

**Glikozillenmiş Protein Tayini için Boronat Temelli Yüzey
Plazmon Rezonans Sensörler**

**Boronate Based Surface Plasmon Resonance Sensors for
Determination of Glycosylated Protein**

Merve ÇALIŞIR

PROF. DR. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

**Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.**

2019

MERVE ÇALIŞIR'ın hazırladığı '**Glikozillenmiş Protein Tayini için Boronat Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr.Adil DENİZLİ
Başkan



Prof. Dr.Handan YAVUZ ALAGÖZ
Danışman



Prof. Dr.Serap ŞENEL
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Ceren HAKTANIR
Üye



Doç. Dr. Fatma YILMAZ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak/..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurullar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

04/01/2019

MERVE ÇALIŞIR

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

04 / 02 / 2019

MERVE ÇALIŞIR

ÖZET

Glikozillenmiş Protein Tayini için Boronat Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler

Merve ÇALIŞIR

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan Yavuz ALAGÖZ

Ocak 2019, 57 sayfa

Şeker hastalarının kan şekeri seviyelerinin takibinde en yaygın kullanılan testler kan glukozu ve glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) ölçümüdür. Kan glukozu ölçümü, günlük glisemik durumun göstergesi iken HbA1c ve diyabet gelişme riskinin bir göstergesidir. Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) hemoglobinin β -zincirinin N-terminal valinine glukoz bağlanması sonucu oluşur ve geçmiş 2-3 aylık dönemdeki ortalama glukoz değerini yansıtır. HbA1c'nin kandaki derişiminin 141mg/dL'den yüksek olması şeker hastalığı teşhisi konması için çoğu zaman yeterlidir. Boronik asit türevleri, cis-diol etkileşimini temel alan karbonhidrat ilişkisi sayesinde HbA1c tayininde sıklıkla kullanılır ve bu ilişki temel alınan tayinler çoğunlukla enzimatik sensörler ve HPLC ile yürütülmektedir. Bu yöntemlerin yanı sıra sensör çalışmaları da alternatif olarak geliştirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada bir boronik asit türevi olan vinil fenil boronik asit ile modifiye edilmiş bir yüzey plazmon rezonans sensörü ile HbA1c tayini yapmak amaçlanmıştır. Çalışmada pH değerinin bağlanmada önemli bir parametre olduğu ve derişim attıkça alınan sinyalin de arttığı görüldüğünden bağlanmanın başarılı bir şekilde sağlandığı sensogramlardan alınan grafiklerle ortaya konulmuştur. 10 μ g/mL derişimde dahi sinyal alınabildiğinden klinik değerlerden çok daha hassas ölçüm yapılabildiği de kanıtlamıştır. Yapay plazma çalışmalarında insan serum albumini, IgG, hemoglobin gibi bağlanma gösterebilecek moleküllere karşı

seçiciliği ayırt edici bir Şekilde fazla olduğu alınan farklı sensogramlarla teyit edilmiştir. Tekrar kullanılabilirlik testlerinde kırınım değerinin oldukça az değişim göstermesi düşük maliyet hedeflenen çalışmalar için de uygun olduğunu göstermiştir. Sonuçlar ayrıca bir SPR biyosensörünün HbA1c ölçümünün doğruluğunu ve yine doğruluğunu arttırmak için hassas bir teknik olarak kullanılabileceğini kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Glikozillenmiş hemoglobin, vinil fenil boronik asit, yüzey plazmon rezonans sensörler

ABSTRACT

Boronate Based Surface Plasmon Resonance Sensor for Determination of Glycosylated Protein

Merve ÇALIŞIR

Master of Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

January 2019, 57 pages

Blood glucose and glycosylated hemoglobin (HbA1c) measurements are the most commonly used tests for diagnosing diabetics. Measurement of blood glucose is an indicator of daily glycemic status. HbA1c measurement is an indicator of the risk of and diabetes to develop. Glycosylated hemoglobin (HbA1c) is the result of glucose binding of the β -chain of hemoglobin to N-terminal valine and reflects the average glucose value over the past 2-3 months. HbA1c in the blood concentration of more than 141mg / dL is often enough to diagnose diabetes. Boronic acid derivatives are often used in HbA1c determination due to the carbohydrate relationship based on the cis-diol interaction and determinations based on this association are mostly carried out by enzymatic sensors and HPLC. In addition to these methods, sensor studies have also started to be developed as an alternative. In this study it was aimed to determine HbA1c by a surface plasmon resonance sensor modified with a boronic acid derivative vinyl phenyl boronic acid. In the study, it was shown that the pH value is an important parameter for binding and the signal received is increased as the concentration is increased. Even at 10 μ g/mL low concentration, signal can be received and showed that at clinical values more accurate measurement can be made. In artificial plasma studies, different sensograms were obtained for human

serum albumin, IgG, and hemoglobin molecules which all could bind to modified chip and the selectivity to the molecules are distinctively differentiated in comparison with HbA1c. In the re-usability tests, the diffraction value varies considerably low, indicating that low cost is also suitable for targeted studies. The results also demonstrate that a SPR biosensor can be used as a precision technique to increase accuracy of HbA1c measurement.

Keywords: Glycosylated hemoglobin, vinyl phenyl boronic acid, surface plasmon resonance sensor

TEŞEKKÜR

Beni Biyokimya Araştırma Grubu'na dâhil ederek temel bilim çalışmanın önemini ve güzelliğini hatırlatan, daha iyisini yapmak için motive eden, hevesinden ve engin bilgisinden çok etkilendiğim ve hakkını asla ödeyemeyeceğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Güler yüzü ve muhteşem enerjisiyle her daim yanımda olan, gerek akademik gerek özel her türlü sıkıntıma sabırla ve samimiyetle destek olan, güzel kalbi ve kişiliğiyle hayatımdaki en büyük şanslardan biri olduğunu düşündüğüm sevgili hocam tez danışmanım Sayın Handan Yavuz Alagöz'e,

Bu güzel ortama adapte olmam için elinden geleni yapan, her adımda yol gösteren ve beni asla yalnız hissettirmeyen değerli hocam Doç. Dr. Nilay Bereli' ye,

Bölüme ilk geldiğimde şaşkınca etrafta dolanırken beni biyokimya ailesiyle tanıştıran, hem kişiliği hem de akademik çalışmalarıyla değerini her geçen gün daha fazla anladığım yardımsever hocam Sayın Prof. Dr. Lokman Uzun'a,

Çalışmalarımda her basamakta yanımda olan ve her panik anımda beni sakinleştiren bu tezi sayesinde tamamlayabildiğim sevgili arkadaşım Dr. Monireh Bakhspour' a,

Her türlü tecrübelerini ve tavsiyelerini benimle paylaşan ve aralarında olmaktan mutluluk duyduğum sevgili Dr. Duygu Çimen, Dr. Sevgi Aslıyüce Çoban, Dr. Ilgım Göktürk Başal, Dr. Canan Armutçu Çoban, Dr. Yeşeren Saylan başta olmak üzere, Doç. Dr. Fatma Yılmaz, Doç Dr. Deniz Türkmen, Semra Akgönüllü' ye

Oğlumu emanet ettiğim ve onsuz asla yapamayacağım her şeyimi borçlu olduğum canım annem Nurten Tunç ve canım babam Mustafa Hakan Tunç'a, her zaman yanımda olan değerli eşim Fatih Çalışır 'a ve dünyanın en tatlı ve orijinal ablası Aslı Göktaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glikozillenmiş Hemoglobin (HbA1c)	3
2.1.1. HbA1c Tarihçesi	4
2.1.2. HbA1c Fizyolojisi	5
2.1.3. HbA1c Tayini ve Klinik Değerleri	5
2.1.4. HbA1c Tahlil Yöntemleri	7
2.2. Biyosensörler	9
2.2.1. Enzimatik sensörler	10
2.2.2. İmmüno-sensörler	12
2.2.3. Elektrokimyasal Sensörler	14
2.2.4. Optik Biyosensörler	15
2.2.5. Yüzey plasmon Rezonans Sensörleri (SPR)	16
2.3. Boronik Asit Şeker Bağlanması	22
2.4. Glikozillenmiş Hemoglobin Tayininde Yapılan Sensör Çalışmaları	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1. Kimyasal Malzemeler	27
3.2. SPR Nanofilmlerin Hazırlanması	27
3.2.1. SPR Çiplerinin Allil Merkaptan ile Modifikasyonu	27
3.2.2. Vinil Fenil Boronik Asit Nanofilm Sentezlenmesi	28
3.3. Spr Çiplerin Karakterizasyonu	29
3.3.1. FTIR Ölçümü	30
3.3.2. Elipsometre Ölçümleri	30
3.3.3. Temas Açısı Ölçümleri	31
3.4. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerle Kinetik Analizler	31
3.4.1. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması	33
3.4.2. Yapay Plazma Çalışmaları	33
4. BULGULAR VE YORUM	34
4.1. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Yüzeyin Karakterizasyonu	34
4.1.1. FTIR Analizi	34

4.1.2.	Elipsometre Analizi	35
4.1.3.	Temas Açısı Ölçümleri.....	36
4.2.	Yüzey Plazmon Rezonans Sensör ile Yapılan Kinetik Çalışmalar	38
4.2.1.	Bağlanmaya pH Etkisinin İncelenmesi.....	38
4.2.2.	Bağlanmaya Derişimin Etkisinin İncelenmesi.....	38
4.2.3.	Denge Analizi.....	41
4.2.4.	Bağlanma Kinetik Analizleri	43
4.2.5.	Denge İzoterm Çalışmaları	45
4.2.6.	Yapay Plazma Çalışmaları	48
4.2.7.	Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması	50
5.	SONUÇ.....	52
	KAYNAKLAR.....	54

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1: Açlık kan şekeri ve glikozillenmiş hemoglobin tayini karşılaştırması.6	6
Çizelge 4.1: Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey, VPBA katılmamış nanofilmlili yüzey ve VPBA nanofilmlili yüzey kalınlıkları.....36	36
Çizelge 4.2: Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey, VPBA katılmamış nanofilmlili yüzey ve VPBA nanofilmlili yüzey temas açıları.37	37
Çizelge 4.3: Boronik asit türevleri kullanılarak hazırlanan HbA1c tayini sensörleri ...41	41
Çizelge 4.4: Scatchard denge analizi.....43	43
Çizelge 4.5: Bağlanma kinetiği parametreleri.....44	44
Çizelge 4.6: Hesaplanan Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich izoterm parametreleri.....47	47
Çizelge 4.7: Vinil fenil boronik asit (VPBA) modifiyeli ve modifiyesiz sensörün IgG, insan serum albümin (HSA), hemoglobin ve HbA1c için karşılaştırmalı seçicilik katsayıları50	50

ŞEKİLLER

Şekil 2.1:	Hemoglobin (A) ile Glikozillenmiş Hemoglobin (B) moleküllerinin tasarlandığı bir görsel.	3
Şekil 2.2:	HbA1c oluşumu [8].	4
Şekil 2.3:	IFCC biriminde HbA1c değerlerine göre diyabet teşhisi.	7
Şekil 2.4:	Bio-Rad firmasının ürettiği HbA1c ölçümü yapan HPLC cihazı	8
Şekil 2.5:	Biyosensörlerin genel çalışma prensibi.....	10
Şekil 2.6:	SPR sensörün şematik temel gösterimi [36].....	17
Şekil 2.7:	Bir metal ve dielektrik ara yüzeyinde yayılan yüzey plazmonu [39]	18
Şekil 2.8:	Analitin bağlanmasıyla oluşan rezonans değişimi ve açı kayması.....	20
Şekil 2.9:	Şekerin komşu diolu ile borik asit etkileşimi [43].....	23
Şekil 2.10:	Değişken pH'da fenilboronik asit ile diol değişimi [43].	24
Şekil 2.11:	T3BA ve APBA kullanılarak hazırlanan sensörlerin şematik gösterimi. ...	26
Şekil 3.1:	Altın yüzeyin allil merkaptanla kaplanması sonucu oluşan bağlanmanın şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.2:	Boronik asit temelli nanofilm kaplı altın yüzeyin şematik gösterimi.	29
Şekil 3.3:	Kullanılan elipsometre cihazı.	30
Şekil 3.4:	Temas açısı ölçüm cihazı.	31
Şekil 3.5:	GWC Technologies SPR cihazı.....	33
Şekil 4.1:	VPBA ile modifiye edilmiş SPR sensörün FTIR spektrumu	34
Şekil 4.2:	Boş altın yüzey (A), allilenmiş yüzey (B), VBPA eklenmemiş nanofilmli yüzey (C) ve VPBA nanofilmli altın yüzey elipsometri görüntüleri.....	35
Şekil 4.3:	Yüzey temas açısı fotoğrafları sırası ile allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey (A), VPBA katılmamış nanofilmli yüzey (B) ve VPBA nanofilmli yüzey (C).	37
Şekil 4.4:	pH değerinin bağlanmaya etkisi.....	38
Şekil 4.5:	Farklı derişimlerdeki HbA1c çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimin sensorgramları.	39
Şekil 4.6:	Boronik asit temelli nanofilm kaplı çipin HbA1c derişimiyle verdiği ΔR kırınımının kalibrasyon grafiği.	40
Şekil 4.7:	Scatchard denge analiz grafiği.	42
Şekil 4.8:	Bağlanma kinetiği grafiği.....	44
Şekil 4.9:	Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich izoterm grafikleri	47
Şekil 4.10:	HbA1c'nin IgG, hemoglobin ve insan serum albümine göre bağlanma sinyalinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.11:	Yapay plazmada 120 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ derişimde HbA1c eklenerek alınan sensorgram.	49
Şekil 4.12:	VPBA temelli sensörün HbA1c ölçümündeki tekrarlanabilirlik	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

PC	Pik Kapasitesi
Q	Adsorpsiyon kapasitesi (ng/g)
R _s	Ayırıcılık
t _R	Alıkonma zamanı

Kısaltmalar

HbA1c	Glikozillenmiş Hemoglobin
VPBA	Vinil Fenil Boronik Asit
APBA	Amino Fenil Boronik Asit
GC	Gaz Kromatografi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
T3BA	Tiofen-3-boronik Asit
AIBN	Azoizobütironitril
EDGMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
LOD	Tayin Limiti
LOQ	Tayin Miktarı

1. GİRİŞ

Şeker hastalığı, vücuttaki insülinin azlığı veya etkisinin düşüklüğü durumunda ortaya çıkan, yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasını bozarak kanda ve dokulardaki anormal glukoz artışına sebep olan çok yaygın bir hastalıktır. Tip 1 şeker hastalığı (T1DM) ve Tip 2 şeker hastalığı (T2DM) olarak ikiye ayrılır. Tip 1 şeker hastalığının görülme oranı Tip 2'ye göre çok daha düşüktür fakat Tip 1 şeker hastalığı tanısı konulan hastalar gerekli insülini tedarik edemedikleri durumda yaşamlarını sürdüremezler. Tip 1 şeker hastalığında pankreastaki Beta hücreleri glukozun kandan hücrelere geçişini sağlamaya yarayan insülini yeteri kadar üretmeyi sağlayamazlar [1].

TD2M yani Tip 2 diyabet dünya genelinde şeker hastalığının en bilinen tipidir ve genellikle 50'li yaşların başlarında fiziksel hareketin azalması ve kilo artışıyla beraber gelişebilir. Hastalığın seyri boyunca pankreas beta hücrelerinin de çok yorulmasıyla beraber hiperglisemi (kanda yüksek glukoz seviyesi) önlenemez ve glukoz metabolizmasında bozukluklar görülür. Bu bozukluklar vücutta kendini körlük, böbrek yetmezliği, kalp rahatsızlıkları gibi dışavurumlarla da belli ederler [2].

Şeker hastalığı öncesi olarak tanımlanan safhada hastalık belirtileri gözlemlenemez. Kandaki glukoz seviyeleri yüksek olsa da tanı için gerekli sınırlarda olmayabilir. Klinik müdahale olmayan bu safhadan sonra da hastalar Tip 2 diyabet geliştirebilirler. Genelde yaşlılık veya başka sebeplerden hastalarda fazla susamak, tualete, daha fazla gitme ihtiyacı, kendini yorgun ve halsiz hissetme, sürekli açlık hali, yaraların yavaş iyileşmesi, cilt enfeksiyonları, değişken ruh hali, baş ağrıları, bacaklarda veya ayaklarda ağrı uyuşma gibi belirtiler fark edilmeyebilir. Şeker hastalığı adaylarının kalp damar hastalıklarına yakalanma riskleri de yüksek olduğundan [3] hastalığın erken teşhisi hayati bir önem kazanmaktadır.

Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM) bilinen adıyla gebelik şekeri hastalığı da birçok ülkede takip edilmesi zorunlu tıbbi risklerden birisidir. Hamilelik sürecinde ortaya çıkabilecek sık rastlanan ve potansiyel olarak ciddi bir durumdur. Hem anne

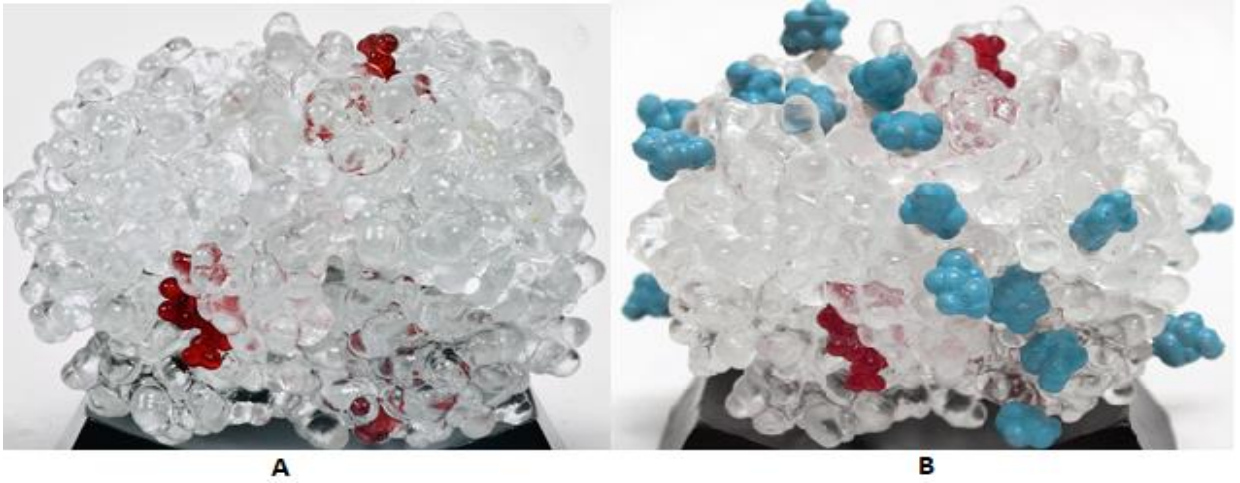
hem de yeni doğanlarda olumsuz etkilere neden olur. Bu etkiler arasında artan sezaryen doğum artışları, bebeğin normalden iri olması, amniyon sıvısının artışı ve kontrol altında tutulamayan kan şekeri durumlarında ani bebek ölümleri sayılabilir [4].

Özetle şeker hastalığı, kontrol altına alınması gereken ve ciddi bir tedavi sürecini içeren bir sağlık problemidir ve günümüz dünyasındaki artış hızına göre tanısının koyulması konusundaki yöntemlerin iyileştirilmesi de yine hayati derecede önemli hale gelmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glikozillenmiş Hemoglobin (HbA1c)

Glikozillenmiş hemoglobin, kısaltılmış adıyla HbA1c, hemoglobinin uzun süre boyunca yüksek seviyelerde kan şekere maruz kaldığında oluşan bir türevidir. Görece büyük bir protein olan hemoglobin 4 zincirden oluşmaktadır. 2 alfa 2 beta adı verilen bu zincirlerin her biri tekil halka yapıda ve merkezinde bir demir atomu olan “heme” grubuna sahiptir [5].

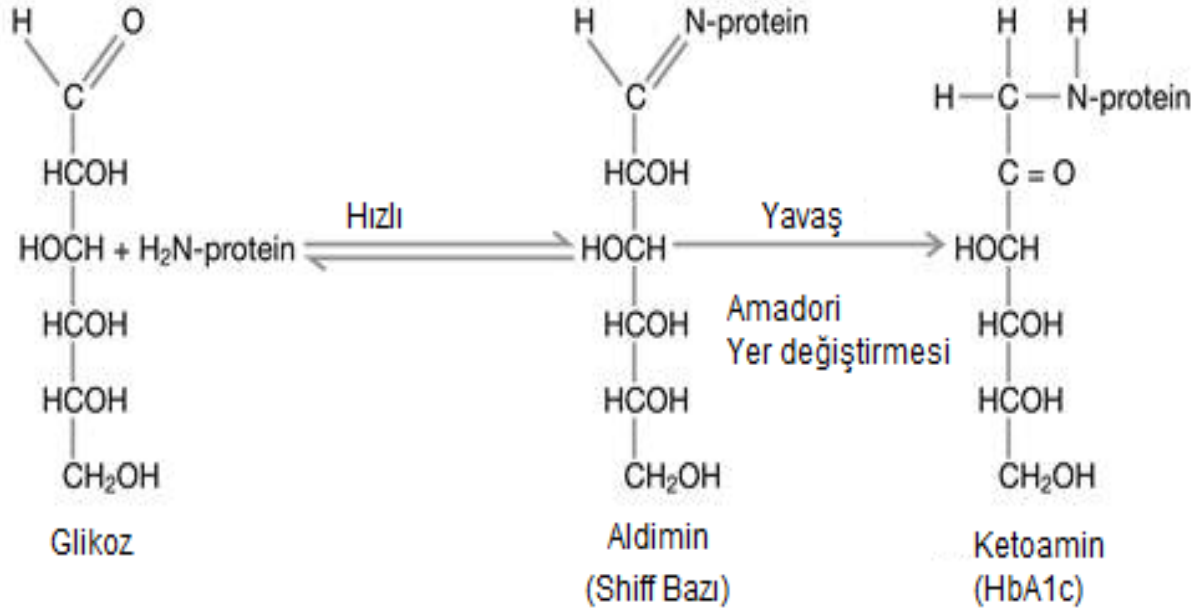


Şekil 2.1: Hemoglobin (A) ile Glikozillenmiş Hemoglobin (B) moleküllerinin tasarlandığı bir görsel.

Kasyon değişim kromatografisi ile hemoglobin HbA1 daha fazla negatif yüke sahip en az üç minör bileşene ayrılabilir. Bu minör hemoglobinler başka bir deyişle hızlı hemoglobinler (elektrik alanda daha hızlı hareket edebilmelerinden dolayı) en başta HbA1 adını alsalar da daha sonra elüsyon hızlarından dolayı HbA1a, HbA1b ve HbA1c olarak adlandırılmışlardır. Bütün bu HbA1 moleküllerinde bir karbonhidrat grubu bulunur ve globin zincirlerinden birine tutunur.

Glukozun enzimatik olmayan bir şekilde proteinin amino grubuna eklenmesi işlemine glikasyon adı verilir ve dolayısıyla, HbA1a, HbA1b ve HbA1c topluca glikozillenmiş hemoglobinler olarak adlandırılır. HbA1c, HbA1'in yaklaşık % 80'ini oluşturan ana fraksiyondur [6].

HbA1c iki aşamada oluşur. İlk olarak, glukoz, Schiff bazı olarak da adlandırılan bir aldimin bileşiği oluşturmak üzere β -zincirlerinin N-ucundaki valinin α -amino grubuyla birleşir. Bu ilk reaksiyon geri dönüşümlüdür ayrışma kolayca gerçekleşir. İkinci aşamada ise aldimin bileşiğinin Amadori tepkimesiyle yer değiştirmesiyle kararlı bir ketoamin olan HbA1c oluşur. Bu reaksiyon ise geri dönüşümlü değildir [7].



Şekil 2.2: HbA1c oluşumu [8].

2.1.1. HbA1c Tarihiçesi

Amerikan Diyabet Derneği üyelerinden Samuel Rahbar, 1968 yılında analitik testlerde HbA1c'nin klinik önemini keşfetti. İlk başlarda kapsamlı olarak önemini takdir edemese de, zaman geçtikçe glukoz metabolizmasında önemli bir klinik gösterge olduğunu ve Tip 2 diyabet geliştirme olasılığını belirlemede önemli bir araç olacağını ortaya koydu. 60'larda hemoglobinin keşfinin sonrasında yapısal varyantlarının ve bunların görevlerinin araştırılması, birçok araştırmacı gibi Rahbar'ı da bu çalışmaların içine aldı [9]. Özellikle hemoglobinin HbA1a, HbA1b, HbA1c, HbA1d ve HbA1e türevlerinin keşfinde rol oynayan Rahbar, HbA1c varyantının kanda olması gereken yüzdelerini ve hasta bireylerdeki değerlerini karşılaştırarak bu varyantın glisemik durum hakkında bir işaret molekül olabileceğini ortaya çıkardı [10]. 1978 yılında HbA1c seviyesinin idrardaki glukoz seviyesiyle orantılı olduğu ortaya çıkarıldı [11].

Bulunan tüm bu bilgiler ışığında HbA1c'nin Tip 1 ve Tip 2 şeker hastalığı tespitinde kullanılabilecek kan şekerini kontrol etme ve uzun dönemde potansiyel şeker hastalığı komplikasyonlarını önlemede değerli bir bileşen olduğu açıklandı [10].

2.1.2. HbA1c Fizyolojisi

Geleneksel olarak kan şekeri ya açlık durumunda ya da belli bir şeker yüklemesi sonrasında yapılan ölçümler ile belirlenir. HbA1c ölçümü ise günümüzde, diyabetli bireylerde glisemik kontrolü izlemek için en çok kullanılan ve kabul edilen yoldur. Hemoglobin proteini bir kez glikozillendikten sonra, kalan 2-3 aylık eritrositler yıkılıncaya kadarki ömrü boyunca kanda aynı değerde kalır. HbA1c düzeyi direkt teşhis için yeterli olmasa da hastalığın seyri hakkında önemli bulgular verir [12].

Eritrositler glukozu serbestçe bağlanabildiğinden, HbA1c oluşum hızı ortamdaki glukoz konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır. Tahara ve arkadaşları plazma glukoz seviyesinin HbA1c'ye katkısının zaman aralıklarına bağlı olduğunu gösterdiler [13]. Elde ettikleri sonuçlar, HbA1c'nin % 50'sinin, önceki 1 aylık süre boyunca plazma glukoz seviyesine göre belirlendiğini gösterirken, % 25'inin, bu aydan önceki 1 aylık dönemde kalan plazma glukoz düzeyi ile belirlendiğini ve kalan % 25'inin, bu 2 aydan önceki 2 aylık süre boyunca plazma glukoz seviyesi ile belirlendiğini gösterdi. Bu oranlar, kısa geçmişte kandaki HbA1c derişiminin glukoz seviyesinin ağırlığını yansıtmada çok fazla katkısı olduğunu kanıtladı.

2.1.3. HbA1c Tayini ve Klinik Değerleri

HbA1c ölçümü kronik hipergliseminin değerlendirmesinde en güvenilir yol olarak kabul edilmektedir ve bu ölçüm, Tip 2 şeker hastalığı komplikasyonlarının gelişme riskini göstermektedir. HbA1c kontrolü ile bu hastalıktan dolayı hastanede yatış yapan bireylerin sayısında yıllık % 2 azalma tespit edildi [14]. Bu yaklaşımın keşfinden beri diyabetin yönetimi çok değişmiştir ve glisemik kontrolün daha sık yapılması gerektiğini ortaya koyarak erken tanı ile hastalığın azalması yolunda büyük bir yol alınmıştır.

HbA1c'nin şeker hastalığı sınırı kanda, DCCT birimiyle % 6.5 veya IFCC birimi ile 48mmol.mol⁻¹'dir. HbA1c seviyesi kan şekeri konsantrasyonundaki günlük dalgalanmalardan etkilenmediğinden diğer glukoz klinik parametrelerine kıyasla diyabetin daha iyi bir tanı aracı ve biyokimyasal belirleyicisi olarak kabul edilmiştir, dolayısıyla açlık hali sağlanması şart değildir. Bu analizler aynı zamanda sadece bir tek kan numunesi gerektirir ve HbA1c'nin günlük değişkenliği açlık kan şekeri ölçümlerine göre önemsizdir. Bu nedenle tekrar testlerinde yanlış negatiflerin ve yanlış pozitiflerin olasılığını azaltarak daha güvenilir sonuçlar sunar [15].

HbA1c analizinin birçok yararına rağmen, dünya genelinde diyabette bir tarama ve tanı aracı olarak doğruluğu ve duyarlılığı açısından pek çok endişeyi beraberinde getirmiştir. Akut hipergliseminin varlığında HbA1c, günlük kan glukoz konsantrasyonu izlemesinde bir tespit yöntemi olarak kullanıma uygun değildir [16].

HbA1c analizi akut hipergliseminin yanında, kısa ömürlü kırmızı kan hücreleri nedeniyle hemoglobınapatiler, talasemi ve diğer kırmızı hücre devri anormallikleri (hemolitik anemi, kronik sıtma ve kan transfüzyonları) olan hastalarda da uygun değildir [17].

Çizelge 2.1: Açlık kan şekeri ve glikozillenmiş hemoglobın tayini karşılaştırması.

Analitik Test	Açlık Kan Şekeri	Glikozillenmiş Hemoglobın
Kan şekerinin gözlenme süresi	8-12 saatlik açlık	3 ay
Zamanlama	Anlık muhtemel sonuçtan teşhis	Geçmişe dönük veriden teşhis
Kararlılık	Orta kararlılık	Günlük değişkenlere bağlı değil
Hasta Hazırlığı	Katı açlık kurallarına bağlılık	Yok

HbA1c DEĞERLERİ

NORMAL <39 mmol/mol	GİZLİ DİYABET 39-47 mmol/mol	DİYABET >48 mmol/mol
-------------------------------	--	--------------------------------

Şekil 2.3: IFCC biriminde HbA1c değerlerine göre diyabet teşhisi.

2.1.4. HbA1c Tahlil Yöntemleri

HbA1c analiz sistemleri 1970'lerden beri geliştirilmektedir. Analizler, ilk önce hemoglobin ile hemoglobin A1c'nin farklı elektrik yüklerini temel almış, daha sonra ise glikozillenmiş hemoglobin ile glikozillenmemiş hemoglobinin yapısal farklarından yararlanılarak yapılmaya çalışılmıştır.

Yük farkına göre yapılan çalışmalar izoelektrik noktası farkını temel alarak çalışır ve bu da iyon değişim kromatografisi, elektroforez, kapiler elektroforez ve izoelektrik odaklanma gibi yöntemleri uygulamayı mümkün kılar [18]. Uygulanabilen bu yöntemlerde hemoglobin ailesinin diğer üyeleri ile yapılan ayrımlarda karışmalar söz konusu olabilmektedir dolayısıyla seçiciliği arttırmak elzem hale gelmektedir. İlk çalışmalardaki odak noktası seçicilikten ziyade analiz vaktini kısaltmaya çalışılmaktı ve bu durum tek kullanımlık mini kolonların üretilmesiyle 2 saat kadarlık bir süreye indirilebildi, fakat shiff bazı ve karbamilat hemoglobinlerin seçiciliği düşürmesi ve sonuçların sıcaklığa son derece bağlı olması problem olmaya devam ediyordu. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) sistemlerinin geliştirilmesi [19] ve



Şekil 2.4: Bio-Rad firmasının ürettiği HbA1c ölçümü yapan HPLC cihazı

uygun kalibratörlerin kullanılması ile sonuçlarda uluslararası değerlerin standardizasyonu yapılabildi schiff bazı ve karbilamitlerin kirliliğinin de önüne geçilebildi. Örnek kapasitesinin azlığı ve tek bir amaç için kullanılabilen bir alet olması da dezavantajları arasında kalmaya devam etti.

Yapı farkına dayanan analizlerde HbA1c'nin içinde bulunan glukoz grubu devreye girdi. Glukozun varlığıyla spesifik olarak etkileşime giren ajanlar daha sonra geliştirilen analitik metotların çıkış noktası haline geldi. İyon değişim kromatografisiyle paralel olarak mini kolonların üretilmesi ile başlayan süreç afinite kromatografiyle devam etti. Burada ortaya çıkan sıkıntı sadece HbA1c değil, tüm glikohemoglobinlere bağlanma olduğundan değerlerin beklenilenden yüksek gelmesiydi. Fakat glikoproteinlerin oluşumu yüzdelerle orantılı olduğundan ötürü sonuçlar standardize edilebildi.

Yapısal farkları temel alan analizlere alternatif olarak immunokimyasal asseyler de 90lı yıllarda kullanıma katıldı [20].

Antikor, β N-terminal glikozillenmiş tetrapeptid grubuna karşı hedeflenir. Assayler immünoturbidimetreden enzimatik tayine kadar değişik şekillerde tasarlanabilir ve birçok kimyasal analiz cihazına uygun bir şekilde üretilebilir. İmmonokimyasal asseyler elektrik yüklerinden etkilenmediğinden rutin laboratuvar tetkiklerine kolayca adapte edilebilir fakat dezavantajları doğrusal bir kalibrasyon eğrisine sahip olmamalarıdır. Kullanılan ajanların kararlılığı sabit olmadığından tekrar tekrar kalibrasyona ihtiyaç duyarlar ve toplam hemoglobinle HbA1c'nin ölçümünü ayrı ayrı yapmasından dolayı sonuçlarda dengesizlikler meydana gelebilmektedir.

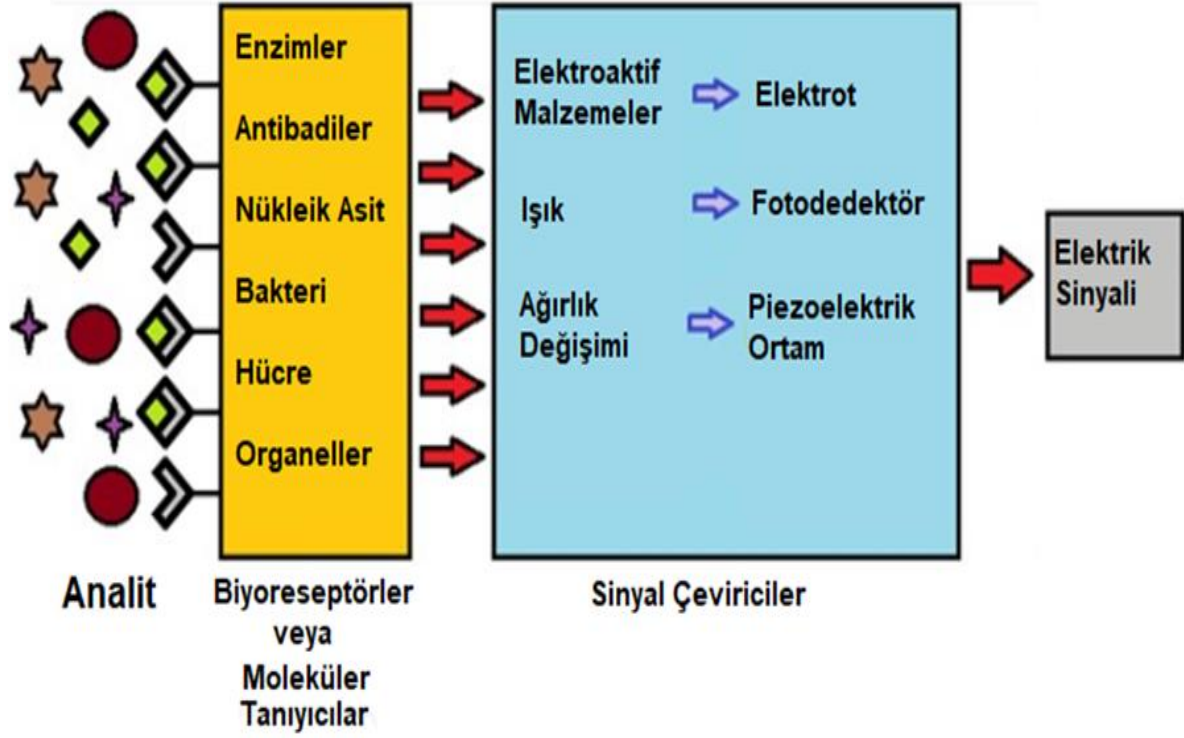
Yapısal farka dayanan bir diğer tahlil yöntemi de enzimatik asseylerdir [21]. 2000'li yıllarda geliştirilen enzimatik testlerde çözünmüş kan örnekleri proteolitik sindirime tabi tutulur. Glikolize edilmiş valinler serbest bırakılır ve fruktozil valin oksidaz için substrat olarak görev yapar. Üretilen hidrojen peroksit, bir kromojen ile yaban turpu peroksidaz katalizörlü bir reaksiyon kullanılarak ölçülür ve dezavantajları aşağı yukarı immunokimyasal asseylerde olan zorluklar ile aynıdır.

Günümüz pazarında Birleşik Devletlerde yapılan bir ankete göre laboratuvarların yüzde 60'ında immünokimyasal testler, yüzde 30'unda otomatik iyon değişim kromatografisi HPLC ve yüzde 10 unu kadarında affinite kromatografik yöntemler kullanılmaktadır [22]. Avrupa'da ise laboratuvarların yüzde 60'ında HPLC, yüzde 35'inde immunokimyasal assayler ve kalan ufak bir yüzdeler dilim de affinite kromatografik yöntemler hastalara uygulamaktadır [23].

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler optik, elektrokimyasal, termometrik, piezoelektrik, manyetik veya mikromekanik olabilen bir fizyokimyasal çevirici ile entegre olan, doku, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri, enzimler, antikorlar, nükleik asitler

gibi biyolojik bir materyal içeren analizleri yapan cihazlar olarak tanımlanırlar [24].



Şekil 2.5: Biyosensörlerin genel çalışma prensibi

Biyosensörler genellikle belirli bir analit veya analit grubunun konsantrasyonuyla orantılı olan dijital bir elektronik sinyal verir. Sinyal prensipte sürekli olabilirken, cihazlar belirli pazar gereksinimlerini karşılamak için tek ölçümler sağlayacak şekilde yapılandırılabilir.

Biyokimya alanlarında zaman içinde oldukça fazla kullanılmaya başlanan bu teknolojik cihazlar genel olarak immünosensörler, enzimatik sensörler ve okuma şekillerine göre elektrokimyasal ve optik sensörler olarak kategorize edilebilirler.

2.2.1. Enzimatik sensörler

Enzimatik sensörler biyosensör teknolojisinin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar ve aktif proteinlerin hedef moleküllerine karşı afinitesini ve seçiciliğini kullanarak klinik teşhislerde ve anlık ölçümlerde etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Enzim biyosensörleri, katalitik olarak aktif proteinlerin hedef moleküllerine karşı afinitesini ve

seçiciliğini kullanırlar. Genellikle sinyal çevirici yüzeyine sabitlenen enzim değişmeden kalırken, substratı, inhibitörü, yardımcı substratı veya yardımcı faktörü ile temsil edilen analit ile etkileşime girer.

Sinyal çevirici genellikle, enzimin analitle etkileşimi sonucu ortaya çıkan etkiyi elektriksel bir sinyale dönüştürür. Assay tipine bağlı olarak, iki temel enzim sensörü çeşidi mevcuttur Birincisinde enzim bir substrat veya eş-substrat/kofaktör varlığını tespit eder. Bu işlem enzimatik aktivitenin artışını izlemek için kullanılan bir dönüştürücü aracılığıyla yapılır ve en bilinen örneği glukoz biyosensörleridir. İkinci grup enzimatik sensörler ise enzim substrat varlığında inhibitor varlığını temsil eder ve bu sistemle enzim inhibisyonunun neden olduğu sinyalin azalması izlenir.

Bu yöntemin en yaygın örneği, böcek ilacı ve savaş zamanında sinir sistemi bozucu ajanlar olarak kullanılan organofosfat bileşiklerinin tespiti. Sinyal çeviriciler elektrokimyasal, optik, ses ve ısı tipinde olabilirler. Tüm bu yaklaşımların en büyük avantajı, seçilen tek bir analitin yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte biyolojik olarak tanınmasıdır.

Enzimatik biyosensörler, genetiği değiştirilmiş yeni enzimlerin kullanımı ve mevcut analitlerin (glukoz, böcek ilaçları vb.) tespiti için mevcut biyosensörlerin gelişmiş performans özelliklerini kullanarak alanlarında önemli gelişmelere imza atmıştır. Bu hızda ilerlemeleri yeni markerleri tespit etmek için genetiği değiştirilmiş enzimlerin kullanılması sayesinde olmuştur. Bir diğer avantajı da karbon nanotüpleri ve diğer farklı "geleneksel olmayan" iletken polimerleri dönüştürücü malzemeleri olarak kullanmasından ileri gelir.

Dikkat çekici yapısal ve elektriksel gelişimleri, özellikle elektrokimyasal algılama teknolojileri alanında yeni seçenekler sunmuştur.

Bu ilerlemeler sadece farklı materyallerin kullanılmasıyla değil, aynı zamanda yeni, orijinal yaklaşımları bünyesine katabilmesiyle de meydana gelmiştir. Bu tür yeniliklerin bir örneği de yeni ortaya çıkan biyomoleküler hesaplama alanıdır. Elektronik hesaplama cihazlarının tipik işlemlerini taklit eden çeşitli hesaplama işlemlerini

gerçekleştirmek için enzimatik algılama sistemlerinin kullanıldığı bu alana biyohesaplama adı verilir ve şık biyomoleküler tasarımları, kimyasal bilgiyi işlemek için geri dönüşümlü, yeniden yapılandırılabilir ve sıfırlanabilir "biyo-mantık" algılama mimarilerini içine alır. Bu özellikle, şimdiye kadar, birkaç farklı türün eşzamanlı analizi için biyosensör veya biyoanaliz dizilerinin kullanılmasının gerekli olduğu enzimatik biyosensör uygulamalarında kullanışlıdır.

Enzimatik biyosensörlerin teknolojisi, başka hiçbir biyoanalitik sistemde bulunmayan güçlü bir performans ve analitik özellik kombinasyonu sunar. Sadece genel bakışta fark edilen potansiyeli bile gelecekteki birçok gelişmeyi teşvik edebilir, bu da klinik, çevresel veya endüstriyel teşhis alanındaki çeşitli uygulamalar için yeni nesil enzimatik biyosensör üretilmesinin önünü açacaktır [25].

2.2.2. İmmünosensörler

İmmünosensörler, spesifik antijen-antikor etkileşimlerine dayanan ve çeviricinin doğrudan veya dolaylı olarak immünokimyasal reaksiyonları tespit ettiği biyosensörlerdir. İmmünosensörler, uygulanan tespit prensibine göre kategorize edilebilir. Başlıca tipleri elektrokimyasal, optik ve mikrogravimetrik immünosensörlerdir. Dolaylı yaklaşımda immün kompleksin saptanması, immünoassay formatına bağlı olarak antikor veya antijenin etiketlenmesi ile elde edilir. Sandviç türü, rekabet, yakalama ve çoğu zaman optik bir algılama flüoresans kemilüminesans, elektrokimyasal parlaklık, absorpsiyon kullanılır. Doğrudan tespit yaklaşımları, antikor ve hedef analit (antijen) arasındaki spesifik bağlanma olayının fizikokimyasal özelliklerde bir değişiklik veya varyasyonla izlendiği etiketsiz yöntemlerdir. Bu durumda, algılama yöntemleri elektrokimyasal empedans spektroskopisi, mikrogravimetri ve yüzey plazmon rezonansı (SPR) içerir. Ek olarak, bu doğrudan tespit yöntemleri ayrıca antijen-antikor reaksiyonu hakkında kinetik bilgi sağlayabilir.

Özel analitlerin tespit edilmesinin yanında, yüksek performanslı sistemler için yapılan araştırmalar, mikro ve nanoteknolojilerin yardımı ile ve mikro akışkanların minyatürleştirilerek sensörlere entegre edilmesini sağladı [26].

İmmünoassay teknolojisinin gelişimi, özellikle klinik laboratuvar için bir başarı öyküsüdür ve halen canlı bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir [27]. Daha fazla gelişme ve otomasyon, klinik bilimlerde immünoassay analiz olanaklarını genişletecektir. Son on yılda gıda endüstrisinde eser miktardaki elementlerin çevresel analizleri ve besin endüstrisi alanında kalite kontrollerini içeren immünoassayler kullanılarak yeni alanlar tanımlanmıştır. Bu uygulamalar sürekli bir kontrole ihtiyaç duyduğundan, çalışan bir immünoassay sistemi olarak bir immünosensör fikri, bu özellikleri kapsayan şekilde tasarlanmıştır.

İmmünosensör şimdi immünokimyasal alanda önemli bir gelişme olarak kabul edilir. Çok sayıda makaleye rağmen bu alan, klinik tanılamalarda immünosensörlerin yalnızca birkaç ticari uygulaması bulunmaktadır. Bunun nedenleri arasında dönüştürücü yüzeyindeki immobilizasyon zorlukları ve antikörlerin veya antikora bağlı reaktiflerin spesifik özellikleri ile ilgili çözülmemiş temel sorular bulunmaktadır. Ek olarak asıl kritik sorun ise klinik uygulamaların rutin tıbbi laboratuvardaki immünosensör cihazlardan ne kadar faydalanabileceğidir.

Kullanılacak analiz cihazlarında bir analitin belirlenmesi için serum, plazma, idrar veya beyin omurilik sıvısı gibi matrislerden alınan numunelere bir ön işlem uygulanmadan ölçüm yapılabilmelidir. Klinik laboratuvarında, immünosensörlerin gelecekteki bir immünoassay yönteminin yerini alabilmesi için çok daha avantajlı ve çok yönlü olabilmesine bağlıdır.

Geliştirilecek immünoanaliz uygulamaları sadece klinik analizler için değil, aynı zamanda çevresel analizler, ilaç ve gıda endüstrilerinde kalite kontrolü, biyogüvenlik ve biyo-terörizmin önlenmesi ve son olarak protein profili ve protein-protein etkileşimi çalışmaları ile proteomik dönem için son derece önemli ve geniş alanlarda fayda sağlama potansiyeline sahiptir [28].

2.2.3. Elektrokimyasal Sensörler

Kimyasal sensörlerin bir sınıfı olan elektrokimyasal sensörler, elektrik tepkisi oluşturan indüklenmiş bir kimyasal değişimi temel alan cihazlardır. Tasarımları, dönüştürücü eleman olarak bir elektrot kullanır [29].

Elektrokimyasal algılama tekniklerinin çoğu potansiyel ve akımda oluşan değişiklikleri kullanır. Sinyal iletim şekillerine göre ayırt edilen elektrokimyasal sensör kategorileri genel olarak potansiyometrik, voltametrik ve konduktometriktir [30].

Potansiyometrik sensörler basit kullanıma sahip cihazlardır ve yüksek seçicilik ve düşük maliyete sahip olmaları nedeniyle alan çalışmalarında tercih edilen yöntemlerdir [31].

Bir çözelti içindeki bileşik ve bir algılama elemanı arasındaki elektron değişimi, potansiyometrik sensörlerde ana fenomendir. Doğrudan potansiyometrik ölçümler, kimyasal bir bileşiğin aktivitesini seçici olarak ölçen bir gösterge olarak iyon seçici elektrot kullanırlar. İyon seçici elektrotlar çoğunlukla gözenekli olmayan membran bazlı cihazlardır ve içinde aktif bir iyon çözeltisi vardır. Membran seçici olarak iyonları bağlar ve elektrik potansiyeli membran boyunca üretilir. İyon seçici elektrottan üretilen potansiyel referans elektrota göre kullanılan çözeltideki hedeflenen iyonun aktifliğiyle orantılıdır ve hesaplamaları bu yöntemle yapılır [32].

Amperometrik veya voltametrik tayin ise elektrot yüzeyinde meydana gelen indirgenme ve yükseltgenme sırasında oluşan akımı temel alarak çalışır. Üretilen akım doğrudan kullanılan örneğin konsantrasyonuyla orantılıdır. Kronoamperometri, çözeltideki moleküllerin yükseltgenmediği veya indirgenmediği bir başlangıç potansiyeline sahip elektrot kullanılan bir yöntemdir. Potansiyel aniden değişerek bir elektrokimyasal reaksiyon başlatır. Potansiyelin aşamalı olarak değişmesi, analiz edilen maddede ani bir reaksiyon başlatır, bu nedenle elektrot yüzeyi ve çevresindeki solüsyon arasında bir konsantrasyon gradyanı üretilir ve bileşiğin elektrotta difüzyonu başlatılır. Tepkime devam ettikçe elektrotun yanındaki çözelti tükenmeye başlar ve

konsantrasyon gradyanı azaldığı için akımda da düşüş gözlemlenir ve hesaplamaları bu yöntemle yapılır [33].

Amperometrik sensörler potansiyometrik cihazlardan daha hassastır ve daha hızlıdır. Diğer elektrokimyasal sensör grupları, direnç ve empedans ölçümlerine dayanan rezistans ve sığa sensörleri içerir ve iyonların iletkenlik değişikliklerini temel alarak ölçüm yapar.

Günümüzde elektrokimyasal sensörler, çevresel, klinik, endüstriyel, tarımsal analizlerde ve günlük yaşamda, örneğin otomobillerde iletken oksijen kısmi basınç sensörü, kan şekeri sensörü, bir elektrokimyasal hücreli karbon monoksit detektörü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.4. Optik Biosensörler

Optik biosensörler en sık kullanılan biosensörler sınıfıdır. Algılama, optik alanın bir biyo-tanıma elemanı ile etkileşimi kullanılarak elde edilir. Yeni optik biosensörlerin uygulanmasında, mikroelektronik ve mekanik sistemler, nano teknolojiler, moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve kimya gibi çoklu ileri kavramlar ve çok disiplinli yaklaşımlar uygulanmaktadır. Optik biosensörlerin araştırması ve teknolojik gelişimi, son on yılda üstel bir büyüme yaşamıştır. Optik biosensör araştırma ve geliştirme, temel olarak sağlık hizmetleri, çevre uygulamaları ve biyoteknoloji endüstrisine yöneliktir [34].

Biosensörlerin tıp, çevre ve biyoteknoloji alanındaki potansiyel uygulamaları çoktur ve her birinin kendi gereksinimleri vardır. Ölçülecek analitin konsantrasyonu, hassasiyeti, numune konsantrasyonu, probu tamamlamak için harcanan süre, biosensörün tekrar kullanılmasını sağlamak için gereken süre ve sistemin temizleme gereksinimleri bu gereksinimlerden bazılarıdır.

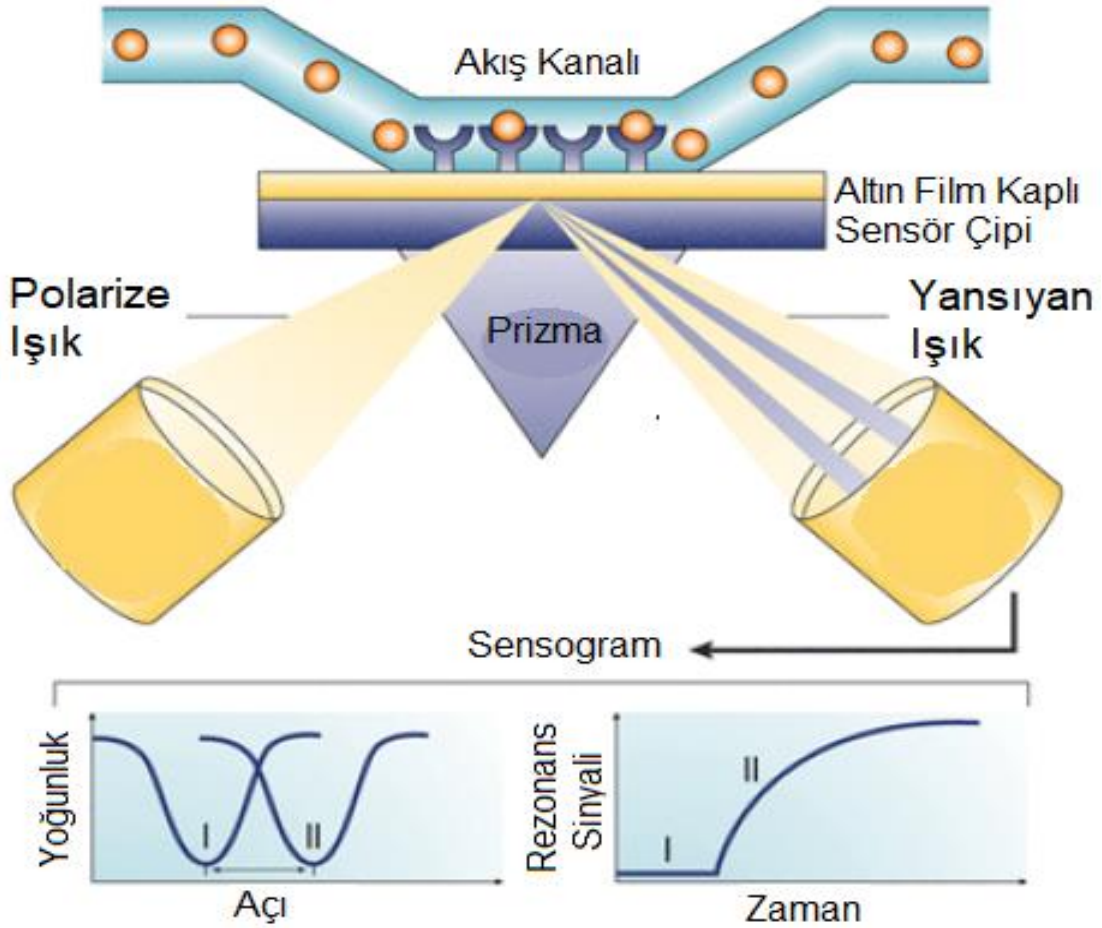
Optik biyotanıma genel olarak iki genel bölümde ele alınır; etiketsiz ve etiketli. Kısaca açıklamak gerekirse, etiketsiz optik biyotanıma, tespit edilen sinyal doğrudan analiz edilen materyalin çevirici ile etkileşimi yoluyla üretilir. Buna karşılık, etiketsiz optik

tanıma, bir etiket kullanımını içerir ve optik sinyal daha sonra kolorimetrik, floresan veya lüminensan yöntemle üretilir. Glukoz gibi basit moleküller, etiket destekli algılama kullanılarak enzimatik oksidasyonla tespit edilebilir. Örneğin şeker hastalığı için kandaki glukoz analizini yapan biyosensörler pazarda yerini almıştır ve bu uygulamaların başarılı uygulamalarından birisidir.

2.2.5. Yüzey plasmon Rezonans Sensörleri (SPR)

Yüzey plazmon rezonansı, optik biyosensör uygulamaları içinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. 1982'deki ilk tanıtımından bu yana bu yöntem etiketsiz ve hassas algılanması ve çok yönlülüğü nedeniyle giderek daha popüler hale geldi [35].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyo tanıma sistemleri, ilk başta kanser göstergesi kurşunlu ilaçlar ve gıda endüstrisinde toksinler gibi sayısız analit için tasarlanmıştır [36]. Uygulama alanının yanı sıra örneklerin özellikleri ve sayısı ve ölçümün amacı, alet ve algılama yüzeyi tasarımı için bazı gereklilikler belirlemiştir. Bu gereklilikleri derinlemesine anlamak deneylerin planlanması ve optimizasyonu için şarttır. Sonraki bölümlerde SPR fenomeninin ardındaki temel teori tanımlanmakta, temel SPR enstrümantasyonunun yapısı gösterilmekte ve SPR biyosensörlerinin karşılaştığı en yaygın zorlukların bazıları listelenmektedir.



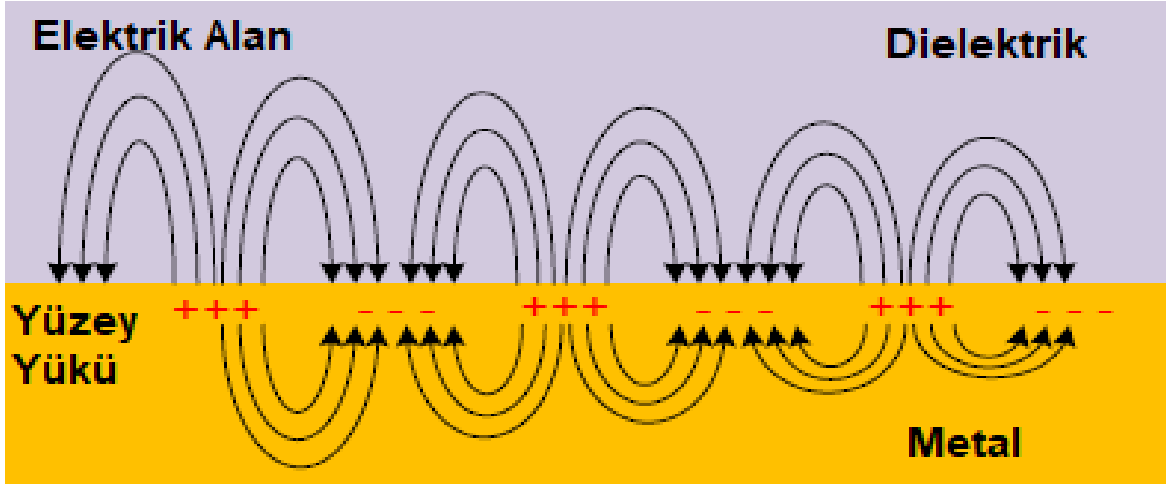
Şekil 2.6: SPR sensörün şematik temel gösterimi [36]

2.2.5.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi

Yüzey plazmonları, iki ortamın ara yüzünde çoğalan yük yoğunluğundaki salınımlardır. Bu enlemesine manyetik polarize elektromanyetik dalgalar, ara yüzde maksimuma ulaşır ve yoğunlukları, birleşik her iki komşu ortamda da gitgide azalır. Bu iki komşu ortamların dielektrik sabitleri, yüzey plazmonlarının oluşmasına izin vermek için zıt işaret olmalıdır. Biyo okuma için ortamlardan birisinin incelenecek ortam olması gerekmektedir ve örnek sıvı da olsa gaz da olsa dielektrik sabiti pozitif olmalıdır. Bu da diğer ortamın negatif dielektrik sabitine sahip olmasını gerektirir. Bu sebepten tanıma yüzeyi olarak genellikle metaller tercih edilir. Yüzey plazmon rezonans biyosensörleri için çoğunlukla altın ve gümüş metalleri kullanılır çünkü kimyasal kararlılıkları diğer metallerden çok daha yüksektir. Bunların dışında yenilikçi

çok katmanlı metal filmler, sensörlerin hassasiyetini artırmak için metallere alternatif olarak tasarlanmaya başlamıştır [37].

Yüzey plazmonlarını uyarmak için, numunenin karşı tarafındaki metalin üzerine ışık düşmesi gerekir. Metal içerisinden ışığın geçebileceği kadar ince olmalıdır ki bu kalınlığın altın ve gümüş metallerde nüfus etme derinliği yaklaşık 100 nanometredir [38]. Uyarılma koşulu, olay fotonlarının momentumunun yüzey plazmonunun momentumuyla eşleşmesidir; Bu koşullarda rezonansa ulaşılır ve fotonların enerjisi en verimli şekilde plazmaya aktarılır.



Şekil 2.7: Bir metal ve dielektrik ara yüzeyinde yayılan yüzey plazmonu [39]

Yüzey plazmonun yayılma sabiti k_{sp} ,

$$k_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

ile formüle edilir, ϵ_m ve ϵ_d metal ve dielektrik ortamların sabitleriyken lamda ise vakumda gelen ışığın dalga boyudur. Yayılma sabiti, gerçekte ve hayali bileşenleri olan iki bölüme ayrılabilir. Gerçek kısım, enerjiyi yüzey plazmonlarına bağlamak için rezonans koşullarını belirlerken, hayali kısım ise yayılma kaybıyla ilgilidir.

Yüzey plazmon çoğalmasının gerçekleşmesi için, fotonların momentumu, yüzey plazmonlarının momentumuna eşit olacak şekilde geliştirilmelidir. Fotonların yayılma sabiti k_{ph} ,

$$k_{ph} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\epsilon_i} = \frac{2\pi}{\lambda} n_i$$

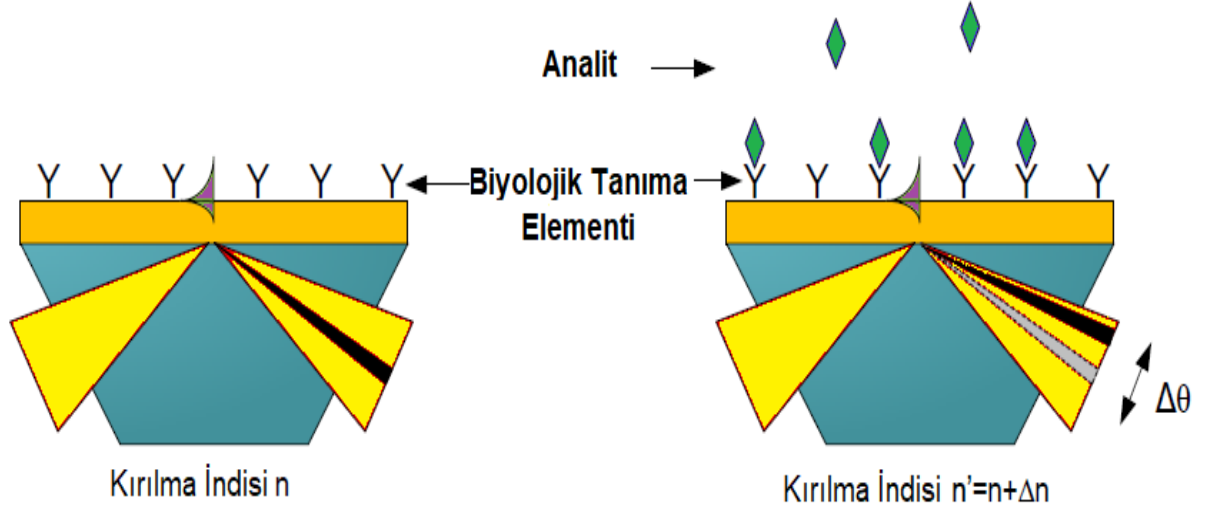
ile formüle edilir ve ϵ_i dielektrik sabiti, n_i metallerin yansımından önce fotonların çoğaldığı ortamın kırılıma indisidir. Standart yöntem, fotonların metal üzerinde yansımından önce yüksek kırılma indeksli bir ortamdan (n_i) geçtiği prizma bağlamasıdır. Yaygın olarak kullanılan malzeme camdır. Cam çeşitli yüksek kırılma indislerine sahip olabilir ve ince metal film biriktirme için uygun bir yüzey sunabilir. Kullanılan iki olası yapılandırma vardır: Kretschmann ve Otto. Kretschmann konfigürasyonunda, prizma direkt olarak metal ile temas halindeyken, Otto konfigürasyonunda dielektrik ortam prizma ile metal arasındadır. Kretschmann konfigürasyonu çok daha fazla tercih edilir. Prizma bağlanmasında fotonların yayılma sabiti,

$$k_{ph} = \frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin\theta$$

formuna dönüşür ve polarizasyon kadar ışığın geliş açısına da bağımlı hale gelir ve enine manyetik polarize ışık uyarılmış yüzey plazmonlara ihtiyaç duyar.

Rezonansta, gelen ışığın enerjisi, yayılmalarına izin veren yüzey plazmonlarına aktarıldığından yansıma yoğunluğu en aza indirgenir. Bu olgu, yansıyan ışığın yoğunluğunu, gelen ışığın açısı veya dalga boyu ya değişen bir girdi parametresi aralığında ölçerek gözlemlenebilir. Parametre arttıkça, ışık yoğunluğu yansıma ve iletim arasında, yansıma toplamının olduğu bir noktaya ulaşana kadar bölünür. Bu toplam iç yansıma bölümünün başlangıcına kritik açı (veya dalga boyu) denir. Girdi parametresi artmaya devam ettikçe, rezonans koşullarının sağlandığı ve yüzey

plazmonlarının yayıldığı nokta olan başka bir dönüm noktasına ulaşır. Buna rezonans açısı (veya dalga boyu) denir ve minimum yoğunluğun konumuna karşılık gelir. Yansıtılan yoğunluğun, geliş açısının veya dalga boyunun bir fonksiyonu olarak izlenmesi, bize bir SPR eğrisine verir.



Şekil 2.8: Analitin bağlanmasıyla oluşan rezonans değişimi ve açı kayması

Yüzey plazmon rezonans ölçümlerinin tepkisi, numunenin kırılma endeksine bağlıdır ve bu da onu biyo okuma için hassas dolayısıyla avantajlı bir teknik haline getirir. Kırılma indisi bağlanma olaylarından dolayı değiştiğinde, yüzey plazmonunun rezonans koşulları da değişir. Bir SPR yanıtı elde etmek için kullanılan iki ana modülasyon formatı, yoğunluk modülasyonu ve açısal modülasyondur. Açısal modülasyonda yansıtılan yoğunluğu değişken açı ile ölçülebilir. Bu formatta, tüm eğrinin gözlemlenmesi mümkündür ve rezonans açısındaki değişim hesaplanabilir. Yoğunluk modülasyonu için ise yansıtılan, eğimin en büyük olduğu rezonans açısına doğru keskin bir düşüş ile gösterilen aralıkta seçilen sabit bir açıda izlenir. Bu konfigürasyon, algılama yüzeyinin büyük bir bölümünü bir kerede görselleştirmek için geniş kamera da kullanılabilir ve buna SPRi, Yüzey Plazmon Görüntüleme adı verilir. Açısal modülasyonun avantajları, alt tespit limiti ev SPR eğrisi ile daha fazla bilgiye erişme imkanı tanınmasıdır. Yoğunluk modülasyonu avantajları ise daha basit alet tasarımı ve daha yüksek çoklama kabiliyetidir.

Başarılı bir biyosensörün olabildiğince küçük bir tespit sınırı (limit of detection LOD) olmalıdır. Bir sensörün kırılma endeksi birimindeki çözünürlüğü, belirli bir analitin ölçülebilen en küçük konsantrasyonuna eşlenebilir. Biyosensörlerle ilgili yapılan araştırmaların çoğu, erken teşhiste kullanabilip hayat kurtarıcı özelliğe sahip olabileceğinden tespit sınırını iyileştirmeye odaklanmak çok önemlidir. Bu durumda, temel zorluklar, daha az gürültülü detektörler kullanarak ve daha verimli veri işleme yöntemleri geliştirmek suretiyle toplanan verilerin kalitesini arttırmaktır.

2.2.5.2. SPR Sensörlerin Avantajları ve Zorlukları

Yüzey plazmon rezonans (SPR) teknolojisi, biyomoleküler etkileşimleri gerçek zamanlı olarak izlemek için etiketsiz bir yaklaşımdır. SPR, makro moleküllerin bağlanması sırasında özgüllük, afinite ve kinetik parametreleri belirlemek için güçlü bir tekniktir. Örnekler küçük moleküllerden ham hücre özütlerine, lipid veziküllere, virüslere, bakterilere ve ökaryotik hücelere kadar çeşitlilik gösterir. Protein-protein protein-DNA enzim-substrat veya inhibitör reseptör-ilaç lipid membran proteini hücre veya virüs-protein gibi çok sayıda etkileşimi gözlemleyecek ekipmanı sağlayabilmesi en büyük avantajlarından birisidir. Bunun yanında tekniğin avantajları arasında gerçek zamanlı izleme, az miktarda numune gereksinimi, karmaşık numunelerden etkileşenlerin saptanabilmesi, esnek deneysel tasarım, yeniden kullanılabilir sensör cipleri ve tekrarlanabilir ölçümler genel olarak sayılabilir. Etiketsiz olması da en önemli avantajlarından birisidir.

Diğer tekniklerde örneğin floresan spektroskopisinde molekülü etiketlemek gereklidir ve bu numune ve zaman kaybına sebebiyet verir. SPR'de standart olan sadece küçük bir miktar numune kullanımı onu özellikle klinik uygulamalarda hastaların konforunu sağlamak adına kullanmaya çok daha elverişli hale getirir.

HbA1c ölçümlerinde kullanılan immunoassaylerden sıklıkla kullanılan Eliza testi ile karşılaştığımızda ise çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Konsantrasyon analizlerinde Eliza testinde antijen sabitlemesi, çok fazla yıkama ve kurutma işlemi, zayıf özgüllük gösteren antibodilerin yıkamada gitmesi gibi dezavantajlar

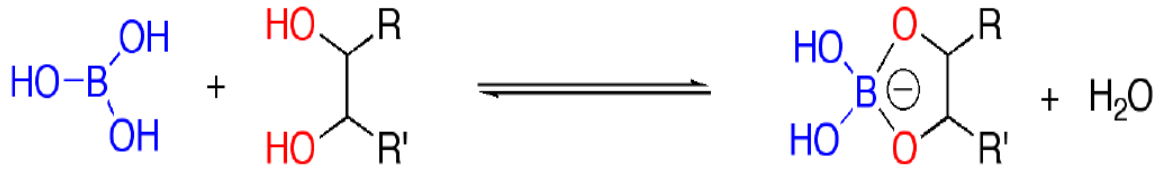
bulunmaktadır. Üstelik bir tarama beş ila otuz saat arasında değişebilmektedir. Yüzey plazmon rezonans teknolojisinin Eliza testine göre en büyük avantajı kısa süreli tavin yapabilme imkanı tanıyabilmesidir ve bu süre en fazla 30 dakikayı almaktadır. Her örnek için yıkama kurutma gibi işlemlerin beklenmesine gerek yoktur, sistem kurulduktan sonra kullanımı için eğitilmiş personele dahi ihtiyaç kalmadan sonuç alınabilir. Bağlanma seviyesinin yanında kinetik analizleri de sensogramdan okumak mümkündür.

Spr tekniğinin zorlukları arasında spr ekipmanlarının pahalı olması, immobilizasyonun sağlanmasında eğitilmiş personel ihtiyacı sayılabilir. Spr tekniğinin kullanımında dikkat edilecek hususlar arasında hava kabarcığı oluşumunu kontrol etmek de önemli bir esastır ve kullanım dezavantajlarından sayılabilir. Hava kabarcıkları moleküllerin absorpsiyonunu etkileyip analitle olan etkileşimi engeller. Yüzeyde kalmaları durumunda, sinyal yanıtında uzun süreli yer değiştirmelere neden olabilirler. Fakat sensör uygulamaları arasında en düşük konsantrasyon aralıklarında çalışabilme ve yüksek hassasiyet isteyen işlemlerde gerekeni verebilmeleri adına, pazarda kullanımlarının da artmasıyla maliyet ve kullanım dezavantajlarının azalacağı ön görülmektedir.

2.3. Boronik Asit Şeker Bağlanması

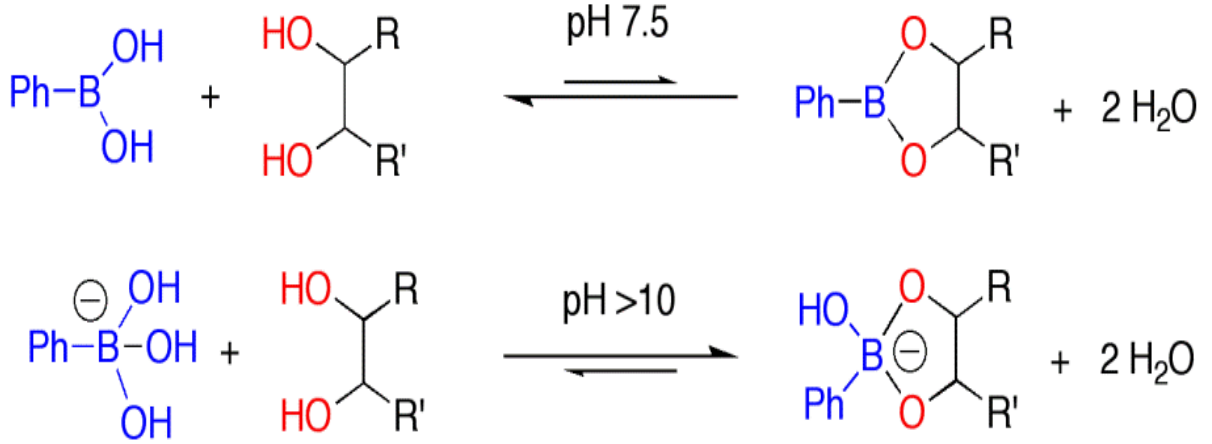
Bor-poliol etkileşimleri, insan sağlığı, bitki gelişimi ve bazı bakteriler arasındaki tanınmanın sağlanabilmesi için büyük bir öneme sahiptir [40]. Bu çeşitlilik belki de borun deniz suyundaki en bol bulunan on elementten biri olduğu ve karbonhidratların gezegenin en bol bulunan biyokütle sınıfını oluşturduğu gerçeği göz önüne alındığında aslında hiç de şaşırtıcı değildir. Afinite kromatografisi yöntemleri ile glikoproteinlerin saflaştırılması için çeşitli boronik asit matrisleri ticari olarak temin edilebilir [41]. Karbonhidrat tanıyıcı boronik asit moleküllerinin kullanılması, erken teşhislerde önemli olabilecek bazı spesifik şekerlerin tanınması için de alternatif bir yol olarak geliştirilebilir. Aynı zamanda hücre yüzeyindeki şekerlerini hedef alarak hazırlanan bor bazlı bir prob, hastalıkların tanımlanması için belirli karakteristik epitoplara tanıyabilir ve yine erken teşhislerde büyük yarar sağlayabilir.

Optik rotasyon üzerine yapılan ufuk açıcı çalışmalarda bor ve polioller arasındaki evliliğin ilk ipuçları tespit edildi [42]. Öncelikle tartarik asidin rotasyonunun borik asit varlığında değiştiği keşfedildi. Bor asitlerin (borik, boronik ve borinik asit) ve monosakaritlerin etkileşiminin detaylı bir şekilde çalışılması bu gelişmeden tam bir yüzyıl sonra başlayabildi. Boronik asitle diol arasında oluşan kovalent ürüne bir karboksilat esteri gibi boronat ester adı verilir. Bu etkileşimler, tetrahedral boronat esterin olduğu bazik pH aralıklarında desteklenir. Sulu çözelti içinde bor asitleri ve iki ligand arasındaki değişim, pH'a bağlı olarak kompleks oluşturabilir ve değişiklik gösterebilir.



Şekil 2.9: Şekerin komşu diolu ile borik asit etkileşimi [43]

Borik asit kökenli iki ana organoboron ailesi vardır ve diollerden su çıkararak ester oluşturabilir. Bunlar borik asidin bir hidroksi grubu yerine karbon atomunun geçtiği boronik asitler ve iki hidroksi grubun yerine geçen karbon bazlı ikamelerin olduğu borinik asitlerdir. Boronatlar polar olmayan çözücüler içinde nötr esterler oluşturabilirler, suda anyonik boronat esterler oluşturma eğilimindedirler. Boronat ester oluşumu fizyolojik pH seviyesinde pek desteklenmezken ve kuvvetli asidik koşullar altında ise tamamen parçalanır.



Şekil 2.10: Değişken pH'da fenilboronik asit ile diol değişimi [43].

2.4. Glikozillenmiş Hemoglobin Tayininde Yapılan Sensör Çalışmaları

Glikozillenmiş hemoglobin tayininde boronik asit formları kullanılarak yapılan sensör analizleri mevcuttur. Bu çalışmalarda genellikle elektrokimyasal sensörlerin alt sınıfları olan voltametrik ve empedans sensörler kullanılmıştır. Boronik asit türevleri olarak kullanılan moleküller arasında başlıca Tiofen-3-boronik asit (T3BA) ve 3-Aminofenil boronik asit (APBA) vardır. Yapılan çalışmaların bazıları şunlardır:

Hsieh ve arkadaşları etiketsiz ve düşük maliyetli, düşük numune hacmine sahip ve deneylerde ek reaktif gerektirmeyen HbA1c tespiti için bir afinite biyosensörü empedans ölçümüne dayanan sensör sistemi geliştirmişlerdir. Halka şeklinde tasarladıkları interdigital elektrotlar (RSIDE'ler) ile HbA1c'nin dağılım eşitliğini ve immobilizasyon verimliliğini arttırmak amaçlanmıştır ve ayrıca empedans değişikliğini karakterize edilmiş ve çeşitli HbA1c konsantrasyonlarını kullanılmıştır. Kendinden oluşumlu Tiofen-3-boronik asit (T3BA) ile elektrotun altın yüzeyi modifiye edilmiştir. Daha sonra, HbA1c ve T3BA arasındaki esterifikasyon reaksiyonu, elektrot yüzeyinde elektriksel özellikte nispi bir potansiyel farklı oluşturmuştur. T3BA modifiyeli RSIDE'ler 100 ila 10 ng/μL gibi geniş bir aralıkta sonuç verebilmekte ve 1 ng/μL düşük saptama limiti ile HbA1c tayininde iyi bir seçicilik sunmaktadır [44].

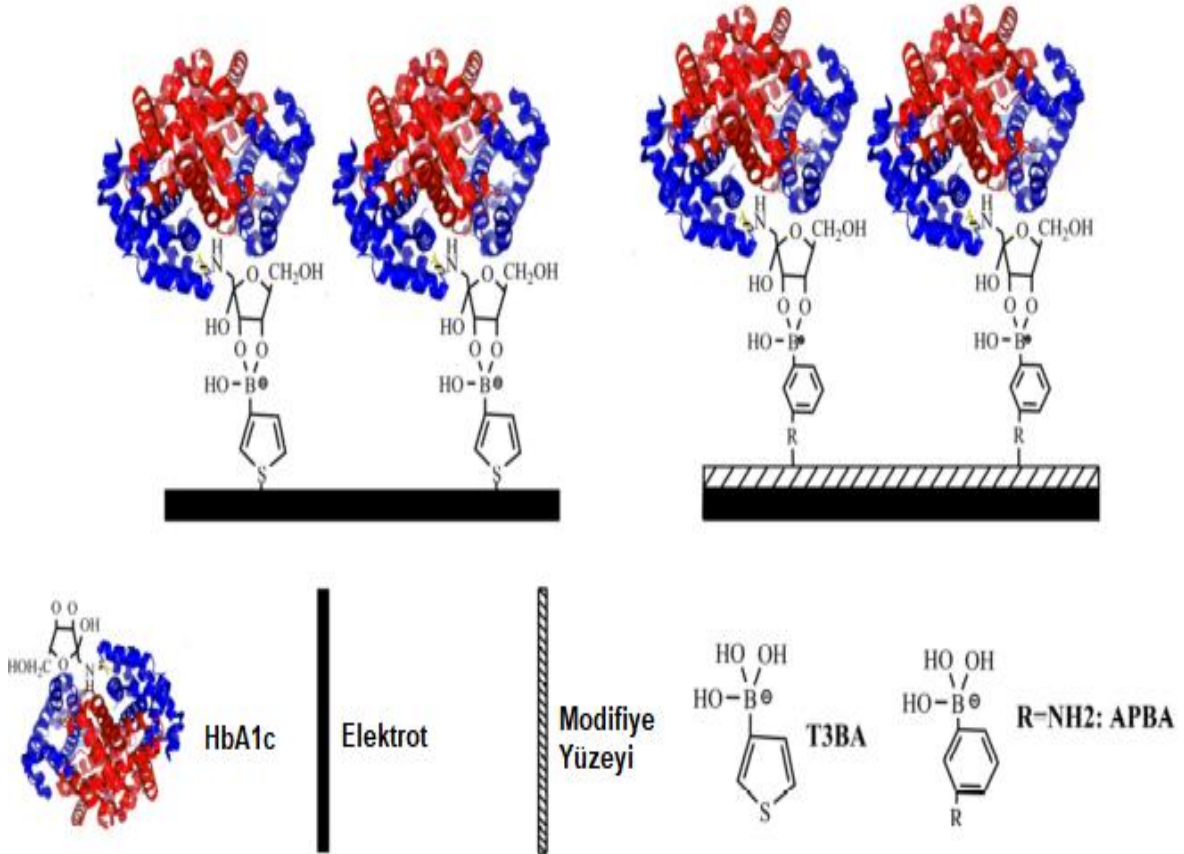
Bir diğerk çalışmada yine empedans temelli etiketsiz bir sensör, HbA1c tayini için tasarlanmıştır ve boronik asit türevi olarak 3-Aminofenil boronik asit kullanılmıştır (APBA). Birleşmiş altın mikroelettrotlar (IDAs) kendinden oluşumlu sistein ile modifiye edilmiş ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmış daha sonra APBA bağlanmıştır. Empedans algılama, klinik HbA1c seviyelerinde (% 0.1-% 8.36) yüksek derecede duyarlı olduğu göstermiştir ve tayin limiti sırasıyla % 0.024 (3σ /eğim) ve % 0.08 (10σ /eğim) olarak çıkmıştır [45].

Elektrokimyasal yöntemlere başvurulan bir başka çalışma da yine APBA modifiyesi ile diyabet tayininde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bu çalışmada etiketsiz elektrokimyasal algılama için çok katmanlı bir manyetik kâğıtle birleştirilmiş balmumu desenli kâğıt üzerinde çift ekranlı bir elettrottan oluşan basit bir 3D-PEID üretilmiştir. Klinik seviyelerde (S/N = 3) of 0.08 g.dL^{-1} and % 0.21 tayin limitleri ile fabrikasyon için uygun hassaslıkta bir sistem tasarlayabilmişlerdir [46].

Amperometrik sensörler kullanılarak yapılan bir çalışma da literatüre katılmıştır. Sensör probunu üretmek için iletken bir polimer olan, poli (tertiofen benzoik asit) (pTTBA), elektrokimyasal yolla altın nano partiküllerin üzerinde oluşturulmuştur daha sonra HbA1c yakalaması için APBA kovalent olarak bağlanmıştır. Hidrojen peroksitin HbA1c tarafından sensör probu üzerinde yakalanan katalitik indirgeme tepkisi, analitik bir sinyal olarak izlendi. HbA1c analizi için deneysel parametreler, H_2O_2 konsantrasyonu, pH, sıcaklık, uygulama potansiyeli ve girişimler açısından optimize edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında, amperometre ile HbA1c'nin lineer dinamik aralığı % 0.1 ila 1.5 arasında ve tespit sınırı % 0.052 ± 0.02 olarak belirlenmiştir. Önerilen HbA1c sensörünün güvenilirliği, bir kan numunesinin bir damlası kullanılarak geleneksel yöntem, empedans yöntemi ve önerilen amperometri arasındaki sonuçların karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir [47].

Fenil boronik asit ve pirolokuinolin kuinin (PBA-PQQ) kompozitlerin kullanılarak grafen oksit indirgenmesine dayanan bir voltametrik elektrokimyasal sensör de HbA1c tayini için tasarlanmıştır. Camsı karbon (GC) elettrotunda grafen oksit (ERGO) biriktirilmiş

daha sonra, PQQ ile çok katmanlı ERGO / GC elektrotunun yüzeyi modifiye edilmiştir. Yüzeğe en son fenilboronik asit bağlanarak PBA-PQQ/ERGO/GC elektrotunun hazırlanması tamamlanmıştır. PBA'nın spesifik boronik asit-diol tanınması amaçlanarak HbA1c ile kompleksleştirilmesi sağlanmış $1.25 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ tayin limiti elde edilmiştir [48].



Şekil 2.11: T3BA ve APBA kullanılarak hazırlanan sensörlerin şematik gösterimi.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

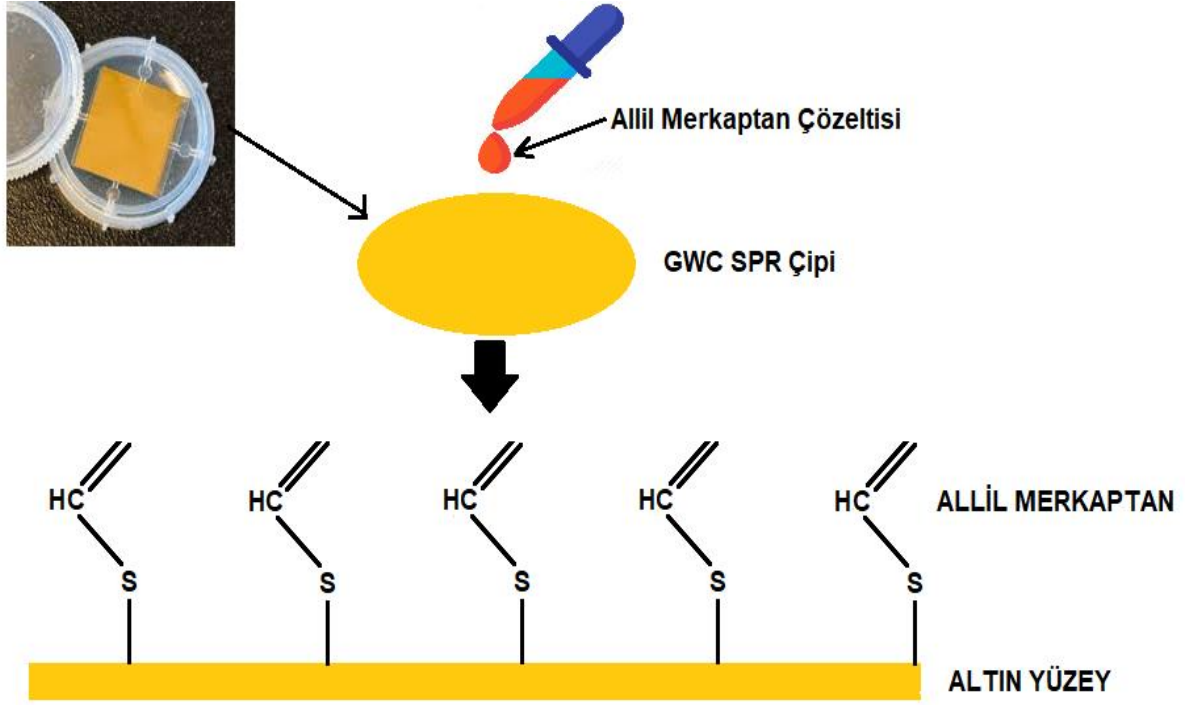
Polimerizasyon için kullanılan etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 2-hidroksimetil metakrilat (HEMA), fostat tamponlarının hazırlanmasında kullanılan dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) ve mono potasyum fosfat (KH_2PO_4), yüzey modifikasyonu için kullanılan allil merkaptan ve 4-vinil fenil boronik asit (VPBA) Sigma Aldrich (St Louis, ABD) firmasından yüksek analitik saflıkta olduğu teyit edilerek satın alınmıştır. Nanofilm hazırlanmasında kullanılan başlatıcı α, α' azoizobütironitril (AIBN) Fluka A.G. (Buchs, İsviçre)'den, yapay insan plazması ise Tokra Medical (Ankara, Türkiye)'den temin edilmiştir. Yüzey plazmon rezonans altın çipleri, SPR sensörüne uygun olarak GWC Technologies (Madison, Wisconsin, ABD)'den temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan saf su Barnstead D2731 ters ozmoz sistemi kullanılarak elde edilmiştir. HbA1c ClinChek Controls (Almanya)'dan temin edilmiştir.

3.2. SPR Nanofilmlerin Hazırlanması

Yüzey plazmon rezonans çiplerinin yüzey modifikasyonu yapılmadan önce altın yüzeyleri 10 mL saf etil alkol, saf su ve sülfürik asit/hidrojen peroksitli asidik piranha çözeltisi ile (3:1 v/v) ayrı ayrı 10 dakika boyunca yıkanmış ve daha sonra 200mmHg basınç ve 37⁰C derece altında kurumaya bırakılmıştır.

3.2.1. SPR Çiplerinin Allil Merkaptan ile Modifikasyonu

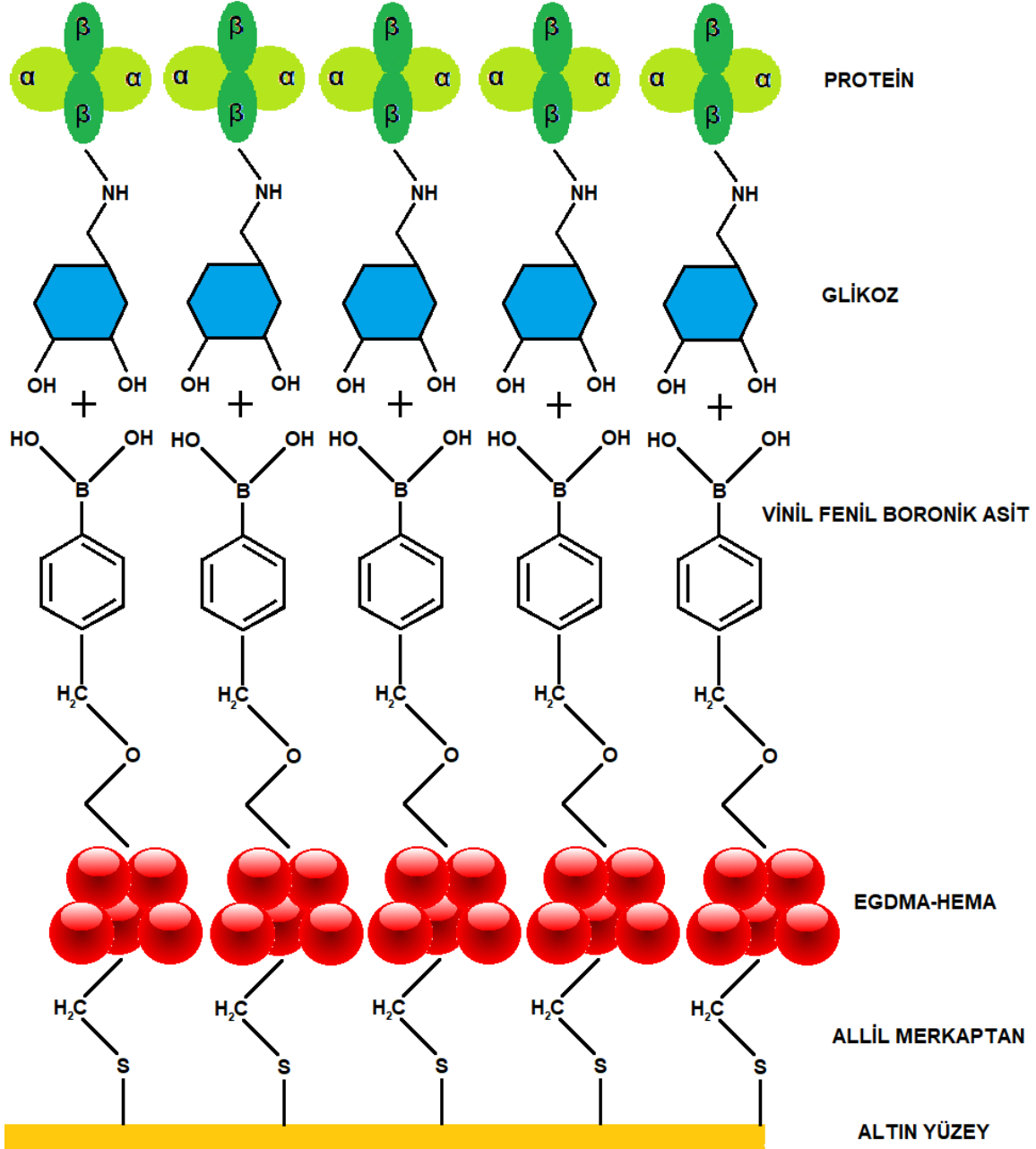
SPR altın çip yüzeyi 3 mM allil merkaptan çözeltisi (CH_2CHCH_2SH) damlatılarak 12 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra bağlanmamış allil merkaptanın uzaklaştırılması için etil alkolle temizlenmiş ve vakum etüvünde 220 mmHg basınç ve 25⁰C de tekrar kurutulmuştur.



Şekil 3.1: Altın yüzeyin allil merkaptanla kaplanması sonucu oluşan bağlanmanın şematik gösterimi.

3.2.2. Vinil Fenil Boronik Asit Nanofilm Sentezlenmesi

13.9 μL HEMA, 40 μL EGDMA ve 4-vinil fenil boronik asit (VPBA) içeren stok çözeltisi hazırlanmıştır. Devamında polimerizasyon başlatıcı olarak 0.1 mg AIBN çözeltiliye eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti SPR çip yüzeyine damlatılarak eşit yayılım sağlanmıştır. 100 W ve 365 nm'de UV ışığı altında polimerleşme için 20-25 dakika azotlu ortamda bekletilmiştir. Beklenen polimerleşme gözlemlendikten sonra yüzey asetat tamponu (25 mM ve pH 5) ve saf suyla yıkanmıştır [49].



Şekil 3.2: Boronik asit temelli nanofilm kaplı altın yüzeyin şematik gösterimi.

3.3. Spr Çiplerin Karakterizasyonu

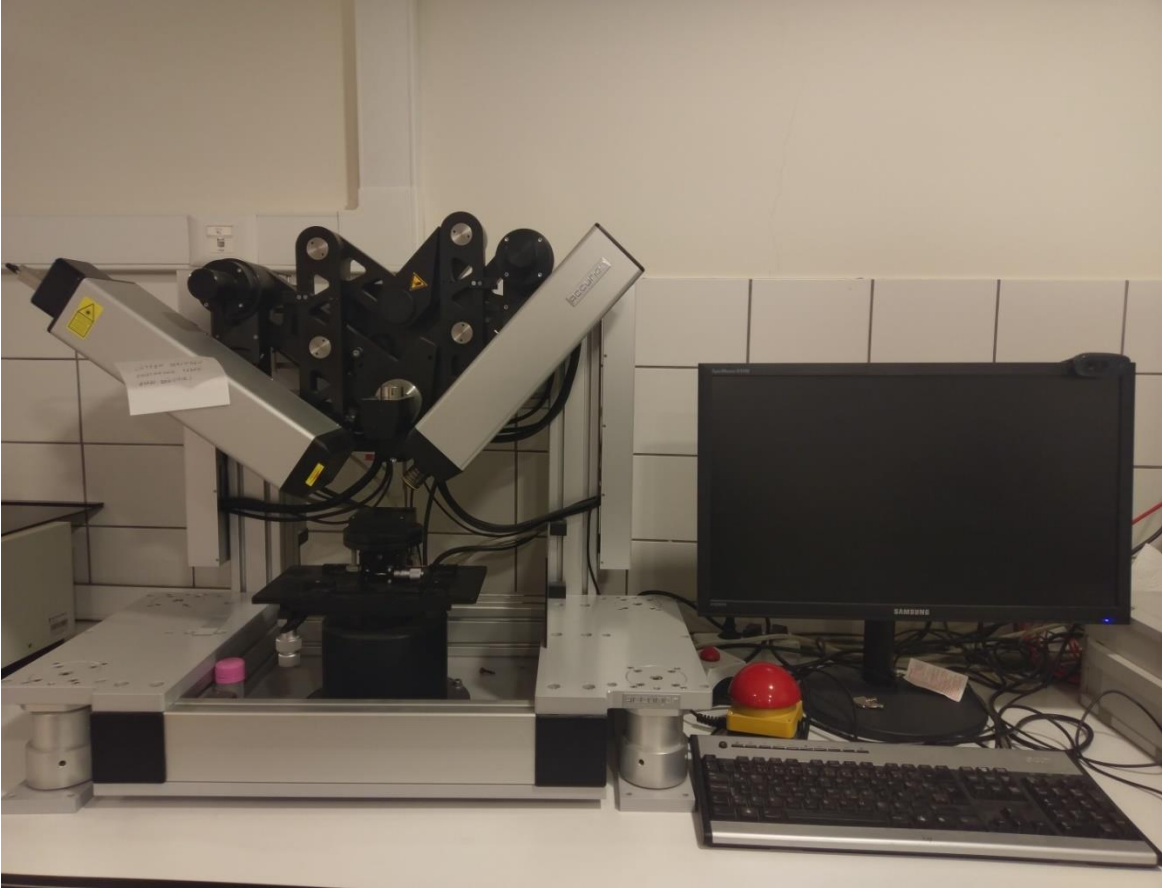
Boronik asit temelli nanofilm kaplanmış ve kaplanmamış çip yüzeylerinin karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometresi (FTIR), elipsometre ve temas açısı ölçümleri yapılmıştır.

3.3.1. FTIR Ölçümü

Boronik asit temelli nanofilm kaplı SPR çiplerin karakterizasyonu öncelikle FTIR ile yapılmıştır. FTIR spektrometresi (Thermo Fisher Scientific Nicolet IS10 Waltham, MA, ABD) kullanılan analizde boronik asitli malzeme KBr ile tablet haline getirilmiş ve $450-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ölçüm yapılmıştır.

3.3.2. Elipsometre Ölçümleri

Boronik asit temelli nanofilm kaplanmış ve kaplanmamış çiplerin kalınlık ölçümleri için Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) kullanılmıştır. 62° açısı ve 532 nm dalga boyu ayarında ölçümler alınmış, ortalama değerler kaydedilmiştir.



Şekil 3.3: Kullanılan elipsometre cihazı.

3.3.3. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile yapılmıştır. Katı yüzeylerin karakterizasyonunda kullanılan ve damlatılan sıvının yayılma görüntüsünü yakalamaya dayanan “Sessile drop” yöntemi ile ölçüm yapılmıştır. Nanofilm ile modifiye edilen ve edilmeyen çip yüzeylerinin ayrı ayrı verileri alınmıştır.



Şekil 3.4: Temas açısı ölçüm cihazı.

3.4. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerle Kinetik Analizler

Boronik asit temelli nanofilm kaplı sensörlerin hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. İlk önce farklı pH örnekleri denenerek optimum pH değerleri belirlenmiş, daha sonra farklı derişimlerde çalışmalar yapılmış, bunları en son tekrar kullanılabilirlik ve yapay plazma örneğinde alınan ölçümler takip etmiştir.

HbA1c'nin izoelektrik noktası $pI = 6.74$ olarak literatürden alınmıştır. Bu değer çıkış noktası alınarak yakın pH aralıklarında ölçümler yapılmış ve optimum sinyal pH 6 değerinde elde edilmiştir. Örnekler pH 6 fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır ve 10 mL hacminde çözeltiler deney için hazırlanmıştır. Desorpsiyon çözeltisi olarak pH 7.4 fosfat tamponu ve 0.1 M NaCl çözeltileri kullanılmıştır. Derişim taramaları 10-200 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında yapılmıştır. GWC Technologies SPR sensör cihazıyla yapılan çalışmaların basamakları şu şekildedir: Sensör çipleri cihaza dikkatli bir şekilde yerleştirildikten sonra sistem çalıştırılmıştır. Örnekler, su ve desorpsiyon çözeltileri geçirilmeden peristaltik pompa her defasında durdurulmuştur. Bu, hava kabarcığı oluşmaması için alınması zorunlu önlemlerden birisidir. Sistemin dengeye gelmesi amaçlanarak öncelikle saf su sistemden geçirilmiştir. Kullanım sıklığına göre 10-15 dakika arasında su geçirilen yüzey artık denge tamponunun geçirilmesi için hazır hale gelmiştir. İçinde örnek olmayan pH6 fosfat tamponu saf suyu takiben sisteme verilmiştir. Denge hali sensogramdan izlenerek gözlemlenmiştir. Yaklaşık 2 dakikalık bir tampon geçişinden sonra örnek içeren pH 6 çözeltisi ile ölçüm alınmaya başlanmıştır. 5 dakikalık bir okumadan sonra sisteme bağlanan molekülleri sökme amacı ile pH 7.4 desorpsiyon çözeltisi 2 dakika süre ile sistemden geçirilmiştir. Bu işlem farklı derişimdeki örneklerin her biri için uygulanmıştır. Her derişim işleminden sonra daha kuvvetli bir desorpsiyon için 0.1 M NaCl 5 dakika süre ile sistemden geçirilmiştir ve bunların karşılığı SPR eğrileri elde edilmiştir.



Şekil 3.5: GWC Technologies SPR cihazı.

3.4.1. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması

Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları, sisteme takılı olan boronik asit temelli nanofilm ile modifiye edilmiş çip çıkartılmadan aynı derişimdeki örnek tekrar geçirilerek yapılmıştır. Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında denge için 3 dakika pH 6 tamponu geçirilmiş, daha sonra 10 dakika süre ile aynı derişimdeki örnek geçirilmiş ve son olarak pH7.4 tamponundaki desorpsiyon çözeltisi 3 dakika geçirilmiştir. Bu işlem 5 kez tekrar edilmiş ve sonunda tekrar kullanılabilirlik sensorgramı elde edilmiştir.

3.4.2. Yapay Plazma Çalışmaları

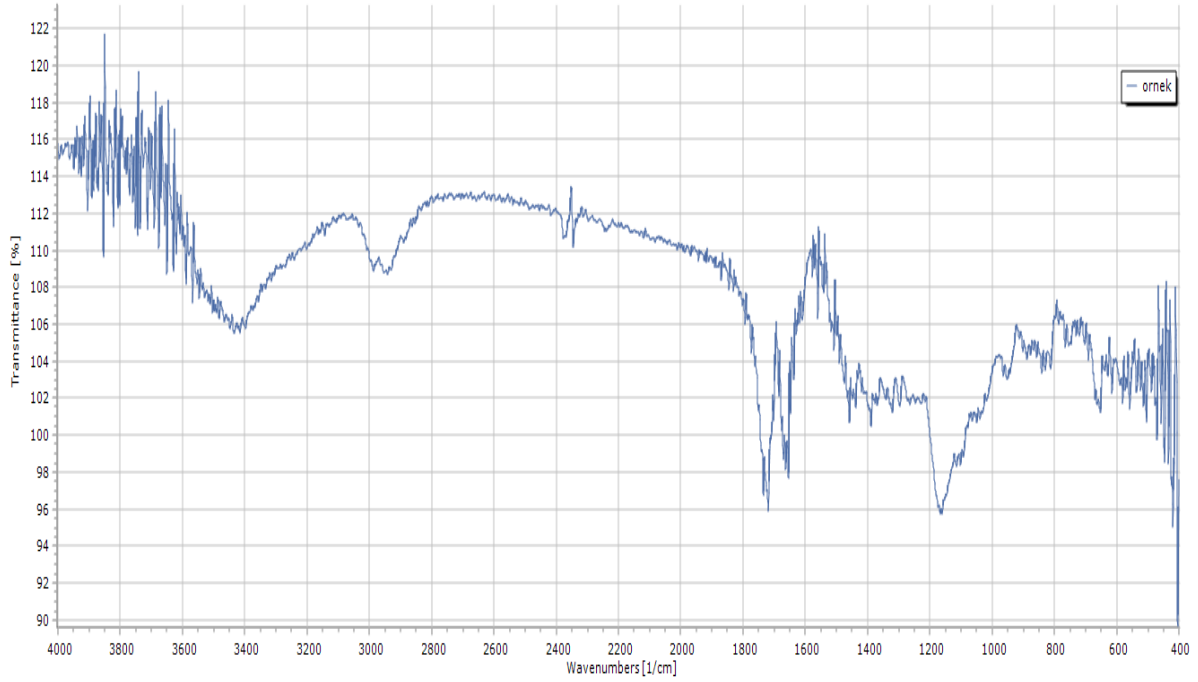
Yapay plazma çalışmaları, kullanılan çözeltiler ile gerçek örneklerin karşılaştırmasına dayanır ve sistemin pratikte kullanımının uygunluğu hakkında önemli bilgiler verir. Boronik asit temelli sensor çipi için HbA1c örneği içeren çözeltileri, HbA1c içeren yapay plazma örneği ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE YORUM

4.1. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Yüzeyin Karakterizasyonu

Yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinin karakterizasyonu için FTIR ve Elipsometre analizlerinin yanı sıra temas açısı ölçümleri de yapılmıştır.

4.1.1. FTIR Analizi



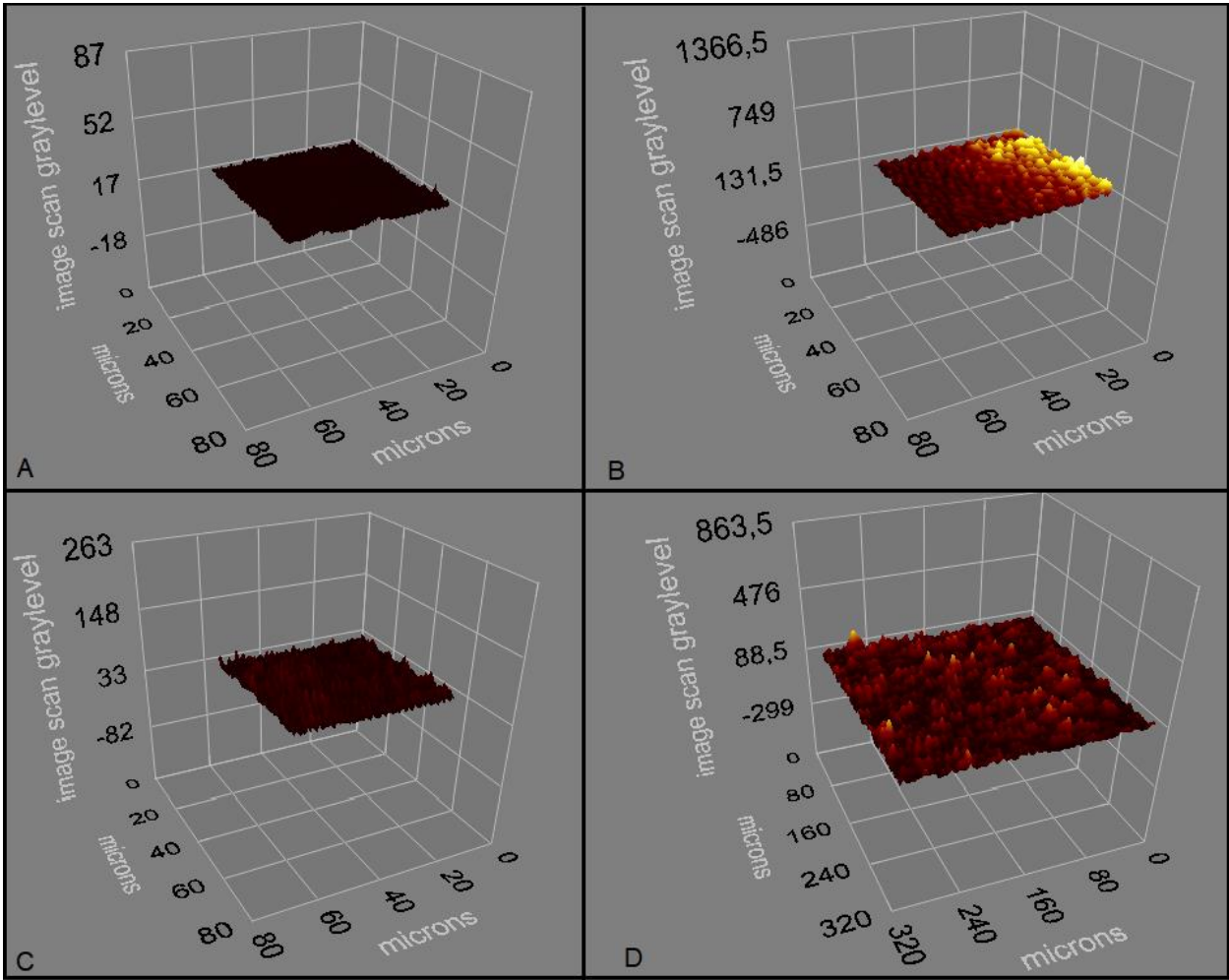
Şekil 4.1: VPBA ile modifiye edilmiş SPR sensörün FTIR spektrumu

VPBA ile modifiye edilmiş çipin yüzey karakterizasyonu için FTIR spektrometresi tercih edilmiştir. 4000-400 cm^{-1} bandında analiz yapılmıştır. FTIR analizinde amaç boronik asit temelli nanofilmin karakterizasyonunun yapılmasıdır. Boronik asit, hedef molekül olan glikozillenmiş hemoglobini bağlayacak olan kısım olduğundan bazı özgün pikleri vermesi beklenmektedir. Nanofilmin yapısındaki EGDMA varlığı 1140 cm^{-1} piklerinde C-O titreşimleriyle kendini göstermektedir. O-H gerilme bandı 3467 cm^{-1} de kendini göstermiştir. Bunun yanında 1450 ve 2950 cm^{-1} pikleri de fenil grupları için alınan tipik piklerdir. Karbonil gerilme bandı ise 1720 cm^{-1} de

görülmektedir. B-O gerilmesi 1375 cm^{-1} de bellidir. Ayrıca B-C gerilmesi de 1140 cm^{-1} de pik vererek boronik ait temelli polimerin varlığını doğrulayan verilerdendir [50].

4.1.2. Elipsometre Analizi

VPBA temelli nanofilm ile modifiye edilmiş, sadece allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve son olarak herhangi bir işlem uygulanmamış boş SPR çiplerinin kalınlıkları elipsometri cihazıyla ölçülmüştür.



Şekil 4.2: Boş altın yüzey (A), allilenmiş yüzey (B), VBPA eklenmemiş nanofilmlili yüzey (C) ve VPBA nanofilmlili altın yüzey elipsometri görüntüleri.

Elipsometri analizi sonucu allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey $32\pm 1.2\text{ nm}$, VBPA eklenmemiş nanofilmlili yüzey $48\pm 2.1\text{ nm}$ ve VPBA eklenmiş nanofilmlili yüzey kalınlığı $50\pm 4.1\text{ nm}$ olarak ölçülmüştür ve bu değerler çizelge 2’de gösterilmiştir.. Bu

ölçümlerden yola çıkarak nanofilmin homojen bir şekilde yüzeye uygulandığını söylemek mümkündür.

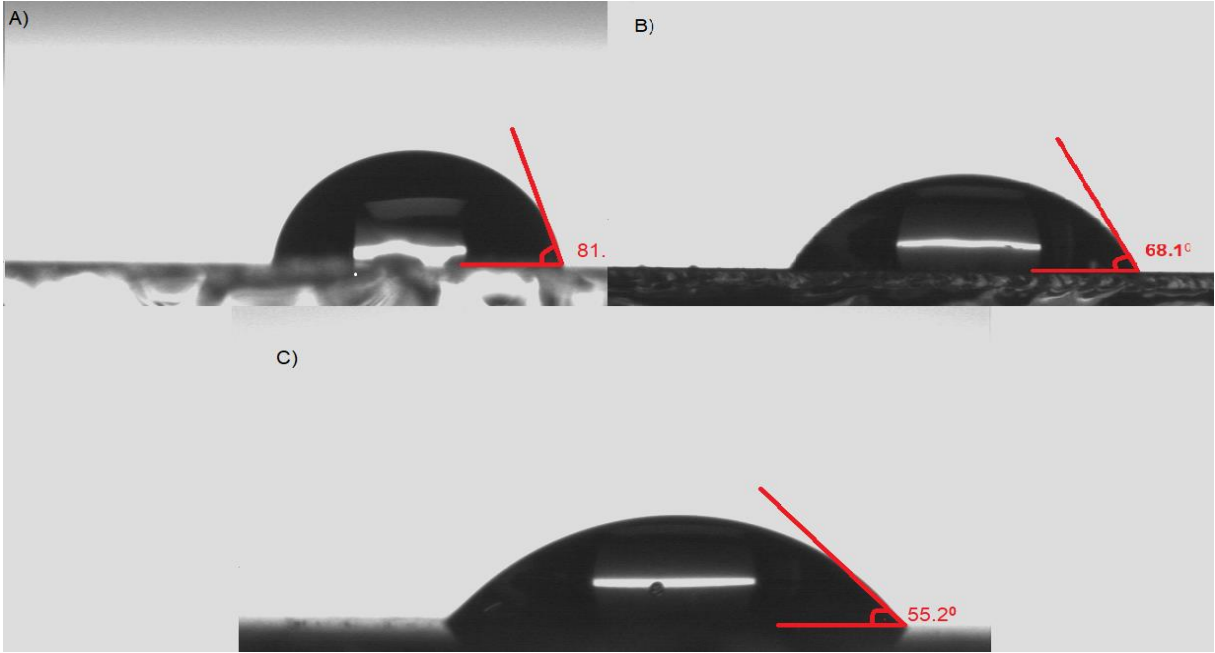
Çizelge 4.1: Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey, VPBA katılmamış nanofilmlili yüzey ve VPBA nanofilmlili yüzey kalınlıkları.

Yüzey	Yüzey Kalınlığı (nm)
Allil Merkaptan ile Modifiye Edilmiş Yüzey	32±1.2
VPBA Katılmamış Nanofilmlili Yüzey	48±2.1
VPBA Nanofilmlili Yüzey	50±4.1

4.1.3. Temas Açısı Ölçümleri

Katı yüzey ile temas eden bir sıvı belli miktarda bir açı oluşturur. Bu açı temas edilen katının ve temas eden sıvının ne olduğuna bağlıdır. Temas açısı ölçümü yüzeyin hidrofilik mi hidrofobik mi olduğu hakkında bilgi verir. Bu açının büyüklüğü aynı zamanda kohezyon ve adezyon kuvvetlerinin büyüklüğüne bağlıdır. Temas açısı 90 dereceden büyükse yüzeyin hidrofobik, düşükse hidrofilik özellikte olduğunu gösterir.

Deneyde yüzey karakterizasyonu için VBPA temelli nanofilm ile modifiye edilmiş, sadece allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve son olarak VPBA eklenmemiş nanofilm yüzeyinde SPR çiplerinin temas açısı ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 4.3: Yüzey temas açısı fotoğrafları sırası ile allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey (A), VPBA katılmamış nanofilmlü yüzey (B) ve VPBA nanofilmlü yüzey (C).

Temas açılarına bakıldığında allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey, VPBA katılmamış nanofilmlü yüzey ve VPBA nanofilmlü yüzeyde ölçülen değerler sırasıyla, 81.4, 68.1 ve 55.2 derecedir. Boş çip yüzeyine yapılan allilleme işlemi ve daha sonra uygulanan VBPA'siz nanofilm ve en son VBPA eklenmesi ile her basamakta açı değeri düşmüştür. Başka bir ifadeyle yapılan eklentilerin hepsi yüzeyin hidrofilik özelliğini arttırmıştır.

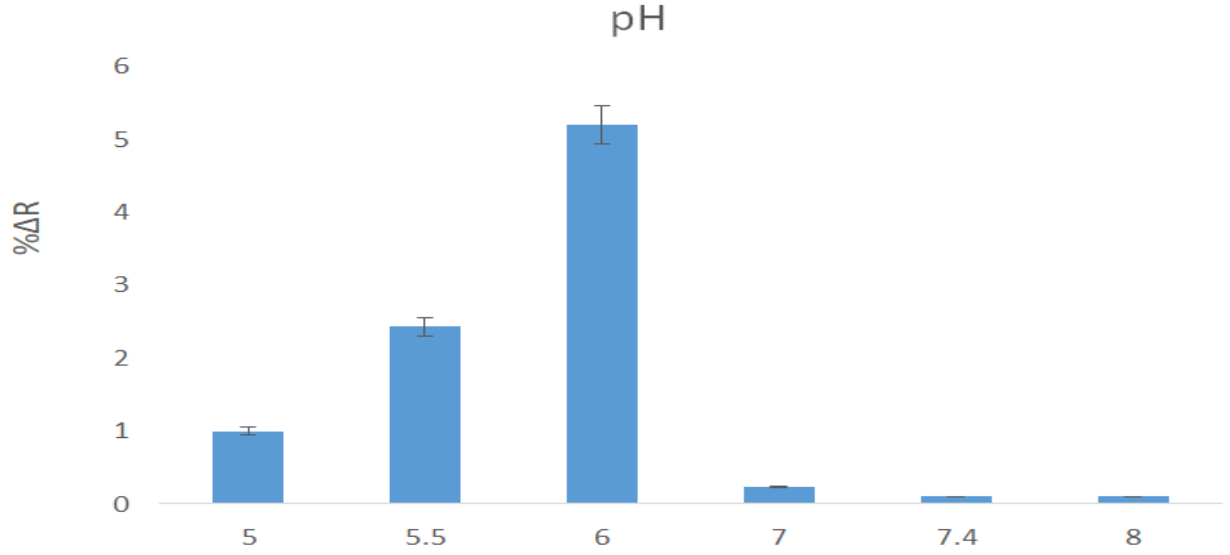
Çizelge 4.2: Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey, VPBA katılmamış nanofilmlü yüzey ve VPBA nanofilmlü yüzey temas açıları.

Yüzey	Temas Açısı ($^{\circ}$)
Modifiye Edilmemiş Altın Yüzey	81.4 (referans)
Allil Merkaptan ile Modifiye Edilmiş Yüzey	81.1
VPBA Katılmamış Nanofilmlü Yüzey	68.1
VPBA Nanofilmlü Yüzey	55.2

4.2. Yüzey Plazmon Rezonans Sensör ile Yapılan Kinetik Çalışmalar

4.2.1. Bağlanmaya pH Etkisinin İncelenmesi

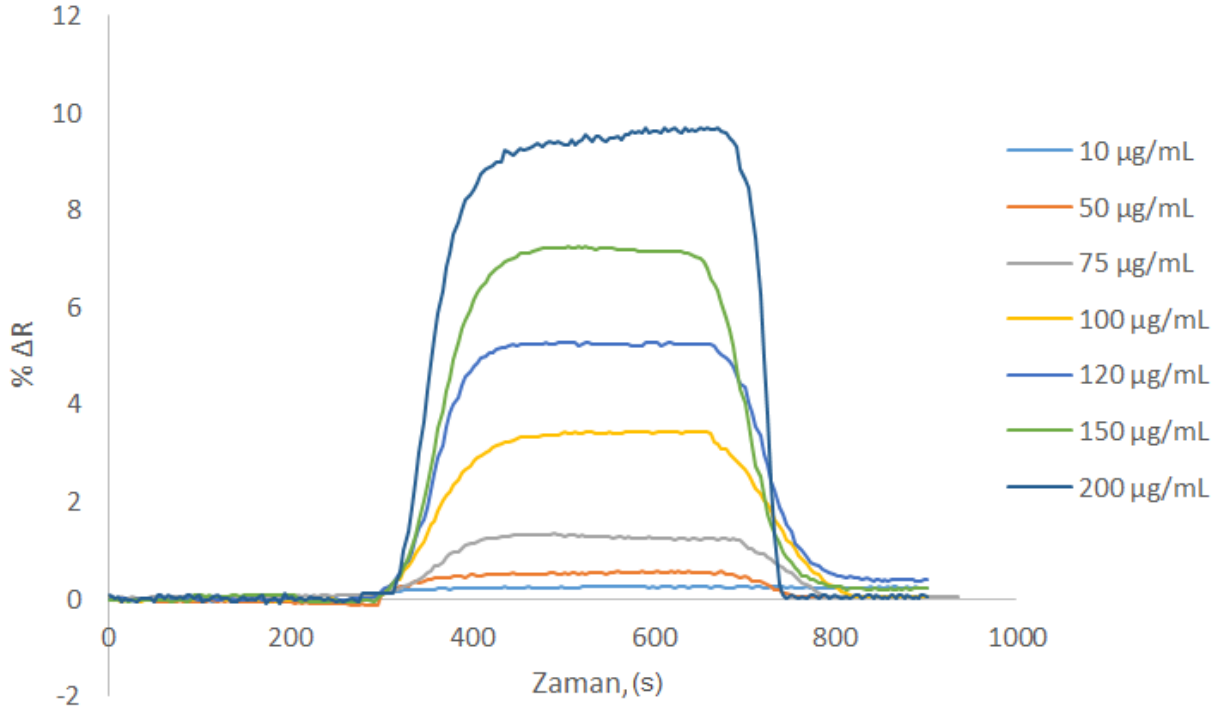
Boronik asit temelli nanofilm ile modifiye edilen SPR çiple yapılan kinetik çalışmalara uygun pH aralıkları ve derişim değişimlerine olan tepkileri gözlemlenerek başlanılmıştır. Uygun pH belirlenmesi için HbA1c'nin izoelektrik noktası 6.74 temel alınarak sırasıyla pH 5.0, 6.0, 7.0, 7.4 ve 8.0 değerlerindeki bağlanma sinyalleri gözlemlenmiştir. İzoelektrik noktasına en yakın değer olan pH 6.0 fosfat tamponunda en yüksek sinyal alınmıştır. Yine bu çalışmadan yola çıkılarak desorpsiyon çözeltisinin pH'ının 7.4 değerinde, çip yüzeyinin tahribatını sağlamadan amacına ulaşabileceği tespit edilmiştir.



Şekil 4.4: pH değerinin bağlanmaya etkisi.

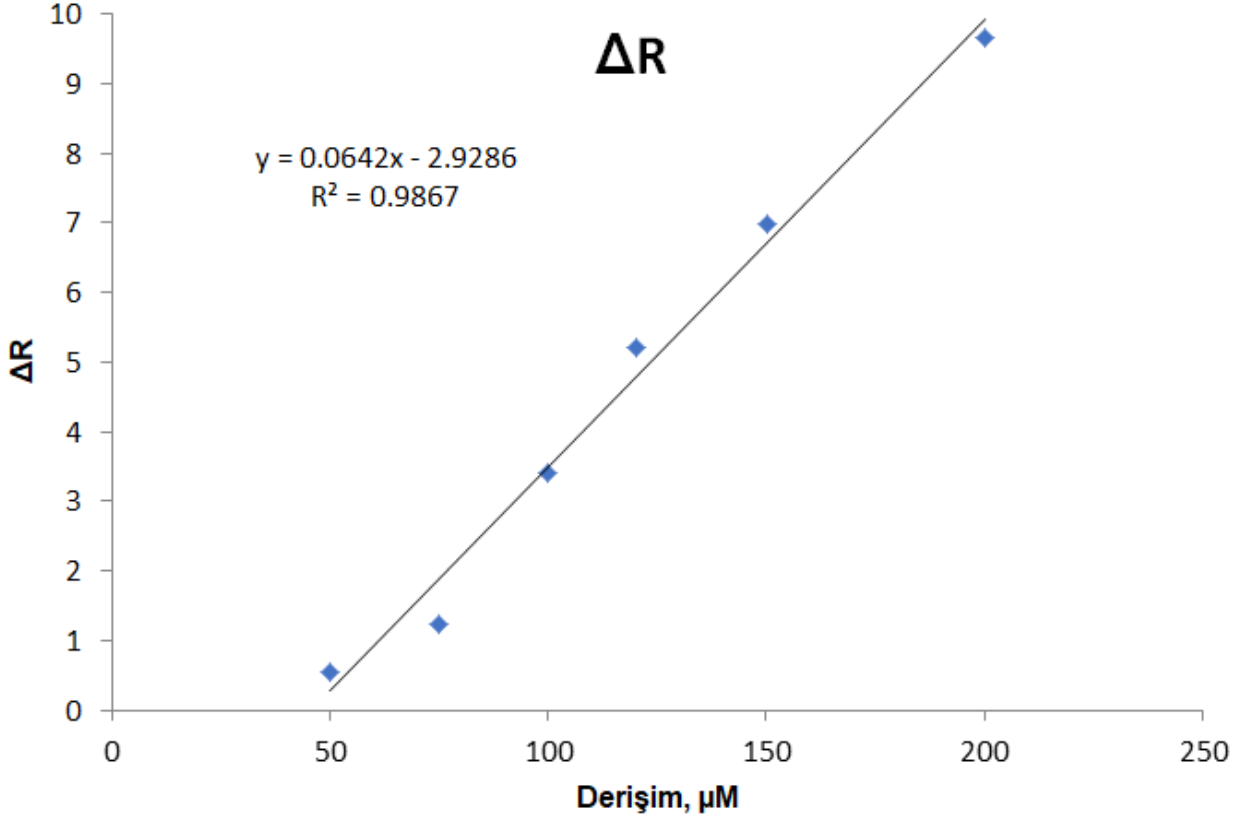
4.2.2. Bağlanmaya Derişimin Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmalarda 10, 50, 75, 100, 120, 150 ve 200 µg/mL derişimde pH 6.0 tampon çözeltisi içinde HbA1c örnekleri hazırlanmış ve sensorgramları alınmıştır.



Şekil 4.5: Farklı derişimlerdeki HbA1c çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimin sensorgramları.

Sistemden öncelikle 5 dakika süresince pH 6.0 tampon çözeltisi geçirilmiş daha sonra belirtilen derişimlerdeki HbaA1c çözeltilerinden biri 8 dakika süre ile geçirilmiş, sonra 2 dakika boyunca pH 7.4 desorpsiyon çözeltisi ile sökme işlemi yapılmıştır. 10 μg/mL-200 μg/mL derişimleri arasında yapılan farklı 7 örnekte görüldüğü üzere, HbA1c derişimi arttıkça ΔR değerinin arttığı açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.6: Boronik asit temelli nanofilm kaplı çipin HbA1c derişimiyle verdiği ΔR kırınımının kalibrasyon grafiği.

10 µg/mL-200 µg/mL derişim aralığında alınan doğrusal grafiğin denkleminin $y=0.0642x-2.9286$ olarak hesaplanmıştır. Bu denklemden doğrusallık $R^2=0.9867$ olarak hesaplanmıştır. R^2 değeri bağlanma ile orantı gösterdiğinden bağlanmanın % 98.67 doğrusallıkta olduğu belirlenmiştir [51].

Kalibrasyon grafiğinden çıkarılan standart sapma ve eğim değerlerinden tayin limiti ve miktarı hesaplanmaktadır. Tayin limiti hesaplamasında (LOD) $LOD = 3*s/b$, tayin miktarı hesaplamasında (LOQ) $LOQ = 10*s/b$ eşitliği kullanılmıştır. Bu eşitliklerde kullanılan s değeri kalibrasyon grafiğinden elde edilen standart sapmayı, b değerine yine bu grafiğin eğimini ifade etmektedir. Yapılan hesaplamalar sonucu LOD ve LOQ değerleri sırası ile 2.86 ve 9.52 olarak bulunmuştur. Daha önce bahsedilen çalışmalar ile birlikte hesaplanan tayin limiti değerleri çizelge 3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: Boronik asit türevleri kullanılarak hazırlanan HbA1c tayini sensörleri

Kullanılan Boronik Asit Türevi	Modifiye Elemanı veya Elektrotu	Tayin Metodu	Tayin Limiti (LOD)
T3BA	Au/IgG-FITC	Empedans	1
APBA	glutaraldehit-SAM Cys	Empedans	% 0.024
APBA	glutaraldehit-ESMs	Empedans	% 0.19–0.21
APBA	pTTBA-Au NPs	Amperometrik	% 0.052
APBA	PQQ-ERGO/GCE	Voltametrik	1.25
VPBA	VPBA-EGDMA-HEMA	SPR	2.86

4.2.3. Denge Analizi

Denge analizleri Scatchard izotermi ile incelenmiştir. Scatchard analizi bağlanan ligand ile bağlanmayan ligand arasındaki derişim miktarını belirleyebilen bir grafikdir. Geri dönüşümlü ligand-reseptör bağlanması ilişkisini inceler. Scatchard grafiği, yüzey plazmon rezonans sensörlerinde bağlanan ve bağlanmayan madde derişimini, kırınım değişimi, yani ΔR , esas alınarak hesaplar. Bu sebepten dolayı fazladan kütle/derişim dönüşümlerine gerek duyulmamaktadır. Scatchard eşitliğinde;

$$d \Delta R/dt = k_a C (\Delta R_{max} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (1)$$

k_a ve k_d parametrelerinde k_a bağlanma hız sabiti ve k_d ayrılma hız sabiti olarak isimlendirilir. Bunların birbirlerine oranı k_a/k_d ise tepkimenin bağlanma sabiti olan K_A değerini verir. Denge halinde çip yüzeyi stabil kalacağından kırılan ışığın açısında bir değişim gözlenmesi beklenemez. Bu yüzden kırınımdaki değişim sıfır olacağından $d\Delta R/dt$ sıfıra eşitlenir. Bu eşitlik sadeleştirildiğinde

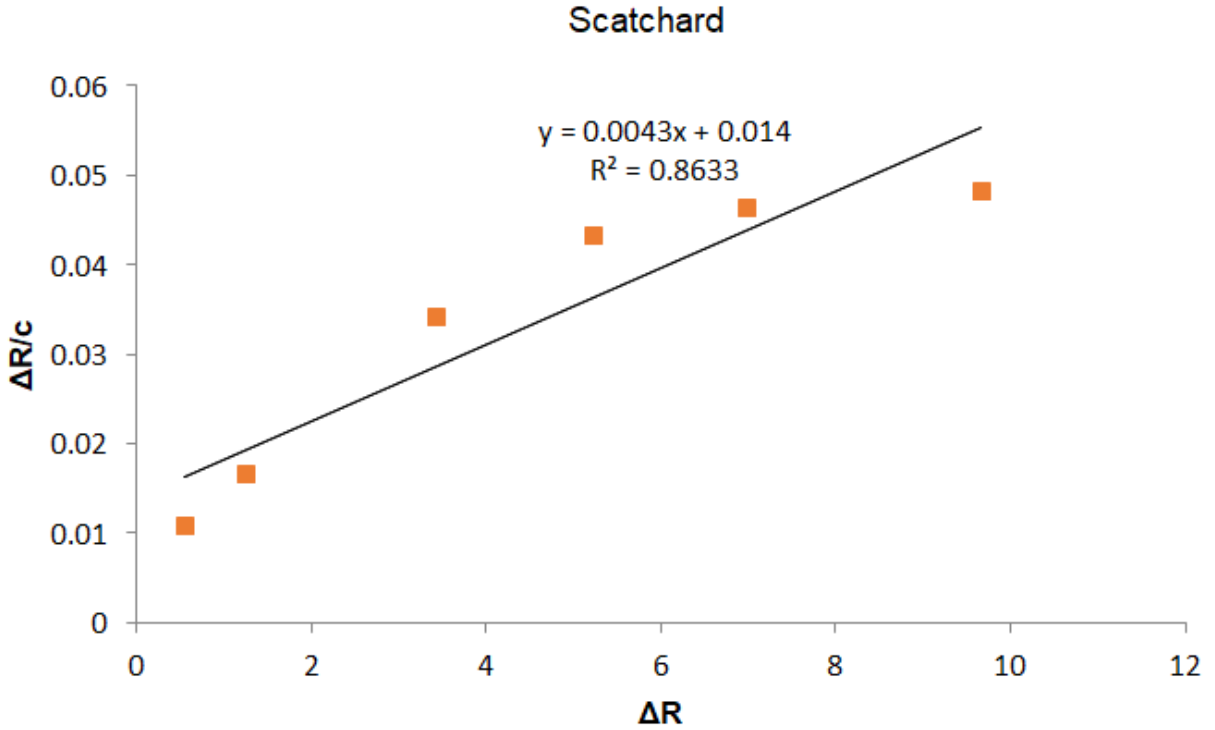
$$\Delta R_{denge}/C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge}$$

eşitliği hesaplamalar için elde edilmiş olur.

(2)

Scatchard grafiği uyguladığımız derişimde çıkarıldığı takdirde x eksenini kestiği noktalar teorik olarak bağlanma noktalarını gösterirken, y eksenini kestiği noktalar ise ayrılma noktalarını verir. ΔR 'nin maksimum olduğu değerde bir noktadan bağlanma yapıldığı varsayıldığında, (2) numaralı eşitlik kullanılarak K_A ve K_D değerleri elde edilebilir.

Scatchard grafikleri bağlanmanın yorumunu bağlanma bölgelerinin sayısından yararlanarak yapar. K_D değerinin K_A değerinden düşük olduğu durumlarda, ligand ve analit arasındaki bağlanmanın birden çok noktada olduğu söylenir. Eğer K_A değeri K_D değerinden çok düşükse, bu durumda bağlanma tek bir noktadan güçlü bir şekilde yapılmıştır. Grafikteki değerlerde K_D değerinin K_A değerinden büyük olması da VPBA-glukoz bağlanmasının tek bir noktada olduğunun göstergesidir.



Şekil 4.7: Scatchard denge analiz grafiği.

Çizelge 4.4: Scatchard denge analizi

Scatchard Denge Analizi	
ΔR_{maks}	9.66
K_A (mg/ml)	0.01
K_D (ml/mg)	142.86
R^2	0.86

4.2.4. Bağlanma Kinetik Analizleri

Bağlanma kinetiğine geçildiğinde denge analizi için uyguladığımız (1) eşitliği tekrar düzenlenerek bir analiz yapılabilir.

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (3)$$

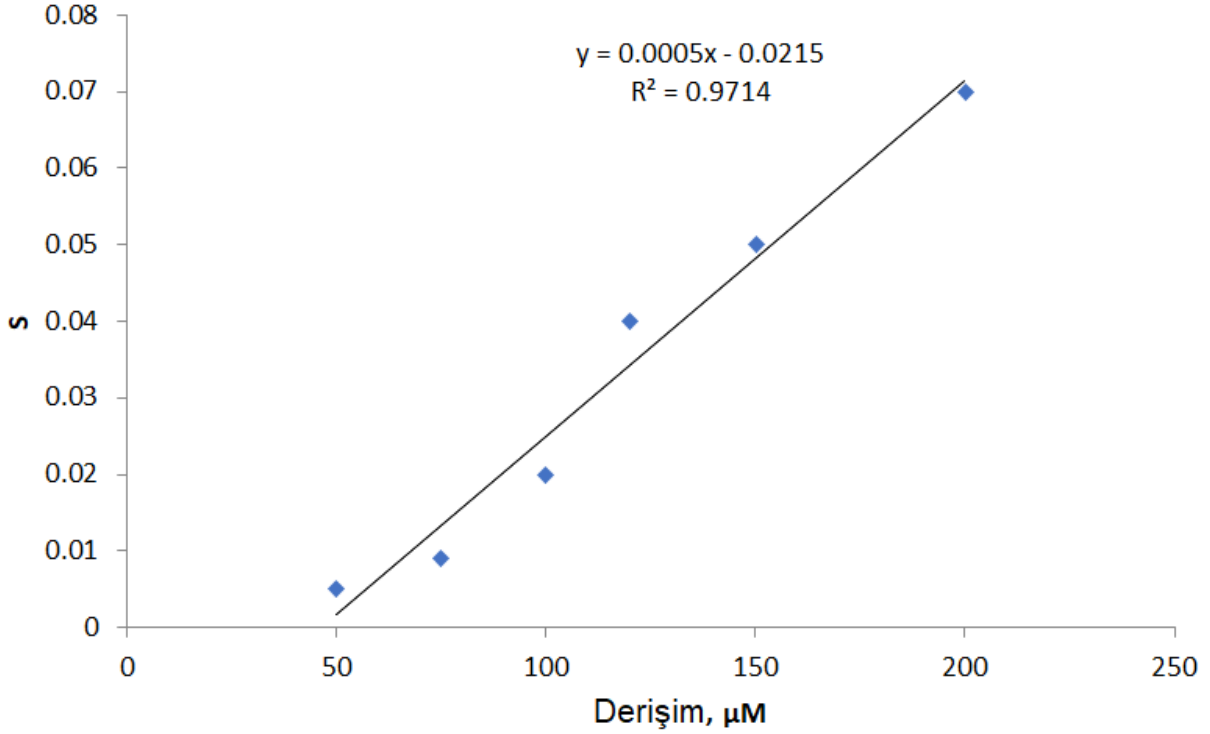
Eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan yukarıdaki doğru grafiği bağlanma hızı ve analit derişiminin ilişkisini verir ve miktarını hesaplamada kullanılabilir. R_{maks} değerinin eşitlikte kullanılmasıyla k_d ve k_a değerleri hesaplanabilir. Sensör yüzeyini tam kapasite doldurmak için kullanılacak örnek miktarı çok fazla olacağından, farklı örnek derişimlerinde alınacak sensorgramların ΔR ve $d\Delta R/dt$ grafiklerinden ileri ve geri hız sabitleri hesaplanarak yine eğimden k_a ve k_d değerleri bulunabilir.

$$S = k_a C + k_d \quad (4)$$

Eşitlik 4'de verilen doğrunun eğimi k_a 'dır ve kesim noktası k_d değerini verir. Belirlenen bir başlangıç noktasında bağlanma sabiti ayrılma sabitinden çok daha yüksek olacağından k_d değerinin hesaplanmasını zorlaştıracaktır. Belirlenen t_0 ve t zamanlarındaki ΔR_0 ve ΔR_t kırınımları oranının doğal logaritması, k_d değerini hesaplamada daha kesin bir sonuç vermektedir.

$$\ln(\Delta R_{t_0}/\Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (5)$$

Bu eşitliklerden tüm bağlanma kinetiği parametreleri hesaplanır [52].



Şekil 4.8: Bağlanma kinetiği grafiği.

Çizelge 4.5: Bağlanma kinetiği parametreleri.

Bağlanma Kinetiği Parametreleri	
$k_a, (\text{mg/L})^{-1}\text{s}^{-1}$	0.0005
k_d, s^{-1}	0.0215
$K_A, (\text{mg/L})^{-1}$	43
$K_D, (\text{mg/L})$	0.0233
R^2	0.9714

Bağlanma kinetiği analizinin sonuçları incelenirken K_A değeri ne kadar yüksekse K_D değerinin o kadar düşük olması beklenir çünkü bu durum analitin alıcıya yüksek afinite gösterdiğinin kanıtıdır. K_A değerinin 43 mg/L^{-1} ve K_D değerinin de 0.0233 mg/L çıktığı bu grafikte, iki oranın birbirine oranının yüksekliği görülmektedir ve HbA1c'nin modifiye ettiğimiz sensöre bağlanmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin kanıtlarından birisidir.

4.2.5. Denge İzoterm Çalışmaları

Freundlich modeli, heterojen yüzeyler üzerinde oluşan adsorpsiyon için uygulanan bir izoterm modelidir. Yüzey plazmon rezonans için standart parametreleri uyarlanarak aşağıdaki formülle ifade edilir,

$$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n}$$

Langmuir izotermi ise, yüzeyde adsorplanan moleküllerin tek tabaka halinde ve homojen bir şekilde adsorplandığı varsayımı yapılarak alınır. Adsorpsiyonda yüzeyin her tarafında adsorpsiyon enerjisinin aynı olduğu ve yüzeyde tutunan moleküller arasında etkileşme olmadığı kabul edilir. Langmuir izotermi denklemlerinin yüzey plazmon rezonans sensörü ΔR değerine uyarlanmış formülü,

$$\Delta R = \{ \Delta R_{\text{maks}} [C] / (K_D + [C]) \}$$

şeklinde dir. Langmuir-Freundlich izoterm modellerinin kabullerinin birleştiği bir yaklaşımda da;

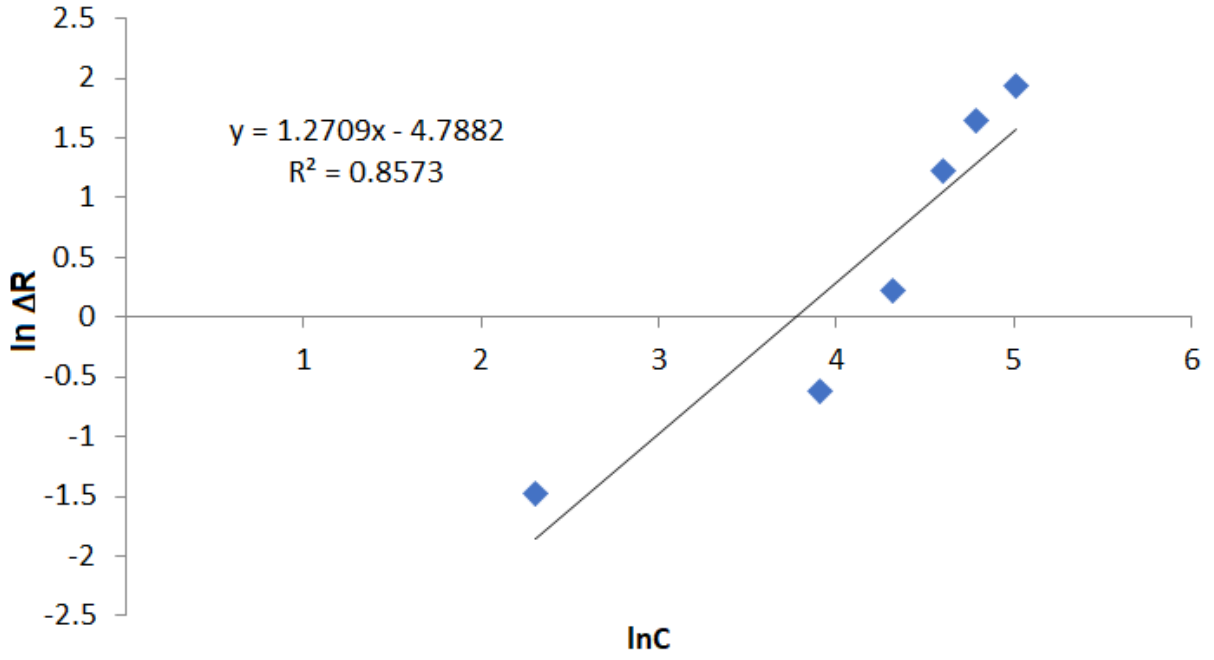
$$\Delta R = \{ \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n} \}$$

eşitliği kullanılır.

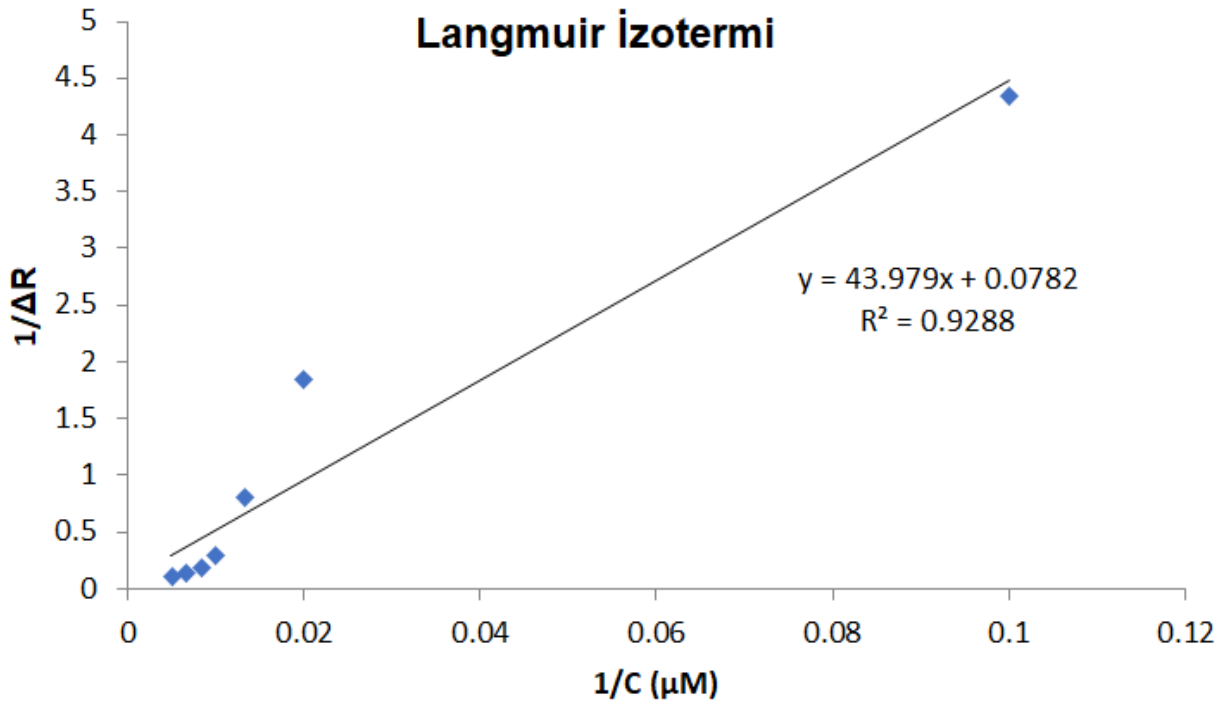
HbA1c ile boronik asit temelli sensör sistemi arasındaki iletişimi incelemek için sırayla Freundlich, Langmuir ve Freundlich-Langmuir izoterm grafikleri çıkarılmıştır.

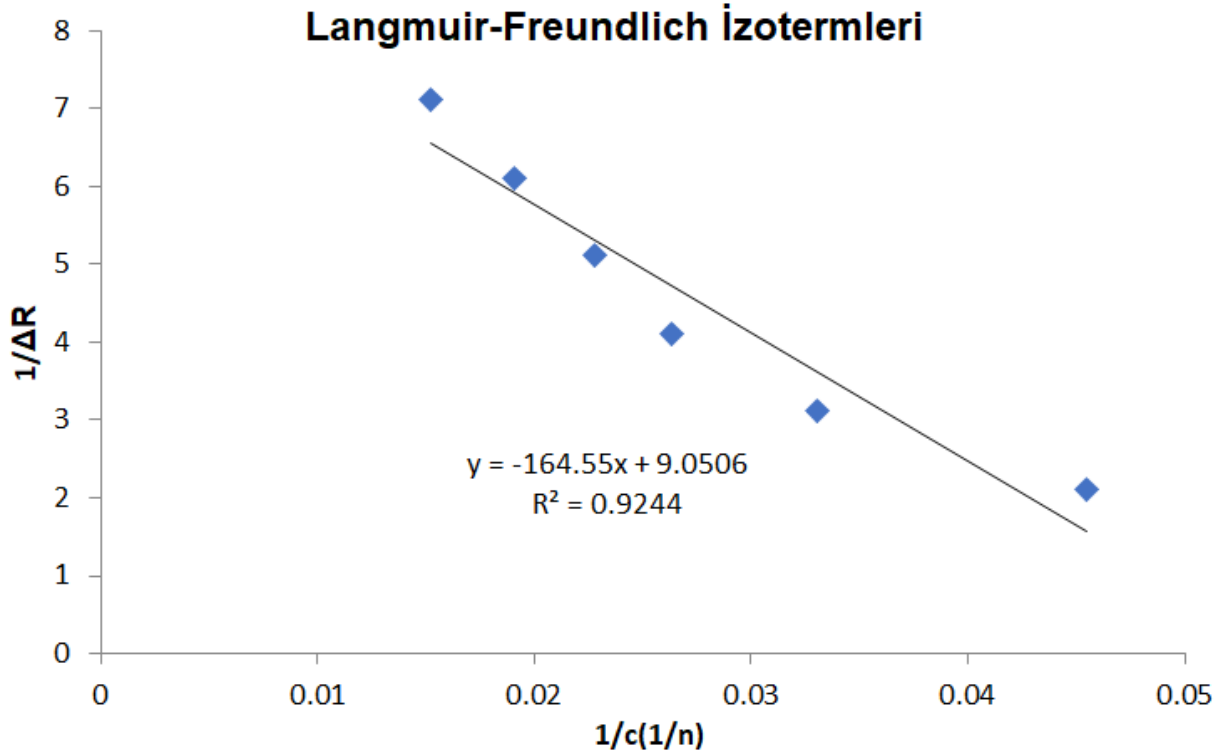
$d\Delta R/dt$ yüzey plazmon rezonans sinyal değişim hızı, m kütle, ΔR_{maks} ölçülen bağlanma sinyali, C derişimi, k_a bağlanma hız sabiti ve k_d ayrılma hız sabiti, $1/n$ Freundlich heterojenite indeksini ifade etmektedir. Bağlanma analiz parametreleri Çizelge 4.6'da verilmiştir

Freundlich İzotermi



Langmuir İzotermi





Şekil 4.9: Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich izoterm grafikleri

Çizelge 4.6: Hesaplanan Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich izoterm parametreleri

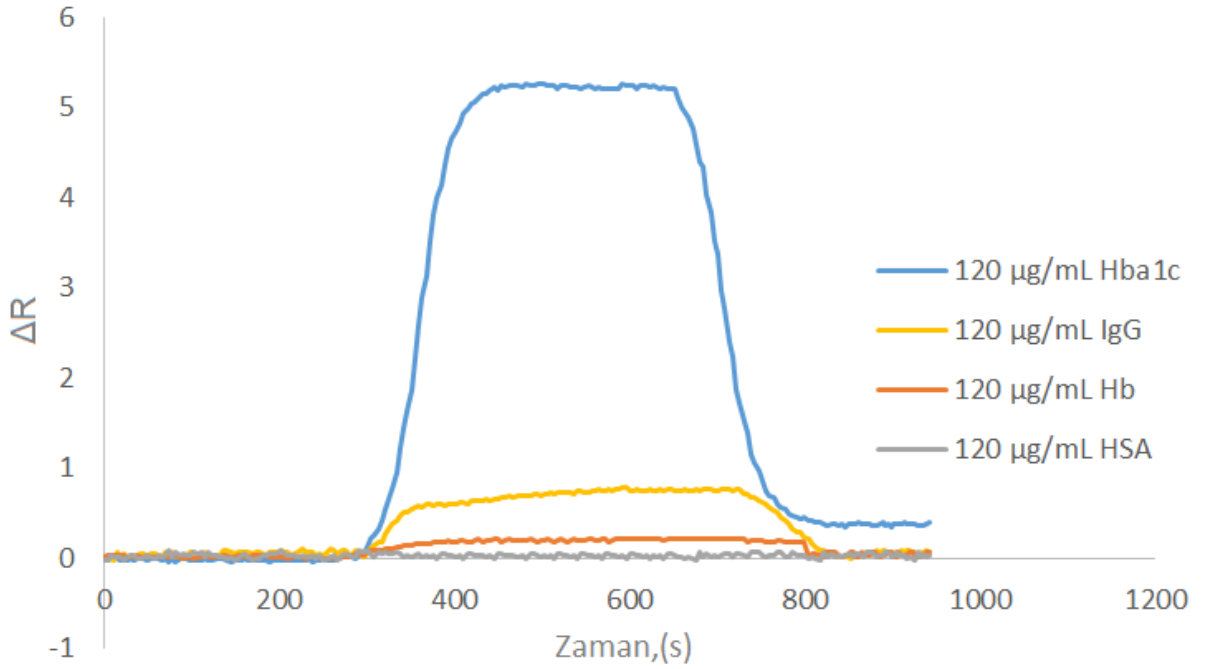
Freundlich		Langmuir		Langmuir -Freundlich	
ΔR_{maks}	2.977	ΔR_{maks}	12.787	ΔR_{maks}	0.11
$1/n$	1.27	$K_D, (mg/l)$	601.023	$1/n$	9.05
R^2	0.8573	$K_A, (mg/l)^{-1}$	0.00166	$K_D, (mg/l)$	18.18
		R^2	0.9288	$K_A, (mg/l)^{-1}$	0.06
				R^2	0.92

Elimizdeki izoterm modellerinin hepsinde başarılı bir bağlanma olduğu gözlemlenmiştir. Fakat özellikle Langmuir modelinin, ΔR_{maks} 12.787 değeri ile VPBA nanofilm SPR sensör ile HbA1c molekülü arasındaki etkileşimi en uygun model

olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, SPR nanosensör üzerine HbA1c bağlanmasının tek tabakalı ve homojen olduğunu da göstermektedir.

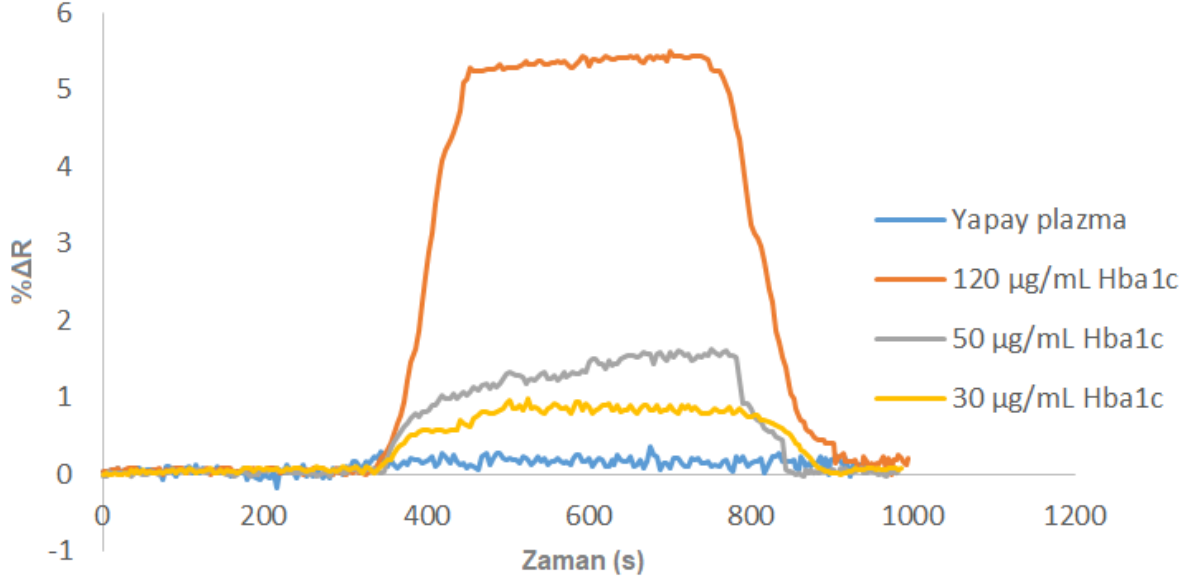
4.2.6. Yapay Plazma Çalışmaları

Boronik asit temelli yüzey plazmon rezonans sensörünün seçiciliğini belirleyebilmek için yapay plazma ile ölçümler alınmıştır. HbA1c'nin boronik aside gösterdiği cis-diol etkileşimine dayanan yüksek afinitenin plazmada bulunan IgG, HSA ve Hb için de aynı derecede bağlanıp bağlanmadığı görmek için ölçümler yapılmıştır. 120 µg/mL derişimde hazırlanan tüm örneklerin sensorgramı şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10: HbA1c'nin IgG, hemoglobinin ve insan serum albümine göre bağlanma sinyalinin karşılaştırılması.

Bu çalışmaların yanı sıra yapay plazmaya HbA1c eklemek suretiyle bir sensorgram daha elde edilmiştir. Yapay plazma örneğine 120 µg/mL, 50 µg/mL, 30 µg/mL derişimde olmak üzere HbA1c eklenmiştir. 30 µg/mL gibi normal tayin sınırlarının çok altındaki seyreltik çözeltilerde bile sinyal alınabilmiştir.



Şekil 4.11: Yapay plazmada 120 µg/mL, 50 µg/mL, 30 µg/mL derişimde HbA1c eklenerek alınan sensorgram.

Hazırlanan sensörün seçicilik katsayısının belirlenmesi için k denge sabitinin bulunması gerekmektedir. k denge sabiti eşitliği,

$$k = \frac{\Delta R_{\text{HbA1c}}}{\Delta R_{\text{yarişmacı}}} \quad (7)$$

formülünden bulunur. Bağlı seçicilik katsayısı (k') ise

$$k' = \frac{k_{\text{VPBA}}}{k_{\text{boş}}} \quad (8)$$

eşitliği ile elde edilebilir. Yapılan hesaplamalar sonucu Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi, boronik asit nanofilmlili sensör ile modifiye edilmemiş sensör arasındaki değerlerde büyük farklılıklar bulunmaktadır.

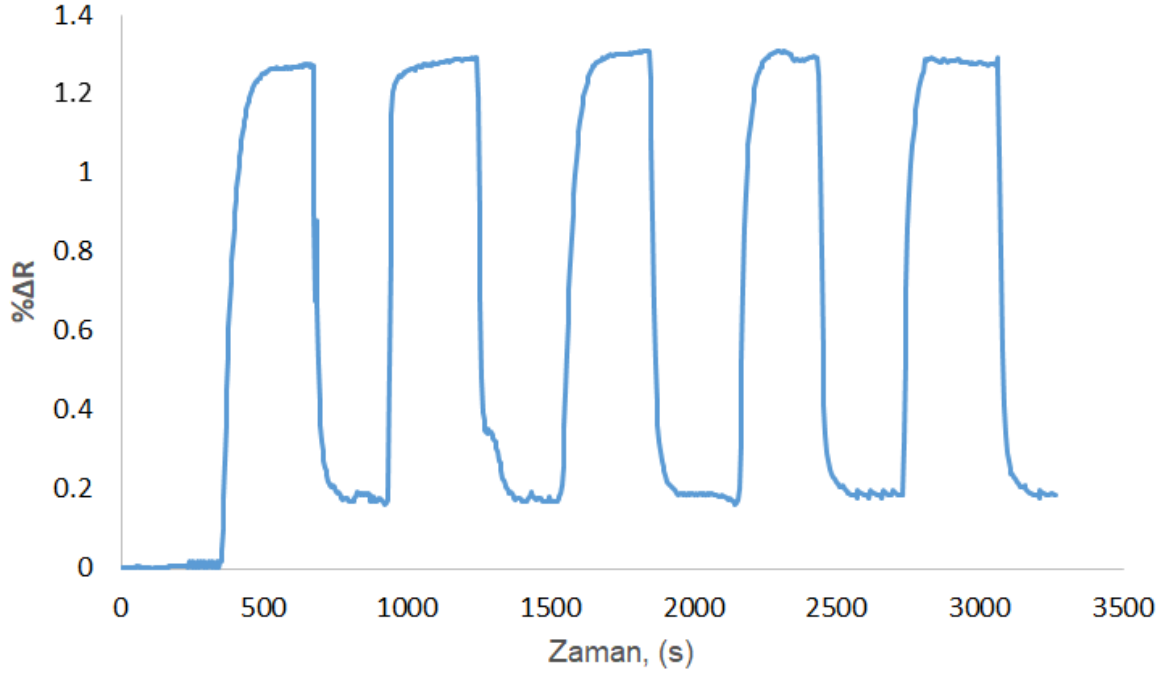
Çizelge 4.7: Vinil fenil boronik asit (VPBA) modifiyeli ve modifiyesiz sensörün IgG, insan serum albümin (HSA), hemoglobin ve HbA1c için karşılaştırmalı seçicilik katsayıları

VPBA Nanofilmlili SPR			VPBA Eklenmemiş SPR		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Hba1C	5.2		0.15		
IgG	0.7	7.3	0.11	1.3	5.4
HSA	0.3	17.3	0.1	1.5	11.6
Hb	0.2	34.6	0.1	1.5	23.1

VPBA nanofilmlili SPR için HbA1c sırasıyla, IgG'ye göre 7.324 kat, HSA'ya göre 17.333 kat, Hb'a göre 34.667 kat fazla seçicilik göstermektedir. Ayrıca modifiye edilmemiş çip ile ΔR karşılaştırmasına bakıldığı zaman 5.2/0.15 gibi ciddi bir fark görülmektedir ki bu nanofilmin HbA1c ile yüksek afinite göstererek başarılı bir şekilde bağlandığının kanıtıdır.

4.2.7. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışması

Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında sisteme 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimde pH 6.0 tamponunda HbA1c çözeltisi verilmiştir. Tampon sistemden geçirildikten sonra yaklaşık 5 dakika örnek verilmiş, desorpsiyon çözeltisi ise 3 dakika geçirildikten sonra aynı işlem 5 defa tekrarlanmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi tekrarlanan her örnekte neredeyse aynı ΔR değeri elde edilmiştir.



Şekil 4.12: VPBA temelli sensörün HbA1c ölçümündeki tekrarlanabilirlik sensogramı.

5. SONUÇ

Şeker hastalığı tayini ve erken teşhisi için hayati önlem taşıyan glikozillenmiş hemoglobinin (HbA1c), yüzey plazmon rezonans sensörüyle (SPR) tayin edilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Glukoz-boronik asit arasındaki cis-diol etkileşimlerin özgün ve kuvvetli olacağı öngörüldüğünden vinil fenil boronik asit (VPBA) bağlanmış nanofilm sentezlenmiş ve glikozillenmiş hemoglobin arasındaki ilişkisi deneyler ile gözlemlenmiştir. Sentezlenen film SPR çip yüzeyine uygulandıktan sonra FTIR, elipsometri ve temas açısı karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. FTIR'da gözlemlenmek istenen pikler alınmıştır. Temas açısı ve elipsometri sonuçları da yüzeyi tanıma, filmin kalınlığı ve dağılımı hakkında istenen sonuçları doğrulamıştır. Yapılan kinetik çalışmalarda derişim, pH etkisi, denge analizleri ve denge izotermi sonuçları analiz edilmiştir. Derişim artışıyla ΔR değeri artmış ve alınan grafiğe göre % 98.67 doğrusallıkta bağlanma olduğu hesaplanmıştır. Denge analizleri ve bağlanma analizleri ise bağlanmanın varsayıldığı gibi tek bir bölgeden güçlü bir şekilde olduğunu grafik sonuçları doğrultusunda göstermiştir. Denge izotermi hepsinde bağlanmayı doğrulayan sonuçlar alınmıştır. Özellikle Langmuir izotermi $\Delta R_{maks}=12.787$ değeri diğer izotermi bir adım önüne geçerek HbA1c bağlanmasının tek tabakalı ve homojen olduğu konusunda sensörümüzü ispatlamıştır. Yapay plazma çalışmalarında afinite gösterebileceği diğer moleküller arasından çok daha yüksek sinyal seviyesiyle ayrılmış ve seçiciliği kanıtlanmıştır. Yaptığımız çalışmada tayin limiti 2.86 olarak hesaplanmıştır. Bu değer diğer çalışmalarda hesaplanan limit değerlerinden yüksek olsa da kalibrasyon aşamasında yapılacak derişim ve cihaz değişiklikleri ile daha aşağıya çekilebilir. Ayrıca daha önceden vurgulanan klinik değerlerin çok altında ölçüm yapılabilmesi, yapılan çalışmanın geçerliliğini kanıtlamaktadır. Son olarak tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında tekrar eden 5 eşit deneyde nerdeyse aynı kuvvetle sinyal vererek tekrar kullanıma uygun bir sistem olduğunu göstermiştir. Kanda HbA1c normal plazma değerleri 117 mg/dL-141 mg/dL olarak literatürde yer almaktadır. Yapılan deneylerde 10-200 $\mu\text{g/mL}$ arası derişimlerde net ve kuvvetli sinyaller alındığı gösterildiğinden sistemin HbA1c molekülü tayinini istenen hassaslıkta yapabilir

olduğunu kanıtlamıştır. Boronik asit ve şeker arasındaki cis-diol etkileşimi ise teoride olduğu kadar uygulamada da başarılı sonuçlar vermiştir. HbA1c tayini için çalışılan enzimatik, immün, empedans, amperometrik ve voltametrik sensör sistemlerine alternatif olarak yüzey plazmon rezonans sensörlerinin de geliştirilebileceği veriler ile kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Tidy, Dr. Type 2 Diabetes | Signs, Symptoms And Treatment. *Patient.Info*, 2019, <https://patient.info/health/type-2-diabetes> (Erişim Tarihi: **28 Ocak 2019**).
- [2] Ozougwu, Ozougwu. The Pathogenesis And Pathophysiology Of Type 1 And Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal Of Physiology And Pathophysiology*, vol 4, no. 4, 2013, pp. 46-57. *Academic Journals*, **2013**.
- [3] Dagogo-Jack, S. Primary Prevention Of Cardiovascular Disease In Pre-Diabetes: The Glass Is Half Full And Half Empty. *Diabetes Care*, vol 28, no. 4, pp. 971-972. *American Diabetes Association*, **2005**.
- [4] Renz, Paula Breitenbach et al. HbA1c Test As A Tool In The Diagnosis Of Gestational Diabetes Mellitus. *PLOS ONE*, vol 10, no. 8. *Public Library Of Science (Plos)*, **2015**
- [5] Kennedy, L. and Baynes, J. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia*, 26(2), **1984**.
- [6] Allen, D., Schroeder, W. and Balog, J. Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. *Journal of the American Chemical Society*, 80(7), pp.1628-1634, **1958**.
- [7] Peacock, I. Glycosylated Haemoglobin: Measurement And Clinical Use. *Journal Of Clinical Pathology*, vol 37, no. 8, **1984**, pp. 841-851. *BMJ*, doi:10.1136/jcp.37.8.841.
- [8] Hinzmann, Rolf et al. "What Do We Need Beyond Hemoglobin A1c To Get The Complete Picture Of Glycemia In People With Diabetes?". *International Journal Of Medical Sciences*, vol 9, no. 8, **2012**, pp. 665-681. *Ivyspring International Publisher*.
- [9] Perutz, MF., Rossmann, MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G et al, 'Structure of h emoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by x-ray analysis', **1960**; 185: 416–422
- [10] Gebel, E., Association, AD, The start of something good: The discovery of HbA1c and the American diabetes association Samuel Rahbar outstanding discovery award, *Diabetes Care*, **2012**; 12: 2429–2431

- [11] Koenig RJ, Peterson, CM, Jones, RL, Saudek, C, Lehrman, M, Cerami A, 'Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus', *NewEngland Journal of Medicine*, **1976**; 295:417–420
- [12] Satman İ.: Diabetes mellitusun epidemiyolojisi, Ed: M Yenigün, M Altuntaş, Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, **2001**, s.69-84
- [13] Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care* **1995** Apr;18(4):440-447.
- [14] Wilf-Miron, Rachel et al. "The association between improved quality diabetes indicators, health outcomes and costs: towards constructing a "business case" for quality of diabetes care - a time series study". *BMC Endocrine Disorders* 14.1, **2014**.
- [15] Foundation, Mayo, Education, M. and Research HBA1C - clinical: HemoglobinA1c, <http://www.mayomedicallaboratories.com/test> (Erişim Tarihi: **28 Ocak 2019**)
- [16] Landgraf, R., The relationship of postprandial glucose to HbA1c, *Diabetes/metabolism research and reviews*. **2004**; 20: 1
- [17] Lippi G, Targher, G, Glycated hemoglobin (HbA1c): Old dogmas, a new perspective, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, **2010**; 48: 609–14
- [18] Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, Muskiet FA, van der Slik W. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. *Clin Chem*. **1995**;41(1):82–6.
- [19] Weykamp, Cas et al. "A Review Of The Challenge In Measuring Hemoglobin A1c". *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol 3, no. 3, **2009**, pp. 439-445.
- [20] John WG, Gray MR, Bates DL, Becham JL. Enzyme immunoassay: a new technique for estimating hemoglobin A1c. *Clin Chem* **1993**; 39(4):663–6.
- [21] Liu L, Hood S, Wang Y, Bezverkov R, Dou C, Datta A, Yuan C. Direct enzymatic assay for % HbA1c in human whole blood samples. *Clin Biochem*. **2008**; 41(7-8):576–83.
- [22] National Glycohemoglobin Standardization Program Protocol, <http://www.ngsp.org/prog/protocol/prot.html> (Erişim Tarihi: **19 Ekim 2008**).
- [23] European Reference Laboratory, <http://www.euroreflab.com> (Erişim Tarihi: **28 Ocak 2019**).

- [24] J.E. Pearson, A. Gill, P. Vadgama Analytical aspects of biosensors *Ann. Clin. Biochem.* 37 (**2000**), pp. 119-145.
- [25] Y Saylan, F Yilmaz, E Özgür, A Derazshamshir, H Yavuz, A Denizli "Molecular Imprinting Of Macromolecules For Sensor Applications." *Sensors* 17.4, **2017**.
- [26] G. Ertürk, and B. Mattiasson. "Molecular Imprinting Techniques Used For The Preparation Of Biosensors." *Sensors* 17.2, **2017**.
- [27] C.R. Lowe Analytical biotechnology *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7 (**1996**), pp. 1-3
- [28] L.J. Sokoll, D.W. Chan Clinical analyzers. *Immunoassay Anal. Chem.*, 71 (**1999**), pp. 356-362
- [29] Wang J. *Analytical Electrochemistry: 2nd ed.* Wiley & Sons Inc., **2000**.
- [30] Vetelino J, Reghu A. *Introduction to Sensors.* CRC Press, New York, **2011**.
- [31] Khalid, Mohammed. *Electrochemistry.* Intechopen, **2013**.
- [32] Dunn P. *Fundamentals of Sensors for Engineering and Science.* CRC Press, **2011**.
- [33] Michael A. C. Borland *LM Electrochemical Methods for Neuroscience.* CRC Press, Taylor & Francis, **2007**.
- [34] Dey D., Goswami T. Optical biosensors: a revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**.
- [35] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 54, no. 1, pp. 3–15, **1999**.
- [36] Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery.* 1(7); 515-528, **2002**.
- [37] B. Sepúlveda, A. Calle, L. Lechuga, and G. Armelles, "Highly sensitive detection of biomolecules with the magneto-optic surface-plasmon-resonance sensor," *Optics Letters*, vol. 31, no. 8, pp. 1085–1087, **2006**.
- [38] J. Homola, "Present and future of surface plasmon resonance biosensors," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, no. 3, pp. 528–539, **2003**.
- [39] Fillion C. S. "Surface Plasmon Resonance Biosensor For The Measurement Of Complex Refractive Indices And The Monitoring Of Bacterial Cell Growth". McGill University, **2016**.
- [40] Chen X, Schauder S, Potier N, Dorsseleer AV, Pelczer I, Bassler BL, Hughson FM Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415: 545-549, **2002**.

- [41] Ferrier R.J., Prasad R. Boric Acid Derivatives as Reagents in Carbohydrate Chemistry. 6. Phenylboronic Acid as a Protecting Group in Disaccharide Synthesis. *J. Chem. Soc.* **1965**.
- [42] Lowry T.M. Optical Rotary Power. London, New York: Dover Publishers Inc., **1964**.
- [43] Pappin, Brighid et al. Boron-Carbohydrate Interactions. Intechopen, **2012**.
- [44] Hsieh, K.M.; Lan, K.C.; Hu, W.L.; Chen, M.K.; Jang, L.S.; Wang, M.H. Glycated hemoglobin (HbA1c) affinity biosensors with ring-shaped interdigital electrodes on impedance measurement. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 49, 450–456
- [45] Boonyasit, Y., Laiwattanapaisal, W., Chailapakul, O., Emneus, J., Heiskanen, A.R. Boronate-modified interdigitated electrode array for selective impedance-based sensing of glycated hemoglobin. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 9582–9589
- [46] Boonyasit, Y.; Chailapakul, O.; Laiwattanapaisal, W. A multiplexed three-dimensional paper-based electrochemical impedance device for simultaneous label-free affinity sensing of total and glycated haemoglobin: The potential of using a specific single-frequency value for analysis. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 936, 1–11
- [47] Kim, D.M.; Shim, Y.B. Disposable amperometric glycated hemoglobin sensor for the finger prick blood test. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 6536–6543
- [48] Zhou, Y.; Dong, H.; Liu, L.; Hao, Y.; Chang, Z.; Xu, M. Fabrication of electrochemical interface based on boronic acid-modified pyrroloquinoline quinine/reduced graphene oxide composites for voltammetric determination of glycated hemoglobin. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 64, 442–448
- [49] Bakhshpour, Monireh et al. "Microcontact Imprinted Quartz Crystal Microbalance Nanosensor For Protein C Recognition". *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, vol 151, 2017, pp. 264-270. *Elsevier BV*, **2016**
- [50] P. M. Barros, I. V. P. Yoshida, and M. A. Schiavon, *J. Non. Cryst. Solids.* 352, 3444, **2006**.
- [51] Ertürk G, Uzun L, Tümer MA, Say R, Denizli A. "Fab Fragments Imprinted SPR Biosensor For Real-Time Human Immunoglobulin G Detection". *Biosensors And Bioelectronics*, vol 28, no. 1, 2011, pp. 97-104. *Elsevier BV*, **2011**.
- [52] Y. Saylan, N. Bereli, L. Uzun, A. Denizli, "Monolithic Boronate Affinity Columns For IgG Separation". *Separation Science and Technology*, vol 49, no. 10, **2014**, pp. 1555-1565.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 1/02/2019

Tez Başlığı / ~~Konusu~~: Glikozillenmiş Protein Tayini için Boronat Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler
Yukarıda başlığı/~~konusu~~ gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 56 sayfalık kısmına ilişkin, 31/01/2019 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Merve Çalışır
Öğrenci No: N16120445
Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

31.01.2019

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Merve ÇALIŞIR
Doğum yeri : Ankara
Doğum tarihi : 28.04.1989
Medeni hali : Evli
E-posta : mervecalisir@hacettepe.edu.tr
Adres : Ahlatlıbel Mah. 1844. Cad. No:179 Çankaya/Ankara

Eğitim

Lise : Gazi Üniversitesi Vakfı Özel Fen Lisesi.
Lisans : Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü .
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde
Almanca : Giriş düzeyinde

İş Deneyimi

2018- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

Deneyim Alanları

Afinite kromatografisi, sensörler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

