

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT KANSERİ TANISINA YÖNELİK PROSTAT SPESİFİK MEMBRAN
ANTİJENİ (PSMA) TABANLI İMMÜNOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gözde KABAY

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

EKİM 2019

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL

Müdür

Bu tezin Doktora derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL

Anabilim Dalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151717002 numaralı Doktora Öğrencisi **Gözde KABAY'** ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“PROSTAT KANSERİ TANISINA YÖNELİK PROSTAT SPESİFİK MEMBRAN ANTİJENİ (PSMA) TABANLI İMMÜNOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI”** başlıklı tezi **02/10/2019** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Osman EROĞUL (Başkan)**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Prof. Dr. A. Kevser ÖZDEN PİŞKİN
Hacettepe Üniversitesi
Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Batur ERCAN
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.



Gözde KABAY

ÖZET

Doktora Tezi

PROSTAT KANSERİNİN ERKEN TANISINA YÖNELİK PROSTAT SPESİFİK
MEMBRAN ANTİJENİ (PSMA) TABANLI İMMÜNOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Gözde Kabay

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen

Tarih: Ekim 2019

Prostat Kanseri (PK), erkeklerde genellikle periferal bazal hücrelerde gelişen bir kanser tipidir. Hastalığın klinikteki tanısında, serum Prostat Spesifik Antijeni (PSA) testi, parmakla rektal muayene (PRM) ve Trans-rektal Ultrasonografi (TRUS) gibi testler kullanılmakta, normal dışı PRM/TRUS ve/veya PSA değerinin 4 ng/mL' nin üzerinde olması gibi anomalilerden herhangi ikisi birlikte olduğunda iğne biyopsisi yapılmaktadır. Hastalığın aşamasının belirlenmesinde, yukarıda bahsi geçen test sonuçları baz alınarak Gleason Skorlaması kullanılmaktadır. Erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada kansere bağlı mortaliteye ve morbiditeye sebep olan bu hastalığın erken dönemde ve doğru tanısının yapılması oldukça önemlidir. Ancak serum biyobelirteci PSA'nın prostat kanserine özgü değil sadece prostata spesifik bir biyobelirteç olması hastalığın doğru tanısını engellemektedir. Bu nedenle prostat kanserinin doğru ve erken tanısında kullanılacak, prostat kanserine özgü biyobelirteçlere dayalı, yüksek performanslı tanı yöntemleri/testlerinin geliştirilerek klinik uygulamalara kazandırılması önem teşkil etmektedir. Bu doğrultuda, doktora tez çalışması kapsamında, prostat kanserine spesifik bir biyobelirteç olduğu literatürdeki çalışmalarda sıklıkla ifade edilen Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA) ölçümünü hedef alan, kuvars ayar çatalı (QTF) tabanlı kütle hassas ve ekran

baskılı elektrot (SPE) tabanlı elektrokimyasal PSMA immünosensörlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk basamağında, QTF dönüştürücü yüzeyleri sırasıyla amino gruplarınca zengin amiloid benzeri protein nanofiberler ve plazma polimerize ince filmler ile modifiye edilmiştir. Yüzey aktivasyonundan sonra, PSMA antijene özgü antikorun (a-PSMA) QTF yüzeylerine immobilizasyonu yapılmış ve geliştirilen immünosensörün hedef analiti PSMA ile etkileşimi rezonans frekansındaki değişimler ölçülerek takip edilmiştir.

İkinci aşamada, elektrokimyasal tabanlı immünosensörün geliştirilmesi hedeflenmiş ve bu hedef doğrultusunda altın çalışma elektrotlu SPE'lerin yüzeyleri sisteamin fonksiyonelleştirilen altın nanoparçacıklar (Cys-AuNp) ile modifiye edilmiştir. Yüzey fonksiyonelleştirilmesi sonrasında, N,N-karbonildiimidazol (CDI) aracılığı ile antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve geliştirilen immünosensörün hedef analiti - PSMA- ile etkileşimi sırasıyla voltametrik analiz ve empedans spektroskopisi ile test edilmiştir. Cys-AuNp modifikasyonu, elektrokimyasal immünosensörlerin analitik ölçüm performansını arttırarak pikogram seviyesindeki analitin dahi fizyolojik tampon çözeltisi (pH:7,4) ve serum ortamlarında tayin edilmesine olanak sağlamıştır.

Özetle, bu doktora tez çalışması kapsamında, prostat kanserine spesifik PSMA antijeninin ve PSMA ekspresyonu gösteren hücrelerin ölçümünü temel alan, prostat kanserinin teşhisinde doğrudan/destekleyici olarak kullanılacak, QTF-tabanlı kütle hassas ve SPE-tabanlı elektrokimyasal immünosensörlerin tasarımları gerçekleştirilmiş ve geliştirilen immünosensörlerin performansları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, bu doktora tezinde sunulan elektrokimyasal tabanlı immünosensörün prostat kanseri veya diğer kanser tiplerinde geliştirilmesi planlanan gelecekteki tanı sistemleri için bir altyapı sunacağına inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, İmmünosensör, Prostat spesifik membran antijeni, Kuvars ayar çatalı, Ekran-baskılı elektrot, Altın nanoparçacık

ABSTRACT

Doctor of Philosophy

DEVELOPMENT OF PROSTATE SPECIFIC MEMBRAN ANTIGEN BASED
IMMUNOSENSOR FOR EARLY DETECTION OF THE PROSTATE CANCER

Gözde Kabay

TOBB University of Economics and Technology

Institute of Natural and Applied Sciences

Biomedical Engineering Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Birsen Can Demirdöğen

Date: October 2019

Prostate Cancer (PK) is a type of cancer that usually develops in peripheral basal cells in men. In clinical diagnosis, serum Prostate Specific Antigen (PSA) test, digital rectal examination (DRE), and Trans-rectal Ultrasonography (TRUS) are commonly used. Needle biopsy is performed when either PRM, TRUS or PSA is over the limit of 4 ng /mL. As a result, Gleason Score is given to determine the stage of the disease based on the test results mentioned above. It is very important to make an early and accurate diagnosis of the disease, which causes high cancer mortality and morbidity in the second place after lung cancer in men. However, the fact that serum biomarker PSA being only a prostate specific biomarker not a prostate cancer specific one, that prevents accurate diagnosis of the disease. Therefore, it is important to develop high performance diagnostic methods/tools based on prostate cancer specific biomarkers that can be used in the accurate and early diagnosis of prostate cancer. Accordingly, the scope of this thesis is to develop mass sensitive quartz tuning fork (QTF) and screen-printed electrode (SPE) based electrochemical PSMA immunosensors targeting measurement of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA), which has been mentioned prostate cancer specific biomarker in the literature.

In the first stage of the study, the QTF transducer surfaces have been modified with amino-rich amyloid-like protein nanofibers and plasma polymerized thin films, in turn. After surface activation, immobilization of PSMA antigen-specific antibody (a-PSMA) onto QTF surfaces was performed and the interaction of the developed immunosensor with the target analyte PSMA was monitored by measuring changes in resonance frequency.

In the second step, the production of electrochemical immunosensor was aimed and to achieve this goal, SPE having gold working electrode was modified by cysteamine (Cys) functionalized gold nanoparticles (Cys-AuNp). After surface functionalization, 1'-Carbonyldiimidazole (CDI) was used for binding amino groups in Cys-AuNPs to carboxyl groups in a-PSMA that resulted in antibody immobilization and the interaction of the developed immunosensor with the target analyte -PSMA- was tested by voltammetric analysis and impedance spectroscopy, respectively. Cys-AuNp modification has improved the analytical signal performance of the immunosensor, allowing even picogram-level analyte detection both in physiological buffer solution (PBS, pH:7.4) also in serum.

In summary, within the scope of the PhD thesis, the design of PSMA immunosensors, which may be used as supportive tool in prostate cancer diagnosis was achieved. The eligibility of produced biosensors for biodetection was investigated via measuring prostate cancer specific biomarker, PSMA, expressing protein/cells and the performance parameters of the developed immunosensors were evaluated. In conclusion, it is believed that, the presented electrochemical-based immunosensor in this PhD thesis will present an infrastructure for future diagnostic tools that are planned to be developed either for prostate cancer or other type of cancers.

Keywords: Prostate cancer, Immunosensor, Prostate specific membrane antigen, Quartz tuning fork, Screen-printed electrode, Gold nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla desteğini esirgemeyen ve bana akademik vizyon kazandıran gerek insanlığı gerekse akademik nitelikleri açısından çok değerli olan sevgili hocam Prof. Dr. Mehmet MUTLU' ya,

Çok kısıtlı zamanda kıymetli zamanını ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana destek olan çok saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN' e, her daim çözüm odaklı olarak, kapılarını en ufak ayırım gözetmeden herbirimize sonuna kadar açan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Osman EROĞUL' a, sorularıma bıkmadan usanmadan cevap veren, bilgi birikimine çok saygı duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN' e, her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan, tezimin değerli kurtarıcısı, canım hocam Prof. Dr. A. Kevser ÖZDEN PİŞKİN' e, uzak ve yakında desteğini benden esirgemeyen değerli Dr. Öğretim Üyesi Batur ERCAN'a, acısıyla tatlısıyla 6 yılı devirdiğimiz canım dostum Gizem'e, Ferda ve Ersin'e, TOBB ETÜ' yü yuva yapan, dostluk kavramına inanmama sebep olan Gizem, Buşra, İlyas, Burak, Tacettin, Enes, Nihal, Merve, Selahattin ve Yusuf'a, uzun soluklu yüksek öğrenim sürecimde bana her zaman destek olan ve inanan canım annem Sabahat ÖZTÖMEK, sevgili kardeşlerim Mert KABAY ve Neslihan Şahin KABAY, hayat enerjisi veren yeğenim Emir Ali KABAY ve canım halam Prof. Dr. Nalan KABAY başta olmak üzere canım aileme yürekten teşekkür ederim.

2014 yılından bu yana, yüksek lisans ve doktora tez çalışmalarım süresince beni maddi olarak destekleyen ve asistanlık yapma imkânı sağlayan TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi ailesine, 2214-A programı (1059B141800294) kapsamında tez çalışmalarımın 9 aylık kısmını Amerika Birleşik Devletleri' nde gerçekleştirmeme destek ve olanak sağlayan TÜBİTAK'a, tez çalışmalarımı tamamlamak için beni Wisconsin-Madison Üniversitesi Biyolojik Sistem Mühendisliği Bölümü'ndeki araştırma grubuna kabul eden sayın Prof. Dr. Sundaram GUNASEKARAN' a ve her daim laboratuvar desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Nihal AHMAD' e, Madison' da hayatımı güzelleştiren dostlarım Adam, Hilary, Batul' e ve araştırmacısı olduğum Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) (THD-2018-16793) kapsamında çalışmalarına maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne yürekten teşekkür ederim.

Bu doktora tezi, her daim özlediğim, akademisyen olmamda katkısı büyük olan babam Dr. Süha KABAY ve duaları ile her zaman yanımda olan canımdan öte sevdiğim anneannem Takdire ÖZTÖMEK' e ithaf edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR	xv
SEMBOL LİSTESİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Prostat Embriyolojisi ve Anatomisi	3
1.2 Prostatla İlişkili Hastalıkların Sınıflandırılması.....	4
1.2.1 Bening prostat hiperplazisi (BPH)	4
1.2.2 Prostatit	5
1.2.3 Prostat kanseri	6
1.2.3.1 Prostat kanseri risk faktörleri	7
1.2.3.2 Prostat ilişkili hastalıklarda biyobelirteçler	8
1.2.3.3 Prostat spesifik membran antijeni (PSMA)	13
1.3 Prostat Kanserinin Klinik Tanısı ve Hastalığın Evrelendirilmesi.....	15
1.4 Biyosensörler	16
1.4.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	17
1.4.1.1 Dönüştürücü türüne göre biyosensörler	18
1.4.2 Biyosensör karakteristik özellikleri ve performans parametreleri	29
1.4.3 Prostat kanseri teşhisinde PSMA tabanlı biyosensörler.....	31
1.5 Yüzey Analiz Teknikleri.....	43
1.5.1 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM).....	36
1.5.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	37
1.5.3 Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi	38
1.5.4 Ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) moleküler absorpsiyon spektroskopisi	39
1.5.5 Zeta potansiyeli analizi	40
2. PROSTAT KANSERİ TANISINA YÖNELİK ANTİ-PSMA TABANLI KÜTLE-HASSAS İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ	43
2.1 Materyal ve Metot.....	43

2.1.1 Materyal.....	43
2.1.2 Metot.....	43
2.1.2.1 Protein çözeltilisinin hazırlanması ve amiloid forma dönüşümünün gerçekleştirilmesi	43
2.1.2.2 Elektro-eğirme işlem parametrelerinin optimizasyonu.....	44
2.1.2.3 Kuvars ayar çatalının yüzey modifikasyon işlemine hazırlanması	45
2.1.2.4 Plazma aşındırma yöntemiyle QTF yüzey modifikasyonunun yapılması.....	45
2.1.2.5 Elektro-eğirme işlemiyle QTF yüzeylerinin modifikasyonu.....	48
2.1.2.6 Yüzey aktivasyonu ve antikor immobilizasyonu	48
2.1.2.7 Hedef analitin tayini	48
2.1.2.8 Seçicilik testi	49
2.2 Bulgular ve Tartışmalar.....	49
2.2.1 Elektro-eğirme işlem parametrelerinin optimizasyonuna ait sonuçlar	49
2.2.2 Plazma modifikasyonu ile QTF yüzeylerinin aşındırılmasına ait sonuçlar.....	52
2.2.3 Nanofiber modifiye QTF çeviricilerinin üretimi.....	52
2.2.4 Nanofiber modifiye QTF yüzeylerinin aktifleştirilmesi	53
2.2.5 Biyolojik tanıyıcı yüzeyin hazırlanması	54
2.2.6 Seçicilik testi	56
2.3 Sonuçlar ve Öneriler	59
3. PROSTAT KANSERİ TANISINA YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL TABANLI PSMA İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ	61
3.1 Materyal ve Metot	61
3.1.1 Materyal.....	61
3.1.2 Metot.....	61
3.1.2.1 Ekran-baskılı altın elektrotların (SPGE) modifikasyon işlemine hazırlanması.....	61
3.1.2.2 Sisteamin modifiye altın nanoparçacıkların (Cys-AuNp) üretimi	62
3.1.2.3 Ekran-baskılı altın elektrot yüzeylerinin altın nanoparçacık (Cys-AuNp) ile modifikasyonu.....	64
3.1.2.4 Sisteamin katkılı altın nanoparçacıklarla modifiye edilen ekran-baskılı elektrot (Cys-AuNp/SPGE) yüzeylerinin aktifleştirilmesi	65
3.1.2.5 Antikor immobilizasyonu	65
3.1.2.6 Hücre kültürü çalışmaları	66
3.1.2.7 Protein izolasyonu ve immüno blot analizi	66
3.1.2.8 Modifiye elektrot yüzeylerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları.....	66
3.1.2.9 Ekran-baskılı elektrotların fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları.....	67
3.2 Bulgular ve Tartışmalar	68
3.2.1 Altın nanoparçacıkların karakterizasyonuna ait sonuçlar	68

3.2.2 Ekran-baskılı elektrotların (SPGE) analizlerine ait sonuçlar	72
3.2.2.1 SPGE yüzey analiz sonuçları.....	72
3.2.2.2 PSMA immüno blot testi sonuçları.....	72
3.2.2.3 Elektrokimyasal analiz sonuçları	74
3.2.2.4 PSMA ve a-PSMA spesifik bağlanmasının test edilmesi	77
3.2.2.5 İnkübasyon süresinin etkisi	84
3.2.2.6 Seçicilik testi	84
3.3 Sonuç ve Öneriler	86
4. KAYNAKLAR	99
5. EKLER	101
ÖZGEÇMİŞ	111



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Prostat bezi ve prostat bezini çevreleyen organlar.....	3
Şekil 1.2 : Benign prostat büyümesi olan prostat dokusunun gösterimi	5
Şekil 1.3 : Prostat kanserinin hasta yaşına bağlı insidansi ve ülkelere göre dağılımı	9
Şekil 1.4 : Prostat bezine ait ilk çizim.....	10
Şekil 1.5 : Prostatik asit fosfataz (PAP) enziminin kristal yapısı	11
Şekil 1.6 : PSA kristal yapı gösterimi.	12
Şekil 1.7 : PSMA glikoproteininin membran yapısı.	14
Şekil 1.8 : Farklılaşan prostat doku motifleri ve Gleason skorlaması. 1- agresif olmayan, 5-en agresif olan motifi temsil etmektedir.....	16
Şekil 1.9 : Biyosensör temel çalışma mekanizması ve bileşenleri.....	17
Şekil 1.10 : pH metrenin bileşenleri (a) pH elektrodu ve (b) pH sensörü hücresi.....	20
Şekil 1.11 : 3-elektrotlu voltametri hücresi.....	21
Şekil 1.12 : (a) 2-elektrot ve (b) 3-elektrot baskılı SPE.....	21
Şekil 1.13 : Kretschmann konfigürasyonu ile tasarlanan SPR cihazının şematik gösterimi	24
Şekil 1.14 : Kuvars kristal mikroterazi (QCM) (a) üst yüzeyi (b) alt yüzeyi.....	26
Şekil 1.15 : Kuvars ayar çatalı	26
Şekil 1.16 : Kuvars ayar çatalı SEM görüntüsü	27
Şekil 1.17 : Min ve diğ. (2010) tarafından geliştirilen RNA/peptid aptamer modifiye altın elektrot	33
Şekil 1.18 : Akış sistemine bağlı Fe ₃ O ₄ -ERGO modifiye 8-hatlı SPE tabanlı mikroakışkan kanallı biyosensörün gösterimi.....	33
Şekil 1.19 : Chaloupková ve diğ. (2018) tarafından geliştirilen Fe ₃ O ₄ ve Ag modifiye biyosensörün üretim basamakları	34
Şekil 1.20 : Seenivasan ve diğ. (2017) tarafından geliştirilen mikro-akışkan tabanlı PSMA biyosensörünün (a) üretimi, (b), (c) ve (d) protein ve hücrelerin elektrokimyasal analizleri	35
Şekil 1.21 : SEM cihazını oluşturan bileşenler	38

Şekil 1.22 : (a) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresinin tipik kurulumu (b) Fourier dönüşümü (FFT) hesaplamasından sonra elde edilen spektrum.....	39
Şekil 1.23 : Plazma reaktörüne yerleştirilmiş QTF örnekler.....	47
Şekil 2.1 : Düşey konumlandırılmış elektro-eğirme düzeneği ve kolektör üzerinde konumlandırılmış kuvars ayar çatalı.	46
Şekil 2.2 : QTF'lerin vakumlu (solda) ve dekapüle (sağda) haldeki görüntüleri	47
Şekil 2.3 : Plazma reaktörüne yerleştirilmiş QTF örnekler.....	47
Şekil 2.4 : 5 s uygulama süresince nanofiber ile modifiye edilen kuvars ayar çatalına ait (a) 5X, (b) 50X büyütme optik mikroskop görüntüleri.	50
Şekil 2.5 : Düşük basınç plazma sistemi	51
Şekil 2.6 : Gluteraldehit ile aktivasyon işlemi öncesi ve sonrasında AL-SSA modifiye QTF yüzeylerine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri. Modifiye olmadan önceki AL-SSA nanofiber yapılı membran ait (A) X20.000 büyütme, (B) X1.000 büyütme SEM görüntüleri ve 2 saat GA modifiye örneğe ait (C) X20.000 büyütme, (D) X1.000 büyütme SEM görüntüleri.	55
Şekil 2.7 : FTIR-ATR spektrumu.....	57
Şekil 2.8 : a-PSMA tabanlı prostat kanseri immüno-sensörünün hedef analiti PSMA proteinini bağlaması sonucu oluşan frekans değişimleri ve kalibrasyon eğrisi (n=3). Frekans değerleri ortalama±standart sapma (±SD) olarak verilmiştir (n=3).	58
Şekil 2.9 : İmmüno-sensörün hedef olan PSMA ve hedef olmayan interlökin, PSA ve kaveolin antijenleriyle etkileşimleri sonucu ölçülen ortalama frekans değişimleri (n=10). Frekans değerleri ortalama±standart sapma (±SD) olarak verilmiştir. (n=3).	58

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

- Çizelge 2.1 : Saf su ortamla 1-24 saat aralıklarında etkileşen 30 s AL-SSA modifiye QTF'lerin ortalama frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 51
- Çizelge 2.2 : Sıvı ortama maruz bırakılan 30 s nanofiber modifiye QTF'lere ait frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 52
- Çizelge 2.3 : Nanofiber modifikasyon süresine bağlı frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). ... 53
- Çizelge 2.4 : 5 s birikim süresinde nanofiber modifiye edilen QTF örneklerinin glutraldehit yüzey aktivasyonu sonucu ölçülen frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 53
- Çizelge 3.1 : Geliştirilen PSMA immünosensörünün performans parametreleri. 87
- Çizelge E1 : PlzP(EDA) film kaplamaları yapılan QTF örneklerin kaplama sonrası ölçülen frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 103
- Çizelge E1 : PlzP(EDA) film kaplamaları yapılan QTF örneklerin kaplama sonrası ölçülen frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 103
- Çizelge E2 : PlzP(EDA) film kaplı QTF örneklerinin glutraldehit ile aktivasyon işlemi sonrasında ölçülen frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 105
- Çizelge E3 : PlzP(EDA) kaplamaları yapılan QTF örneklerinin PSMA protein immobilizasyonu sonrası ölçülen frekans değişimleri. Değerler ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 106
- Çizelge E4 : PlzP(AMY) film kaplaması yapılan QTF örneklerin kaplama sonrası ölçülen frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 107
- Çizelge E5 : PlzP(AMY) film kaplamaları yapılan QTF örneklerinin glutraldehit aktivasyonu sonrasında hesaplanan frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10). 108
- Çizelge E6: PlzP(AMY) kaplamaları yapılan QTF örneklerinin PSMA protein immobilizasyonu sonrası ölçülen frekans değerleri (n=10). Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir. 109

KISALTMALAR

ACS	: Amerikan Kanser Derneği
c-PSA	: kompleks-PSA
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
f-PSA	: serbest-PSA
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FH I	: Folathidrolaz I
GCPII	: Glutamat Karboksipeptidaz II
CDI	: 1,1-karbonildiimidazol
CIA	: Kemilüminesans İmmünolojik Testi
CNT	: Karbon Nanotüp
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDA	: Etilendiamin
BPH	: Bening Prostat Hipertrofisi
DTH	: Dihidrotesteron
FIA	: Floresans İmmünolojik Testi
FET	: Alan Etkili Transistör
IL-6	: İnterlökin-6
ITO	: İndiyum Bakir Oksit
ISFET	: İyon-seçici Alan Etkili Transistor
JFET	: Bağlantı Kapılı Alan Etkili Transistör
LOD	: Tespit Limiti
LQL	: Tayin Limiti
MOSFET	: Metal oksit Yarıiletken Alan Etkili Transistör
NAA	: N-asetilaspartat
NAAG	: N-asetilaspartil Glutamat
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü
NSAID	: Steroid Yapıda Olmayan İltihap Önleyici İlaçlar
PA	: Prostat Antijeni
PAP	: Prostatik Asit Fosfataz
PCa 3	: Prostat Kanser Geni 3
PET	: Pozitron Emisyon Tomografi
PF-4	: Platelet Faktör-4
PK	: Prostat Kanseri
PlzP	: Plazma Polimeri
PRM	: Parmakla Rektal Muayene
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PSA	: Prostat Spesifik Antijeni
PZT	: Piezoelektrik
RIPA	: Radyoimmüno-çökeltme tahlili tamponu
PSPD	: Pozisyon Hassas Fotodetektör
QCM	: Kuvars Kristal Mikroterazi

QTF	: Kuvars Ayar Çatalı
RF	: Radyo Frekans
RNA	: Ribonükleik asit
SAW	: Yüzey Akustik Dalga
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SPE	: Ekran-baskılı Elektrot
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
SSA	: Sığır Serum Albümin
TGF-α	: Dönüştürücü büyüme faktörü-alfa
TRUS	: Trans-rektal Ultrasonografi
UV-Vis	: Morötesi Görünür Bölge
IgG	: İmmünoglobulin G
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinüklotit
WCRF	: Dünya Kanser Araştırma Fonu
XPS	: X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi



SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
Re	Reynolds sayısı
t	Zaman
T	Sıcaklık
x	Yatay bileşen
v	Düşey bileşeni
λ	Dalgaboyu
f	Frekans
ϵ	Elektrotlar arasındaki ortamın dielektrik sabiti
ϵ_0	Serbest uzayın geçirgenlik katsayısı ($8,85 \times 10^{-12}$ F/m),
R	Direnç
Z	İmpedans
C	Kapasitans
X	Reaktans
X_C	Kapasitif reaktans
X_L	İndüktif reaktans
Δf	Frekans kayması (Hz)
f_0	Temel rezonans frekansı (Hz)
Δm	Kütle değişimi
A	Alan
μ	Kesme katsayısı ($2,95 \times 10^{11}$ g/cm.s ²)
ρ	Kuvars yoğunluğu ($2,65$ g/cm ³)

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PK) erkeklerde en sık görülen neoplazidir ve akciğer kanserinden sonra ikinci sıklıkta kansere bağlı morbidite ve mortalite sebebidir. Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) tarafından 2012 yılında yayınlanan raporda, prostat kanserinin yıllık frekansının her yıl düzenli olarak arttığı, dünya çapında yaklaşık 1,1 milyon erkeğe prostat kanseri teşhisi koyulduğu ve teşhis koyulan hastaların bir kısmının hastalığın ilk 5 yılında hayatını kaybettiği ifade edilmektedir [1]. Oldukça yavaş büyüyen ve geç bulgu veren bir tümör olan ve buna ek olarak heterojen bir yapıya sahip olduğu için seyri değişkenlik gösteren prostat kanseri tanısının erken dönemde yapılması oldukça önem taşımaktadır.

Kliniğe başvuran hastalarda prostat kanseri taraması yapılırken, FDA onaylı serum biyobelirteci olan Prostat Spesifik Antijeni (PSA) ölçülmekte ve hastalığın tanısında PSA testine ek olarak, Parmakla Rektal Muayene (PRM), Trans-rektal Ultrasonografi (TRUS) ve hasta yaşı bilgileri kullanılmaktadır. Normal olmayan PRM/TRUS sonuçları, PSA seviyesinin 4 ng/mL cut-off değerinden yüksek olması veya ileri yaş gibi durumlardan en az ikisi birlikte olduğunda hastaya iğne biyopsisi yapılması önerilmektedir [2].

Geçmiş çalışmalar, PSA'nın prostat dokusu ve diğer normal dokularda da (böbrek, karaciğer, özefagus, mide, ince barsak, kolon, beyin, akciğer) bulunduğunu bildirmiştir [3,4]. Ayrıca artan yaşla, prostat büyümesi ve/veya iltihaplanması sonucunda da serum PSA seviyesi yükselmekte ve PSA yükselmesi nedeniyle yapılan biyopsilerde, yüksek oranda yanlış negatif/yanlış pozitif biyopsi sonuçları elde edilmesi, hasta konforunun bozulmasına ayrıca sağlık sektörü açısından da yüksek zaman ve maliyet sorunlarına yol açmaktadır [5,6]. Sonuç olarak, PSA'nın prostat spesifik bir biyobelirteç olmasına rağmen prostat kanserine spesifik olmaması, PSA'nın prostat kanserinin doğru tanısında kullanılamayacağını göstermiştir [6,7]. Bu bağlamda, hedefe yönelik tedavi için prostat kanserine özgü belirteçlerin bulunması, bu spesifik biyobelirteçlere dayanan PSA taramasını destekleyici ya da PSA taramasına alternatif olabilecek yeni tani sistemlerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

Bu bağlamda prostat kanserinin doğru ve spesifik tanısında kullanılabilecek biyobelirteçler araştırılmakta ve bu kapsamda Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA), Prostat Kanseri Geni 3 (PCa3), kalikrein 2 (KLK 2), pro-PSA vb. biyobelirteçler ön plana çıkmaktadır [6,8,9]. Bahsi geçen biyobelirteçler arasında PSMA, prostat kanserini prostatla ilişkili diğer anomalilerden ayırt etmeye olanak tanınmasıyla oldukça dikkat çekmektedir. Xiao ve diğ. (2001) tarafından geliştirilen çalışmada, serum PSMA seviyelerinin, sağlıklı kontrol gruplarında ortalama 272,9 ng/mL (yaş<50) ve 359,4 ng/mL (yaş>50) olarak ölçüldüğü, PK durumunda ortalama 623,1 ng/mL değerine yükseldiği, BPH durumunda ortalama 117,1 ng/mL seviyesine düştüğü rapor edilmiştir [10]. Elde edilen bu verilere dayanarak, PSMA'nın prostat kanserinin ayırıcı tanısında kullanımına uygun bir biyobelirteç olduğuna ve doktora tezi kapsamında geliştirilecek prostat kanseri immünosensörlerinin PSMA antijeninin ölçümünü hedef alacak şekilde tasarlanmasına karar verilmiştir.

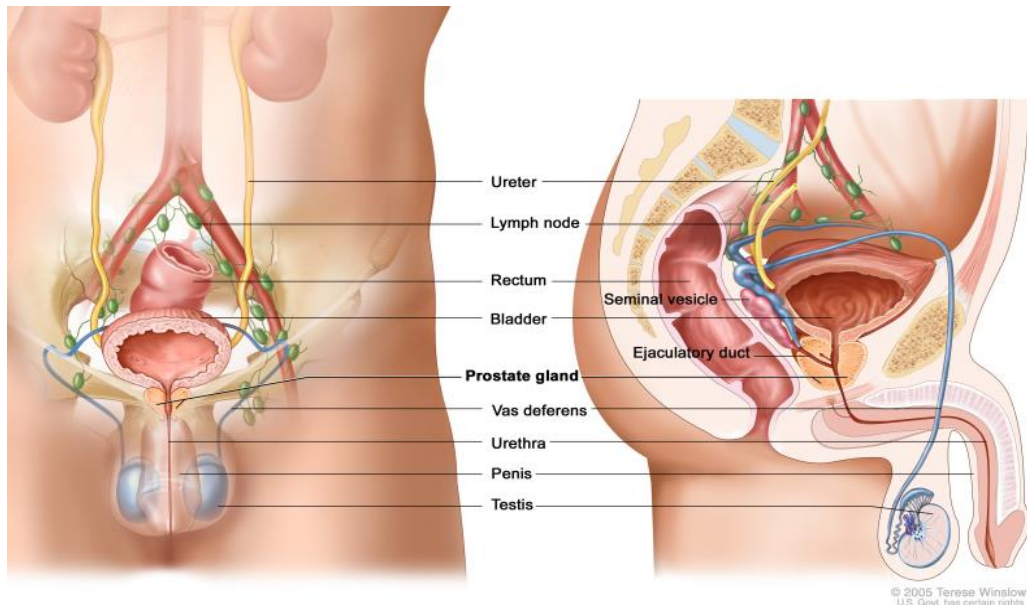
Biyosensörler, buldukları ortamda gerçekleşen biyolojik veya kimyasal bir reaksiyonu algılayarak reaksiyondaki analitin derişimiyle orantılı olacak şekilde sinyal üreten sistemlerdir. Biyosensörler, ilaç ve kirleticilerin, hastalığa neden olan biyobelirteçlerin ve bedensel sıvılarda (kan, idrar, tükürük, ter) bir hastalığın göstergesi olan mikroorganizmaların tespiti gibi uygulamalarda kullanılır. Çevirici türüne göre biyosensörler: elektrokimyasal, optik ve kütle hassas biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır [11]. Bu biyosensör çeşitleri arasından elektrokimyasal tabanlı biyosensörler, yüksek hassasiyetleri, seçicilikleri, hızlı cevap vermeleri, etiketsiz çalışabilmeleri ve düşük maliyetlerinden dolayı sensör uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar [12]. Ekran-baskılı elektrotlar (Screen Printed Electrode, SPE), düşük maliyetleri ve yüksek hassasiyetleri nedeniyle elektrokimyasal tabanlı biyosensörlerde en çok tercih edilen elektrot tipidir [13,14]. Kütle hassas tabanlı sensörlerde ise yüksek kalite faktörü, keskin frekans tepkisi ve hassasiyetiyle kuvars ayar çatalı (Quartz Tuning Fork, QTF) çeviriler kuvars kristal mikroteraziye (Quartz Crystal Microbalance, QCM) göre sahip oldukları üstünlükler nedeniyle dikkat çekmektedirler [15,16].

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda doktora tez çalışmasında, QTF yüzeyleri amino grup içeren amiloid protein nanofiber ve plazma polimerize filmler; SPE' ler ise sisteamin fonksiyonelleştirilmiş altın nanoparçacıklar (AuNp) kullanılarak modifiye edilmiştir. Amino gruplarınca zengin elektrot yüzeyleri aktifleştirilerek, antikor (a-PSMA) immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve PSMA ekspresyonu

gösteren/göstermeyen protein/hücre örnekleri geliştirilen immüno-sensörlerle tayin edilerek sensörlerin analitik ölçüm performansları test edilmiştir.

1.1 Prostat Embriyolojisi ve Anatomisi

Prostatın embriyolojik gelişimi, embriyonun 8-12. haftalarında koryonik gonadotropinin uyarımı sonucu salgılanan testosteron tarafından sağlanır. Prostat bezi, embriyonun 12. haftasından itibaren ise, endodermden köken alan ürogenital sinüsten gelişir. Verumontanumun her iki yanında, ürogenital sinüsün posteriorunda oluşan küçük epitelyal tomurcuklar mezenkime penetre olarak prostatı meydana getirir. Çevre mezenşim prostat stroma ve kas kısmını oluştururken, prostat epitelü üretral tomurcuğun endodermal epitelinden meydana gelir. Prostat gelişimi, fütal testislerden salgılanan androjen hormonlarının kontrolünde gerçekleşir. Prostatik epitel ve stroma endodermden gelişirken, sperm kanalının (vas deferens) intraprostatik kısmı ve ejakülatuar kanal Wolf kanalından gelişir. Prostat bezi doğum anında küçük olup puberteye kadar adeta bir dinlenme safhasındadır. Ergenlik döneminde, glandüler dokudaki testosteron etkisinde hiperplazi gerçekleşir ve gland boyutları 6 ayda başlangıç büyüklüğünün 2 katına çıkar. Bu şekilde zamanla büyüüp gelişen prostat 18-20 gram ağırlığa ve ortalama 4 x 3 x 3 cm³ (transvers x antero-posterior x sagittal) boyutlarına ulaşır [17,18]. Prostat ve prostatı çevreleyen organlara ait görüntü Şekil 1.1'de verilmektedir [17,19].



Şekil 1.1 : Prostat bezi ve prostat bezini çevreleyen organlar [20].

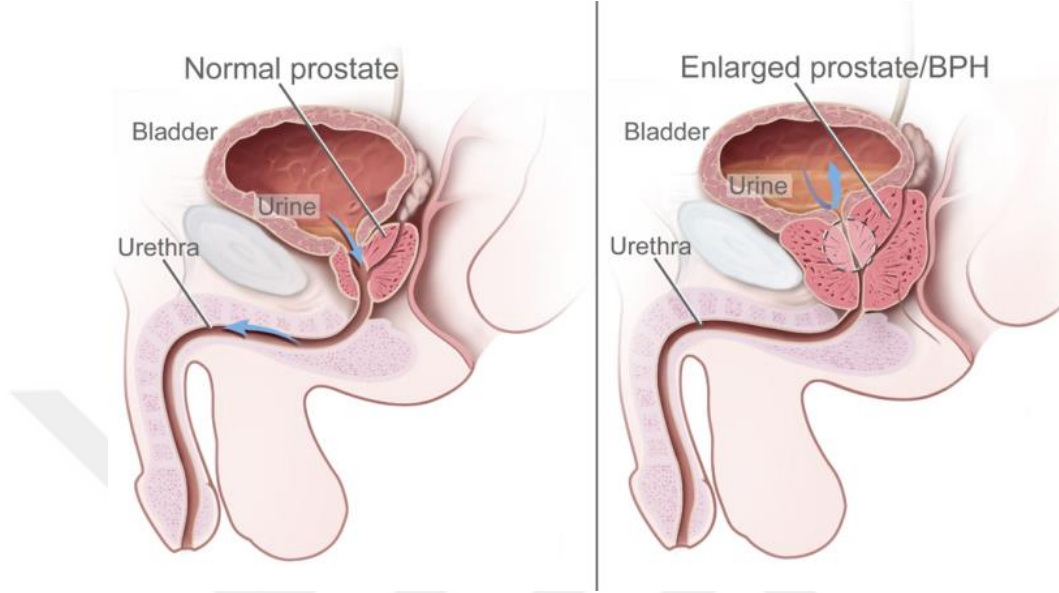
Prostat anatomik olarak, erkek üreme sistemindeki en büyük aksesuar ekzokrin bezi olma özelliğini taşıyan ve prostatik üretranın etrafını saran koni şeklinde bir organdır. Lowsley sınıflandırmasına göre prostat: anterior, posterior, median, sağ lateral ve sol lateral olmak üzere toplam 5 lob içermektedir. Prostat kanseri genellikle orta veya dış yan loplardaki periüretral bezlerden kaynaklanmaktadır [21]. Prostatik üretrayı çevreleyen prostat, fibromusküler kapsül ve tübüloalveolar özellik gösteren glandüler dokudan oluşmuştur. Üretra kanalının başlangıç kısmında, rektum ve idrar kesesinin arasında yer alan prostat bezi, 4 posterior üretrayı içermektedir. Temelde sperm hücrelerini barındıran ve taşınmasını sağlayan semen sıvısının %15-20'lik kısmının üretiminden sorumludur. Boyutu yaşla birlikte değişiklik göstermesinin yanı sıra büyümesi, androjen gibi erkeklik hormonları tarafından tetiklenmektedir. Prostat ve androjen ilişkisi prostat benign prostat hiperplazisi (BPH), prostat kanseri ve prostatit gibi önemli hastalıklara neden olmaktadır.

1.2 Prostatla İlişkili Hastalıkların Sınıflandırılması

1.2.1 Bening prostat hiperplazisi (BPH)

BPH, prostat bezinin yaşlanmaya bağlı olarak genişlemesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.2). İyi huylu olan bu hipertrofide, prostatın genişlemesiyle birlikte üretraya baskı artar. Mesane duvarı zamanla kalınlaşarak zayıflar ve esnekliğini yitirir. Sonuç olarak üretra daralır ve hasta idrar kesesini tam olarak boşaltamaz. Ek olarak, idrar akım gücünde azalma, sık sık idrara çıkma, zorlanma, sıkışma ve gece idrara kalkma gibi durumlarla karşılaşmaktadır. Normal bir yetişkinde prostat bezi ortalama 18-20 gramdır. Hipertrofi gösteren hastalarda ortalama prostat ağırlığı 33-gram iken prostata bağlı semptomlar nedeniyle müdehale edilen hastalarda bu ağırlık ortalama 52 grama yükselmektedir. 40 yaş civarındaki hastaların yaklaşık %8'inde teşhis edilen BPH'ye, 60 yaş civarında %50 ve 90 yaş civarında ise yaklaşık %90 oranında rastlanmaktadır. BPH'nin ilk dönemlerinde olan ve prostatizm şikâyeti olan 50-60 yaş grubundaki hastalarda ise, BPH frekansı %50'lere ulaşmaktadır [18,22]. BPH'nin yaşlanma sonucunda oluştuğu ve testislerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Çünkü, testisleri ergenlik dönemi öncesinde alınan erkeklerde BPH gelişiminin olmadığı yapılan araştırmalar sonucunda kaydedilmiştir. Erkekler yaşamları boyunca erkeklik hormonu olan testosteron ve az miktarda östrojen salgılamaktadır. Artan yaşla birlikte testosteron seviyesinin azalması, östrojenin artmasına neden olmakta ve bu hormonal

dengelesizlik durumunun da BPH ile neticelenebileceği ifade edilmektedir. Başka bir teoriye göre, prostat gelişim ve büyümesinde görev alan dihidrotestosteronun (DHT), testosteronun azalmasından etkilenmediği aksine DHT'nin prostattaki birikiminin BPH'ye sebep olabileceği ifade edilmektedir [23].



Şekil 1.2 : Benign prostat büyümesi olan prostat dokusunun gösterimi [20].

1.2.2 Prostatit

Kronik prostatit veya kronik pelvik ağrı sendromu olarak bilinen prostatit, genellikle kişilerin yaşam kalitesini ve sosyal yaşamlarını ciddi olarak etkileyen ve mekanizması tam olarak bilinmeyen bir klinik tabloyu ifade etmek için kullanılmaktadır [24]. Prostatitlerin genel patolojik tanımı prostat bezinin inflamasyonu olsa da en sık görülen formları akut ve kronik bakteriyel prostatit, bakteriyel olmayan prostatit ve prostatodinidir. Çoğunlukla *Pseudomonas* ve *Enterococcus faecalis* gibi koliform bakterilerden kaynaklı olan bakteriyel prostatitin tedavisi uygun bir antimikrobiyal ilaç ile uzun sürede (4-16 hafta) yapılmaktadır. Prostatitli erkeklerin yaklaşık %90'ında bakteriyel olmayan prostatit veya prostatodini vardır. Bakteriyel olmayan prostatit, bilinmeyen bir nedenle prostatın iltihabı sonucunda oluşmaktadır. Prostatodini durumunda ise hasta tipik olarak steril kültürlerle ve normal prostat salgılarına sahiptir fakat ejakülasyon fonksiyon bozukluğu göstermektedir. Bakteriyel olmayan prostatit tiplerinin bilinen mikrobik bir nedeni olmadığından antimikrobiyal ajanlar kullanılarak yapılan tedaviler etkisizdir [25–27].

Hastalığın gelişiminde özellikle genetik etmenler, bazı gram pozitif bakteriler, prostat taşları, otoimmün faktörler, vazektomi, intraprostatik reflü, kolonoskopi gibi

faktörlerin rol oynayabileceği belirtilmiştir [26]. Dünya'daki erkeklerin yaklaşık % 50'si, hayatlarının bir döneminde bu hastalıkla karşılaşabilmektedirler [28]. Semptomların 3 aydan uzun sürmesi, hastalığın kronik fazda olduğunu göstermektedir. Kronik prostatit çoğunlukla genç hastalığı olarak bilinse de Nickel ve diğ. (2001) tarafından 20-74 yaş arasındaki Kanadalı deney grubunun kapsayan bir çalışmada, prostatitin tüm yaş gruplarında %8,0-14,0 oranında görüldüğü, 50 yaş altındaki erkeklerde prevalansın %11,5; 50 yaş üzerindeki grupta ise % 8,5 olduğu rapor edilmiştir [29]. Vücutta meydana gelen inflamasyon sonucunda inflamasyonun olduğu dokuda histopatolojik değişikliklerin ortaya çıktığı bilinmektedir. Prostat kanseri nedeni ile ameliyat edilen hastaların patoloji örneklerinde de akut ve kronik inflamasyon alanları gözlenmekte ve bu nedenle inflamasyon kaynaklı prostat hastalıkları ile prostat kanseri ilişkisi araştırılmaktadır [30].

1.2.3 Prostat kanseri

ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) tanımına göre kanser; kontrolsüz olarak çoğalan malign hücrelerin organizmada normal işlev gören diğer hücrelerin yapısını ve işlevini tahribiyle oluşup çoğalması sonucunda yığın meydana getirmesidir [31]. Prostat, semenin yaklaşık %30 ila %35'ini oluşturan sıvıyı üreten glandüler dokudan oluşur. Prostat bezinin görevi, kalsiyum, sitrat, fosfor iyonları, pıhtılaşma enzimi ve fibrinolizin içeren akışkan, süt benzeri salgının yani semenin üretimidir. Ejakülasyon sırasında prostat bezinin kapsülü, sperm kanalıyla eş zamanlı olarak kasılır, bazik prostat sekresyonunu semen hacmine ekler ve fertilizasyon için gereken pH seviyesinin korunmasını sağlar [32]. Kanser oluşumu, sağlıklı prostat glandüler hücrelerinin, genellikle periferik bazal hücrelerde oluşan mutasyonu ile başlar [33]. Prostat kanser hücreleri büyüyüp çoğalarak çevre dokulara sızar ve bu bölgelerde tümör oluştururlar. Bu tarz bir tümör prostatın dışında gelişebileceği gibi, prostat içerisinde de yıllarca lokalize halde kalabilir. Prostat kanserindeki hücrelerin üreme hızları birbirlerinden farklıdır. Örnek olarak, malign hücreler normal prostat hücrelerine yakın yapıda olduklarında düşük üreme hızına sahiptirler. Farklılaşma düzeyi arttıkça büyüme hızı da buna paralel olarak artmaktadır. Kanserli tümörün boyutu büyüdükçe ve/veya tümör saldırgan hücrelerden meydana gelmişse bu hücrelerin bazıları damarlar ve/veya lenf yoluyla lenf düğümlerine ve başta vertebral kemikler olmak üzere; kostalar, pelvis, femur ve omuz gibi aksiyel iskelet sistemine yayılım gösterir. Bu nedenle sıklıkla sırt ve kalça ağrıları ortaya çıkar [34–36].

Lokalize PK'nin standart tedavisi; cerrahi, radyoterapi ve yakın takiptir. İlerlemiş ve metastatik kanserlerin mevcut tedavileri ise hormon terapisi ve kemoterapidir. Prostat bezinin fonksiyonunu gerçekleştirmesi androjen hormonunun sağlıklı salımına bağlıdır. Fakat, prostat kanserinde androjen baskılama tedavisi sonrasında androjenden bağımsız oluşan karsinom hücreleri tamamıyla yok edilememektedir. Androjenden bağımsız PK'nın progresyonu ve metastazı ise kanser ölümlerinin gerçek sebebidir [37,38].

1.2.3.1 Prostat kanseri risk faktörleri

Prostat kanseri (PK), özellikle 50 yaş üstü erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biri ve kanser kaynaklı ölümlerin ikinci sıradaki sebebi olan bir tür adenosarkinomdur. Amerikan Kanser Derneği (ACS) tarafından yayınlanan istatistiksel verilere göre, 2019 yılında olası prostat kanseri vaka sayısının 2018 yılına kıyasla %7 oranda artacağı, dolayısıyla yaklaşık 174.650 adet vaka olacağı tahmin edilmektedir [39].

Yaşlanma nedeniyle prostat bezinin epitel hücrelerinde değişikliklerin gelişmesi kaçınılmazdır. Bu değişikliklerin oluşum sürecini etkileyen ve ne zaman başlayacaklarını belirleyen birçok faktör vardır. Prostat kanseri genel olarak sağlıklı prostat glandüler hücrelerinin bazal hücrelerden başlayarak mutasyona uğraması sonucunda oluşmaktadır. Periferik bazal hücre kaynaklı gelişen prostat kanserinin oldukça yaygın olması nedeniyle, serum PSA seviyesi yüksek hastalara teşhis koyma aşamasında PSA testine ek olarak TRUS ve PRM yapılmaktadır. Prostat kanseri risk faktörleri: yaş, kalıtsal faktörler, etnik köken, çevresel faktörler ve beslenme olarak gruplandırılmaktadır [18].

- **Yaş:** PK gelişiminde en önemli risk faktörü yaştır. Prostat kanseri hastalarının %95'i 45-89 yaş arasındadır. Kanser tanısı yapılan hastaların %75'inden fazlası 65 yaşın üstündedir. 85 yaşındaki erkeklerde PK riski tüm dünyada %0,5-20,0 arasındadır. Otopsi çalışmalarında, 30 yaşındaki erkeklerin %30'u, 50 yaşındaki erkeklerin %50'si ve 85 yaş üstündeki erkeklerin büyük çoğunluğunun histolojik (latent) PK'ya sahip oldukları ifade edilmektedir. 50 yaşından küçük erkeklerde PK sıklığı %1'den az olmasına rağmen, PK gençlerde oldukça hızlı ilerleme göstermektedir. Prostat kanseri insidansı diğer kanser türlerinin aksine yaş artışı ile orantılı şekilde artış göstermekte ve bu nedenle özellikle 50 yaş ve sonrasındaki erkeklerde yıllık tarama testi yapılması önerilmektedir [2].

- **Kalıtısal etmenler:** Kalıtısal faktörler göz önünde bulundurulduğunda, aile öyküsünde prostat kanseri bulunan kişilerin bu kanser türüne yakalanma ihtimallerinin %10 daha yüksek olduğu belirtilmektedir [20]. PK gelişim riski PK olan akrabaların sayısı ve onların tanı anındaki yaşı ile ilişkilidir. Kişinin kansere yakalanma riski PK birinci derece akrabalarından birinde mevcutsa 2 kat, akrabalarının iki ya da üçünde mevcutsa 5-11 kat artmaktadır. Prostat kanseri tanısı yapılan aile bireylerinde hastalığın başlangıç yaşı 70 ise 4 kat, 60 ise 5 kat ve 50 ise risk 7 kat artmaktadır [40,41].

- **İrk:** 1993 yılından itibaren prostat kanserine bağlı ölüm oranındaki düşüş Afrikalı-Amerikalı etnik kökenine sahip kişilerde gözlemlenmemiştir.

1.2.3.2 Prostat ilişkili hastalıklarda biyobelirteçler

Ulusal Sağlık Enstitüsü'ne göre biyobelirteç, normal biyolojik süreçlerin, terapötik bir müdahaleye fizyolojik ve patojenik süreçlerin veya farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak nesnel olarak ölçülebilen ve değerlendirilebilen bir biyolojik ajan olarak tanımlanmaktadır. Kanser biyobelirteçleri, tümöre cevap olarak tümör tarafından veya vücut tarafından üretilir [43,44]. Biyobelirteçler kullanım amaçlarına göre 6 alt grupta sınıflandırılmaktadırlar [45].

- *Tespit/tarama:* PK risk faktörlerini taşıyan veya hastalığın semptomlarına sahip olan hastaları değerlendirmek için kullanılır.

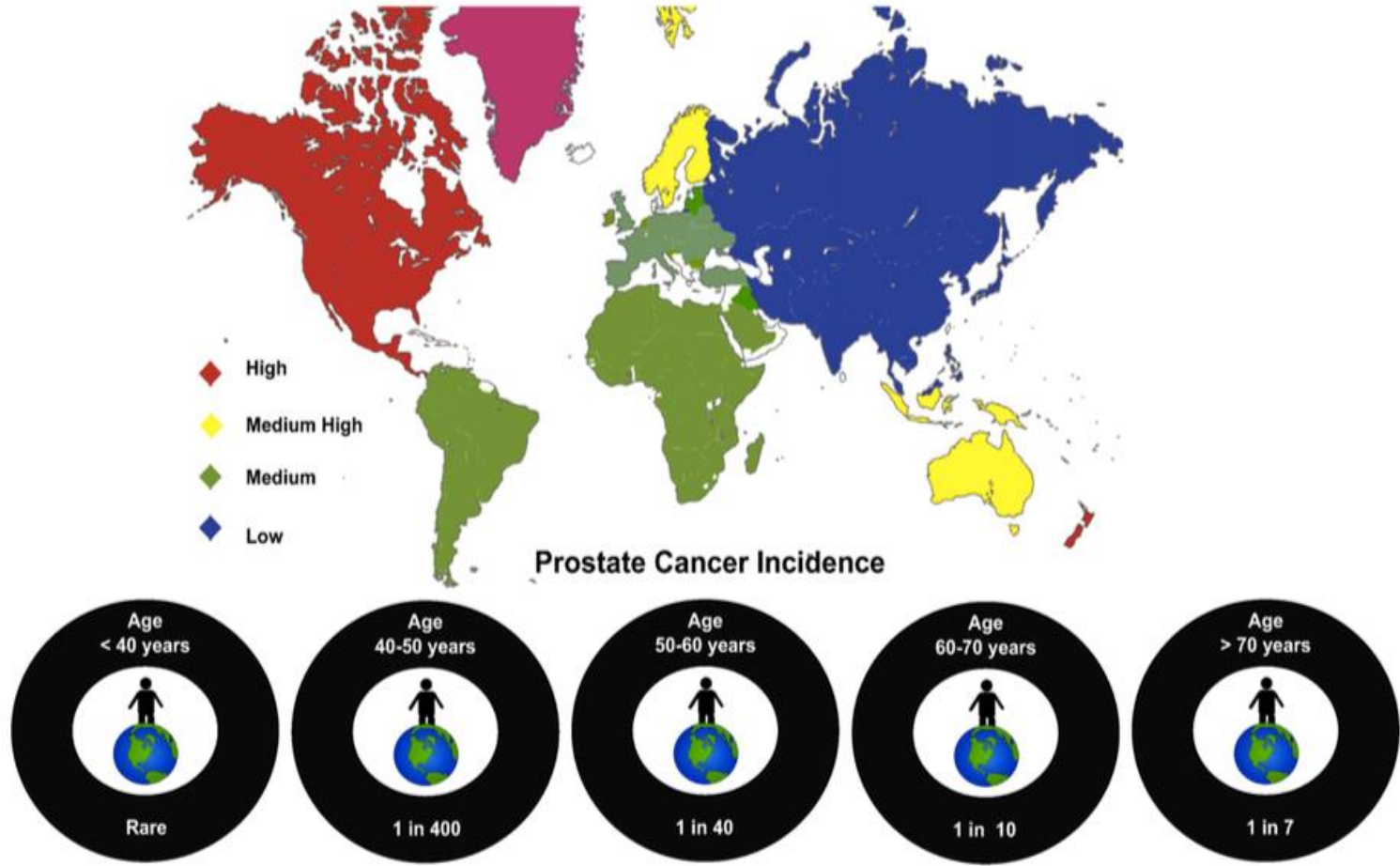
- *Teşhis:* Bu amaçla kullanılan biyobelirteçler, kanserin varlığını veya yokluğunu değerlendirmede klasik histopatolojik özelliklere yardımcı olabilir.

- *Prognostik:* Hastalığın tekrarlaması veya ilerlemesi gibi olasılıkların tahmininde kullanılır.

- *Öngörücü (Predictive):* Tedavinin etkili olup olmayacağını tahmin etmek ve/veya tedavinin etkinliğini izlemek için kullanılır ve en iyi tedavi yöntemini belirlemeye yardımcı olur.

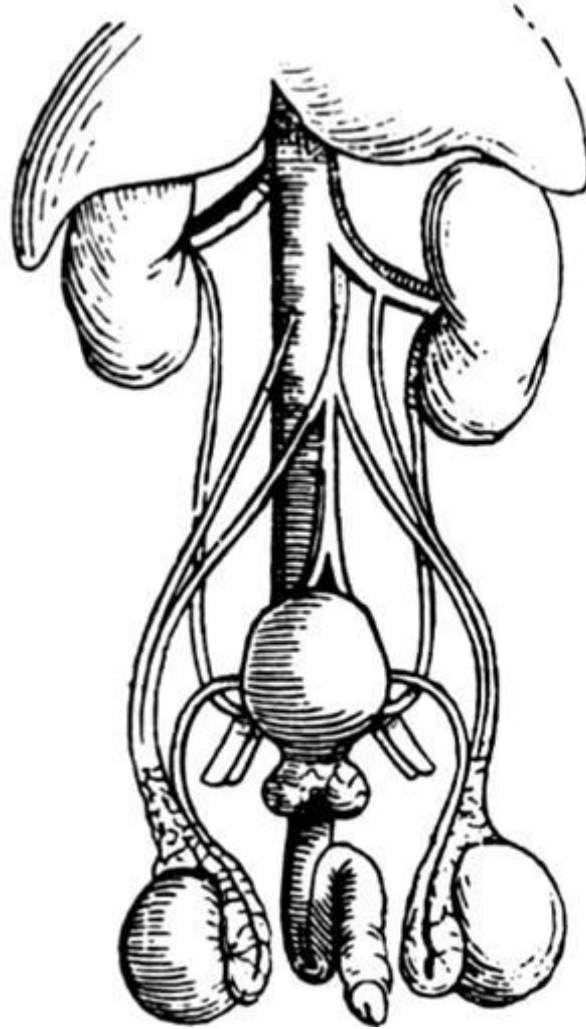
- *Terapötik hedef:* Bu biyobelirteçler kullanılarak, belirli bir tedavi yönteminden fayda görecektir hastalar belirlenmektedir.

- *Sonlanım uç nokta (Surrogate endpoint):* Klinikte vekil sonlanım uç noktası yerine geçmek ve/veya klinik yarar veya zarar eksikliğini ölçmek için kullanılır. Vekiller, hastalığa bağlı ölüm, hastalığın tekrarlaması veya nüksetmesi gibi geleneksel sonlanım noktalarının yerini alabilir. Bu tarz biyobelirteçler, klinik sonlanım noktalarını değiştirerek Faz I ve Faz II klinik deneyleri için gereken zaman ve maliyeti azaltabilir.



Şekil 1.3 : Prostat kanserinin hasta yaşına bağlı insidansi ve ülkelere göre dağılımı [42]

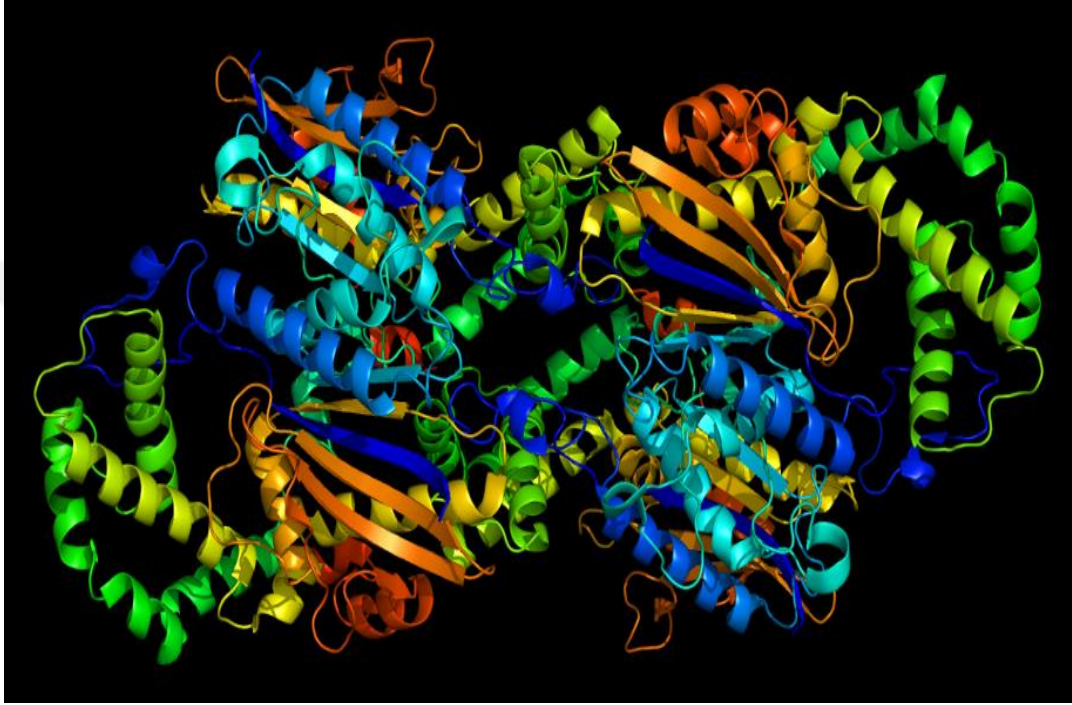
Prostat bezi ilk olarak, Yunan anatomist Herophilus tarafından kadavrular üzerinde yapılan çalışmada fark edilmiştir [46]. 1530 yılında Ferri, prostat tümörlerinin idrar kanalını nasıl kapadığından bahsetmiştir [47]. 1538 yılında Vesalius prostat bezine ait ilk çizimi yapmıştır [48] (Şekil 1.4). 1649 yılında Fransız Doktor Jean Riolan hastalığın semptomlarını tanımlayarak prostat büyümesinin idrar akışını engellediğini açıklamıştır.1935 yılında Kutscher ve Wolbergs, sağlıklı prostat dokusunun yüksek oranda fosfataz içerdiğini gözlemlemiş ve bu gözlem Gutman tarafından desteklenerek sağlıklı prostat dokusunun yanı sıra karsinomlu prostat dokularında da “asit” fosfataz olduğu şeklinde genişletilmiştir. 1938'de, primer ve metastatik prostatik kanserine sahip birçok erkekte, serum prostatik asit fosfataz (PAP) konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür [49].



Şekil 1.4 : Prostat bezine ait ilk çizim [48].

PAP, prostat bezinde üretilen ve sağlıklı erkeklerin semeninde bulunan 100 kDa'luk bir enzimdir (Şekil 1.5). PAP, metabolizmanın düzenlenmesi ve prostat bezi epitel

hücrelerinin büyümesinden sorumludur. Gutman'ın gözlemini takiben birkaç araştırmacı PAP aktivitesini inceleyerek PAP enzimatik aktivitesi ile prostat kanseri arasında bir bağlantı kurmuşlardır. Bu gözlem ayrıca ilk kez enzimatik aktivite ölçümüne dayalı kolorimetrik PAP analizinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu tür analizlerin dezavantajları: düşük özgüllük, duyarlılık, reaksiyon süresi, pH ve sıcaklığa büyük ölçüde bağlı olan serum enzimatik aktivitesinin düşük stabilitesidir [49].



Şekil 1.5 : Prostatik asit fosfataz (PAP) enziminin kristal yapısı [50].

PAP analizinin duyarlılığı, 1975'te PAP için bir radyoimmünolojik test sistemi geliştirilerek iyileştirilse de hastalığın erken evredeki tespiti için duyarlılığın yetersiz olması ve diğer dezavantajları nedeniyle, hastalığın erken teşhisinde kullanılabilecek daha hassas ve daha kesin yanıt verecek bir test sisteminin geliştirilmesine büyük ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda, 1960-1970 yıllarında prostat kanseri tanısına yönelik yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. 1960 yılında Flocks, prostat spesifik antijeninin (PSA) özelliklerini tanımlamıştır [51]. On yıl sonra, Mitsuwo Hara ve diğ. [52], insan serumunda γ -seminoprotein adlı bir protein keşfederek, tecavüz vakalarında adli tanısal bir biyobelirteç olarak kullanımını önermiştir. 1973 yılında, erkek doğurganlığı üzerine araştırmalar yaparken Li ve Beling, E1 ve E2 adlı iki proteini insan serumundan saflaştırdıklarını bildirmiş ve ardından E1 antijeninin PSA ile benzer olduğu göstermişlerdir. 1979'da Wang, prostat kanseri hücrelerine karşı bir antikör (p8) ile çalışırken, prostat bezinden bir antijen izole etmiş ve böylelikle

günümüzde PSA (Şekil 1.6) olarak bilinen prostat antijenini (PA) keşfetmiştir. Bu çalışma ile sağlıklı, malign yapıq prostat dokularındaki prostat antijeninin varlığını, prostat antijeni ile serum PAP arasındaki kimyasal ve immünolojik farklılıkları göstermişlerdir [53].



Şekil 1.6 : PSA kristal yapı gösterimi.

1984 yılında FDA tarafından onaylanan glikoprotein PSA, prostat kanserinin teşhisinde kullanılan en temel biyobelirteç olma özelliğini kazanmıştır. Serum PSA, başlangıçta uygulanan tedavinin etkinliğinin belirlenmesinde kullanılırken, daha sonra teşhis amacıyla kullanılmıştır. Fakat yapılan çalışmalarda serum PSA'nın, prostatit ve BPH gibi durumlarda da artış göstermesi nedeniyle bu biyobelirtecin kanser değil prostat spesifik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca PSA testinin genellikle klinik olarak test edilemeyen, uzun süreçte büyüyen tümörlerin varlığında da artış göstermesi veya her PSA artışının kanserle ilintili olmaması PSA'nın prostat kanserinin tanısında tek başına güvenilir bir biyobelirteç olmadığını göstermiştir [54].

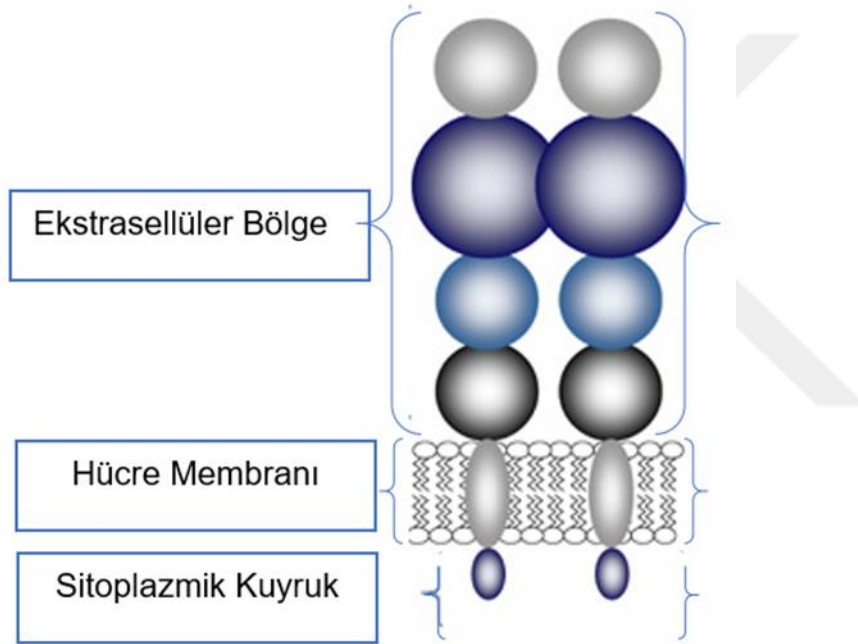
PSA'nın yanı sıra PSA'nın izoformları da klinik ve akademik çalışmalarda kullanılarak prostat kanserinin ayrıcı tanısındaki başarıları test edilmiştir. 1990'lı yılların başında Lilja ve Stenman, serumdaki serbest-PSA (f-PSA) ve kompleks-PSA (c-PSA) formlarının da prostat kanserinin biyobelirteçleri olduğunu keşfetmiştir [55]. C-PSA serum serin proteaz inhibitörlerine kovalent olarak bağlanırken, bağlanmadan kalan PSA'ya serbest PSA (f-PSA) denir. Benign PSA ve aktif olmayan PSA (i-PSA) diğer PSA izoformlarını da içerir (proPSA) [56].

Papsidero ve diğ. (1980), PSA testi yapmış [57] ve bu çalışmanın ardından Stamey ve diğ. (1987), sağlıklı grup ve kanserli grup dahil toplamda 2.200 serum örneğini değerlendirerek, PSA' nın prostat kanserinin biyobelirteci olarak kullanılabilceğini gösteren devrim niteliğinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir [22]. 1986 yılında Hybritech firması, 4 ng/mL serum PSA konsantrasyonunun prostat kanserinin cut-off değeri olduğunu ifade etmiştir. Klinik çalışmalarda ise, kanser teşhisi için serum PSA konsantrasyon aralığının 2,8 ila 4,0 ng/mL olması gerektiği vurgulanmaktadır. 1986'da yapılan ek klinik çalışmaların ardından, FDA, PSA ölçümünü prostat kanseri olduğu teşhis edilen kişilerde hastalığın ilerlemesini takip etmek için bir izleme stratejisi olarak kullanımını onaylamıştır. FDA onayı kapsamında, 50-74 yaş grubundaki 6.630 erkeği kapsayan bir tarama çalışmasından elde edilen klinik verilere dayanarak, 50-54 yaş grubundaki "cut-off" seviyesi 4,0 ng/mL olarak belirlenmiştir [58]. FDA, 50 yaşın üzerindeki erkeklerde PRM ile birlikte kullanılması şartıyla Hybritech tarafından üretilen Tandem PSA testinin prostat kanserinin tanısında kullanımını onaylamıştır. Fakat nihai tanının biyopsi sonuçlarına bağlı olmasını önermişlerdir. Mevcut klinik uygulamada ise, f-PSA'nın toplam PSA'ya (%f-PSA) oranı %25 ve üzerindeki hastalara biyopsi yapılmaktadır. FDA tarafından onaylanan diğer bir biyobelirteç ise prostat spesifik kodlayıcı olmayan (non-coding) mRNA olan prostat kanser antijeni 3 (PCA-3)'tür. PCA-3, PSA ve PSA izoformlarına kıyasla daha güvenilir bir biyobelirteç olsa da yalnızca prostat biyopsilerinin incelenmesinde ve klinikte düşük öneme sahip tümörlerin teşhisinde kullanılan bir biyobelirteçtir. Bahsi geçen biyobelirteçlere ek olarak prostat kanserinin doğrudan ve ayırıcı tanısında kullanım amacıyla geliştirilen ve patentlenen birçok biyobelirteç bulunmaktadır. Bahsi geçen bu biyobelirteçler Sharma ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada özetlenmektedir [42].

1.2.3.3 Prostat spesifik membran antijeni (PSMA)

PSMA (Şekil 1.7), başka bir deyişle folat hidrolaz I (FH I) veya Glutamat Karboksipeptidaz II (GCP II), tip II membran sınıfından, 19 amino asitten oluşan iç kısım, 24 amino asitten oluşan transmembran kısım ve 707 aminoasitten oluşan dış kısma sahip, çinko-metaloenzim özellikli bir transmembran glikoproteindir. N-asetil-L-aspartat-L-glutamat (NAAG) ve N-Asetilaspartata (NAA) hidrolizini katalizler ve prostat kanseri hücrelerinde oldukça fazla ekspres edilir. PSMA'nın PSA'dan daha spesifik bir prostat kanseri biyobelirteci olduğu literatürdeki akademik ve klinik

çalışmalarda ispatlanmış ve günümüzde PK teşhisi amacıyla, PET görüntüleme, immnlojik testler ve immünohistokimyasal analizlerin yanı sıra biyosensör uygulamalarında da hedef analit olarak kullanılmaktadır [9,59,60]. PSMA, hasta ve sağlıklı erişkinlerin prostat dokularında, hücrelerinde ve serumlarında tespit edilmiştir. Fakat serum PSMA düzeyleri, primer ve metastatik PK'ya sahip hastalarda sağlıklı hastalara kıyasla belirgin oranda farklılık göstermektedir. Ayrıca, serum PSMA seviyelerindeki artışının yaşla da orantılı olduğu, özellikle 50 yaşın üstündeki erkeklerde gençlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. PSMA serum düzeyleri ve hastalığın saldırganlık eğilimi arasındaki ilişkiyi açıklayan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.



şekil 1.7 : PSMA glikoproteininin membran yapısı.

Örneğin, Xiao ve diğ. (2001) tarafından yapılan çalışmada, ilerlemiş PK vakalarındaki serum PSMA seviyelerinde sağlıklı hastalardaki PSMA seviyesine kıyasla yükselme olduğu gözlenmiştir. Prostat kanseri tanısında serum biyobelirteci olarak PSMA kullanımının eksikliklerinden biri, meme kanseri hastalarının serumunda da PSMA seviyelerinde yükselmenin gözlemlenmesidir. Fakat meme kanseri erkeklerde yaygın olmadığından bu durumun PK teşhisinde PSMA'nın kullanımını olumsuz etkileyeceği düşünülmemektedir. PSMA'nın prostat kanseri teşhisinde kullanımında karşılaşılacak diğer bir dezavantajı ise, serum PSMA seviyelerinin yaşla birlikte doğal olarak artma eğiliminde olmasıdır [4,60–63]. Fakat, pikogram seviyesindeki analit değişimlerini

algılayabilecek yüksek hassasiyetli analitik ölçüm cihazlarının geliştirilmesi sonucunda bu dezavantajın ortadan kaldırılarak geliştirilen PSMA tabanlı tanı sisteminin prostat kanserinin prostata bağlı diğer hastalıklardan ayırt edici tanısında kullanılması bu doktora tez çalışmasının temel hedefini oluşturmaktadır.

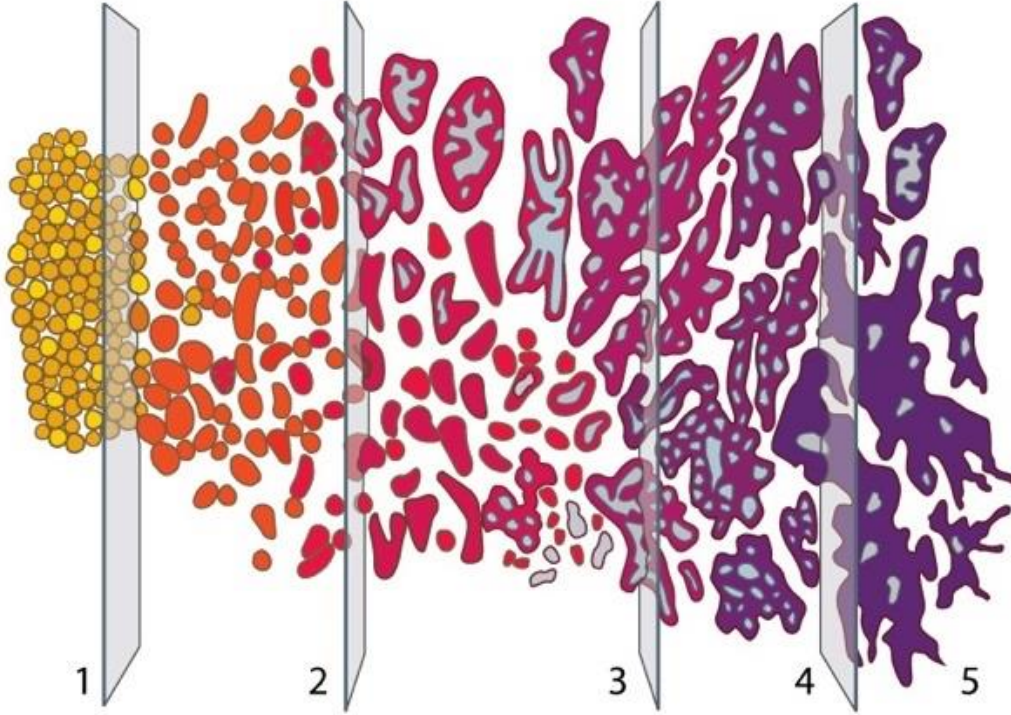
1.3 Prostat Kanserinin Klinik Tanısı ve Hastalığın Evrelendirilmesi

Prostat tümörlerinin büyük bir çoğunluğu özellikle erken dönemde yavaş büyüme göstermekte ve belirgin semptom göstermemelerinden dolayı erken dönemde tanı koyulması oldukça zor olmaktadır. Klinikte prostat biyopsisi, prostat kanserini doğrulayan tek altın standarttır. Prostat biyopsisine ek olarak önerilen diğer yöntemler: PRM ve TRUS'tur. Fakat, bahsi geçen bu teknikler, aşırı derecede invaziv olmaları nedeniyle hastalar için rahatsızlığa neden olmaktadır. PRM, prostat kanseri, alt rektum ve pelvisteki anomalilerin tespitinde kullanılan en popüler yöntemdir. Prostat kanser vakalarının %80'i, prostat glandının posterior bölgesindeki periferal zonda geliştiğinden, tanı aşamasında rektal muayene yapılması bu duruma oldukça uygun bir yaklaşımdır. Serum PSA seviyesi 2 ng/mL'nin üzerinde olan ve PRM sırasında anomali tespit edilen hastalar PRM pozitif olarak kabul edilmektedir. Buna karşın PRM test sonucu şüpheli olan hastaların Gleason skoruna bakılarak hastalığın evresi skorlandırılmaktadır [64].

Gleason skoru, Donald F. Gleason tarafından 1960 ve 1975 yılları arasında 4.000'den fazla PK hastasının biyopsi ve rezeksiyon örneklerinin histopatolojik incelemesi sonucunda, PK agresifliğini derecelendirmek amacıyla geliştirilen histopatolojik bir metottur. Prostat adenokarsinomunda, Gleason derecelendirme sisteminin prognozla yakın ilişkisi ve tedaviyi belirlemede önemli rolü bulunmaktadır. Bu metotta biyopsi ile alınan doku örnekleri mikroskopik olarak incelenerek, baskın ve ikincil sıklıkta görülen tümör paternleri: 1 (agresif olmayan) ve 5 (çok agresif) seviyeleri arasında puanlandırılarak (Şekil 1.8) evrelendirme yapılmaktadır. Genellikle D'Amico ölçeğine göre yapılan evrelendirme ile kanserli hücrelerin dağılımı ve olası metastaz incelenir, PSA testi ve Gleason skoru aracılığıyla risk grupları saptanır. Bu şekilde hastaya en uygun tedavi seçenekleri belirlenir [65].

Klinikte vücut sıvılarındaki prostat kanseri biyobelirteçlerinin kantitatif ve kalitatif analizlerinde, Enzime Bağlı İmmüno sorbent Testi (ELISA), Kemilüminesans İmmünolojik Testi (CIA), Floresans İmmünolojik Testi (FIA) gibi geleneksel ölçüm

metotları kullanılmaktadır [66,67]. Bahsi geçen immünolojik testlerin, pahalı ve zaman alıcı olmaları, karmaşık kurulumu sahip olmaları ve en önemlisi yeterli hassasiyete ($\sim\text{ng} / \text{mL}$) sahip olmamaları gibi eksiklikler bu testlerin klinikteki kanser teşhisinde kullanımlarını kısıtlamakta ve bu yöntemlere alternatif yöntemler araştırılmaktadır.

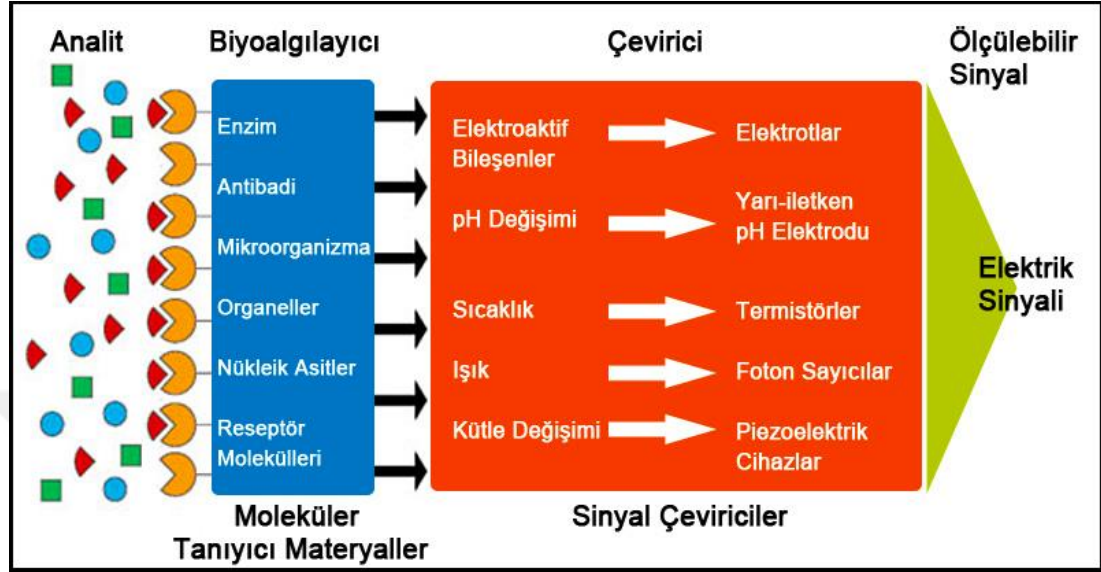


Şekil 1.8 : Farklılaşan prostat doku motifleri ve Gleason skorlaması. 1-agresif olmayan, 5-en agresif olan motifi temsil etmektedir [68].

1.4 Biyosensörler

Biyosensör temel tanıma göre, tanıyıcı spesifik biyolojik bileşen ve sinyal yükseltici dönüştürücüden oluşan bir aygıttır. Biyosensör tarihi, 1956 yılında oksijen probunu önererek, 1962 yılında enzim elektrodunu geliştiren Leland C. Clark ile başlamış, fizik, kimya, malzeme ve elektrik-elektronik gibi disiplinlerin katkısıyla gelişmiş ve bu doğrultuda tıptan tarıma biyoteknolojiden savunmaya kadar birçok alanda yaygınlaştırılmıştır [69,70]. Biyosensör tanımında da belirtildiği üzere, biyosensör cihazı biyolojik tanıyıcı tabaka ve sensör elementi olarak iki bölümden oluşur. Biyolojik tanıyıcı tabaka hedef olan analitin tanınmasını spesifik olarak sağlarken, sensör elementi ise analit-reseptör etkileşimi sonucunda gerçekleşen fiziksel ya da kimyasal değişimin algılanmasını ve bu etkileşimin elektriksel sinyale dönüştürülerek

yükseltilmesini sağlamaktadır. Biyosensörlerde hedef analitin konsantrasyonu, biyoreseptörün analite özgünlüğü gibi değişkenlere bağlı olarak, biyobelirtecin ortamdaki konsantrasyonu ile orantılı değişen sinyal aracılığıyla belirlenir [71]. Şekil 1.9'da biyosensör bileşenlerine ait şema gösterilmektedir.



Şekil 1.9 : Biyosensör temel çalışma mekanizması ve bileşenleri [72].

Bir biyosensörün kullanıma uygun olabilmesi için bazı özellikleri taşıması gerekmektedir. Bu özellikler [71,73]:

- Hedef analite özgünlük,
- Ucuzluk, kullanım kolaylığı ve pratiklik,
- Doğruluk, güvenilirlik, yüksek hassasiyet ve kararlılık,
- Hızlı yanıt süresi ve kendini yenileme (recovery) özelliğine sahip,
- Yüksek tekrarlanabilirlik,
- Taşınabilirlik,
- Farklı çevresel koşullarda kararlılık (sıcaklık, basınç, pH, vb.) olarak sıralanabilir.

1.4.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyolojik tanıma elementine göre biyosensörler, etiketli (labeled) ve etiketsiz (label-free) biyosensörler olarak ikiye ayrılır [6,74]. Etiketli biyosensörlerde radyoaktif, floresan işaretleme gibi etiketleme yöntemleri tercih edilirken, etiketsiz yöntemlerde herhangi bir işaretleyici ajan bağlanmamış hedef moleküller doğrudan algılanarak konsantrasyon değişimi zamana bağlı olarak takip edilebilmektedir.

Biyolojik tanıyıcı kısım (biyoreseptör), biyosensörün seçiciliğini dolayısıyla performansını belirleyen en önemli kısımdır. Biyoreseptörün türüne göre biyosensörler: enzim, antikor, mikro-organizma ve gen tabanlı (DNA ve aptamer) biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır [71].

Ayrıca dönüştürücü elementin türüne göre biyosensörler: (i) elektrokimyasal biyosensörler, (ii) iletkenlik/kapasitans/empedans biyosensörleri, (iii) kütle hassas biyosensörler, (iv) termal biyosensörler ve (v) optik biyosensörler olarak gruplandırılmaktadır [71]. İlerleyen bölümlerde genel sınıflandırma dönüştürücü türüne göre yapılacak ve tez kapsamında üretilen biyosensörler bu doğrultuda isimlendirilecektir.

1.4.1.1 Dönüştürücü türüne göre biyosensörler

- **Elektrokimyasal dönüştürücüler:** Potansiyometri, membran veya elektrot potansiyeli uygulanan çalışma elektrodunun analit konsantrasyonu veya analitin termodinamik aktivitesi hakkında bilgi verdiği bir metottür. Potansiyometrik çeviriciler kullanılarak üretilen biyosensörlerde, biyolojik tanıyıcı ajanla hedef analitin arasındaki etkileşim sonucunda çalışma ve referans elektrodu arasında potansiyel fark oluşur. Bu sistemlerin en büyük dezavantajı, biyolojik reaksiyon sonucunda oluşan potansiyel değişiminin çok düşük olmasıdır. Bu nedenle biyolojik ajanın bulunduğu matristeki interferanslara oldukça dikkat edilmesi biyosensörün güvenilir ve hassas olması açısından oldukça önemlidir. pH metre, potansiyometrik ölçümü temel alan yaygın kullanıma sahip bir cihazdır [71]. Sistemin pH değeri, hidrojen iyonlarının konsantrasyonu ile ilişkilendirilerek aşağıdaki ifadeye göre belirlenir (1).

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+] \quad (1)$$

Potansiyometrik çeviricilerin özellikleri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir [71].

- Kolay kurulumu sahiptir; temel olarak referans elektrodu, çalışma elektrodu ve yüksek empedanslı voltmetreden oluşur.
- İyon seçici elektrotlar spesifik iyonların potansiyel sinyalin ölçümünde kullanılır.
- Denge durumunda analit miktarı değişmez ve sensörden akım geçmez.
- Seçici elementi iyon seçici membran elektrot ya da metal oksit kaplama elektrottür.
- Sensör cevabı logaritmiktir, her 10 birimlik konsantrasyon değişiminde çıkış sinyalinde genellikle 59 mV değişim olur. Bu durum geniş lineer aralığa neden olsa da gürültülü ve düşük hassasiyetli sensör üretimine yol açmaktadır.

Tipik pH elektrot ve pH sensörlerine ait şematik gösterim Şekil 1.10'da verilmektedir.

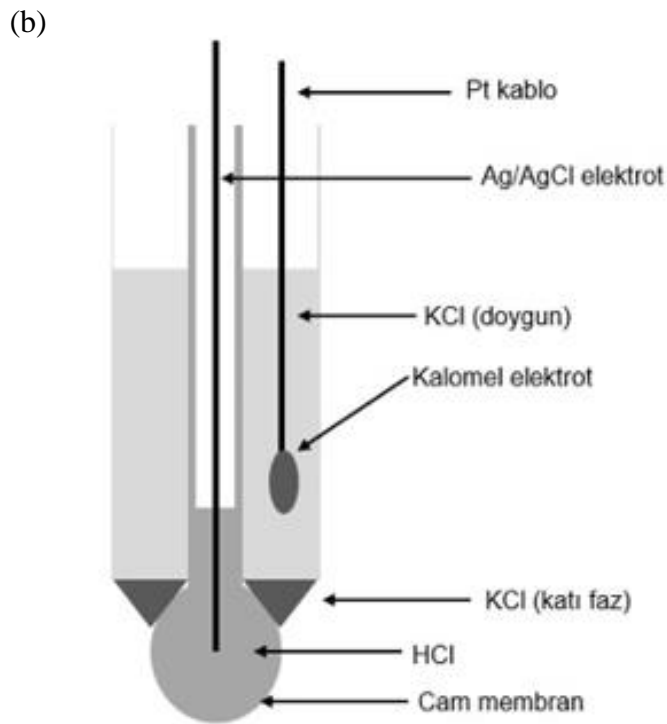
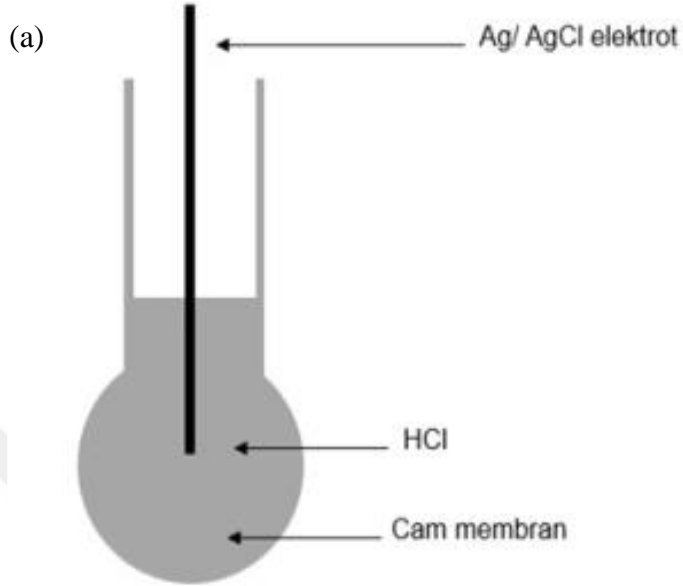
Amperometrik ve voltametrik çeviriciler, potansiyometrik çeviricilerden farklı olarak denge durumunda olmayan potansiyel uygulanarak oluşan akıma veya akım-voltaj ilişkisine dayalı nicelik (amperometri) ölçümü yapmayı sağlayan sistemlerdir. Bu teknolojinin temelinde, metal elektrodun Fermi seviyesinden ve hedef analitin moleküler orbitalleri arasında gerçekleşen elektron transferi vardır. Voltametrik çeviricilerde, elektroda uygulanan sabit veya değişken potansiyele karşılık sistemin verdiği cevap akım cinsinden ölçülür. Potansiyel basamaklı olarak değiştirilebilir ya da sabit şekilde uygulanarak sistemde oluşan akım, hücre potansiyeli cinsinden ifade edilir. Zamana bağlı olarak elde edilen bu grafiğe voltamogram denir. Amperometrik çeviricilerde, sabit potansiyelde sistemdeki akım ölçülerek hedef analitin konsantrasyonu hesaplanır. Amperometrik ölçümün en basit formu tekli-potansiyel amperometri ve DC amperometridir.

Glikoz sensörleri, amperometrik ölçümü temel alan sensörlerdendir. Voltametrik analizlerde genellikle üç-elektrotlu sistem kullanılır (Şekil 1.11). Bu elektrotlar referans elektrot, çalışma elektrodu ve karşıt elektrot olarak isimlendirilir. Modern voltamogramlarda çalışma elektrodu karşıt elektroda göre polarize edilirken, çalışma elektrodunun voltaj değeri referans elektroda göre ölçülür. Bu şekilde, 3-elektrotlu hücrede referans elektrottan yüksek akım geçmesi engellenmiş olur. Voltametrik ölçüm yapabilmek için bu elektrotlardan en az iki tanesinin olması gerekmektedir. Pratikte ise, akım geçen bir elektrotta potansiyeli iki elektrot kullanarak sabit tutmak oldukça zordur. 2-elektrotlu sistemlerde, referans elektroduna düşük miktarda akım uygulanır ve bu elektrot potansiyel ölçümünde ve sabitlenmesinde referans olarak kabul edilir [76].

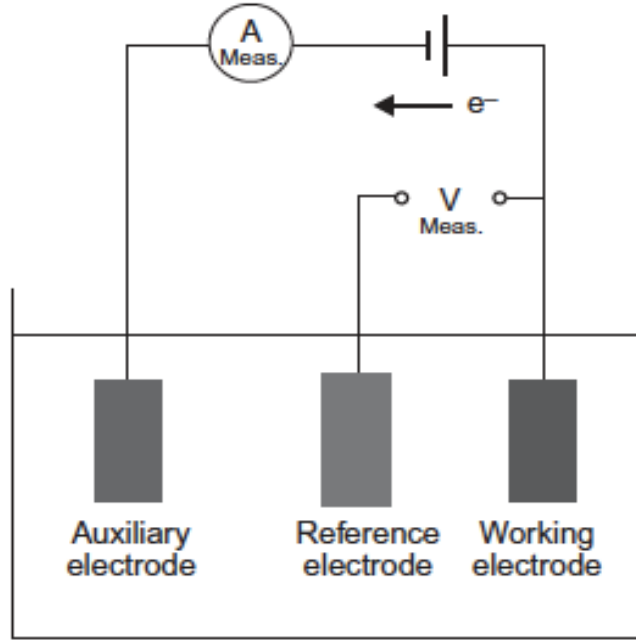
3-elektrotlu sistemin kullanımı ise, potansiyel ve akım ölçümlerinde yüksek doğruluk sağlar. Bu sistemlerde uygulanan potansiyel, analitin elektron transfer reaksiyonu için gereken sürücü kuvveti sağlar. Ölçülen akım, elektrokimyasal reaksiyondaki elektron transfer katsayısı ile orantılıdır. Elektrokimyasal hücrede, potansiyometrideki gibi, inorganik tuzlar (KCl, Na₂SO₄), mineral asitler (HCl, H₂SO₄) vb. destekleyici elektrolitler kullanılarak iyonik ortam oluşturulur ve polarizasyon sonucunda gerçekleşen iyon transferinin kararlılığı sağlanır [71].

Ekran baskılı elektrotlar (SPE), bahsi geçen 3-elektrotlu sistemlerin minyatürize edildiği elektrotlardır. SPE'lerin küçük boyutta sağladıkları kullanım kolaylığı, düşük maliyetleri ve endüstriyel ölçekte üretilebilirlikleri gibi avantajlarından dolayı bu elektrotlar sensör ve biyosensör araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, bu

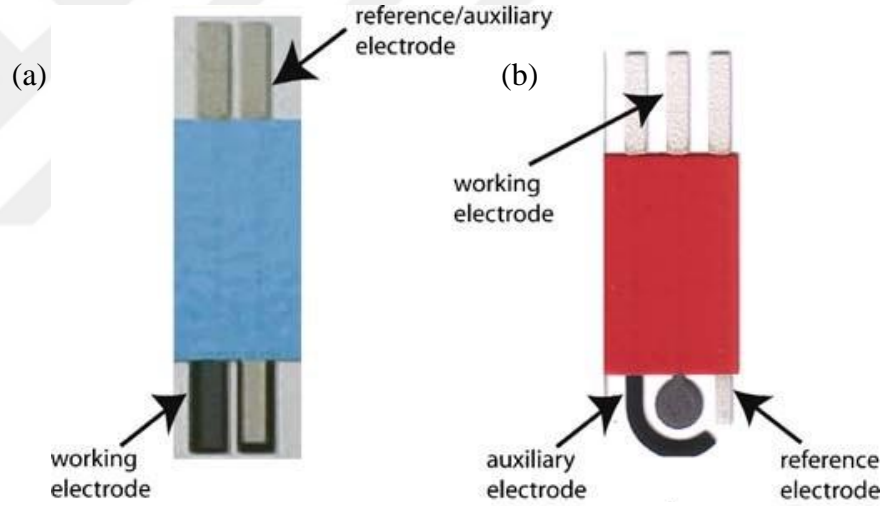
elektrotların taşınabilir analitik sistemlere kolaylıkla entegre edilebilmesi, çevre, endüstriyel ve klinik uygulamalarda tercih edilmelerini sağlamaktadır [77]. Ekran-baskılama teknolojisi ile geliştirilen 2 ve 3-elektrotlu SPE' ler Şekil 1.12 de gösterilmektedir.



Şekil 1.10 : pH metrenin bileşenleri (a) pH elektrodu ve (b) pH sensörü hücresi [75].



Şekil 1.11 : 3-elektrotlu voltametri hücresi



Şekil 1.12 : (a) 2-elektrot ve (b) 3-elektrot baskılı SPE [13,77].

- **Empedans/iletkenlik/kapasitans çeviriciler:** Sıvıların iletkenliği, mineral tuzları, asit veya bazların sıvı ortamda iyonlarına ayrışmasından kaynaklanır. İyon halde elektrolit içeren hücreye sabit bir potansiyel uygulanması sonucunda sistemde elektrik alan oluşur ve iyonların zıt yüklü elektrotlara doğru hareketi sonucunda hücrede akım meydana gelir. Bu akım, çözeltinin direncine (R), elektrotların yüzey alanları ve aralarındaki mesafeye göre değişmektedir. Kapasitans ve iletkenlik çeviriciler yapısal olarak birbirine benzemekle birlikte bu çeviriciler empedans çeviricilerin

basitleştirilmiş versiyonlarıdır. Empedans, direnç, kapasitans ve indüktans arasındaki ilişki Eşitlik 2’de verildiği şekilde ifade edilmektedir [78].

$$Z = R + jX = R + j(x_L - x_C) \quad (2)$$

Kapasitans çeviriciler, dielektrik katman üzerine immobilize edilen reseptör ile analit etkileşimi sonucu elektrolit/elektrot arayüzünde oluşan dielektriksel değişimleri ölçer. Kapasitans (C), Eşitlik 3’e göre hesaplanır.

$$C = 2 \frac{\epsilon_0 \times \epsilon A}{d} \quad (3)$$

Bu denklemden ϵ ; elektrotlar arasındaki ortamın dielektrik sabitini, ϵ_0 ; serbest uzayın geçirgenlik katsayısını ($8,85 \times 10^{-12}$ F/m), A; elektrotların yüzey alanını (m^2), d ise yalıtkan tabakanın kalınlığını (m) ifade eder. Bu denkleme göre, elektrotlar arası mesafe arttıkça kapasitans düşer. Başka bir deyişle, hedef molekülün reseptörüne bağlanması sonucunda yer değiştiren karşıt iyonlar kapasitans değerinde azalmaya neden olur. Reseptörle modifiye edilen yüzeye bağlanan analitin miktarı arttıkça, kapasitans değerindeki düşüş de artar.

Elektrokimyasal yöntemlerin farklı bir türü de Alan Etkili Transistörlerdir (Field Effect Transistors, FETs). Yarı iletken iki elektrot arasındaki iletkenlik değerinin (source ve drain) üçüncü bir elektrot (gate) tarafından kontrol edildiği bu sistemlerdeki gürültü oranı oldukça düşüktür. MOSFET (metal–oxide–semiconductor field-effect transistor), ISFET (ion-sensitive field-effect transistor), JFET (Junction gate field-effect transistor) gibi türleri de bulunmaktadır [56].

- Optik Çeviriciler: Optik çeviriciler, görünür bölge (10–390 nm), mor ötesi (390–700 nm) ve kızıl ötesi (700 nm–1 mm) bölgelerdeki sinyalin dönüştürülmesini sağlar. Biyosensördeki biyolojik tanıma işleminin validasyonu: absorpsiyon, floresans/fosforesans, kemilüminesans ve kırıcılık indisleri incelenerek yapılır [79].

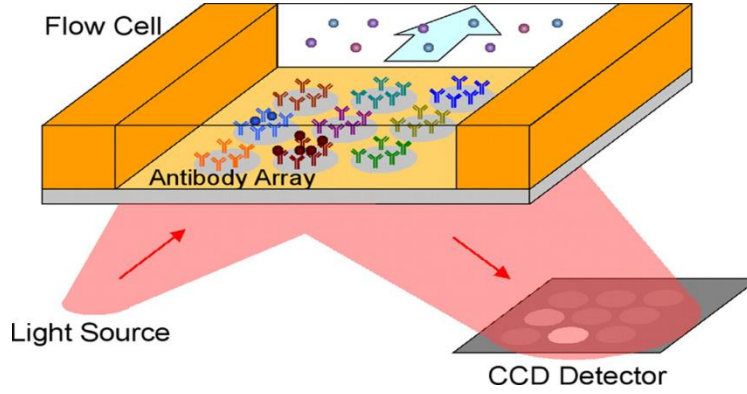
Optik çeviriciler, biyosensör çeviriciler arasında en eski ve en güvenilir tekniklerden biridir. Yüksek hassasiyet, küçük boyut, etkin maliyet gibi özelliklerinden dolayı diğer geleneksel analiz yöntemlerine alternatif olarak gösterilmektedir. Optik biyosensörlerin avantajları; hızlı olmaları, sinyalin elektriksel ya da manyetik parazitlere karşı dayanıklı olmaları, uzaktan algılamaya ve tek bir cihazda çoklu algılama yapılmasına olanak sağlaması olarak sıralanabilir. Bu nedenle özellikle gıda, güvenlik, yaşam bilimleri, çevre analizleri ve medikal alanlardaki biyosensör çalışmalarında optik çeviriciler kullanılarak geliştirilen sensörlerin kullanımında belirgin bir artış gözlenmektedir [80].

Optik biyosensörler temelde, ışık kaynağı, ışık demeti oluşturmak ve oluşan ışığı yönlendirmek için gerekli optik bileşenler, yüzeyi fonksiyonelleştirilmiş algılayıcı kristal ve ışık detektöründen oluşmaktadır. Optik biyosensörler ile doğrudan veya dolaylı olarak iki farklı şekilde ölçüm yapılabilmektedir. Doğrudan ölçümde, hedef moleküller etiketlenmeden ya da değiştirilmeden doğrudan analit tayini yapılır ve analit dalga kılavuzunun optik özelliklerinden doğrudan etkilenir. Bu tip analit tayini kolay ve ucuz olmasının yanı sıra moleküler etkileşimin kantitatif ve kinetik ölçümüne izin vermektedir. Dolaylı ölçümde ise hedef analit ve biyolojik tanıyıcı ajanlar genellikle floresan etiketlemeyle etiketlenirler. Bu analitlerin tespitinde yüzeye tutunma, ışıma, fosforesans, polarizasyon, rotasyon veya harmonik üretim temelli doğrusal olmayan optik olgulardan faydalanılmaktadır. İlk optik kimyasal sensör, absorpsiyon spektrumundaki değişiklikleri ölçme temeline dayalı olup, CO₂ ve O₂ derişimlerinin ölçülmesi amacıyla geliştirilmiştir [81,82].

Optik biyosensörlerin günümüzde en yaygın kullanılan türü, (SPR) biyosensörleridir. 1902 yılında fiziksel açıdan tanımlanan plazmon rezonansı, yüzey plazmonlarının anlaşılması sonucunda geliştirilmiş ve ilk ticari SPR biyosensörü Biacore firması tarafından 1993 yılında üretilmiştir. SPR sensörlerinde temel olarak, polarize ışık, yüzeyi altın kaplı bir prizmaya gönderildiğinde ışığın bir kısmı absorblanmakta, bir kısmı da yansıtılmaktadır. Gelme açısı değiştirilip yansıyan ışığın şiddeti takip edildiğinde yansıyan ışık şiddetinde azalma görülür. Rezonans durumunda yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kayıp olur ve bu açığa SPR açısı adı verilir. İki optik ortamın ara yüzeyine yerleştirilen ince iletken filme belirli açıda gelen ışığın etkisinde yüzey plazmonları osilasyon yaparak rezonans gerçekleştirmektedir. Rezonans durumunda yüzey elektronları tarafından gelen ışığın enerjisi absorblanarak yansıyan ışığın yoğunluğunda bir azalma meydana gelmekte ve bu iki ışık yoğunluğu arasındaki fark ölçülerek hedef analitin miktarı tayin edilmektedir.

Gelen ışığın metal-su ara yüzündeki penetrasyon derinliği, gelen ışığın dalga boyuna ve metalin türüne bağlıdır. Örneğin, altın için penetrasyon derinliği yaklaşık 25-30 nm'dir. Yüzey plazmon dalgasının rezonansı ise ortamın kırılma indisine (n) bağlıdır. Sulu tampon sisteminin kırıcılık indisi (n) yaklaşık 1,0 iken proteinlerinki 1,33'tür. Proteinlerin yarı iletken yüzeye adsorpsiyonu sonucunda rezonans açısında kayma oluşarak ortamın kırılma indisini arttıracaktır. SPR cihazlarında fotodetektörler kullanılarak, metal ara yüzeyinde plazmon rezonansı etkisinde gerçekleşen frekans derişimleri ölçülür. Günümüzde geliştirilen SPR biyosensörleri, pg seviyedeki analit

değişimlerini dahi ölçebilecek hassasiyete sahiptir [71,76,81,83]. Şekil 1.13'te SPR biyosensörüne ait temel bileşenler gösterilmektedir.



Şekil 1.13 : Kretschmann konfigürasyonu ile tasarlanan SPR cihazının şematik gösterimi [84].

- Kütle Hassas Çeviriciler: Fiziksel çeviriciler kapsamında, piezoelektrik (PZT) özellik gösteren malzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Piezoelektrik özellik: kuvars kristal, galyum fosfat, kuvars, kurşun magnezyum niyobat – kurşun titanat gibi malzemelere ait bir özelliktir. Kristal içerisindeki atomların deformasyon sonucunda mevcut oldukları konumdan belirli bir zamanda yer değiştirmeleri ve sonrasında tekrar başlangıçtaki konuma dönmelerine osilasyon denilmektedir. Kristalin rezonans frekansı bu osilasyon döngüsünün birim zamandaki tekrarlanma sayına bağlıdır. Piezoelektrik malzemelerde frekans değişimi, ya elektrik alan uygulama yoluyla kristalde mekanik deformasyon elde ederek ya da tam tersi şekilde mekanik stres etkisinde elektriksel polarizasyon oluşturma yoluyla elde edilebilir. Bu şekilde kristalde bulunan negatif ve pozitif yüklü iyonlar, osilasyon sebebiyle yük dağılımına sebep olmakta ve polarizasyon oluşmaktadır. Sonuç olarak, kristalin yeni salınım frekansı ile rezonans frekansı arasında oluşan kaymadan kaynaklanan enerji farkı elektriksel yük dolayısıyla elektriksel alan oluşturmakta ve oluşan bu elektrik alan da kristalde mekanik salınımına sebep olmaktadır. Kuvars kristallerin kristal kesimleri birbirinden farklılık göstermekte ve kesimlerdeki bu farklılık kristalin özelliklerini etkilemektedir. Sensör uygulamalarında genellikle AT-/BT-kesim kuvars osilatörler kullanılmaktadır [76,85].

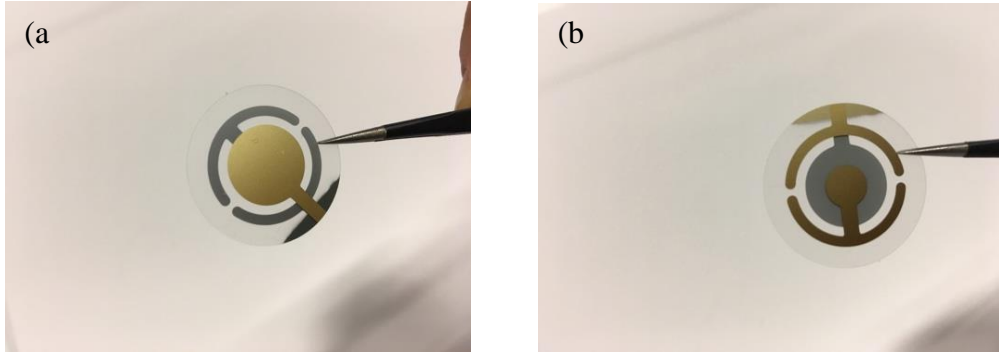
PZT elektrotların yüzey filmleri ve elektronik bağlantıları, elektriksel kaplama ve püskürtme (sputtering) ile yapılır. Temel çalışma mekanizmasında osilatör elektrotlar arasındaki kristalin merkez bölgesi maksimum genlikli vibrasyonun oluşmasını

sağladığından dolayı kütle hassasiyeti kristalin merkezinde maksimumdur. Merkezden uzaklaştıkça rezonans frekansı uzaklıkla ters orantılı olarak azalmakta ve belli frekanslar sönümlenmekte(damping), kristalin kenarlarında ise osilasyon gerçekleşmemektedir. Kapasitans etkisini azaltmak için elektrotlar birbirinden farklı boyutlarda üretilmektedir. Küçük olan elektrot, elektriksel piezoaktif alana karar verir [16,86].

Biyosensör sistemlerde kullanılan PZT özellikteki kristallerin çalışma prensiplerini özetlersek, elektrot yüzeyine yapılan modifikasyonlar ve/veya biyolojik etkileşimler neticesinde PZT kristal yüzeyine etki eden basınç, kristal örgüsünün oryantasyonunun değişmesine yol açmaktadır. Bu değişim, piezoelektrik çevirici yardımıyla farklı formlardaki dalgalara dönüştürülür. Kristalin temel rezonans frekansındaki kayma PZT çeviricinin dönüştürdüğü dalganın frekansıyla kıyaslanarak elektrot modifikasyonu veya biyolojik etkileşim hakkında bilgi edinilir. Piezoelektrik çeviricilerin biyosensör alanında kullanımına yönelik yapılan araştırmalar, bu sistemlerin biyokimyasal reaksiyonları doğrudan, düşük maliyetli olarak tespit edilebildiğini göstermektedir. QCM, QTF ve yüzey akustik dalga (SAW) sensörlerinin temelini PZT çeviriciler oluşturur [80,85,87].

Kuvars kristal mikroterazi veya başka bir deyişle kuvars kristal mikrobals (QCM), biyosensörlerde sıklıkla kullanılan bir çevirici türüdür. Temel olarak tersinir haberleşen osilator devre ve piezoelektrik kristalden oluşur. Rezonatörün frekansındaki değişimi ölçerek elektrot yüzeyinde birim alandaki kütle değişim miktarının hesaplanması amacıyla kullanılır. Kristal modifiye edilmiş ve edilmemiş hallerde belirli bir kalite faktörüne (Q) sahiptir. Akustik rezonatörün yüzeyinde gerçekleşen küçük kütle değişimleri kalite faktörünü etkileyerek kristal atomlarının rezonans frekansında kaymalara neden olur. Bu şekilde ara yüzeydeki viskoelastik değişimler ve yüzeydeki kütle değişimleri hassas olarak algılanabilmektedir. Kalınlık-kesme modlu ve yüzey akustik dalga (SAW) kütle hassas detektörü olan QCM (Şekil 1.14), elektrodun aktif yüzeyine tutunan bileşenlerin rezonans frekansına etkisini ve elektrot-sıvı ara yüzeyindeki tüm değişimleri ölçmeyi sağlamaktadır. QCM, vakum altında, gaz fazında ve sıvı ortamlarda kullanılabilir. Vakum ortamında kullanılan ince film biriktirme sistemlerinde film kalınlığının takibinde faydalıdır. Sıvı ortamlarda ise, tanıyıcı biyolojik ajanlarla fonksiyonelleştirilmiş yüzeylerin analitlerine karşı afinitelerini belirlemede oldukça etkilidirler ve bu nedenle biyomoleküler etkileşimleri incelemek için kullanılmaktadırlar [88]. Sensör ve

biyosensör alanında, 10–15 mm çapında ve 0,1–0,2 mm kalınlığına sahip AT-kesim kuvars diskler kullanılmaktadır. Bu diskler genellikle gümüş ya da altın ince filmle kaplıdır ve modifiye edilmemiş halde 6-20 MHz rezonans frekansına sahiptirler.

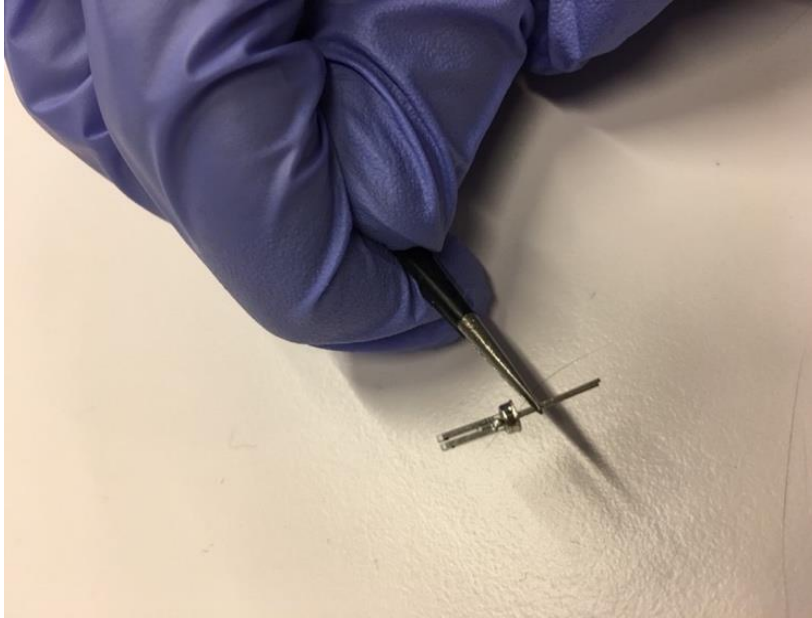


Şekil 1.14 : Kuvars kristal mikroterazi (QCM) (a) üst yüzeyi (b) alt yüzeyi [16].

QCM’de frekans kayması (f) ve kütle değişimi (Δm) arasındaki ilişki Newtoniyen akışkanlar için Sauerbrey denklemleri (4) ile hesaplanır [89].

Denklemlerde f_0 ; temel rezonans frekansını, A ; kristal yüzeyinin alanını, ρ ; kuvars yoğunluğunu, μ ; kesme katsayısını göstermektedir.

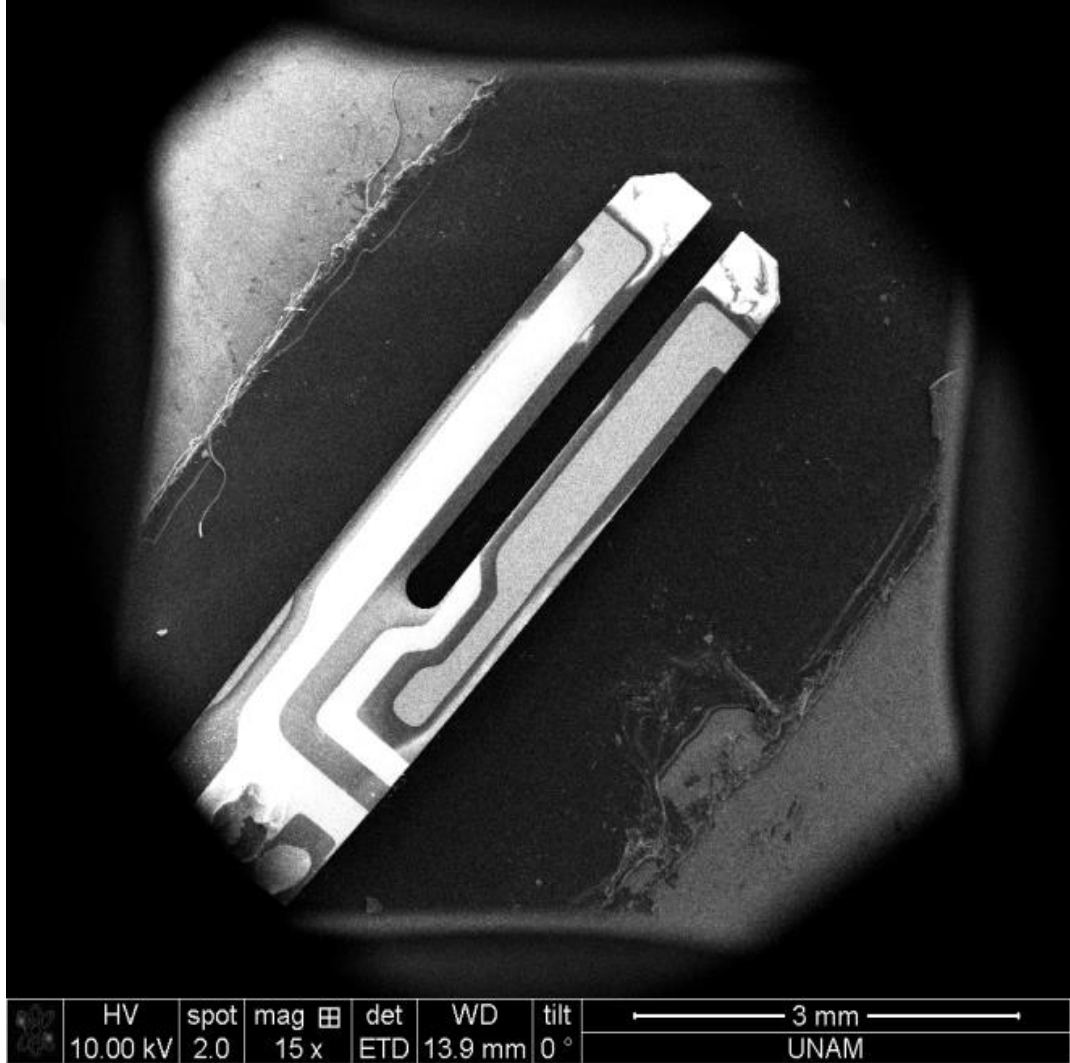
$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu\rho}} \Delta m \quad (4)$$



Şekil 1.15 : Kuvars ayar çatalı [16].

QTF (Şekil 1.15), yüksek kararlılık, yüksek kalite faktörü, gelişkin hassasiyet ve düşük güç tüketimi gibi özellikleri sebebiyle frekans değişimlerinin ölçümlerinde yaygın olarak kullanılan bir rezonatör haline gelmiştir. QTF rezonatörler hem piezoelektrik hem de ters piezoelektrik etkileri birlikte gösterirler. QTF’in iki yüzünde toplamda 8

adet metal kaplamaya sahip yüzey ve bu metal yüzeylere bağlı iki adet elektrot bulunmaktadır [90]. Bu elektrotlar kullanılarak, QTF'in simetrik ve sürekli vibrasyonlar sonucunda oluşturdukları polarizasyon voltajı ölçülmektedir. Öte yandan bu elektrotlar, ters piezoelektrik etkiyi kullanarak QTF uçlarına uygulanan polarizasyon voltajı etkisinde oluşan titreşim hakkında da bilgi vermektedirler. Şekil 1.16'da QTF'e ait SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1.16 : Kuvars ayar çatalı SEM görüntüsü [16].

Özetle, vakum altında 32.758 Hertz büyüklüğündeki frekansla titreşen QTF çatalı dekapülasyon sonrasında farklı bir ortamla etkileştirildiklerinde, etkileştirildikleri ortamın özelliklerine bağlı olarak çatal üzerinde net bir kuvvet oluşmakta ve oluşan bu kuvvet QTF'in doğal rezonans frekansında kaymaya sebep olmaktadır. Bu frekans kayması aynı zamanda kalite faktörünün de değişimine sebep olmaktadır ($Q_{\text{vakum}} \leq 100.000$ ve $Q_{\text{hava}} \leq 10.000$) [15,87].

Ayrıca, QTF çatalları numune yüzeyine yaklaştıkça piezoelektrik etki nedeniyle QTF uç-örnek arasındaki atomik kuvvette değişim oluşmakta ve bu kuvvet değişiminin yüklerin vibrasyonunu etkilemesi sonucunda da elektriksel sinyal açığa çıkmaktadır. Bu geri dönüşümlü mekanizma, QTF'lerin kuvvet sensörü olarak çalışma prensibini açıklamaktadır. Geçtiğimiz yıllarda QTF'ler, sahip oldukları yüksek mekanik kalite faktörleri, pN seviyesindeki kuvvet değişimlerini ölçebilmeleri ve Angström seviyesinde çözünürlük sağlamaları gibi gelişkin özelliklerinden dolayı AFM, SPM uygulamalarında sensör elementi olarak kullanılmaktadırlar [15,91].

QTF'lerin özellikle gaz sensörü olarak kullanıldığı çalışmalara literatürde rastlansa da biyosensör alanında kullanımları yaygın değildir [92–95]. QTF tabanlı biyosensörlere ait ilk çalışmalar grubumuzca yapılmış, üretilen immünosensörün doğrusallık sınırı 1–200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ ve hassasiyeti 0,3891 Hz/ μM bulunması sonucunda QTF' in fenilketonüri hastalığının erken tanısında biyosensör olarak kullanılabilceği deneysel olarak gösterilmiştir [16].

Sensörün sinyal performansı, çevirici yüzeyinin modifikasyonu sonucunda geliştirilen biyolojik tanıyıcı tabaka ile doğrudan ilişkilidir. Piezoelektrik etki prensibini temel alan dönüştürücülerde, elektrot yüzeyine yapılan modifikasyonlar özellikle kalite faktörünü doğrudan etkileyerek, sinyal kalitesini ve sistemin performansını belirlemektedir. Bu kapsamda geçtiğimiz yıllarda, sensör yüzeyleri: iletken polimerler, nanofiberler, nanoparçacıklar, karbon nanotüpler, grafen oksit vb. malzemeler ile modifiye edilerek sensör performansının artırılması amaçlanmıştır [88,96–98]. Bu kapsamda, doktora tez çalışmasının ilk bölümünde, QTF yüzeylerinde biyolojik tanıyıcı tabaka oluşturulması amacıyla çevirici yüzeylere, amiloid forma indirgenmiş BSA nanofiberler modifikasyonu yapılmıştır. İkinci bölümde ise SPGE çalışma elektrodu yüzeyleri sistemin fonksiyonel altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiştir. Bu modifikasyonlar sonucunda, dönüştürücü yüzeylerinin yüzey alanı/hacim oranlarının artırılması ve böylece biyolojik ajan immobilizasyon kapasitesinin geliştirilerek düşük ölçüm limitinde yüksek ölçüm hassasiyetine sahip sensörlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

- **Termal çeviriciler:** Termal çeviriciler, termometre, termopil veya termistör gibi fiziksel çeviricilerden oluşmakta ve ekzotermik tepkimelerde oluşan ısı değişimlerini ölçme prensibi ile çalışmaktadırlar. Analitik çözelti kalorimetrisinde enstrümanlar; ısı iletimi, izoperibol kalorimetre ve izotermal kalorimetre şeklinde sınıflandırılmaktadır [99]. Sistemin biyokimyasal tepkimelere verdiği cevap, ürünlerdeki molar entalpi

değişimine, termokimyasal katsayısına ve sistemde oluşan sıcaklık değişimine bağlıdır.

Katalitik doğasından dolayı, enzimatik tepkimelerin molar entalpisi diğer tepkimelere kıyasla daha yüksektir. Bu nedenle termistör çeviriciler, kalorimetrik tabanlı biyosensörler kapsamında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevre ile ısı yalıtımının iyi yapılması durumunda gösterdikleri yüksek hassasiyet ve küçük boyutları tercih edilmelerinin diğer sebepleri arasında sayılabilir [71].

1.4.2 Biyosensör karakteristik özellikleri ve performans parametreleri

Farklı tür biyosensörler farklı karakteristik özelliklere, avantaj ve dezavantajlara sahip olabilmektedir. İdeal bir biyosensörden beklenen karakteristik özellikler aşağıda sıralanmıştır [100,101].

- *Analit özgünlüğü (specificity) ve seçicilik (selectivity)*: Özgüllüğü yüksek bir analizde, hedef analit ile hedef olmayan benzer yapıdaki biyolojik ajanlar arasında yüksek ayırıcılık olmalıdır ve pozitif hata oranı azdır. Biyosensör cihazı, hedef analit için yüksek seçiciliğe sahip olmalı ve benzer kimyasal yapıya sahip biyolojik ajanlara hiçbir şekilde çapraz reaktivite göstermemeli ya da minimum düzeyde göstermelidir.
- *Cevap süresi*: Biyosensörün etkin bir şekilde çalışabilmesi için hedef analitin gerçek zamanlı izlenmesi tercih edilir. Buna ek olarak, analiz süresinin mümkün olduğunca kısa olması ve biyosensörün yeniden kullanılabilirliği için iyileşme (recovery) süresinin kısa olması gerekmektedir.
- *Duyarlılık (sensitivity)*: Duyarlılığı yüksek bir analiz, hedef analitin daha düşük derişimlerde tespit edilebilmesine imkân vermekte, negatif hatayı azaltmaktadır. Ayrıca, reaksiyonun, karıştırma, pH ve sıcaklık gibi kontrol edilebilir fiziksel parametrelerden bağımsız olması gerekmektedir. Biyosensör cihazıyla ölçüm yapılırken örneklerin ön temizliği gibi modifikasyon işlemlerinin olabildiğince az olması gerekmektedir. Eğer reaksiyon koenzim ya da kofaktörler içeriyorsa, bunların tercihen enzimle birlikte ko-immobilize halde bulunması gerekmektedir.
- *Tekrarlanabilirlik (repeatability) ve yeniden üretilebilirlik (reproducibility)*: Tekrarlanabilir ölçüm yapılabilmesi için; aynı konsantrasyonlara sahip örneklerin, birden fazla kez test edildiklerinde her seferinde aynı sonucu vermeleridir. Biyosensörün kolay kalibre edilebilmesi, güvenilir analiz yapabilmesi için tekrar üretilebilir olması gerekmektedir.

- *Doğruluk (accuracy)*: Bir biyosensör pozitif ve negatif hataları minimum olacak şekilde doğru ölçüm yapmalıdır. Yanıtların; kesin, hassas, tekrarlanabilir ve doğrusal olması gerekmektedir. Ayrıca, elde edilen sinyalin elektriksel gürültüden arındırılmış olması gibi özellikler de oldukça önemlidir.
- *Dayanıklılık (robustness) ve kararlılık (stability)*: Bir biyosensör: sıcaklık, nem, pH, elektronik girişimler gibi çevresel faktörlerden etkilenmemelidir. Özellikle depolama koşulları altında stabil olmalı ve fazla sayıdaki analizlerde yüksek dayanıklılık ve kararlılık göstermelidir. Biyolojik bileşenlerin çoğu, değişen biyokimyasal ve çevresel şartlarda kararlılık göstermemektedirler. Bu nedenle, biyolojik elementlerin aktivitelerinin uzun süre korunması, biyosensörlerin pratikte kullanılabilir hale getirilerek pazarlanabilmeleri açısından önemlidir.
- *Yenilenebilirlik (Recovery) ve maliyet*: Düşük maliyetli sensörlerin tek kullanımlık olmaları yeterli olsa da aynı sensörün yenilenebilir olması sonucunda çoklu ölçüme olanak tanınması tercih edilmektedir. Ek olarak, üretim maliyetlerinin düşük olması, biyosensörlerin daha geniş çaplı uygulama alanı bularak yaygınlaşmaları açısından önemlidir.
- *Kullanım kolaylığı ve taşınabilirlik*: İdeal olarak tam otomatik, ucuz, küçük ve taşınabilir olan sistemler tercih edilmektedir. Ayrıca sistem arayüzünün kalifiye olmayan operatörler tarafından kullanılabilir düzeyde olması gerekmektedir.
- *Boyut ve ağırlık*: Biyosensörlerin taşınabilir olması genellikle saha uygulamalarında kullanımlarını kolaylaştırmak açısından tercih edilmektedir. Ek olarak küçük boyutlarda tasarlanan minyatürize edilmiş biyosensör cihazlar, başka cihazlarla entegre edilerek kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

Yukarıda bahsi geçen karakteristik özelliklerin yanı sıra, kalibrasyonu yapılan biyosensöre ait özellikler de biyosensörlerin performanslarını tanımlamak açısından oldukça önemlidir. Kalibrasyon karakteristikleri: hassasiyet, tespit limiti (limit of detection, LOD), tayin limiti (limit of quantification, LOQ) çalışma ve doğrusal ölçüm aralığı (LDL) gibi alt parametreler bağlamında incelenir.

Sensör kalibrasyonu, biyosensörün önceden belirlenmiş konsantrasyonlarda hedef analit içeren standart bir çözelti ile etkileştirilmesi sonucu yapılan ölçümlerle gerçekleştirilmektedir. Değişen analit konsantrasyonuna karşı sensörün yanıtı test edilerek grafik haline getirilir ve kalibrasyon eğrisi elde edilmektedir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal kısmının eğimi hassasiyeti vermektedir. Hassasiyet, birim analit derişimindeki değişime karşı elde edilen cevabın büyüklüğü cinsinden ifade

edilmektedir. Farklı biyoalgılama materyalleri ve çevirici cihazların tipine bağlı olarak bir biyosensörün hassasiyetini etkileyen birçok parametre bulunmaktadır [96,97].

Biyosensöre ait LDL, alt ve üst ölçüm seviyelerinin doğrusallığa sahip bölümü olarak tanımlanmaktadır. LOD ise, ortamda analitin varlığında oluşan gürültüden istatistiksel olarak belirgin şekilde farklı olan sinyal olarak tanımlanmaktadır ve biyosensörün kalitesini gösteren önemli bir faktördür. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen standart sapmanın, kalibrasyon eğrisinin lineer regresyon değerine göre 3,3 ($R^2 \sim 0,98$ ise) veya 2 katı ($R^2 \sim 0,95$ ise) alınarak hesaplanır. Biyosensörün LOQ değeri ise genellikle LOD'den 5 kat daha yüksektir. Tespit limiti ayrıca tanımlanmış sinyal/gürültü (S/N) oranı baz alarak da belirlenmektedir. Tespit limitinde gürültü de değerlendirildiğinden hassasiyet ile karıştırılmamalıdır [102].

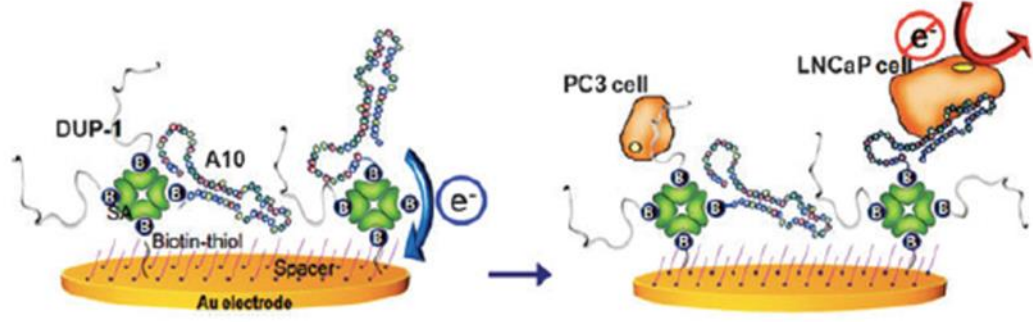
1.4.3 Prostat kanseri teşhisinde PSMA tabanlı biyosensörler

Prostat kanseri (PK), akciğer kanserinden sonra en sık gözlemlenen orta yaş üstü erkeklerde oldukça yaygın ve tehlikeli olan kanser türlerinden biridir. Bu nedenle bu hastalığın doğru teşhisi ürologlar ve hastalar açısından büyük önem taşımaktadır. Klinik testlerde, bu hastalığın FDA tarafından belirlenen biyobelirteç olan PSA testi yapılmakta, PRM, TRUS ve biyopsi sonrasında hastalığın evresi Gleason Skoru ile belirlenmektedir. Fakat, PSA ölçümünü temel alan tanı yönteminin yetersizliği, prostat spesifik olmasına rağmen prostat kanserine spesifik olmamasıdır [2,17]. Özellikle artan yaşla, prostat büyümesi ve/veya iltihaplanması gibi durumlarda da kandaki PSA seviyesinin yükselmesi, yüksek oranda yanlış-negatif biyopsi sonuçları ile karşılaşılmasına dolayısıyla da hasta konforunun bozulmasına sebep olmaktadır. Aksi durumda gözlemlenen düşük PSA seviyesi ise her zaman kanser olmadığı anlamına gelmemektedir. Geleneksel klinik uygulamalarda kullanılan ELISA, FIA, CIA gibi kantitatif yöntemlerde PK teşhisinde yeterince hassas sonuç vermediğinden, karşılaşılan yanlış-pozitif /negatif sonuçları engellemek için geleneksel tanı yöntemlerine alternatif olabilecek ya da tanı destekleyici olarak kullanılacak yeni stratejiler araştırılmaktadır [106]. Kanser vakalarının ve geç tanı kaynaklı ölümlerin artması nedeniyle düşük maliyetleri, analit özgüllüğü, ölçüm doğruluğu ve hassasiyetleri ile biyosensörler kanser tanısında geçtiğimiz yıllarda ön plana çıkmıştır [104–106]. Günümüze kadar prostat kanserinin erken ve/veya ayırıcı tanısında kullanılmak üzere birçok biyosensör cihaz geliştirilmiştir. Geliştirilen bu cihazların çoğunun PSA ölçümüne yönelik olmaları ve PSA'nın prostat kanserine değil prostatla

ilişkili her türlü anomalide artış göstermesi nedeniyle PSA ölçümüne yönelik geliştirilen immünojenik testler ve biyosensörler, prostat kanserinin doğru/ayırıcı tanısında kullanıma uygun değildir [107]. Bu nedenle PK teşhisinde, hücre örneklerinde ve vücut sıvılarında bulunan sadece prostat kanserine spesifik olan RNA, DNA veya protein yapısındaki biyobelirteçlerin ölçümünü hedef alan biyosensörler geliştirilmektedir. Örneğin, Xiao ve diğ. (2001) tarafından yapılan ELISA testi ile, serum PSMA seviyesinin, sağlıklı kontrol gruplarında ortalama 272,9 ng/mL (yaş<50) ve 359,4 ng/mL (yaş>50) ölçüldüğü, prostat kanseri durumunda ortalama 623,1 ng/mL değerine yükseldiği, BPH durumunda ise ortalama 117,1 ng/mL seviyesine düştüğü rapor edilmiştir [10]. Elde edilen bu verilere dayanarak, PSMA'nın prostat kanserinin ayırıcı tanısında kullanımına uygun bir biyobelirteç olduğuna ve bu doktora tezi kapsamında geliştirilecek prostat kanseri immünosensörünün PSMA protein/ PSMA ekspresyonu gösteren hücrelerin ölçümüne yönelik olacak şekilde tasarlanmasına karar verilmiştir.

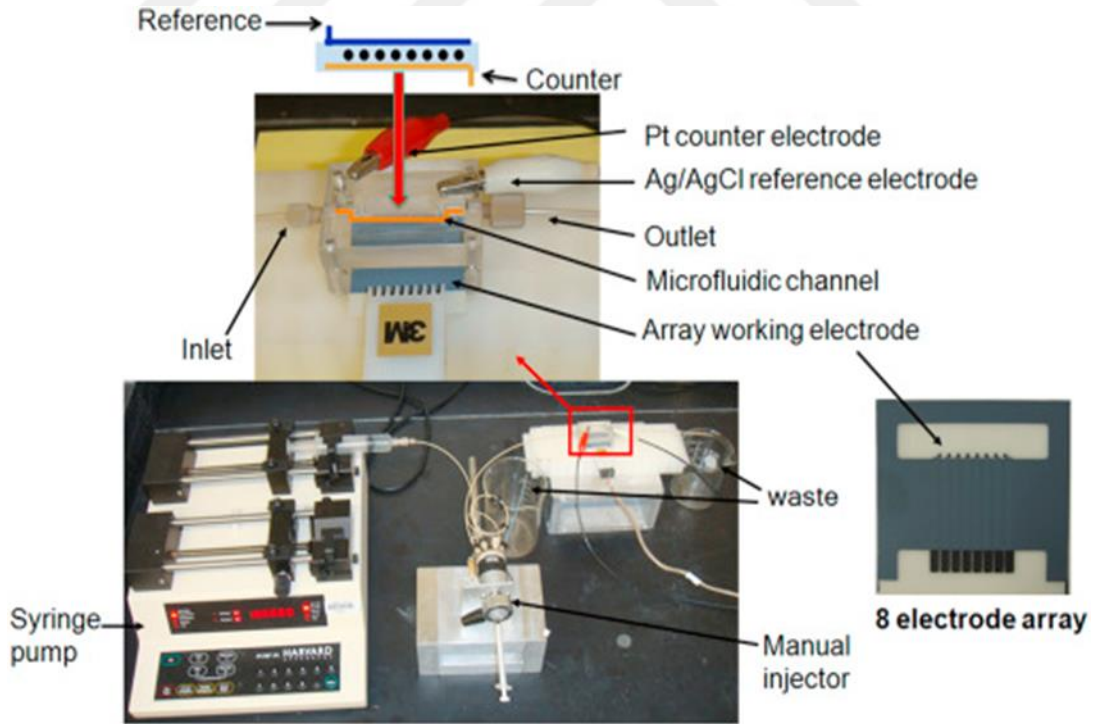
Literatürdeki PSMA tabanlı biyosensör çalışmaları oldukça sınırlı olmakla birlikte, yayınlanan çalışmaların büyük bir kısmını elektrokimyasal tabanlı biyosensörler oluşturmaktadır. Örneğin, Chikkaveeraiah ve diğ. (2009), tek-yüzü modifiye edilmiş elektrokimyasal tabanlı immünohatları (immunoarray) karbon nanotüp (CNT) ile modifiye ettikten sonra insan serum örneklerinde PSA, PSMA, platelet faktör-4 (PF-4) ve interlekin-6 (IL-6) taraması yapmışlardır. PSA, PSMA, PF-4 ve IL-6 için lineer ölçüm limitleri sırasıyla: 1–40 ng.mL⁻¹, 10–250 ng.mL⁻¹, 1–40 ng.mL⁻¹ ve 50–500 pg.mL⁻¹ olarak hesaplamışlardır [108].

Min ve diğ. (2010), A10 RNA aptamer ve DUP-1 peptid aptamer konjugasyonu sonucunda RNA/peptid aptamer proflu altın elektrot (Şekil 1.17) geliştirerek prostat kanseri ekspresyonu gösteren/göstermeyen hücre hatlarında PSMA (+) ve PSMA (–) ölçümü gerçekleştirmiştir. Bu kapsamda, biotin-tiol, streptavidin (SA), A10+DUP-1 aptamerleri, BSA ve prostat kanser ekspresyonu gösteren hücre ortamlarında test edilmiştir. RNA/peptid aptamer probu ile modifiye edilen altın elektrodun yük transfer direncindeki değişimler, EIS analizleri ile elde edilen Nyquist eğrileri ile takip edilmiş ve prostat kanser hücrelerinin varlığında yük transfer direncinde maksimum azalma gözlemlenmiştir [109].



Şekil 1.17 : Min ve diğ. (2010) tarafından geliştirilen RNA/peptit aptamer modifiye altın elektrot [109].

Akter ve Arrigan (2016), PSMA saptanması için geliştirdikleri mikroakışkan kanallı elektrodun arayüzeyinde, PSMA'nın proteolizi sonucu açığa çıkan ve enzimatik olarak katalizlenen proteolitik ürünü kullanmış ve proton destekli iyon transferi fenomeninden yola çıkarak pM konsantrasyonlardaki PSMA miktarını tayin etmişlerdir. Voltametrik analizler sonucunda, PSMA için lineer ölçüm aralığı: 0,117–1,17 nM ve LOD: 69 pM olarak hesaplanmıştır [61].

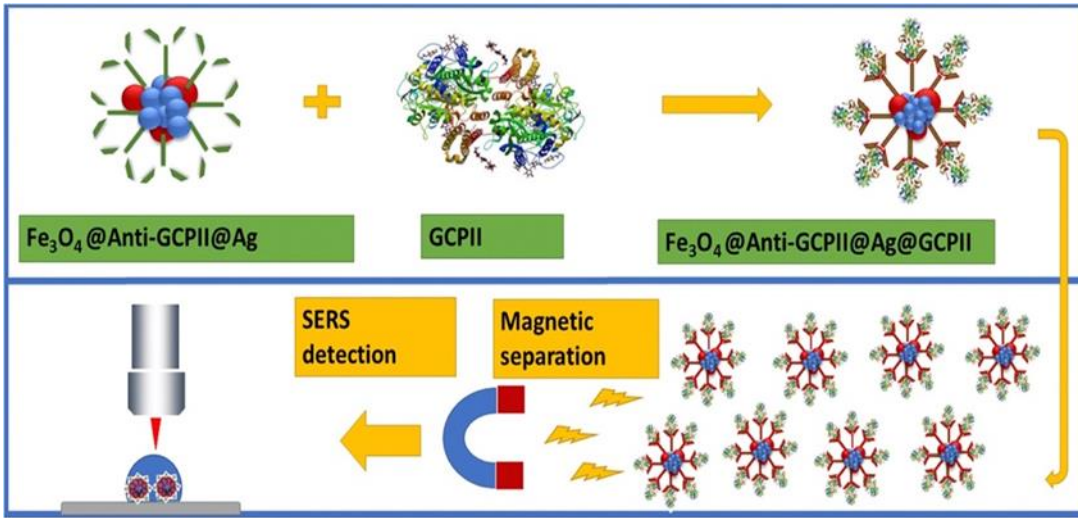


Şekil 1.18 : Akış sistemine bağlı Fe₃O₄-ERGO modifiye 8-hatlı SPE tabanlı mikroakışkan kanallı biyosensörün gösterimi [62].

Sharafeldin ve diğ. (2017), elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit (ERGO) tabakaların üzerine dekore ettikleri Poli (dimetil dialil amonyum klorür) (PDDA) kaplı

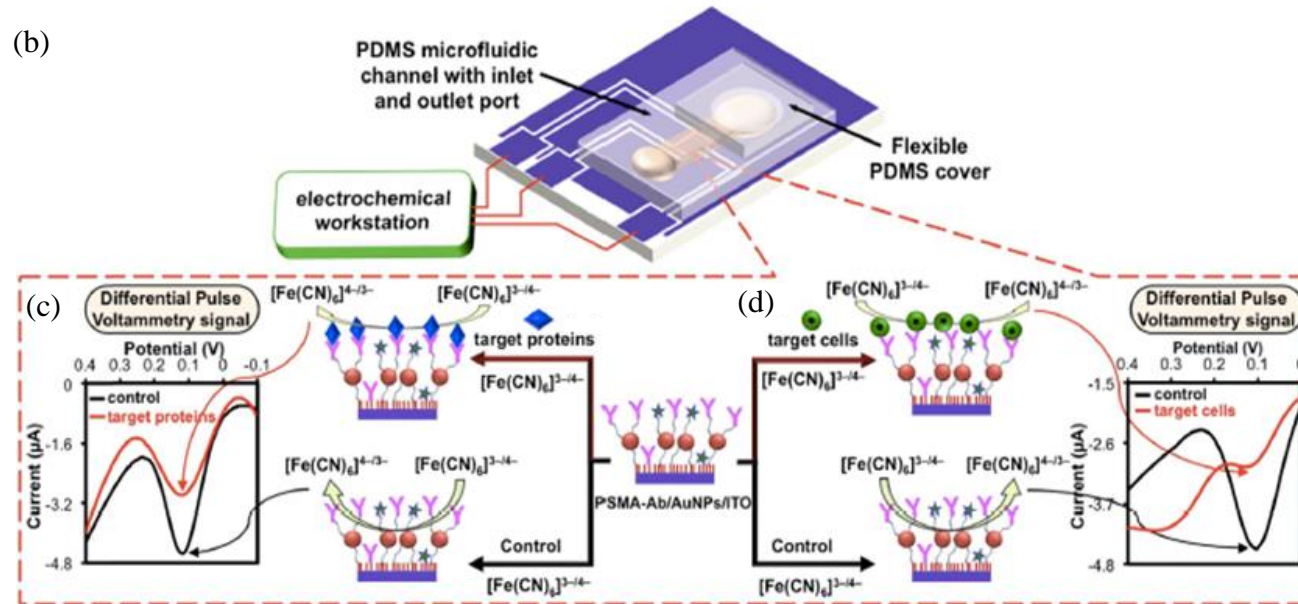
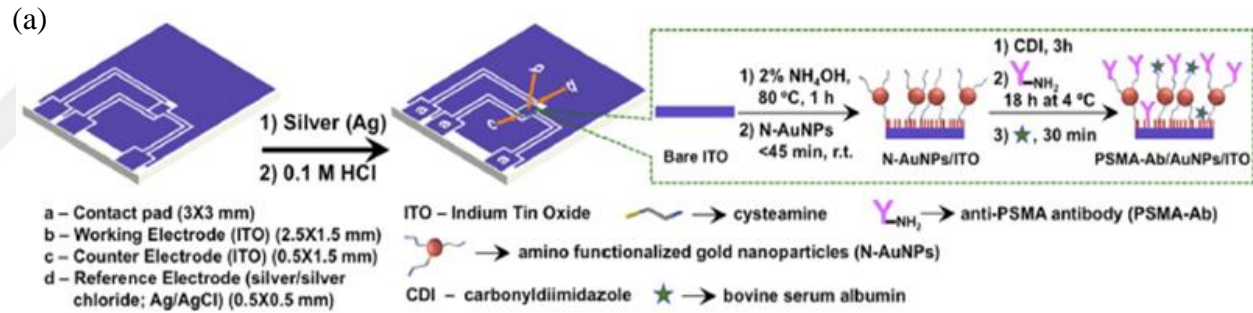
manyetit (Fe_3O_4) nanoparçacıklarını kullanarak geliştirdikleri mikroakışkan tabanlı biyosensör aracılığıyla serum ortamında PSA ve PSMA ölçümü yapmışlardır (Şekil 1.18). Bahsi geçen biyosensörün LOD değeri PSA ve PSMA için sırasıyla 15 fg/mL ve 4,8 fg/mL olarak rapor edilmiştir.

Chaloupková ve diğ. (2018), Fe_3O_4 ve gümüş (Ag) nanoparçacıklarıyla dekore ettikleri nanokompoziti düşük moleküler kütleli ve sentetik antikor PSMA (a-GCPII/a-PSMA) ile fonksiyonelleştirmişlerdir. Manyetik alan destekli-yüzey güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (MA-SERS) yöntemi ile kan örneklerinde PSMA ölçümü gerçekleştirmişlerdir. Ölçümleme limiti 6 pmol/L olarak belirlenen biyosensörün LOD değerinin ise 0,48 ng/mL olduğu ve sensörün sinyal stabilitesini 21 gün boyunca koruduğu rapor edilmiştir (Şekil 1.19) [60].



Şekil 1.19 : Chaloupková ve diğ. (2018) tarafından geliştirilen Fe_3O_4 ve Ag modifiye biyosensörün üretim basamakları [60].

Seenivasan ve diğ. (2017), indiyum oksit (ITO) substratları polidimetilsiloksan (PDMS) ile desenleyerek ardından altın nanoparçacıkla modifiye etmişlerdir. PSMA ölçümüne yönelik tasarlanan bu mikro-akışkan kanallı biyosensöre, 40 μL hacimli PSMA protein/hücreleri içeren fizyolojik sıvılar yüklenerek sinyal değişimi elektrokimyasal olarak test edilmiştir. Ölçüm sonucunda hesaplanan LOD ve LDL değerleri PSMA proteinleri için 12,5 ng/mL ve 19–6,25 ng/mL, PSMA ekspresyonu gösteren hücreler için ise 150 hücre/mL ve 375–10.000 hücre/mL olarak hesaplanmıştır [6]. Seenivasan ve diğ. (2017) tarafından geliştirilen mikro-akışkan kanallı biyosensörün üretim basamakları ve PSMA proteini ile prostat kanseri ekspresyonu gösteren hücre örneklerinin testinde kullanılan elektrokimyasal ölçüm basamakları Şekil 1.20’de özetlenmiştir [6].



Şekil 1.20 : Seenivasan ve diğ. (2017) tarafından geliştirilen mikro-akışkan tabanlı PSMA biyosensörünün (a) üretimi, (b), (c) ve (d) protein ve hücrelerin elektrokimyasal analizleri [6].

1.5 Yüzey Analiz Teknikleri

1.5.1 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

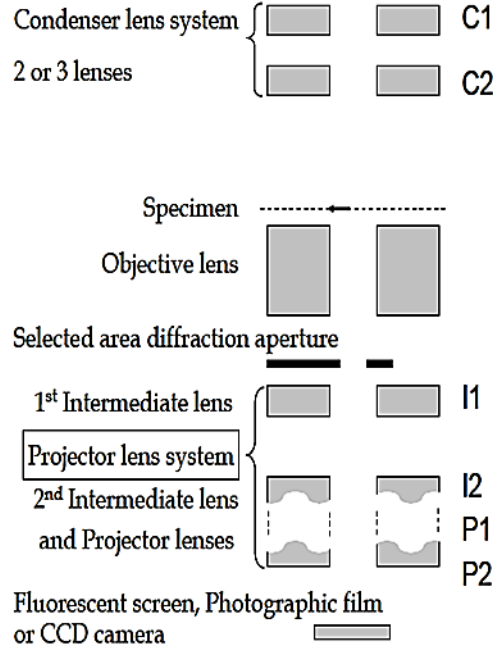
Geçirimli Elektron Mikroskobisi (TEM), görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro ve kristal yapılarının belirlenmesini sağlayan bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Temel olarak, hedef malzemenin hızlandırılan paralel elektron demeti ile etkileşimi sonucunda, örnekten doğrudan geçen kırınımına uğramamış ışınları ve numunenin belirli düzlemlerinden Bragg yasasına uygun açılarda kırınımına uğramış ışınları numunenin altında toplayarak görüntü oluşturma esasına dayanır. Oluşan 2-boyutlu görüntü odaklanıp büyütülür ve ekrana yansıtılarak son görüntü oluşturulur. Ekran, floresan ekran, fotografik film veya yük-eşlenmiş sensör (CCD) olabilir. Aydınlık alan görüntülerinde sadece geçen ışın demeti kullanılarak, karanlık alan görüntülerinde ise kırınımına uğramış ışınlardan biri kullanılarak numunelerdeki mikron altı boyutlardaki oluşumlar incelenebilir ve fazlar ayırt edilebilir [110].

Bu yöntem ışık mikroskobu ile benzer olmasına rağmen, elektronların de-Broglie dalga boylarının küçük olmasından dolayı ışık mikroskobuna kıyasla oldukça yüksek çözünürlüğe sahiptir. Örneğin, nano boyutta ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelerde malzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılabilir. Yüksek büyütmelerde kompleks dalga etkileşimleri görüntünün intensitesini etkilerken, büyütme oranı az olduğunda görüntüdeki kontrast örnek kompozisyonu ve kalınlığına bağlı olarak örneğin elektronları absorblamasıyla oluşur. TEM cihazı farklı modlarda kullanılarak kristal oryantasyonlarındaki modülasyonlar, elektronik yapı, kimyasal özellikler ve elektron faz kaymaları hakkında bilgi edinilmektedir. TEM cihazı, fizik ve biyoloji uygulamalarında araştırma ve geliştirme amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca bu teknik, kanser araştırmaları ve malzeme konularında da uygulama alanlarına sahiptir [110]. Geleneksel bir TEM cihazı temel olarak üçlü lens çifti içerir. Bu lens çiftlerinden birincisi elektron tabancasından gelen ve elektronları odaklamaya yarayan yoğunlaştırıcı (condenser 1 ve 2:C1 ve C2) lensler olarak isimlendirilir. İkinci lens çifti olan objektif lensler ise, örneğe ait ilk görüntüyü oluşturarak ardından gelen lenslere aktarır. Üçüncü lens sistemi ise, 4 ayrı lensten oluşur ve projektör lens adını alır. Tüm bu lenslerden geçen elektronlar ekran üzerine yansıtılarak son görüntünün oluşumu sağlanır. TEM cihazında görüntü örnekten geçen

elektronlar tarafından oluşturulurken, SEM cihazında yansıyan elektronlar tarafından oluşturulur [110].

1.5.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), elektron demeti yönlendirilen numune yüzeyinden yüksek çözünürlükte 3-boyutlu görüntü almayı sağlayan sistemlerdir. 1930 yılında Manfred Ardenne bu yöntemin bulunuşuna öncülük etmiş, Charles Oatley ise SEM cihazını ilk olarak ticari hale getirmiştir. SEM cihazı TEM cihazına benzer şekilde elektron optik kolonu, vakum sistemi, elektronik kısım ve yazılımdan oluşur (Şekil 1.21). Kolon TEM'e kıyasla daha küçüktür çünkü örnek üstündeki lensler, elektronu ince bir noktadan geçirerek örneğe odaklamak için gereklidir. Örneğin koyulduğu hazne ise TEM cihazına göre daha büyüktür, çünkü SEM'de TEM gibi örnek boyutunda katı bir sınırlama söz konusu değildir [111]. SEM cihazı temel olarak elektron tabancası ve kontrol konsolundan oluşur. Elektron kolonu, elektron tabancası ve lenslerle örnek yüzeyine hareket eden elektronların oluşumundan, hızlandırılmasından ve örnek üzerine hızlandırılmış elektronların odaklanmasından sorumludur. Kontrol kolonu ise elektron demetinin kontrolünü sağlamaya yarar. Kolonun üstündeki elektron tabancası, numune yüzeyinde 1 nm çapında küçük bir noktaya odaklanmış ve 0,1–30 keV enerji aralığında hızlandırılan elektron demetini üretir ve düşük basınçta (10^{-4} Pa) çalışır. İki çift elektromanyetik saptırıcı bobin (scanning coil) kullanılarak elektron demetinin örnek üzerini süpürmesi sağlanır. İlk bobin çifti elektron demetini mikroskobun optik ekseninden dışarı iterken ikinci bobin çifti bu demeti eksene doğru bükür. Bu elektron demeti, numune üzerinde dikdörtgen bir ızgarada taranır ve elektron demeti ile etkileşen numune tarafından oluşturulan sinyallerin yoğunluğu ölçülerek bilgisayar belleğinde saklanır. Kaydedilen değerler daha sonra görüntü ekranındaki parlaklık değişimleri olarak eşleştirilir. İkincil elektron (Secondary electron, SE) sinyali en sık kullanılan sinyaldir. Görüntülenen görüntünün boyutun, numunede taranan alanın boyutuna oranı, büyütme oranını verir. Bu yöntemin sağladığı en büyük avantaj; ışık mikroskopuna kıyasla oldukça büyük ölçeklerde, ayrıntılı görüntü sağlamasıdır. Görüntünün siyah beyaz olmasının sebebi ise kaynak olarak elektron demetinin kullanılmasıdır. SEM'de morfolojik analiz yapılacak örneğin iletken olması gerekmektedir. Analizi yapılacak yüzey yalıtkan ise, ölçüm öncesi çeşitli yöntemlerle yüzey kaplanarak iletkenleştirilmesi sağlanır [111].

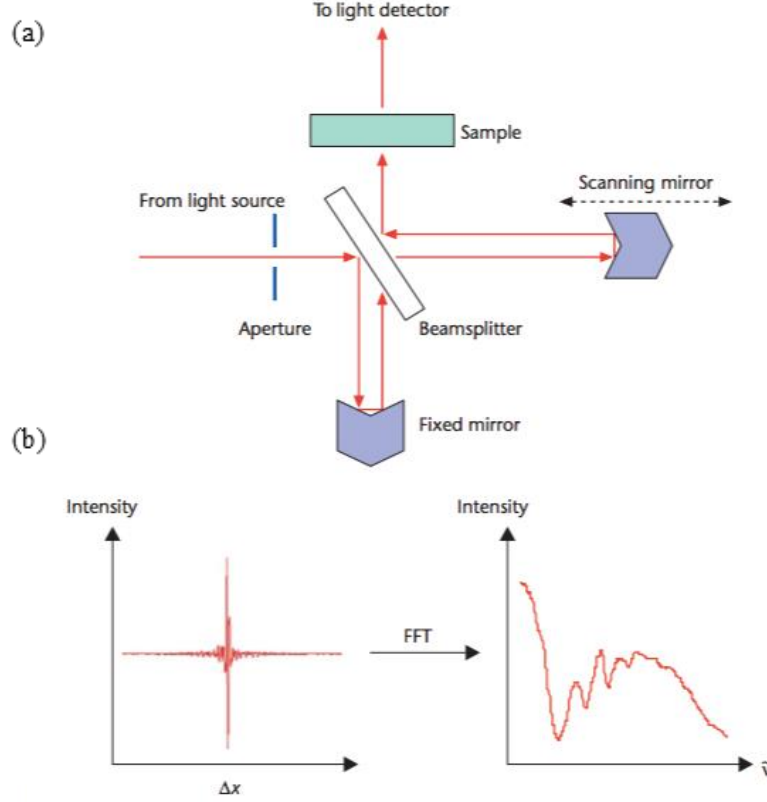


Şekil 1.21 : SEM cihazını oluşturan bileşenler [110].

1.5.3 Fourier dönüştümlü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi

FTIR cihazının temel çalışma prensibi incelendiğinde, cihaz, parlayan siyah gövdeli bir kaynaktan yayılan bir IR ışını üretir (Şekil 1.23). Daha sonra bu ışın, spektral kodlamanın yapıldığı interferometreye geçer. İnterferometrede farklı yol uzunluklarında kırılgınların rekombinasyonu, interferogram adı verilen yapıcı ve yıkıcı girişim oluşturur. Işın numune bölmesine girer ve örnek interferogramdan numunenin karakteristiği olan spesifik dalga boyundaki enerjiyi absorblar. Ardından, detektör tüm frekanslar için eşzamanlı olarak topladığı özel interferogram sinyallerini zamana karşılık gelen enerji şeklinde ölçer. Bu arada, referans (arka plan) örneği taranır ve son olarak, arzu edilen spektrum, numune spektrumundan arka plan spektrumu otomatik olarak çıkarıldıktan sonra FTIR yazılımı sayesinde bilgisayar ekranında görsel olarak ifade edilir [112].

FTIR spektrometresi geniş spektrum aralıklarında yüksek çözünürlüklü veri toplayabilir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14.000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır. Yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim 14.000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır [114]. FTIR cihazı ile kızıl ötesi bölgedeki absorpsiyon bandı incelenerek, molekül içerisinde spesifik fonksiyonel gruplar belirlenebilir.



Şekil 1.22 : (a) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresinin tipik kuruluşu (b) Fourier dönüşümü (FFT) hesaplamasından sonra elde edilen spektrum [113].

Tipik olarak, FTIR spektrumundan analiz edilebilecek dört bağ türü bölgesi vardır. Tekli bağlar (O–H, C–H ve N–H) yüksek dalga boylarında ($2500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) tespit edilebilirken, çift ve üçlü bağ içeren fonksiyonel gruplar ise, sırasıyla $1500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ ve $2000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ dalga numarası bölgelerinde tespit edilir. Ek olarak çoğu molekül karakteristiğine bağlı olarak $650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ düşük dalga sayım bölgesinde olan bir titreşim, molekülün tanımlaması amacıyla kullanılmaktadır [112]. Şekil 1.23, basit bir FTIR cihazının ana bileşenlerini (Şekil 1.23a) ve ilişkili spektrumu (Şekil 1.23b) şematik olarak gösterilmektedir.

1.5.4 Ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) moleküler absorpsiyon spektroskopisi

Absorbans spektroskopisi veya spektrofotometrinin temel amacı, belirli bir malzeme tarafından emilen veya iletilen ışık miktarının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak nicel olarak ifade edilmesidir. Bu sayede analizi yapılan malzemede atomik seviyede gerçekleşen elektronik geçişler hakkında bilgi edinilebilir. İzole edilmiş atomlar durumunda sadece elektronik geçişler meydana gelirken, moleküller söz konusu olduğunda dönme ve titreşim hareketleri de gerçekleşmektedir [115].

Işık malzemeye ulaştığında, malzemeyle etkileşimi absorpsiyon (A), saçılma (S), yansıma (R) veya kırılma gibi yollarla olmaktadır. Beer-Lambert yasası tüm bu etkileşimler sonucu iletilen ışık yoğunluğunun (I) gelen ışık yoğunluğuna (I_0) oranını yani transmittansı (T) ifade etmek için kullanılır. Absorpsiyon (A) transmittans değerinin doğal logaritmasının tersi alınarak hesaplanır. Eşitlik 5 ve 6 kullanılarak, analiz edilen malzemenin konsantrasyonu hesaplanmaktadır [116]. Denklemden;

$$\frac{I}{I_0} = e^{-k_\lambda l} = T \quad (5)$$

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = A = k_\lambda l = \epsilon Cl \quad (6)$$

UV-Vis spektroskopisi, malzemelerin ışıkla etkileşim özelliklerinin incelenmesinde kullanılan bir tekniktir. Morötesi bölge 200 ile 400 nm, görünür ışık bölgesi ise 400 nm ile 800 nm dalga boyları arasındadır. UV-Vis spektroskopisi, bir Tungsten ya da döteryum ışık kaynağı kullanılarak üretilen ışın demetinin bir malzemeyle etkileşimi sonrasındaki değişiminin incelenmesini sağlamaktadır. Ayrıca yarı iletkenlerin enerji bant değerlerinin, metallere oksidasyon basamaklarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [115,117].

1.5.5 Zeta potansiyeli analizi

Bir sıvıdaki küçük parçacıkların yüzey yükünün ve süspansiyondaki dağılım mekanizmalarının belirlenmesinde dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi kullanılmaktadır. Yüzey yükü, bir partikülün elektrik potansiyelinin partikül yüzeyinden belirli bir uzaklıkta belirlenmesiyle bulunur. Partiküller, içinde bulunduğu çözöcüdeki karşıt yüklü iyonları kendine çekerek yüzeyinden dışarı doğru yayılan güçlü bir bağ yüzeyi oluşturur ve bu yüzeye "kayma yüzeyi" adı verilmektedir. Yüklü tane ve onun etrafında bulunan iyonların kayma yüzey sınırına kadar olan kısmı bir bütün olarak hareket eder. Parçacık yüzeyinden belli bir uzaklıkta olan kayma düzlemiyle yüklerin geçişinin serbest olduğu difüzyon katmanı arasındaki bölgede zeta potansiyelinin ölçümü yapılır. Zeta potansiyel değerinin büyüklüğü, süspansiyonun stabilitesi ve partikül yüzey morfolojisi ile yakından ilgilidir. Bu nedenle partiküllerin sıvı ortamdaki stabilite ve yüzey tutulum özelliklerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılır [118].

Zeta potansiyel ölçümü cihazı, partikül boyutu veya moleküler ağırlıktan farklı olarak, partikülün bulunduğu ortam hakkında da bilgi verir. Ölçüm hassasiyetini yükseltmek, örneğin bulunduğu ortamda ışık saçılımının kolaylıkla gerçekleşebilmesine bağlıdır. Bu nedenle potansiyel ölçümü gerçekleştirilecek çözeltinin derişik olmaması gerektirmektedir. Fakat çözeltileri seyreltme yoluyla elde edilen sonuçlar da partiküllerin kendi ortamlarındaki potansiyel değerlerinden farklılık göstererek kullanıcıyı yanıltabilir [118].



2. PROSTAT KANSERİ TANISINA YÖNELİK ANTI-PSMA TABANLI KÜTLE-HASSAS İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

2.1 Materyal ve Metot

2.1.1 Materyal

Elektro-eğirme çözeltisi hazırlamak için kullanılan kimyasal ajanlar: trifloroetanol (TFE) ve beta-merkapttoetanol (β -ME) Sigma'dan (ABD) temin edilmiştir. Kaveolin-1, interlökin, PSA ve folat hidrolaz PSMA ve monoklonal PSMA antikoru (mAb) Abcam'den (ABD) alınmıştır. Tampon çözeltisi hazırlamak için kullanılan tüm kimyasallar (NaCl , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) ve sığır serum albümin (SSA) ($M_a \approx 66$ kDa) Acros Organics'den (ABD) temin edilmiştir.

Elektro-eğirme işlemi, DC güç kaynağı, akış pompası ve iğne ucu (Inovenso, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplayıcı levha olarak (kolektör) alüminyum folyo kullanılmıştır. Kuvars ayar çatalları (QTF) Shoulder Crystal (Çin) firmasından temin edilmiştir. Kuvars ayar çatallarının modifikasyon sonrasındaki frekans değişimlerinin belirlenmesinde ise sensör dönüştürücü (Asensis, Türkiye) cihazı kullanılmıştır.

2.1.2 Metot

2.1.2.1 Protein çözeltisinin hazırlanması ve amiloid forma dönüşümünün gerçekleştirilmesi

Sığır serum albümin (SSA), 66.5 kDa molekül ağırlığında, 17 adet disülfid (S-S) bağı içeren, sistein zengini küresel yapıda bir proteindir. Sudaki çözünürlüğünün yüksek olması (>100 mg/mL), maliyetinin düşük olması, biyoaktif ajanları koruyarak, bu yapıların stabilitesini arttırmaları gibi özellikleri sayesinde biyoteknoloji uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinlerin denatürasyonu, protein molekülündeki yan bağların yıkılması ile polipeptit zincirinin katlarının açılması ve ardından farklı bir biçimde proteinin yeniden katlanması olayıdır. Proteinin yapısal bozulması, birincil yapıya indirgenmesi durumunda tersinmezdir ve çoğu kez hidrojen bağlarını yıkan etkilerle olur. Denatürasyona: ultrason, ısı, X- ve UV-ışınları, organik çözücüler sebep olabilmektedir. Denatürasyon sonucunda S-S bağları kırılıp ardından

farklı şekilde katlanan proteinin yapısının tersinir hale gelmemesi, başka bir deyişle bu alt birimlerin stabilize edilmesi, amiloid hale dönüşümün sağlanması ile mümkündür. Bu şekilde, mekanik özellikleri güçlendirilmiş, doğal yapılı ve suda çözünmeyen kararlı bir biyokompozit malzemenin üretilebileceği grubumuz ve diğer gruplarca yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir [96,119,120].

Elektro-eğirme yöntemi, sıvı fazdaki polimer çözeltilerini kullanarak yüksek elektrik alan etkisinde jet oluşturarak katı fazda lif üretimi yapmayı sağlayan ve yukarıdan-aşağıya üretim yaklaşımını temel alan bir yöntemdir. Elektro-eğirme işlemini gerçekleştirebilmek için, çözelti, işlem ve ortam parametrelerinin optimizasyonu oldukça önemlidir. Çözelti parametreleri incelendiğinde, konsantrasyon, viskozite, çözücü özellikleri gibi parametreler çözeltinin elektro-eğrilebilirliğini doğrudan etkilemektedir. Protein çözeltileri, yapısındaki disülfid bağları (S-S) nedeni ile elektro-eğirme yoluyla nanofiber üretimine uygun değildir. Bu kapsamda, elektro-eğrilebilir olmayan SSA'nın amiloid formda baskın olan ikincil ve birincil yapı formlarına indirgenmesi ve indirgenen bu yapının stabilize edilerek elektro-eğrilir hale getirilebilmesi amaçlanmıştır.

Protein çözeltisi hazırlama aşamasında sırasıyla, doğal halde küresel olan SSA, kütlece %12 oranında olacak şekilde PBS (pH: 7,4) tampon çözeltisinde çözülmüş ve ardından çözeltiye proteinin tersiyer formunu oluşturan disülfid bağlarını kırmak amacıyla SSA'daki disülfid bağ sayısının 10 eşdeğer katına karşılık gelecek şekilde beta-merkaptöetanol (β -ME) ilavesi yapılmıştır. Ardından, indirgenen alt protein yapı formunu stabilize etmek amacıyla SSA protein çözeltisine 1,5:1,0 (v:v) TFE:PBS hacim oranında olacak şekilde TFE ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan protein çözeltisi, manyetik karıştırıcıda 600 rpm hızda 2 saat süresince oda sıcaklığında (23 ± 2 °C) karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 5 mL hacimli şırıngaya yüklenerek akış pompasına yerleştirilmiş ve elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.1.2.2 Elektro-eğirme işlem parametrelerinin optimizasyonu

QTF çevirici yüzeylerinin yüzey alanı/hacim oranını arttırmak amacıyla yapılacak nanofiber modifikasyonunu basamağında elektro-eğirme düzeneği kullanılmıştır. Bu kapsamda öncelikle elektro-eğirme işlem parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme işleminin gerçekleştirilmesinde kullanılacak sistem parametrelerinden iğne ucu-toplayıcı arası uzaklık 10 cm olacak şekilde sabit

tutularak, voltaj: 9-12 kV ve çözelti akış hızı: 0,1-0,5 mL/s parametre aralıklarında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elektro-eğirme işlem parametrelerinin optimizasyonu, geçmiş çalışmalarımızda kütle hassas QCM yüzeylerini modifiye ettiğimiz işlem parametreleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır [96]. Hazırlanan amiloid SSA çözeltisi, 0,8 mm iç yarıçaplı iğneye sahip 5 mL hacimli şırıngaya yüklenerek, şırınga pompasına yerleştirilmiştir (Şekil 2.1). Ardından şırınga pompası düşey şekilde konumlandırılarak, güç kaynağının pozitif kutbu iğne ucuna, negatif kutbu ise kolektöre bağlanmış ve elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.1’de elektro-eğirme düzeneği ve kolektör olarak kullanılan alüminyum levha kaplanan strafora yerleştirilmiş QTF örneğine ait görüntü verilmektedir.

Elektro-eğirme işleminin ilk aşamasında, kuvars ayar çatalı üzerinde 30 s süresince nanofiber toplanmış ve modifiye ayar çatalı optik mikroskop (Nikon Eclipse, LV100) ile incelenmiştir. Ardından, nanofiber modifiye edilen çevirici yüzeylerin sıvı ortamdaki yüzey stabiliteyi 1-24 saat aralıklarında frekans ölçümü alınarak test edilmiş ve nanofiber modifikasyonunun sıvı ortamdaki stabilitesi frekans değişimleri göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır (n=10).

Optimizasyon işleminden sonra, fiber birikim süresinin frekans değişimine etkisini incelemek amacıyla, 5-120 s süre aralıklarında biriktirilen fiberlerin frekansları ölçülmüş, frekans sapmasının en kararlı olduğu gözlemlenen modifikasyona ait fiber birikim süresi diğer basamaklarda kullanılacak şekilde sabitlenmiştir.

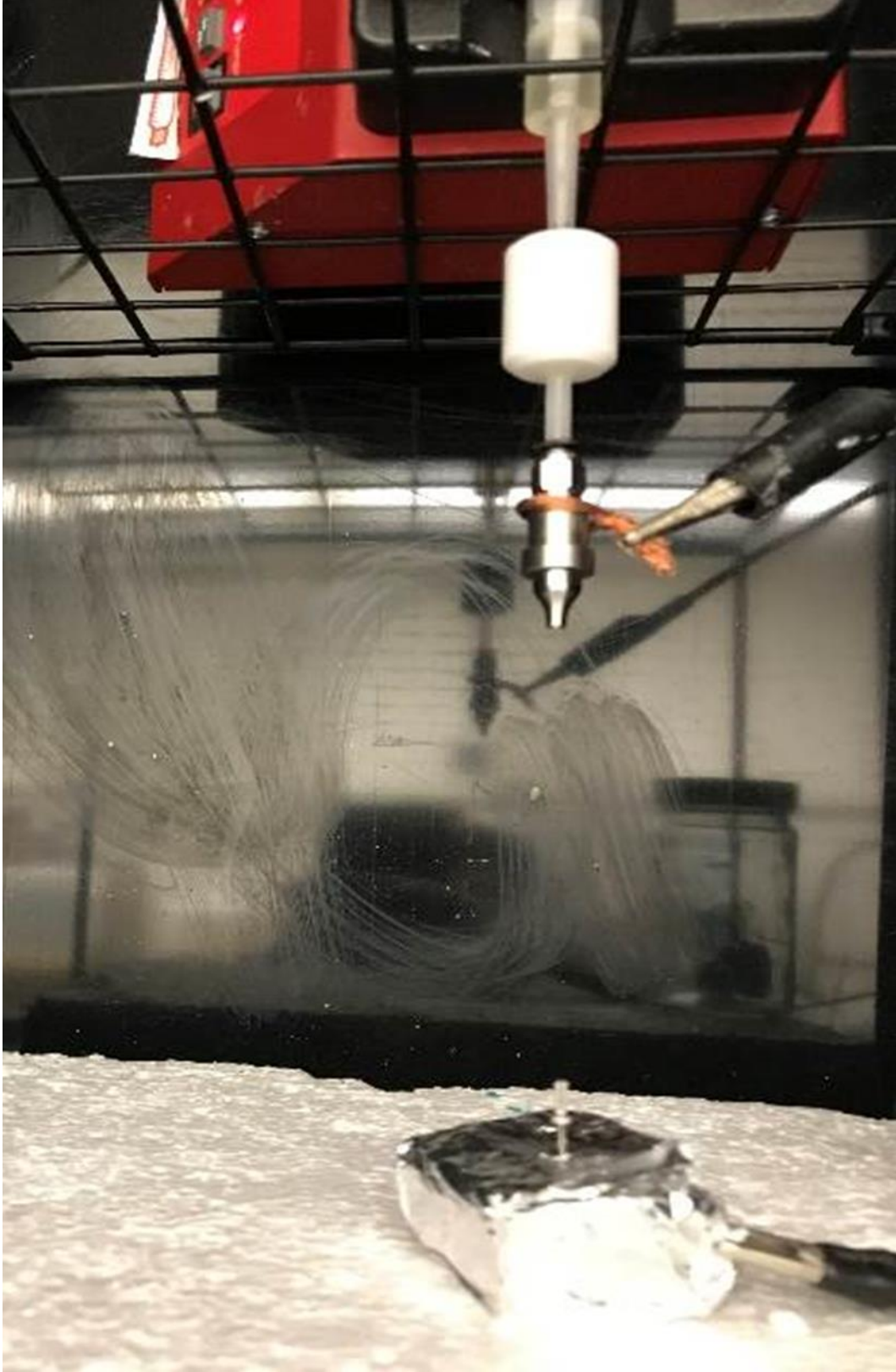
2.1.2.3 Kuvars ayar çatalının yüzey modifikasyon işlemine hazırlanması

Kuvars ayar çatalı, kuvars kısmın zarar görmemesi amacıyla vakumlanmış kapsül formunda temin edilmektedir. Modifikasyon öncesinde kapsülünden hassasça ayrılan çatalar, sırasıyla hacimce %70’lik etanol ve saf su ile temizlenerek QTF’lerin üzerindeki safsızlıklar giderilmiştir. Ardından QTF’ler oda sıcaklığında kurutularak sensör denetçi cihaz ile modifikasyon öncesi frekans değerleri ölçülmüştür. QTF’lerin vakumlu ve dekapsüle edilmiş haldeki görüntüleri Şekil 2.2’de verilmektedir.

2.1.2.4 Plazma aşındırma yöntemiyle QTF yüzey modifikasyonunun yapılması

Plazma aşındırma yöntemi, malzeme özelliklerinin uygulamaya yönelik manipüle edilmesinde kullanılabilecek doğa dostu yöntemlerin başında gelmektedir [121]. Plazma yöntemi ile yüzey aşındırması yapılarak, malzemenin yüzey enerjisi

değiştirilebilmekte ve bu sayede malzeme ile etkileşen ajanların yüzeye tutunma özellikleri kontrol edilebilmektedir.

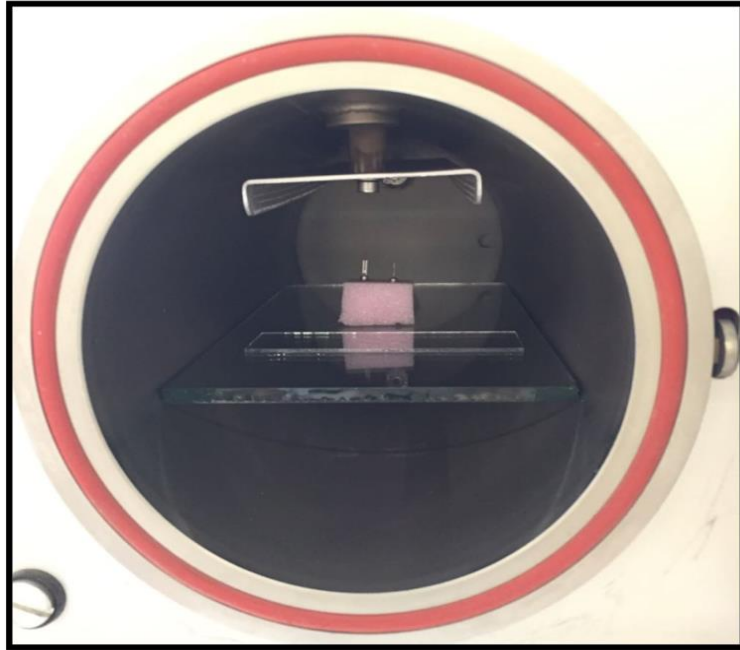


Şekil 2.1 : Düşey konumlandırılmış elektro-eğirme düzeneği ve kolektör üzerinde konumlandırılmış kuvars ayar çatalı.



Şekil 2.2 : QTF'lerin vakumlu (solda) ve dekapsüle (sağda) haldeki görüntüleri

Kuvars ayar çatalları, Şekil 2.3'te de gösterilen düşük basınç/radyo frekans (LP/RF) plazma sistemi (Pico, Diener Electronic GmbH, Almanya) kullanılarak oksijen gazı etkisinde 75W-10 dakika işlem parametrelerinde aşındırılmış ve modifikasyon işlemi öncesine göre frekans kayma miktarları hesaplanmıştır. Ardından plazma aşındırılan yüzeylere 30 s birikim süresinde nanofiber modifikasyonu yapılarak frekans ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 1.23 : Plazma reaktörüne yerleştirilmiş QTF örnekler.

2.1.2.5 Elektro-eğirme işlemiyle QTF yüzeylerinin modifikasyonu

Elektro-eğirme sistemiyle nanofiber üretiminde kullanılacak parametreler aşağıda belirtildiği şekilde belirlenmiş ve QTF yüzeylerinin nanofiber modifikasyonunda kullanılmak üzere sabitlenmiştir [122].

- İşlem parametreleri: Voltaj: 12 kV; iğne ucu-toplayıcı arası uzaklık: 10 cm; akış hızı: 0,35 mL/s, birikim süresi: 5-120 s.
- Çözelti parametreleri: %12 (w:w) SSA+1,0:1,0 (v:v) TFE:PBS (pH:7,4)+10 eşdeğer bağ beta-merkaptoetanol(β -ME).

2.1.2.6 Yüzey aktivasyonu ve antikor immobilizasyonu

Optimizasyonu yapılan elektro-eğirme işlem parametreleri kullanılarak üretilen nanofiberler, hacimce % 2,5 (v:v)' luk GA çözeltisi ile 1-24 saat aralıklarında etkileştirilerek amin gruplarınca fonksiyonel SSA- nanofiber modifiye QTF yüzeylerinin aktifleştirilmesi gerçekleştirilmiş ve aktifleştirilen yüzeyler antikor immobilizasyonuna uygun hale getirilmiştir.

Aktivasyon işlemi sonrasında QTF'ler saf su ile yıkanarak nanofiberler yüzeylerine tutunmayan glutraldehit molekülleri ortamdaki uzaklaştırılmış ve oda sıcaklığında kurutma işlemi sonrasında örneklerin GA ile aktifleştirilmesi sonucunda değişen frekans değerleri sensör denetçi cihaz yardımıyla ölçülerek frekans kayma değerleri hesaplanmıştır.

Antikor immobilizasyonu aşamasında, GA aktivasyonu yapılan nanofiber modifiye kuvars ayar çatallarının uçları, 1:10 (v:v) PBS (pH:7,4)'te hazırlanan 5 μ L anti-PSMA antikor çözeltisine daldırılarak 18 saat süresince 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Son olarak, 30 dakika süresince %1' lik SSA ile etkileştirilen QTF'lerin aktif olmayan antikor uçları bloklanmıştır. Antikor bağlanması gerçekleştirilen QTF'lerin frekans ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca FTIR analizli kullanılarak antikor bağlanması kimyasal olarak incelenmiştir.

2.1.2.7 Hedef analitin tayini

Antikor (a-PSMA) ve antijen (PSMA) etkileşimini incelemek amacıyla, modifiye olmamış ve modifiye QTF'ler, derişimleri 1-1.000 ng/mL aralığında değişen antijen çözeltileriyle 30 dakika süresince (1, 10, 100, 500, 1.000 ng/mL) etkileştirilmiş, ardından QTF'ler soğuk PBS (pH:7,4) ile yıkanarak kurutulmuş ve frekans ölçümleri

yapılmıştır. Antijen bağlanması etkinliği frekans kayması cinsinden incelenmiştir (n=10).

2.1.2.8 Seçicilik testi

Antikor immobilizasyonu ve SSA blokajı yapılan QTF'ler 30 dakika boyunca interlökin, PSA ve kaveolin-1 antijenlerinin çözeltilerine ayrı ayrı ve tek seferde daldırılmış, yıkanıp kurutulduktan sonra frekansları ölçülmüştür. Bu şekilde hazırlanan immünosensörün, antijeni PSMA'ya karşı seçiciliği araştırılmıştır.

2.2 Bulgular ve Tartışmalar

2.2.1 Elektro-eğirme işlem parametrelerinin optimizasyonuna ait sonuçlar

Polimer çözeltilerden yüksek elektrik alan altında katı fazda nanofiberlerin üretiminde elektro-eğirme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır [96,122]. Elektro-eğirme işleminin gerçekleştirilmesindeki en önemli husus, çözelti, sistem ve ortam parametrelerinin optimize edilmesidir. Bu amaçla, tez kapsamında kullanılması düşünülen doğal amin yapısına sahip SSA, geçmiş çalışmalarımız kapsamında elektro-eğrilebilir hale getirilmiş ve bu tez çalışmasında geçmiş çalışmamızda kullanılan parametreler baz alınarak yalnızca işlem parametrelerinden akış hızı 0,35 mL/s'ten 0,20 mL/s'ye azaltılmıştır [96]. Akış hızının azaltılmasının temel nedeni, QTF'in modifikasyon işlemi sırasında uygulanan yüksek elektrik alan altında sıvri uç etkisi göstermesi ve QTF üzerindeki birim yüzeye düşen elektriksel alanın artması nedeniyle 0,35 mL/s'lik akış hızının 10 kV'luk voltajda yüksek olması olarak açıklanabilir. Bu nedenle, QTF yüzeylerini modifiye etmek için kullanılacak sistem parametreleri: 12 kV voltaj, 0,20 mL/s akış hızı ve 10 cm iğne ucu-kolektör arası mesafe olarak belirlenmiştir.

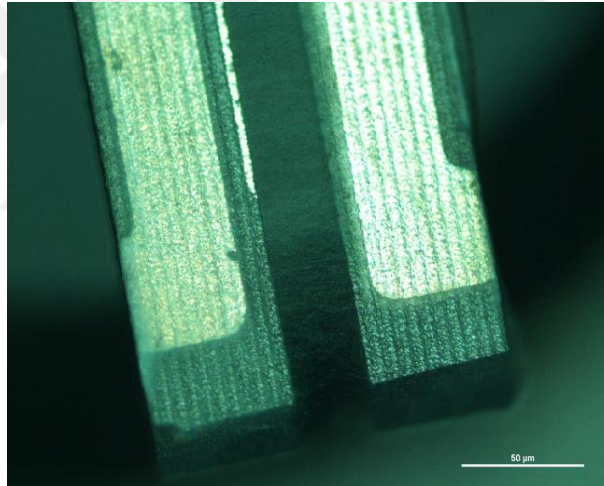
Kuvars ayar çatalının vakumlu haldeki temel rezonans frekansı 32.768,0±0,0 Hz'dir. Dekapsülasyon ve temizleme işleminden sonra kurutulan tüm QTF örneklerinin frekansları ortalama olarak 32.759,1±0,7 Hz olarak hesaplanmıştır (n=20). QTF çatalının fiber modifikasyonu sonrasında değişen frekans değerleri, sensör denetçi ile ölçülmeye çalışılsa da ayar çatalının uçları arasında yapılan nano-köprü formundaki nanofiber modifikasyonunun ayar çatalının salınımına engel olması nedeniyle rezonans piki gözlemlenememiştir [123]. Nano-köprü formunda nanofiber modifiye QTF çatalına ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 2.4'de gösterilmektedir.

Bu nedenle doktora tezi kapsamında çatal uçları arasına yapılması planlanan nano-köprü modifikasyonunun yerine sadece çatal yüzeylerine nanofiber modifikasyonu

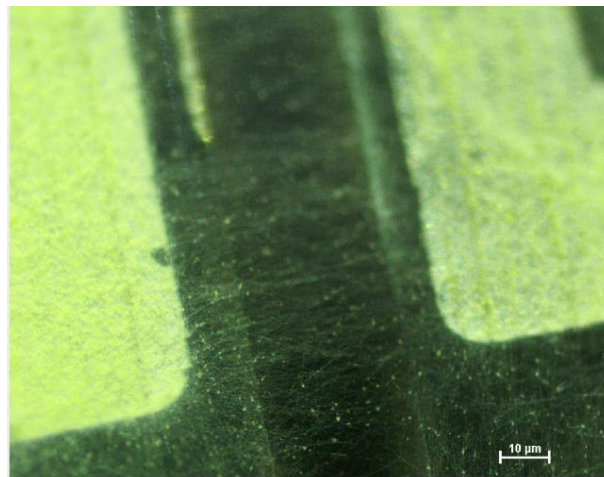
yapılmasına ve bu sayede biyolojik ajan immobilize edilecek elektrot yüzey alanının artırılmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda, frekans ölçümünün gerçekleştirilebilmesi için, frekans ölçümü öncesinde çatalların arasındaki fiber bağlantıları kesilmiştir.

Ön deneme olarak, bahsi geçen çözelti ve işlem parametreleri ile ve 30 s birikim süresinde QTF çevirici yüzeylere nanofiber modifikasyonu gerçekleştirilmiş, modifikasyon öncesi/sonrası ve sıvı ortamda 1-24 saat bekletilen ayar çatallarının frekans kayma değerleri, modifiye edilmemiş QTF örnekleri referans alınarak hesaplanmıştır (Çizelge 2.1). Çizelge 2.1’de verilen frekans sonuçları, 2 saat sıvı ortamla etkileşen AL-SSA nanofiber modifiye ayar çatallarının yüzeylerindeki AL-SSA fiberlerinin çevirici yüzeylerinden ayrıldıklarını göstermektedir. Bu nedenle AL-SSA yapıları nanofiberlerin çevirici yüzeyine tutulumlarını arttırmak amacıyla, modifikasyon öncesi QTF’lerin yüzey özelliklerinin yüzey tutunumunu arttıracak şekilde değiştirilmesi ve bu amaçla oksijen plazma yapılması planlanmıştır [86].

(a)



(b)



Şekil 2.3 : 5 s uygulama süresince nanofiber ile modifiye edilen kuvars ayar çatalına ait (a) 5X, (b) 50X büyütme optik mikroskop görüntüleri.

Çizelge 2.1 : Saf su ortamla 1-24 saat aralıklarında etkileşen 30 s AL-SSA modifiye QTF'lerin ortalama frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Modifikasyon öncesi ortalama frekans (f_{ort}) Hz	Nanofiber modifikasyonu sonrası ortalama frekans kayması (Δf) Hz	1. saat	2. saat	4. saat	8. saat	24. saat
		(Δf) Hz	(Δf) Hz	(Δf) Hz	(Δf) Hz	(Δf) Hz
32.759,1 \pm 0,7	-30,1 \pm 4,2	-30,1 \pm 3,4	-28,2 \pm 1,1	-14,2 \pm 3,6	-12,6 \pm 8,1	-12,1 \pm 2,2



Şekil 2.4 : Düşük basınç plazma sistemi

2.2.2 Plazma modifikasyonu ile QTF yüzeylerinin aşındırılmasına ait sonuçlar

Kuvars ayar çatalları, düşük basınç/radyo frekans (LP/RF) plazma sisteminde (Pico, Diener Electronic GmbH, Almanya) oksijen gazı kullanılarak 75 W plazma gücüne ve 10 dakika işlem süresince aşındırılmıştır (Şekil 2.5). Plazma işlemi sonucunda ölçülen frekans değerlerinin modifikasyon öncesine göre $+4,8\pm 0,7$ Hz'lik artışı, oksijen aşındırma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Oksijen plazmasının nanofiberlerin kuvars yüzeyindeki stabilitelere etkisini incelemek amacıyla aşındırılan yüzeylere 30 s birikim süresinde nanofiber modifikasyonu yapılmış, AL-SSA modifiye QTF örnekleri saf su ortamında 1-24 saat aralığında bekletilerek belirli zaman aralıklarında kurutulmuş ve frekans değerleri kaydedilmiştir. Frekans sonuçları, oksijen plazması sonrasında QTF yüzeylere modifiye edilen nanofiberlerin QTF yüzeyinde tutunumlarının 4 saate kadar koruduklarını göstermektedir. Plazma işlemi öncesi ve sonrasında ayrıca sıvı ortama maruz bırakılan ayar çatallarına ait frekans değerleri Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 : Sıvı ortama maruz bırakılan 30 s nanofiber modifiye QTF'lere ait frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Plazma işlemi sonrası ortalama frekans kayması (Δf) Hz	Nanofiber modifikasyon sonrası ortalama frekans kayması (Δf) Hz	1. saat (Δf) Hz	2. saat (Δf) Hz	4. saat (Δf) Hz	8. saat (Δf) Hz	24. saat (Δf) Hz
$+4,8\pm 0,7$	$-30,1\pm 4,2$	$-30,0\pm 3,3$	$-29,6\pm 3,0$	$-29,2\pm 2,2$	$-24,8\pm 5,1$	$-24,1\pm 3,8$

2.2.3 Nanofiber modifiye QTF çeviricilerinin üretimi

Elektro-eğirme işleminde kullanılacak çözelti ve işlem parametreleri ön çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir. 75 W gücünde 10 dakika uygulama süresinde oksijen plazma ile aşındırılan QTF yüzeyleri, 5-120 s zaman aralıklarında AL-SSA yapısında nanofiber ile modifiye edilmiştir. Üretilen nanofiberlere ait frekans sapma değerleri Çizelge 2.3'te gösterilmektedir. Bu kapsamda nanofiber modifikasyonu öncesinde, çevirici yüzeyler düşük basınç/radyo frekans (LP/RF) oksijen plazması ile aşındırılmıştır (Şekil 2.5).

Çizelge 2.3 : Nanofiber modifikasyon süresine bağlı frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Nanofiber modifikasyon süresi (t)	5	10	20	30	60	120
Frekans kayması (Δf) Hz	-20,7 \pm 8,1	-22,2 \pm 14,7	-25,2 \pm 18,1	-30,1 \pm 4,2	-41,1 \pm 25,9	-42,1 \pm 25,6

Çizelge 2.3 incelendiğinde, 5-120 s aralığında üretilen nanofiber modifiye QTF'lerin frekans sapmalarının kendi içinde tutarlı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, elektro-eğirme işleminde aynı işlem ve çözelti parametreleri kullanılmasına rağmen eşit sayıda ve aynı özellikte fiber üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Bu tarz bir biyosensör modifikasyonu, tekrarlanabilir sonuçlar vermede yetersiz kalacaktır. Bu duruma karşın, nanofiber modifikasyonunun frekans keskinliği ve kalite faktörüne etkisi incelendiğinde, 5 s boyunca üretilen fiberlerin daha keskin ve standart sapma değeri düşük frekans değerleri verdiği bu nedenle ölçüm hassasiyetini mümkün oldukça korumak amacıyla aktivasyon aşaması öncesinde gerçekleştirilecek nanofiber modifikasyonunun 5 s birikim süresi kullanılarak yapılmasına karar verilmiştir.

2.2.4 Nanofiber modifiye QTF yüzeylerinin aktifleştirilmesi

Antikor immobilizasyonunu gerçekleştirmek için 5 s nanofiber modifiye QTF örnekleri hacimce %2,5 (v/v) GA çözeltisine daldırılarak 2-24 saat zaman aralıklarında bekletilmiştir. Bu şekilde glutraldehit ortamına maruz bırakılan amiloid formdaki SSA protein nanofiberlerin doğal yapısında bulunan fonksiyonel amino gruplarının tek basamakta aktifleştirilmesi hedeflenmiştir. Tüm parametreler 10 adet QTF kullanılarak test edilmiş ve hesaplanan ortalama frekans değerleri ve standart sapmalar Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4 : 5 s birikim süresinde nanofiber modifiye edilen QTF örneklerinin glutraldehit yüzey aktivasyonu sonucu ölçülen frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Glutraldehit Uygulama Süresi (s)	2	4	12	24
Frekans Kayması, Δf (Hz)	-9,1 \pm 3,0	-2,7 \pm 2,1	+4,2 \pm 3,2	+8,1 \pm 2,8

Frekans değişimleri incelendiğinde, 2 saat GA uygulaması ile yüzeyleri aktifleştirilen örneklerin frekans değişimlerinin daha yüksek ve diğer sürelerde aktifleştirilen örneklere kıyasla (4, 12 ve 24 saat) bağlanmanın daha kararlı olduğunu gösterdiği için antikör immobilizasyonu işleminin öncesinde, AL-SSA modifiye QTF yüzeylerinin 2 saat süresince gluteraldehit aktifleştirmesi yapılmasına karar verilmiştir.

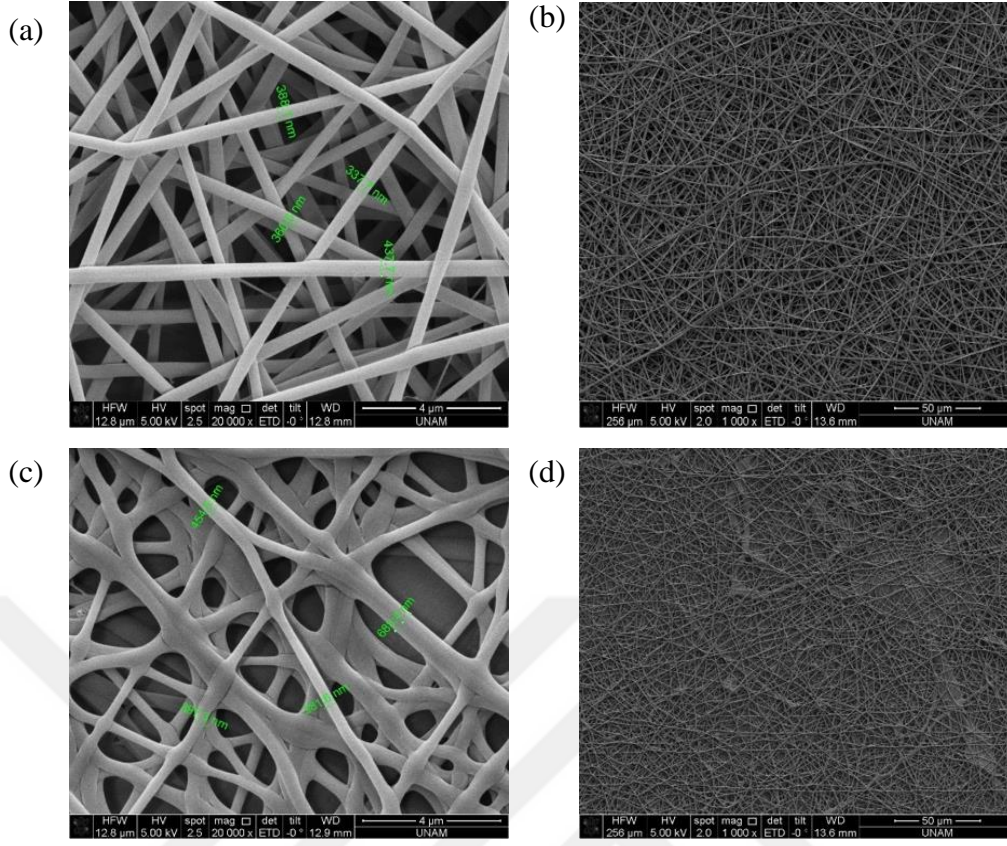
2.2.5 Biyolojik tanıyıcı yüzeyin hazırlanması

Önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde 75 W-10 dk oksijen plazma ile aşındırılan QTF yüzeyleri, 5 s süresince AL-SSA nanofiberlerle modifiye edilmiştir. Ardından AL-SSA nanofiberdeki amin gruplarının gluteraldehit ile aktifleştirilmeleri sağlanarak tanıyıcı yüzey antikör bağlanmasına uygun hale getirilmiştir. GA modifikasyonu öncesi ve 2 saat gluteraldehit aktifleştirmesi sonrasında AL-SSA nanofiberlerin SEM görüntüleri, şekil 2.6' da gösterilmektedir.

SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere, 5 s süresince üretilen nanofiberler oldukça homojen olmasına rağmen, 2 saat süreyle yapılan gluteraldehit aktivasyon işlemi sonrasında fiberler fiber formdan jelsi yapıya dönuşmüştür. Nanofiberlerin morfolojik yapısı incelendiğinde fiberlere ait homojen dağılımının aldehit modifikasyonu sonrasında negatif yönde etkilendiği gözlemlenmiştir.

Fiberlerin ortalama yarıçaplarının hesaplanmasında ImageJ programı kullanılmış ve bu kapsamda 20 nanofiberin çap değeri ölçülerek bu değerlerin ortalaması hesaplanmıştır. Gluteraldehit modifikasyonu öncesinde fiberlerin ortalama çap değeri 260 ± 33 nm olarak hesaplanmış, 2 saat gluteraldehit uygulanan örneklerde ise bu değer 411 ± 114 nm'e yükselmiştir. Gluteraldehit uygulaması sonrasında çaptaki standart sapmanın bu seviyede artışı, homojenitenin bozulduğunun başka bir göstergesi olsa da frekans sonuçları da göz önünde bulundurulduğunda 1 saat gluteraldehit aktivasyonunun protein immobilizasyonu için yeterli olmaması nedeniyle, antikör immobilizasyonu öncesinde nanofiber yüzeylerinin 2 saat süresince GA aktifleştirilmesinin yapılmasına karar verilmiştir.

Biyolojik tanıyıcı tabaka hazırlığının ikinci aşamasında ise, 5 s birikim süresi kullanılarak nanofiber modifiye edilen QTF'ler hacimce %10 oranında PBS (pH:7,4) ile seyreltilen a-PSMA çözeltisine daldırılarak + 4 C°'de ve 18 saat süreyle antikör immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Son olarak, 1% SSA ile 30 dakika etkileştirilen ayar çatallarının aktif olmayan aldehit uçlarının bloklanması gerçekleştirilerek spesifik olmayan etkileşimlerin azaltılması sağlanmıştır



Şekil 2.5 : Gluteraldehit ile aktivasyon işlemi öncesi ve sonrasında AL-SSA modifiye QTF yüzeylerine ait taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri. Modifiye olmadan önceki AL-SSA nanofiber yapılı membran ait (a) X20.000 büyütme, (b) X1.000 büyütme SEM görüntüleri ve 2 saat GA modifiye örneğe ait (c) X20.000 büyütme, (d) X1.000 büyütme SEM görüntüleri.

Modifikasyonların etkinliğini kanıtlamak için yüzey hassas kimyasal analizler kapsamında FTIR-ATR analizi gerçekleştirilmiştir. FTIR-ATR analizi modifiye edilmemiş (QTF), nanofiber modifiye (AL-SSA) ve antikör modifiye AL-SSA (AL-SSA/a-PSMA) örneklerinin yüzeylerindeki fonksiyonel grupların tespitinde kullanılmış ve ilgili spektrumlar Şekil 2.7’ de verilmiştir. Yansıtma (transmitans) verileri incelendiğinde, QTF’teki en belirgin piklerin 3600 cm^{-1} ’deki serbest $-\text{OH}$ ve $3500\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ üzeri geniş $-\text{OH}$ bandı olduğu gözlemlenmiştir (Navarra vd. 2005). Nanofiber modifikasyonu sonrası AL-SSA örneğinde, $-\text{OH}$ piklerinin intensitesi azalmış buna karşın 3300 cm^{-1} ve 1529 cm^{-1} ’deki $-\text{NH}$ birincil aminin bükülme vibrasyon pikleri oluşmuştur. AL-SSA/a-PSMA örneğinde ise, AL-SSA örneğindeki birincil amino gruplarına karşılık gelen pik şiddetlerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, amiloid forma denatüre edilen proteininin immobilize edilen proteine kıyasla birincil formları daha çok içermesi ile açıklanabilir ayrıca protein denatürasyonunun da antikör immobilizasyonunun da başarılı olduğunu göstermektedir. AL-SSA

örneğinde diğer örneklerden farklı olarak 1648 cm⁻¹'de gözlemlenen güçlü pik, amid veya amidin gruplarının –CN bükülmesinden kaynaklanmaktadır. AL-SSA örneğine antikor immobilizasyonu yapılması sonrasında bu karakteristik pikin de intensitesinin düştüğü gözlemlenmiştir.

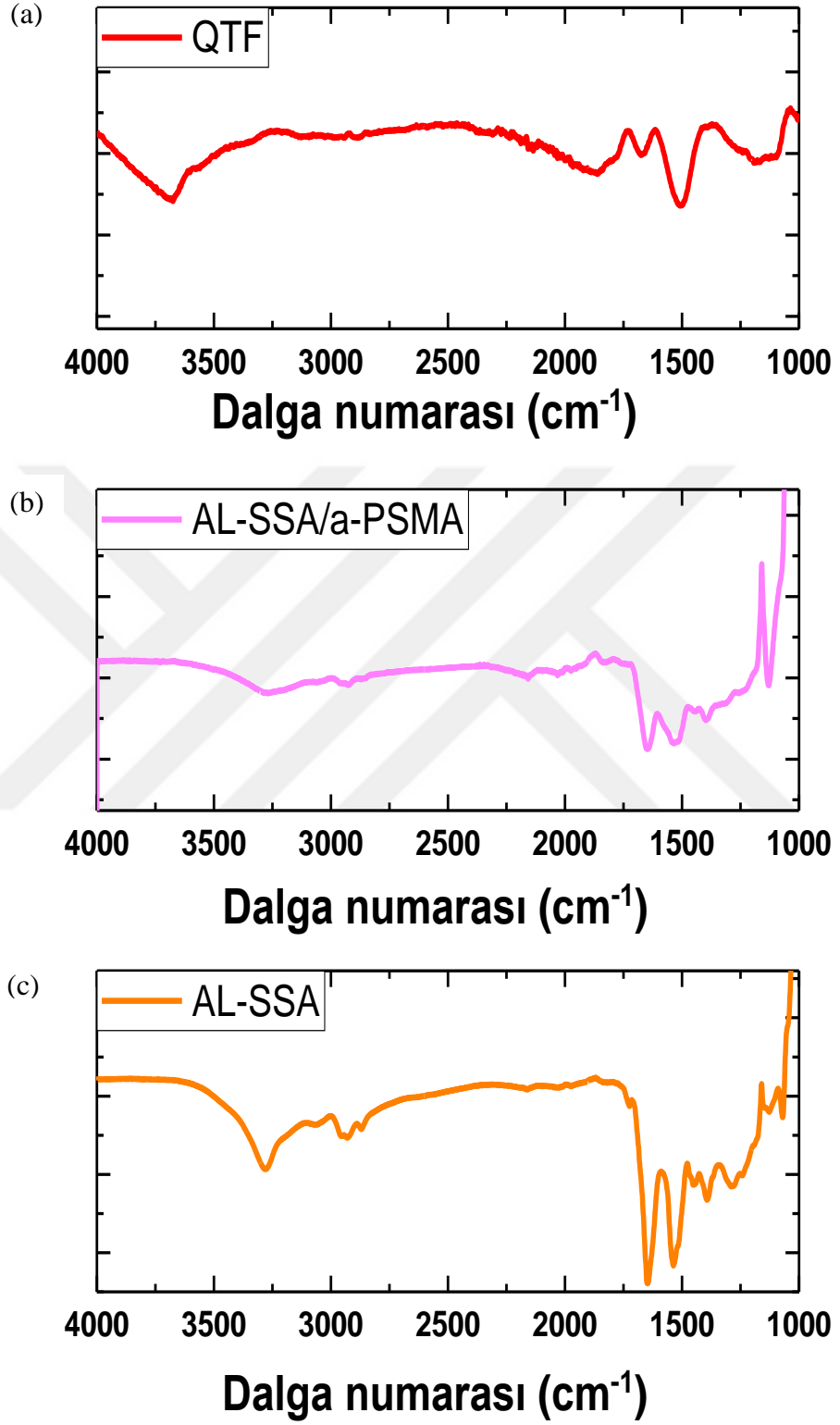
Özetle, PSMA ölçümüne yönelik geliştirilen QTF immüno-sensörünün üretim basamakları şu şekilde sıralanabilir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında QTF uçları, elektro-eğirme işlem parametreleri: 0,20 mL/s akış hızı, 10 cm iğne ucu-kollektör arası mesafe ve 12 kV voltajda, 5 s süresince nanofiberle modifiye edilmiştir [96]. Ardından 2 saat gluteraldehit ile aktifleştirilen AL-SSA nanofiber modifiye uçlara sırasıyla antikor immobilizasyonu ve %1 SSA bloklanması işlemleri gerçekleştirilmiş ve bu şekilde biyolojik tanıyıcı tabaka hazırlanmıştır. PSMA antijeninin ölçümü aşamasında öncelikle pg seviyedeki PSMA antijeninin ölçümü yapılsa da sonuçlar anlamlı çıkmamıştır. Ardından 1 ng/mL ve 1000 ng/mL arası konsantrasyonlarda hazırlanan PSMA antijenleri ile etkileştirilen QTF uçlarında gerçekleşen frekans değişimleri incelendiğinde, lineer regresyon değeri en yüksek olan 5-100 ng/mL aralığı, immüno-sensörün lineer ölçüm aralığı (LDL) olarak belirlenmiştir (R²=0,967). Sistemin en düşük ölçüm limiti (LOD) Eşitlik 7 kullanılarak 33,4 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Şekil 2.8' de immüno-sensöre hedef antijeni PSMA'nın bağlanması sonucunda meydana gelen frekans kayma değerleri gösterilmektedir.

Şekil 2.8' de gösterildiği üzere LOD değeri oldukça küçük olsa da ölçümlerdeki standart sapma değerleri oldukça yüksektir. 100 ng/mL PSMA konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlar için antijen ölçümü yapılamaması, sıvı ortamda nanofiberlerin ve dolayısıyla biyolojik tanıyıcı tabakanın yeterince stabil olmaması dolayısıyla da QTF yüzeylerinden ayrılmalarıyla ilişkilendirilmiştir.

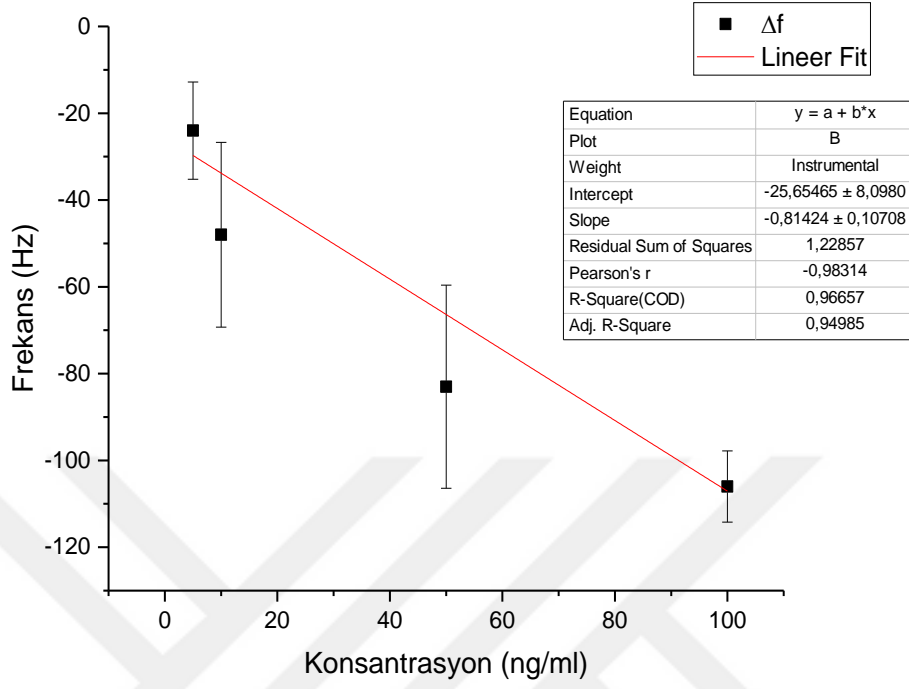
2.2.6 Seçicilik testi

Seçicilik testi, biyosensörün oldukça çok sayıda protein içeren vücut sıvılarında kullanılabilirliğini test etmek açısından oldukça önemlidir. Bu doğrultuda, a-PSMA modifiye edilmiş QTF'ler 100 ng/mL konsantrasyonundaki kaveolin-1, interlökin ve PSA antijen çözeltileri ile 30 dakika süresince ayrı ayrı etkileştirilmiştir (Şekil 2.9). Elde edilen sonuçlar, a-PSMA tabanlı immüno-sensörün hedef olmayan proteinlere karşı afinitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, antikor a-PSMA'nın hedef analite özgü yani antijenine seçici olduğu gösterilmiştir.

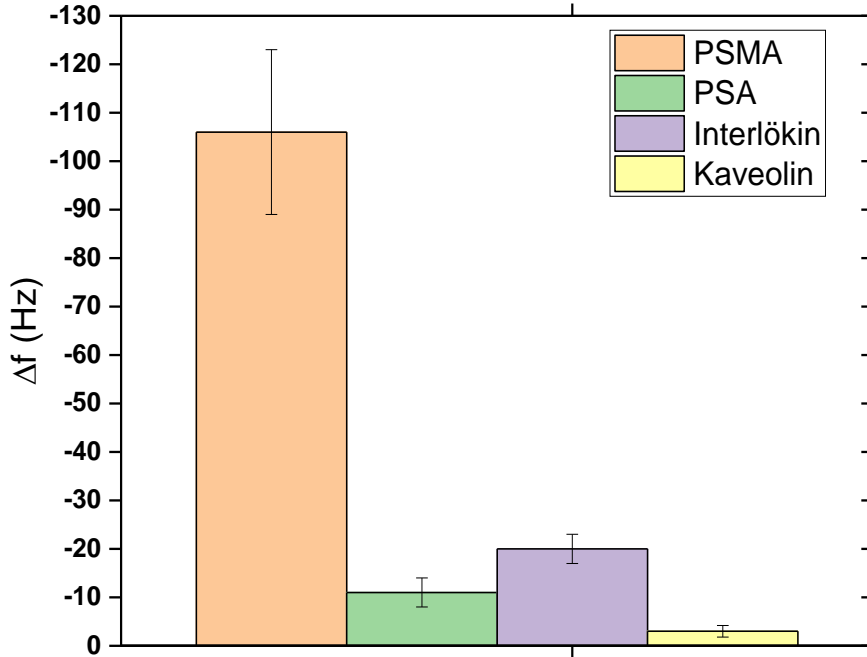
$$LOD = \frac{k \times SD}{m}; k = 3,3 \quad (7)$$



Şekil 2.6 : FTIR-ATR spektrumu (a) QTF, (b) AL-SSA/a-PSMA, (c) AL-SSA.



Şekil 2.7 : a-PSMA tabanlı prostat kanseri immünosensörünün hedef analiti PSMA proteinini bağlaması sonucu oluşan frekans değişimleri ve kalibrasyon eğrisi. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=3).



Şekil 2.8 : İmmünosensörün hedef olan PSMA ve hedef olmayan interlökin, PSA ve kaveolin antijenleriyle etkileşimleri sonucu ölçülen ortalama frekans değişimleri (n=10). Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir. (n=3).

2.3 Sonuçlar ve neriler

Tez önerisinde belirlenen hedeflerle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında ulaşılan sonuçlar ve ulaşılamayan hedefler basamaklar halinde açıklanmıştır.

- Literatürde *ilk defa*, bir kanser biyobelirtecinin ölçümünü hedef alan QTF tabanlı immünosensörü geliştirilmiştir.
- QTF yüzeylerine *ilk kez kendiliğinden aktif amin gruplarına sahip amiloid protein yapılı* nanofiber modifikasyonu yapılarak biyolojik tanıyıcı tabaka oluşturulmuş ve hazırlanan immünosensör PSMA proteininin ölçümünde kullanılmıştır.
- Nano-köprü modifikasyonu, çatalların rezonansını engellediği için kullanılamamış, çatallar arasındaki nanofiber bağlantısı kesilerek kullanılmıştır. Bu şekilde nanofiber kullanımının amacı, sadece QTF yüzey alanını arttırma ve dahafazla miktardaki biyolojik ajan immobilizasyonunu ek bir fonksiyonelleştirmeye gerek duymadan doğrudan sağlamak içindir.
- Pikogram seviyesinde ölçüm hassasiyeti olmasa da nanogram seviyesinde ölçüm yapabilen bir biyosensörün üretimi gerçekleřtirilmiřtir. Bu deėer, Xiao ve ark. (2001) tarafından yapılan çalıřmada, saėlıklı kontrol gruplarında ortalama 272,9 ng/mL (yař<50) ve 359,4 ng/mL (yař>50) lülen, prostat kanseri durumunda ortalama 623,1 ng/mL deėerine yükselen, benign prostat hiperplazisi durumunda ise ortalama 117,1 ng/mL seviyesine dūřen serum PSMA deėerlerinin ölçümünde yeterli olacaėı dūřünölmektedir (Xiao vd., 2001).
- Yüzeye bağlanan kütleinin değişimi sonucu oluşan frekans değişiminin ölçümü prensibine dayalı olarak alışan PSMA immünosensörü beklenildiği seviyede hassas/seçici olmamıştır.

Ek olarak, amiloid protein nanofiberlerdeki amin grup konsantrasyonunun protein immobilizasyonuna yeterli görölmemesi durumunda nanofiber modifikasyonuna alternatif olarak yapılması dūřünölen plazma modifikasyonu da bu doktora tez çalışmasının alt basamağı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda amin gruplarınca zengin etilendiamin (EDA) ve amilamin (AMY) monomerleri kullanarak QTF yüzeylerine plazma polimerize ince film (PPTF) modifikasyonu yapılmış ve yukarıda bahsedilen biyolojik tanıyıcı tabakayı üretmek için kullanılan basamakların her biri ayrı ayrı tekrar edilmiştir. Fakat, EDA ve AMY PPTF'lerin özellikle sıvı ortamda QTF

yüzeylerinde stabil olmadıkları ve nanofiberlere kıyasla çok daha kısa sürede QTF yüzeylerinden ayrıldığı gözlemlenmiştir. EK-1’de QTF yüzeylerine yapılan EDA ve AMY PPTF’lerin hava ortamındaki stabilite test sonuçları ve her bir modifikasyon işlemi sonrasındaki frekans sonuçları bulunmaktadır.

Sonuç olarak, önerilen kütle hassas PSMA immüno sensörü geliştirilse de nanofiber modifikasyonunun tekrar edilebilir olmaması ve QTF yüzey modifikasyonunun daldır-kurut yöntemiyle etkin bir şekilde yapılamaması gibi nedenlerden dolayı ölçümlerde yüksek standart sapma meydana gelmiştir. Üretilen immüno sensör, bu haliyle kanser teşhisinde kullanıma uygun değildir. Bu nedenle, bahsi geçen sisteme alternatif olarak sıvı ortamda çalışmaya uygun ekran baskılı altın elektrotlar (SPGE) kullanılarak, PSMA immüno sensörünün üretiminin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. SPGE tabanlı PSMA immüno sensörünün üretimi ve PSMA ölçümünde kullanımına ait detaylar Bölüm 3’te detaylı olarak anlatılmaktadır.

3. PROSTAT KANSERİ TANISINA YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL TABANLI PSMA İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

3.1 Materyal ve Metot

3.1.1 Materyal

İmmünoensör geliştirilmesinde kullanılan 3,4 cm x 1,0 cm x 0,05 cm boyutlarındaki ekran-baskılı altın elektrotlar (SPGE, DRP C220AT) Metrohm (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Tetrakloroaurik (III) asit ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sodyum borhidrür (NaBH_4), 1,1-karbonildiimidazol (CDI), sülfürik asit (H_2SO_4) ve sisteamin (Cys) Acros Organics'ten (Morris Plains, NJ, ABD) satın alınmıştır. Potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), potasyum ferrosiyanür ($\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ve potasyum klorür (KCl) Fisher Scientific'ten (New Hampshire, NH, ABD) temin edilmiş ve elektrokimyasal ölçümler sırasında redoks ajanları ve destekleyici elektrolit olarak kullanılmıştır.

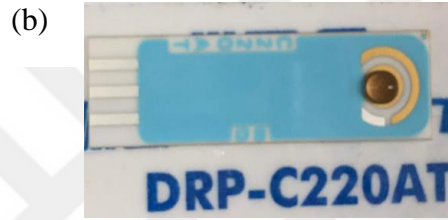
Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) tabletleri (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) deiyonize suda ($> 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) çözülerek (Milli-Q Plus, Millipore, Billerica, MA, ABD) fizyolojik tampon çözeltileri hazırlanmıştır (pH: 7,4). Sığır serum albümini (SSA) Acros Organics (Morris Plains, NJ, ABD), monoklonal tavşan PSMA antikoru (mAb, #12815) ise Cell Signaling (Danvers, MA, ABD) firmasından temin edilmiştir. Deneyle aksi belirtilmediği takdirde oda sıcaklığında ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Metot

3.1.2.1 Ekran-baskılı altın elektrotların (SPGE) modifikasyon işlemine hazırlanması

Ticari olarak temin edilen SPGE'ler, hacimce %70 etanol ve distile su ile yıkayıp kurutulmuştur (Şekil 3.1). Tüm elektrotlar, modifikasyon öncesi ve modifikasyon işlemleri sonrasında döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile analiz edilmiştir. Tüm elektrokimyasal ölçümler, CHI elektrokimyasal ölçüm sistemi (CHI660D, CHI Instruments, Austin, TX, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Biyolojik tanıyıcı tabaka modifikasyonu öncesinde, elektrotların sinyal kararlılıklarını sağlamak amacıyla SPGE'lerin yüzey aktivasyonları

gerçekleştirilmiştir. Yüzey aktifleştirilmesi aşamasında SPGE'ler 0,5 M H₂SO₄ çözeltisine daldırılarak voltaj aralığı -0,3 V ile 1,4 V ve tarama hızı 50 mV/s olacak şekilde 20 döngüsel tarama yapılmıştır [131].



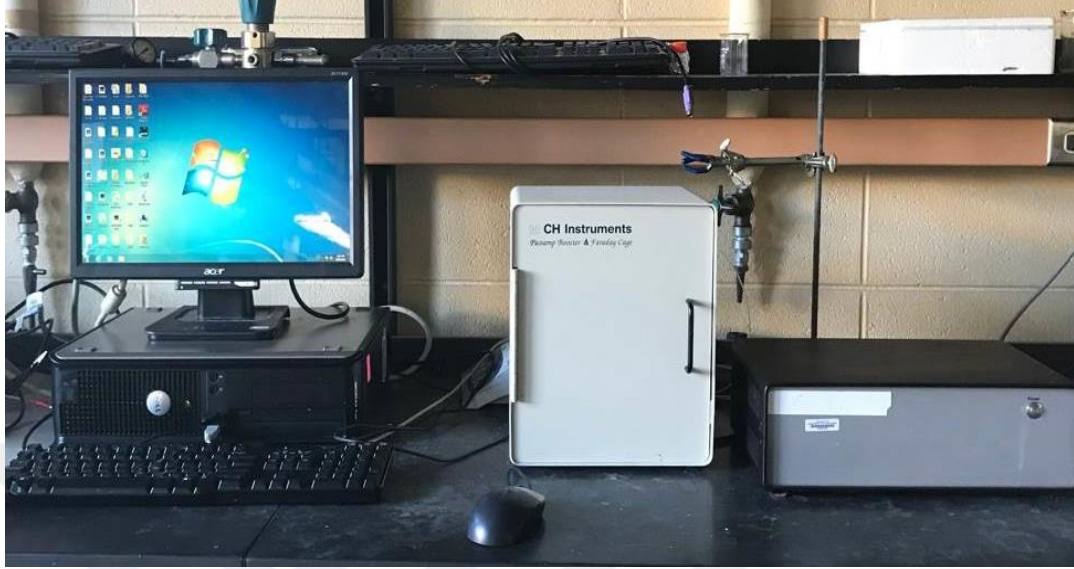
Şekil 3.1 : (a) Modifikasyon işlemi öncesi ve (b) Cys-AuNp modifikasyonu sonrasında SPGE'lerin görüntüleri.

Sülfürik asit ortamında aktivasyonu yapılan ve damlat-kurut yöntemiyle Cys-AuNp modifikasyonu gerçekleştirilen elektrotlar, Faraday kafesi içerisine yerleştirilen 0,1 M potasyum klorür (KCl) ve 250 μ M ferrisiyanür/ferrosiyanür [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren PBS (pH:7,4) çözeltisine daldırılarak elektrokimyasal ölçüm cihazına bağlanmış, voltaj aralığı: -0,2 ile 0,6 V ve tarama hızı 50 mV/s olacak şekilde döngüsel voltametri (CV) ile; açık devre potansiyeli (V_{oc}): 0,12 V; frekans aralığı: 0,1-100.000 Hz olacak şekilde elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile test edilmiştir. Bu şekilde H₂SO₄ yüzey aktifleştirilmesinin etkinliği belirlenmiştir [125]. Elektrokimyasal ölçümleri yapmak amacıyla kullanılan düzenek Şekil 3.2'de gösterilmektedir.

3.1.2.2 Sisteamin modifiye altın nanoparçacıkların (Cys-AuNp) üretimi

Bu çalışmada, PSMA proteini/PSMA ekspresyonu gösteren hücrelerin elektrokimyasal sinyal cinsinden ölçülebilmesi amacıyla immünosensörün tanıyıcı tabakasında kullanılacak a-PSMA antikorunun SPGE yüzeyine immobilize edilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, yüksek yüzey kararlılığına sahip ve

iletkenliği ve yzey alanı yksek biyolojik tanıyıcı tabaka altyapısının SPGE-a PSMA ara yzeyine modifiye edilmesi gerekmektedir.

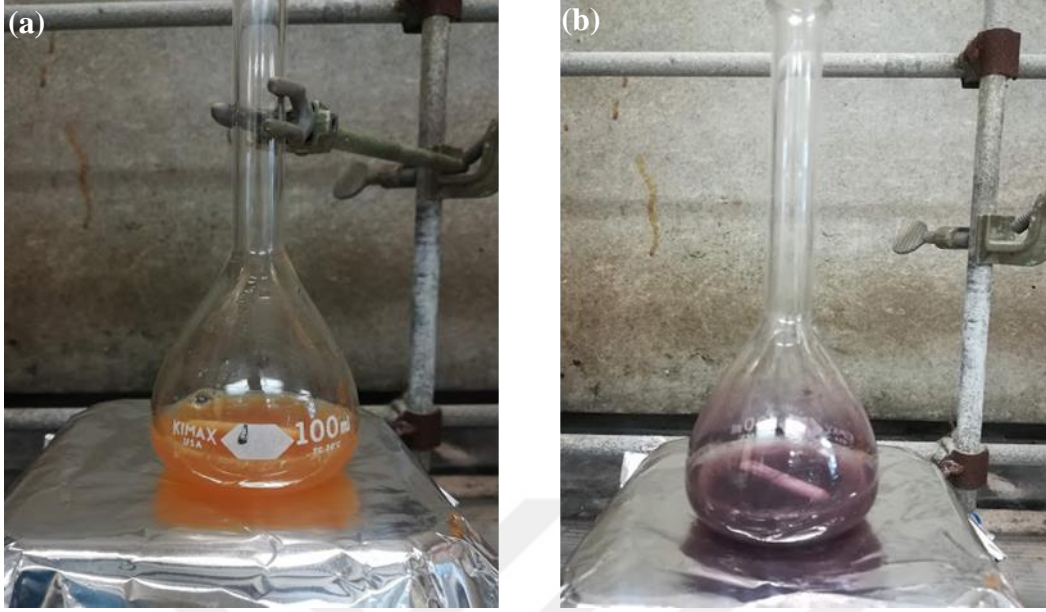


Şekil 3.2 : CHI elektrokimyasal ölçüm düzeneği ve Faraday kafesi.

Altın nanoparçacıklar, kolay üretilebilirlikleri/fonksiyelleştirilebilmeleri ve elektron transferini kolaylaştırmaları gibi nedenlerden dolayı SPGE yzey modifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle amin veya tiol gruplarıyla fonksiyonelleştirildiklerinde, çapraz bağlama ajanları ile biyolojik ajanların immobilizasyonuna olanak sağladıkları literatürdeki çalışmalarda sıklıkla gösterilmiştir. Bu nedenle doktora tez çalışmasının ikinci bölümünde gerçekleştirilecek SPGE yzeylerinin modifikasyonunda, sisteaminle modifiye edilen altın nanoparçacıklarının (Cys-AuNp) kullanımına karar verilmiştir. Cys-AuNp'ların üretimine ait detaylar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir [126].

Sisteamin modifiye altın nanoparçacıkların üretiminde (Cys-AuNp), Niidome ve ark. (2004) tarafından geliştirilen üretim yöntemi kısmen değiştirilerek uygulanmış ve Cys-AuNp'lar tek aşamada sentezlenmiştir (Niidome ve ark. 2004). Öncelikle, 40 mL 3 mM sulu tetrakloroaurik (III) asit çözeltisine, 400 µL hacimde ve 500 mM derişimli sisteamin çözeltisi ilave edilmiş ve 20 dakika boyunca 600 rpm hızla manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra, 80 µL 10 mM sodyum borhidrür (NaBH₄) çözeltisi altın partiküllerinin indirgenmesi amacıyla karışıma hızla eklenerek nihai çözelti karanlık ortamda 20 dakika daha karıştırılmıştır. Elde edilen karışımın rengi, önceki çalışmalarda belirtildiği gibi (Niidome ve ark. 2004) koloidal altın nanoparçacıklarının oluşumunu gösteren kahverengiden mora dönüşmüştür (Şekil

3.3). Üretilen kolloidal Cys-AuNp çözeltisi, 3 ay süresince 4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiş, elektrot modifikasyonu ve karakterizasyon aşamalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.3 : (a) Altın çözeltisi ve (b) kolloidal Cys-AuNp.

3.1.2.3 Ekran-baskılı altın elektrot yüzeylerinin altın nanoparçacık ile modifikasyonu

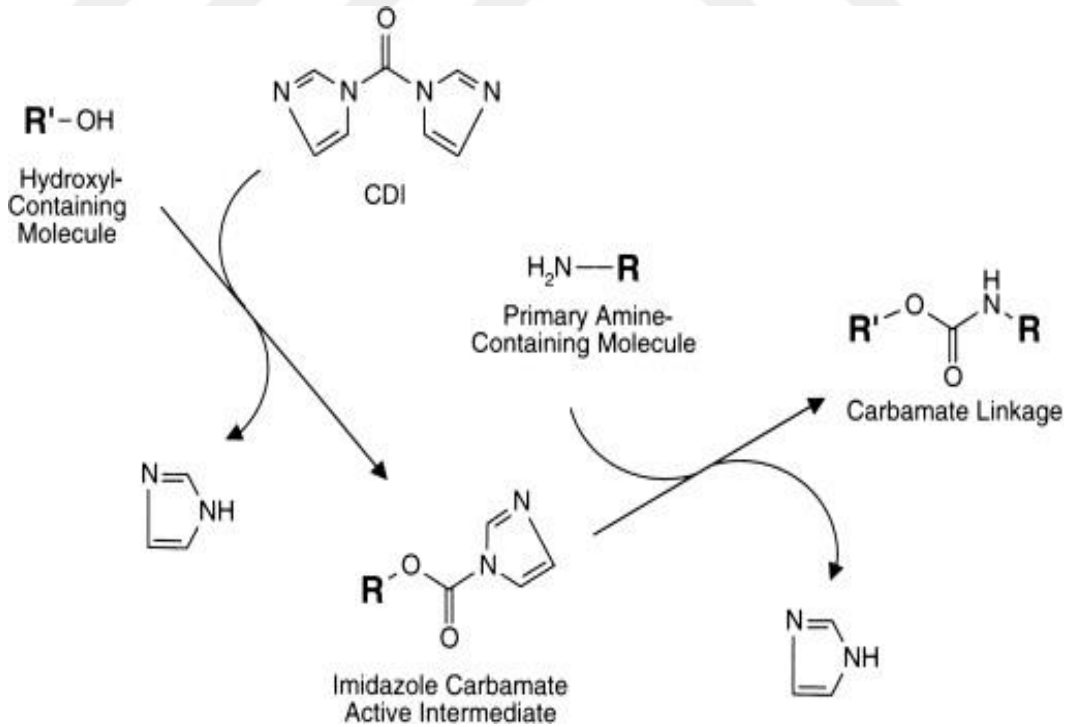
SPGE'ler 3 mm çaplı altın çalışma elektrodu, altın karşıt (counter) elektrot ve gümüş (Ag) referans elektrodu içermektedir. Sülfürik asit ile aktifleştirme işlemi gerçekleştirilen SPGE'lerin çalışma elektrot yüzeyleri, 5-20 µL hacimlerinde Cys-AuNp çözeltisi kullanılarak 5 µL'lik katmanlar halinde modifiye edilmiştir. Modifikasyon işleminden önce SPGE, yüzeyi H₂SO₄ ile aktifleştirilen SPGE ve nanoparçacık modifiye SPGE'ler PBS (pH:7,4) ortamında hazırlanmış 0,1 M potasyum klorür (KCl) ve 250 µM ferrisiyanür/ferrosiyanür [Fe(CN)₆^{3-/4-}] içeren redoks çözeltisine daldırılarak elektrokimyasal analiz cihazına bağlanmış, voltaj aralığı: -0,2 ile 0,6 V ve tarama hızı 50 mV/s olacak şekilde döngüsel voltametri ile analiz edilerek en yüksek sinyali veren ve yüzey kararlılığı yüksek Cys-AuNp modifikasyon miktarı belirlenmiştir. Belirlenen Cys-AuNp miktarı antikor immobilizasyonu öncesinde SPGE yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılmıştır.

3.1.2.4 Sisteamin katkılı altın nanoparçacıklarla modifiye edilen ekran-baskılı elektrot (Cys-AuNp /SPGE) yüzeylerinin aktifleştirilmesi

Karboksil grupları, amin gruplarıyla etkileşerek amid bağları oluşturma yoluyla ya da hidroksil gruplarıyla ester bağları kurarak çapraz bağlama ajanı olarak çalışır (Şekil 3.4). Bu kapsamda, Cys-AuNp modifiye yüzeyler 5 µL hacmindeki 0,3 M CDI sulu çözeltisi ile 3 saat süresince 37 °C sıcaklıktaki su banyosunda muhafaza edilerek aktifleştirilmiştir.

3.1.2.5 Antikor immobilizasyonu

Kimyasal aktivasyon aşamasının ardından modifikasyon parametreleri belirlenen SPGE yüzeylerine 5 µL hacminde a-PSMA (10 µg/µL) çözeltileri damlatılmıştır. Bu aşamada karbonildiimidazol (CDI) ile aktifleştirilmiş Cys-AuNp'lerinin amino gruplarıyla (–NH₂), a-PSMA antikorunun hidroksil (–OH) uçları arasında ester bağı yapılması amaçlanmıştır. Son aşamada ise antijen bağlanmasının etkinliğini olumsuz etkileyecek fonksiyonel grupların SSA ile inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda modifiye SPGE'ler, 30 dakika boyunca 5 µL hacmindeki %1'lik SSA çözeltisi ile etkileştirilmiştir.



Şekil 3.4 : CDI etkileşim mekanizması [127].

Antikor immobilizasyonu gerçekleştirilen elektrotlar (Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE), antijen ölçümü yapılabana kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiş, ölçüm öncesinde soğuk PBS (pH:7,4) ile 3 defa yıkanarak kurutulmuştur.

3.1.2.6 Hücre kültürü çalışmaları

İnsan PK epitel hücre hatları LNCaP, C4-2 ve MDA PCa-2b ve sağlıklı prostat hücreleri (NrPEC) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir. Tüm PK hücreleri, %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) içeren RPMI 1640 (KN: 11875093) besiyerinde standart hücre kültürü koşullarında gün aşırı besiyeri değişimi sağlanarak çoğaltılmıştır. Normal prostat epitel hücreleri (NrPEC) ise ATCC talimatlarına göre, L-Glutamin, Ekstrakt P, Epinefrin, rh TGF- α , hidrokortizonlu hemisüksinat, rh insülin ve Apo-transferin ile takviye edilmiş prostat epitel hücresi bazal ortamında muhafaza edilmiştir. Tüm hücreler standart hücre kültürü koşullarında geliştirilmiş ve protein izolasyonu yapılacak hücrelerin izolasyon işleminin öncesinde Bio-Rad otomatik hücre sayıcı (Kaliforniya, ABD) ile sayımları yapılmıştır.

3.1.2.7 Protein izolasyonu ve immünoblot analizi

İmmünoblot analizi için, hücre lizatları proteaz inhibitör kokteyli ve 1 mM PMSF içeren 1 x RIPA tamponunda hazırlanmıştır. Hücre ekstraktları, mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirilerek 10 dakika boyunca 14.000 g hızla santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatantlar toplanarak protein miktarları, BCA Kiti (Thermo Scientific) ile belirlenmiştir. SDS-PAGE aşamasında, eşit miktarda protein (30 μ g) nitroselüloz membrana aktarılarak %5 yağsız kuru sütle bloke edilmiş ve proteinler elektroforez edilmiştir. PSMA antikor ve ikincil HRP-konjugasyonu yapılan proteinler, kemilüminesans tespiti ile problemlenmiştir. Western blotların görüntüleri Kodak Image Station 4000MM (Carestream Health Inc, ABD) cihazı kullanılarak alınmış ve ImageJ programı kullanılarak görüntüler üzerinden protein bantlarının tübülün yükleme kontrol bantlarına oranlanmış ve görece protein miktarları hesaplanmıştır.

3.1.2.8 Modifiye elektrot yüzeylerinin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları

Amin gruplarınca fonksiyonelleştirilmiş altın nanoparçacıkların karakterizasyonları doğrudan kolloidal parçacıklar kullanılarak, ekran-baskılı altın elektrotlara ait fiziksel ve kimyasal analizler ise çalışma elektrodu üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen Cys-AuNp'lerin fiziksel karakterizasyonları aşamasında; parçacık boyutu ve morfolojisinin analizi TEM ile, Cys-AuNp'ların yüzey yükü ve hidrodinamik çaplarının ölçümü ise Zeta potansiyeli analiz cihazı (Nano-ZS, Zetasizer, Malvern Instruments) ile gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal karakterizasyonlar kapsamında ise, Cys-AuNp'ların ışıkla etkileşimleri ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis, Lamda-25, PerkinElmer) absorpsiyon spektroskopisi ile 200-700 nm aralığındaki dalga boylarında incelenmiştir. Yüzey fonksiyonel gruplarının belirlenmesi aşamasında ise Zayıflatılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR, Spectrum 100, Perkin-Elmer) cihazı kullanılmıştır. Dalga numarası 4000–650 cm^{-1} aralığında tarama yapılmıştır.

3.1.2.9 Ekran-baskılı elektrotların fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları

SPGE yüzeylerinin modifikasyon işlemleri öncesi ve sonrasındaki fiziksel karakterizasyonları alan emisyonlu -taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Kimyasal karakterizasyonlar kapsamında ise yüzey fonksiyonel gruplarının belirlenmesi hedeflenmiş ve bu kapsamda ATR-FTIR cihazı kullanılmıştır.

3.1.2.10 Elektrokimyasal analizler ile antikor-antijen etkileşiminin etkinliğinin belirlenmesi

Elektrokimyasal analizler kapsamında modifiye edilmemiş (SPGE) elektrotlar CV ve EIS analizleri, modifiye edilmiş (Cys-AuNp/SPGE, Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE) tüm elektrotlar ise DPV, CV ve EIS analizlerine tabi tutulmuştur. Bu kapsamda SPGE'lerin CHI elektrokimyasal ölçüm düzeneğine bağlantısı yapılmış ve elektrot Faraday kafesinin içerisine yerleştirilerek, PBS (pH:7,4) ortamında hazırlanan 0,1 M potasyum klorür (KCl) ve 250 μM ferrisiyanür/ferrosiyanür $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}]$ içeren çözeltisiye daldırılarak elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir.

CV ölçümleri, -0,20 ile 0,40 V aralığında tarama hızı 50 mV/s olacak şekilde yapılmıştır. EIS analizlerinde ise sistem parametreleri; 0,10 Hz ile 100 kHz frekans aralığında, açık devre potansiyeli (V_{OCP}) 0,12 V olacak şekilde belirlenmiştir. EIS analizlerinden elde edilen veriler CV analizinden elde edilen verilerle karşılaştırılarak modifikasyon sonrasındaki yüzey iletkenliği ve yüzey alanı hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca Randles Hücresi simülasyonu kullanılarak kinetik ve yük transfer bileşenlerini içeren eşdeğer devre kurulmuş ve R_{CT} değerleri hesaplanmıştır.

DPV ölçümlerinin ilk aşamasında, MDA PCa-2b hücrelerinden izole edilen PSMA proteinlerinin ve PSMA ekspresyonu gösteren LNCaP hücrelerinin immünoensörle etkileşimleri PBS (pH:7.4) ortamında test edilmiştir. DPV parametreleri: tarama voltaj aralığı: -0,1 ile 0,4 V, basamak voltajı 10 mV olacak şekilde belirlenmiştir. PSMA protein/hücre ekleme işlemi sonrasında hazırlanan çözeltiler, manyetik karıştırıcı yardımıyla 5 dakika süresince karıştırılmış ve DPV analizleri ile elde edilen sinyaller kaydedilmiştir.

İmmünoensörün aktif yüzeyine hedef analitlerin bağlanması sonucunda engellenen elektron transferi, katodik akımda azalmaya sebep olmaktadır. DPV analizi ile, konsantrasyon artışı ile ters orantılı olarak değişim gösteren akım değerleri kaydedilmiş ve bu veriler kalibrasyon eğrisinin hazırlanarak immünoensörün performans parametrelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Sensörün seçiciliği, PSMA ekspresyonu gösteren (C4-2 ve LNCaP) ve göstermeyen (PC3) insan PK epitel hücre hatları ile sağlıklı prostat hücreleri (NrPEC) kullanılarak test edilmiştir. PSMA ekspresyonu gösteren ve göstermeyen hücrelerin immünoensörle etkileşimleri sonucunda oluşan sinyaller DPV analizleri ile incelenmiş ve yorumlanmıştır. DPV parametreleri: tarama voltaj aralığı: -0,1 ile 0,4 V, basamak voltajı 10 mV olacak şekilde belirlenmiş ve tüm elektrokimyasal ölçümler 0,1 M KCl ve 250 μM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren PBS (pH:7,4) ortamında gerçekleştirilmiştir.

Tüm veriler, Origin 2019 programına aktarılmış ve her grafik için lineer eğri uydurma (linear curve fitting) yapılarak, geliştirilen immünoensörün en düşük ölçüm limiti (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır (n=3). Bu hesaplamalar, en düşük ölçüm limiti ($\text{LOD}=3,3 \times (\text{y eksenini kestiği noktanın standart sapması}/\text{eğim})$) ve ölçüm sınırı ($\text{LOQ}=10 \times (\text{y eksenini kestiği noktanın standart sapması}/\text{eğim})$) denklemleri kullanılarak yapılmıştır.

3.2 Bulgular ve Tartışmalar

3.2.1 Altın nanoparçacıkların karakterizasyonuna ait sonuçlar

Elektrokimyasal indirgenme yöntemi nanoparçacık modifikasyonunun en etkin ve kolay şekilde gerçekleştirilebilmesi için literatürde sıkça kullanılmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında sisteaminle etkileştirilen altın partikülleri elektrokimyasal indirgenme yoluyla amino gruplarıyla modifiye edilmiş ve amino grubunca fonksiyonelleştirilmiş altın nanoparçacıkların üretimi gerçekleştirilmiştir [128]. Sisteamin, bir ucunda amino

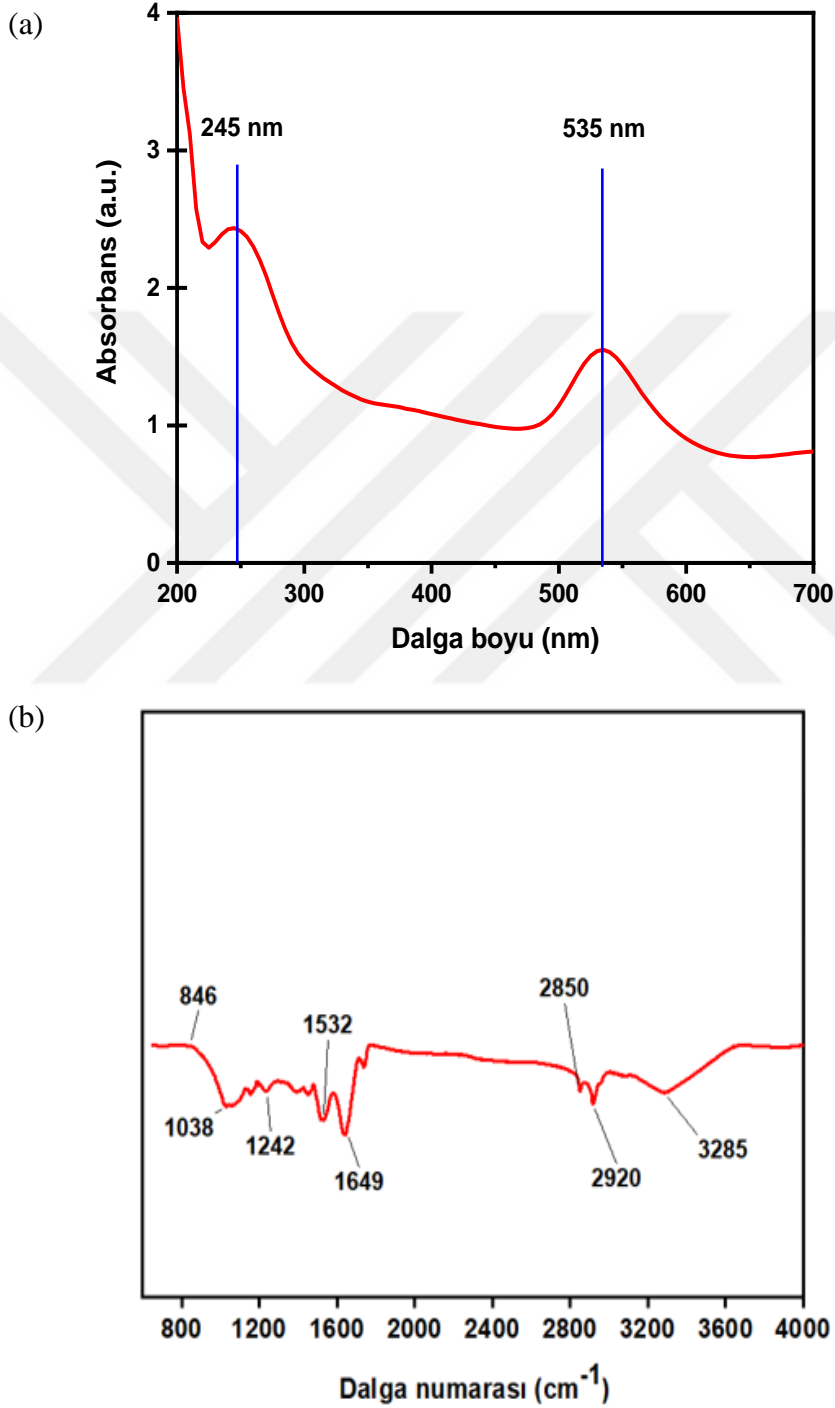
grubu diğer ucunda ise tiol grubu olan katyonik bir yapıya sahiptir. Altın nanoparçacıkların amino grubunca fonksiyonel olmasının sebebi, sisteamin moleküllerinin tiol ucunun altına bağlanırken amin gruplarının yüzeyde serbest kalmasıdır. Serbest kalan bu amin fonksiyonel uç, yapıya biyouyumluluk kazandırılması ve biyolojik ajan bağlanması açısından oldukça önemlidir. Sisteamin modifikasyonunun başarısını tespit etmek amacıyla üretilen nanoparçacıkların UV-Vis ve ATR-FTIR spektrum analizleri yapılmıştır. UV-Vis ve ATR-FTIR analizlerine ait sonuçlar Şekil 3.5’de verilmektedir.

Altın nanoparçacıklarının formasyonu, UV-Vis spektrumunda (Şekil 3.5a) altın nanoparçacığın yüzey plazmon rezonansı olan 535 nm absorpsiyon değeri gözlemlenmektedir. Aynı zamanda sisteamin ile altın arasındaki etkileşim sonucunda 245 nm dalga boyunda oluşan kayma, sisteaminin altın partikülleri tarafından absorplandığını göstermektedir. Ayrıca, modifikasyonun etkinliği, modifiye edilmemiş halde turuncu/kırmızı renkte olması beklenen AuNp kolloidal çözeltisinin sisteaminle modifikasyonu sonucunda renginin mora kayması ile gözle de teşhis edilebilmektedir [6,129].

FTIR-ATR spektral analizine (Şekil 3.5b) bakıldığında ise, 3285 cm^{-1} ’de karakteristik –NH gerilme piki (–NH ve NH_2 titreşim modları) ve 1649 cm^{-1} ’de gözlemlenen δNH , NH_2 deformasyon vibrasyon pikleri, sisteaminin AuNp’lar tarafından hapsedildiğini kanıtlamaktadır. Ek olarak sisteamine ait pikler değerlendirilecek olursa, 2920 ve 2850 cm^{-1} aralığındaki zayıf pikler – CH_2 gerilme; 1532 ve 1038 cm^{-1} aralığındaki pikler ise –NH bükülme modlarına aittir [6,129].

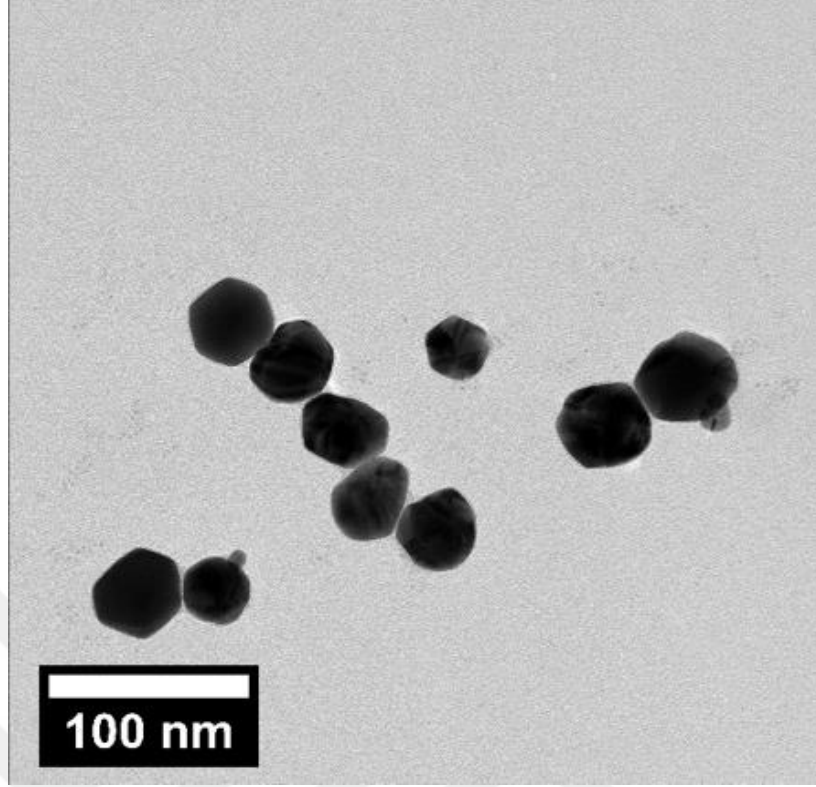
Kimyasal karakterizasyonlara ek olarak, Cys-AuNp’ların fiziksel yapı analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda parçacıkların hidrodinamik ve kuru çapları ölçülmüş, ayrıca parçacıkların kolloidal çözeltideki dağılımları incelenmiştir. Negatif yüklü AuNp’lerin sisteaminle etkileşimi sonucunda değişen potansiyel değerleri Zeta potansiyel analizi ile belirlenmiş ve sisteamin modifikasyonunun etkinliği gösterilmiştir. Cys-AuNp’ların ortalama ıslak çapı ve Zeta potansiyel değerleri: $37,8 \pm 6,3\text{ nm}$ ve $+43,9 \pm 3,1\text{ mV}$ olarak hesaplanmıştır ($n=10$). Pozitif potansiyel değerinden de anlaşılacağı şekilde, anyonik AuNp yüzeyine katyonik sisteaminin kemisorpsiyon aracılığıyla bağlandığı ve bu sayede AuNp’ların yüzeyinde pozitif potansiyel yarattığı söylenebilir. Parçacıkların morfolojik özelliklerinin ve kuru çaplarının belirlenmesinde TEM analizi kullanılmıştır. TEM görüntüsü incelendiğinde Cys-

AuNp'lerin bir bölümünün kümelenme eğiliminde oldukları gözlenmektedir. ImageJ programı kullanılarak hesaplanan kuru haldeki ortalama çap değeri olan $30,2\pm 7,1$ nm ($n=50$) beklenildiği üzere $37,8\pm 6,3$ nm olarak hesaplanan ıslak çap değerinden yaklaşık 8 nm daha küçüktür. Cys-AuNp' lara ait TEM görüntüsü ve çap dağılımına ait grafik Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

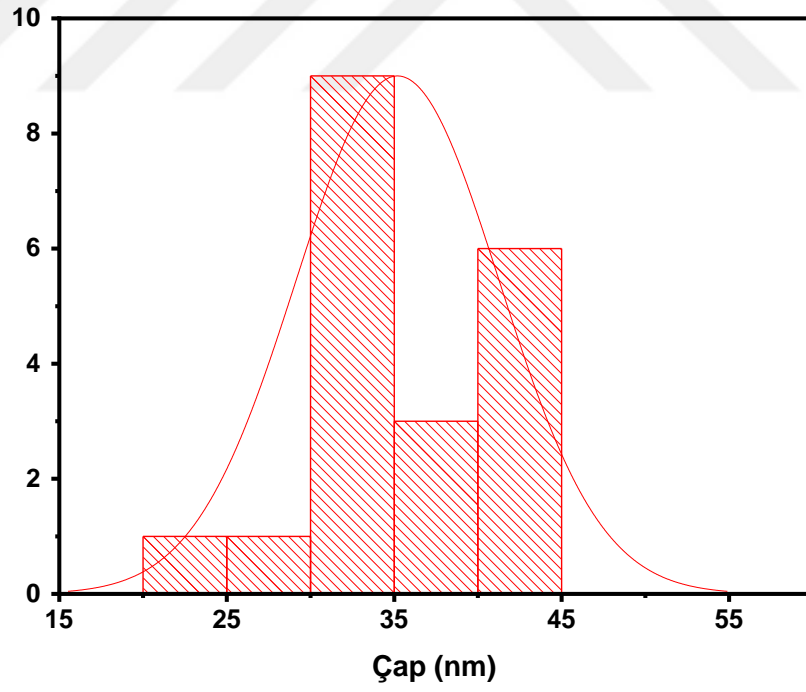


Şekil 3.5 : Cys-AuNp'lara ait (a) UV-Vis ve (b) ATR-FTIR spektrumları.

(a)



(b)



Şekil 3.6 : Cys-AuNp'lara ait (a) TEM görüntüsü ve (b) çap dağılımına ait grafik.

3.2.2 Ekran-baskılı elektrotların (SPGE) analizlerine ait sonuçlar

3.2.2.1 SPGE yüzey analiz sonuçları

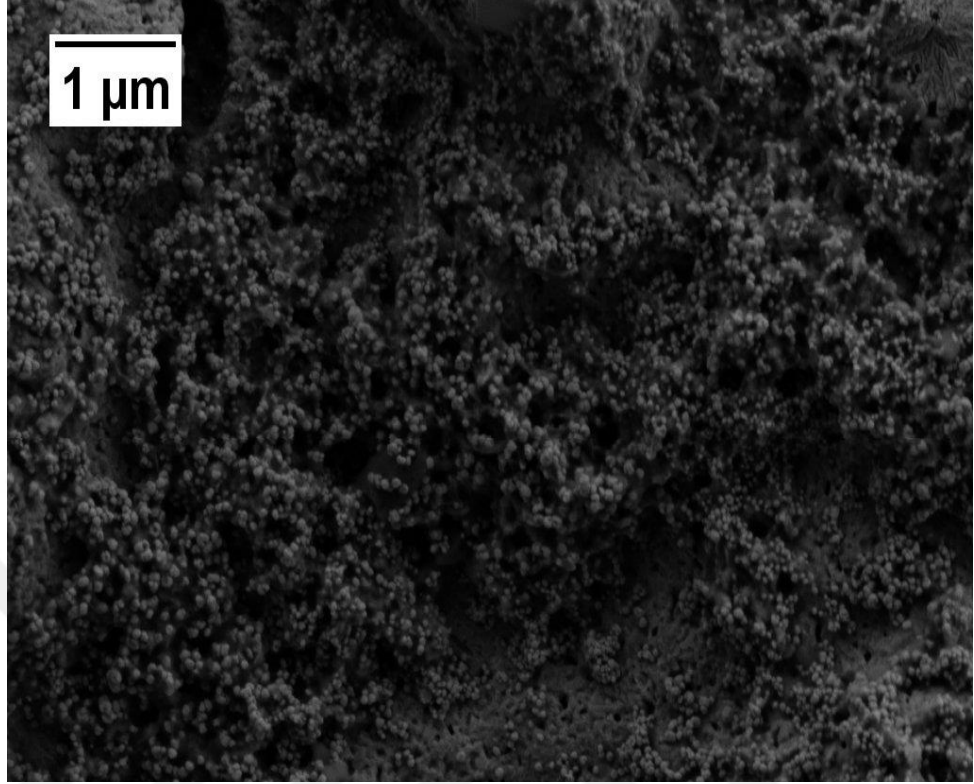
Modifiye olmamış SPGE ve Cys-AuNp ile modifiye edilen Cys-AuNp/SPGE elektrotlarına ait yüzey analizleri için FE-SEM cihazı kullanılmıştır. Örnek hazırlama aşamasında, toplamda 10 µL hacimli Cys-AuNp çözeltisi SPGE çalışma elektrodu yüzeyine damlatılıp kurutulduktan sonra elektrotlar yıkanarak SPGE yüzeyine tutunmadan kalan nanoparçacıklardan temizlenmiş ve ikinci kurutma işlemi sonrasında stablara yerleştirilen örneklerin analizi yapılmıştır. Şekil 3.7’deki FE-SEM görüntüleri incelendiğinde, modifikasyon işleminden sonra nanoparçacıkların yüzeye tutunduğu, yıkama işlemi sonrasında dahi yüzeyden ayrılmadığı gözlemlenmektedir. Ayrıca, nanoparçacıklar çalışma elektrodunun belli bölgelerde birikim gösterse de genel olarak homojen bir dağılım göstermektedir. SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere, yalnızca 10 dakika sürede modifiye edilen Cys-AuNp modifikasyonu ile çalışma elektrodunun etkin yüzey alanı artırılmış ve modifiye olmayan elektroda kıyasla yüzeye daha fazla miktarda a-PSMA bağlanmasına olanak sağlanmıştır. Ek olarak Cys-AuNp’lar, elektron transferinin artırılarak sinyal hassasiyetinin de yükseltilmesini sağlamışlardır.

3.2.2.2 PSMA immüno blot testi sonuçları

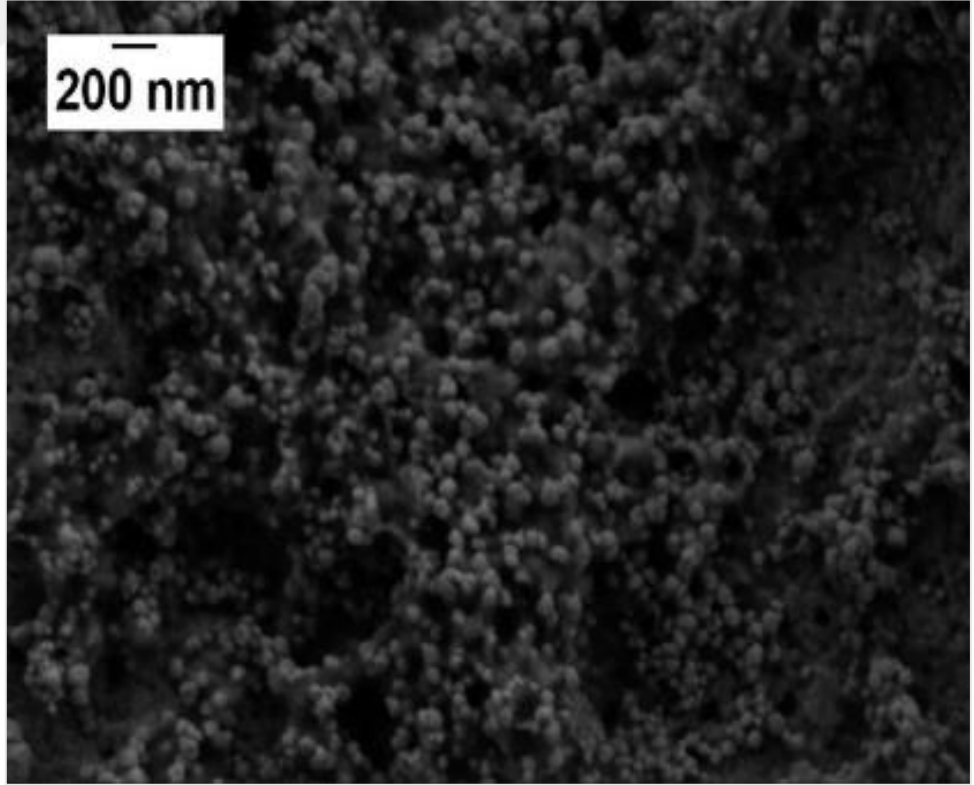
İmmüno blot testi kapsamında, sağlıklı prostat epitel hücre hattı (NrPEC) ve genetik kompleksliğe sahip çeşitli prostat kanseri hücre hatları (PC3, LNCaP, C4-2 ve MDA PCA-2b) test edilerek PSMA ekspresyonları incelenmiştir. Bu kapsamda, ImageJ programında Western blot görüntüsünün kontrast ayarları değiştirilmiş, protein bantlarının ve yükleme kontrollerinin bant genişlikleri piksel seviyelerine bağlı olarak hesaplanmıştır. Ardından seçilen protein bandının o banda karşılık gelen piksel değerini kontrol bandı piksel değerine oranlayarak yüklenen protein miktarlarının görece oranları belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, MDA PCA-2b’ nin ~1,92 oranıyla en fazla PSMA ekspresyonu gösteren [PSMA(+)] hücre hattı olduğu gözlemlenmiştir. C4-2 ve LNCaP’ in PSMA ekspresyonları ise birbirlerine oldukça yakındır (~1,31). Buna karşın prostat kanser hattı olan PC3 ve prostat epitel hücre hattı NrPEC’ nin sırasıyla ~0,28 ve ~0,26 olarak hesaplanan bant genişlik oranları prostat kanseri olmasına rağmen PC3’ nin tıpkı sağlıklı hücrelerdeki gibi PSMA ekspresyonu

ifade etmektedir [PSMA(-)]. Bahsi geçen tüm hücreler, PSMA tabanlı immünosensörün seçicilik testi kapsamında kullanılmıştır (Şekil 3.8).

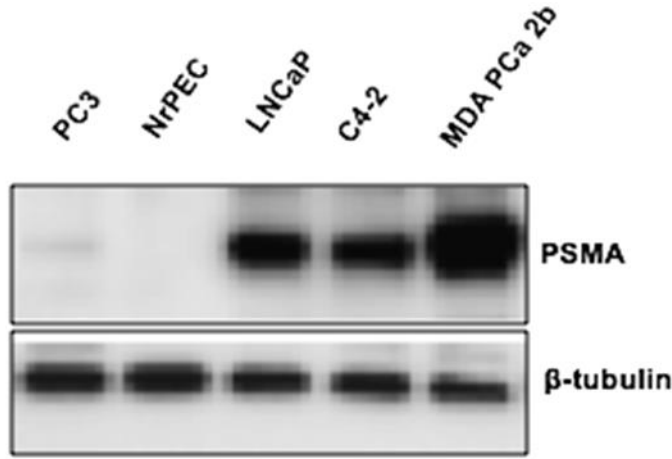
(a)



(b)



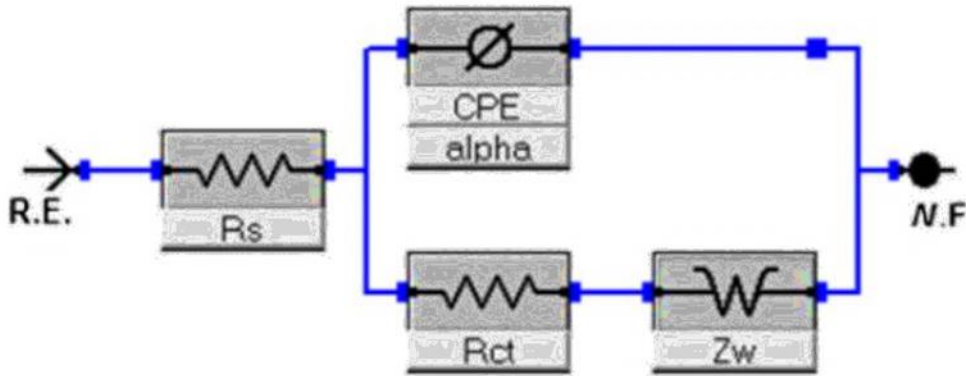
Şekil 3.7 : Cys-AuNp modifiye SPGE'lerin FE-SEM görüntüleri.



Şekil 3.8 : İmmünoiblot testi

3.2.2.3 Elektrokimyasal analiz sonuçları

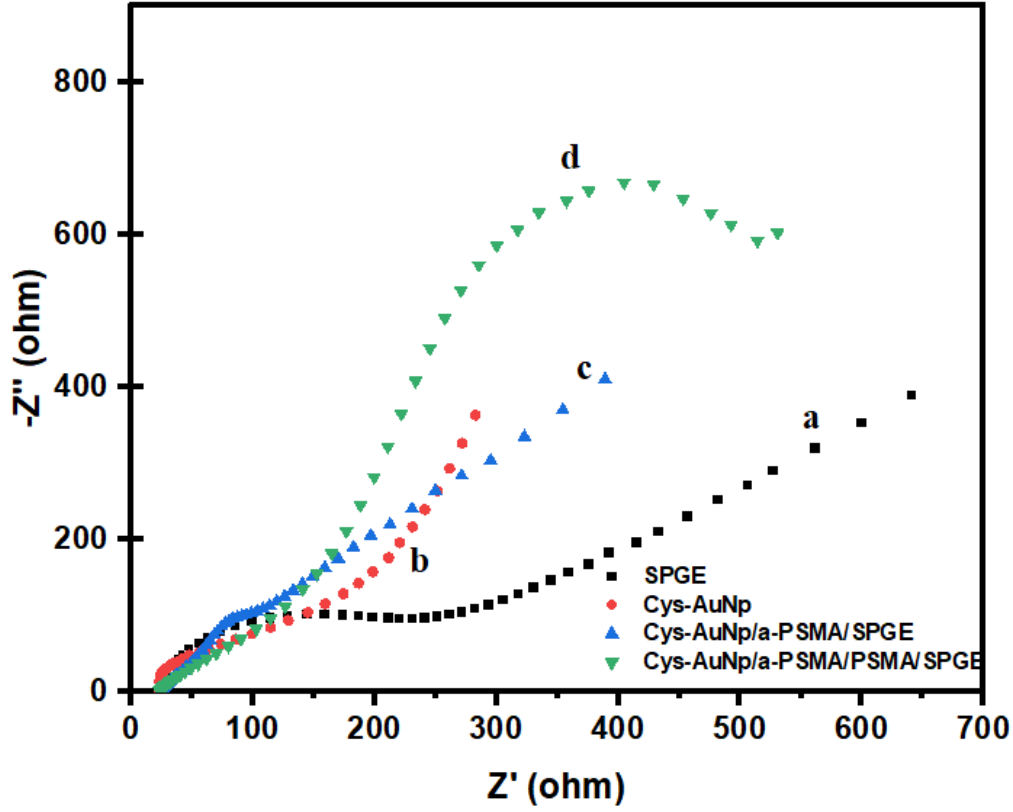
Elektron transfer rezistansı (R_{ct}), redoks çözeltisi ile elektrodun ara yüzeyinde gerçekleşen elektron transfer hızını ifade eder. Geçmiş çalışmalar, yük transfer direnci ile elektrodun yüzeyindeki madde miktarı arasında doğru orantı olduğunu göstermektedir. R_{ct} değeri, EIS ölçümünde yüksek frekanslarda elde edilen Nyquist eğrisinin yarı çember çap değerine karşılık gelmektedir. Randles eşdeğer devresi, empedans spektrumunun sayısallaştırılmasında en sık kullanılan eşdeğer devre modelidir. Bu devre modelinde C_{DL} , sistemin ikili katman kapasitans değerini; R_{ct} ve R_{se} yük transfer direnci ve elektrolitin direncini ve Z_{wi} ise Warburg empedansını temsil etmektedir [130]. Doktora tez çalışması kapsamında, EIS analizleri yapılmış ve elde edilen veriler kullanılarak CHI elektrokimyasal ölçüm sisteminin program arayüzü aracılığıyla Şekil 3.9’da gösterilen eşdeğer devre modeli çizilerek EIS analizi sonucu elde edilen Nyquist eğrilerinin sayısal değerlere dönüştürülmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.9 : Nyquist eğrisi eşdeğer devre modeli gösterimi.

Doktora tezi kapsamında, SPGE'ler modifikasyon işlemi öncesinde ve her modifikasyon basamağı sonrasında EIS ölçümüne tabi tutulmuş ve Randles eşdeğer devresine fit edilen empedans spektrumu kullanılarak yaklaşık R_{CT} değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.9). Cys-AuNp modifikasyonu öncesinde SPGE'ler $335,0 \Omega$ değerinde bir yük transfer rezistansına sahiptir. Cys-AuNp modifikasyonu sonrasında bu rezistans değeri $26,1 \Omega$ değerine düşmüştür. Rezistans değerindeki bu azalışın nedeni, Cys-AuNp'ların elektrot yüzey alanını artırması ve sisteminin katyonik olması nedeniyle anyonik redoks bileşenlerini elektrostatik olarak çekerek elektron transfer hızının artmasına neden olmasındır. Cys-AuNp/SPGE yüzeylerine a-PSMA immobilizasyonu sonrasında üretilen Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE örneğinin R_{CT} değeri $118,5 \Omega$ seviyesine yükselmiştir. R_{CT} değerindeki bu yükselmenin nedeni, elektrot yüzeyine immobilize edilen a-PSMA moleküllerinin redoks probunun elektrot yüzeyine difüzyonunu engellemesidir. Elde edilen bu sonuçlar, modifiye SPGE yüzeylerine a-PSMA immobilizasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Son olarak 500 pg PSMA antijeni olan reaktörde EIS analizi yapıldığında, R_{CT} değerinin $512,8 \Omega$ seviyesine ulaştığı gözlenmiştir. Bu durum proteinin iletken olmaması ve elektrot yüzeyine modifikasyonu sonucunda redoks probunun elektroda difüzyon hızındaki azalmadan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla artan bu R_{CT} değerine bağlı olarak, Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE elektroduna PSMA'nın bağlandığı sonucuna ulaşılmaktadır. Bu durum CV analizlerinde de bariz olarak görülmektedir. Şekil 3.10'da gösterilen Nyquist eğrileri, modifikasyon işlemi öncesinde (a) SPGE, (b) Cys-AuNp modifikasyonu sonrası Cys-AuNp/SPGE, (c) antikor immobilizasyonu sonrası Cys-AuNp/a PSMA/SPGE ve (d) 500 ng antijen tutunumu sonrasındaki Cys-AuNp/a-PSMA/PSMA/SPGE elektrotlarını göstermektedir.

Elektrokimyasal analizlerin ikinci aşamasında modifikasyon hakkında daha detaylı bilgi edinebilmek amacıyla döngüsel voltametri (CV) analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.11.a' da modifikasyon işlemi öncesinde SPGE, H_2SO_4 ile aktifleştirilen SPGE ve Cys-AuNp modifiye SPGE'lerin $0,1 \text{ M KCl}$ ve $250 \mu\text{M} [\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ içeren PBS (pH:7,4) ortamına daldırıldığında $-0,2 \text{ V}$ ile $0,6 \text{ V}$ voltajları arasında ters katodik tarama sonucunda elde edilen voltamogramlar verilmektedir.



Şekil 3.10 : Elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılarak elde edilen Nyquist eğrileri.

Şekil 3.11 (a) incelendiğinde, yüzey aktifleştirmesinin SPGE' nin aktifleştirme işlemi öncesinde ölçülen katodik pik değeri olan $-54,01 \mu\text{A}$ ' den $65,77 \mu\text{A}$ seviyesine yükselttiğini ve redoks pikleri arasındaki voltaj farkının (ΔE_p) $0,167 \text{ V}$ ' tan $0,118 \text{ V}$ seviyesine düşürdüğünü dolayısıyla elektrodun sinyal ayırım gücünü olumlu etkilediği sonucuna ulaşılmaktadır. Ayrıca, yüzeyleri aktifleştirilen SPGE'lerin $5, 10$ ve $20 \mu\text{L}$ hacimlerdeki Cys-AuNp ile modifikasyonu sonrasında yapılan CV analizlerinde, katodik pik değerlerinin sırasıyla: $-73,21$; $-94,48$ ve $-86,12 \mu\text{A}$ olarak okunduğu ve $10 \mu\text{L}$ hacmindeki Cys-AuNp modifikasyonunun optimum sinyali verdiği gözlemlenerek immünosensör yüzeylerinin $10 \mu\text{L}$ ' lik hacmindeki Cys-AuNp ile modifiye edilmesine karar verilmiştir.

Şekil 3.11.b' de, a-PSMA immobilizasyonu sonrasında katodik akım pik değerinin $-79,22 \mu\text{A}$ ' e düşerken, ΔE_p değerinin $0,16 \text{ V}$ ' a yükseldiği gözlemlenmiştir. Son olarak 500 ng PSMA proteini immünosensörle etkileştirildiğinde elektron transfer hızının $\Delta E_p=0,10 \text{ V}$ ' e ve katodik pikin $-71,22 \mu\text{A}$ 'e düştüğü gözlemlenmiştir. CV ve EIS analizleri beraber incelendiğinde immünosensöre yapılan yüzey modifikasyonlarının her basamakta geçerli olduğu ve modifikasyonlar sonucunda üretilen immünosensörün

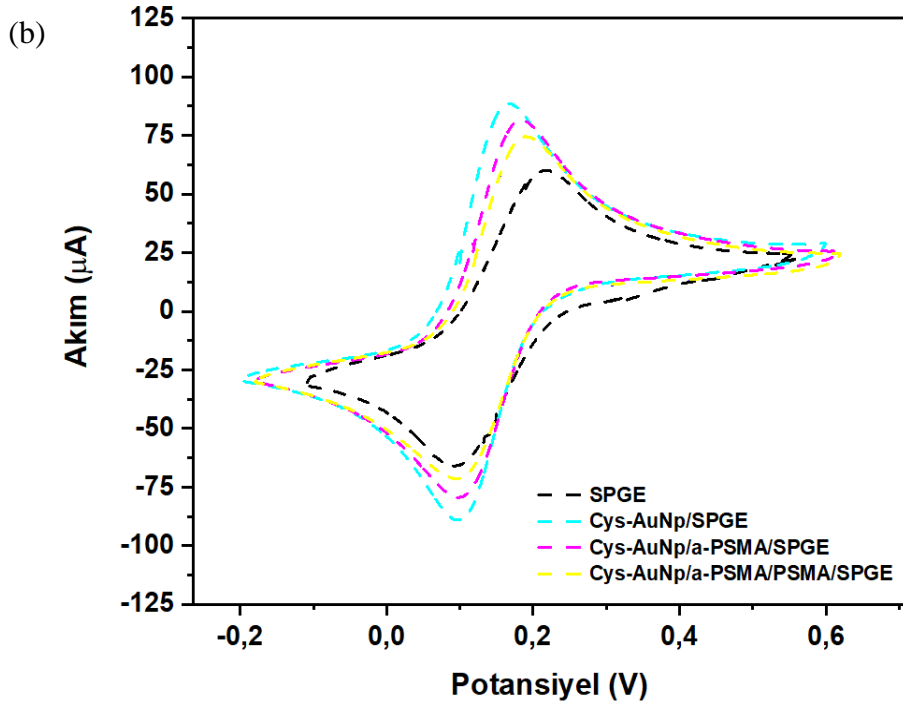
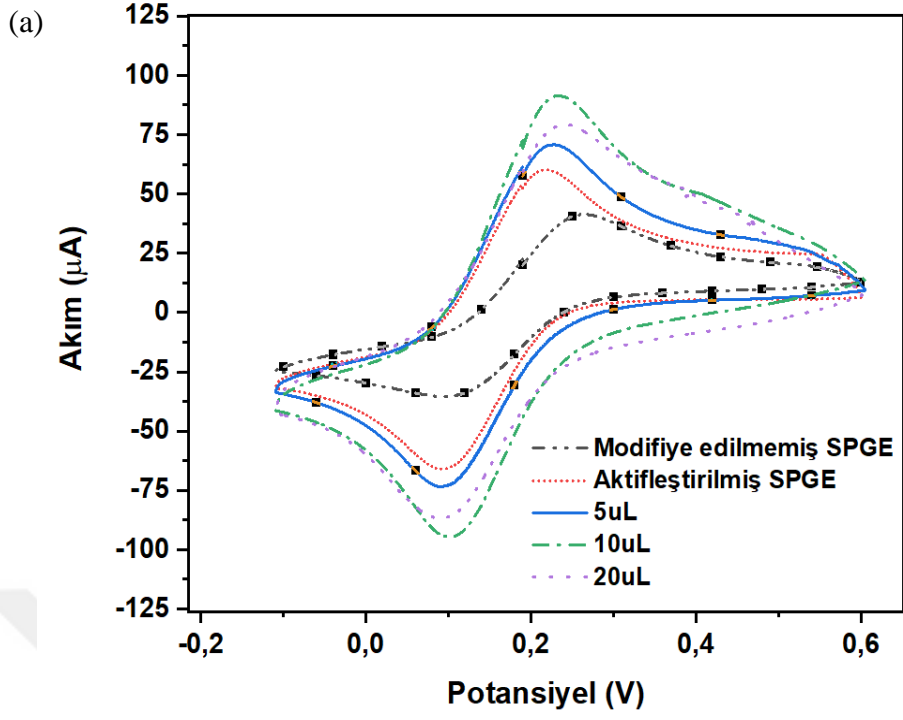
hedef proteini PSMA'yı biyolojik tanıyıcı yüzeyine başarıyla bağladığını göstermektedir.

3.2.2.4 PSMA ve a-PSMA spesifik bağlanmasının test edilmesi

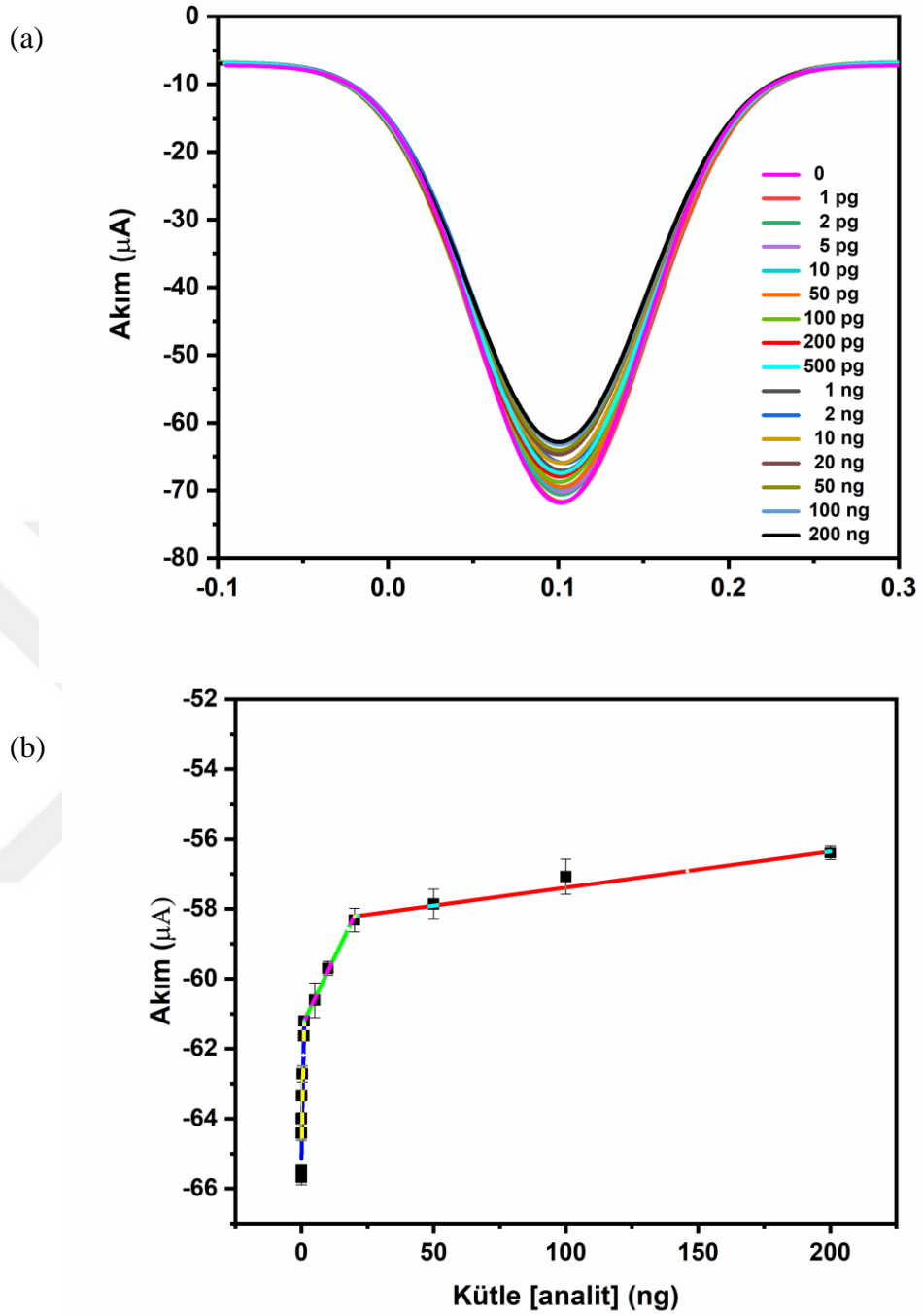
Elektrokimyasal analizlerin son aşamasında, 0,1 M KCl ve 250 μM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 5 mL'lik PBS (pH:7,4) çözeltisine PSMA proteini (0-200 ng/5 mL) ve PSMA ekspresyonu gösteren LNCaP hücreleri (0-400 hücre/5 mL) eklenerek Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE immünosensörü ile etkileşimleri sonucunda üretilen sinyaller test edilmiştir. Bu doğrultuda, DPV analiz yöntemi kullanılmış, değişen PSMA protein/PSMA ekspresyonu gösteren hücre miktarlarına karşılık gelen katodik akımların pik değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlanmış ve immünosensörün performansı belirlenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak, PSMA proteinlerinin immünosensörle etkileşimlerinin oluşturduğu sinyaller test edilmiştir. Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE immünosensörünün, PBS (pH=7,4) içerisindeki akım cevabı protein ilavesi olmadan önce ortalama $-71,83 \pm 0,2 \mu\text{A}$ olarak ölçülürken, reaktöre 200 ng PSMA proteini ilave edildikten sonra akım $-62,79 \pm 0,45 \mu\text{A}$ seviyesine düşmüştür. Fizyolojik tampon çözelti ortamındaki PSMA antijenlerinin ölçümünde 3 ayrı lineer bölge olduğu gözlemlenmiştir. Bu bölgeler: 0-1 ng/5 mL arası ($R^2=0,964$); 1 ng ile 20 ng/5 mL arası ($R^2=0,998$) ve 20 ng-200 ng/5mL aralığı ($R^2=0,991$) olarak belirlenmiştir.

1-20 ng/5 mL arasındaki lineer bölgeyi ifade eden denklik kullanılarak, immünosensörün PBS ortamındaki antijen ölçümü için 1-20 ng/5 mL arasındaki lineer bölgeyi ifade eden doğru denklemi kullanılarak, LOD değeri 0,206 ng/5 mL (0,041 ng/mL), LOQ değeri ise 0,625 ng/5 mL (0,125 ng/ mL) olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.12). Hassasiyet ise 0,03 $\mu\text{A/nM}$ ' dır.

DPV ölçümlerinin ikinci basamağında, PBS (pH:7,4) ortamındaki PSMA ekspresyonu gösteren LNCaP hücrelerinin immünosensörle olan elektrokimyasal etkileşimleri test edilmiştir. Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE elektrodu, 0,1 M KCl ve 250 μM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren PBS (pH:7,4) ortamında iken ölçülen akım pik değeri $-71,85 \pm 1,20 \mu\text{A}$ iken, 400 LNCaP hücrelerinin reaktöre ilave edilmesi bu akım değerini $-44,58 \pm 1,43 \mu\text{A}$ seviyesine düşürmüştür (Şekil 3.13a).



Şekil 3.11 : Döngüsel voltametrik analizler sonucunda elde edilen voltamogramlar. (a) aktifleştirme etkisi, (b) modifikasyon etkisi.



Şekil 3.12 : PSMA immünosensörünün PBS (pH:7,4) ortamındaki 0-200 ng aralığındaki PSMA antijenleriyle etkileşimi sonucunda elde edilen DPV sinyalleri (n=3).

Lineer kalibrasyon eğrisine göre (Şekil 3.13b), PSMA immünosensörünün 0-400 LNCaP hücrelerinin ölçümünde 2 lineer bölge gözlenmektedir. Bu lineer bölgelerden birincisi 0-100 hücre ölçülen aralık ($R^2=0,997$), ikincisi ise 100-400 hücre ölçülen aralıktır ($R^2=0,998$). Lineer regresyonu yüksek olan ikinci lineer bölgeyi tanımlayan

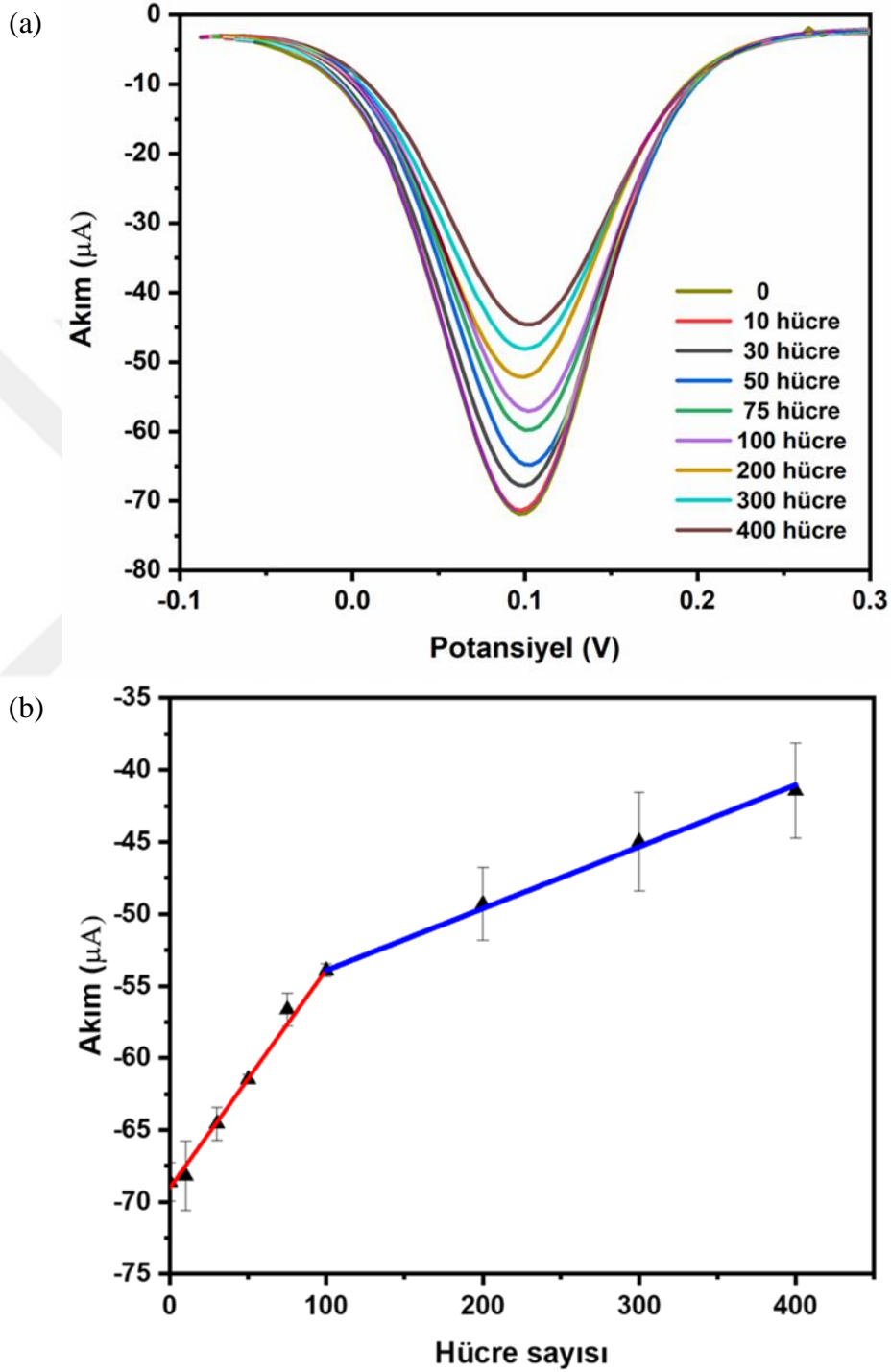
doğru denklemi denklemini kullanılarak LOD değeri: 12,28 hücre/5 mL (2,46 \approx 3 hücre/mL) ve LOQ değeri ise 37,00 hücre/5 mL (7,4 \approx 7 hücre/mL) olarak hesaplanmıştır. Hassasiyet ise 0,086 μ A(hücre.mL)⁻¹ dir.

Diğer aşamada ise, modifiye haldeki Cys-AuNP/SPGE'lerin serum ortamındaki protein ve hücrelerle etkileşimleri elektrokimyasal olarak test edilmiştir. Bu kapsamda, Cys-AuNP/a-PSMA/SPGE elektrodu, 1:10 (v:v) serum:PBS (pH=7,4) ile yıkanan PSMA protein/hücre örnekleri tampon çözeltilisine ilave edilmiş ve voltametrik analizleri yapılmıştır. Bahsi geçen serum-PSMA proteini ve serum-LNCaP hücrelerinin immünosensörle etkileşimlerini gösteren DPV sinyalleri ve ilgili kalibrasyon eğrileri şekil 3.14 ve şekil 3.15'te verilmektedir.

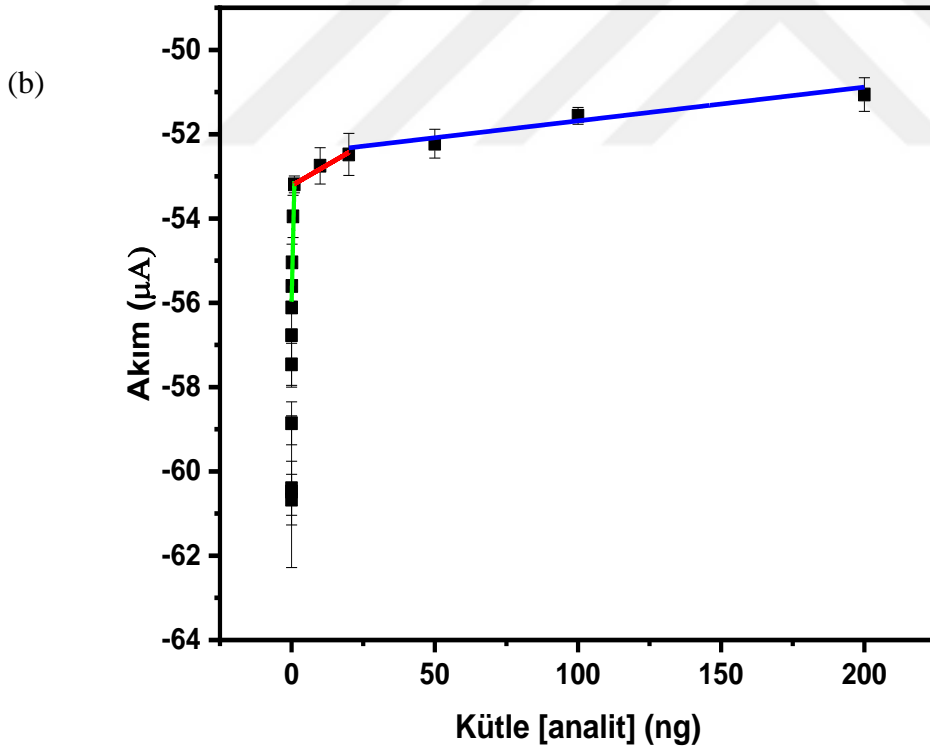
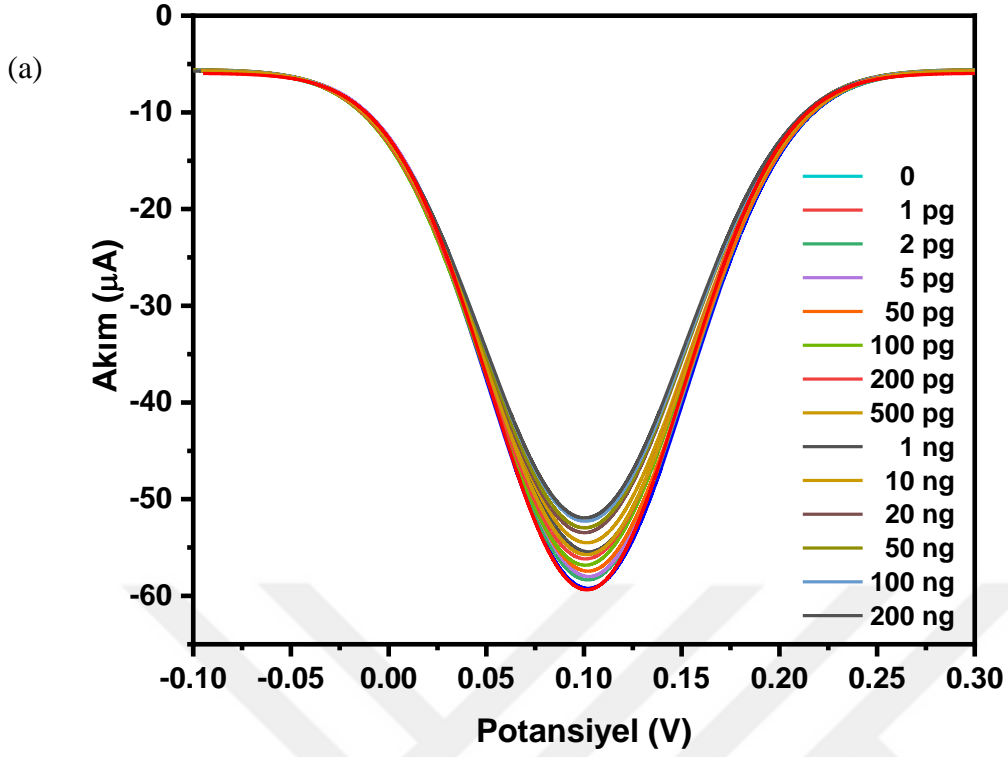
Cys-AuNP/a-PSMA/SPGE elektrodunun protein ilavesi olmadan önce -59,38 \pm 1,32 μ A olan katodik akım pik değeri, reaktörün toplam hacminde 200 ng serum PSMA antijeninin bulunduğu durumunda -51,89 \pm 0,21 μ A seviyesine düşmüştür. Elde edilen lineer kalibrasyon eğrisine göre (şekil 3.14.b), PSMA immünosensörünün hedef PSMA proteiniyle etkileşimi sonucunda elde edilen sinyaller analiz edildiğinde, 50 pg-1000 pg (R²=0,957), 1-20 ng (R²=0,984) ve 20 ng-200 ng (R²=0,896) olacak şekilde birbirinden farklı 3 lineer bölge olduğu gözlemlenmiştir. Serum ortamındaki PSMA antijeninin ölçümünde, LOD ve LOQ belirlenirken lineer regresyonu en yüksek olan 1-20 ng lineer aralığına karşılık gelen doğru, LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde kullanılmış ve bu değerler sırasıyla 0,423 ng/5 mL (0,084 ng/mL) ve 1,282 ng/5mL (0,256 ng/mL) olarak hesaplanmıştır. Hassasiyet ise 0,008 μ A/nM olarak hesaplanmıştır.

Cys-AuNP/a-PSMA/SPGE elektrodu sisteme hücre ilavesi yapılmadığı durumda akım -70.27 \pm 1,34 μ A ölçülürken, reaktöre toplam 400 tane PSMA ekspresyonu gösteren LNCaP hücresi eklendikten sonra akım -63,78 \pm 0.32 μ A seviyesine düşmüştür. Çizilen lineer kalibrasyon eğrisine göre (şekil 3.15.b), PSMA immünosensörünün hücre ile etkileşimi sonucunda elde edilen sinyaller analiz edildiğinde, 0-75 hücre aralığındaki R²=0,942; 75-400 hücre aralığında ise R²=0,998 olarak hesaplanmıştır. Regresyon katsayısı yüksek olan ikinci bölge kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda, LOD değeri 14,00 hücre/5 mL (2,80 \approx 3 hücre/mL); LOQ değeri ise 42,86 hücre/5 mL (8,57 \approx 9 hücre/mL) olarak bulunmuştur. Hassasiyet ise 0,001 μ A.(hücre/mL)⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Fizyolojik tampon ortamında alınan sinyale kıyasla serum ortamında daha düşük intensiteye sahip sinyal elde edilse de verilerden anlaşılacağı üzere immünosensörün farklı ortamlardaki hücreleri ölçüm performansında kayda değer bir

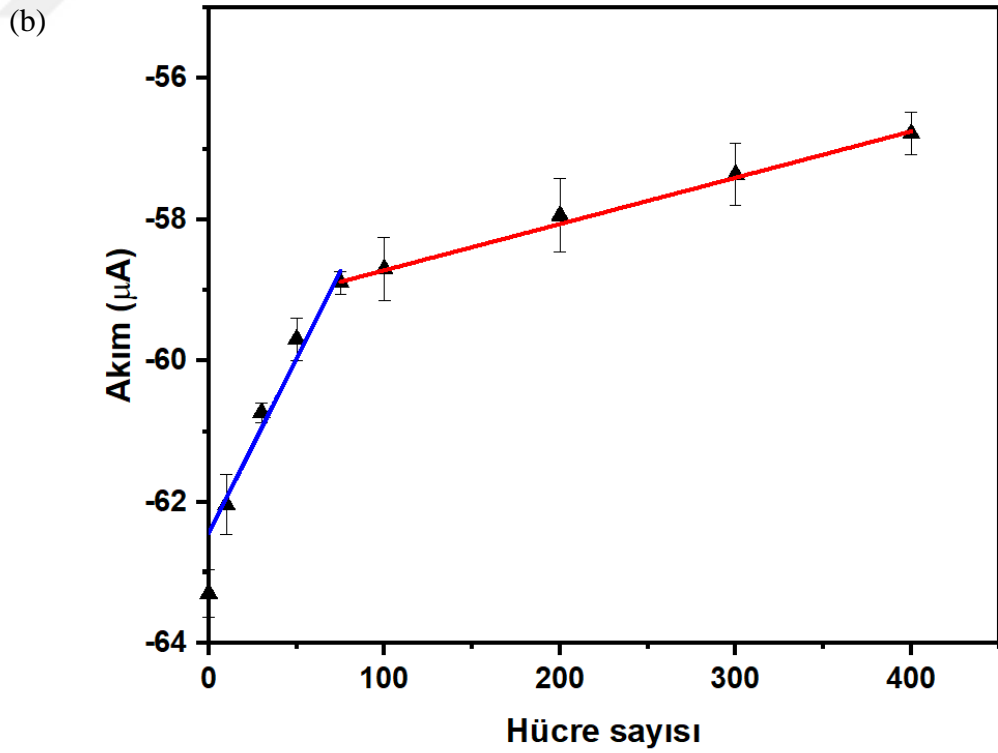
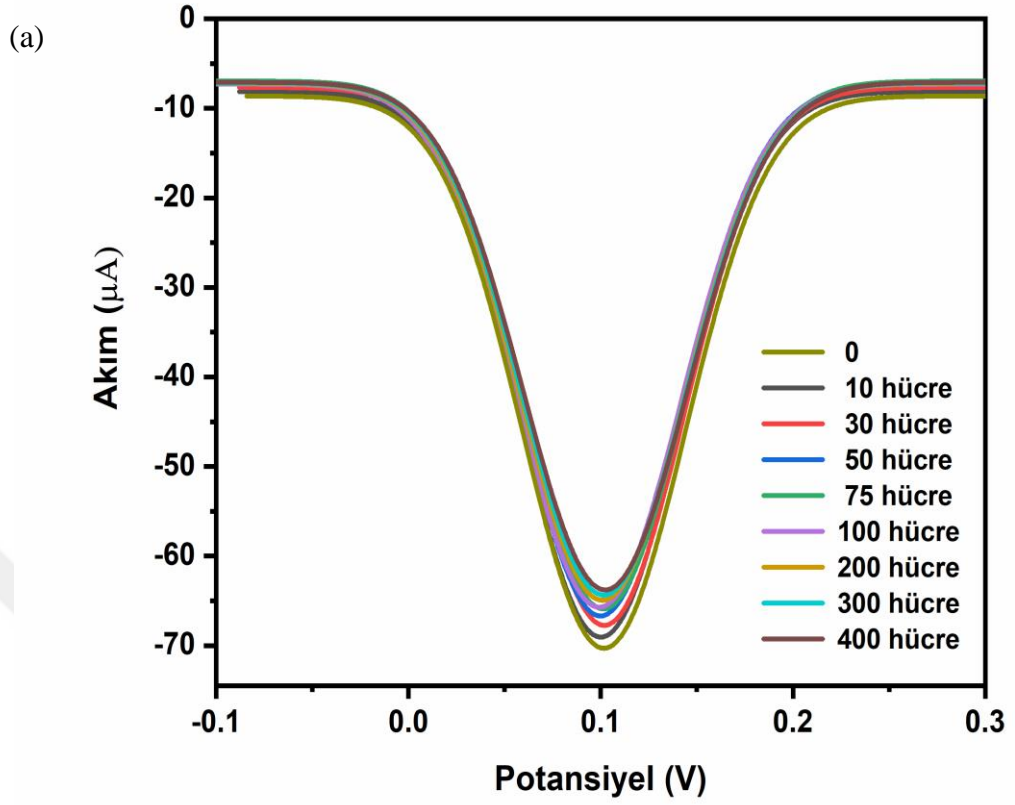
değişim gözlenmemiştir. Serum ortamında ölçülen sinyal intensitelerinin tampon çözelti ortamındaki sinyal intensitelerine kıyasla düşük olmasının sebebinin, serum ortamında bulunan proteinlerin spesifik olmayan bağlarla immünosensör yüzeyine bağlanması ya da reaktör ortamında artış gösteren protein ve hücrelerin $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$ iyonlarının difüzyon yeteneğini azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 3.13 : PSMA immünosensörünün PBS (pH:7,4) ortamına eklenen LNCaP hücreleriyle etkileşimi sonucunda elde edilen sinyaller. (a) DPV analizi sonuçları, (b) kalibrasyon eğrisi (n=3).



Şekil 3.14 : PSMA immünoşensörünün PBS (pH:7,4) ortamına eklenen serum PSMA antijenleriyle etkileşimi sonucunda elde edilen sinyaller. (a) DPV analizi sonuçları, (b) kalibrasyon eğrisi (n=3).



Şekil 3.15 : PSMA immünosensörünün serum LNCaP hücreleriyle etkileşimi sonucunda elde edilen sinyaller. (a) DPV analizi sonuçları, (b) kalibrasyon eğrisi (n=3).

3.2.2.5 İnkübasyon süresinin etkisi

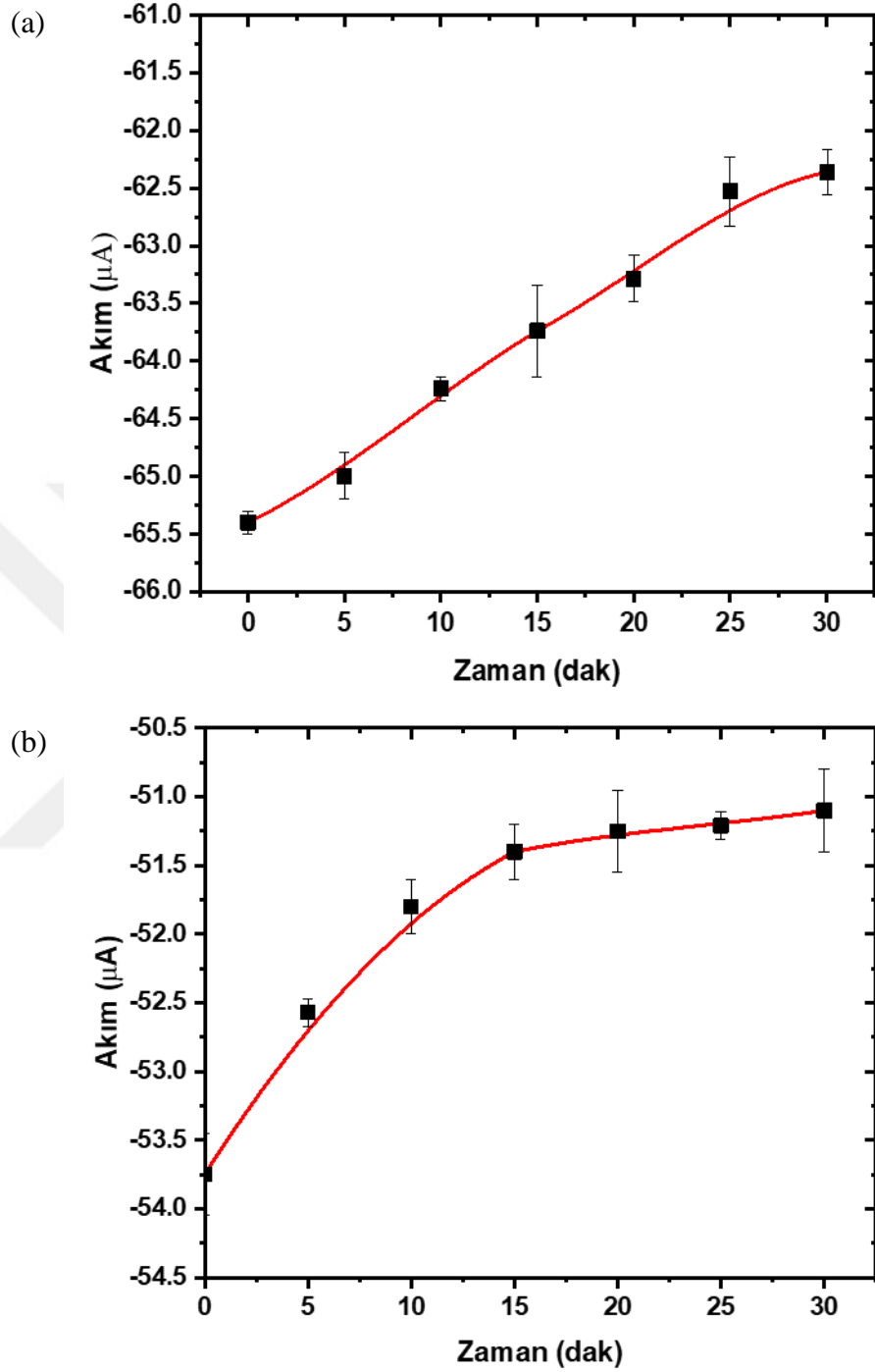
Biyosensöre modifiye edilen tanıyıcı biyolojik ajan ile hedef analit arasındaki etkileşimin kararlı bir sinyal oluşturması bahsi geçen etkileşimin optimum sürede olmasına doğrudan bağlıdır. Bu nedenle, doktora tezi kapsamında üretilen Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE immünosensörleri, 0-30 dakika zaman aralıklarında 500 pg PSMA ve 50 LNCaP hücresi içeren PBS (pH:7,4) çözeltilerine ayrı ayrı daldırılmış ve 200 rpm hızındaki manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 5 dakika aralıklarla DPV ölçümleri yapılmıştır. DPV sinyallerinden faydalanarak, zamana bağlı değişen katodik akım pik değerleri incelendiğinde, biyolojik tanıyıcı tabaka ile hedef analitlerin etkileşimi için gereken optimum inkübasyon sürelerinin PSMA antijeni için 25 dakika, PSMA ekspresyonu gösteren LNCaP hücreleri içinse 20 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 3.16).

3.2.2.6 Seçicilik testi

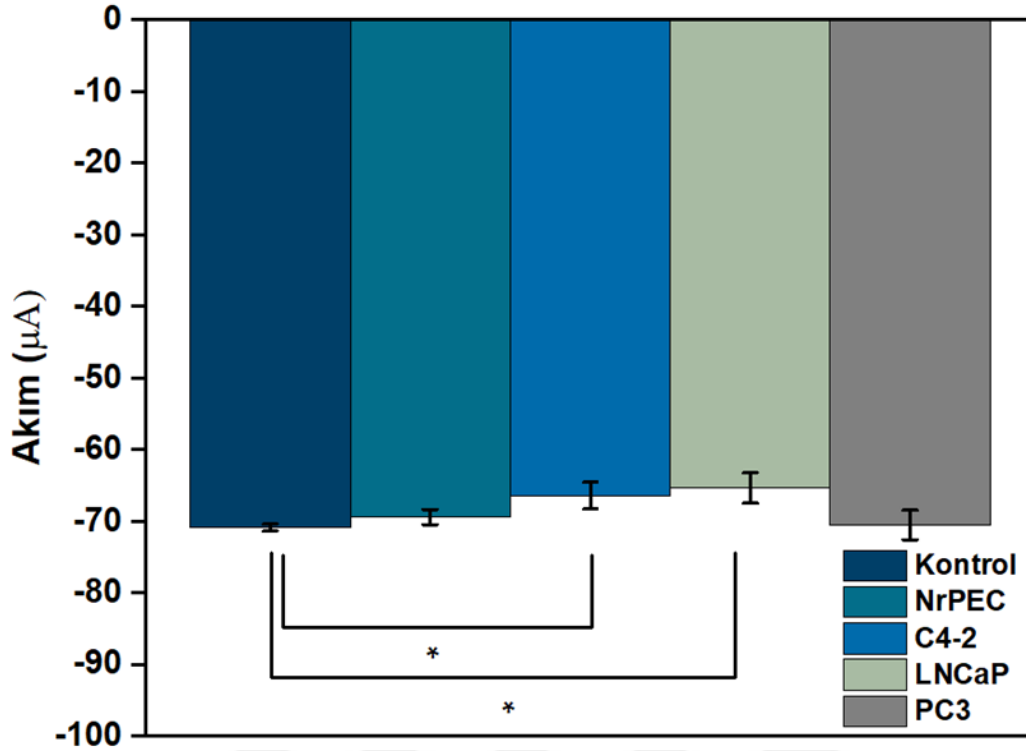
Bu kapsamda, PK epitel hücre hatları C4-2, PC3, LNCaP ve sağlıklı prostat epitel hücreleri (NrPEC) kullanarak PBS (pH:7,4) çözeltilerine ayrı ayrı eklenen (50 hücre/5 mL) hücrelerin immünosensöre karşı oluşturduğu cevaplar DPV analizi ile test edilmiştir. Şekil 3.17’de gösterildiği gibi, PSMA immünosensörünün ortalama akım pik değeri: $-70,87 \pm 0,49 \mu A$ olarak hesaplanmıştır (n=3). 50 hücre/5 mL olacak şekilde NrPEC, C4-2, PC3 ve LNCaP hücrelerinin PBS (pH:7,4) ortamına ilave edilmeleri sonrasında ölçülen ortalama akım değerleri sırasıyla: $-69,39 \pm 1,06$; $-67,43 \pm 1,87 \mu A$; $-67,43 \pm 1,87 \mu A$, $-70,51 \pm 2,10 \mu A$ ve $-65,37 \pm 2,14 \mu A$ ’dir.

Sonuçların istatistiksel olarak analizinde Çift Yönlü-Çoklu Varyans Analizi (Two Way MANOVA) kullanılmış ve veriler ikili gruplar halinde analiz edilerek $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen istatistiksel verilere göre sadece LNCaP ve C4-2 ile kontrol grubu arasındaki sinyal farkı anlamlıdır ($p=0,012$). Ayrıca, LNCaP ile PC3 karşılaştırıldığında elde edilen sinyaller istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,023$). PSMA ekspresyonu gösteren prostat kanser hücrelerinin seçicilik testleri sonucunda belirgin akım değişimleri gözlemlenirken, sağlıklı prostat epitel hücreleri ($p=0,808$) ve PC3 ($p=0,889$) hücrelerine karşı immünosensörün cevabı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). Sensörün PC3 hücrelerine cevabının anlamsız olmasının nedeni PC3’ nin prostat kanseri hücre hattı olmasına rağmen PSMA ekspresyonu göstermemesidir ki bu sonuç Western blot analizleriyle de

doğrulanmıştır. Özetle geliştirilen immünosensör, PSMA ekspresyonu gösteren hücre ve proteinlerin seçici olarak ölçümünde kullanıma uygundur.



Şekil 3.16 : Cys-AuNp/a-PSMA/SPGE immünosensörünün (a) 500 pg PSMA ve (b) 50 LNCaP hüresi ile 0-30 dakika zaman aralıklarındaki etkileşimleri sonucunda elde edilen DPV sinyalleri (n=3).



Şekil 3.17 : Geliştirilen PSMA immünosensörünün PSMA ekspresyonu gösteren sağlıklı prostat epitel hücreleri NrPEC , PSMA ekspresyonu gösteren (C4-2 ve LNCaP) ve PSMA ekspresyonu göstermeyen (PC3) PK hücrelerine karşı seçiciliği (n=3).

3.3 Sonuç ve Öneriler

Doktora tez çalışmasının ikinci bölümünde, SPGE yüzeyleri sisteamin fonksiyonelleştirilmiş altın nanoparçacıklarla modifiye edilerek elektrokimyasal tabanlı PSMA immünosensörü geliştirilmiştir. TEM analizi sonucunda Cys-AuNp'lerin kuru haldeki ortalama çap değeri $30,2 \pm 7,1$ nm (n=50), DLS analizi sonucunda parçacıkların ortalama ıslak çap ve Zeta potansiyel değerleri: $37,8 \pm 6,3$ nm ve $+43,9 \pm 3,1$ mV olarak hesaplanmıştır (n=10). Pozitif zeta potansiyel değeri, anyonik AuNp yüzeyine katyonik sisteaminin kemisorpsiyon aracılığıyla bağlandığını göstermektedir. SPGE modifikasyonu aşamasında kullanılacak optimum Cys-AuNp hacmi $10 \mu\text{L}$ olarak belirlenmiş ve yapılan bu modifikasyon sonucunda elektrodun etkin yüzey alanı artırılarak modifiye olmayan elektroda kıyasla yüzeye daha fazla miktarda a-PSMA bağlanmasına olanak sağlanmıştır. Ayrıca sisteaminin katyonik olması nedeniyle anyonik redoks çözeltisi bileşenleri elektrostatik olarak çekilerek elektron transfer hızının artmasına neden olmuş ve PSMA protein/hücrelerinin ölçümündeki sinyal hassasiyetinin de yükselmesini sağlamıştır.

İmmünoelot testi kapsamında, sağlıklı prostat epitel hücre hattı (NrPEC) ve prostat kanseri hücre hatları (PC3, LNCaP, C4-2 ve MDA PCa-2b) test edilerek PSMA ekspresyonları incelenmiş ve bahsi geçen tüm hücreler, PSMA tabanlı immünoelotün seçicilik testi kapsamında kullanılmıştır. Sonuçlar, geliştirilen immünoelotün, PSMA ekspresyonu gösteren hücre ve proteinleri seçici olarak ölçümünde kullanıma uygun olduğunu göstermiştir.

Biyosensöre modifiye edilen tanıyıcı biyolojik ajan ile hedef analit arasındaki etkileşimin kararlı bir sinyal oluşturması bahsi geçen etkileşimin optimum sürede olmasına doğrudan bağlıdır. Biyolojik tanıyıcı tabaka ile hedef analitlerin etkileşimi için gereken optimum inkübasyon süreleri PSMA proteini için 25 dakika, PSMA ekspresyonu gösteren LNCaP hücreleri içinse 20 dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirilen immünoelotün PSMA proteinleri ve PSMA ekspresyonu gösteren hücreleri ölçümündeki performans parametreleri Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Geliştirilen PSMA immünoelotünün performans parametreleri

Ortam	Analit türü	LDL	LOD	LOQ	R ²	t _{inkübasyon} (dk)
PBS (pH:7,4)	PSMA	0,2-4,0 ng/mL	41 pg/mL	0,125 ng/mL	0,998	25
	LNCaP	0-100 hücre/mL	3 hücre/mL	7 hücre/mL	0,998	20
Serum	PSMA	0,2-4,0 ng/mL	0,084 ng/mL	0,256 ng/mL	0,984	25
	LnCaP	15-80 hücre/mL	3 hücre/mL	9 hücre/mL	0,998	20

Özetle, bahsi geçen tez çalışması kapsamında, PSMA protein/hücre örneklerinin serum ve fizyolojik tampon çözeltisi ortamlarında pg seviyesinde hassasiyetle ölçebilen elektrokimyasal tabanlı PSMA immünoelotü geliştirilmiştir. Gelecek çalışmalar kapsamında sensör sisteminin ölçüm performansını ve ölçümün sinyal stabilitesini arttırmak amacıyla nanoparçacık modifikasyonunun elektrot yüzeyine damlat-kurut yöntemi ile modifikasyonunu yerine parçacıkların elektrokimyasal yöntemle yüzeye deponit edilmesi planlanmaktadır.

Ayrıca gelecek projeler kapsamında alınacak etik izinler doğrultusunda bu çalışmada geliştirilen immünoelotün sağlıklı, BPH’ li ve prostat kanserli hastaların serum örneklerinde PSMA ölçümünde kullanılması ve geliştirilen immünoelotün validasyonunun yapılması planlanmaktadır.

4. KAYNAKLAR

- [1] **Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., Wu, A.H., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., vd.** (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *Journal of the National Cancer Institute*. 87, 9, 652–661.
- [2] **Bangma, C.H., Kranse, R., Blijenberg, B.G., ve Schröder, F.H.** (1995). The value of screening tests in the detection of prostate cancer. Part I: Results of a retrospective evaluation of 1726 men. *Urology*. 46, 6, 773–778.
- [3] **Mhaweche-Fauceglia, P., Zhang, S., Terracciano, L., Sauter, G., Chadhuri, A., Herrmann, F.R., vd.** (2007). Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: An immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology*. 50, 4, 472–483.
- [4] **Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., Landas, S., Imaida, K., Rovito, P.M., Wang, C.Y., vd.** (2006). Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World Journal of Surgery*. 30, 4, 628–636.
- [5] **Lin, K., Crosswell, J., Koenig, H., Lam, C., ve Maltz, A.** (2011). Prostate-Specific Antigen-Based Screening for Prostate Cancer : An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Evidence Synthesis*. 90, 12-05160-EF-1.
- [6] **Seenivasan, R., Singh, C.K., Warrick, J.W., Ahmad, N., ve Gunasekaran, S.** (2017). Microfluidic-integrated patterned ITO immunosensor for rapid detection of prostate-specific membrane antigen biomarker in prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*. 95, 160–167.
- [7] **Mamoulakis, C., Mavridis, C., Georgiadis, G., Belantis, C., Zisis, I.E., Skamagkas, I., vd.** (2019). Prostate Cancer Biomarkers. içinde: R. Gupta (Ed.), *Biomarkers Toxicol.*, Second Edi, Elsevier, ss. 869–881.
- [8] **Udager, A.M. ve Tomlins, S.A.** (2018). Molecular Biomarkers in the Clinical Management of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. a030601.

- [9] **Davis, M.I., Bennett, M.J., Thomas, L.M., ve Bjorkman, P.J.** (2005). Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102, 17, 5981–5986.
- [10] **Xiao, Z., Adam, B., Cazares, L.H., Clements, M.A., Davis, J.W., Schellhammer, P.F., vd.** (2001). Quantitation of Serum Prostate-specific Membrane Antigen by a Novel Protein Biochip Immunoassay Discriminates Benign from Malignant Prostate Disease Advances in Brief Quantitation of Serum Prostate-specific Membrane Antigen by a Novel Protein Biochip Immu. *Cancer Research*. 61, 6029–6033.
- [11] **Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., ve Estrela, P.** (2016). Introduction to biosensors. *Assays In Biochemistry*. 60, 1, 1–8.
- [12] **Pumera, M., Sánchez, S., Ichinose, I., ve Tang, J.** (2007). Electrochemical nanobiosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 123, 2, 1195–1205.
- [13] **Taleat, Z., Khoshroo, A., ve Mazloum-Ardakani, M.** (2014). Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchimica Acta*. 181, 9–10, 865–891.
- [14] **Miscoria, S.A., Jacq, C., Maeder, T., ve Martín Negri, R.** (2014). Screen-printed electrodes for electroanalytical sensing, of chromium VI in strong acid media. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 195, 294–302.
- [15] **Bettac, A., Koeble, J., Winkler, K., Uder, B., Maier, M., ve Feltz, A.** (2009). QPlus: atomic force microscopy on single-crystal insulators with small oscillation amplitudes at 5 K. *Nanotechnology*. 20, 26, 264009.
- [16] **Kaleli Can ve Gizem** (2018). *Fenilketonüri Tanısına Yönelik QTF-tabanlı Kütle Hassas İmmünosensör Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, ANKARA, 2018.
- [17] **Epstein, P.** (1990). BCG vaccination and nutrition. *The Lancet*. 335, 8704, 1536–1537.
- [18] **Yıldızhan, E.** (2006). *Prostat Kanseri Tanısında Rektal Muayene, PSA ve TRUS Sonuçlarının TRUS Biyopsi Sonuçları ile Karşılaştırılması*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İSTANBUL, 2006.
- [19] **Özaydın, S.** (2017). *Prostat, İnsanda Tümörlü ve Tümörsüz Dokularında Etkin Olan İyon Kanal Ekspresyonlarının Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, ELAZIĞ, 2017.
- [20] **PDQ Screening and Prevention Editorial Board** (2019). Prostate Cancer Prevention (PDQ®): Patient Version. National Cancer Institute, USA.

- [21] **Aktümsek, A.** (2017). *Anatomi ve fizyoloji*. 11. baskı, NOBEL Akademik Yayıncılık, Ankara.
- [22] **Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S., ve Redwine, E.** (1987). Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *New England Journal of Medicine*. 317, 15, 909–916.
- [23] **Akdoğan, B. ve Özen, H.** (2006). Testesteron replasman tedavisi sonrası gelişen benign prostat hipertrofisi ve prostat kanseri. *Üroonkoloji Bülteni*. 2, 1–6.
- [24] **Naber, K.G., Bergman, B., Bishop, M.C., Bjerklund-Johansen, T.E., Botto, H., Lobel, B., vd.** (2001). EAU Guidelines for the Management of Urinary and Male Genital Tract Infections. *European Urology*. 40, 5, 576–588.
- [25] **Meares, E.M.** (1991). Prostatitis. *Medical Clinics of North America*. 75, 2, 405–424.
- [26] **Ludwig, M.** (2008). Diagnosis and therapy of acute prostatitis, epididymitis and orchitis. *Andrologia*. 40, 2, 76–80.
- [27] **Mungan, M. ve Canda, A.** (2004). Kronik prostatitler. *Türkiye Klinikleri Journal of Urology*. 1, 2, 121–130.
- [28] **Krieger, J.N. ve Weidner, W.** (2003). Prostatitis: ancient history and new horizons. *World Journal of Urology*. 21, 2, 51–53.
- [29] **Nickel, J.C., Downey, J., Hunter, D., ve Clark, J.** (2001). Prevalence Of Prostatitis-Like Symptoms In A Population Based Study Using The National Institutes Of Health Chronic Prostatitis Symptom Index. *Journal of Urology*. 165, 3, 842–845.
- [30] **Cohen, R.J., Shannon, B.A., McNeal, J.E., Shannon, T., ve Garrett, K.L.** (2005). Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: A possible link to cancer evolution? *Journal of Urology*. 173, 6, 1969–1974.
- [31] **Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., ve Thun, M.J.** (2007). Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 57, 1, 43–66.
- [32] **Passmore, R.** (1961). TEXTBOOK OF MEDICAL PHYSIOLOGY. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*. 46, 4, 405–406.
- [33] **Kimura, T.** (2012). East meets West: ethnic differences in prostate cancer epidemiology between East Asians and Caucasians. *Chinese Journal of Cancer*. 31, 9, 421–429.
- [34] **Drago, J.R., Goldman, L.B., ve Gershwin, M.E.** (1980). Evaluation of nonhormonal cytotoxic chemotherapy in the Nb rat prostate adenocarcinoma. Autonomous tumor (18-pr and 13-pr). *Cancer*. 46, 2, 273–278.

- [35] **Saitoh, H., Hida, M., Shimbo, T., Nakamura, K., Yamagata, J., ve Satoh, T.** (1984). Metastatic patterns of prostatic cancer: Correlation between sites and number of organs involved. *Cancer*. 54, 12, 3078–3084.
- [36] **Dodds, P.R., Caride, V.J., ve Lytton, B.** (1981). The role of vertebral veins in the dissemination of prostatic carcinoma. *Journal of Urology*. 126, 6, 753–755.
- [37] **Heidenreich, A., von Knobloch, R., ve Hofmann, R.** (2001). Current Status of Cytotoxic Chemotherapy in Hormone Refractory Prostate Cancer. *European Urology*. 39, 2, 121–130.
- [38] **Djavan, B.** (2011). Immunotherapy for prostate cancer. *Canadian Journal of Urology*. 18, 4, 5763.
- [39] **Siegel, R.L., Miller, K.D., ve Jemal, A.** (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 69, 1, 7–34.
- [40] **Baştoklu, S.** (2015). Prostat Adenokarsinomlarında İmmünohistokimyasal LC3A, NGEF ve Hepsin Ekspresyonlarının Klinikopatolojik Prognostik Parametrelerle İlişkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi, KONYA, 2015.
- [41] **Carter, B.S., Bova, G.S., Beaty, T.H., Steinberg, G.D., Childs, B., Isaacs, W.B., vd.** (1993). Hereditary Prostate Cancer: Epidemiologic and Clinical Features. *Journal of Urology*. 150, 3, 797–802.
- [42] **Sharma, S., Zapatero-Rodríguez, J., ve O’Kennedy, R.** (2017). Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnology Advances*. 35, 2, 135–149.
- [43] **Ilyin, S.E., Belkowski, S.M., ve Plata-Salamán, C.R.** (2004). Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends in Biotechnology*. 22, 8, 411–416.
- [44] **Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., vd.** (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 69, 3, 89–95.
- [45] **Shariat, S.F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., Vickers, A.J., ve Bjartell, A.** (2011). Tumor markers in prostate cancer I: Blood-based markers. *Acta Oncologica*. 50, sup1, 61–75.
- [46] **Bay, N.S.-Y. ve Bay, B.-H.** (2010). Greek anatomist herophilus: the father of anatomy. *Anatomy & Cell Biology*. 43, 4, 280.
- [47] **Patterson, J.T. ve Olson, J.S.** (1991). The History of Cancer: An Annotated Bibliography. *The Journal of American History*. 77, 4, 1475.
- [48] **Josef Marx, F. ve Karenberg, A.** (2009). History of the Term Prostate. *The Prostate*. 69, 2, 208–213.

- [49] **Gutman, A.B. ve Gutman, E.B.** (1938). An “Acid” Phosphatase Occurring In The Serum Of Patients With Metastasizing Carcinoma Of The Prostate Gland. *Journal of Clinical Investigation*. 17, 4, 473–478.
- [50] **Jakob, C.G., Lewinski, K., Kuciel, R., Ostrowski, W., ve Lebioda, L.** (2000). Crystal structure of human prostatic acid phosphatase. *The Prostate*. 42, 3, 211–218.
- [51] **Flocks, R.H., Urich, V.C., Patel, C.A., ve Opitz, J.M.** (1960). Studies on the Antigenic Properties of Prostatic Tissue I. *Journal of Urology*. 84, 1, 134–143.
- [52] **Hara, M., Koyanagi, Y., Inoue, T., ve Fukuyama, T.** (1971). Some physico-chemical characteristics of “-seminoprotein”, an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. *Japanese Journal of Legal Medicine*. 25, 4, 322–324.
- [53] **Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., ve Chu, T.M.** (2017). Purification of a Human Prostate Specific Antigen. *Journal of Urology*. 197, 2, 148–152.
- [54] **Thorpe, A. ve Neal, D.** (2003). Benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*. 362, 9382, 496.
- [55] **Lilja, H.** (1988). Structure and function of prostatic- and seminal vesicle-secreted proteins involved in the gelation and liquefaction of human semen. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 48, 191, 13–20.
- [56] **Gilgunn, S., Conroy, P.J., Saldova, R., Rudd, P.M., ve O’Kennedy, R.J.** (2013). Aberrant PSA glycosylation—a sweet predictor of prostate cancer. *Nature Reviews Urology*. 10, 2, 99–107.
- [57] **Papsidero, L.D., Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., ve Chu, T.M.** (1980). A Prostate Antigen in Sera of Prostatic Cancer Patients. *Cancer Research*. 40, 7, 2428–2432.
- [58] **Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., Dodds, K.M., Coplen, D.E., Yuan, J.J.J., vd.** (1991). Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 324, 17, 1156–1161.
- [59] **Chang, S.S.** (2004). Overview of prostate-specific membrane antigen. *Reviews in Urology*. 6, 10, 13-8.
- [60] **Chaloupková, Z., Balzerová, A., Bařinková, J., Medřřiková, Z., Šácha, P., Beneš, P., vd.** (2018). Label-free determination of prostate specific membrane antigen in human whole blood at nanomolar levels by magnetically assisted surface enhanced Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 997, 44–51.

- [61] **Akter, R. ve Arrigan, D.W.M.M.** (2016). Detection of Prostate Specific Membrane Antigen at Picomolar Levels Using Biocatalysis Coupled to Assisted Ion Transfer Voltammetry at a Liquid-Organogel Microinterface Array. *Analytical Chemistry*. 88, 23, 11302–11305.
- [62] **Sharafeldin, M., Bishop, G.W., Bhakta, S., El-Sawy, A., Suib, S.L., ve Rusling, J.F.** (2017). Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 91, 359–366.
- [63] **Xiao, Z., Adam, B.L., Cazares, L.H., Clements, M.A., Davis, J.W., Schellhammer, P.F., vd.** (2001). Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. *Cancer Research*. 61, 16, 6029–33.
- [64] **Gleason, D.F.** (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*. 50, 3, 125–128.
- [65] **D'Amico, A. V.** (1998). Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA*. 280, 11, 969.
- [66] **MacBeath, G.** (2002). Protein microarrays and proteomics. *Nature Genetics*. 32, S4, 526–532.
- [67] **Fu, Z., Hao, C., Fei, X., ve Ju, H.** (2006). Flow-injection chemiluminescent immunoassay for α -fetoprotein based on epoxysilane modified glass microbeads. *Journal of Immunological Methods*. 312, 1–2, 61–67.
- [68] **Kramer, S. A., Spahr, J., Brendler, C. B., Glenn, J. F., & Paulson, D. F.** (1980). Experience with Gleason's histopathologic grading in prostatic cancer. *The Journal of Urology*, 124, 2, 223-225.
- [69] **Clark, L.C.** (1965). Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO Journal*. 2, 1, 41–48.
- [70] **Clark, L.C. ve Lyons, C.** (2006). Electrode Systems For Continuous Monitoring In Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 102, 1, 29–45.
- [71] **O'Hare, D.** (2014). Biosensors and Sensor Systems. içinde: Body Sens. Networks, Springer London, London, ss. 55–115.
- [72] **Çırak, T.** (2014). Biyolojik Moleküllerin Tayinine Yönelik Kantilever Bazlı Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, ANKARA, 2014.
- [73] **Moore, F.A., McKinley, B.A., ve Moore, E.E.** (2004). The next generation in shock resuscitation. *Lancet*. 363, 9425, 1988–1996.
- [74] **Pohanka, M. ve Republic, C.** (2008). Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*. 6, 2, 57–64.

- [75] **Mutlu, M., Kabay, G., Kaleli Can, G., Hatice Ferda, Ö., Kömürcü, P., Özlü, B., vd.** (2019). Clark'tan Günümüze Biyosensörler. içinde: O. Koçak, O. Eroğul (Ed.), *Biyomedikal Mühendisliği ve Uygulamaları*, 1. baskı, TMMOB Elektrik Mühendisleri Odası, ANKARA, ss. 69–93.
- [76] **Evtugyn, G.** (2014). Biosensor Signal Transducers. içinde: *Biosens. Essentials*, Springer, Berlin, Heidelberg, Heidelbergss. 99–205.
- [77] **Tudorache, M. ve Bala, C.** (2007). Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 388, 3, 565–578.
- [78] **Li, Y.** (2006). CIGR Handbook of Agricultural Engineering. içinde: *CIGR Handb. Agric. Eng.*, ss. 52–93.
- [79] **Parmin, N., Hashim, U., Gopinath, S.C.B., ve Uda, M.N.A.** (2019). Biosensor Recognizes the Receptor Molecules. içinde: *Nanobiosensors Biomol. Target.*, Elsevier, ss. 195–210.
- [80] **Ali, J., Najeeb, J., Asim Ali, M., Farhan Aslam, M., ve Raza, A.** (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors and Bioelectronics*. 8, 1, 1–8.
- [81] **Homola, J., Yee, S.S., ve Gauglitz, G.** (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 54, 1–2, 3–15.
- [82] **Ray, S., Mehta, G., ve Srivastava, S.** (2010). Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges. *Proteomics*. 10, 4, 731–748.
- [83] **Leca-Bouvier, B.D. ve Blum, L.J.** (2010). Enzyme for biosensing applications. içinde: *Recognit. Recept. Biosens.*, Springer New York, New York, NY, ss. 177–220.
- [84] **Lausted, C., Hu, Z., ve Hood, L.** (2008). Quantitative serum proteomics from surface plasmon resonance imaging. *Molecular and Cellular Proteomics*. 7, 12, 2464–2474.
- [85] **O'Sullivan, C.K. ve Guilbault, G.G.** (1999). Commercial quartz crystal microbalances - Theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 14, 8–9, 663–670.
- [86] **Kaleli Can, G., Özgüzar, H.F., Kabay, G., Kömürcü, P., ve Mutlu, M.** (2018). Simultaneous insulation and modification of quartz tuning fork surface by single-step plasma polymerization technique with amine-rich precursors. *MRS Communications*. 1–9.
- [87] **Zhang, J., O'Shea, S., ve O'Shea, S.** (2003). Tuning forks as micromechanical mass sensitive sensors for bio- or liquid detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 94, 1, 65–72.
- [88] **Skládal, P.** (2003). Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14, 4, 491–502.

- [89] **Sauerbrey, G.** (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wagungdiinner Schichten und zur Mikrowagung. *eitschrift fur Physik*. 155, 206–222s.
- [90] **Vlassov, S., Scheler, O., Plaado, M., Löhmus, R., Kurg, A., Saal, K., vd.** (2012). Integrated carbon nanotube fibre–quartz tuning fork biosensor. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 61, 1, 48–51.
- [91] **Su, X., Dai, C., Zhang, J., ve O’Shea, S.J.** (2002). Quartz tuning fork biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 17, 1–2, 111–117.
- [92] **Zeisel, D., Menzi, H., ve Ullrich, L.** (2000). A precise and robust quartz sensor based on tuning fork technology for (SF6)-gas density control. *Sensors and Actuators, A: Physical*. 80, 3, 233–236.
- [93] **Matsiev, L.F.F., Bennett, J.W.W., McFarland, E.W.W.** (1998). Application of low frequency mechanical resonators to liquid property measurements. içinde: Proc. IEEE Ultrason. Symp., IEEE, ss. 459–462.
- [94] **Sampson, A., Panchal, S., Phadke, A., Kashyap, A., Suman, J., Unnikrishnan, G., vd.** (2018). Quartz tuning fork based sensor for detection of volatile organic compounds: towards breath analysis. *Materials Research Express*. 5, 4, 045407.
- [95] **Zhang, J., Dai, C., Su, X., ve O’Shea, S.J.** (2002). Determination of liquid density with a low frequency mechanical sensor based on quartz tuning fork. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 84, 2–3, 123–128.
- [96] **Kabay, G., Kaleli Can, G., Mutlu, M., Can, G. Kaleli, ve Mutlu, M.** (2017). Amyloid-like protein nanofibrous membranes as a sensing layer infrastructure for the design of mass-sensitive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 97, 285–291.
- [97] **Rodoplu, D., Sen, Y., Mutlu, M.** (2013). Modification of Quartz Crystal Microbalance Surfaces via Electrospun Nanofibers Intended for Biosensor Applications. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*. 5, 4, 444–451.
- [98] **Alp, B., Mutlu, S., ve Mutlu, M.** (2000). Glow-discharge-treated cellulose acetate (CA) membrane for a high linearity single-layer glucose electrode in the food industry. *Food Research International*. 33, 2, 107–112.
- [99] **Newman, D.J., Olabiran, Y., ve Price, C.P.** (1997). Bioaffinity agents for sensing systems Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food and the Environment, ss. 59-89. CRC, London, UK
- [100] **Thakur, M.S. ve Ragavan, K. V.** (2013). Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*. 50, 4, 625–641.
- [101] **Özoğlu, Ö., Ünal, M.A., ve Altuntaş, E.G.** (2017). Biyosensörler: Gıda ve Sağlık Alanında Laktat Biyosensörleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*. 2, 2, 180–193.

- [102] **Shrivastava, A. ve Gupta, V.** (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2, 1, 21.
- [103] **Kavosi, B., Salimi, A., Hallaj, R., ve Moradi, F.** (2015). Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*. 74, 915–23.
- [104] **Jayanthi, V.S.A., Das, A.B., ve Saxena, U.** (2017). Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. 91, 15–23.
- [105] **Bohunicky, B. ve Mousa, S.A.** (2011). Biosensors: The new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, Science and Applications*. 4, 1, 1–10.
- [106] **Tothill, I.E.** (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 20, 1, 55–62.
- [107] **Najeeb, M.A., Ahmad, Z., Shakoor, R.A., Mohamed, A.M.A., ve Kahraman, R.** (2017). A novel classification of prostate specific antigen (PSA) biosensors based on transducing elements. *Talanta*. 168, 3, 52–61.
- [108] **Chikkaveeraiah, B. V., Bhirde, A., Malhotra, R., Patel, V., Gutkind, J.S., ve Rusling, J.F.** (2009). Single-Wall Carbon Nanotube Forest Arrays for Immunochemical Measurement of Four Protein Biomarkers for Prostate Cancer. *Analytical Chemistry*. 81, 21, 9129–9134.
- [109] **Min, K., Song, K.M., Cho, M., Chun, Y.-S., Shim, Y.-B., Ku, J.K., vd.** (2010). Simultaneous electrochemical detection of both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancer cells using an RNA/peptide dual-aptamer probe. *Chemical Communications*. 46, 30, 55–66.
- [110] **Sasaki, K., Murata, H., Kuroda, K., ve Sak, H.** (2012). Conventional Transmission Electron Microscope Observation of Electric and Magnetic Fields. içinde: *Transmission Electron Microscope*, InTech, ss. 40–45.
- [111] **Southworth, H.N.** (1975). Scanning Electron Microscopy and Microanalysis içinde: *Physicochem. Methods Miner. Anal.*, Springer US, Boston, MA, ss. 421–450.
- [112] **Petit, S. ve Madejova, J.** (2013). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. içinde: *Dev. Clay Sci.*, Elsevier, ss. 213–231.
- [113] **Cepus, V., Ulbrich, C., Allin, C., Troullier, A., ve Gerwert, K.** (1998). Fourier transform infrared-photolysis studies of caged compounds. *Methods in Enzymology*. 291, 223–245.
- [114] **Townshen, A.** (1983). Principles of Instrumental Analysis. *Analytica Chimica Acta*. 152, 314.

- [115] **Owen, A.** (2013). Fundamentals of UV-visible spectroscopy. Hewlett Packard.
- [116] **Swinehart, D.F.** (1962). The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*. 39, 7, 333.
- [117] **Perkampus, H.-H.** (1992). Recent Developments in UV-Vis Spectroscopy. içinde: UV-VIS Spectrosc. Its Appl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, ss. 81–130.
- [118] **Bhattacharjee, S.** (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 235, 337–351.
- [119] **Dror, Y., Ziv, T., Makarov, V., Wolf, H., Admon, A., ve Zussman, E.** (2008). Nanofibers made of globular proteins. *Biomacromolecules*. 9, 10, 2749–2754.
- [120] **Seker, U.O.S., Chen, A.Y., Citorik, R.J., ve Lu, T.K.** (2017). Synthetic Biogenesis of Bacterial Amyloid Nanomaterials with Tunable Inorganic-Organic Interfaces and Electrical Conductivity. *ACS Synthetic Biology*. 6, 2, 266–275.
- [121] **D’Agostino, R.** (1990). Plasma deposition, treatment, and etching of polymers. Academic Press, San Diego, CA.
- [122] **Kabay, G., Kaleli, G., Sultanova, Z., Ölmez, T.T.T.T., Şeker, U.Ö.Ş. ve Mutlu, M.** (2016). Biocatalytic protein membranes fabricated by electrospinning. *Reactive and Functional Polymers*. 103, 26–32.
- [123] **Yun, M., Lee, S., Yim, C., Jung, N., Thundat, T., ve Jeon, S.** (2013). Suspended polymer nanobridge on a quartz resonator. *Applied Physics Letters*. 103, 5, 053109.
- [124] **Di Carlo, G., Trani, A., Zane, D., Ingo, G.M., Pasquali, M., Dell’Era, A., vd.** (2014). Influence of Different Biological Environments on Serotonin (5-HT) Electrochemical Behavior at Gold Screen Printed Electrodes. *Electroanalysis*. 26, 6, 1409–1418.
- [125] **Ndiaye, A.L., Delile, S., Brunet, J., Varenne, C., ve Pauly, A.** (2016). Electrochemical sensors based on screen-printed electrodes: The use of phthalocyanine derivatives for application in VFA Detection. *Biosensors*. 6, 3, 46.
- [126] **Cordeiro, M., Carlos, F.F., Pedrosa, P., Lopez, A., ve Baptista, P.V.** (2016). Gold nanoparticles for diagnostics: Advances towards points of care. *Diagnostics*. 6, 4, 43.
- [127] **Hermanson, G.T.** (2008). Bioconjugation in the study of protein interactions. içinde: Bioconjugate Tech., Academic Press, ss. 1003–1039.
- [128] **Niidome, T., Nakashima, K., Takahashi, H., ve Niidome, Y.** (2004). Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells. *Chemical Communications*. 17, 1978-1980.

- [129] **Shukri, W.N.W., Bidin, N., Islam, S., Krishnan, G., Bakar, M.A.A., ve Affandi, M.S.** (2016). Synthesis and characterization of uncoated and cysteamine-coated gold nanoparticles by pulsed laser ablation. *Journal of Nanophotonics*. 10, 4, 046007.
- [130] **Rather, J.A., Khudaish, E.A., ve Kannan, P.** (2018). Graphene-amplified femtosensitive aptasensing of estradiol, an endocrine disruptor. *Analyst*. 143, 8, 1835–1845.



5. EKLER

EK1-B Planı Kapsamında Yapılan Çalışmalar

EK1.1 Plazma polimerizasyon yöntemiyle QTF yüzeylerinin modifikasyonu ve temas açısı ölçüm sonuçları

EK1.1.1 EDA monomeri ile yapılan QTF plazma modifikasyonu, film aktivasyonu ve protein immobilizasyonu

EK1.1.2 EDA monomeri ile yapılan QTF plazma modifikasyonu, film aktivasyonu ve protein immobilizasyonu

EK1.1 Plazma polimerizasyon yöntemiyle QTF yüzeylerinin modifikasyonu ve temas açısı ölçüm sonuçları

Plazma polimerizasyonu yöntemiyle modifikasyon işlemi radyo frekans/düşük basınç (RF/LP) plazma reaktörüne etilendiamin (EDA) ve amilamin (AMY) monomerleri beslenerek gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon işleminde QTF ve lam malzemeler alttaş olarak seçilmiştir. Modifikasyon işlemi öncesinde QTF'lerin dekapsülasyonu yapılmış ve temizleme işlemi sonrasındaki rezonans frekans değerleri ortalama $32759,1 \pm 0,7$ Hz olarak hesaplanmıştır. Ardından QTF yüzeylerine, 30-90 W plazma boşalım gücünde ve 1, 5 ve 10 dakika süresince plazma modifikasyonu yapılmıştır. Plazma polimerize filmlerin oldukça ince olması nedeniyle, rezonans frekans kaymaları tüm plazma parametrelerinde yaklaşık -3,0 ile 2,0 Hz frekans aralığında değişmiştir. Kaplama sonrası azalması ya da sabit kalması beklenen rezonans frekans değerlerinde gözlemlenen artışın, cihaz kaynaklı hata payından ya da modifikasyon sonucunda QTF'lerin yay sabitininin değişerek QTF rezonans frekansını etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir ($\sim 3,1$ Hz). PlzP(EDA) monomeri kullanılarak üretilen tüm filmlerin frekans kayma değerleri, cihazın hata payı aralığında olduğu için bu aşamada herhangi bir parametre elenememiştir. PlzP(EDA) kaplı QTF'lere ait plazma modifikasyonu işlemi sonrası hesaplanan frekans değerleri Çizelge Ek1' de verilmektedir.

Plazma polimerizasyonu işlemi sonrasında ölçülen frekans sapmaları kullanılarak örnekler arasında bir ayırım yapmak söz konusu olmadığından, plazma işlem parametrelerinin optimizasyonu amacıyla filmlerin hava ortamındaki kararlılıklarının incelenmesine karar verilmiş ve bu kapsamda temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge Ek1 : PlzP(EDA) film kaplamaları yapılan QTF örneklerin kaplama sonrası ölçülen frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Boşalım gücü (W)	Uygulama süresi (dak)		
	1	5	10
	Frekans Farkı (Δ f) Hz		
30 W	-1,7 \pm 0,0	+1,2 \pm 0,1	+2,7 \pm 0,1
60 W	+0,0 \pm 0,1	-3,2 \pm 0,0	+2,0 \pm 0,0
90 W	-3,2 \pm 0,0	+1,2 \pm 0,0	-2,7 \pm 0,0

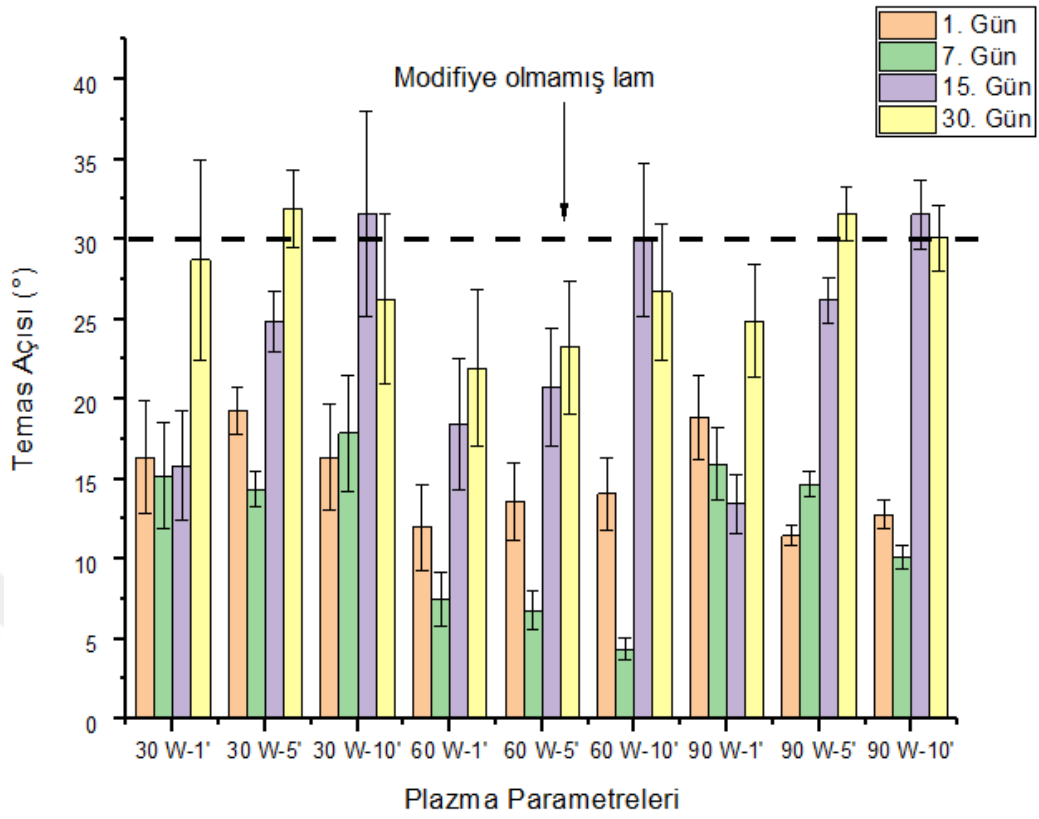
EK1.1.1. EDA monomeri ile yapılan QTF plazma modifikasyonu, film aktivasyonu ve protein immobilizasyonu

Etilendiamin molekülü, iki amino grubundan oluşan organik bir bileşiktir. Kimyasal formülü $C_2H_4(NH_2)_2$ olan bu bileşik, polietilen aminlerin ilk üyesidir. Etilendiamin, havadaki nem ile kolayca reaksiyona girerek, kısa süreli maruziyetlerin bile sağlığa ciddi zararlar verebileceği, aşındırıcı, zehirli ve tahriş edici toksik bir duman oluşturur. Moleküler yapısı ve molekülü oluşturan atomların bağ enerjileri incelendiğinde en düşük enerjili bağın C–N bağına ait olduğu görülmektedir. Dolayısıyla plazma sistemine bu bağ enerjisini kırmaya yetecek enerjinin (305 kJ/mol) aktarılması durumunda bu bağ kırılarak $-NH_2$ radikallerinin reaktör atmosferinde oluşması ve böylelikle üretilen ince filmin, polar grupların varlığından dolayı teorik olarak hidrofilik özellik göstermesi beklenmektedir. Hidrofiliklik, su sevme ve suya ilgi duyma ile ilgili bir malzeme özelliğidir ve bu tür malzemeler suyu kolayca absorblarlar. Hidrofilik malzemeler, yüksek yüzey gerilimi değerlerine sahiptir. Bu malzemelerin yüzey kimyası, membran yüzeyinde bir su tabakası ya da kaplamanın oluşmasını sağlar. Hidrofilik malzemeler su ile ‘hidrojen bağları “oluşturma kabiliyetine sahip aktif grupların varlığı ile karakterize edilir.

Plazma ile modifiye edilmiş örneklerin temas açılarının ölçümü öncesi, kaplama işleminin gerçekleştirildiğinin doğrulanması ve kaplamanın yüzey davranışının analiz edilmesi için referans olarak belirlenen modifiye edilmemiş lam örneklerinin temas açısı ölçülmüş ve ortalama temas açısı $30,2^{\circ} \pm 4,1^{\circ}$ ($n = 15$) olarak hesaplanmıştır. 30 W plazma boşalım gücünde 1 dakika uygulama süresinde üretilen filmlerin kalınlıklarının az olması nedeniyle, hava ortamında bırakılmalarının 15. gününde temas açısı değerleri modifiye edilmemiş lamın temas açısı seviyesine düşmüş, 30 W-5 dk/10 dk' da üretilen filmler ise 15 gün süresince hidrofilitik özelliklerini korumuştur. 60 W-1 dk plazma parametrelerinde üretilen filmler, 30 W-1 dakikada üretilen filmlere benzer şekilde 15. günde stabilitesini kaybetmiş, 30 W-5 dk/10 dk örnekleri ise amin gruplarının yeniden oryantasyonundan dolayı hava ortamında geçirdikleri 7. günde 1. güne kıyasla daha hidrofilitik özellik göstermişlerdir. Aksine, 90 W uygulama gücünde 5 dakikada üretilen örnekler 15. günde en düşük stabiliteye sahipken, 1 ve 10 dakikada üretilen filmler 15 gün boyunca hidrofilitelerini koruyabilmişlerdir. Sonuç olarak PlzP(EDA) filmlerin hava ortamındaki stabiliteyi incelendiğinde, 30 W-10 dk, 60 W-5 dk/10 dk, 90 W-1dk/10 dk örneklerinin hava ortamında stabil oldukları, 30 W/60 W-1dk ve 90 W-5 dk' lık filmlerin ise stabiliteilerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil Ek1).

Biyosensör modifikasyonu ve PSMA testi sürecinde yapılacak tüm işlemler sıvı ortamda gerçekleştirileceğinden, filmlerin sıvı ortamındaki stabiliteyi de oldukça önemlidir. Daha kapsamlı açıklamak gerekirse, yüzey aktifleştirme ve protein immobilizasyon işlemleri sırasında PlzP yöntemiyle ince film kaplanan QTF'ler sıvı ortama maruz kalacak ve bu durum, kararlılığı düşük filmlerin yüzeyden ayrılmasına sebep olacaktır. Yüzeydeki filmin aşınması ve/veya ayrılması sensör denetçi ile rezonans frekansının ölçümü yoluyla belirlenmektedir.

Bu kapsamda öncelikle PlzP(EDA) kaplanan QTF ayar çataları, 2 saat süreyle hacimce %2,5 (v:v)'lik glüteraldehit çözeltisinde bekletilmiş ardından örnekler $+4^{\circ}C$ deki saf su ve PBS ($pH=7,4$) ile yıkanarak kurutulmuş ve frekans ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge Ek2). Glüteraldehit yüzey aktifleştirilmesi kullanılarak modifikasyonu yapılan PlzP(EDA) filmlerinden $-6,7 \pm 0,0$ Hz ve $-2,1 \pm 0,00$ Hz frekans kayması gözlemlenen 60 W-10 dk ve 90 W-5 dk PlzP(EDA) örneklerinin, frekans kaymalarının negatif olması diğer PlzP(EDA) örneklerine kıyasla sıvı ortamda daha stabil oldukları göstermektedir.



Şekil Ek1 : PlzP(EDA) filmlerinin 1-30 gün süresince hava ortamındaki stabilite test sonuçları. Temas açısı değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=3).

Ayrıca hava ortamındaki stabilitesini koruması ve $1,0 \pm 0,0$ Hz seviyesinde bir rezonans frekans artışının cihazdan kaynaklı hata payı aralığında olmaması nedeniyle 30 W-10 dk plazma parametrelerinde üretilen örnekte göz önünde bulundurularak, protein immobilizasyonunun gerçekleştirileceği parametreler 30 W/60 W-10 dakika ve 90 W-5 dakika olacak şekilde belirlenmiştir.

Çizelge Ek2 : PlzP(EDA) film kaplı QTF örneklerinin gluteraldehit ile aktivasyon işlemi sonrasında ölçülen frekans değişimleri. Frekans değerleri ortalama \pm standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Boşalmı gücü (W)	Uygulama süresi (dak)		
	1	5	10
	Frekans Farkı (Δf) Hz		
30 W	3,1 \pm 0,0	2,1 \pm 0,0	1,0\pm0,0
60 W	3,3 \pm 0,0	4,2 \pm 0,1	-6,7\pm0,0
90 W	2,1 \pm 0,0	-2,1\pm0,0	2,1 \pm 0,0

30 W/60 W-10 dakika ve 90 W-5 dakika plazma parametrelerinde üretilen PlzP(EDA) filmleri ile modifiye edilen QTF' ler, 2 saat GA yüzey aktifleştirme işlemi sonrasında, 10 µg/mL SSA ile etkileştirilerek protein immobilizasyonu yapılmıştır. QTF yüzeylere protein immobilizasyonu sonrasında hesaplanan frekans kaymalarının pozitif olması, aktifleştirilen film yüzeylerinden EDA filmlerinin ayrıldığına işaret etmektedir. Bu durumun QTF ile PlzP(EDA) arasındaki bağların zayıf olmasından ve EDA filmlerin sıvı ortamda düşük stabilite göstermelerinden kaynakladığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, QTF yüzeylerine modifiye edilen amin içerikli PlzP(EDA) filmlerinin tek başına sıvı ortamdaki stabilitelerinin düşük olması sebebiyle, biyolojik sıvılarda kanser antijeni ölçümünde amacıyla geliştirilmesi planlanan QTF immünosensörünün biyolojik tanıyıcı yüzeyinin üretiminde kullanımına uygun olmadığına karar verilmiştir.

Çizelge Ek3 : PlzP(EDA) kaplamaları yapılan QTF örneklerinin protein immobilizasyonu sonrası ölçülen ölçülen frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (±SD) olarak verilmiştir (n=10).

Monomer	Plazma parametreleri		Frekans kayması (Δf) Hz
	Boşalım gücü (W)	Uygulama süresi (dk)	
EDA	30	10	5,2±0,0
	60	10	6,0±0,0
	90	5	8,7±0,0

EK1.1.2. AMY monomeri ile yapılan plazma modifikasyonu, film aktivasyonu ve protein immobilizasyonu

PlzP(EDA) filmlerine ek olarak, benzer moleküler oryantasyona sahip amilamin (AMY) monomeri kullanılarak plazma polimerize amilamin [PlzP(AMY)] filmleri üretilmiştir. N-amilamin diğer adıyla pentilamin, $CH_3(CH_2)_4NH_2$ kimyasal formülü ile ifade edilen organik kimyasal bir bileşiktir. Genellikle çözücü olarak, boyalar, emülgatörler ve farmasötik ürünlerin üretiminde bir hammadde olarak veya tatlandırıcı madde olarak kullanılır. Pentilamin diğer basit alkil aminlerin tipik reaksiyonları, yani protonasyon, alkilasyon, asilasyon, karbonillerle yoğunlaşma sergiler. Diğer basit alifatik aminler gibi, pentilamin zayıf bir bazdır (pKa:10.21). Etilendiamin molekülündeki çift amino grubuna karşılık, 4 adet amino grubu içeren amilamin

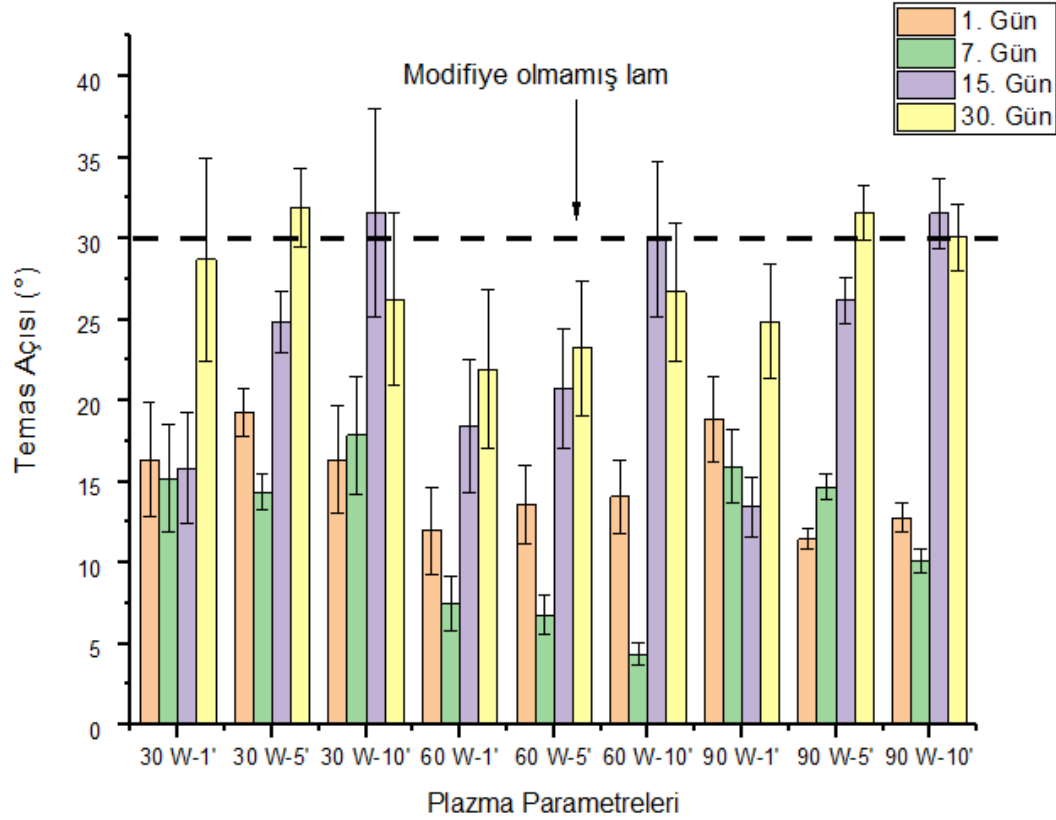
monomeri kullanılarak PlzP(AMY) filmler üretilmiş ve plazma polimerizasyon işlemi sonucunda üretilen ince filmlerin yarattığı rezonans frekans kaymaları Çizelge E4' te verilmiştir. Çizelge Ek4' te ifade edildiği şekilde 30 W-1/10 dk ile 60 W-10 dk plazma parametrelerinde üretilen filmlerin yarattıkları frekans düşmesi gözlemlenmiş, fakat 60 W-5 dk' lık örnek dışındaki tüm örneklerin frekans sapmalarının cihazın ölçüm hatasından kaynaklanabileceği düşünüldüğünden optimum parametreler filmlerin hava ortamındaki stabilitelelerinin belirlenmesinde kullanılan temas açısı ölçümleri ve aktivasyon işlemi sonucundaki frekans sapma verileri değerlendirilerek belirlenmiştir. 30 W, 60 W ve 90 W boşalım gücünde ve 10 dakika uygulama süresinde üretilen tüm filmlerin 15 gün sonra QTF yüzeylerinden ayrıldıkları belirlenmiştir. Buna karşın, 30 W/90 W-1 dk'lık örnekler 15 gün boyunca stabilitelelerini korumuşlardır (Şekil Ek2).

Çizelge Ek4 : PlzP(AMY) film kaplaması yapılan QTF örneklerin kaplama sonrası ölçülen frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Boşalım gücü (W)	Uygulama süresi (dak)		
	1	5	10
	Frekans Farkı (Δf) Hz		
30 W	0,0±0,0	3,0±0,1	-1,5±0,1
60 W	2,2±0,0	4,2±0,1	-1,7±0,0
90 W	2,0±0,0	2,7±0,2	1,1±0,0

Etilendiamin film kaplı QTF ayar çataları kullanılarak gerçekleştirilen aktivasyon işlemi benzer şekilde amilamin filmler için de yapılmış ve yüzey aktifleştirilmesi gerçekleştirilen QTF'lerin frekans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Frekans sonuçları incelendiğinde, 60 W-10 dk parametrelerinde üretilen PlzP(AMY) filmlerin ortalama $-1,3\pm 0,0$ Hz' lik frekans kaymasına sebep oldukları ve sıvı ortamdaki stabilitesini 15 gün süresince koruduğu gözlemlenmiştir. 60 W-1 dk plazma parametrelerinde üretilen filmlere ek olarak, temas açısı ölçümleri sonucunda en yüksek stabiliteye sahip oldukları belirlenen 30 W-1 dakika ve 90 W-1 dakika ve 90 W-10 dakika

parametrelerinde üretilen PlzP(AMY) filmlerinin de QTF yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılarak model protein SSA immobilizasyonu yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil Ek2 : PlzP(AMY) filmlerin hava ortamında 1 ve 30 gün aralığındaki stabilite testi sonuçları. Temas açısı değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=3).

Çizelge Ek5 : PlzP(AMY) film kaplamaları yapılan QTF örneklerinin gluteraldehit aktivasyonu sonrasında ölçülen frekans değerleri. Frekans değerleri ortalama±standart sapma (\pm SD) olarak verilmiştir (n=10).

Boşalım gücü (W)	Uygulama süresi (dak)		
	1	5	10
	Frekans Farkı (Δ f) Hz		
30 W	0,6 \pm 0,0	2,9 \pm 0,0	2,3 \pm 0,3
60 W	2,4 \pm 0,0	4,4 \pm 0,1	-1,3\pm0,0
90 W	2,3 \pm 0,0	4,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0

Gluteraldehit ile yüzeyleri aktifleştirilen PlzP(AMY) film modifiye QTF'lere yapılan 10 µg/mL SSA immobilizasyonu sonucunda hesaplanan frekans kayma değerleri Çizelge Ek6' da verilmektedir. Frekans kayma değerlerinden de anlaşılacağı şekilde, QTF yüzeylerine PlzP(EDA) ve PlzP(AMY) filmleri kullanılarak geliştirilen biyolojik tanıyıcı tabakaların hiçbirinde model protein SSA proteininin yüzeye tutumunu gerçekleştirilememiştir.

Çizelge Ek6: PlzP(AMY) kaplamaları yapılan QTF örneklerinin PSMA protein immobilizasyonu sonrası ölçülen frekans değerleri (n=10). Frekans değerleri ortalama±standart sapma (±SD) olarak verilmiştir.

Plazma parametreleri			Frekans kayması (Δf) Hz
Monomer	Boşalım gücü (W)	Uygulama süresi (dk)	
AMY	30	1	5,3±0,0
	60	1	6,1±0,1
	60	10	8,0±0,0
	90	1	7,2±0,0

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gözde KABAY
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri : 23/08/1989 İZMİR
E-posta : gozdekabay@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Fakültesi, Fizik
- **Lisans** : 2013, Dokuz Eylül Üniversitesi
Eğitim Fakültesi, Fizik Öğretmenliği
- **Yüksek lisans** : 2015, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği
- **Doktora** : 2019, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

Yıl	Kurum	Ödüller/ Burslar
2018	METROHM	Metrohm Genç Kimyager Ödülü
2018	TÜBİTAK	2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Bursu

YABANCI DİL: İNGİLİZCE

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Kaleli-Can G., Özgüzar H.F., **Kabay G.**, Kömürcü P., Mutlu M., 2018. Simultaneous insulation and modification of quartz tuning fork surface by single-step plasma polymerization technique with amine-rich precursors. *MRS Communications*, 1-9.
- **Kabay G.**, Kaleli-Can G., Mutlu M., 2017. Amyloid-like protein nanofibrous membranes as a sensing layer infrastructure for the design of mass-sensitive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 97, 285-291.
- **Kabay G.**, Kaleli G., Sultanova Z., Ölmez T. T., Şeker U.O.Ş., Mutlu M. 2016. Biocatalytic Protein Nanofibers Produced by Electrospinning, *Reactive and Functional Polymers*, 103, 26-32.

- **Kabay G.**, Kaleli G, Sultanova Z., Seker U. O. S., Mutlu M., 2015. Performance of Enzyme Immobilization Methods on Bio-inspired Albumin Scaffolds. *Nanofibers and Related Applications (NART)*, Prague, Czech Republic.
- **Kabay G.**, Kaleli G., Sultanova Z., Seker U. O. S., Mutlu M. 2015. Preparation of Enzyme-carrying Living Membranes Produced by Electrospinning for Biosensor Applications. *2nd International Congress on Biosensors*, Gediz University, İzmir, Turkey.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Ozlu B., **Kabay G.**, Bocek I., Yilmaz M., Piskin A. K. Shim B. S., Mutlu M., 2019. Controlled release of doxorubicin from polyethylene glycol functionalized melanin nanoparticles for breast cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 570, 118613.
- Özgüzar H. F., Kaleli-Can G., **Kabay G.**, Mutlu M., 2019. Quartz Tuning Fork as a Mass Sensitive Biosensor Platform with A Bi-Layer Film Modification via Plasma Polymerization. *MRS Communications*.
- **Kabay G.**, Demirci C., Kaleli-Can G., Meydan A. E., Günaydın-Dasan B., Mutlu M., 2017. Controlled release of a hydrophilic drug from electrospun amyloid-like protein blend nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, 81, 271-279.
- **Kabay G.**, Meydan A. E., Kaleli-Can G., Demirci C, Mutlu M., 2017. Controlled release of a hydrophilic drug from electrospun amyloid-like protein blend nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, 81, 271-279.
- Sultanova Z., Kaleli G., **Kabay G.**, Mutlu M., 2016. Controlled Release of a Hydrophilic Drug from Coaxially Electrospun Polycaprolactone Nanofibers. *International J of Pharmaceutics*, 505 (1–2), 133-138.
- Yurumezoglu K., Isik H., Arikan G., **Kabay G.**, 2015. Teaching the absorption of light colours using an artificial rainbow. *Physics Education* 50 (4), 402.
- Sultanova Z., **Kabay G.**, Kaleli G., Mutlu M., 2015. Coaxial electrospun PCL/PVA-chitosan nanofibers: A novel non-viral gene delivery scaffold. *International Conference on Plasma Science (ICOPS)*, (pp. 1-1), Antalya, Turkey.
- **Kabay G.**, Kaleli G., Dincel O., Mutlu M., 2014. Physical Modification of Polycarbonate Nanorod Arrays by Low-Pressure Low-Frequency Oxygen Plasma, *FP7-KORANET Course on Novel Approaches in Non-Thermal Processing of Materials*, TOBB University of Economics and Technology, Ankara, Turkey.
- Altuntas S., **Kabay G.**, Büyükserin F., Mutlu M., 2014. Investigation of Low-Pressure Low-Frequency Oxygen Plasma on Chemical/Physical Properties of Polycarbonate Nanorod Arrays, *1st International Middle East Plasma Science (IMEPS) Conference*, Antalya, Turkey.