

**İNVAZİV MEME KANSERİ HÜCRESİ TAYİNİ İÇİN KUVARS
KRİSTAL MİKROTERAZİ SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE
SENSORS FOR DIAGNOSIS OF INVASIVE BREAST
CANCER CELL**

SEDA ATAY

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

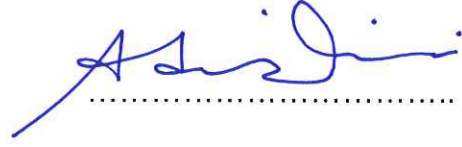
Olarak hazırlanmıştır.

2014

SEDA ATAY'in hazırladığı "İnvaziv Meme Kanseri Hücreleri Tayini İçin Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörlerin Hazırlanması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan



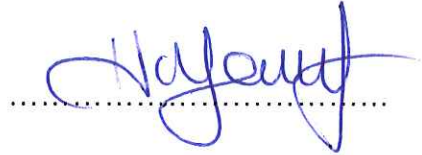
Prof. Dr. M. Aşkın TÜMER

Üye



Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Üye (Danışman)



Prof. Dr. Serap Şenel

Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz

Üye



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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tez çalışmam sırasında kaybettiğim çok sevdiğim canım

Dedem'e...

ETİK

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar 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.

02/09/2014

Seda ATAY

ÖZET

İNVASİV MEME KANSERİ HÜCRESİ TAYİNİ İÇİN KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

SEDA ATAY

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Eylül 2014, x sayfa

Yapılan çalışmanın amacı yüksek oranda invaziv insan meme kanseri hücreleri tayinine yönelik kuvars kristal mikroterazi sensör hazırlanmasıdır. Sensörün seçiciliği için meme kanseri hücreleri yüzeyindeki aşırı eksprese olmuş transferrin reseptörü ile transferrin etkileşiminden faydalanılmıştır. QCM biyosensör, QCM çipin altın yüzeyine tutturulan Poly(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) partiküllerin transferrin ile modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Nanopartiküller etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'nin miniemülsiyon polimerizasyon reaksiyonu ile hazırlanmıştır. Nanopartiküller zeta boyut analizi ile karakterize edilmiştir. Daha sonra hazırlanan nanopartiküller, az miktarda nanopartikül çözeltisinin altın yüzeye damlatılmasıyla ve sonra 37°C'da 6 saat kurutulmasıyla tutturulmuştur. QCM çipin yüzeyine yerleştirilen

p(HEMA) partiküller transferrin ile modifiye edilmiştir. Bunun için, aktivasyon ajanı olarak karbodiimit kullanılmıştır. pH' sı 7.4'e ayarlanmış fosfat tamponu içine yüzeyinde p(HEMA) partikül bulunan çip, karbodiimit ve transferrin konulmuştur. QCM çip yüzeyindeki p(HEMA) partiküllerin transferrin ile modifiye olması için 24 saat çalkalamalı etüvde, oda sıcaklığında bekletilmiştir. Transferrinsiz QCM sensör hazırlanırken p(HEMA) partiküller modifiye edilmemiştir. Hazırlanan QCM sensörler atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, FTIR-ATR ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri ve AFM görüntüleri, nanopartiküllerden oluşan ince filmlerin hemen hemen tek tabakalı olduğunu göstermektedir. Karakterizasyon çalışmaları ardından hazırlanan transferrinli ve transferrinsiz sensörler QCM sistemine bağlanarak yüksek oranda invaziv meme kanseri hücrelerine ait kinetik ve afinite bağlanma çalışmaları yapılmıştır. Adsorbsiyon kinetikleri farklı derişimlerdeki insan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 'den hazırlanan hücre çözeltilisinin QCM sisteminden geçirilmesi ile belirlenmiştir. Langmuir- Freundlich adsorbsiyon modeli, bu afinite sistemi için en uygun model olarak bulunmuştur. Transferrin modifiyeli sensörün seçiciliğini göstermek için insan meme kanseri hücre hatlarından olan MDA-MB-231(Yüksek oranda invaziv), MCF-7 (daha az oranda invaziv) ve serum ve medyumdan yoksun bırakılmış MDA-MB-231 (hücre yüzey yapısı bozulmuş) hücrelerinin yarışmalı adsorbsiyonu araştırılmıştır. Sonuçlar sensörün, yüksek oranda invaziv olan MDA-MB-231 hücre soyu için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, MDA-MB-231, MCF-7, invaziv meme kanseri, kuvars kristal mikroterazi

ABSTRACT

PREPARATION OF QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE SENSORS FOR DIAGNOSIS OF INVASIVE BREAST CANCER CELL

SEDA ATAY

**Master of Science, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

September 2014,106 pages

The aim of this study is to prepare a quartz crystal microbalance (QCM) biosensor for the detection of high-invasive breast cancer cells. For the selectivity of the sensor, the interaction between transferrin receptors overexpressed on the surface of breast cancer cells and transferrin was used. The QCM biosensor was prepared by modifying poly(HEMA) particles which, along with transferrin, attached on the gold surface of the QCM sensor. In the first step, nanoparticles were prepared by a miniemulsion polymerization reaction of 2-hydroxyethyl methacrylate HEMA and ethylene glycol dimethacrylate (EGMA). The nanoparticles were characterized by zeta-sizer measurements. After that, the nanoparticles were immobilized by dropping a small amount of nanoparticle solution onto the gold surface and then drying at 37 C° for 6 hours. P(HEMA) particles which attached on the surface of the QCM sensor were modified with transferrin. Carbodiimide was used as an activation agent for modification. For the modification of p(HEMA) particles that attached on the surface of the sensor

with transferrin, a QCM chip with p(HEMA) particles, transferrin and carbodiimide were put into pH 7.4 phosphate buffer solution and kept in an agitated incubator, at room temperature for 24 hours. When preparing the QCM sensor without transferrin, p(HEMA) particles were unmodified. The prepared QCM sensor was characterized with atomic force microscopy (AFM), ellipsometer, fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR) and contact angle measurement. The thickness measurement and AFM observation indicated that the nanoparticle thin films were almost monolayer. After the characterization studies, the sensors with and without transferrin were connected to a QCM system to carry out kinetic and affinity studies on the high-invasive breast cancer cells. A cell solution of human breast cancer cell line MDA-MB-231 with different concentrations were applied to the QCM system to determine the adsorption kinetics. The Langmuir-Freundlich adsorption model was found as the most suitable model for this affinity system. In order to show the selectivity of the modified sensor with transferrin, competitive adsorption of MDA-MB-231 (high invasive), MCF-7 (low invasive) and serum and medium starved MDA-MB-231 was investigated. The results showed that the nanosensor with transferrin had high selectivity and sensitivity for cells which belong to high invasive human breast cancer cell line MDA-MB-231.

Key Words: Breast cancer, MDA-MB-231, MCF-7, invasive breast cancer, quartz crystal microbalance

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamı yaparken engin bilgi ve tecrübesine hayranlık duyduğum, sorunlarımı çözmemde bana her zaman yardımcı, akademik hayata attığım ilk adımda yanımda olan, bioreg araştırma grubunun bir üyesi olmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye

Her zaman varlığını yanımda hissettiğim, bana olan güveni ve inancı hiç tükenmeyen, beni her daim destekleyen, lisans dönemimden beri engin bilgi ve zekasına hayranlık duyduğum, çok sevdiğim ve saygı duyduğum, değerli hocam Prof.Dr. Aşkın Tümer'e

Tez çalışmamı yaparken bilgisini ve yardımlarını hiç eksik etmeyen, sorunlarımı çözmemde hep yanımda olan, danışmanım olmasından mutluluk duyduğum, bana gösterdiği içtenlikten ve ilgisinden dolayı hocam Prof.Dr.Handan Yavuz Alagöz'e

Bu tez çalışmasının plan aşamasında tanıştığım ve iyiki tanıdım dediğim, fikir ve bilgilerini benden esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Kevser Özden 'e

Deneylem ve çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan, çalışmamın her aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen, sorunlarımı çözmemde içten ve benimseyerek her zaman yanımda olan, bu çalışmamı tamamlamamda bana olan inancından ve desteğinden dolayı, hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a

Teorik bilgi ve desteklerini esirgemeyen Doç.Dr. Lokman Uzun 'a

Tez çalışmam boyu bana destek olan arkadaşlarım Gülsu Şener, Emel Tamahkar, Esmâ Sari, Lale Bağmanlı, Çiğdem Çiçek, Recep Üzek, Canan Armutcu, Bahar Ergün, Sevgi Aslıyüce Çoban, Mehmet Emin Çorman, Nilay Bereli, Ali Derazshamsir, Kemal Çetin, Fatma Kartal, Mine Dursun, Sabina Hüseyinli, Gizem Ertürk, Yeşeren Saylan, Duygu Çimen, Aykut Arif Topçu, Semra Akgönüllü, Ilgım Göktürk, Dilara Saçlıgil, Monir Bapour, Erdoğan Özgür'e

Bana sonsuz destek ve inancıyla yanımda olan, benden çok bana inanan, destekleriyle beni her zaman cesaretlendiren, varlığı beni mutlu eden canım'a, daima yanımda olan canım aileme; annem, babam ve her şeylerim kardeşlerime, sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	Error! Bookmark not defined. 3
2.1. Kanserin Biyokimyası	3
2.2. Meme Kanseri.....	5
2.2.1. Meme Kanserine Yakalanmada Etkili Olan Risk Faktörleri	6
2.2.2 Meme Kanserinin Biyolojisi	8
2.2.3 Meme Kanserinin Sınıflandırılması	9
2.2.4 Meme Kanserinin Belirtileri	10
2.2.5 Meme Kanserinde Prognostik Faktörler.....	12
2.2.6 Meme Kanseri Tümör Belirteçleri.....	13
2.3 Kanser hücresi ve demir metabolizması	16
2.3.1 Vücut içi demir döngüsü.....	16
2.3.2 Demirin hücreler tarafından alınması	18
2.3.3. Transferrin-Transferrin Reseptör Kompleksi	19
2.3.3.1. Transferrin	19
2.3.3.2 Transferrin reseptörü	20
2.3.3.3. Transferrin-reseptör kompleksi	20
2.3.4. Transferrin reseptörü sentezinin kontrolü	21
2.3.4.1. Kanser hücresinde transferrin reseptörü.....	23
2.4. Biyosensörler	24
2.4.1 Piezoelektrik Kristalli Biyosensörler (Kütle Duyarlı Biyosensörler)....	28
2.4.1.1. Piezoelektrik etki.....	28
2.4.1.2. Ters piezoelektrik Etki.....	30

2.4.2. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)	31
3. DENEYSEL YÖNTEMLER	34
3.1 Kimyasal Maddeler	34
3.2. Hücrelerin Hazırlanması	34
3.3. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Yüzeyine Tutturulmuş P(HEMA) Nanopartiküllerin Transferrin ile Modifiye Edilmesi	35
3.3.1. Poli(HEMA) Nanopartiküllerin Hazırlanması	35
3.3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	36
3.3.2.1. Zeta Boyut Analizi	36
3.4. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörler	Error! Bookmark not defined.
3.4.1. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Yüzeyine Nanopartiküllerin Tutturulması	Error! Bookmark not defined.
3.4.2. Nanopartikül ile Kaplanmış Sensör Yüzeyinin Transferrin ile Modifiye Edilmesi	Error! Bookmark not defined.
3.4.3. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörlerin Karakterizasyonu	38
3.4.3.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi	38
3.4.3.2. Elipsometre	38
3.4.3.3. Temas Açısı Ölçümleri	39
3.4.3.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	39
3.4.4. QCM Sensörle Kinetik Analizler	39
3.4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler	40
3.4.6. İnvaziv Meme Kanseri Hücrelerinin Transferrin ile Modifiye Edilmiş Nanosensöre olan Seçiciliğinin Belirlenmesi	41
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	42
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	42
4.1.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi	42
4.2. Nanosensörün Yüzey Karakterizasyonu	43
4.2.1. Nanosensör yüzeyindeki p(HEMA) partiküllere transferrin tutturulması ve sensörün FTIR-ATR Analizi	43
4.2.2. Elipsometre Analizi	46
4.2.3. Temas Açısı Ölçümleri	48
4.2.4. Atomik Kuvvet Mikroskopu Analizi	50

4.3. QCM Nanosensörlerle Kinetik Analizler	54
4.4. Denge İzoterm Modelleri.....	64
4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler	66
4.6 Nanosensörün Seçiciliğinin Belirlenmesi	68
5. YORUM	71
6. Kaynaklar.....	74
7.Özgeçmiş.....	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Meme kanseri gelişim basamakları.....	8
Şekil 2.2. Demir metazbolizması.	17
Şekil 2.3. Hücre içine demir alınması şematik gösterimi.	19
Şekil 2.4. a)Transferrinin kristal yapısı b)Transferrin demir bağlama bölgesi	20
Şekil 2.5. a) Transferrinin C- lobunun reseptörün alfa 1, 2 ve 3 ile etkileşimi b) N- lobun proteaz benzeri domain ve alfa 1, 2 ile etkileşimi c) Transferrin reseptörü ile transferrin kompleksi.....	21
Şekil 2.6. a) Düşük demir yoğunluğunda (Iron Responsive Elements)(IREs) ile IRP-1 ve IRP-2 birbirine bağlanır b) Yüksek demir yoğunluğunda ise IRP-1 ve IRP-2 ile IREs bağlanamaz.....	23
Şekil 2.7. Biyosensörlerin çalışma prensibi.	25
Şekil 2.8. Biyoreseptörlerin şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.9. Piezoelektrik Etki	28
Şekil 2.10. a)Kuars kristalinin yapısı mineral yapısı b) AT-Kesim ve BT-Kesim kuvars kristal düzlemleri	29
Şekil 2.11. Piezoelektrik bir kristalin yapısal simetri merkezi.....	30
Şekil 2.12. QCM için kullanılan kuvars elektrot	31
Şekil 3. 1. QCM sensör yüzeyine partiküllerin tutturulması	37
Şekil 3. 2. Deneylerde kullanılan Maxtek marka QCM sistemi	40
Şekil 4.1. p(HEMA) partiküllerin zeta boyut analizi.....	42
Şekil 4.2. p(HEMA) partikülün molekül formülü	43
Şekil 4.3. QCM sensör yüzeyine tutunmuş p(HEMA) partiküllerin transferrin ile modifikasyonunun molekül formülü	44
Şekil 4.4. Yüzeyine p(HEMA) nanopartiküllerin tutturulduğu QCM sensörüne ait FTIR-ATR spektrumu	45
Şekil 4.5. Yüzeyindeki p(HEMA) partikülleri transferrin ile modifiye edilen QCM sensörüne ait FTIR-ATR spektrumu.....	46
Şekil 4.6. Transferrin modifiyeli QCM sensörün 3B elipsometre görüntüsü.....	47

Şekil 4.7. Transferrin ile modifiye edilmemiş QCM sensörün 3B elipsometre görüntüsü.....	47
Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.....	49
Şekil 4. 9. Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensör.....	49
Şekil 4. 10. Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensör.....	50
Şekil 4.11. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.....	51
Şekil 4. 12. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.....	51
Şekil 4. 13. Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü	52
Şekil 4. 14. Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.....	52
Şekil 4. 15. Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.....	53
Şekil 4. 16. Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.....	53
Şekil 4. 1. MDA-MB-231 meme kanseri hücre çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgramlar. (a) 500 hücre/ml (b) 1000 hücre/ml (c) 5000 hücre/ml (d) 25.000 hücre/ml (e) 75.000 hücre/ml (f) 100.000 hücre/ml (g) 125.000 hücre/ml	56
Şekil 4. 18. MDA-MB-231 meme kanseri hücre çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgramlar (a) 500 hücre/ml (b) 1000 hücre/ml (c) 5000 hücre/ml (d) 25.000 hücre/ml (e) 75.000 hücre/ml (f) 100.000 hücre/ml (g) 125.000 hücre/ml.....	59
Şekil 4. 19. MDA-MB-231 meme kanseri hücre çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgram.....	60

Şekil 4. 20. Yüzeyine transferrin ile modifiye edilmiş p(HEMA) partiküllerin tutturulduğu QCM sensörden geçirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücresine ait derişim ($C_{\text{hücre}}$) ile Δm arasındaki ilişki.....	60
Şekil 4. 21. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scarthard) (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.....	63
Şekil 4. 22. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.....	65
Şekil 4. 23. 75.000 hücre/ml derişimde (a) MDA-MB-231 (b) MCF-7 (c) 2 gün tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltileri ile transferrin modifiyeli p(HEMA) partiküllü QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlardır.....	68
Şekil 4. 2. 75.000 hücre/ml derişimlerde (a) MDA-MB-231 (b) MCF-7(c) 2 gün tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltilerinin transferrinsiz QCM sensörü arasındaki etkileşime ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlar..	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Meme kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması	10
Çizelge 4. 1. Temas açısı sonuçları	48
Çizelge 4. 2. Atomik kuvvet mikroskop sonuçları	50
Çizelge 4. 1. Kinetik hız sabitleri.....	62
Çizelge 4. 4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.....	66
Çizelge 4.5. MDA-MB-231 hücre hattının MCF-7 ve bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltilerine göre seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	70

1.GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık tanı konulan kanserdir ve kanser nedenli ölümlerde meme kanseri (% 15) akciğerden (% 26) sonra 2. sırada yer almaktadır [1]. 2008 yılında, dünyada yaklaşık 1.38 milyon kadına meme kanseri tanısı konulduğu ve bu hastaların üçte birinin (460.000 kişi) öldüğü bilinmektedir [2].

Avrupa'da yılda 180.000, ABD'de yılda 211.000 yeni olgu saptanmaktadır [3]. Ülkemizde en güncel meme kanseri istatistiği 2005 yılında sağlık bakanlığı tarafından yapılmıştır ve bu istatistiklere göre meme kanseri %35.47'lik oranla ülkemiz kadınları arasında en yaygın görülen kanser tipidir. Meme kanseri, tüm jinekolojik tümörlerden 3 kat daha yaygındır. Günümüzde meme kanserinin oluş nedeni tam olarak bilinmemektedir. Erkeklerde kadınlar kadar sık olmasada görülme sıklığı vardır. Her meme kanseri olan 100 kadına karşılık 1 erkekte de aynı hastalık oluşmaktadır [4]. Dünya çapında ölüm oranı bu kadar yüksek olan meme kanserinin erken aşamada tanısının konulabilmesi, tedavi sürecinin biran önce başlatılabilmesi için oldukça önemlidir.

Günümüzde meme kanseri tanısı için erken tanı uygulamalarına baktığımızda, kendi kendine muayene, doktor muayenesi, ultrasonografi, mamagrofi, MRI ve diğer radyoaktif işaretleyicilerin kullanıldığı görüntüleme sistemleri kullanılmaktadır [5]. Ancak kullanılan bu görüntüleme yöntemlerinin hiçbirisi tümörün benign ya da malign olduğu hakkında bilgi sağlamaz ve kesin tanı konulamaz. Çeşitli klinik testler; sitolojik, patolojik, kan testleri ile birlikte kesin tanı konulabilir. Bu yüzden klinik öncesi test çalışmalarında yüksek hassasiyet ile kanser hücrelerinin saptanması için hızlı ve basit tekniklerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır [6]. Çünkü geleneksel yöntemler genellikle uzun ve karmaşık prosesler, karmaşık enstrümantasyon gerektirir ve kullanılan malzemeler yüksek maliyet içerebilir. Bu nedenle kanser hücre tespiti için yeterli duyarlılığa sahip uygun bir yöntemin geliştirilmesi toplum için bir ihtiyaçtır [7-8].

Kanserli bir hücrenin en önemli özelliği sürekli bölünme ve çoğalma eğiliminde olmasıdır. Hücrelerin bölünüp yeni bir hücre oluşturabilmesi için ihtiyaç duyduğu başlıca elementlerden biri de demirdir. Demir bölünme ve çoğalma için hücre içeriğindeki birçok enzim ve proteinin yapısına katılır [9].

Vücut içi sirkülasyonda transferrine bağlı olarak taşınan demir hücre içine transferrin reseptörü ile alınır. Kanserli bir hücrede bölünme için sürekli aktif olan bir hücredir. Yüksek oranda yayılma eğiliminde olan kötü huylu tümörlerin ise daha aktif olduğu düşünülürse demire olan ihtiyaçlarının artması ve bundan dolayı da hücre yüzeyindeki demiri hücre içine alan transferrin reseptörü sayısının artmasını bekleriz [10].

Yapılan çalışmalar da gösteriyor ki hücre yüzeyi transferrin reseptörleri karsinomalarda, sarkomalarda, lösemi ve lenfomalarda çok yaygın olarak tespit edilebilmektedir [11]. Bu reseptörlerin hem normal hem de neoplastik hücrelerde, hücre çoğalması ile ilgili olmasından dolayı, içinde meme kanserinin de bulunduğu, birçok kanserin izlenmesinde kullanılması oldukça fayda sağlayabilecektir [12]. Özellikle yüksek metastazik özellik gösteren kötü huylu meme kanseri hücreleri yüksek oranda transferrin reseptörü sentezlerken, iyi huylu ve normal meme hücrelerinde daha az oranda transferrin reseptör sentezi saptanmıştır [13].

Meme kanserinde yüksek oranda invaziv olan türlerinin başka doku ve organlara sıçrayarak yayılması meme kanseri ölümlerinin başlıca nedenidir. Bu yüzden doğru, hızlı ve basit bir şekilde yüksek oranda yayılma özelliğindeki malign kanser hücrelerinin erken aşamada tanısının konulması oldukça önemlidir [14].

Yapılan bu tez çalışmasında yüksek oranda invaziv olan insan meme kanseri hücrelerinin tayini için transferrin ile modifiye edilmiş kuvars kristal mikroterazi sensörlerin hazırlanması amaçlanmıştır. QCM sensörler basitliği, uygulanabilirliği, düşük fiyatı ve eş zamanlı ölçüm gerçekleştirebilme özelliğine sahiptir. QCM sensörlerin tekniği, kuvars kristale bağlı elektrotlardan elektrik akımı geçirilerek oluşturulan titreşim frekansının, yüzeye bağlanan herhangi bir analitle kütledeki artışın frekansın değişmesiyle ölçülmesidir. QCM sensör yüzeyine tutturulan p(HEMA) nanopartiküllerin yüzeyinin, transferrin ile modifiye edilerek yüksek oranda invaziv olan insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 'in yüksek hassasiyetli ve seçimli tayininin sağlanması çalışmanın temel amacıdır. p(HEMA) partiküller ise yüzey alanını arttırmak için kullanılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KANSERİN BİYOKİMYASI

Kanser, tek bir hücredeki çoklu moleküler işlemlerin etkileşiminden kaynaklanan kompleks bir hastalık olup hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengenin kontrolsüz bir şekilde gerçekleşmesi ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Buldukları dokudan diğer dokulara yayılmasıyla karakteristik bir hastalık. 100 den fazla kanser çeşidi tanımlanmış olmakla birlikte her kanser, orjinlendiği dokuya ve bireye göre farklı karakteristik özellik gösterir. Epitelyal hücrelerinden köken alanlar “karsinom”, mezoderm hücrelerinden (kemik, kas gibi) köken alanlar “sarkom”, meme hücreleri gibi salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise “adenokarsinom” olarak isimlendirilir. Tümörler, iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) tümör olarak köken aldığı hücre, doku ve organ özelliklerine göre adlandırılır. İyi huylu tümörler (benign) ölümcül değildirler. Herhangi bir dokuda oluşabilirler. Çevrelerindeki dokulardan bir zar ile izole durumda oldukları için çevre dokularda yayılım göstermezler ve metastaz yapma yetenekleri yoktur. Kötü huylu tümörler (malign) ise kanser olarak adlandırılır, invazyon ve kan damarları ya da lenf damarları aracılığı ile uzaktaki dokulara metastaz yapma yeteneklerinden dolayı organizmanın ölümüne sebep olurlar [15].

Kanserli bir hücrede genlerin ekspresyon (ifade) kalıplarında değişimler olur ve metastaz yapma özelliği gösterirler. Normal bir hücredeki bölünme ve farklılaşma mekanizmalarındaki bilgi, sinyal ve enerji akışlarındaki bozulmalar kansere yol açar. Kanser başladığı hücrede gerçekleşen bir diğer olay ise hücrelerin çoğalma ve apoptozise gitmesini (programlı hücre ölümünü) gerçekleştiren denge mekanizmalarının (apoptotik ve antiapoptotik mekanizmaların) düzeninin bozulmasıdır.

Normal bir dokuda hücre çoğalması ile apoptozise bağlı hücre kayıpları arasında uyumlu bir denge varken, kanserli bir doku hücresinde genetik bilginin kontrol mekanizmalarında gerçekleşen farklılaşmalardan dolayı gen ekspresyonlarında anormallikler buna bağlı DNA'nın yapısında değişiklikler gözlenir. Genetik bilgideki tüm bu değişiklikler, hücre çoğalmasının ve/veya apoptozisinin işleyişinin

bozulmasına, apoptozisten kaçan tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına sebep olur [16].

Farklı moleküler mekanizmalardaki düzensizlikler her hücre tipinde kansere yol açar. Hanahan ve Weinberg 2000 yılında kanser hücresinin karakteristik özelliklerini şu şekilde tanımlamışlardır:

1) Dışardan gelen çoğalma sinyaline bağımlı olmadan bölünme özelliği kazanmaları;
- Kanser hücreleri çoğalma sinyallerine ihtiyaç duymaksızın bölünme potansiyeli kazanırlar.
- Hücrede oluşan mutasyonlar hücrenin çoğalmayı aktive edici yollarında görev alan moleküllerin fonksiyonunu etkileyerek kontrolsüz çoğalmaya sebep olur.

2) Çoğalma sinyallerinin inhibisyonunu sağlayan yollardaki moleküllerde oluşan mutasyonlar ise;

-Çoğalma sinyallerinin kesintisiz devam etmesine dolayısıyla sürekli bölünmeye neden olur.

3) Apoptozisten (Programlı hücre ölümü) kaçabilmeleri;

- Kanser hücreleri apoptotik sinyallere duyarsızlaşırlar.
- Apoptozis mekanizmasını düzenleyen yollardaki moleküllerde oluşan mutasyonlar kanser hücrelerini apoptotik sinyallere karşı duyarsız hale getirir.

4) Limitsiz bölünme potansiyeli kazanmaları;

- Kanser hücrelerinde, bölünmeye paralel olarak telomerlerin kısalması söz konusu olmadığından bölünme özellikleri devam eder.
- Telomerlerin uzunluğunun düzenlenmesini kontrol eden mekanizmaları bozan değişimler, kanser hücrelerine sınırsız bölünme potansiyeli kazandırır.

5) Yeni kan damarlarının oluşumu (Anjiyogenez);

- Kanser hücreleri, artan besin ve oksijen ihtiyaçlarını yeni kan damarları oluşturarak sağlarlar.

6) İnvazyon ve metastaz yapmaları;

- Kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine göçü, vücudun genel homeostazısını bozarak ölüme yol açar.

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık rastlanan malignitedir ve kanserden ölüm sebepleri arasında önemli bir yer tutmaktadır [17].

Memede salgı yapan hücreler tarafından oluşturulan lobüllerin birleşmesiyle loblar oluşur. Lobüller birbirlerine süt kanalları ile bağlanır ve bu süt kanalları da meme başına doğru birleşirler. Meme kanseri, lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle gelişmektedir [18].

Genel olarak süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir. Bugünkü bilgilere göre meme kanseri (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epiteli, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri gelişir. Başlangıçta süt aktaran kanal sistemi (duktus) içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçerler. Bu aşamada tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karşılaşarak metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar. Bir gram meme kanseri dokusunun ortalama sekiz yılda geliştiği tahmin edilmektedir. Ancak bu tüm tümörler için geçerli olmayabilir [19].

Meme kanseri heterojen bir hastalıktır ve meme epitelinden kaynaklanan kötü huylu tümörlerdir. Meme kanseri dünyada yıllık 1 milyon yeni tanı ve yaklaşık 373.000 ölüm vakasıyla kadınlarda en önemli kanser nedenleri arasındadır.(1). Kadınlarda yaşam boyu gelişme riski 1/12 ile 1/20 arasında değişmektedir (2).Deri kanserleri hariç, meme kanseri kadınlarda en sık tanı konulan kanserdir ve kanser nedenli ölümlerde meme kanseri (% 15) akciğerden (% 26) sonra 2. sırada yer almaktadır (3) [20].

Meme kanserinin görülme sıklığı, son yıllarda giderek artmıştır. Bu artışın ekzojen hormonlar, mensturasyon durumu (erken menarş, geç menopoz), kilo, beslenme biçimi ve alkol tüketimi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [21].

2.2.1. Meme Kanserine Yakalanmada Etkili Olan Risk Faktörleri

Meme kanserinin halen yeni bilgilerin ortaya çıktığı ve gelişmelerin yaşandığı oldukça geniş bir alan olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekte, tüm dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmekte ve bu özelliklere de kısaca "risk faktörü" adı verilmektedir [22].

Birçok risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına göre, görülme sıklığı da farklılık göstermektedir [23].

Kadınlarda meme kanseri görülme riskini yükselten bu faktörler de şu şekilde sıralanmaktadır [24].

1.Yaş: Meme kanseri tanısı konan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, %70 'inin yaşının 50 yaş ve üzerinde olduğu ifade edilmekte ve yaşı 50 yaş ve üzerinde olan kadınların meme kanseri görülme sıklığının, yaşı 50 yaşın altında olan kadınlara nazaran 4 kat daha fazla olduğunun altı çizilmektedir [25].

2.Kişisel Meme Kanseri Hikayesi: Daha önce meme kanseri geçiren ve tedavi olan kadınların, diğer memelerinde kanser gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir [26].

3.Fertil Çağ Süresi: Kadınların adet görmeye erken yaşta başlamaları, bununla birlikte ilerleyen yaşlarda menopoza girilmesi fertil çağı uzatmaktadır. Bu sırada kadının daha uzun süre östrojen hormonu etkisi altında kaldığı bunun da meme kanseri gelişme riskini yükselttiğine işaret edilmektedir [27].

4.Ailede Meme Kanseri Hikayesi: Aile bireyleri arasında meme kanserine yakalanmış kimse bulunmasının, kadınların meme kanserine yakalanma olasılığını yükselttiği ifade edilmektedir. Özellikle kız kardeşi veya annesi meme kanserine yakalanan bir

kadının, meme kanserine yakalanma riski, diğer kadınlara nazaran 2 ila 5 kat oranında daha fazladır [28].

5. Doğurganlık Hikayesi: Kadınların ilk çocuğunu doğurma yaşı meme kanserine yakalanma açısından önemlidir. İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanseri görülme oranı 20 yaşından önce doğuranlara göre 2 kat daha fazladır. Hiç çocuk doğurmayan kadınlarda ise risk daha da yükselmektedir [29].

6. Sosyo-ekonomik Seviyenin Yüksekliği: Varlıklı ve sosyo-ekonomik düzeyi yüksek olan kadınlarda, meme kanseri görülme sıklığının daha fazla olduğu ifade edilmektedir. Bu özelliğe sahip olan ailelerin kızları daha iyi beslendikleri için daha erken yaşta gelişmekte ve bunun sonucu olarak da daha erken yaşta adet görmeye başlamaktadır. Ayrıca bu çocuklar büyüdüleri zaman eğitim ve iş nedeniyle daha geç yaşta evlendikleri için daha geç yaşta çocuk sahibi olmaları söz konusu olmaktadır [30].

7. Östrojen Alınması ve Doğum Kontrol Hapı Kullanılması: Menopoz nedeniyle uzun süre (10 yıldan fazla) östrojen tedavisi gören kadınlarda meme kanseri görülme riskinin yükseldiği ifade edilmektedir [31].

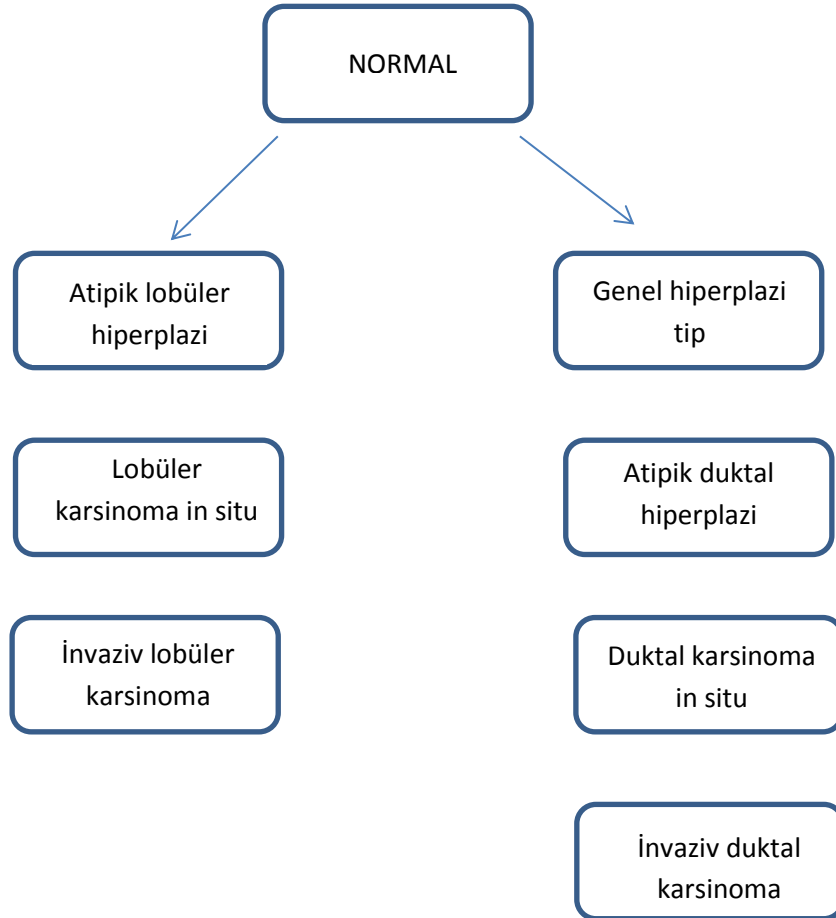
8. Şişmanlık ve Yağlı Beslenme: Bazı çalışmalarda şişmanlığın özellikle 50 yaş ve üzerindeki kadınlarda meme kanserine yakalanma riskini yükselttiğine işaret edilmektedir [32].

Yukarıdaki maddelere ek olarak bazı kaynaklarda kişilerin, yetersiz fiziksel aktivite yapmasının, beyaz ırktan olmasının, göğüs bölgelerinin yoğun radyasyona maruz kalmasının, bebeklerin emzirilmemesinin rahim ve yumurtalık kanseri geçirilmesinin kırmızı et yönünden zengin beslenme alışkanlığının benimsenmesinin ve uygun pişirme yöntemlerinin kullanılmamasının da meme kanserine yakalanma açısından risk faktörleri arasında sayılacağına değinilmektedir. Bu açıklamalarda da görüldüğü gibi, meme kanserine neden olan tek bir faktör bulunmamakta, birtakım risk faktörlerinin bu hastalığa yakalanma ve gelişim sürecini hızlandırdığı belirtilmektedir [33].

2.2.2 Meme Kanserinin Biyolojisi

Normal meme dokusunun kanser hücresine dönüşmesi çok aşamalı ve karmaşık bir süreçtir. Başlangıçta, normal hücrelerde gerçekleşen ve çekirdek ya da sitoplazmik onkogenleri aktive eden, transkripsiyonu düzenleyen mekanizmaları, sinyal moleküllerini etkileyen, büyüme faktörü ve reseptör etkileşimini bozan veya tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini baskılayan çeşitli değişiklikler bu hücrelerin çoğalmasını sağlar. Buna paralel olarak ortaya çıkan yeni değişiklikler çok aşamalı meme karsinogenezinde komşu dokulara yayılabilen, immün denetimden kaçan ve metastaz yapabilen hücreler oluşturur. Bu hücreler, normal hücre çoğalmasını düzenleyen doğal sinyallere yanıt verme yeteneğini de kaybederek kontrolsüzce çoğalmaya başlar [34].

Meme kanserinin karsinogenez süreci, sırasıyla bening proliferatif meme lezyonları, karsinoma in situ, erken dönem meme kanseri (evre 1- 2), lokal ileri evre meme kanseri (evre 3) ve invaziv kanser evrelerinden oluşmaktadır [35].



Şekil 2.1. Meme kanseri gelişim basamakları [36].

Farklı kişilerde davranışının değişken olması ve diğer bazı kanser türlerine göre çoğalmasının daha yavaş gerçekleşmesi meme kanserinin en önemli iki özelliğidir [37].

Preklinik dönemde meme kanserinin logaritmik ve sürekli bir büyüme gösterdiği tahmin edilmektedir. Memedeki kitle 1 cm çapa ulaştığında palpe edilebilir tümör boyutlarındadır ve bu çaptaki bir kitle yaklaşık 10^9 tümör hücresi içerir. Malignite gelişiminin tek hücreden başladığı kabul edildiğinde, bu tek hücrenin 10^9 hücre olması için 30 bölünme gerekmektedir. Meme kanserinde preklinik tümör ikilenme süresi ortalama 100 gün ise bu durumda meme kanseri olgularında yaklaşık 10 yıllık bir preklinik evre söz konusudur. Meme kanserinde tanı konulduktan sonraki doğal seyir de oldukça yavaştır. Tedavi edilmeyen olgularda ortalama yaşam süresi 2.7 yıldır [38].

2.2.3 Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserlerinin sınıflandırılması klinik veya histopatolojik olarak yapılır. Meme kanser tipleri kanser hücrelerinin yerleşim yerine ve yaygınlığına göre isimlendirilmektedir. Genel olarak hücreler süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde lokalize ise lobüler, medullada ise medüller meme kanseri olarak adlandırılır. Kanser hücreleri, çevresindeki bazal hücreleri aştığında invazif, aşmadığında in situ olarak isimlendirilirler. İnvazif duktal karsinom en fazla görülen meme kanseri tipi olup tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %75'ini oluşturduğu bildirilmiştir [39].

En yaygın olarak kullanılmakta olan sınıflandırma, Dünya Sağlık Örgütü'nün Meme Tümörleri Sınıflamasıdır. Bu sınıflama çizelge 2.1'de gösterilmiştir [40].

Çizelge 2.1. Meme kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması

A. Noninvasiv Karsinomlar
1. İntraduktal Karsinomlar
2. Lobuler Karsinoma İn situ
B. İnvaziv Karsinomlar
1. İnvazif Duktal Karsinoma
2. İntraduktal Komponent Belirgin İnvazif Duktal Karsinoma
3. İnvazif Lobuler Karsinoma
4. Müsinoz Karsinoma
5. Meduller Karsinoma
6. Papiller Karsinoma
7. Tübüler Karsinoma
8. Adenoid Kist Karsinoma
9. Sekretuar Karsinoma
10. Apokrin Gland Karsinoma
11. Metaplazi ile Birlikte Olan Karsinomalar
a. Squamoz Tip
b. Spindle Hücre Tipi
c. Osseöz ve Kartilajinöz Tip
d. Miks Tip
e. Diğerleri
f. Memenin Paget Hastalığı

2.2.4 Meme Kanserinin Belirtileri

Meme kanserinin belirtileri hastalığın vücuttaki yayılım derecesine ve kişiden kişiye göre farklılık göstermektedir. Kadınların çoğunda meme kanseri ilk başlarda ağrısız olarak ortaya çıksa da aşağıda yer alacak olan belirtilerin görüleceği de ifade edilmektedir. Bu nedenle yapılan meme muayenesi sırasında bu değişiklikler fark edildiğinde gecikmeden bir hekime başvurulması gerekmektedir.

Meme kanserinin belirtileri konusunda unutulmaması gereken nokta, memede meydana gelen değişikliklerin birçok nedeni olduğudur. Bu değişikliklerin büyük çoğunluğu zararsız olmakla birlikte küçük bir ihtimalle meme kanserinin ilk işaretleri olabileceği de unutulmamalıdır. Bu nedenle kadınların kendileri için neyin normal

olduğunu bilmeleri memelerinin doğal yapısını incelemeleri, değişikliklerin neler olduğunu tespit etmeleri ve gecikmeden rapor etmeleri tavsiye edilmekte ve yaşları ile orantılı meme tarama programlarına katılmalarının önemine dikkat çekilmektedir [41].

Yukarıdaki bilgiler ışığında literatürde meme kanserinin belirtileri ile ilgili olarak yer alan ifadeler incelendiğinde;

- memede bir kitlenin varlığının,
- memenin portakal kabuğu şeklinde bir görüntü almasının,
- doğumsal nedenlere bağlı olmaksızın meme başının içe çekilmesinin,
- meme başından kanlı ya da kansız akıntı gelmesinin,
- meme derisinde ülser, kızarıklık ve ödem meydana gelmesinin,
- lenf bezlerinde şişlik olmasının ve kolda şişlik ve ödem oluşmasının vb.nin önemli olduğu görülmektedir [42].

Memede ele gelen kitlelerin çoğu kanser olmamakla beraber, kadınlar tarafından memede farklı bir kitle veya sertlik fark edildiğinde yeterli önlemlerin alınması gerekmektedir. Meme kanseri öncelikle bölgesel lenf bezlerine yayılmakta ve sıklıkla da koltukaltı lenf bezlerini tutmaktadır. Bölgesel lenf bezlerini aşan kanser hücreleri kan dolaşımına katılarak sırasıyla akciğer, plevra (akciğer zarı), kemik (kaburga, bel omurları, kafatası, kol kemikleri), karaciğer, periton (karın zarı), böbrek üstü bezleri, beyin ve yumurtalıklara yayılma gösterebilmektedir. Meme kanserinin ileri evrelerinde kanserin meme dışındaki başka organlara yayılmasına da metastaz denilmektedir. Bu da meme kanseri hastalarında sıklıkla görülen durumlardan biri olarak ifade edilir [43].

2.2.5 Meme Kanserinde Prognostik Faktörler

Prognostik faktör terimi, kanserde tanı anında var olan ve bir tümörün doğal seyrini önceden belirlemek için kullanılabilir. Meme kanserinde bu amaçla kullanılan standart prognostik faktörler aksiller lenf nodu tutulumu ve sayısı, histolojik alt tip, tümör büyüklüğü, nükleer ve histolojik derece, ER (östrojen reseptör) ve PR (progesteron reseptör) durumunu içermektedir. Yaş, menapoz durumu, ırk, onkogenler, tümör supresor genler, büyüme faktörleri gibi işaretleyiciler muhtemel diğer prognostik faktörlerdir.

Üzerinde daha çok çalışılmasına ve yenilerinin bulunmasına açık olan prognostik faktörler aşağıda gösterildiği gibi çeşitli alt gruplarda sınıflanmıştır [44].

1-Fiziksel etkenler: Yaş, ırk, kilo

2-Klinik etkenler: Tümör boyutu, deriye, kasa invazyon, çevre dokuya fiksasyon, aksiller lenf nodu tutulumu

3-Patolojik özellikler:

-Lenf nodu metastazı: En önemli prognostik parametredir. Lenf noduna yayılmamış hastalarda 10 yıllık yaşam %75 iken, yayılmış hastalarda bu oran %25-30'a düşmektedir.

-Tümör boyutu: Uzak metastazı olmayan ve lenf noduna yayılmamış hastalarda en güçlü prognoz belirleyicisi tümör büyüklüğüdür. Tümör boyutu arttıkça aksiller lenf nodu metastazı artmakta ve sağkalım oranı düşmektedir [45].

-Tümörün histolojik tipi

-Histolojik derecelendirme: Günümüzde morfolojik tipine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün derecelendirilmesi önerilmektedir ve en çok kullanılan derecelendirme sistemi modifiye Bloom-Richardson sistemidir. Bu derecelendirme sisteminde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdukları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı değerlendirilerek elde edilen toplam değere göre derece belirlenmektedir.

-Lenfovasküler invazyon: Tümör çevresindeki lenfatik ve kan damarlarının lümeninde tümör hücrelerinin görülmesi durumunda lenf nodu metastazı olasılığı yüksektir.

4-Evre

5-Kemik iliği metastazları

6-Biyolojik belirleyiciler (Proliferasyon belirleyicileri, DNA içeriği, Litik enzimler, Steroid hormon reseptörleri, Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler)

-Östrojen ve progesteron reseptörleri: Meme kanserlerinin üçte birinde östrojen ve progesteron reseptörleri kaybolmuştur. Bu tümörler için kötü prognozu göstermektedir. İyi huylu tümörlerde reseptör seviyesi daha yüksek düzeydedir ve ER (+) tümörlerin prognozu daha iyidir. ER (+) ve PR (+) tümörlerde yaşam süresi daha uzundur [46].

-p53: Tümör baskılayıcı gendir. Meme karsinomlarının %50'sinde mutant p53 gen ifadesi vardır. Yüksek histolojik derece ve klinik agresiflik ile birliktedir. Nod (-) hastalarda kullanılan bir prognostik belirteçtir [47].

7-HER-2/neu: Epidermal growth faktör reseptör ailesinden bir protoonkogendir. Meme karsinomlarının %10-30'unda FISH "fluorescent in situ hybridization" ile saptanan HER-2/neu gen amplifikasyonu ve immunhistokimyasal yöntemle saptanan protein aşırı ekspresyonu vardır. HER-2/neu aşırı ekspresyonu kötü prognostik parametredir ve genellikle histolojik derecesi yüksek, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir [48].

2.2.6 Meme Kanseri Tümör Belirteçleri

Meme kanseri tanısında en çok kullanılan tümör belirteçleri: CA 15-3, MCA, CEA, TPA, TPS ve Cyfra 21.1'dir [49].

Serumda CA 15-3, CEA, CA549, MCA, CA 27.29 testlerinden ikisine ilaveten, dokuda östrojen, progesteron reseptörleri ile onkogen c-erbB-2, serumda c-erbB-2 ektodomen ölçümleri teşhisi yaşam süresini % 90'lara çıkartabilmektedir. Hatta tümörün çevreye ya da lenf düğümlerine yayılımı yok ise % 100' lere çıkabilir [50].

1) Karbonhidrat Antijen 15-3 (CA 15-3)

Meme dokusunun epitel hücreleri tarafından üretilen yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein yapısında bir antijendir. Günümüzde meme kanserinin yaygınlığını saptamada kullanılmaktadır. Organa veya tümöre özgün değildir. Duyarlılığı % 77'dir. Diğer tümör belirteçleriyle birlikte kullanıldığında duyarlılığı % 12-25 oranında artmaktadır [51].

Tedaviye cevabı izlemede de sadece CA15-3 kullanımı önerilmemekle beraber, yüksek CA15-3 seviyesinin tedavinin yetersizliğinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir [52]

2) MCA "Mücin-like Carcinoma Associated Antijen"

MCA bir serum glikoproteinidir. Normal dokuda MCA düzeyleri çok düşük olmasına karşın tümör sitozolünde yüksektir. Horgan ve ark.'ın çalışmasında, benign meme hastalığı olan hastalarda, MCA seviyesinde yükselme olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada meme kanserli hastalar arasında evre III ve evre IV olan hastalarda anlamlı bir artış saptanmıştır [53].

3) Karsino Embriyonik Antijen (CEA)

Glikoprotein yapısında tümör belirteçidir. Yetişkin insanların serumunda yüksek düzeyde olması malignite bulgusudur. Primer olarak kolorektal kanserlerde kullanılır. Ayrıca meme, akciğer, pankreas, mide, serviks, mesane, böbrek, tiroid, karaciğer ve over kanserlerinde de yükselmektedir. Erken evre meme kanserinde duyarlılığı düşük olmasına rağmen metastatik meme kanserlerinde % 40-50 olguda yükseldiği gösterilmiştir [54].

4) Doku Polipeptid Antijen (TPA)

Sitokeratin 8, 18, 19 içeren sitokeratin kompleksidir. Tümör hücrelerinin membranında ve epitel hücrelerinde bulunan doku polipeptid antijenidir [55]. Serum düzeyindeki düşüklük, hücrelerdeki artmış proliferasyonu gösterir. Yüksek sitozolik TPA düzeyleri meme kanserinde iyi prognozu gösterir [56].

5) Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

6000 kDA ağırlığında bir peptittir. Birçok çalışma EGFR'nin meme kanserinde prognostik ve prediktif değeri olduğunu ortaya koymuştur [57].

6) Katepsin D

52 kDA ağırlığında, asidik lizozomal bir proteaz olan fosfolikoproteindir. Katepsin D geni meme kanserli hastalarda aşırı ekspresyon gösterir [58].

7) c-erb B-2 (HER-2)

185 kDa ağırlığında transmembran proteindir. Meme kanserli hastanın Herseptin ile tedavisinin yapıp yapılamayacağını belirlemede, Herseptin tedavisinin izlenmesinde, tümörün erken dönemini belirlemede kullanılabilir [59].

8) p53

p53, tümör baskılayıcı genlerdendir. Aşırı ekspresyonu meme kanserinde kötü prognozun göstergesidir. p53 proteini, transkripsiyon faktörü olarak DNA'nın özgül bölgesine bağlanarak, diğer genleri düzenler. Gen hücreyi DNA hasarına karşı korur ve hasar olduğu zaman hücre çoğalmasını G1/S sınırında durdurarak, DNA onarımını başlatır. Onarımın başarı ile tamamlanamadığı durumlarda ise apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar. Mutant p53 proteini meme, hemotopoetik sistem, baş-boyun, endometrium, akciğer, kolon kanserlerinde belirlenmiştir [60].

9) CA 27.29

Breast carcinoma associated antijen, cancer antijen 27.29 isimleri ile de bilinir. Meme kanseri nükslerini belirlemede kullanılır. II veya III evre meme kanserli olgularda nüksü belirlemek için yararlı olan CA 27.29, tarama ve rutin izlemede önerilmemektedir [61].

10) Karbonhidrat Antijen 549 (CA 549)

Normal meme ve epitelyal dokularda bulunabilen bir glikoproteindir. Meme, akciğer, prostat, kolon kanseri olan hastaların serum düzeylerinde artış görülmüştür. Tedavi izlemi ve progresyon izlemi için kullanılmaktadır [62].

Metastazı olan meme kanserli hastaların izlenmesinde kullanılır. Hassaslığı ve seçiciliğinin düşük olması nedeni ile tarama ve teşhiste kullanılmaz.

2.3 Kanser hücresi ve demir metabolizması

2.3.1 Vücut içi demir döngüsü

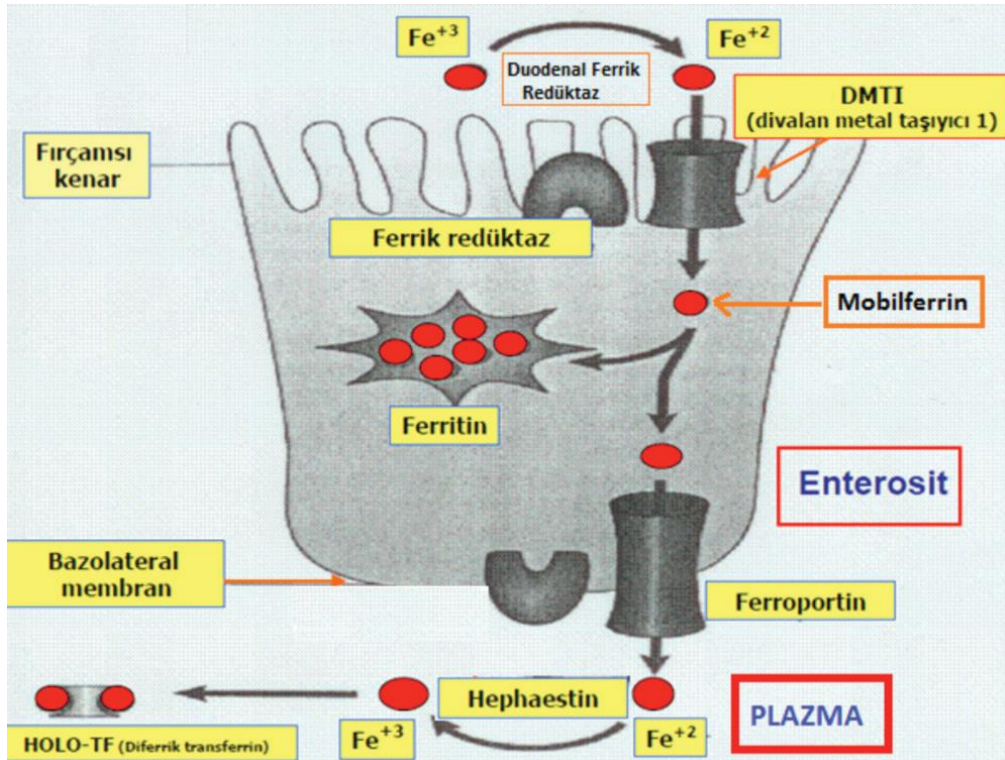
Demir insan için esansiyel bir elementtir ve insan vücudunda ki en bol bulunan geçiş metalidir. Demir insan vücudunda ferrik (Fe^{+3}) veya ferröz (Fe^{+2}) demir olarak iki formda bulunur. Ferrik Fe^{+3} ve ferröz Fe^{+2} formlarına dönüşüm sırasında elektron alma ve verme özelliklerinden dolayı demir, taşıma ve depolamada görevli moleküllerin ve enerji üretiminde görevli enzimlerin temel elemanıdır. Demir ayrıca hücre bölünmesi sırasında deoksiribonükleotid sentezinden sorumlu ribonükleotid redüktaz enziminin sentezi sırasında da oldukça önemli rol oynar. Demir mitokondrideki hem'in ve demir-sülfür bağlı proteinlerin sentezinde de oldukça önemlidir. [63]

Demirin elektron değişimi, (Fe^{+3}) ve (Fe^{+2}), redoks aktivitesi için gereklidir. Demir fazlalığında oluşan serbest demir, prooksidan olarak serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açar. Bu nedenle demir hiçbir zaman serbest bırakılmamaya çalışılır [64-65].

Organizmada bulunan demirin %60-70'i hemoglobinde, %10'u miyoglobin, sitokromlar ve demir içeren enzimlerde bulunur. Kalan %20-30'u başlıca karaciğer ve makrofajlarda depolanır. Organizmadan demiri atan fizyolojik bir mekanizma yoktur. Gastrointestinal sistemden dökülen epitelial hücreleri ve kanamalar dışında demir kaybı olmaz [66].

Demir duodenumdan ve proksimal jejunumdan emilir. Besinlerle alınan demirin %90 kadarı non-hem demiridir. Non-hem demirinin ancak %5'i emilir. Non-hem demiri gıdalarda Fe^{+3} kompleksler şeklindedir, emilimi diyetteki faktörlerden ve kişinin vücudundaki demir durumundan etkilenir. Hem demiri ise yüksek emilim oranına sahip olup, diyetteki faktörlerden çok az etkilenir. Hem demiri diyetle alınan demirin %10 kadarıdır [67].

Musin demir molekülünü bağlayabilme yeteneği olan bir proteindir. Musin-demir kompleksi duodenumun alkali ortamında emilim için gereklidir. Böylece demir ince bağırsak hücrelerin yüzeyinde bulunan “integrinler” aracılığı ile membrandan geçer ve sitoplazmik bir demir bağlayıcı protein olan “mobilferrin” ile bağlanır. Her bir molekül mobilferrin bir molekül demir bağlar. Mobilferrin, demiri hücrenin bazolateral yüzeyine taşır. Diyetle alınan Fe^{+3} , duodenumun fırçamsı kenarında duodenal ferrik redüktaz (Dcytb) ile Fe^{+2} ye indirgenir ve divalent metal transporter 1 (DMT1) aracılığı ile fırçamsı kenar membranından enterositlere alınmaktadır. Fe^{+2} hücrede ferritin olarak depolanıp, dökülen enterositlerle birlikte atılmakta ya da ferroportin aracılığı ile basolateral membrandan plazmaya geçmektedir. Fe^{+2} hephaestin (Heph) aracılığı ile Fe^{+3} yükseltgenir ve transferine bağlanarak taşınır. Demir, ihtiyacı olan hücrelerin yüzeyinde bulunan transferrin reseptörü 1 (Tfr1) aracılığı ile hücelere alınmaktadır (Şekil 2.2) [68].



Şekil 2.2. Demir metabolizması

2.3.2 Demirin hücreler tarafından alınması

Demir vücut içi sirkülasyonda transferrine bağlanarak hücrelere taşınır. Vücut demirinin yaklaşık % 0,1'i sirkülasyonda bulunur ve tamamına yakını transferrin (Tf)'e bağlanır. Bunun organizma için yararları [69] ;

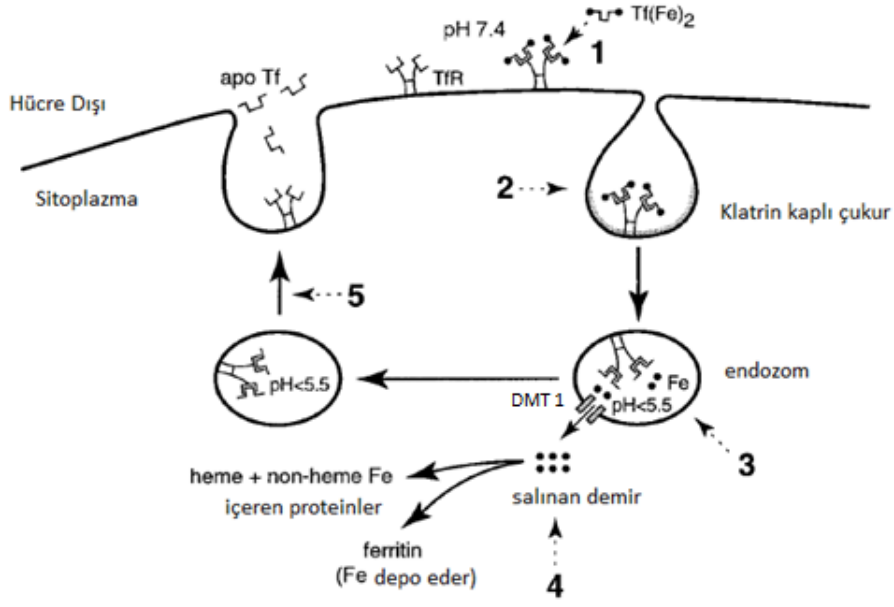
1. Fizyolojik durumlarda çözünebilir demir sağlar.
2. Demire bağlı serbest radikal toksisitesini önler.
3. Demirin hücre içine transportunu kolaylaştırır.

Hücre içine demir alımı hücre membran proteini olan transferrin reseptör 1 (TfR 1) tarafından düzenlenir. Transferrinin reseptörüne bağlanıp kompleks bir form alması reseptör aracılı endositozis ile sağlanır ve içeri alınması kltrin kaplı endozomla gerçekleşir [70].

Proton pompaları aracılığıyla ortamın pH'ı 5.5 civarına düşürülerek Tf-TfR kompleksi konformasyonel değişikliğe uğratılır.

Fe^{+3} endozomal ferredüktaz enzimi ile Fe^{+2} e redüklenir ve DMT 1 (divalent metal transporter) aracılığıyla sitosole salınır. Sitosolde ki demir ya Fe-S bağı içeren proteinlerin yapısına katılır ya da hücre içi demir depolama proteini olan ferritinde depolanır. Demir ayrıca ferritinin degregasyonu sonucu ortaya çıkan yıkım ürünü olan haemosiderin kompleksinde de depo edilir [71].

Asidik ortamda (pH 5,5 altında), demir Tf'den ayrıldıktan sonra ya hücre tarafından kullanılır veya ferritin şeklinde depo edilir. Endozomal asidifikasyon sonucu demirsiz kalan apotransferrin (ApoTf)'in TfR'e afinitesi yüksektir. ApoTf/TfR kompleksi endozom ile birlikte tekrar hücre yüzeyine transfer edilir. Hücre yüzeyinde nötral pH ile temas sonucu ApoTf, TfR'ne olan afinitesini kaybeder ve membrandan ayrılır ve böylece reseptör yüzeyi tekrar kullanım için hazır olur [72].



Şekil 2.3. Hücre içine demir alınması şematik gösterimi [73].

2.3.3. Transferrin-Transferrin Reseptör Kompleksi

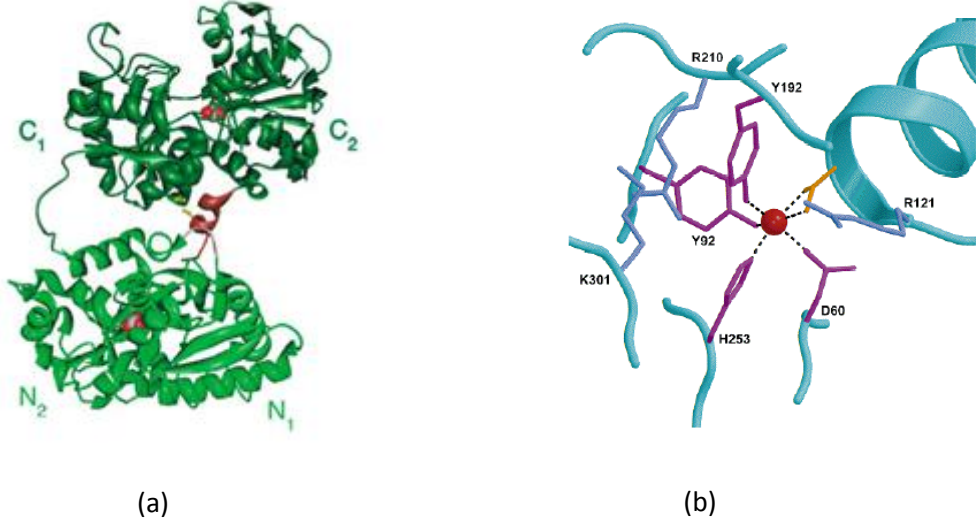
2.3.3.1. Transferrin

Tf, 80 kDa ağırlığında 679 aminoasitlik diziden oluşur ve kanda demiri taşıyan glikoproteindir. Tf geni 3. kromozomda lokalizedir. Jel elektroforezi ile 21 farklı genetik varyant belirlenmiş olup aralarında en yaygını transferrin C'dir. Serumda 200 mg/dl düzeyinde bulunur. Günde 30 mg demirin plazma ile demire ihtiyacı olan hücrelerin TfR'ne transportundan sorumludur. Plazma ile ekstravasküler alanda bulunan tek zincirli glikoproteindir. Depo demiri, Tf sentezinin regülasyonunu sağlar. Plazma Tf konsantrasyonu demir eksikliğinde artarken, vücutta demir birikiminde azalır. [74-75].

Tf polipeptid zinciri iki homolog yarıdan oluşur. N- ve C- terminal loblar iki tane domain içermektedir. (N₁,N₂ ve C₁, C₂) (Şekil 2.4).

Demirin Tf ile bağlanması genellikle karbonat (CO₃⁻²) gibi sinerjistik bir anyonla sağlanır. Karbonat iyonu, 2 Tirozin, 1 Histidin ve 1 Aspartik asit ile transferrinin her iki

lobuna 2 tane Fe^{+3} 'in yüksek afiniteyle bağlanması sağlanır. pH 7.4 'te Tf iki tane ferrik demiri (Fe^{+3}) bağlayarak dimerik formdaki TfR 'ye bağlanır.pH 'nın düşmesiyle Tf konformasyonel değişikliğe uğrar ve demir salınmış olur [76].



Şekil 2.4. a) Transferrinin kristal yapısı b) Transferrin N-Lop demir bağlama bölgesi [77-78].

2.3.3.2 Transferrin reseptörü

Demir taşıyan transferinle kompleks oluşturarak demirin hücre içine alınmasını sağlar. 760 aminoasitten oluşan, homodimerik yapıda transmembran proteinidir. Sitoplazmik domaini, tek geçişli zar domaini ve büyük dış domaini vardır [79-80]. Kelebek benzeri dimerik TfR' nün dış domainin her monomeri 3 belirgin domainden oluşur. Bunlar; proteaz benzeri domain, apikal domain ve helikal domaindir [81].

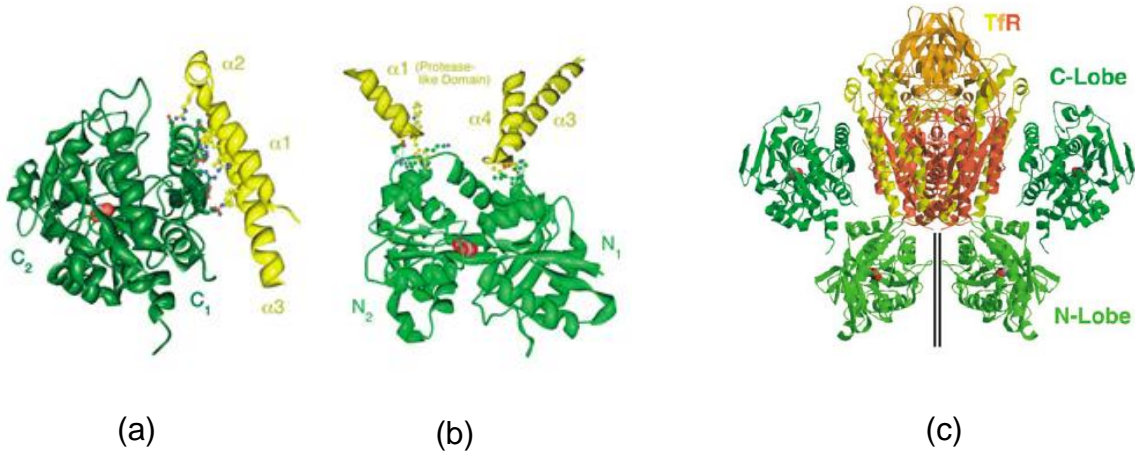
2.3.3.3. Transferrin-reseptör kompleksi

Daha öncede belirtildiği gibi demirin hücre içine alınabilmesi için transferrin ile transferrin reseptörün birbirine bağlanarak bir kompleks oluşturması gerekir. Diğer reseptör ligand ilişkilerinden farklı olarak dimerik formdaki transferrin transferrin reseptörüne uçtan değil lateral olarak bağlanarak kompleks oluşturur [82].

Membran arasına uzanan Tf nin C- lobu ile reseptörün dış domainindeki helikal domainler etkileşime girer. N- lobu ise TfR dış domaini ile membran arasında sandviç pozisyonunu alır [83].

Bir transferrin, reseptörünün iki alt ünitesiyle etkileşime girer. TfR' nün apikal kısmının Tf-TfR kompleksine tek katkısı ise diğer proteinlerin komplekse bağlanmasını sağlamaktır. Örneğin; ferredüktazı bağlayabilir [84].

Tf, reseptörüne bağlanınca düz bir yapı alır. Bu sayede C- terminal heliks uçlarının daha iyi bağlanır ayrıca reseptöre bağlanan transferrinin C terminalindeki alfa helikslerin düzleşmesi Fe salınımına yardımcı olur. Demir salındığı zaman ise C- lobu membran ile paralel hale gelir. Düşük pH'da diferrik Tf 'den demir salınır [85].



Şekil 2.5. a) Transferrinin C-lobunun reseptörün alfa 1, 2 ve 3 ile etkileşimi b) N- lobun proteaz benzeri domain ve alfa 1, 2 ile etkileşimi c) Transferrin reseptörü ile transferrin kompleksi [86].

2.3.4. Transferrin reseptörü sentezinin kontrolü

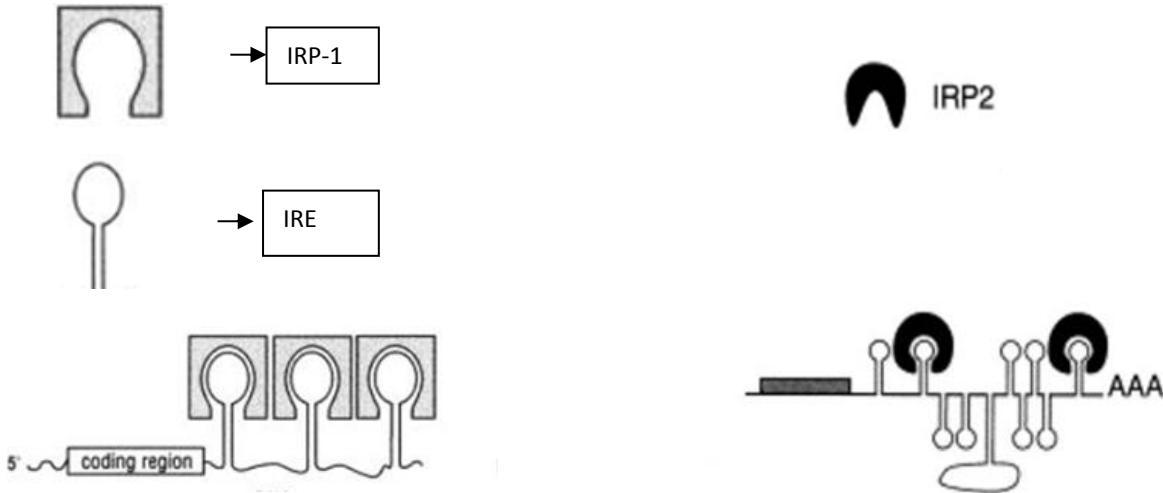
Hücresel düzeyde demir düzenlenmesinin moleküler kontrolü; demirin taşınması, depolanması, kullanımı ile ilgili tüm ana proteinlerin sentezi post-transkripsiyonel düzeyde hücre içi demirle düzenlenmektedir. Bu düzenlenme sitoplazmada bulunan ve hücre içinde demiri hisseden, hücresel demir sensör proteinleri olan iron

regulatuar proteinler (IRP) ile demir proteinlerinin mRNA'ları üzerinde 30 nükleotidlik bölgeyi içeren iron responsive elementler (IRE) arasındaki ilişkiye bağlıdır. Hücre içinde demir eksikliği olduğunda IRP'lerle IRE'ler bağlanırlar. Bu bağlanma transferrin reseptörü (TfR) ve diğer demir ile ilgili proteinlerin sentezini düzenler [87-88-89].

Demiri tükenmiş hücrenin hücre sel demir sensör proteinleri (IRP), RNA üzerindeki iron responsive elementler (IREs) bölgesine yüksek afiniteyle bağlanır. Buda transferrin reseptör proteininin sentezinden sorumlu mRNA'nın de gregasyonunu engelleyerek reseptörün sentezini sağlar. Eğer demir hücre içeriğinde fazlaysa bu IRP'leri inaktive eder. IRP 1 ve 2 'nin IRE'lere bağlanamaması TfR mRNA'sının de gregasyonuna sebep olur. Buda hücreye daha fazla demir alımını önler [90].

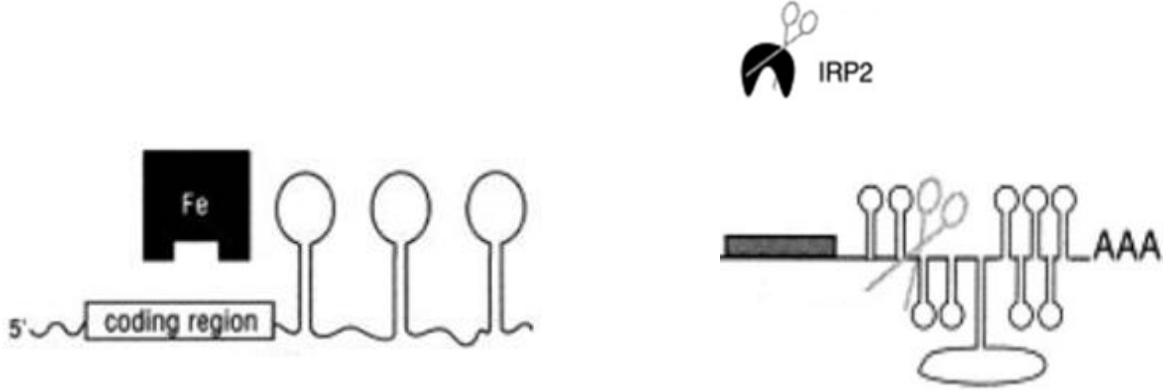
IRP-1 ve IRP-2 ile Transferrin Reseptör mRNA'nın etkileşimi

Düşük demir yoğunluğu



a) Transferrin reseptör mRNA' sı kararlı

Yüksek demir yoğunluğu



b) Transferrin reseptör mRNA' sı kararlı değil

Şekil 2.6 a) Düşük demir yoğunluğunda transferrin reseptör bölgesini kodlayan mRNA üzerindeki demir duyarlı elementler kısmı (Iron Responsive Elements)(IREs) ile demir düzenleyen RNA bağlayıcı protein IRP-1 ve IRP-2 birbirine bağlanır. Stabil tutulan mRNA üzerinden transferin reseptör proteini sentezi yapılır. b) Yüksek demir yoğunluğunda ise IRP-1 ve IRP-2 ile IREs bağlanamaz. Stabil tutulamayan mRNA degra de olur. Reseptör sentezi yapılamaz [91].

2.3.4.1. Kanser hücresinde transferrin reseptörü

Demir hücre bölünmesi ve farklılaşması için oldukça önemli bir elementtir. Bölünme kontrol mekanizmasını kaybetmiş, sürekli bölünme eğiliminde olan kanserli bir dokuda ise demir, malignant hücrelerin kitlesel yayılımında önemli bir yere sahiptir ve tümör proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir [92].

Kanser hücreleri sürekli demir eksikliği olan bir hücre fenotipi göstermektedir. Bu yüzden kanser hücrelerinde transferin reseptörünün ekspresyonu ve diğer demir alımıyla ilişkili proteinlerin ekspresyonu, hücre proliferasyonu ile doğru orantı göstermektedir [93].

Meme kanseri üzerine yapılan çalışmalarda yüksek malignansi gösteren kötü huylu meme kanseri hücresinin (2. ve 3.derece) yüksek oranda transferrin reseptörü sentezlediği, iyi huylu olanlarda ve normal meme hücresinde ise daha az TfR sentezi

yapıldığı gösterilmiştir. Bu araştırmalar şu sonucu gösteriyor ki kanserli bir hücrenin bölünme hızının artışı ve yüksek proliferasyon özelliği göstermesiyle demire olan yüksek ihtiyacından dolayı transferrin reseptör sayısını arttırması, bu tümörün malignansi derecesi hakkında bize önemli ipuçları verir [94].

Yüksek hassasiyet ile kanser hücrelerinin saptanması için hızlı ve basit tekniklerinin geliştirilmesi klinik öncesi test çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. şu anda klinik öncesi test ve kanser hücre biyolojisi için kullanılan geleneksel yöntemler sitolojik test, floresan görüntüleme ve radyoaktif algılama özelliği içerir [95].

Bu teknikler genellikle geniş deneysel işlemler, karmaşık enstrümantasyon ve yüksek maliyetler içerebilir [96].

Yapılan bu tez çalışmasında yüksek oranda invaziv meme kanseri hücrelerinin teşhisi için bir sensör tasarlanması amaçlanmıştır. Bunun için meme kanseri hücresi yüzeyinde transferrin reseptör sayısındaki artıştan [97] yararlanılmıştır.

Hazırladığımız sensörle aşırı artmış transferrin reseptör ekspresyona sahip meme kanseri hücrelerini [98] seçici, hızlı ve oldukça basit bir şekilde tanıyarak invaziv meme kanseri potansiyelinde ki bir hücreyi erken safhada teşhis edebiliriz.

Sensör aynı zamanda kanser hücrelerinin malignansi derecesi hakkında bilgi vererek uygun tedavinin verilebilmesi için kanserin evresi hakkında bilgi edinebilmemizi sağlar. Çalışmamızda örnek hücre olarak insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 seçilmiştir ve sensör uygulamalarında oldukça iyi sonuçlar vermiştir [99-100].

2.4. Biyosensörler

Canlılar teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlık performansı gösterirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler eşlerinin yaydığı birkaç molekölü bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar [101].

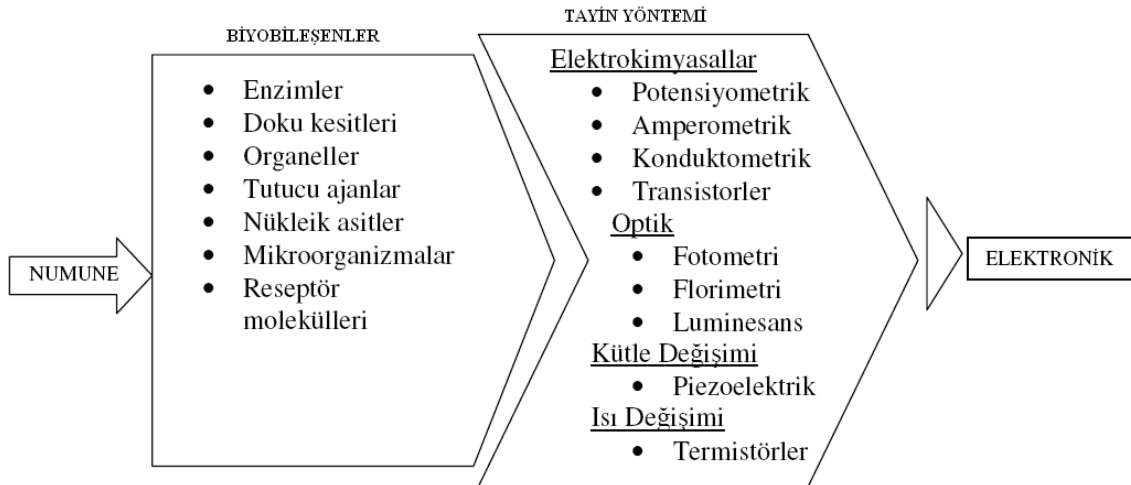
Canlıların, çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme sistemleri, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel teşkil etmekte ve sıklıkla biyolojik analizler için kullanılmaktadır [102].

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukoz oksidaz (GOx) enzimini O₂ elektrodu ile kombine

ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur. Klinik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok organik ve biyolojik maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler adı verilir [103].

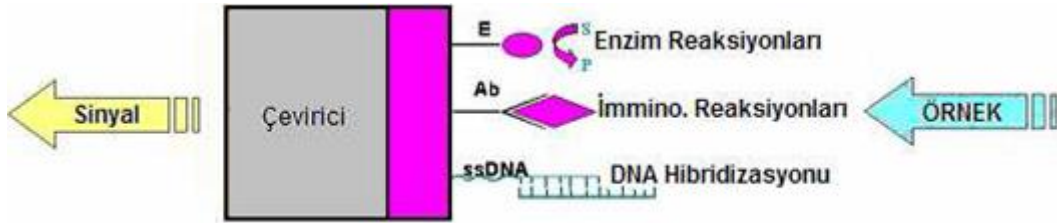
Biyosensörler; bilgiyi algılayabilen, saklayabilen ve iletebilen biyolojik alıcıya ve fizikokimyasal çeviriciye sahip cihazlardır. Biyolojik alıcılar; enzimler, dokular, mikroorganizmalar, antikorlar, hücre reseptörleri gibi biyolojik tabanlı malzemelerden oluşmaktadır. Başka bir deyişle, biyomalzemeler biyolojik malzemeleri tanıyabilme özelliğine sahip analitik cihazlardır. Bu tanıma işlemi sonrasında ise yapısında bulunan çevirici mekanizma ile algılamış olduğu malzemeyi biyokimyasal sinyale ya da elektrik sinyaline çevirme yeteneğine sahiptir [104].

Biyosensörler biyobileşenler (reseptör) ile fiziksel bileşenlerden (transduser) oluşurlar. Biyosensörün çalışma prensibi Şekil 2.7’de şematize edilmiştir [105].



Şekil 2.7. Biyosensörlerin çalışma prensibi

Biyoreseptör bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır ve biyosensörün hassasiyeti ile seçiciliğinde etkilidir ve bu reseptörler tek bir partiküler substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoreseptörler 3 grup (biyokatalitik, biyoaffinite ve hibrit reseptörleri) altında toplanırlar.



Şekil 2.8. Biyoreseptörlerin şematik gösterimi [106].

Biyokatalitik reseptörler, analiti belirlenmeyen formdan belirlenebilir forma dönüştürerek transdüserle kaydedilebilir ve belirlenebilir kılar [107].

Biyokatalitik tanıma elementleri enzim (mono veya multi enzim) içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar, örn; bakteriler, mantarlar, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki, hayvan doku parçalarından oluşur [108].

Affinite reseptörler, etkileşimleri antikor-antijen veya nükleik asit gibi biyolojik affiniteye sahip elementlerin etkileşimlerine dayanan reseptörlerdir. Bu gruptaki antikor-antijen bazlı biyosensörler ise immünosensörler olarak adlandırılırlar [109].

Hibrit reseptörlerin biyosensör uygulamalarında ise nükleik asit kullanımı rapor edilmiştir. Bu sensörlerin kullanım alanları DNA'da meydana gelen zararları kimyasal olarak belirleme ve DNA'nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir [110].

Genel olarak biyolojik komponent uygun bir şekilde immobilizasyonla çeviriciye bağlanır. Immobilizasyon metodu immobilize edilecek biyokomponentin yapısına göre

belirlenir. Kullanılan çevirici elementi ve analitin fiziksel durumu da seçilecek metod için önemli faktörlerdir.

Genel olarak 5 yaygın metod bulunmaktadır. Bunlar;

- 1-Adsorbsiyon
- 2-Mikroenkapsülasyon
- 3-Tutuklama
- 4-Çapraz bağlama
- 5-Kovalent bağlama'dır [111].

Biyosensörler çok çeşitli şekillerde, boyutlarda tasarlanabilir [112]. Transdüksiyon mekanizması sonucunda optik, elektrokimyasal, piezoelektik, termometrik, manyetik sinyaller analit analizinde kullanılmak üzere sinyallere çevirilebilirler. Dönüştürücüler temelde dört grup altında toplanırlar [113];

1-Elektrokimyasal dönüştürücüler

- Amperometrik
- Potansiyometrik
- Kondüktometrik

2-Optik dönüştürücüler

- Absorbans ölçümünü temel alanlar
- Floresans veya fosforesans ölçümünü temel alanlar
- Kırılma indisini temel alanlar

3-Kütle değişimini temel alan dönüştürücüler

4-Isı değişimini temel alan dönüştürücüler

Biyosensörlerin örnek hazırlama işleminin basit olması, örnek kullanımının az olması, kompleks karışımlardan analizin yapılabilir olması, küçük olması, hızlı olması gibi bir çok avantajı vardır [114].

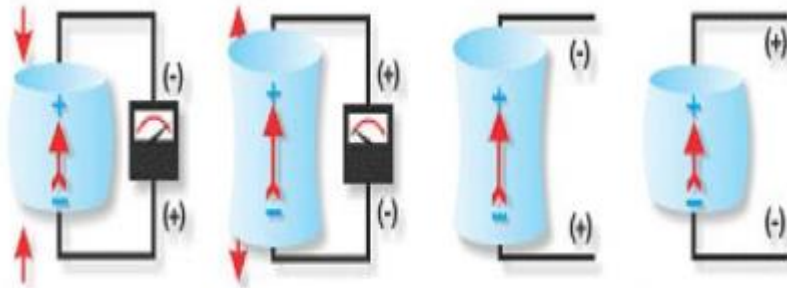
En önemli avantajı, biyofizik teknikleri, floresan işaretleme, kimyasal yöntemler gibi bir çok yardımcı tekniğe ihtiyaç duymadan ölçüm yapılabilen bir sistem olmasıdır [115].

2.4.1 Piezoelektrik Kristalli Biyosensörler (Kütle Duyarlı Biyosensörler)

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan, gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır [116]. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır.

2.4.1.1. Piezoelektrik etki

Piezoelektrik etki ilk defa 1880 yılında Curie Kardeşler tarafından keşfedilmiştir. Piezoelektrik etkiye sahip bir kristal mekanik olarak deforme olduğunda, yüzeyinde elektriksel bir potansiyel oluşur [117]. Çapraz sapmadan dolayı, bükülme, kırılma, basınç ya da eğilmeden kaynaklanan elektriksel yük meydana gelir [118]. Bu etki materyeldeki iyon değişimi ile açıklanır. İyonların yer değiştirmesi elektriksel polarizasyona sebep olur. Şekil 2.9.'da piezoelektrik etkinin şematik gösterimi verilmiştir Kristale mekanik basınç uygulandığında elektrik potansiyelinin değişimi, elektriksel alan uygulandığında ise kristalin sıkışma ve uzaması gösterilmiştir. [119-120].



Şekil 2.9. Piezoelektrik Etki

Kuvars; piezoelektrik özellik gösteren bir taştır. Üzerine uygulanan belli bir mekanik basınç etkisiyle (sıkışma, esneme, burulma) kristal yüzeyleri arasında bir elektriksel gerilim üretilir.

Kuvars kristali, silikon ve oksijenden elde edilir ve SiO_2 kimyasal formülüne sahiptir. Piezoelektrik ve mikroelektronik yapıların kombinasyonu ile cihaz tasarımları 1960'larda başlamıştır. Ticari olarak kullanılan başlıca piezoelektrik malzeme kuvars kristalidir (silikon oksit) [121].

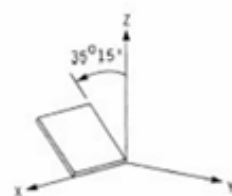
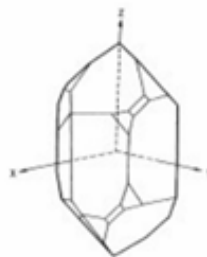
Kuvars kristaller kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütlesine bağlı olan doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Kristalin kırılma şeklinin rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır. Yüksek kaliteli mekaniksel ve piezoelektrik özelliğinden dolayı QCM uygulamalarında alfa-kuvars kristalleri tercih edilmektedirler. Kristal oryantasyonu ile birlikte kesilme açısı da salınımın şeklini belirlemektedir [122].

Ticari sistemler kütle ölçüm duyarlılığı minimum 1 ng/cm^2 olan ve 100 mg 'a kadar ölçüm alınabilmesini sağlayan güvenilir düzenekler olarak tasarlanmışlardır. Kristalin hazırlanmasında en büyük zorluk, istenilen özelliklerde kesmeye çalışırken kütle dedektörünün mikroterazi faktörünü gözardı etmesidir [123].

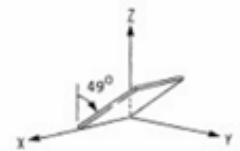
Kuartz kristallerin sensör uygulamalarında kullanılmaları için Y- kesme ailesine bağlı AT- kesme ve BT- kesme kristaller kullanılmaktadır. Şekil 2.10. 'da gösterildiği gibi AT- kesmede, kuartz tabaka, z ekseninden $+35^\circ 15'$ açıyla, BT- kesmede ise z ekseninden $-49,00^\circ$ açıyla kesilmiştir (O' Sullivan et. al., 1999). AT kesme kristallerde sıcaklık katsayısı, kesme şeklinden dolayı $10\text{-}50^\circ\text{C}$ aralığında $1 \text{ ppm}/^\circ\text{C}$ civarında sifıra oldukça yakındır ve bu da kristalin geniş bir frekans aralığında rezonans frekansının kararlı olarak kalmasına olanak tanır [124].



(a)



(b)



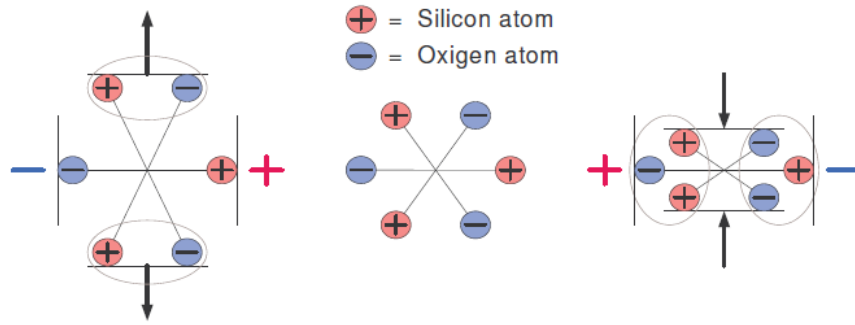
Şekil 2.10. a) Kuvars kristalinin mineral yapısı b) AT-Kesim ve BT-Kesim kuvars kristal düzlemleri [124]

Bir kristalde piezoelektrik özelliğın gözlenmesi, yüzey yüklerinin oluşmasına bağılıdır. Fakat simetri özellikleri bu yüklerin oluşması için gerekli koşulları kısıtlamaktadır. Bu nedenle simetri merkezi olmayan kristaller bu iş için en uygun malzeme grubunu oluşturmaktadır.

Sonuç olarak,

Elektriksel olarak yüksüz ve yapısal simetri merkezi bulunmayan bir kristale uygulanan basınç ile;

- 1) Artı yük ve eksi yüklerin merkezleri birbirinden hafifçe ayrılır,
- 2) Kristalin karşılıklı yüzlerinde zıt yükler oluşur,
- 3) Kristalin karşılıklı yüzleri arasında elektrik alanı oluşur,
- 4) Kristalin karşılıklı yüzleri arasında ölçülebilir bir potansiyel farkı oluşur (Şekil 2.11) [125].



Şekil 2.11. Piezoelektrik bir kristalin yapısal simetri merkezi

2.4.1.2. Ters Piezoelektrik Etki

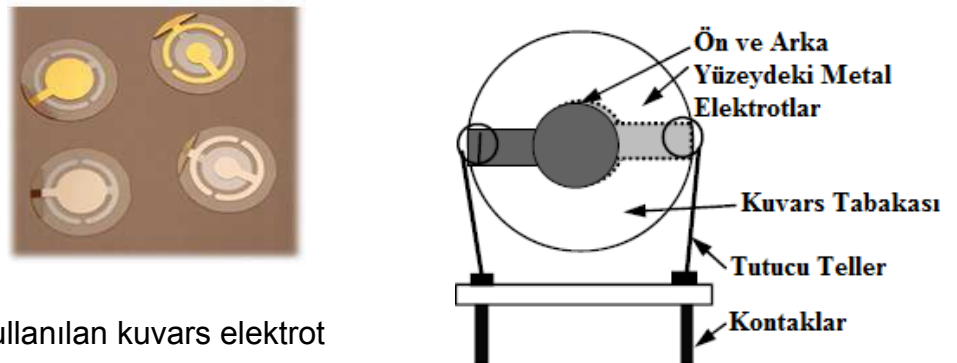
Curie kardeşler yaptıkları çalışmalarda, piezoelektrik kristalinin iki yüzeyi arasında uygulanan elektriksel gerilim farkının kristallerde boyut değiştirmeye ve gerilime yol açtığını göstermişlerdir. Başka bir ifadeyle, “ters Piezoelektrik etki” olarak bilinen bu etkiyi kullanarak, kristal yüzeyleri arasında uygulanan elektriksel gerilimin şiddetini değiştirerek piezoelektrik kristalin boyutlarını bununla orantılı olarak değiştirmek mümkün olmaktadır. Sonuç olarak terspiezoelektrik etkide, karşılıklı yüzeyleri arasında elektrik gerilimi uygulanan bir kristalde boyutsal bir şekil değişimi oluşmaktadır [126].

Kristallerde titreşim söz konusudur. Titreşim, kristal içindeki atomların belli bir zaman içinde orijinal konumlarından deforme olmuş konuma geçmeleri, buradan yine orijinal konuma dönmeleri ve devam eden sürekli aynı şekilde tekrarlanan bir davranış göstermektedir. Bu döngülerin birim zamanda tekrarlanma sayısı kristalin rezonans (temel) frekansı olarak tanımlanır. Piezoelektrik kristallerde pozitif ve negatif yüklü iyonlar vardır. Titreşim sonucu yük dağılımı değişir, başka bir ifadeyle polarizasyon oluşur. Dolayısıyla bu salınım frekansına karşı salınan elektrik alan oluşumu söz konusudur. Elektrik alan salınım frekansı rezonans frekansı ile aynıdır [127].

2.4.2. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)

Kuvars kristal mikroterazi (QCM), kütle değişimlikleri, elektrik sinyaline çevirebilen bir cihazdır. Her iki yüzü metal elektrotlarla kaplı olan ince bir kuvars kristalinden oluşmaktadır. Kuvars kristalinin belirli açılarda kesilmesiyle farklı kayma modlarındaki QCM'ler elde edilir. En yaygın olarak kullanılanı ise AT-kesim modlu kuvars kristalidir. AT-kesimli kuvars kristali, kuvarsın Z-ekseninden $35^{\circ}15'$ lik bir açıyla kesilmesinden elde edilmektedir [128]. Bu kuvars kristalleri piezoelektrik etkiye sahiptir. QCM'in üzerine alternatif, yüksek akımlı bir elektrik alan uygulanmasıyla, QCM mekanik rezonans modunda salınım yapar. Kütle hassasiyeti kristalin toplam kütlesi üzerindeki titreşim frekansına bağlı olarak ortaya çıkar [129]. Çözelti ile temas eden rezonatör (ki bu genellikle kuvars kristaldir) oldukça kararlı sinyal veren bir elektronik devreye bağlıdır. Rezonatör üzerindeki herhangi bir değişiklik titreşim frekansında ani bir değişime neden olur. Elektrot üzerindeki kütle birikiminin neden olduğu frekans değişimi Sauerbrey (1959) eşitliğinden elde edilir [130].

QCM'in yöntem adı verilen en yaygın uygulaması, sensör elektrotları üzerindeki kütle birikimlerinin ölçümüdür. QCM için kullanılan kuvars elektrot Şekil 2.12'de görülmektedir [131].



Şekil 2.12. QCM için kullanılan kuvars elektrot

Kuvars Kristal mikroterazi (QCM) yüksek duyarlılıkla kütle ölçümlerini yapabilen akustik dalga mikrosensörlerinin bir çeşididir. Uygun koşullar altında, tipik bir QCM 0.1-1 ng/cm² lik bir kütle değişimini ölçebilir. Kimyasal maddelerin veya biyomoleküllerin spesifik tayinleri için yapılan uygulamalarda kristal elektrotlar, moleküllerin bağlanması veya adsorpsiyonu için ince filmlerle kaplanır [132].

Sensör yüzeyindeki saf kütleler için, doğrusal eşitlik ilk kez Sauerbrey tarafından türetildi. Kuvars kristal rezonatörün frekansındaki değişim (Δf) ve kütle birikimi (Δm) Sauerbrey (1959) eşitliğinden elde edilir [133].

2.1. Denklem

$$\Delta f_m = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q} m_s = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q} \frac{\Delta m_s}{A_{el}}$$

Δf frekans değişimi; f_0 , temel frekans; A , kuvars yüzeydeki metal elektrot alanı; μ_q ve ρ_q kesme modülü ($2.95 \cdot 10^{-11}$ dyn/cm²), kuvars yoğunluğu (2.65 g/cm³). Kütle birikimi ve rezonans frekansındaki değişim arasında doğrusal bağlantı kullanılır, Δm nanogram aralığında kütle değişimini verir. Kütlelerin kuvars yüzeye bağlanması ile kristalin salınımı frekansı azalır [133].

Sauerbrey eşitliği sadece rezonatör üzerinde biriken ince katı tabakalar için geçerlidir. Başlangıçta QCM ölçümleri için katı faz kullanılmasına karşın daha sonra uygun salınım devrelerinin geliştirilmesi ile sıvı fazda da ölçüm yapmak mümkün olmuştur. Konash ve Nomura salınım döngüsünü modifiye etti ve sıvı içindeki salınımı seçici olmayan sensör yüzeyini QCM sisteminin algılamasını sağladı [134].

Sıvının yoğunluğu (ρ_1), viskozitesi (η_1), ve kuvars kristalin frekansı arasındaki ilişkiyi açıklayan eşitlik Kanazawa ve Gordon tarafından türetilmiştir [135].

2.2. Denklem

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{P_1 \eta_1}{\pi P q \mu q}}$$

İki tabakalı bir sistemde frekans değişimi, tüm değişimlerin toplanması ile hesaplanır.

2.3. Denklem

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = -f_0^2 \left(\frac{\Delta m_s}{F_q \rho_q A_{el}} + \sqrt{\frac{P_1 \eta_1}{f_0 \pi P q \mu q}} \right)$$

f_0 (Hz), rezonans frekansı; F_q ($F_q = 1/4 f_0 \cdot d_q$) (Hz.cm²/ng), frekans sabiti; d_q (mm), kristalin kalınlığı ; ρ_q (g/cm³), yoğunluğu; A_{el} (mm²), kristalin rezonatör elektrot boyutu; q_1 (g/cm³), sıvının yoğunluğu; n_1 (kg/m/s), sıvının viskozitesi.

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1 Kimyasal Maddeler

Transferrin, poli(vinil alkol) (PVA), sodyum dodesil sulfat (SDS), amonyum persulfat (APS), sodyum bikarbonat , karbodiimit ve sodyum bisülfid Sigma firmasından temin edilmiştir (St. Louis, ABD). Nanopartiküllerin hazırlanmasında temel bileşen olarak kullanılan etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve monomer 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) Fluka A.G (Buchs,İsviçre) firmasından temin edilmiştir. HEMA polimerizasyon inhibitörünü uzaklaştırmak için düşük basınçta (100 mmHg) damıtılmış ve kullanılabildiği kadar 4 °C muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure ® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci, 18 MΩ/cm'dir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler, bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir.

3.2. Hücrelerin Hazırlanması

Çalışmamızda iki çeşit hücre hattı kullanılmıştır. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonunda satılan fakat bizim Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D'dan temin ettiğimiz MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücrelerin kültürü ve sayım işlemleri yapıldıktan sonra elimize geçmiştir. Hücreler sayımı yapılarak 1 ml besiyeri içinde bize verilmiştir. 1 ml besiyeri içindeki hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril polipropilen konik dipli tüpe yavaşça aktarılmıştır. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj (Hettich Rotina 35R, Almanya) edildikten sonra üst sıvı kısmı atılmıştır. Hücre pelleti 1 ml pH 7.4 PBS (Phosphate Buffered Saline) tampon içinde iyice karıştırılarak süspansiyon haline getirildikten sonra, bu stoktan diğer hücre konsantrasyonları hazırlanmıştır. İki hücre hattı için de aynı işlemler gerçekleştirilmiştir. Yarışmalı adsorbsiyon için yüzeyde transferrin

reseptör yapılarını bozmak adına bir de serum ve medyundan yoksun bırakılmış, 2 gün yalnızca PBS içinde bekletilmiş MDA-MB-231 kullanılmıştır.

Kullanılan Hücre Soyları

1. MDA-MB-231 Hücre Soyu

- İnsan epitelyal meme adenokarsinomu hücre soyu
- Östrojen reseptörü (-)
- Epidermal growth factor (EGF) (+)
- Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)
- E-kaderin (-)
- Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
- Plevral efüzyondan elde edilmiştir.
- Yüksek oranda invazif

2. MCF-7 Hücre Soyu

- İnsan epitelyal meme adenokarsinomu hücre soyu
- Östrojen reseptörü (+)
- Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
- Plevral efüzyondan elde edilmiştir.
- Daha az oranda invazif

3.3. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Yüzeyine Tutturulmuş P(HEMA) Nanopartiküllerin Transferrin ile Modifiye Edilmesi

3.3.1. Poli(HEMA) Nanopartiküllerin Hazırlanması

Poli(HEMA) nanopartiküllerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir : Polimerizasyon ikili sıvı faz karışımında gerçekleştirilmiştir. Birinci sıvı faz, PVA (93,75 mg), SDS (14.425 mg) ve sodyum bikarbonat (11.725 mg)' in sulu çözeltisidir

(5 ml). İkinci sıvı faz, PVA (0,05 g) ve SDS (0.05 g)' nin sulu çözeltisidir (100 ml). Monomer fazı ise; HEMA monomeri (0.45 ml) ve EDMA (1.05 ml) kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklenmiştir. Karışım, miniemülsiyon elde etmek için 25.000 rpm'de 30 dk homojenize (T10, Ika Labortechnik, Almanya) edilmiştir. Hazırlanan miniemülsiyon manyetik karıştırıcı üzerinde ikinci sıvı faz içine yavaşça eklenmiştir. Daha sonra karışım cam polimerizasyon reaktörüne aktarılmıştır. Reaktor mekanik olarak karıştırılmış (600 rpm) ve 40° C' ta ısıtılmıştır. (Radleys Carousel 6, Essex, İngiltere). Son olarak, sodium bisulfit (57.3 mg) ve amonyum persülfat (063 mg) karışıma eklenmiştir. Polimerizasyon 40° C' ta 24 saat süreyle devam ettirilmiştir. Elde edilen nanopartiküller 5 kez deiyonize su, 5 kez etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırılmıştır. Her bir yıkama basamağı için çözelti 14000 rpm' de 1 saat süreyle santrifüj edilmiş (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) ve nanopartiküller yıkama ortamından ayrılmıştır. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde tekrar dağıtılmış ve 4°C' de saklanmıştır.

3.3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

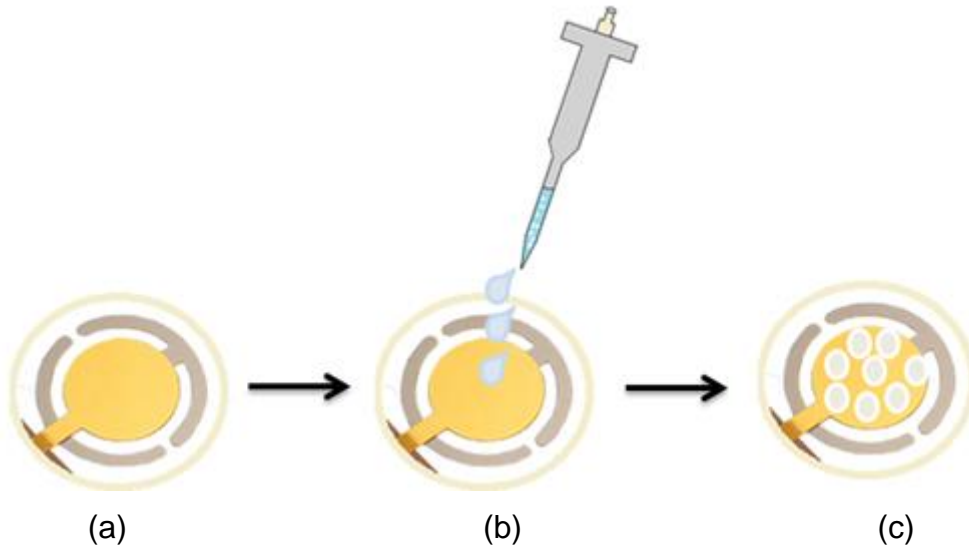
3.3.2.1. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen poli(HEMA) nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan nanopartiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0 µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının ($1 \times 10^3 - 2 \times 10^7$ aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir: nanopartikül çözeltisi (3 ml) nanoboyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısında 25°C'da tayin edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.88 mPa.s) ve kırılma indeksi (1.33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali birim saniyedeki partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır. Burada şu not edilmelidir ki; örnekteki nanopartikül derişimi ölçüm için yeterli yoğunluktadır. Ölçümler, 3 kere tekrarlanmıştır ve sonuçlar zeta boyut analizörünün yazılımı ile incelenmiş ve standart sapma değerleri ile birlikte rapor edilmiştir.

3.4. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörler

3.4.1. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Yüzeyine Nanopartiküllerin Tutturulması

Nanopartiküllerin kuvars kristal mikroterazi sensör yüzeyine tutturulmasından önce QCM sensörün altın yüzeyi asidik pirana çözeltisi (3:1 H₂SO₄:H₂O₂, v/v) ile temizlenmiştir. Asidik pirana çözeltisi (20 ml) içerisinde daldırılan sensör, 20 saniye çözelti içerisinde bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan sensör, deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. Yüzeyi temizlenen QCM sensörün altın yüzeyine 100 kat seyreltilmiş (% 4.2, v/v) nanopartikül çözeltisi damlatılmıştır (7 µl). Tozsuz ortamda 37°C'de 6 saat kurutulmuştur. Nanopartiküllerle kaplanmış QCM sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) kurutulmuştur.



Şekil 3. 1. QCM sensör yüzeyine partiküllerin tutturulması (a) pirana çözeltisi ile yıkanmış QCM sensörün yüzey görüntüsü (b) partikül çözeltisinin sensör yüzeyine damlatılması (c) nanopartikül kaplanmış QCM sensör

3.4.2. Nanopartikül ile Kaplanmış Sensör Yüzeyinin Transferrin ile Modifiye Edilmesi

Kuvars kristal mikroterazi sensör yüzeyine yerleştirilmiş p(HEMA) nanopartiküllerin yüzeyini transferrin ile modifiye edebilmek için karbodiimit kullanılmıştır. Bunun için 0.1 M, 10 ml, pH 7.4 te fosfat tamponu içinde 50 mg karbodiimit ve 5 mg transferrin proteini çözülmüştür. Hazırlanan bu çözelti içine, yüzeyinde nanopartiküllerin bulunduğu QCM sensör batırılmıştır. QCM sensör, yüzeyindeki p(HEMA) partiküllerin OH- gruplarıyla, transferrin proteinin karboksil gruplarının bağlanabilmesi için çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 24 saat boyunca çözelti içinde çalkalanmıştır (100 rpm). Süre sonunda sensör 0.5 M NaCl ve yine pH 7.4 fosfat tamponu ile yıkanmıştır.

Yüzeyi transferrin ile modifiye edilmiş, p(HEMA) nanopartiküllü QCM sensörün karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometrisi, atomik kuvvet mikroskopisi, temas açısı ölçümleri ve elipsometre kullanılmıştır. Yine aynı şekilde transferrin ile modifiye edilmemiş sensörün karakterizasyonu için de aynı yöntemler kullanılmıştır.

3.4.3. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörlerin Karakterizasyonu

3.4.3.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

QCM sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Ölçüm yapılan örnek haznesinden 10 dk azot gazı geçirilerek havadan kaynaklanan nem ve karbondioksit uzaklaştırılmıştır. QCM sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülerek spektrumlar alınmıştır.

3.4.3.2. Elipsometre

Hazırlanan sensörlerin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. QCM sensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama program için BK7 + 50 nm altın + 70 nm polimer katmanı veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler sensör

yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

3.4.3.3. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri için KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Kuvars kristal mikroterazi (QCM) sensörlerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop) yöntemi ile temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 10 ayrı fotoğraf çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş ve edilmiş sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri hesaplanmıştır.

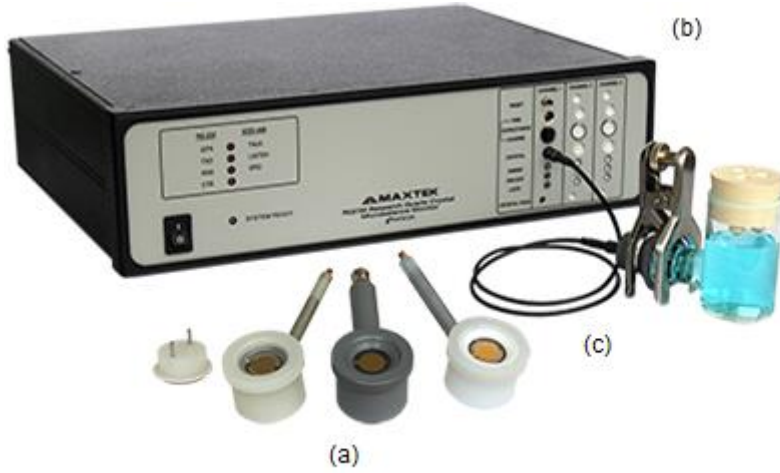
3.4.3.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

QCM sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096×4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. QCM sensör çift yüzlü karbon bant ile örnek tutturucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 kHz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, $1 V_{RSM}$ ve boş titreşim genliği ise $2 V_{RSM}$ dir. Örnek 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256 × 256 piksel çözünürlükte, 5×5 μm 'lik bir alanın görüntüsü alınmıştır.

3.4.4. QCM Sensörle Kinetik Analizler

Kuvars kristal mikroterazi sensör yüzeyine tutturulmuş p(HEMA) partiküllerin transferrin ile modifiye edilmesinden sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki MDA-MB-231 hücre çözeltileri ile gerçekleşmiştir. Bu çözeltiler 10 mM pH 7.4 fosfat tamponuyla (phosphate buffer saline-PBS) hazırlanarak QCM sistemine verilmiştir. QCM sistemi; frekans sayacı, gerilim kaynağı, osilator devre, peristaltik pompa, yalıtım kabini ve bilgisayardan oluşmaktadır. Yüzeyi transferrin ile modifiye edilen, p(HEMA) partiküllü QCM sensörler, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu başlık altında uygulanan

deneysel işlem şu şekildedir: QCM sensör yüzeyi deiyonize su (50ml) ile yıkanmıştır. Daha sonra transferrin ile modifiye edilmiş sensör, fosfat tamponu ile (pH 7.4) oda sıcaklığında dengelenmiş ve rezonans frekansı (f_0) belirlenmiştir. Rezonans frekansının belirlenmesinden sonra QCM sisteminden 3 dakika süre ile fosfat tamponu (pH 7.4) geçirilmiştir. Bu dengeleme basamağının ardından farklı derişimdeki MDA-MB-231 hücre çözeltileri teker teker (5 ml, 1.0 ml/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 20 dk) sisteme pH 7.4 fosfat tamponu içinde çözülmüş 1 M NaCl çözeltisi verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, QCM sensör su ve fosfat tamponu (pH 7.4) ile tekrar yıkanarak dengelenmiştir. Farklı derişimdeki MDA-MB-231 çözeltileri sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler, RQCM (Maxtek) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 3. 2. Deneysel olarak kullanılan Maxtek marka QCM sistemi a) akış hücresi, b) kuvars kristal mikroterazi, c) bağlantı kanalı

3.4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler

Yüzeyindeki p(HEMA) partikülleri transferrin ile modifiye edilmiş QCM sensörün yüksek oranda invaziv meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'e olan seçiciliğini göstermek için MDA-MB-231, MCF-7 ve tamponda bekletilmiş MDA-MB-

231 hücre çözeltileri QCM sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

MCF-7 ve tamponda bekleyen MDA-MB-231 hücre çözeltileri 75.000 hücre/ml derişiminde pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) ile hazırlanarak QCM sistemine gönderilmiştir.

3.4.6. İnvaziv Meme Kanseri Hücresinin Transferrin ile Modifiye Edilmiş Nanosensöre olan Seçiciliğinin Belirlenmesi

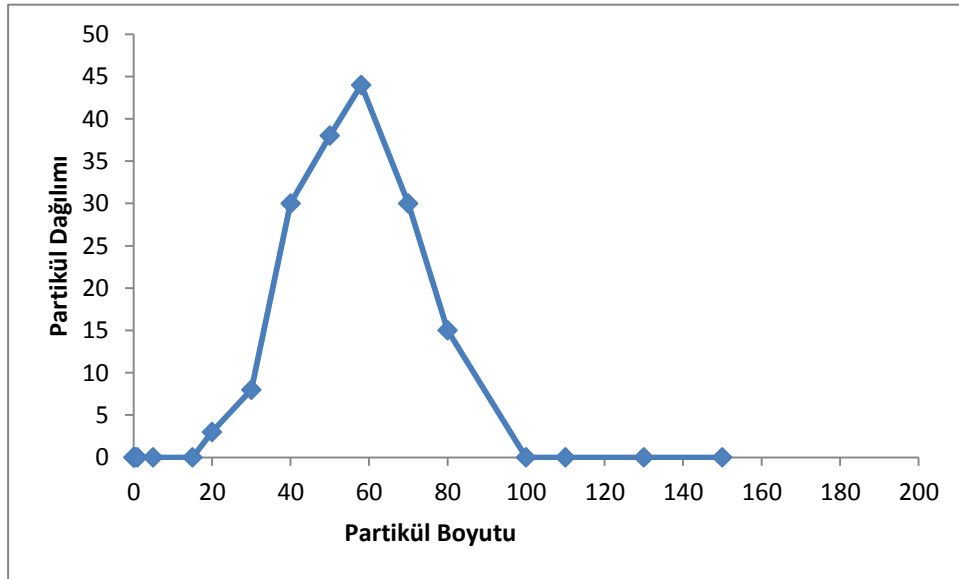
Hücrelerin yüzeyindeki p(HEMA) nanopartikülleri transferrin ile modifiye edilmiş nanosensöre olan seçiciliğinin belirlenmesi için yüzeyinde transferrin ile modifiye edilmemiş p(HEMA) partikül bulunan sensör hazırlanmıştır. MDA-MB-231, MCF-7 ve tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücre hatlarından oluşan çözeltiler QCM sistemine gönderilmiştir. Bu çözeltiler 75.000 hücre/ml derişiminde hazırlanmıştır. Seçicilik deneyleri için de yukarıda anlatıldığı gibi rezonans frekansı belirlenmiştir. Çözeltiler QCM sensörle etkileştirilmiş ve kinetik veriler alınarak RQCM (Maxtek) yazılımı ile analiz edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1 Nanopartiküllerin Boyut Analizi

Şekil 4.1'de EGMA çapraz bağlayıcı ve HEMA monomeriyle hazırlanmış nanopartiküllerin zeta boyut analizi sonuçları görülmektedir. Nanopartiküllerin ortalama boyutu 58 nm ve polidispersitesi 0.229 olarak bulunmuştur.

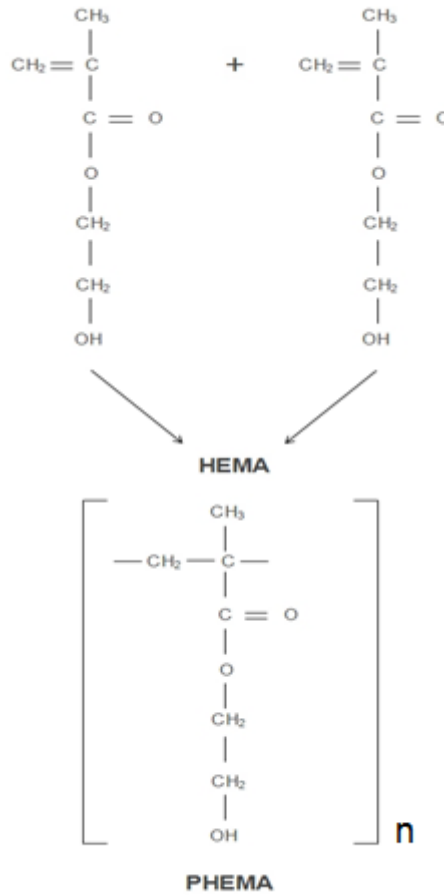


Şekil 4.1. p(HEMA) partiküllerin zeta boyut analizi

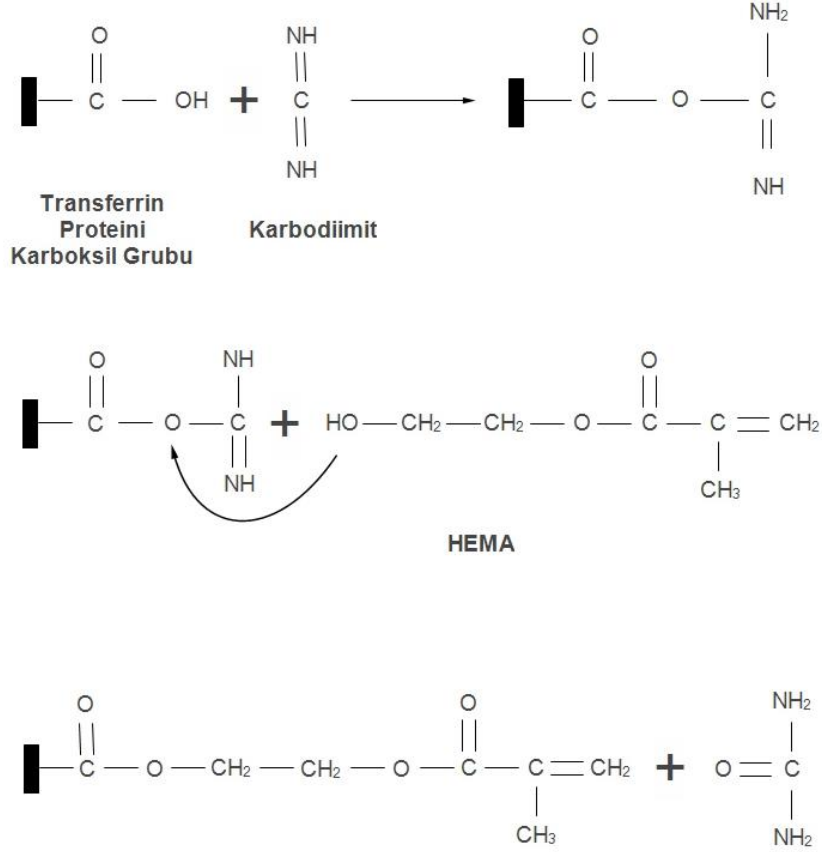
4.2. Nanosensörün Yüzey Karakterizasyonu

4.2.1. Nanosensör Yüzeyindeki p(HEMA) Partiküllerine Transferrin Tutturulması ve Sensörün FTIR-ATR Analizi

Daha öncede bahsedildiği gibi p(HEMA) nanopartiküller sentezlendikten sonra QCM sensör yüzeyine tutturulmuştur. QCM sensörün MDA-MB-231 invaziv meme kanseri hücre hattının hücrelerini yüksek seçicilikte bağlayabilmesi için transferrin ile modifiye edilmiştir. Modifikasyon işlemi için karbodiimitten yararlanılmıştır. p(HEMA) partiküllerin molekül formülü şekil 4.2'de ve transferrin ile modifikasyonu şekil 4.3' te gösterilmektedir. QCM sensörün altın yüzeylerinin karakterizasyonu için ise FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. QCM sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansımaya miktarı ölçülmüştür.

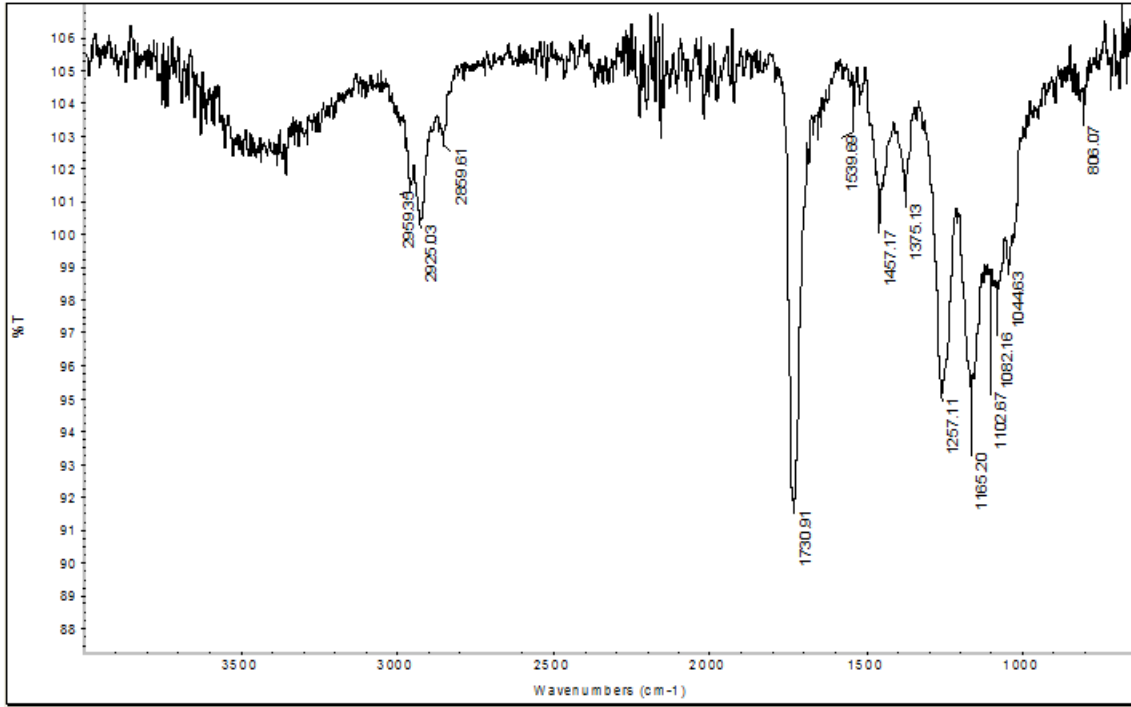


Şekil 4.2. p(HEMA) partikülün molekül formülü



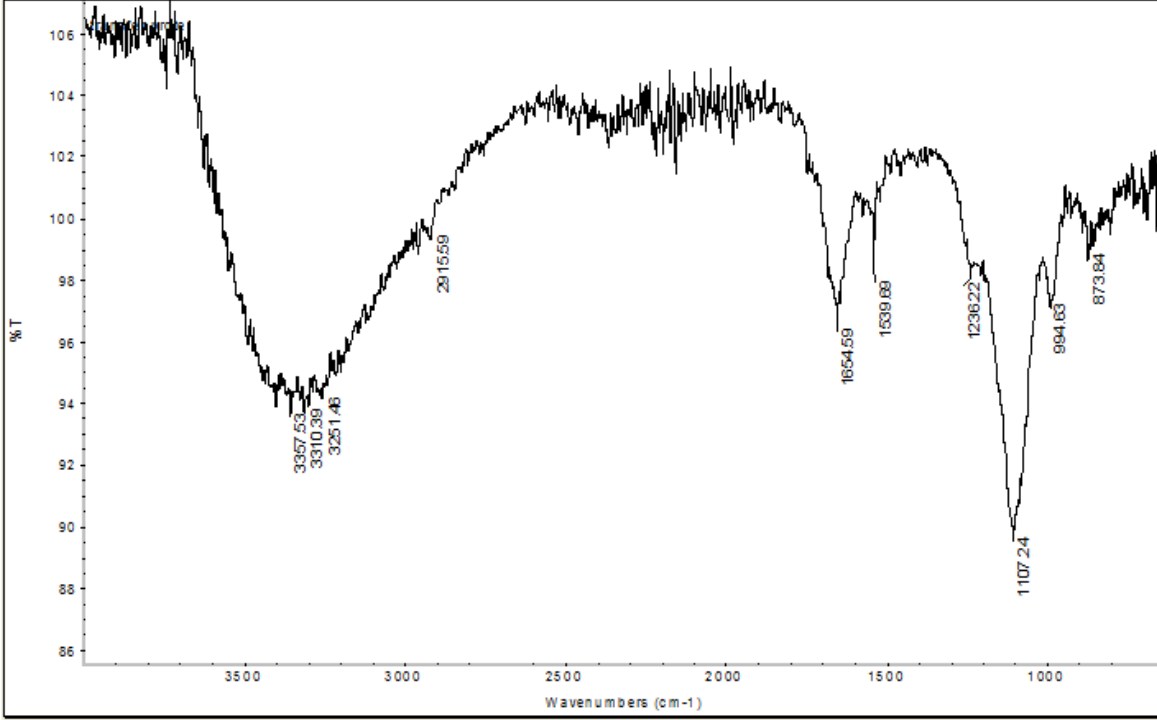
Şekil 4.3. QCM sensör yüzeyine tutunmuş p(HEMA) partiküllerin transferrin ile modifikasyonu

Şekil 4.4. yüzeyine p(HEMA) nanopartiküllerin tutturulduğu QCM sensörüne ait FTIR-ATR spektrumunu göstermektedir. 1730 cm^{-1} de görülen band HEMA'nın ester grubundaki karbonil grubu'nun (-C=O) gerilme bandına aitken, $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ arasındaki geniş band HEMA molekülünde bulunan hidroksil (-OH) grubuna aittir. 1633 cm^{-1} deki HEMA monomerine ait C=C çift bağlarını belirten bandın p(HEMA)' ya ait spektrumda gözlenmemesi yapının polimerleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.4. Yüzeyine p(HEMA) nanopartiküllerin tutturulduğu QCM sensörüne ait FTIR-ATR spektrumu.

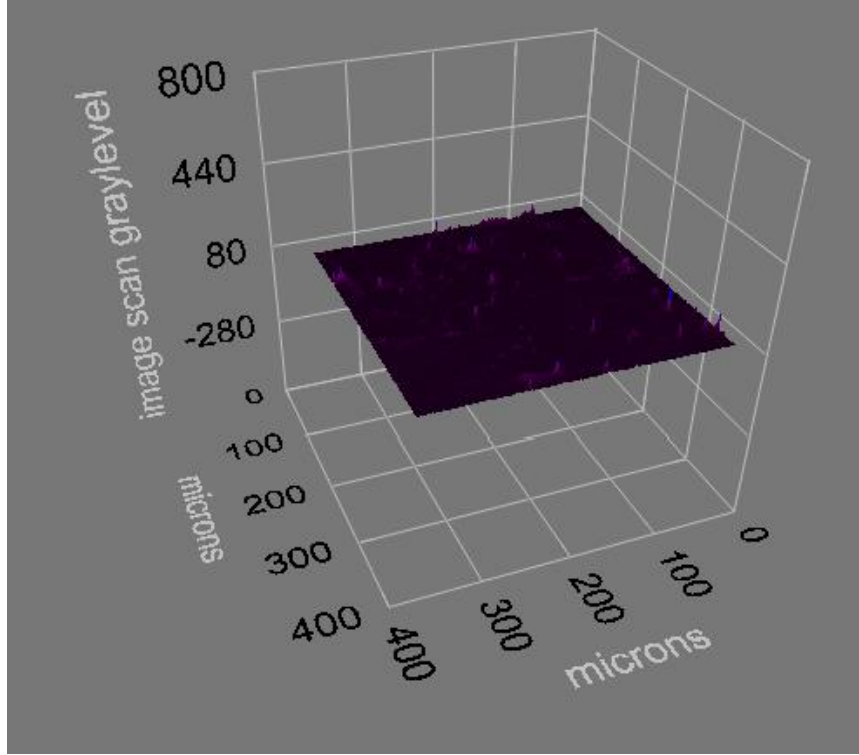
Şekil 4.5 yüzeyindeki p(HEMA) partikülleri transferrin ile modifiye edilen QCM sensörüne ait FTIR-ATR spektrumunu göstermektedir. Karbodiimit molekülü ile aktive edilen transferrin proteinin p(HEMA) nanopartikülüne bağlanmasına ait FTIR-ATR bandlarını göstermektedir. 1107 cm^{-1} deki band transferrin molekülünün PHEMA'nın yapısına katılması sonucu oluşan ester grubundaki C-O-C gerilme bandına aittir. HEMA molekülüne ait 1730 cm^{-1} deki (-C=O) gerilme bandı yapıya transferrin bağlanması sonucu 1654 cm^{-1} ne kaymıştır. Ayrıca 3000-3700 cm^{-1} deki HEMA molekülüne ait hidroksil (-OH) grubunun sinyal şiddeti yapıya transferrin katılımından kaynaklanan artan -OH ve -NH gruplarının sayısı ile artmaktadır. Transferrin proteinine ait amid I bandının sinyali 1640 cm^{-1} civarında, amid II bandına ait sinyal 1577 cm^{-1} de bulunmaktadır. Bu bandlar protein molekülünde oldukça fazla bulunan amid gruplarının fazlalığı sebebi ile geniş band şeklindedir. Bu durum transferrin proteininin p(HEMA)'nın yapısına katıldığını göstermektedir.



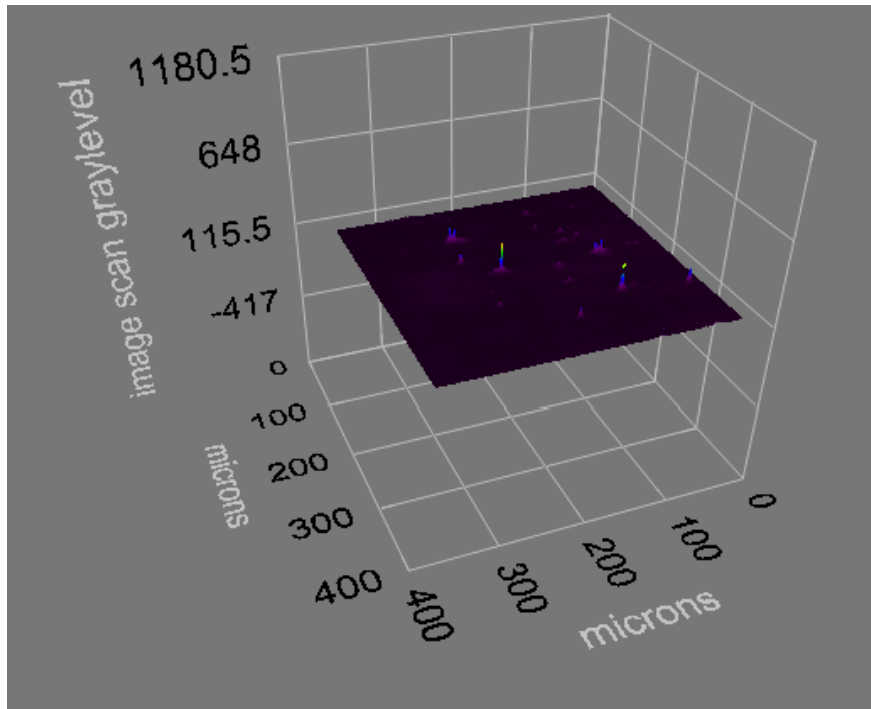
Şekil 4.5. Yüzeyindeki p(HEMA) partikülleri transferrin ile modifiye edilen QCM sensörüne ait FTIR-ATR spektrumu

4.2.2. Elipsometre Analizi

Yüzeyindeki p(HEMA) partikülleri transferrin ile modifiye edilmiş QCM sensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Elipsometrik ölçümler 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Transferrin modifiyeli ve modifiyesiz p(HEMA) partiküllü QCM sensörlerin ortalama kalınlık değeri sırasıyla 64.2 ± 3.06 nm (Şekil 4.6) ve 59.1 ± 2.04 nm (Şekil 4.7) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Transferrin modifiyeli QCM sensörün 3B elipsometre görüntüsü



Şekil 4.7. Transferrin ile modifiye edilmemiş QCM sensörün 3B elipsometre görüntüsü

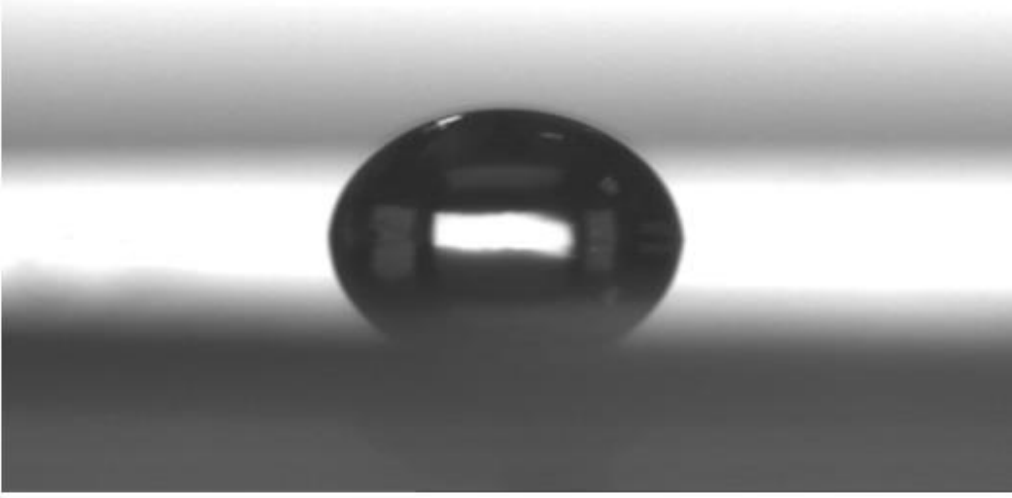
4.2.3. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş QCM sensörün ve yüzeyinde p(HEMA) partiküllerin bulunduğu QCM nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de modifiye edilmemiş QCM sensörün ve yüzeyinde p(HEMA) partiküllerin bulunduğu QCM nanosensörlerin yüzey temas açıları gözetlenmiştir

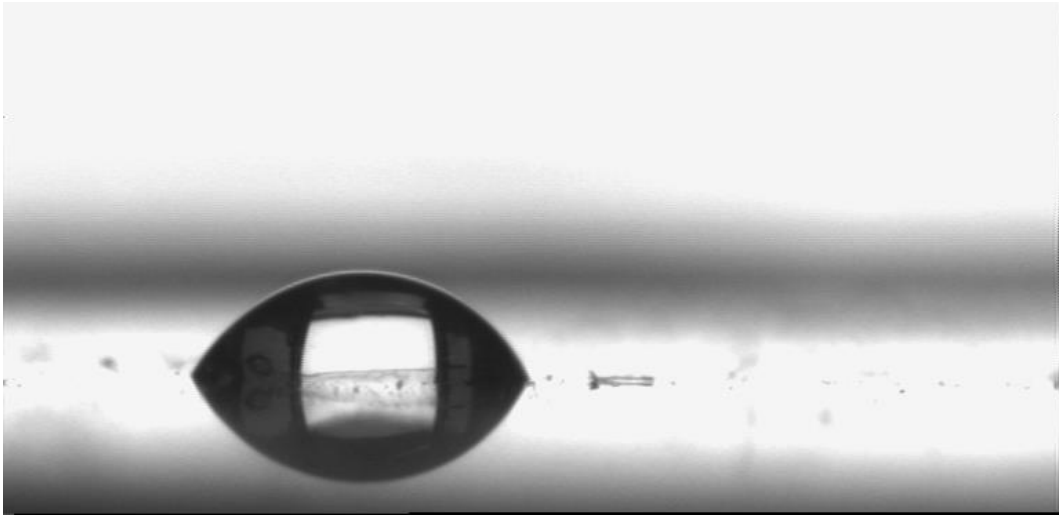
Çizelge 4. 1. Temas açısı sonuçları

Yüzey	Temas Açısı, °
Modifiye edilmemiş altın yüzey	84.0 ± 1.2
Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensör	73.6 ± 3.2
Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensör	78.3 ± 2.5

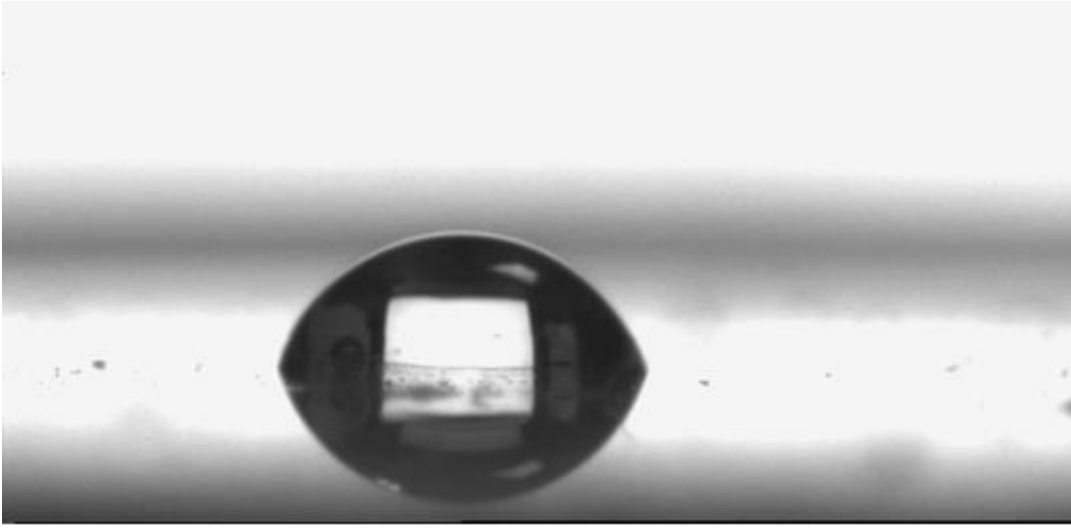
Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş QCM çip yüzeyinin temas açısı değeri (84°), Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM çip yüzeyinde 73.6°'ye ve Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensör çip yüzeyinde 78.3° 'ye düşmüştür. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: QCM çiplerine p(HEMA) kullanılmıştır. p(HEMA) hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür. p(HEMA) partiküllerinde transferrin ile modifiye edilmesi proteinin hidrofilik özelliği arttırmasından dolayı açı daha da düşmüştür. Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8 de temas açısı ölçümleri alınan modifiye edilmemiş, transferrinli partiküllü ve transferrinsiz partiküllü QCM sensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.



Şekil 4.9. Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensör



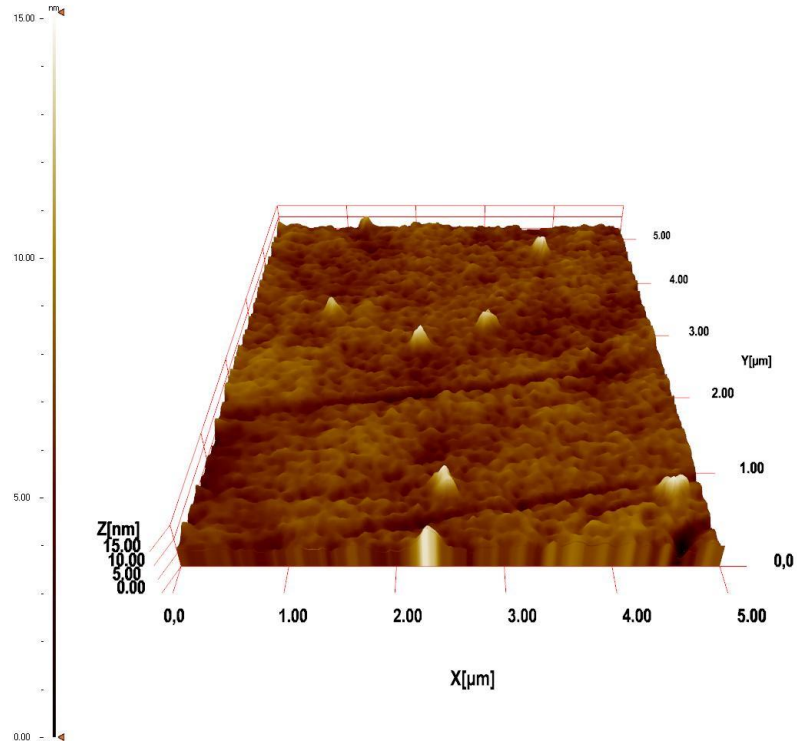
Şekil 4.10. Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensör

4.2.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

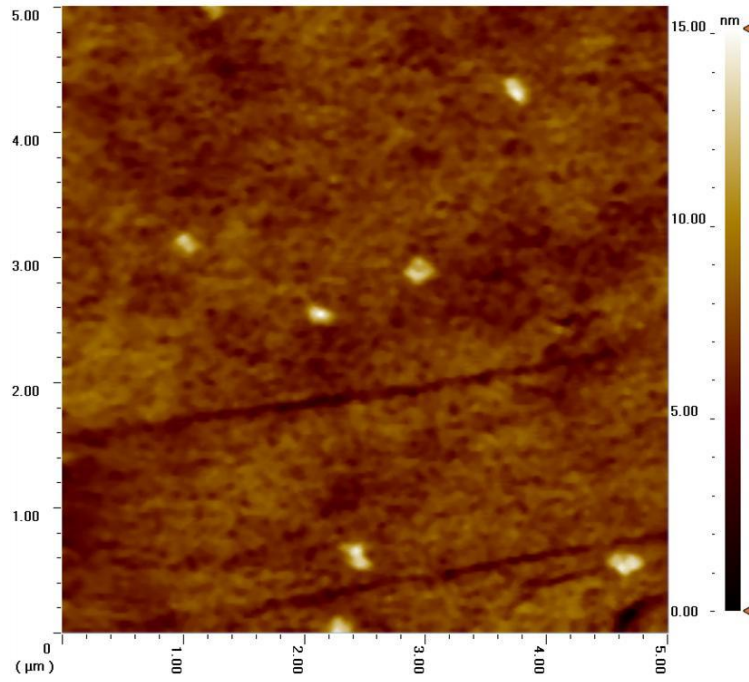
Modifiye edilmemiş QCM sensörün ve yüzeyinde p(HEMA) partiküllerin bulunduğu QCM nanosensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş modifiye edilmemiş QCM sensörün yüzey derinliği, 10.01 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Transferrin modifiyeli p(HEMA) partiküllü QCM nanosensörün ortalama pürüzlülüğü 59.95 nm (Şekil 4.10) ve transferin modifiyesiz p(HEMA) partiküllü nanosensörün ortalama pürüzlülüğü 41.05 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; p(HEMA) nanopartiküllerin QCM altın yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. Yüzeyine p(HEMA) partiküllerin tutunmuş olduğu QCM nanosensörlerin yarı değen modda AFM görüntüleri Şekil 4.10. ve 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. Atomik kuvvet mikroskop sonuçları

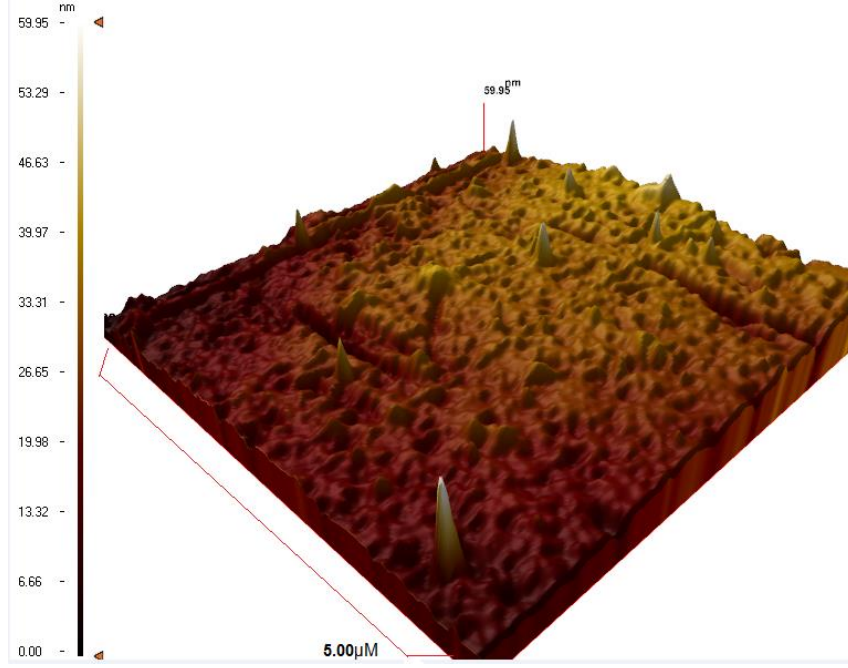
Yüzey	Derinlik, nm
Modifiye edilmemiş altın yüzey	10 nm
Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensör	59.95 nm
Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensör	41.05 nm



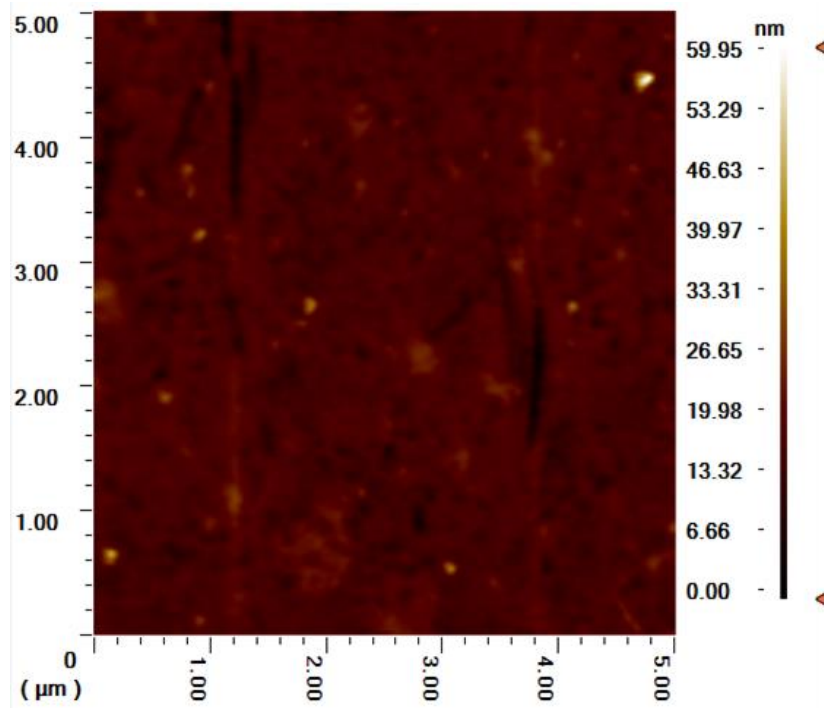
Şekil 4.11. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü



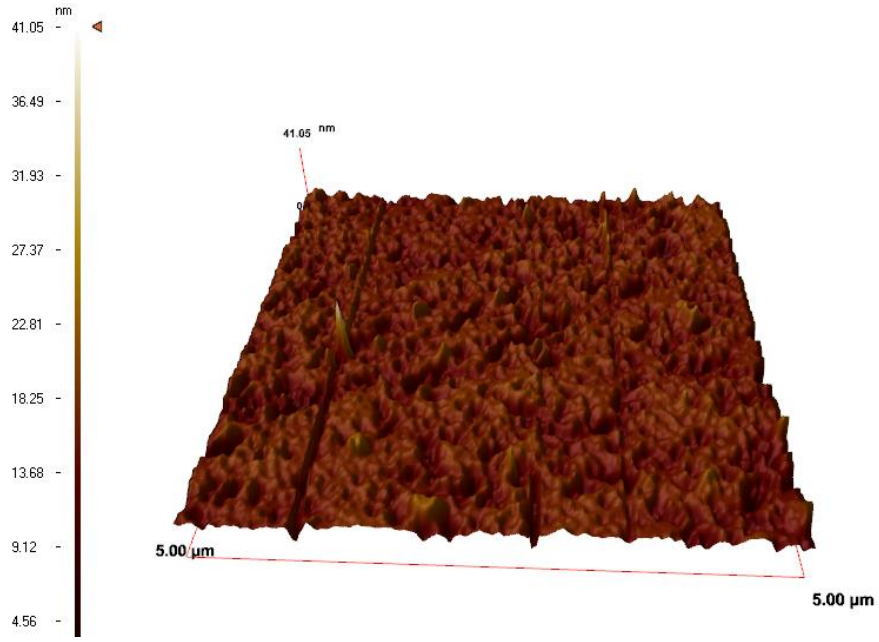
Şekil 4. 1. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü



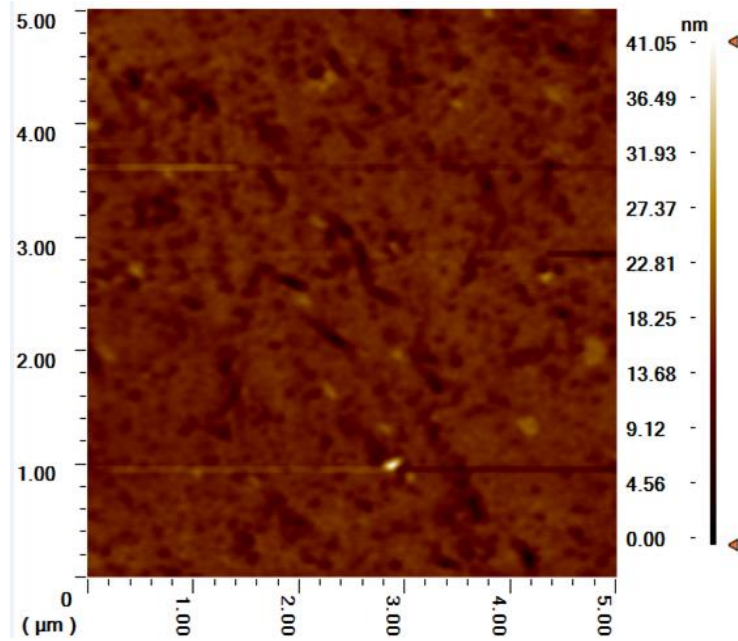
Şekil 4. 2. Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü



Şekil 4. 3. Transferrinli p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü



Şekil 4. 4 Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü

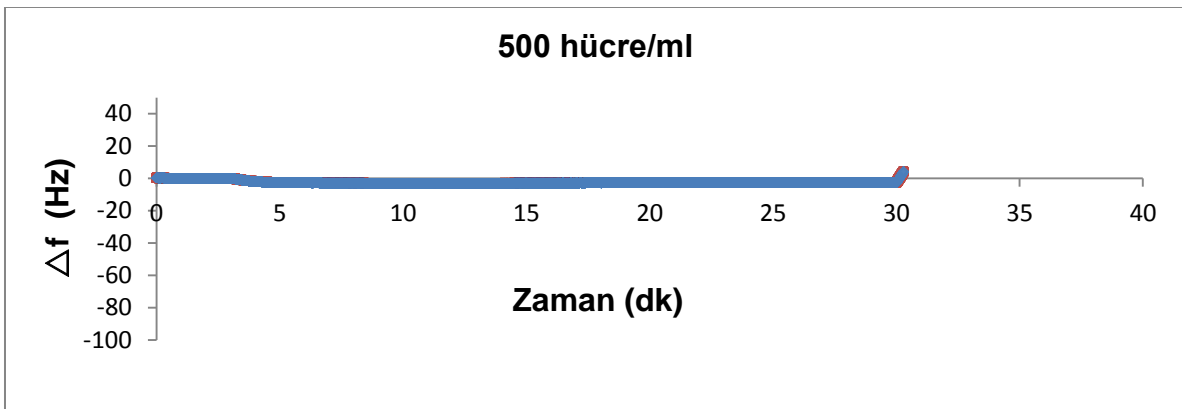


Şekil 4. 5. Transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü

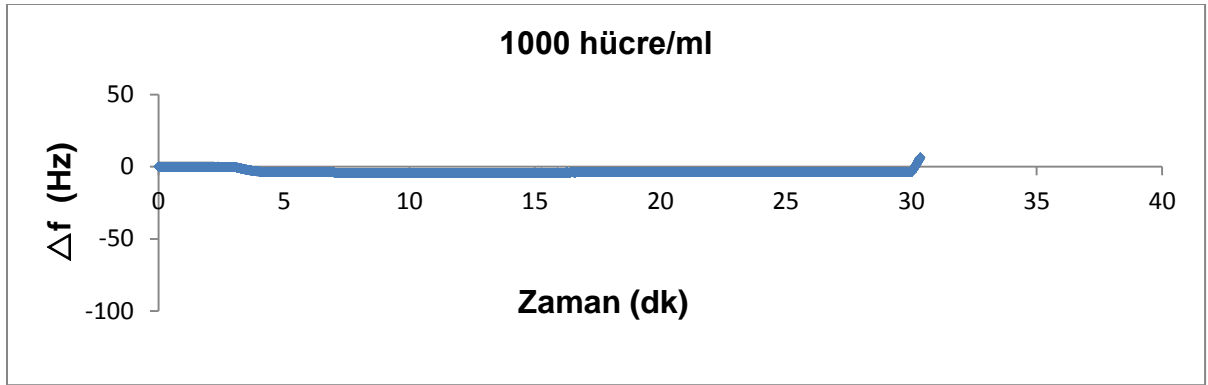
4.3. QCM Nanosensörlerle Kinetik Analizler

Bu çalışma kapsamında seçici MDA-MB-231 invaziv meme kanseri hücresi için, yüzeyinde transferrin ile modifiye edilmiş p(HEMA) partiküllerin bulunduğu QCM sensörler hazırlanmıştır. QCM sinyali ile MDA-MB-231 meme kanseri hücresi derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için farklı derişimlerde, 500 hücre/ml- 125.000 hücre/ml aralığında hücre çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığı ile QCM sensörlerle etkileştirilmiştir. RQCM (Maxtek) yazılımı elde edilen veriler eş zamanlı olarak izlenmiş ve kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.15'te farklı derişimlerdeki MDA-MB-231 hücre çözeltilisinden elde edilen sensorgramlar verilmiştir.

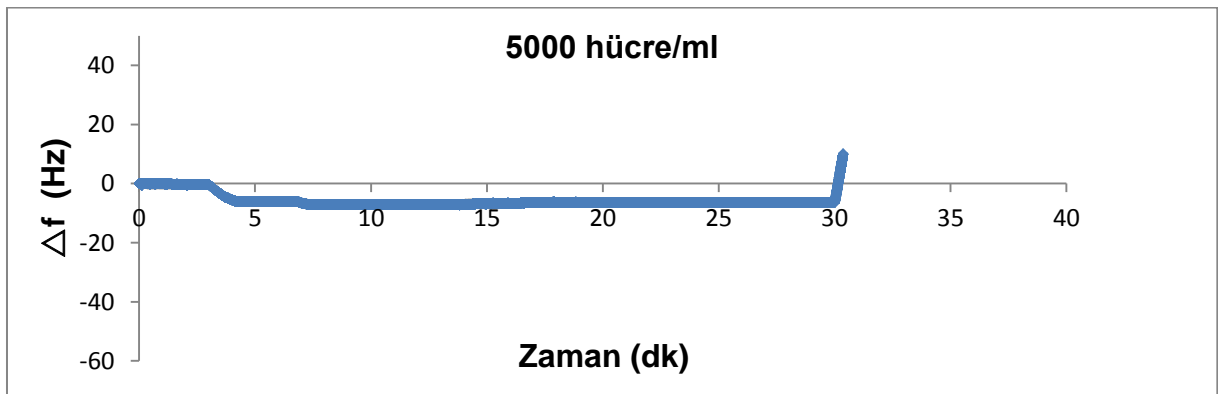
Şekil 4.17'de farklı derişimlerde MDA-MB-231 hücre çözeltilisinin sensöre uygulanmasıyla elde edilen zamana karşı Δf değişim değerini gösteren ve Şekil 4.18'de zamana karşı Δm değişim değerini gösteren grafikler verilmiştir. Bu şekilde farklı derişimlerde MDA-MB-231 hücre çözeltilerine ait tüm grafikler birlikte verilmiştir. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle denge tamponu (3 dakika süresince), daha sonra, sistem yeniden dengeye ulaşana kadar hücre çözeltilisi geçirilmiş (yaklaşık 30 dk süresince) ve son aşamada desorpsiyon çözeltilisi kullanılmıştır (yaklaşık 15 dakika süresince). Tüm ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 60 dakika beklenmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi artan derişimle birlikte sensorgramdaki Δf (Δm) değişimleri doğru orantılıdır.



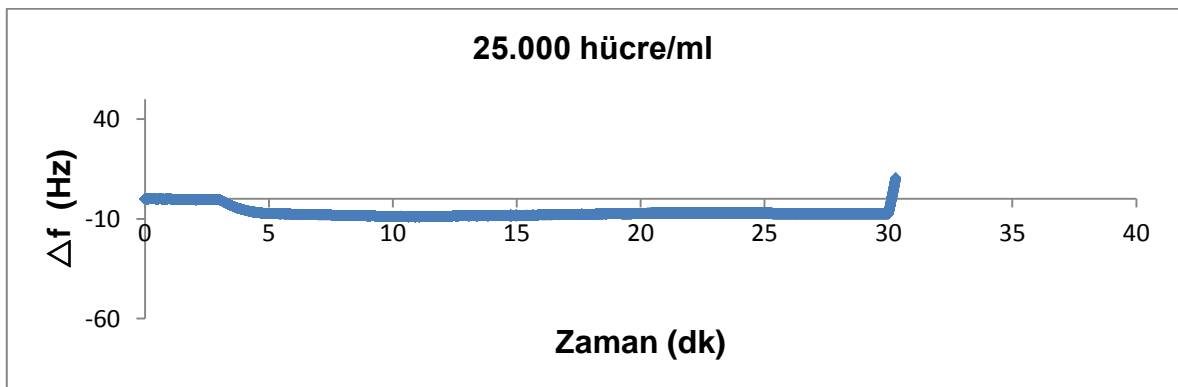
(a)



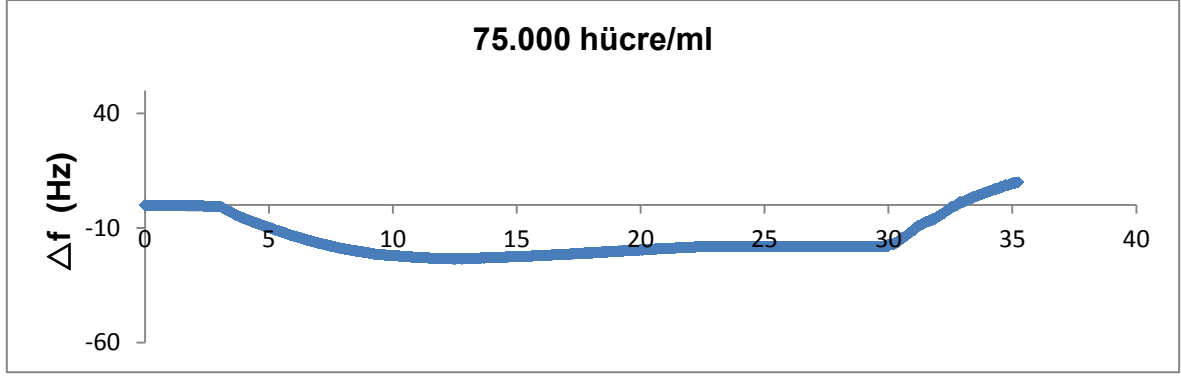
(b)



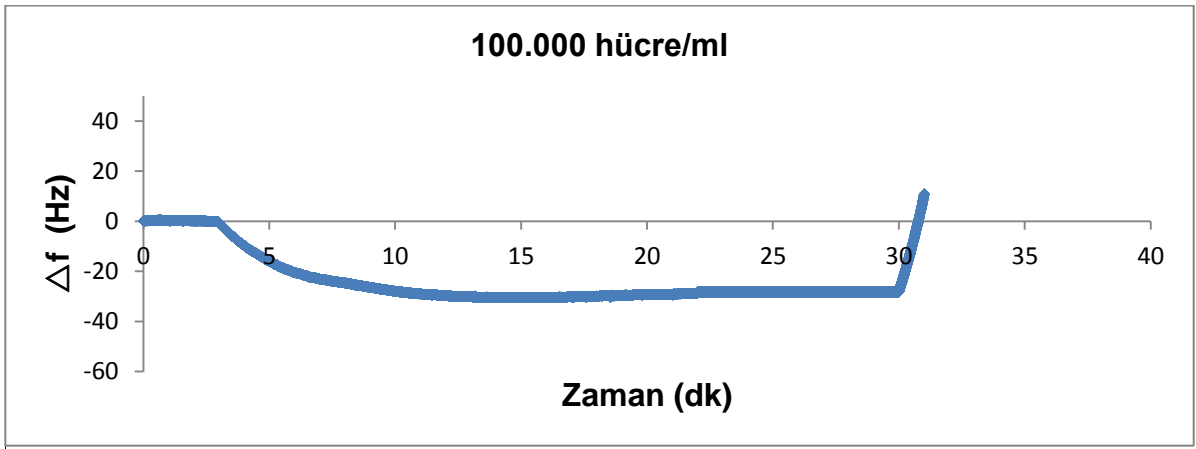
(c)



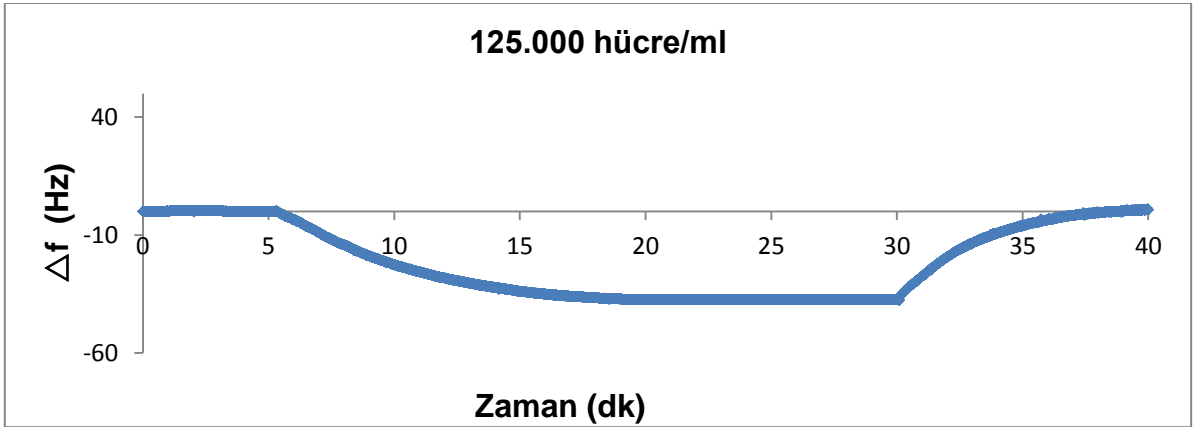
(d)



(e)

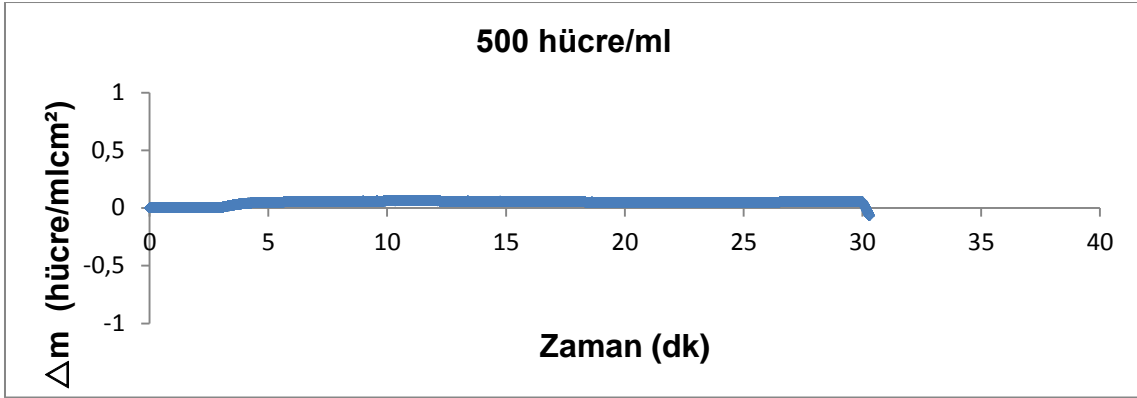


(f)

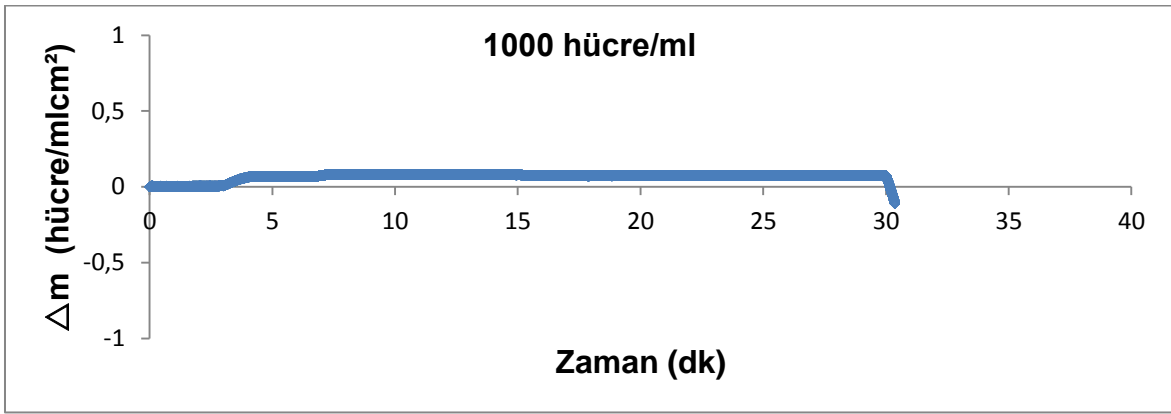


(g)

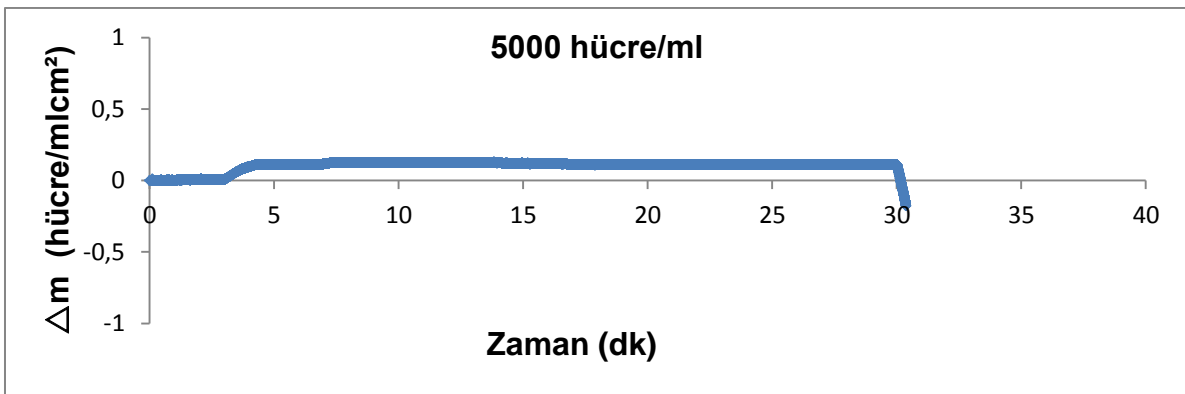
Şekil 4. 6. MDA-MB-231 meme kanseri hücre çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgramlar. (a) 500 hücre/ml (b) 1000 hücre/ml (c) 5000 hücre/ml (d) 25.000 hücre/ml (e) 75.000 hücre/ml (f) 100.000 hücre/ml (g) 125.000 hücre/ml



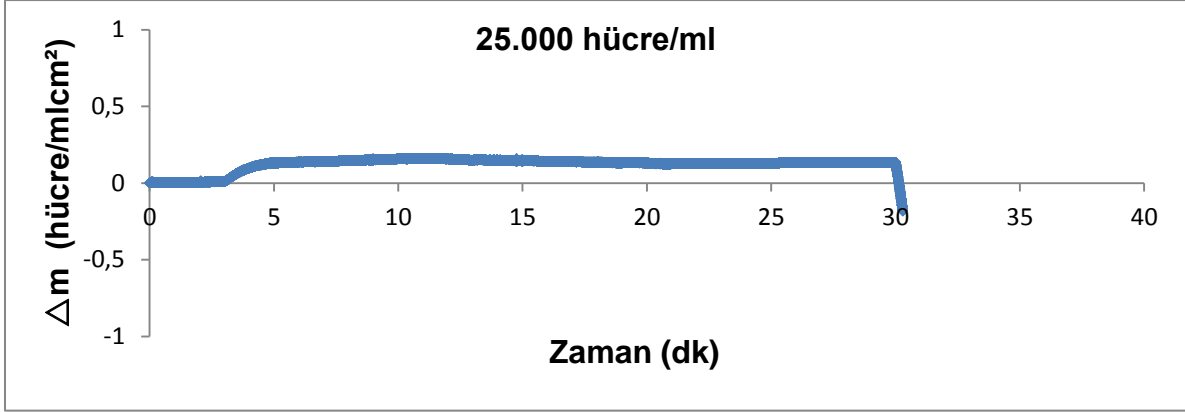
(a)



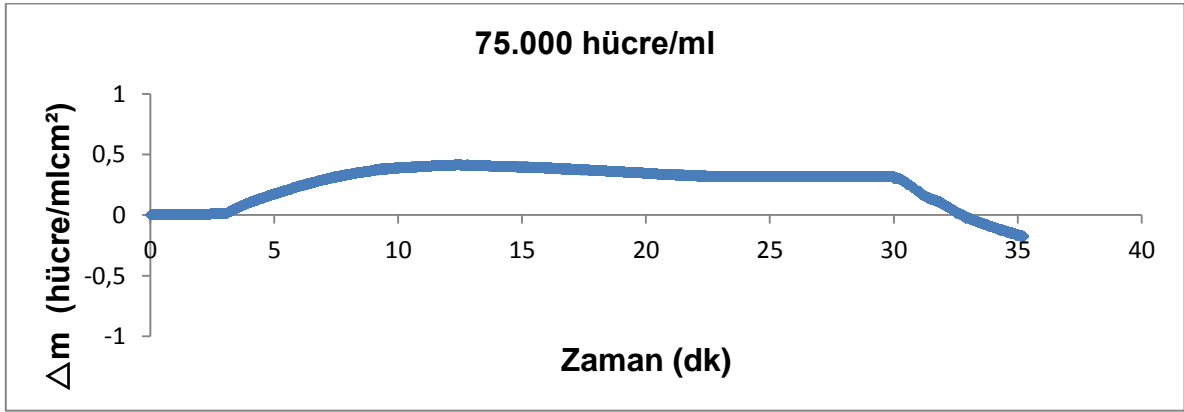
(b)



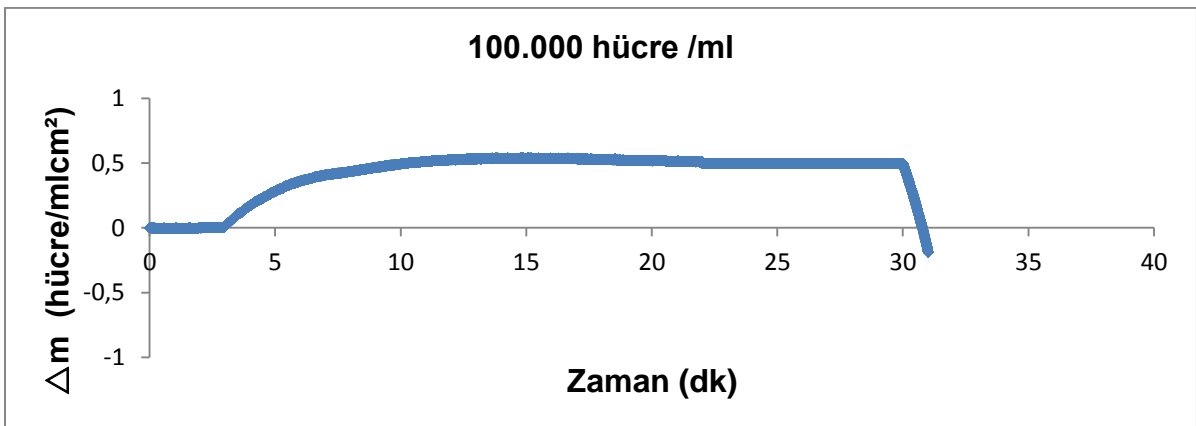
(c)



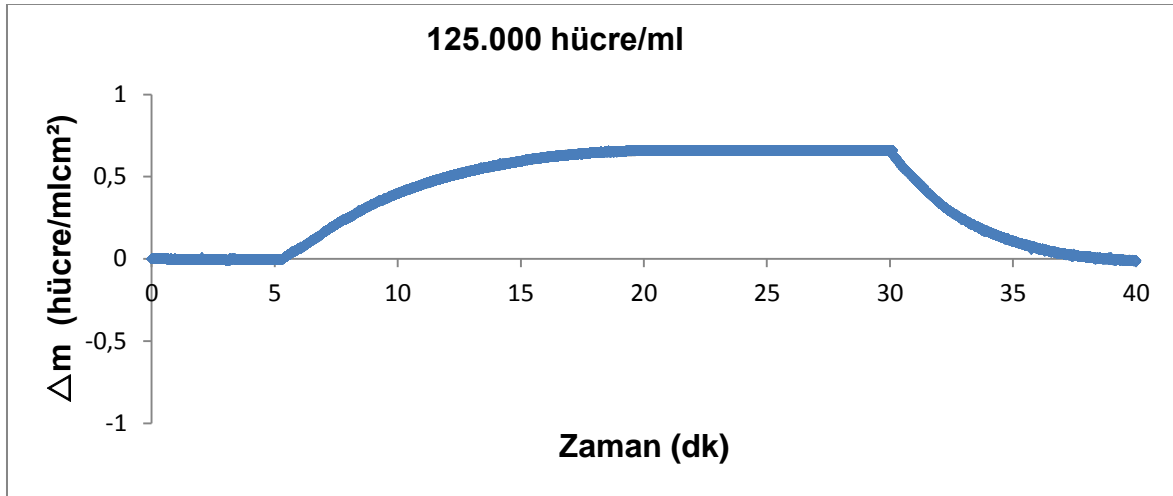
(d)



(e)

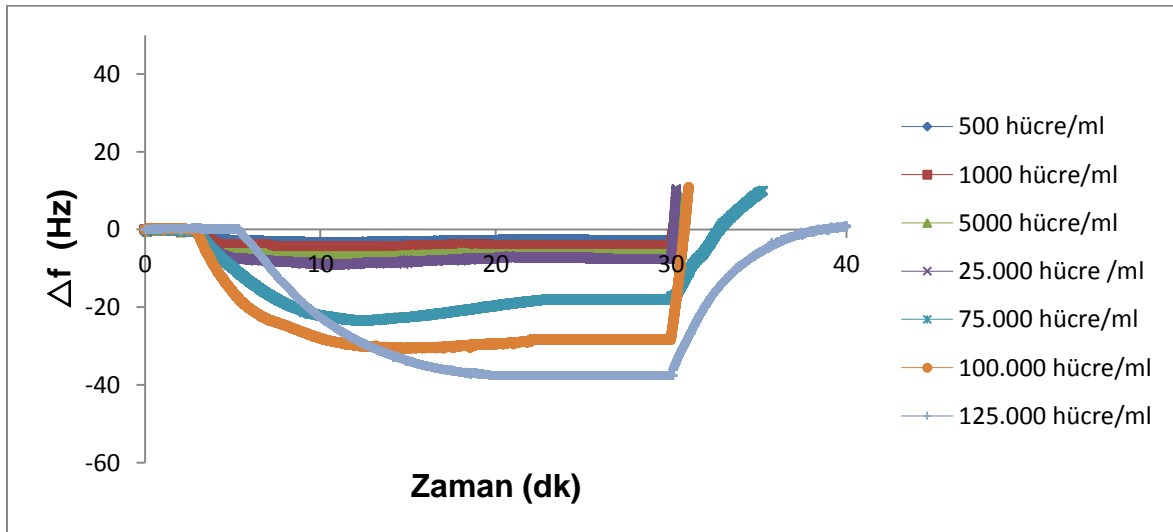


(f)

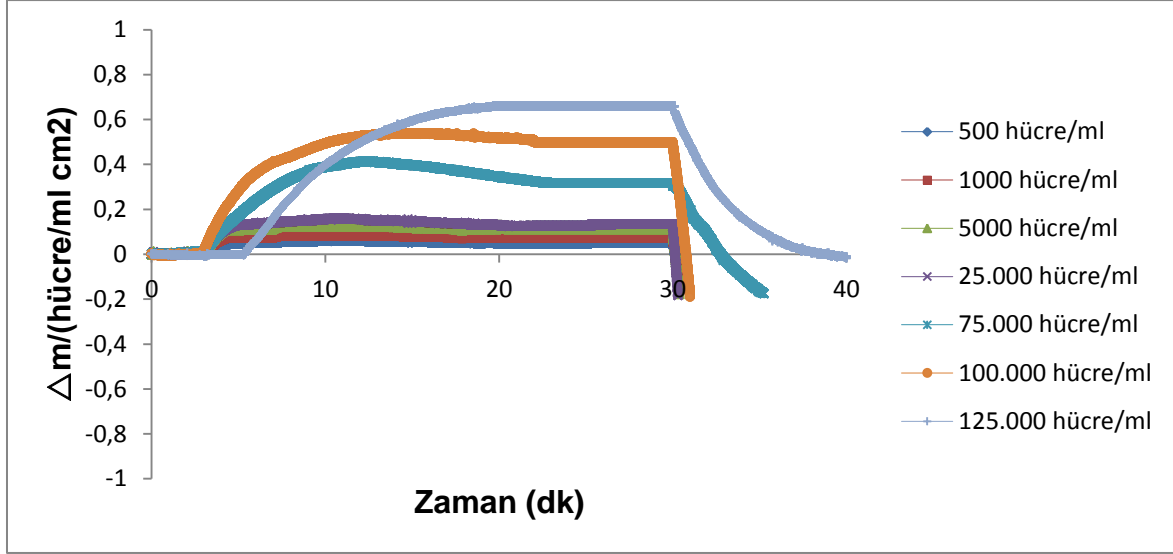


(g)

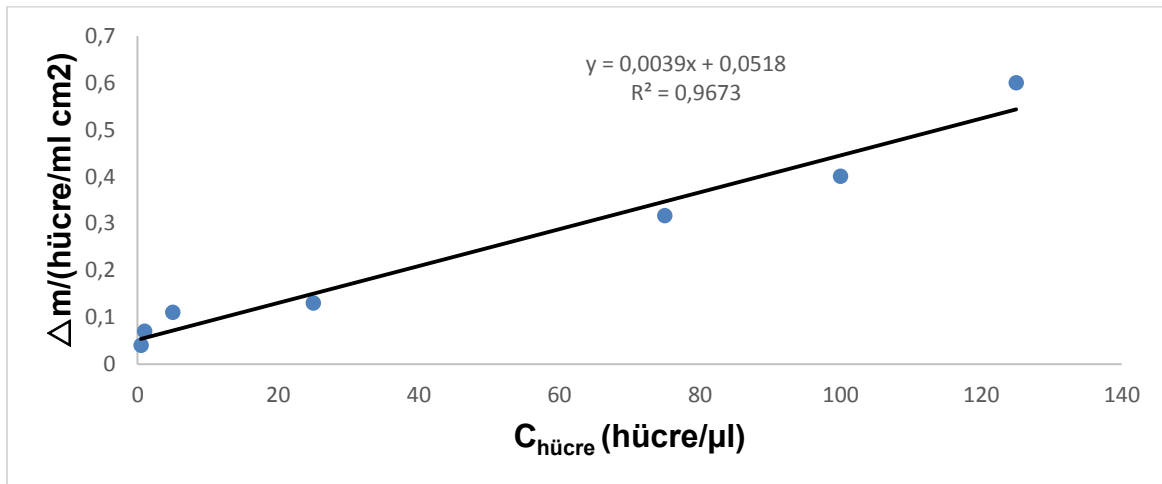
Şekil 4. 7. MDA-MB-231 meme kanseri hücre çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgramlar (a) 500 hücre/ml (b) 1000 hücre/ml (c) 5000 hücre/ml (d) 25.000 hücre/ml (e) 75.000 hücre/ml (f) 100.000 hücre/ml (g) 125.000 hücre/ml.



(a)



Şekil 4.19. MDA-MB-231 meme kanseri hücre çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgram.



Şekil 4.20. Yüzeğine transferrin ile modifiye edilmiş p(HEMA) partiküllerin tutturulduğu QCM sensörden geçirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine ait derişim ($C_{\text{hücre}}$) ile Δm arasındaki ilişki.

Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi Δm değeri artan hücre derişimiyle artmaktadır. QCM sensör 500 hücre/ml- 125.000 hücre/ml derişim aralığında derişim sinyal doğrusallığı göstermektedir. 500 hücre/ml- 125.000 hücre/ml aralığındaki alınan veriler

değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 0,0039x + 0,0518$ ve doğrusallığı (R^2) 0,96730 olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, hazırlanan QCM sensor %96 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.

Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa; diğer tüm derişim değerleri QCM sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlelenin derişime dönüştürülme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulu altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta m/dt = k_a C \Delta m_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta m \quad (4.1)$$

Burada, $d\Delta m/dt$, QCM sinyalinin derişim hızı; m ve Δm_{maks} bağlanma ile ölçülen ve kütle artışından kaynaklanan maksimum sinyal (hücre/mlcm²); C , analit derişimi (hücre/ml); k_a , bağlanma hız sabiti (hücre/mls) ve k_d , ayrılma hız sabiti (1/s)'dir.

Bağlanma sabiti K_A (hücre/ml), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır. ($K_A = k_a/k_d$).

Denge durumunda, $d\Delta m/dt=0$ alınarak eşitlikler basitleştirilir:

$$\Delta m_{denge}/C = K_A \Delta m_{maks} - K_A \Delta m_{denge} \quad (4.2)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta m_{denge}/C$ 'ye karşı Δm_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta m/dt = k_a C \Delta m_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta m \quad (4.3)$$

eşitliği elde edilir. Buradan etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta m/dt$ 'ye karşı Δm grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisinde ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer Δm_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgam kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erişirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekli olduğu için Δm_{maks} ' in deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde

bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta m/dt$ 'ye karşı Δm grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir.

$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

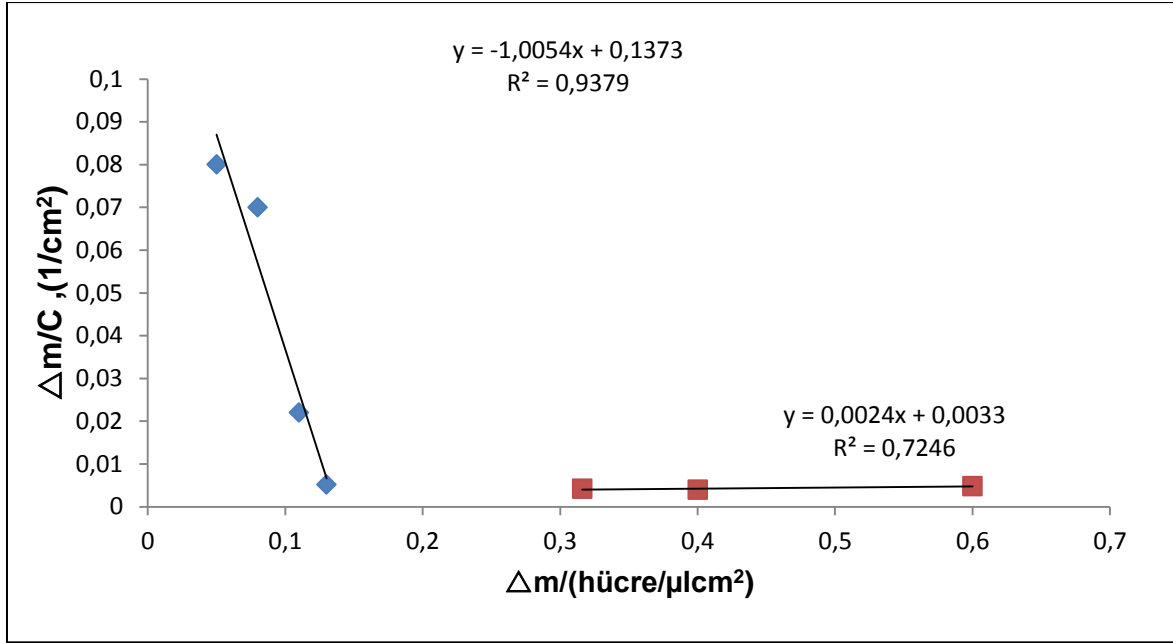
S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln (\Delta m_0 / \Delta m_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

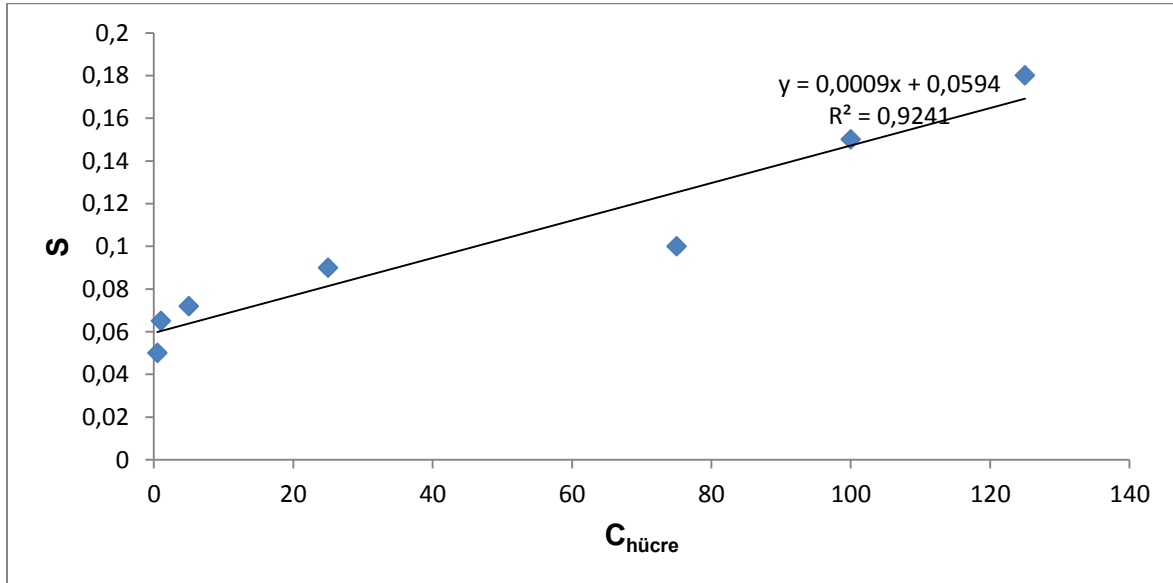
Burada; Δm_0 ve Δm_t ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki QCM sinyal değerleridir. Şekil 4.20' de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 4. 3. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
Δm_{maks}	0,12	k_a , hücre /ml s	0,0009
K_A , hücre/ml	1,005	k_d , 1 /s	0,0594
K_D , ml/hücre	0,99	K_A , hücre/ml	0,018
R^2	0,93	K_D , ml/hücre	55,55
		R^2	0,92



(a)



(b)

Şekil 4. 21. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scarthard) (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı

4.4. Denge İzoterm Modelleri

Transferrin ile modifiye edilmiş p(HEMA) partiküllü QCM sensör ile MDA-MB-231 meme kanseri hücresi arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scarthard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

Scarthard

$$\Delta m_{\text{denge}}/[C] = K_A(\Delta m_{\text{maks}} - \Delta m_{\text{denge}})$$

Langmuir

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

Freundlich

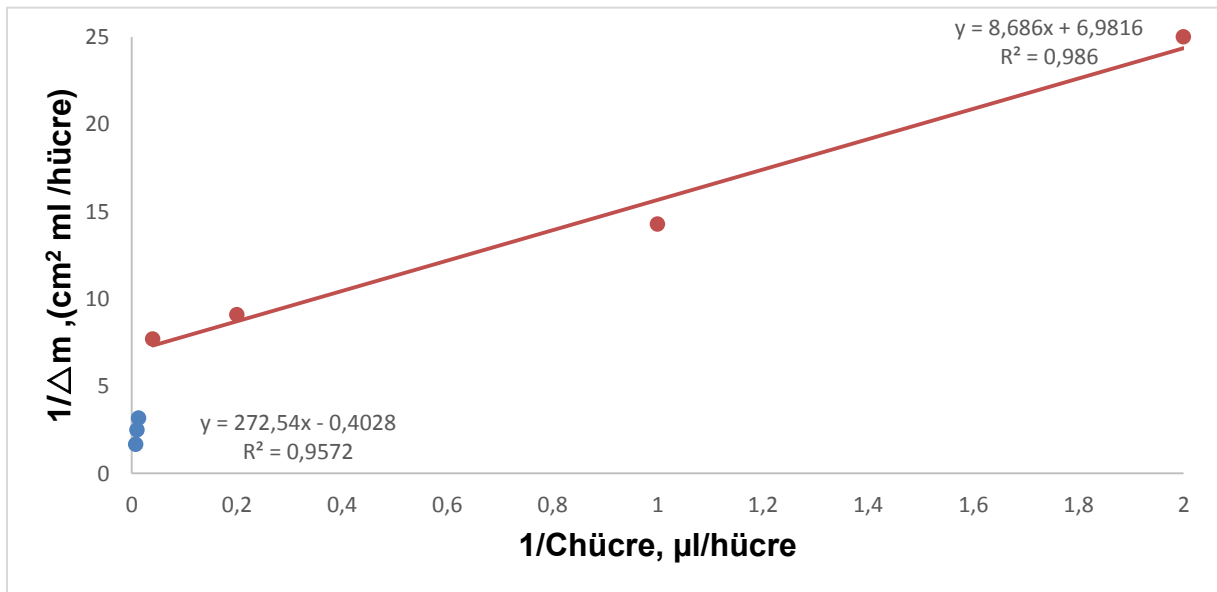
$$\Delta m = \Delta m_{\text{maks}}[C]^{1/n}$$

Langmuir-Freundlich

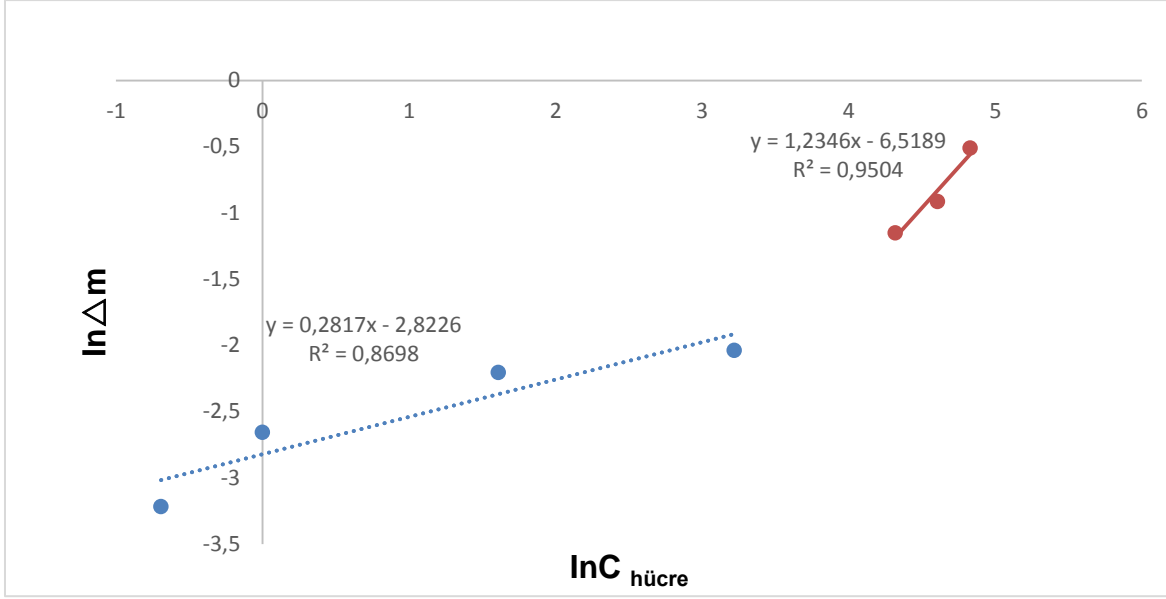
$$\Delta m = \{ \Delta m_{\text{maks}}[C]^{1/n} / K_D+[C]^{1/n} \}$$

Burada; Δm_{maks} (hücre/mlcm²), maksimum QCM sinyal kayması; Δm_{denge} , denge halindeki QCM sinyal kayması; [C], analit derişimi (hücre/ml); K_A (hücre/ml), bağlanma denge sabiti; K_D (ml/hücre), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

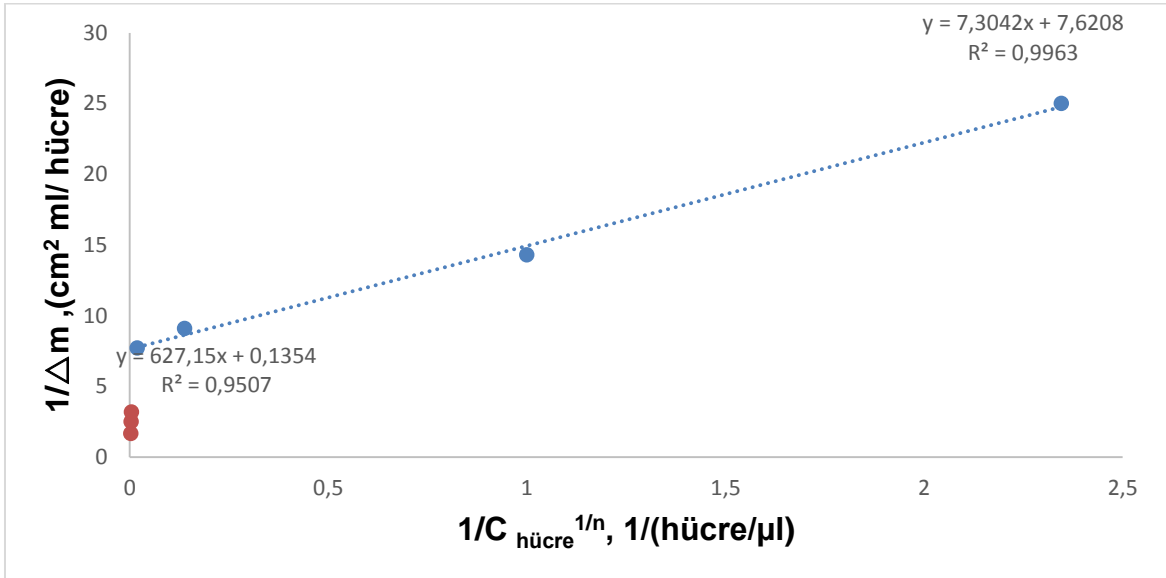
Langmuir adsorpsiyon modeli homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Şekil 4.21'de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4. 22. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich

Çizelge 4. 4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
Δm_{maks}	0,14	Δm_{maks}	1.4	Δm_{maks}	0,12
K_A , hücre/ml	0,8	1/n	1.23	1/n	0,1272
K_D , ml/hücre	1,21	R^2	0,95	K_A , hücre/ml	1,4
R^2	0,986			K_D , 1ml/hücre	0,7
				R^2	0,99

Şekil 4.21'e göre deneysel olarak elde edilen veriler Langmuir-Freundlich modeli ile uyumludur ($R^2 = 0.99$). Hücreler arası etkileşimler oldukça karmaşıktır. Bu model hücreler için uygunluk göstermektedir. Hem düşük hem yüksek derişimler için uygun olan bu adsorbsiyon modeli hücreler içinde oldukça uyumludur.

4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler

MCF-7 ve tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücre hatları için invaziv MDA-MB-231 hücre hattına göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.6)$$

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (ml/g); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (nM); V , kullanılan çözelti hacmini (ml) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. QCM sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin Δm ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

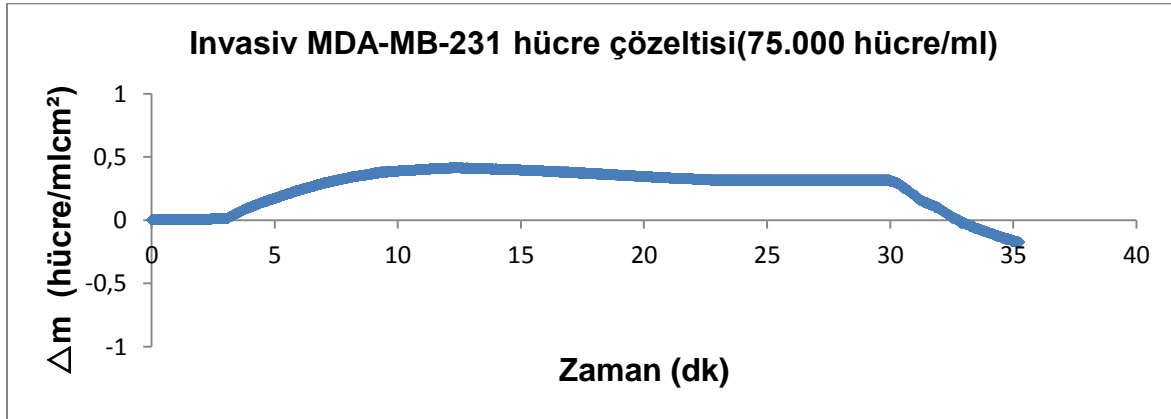
Bu durumda; seçicilik katsayısı,

$$k = \Delta m_{yüksek\ oranda\ invaziv\ hücre} / \Delta m_{invaziv} \quad (4.7)$$

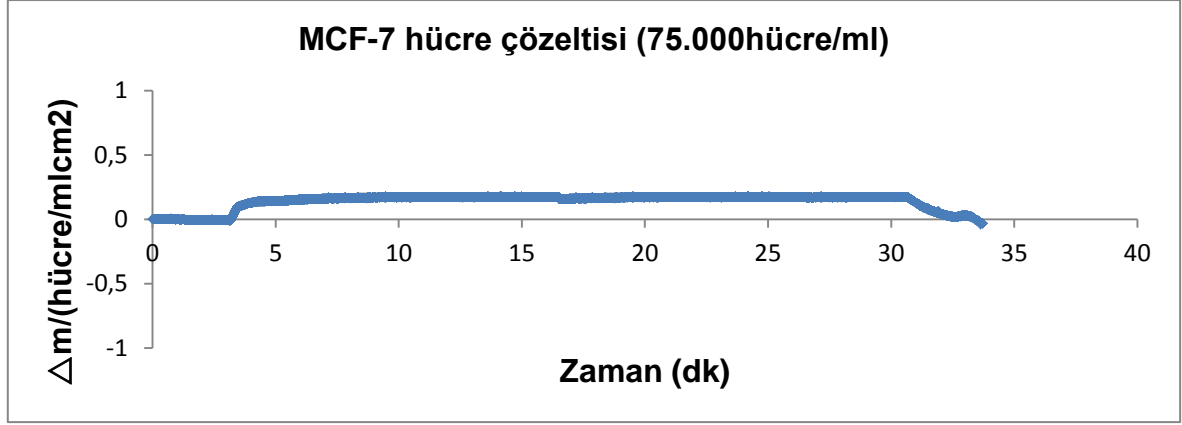
şeklinde kullanılabilir. Yüzey modifiye seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{modifiye\ edilmiş} / k_{kontrol} \quad (4.8)$$

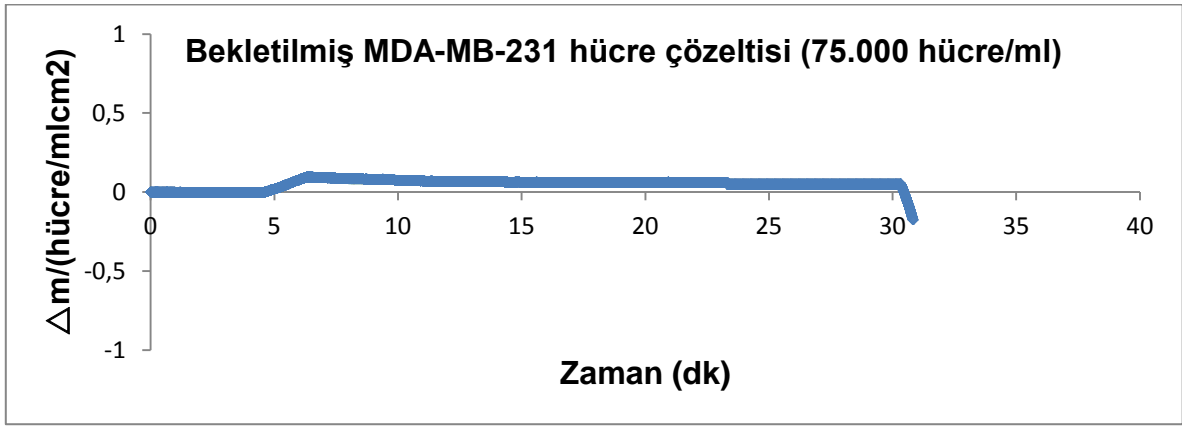
şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan transferrin modifiyeli sensörün invaziv MDA-MB-231 hücre hattına karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri MFC-7, tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 ve invaziv MDA-MB-231 hücre hatlarının çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, şekil 4.22'de Δm /zaman ilişkilerine ait sensorgramlarda görülmektedir. MCF-7 hücre hattında metastatik özellikte meme kanseri hücresi hattıdır ancak MDA-MB-231 kadar invaziv değildir. 2 gün tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücreleri ise medyundan uzaklaştıkları ve tampon içinde 2 gün bekletilmesi hücrenin yüzey yapısının etkilenmesini sağlar. Büyük olasılıkla canlılıklarını yitirmişlerdir. Bu hücrelerin transferrin ile modifiye edilmiş sensöre karşı verdiği sensorgram sinyal değerleri ise (Δm) MCF-7 için 0,17 ve bekletilmiş hücreler için 0,05'dir. Aynı derişimdeki MDA-MB-231 için elde edilen sinyal ise 0,316'dır. Bu sonuçlara göre transferrin ile modifiye edilmiş sensör MDA-MB-231 hücre hattını, MCF-7'ye göre 1,85 kat, tamponda bekletilmiş MDB-MB-231'e göre 6,32 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet, yüksek orana invaziv olan MDA-MB-231'in yüzeyindeki transferrin reseptör sayısındaki fazlalıktan kaynaklanarak, sensöre olan seçiliğini arttırdığını göstermektedir.



(a)



(b)

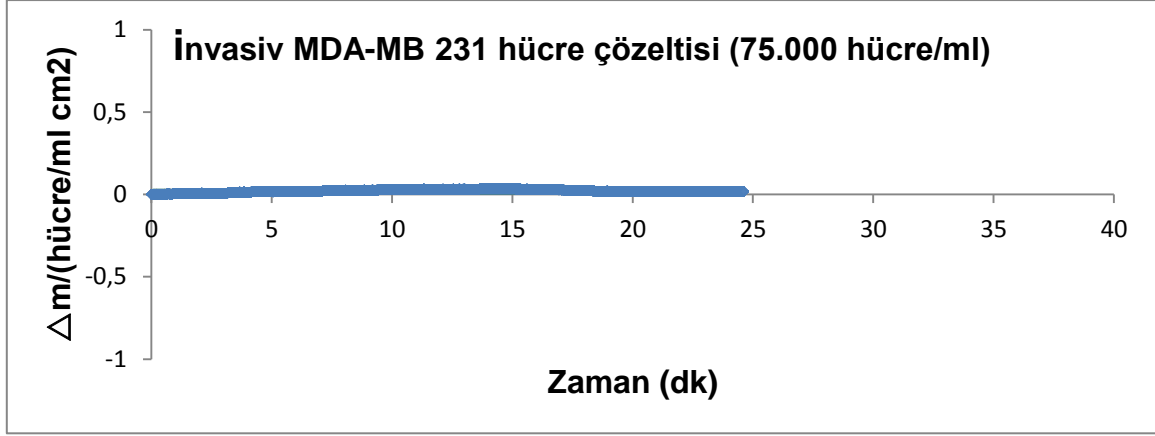


(c)

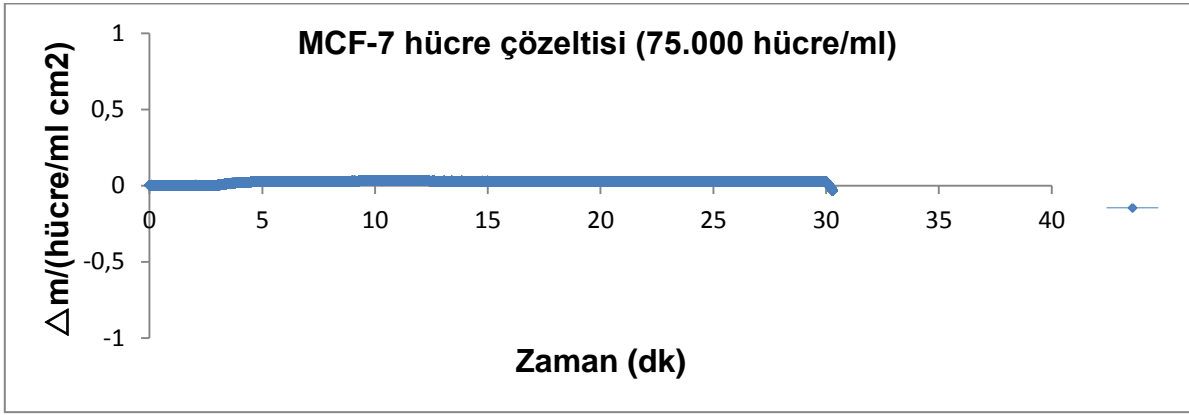
Şekil 4. 23. 75.000 hücre/ml derişimde (a) MDA-MB-231 (b) MCF-7 (c) 2 gün tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltileri ile transferrin modifiyeli p(HEMA) partiküllü QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlardır.

4.6 Nanosensörün Seçiciliğinin Belirlenmesi

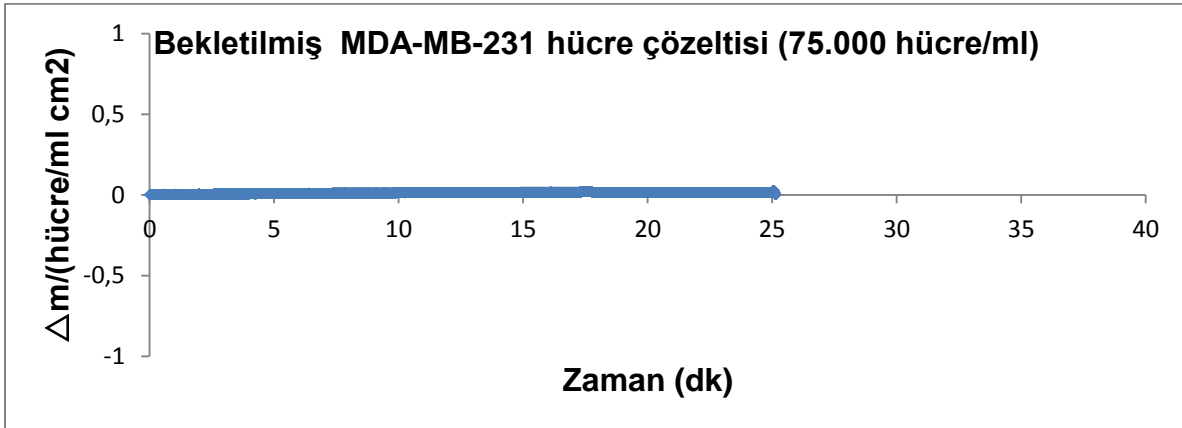
Yüzeyinde transferrin modifiyeli p(HEMA) partikül bulunan sensörün transferrinin seçiciliğini göstermek için transferrin ile modifiye edilmemiş p(HEMA) partiküllü sensör de hazırlanmıştır. 75.000 hücre/ml derişiminde hücre çözeltileri QCM sistemine gönderilmiştir. Transferrinsiz sensörün bu çözeltilere verdiği sinyal şekil 4.23'te gösterilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4. 8. 75.000 hücre/ml derişimlerde (a) MDA-MB-231 (b) MCF-7(c) 2 gün tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltilerinin transferrinsiz QCM sensörü arasındaki etkileşime ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlar.

Çizelge 4.5. MDA-MB-231 hücre hattının MCF-7 ve bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltilerine göre seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

	Transferrinli p(HEMA)		Transferrinsiz p(HEMA)		
	Δm	k	Δm	k	k'
MDA-MB-231	0,316	-	0,03	-	-
MCF-7	0,17	1,85	0,0325	0,92	2,01
Bekletilmiş MDA-MB-231	0,05	6,32	0,013	2,3	2,74

Yüzeyinde transferrin bulunmayan sensörün aynı derişimdeki MDA-MB-231, MCF-7 ve bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltileri için verdiği sensorgram sinyal değerleri (Δm) 0,03, 0,0321 ve 0,013'tür.

Şekil 4.23 incelendiğinde transferrinsiz QCM sensörün aynı derişimdeki MDA-MB-231, MCF-7 ve bekletilmiş MDA-MB-231 hücre çözeltileri için verdiği sinyal artışının oldukça az olduğu görülmektedir. Transferrinsiz ve transferrinli QCM sensörler karşılaştırıldığında MDA-MB-231 için sinyal duyarlılığının 1,85 kattan 0,92 kata düştüğü görülmektedir.

Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılması ile hesaplanan seçicilik kat sayıları MCF-7 için 1,85 (transferrinli), 0,92 (transferrinsiz) olarak bekletilmiş MDA-MB-231 için 6,32 (transferrinli), 2,3 (transferrinsiz) olarak bulunmuştur. Transferrinin seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı 2,01 (MDA-MB-231/MCF-7) ve 2,74 (MDA-MB-231/tamponda bekletilmiş MDA-MB-231) olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlara bakıldığında, yüzeyi transferrinli QCM sensör; MDA-MB-231'i MCF-7' ye göre 2,01 kat, tamponda bekletilmiş MDA-MB-231'e göre 1,68 kat seçicilikle tanımaktadır.

5. YORUM

- Etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'nın miniemülsiyon polimerizasyon reaksiyonu ile p(HEMA) nanopartiküller sentezlenmiştir.
- Sentezlenen nanopartiküller zeta boyut analizi ile karakterize edilmiştir. Nanopartiküllerin boyutu 58 nm olarak saptanmıştır. Polidispersitesi 0,229 olarak bulunmuştur. Nanopartikülün ortalama boyut dağılımındaki partiküllerin yüzdesi % 43 olarak bulunmuştur.
- QCM sensörün altın yüzeylerine p(HEMA) nanopartiküller tutturulmuştur. Sensör yüzeyine tutturulan p(HEMA) nanopartiküller transferrin ile modifiye edilmiştir. Sensörün altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. FTIR-ATR spektrumunda 1107 cm^{-1} deki band transferrin molekülünün PHEMA'nın yapısına katılması sonucu oluşan ester grubundaki C-O-C gerilme bandına aittir. HEMA molekülüne ait 1730 cm^{-1} deki (-C=O) gerilme bandı yapıya transferrin bağlanması sonucu 1654 cm^{-1} ne kaymıştır. Ayrıca $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ deki HEMA molekülüne ait hidroksil (-OH) grubunun sinyal şiddeti yapıya transferrin katılımından kaynaklanan artan -OH ve -NH gruplarının sayısı ile artmaktadır. Bu durum transferrin proteininin p(HEMA)'nin yapısına katıldığını göstermektedir.
- Modifiye edilmemiş, transferrin ile modifiye edilmiş p(HEMA) partiküllü ve yalnızca p(HEMA) nanopartikül tutturulmuş QCM sensörün yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş QCM sensörün yüzey derinliği 10 nm olarak belirlenmiştir. Transferrinli ve transferrinsiz p(HEMA) nanopartiküllü QCM sensörün yüzey derinlikleri sırasıyla 58 nm ve 41 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; nanopartiküllerin yüzeye başarılı bir şekilde kaplandığını ve p(HEMA) nanopartiküllerin transferrin ile modifiye olduğunu ve proteinlerin yüzeyi kapladığını göstermektedir.

- Transferrinli ve transferrinsiz p(HEMA) partiküllü QCM sensörlerin ortalama yüzey kalınlıkları elipsometre cihazı ile incelenmiştir ve ortama kalınlık değerleri sırasıyla 64.2 nm ve 59.1 nm olarak hesaplanmıştır.
- Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş QCM sensör yüzeyinin temas açısı değeri 84°, p(HEMA) nanopartikül tutturulmasıyla 78.3° ve p(HEMA) nanopartiküller transferrin ile modifiye edilince 73.6° ye düşmüştür.
- Yüzey temas açısının önemli miktarda düşmesi yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; nanopartikül sentezinde HEMA monomeri kullanılmıştır. HEMA'nın yapısındaki hidroksil grubundan dolayı hidrofilik karaktere sahiptir. Bu sebeple, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını artırmış ve temas açısı değerini de düşürmüştür. Nanopartiküllerin yüzeyinin transferrin ile modifiye edilmesi hidrofilitesi artırmış ve temas açısı değeri daha düşük olmuştur.
- Transferrin ile modifiye edilmiş QCM sensörlerle değişik derişimlerde invaziv insan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'den hazırlanmış hücre çözeltileri etkileştirilmiştir. Derişimdeki artış ile birlikte Δm değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak çözeltili hücre ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.
- Δm 'ye karşılık zaman grafikleri birlikte çizildiğinde elde edilen sensorgramlar daha kolay incelenebilmektedir. Hücre derişimi artıkça Δm değerinin de arttığı daha açık şekilde belirlenmiştir
- QCM sensör tek derişim aralığında doğrusallık göstermektedir. 500 hücre/ml-125.000 hücre/ml aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun dekleme $y = 0,0039x + 0,0518$ ve doğrusallığı $R^2 = 0,9673$ olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, hazırlanan QCM sensörün 500 hücre/ml-125.00 hücre/ml derişim aralığında % 96,7 doğrusallıkla ölçüm yapmaktadır.
- Langmuir- Freundlich modelinin hazırlanan sensörlere en uygun izoterm modeli olduğu görülmüştür. Buradan hesaplanan Δm_{maks} değeri deneysel

değere (0,12) oldukça yakındır. Langmuir-Freundlich denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 1.4 hücre/ml ve 0.17 ml/hücre dir.

- Hazırlanan transferrin ile modifiye edilmiş sensörün invaziv MDA-MB-231 hücrelerine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri MCF-7 ve 2 gün tampon çözeltisinde bekletilmiş (medyumdan yoksun bırakılmış) hücrelerin çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Transferrin modifiye edilmiş sensörlerin MCF-7 ve bekletilmiş MDA-MB-231 hücrelerine verdiği sensorgram sinyal değerleri (Δm) sırasıyla 0,17 ve 0,05'dir. Aynı derişimdeki invaziv MDA-MB-231 için elde edilen sinyal değeri ise 0,316'dir. Bu sonuçlara göre transferrin ile modifiye edilmiş sensör invaziv MDA-MB-23'e e, MCF-7'ye göre 1.85 kat, bekletilmiş MDA-MB-231'e göre 6.32 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet, yüksek invaziv potansiyeli olan MDA-MB-231 hücre hattının diğer hücrelere göre daha fazla bölünme isteği ve bu yüzden hücre yüzeyindeki transferrin reseptörlerinin fazlalığı, sensör yüzeyindeki transferrine olan afiniteyi arttırmıştır.
- Transferrin ile modifiye edilmiş sensörün transferrinin sağladığı seçiciliğini göstermek için transferrin ile modifiye edilmemiş yalnızca p(HEMA) partiküllerin bulunduğu sensör de hazırlanmıştır. 75.000 hücre/ml derişimindeki invaziv MDA-MB-231, MCF-7 ve medyumdan yoksun bırakılmış MDA-MB-231 hücre çözeltileri QCM sistemine gönderilmiştir. Transferrin ile modifiye edilmemiş QCM sensörün aynı derişimdeki hücre çözeltilerine verdiği sinyal artışının oldukça az olduğu görülmektedir. Eşitlik 4;7 ve 4.8 kullanılmasıyla hesaplanan seçicilik katsayıları MCF için 1,85 (transferrinli), 0,92 (trasferrinsiz) olarak ve tamponda bekletilmiş MDA-MB-231 için 6,32 (transferrinli), 2,3 (transferrinsiz) olarak bulunmuştur. Transferrinin sağladığı seçiciliği gösteren bağıl seçicilik kat sayısı 2,01 (invaziv MDA-MB-231/ MCF7) ve 2.74 (invaziv MDA-MB-231/ tamponda bekletilmiş MDA-MB-231) olarak hesaplanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Cancer Facts & Figures 2010, *American Cancer Society*, 16.10.2011. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>.
- [2] Giuliano, A.E., Breast disorders. *Current Medical Diagnosis & Treatment*, 48th ed., McGraw-Hill Companies, Inc. USA, pp. 630-654, 2009.
- [3] No:240. <https://apps.who.int/inf-fs/en/fact240.html>.
- [4] Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı (Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü) 2005 Yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri. ketem.org/istatistik.php. (Haziran,2010)
- [5] Ruimin Wang, Jing Di, Jie Ma, Zhanfang Ma**Electrochimica Acta* 61 (2012) 179– 184)(.(A. Subramanian, J. Irudayaraj, T. Ryan, A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7, *Biosens.Bioelectron.* 21 (2006) 998–1006.[7] A.D.
- [6] Taylor, J. Ladd, Q.M. Yu, S.F. Chen, J. Homola, S.Y. Jiang, Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 752–758.[8]

- [7] V. Koubová, E. Brynda, L. Karasová, J. Škvor, J. Homola, J. Dostálek, P. Tobišská, J. Rošický, Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors, *Sens. Actuators, B: Chem.* 74 (2001) 100–105.[9]
- [8] A.A. Yanik, M. Huang, O. Kamohara, A. Artar, T.W. Geisbert, J.H. Connor, H. Altug, An optofluidic nanoplasmonic biosensor for direct detection of live viruses from biological media, *Nano Lett.* 10 (2010) 4962–4969.
- [9] Iron homeostasis in breast cancer Oriana Marques a,b,c,†, Berta Martins da Silva a,b, Graça Porto b,c,d, Carlos Lopes b,e, *Cancer Letters* 347 (2014) 1–14
- [10] Differences in Transferrin Response and Numbers of Transferrin Receptors in Rat and Human Mammary Carcinoma Lines of Different Metastatic Potentials Takatoshi Inoue, Philip G. Cavanaugh, Peter A. Steck, Nils Brunner, Nd Garth 1. Nicolson* Departments of Tumor Biology (T./., P.C.C., P.A.S., C. 1. N.) and Neuro-Oncology (P.A.S.), The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030; and Finsen Laboratory (N.B.), Copenhagen 2 100, Denmark *Journal Of Cellular Physiology* 156:212-217 (1993)
- [11] Van Leeuwen-Stok EA; Jonkhoff AR; Visser-Platier AW; Drager LM; Teule GJ; Huijgens PC; Schuurhuis GJ.(1998): *Cell cycle dependency of 67gallium uptake and cytotoxicity in human cell lines of hematological malignancies.* *Leuk Lymphoma*, 31(5-6):533-44 Nov.
- [12] Kube D; Vockerodt M; Weber O; Hell K; Wolf J; Haier B; Grasser FA; Muller-Lantzsch N; Kieff E; Diehl V; Tesch H. (1999): *Expression of epstein-barr virus nuclear antigen 1 is associated with enhanced expression of CD25 in the Hodgkin cell line L428.* *J Virol*, 73(2):1630-6 Feb.
- [13] Bhuiyan ZA; Yatsuki H; Sasaguri T; Joh K; Soejima H; Zhu X; Hatada I; Morisaki H; Morisaki T; Mukai T.(1999): *Functional analysis of the*

p57KIP2 gene mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. Hum Genet, 104(3):205-10 Mar.

- [14] M. Lacroix, Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells, *Endocr. Relat. Cancer* 13 (2006) 1033–1067.
- [15] Baloğlu, E., 2001, *Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Analogs*, Doktor of Philosophy in Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University
- [16] Monninkhof, E.,M., Elias, S.,G., Vlems, F.,A., van der Tweel, I., Schuit, A.,J., Voskuil, D.,W., van Leeuwen, F.,E., TFPAC., 2007. Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology*, Vol. 18, no. 1, pp. 137-157)
- [17] Tavassoli FA: *Pathology of the breast*. 2 nd ed. Stamford: Appleton & Lange, 1-74:301-436,1999
- [18] Tavassoli, F.A., Devilee, P. (2003), "World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs," Lyon IARC Press, 227-228
- [19] Aydıntuğ, S. (2004), "Meme Kanserinde Erken Tanı," *STED.*, 13 (6), 226-229. Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kumar, M.N. (2006), "Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(1), 206-210.
- [20] Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 1: 149-61. 2. Induced abortion does not increase breast cancer risk. WHO Information Fact Sheets. No:240. <https://apps.who.int/inf/fs/en/fact240.html>. 15.06.2010. 3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2010. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>. 16.10.2011.
- [21] Beral ve diğ., 2003; Reeves ve diğ., 2007; Monninkhof ve diğ., 2007 Beral, V., 2003. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, Vol. 362, pp. 419-427

- [22] Bottorff J.L., Johnson J.L. Bhagat R., Grewal S., Balneaves L.G., Clarke H., Hilton B.A. (1998) Beliefs Related to Breast Health Practices: The Perceptions of South Asian Women Living in Canada. *Social Science and Medicine*;47(12):2075-2085.
- [23] Bentley J.R., Delfino R.J., Taylor T.H., Howe S., Anton-Culver H. (1998) Differences in Breast Cancer Stage at Diagnosis Between Non-Hispanic White and Hispanic Populations, San Diego County 1988-1993. *Breast Cancer Research and Treatment*;50:1-9
- [24] Vatten L.J. (1991) Can Breast Cancer be Prevented? *Tidsskr Nor Laegeforen* (Article in Norwegian) May 30;111(14):1745-1748.
- [25] Matsui W., Breast Cancer, <http://www.nlm.nih.gov> (May 15 2002)
- [26] Campbell J.B. (2002) Breast Cancer-Race, Ethnicity, and Survival: A literature Review. *Breast Cancer Research and Treatment*;74:187-192
- [27] Bentley J.R., Delfino R.J., Taylor T.H., Howe S., Anton-Culver H. (1998) Differences in Breast Cancer Stage at Diagnosis Between Non-Hispanic White and Hispanic Populations, San Diego County 1988-1993. *Breast Cancer Research and Treatment*;50:1-9
- [28] Sasco A.J. (2000) Screening for Cancer: What's New? *Bulletin du Cancer* (Article in French);87(3):239-243.
- [29] Salih A.K., Fentiman I.S. (2002) 14. Breast Cancer Prevention. *International Journal of Clinical Practice* May;56(4):267-71
- [30] Wang D.Y., DeStavola B.L., Allen D.S., Fentiman I.S., Bulbrook R.D., Hayward J.L., Reed M.J. (1997) Breast Cancer Risk is Positively

Associated with Height. Breast Cancer Research and Treatment;43:123-128.

- [31] Remennick L.I. (1999) Preventive Behavior Among Recent Immigrants: Russian Speaking Women and Cancer Screening in Israel. Social Science and Medicine;48:1669-1684.
- [32] Clavel-Chapelon F., Gerber M. Reproductive Factors and Breast Cancer Risk. Do They Differ According to Age At Diagnosis? Breast Cancer Research and Treatment;72:107-115 (2002)
- [33] Clavel-Chapelon ve Gerber, 2002; Matsui, 2002; Ülgey, 1999
- [34] Ünver, S., *Meme Kanserinde Doku Ferritin Düzeyinin Standart Prognostik Parametrelerle Korelasyonu ve Prognostik Önemi*, Uzmanlık Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul, 1998
- [35] M.W. Hentze, L.C. Kuhn, Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 8175–8182.
- [36] Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., (Gale, T., Lakhani, S.R. (2005), "Molecular evolution of breast cancer," *The Journal of Pathology*, 205(2), 248-54
- [37] Clark G.M., Sledge JR G.W., Osborne, C.K., McGuire, W.L."Survival from first recurrence: relatif importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patient," *J Clin Oncol.*, 5, 55-61 (1987).
- [38] Henderson. I.C., Harris, J.R., Kine, D.W., Hellman, S. "Cancer of the Breast," *Cancer Principles and Practice of Oncology*, (Ed: Devita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A.), JB Lippicott Company, Philadelphia, 1197-1268 (1989).

- [39] Schneider, A., Schulz-Schaeffer, W., Hartmann, T., Schulz, J.B., Simons, M. "Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons," *Neurobiology of Disease*, 23(3), 573-577 (2006).
- [40] İnanç, S. "Meme Kanserinin Doğal Seyri ve Prognostik Faktörler," *Meme Kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi*, (Ed: Topuz, E.), İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 72-101 (1997).
- [41] National Health Services Breast Screening Programmes. <http://cancerscreening.org.uk/breastscreen>
- [42] Demirtaş T. (1995) Meme Kanserinin Erken Tanısında Kendi Kendine Meme Muayenesinin Önemi ve Meme Kanseri Hakkında Üniversitemiz Medikal ve Paramedikal Son Sınıf Kız Öğrencilerinin Bilgi Düzeylerinin Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemşirelik Ana Bilim Dalı, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Erzurum
- [43] Bartelink H., Benz C., Cleveland D., Dorn R., Gralow J., Gradishar W.J., Grant K., Heimann R., Hellman S., Hudis C., Kerbel R., Lippman M., Lung J., Posner M.C., Steeg P., Vestal R., Weichselbaum R.R., Zetter B. (2003) "Expedition Inspiration Fund for Breast Cancer Research Meeting 2003", *Breast Cancer Research and Treatment*;80: 139-144
- [44] Tavassoli FA. Normal development and anomalies. In: Tavassoli FA (ed). *Pathology of the Breast*. 1st edition. Connecticut: Appleton & Lange; 1992. 1-24.59. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b NO MO). *Cancer* 1995; 76: 2266-73.60. Clayton F, Hopkins CL. Pathologic correlates of prognosis in lymph node-positive breast carcinomas. *Cancer* 1993; 71: 1780-9
- [45] Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Clin. Oncol* 2001; 19: 3817-27.63. ESMO. Minimal Clinical

Recommendation for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of primary breast cancer. *Ann. Oncol* 2001; 12: 1047-8

- [46] Lapidus RG, Nas SJ, Davidson N. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3: 85-94.65.
- [47] Değerli, Ü., Meme Kanseri. Genel Cerrahi. 6. Baskı. İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri; 1998. 288-96
- [48] Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, et al. Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1650-6
- [49] Sicles EA. Findings at mammographic screening on only one Standard projection outcomes analysis. *Radiology* 1998; 208: 471-5. 71. Lawrence WF, Liang W, Mandelblatt JS, et al. Serendipity in diagnostic imaging: magnetic resonance imaging of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1792-800.
- [50] Pettersson T, Kivivuori SM, Siimes MA: Is serum transferrin receptor useful for detecting iron deficiency in anaemic patients with chronic inflammatory diseases. *Brit J Rheum.* 1994;33:740-744.
- [51] Safi F, Kohler I, Rottinger E, et al. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 574-82.
- [52] Hacıbekiroğlu M. Meme Kanserinde Tümör Marker'lar ve Biyokimyasal Değişimler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi 2006; 54: 35 - 41.
- [53] Horgan PGR, Byrne J, O'Donoghue J, Money E, Grimes H, Given HF. Mucin-like carcinoma associated antigen (MCA) et presentation with breast cancer. *Ir j Med Sct* 1997; 166: 215-6.
- [54] Yasasever V. Tümör belirleyiciler. Topuz E (editör). Meme kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 1997. 156-70.

- [55] Gion M, Mione R, Barioli P, Sartorello P, Capitanio G. Tissue polypeptide antigen and tissue polypeptide specific antigen in primary breast cancer. Evaluation in serum and tumor tissue. *Eur J Clin Chem Biochem* 1994; 32: 779-87.
- [56] Gion M, Mione R, Becciolini A, Balzi M, Correale M, Piffanelli A, Giovannini G, Sacconi Jotti G, Fontanesi M. Relationship between cytosol TPS, TPA and cell proliferation. *Int j Biol Markers* 1994; 9: 109-14.
- [57] Formento JL, Francoal M, Formento P, Etienne MC, Fischel JL, Namer M, Frenay M, Francois E, Milano G. Epidermal growth factor receptor assay validation of a single point method and application to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 17: 211-9.
- [58] Ardavanis A, Scorilas A, Loukeri A, Gerakini F, Pissakas G, Missitzis I, Apotolikas N, Yiotis I. Cathepsin D may help in discriminating nodenegative breast cancer patients at risk for local regional recurrence. *Anticancer Res* 1998; 18: 2885-90.
- [59] Tsuruo T, Lida H, Naganuma K, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Promotion by verapamil of vincristine responsiveness in tumor cell lines inherently resistant to the drug. *Cancer Res*.1983; 43: 808-13.
- [60] Pietsenpol JA, Vogelstein B. Tumour suppressor genes. No room at the p53 inn. *Nature* 1993; 365: 17-8.
- [61] Bornbardieri E, Gion M, Mione R, et al. A Mucinous-like carcinomaassociated antigen (MCA) in the tissue and blood of patients with primary breast cancer. *Cancer* 1989; 63: 490-5.
- [62] Thompson CB. Apoptosis. In: Paul Saltman P. *Oxidative stress: a radical view*. *Semin hematol* 1989;26:249-56.
- [63] T. Ganz, E. Nemeth, Heparin and disorders of iron metabolism, *Annu. Rev. Med.* 62 (2011) 347–360.
- [64] N.C. Andrews, Disorders of iron metabolism, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 1986–1995.

- [65] Uysal Z. Demir Metabolizmasında, Demir Eksikliğinde ve Demir Fazlalığında Yenilikler. Ankara Ün Tıp Fak Mecmuası 1999; 52:157-64.
2. Uysal Z. Hepsidin ve demir metabolizması. 6. Hematoloji İlk Basamak Kursu Eğitim Kitabı, Ulusal Hematoloji Kongresi 2007: Ankara: 14-20. 3.
- [66] Conrad ME, Umbreit JN. A concise review: Iron absorption-the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. Am J Hematol 1993;42:67-73. 6. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of Iron Homeostasis. N Engl J Med 2005;352:1741-4.
- [67] Mackenzie B, Garrick MD. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;289:981-6. 9.
- [68] Ganz T, Nemeth E. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. Biochim Biophys Acta 2006;1763:690-9.
- [69] Ünal S., Yetkin S., Demir Eksikliği Anemisi.Katkı Pediatri Dergisi. 2004;16(3):327-45
- [70] Gümrük F., Altay Ç.: Demir metabolizması ve demir eksikliği anemisi. Katkı Pediatri Dergisi. 1995;3:265-285
- [71] Brittenham GM: Disorders of iron metabolism: Iron deficiency and iron overload in: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ et al(eds). Hematology. Basic Principles and Practice. 3 th ed. London: Churcill Livingstone 1991; 368-392.
- [72] E.H. Morgan, Transferrin, biochemistry, physiology and clinical-significance,Mol. Aspects Med. 4 (1981) 1–123.
- [73] P. Ponka, C.N. Lok / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 31 (1999) 1111:1137

- [74] Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood*.1990;75:102-7.
- [75] Provan D. Mechanisms and management of iron deficiency anaemia. *British Journal of Haematology*. 1999; 105: 19-26.
- [76] Baker, H.M., Anderson, B.F., and Naker, E.N. Dealing withand heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3579–3583. (2003).
- [77] Baker, E.N.; Baker, H.M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci*. 2005, 62, 2531-2539.
- [78] Hall, D.R., Hadden, J.M., Leonard, G.A., Bailey, S., Neu, M., Winn, M., and Lindley, P.F. (2002). The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å°, respectively. *Acta Crystallogr. D*58, 70–80.
- [79] A. McClelland, L.C. KuÈ hn, F.H. Ruddle, The human transferrin receptor gene: Genomic organization andthe complete primary structure of the receptor deducedfrom a cDNA sequence, *Cell* 39 (1984) 267:274.[23]
- [80] Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* (1984) 675:678. [24] S. Jing, I.S. Trowbridge, Identification of the intermo-lecular disulfide bonds of the human transferrin recep- tor and its lipid-attachment site, *EMBO Journal* 6 (1987) 327:331.
- [81] C. Schneider, M.J. Owen, D. Banville, J.G. Williams, Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* (1984 675±678. [24] S.
- [82] Lawrence, C.M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D.W., and Harrison, S.C. (1999). Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286, 779–782.
- [83] M. Kolberg, K.R. Strand, P. Graff, K.K. Andersson, Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases, *Biochim. Biophys. Acta* 1699 (2004) 1–34.

- [84] Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal transporter. *Nature* 388, 482–488
- [85] Bali, P.K., and Aisen, P. (1991). Receptor-modulated iron release from transferrin: differential effects on N- and C-terminal sites. *chemistry* 30, 9947–9952.
- [86] Fuchs, H., Lucken, U., Tauber, R., Engel, A., and Gessner, R. (1998). Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy. *Structure* 6, 1235–1243.
- [87] J. Wang, K. Pantopoulos, Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem. J.* 434 (2011) 365–381
- [88] E.C. Theil, Targeting mRNA to regulate iron and oxygen metabolism, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 87–93.
- [89] M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, B. Galy, C. Camaschella, Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism, *Cell* 142 (2010) 24–38. M.L. Wallander, E.A. Leibold, R.S. Eisenstein, Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 668–689.
- [90] M.W. Hentze, L.C. Kuhn, Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 8175–8182
- [91] P. Ponka, C. Beaumont, D.R. Richardson, Function and regulation of transferrin and ferritin, *Seminars in Hematology* 35 (1998) 35:54.
- [92] D.R. Richardson, E. Baker, The uptake of iron and transferrin by the human malignant melanoma cell, *Biochim. Biophys. Acta* 1053 (1990) 1–12.
- [93] D. Trinder, O. Zak, P. Aisen, Transferrin receptor-independent uptake of ferric transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression, *Hepatology* 23 (1996) 1512–1520.

- [94] J.W. Larrick, P. Cresswell, Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation, *J. Supramol. Struct.* 11 (1979) 579–586.
- [95] C.R. Chitambar, E.J. Massey, P.A. Seligman, Regulation of transferrin receptor expression on human leukemic cells during proliferation and induction of differentiation. Effects of gallium and dimethylsulfoxide, *J. Clin. Invest.* 72 (1983) 1314–1325.
- [96] R. Sutherland, D. Delia, C. Schneider, R. Newman, J. Kemshead, M. Greaves, Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4515–4519.
- [97] I.S. Trowbridge, F. Lopez, Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 1175–1179.
- [98] R. Taetle, J.M. Honeysett, Effects of monoclonal anti-transferrin receptor antibodies on in vitro growth of human solid tumor cells, *Cancer Res.* 47 (1987) 2040–2044.
- [99] H.L. Elford, M. Freese, E. Passamani, H.P. Morris, Ribonucleotide reductase and cell proliferation. I. Variations of ribonucleotide reductase activity with tumor growth rate in a series of rat hepatomas, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 5228–5233.
- [100] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, S. Lau, P.J. Jansson, D.B. Lovejoy, Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as antitumour agents, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 702–717.
- [101] Meral B., Öcal C., Özbek F., Öney R. G., *Kimya mühendisliğine Giriş Ders Kitabı*, Biyosensörler, Ankara Üniversitesi, Ankara, 30-35 (2006).
- [102] Arshak, K., Mohamed, Z., Souna, E., Anthomy, T., *Principle of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. New York: Springer Science and Business Media, 2008
- [103] Aykut, U. ve Temiz H., “Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3:51-59 (2006).

- [104] Nuggehalli M. Ravindra, Camelia Prodan, Shanmugamurthy Fnu, Ivan Padroni, And Sushil K. Sikha, *Advances in the Manufacturing, Types, and Applications of Biosensors*, JOM-December 2007
- [105] Arslan, F., “Ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması”, *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 31-42 (2004).
- [106] Analitik Kimya (Eczacılık) Programı Yüksek Lisans Tezi
Kimyager Yasemin Maraba
- [107] Uludağ, Y., Piletsky, S.A, Turner, A.P.F ve Cooper, M.A, Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. *FEBS Journal*, 274, 5471-5480, 2007
- [108] Thevenot, DR., Toht K., Drust RA., Wilson GS., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications*, *Biosensor Bioelectron*, 16, 121-131, 2001
- [109] Reeves, G.,K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E., Bull, D. 2007. Million Women Study Collaboration. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *British Medical Journal*, Vol. 335, no. 7630, pp. 1134.
- [110] Uludağ, Y., Piletsky, S.A, Turner, A.P.F ve Cooper, M.A, Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. *FEBS Journal*, 274, 5471-5480, 2007
- [111] M.U. Muckenthaler, B. Galy, M.W. Hentze, Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network, *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008) 197–213.
- [112] Nuggehalli M. Ravindra, Camelia Prodan, Shanmugamurthy Fnu, Ivan Padroni, And Sushil K. Sikha, *Advances in the Manufacturing, Types, and Applications of Biosensors*, JOM-December 2007
- [113] Junhui, Z., Hong, C., Ruifu, Y., DNA based biosensors, *Biotechnology Advances*, 24, 145- 178, 1881.

- [114] Parellada, J., Narvaez, A., Lopez, MA., Domingue, E., Fernandez, JJ., pavlov, V., Katakis Anal Chim Acta, 362, 47-57 1998
- [115] Hikmat N. Daghestani And Billy W.Day, Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors, Sensors 2010
- [116] Biyosensörler; http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm
- [117] Curie J. and Curie P. (1880). "Development par pression de l'electricite polaire dans les cristaus hemidres a faces inclinees". C. R. Acad. Sci. Paris, 91, 294-295.
- [118] Keith E. Herold, (2009). "Biosensors and Biodetection". Ed.Avraham Rasooly, Volume 2.
- [119] J.F. Alder, J.J. McCallum, (1983). "Piezoelectric crystals for mass and chemical measurements". Analyst, Vol. 108, pp. 1169.
- [120] M.R. Deakin, D.A. Buttry, (1989). "Electrochemical Applications of the Quartz Crystal Microbalance". Anal. Chem. 61 1147A.
- [121] Lu, C. and Czanderna, A.W., (1984). "Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances". Lu, C. and Czanderna, A.W., Eds.; Elsevier: Amsterdam
- [122] Tzong-Jih Cheng, Hsien-Chang Chang, Tsun-Mei Lin, A piezoelectric quartz crystal sensor for the determination of coagulation time in plasma and whole blood, Biosensors & Bioelectronics Vol. 13. No. 2, pp. 147-156, 1998.
- [123] Renee L. Bunde, Eric J. Jarvi, Jeffrey J. Rosentreter, Piezoelectric quartz crystal biosensors, Talanta 46 (1998) 1223–1236.
- [124] Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. (1999). Sulfur based self assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric crystals for immunosensor development, Fresenius J. Anal. Chem., 364: 54-57

- [125] Ahmad Safari, Victor F. Janas, (1999). "Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook". CRC Press LLC, s.142.
- [126] Ahmad Safari, Victor F. Janas, (1999). "Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook". CRC Press LLC, s.142.
- [127] TABRİZİ, Amir Parviz Farşçi, (2005). "Altın Nanopartikül Üretim Ve Kuartz Kristal Mikrobalans Sisteminde Kullanımı". Yük. Lis. Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, S.11.
- [128] Shons, A., Dorman, F., Najarian, J. (1972). The piezoelectric Quartz immunosensor, *J.Biomed. Manter Res.*, 576-570 Sauerbrey G. (1959). Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance, *Z Physik*;155:206–12.
- [129] Pavey KD., Quartz crystal analytical sensors: the future of label-free, real-time diagnostics, *Expert review of Molecular Diagnostics*, 2, 173-286
- [130] Wudy, F., Stock, C., Gores, H. J., Basics: Measurement techniques: Electrochemical quartz crystal microbalance, *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, (eds: Garcke, J.), Elsevier, 2009
- [131] M. Rodahl, F. Höök, C. Fredriksson et al., (1997). "Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion". *Faraday Discussions*, Vol. 107, pp. 229–246.
- [132] Skadal, P. (2003). Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions, *J. Braz. Chem. Soc.*, 14,4: 491-50
- [133] Sauerbrey G. (1959). Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance, *Z Physik*;155:206–12.
- [134] T. Nomura, M. Okuhara, (1982). "Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids". *Analytica Chimica Acta*, Volume 142, 1 October, Pages 281-284.

- [135] Neumeister, J., Thum, R., Ve Lüder, E., A saw delay- line oscillator as a high- resolution temperature sensor, Sens. Actuators A, 21-23, 670, 1990

7.ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Seda ATAY
Doğum yeri: Polatlı / ANKARA
Doğum tarihi: 22.10.1989
Medeni hali: Bekar
e-posta adresi: sedaatay89@gmail.com
Adres: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Biyokimya ABD
06800 Beytepe Çankaya/ Ankara/ TÜRKİYE

Eğitim

Lise : 2003-2007 Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
Lisans : 2007-2012 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
(Anadal)
Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü
(Yandal)
Yüksek Lisans: 2012-2014 Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve
Nanotıp A.B.D

Yabancı Dil

İngilizce : İyi düzeyde

Deneyim Alanları: Sensörler, Nanokompozitler, Hidrojeller, Moleküler
Baskılama, Hücre Çalışmaları

Aldığı dereceler:

2012 yılı Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Birinciliği,
Biyoloji Bölüm Birinciliği