *Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity*, Biosensors and Bioelectronics, 13: 511–518, (1998).
37. A. Mulchandani, K. R. Rogers, *Affinity Biosensors: Techniques and Protocols*, (Humana Press, London, 1998).
38. D.G. Buerk, *Biosensors: Theory and Applications*, (Taylor & Francis, ABD, 1995).
39. S. Hleli, C. Martelet, A. Abdelghani, N. Burais, N. Jaffrezic-Renault, *Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer*, Sensors and Actuators B: Chemicals, 113:711-717, (2006).
40. M. Jie, C.Y. Ming, D. Jing, L.S. Cheng, L.H. Na, F. Jun, C.Y. Xiang, *An electrochemical impedance immunoanalytical method for detecting immunological interaction of human mammary tumor associated glycoprotein and its monoclonal antibody*, Electrochemistry Communications, 1 (9): 425-429, (1999)
41. S.C Pak, W. Penrose, P.J Hesketh, *An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding*, Biosensors and Bioelectronics, 16: 371–379, (2001).
42. Y.X Hou, N Jaffrezic-Renault, C. Martelet, A.D. Zhang, J. Minic-Vidic, T. Gorojankina, M.A. Persuy, E. Pajot-Augy, R. Salesse, V. Akimov, L. Reggiani, C. Penetta, E. Alfinito, O. Ruiz, G. Gomilla, J. Samitier, A. Errachid, *Gold surface functionalization and patterning for specific immobilization of olfactory receptors carried by nanosomes*, Biosensors and Bioelectronics, 22:1550-1555, (2007).
43. A. Sargent, O. A. Sadik, *The electrochemistry of antibody-modified conducting polymer electrodes*, Electrochimica Acta, 44: 4667–4675, (1999).
44. A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, *Application of polypyrrole for the creation of immunosensors*, Critical Rev Anal Chem 32, 245-252, (2002)

45. O. Ouerghi, A. Touhami, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, H. Ben Ouada, S. Cosnier, *Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization*, *Bioelectrochemistry*, 56: 131–133, (2002).
46. L. Geoffrey, P. Peter, P. Vadgama, *Electrochemical impedance spectroscopy as a platform for reagentless bioaffinity sensing*, *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 78:249–256, (2001).
47. 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*, 706:343-349, (2011).
48. A.B. Kharitonov, J. Wasserman, E. Katz, I. Willner, *The use of impedance spectroscopy for the characterization of protein-modified ISFET devices: application of the method for the analysis of biorecognition processes*, *The Journal of Physical Chemistry B*, 105:4205–4213, (2001).
49. P van Gerwen, W. Laureyn, W. Laureys, *Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors*, *Sensors and Actuators B, Chemicals*, 49:73–80, (1998).
50. M.Ç. Canbaz, M. K. Sezgintürk, *Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection*, *Analytical Biochemistry* 446 9–18, (2014).
51. L. I. Andersson, *Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field*, *Journal of Chromatography B*, 745:3–13, (2000).
52. T. Panasyuk-Delaney, V.M. Mirsky, M. Ulbricht, O.S. Wolfbeis, *Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers*, *Analytical Chimica Acta*, 435:157–162, (2001).
53. J. Kafka, O. Panke, B. Abendroth, F. Lisdat, *A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy*, *Electrochimica Acta* 53 7467–7474, (2008)
54. J. Deng ve C.S. Toh, *Impedimetric DNA Biosensor Based on a Nanoporous Alumina Membrane for the Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus*, *Sensors*, 13, 7774-7785, (2013).
55. Li A.X, F. Yang, Y. Ma, X.R. Yang, *Electrochemical impedance detection of DNA hybridization based on dendrimer modified electrode*, *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1716-1720, (2007).

56. Y. Xu, L. Yang, X.Y. Ye, P.G. He, Y.Z. Fang, ***Impedance DNA biosensor using electropolymerized polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes modified electrode***, *Electroanalysis*, 18:873-881, (2006).
57. F. Davis, M.A. Hughes, A.R. Cossins, S.P.J. Higson ***Single gene differentiation by DNA-modified carbon electrodes using an AC impedimetric approach***” *Analytical Chemistry*, 79:1153-1157, (2007).
58. T.S Hug, ***Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery***, *Assay and Drug Development Technologies*, 1:479-488, (2003).
59. R.A. Yotter, D.M. Wilson “***A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems***” *IEEE Sensors Journal*, 4:412-429, (2004).
60. H.Y. Yin, F.L. Wang, A.L. Wang, J. Cheng, Y.X. Zhou, ***High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections***, *Analytical Letters*, 40:85-94, (1996).
61. M. Jonsson, K. Welch, S. Hamp, M. Stromme, ***Bacteria counting with impedance spectroscopy in a micro probe station***, *The Journal of Physical Chemistry*, 110: 1165-1169, (2006).
62. L.J. Yang, Y.B. Li, ***Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury***, *Journal of Microbiological Methods*, 64:9-16, (2006).
63. R. Maalouf, C. Fournier-Wirth, J. Coste, H. Chebib, Y. Saikali, O. Vittori, A. Errachid, J.P. Cloarec, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault ***Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance***, *Analytical Chemistry*, 79:4879-4886, (2007).
64. P. Boyle, B. Levin, ***Dünya Sağlık Örgütü Uluslar arası Kanser Araştırma Kurumu Dünya Kanser Raporu***, 11-494, Lyon, (2008).
65. A.Mishra ve M. Verma, ***Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time?***, *Cancers*, 2, 190-208, (2010).
66. M. Ç. Canbaz, M. K. Sezgintürk (Danışman), ***Bir Meme Kanseri Biyomarkeri Olan HER3 Analizi İçin Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi***, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, (2013).
67. B.Vogelstein, K.W. Kinzler, ***The Genetic Basis of Human Cancer***, McGraw Hill Professional, USA, (2002).

68. A. N. Bhatt, R. Mathur, A. Farooque, A. Verma & B.S. Dwarakanath, *Cancer biomarkers - Current perspectives*, Indian J Med Res 132, pp 129-149, (2010).
69. 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. Zanollo, F. M. Marincola, E. Wang, *Common Cancer Biomarkers*, Cancer Res 66: (6), 2953 – 2961, (2006).
70. G. L. Perkins, E.D. Slater, G.K. Sanders, J. G. Prichard, *Serum Tumor Markers*, American Family Physician, 68, (6): 1075 – 1082, (2003).
71. S.A. Soper, K. Brown, A. Ellington, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gauf, S. I. Gutman, D. F. Hayes, B. Korte, J. L. Landers, D. Larson, F. Ligler, A. Majumdar, M. Mascini, D. Nolte, Z. Rosenzweig, J. Wang, D. Wilson, *Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics*, Biosens. Bioelectr., 21: 1932–1942, (2006).
72. P. Pinsky, G. Andriole, E. Graha, *Prostate-specific antigen velocity and prostate cancer gleason grade and stage*, Cancer, 109: 1689–95, (2007).
73. I. E. Tothill, *Biosensors for cancer markers diagnosis*, Seminars in Cell & Developmental Biology 20 55–62, (2009).
74. M. Mascini & S. Tombelli, *Biosensors for biomarkers in medical diagnostics*, Biomarkers 13:(78): 637-657, (2008).
75. M. A. Omole, N. Noah, L. Zhou, A. Almaletti, O. A. Sadik, H. N. Asemota, E. S. William, J. Gilchrist, *Spectroelectrochemical characterization of pain biomarkers*, Analytical Biochemistry 395 54–60, (2009).
76. W.L. Xie, J.G. Chipman, D.L. Robertson, R.L. Erikson, and D.L. Simmons, *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88(7): 2692–2696, (1991).
77. C. A. Rouzer & L. J. Marnett, *Cyclooxygenases: structural and functional insights*, The Journal of Lipid Research, 50, 29-34, (2009).
78. M.T. Rizzo, *Cyclooxygenase-2 in oncogenesis*, Clinica Chimica Acta 412 671–687, (2011).
79. S.M. Prescott, F.A. Fitzpatrick, *Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis*, Biochimica et Biophysica Acta 1470 M69-M78, (2000).

80. N.M. Noah, S.K. Mwilu, O.A. Sadik, A. A. Fatah, R. D. Arcilesi, *Immunosensors for quantifying cyclooxygenase 2 pain biomarkers*, Clinica Chimica Acta 412: 1391–1398, (2011).
81. J.H. Rogers, *Calretinin: A Gene for a Novel Calcium-binding Protein Expressed Principally in Neurons*, The Journal of Cell Biology 105, 1343-1353, (1987).
82. A.J. Camp, R. Wijesinghe, *Calretinin: Modulator of neuronal excitability*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41, 2118–2124, (2009).
83. N. Inase, S. Miyake, Y. Yoshizawa, *Calretinin promoter for suicide gene expression in malignant mesothelioma*, Anticancer Res. 21, 1111–1114, (2001).
84. F. Barinka, R. Druga, *Calretinin Expression in the Mammalian Neocortex: A Review*, Physiol. Res. 59: 665-677, (2010).
85. M. Alaeddini, S Etemad-Moghadam & F Baghahi, *Comparative expression of calretinin in selected odontogenic tumours: a possible relationship to histogenesis*, Histopathology 52, 299–304, (2008).
86. V. Guinard-Samuel, A. Bonnard, P.De Lagausie, P. Philippe-Chomette, C. Alberti, A. El Ghoneimi, M. Peuchmaur and D. Berrebi-Binczak, *Calretinin immunohisto-chemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease*, Nature Modern Pathology 22, 1379–1384, (2009).
87. <http://en.wikipedia.org/wiki/Calretinin>
88. I. Raiko, I. Sander, D. G. Weber, M. Raulf-Heimsoth, A. Gillissen, J. Kollmeier, A.Scherpereel, T. Brüning and G. Johnen, *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients*, BMC Cancer, 10:242-246, (2010).
89. <http://www.uscnk.com/uscn/ELISA-Kit-for-Human-Calretinin-CR-1068.htm>
90. M.N. Sonuç, M. K. Sezgintürk, “*Itra sensitive electrochemical detection of cancer associated biomarker HER3 based on anti-HER3 biosensor*”, Talanta, 120: 355–361 (2014).
91. M. Ç. Canbaz, Ç. Sayıklı Şimşek, M. K. Sezgintürk, *Electrochemical biosensor based on self-assembled monolayersmodified with gold nanoparticles for detection of HER-3*, Analytica Chimica Acta, Article in Press.

ÖZGEÇMİŞ

19 Ocak 1984 tarihinde Turhal'da doğdum. İlköğrenimimi Hacı Mehmet Şalgamcıoğlu İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Sakıp Sabancı Anadolu Lisesinde tamamladım. Lisans eğitimimi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünde 2006 yılında tamamladıktan sonra aynı sene İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimime başladım. Fakat özel sebeplerimden dolayı buradan ayrıldım ve müteakip bahar yarıyılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalı'nda yüksek lisansa başladım. Lisans döneminde bitirme ödevimi Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU danışmanlığında "Tripsin Pegilasyonu" konulu deneysel çalışma ile hazırladım. Yüksek lisans tezimi de Prof. Dr. Erol AKYILMAZ danışmanlığında "Altın Elektrot Yüzeyinde Tek Tabaka Oluşumuna Dayalı Çift Enzimli Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi" başlıklı çalışma ile tamamladım.

2009 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladıktan hemen sonra Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalında Doktora eğitimime başladım.

2011 Yılında Kırklareli Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Beslenme ve Diyetetik Bölümünde öğretim görevlisi kadrosuna atandıktan sonra yatay geçişle Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilim Dalı'na yatay geçiş yaptım.

Bu tezin bir kısmı "An Impedimetric Biosensor Based on PAMAM/ 12-Mercaptododecanoic Acid Modified Gold Electrode for Determination of Cyclooxygenase-II" başlığı ile 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology" konferansında poster olarak sunulmuştur.