

**KANSER TANISINDA KULLANILMAK ÜZERE YENİ
NESİL KOLORİMETRİK BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF NEW GENERATION
COLORIMETRIC BIOSENSORS FOR CANCER
DIAGNOSIS**

İREM ÇELEBİER

PROF. DR. NEVİN KESKİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Aileme

ÖZET

KANSER TANISINDA KULLANILMAK ÜZERE YENİ NESİL KOLORİMETRİK BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

İrem ÇELEBİER

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nevin KESKİN

Haziran 2022, 95 sayfa

Meme kanseri, kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türüdür. Günümüzde meme kanserinin teşhisi uzman analizi gerektiren, taşınması zor, pahalı ve zaman alıcı tekniklerle belirlenmekte olup, spesifik ve aşırı duyarlı yeni cihazlara olan ihtiyaç artmaktadır. Kanserin erken teşhisi, hastanın hayatta kalması ve tedavinin başarısı için oldukça önemlidir. Biyosensör teknolojisinin kanser teşhisinde kullanılmasıyla beraber birçok araştırmacı düşük maliyetli, hızlı, kullanıcıyla uyumlu ve hasta bakım noktasında kullanılabilen biyosensörlerin geliştirilmesine yönelmiştir.

Bu tez çalışmasında, meme kanseri teşhisine yönelik yeni nesil kolorimetrik bir biyosensör tasarlanmıştır. Sensör platformu olarak, optik-immüno-algılama için kullanışlı olan cam kapiller tüpler tercih edilmiştir. Cam yüzeyler sıvı ve gaz fazında iki farklı yöntem kullanılarak, aminle fonksiyonel hale getirilmiştir. Cam yüzeyler, X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS) ile analiz edilerek, gaz

fazında yapılan aminleme işleminin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Gaz fazında aminleme için, basıncın ve APTES konsantrasyonunun aminlemeye olan etkisi incelenerek, en iyi aminlemenin 50 µl APTES ile 0.06 Mpa basınç altında gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Biyolojik algılama elemanı olarak, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2) ve kanser antijeni 15-3 (CA15-3) meme kanseri antikoları kullanılmıştır. Oksidasyon işlemiyle aktif hale getirilen belirleyici antikolar (det-ab) amin ile fonksiyonel hale getirilmiş cam yüzeyler üzerine immobilize edilmiştir. Hedef molekül (belirteç) olarak, HER-2 ve CA15-3 antijenleri ve SK-BR-3 HER2(+) meme kanseri hücreleri kullanılmıştır.

Kolorimetrik biyosensörde meme kanseri belirteçlerinin saptanması ve görselleştirilmesi için sinyal verici olarak, eşsiz optik özelliklere sahip olan altın nanopartiküller (AuNP) kullanılmıştır. Modifiye ettiğimiz kimyasal yöntemle sentezlenen AuNP' ler, spesifik tanıma ve bağlanma bölgeleri oluşturmak için MUA ile kaplanarak tek katmanlı hale getirilmiştir. AuNP' ler Zeta-Sizer, UV-VIS, FTIR, TEM gibi çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmiş ve 25 nm boyutunda AuNP' ler elde edilmiştir. Sentezlenen AuNP' ler yakalayıcı antikolar ile muamele edilerek, antikoların AuNP yüzeyine konjugasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tasarlanan cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensör; belirleyici antikor, kanser antijeni ve yakalayıcı antikor kaplı AuNP' ler ile muamele edilerek validasyon gerçekleştirilmiştir. Belirleyici antikor miktarı, AuNP' ler ile muamele edilen yakalayıcı antikor miktarı, antijen konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi farklı parametrelerin immobilizasyona etkisi incelenerek biyosensör optimize edilmiştir. Cam yüzey üzerinde gerçekleşen immobilizasyon FTIR tekniği ile karakterize edilerek, -NH pikleri ve amid bantlarının görülmesi ile doğrulanmıştır.

Tasarlanan kolorimetrik biyosensörün validasyon sonuçları herhangi bir cihaza ihtiyaç duyulmadan çıplak gözle ve mikroskop altında görüntülenmiştir. Meme kanseri biyobelirteçleri (HER-2 ve CA15-3) ve HER2(+) hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi, cam yüzeylerde meydana gelen renkli tabakalaşma ile tespit edilmiştir. Gerçekleşen renk oluşumları meme kanseri teşhisi için tasarlanan yeni nesil kolorimetrik biyosensörün çalışma etkinliğini

doğrulamıştır. Tasarlanan biyosensörün taşınabilir boyutu, uzman kişilere ihtiyaç duymadan kolaylıkla uygulanabilme ve sonuç elde edebilme gibi özellikleri ileride kanser teşhisi için tasarlanacak tarama testlerine önemli bir katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasının, meme kanseri teşhisi için kullanımı kolay, uygun maliyetli ve hasta bakım noktasında uygulanabilir bir yaklaşıma sahip yeni nesil biyosensörlerin geliştirilmesine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Kolorimetrik biyosensör, Altın nanopartikül, Cam kapiller, HER-2, CA15-3

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NEW GENERATION COLORIMETRIC BIOSENSORS FOR CANCER DIAGNOSIS

İrem ÇELEBİER

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nevin KESKİN

June 2022, 95 pages

Breast cancer is the most common type of cancer among women. Today, breast cancer diagnosis is determined by techniques requiring expert analysis, difficult to carry, expensive, and time-consuming, and the need for specific and hypersensitive new devices is increasing. Early diagnosis of cancer is crucial for patient survival and the success of the treatment. With biosensor technology in cancer diagnosis, many researchers have turned to improving low-cost, fast, convenient biosensors that can be used at the point of care.

In this thesis, a new generation colorimetric biosensor was designed for the diagnosis of breast cancer. Glass capillary tubes, which are helpful for optical-immuno-sensing, were chosen as sensor platform. Glass surfaces are functionalized with amine by using two different methods in liquid and gas phase. Glass surfaces were analyzed with XPS. It was determined that the amination process in gas phase was more effective. The effect of pressure and APTES

concentration on amination was examined for gas-phase amination. It was determined that the best amination was achieved with 50 μ l APTES under 0.06 Mpa pressure.

Human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) and cancer antigen 15-3 (CA15-3) breast cancer antibodies were used as the biological sensing element. Detection antibodies activated by the oxidation process were immobilized on glass surfaces functionalized with amine. HER-2 and CA15-3 antigens and SK-BR-3 HER2(+) breast cancer cells were used as markers.

Gold nanoparticles (AuNP) with unique optical properties have been preferred as signal transmitters to detect and visualize breast cancer markers in colorimetric biosensor. AuNPs synthesized by the chemical method modified were coated with MUA to form specific recognition and binding sites and made into a monolayer. AuNPs were characterized using various techniques such as Zeta-Sizer, UV-VIS, FTIR, TEM, and 25 nm AuNPs were obtained. The synthesized AuNPs were treated with capturing antibodies and the antibodies were conjugated to the AuNP surface.

The glass capillary-based colorimetric biosensor was validated using detection antibody cancer antigen, and capture antibody coated AuNPs. The biosensor was optimized by examining the effects of different parameters such as antigen concentration, incubation time, the amount of detection antibody, and capture antibody coated with AuNPs on immobilization. The immobilization on glass surface was characterized by FTIR and was confirmed by the appearance of -NH peaks and amide bands.

The validation results of the designed colorimetric biosensor were viewed with the naked eye and under a microscope without the need for any device. The immobilization which breast cancer biomarkers (HER-2 and CA15-3), and HER2(+) cells was detected by the colored layering on the glass surfaces. The resulting color formations confirmed the working efficiency of the new generation colorimetric biosensor designed for breast cancer diagnosis. The features of designed biosensor, such as its portable size, easy application, and obtaining results without an expert, will make a significant contribution to the screening tests to be designed for cancer diagnosis in the future.

We hope that this study will be helpful in the development of new generation biosensors with a simple, easy-to-use, cost-effective and applicable approach for cancer diagnosis.

Keywords: Breast cancer, Colorimetric biosensor, Gold nanoparticle, Glass capillary, HER-2, CA15-3

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorlandığım her konuda nerede ve ne zaman olursa olsun benimle ilgilenen, motivasyon ve desteğini esirgemeyen, benim için çok ayrı bir yeri olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Nevin Keskin'e

Tez çalışmalarım sırasında, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili ve Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e

Çalışmalarım sırasında laboratuvarını bana açan Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a
Meme kanseri hücrelerini temin etmemizi sağlayan Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na

Hücrelerin çalışma için hazırlanmasına yardımcı olan Doç. Dr. Aylin Özer Gürpınar ve Dr. Handan Sevim Akan'a

Mikroskopik görüntülemeleri gerçekleştirmemize yardımcı olan Doç. Dr. Sırma Çapar'a

Tez çalışmalarım sırasında bana destek olan arkadaşlarım Dr. Soheil Malekghasemi ve Dr. Tayfun Vural'a

Üniversiteye başladığım ilk günden beri yanımda olan, akademik hayatta birçok şeyi birlikte yaşayıp tecrübe ettiğim sevgili arkadaşım Meltem Ulusoy'a,

Her koşulda destek olan sevgili arkadaşlarım Oğuz Kağan Bayrakdar, Zeynep İğde, Özgecan Erdem, Elifnur Birtürk ve Sevgi Yorulmaz' a

Doktora eğitimim sırasında 2211-C Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK' a

Tez çalışması için maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne

Hayatım boyunca verdiğim her kararda beni destekleyen, pes edip yorulduğum anlarda geri dönmemi sağlayan, sonsuz sevgilerini her zaman hissettiren canım annem, babam ve biricik kardeşim Aybike' ye

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Biyosensör.....	4
2.1.1. Biyolojik Tanıma Elemanı Olarak Antikorlar	6
2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması ve Kullanım Alanları	7
2.2.1. Optik Biyosensörler	8
2.2.1.2. Kolorimetrik Biyosensörler	9
2.3. Kanser Teşhisinde Biyosensörler	10
2.4. Nanomalzemeler	11
2.4.1. Nanomalzemelerin Sensörlerde Kullanımı	12
2.4.2. Nanomalzemelerin Konjugasyonu	12
2.5. Optik Biyo-Tanıma İçin Metal Nanopartiküller.....	14
2.5.1. Altın Nanopartiküller.....	14
2.6. Mikroakışkan Sistemleri.....	17
2.6.1. Cam Kapiller	18
2.6.2. Cam Yüzeylerin Modifikasyonu.....	18
2.7. Biyosensör ve Nanomalzeme Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler	20

2.8. Meme Kanseri	22
2.8.1. Meme Kanseri Biyobelirteçleri.....	24
2.8.1.1. İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 (HER2).....	26
2.8.1.2. Kanser Antijeni 15-3 (CA15-3).....	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	29
3.1.1. Altın Nanopartikül Sentezi ve Modifikasyonunda Kullanılan Kimyasallar	29
3.1.2. Sensör Platformu ve Kullanılan Kimyasallar	29
3.1.3. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar	29
3.1.4. Biyolojik Tanıma Elemanı Olarak Kullanılan Antikorlar	30
3.1.5. Kanser Biyobelirteçleri	30
3.2. Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu.....	30
3.2.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi	30
3.2.2. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin Modifikasyonu	31
3.2.3. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	31
3.3. Cam Kapillerin Aminlenmesi ve Karakterizasyonu	32
3.3.1. Cam Yüzeylerin Temizlenmesi.....	32
3.3.2. Cam Yüzeylerin Aminlenmesi	33
3.3.2.1. Sıvı Fazda Aminleme	33
3.3.2.2. Gaz Fazda Aminleme	33
3.3.3. Cam Yüzeylerin XPS İle Karakterizasyonu	34
3.4. Aminlenmiş Camların Optimizasyonu	35
3.4.1. Basıncın Aminlemeye Olan Etkisi	35
3.4.2. APTES Miktarının Aminlemeye Olan Etkisi.....	35
3.5. Cam Kapillerin Meme Kanseri Antikorları İle İmmobilizasyonu.....	35
3.5.1. Yakalayıcı (Capture) Antikorumun AuNP' ler İle Aktive Edilmesi	35

3.5.2. Belirleyici (Detection) Antikorun Oksidasyonu ve İmmobilizasyon ..	36
3.5.3. HER2 Antikorunun Optimizasyonu.....	37
3.5.4. CA15-3 Antikorunun Optimizasyonu	37
3.6. Kolorimetrik Biyosensörün Validasyonu.....	38
3.7. HER2 (+) Meme Kanseri Hücreleri Kullanılarak Biyosensörün Valide Edilmesi.....	38
3.7.1. HER2 Hücrelerinin Hazırlanması	38
3.7.2. HER2 Hücrelerinin İmmobilizasyonu.....	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	40
4.1.1. Boyut Dağılımı ve Yüzey Yükü Analizi	40
4.1.2. UV-VIS	42
4.1.3. TEM Görüntüleme ve EDX Analizi	43
4.1.4. FTIR	44
4.2. Aminlenmiş Cam Yüzeyin Karakterizasyonu	46
4.2.1. Aminlenen Cam Yüzeylerin XPS Analizi	46
4.2.2. Gaz Fazında Aminlenen Cam Yüzeylerin Optimizasyon Sonuçları .	49
4.3. HER-2 ve CA15-3 Antikorları İle Muamele Edilen AuNP' lerin Analizi ...	56
4.3.1. HER-2 Yakalayıcı Antikoruyla Muamele Edilen AuNP' lerin Zeta Potansiyel Analizi.....	56
4.3.2. CA15-3 Yakalayıcı Antikoruyla Muamele Edilen AuNP' lerin Zeta Potansiyel Analizi.....	58
4.3.3. HER-2 ve CA15-3 Yakalayıcı Antikorlarıyla Muamele Edilen AuNP' lerin UV-VIS Spektrofotometri Analizi	60
4.4. Kolorimetrik Biyosensörün Optimize Edilmesi	61
4.4.1. HER-2 Teşhisine Yönelik Kolorimetrik Biyosensörün Optimizasyonu	61

4.4.2. CA15-3 Teşhisine Yönelik Kolorimetrik Biyosensörün Optimizasyonu	63
4.4.3. HER-2 (+) Hücreleri	65
4.5. Tasarlanan Kolorimetrik Biyosensörün Validasyon Sonuçları.....	66
4.5.1. FTIR Analizi	66
4.5.2. İmmobilize Edilmiş Cam Yüzeylerin Işık Mikroskopunda Görüntülenmesi.....	67
4.5.2.1. HER-2 İmmobilizasyon Görüntüleri	67
4.5.2.2. CA15-3 İmmobilizasyon Görüntüleri.....	68
4.5.2.3. HER-2 (+) Meme Kanseri Hücrelerinin İmmobilizasyon Görüntüleri	70
4.5.3. Tasarlanan Kolorimetrik Biyosensörün Fotoğrafları	70
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	73
6. KAYNAKLAR.....	85
EKLER	93
EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	93
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	94
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Mua ile modifiye edilmiş aunp' ler.....	31
Şekil 3.2. Cam yüzeylerin aptes ile aminlenmesi	34
Şekil 3.3. Aunp yüzeyine konjuge edilmiş antikorlar.....	36
Şekil 3.4. Oksidasyon işlemiyle aktive edilen antikorların cam yüzey üzerine immobilizasyonu.....	36
Şekil 3.5. Cam yüzey üzerinde (det-ab, antijen ve cap-ab kaplı aunp) gerçekleşen immobilizasyon	37
Şekil 4.1. Sitrat indirgeme metoduna göre sentezlenen AuNP'ler.....	39
Şekil 4.2. Aunp boyut analizi	40
Şekil 4.3. Aunp zeta potansiyel (yük dağılım) analizi	41
Şekil 4.4. Mua kaplı aunp' lerin yük dağılım analizi	41
Şekil 4.5. Sentezlenen aunp ve mua kaplı aunp' lerin uv-vis spektrum grafiği.....	42
Şekil 4.6. Aunp' lerin (a) 200 nm (b) 50 nm (c) 20 nm ölçekteki tem görüntüleri ve (d) aunp' lerin çap boyutunun gösterildiği tem görüntüsü	43
Şekil 4.7. Aunp' lerin edx analiz grafiği.....	44
Şekil 4.8. Sentezlenen AuNP' lerin FTIR spektrumu.....	45
Şekil 4.9. Normal cam (işlem görmemiş) yüzeyin geniş tarama xps spektrumu	47
Şekil 4.10. Yüzeyi temizlenmiş camın (piranha çözeltisi ile muamele edilmiş) geniş tarama xps spektrumu	47
Şekil 4.11. Sıvı fazda aminlenmiş camın geniş tarama xps spektrumu	48
Şekil 4.12. Gaz fazda aminlenmiş camın geniş tarama xps spektrumu	48
Şekil 4.13. 0.06 mpa basınç altında, 50 µl aptes kullanılarak yapılan aminleme işleminin geniş tarama xps spektrumu	52
Şekil 4.14. C1s spektrumuna ait bağlanma enerjilerinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği.....	53
Şekil 4.15. N1s spektrumuna ait bağlanma enerjilerinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği.....	54

Şekil 4.16. O1s spektrumuna ait bağlanma enerjisinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği	55
Şekil 4.17. Si2p spektrumuna ait bağlanma enerjilerinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği.....	55
Şekil 4.18. 5 µl her-2 ile muamele edilen aunp' lerin zeta potansiyel dağılımı .	56
Şekil 4.19. 10 µl her-2 ile muamele edilen aunp' lerin zeta potansiyel dağılımı	57
Şekil 4.20. 20 µl her-2 ile muamele edilen aunp' lerin zeta potansiyel dağılımı	57
Şekil 4.21. 5 µl ca15-3 ile muamele edilen aunp' lerin zeta potansiyel dağılımı	58
Şekil 4.22. 10 µl ca15-3 ile muamele edilen aunp' lerin zeta potansiyel dağılımı	59
Şekil 4.23. 20 µl ca15-3 ile muamele edilen aunp' lerin zeta potansiyel dağılımı	59
Şekil 4.24. Aunp, mua ile modifiye edilmiş aunp, her-2 ve ca15-3 (cap-ab) antikorlarıyla fonksiyonel hale getirilmiş aunp' lerin uv-vıs spektrumu	60
Şekil 4.25. Farklı miktarlarda uygulanan her-2 antijenlerinin renk yoğunluğuna etkisi.....	61
Şekil 4.26. Farklı miktarlarda uygulanan her-2 belirleyici antikorlarının cam yüzeyde görülen renk yoğunluğuna etkisi	62
Şekil 4.27. Her-2 belirleyici antikor inkübasyon süresinin renk yoğunluğuna etkisi	63
Şekil 4.28. Farklı miktarlarda uygulanan ca15-3 antijenlerinin renk yoğunluğuna etkisi.....	63
Şekil 4.29. Farklı miktarlarda uygulanan ca15-3 belirleyici antikorlarının renk yoğunluğuna etkisi.....	64
Şekil 4.30. Ca15-3 belirleyici antikor inkübasyon süresinin renk yoğunluğuna etkisi	65
Şekil 4.31. Her-2 antijeni ve her-2 (+) hücrelerinin cam yüzey üzerinde oluşturduğu renk yoğunluğu	65
Şekil 4.32. Aminlenmiş, belirleyici antikor eklenmiş ve immobilizasyonu tamamlanmış camların ftır analizi.....	66

- Şekil 4.33. Farklı antijen miktarlarıyla hazırlanmış her-2' ye ait kolorimetrik biyosensörün ışık mikroskopu (5x) altındaki görüntüleri (a) işlem görmemiş cam (b) 50 ng/ml her2 (c) 100 ng/ml her2 (d) 200 ng/ml her2 ve (e) 300 ng/ml her2 68
- Şekil 4.34. Farklı antijen miktarlarıyla hazırlanmış ca15-3' e ait kolorimetrik biyosensörün ışık mikroskopu (5x) altındaki görüntüleri (a) işlem görmemiş cam (b) 100 u/ml ca15-3 (c) 200 u/ml ca15-3 (d) 300 u/ml ca15-3 (e) 400 u/ml ca15-3 ve (f) 500 u/ml ca15-3 70
- Şekil 4.35. Kolorimetrik biyosensör üzerine uygulanan her-2 (+) meme kanseri hücrelerinin ışık mikroskopu (5x) altındaki görüntüsü (a) ½ oranında sulandırılmış her-2 hücreleri ve (b) stok her-2 hücreleri 70
- Şekil 4.36. Her-2 kanser biyobelirtecinin teşhisi için tasarlanan cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensörün fotoğrafları 71
- Şekil 4.37. Ca15-3 kanser biyobelirtecinin teşhisi için tasarlanan cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensörün fotoğrafları 72
- Şekil 4.38. Her-2 (+) hücrelerinin (stok ve ½ oranında sulandırılmış) cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensör üzerine immobilize edilmiş fotoğrafı72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanomalzemelerin karakterizasyonunda kullanılan teknikler	21
Çizelge 2.2. Meme kanseri tanısında kullanılan teknikler ve sınırlamaları	23
Çizelge 2.3. Meme kanseri biyobelirteçleri	26
Çizelge 4.1. Aunp ve mua-aunp' lerin uv-vis sonuçları.....	42
Çizelge 4.2. Aunp' lerin içerdği elementlerin atomik yüzdeleri.....	44
Çizelge 4.3. Sıvı ve gaz fazında aminlenen cam yüzeylerin xps analizi ile elde edilen atomik konsantrasyon yüzdeleri.....	49
Çizelge 4.4. Farklı aptes konsantrasyonları ile işlevselleştirilmiş cam yüzeylerin xps analizinden elde edilen atomik kompozisyon yüzdeleri.....	50
Çizelge 4.5. Farklı basınçlarda aminlenmiş cam yüzeylerin atomik konsantrasyon yüzdeleri.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
nm	: Nanometre
mV	: Milivolt
eV	: Elektronvolt
Mpa	: Mega pascal

Kısaltmalar

AuNP	: Altın nanopartikül
MUA	: 11-Merkapto undekanoik asit
APTES	: (3-Aminopropil)trietoksisilan
HER-2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
CA15-3	: Kanser antijeni 15-3
det-ab	: Belirleyici antikor
cap-ab	: Yakalayıcı antikor
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
XPS	: X-ışını fotoelektron spektroskopisi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopu
EDX	: Enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi

1. GİRİŞ

Kanser anormal hücrelerin hızla bölünmesiyle ortaya çıkan, diğer doku ve organlara yayılabilen, insanlar için en tehlikeli hastalık grubudur. Meme kanseri en sık görülen kanser türlerinden olup, her yıl 1,5 milyondan fazla kadını etkilemekte ve kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin en önemli nedeni olarak görülmektedir [1–4].

Kadınlarda meme kanseri riski; yaşa, genetik mutasyonlara, aile öyküsüne, çevresel koşullara, yüksek yağlı gıdaların alınmasına ve geç gebeliklere bağlı olarak değişmektedir [5]. Meme kanserinde etkili bir teşhis, uygun tedavilerin seçilmesi ve hayatta kalma sürelerinin uzatılması için oldukça önemlidir. Özellikle başarılı bir kanser tedavisi için erken teşhis hayati öneme sahiptir [2].

Meme kanseri teşhisinde mamografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), sonografi gibi görüntüleme teknikleri; enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA), radyoimmün test (RIA) ve immünohistokimya (IHC) gibi biyobelirteç bazlı ekspresyon teknikleri ve biyopsi gibi sitolojik-histopatolojik teknikler kullanılmaktadır [6,7]. Ancak mevcut görüntüleme yöntemleri, kanseri dokuda gözle görülür bir değişiklik olduğunda tespit edebilmektedir. Mamografi, meme kanseri teşhisinde rutin olarak kullanılmakla birlikte, bu yöntem her zaman iyi huylu ve kötü huylu lezyonlar arasında ayırım yapamamaktadır [8]. Kanser in doğrulanması için invaziv biyopsi yapılması gerekmektedir. Mevcut yöntemlerin sahip olduğu düşük hassasiyet, yanlış sonuç verme, geç teşhis gibi sınırlamalar araştırmacıları yeni teşhis teknikleri geliştirmeye yöneltmektedir [6,9].

Nanoteknoloji, kanser tedavisinde yeni teşhis ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine odaklanan, hızla genişleyen bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır [10]. Nanoteknoloji tabanlı teşhis yöntemleri, gerçek zamanlı, kullanışlı ve uygun maliyetli kanser tespiti için umut verici araçlar olarak geliştirilmektedir [6].

Günümüzde sağlık sektörü, biyosensörlere dayalı teşhis yöntemlerine yönelmektedir. Biyosensörler güçlü analitik cihazlar olup, ilaç keşfi, tıbbi teşhis, gıda güvenliği, tarımsal ve çevresel izleme, güvenlik ve savunma gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir. Biyosensörler; taşınabilirlikleri, yeniden kullanılabilirlikleri, gerçek zamanlı yanıtları, yüksek özgüllükleri ve seçicilikleri nedeniyle, diğer geleneksel laboratuvar tabanlı algılama tekniklerine kıyasla daha güvenilir, uygun maliyetli ve kullanımları kolay enstrümanlardır[7,11]. Biyosensörler, klinikte erken teşhis için önemli bir itici güç olarak kabul edilmektedir. Biyosensörler kanserin tespiti, izlenmesi ve prognozu için kan, idrar gibi vücut sıvıları veya tümör dokusunda bulunan spesifik biyobelirteçleri kullanmaktadır [9].

Kanser biyobelirteçleri, vücut veya kanser hücreleri tarafından salgılanan proteinler (hücre yüzey proteinleri vb.), karbonhidratlar veya nükleik asitler (dolaşan tümör DNA'sı, miRNA, vb.) olabilmektedir. Kanser gibi anormal süreçler sırasında değişen bu belirteçler teşhis için önemli olmakla birlikte, çok düşük konsantrasyonlardaki biyobelirteçleri tespit edebilen oldukça hassas araçlar olan "biyosensörlere" ihtiyaç duyulmaktadır [12,13].

Biyosensörler, nanomalzemeler ve yüzey mühendisliği yardımı ile çok düşük miktardaki biyobelirteçleri bile tespit edebilen biyoanalitik cihazlardır [14]. Biyosensörler, spesifik hedefleme sağlamak için nanopartiküller/nanomalzemeler ile geliştirilebilmektedir [15]. Nanopartiküllerin kullanımı, biyosensörleri spesifik belirteçlerin teşhisi için daha duyarlı hale getirerek, artan bir yüzey-hacim oranı sağlamaktadır [16].

Altın nanopartiküller (AuNP' ler) kanser teşhisinde yaygın olarak kullanılan nanomalzemelerdir [13]. AuNP' ler boyutlarına ve şekillerine bağlı olarak optik, elektronik ve yüksek yüzey alanı/hacim oranı gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Modern nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, AuNP' lerin biyomedikal alanda uygulanma sıklığı artmaktadır [17]. Geniş yüzey/hacim oranları sayesinde AuNP yüzeyi antikor, peptit, aptamer ve küçük moleküller ile yoğun bir şekilde

kaplanabilmekte, spesifik kanser moleküllerini tanıyarak onlara bağlanabilmektedir [6]. AuNP' ler, yüksek sönme katsayıları ve özel lokalize yüzey plazmon rezonanslarıyla (LSPR) kolorimetrik biyosensörlerde renk geliştirme parçası (sinyal göstergesi) olarak kullanılmaktadır [7,9].

Kolorimetrik biyosensörler, kalitatif analiz için çıplak gözle veya kantitatif analiz için basit spektrometri ile kolayca ayırt edilebilen, hedef kaynaklı renk yoğunluğu değişimine dayanan sensörlerdir [18].

Kolorimetrik biyosensörler, alan analizi veya tümör biyobelirteçlerinin hızlı taranması için kullanılacak en önemli teşhis platformlarından biridir [19]. Kolorimetrik biyosensörler basit tasarım, kullanım kolaylığı, hızlı sonuç ve düşük maliyet gibi özellikleriyle, kanser biyobelirteçlerinin tespiti ve erken teşhiste öne çıkmaktadır [9].

Bu tez çalışmasında, meme kanserinin teşhisi için HER2(+) (İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2) ve CA15-3 (Kanser antijeni) kanser biyobelirteçleri kullanılarak, cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensörler tasarlanmıştır. Tasarlanan biyosensör çeşitli parametrelerde çalışılarak, optimize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensör

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliğine (IUPAC) göre biyosensör, "Genellikle elektriksel, termal veya optik sinyallerle kimyasal bileşikleri saptamak için enzim, bağışıklık sistemi elemanı, doku, organel veya hücrelerin aracılık ettiği spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanan bir cihaz" olarak tanımlanmaktadır [14]. İlk biyosensör 1962' de Clark ve Lyons tarafından, amperometrik oksijen elektrotu üzerinde glukoz oksidaz enziminin hareketsiz hale getirilmesiyle, glukoz tayini için geliştirilmiştir [20].

Biyosensörler genel olarak "biyolojik tanıma elemanı, dönüştürücü ve işlemci" olmak üzere 3 ana elemandan oluşmaktadır. Biyolojik tanıma elemanı hedef molekülün tanınması, dönüştürücü biyolojik tanımanın ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesi, işlemci ise bu sinyalin işlenmesini sağlamaktadır. Biyolojik tanıma elemanı ile hedef molekül (analit) veya biyobelirteç arasında seçici ve güçlü bir bağlanma gerçekleşmesi oldukça önemlidir [21–23].

Biyosensörler hedef molekülü belirlenmenin yanı sıra, hedef molekül konsantrasyonunda meydana gelebilecek en küçük değişimi bile ayırt edebilen, yüksek çözünürlüklü ölçülebilir sinyaller elde edilebilecek şekilde tasarlanmaktadır [21,24].

Biyosensörlerin analitik performansı, duyarlılık, seçicilik, algılama sınırı, algılama aralığı, yeniden kullanılabilme kapasitesi gibi özellikler göz önünde bulundurularak belirlenmektedir. Biyosensörler, yalnızca bir analitin varlığını ve miktarını tespit etmek için değil, aynı zamanda klinik teşhis, çevresel çalışmalar, hücre fizyolojisi, hücre mekaniği, ilaç moleküllerinin hücrelere etkisi gibi farklı araştırma alanlarında kullanılmaktadır [14].

Tasarlanmak istenen biyosensör 3 temel yapıdan oluşmaktadır.

Sensör platformu (matrisi): Biyosensör platformlarının tasarımında kullanılan malzemelerin yapısı ve bileşimi, sensör algılama kapasitesini büyük ölçüde etkilemektedir [21,24]. Kağıt, cam, grafit, karbon macun, camsı karbon elektrot (GCE), ekran baskılı elektrotlar (SPE) ve indiyum kalay oksit (ITO) en yaygın kullanılan sensör platformlarından bazılarıdır [14].

Biyolojik tanıma (algılama) elemanları: Dönüştürücü yüzeyinde hareketsiz hale getirilmiş biyolojik tanıma elemanları, hedef moleküller (biyobelirteçler) ile etkileşime girerek, biyosensörün algılama görevini gerçekleştiren kısımdır. Biyolojik tanıma elemanları, biyoreseptör olarak da adlandırılmaktadır [13,21,24]. Genellikle hedef molekülü yüksek hassasiyetle tespit edebilecek enzim, antikor, nükleik asit dizisi (DNA-RNA), mikroorganizma, hücre, lektin, protein reseptörü ve aptamer gibi biyo-tanıma elemanları tercih edilmektedir [13].

Dönüştürücü: Biyolojik algılama basamağının, ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesini sağlamaktadır. Dönüştürücü, üzerinde biyo-tanıma elemanlarının hareketsizleştirilmesi, biyosensörün duyarlılık, seçicilik, tekrarlanabilirlik gibi özelliklerini belirlemektedir [13,21,24].

Bir biyosensörün duyarlılığı, biyo-tanıma elemanlarına bağlanan biyobelirteçlerin sayısı ile dönüştürülen sinyalin yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Biyolojik numuneler karmaşık ve çok sayıda farklı molekülden oluştuğu için seçicilik, bakım noktası biyosensörlerinin etkin bir şekilde çalışması için önemli bir faktördür. Seçicilik biyosensörün yalnızca numunedeki hedef biyobelirteçlere bağlandıktan sonra oluşturduğu pozitif sinyal olarak ortaya çıkmaktadır. Negatif bir numuneden, yanlış pozitif sonuç alınan biyosensörlerin kullanımı önerilmemektedir [13,14]. Tekrarlanabilirlik, analiz edilecek örneklerin birden fazla ölçümünün alınarak her ölçümde aynı sonuçların elde edilmesidir. Tasarlanan biyosensörün yeniden kullanılabilir olması, biyosensörün belirli bir biyobelirteci birkaç kez başarılı bir şekilde tespit edebileceğini göstermekte olup, maliyet açısından avantaj sağlamaktadır [13].

Biyosensör tasarımı için önemli parametreler:

- Dönüştürücü üzerinde hareketsiz hale getirilmiş biyolojik tanıma elemanları kararlı olmalıdır.
- Biyolojik tanıma elemanları, biyobelirteçlere özgül olmalıdır.
- Numune pH' ı veya sıcaklığının değişmesiyle oluşan yanlış sinyaller ayırt edilebilmelidir.
- Farklı ölçümlerde kimyasal sinyal doğrulanabilir ve tekrarlanabilir olmalıdır.
- Uygun maliyetli olmalıdır [13].

2.1.1. Biyolojik Tanıma Elemanı Olarak Antikorlar

Çeşitli biyolojik tanıma elemanları arasında antikorlar (Ab), güçlü sinyal oluşturan, farklı biyobelirteçleri hareketsiz hale getirerek yüksek özgüllük ve doğrulukla tanıyan benzersiz 3 boyutlu yapıları ile sensör çalışmalarını için oldukça umut vericidir [25].

Antikorlar, antijen olarak bilinen yabancı maddelere yanıt olarak bağışıklık sisteminin vücutta ürettiği protein molekülleridir [26]. Antikorlar B lenfositleri tarafından yapılmakta olup, kan ve lenf sistemi boyunca dolaşmaktadır. Antikorlar genellikle serumdan (poliklonal antikor), karın boşluğundaki sıvıdan veya hibridoma hücre hattının kültür süpernatantından (monoklonal antikor) izole edilmektedir. Antikorlar, hedef moleküllerine karşı yüksek afinite ve yüksek özgüllük göstermektedir [13].

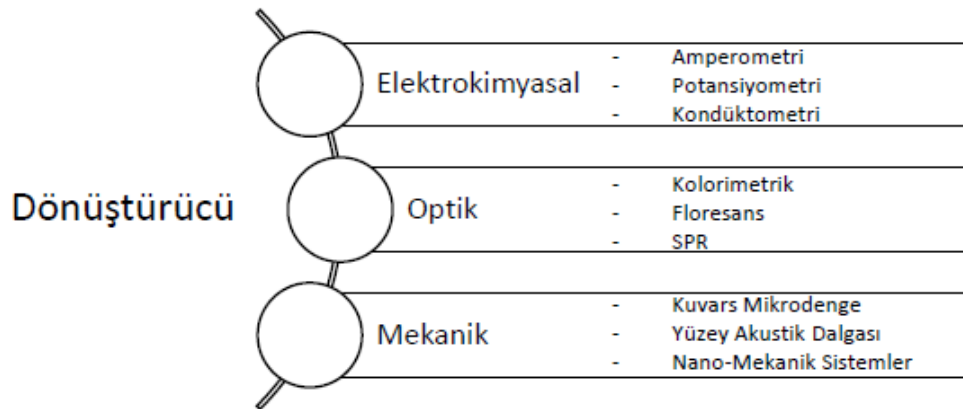
Antikor yapısal olarak iki alana sahiptir. İlk alan, değişken bölge olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge spesifik biyobelirteçleri bağlayabilen, nükleotid bağlama bölgelerine sahip antijen bağlama parçaları (Fab) olarak adlandırılan iki değişken bölge içermektedir. Fab bölgesinde amin grupları bulunmaktadır. Diğer alan ise, sabit bölge olarak bilinen antikorun substrat üzerinde immobilize eden karboksil grubu taşıyan, sabit parçayı (Fc) içermektedir. Antikorlar, kovalent veya kovalent olmayan bağlanma yöntemleri ile substratlar üzerinde hareketsiz hale getirilmektedir [27].

Bir biyosensörün güvenilirliği, biyotanıma elemanlarının sensör yüzeyine ne kadar iyi bağlandığına (immobilizasyona) ve kullanım sırasında yüzeyde kalmasına bağlı olarak değişmektedir. Antikorlar, sahip oldukları tek fonksiyonel terminal grup sayesinde, katı yüzeyler üzerine kolaylıkla immobilize olabilmektedir. Antikorların bu özellikleri göz önüne alınarak metal nanopartiküller ile kaplanması, minyatürleştirilmiş dönüştürücü üretimi için de gelecek vadetmektedir [25].

Antikorlar hastalık belirteçleri, biyolojik savaş ajanları, yasadışı ilaçlar, gıda ve çevre kirleticileri gibi çok sayıda analitin belirlenmesinde biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılmaktadır. Özellikle monoklonal antikorların, özdeş bağışıklık hücrelerinden oluşmaları ve tek değerli afiniteye sahip olmaları, hedef molekülün (analitin) aynı epitopuna bağlanmalarını sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde monoklonal antikorlar kanser teşhisinde biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılabilir [25].

2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması ve Kullanım Alanları

Biyotanıma elemanlarına ve dönüştürülen sinyale bağlı olarak, biyosensörler belirli teşhis amaçları için kullanılmak üzere sınıflandırılmaktadır. Dönüştürücü mekanizmasına göre biyosensörler Şekil 2.1' deki gibi sınıflandırılmaktadır [28].



Şekil 2.1. Dönüştürücü mekanizmasına göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler; klinik teşhis, sağlık, ilaç geliştirme ve izleme, çevre, tarım, yiyecek-içecek endüstrisi, su kalitesi ve güvenlik olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda hızlı, kolay ve hasta başında (bakım noktası) test için tasarlanan biyosensörler biyomedikal alanda öne çıkmaktadır [29].

Günümüzde basit, ucuz, doğru, hassas ve güvenilir biyosensör platformlarına ihtiyaç duyulmakla birlikte, bu özellikleri taşıyan optik biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır [26,29].

2.2.1. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler, analit (biyobelirteç) ile biyo-tanım elemanı arasındaki etkileşimin oluşturduğu ışık dalga boyu, optik alan fazı, polarizasyon veya frekanstaki değişiklikleri izleyen sensörlerdir [11,30]. Optik biyosensörler, tıbbi teşhis, gıda analizi, çevresel uygulamalar, ilaç keşfi, güvenlik ve savunma gibi çeşitli alanlarda geniş bir uygulamaya sahiptir [11,26].

Optik sensörler, düşük tespit limiti, çok yönlülük, tahrip edici olmama, etiketsiz olma, hızlı sinyal izleme ve analiz, aynı anda farklı analitleri veya çoklu analiti tespit edebilme gibi çeşitli avantajları ile algılama yöntemleri arasında öne çıkmaktadır. Optik biyosensörlerin kullanımı iki farklı şekilde olmaktadır [11,26].

- Analitin doğrudan saptanması
- Dolaylı algılama

“UV Absorpsiyonu, Düzlemsel Optik Dalga Kılavuzu, Fiber Optikler, Yüzeyi Arttırılmış Raman Spektroskopisi (SERS) ve Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)” analitin doğrudan saptandığı durumlarda kullanılmaktadır. Dolaylı algılama ise, optik olarak etiketlenmiş problemler aracılığıyla “Floresans ve Kemilüminesans” uygulamalarında gözlenmektedir [11,31].

Kullanılan dönüştürücü mekanizmasına bağılı olarak optik biyosensörler kendi içinde lüminesans, floresans, kolorimetrik ve interferometrik tabanlı olarak ayrılmaktadır [13].

Optik platformlar, kullanım kolaylığı, çoklu analit tespiti ve otomatik mikroakışkan sistemler gibi özelliklerden yararlanarak çeşitli biyosalgılama uygulamaları için uyarlanabilir analitik yaklaşımlar olarak kendilerini kanıtlamıştır [32]. Bir optik biyosensör, tanıma elemanının hedef analit ile etkileşimini izleyerek ölçülebilir bir sinyal üretir [33]. Işık tabanlı sensörler, belirli ışık dalga boylarındaki değişiklikleri algılayabilen optik biyosensörler olarak da bilinir. Bir lüminesans, floresan, kolorimetrik veya interferometrik dönüştürücü kullanılabilir. Analit tanımaya yanıt olarak dalga boylarındaki veya SPR'deki değişiklik, optik dönüştürücüler kullanılarak elektriksel/dijital bir okumaya dönüştürülür [34].

2.2.1.2. Kolorimetrik Biyosensörler

Işığın genliğinde oluşan değişikliği, ortamdaki analit konsantrasyonunu ölçmede kullanan sensörler “Kolorimetrik Biyosensörler” olarak bilinmektedir [18,19]. Kolorimetrik biyosensörler görünür ışık spektrumunda çalışan, hedef molekülün algılanması sırasında herhangi bir cihaza ihtiyaç duymadan çıplak gözle görüntüleme gerçekleştiren sensör çeşididir [35].

Kolorimetrik sensörlerin çoğu, hedef analit ile biyolojik tanıma elemanı arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan renkli ürünlerin izlenmesini içermektedir. Çıplak gözle veya optik algılama cihazıyla tanımlanabilen renkli ürün, analit konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu algılama türleri, etiketsiz algılama yöntemi olarak sınıflandırılmaktadır [11,36].

Metal nanopartiküller ve modern analitik yöntemler kullanılarak tasarlanan kolorimetrik biyosensörler, benzersiz boyutları ve mesafeye bağılı optik özellikleri ile biyosensör çalışmaları için oldukça umut vericidir [37]. Kolorimetrik biyosensör tasarımında genellikle, altın ve gümüş metal nanopartikül çeşitleri kullanılmaktadır. Özellikle altın nanopartiküller (AuNP) sahip oldukları yüksek

sönme katsayıları ile kolorimetrik çalışmalarda yüksek hassasiyet göstermekte ve oluşan renk değişiklikleri kolaylıkla gözlenebilmektedir. AuNP tabanlı kolorimetrik sensörler, nükleik asit, protein ve küçük moleküller gibi çeşitli hedefleri tespit etmek için kullanılmaktadır [35,38].

Son yıllarda, antikor-antijen bağlantısının meydana getirdiği yüksek özgüllükten faydalanan metal nanopartiküllere dayalı kolorimetrik immünosensörler hızla gelişmektedir [39]. Bu kolorimetrik sensörler, geleneksel immünolojik testler ile karşılaştırıldığında basitlik, hızlı hazırlık, gelişmiş stabilite ve spesifik olmayan adsorpsiyonda azalma gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Özellikle AuNP ve antikorun bir araya geldiği kolorimetrik yaklaşımlar, oldukça ilgi çekmektedir [35,38].

2.3. Kanser Teşhisinde Biyosensörler

Her yıl dünya çapında artan sayıda kanser vakası nedeniyle, kanserin erken teşhisine yönelik araştırmalar oldukça önemlidir [34]. Kanser teşhisinde genellikle kanser hücrelerinin histopatolojik olarak incelendiği protokoller uygulanmaktadır. Hasta tümöründen özel iğne veya cerrahi yolla alınan numuneler, çeşitli aşamalardan geçirilerek, mikroskop altında incelenmektedir. Mikroskopik görüntüleme, hasta numunesindeki hücre morfolojisi hakkında doğrudan bilgi verdiği için kanser teşhisinde oldukça önemlidir. Numunelerin hazırlanma ve incelenme aşaması çok fazla dikkat, uzmanlık, zaman ve maliyet gerektirdiği için kanser teşhisinde daha basitleştirilmiş, kullanımı kolay, uygun maliyetli bir yaklaşıma sahip olan biyosensörler ön plana çıkmaktadır [1,7].

Son yıllarda düşük maliyetli, seçici, kararlı ve daha iyi hassasiyet gösteren çok sayıda biyosensör geliştirilmekle birlikte, bu sensörlerin çoğu hala deneysel aşamada olup ileride ticarileştirilmeleri beklenmektedir [40]. Kanser biyosensörlerinin tasarımında diğerlerinden farklı olarak dönüştürücü bileşenin minyatür hale getirilememesi, biyo-tanıma elemanlarının dayanıklılık süresi ve maliyet etkinliğiyle ilgili çeşitli sınırlamalar ortaya çıkmakla birlikte, bu problemlerin çözümünde nanomalzemelerin kullanımı öne çıkmaktadır. Özellikle

kanser tespiti için mikroakışkan temelli optik immünosensörler, küçük boyutları, düşük maliyetleri ve basit kullanımları nedeniyle oldukça popüler hale gelmektedir [6,7].

Kanser biyosensörleri teşhisin yanı sıra, tedavinin izlenmesi ve kişiye özgü tedavi protokollerinin geliştirilmesinde de kullanılabilir [34]. Meme kanseri tümör belirteçlerinin tespiti için floresan, kolorimetrik, yüzey plazmon rezonans ve elektrokemilüminesans biyosensörleri gibi bir dizi optik biyosensör geliştirilmektedir [40,41].

2.4. Nanomalzemeler

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (USFDA) ve AB Komisyonu'na göre, en az 1-100 nm aralığında boyuta sahip olan malzemelere, nanomalzeme adı verilmektedir [42]. Nanomalzemeler, yüksek elektriksel iletkenlik, geliştirilmiş çarpılma taşıma kapasitesi, renk ve piezoelektrik duyarlı reaksiyonlar, değişen şekil ve boyutlar gibi ayırt edici özelliklere sahiptir. Bu özellikler nanomalzemelerin, biyo-algılayıcı aptamerler tarafından konjugasyon ve işlevselleştirme için uygun hale getirilmelerini sağlamaktadır [43].

Günümüzde nanomalzemeler, ilaç dağıtımı, foto-termal terapi, biyo-algılama terapötikler gibi farklı çalışma alanlarının yanı sıra, sensör tasarımında da kullanılmaktadır. Özellikle sensör yüzeyinin daha iletken hale getirilmesi, daha fazla biyolojik tanıma elemanı eklenmesi ve kirlenmenin etkilerinin azaltılması için, biyosensör tasarımında nanomalzemeler tercih edilmektedir [15].

AuNP' ler, grafen oksit (GO), çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT) veya karbon nanoçubuklar, oldukça iletken yapıları ve genişletilmiş yüzey alanları ile sık kullanılan nanomalzemeler arasındadır. Bu tür malzemeler, geçici platformlarda biyomolekül immobilizasyonunu kolaylaştırmaktadır [7,10,44].

2.4.1. Nanomalzemelerin Sensörlerde Kullanımı

Nanomateriyallerin işlevsel hale getirilerek konjuge edildiği biyosensörlerde farklı şekil, boyut, özellik ve yapıda nanomalzemeler kullanılmaktadır [42]. Biyosensörlerin üretiminde nanomalzemeler, özellikle de nanopartiküllerin kullanılması geleneksel biyosensörlerin dezavantajlarını yok etmektedir. Nanopartiküllerin sahip oldukları boyut, güçlü yüzey plazmon rezonansı (SPR), yüksek manyetizasyon ve kimyasal reaktivite gibi benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikler sağlayarak, yüksek bir yüzey-hacim oranı sunmaktadır. Daha geniş bir yüzey alanı ise, daha fazla sayıda biyoreseptörü etkin bir şekilde hareketsiz hale getirerek, numunede bulunan biyobelirteçlerin bağlanmasını en üst düzeye çıkarmakta ve kimyasal bağlanma sinyalini geliştirmektedir. Böylece, biyosensör hassasiyetinin yanı sıra in-vivo görüntüleme kalitesi de iyileştirilebilmektedir [44,45].

2.4.2. Nanomalzemelerin Konjugasyonu

Biyolojik algılama elemanlarının nanomalzemeler ile gerçekleştirdiği konjugasyon, kovalent (amid birleştirme reaksiyonları, çapraz bağlama, tıklama kimyası vb.) veya kovalent olmayan (elektrostatik, hidrofobik, Van der Waals veya hidrojen bağı gibi) etkileşimler olarak sınıflandırılmaktadır [46].

Fizisorpsiyon, proteinler gibi biyomoleküllerin kovalent olmayan etkileşimler yoluyla nanomalzeme yüzeyine adsorbe olduğu immobilizasyon tekniğidir. Kovalent olmayan etkileşimler, pH, iyonik güç, sıcaklık ve yüzey koşullarındaki değişiklik gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle, biyosensör tasarımında genellikle kovalent etkileşimler tercih edilmektedir. Kovalent etkileşim için yaygın olarak glüteraldehit, EDC-NHS ve biyotin-avidin çapraz bağlayıcıları kullanılmaktadır [46].

EDC (1etil-3(3dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür), karboksil gruplarını tipik olarak amin reaktif NHS (N-hidroksisüksinimid) esterlerinin oluşumu yoluyla birincil aminlerle birleştirmek için kullanılan, sıfır uzunluklu bir çapraz bağlama

maddesidir. NHS varlığında EDC, karboksilik asit gruplarını amin reaktif NHS esterlerine dönüştürmek için kullanılmaktadır. Bu işlem, EDC' yi asit içeren bir molekülle karıştırıp, ortama NHS ilave ederek gerçekleştirilmektedir. NHS grubuna bir sülfonik asit grubunun eklenmesi hem aktifleştirilmiş esterlerin hem de ayrılan grubun suda çözünürlüğünü arttırarak, aktivasyondan sonra substratların temizlenmesini kolaylaştırmaktadır [47].

EDC / NHS birleştirme kimyası yüksek dönüşüm verimliliği, hafif reaksiyon koşulları, kolayca ayrılabilen yan ürünler ve en önemlisi organik materyallerle olan uyumluluk gibi çeşitli avantajlara sahiptir [48–50]. EDC-NHS konjugasyonunda, nanopartikül kompleksi üzerindeki –COOH grubu ile protein veya antikorun –NH₂ grubu arasında amid bağı oluşturularak, antikor veya proteinler nanopartiküllere bağlanmaktadır. Bu bağlayıcılar, reaksiyonun fizyolojik pH' da ve suda güçlü bir kovalent bağ oluşturmasını sağladığı için, diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır [47]. EDC ve NHS, proteinler ile kullanılan iyi geliştirilmiş kaplama ajanları olup, EDC / NHS birleştirme kimyası reseptör olarak biyolojik moleküllerin kullanıldığı farklı biyosensörlerin, biyo-çiplerin ve laboratuvar çiplerinin geliştirilmesinde tercih edilmektedir [48–50].

Biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan AuNP' ler de ise, kendiliğinden oluşan tek katman (SAM:self assembled monolayer) sayesinde kovalent etkileşim gerçekleşmektedir. SAM oluşturulmasında genellikle 11-merkaptoundekanoik asit gibi tiyol (sülfidril grupları (-SH)) içeren bileşikler (merkaptanlar) kullanılmaktadır. Özellikle bu bileşikler biyolojik tanıma elemanlarının daha işlevsel hale getirilmesinde rol almaktadır [51].

Katı destek üzerinde antikor gibi büyük proteinlerin immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan birkaç yöntem bulunmaktadır. Destek materyali ve protein arasındaki kovalent bağ genellikle bir ara grup aracılığıyla gerçekleşmektedir. Destek yüzeyi, karboksilik asit (COOH), amin (NH₂), maleimid (H₂C₂ (CO) ₂NH), gibi gruplarla veya daha az sıklıkla iyodoasetamid grupları, izotiyosiyanat (-N = C = S) grupları veya boronik asit gibi gruplarla reaktif hale getirilmektedir. Bu gruplar

ile aktif hale gelen destek yüzeyi, amino, tiyol, karboksi grupları veya antikorların sakkarit grupları ile reaksiyona girerek kovalent bağ oluşumunu katalizlemektedir [31].

2.5. Optik Biyo-Tanıma İçin Metal Nanopartiküller

Metal nanopartiküller boyutlarına bağlı olarak optik, elektromanyetik ve kimyasal özellikleri için kullanılmaktadır [44]. Metalik nanopartiküller arasında, altın (Au) ve gümüş (Ag) nanopartiküller (NP), biyosensör çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır. AuNP ve AgNP' ler, sahip oldukları farklı fiziksel ve kimyasal özellikler ile biyosensör üretimi için mükemmel bir zemin oluşturmaktadır. Metal nanopartiküller değiştirilebilir bir yüzey kimyasına sahiptir. Bu özellikleri ile biyotanıma elemanı olarak DNA, protein, enzim, antikor ve peptit gibi biyomoleküllerle işlevselleştirilmiş biyosensörlerin sıvı numunelerinde biyobelirteçlerin varlığını tespit edebilmektedir [42].

AuNP ve AgNP' ler, biyotanıma uygulamaları için yararlı olan yüzey plazmon rezonansı (SPR) nedeniyle, benzersiz ve ayarlanabilir optik özelliklere sahiptir. Böylece, metal nanopartiküller kullanılarak tasarlanan biyosensörün yok olma spektrumu kolay, hızlı ve uygun maliyetli bir teknik olan spektrofotometre ile ölçülebilmektedir [42,45]. Metal nanopartiküllerin antikorlarla kaplandığı biyosensör uygulamaları hem nanopartiküllerin optik özellikleri hem de antikorların sahip olduğu benzersiz 3 boyutlu yapıları sayesinde, kanser biyobelirteçleri de dahil olmak üzere, çeşitli analitlerin saptanması kullanılmaktadır [41]. Özellikle AuNP' ler kimyasal stabiliteleri ve biyouyumlulukları nedeniyle, biyosensör çalışmalarında çok fazla tercih edilmektedir [52].

2.5.1. Altın Nanopartiküller

Altın nanopartiküller (AuNP), 5 ila 110 nm arasında değişen, küre, küp, nanoçubuk ve nanoşerit dahil olmak üzere farklı formlarda bulunabilen nanomalzeme grubudur. AuNP' ler yüksek kimyasal kararlılık, boyuta bağlı olarak

sunduğu benzersiz optik ve elektronik özellik, ışığı rezonans olarak dağıtma yeteneği, mükemmel iletkenlik, biyo-uyumluluk, sentez ve işlevsellik kolaylığı gibi avantajlarıyla biyolojik algılama için en yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerdir [53].

Tüm nanomalzemeler arasında AuNP' ler, elektrokimyasal biyosalgılama ve kanser biyobelirteçlerinin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Basit ve hızlı sentez, uygun işlevsellik, toksik olmama, geniş yüzey alanı/hacim oranı ve yüksek elektriksel iletkenlik meme kanserinin klinik teşhisi için AuNP' lere olan tercihi artırmaktadır. AuNP' ler yalnızca elektrokimyasal analizlerde değil, aynı zamanda floresan ve kolorimetrik analizler gibi optik çalışmalarda da yer almaktadır [54,55]. AuNP, biyo-afinite tabanlı biyosensörlerin geliştirilmesinde diğer nanomalzemelerle birlikte veya antikor/aptamer ile konjuge olarak kullanılmaktadır. AuNP, antikorun floresans sinyalini güçlendirmektedir [54,55].

AuNP' lerin yüzeyi çeşitli organik moleküller yardımı ile modifiye edilmektedir. Nanopartiküllerin modifikasyonu için genellikle amin, karboksilat, PEG (polietilenglikol), tiyol gibi moleküller tercih edilmektedir. Bu moleküller nanopartikülleri biyo-uyumlu hale getirerek, partikül üzerinde çeşitli spesifik tanıma ve bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır. AuNP' lerin yüzeyi, tiyol grubu içeren ((HS- (CH₂)_n -X) gibi) reaktifler kullanılarak tek katmanlı (SAM) hale getirilmektedir. AuNP yüzeyinin tek katmanlı tabaka ile kaplanması, AuNP' ü stabilize ederek daha kullanışlı hale getirmektedir [38].

AuNP' lerin morfolojisi ve fizyolojisi optik özellikleri ile ilişkilidir. Nanopartiküllerin boyutunun değiştirilmesi koloidal AuNP' lerin rengini etkilemektedir. Sulu çözeltide, küresel AuNP'ler turuncu-kırmızıdan, mora doğru bir renk aralığı göstermektedir. 1 ile 100 nm arasında değişen boyutlarına göre, AuNP' ler 500-550 nm arasında absorbanans vermektedir [52].

AuNP' ler çözelti içinde dağıldıklarında güçlü lokalize yüzey plazmon rezonansları (SPR) nedeniyle kırmızı renkte görünmektedir. Bu renk, parçacıklar toplanmaya başladıkça aralarındaki mesafe bağlı olarak kırmızıdan maviye doğru belirgin bir şekilde değişmektedir [53]. Küçük küresel nanoparçacıklar şarap kırmızısı görünürken, daha büyük parçacıklar veya daha küçük parçacıkların kümeleri, mordan-maviye kadar değişen renklerde görünmektedir [56].

AuNP' ler belirgin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile tedavi, teşhis, biyolojik etiketleme, ilaç dağıtımı, kimyasal ve biyolojik algılama, görüntüleme, doğrusal olmayan optik, fotovoltajik ve kataliz gibi çeşitli alanlarda yapı iskeletleri olarak kullanılmaktadır [52].

AuNP' lerin, geniş yüzey-hacim oranı, şekille ilgili optoelektronik nitelikler, mükemmel biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi spesifik özellikleri, onları biyoteknoloji için olağanüstü araçlar haline getirmektedir [55].

AuNP' ler,

- Yüksek X ışını absorpsiyonuna katkı
- Sentetik kullanım kolaylığı
- Partikülün fizikokimyasal özellikleri üzerinde kesin kontrol sağlama
- Tiyoal-disülfid ve aminlere güçlü bağlanma affinitesi
- Farklı elektrolit özellikler ve benzersiz optik ayarlama gibi çeşitli özelliklere de sahiptir [55].

AuNP' ler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak 3 farklı şekilde sentezlenebilmektedir [52].

Fiziksel Sentez: Termolitik ve ultraviyole radyasyon metotlarını içermektedir [51,52].

Kimyasal Sentez: Sulu ortamda indirgeyici ajanlar (Sodyum sitrat ve sodyum borohidrit) tarafından meydana gelen kimyasal reaksiyondan oluşmaktadır. Altın tuzlarının kimyasal olarak indirgendiği Turkevich prosedürü yaygın olarak kullanılmaktadır [53]. Bu prosedür; basit oluşu, kolloidal nanopartiküllerin

stabilitesi, altın sentezinin kolaylığı ve boyutunun kontrol edilebilirliğinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir [52].

Biyolojik Sentez: Bakteri, fungus, alg, maya, virüs ve bitkisel kaynaklar kullanılarak yapılan AuNP sentezidir. Çevreye zararsız, güvenli, tehlikeli atık oluşumunu azaltan bir sentez yöntemidir [55].

AuNP' ler antik çağlardan günümüze, antimikrobiyal etki, kataliz, X-ray görüntüleme, nanoelektronik, su remediasyonu, hastalık teşhisi ve kontrolü, fototermal ve fotodinamik terapi, gen ifadesi, gen terapisi, ilaç dağıtımı, kanser terapisi ve biyosensörler gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [51,55].

AuNP' ler sahip oldukları şekil, boyut ve yüksek sönme katsayısı gibi optik özellikleri ile biyolojik moleküllerin ve metal iyonlarının tespit edilmesinde "kolorimetrik algılama platformları" olarak kullanılmaktadır [43,57]. Özellikle AuNP' lerin agregasyonuna dayalı kolorimetrik testler, basitlikleri ve duyarlılıkları nedeniyle tanı uygulamalarında dikkat çekmektedir [58].

2.6. Mikroakışkan Sistemleri

Mikroakışkanlar, kimya, biyokimya, mühendislik, fizik, nanoteknoloji ve biyoteknoloji gibi birçok farklı bilimi birbirine bağlayan çok disiplinli bir teknolojidir. Büyük yüzey-hacim oranı, yerinde test için önemli olan mikroakışkan cihazların taşınabilirliğini sağlamaktadır [39].

Mikroakışkanlar, sürekli akış, damlacık bazlı ve dijital mikroakışkanlar olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. Sürekli mikroakışkan cihazlar, kalıcı olarak kazanmış mikro kanallardan ve bu cihazlarda bir sıvı akışını manipüle etmek için kullanılan çevresel cihazlardan (mikro-pompalar ve mikro-valfler gibi) oluşmaktadır. Damlacık tabanlı mikroakışkan sistemler, bir T bağlantısında iki veya daha fazla karışmaz sıvı (çoğunlukla) kullanarak, mikro kanallarda damlacıklar oluşturmaktadır. Dijital mikroakışkan sistemlerde ise, elektrostatik olarak çalıştırılan elektrot üzerinde farklı damlacıkların hareketi ve kontrolü

gerçekleştirilmektedir [11]. Özellikle cam kılcal boruları (kapiller), mikroakışkan teknolojisinde teşhis, tarama, akış kimyası ve malzeme sentezi için yaygın olarak kullanılmaktadır [59].

2.6.1. Cam Kapiller

Cam kapiller milimetre çapında ve santimetre uzunluğunda olan boyut, ağırlık depolama ve maliyet açısından birçok avantaja sahip malzemelerdir [11,60]. Cam kapiller hem sıvıların hem de ışığın yönlendirilmesinde kullanılabilir. Cam kapillerin aktif yüzey alanı, sinyal oluşumu ve sensör hassasiyeti için oldukça önemlidir. Özellikle optik immüno-algılama için cam kapillerin kullanımı öne çıkmaktadır [22,31].

2.6.2. Cam Yüzeylerin Modifikasyonu

Cam yüzey ve metal oksit nanopartiküller genellikle silil reaktifler (örneğin; 3-aminopropiltrimetoksisilan) kullanılarak fonksiyonel hale getirilmektedir [31]. Cam yüzeylerin çeşitli gruplar ile fonksiyonel hale getirilmesinde, silanizasyon (aminleme) yöntemi tercih edilmektedir [61].

Silanizasyon, yüzeydeki hidroksil grupları ile alkoksi veya kloro reaktif gruplar arasında gerçekleşen kovalent bağ oluşumuyla, yüzeyin fonksiyonel hale getirilmesi işlemidir [62]. Silanizasyon, genellikle kimyasal olarak aktif hidroksil gruplarına sahip herhangi bir substrat üzerinde gerçekleşebilmektedir [63]. Bazı substratlar (silika ve agaroz vb.) hidroksil gruplarına sahipken, bazılarının hidroksil grubu oluşması için asit, pirana çözeltisi, plazma işlemi veya KOH / NaOH kullanılarak bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir [64]. Silanizasyon yönteminde, çeşitli substratların cam veya silika yüzeyler üzerine immobilizasyonu için, genellikle çapraz bağlayıcı reaktif olarak organosilanlar kullanılmaktadır [46,64–66]. Bu bağlayıcı reaktifler ile silika, kuvars, cam, demir, bakır gibi inorganik substratlar yaygın olarak kullanılmaktadır [46].

Silanizasyon, çeşitli fonksiyonel silan bağlama maddeleri kullanılarak oda sıcaklığı veya yüksek sıcaklık gibi koşullarda, sulu faz, organik faz, gaz fazı ve kimyasal buhar biriktirme yöntemleriyle gerçekleştirilebilmektedir [67].

Silan bileşiklerinin silanizasyonu; yüzeylerin fonksiyonel hale getirilmesi, tıbbi cihaz, mikro ve nano üretim teknolojileri gibi çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [68]. Malzeme yüzeylerinin immobilizasyon için uygun hale getirilmesinde, en çok tiyol sonlu (-SH) ve amin (-NH₂) sonlu silan grupları tercih edilmektedir [69].

Çeşitli silanlama maddeleri arasında, aminosilanlar yüzey reaksiyon kimyasında benzersiz olup, yüzeyleri amin grupları ile işlevselleştirmek için en yaygın kullanılan reaktiflerdir [70–72]. Aminosilanlar, amin grupları ile molekül içi veya moleküller arası siloksan oluşumunu katalizledikleri için, protein mikrodizisi, biyosensör gibi uygulamalarda proteinleri veya diğer molekülleri, cam veya silikon dioksit yüzeylere bağlayıcılarla bağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır [71]. Aminosilanlar, cam yüzey üzerindeki silanol (Si-OH) gruplarıyla tepkimeye girerek Si – O – Si – R – NH₂ yapısını oluştururlar. Oluşan amin tabakası cam yüzeyden dışarı doğru uzanan ve farklı teknolojik alanlarda kullanılabilen bir platform sunmaktadır [72–75].

3-Aminopropiltrietoksisilan (APTES), çeşitli yüzeylerin özellikle silika veya cam yüzeylerin amin grupları ile işlevselleştirmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. APTES, üç hidrolize edilebilir etoksi grubuna ve aminopropil gruplarından amine (NH₂) sahiptir [71,76,77]. APTES' teki alkoksi grupları su varlığında polimerizasyona ve hidrolize duyarlı olduğu için, yüzeylerin APTES ile muamele edilmesinde genellikle susuz organik çözücüler tercih edilmektedir [71]. APTES ile silanize edilmiş yüzeyler yüksek immobilizasyon yoğunluğuna sahip, biyolojik kirliliği az, yüzeydeki biyomoleküller sızıntılara karşı dayanıklı ve stabil bir bağlanma göstermektedir [64].

2.7. Biyosensör ve Nanomalzeme Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler

Biyosensör çalışmaları, özellikle nanoteknoloji alanındaki gelişmelerden büyük ölçüde etkilenmektedir. Kullanılan nanomalzemenin şekli, boyutu, yüzey ligandı, büyüme kinetiği ve çevresindeki malzemelerle etkileşimi, çeşitli karakterizasyon yöntemleri kullanılarak belirlenmektedir. Karakterizasyon için genellikle zeta analizi, elektron mikroskobu, X-ışını ve spektroskopi tabanlı yöntemler tercih edilmektedir [78].

Tüm bu teknikler arasında UV-VIS spektrofotometri, nanopartikül oluşumunu izlemek için gerçekleştirilen ilk karakterizasyon tekniğidir. Bir çözelti içinde iyi dağılmış bir nanomalzeme, boyutuna, konsantrasyonuna, aglomerasyon durumuna ve kırılma indisine göre karakteristik bir absorpsiyon bandı vermektedir. UV-VIS spektrofotometri, bu karakteristik absorpsiyon bantlarının gözlemlenmesi ve kolloidal çözeltilerdeki nanopartiküllerin stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [45].

Elektron mikroskopları, nanomalzemenin boyutunun ve şeklinin ayrıntılı olarak görselleştirilmesinde kullanılmaktadır. TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu), iletilen elektron ışınlarının ince bir numuneden geçtiği ve malzemenin bilgisini almak için numunenin çevreyle kontrastının incelendiği SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)' den daha yüksek bir çözünürlük (101 nm' den az) elde etmektedir [14].

Nanomalzeme yüzeyinin işlevselleştirilmesi ve prob üretiminde, FTIR, Raman spektroskopisi, EDX (element haritalaması) ve XPS gibi çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılmaktadır [14].

FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi), orta kızılötesi bölgedeki spektrumda (4000-400 cm^{-1}) bulunan organik bileşiklerin; fonksiyonel grupları, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve

yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığını belirlemek için kullanılan yöntemdir. FTIR, nanopartiküllerin yapısını ve etkileşimlerini incelemek için kullanılan en önemli karakterizasyon tekniklerinden biridir [78,79].

EDX, atomik seviyede nanopartiküllerdeki elementlerin haritalanması için kullanılmaktadır [14].

Başka bir karakterizasyon tekniği olan XPS ise, ligand etkileşimlerini ve nanopartiküllerin çekirdek-kabuk yapılarının yüzey işlevselleşmesini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [78,80].

Zeta analizi, nanopartiküllerin karakterizasyonu için sıklıkla tercih edilmektedir. “Zeta Size” ölçümü partiküllerin boyutu; “Zeta Potansiyel” ölçümü ise, partiküllerin yüzey yükünün belirlenmesinde kullanılmaktadır [81]. Belirtilen tüm karakterizasyon teknikleri, nanomalzemenin genel özelliklerini değerlendirmek için birbirleriyle kombinasyon halinde kullanılmakta ve doğrulanmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Nanomalzemelerin Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler [14]

Karakterizasyon Tekniği	İncelenen Parametreler
EDX	Elementel bileşim
FTIR	Yüzey bileşimi, ligand bağlama
TEM	Nanopartikül boyutu, boyut monodispersitesi, şekil, kümelenme durumu, matrislerdeki nanopartiküllerin tespiti ve lokalizasyonu, büyüme kinetiği
UV-VIS	Optik özellikler, boyut, konsantrasyon, yığılma durumu, nanopartikül şekli
XPS	Elektronik yapı, elementel bileşim, oksidasyon durumu, ligand bağlanması (yüzeğe duyarlı)

Zeta Size	Partikül boyutu
Zeta Potansiyel	Aglomerasyon durumu, dağılım kararlılığı

2.8. Meme Kanseri

Kanser kontrolsüz hücre büyümesine ve tümör gelişimine neden olan, insan sağlığı ve yaşamı için en önemli tehditlerden biridir [40,82]. Kanser türleri arasında meme kanseri, yılda 2.3 milyon yeni vaka ile en yüksek insidans oranına sahip olan kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin en büyük nedenidir [40,83].

Kanserin erken teşhisi, hastanın hayatta kalması ve tedavinin başarısı için çok önemlidir [34]. Tümör biyobelirteçleri kanserin teşhisi, izlenmesi, sınıflandırılması, ilerlemesi ve kemoterapiye direncin değerlendirilmesinde kullanılan terapötik önemi yüksek moleküllerdir [82].

Günümüzde tanı için MRI, mamografi, ultrason, bilgisayarlı tomografi taraması, X-ray görüntüleme ve doku biyopsisi gibi teknikler kullanılmaktadır. Bunlar, ilgili ekipman ve uzman analizi gerektiren tespit maliyeti yüksek yöntemler olmakla birlikte, genellikle semptomlar ortaya çıktıktan sonra kullanılmaktadır [7,82]. İmmünoanaliz ve PCR gibi teknikler ise, tümör biyobelirteçlerinin tespit edilmesinde kullanılmakla birlikte, kullanılan immünoanaliz tekniklerinin düşük hassasiyete sahip olması ve PCR' in uygulanmasında görülen karmaşıklık nedeniyle farklı alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır (Çizelge 2.2) [7,84]. Özellikle kan dolaşımında bulunan kanser biyobelirteçlerinin teşhisi için, non-invaziv (cerrahi müdahale gerektirmeyen) yöntemlere olan talep artmaktadır [84]. Biyosensörler bu ihtiyaçları karşılayabilen bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Biyosensörler, bir hastalığı teşhis etmek ve terapötik etkinliği izlemek için tasarlanan, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha verimli ve az maliyetli olması beklenen araçlardır [40].

Çizelge 2.2. Meme Kanseri Tanısında Kullanılan Teknikler ve Sınırlamaları [7]

Kullanılan Teknik	Sınırlamalar
Mamografi	<p>Meme kanserlerinin sadece %70'ini tespit eder</p> <p>Düşük duyarlılık ve özgüllük</p> <p>Meme dokusu yoğunluğu arttıkça hassasiyet azalır</p> <p>Yoğun ve küçük dokudaki tümörü erken evrede tespit edemez</p> <p>Sık yanlış pozitif sonuçlar</p> <p>Düşük enerjili X ışınları dokuda mutasyonlara neden olabilir</p> <p>Analiz sırasında tümör dokusunun parçalanması metastaza neden olabilir</p> <p>Tümör hücrelerini kaçırabilir</p> <p>Gereksiz ameliyat</p>
Biyopsi	<p>Tümör metastazına neden olabilir</p> <p>Nitelikli uzmana ihtiyaç duyar</p> <p>Daha sonraki aşamalarda onay için yapılır</p> <p>Masraflı</p>
MRI	<p>Duktal ve lobüler karsinom gibi tüm kanser türlerini tespit edememe</p> <p>Masraflı</p>
Sonografi	<p>Daha az hassas ve nispeten pahalı</p> <p>Gerçek zamanlı muayeneyi analiz etmek için deneyimli uzmana ihtiyaç vardır</p>
FISH (Flüoresan in situ hibridizasyon)	<p>Yarı nicel sonuç verir</p> <p>Hastaları biyobelirteçlere göre pozitif veya negatif gruplara ayırır</p>
ELISA	<p>Zaman alıcı</p>

	Masraflı
	Düşük seviyeli belirteçlere karşı duyarsız
	Analitlerin asıl rengi yanlış sonuçlara yol açabilir
	Analiz yapmak için eğitimli personel gerekir
RIA	Radyoaktivite riski
	Karmaşık prosedür
	Zaman alıcı
	Analiz yapmak için eğitimli personel gerekir
IHC	Karmaşık teknik
	Zaman alıcı
	Analiz yapmak için eğitimli personel gerekir

Son zamanlarda kanserin klinik teşhisi için yenilikçi, basit, ekonomik ve uygulanabilir platformlar sunan biyosensörler oldukça popüler hale gelmektedir [82]. Özellikle nanomalzeme, biyobelirteç, mikroakışkan ve modelleme yazılımı alanlarında gerçekleşen son gelişmelerle birlikte, biyosensörlerin klinik alanda ve hasta bakım noktalarında daha hassas ve kullanışlı hale getirmesi beklenmektedir [34].

2.8.1. Meme Kanseri Biyobelirteçleri

Biyobelirteçler, kanser hücresinde aşırı olarak ifade edilen veya mutasyona uğrayan protein, DNA ve RNA gibi moleküllerdir. Biyobelirteçler, kanser türlerinin ayırımında kullanılabildiği gibi, erken teşhis ve tedaviye de yardımcı olmaktadır. Yeni biyobelirteçlerin ortaya çıkarılmasında hastaların moleküler profilleri genomik, proteomik ve biyoinformatik ile kombinasyon halinde incelenmektedir. Biyolojik sıvılardaki biyobelirteçler farklı hastalık evrelerine ve durumlarına bağlı olarak değişebildiği için, genellikle kanser teşhisinde çeşitli moleküler belirteçler kullanılmaktadır [85].

Biyobelirteçlerin tespitinde, enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi klasik yöntemler tercih edilmekle birlikte bu yöntemler yüksek maliyet, uzman kişilere ihtiyaç duyma ve süreç yavaşlığı gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, belirli bir kanser türünün teşhisinde o kansere özgü biyobelirteci tespit edebilen biyosensörler, hızlı teşhis için oldukça önemlidir [86].

Biyobelirteç, sensörün biyolojik tanıma elemanına bağlanarak kimyasal bir sinyal oluşturmaktadır. Dönüştürücü ise bu sinyali, kanserin evresini belirlemek, değerlendirmek ve daha fazla analiz için elektronik olarak işleyerek okunabilir bir çıktıya dönüştürmektedir [86].

Kanserin erken aşamalarında, kan gibi vücut sıvılarında biyobelirteç miktarının düşük olmakla birlikte, bir biyosensör numunede bulunan düşük miktardaki biyobelirteci tespit edebilmelidir. Bir biyosensörün duyarlılığı, minimum saptama sınırı (LOD) değeri ile belirlenmektedir. LOD, hasta numunesinde bulunan analitlerin (hedef molekül) saptandığı minimum değerdir [86].

Her kanserin farklı, bazen de ortak biyobelirteçleri (kansere ilişkili proteinler) bulunmaktadır. Meme kanserinin erken teşhisi, takibi ve tedavi edilmesi biyobelirteçlerin kullanımı oldukça önem taşımaktadır [7]. Meme kanserinin teşhisinde kullanılan genomik, transkriptomik ve proteomik biyobelirteçler Çizelge 2.3' de gösterilmektedir [82,87].

Günümüzde tedavi protokollerine karar verilirken tümör boyutu, kanser evresi ve negatif risk faktörleri (Her-2 ve Östrojen reseptörü (ER) / Progesteron reseptörü (PR)) ile birlikte CA 15-3 seviyeleri dikkate alınmaktadır [88].

Çizelge 2.3. Meme Kanseri Biyobelirteçleri [82].

	Biyobelirteçler	Kullanım Alanları
Genomik Meme Kanseri Biyobelirteçleri	BCRA1 ve BRCA2 genleri MUC1	Teşhis
Transkriptomik Meme Kanseri Biyobelirteçleri	miRNA 9, miRNA 10b, miRNA-21, miRNA 17-5p, miRNA 148a, miRNA 335, miRNA 155 ve miRNA210	Teşhis ve Belirti
Proteomik Meme Kanseri Biyobelirteçleri	(HER) ailesi, p53, CA125, CA19-9, CA15-3, CA242, CA27.29, CA15-9, EGF, VEGF, CEA	Teşhis ve Belirti

2.8.1.1. İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 (HER2)

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) proteini, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR veya ErbB) ailesinin üyesi ve bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür [84,87]. Meme kanseri vakalarının %15-30' unda HER-2 aşırı ifade olmaktadır [85,89]. Bu belirteç en agresif biyolojik davranışlarla ilişkilendirilmektedir. Özellikle HER2-pozitif meme kanseri hastalarının, HER2-negatif hastalara göre daha kötü prognoz göstermesi daha ağır bir tedavi görmelerine neden olmaktadır. Bu nedenle HER2' nin aşırı üretiminin tespiti, teşhis ve tedavi için büyük önem taşımaktadır [90]. Dolaşımda görülen HER-2 reseptör protein seviyesi, teşhis için indikatör olarak kullanılabilir. HER-2 reseptör proteininin yüksek seviyelerde ifade edilmesi, meme kanseri hastalarının hayatta kalma oranını önemli derecede azaltmaktadır. Aynı zamanda hastalığın tekrar etmesi durumunda, HER-2 erken teşhis için izleme biyobelirteci olarak kullanılmaktadır. HER-2, meme kanserinin metastaz yapma durumunu tahmin etmeye de yardımcı olmaktadır [87].

HER2' nin serumdaki normal konsantrasyonunun 15 ng/ml olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda metastaz yapan meme kanserinde serumdaki HER-2 oranının 15 ng/ml' den fazla olduğu görülmektedir [91].

Son yıllarda HER2-pozitif kanser hücrelerin tespiti için FISH, immünohistokimya ve PCR gibi metotlar kullanılmakla birlikte, bunların birçoğu hücre belirlemeyle sınırlı olup serumda bulunan HER-2 konsantrasyonunu lememektedir [40]. Bu yöntemler düşük özgüllük, karmaşıklık, pahalılık ve duyarlılık eksikliği gibi çeşitli dezavantajlara sahip olduklarından, alternatif yöntemlerin geliştirilmesine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır [84].

2.8.1.2. Kanser Antijeni 15-3 (CA15-3)

CA15-3, mucin (MUC) denilen MUC1 gen ailesine ait karbohidrat içeren protein antijenidir. MUC1 geni, malignant meme tümörlerinde aşırı ifade edilmektedir. MUC1' in aşırı ifade edilmesi, meme kanseri tümör biyobelirteci olan CA15-3' n açığa çıkmasına neden olmaktadır. CA15-3' n kandaki konsantrasyonu, meme kanserinin teşhisinde ve klinik olarak ileri meme kanserinde yaygın olarak kullanılan önemli bir biyobelirteçtir. CA15-3, acil operasyonlardan sonra hastaların durumunun takip edilmesinde de kullanılmaktadır [40].

İnvaziv meme kanseri (metastaz yapmış kanser) olan kadınların yaklaşık %60-75' i yüksek CA15-3 seviyelerine sahiptir. Sağlıklı insanlar için CA15-3 seviyeleri 30 U/mL' den daha düşük olmakla birlikte, CA15-3'n konsantrasyonu 100 U/mL' nin üzerinde olduğunda, hastaların meme kanseri oldukları düşünülmektedir [85,91]. CA15-3' n serumdaki konsantrasyonunun ve hastalardaki oranının yükselmesi, tümörün büyüklüğü veya hastalığın evresiyle de artış göstermektedir[87]. Meme kanserli hastalarda CA15-3 konsantrasyonları Evre I kanserde %10, Evre II kanserde %20, Evre III kanserde %40 ve Evre IV kanserde %75 yükselmektedir [88].

Serumdaki CA15-3, enzim bağlantılı immünosorbent analiz, radyo immünolojik test ve kimyasal immünolojik testler gibi çeşitli immünolojik metotlarla belirlenmektedir. Bu yöntemler yüksek maliyet, zaman alma ve karmaşıklık gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, CA15-3' ün hızlı ve yüksek duyarlı tespitine yönelik yeni yaklaşımlara olan talep artmaktadır [88,92].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

3.1.1. Altın Nanopartikül Sentezi ve Modifikasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen Altın (III) klorür trihidrat (HAuCl_4), Sodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ve Sodyum hidroksit (NaOH) altın nanopartiküllerin sentezi sırasında; MUA-11 Merkapto undekanoik asit ($\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$) ve Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) ise modifikasyonunda kullanılmıştır.

Chrom filter firmasından temin edilen CA membranlı, 0.22 μm 33 mm steril şırınga filtresi istenmeyen boyutlardaki altın nanopartiküllerin filtre edilerek, çözeltilerden ayrılması için kullanılmıştır.

3.1.2. Sensör Platformu ve Kullanılan Kimyasallar

Hirschmann firmasından temin edilen tek kullanımlık mikropipetler (cam kılcal-kapiller tüpler) sensör platformu olarak kullanılmıştır.

Cam yüzeylerin temizlenmesi için Merck firmasından temin edilen Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve Sülfirik asit (H_2SO_4) kullanılmıştır.

Cam yüzeylerin fonksiyonel hale getirilmesinde, Sigma-Aldrich firmasından temin edilen; Aseton (CH_3COCH_3), Metanol (CH_3OH), Toluen (C_7H_8), 3-(Aminopropil)trietoksilan (APTES) ve Trietilamin ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$) kullanılmıştır.

3.1.3. İmmobilizasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Sodyum klorür (NaCl), 4-Morfolinetansülfonik asit monohidrat fosfat (MES) ve Merck firmasından temin edilen Tris(hidroksimetil)aminometan ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$), antikorların oksidasyonunu sağlayan tamponların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS), antikorların altın nanopartikül ve cam yüzeyine immobilizasyonunda çapraz bağlayıcılar olarak kullanılmıştır.

Biomatik firmasından temin edilen fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS tablet) antijen ve antikorların dilüsyonunda kullanılmıştır.

3.1.4. Biyolojik Tanıma Elemanı Olarak Kullanılan Antikorlar

Sino Biological firmasından temin edilen HER2/ERBB2 Mab (capture-yakalayıcı antikor), HER2/ERBB2 Mab (detection-belirleyici antikor); MyBiosource firmasından temin edilen Kanser Antijeni 15-3 (CA 15-3) MUC 1 antikor (capture-yakalayıcı), Kanser Antijeni 15-3 (CA 15-3) MUC 1 antikor (detection-belirleyici), biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılmıştır.

3.1.5. Kanser Biyobelirteçleri

Kanser biyobelirteci olarak, Sino Biological firmasından temin edilen HER2/ERBB2 proteini (antijen), MyBiosource firmasından temin edilen Kanser Antijeni (CA 15-3) MUC 1 Antijeni ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden temin edilen SK-BR-3 HER2 (+) meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır.

3.2. Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

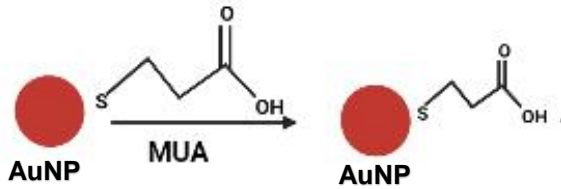
3.2.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi

0.008 g H₂AuCl₄, 0.8 ml ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Bu altın çözeltisi 80 ml ultra saf su içerisine aktararak, 800 rpm' de 90 °C 15 dk geri akım sisteminde (refluks) kaynatılmıştır. Kaynayan altın çözeltisine, 2.8 ml %1' lik sodyum-sitrat eklenerek, karışım 15 dk daha kaynatılmıştır. Bu süreç boyunca çözeltinin rengi, açık pembeden canlı bir kırmızıya dönmüştür. Elde edilen altın nanopartikül (AuNP) solüsyonu, oda sıcaklığında ışık geçirmeyen bir erlen içerisinde 1 saat

daha karıştırılmıştır. Daha sonra sentezlenen AuNP' ler CA membranlı steril şırınga filtresiyle (0.22 µm 33 mm) filtre edilerek, +4 °C' de saklanmıştır [93].

3.2.2. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin Modifikasyonu

Sentezlenen altın nanopartikül solüsyonu, 1mM NaOH ile 1 gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra, yüzeyin tek katmanlı [self-assembled monolayers (SAMS)] hale getirilmesi için 10 ml AuNP solüsyonu, 10 mM 100 µl (etanolde doyurulmuş) MUA (11-Merkapto undekanoik asit) ile 6 saat boyunca, 150 rpm' de, +4°C' de muamele edilmiştir. Bu işlem sonucunda AuNP' lerin yüzeyi MUA ile kaplanarak tek katmanlı hale getirilmiştir (Şekil 3.1) [93].



Şekil 3.1. MUA ile modifiye edilmiş AuNP' ler

3.2.3. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen AuNP' lerin karakterizasyonu için;

- Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere),
- UV-VIS Spektrofotometri (Nanodrop 1000),
- Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR) ve
- Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) cihazları kullanılmıştır.

FTIR için, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Merkezi Analiz Laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) için, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) merkezi laboratuvarından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

Zeta-Sizer: Polistiren küvet içerisine 200 µl AuNP çözeltisi, 800 µl saf su eklenerek hazırlanan örnek Zeta-Sizer cihazında okunmuştur. Bu cihaz ile sentezlenen nanopartiküllerin boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve yüzey yükü (zeta-potansiyel) belirlenmiştir.

FTIR: Sentezlenen AuNP 50 ml' lik falcon tüplerine alınarak, 4100 rpm' de 40 dk ilk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra pelet, ependorflara aktarılarak; 10.000 rpm' de 10 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda elde edilen pelet, 60 °C' lik etüvde 24 saat kurutularak FTIR cihazında analiz edilmiştir. Analiz işlemi 400-4000 cm⁻¹' de gerçekleştirilmiştir.

TEM: Sentezlenen AuNP' e, aydınlık alanda yüksek çözünürlüklü görüntüleme (HRTEM), TEM mod görüntüleme ve yerel EDX analizi (beklenen elementler C,O,Au,N) yapılmıştır. Farklı nm' ler de görüntüleri alınan AuNP' lerin, şekli ve boyutu belirlenmiştir.

UV-VIS spektrofotometri (Nanodrop): AuNP' lerin sahip oldukları kimyasal yapıyı belirlemek için kullanılmıştır. Ölçümler 220-700 nm arasında yapılmıştır. AuNP ve MUA kaplı AuNP' lerin absorbans değeri belirlenmiştir.

3.3. Cam Kapillerin Aminlenmesi ve Karakterizasyonu

Cam kapiller ve görüntüleme için kullanılacak lamlar aminleme işleminden önce, yüzey temizleme aşamasından geçirilmiştir. Bu aşama, cam yüzey üzerindeki –OH gruplarını zenginleştirmek ve camı aminlemeye uygun hale getirmek için yapılmıştır. En iyi aminleme yönteminin belirlenmesi için hem sıvı hem de gaz fazında aminleme işlemi yapılmıştır. Elde edilen sonuca göre yöntemlerden biri seçilerek, çalışmanın geri kalanı bu aminleme yöntemine göre yapılmıştır.

3.3.1. Cam Yüzeylerin Temizlenmesi

İlk olarak camlar, aseton içerisinde 10 dk sonikasyon ile temizlenmiş ve daha sonra 10 dk desikatör içerisinde (vakum altında) kurutulmuştur. Camlar kurutma işleminden sonra, taze hazırlanmış Piranha çözeltisi (%70 H₂SO₄ ve %30 H₂O₂) ile 30 dk muamele edilmiştir. Bu süre sonunda bol miktarda distile su ile yıkanarak, vakum altında kurutulmuştur [46].

3.3.2. Cam Yüzeylerin Aminlenmesi

3.3.2.1. Sıvı Fazda Aminleme

- Camlar sırasıyla Metanol, Metanol-Tolüen, Tolüen içerisinde 10' ar dk bekletilmiştir.
- Daha sonra aminosilan solüsyonu ile oda sıcaklığında, 70 rpm çalkalayıcı içerisinde 30 dk muamele edilmiştir [74].

Aminosilan Solüsyonu Hazırlama: Tolüen içerisinde %2' lik Aminopropiltrioksilan (APTES) çözeltisi hazırlanmıştır. Aminosilan solüsyonu hazırlandıktan sonra, 10 dk hidroliz olması için bekletilmiş, sonra kullanılmıştır.

- Aminosilan solüsyonu ile muameleden sonra, camlar ultrasonik banyo içerisinde Tolüen, Metanol-Tolüen, Metanol ile 10' ar dk bekletilmiştir.
- Bu işlemde sonra, camlar 110 °C fırın içerisinde 1 saat kurutularak aminleme işlemi tamamlanmıştır. Camlar kullanılabilece kadar desikatör içerisinde (vakum altında) oda sıcaklığında saklanmıştır. Yapılan tüm bu işlemler sırasında havayla temastan kaçınılmıştır [74].
- Aminleme işlemi tamamlanan camlar XPS (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) ile analiz edilmiştir.

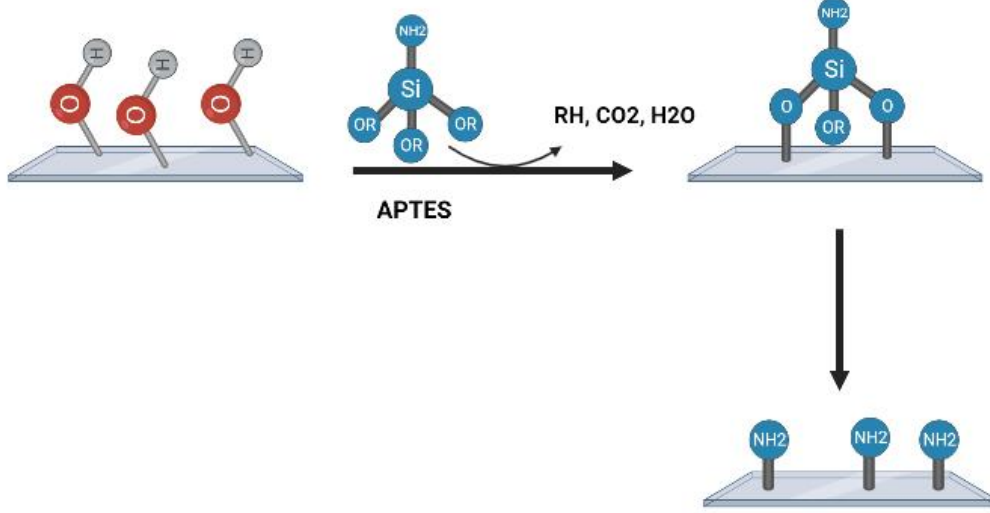
3.3.2.2. Gaz Fazda Aminleme

Cam yüzeyler gaz fazında aminlenmeye başlanmadan önce, sıvı fazda olduğu gibi yüzey temizleme basamağından geçirilmiştir.

Öncelikle kullanılacak basınç göstergeli desikatör bol miktarda argon gazı ile muamele edilerek, desikatör içerisindeki nem ve hava ortadan kaldırılmıştır.

Desikatör içerisine 1.5 cm boyunda kesilmiş cam kapiller dikey konumda yerleştirilmiştir. Camların tam altına gelecek şekilde eppendorf kapakları içerisine 30 µl APTES (4.231 mol/l) ve 10 µl Trietilamin (%99' luk) koyularak, desikatör kapatılmıştır. Bu işlemler sırasında APTES ve Trietilamin'in hava ile çok temas etmemesine dikkat edilmiştir. Desikatör içerisine 2 dk argon gazı verilerek, vakumlama işlemine geçilmiştir. Basınç 0.04 Mpa olana kadar desikatör vakumlanmış ve camlar 120 dk inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra APTES ve Trietilamin ortamdan uzaklaştırılmıştır. Desikatör tekrar vakumlanarak (0.04 Mpa) camlar 2 gün boyunca yüzeyin APTES ile kaplanabilmesi (aminlenmesi için) inkübasyona bırakılmıştır (Şekil3.2) [73].



Şekil 3.2. Cam yüzeylerin APTES ile aminlenmesi

Aminleme işlemi tamamlanan camlar XPS (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) ile analiz edilmiştir. XPS analizi için Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezinden (UNAM) hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Cam Yüzeylerin XPS İle Karakterizasyonu

X-ışını fotoelektron spektrometresi için;

1. Normal cam (işlem görmemiş),
2. Yüzeyi temizlenmiş cam,
3. APTES ile aminlenmiş cam (sıvı faz),
4. APTES ile gaz fazında aminlenmiş cam örnekleri, genel tarama ve kısmi tarama yapılmak üzere analize gönderilmiştir.

Ölçümler Al monokromatik x-ışınında gerçekleştirilmiş ve C, O, N, Si elementleri taranmıştır. Sonuçlar genel tarama (survey) grafikleri şeklinde elde edilmiştir. Elde edilen veriler Origin programına yüklenerek fit grafikleri çizilmiştir.

3.4. Aminlenmiş Camların Optimizasyonu

Bu aşamada gaz fazında aminlenen camlar için, 2 farklı parametre araştırılmıştır.

3.4.1. Basıncın Aminlemeye Olan Etkisi

Vakumlu desikatör kullanılarak 0.04, 0.06 ve 0.08 Mpa basınç altında, aminleme işlemi gerçekleştirilmiş ve basıncın aminlemeye olan etkisi belirlenmiştir.

3.4.2. APTES Miktarının Aminlemeye Olan Etkisi

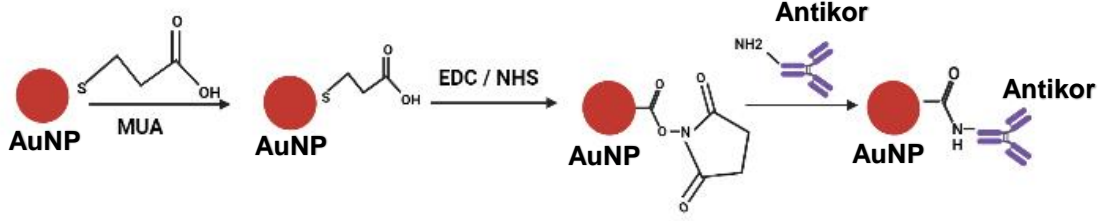
Cam kapiller (0.04 Mpa basınç altında) 30, 50 ve 70 µl APTES kullanılarak aminle fonksiyonel hale getirilmiştir. Konsantrasyonun aminlemeye olan etkisi belirlenmiştir.

3.5. Cam Kapillerin Meme Kanseri Antikorları İle İmmobilizasyonu

Çalışmada meme kanseri teşhisi için kullanılmak üzere, HER2 ve CA15-3 belirteçleri seçilmiştir. Cam yüzey üzerinde oluşturulacak immobilizasyon aşamasında, her kanser belirteci için yakalayıcı (capture) ve belirleyici (detection) antikorla birlikte, antijen kullanılmış ve cam üzerinde sandviç modelinde bir immobilizasyon gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Yakalayıcı (Capture) Antikorum AuNP' ler İle Aktive Edilmesi

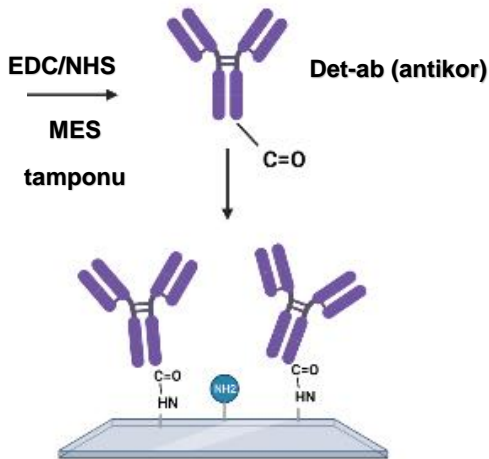
- 4 ml AuNP' e sırayla; 6 µl EDC (50mM) ve 6 µl NHS (15mM) eklenerek 30 dk karıştırılmıştır.
- Karışım 11000 rpm' de 15 dk santrifüj edilerek, pelete 2 ml fosfat tamponu- PB (0.1 M, pH 7.4) eklenmiştir.
- Çözülmüş pelete 10 µl yakalayıcı antikor (cap-ab) eklendikten sonra, 1 saat nazikçe karıştırılmıştır.
- Elde edilen AuNP-(cap-ab) solüsyonu 1 gece 4 °C' de bekletildikten sonra kullanılmıştır (Şekil 3.3) [93].



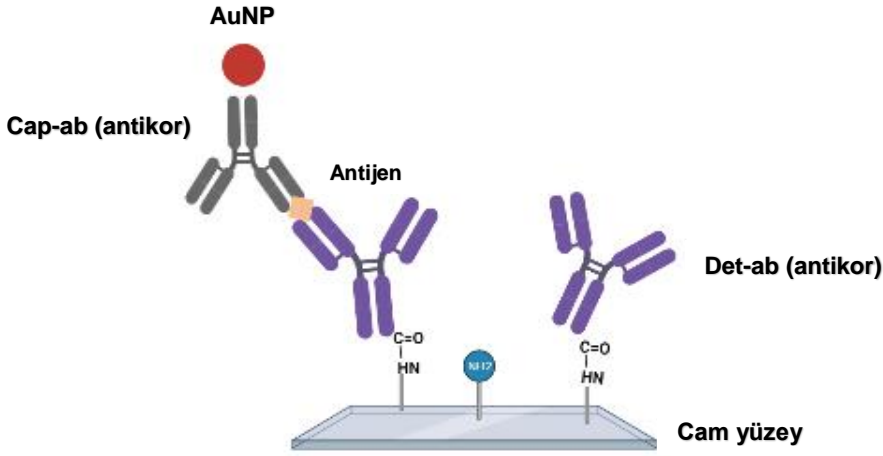
Şekil 3.3. AuNP yüzeyine konjuge edilmiş antikorlar

3.5.2. Belirleyici (Detection) Antikorum Oksidasyonu ve İmmobilizasyon

- 0.4 mg EDC ve 1.1 mg NHS, 100 µl MES tamponunda (0.1 M pH 4.7) çözülmüştür.
- 10 µl Antikor, 89 µl PBS (0.1 M pH 7.4) ve 1 µl EDC-NHS 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Aktive edilen belirleyici antikor (det-ab) aminlenmiş cam yüzeyine verilerek, 1 saat 37 °C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra, 5 kez 300 µl PBS (0.1 M pH 7.4) ile yıkanmıştır [94].
- Det-ab ile kaplanan camlara, antijen eklenerek 1 saat oda sıcaklığında immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu adım tamamlandıktan sonra, hazırlanan AuNP-Yakalayıcı Antikor çözeltisi camlara eklenerek 4 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Oksidasyon işlemiyle aktive edilen antikorların cam yüzey üzerine immobilizasyonu



Şekil 3.5. Cam yüzey üzerinde (det-ab, antijen ve cap-ab kaplı AuNP) gerçekleşen immobilizasyon

3.5.3. HER2 Antikorumun Optimizasyonu

Biyosensörün çalıştığı en iyi koşulları belirlemek için, cap-ab miktarı (5, 10, 20 μ l-1:13 oranında dilüe edilmiş), det-ab miktarı (15, 20, 30 μ l-1:13 oranında dilüe edilmiş), antijen konsantrasyonu (50, 100, 200, 300 ng/ml) ve det-ab inkübasyon süresi (30 dk, 1, 2 ve 4 sa) gibi çeşitli parametreler araştırılmıştır. Analizler, FTIR ve mikroskopik görüntüleme ile yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan yakalayıcı antikorumların (cap-ab) zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır.

3.5.4. CA15-3 Antikorumun Optimizasyonu

Biyosensörün çalıştığı en iyi koşulları belirlemek için, cap-ab miktarı (5, 10, 20 μ l-1.15 mg/ml), det-ab miktarı (10, 20, 30 μ l-2.85 mg/ml), antijen konsantrasyonu (100, 200, 300, 400, 500 U/ml) ve det-ab inkübasyon süresi (30 dk, 1, 2 ve 4 sa) gibi çeşitli parametreler araştırılmıştır. Analizler, FTIR ve mikroskopik görüntüleme ile yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan yakalayıcı antikorumların (cap-ab) zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır.

3.6. Kolorimetrik Biyosensörün Validasyonu

Cam kapiller ve lam üzerinde immobilizasyonu tamamlanan kolorimetrik biyosensörün validasyonu, FTIR analizi ve Leica DMR marka ışık mikroskopunda (5X büyütme) görüntü alınarak tamamlanmıştır. Alınan görüntüler Image J programında analiz edilmiştir.

3.7. HER2 (+) Meme Kanseri Hücreleri Kullanılarak Biyosensörün Valide Edilmesi

SK-BR-3 HER2 (+) meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. HER2 hücreleri, %10 FBS (fetal sığır serumu), %1 c-Glutamin ve %1 Pen/Strep (penisilin-streptomisin) içeren McCoy' s 5A besiyerinde çoğaltılmıştır.

3.7.1. HER2 Hücrelerinin Hazırlanması

Kültür kabında bulunan besiyeri dökülerek, hücreler tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmıştır.

Tripsinizasyon işlemi: Hücreleri kaldırmak için ilk olarak, kültür kabına 1 ml tripsin eklenerek yüzey tripsin ile yıkanmıştır. Daha sonra ortama 2. kez tripsin eklenerek, flask %5 CO₂ içeren 37 °C' lik etüve kaldırılmıştır. Bu işlem ile flaska tutunmuş hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Hücreler, OLYMPUS IX70 marka inverted mikroskopla görüntülenmiştir.

Hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandıktan sonra, flaska besiyeri eklenerek hücreler toplanmıştır. Falcon tüpüne alınan hücreler, 800 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek ortamdaki tripsin hücrelerden uzaklaştırılmıştır. Üst sıvı dökülerek dibe çöken hücrelere hafifçe vurulmuş ve üstlerine 10 ml besiyeri eklenmiştir. Hücreler ve besiyeri homojenize edilerek biyosensör uygulaması için hazır hale getirilmiştir.

3.7.2. HER2 Hücrelerinin İmmobilizasyonu

Gaz fazında aminleme işlemiyle immobilizasyon için hazır halen gelen cam yüzeyler ilk olarak HER2-det-ab (antikor) ile 1 saat, 37 °C' de inkübe edilmiştir.

Daha sonra toplanan HER2 (+) meme kanseri hücrelerinden 50 μ l (2×10^6 hücre/ml) eklenerek, 1 saat oda sıcaklığında immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu adım tamamlandıktan sonra, hazırlanan AuNP-HER2-cap-ab (antikor) çözeltisi camlara eklenerek, 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. Validasyon mikroskopik görüntüleme ile tamamlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

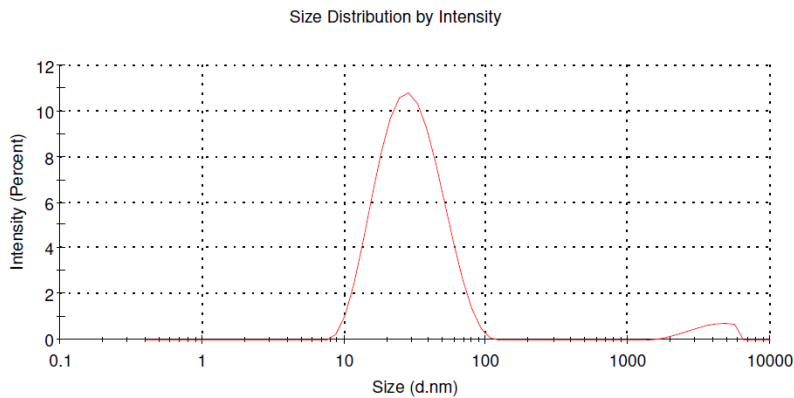
Sitrat indirgeme metoduna göre sentezlediğimiz AuNP' ler Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Yapılan sentez sonucunda şarap kırmızısı renginde, berrak bir nanopartikül çözeltisi elde edilmiştir. Sentezlenen AuNP' ler; Zeta-boyut, Zeta potansiyel, UV-VIS, FTIR, EDX ve TEM teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir.



Şekli 4.1. Sitrat indirgeme metoduna göre sentezlenen AuNP'ler

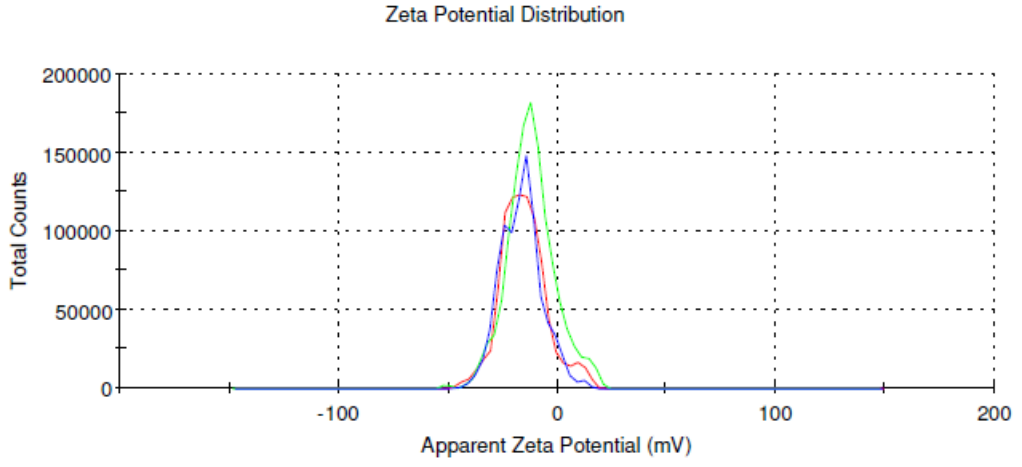
4.1.1. Boyut Dağılımı ve Yüzey Yükü Analizi

AuNP' lerin ortalama boyutu ve yüzey yükü Zeta-Sizer cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ortalama boyutu 25 nm ve polidispersite değeri (PDI) 0.3 olan AuNP' ler sentezlenmiştir (Şekil 4.2).



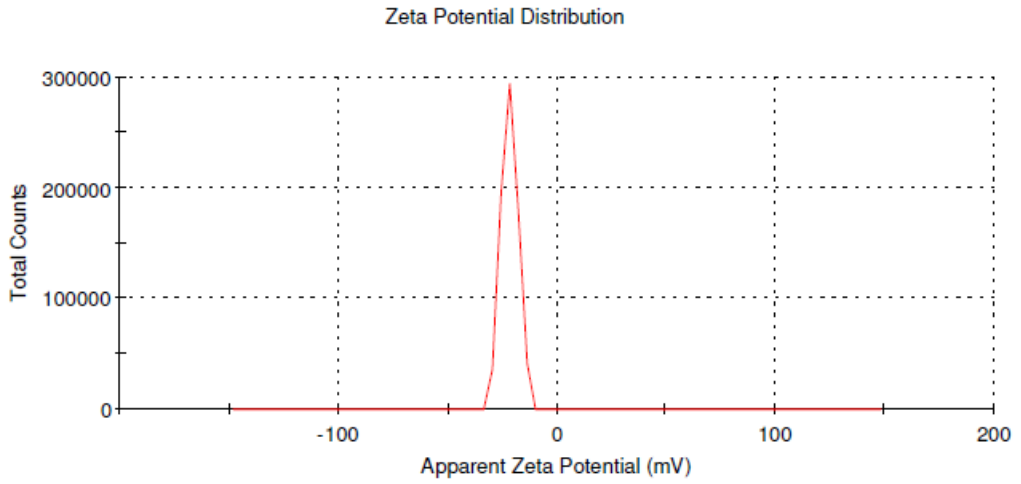
Şekil 4.2. AuNP boyut analizi

AuNP' lerin zeta potansiyel (yüzey yükü dağılım) değeri ise, -33.4 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. AuNP zeta potansiyel (yük dağılım) analizi

MUA (11-Merkapto undekanoik asit) ile kaplanmış AuNP' lerin zeta potansiyel değeri ise, -21.8 mV olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. MUA kaplı AuNP' lerin yük dağılım analizi

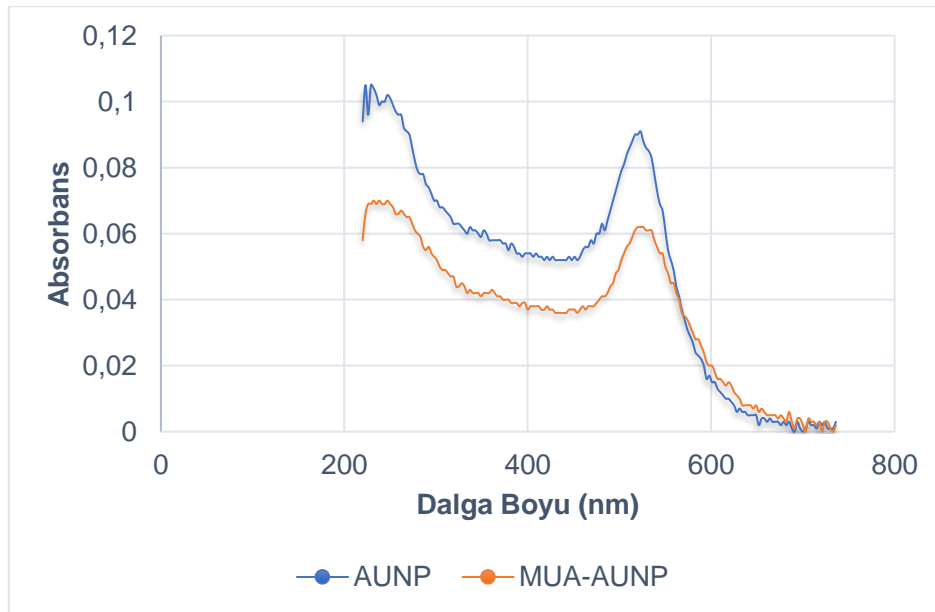
Elde sonuçlar göre, MUA ile kaplanan AuNP' lerin yüzeyindeki yük dağılımının değiştiği görülmüştür. Yük dağılımındaki bu değişiklik, AuNP yüzeyindeki sitrat iyonlarının yerini MUA' ların aldığını ve AuNP yüzeyinin MUA ile fonksiyonel hale getirildiğini göstermektedir.

4.1.2. UV-VIS

MUA ile fonksiyonel hale getirilen AuNP' lerin analizi, UV-VIS spektrofotometri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sentezlenen AuNP' ler 523 nm' de; MUA kaplı AuNP' ler ise 527 nm' de absorbands vermiştir (Çizelge 4.1). UV-VIS spektrum grafiğinde görülen kayma, sentezlenen AuNP' lerin MUA ile kaplandığını göstermektedir. Absorbans değerinde gerçekleşen kayma Şekil 4.5' de gösterilmiştir

Çizelge 4.1. AuNP ve MUA-AuNP' lerin UV-VIS sonuçları

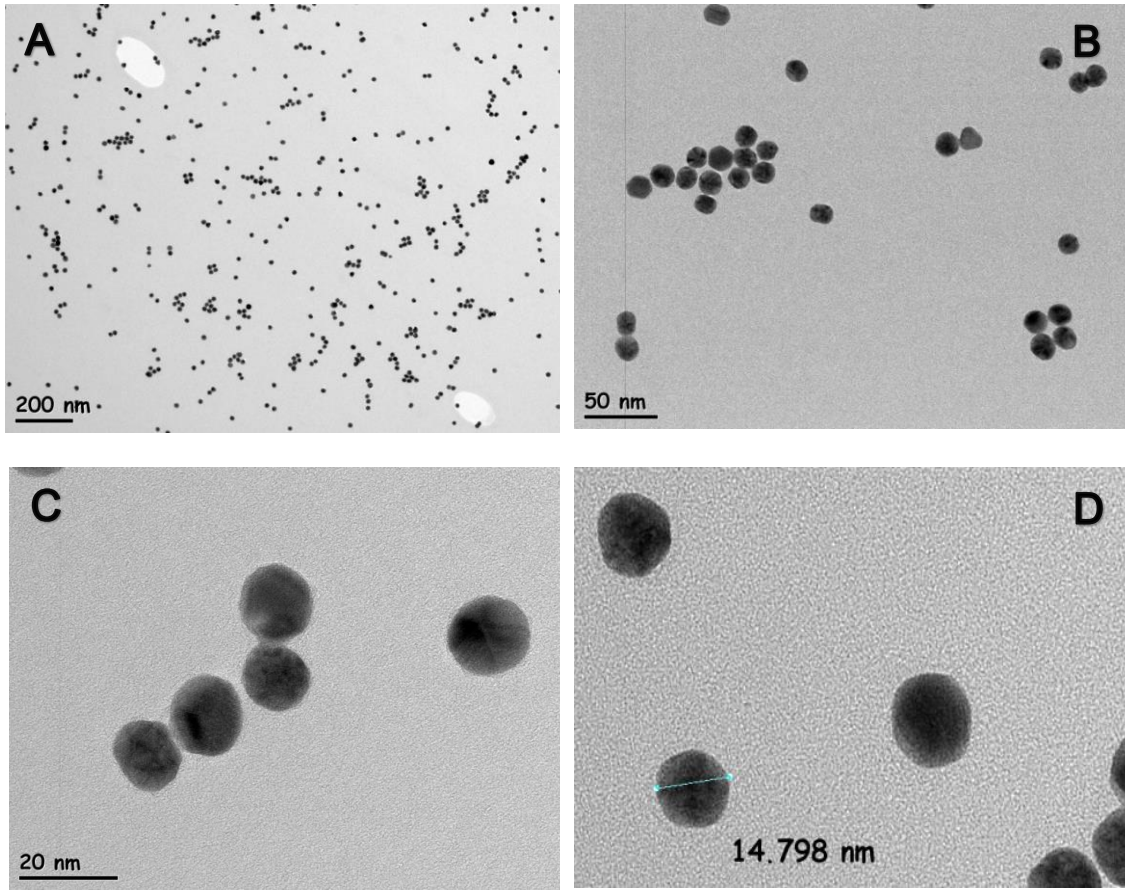
	Dalga Boyu	Absorbans
AuNP	523 nm	0,091
MUA-AuNP	527 nm	0,062



Şekil 4.5. Sentezlenen AuNP ve MUA kaplı AuNP' lerin UV-VIS spektrum grafiği

4.1.3. TEM Görüntüleme ve EDX Analizi

Sentezlenen AuNP'lerin boyut, şekil ve kümelenme durumu gibi özellikleri TEM (Geçirimli Elektron Mikroskopi) görüntüleme tekniği ile tespit edilmiştir. AuNP'lerin element içeriği ise, EDX analizi yapılarak belirlenmiştir. AuNP'lerin farklı ölçeklerde alınan TEM görüntülerine göre, küresel şekile sahip olduğu ve boyutlarının 14-16 nm arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).

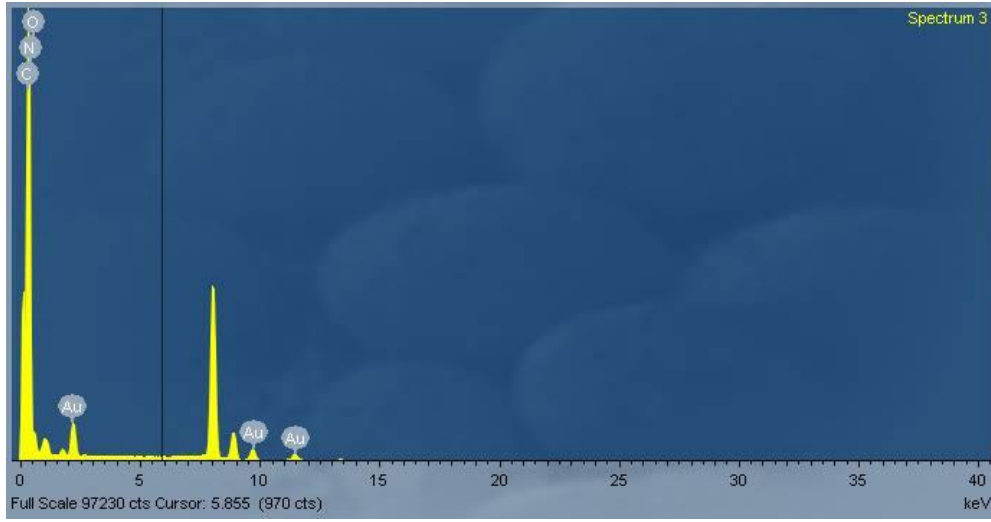


Şekil 4.6. AuNP'lerin (A) 200 nm (B) 50 nm (C) 20 nm ölçekteki TEM görüntüleri ve (D) AuNP'lerin çap boyutunun gösterildiği TEM görüntüsü

Yapılan EDX analizi ile sentezlenen AuNP'lerin C, N, O ve Au elementlerini içerdiği görülmüştür (Şekil 4.7). C elementinin en yüksek atomik yüzdeye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. AuNP' lerin içerdiği elementlerin atomik yüzdeleri

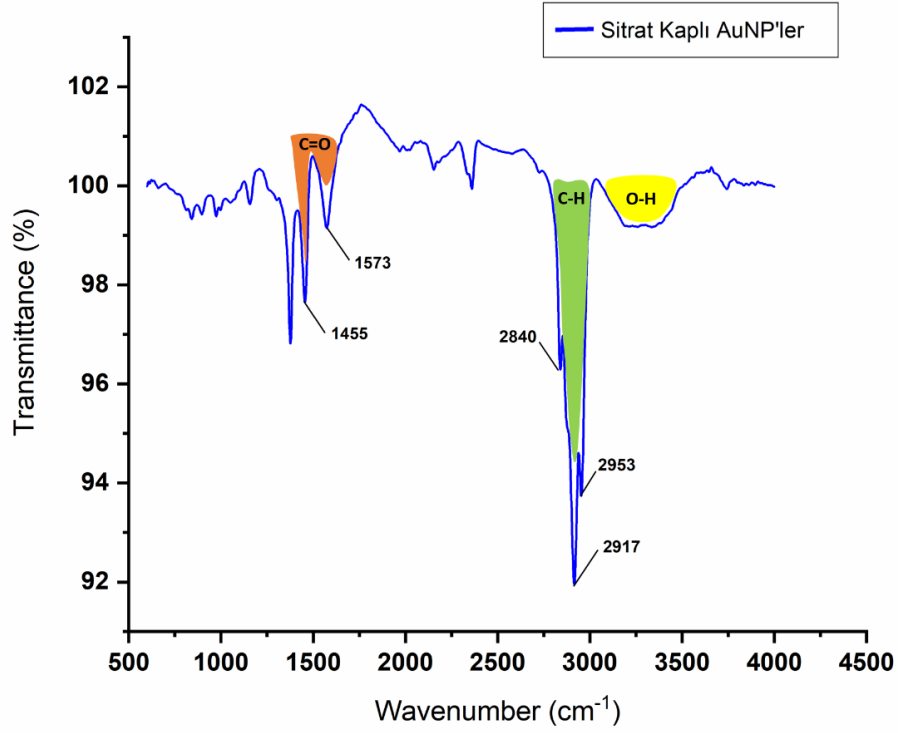
Element	Peak	Area	k	Abs	Weight%	Weight%	Atomic%
	Area	Sigma	factor	Corrn.		Sigma	
C K	572160	1824	1.617	12.968	66.15	0.88	70.55
N K	27191	1522	2.171	71.069	23.14	1.00	21.16
O K	27777	756	1.326	50.884	10.33	0.29	8.27
Au L	36148	582	1.920	0.994	0.38	0.01	0.02
Totals					100.00		



Şekil 4.7. AuNP' lerin EDX analiz grafiği

4.1.4. FTIR

AuNP yüzeyinin sitrat iyonları ile işlevselleştirilmesi FTIR ölçümü ile belirlenmiştir (Şekil 4.8). FTIR spektrumları, AuNP' lerin yapısı (sahip olduğu fonksiyonel gruplar ve bağlar) hakkında bilgi vermektedir.



Şekil 4.8. Sentezlenen AuNP' lerin FTIR spektrumu

- 1573 cm^{-1} ' deki karakteristik pik, ($\text{Vas}(-\text{COO})$) karboksilat asimetrik gerilmesine,
- 1455 ve 1375 cm^{-1} ' deki karakteristik pikler, ($\text{Vs}(-\text{COO})$) karboksilat simetrik gerilmesine,
- 2953, 2917 ve 2840 cm^{-1} ' deki karakteristik pikler ise, ($\text{Vas}(\text{CH}_2)$) asimetrik gerilmesine karşılık gelmektedir.

Küresel AuNP oluşumu, yüzeyde bulunan sitrat iyonlarının dengeleyici kapasitesine bağlı olarak değişmektedir. FTIR sonuçlarında görülen $-\text{COO}$ pikleri, karakteristik sitrat bantlarını işaret etmekte ve sitrat iyonları ile AuNP arasındaki etkileşimi doğrulamaktadır. Elde edilen FTIR sonuçları, sitrat indirgeme yöntemiyle AuNP' lerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

4.2. Aminlenmiş Cam Yüzeyin Karakterizasyonu

Cam yüzeyler sıvı ve gaz fazı olmak üzere, 2 farklı yöntemle aminle fonksiyonel hale getirilmiştir. Cam yüzeyler, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) karakterize edilmiştir.

4.2.1. Aminlenen Cam Yüzeylerin XPS Analizi

1.Normal cam (işlem görmemiş), 2.Yüzeyi temizlenmiş cam (piranha çözeltisi ile muamele edilmiş), 3.APTES ile sıvı fazda aminlenmiş cam ve 4.APTES ile gaz fazında aminlenmiş cam örnekler, genel tarama ve kısmi tarama yapılmak üzere XPS analize gönderilmiştir.

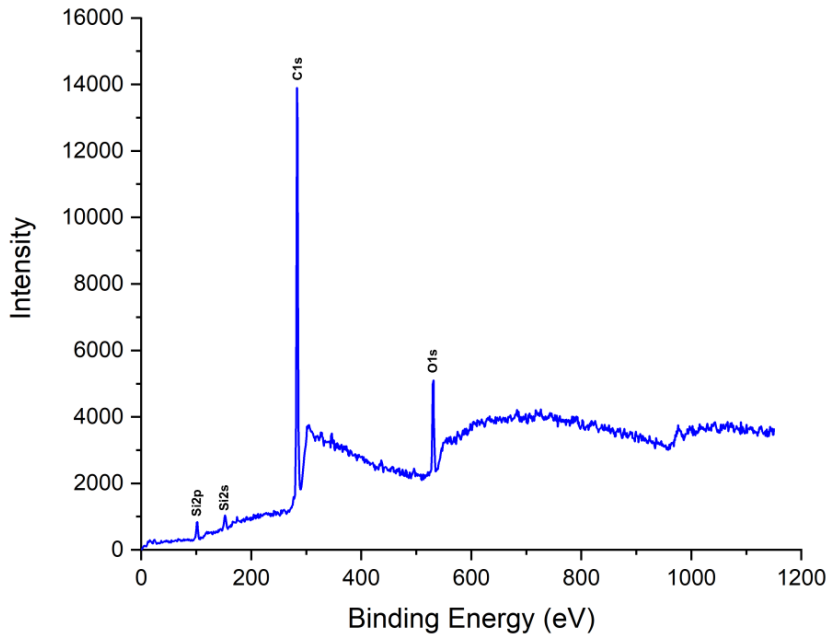
Ölçümler Al monokromatik x-ışınında gerçekleştirilmiştir. C, O, Si ve N elementleri taranmıştır. Sonuçlar, geniş tarama XPS spektrum grafikleri şeklinde elde edilmiştir.

Normal cam için taranan elementlerin atomik yüzdesi; C1s %91.5, O1s %6.8, Si2p %1.7 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).

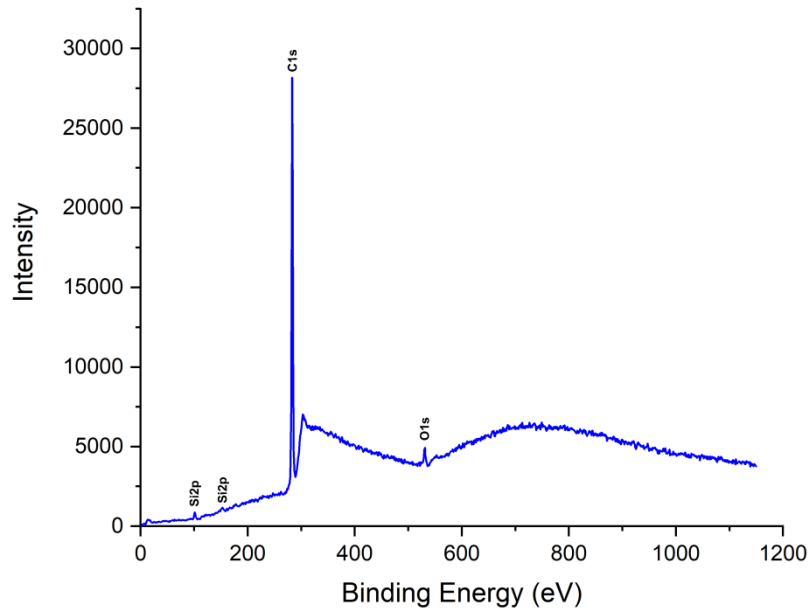
Yüzeyi temizlenmiş cam için taranan elementlerin atomik yüzdesi; C1s %98, O1s %1.4, Si2p %0.6 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).

Sıvı fazda aminlenmiş cam için taranan elementlerin atomik yüzdesi; C1s %74.9, O1s %18.6, Si2p %6, N1s %0.5 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

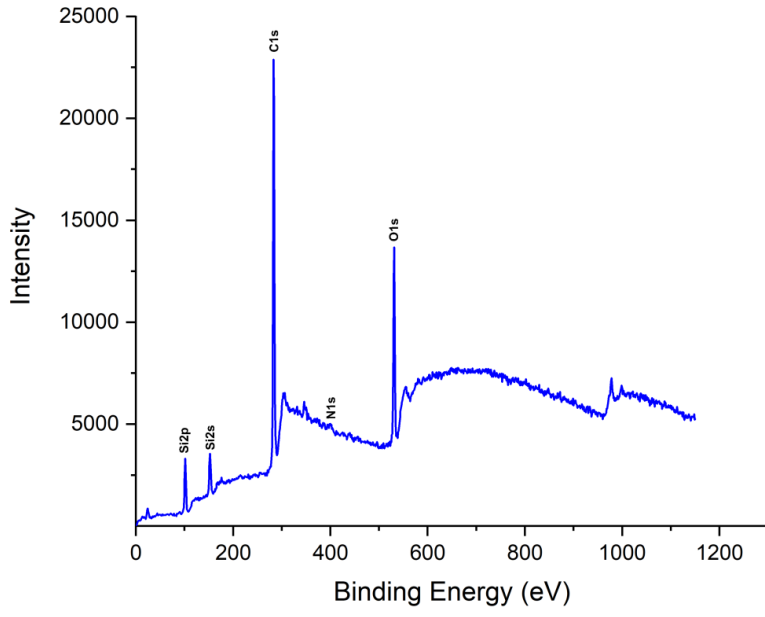
Gaz fazda aminlenmiş cam için taranan elementlerin atomik yüzdesi; C1s %81.9, O1s %14, Si2p %3.5, N1s %0.6 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



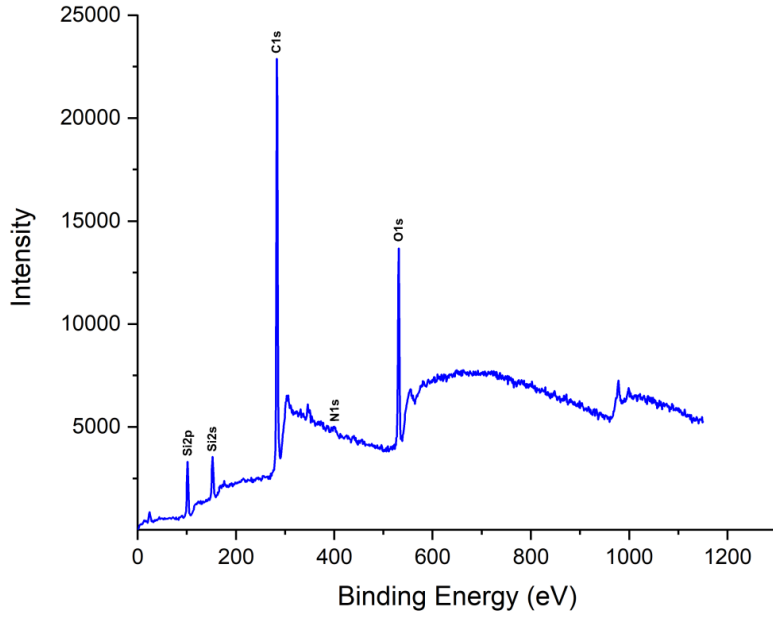
Şekil 4.9. Normal cam (işlem görmemiş) yüzeyin geniş tarama XPS spektrumu



Şekil 4.10. Yüzeyi temizlenmiş camın (piranha çözeltisi ile muamele edilmiş) geniş tarama XPS spektrumu



Şekil 4.11. Sıvı fazda aminlenmiş camın geniş tarama XPS spektrumu



Şekil 4.12. Gaz fazda aminlenmiş camın geniş tarama XPS spektrumu

Elde edilen sonuçlara göre; 1. ve 2. Cam yüzeylerde N elementine ait pik gözlenmemiştir. 3. ve 4. Camlarda (APTES ile muamele edilmiş) gözlenen N elementine ait pik yüzeyin aminle kaplandığını göstermektedir.

N1s piki ve diğer element yüzdelerindeki değişiklikler (C1s yüzdesi azalırken, Si2p yüzdesi artması), cam yüzeylere yapılan aminleme işleminin (APTES ile muamelenin) başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.

2 farklı metot kullanılarak yapılan aminleme işlemi sonunda, gaz fazında yapılan aminlemenin daha başarılı olduğunu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Çalışmalara gaz fazında aminleme yöntemi seçilerek devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Sıvı ve gaz fazında aminlenen cam yüzeylerin XPS analizi ile elde edilen atomik konsantrasyon yüzdeleri

Bağlı Atom Konsantrasyonu (%)	Kontrol (işlem görmemiş cam)	Sıvı Faz	Gaz Faz
% C	11.18	74.9	81.9
% O	57.86	18.6	14
% Si	27.79	6	3.5
% N	-	0.5	0.6

4.2.2. Gaz Fazında Aminlenen Cam Yüzeylerin Optimizasyon Sonuçları

Optimizasyon için, APTES konsantrasyonu ve basınç etkisi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. APTES konsantrasyonunun aminlemeye etkisini belirlemek amacıyla, desikatör içerisindeki basınç 0.04 Mpa' da sabit tutularak üç farklı APTES konsantrasyonu (30, 50 ve 70 µl) araştırılmıştır. En iyi aminlemenin gerçekleştiği basıncın belirlenmesi için konsantrasyon (50 µl APTES) sabit tutularak, desikatör içerisinde 0.04, 0.06 ve 0.08 Mpa basıncın etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen XPS analiz sonuçlarına göre, C, O, Si, N atomlarının verdiği piklerin şiddeti değişmektedir. Çizelge 4.4' de 30, 50 ve 70 µl APTES konsantrasyonlarına ait cam kapiller tüplerin yüzeyindeki atomik bileşimlerin yüzdesi verilmektedir. Buna göre, 30, 50 ve 70 µl APTES kullanılan cam yüzeylerin N elementinin atomik yüzdeleri sırasıyla, %1.51, %1,84 ve %1,28 olarak tespit edilmiştir. En etkili aminleme işleminin, 50 µl APTES kullanılan cam kapiller tüp yüzeyinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4. Farklı APTES konsantrasyonları ile işlevselleştirilmiş cam yüzeylerin XPS analizinden elde edilen atomik kompozisyon yüzdeleri

Bağlı Atom Konsantrasyonu (%)	APTES Konsantrasyonu			
	Kontrol	30 µl	50 µl	70 µl
% C	7.68	66.93	45.79	77.63
% O	61.81	20.21	33.7	13.1
% Si	29.78	10.64	18.05	8
% N	-	1.51	1.84	1.28

Desikatördeki ortam basıncının aminlemeye etkisini belirlemek için, 50 µl APTES ile muamele edilen cam kapiller tüpler, 0.04, 0.06 ve 0.08 Mpa basınç altında inkübasyona bırakılmıştır. Desikatör içindeki basınç arttırıldığında atomlarının verdiği piklerin şiddetinin ve atomik bileşimlerinin yüzdesinin değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.5).

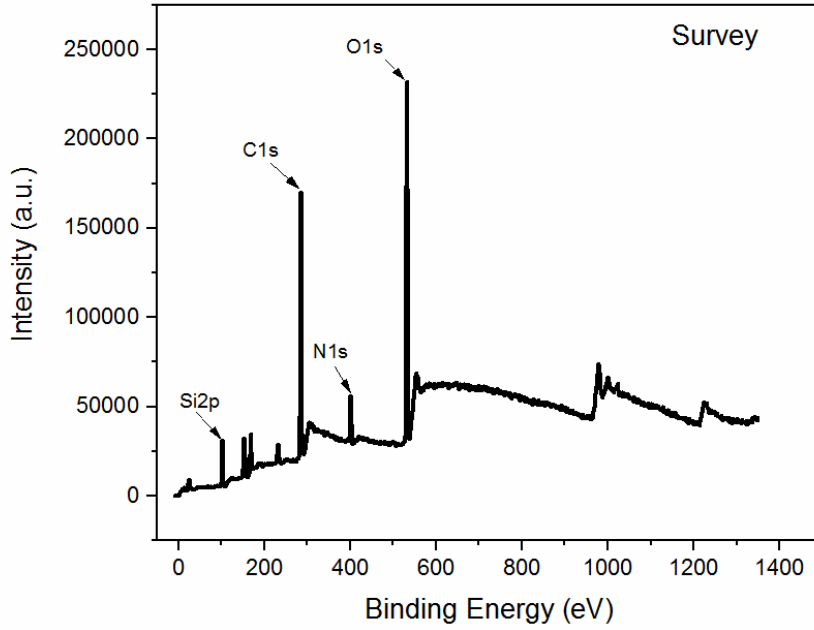
Çizelge 4.5. Farklı basınçlarda aminlenmiş cam yüzeylerin atomik konsantrasyon yüzdeleri

50 µl APTES	Kontrol	0.04 Mpa	0.06 Mpa	0.08 Mpa
% C	20.71	73.75	51.15	51.96
% O	53.93	16.84	31.05	29.28
% Si	24.46	7.87	10.41	13.48
% N	-	1.53	7.39	5.29

Çizelge 4.5' te verilen XPS analizi sonuçlarına göre, işlenmemiş cam (kontrol) ile aminlenmiş camlar karşılaştırıldığında C atomunun yüzdesinde artış olduğu görülmüştür. Kontrol de N atomuna ait pik gözlenmezken, aminlenmiş camlarda N atomuna ait pik görülmüştür. Aminlenmiş camlarda basınç artışı ile Si ve O atomunun yüzdesinin azaldığı, C ve N atomunun yüzdesinin ise arttığı görülmüştür.

En iyi aminlemenin, 0.06 Mpa basınç altında gerçekleştiği ve N elementine ait atomik bileşiminin %7.39 olduğu belirlenmiştir. Ortam basıncının 0.08 Mpa çıkmasıyla birlikte, N atomunun yüzdesinin %7.39' dan, %5.29' a düştüğü görülmüştür.

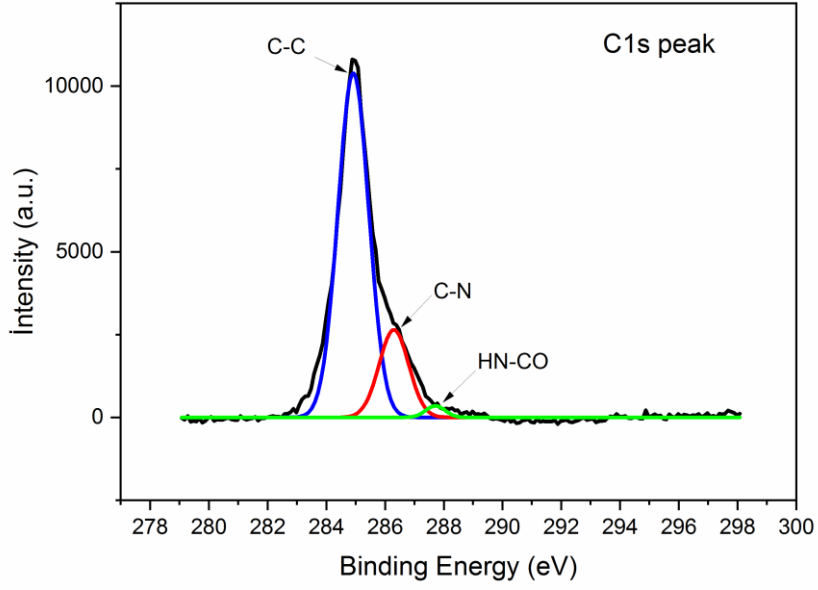
Elde edilen verilere göre, desikatör içerisindeki ortam basıncının APTES ile yapılan aminleme işlemi için önemli bir parametre olduğu görülmüştür. Yapılan optimizasyona göre, gaz fazında en iyi aminlemenin 0.06 Mpa basınç altında, 50 µl APTES kullanılarak gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 0.06 Mpa basınç altında, 50 µl APTES kullanılarak yapılan aminleme işleminin geniş tarama XPS spektrumu

C1s, N1s, O1s ve Si2p enerji spektrumlarına ait fit (iç kısımdaki spektrum) grafikleri Origin programı kullanılarak çizilmiştir.

Yüksek çözünürlüklü XPS grafiğinde C1s pikine ait spektrum karbon atomunun yaptığı bağlar göz önünde bulundurularak üç bileşen halinde analiz edilmiştir. İlk olarak 284.9 eV değerinde bağlanma enerjisine sahip olan C-C veya C-H bağlarını içeren pik, daha sonra 286.3 eV bağlanma enerjisinde pik veren C-N bağı ve 287.7 eV değerinde bağlanma enerjisine sahip halka yapıdaki O-C-O veya C=O bağı içeren pik tespit edilmiştir (Şekil 4.14). C1s zirvesindeki ana bileşenin 284.9 eV' de kaldığı tespit edilmiştir. C1s zirvesinde gözlenen sinyal artışı cam yüzey üzerinde APTES' in biriktiğine işaret etmektedir.

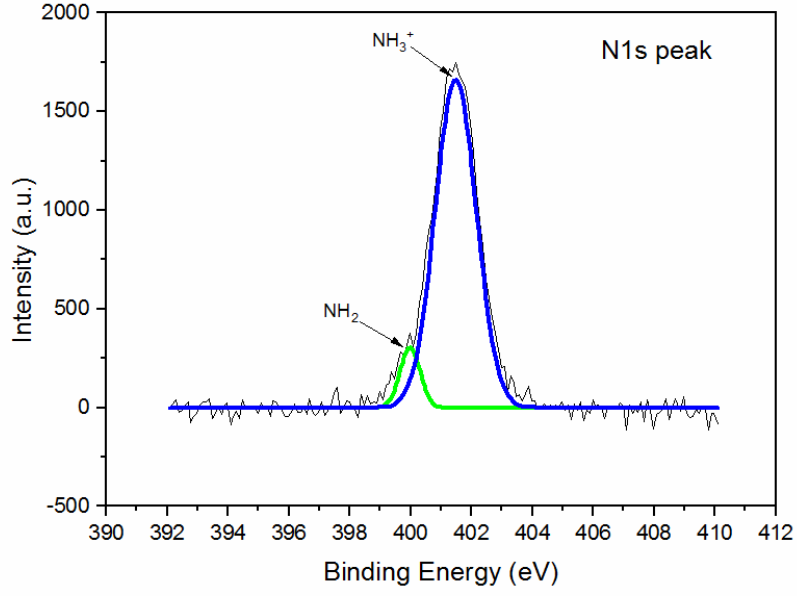


Şekil 4.14. C1s spektrumuna ait bağlanma enerjilerinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği

N1s spektrumu, N atomunun yaptığı bağlar açısından iki bileşen halinde analiz edilmiştir (Şekil 4.15). N1s pikine ait ilk bileşenin 399.9 eV civarında olduğu belirlenmiştir. Bu pik, nötr amin gruplarının (C-NH₂) bağlanma enerjisini göstermektedir. Bu gruplar N/H bağlarının erişilebilirliği nedeniyle biyofonksiyonelleştirme için oldukça ilgi çekicidir.

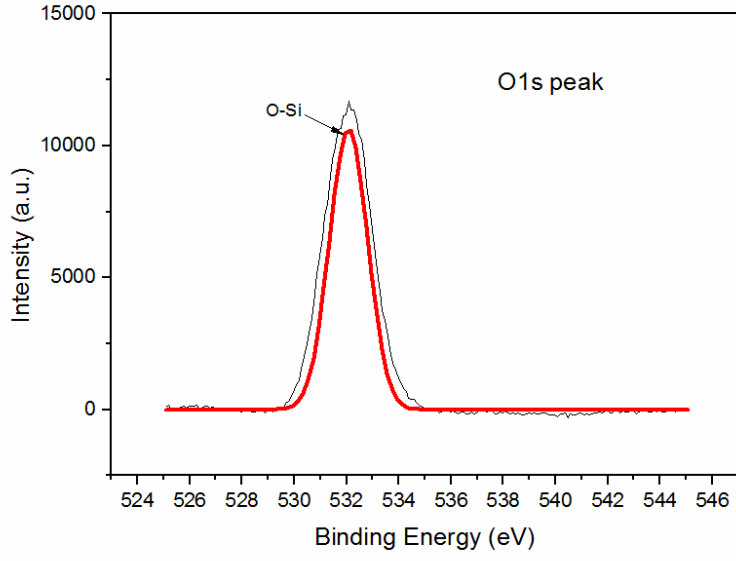
N1s spektrumundaki diğer bileşenin, 401.5 eV bağlanma enerjisine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bağlanma enerjisindeki grup, protonlanmış amino grupları (NH₃⁺) olarak bilinmektedir. Protonlanmış amino grupları, aminleme işlemi sırasında veya X ışınlarının yüzey üzerinde yarattığı etki sonucu oluşmaktadır. N1s spektrumunda protonlanmış amino (NH₃⁺) grupları cam yüzeyine (içeri) doğru bir yönelim gösterirken, serbest amin grupları (C-NH₂) cam yüzeyinden dışarı doğru çıkıntı yapmaktadır.

N1s ve C1s zirvesinde görülen bu sinyal artışları, cam yüzeyin APTES ile kaplandığını doğrulamaktadır.



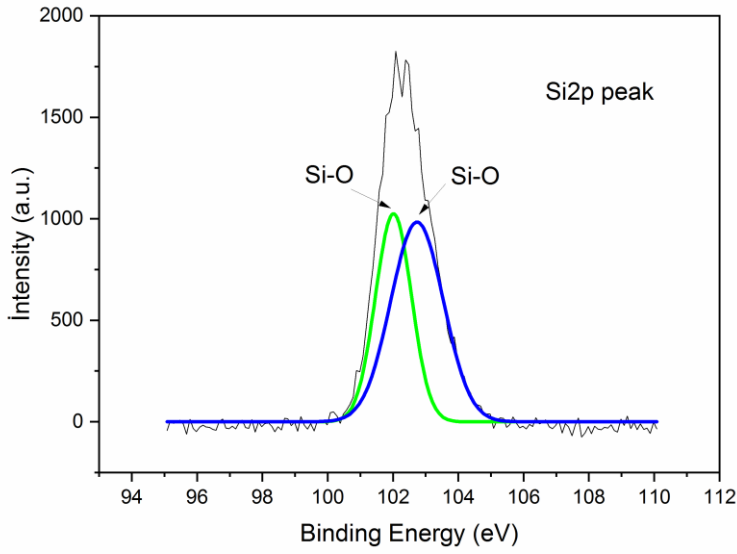
Şekil 4.15. N1s spektrumuna ait bağlanma enerjilerinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği

Yüksek çözünürlüklü O1s spektrumunun bağlanma enerjisinin ise, 532.1 eV olduğu belirlenmiştir. Bu zirve, O-Si kimyasal bağının bir özelliği olup silikon oksit içerisindeki oksijene karşılık gelmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. O1s spektrumuna ait bağlanma enerjisinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği

Si2p spektrumuna bakıldığında ise, 102.1 ve 102.7 eV' de iki pik görülmüştür (Şekil 4.17). Bu sinyallerin, Si-O kimyasal bağına özgü olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.17. Si2p spektrumuna ait bağlanma enerjilerinin gösterildiği fit (iç spektrum) grafiği

O1s ve Si2p sinyallerindeki azalma, yüzey kimyasal bağının Si-O-H' dan Si-O-Si' a değiştiğini ve APTES 'in yüzeye bağlandığını göstermektedir. XPS analizi sonucunda tespit ettiğimiz karakteristik sinyaller, cam yüzeyin amin ile fonksiyonel hale getirildiğine işaret etmektedir.

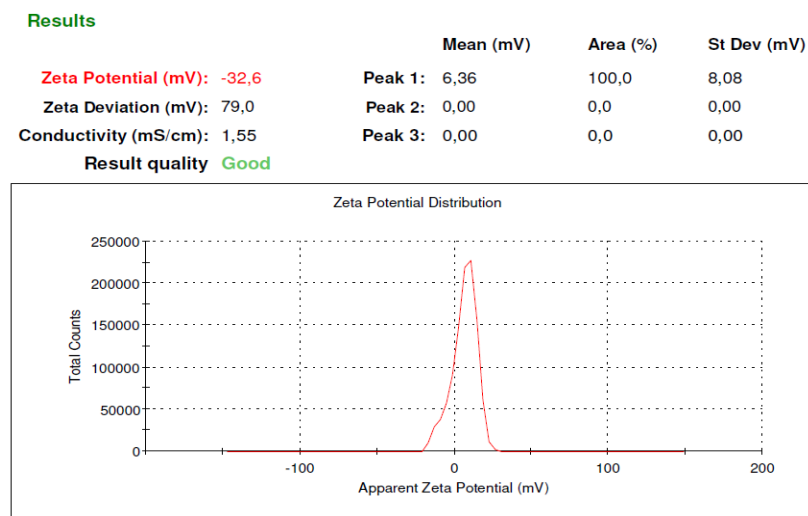
4.3. HER-2 ve CA15-3 Antikorları İle Muamele Edilen AuNP' lerin Analizi

HER-2 ve CA15-3 yakalayıcı antikorları ile modifiye edilen AuNP' ler; Zeta potansiyel, UV-VIS ve FTIR karakterizasyon teknikleri ile analiz edilmiştir.

4.3.1. HER-2 Yakalayıcı Antikoruyla Muamele Edilen AuNP' lerin Zeta Potansiyel Analizi

Farklı miktarlardaki (5, 10 ve 20 µl) HER-2 yakalayıcı antikorlarının (cap-ab) AuNP' lere bağlanma kapasitesi, zeta potansiyel (yük dağılımı) analizi yapılarak incelenmiştir. Elde edilen zeta potansiyel analizlerine göre;

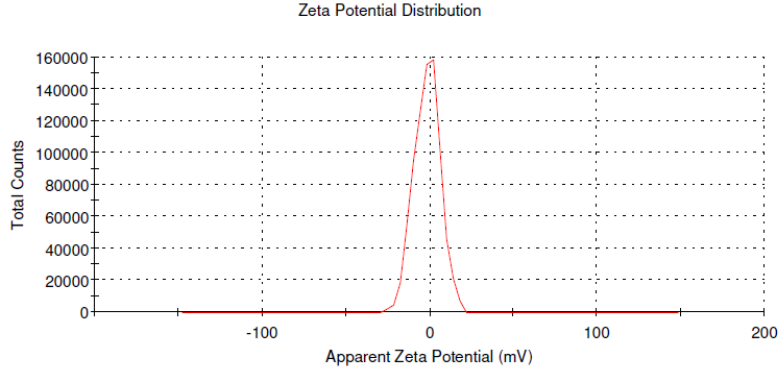
- 5 µl HER-2 içeren AuNP' lerin ortalama -32,6 mV (Şekil 4.18),
- 10 µl HER-2 içeren AuNP' lerin ortalama -36,8 mV (Şekil 4.19),
- 20 µl HER-2 içeren AuNP' lerin ise, ortalama -34,7 mV değerinde (Şekil 4.20) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. 5 µl HER-2 ile muamele edilen AuNP' lerin zeta potansiyel dağılımı

Results

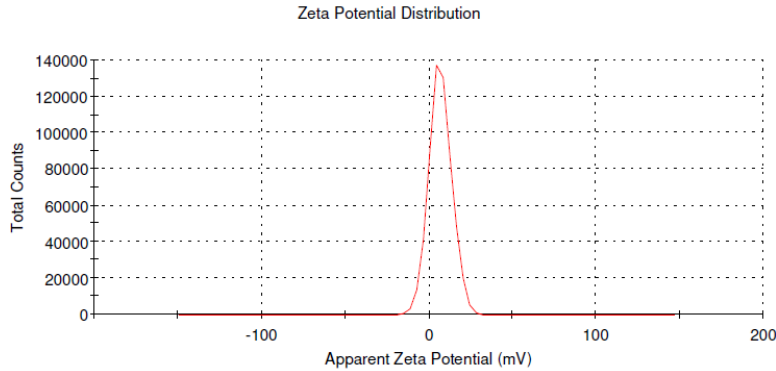
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -36,8	Peak 1: -1,71	100,0	7,69
Zeta Deviation (mV): 70,3	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,60	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4.19. 10 µl HER-2 ile muamele edilen AuNP' lerin zeta potansiyel dağılımı

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -34,7	Peak 1: 6,73	100,0	6,74
Zeta Deviation (mV): 81,8	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,62	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4.20. 20 µl HER-2 ile muamele edilen AuNP' lerin zeta potansiyel dağılımı

Yapılan analizler sonucunda, HER-2 yakalayıcı antikorunun AuNP yüzeyine bağlandığı doğrulanmış ve en uygun HER-2 miktarı 10 µl olarak belirlenmiştir.

4.3.2. CA15-3 Yakalayıcı Antikoruyla Muamele Edilen AuNP' lerin Zeta Potansiyel Analizi

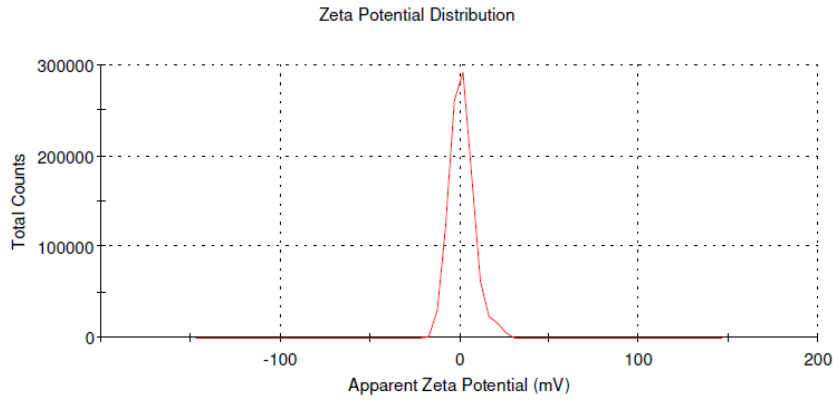
Farklı miktarlardaki (5, 10 ve 20 μ l) CA15-3 yakalayıcı antikorlarının (cap-ab) AuNP' lere bağlanma kapasitesi, zeta potansiyel (yük dağılımı) analizi yapılarak incelenmiştir.

Elde edilen zeta potansiyel analizlerine göre;

- 5 μ l CA15-3 içeren AuNP' lerin ortalama -42,5 mV (Şekil 4.21),
- 10 μ l CA15-3 içeren AuNP' lerin ortalama -38,5 mV (Şekil 4.22),
- 20 μ l CA15-3 içeren AuNP' lerin ise, ortalama -26,3 mV değerinde (Şekil 4.23) olduğu tespit edilmiştir.

Results

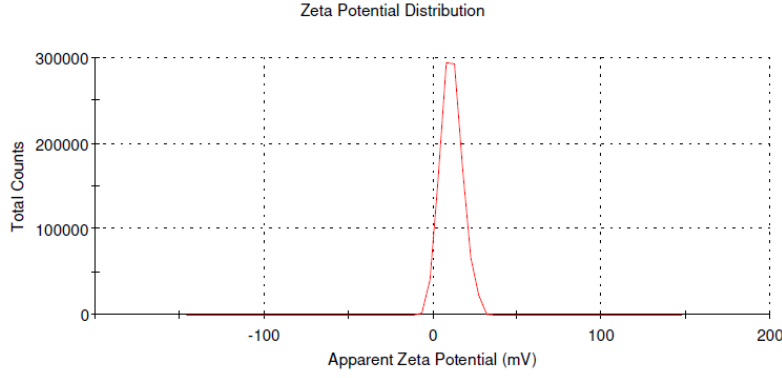
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -42,5	Peak 1: 1,07	100,0	6,95
Zeta Deviation (mV): 94,6	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 2,78	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4.21. 5 μ l CA15-3 ile muamele edilen AuNP' lerin zeta potansiyel dağılımı

Results

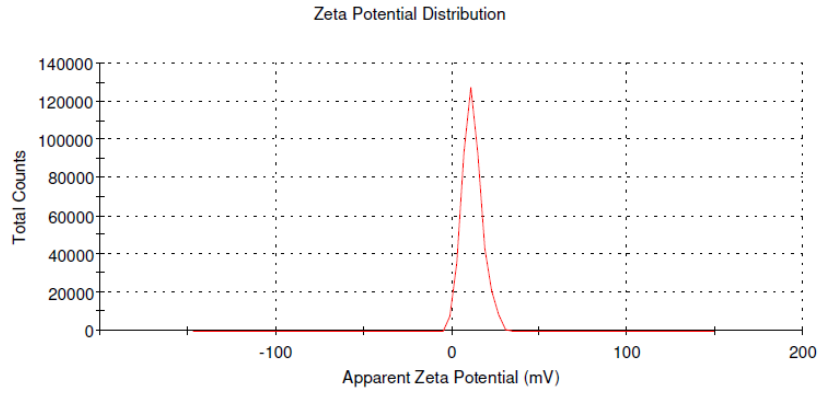
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -38,5	Peak 1: 10,9	100,0	6,42
Zeta Deviation (mV): 104	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 2,78	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4.22. 10 µl CA15-3 ile muamele edilen AuNP' lerin zeta potansiyel dağılımı

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26,3	Peak 1: 11,6	100,0	5,72
Zeta Deviation (mV): 81,9	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 3,01	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			

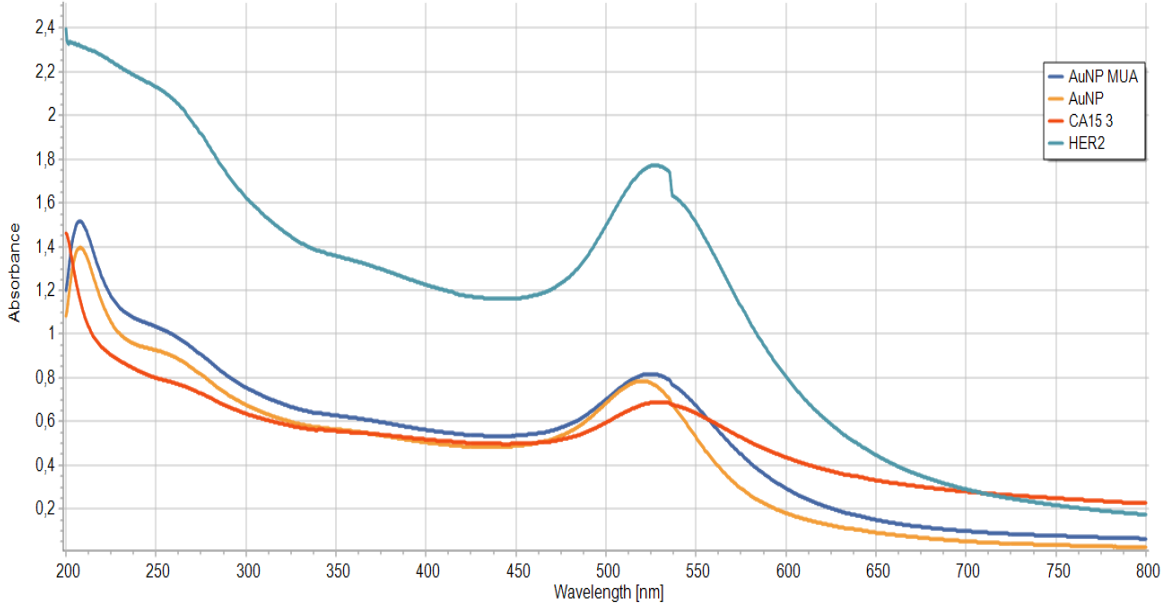


Şekil 4.23. 20 µl CA15-3 ile muamele edilen AuNP' lerin zeta potansiyel dağılımı

Elde edilen bu sonuçlar, CA15-3 yakalayıcı antikorunun AuNP yüzeyine bağlandığını göstermektedir. En uygun CA15-3 yakalayıcı antikor miktarı 5 µl olarak belirlenmiştir.

4.3.3. HER-2 ve CA15-3 Yakalayıcı Antikorlarıyla Muamele Edilen AuNP'lerin UV-VIS Spektrofotometri Analizi

AuNP, MUA ile modifiye edilmiş AuNP, HER-2 ve CA15-3 (cap-ab) antikorlarıyla fonksiyonel hale getirilmiş AuNP'lerin UV-VIS spektrofotometri ölçümleri yapılarak, absorbans değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. AuNP, MUA ile modifiye edilmiş AuNP, HER-2 ve CA15-3 (cap-ab) antikorlarıyla fonksiyonel hale getirilmiş AuNP'lerin UV-VIS spektrumu

Elde edilen UV-VIS spektrofotometri sonuçlarına göre;

- AuNP'ler 520 nm
- MUA-AuNP'ler 524 nm
- HER2 kaplı AuNP'ler 527 nm ve CA15-3 kaplı AuNP'ler 529 nm'de pik vermiştir.

AuNP'lerin antikorlarla konjugasyonu sonucunda, piklerin sağa doğru kaydığı gözlenmiştir. Absorbans değerlerinin sağa doğru kayması, AuNP yüzeyinde fonksiyonel bir değişiklik olduğunu göstermektedir. HER-2 antikoruyla konjuge edilmiş AuNP'ler uzun bir pik oluştururken, CA15-3 antikoruyla kaplı AuNP'lerin

daha kısa boylu bir pik yaptığı görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, AuNP' lerin HER-2 ve CA15-3 antikorları ile konjuge hale geldiğini göstermektedir.

4.4. Kolorimetrik Biyosensörün Optimize Edilmesi

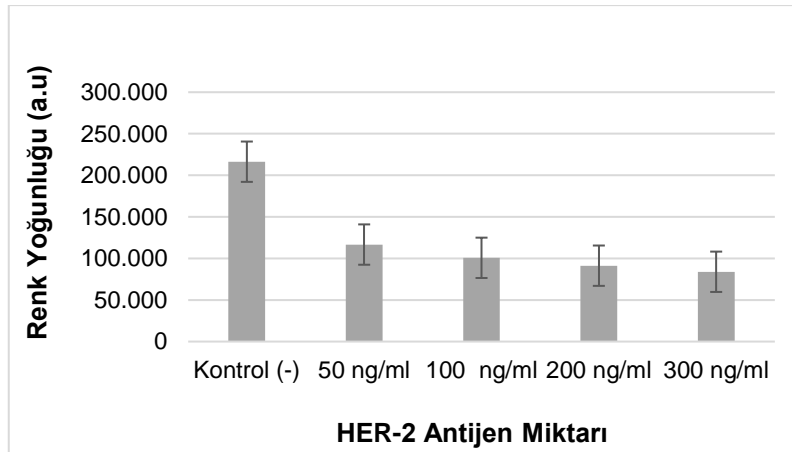
Tasarlanan kolorimetrik biyosensörün optimum çalışma etkinliğinin belirlenmesi için antijen miktarı, uygulanan belirleyici antikorun miktarı ve inkübasyon süresi gibi çeşitli parametreler araştırılmıştır.

Cam yüzeyler ışık mikroskopunda görüntülenerek, elde edilen görüntüler Image J programında renk yoğunluğuna göre analiz edilmiştir.

4.4.1. HER-2 Teşhisine Yönelik Kolorimetrik Biyosensörün Optimizasyonu

HER-2 antijen miktarının (50, 100, 200 ve 300 ng/ml) cam yüzeydeki immobilizasyona etkisi Image J programı kullanılarak belirlenmiştir.

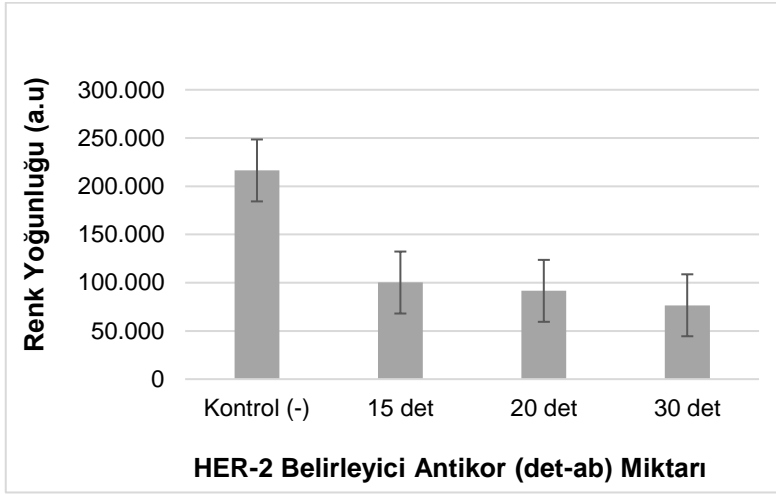
Kontrol (-) için, işlem görmemiş cam yüzeylere ait görüntülerin yoğunluğu Image J programında analiz edilerek, antijen miktarına karşı renk yoğunluğu grafiği çizilmiştir. Buna göre, en etkili immobilizasyonun 300 ng/ml HER-2 antijeninin kullanıldığı cam yüzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Farklı miktarlarda uygulanan HER-2 antijenlerinin renk yoğunluğuna etkisi

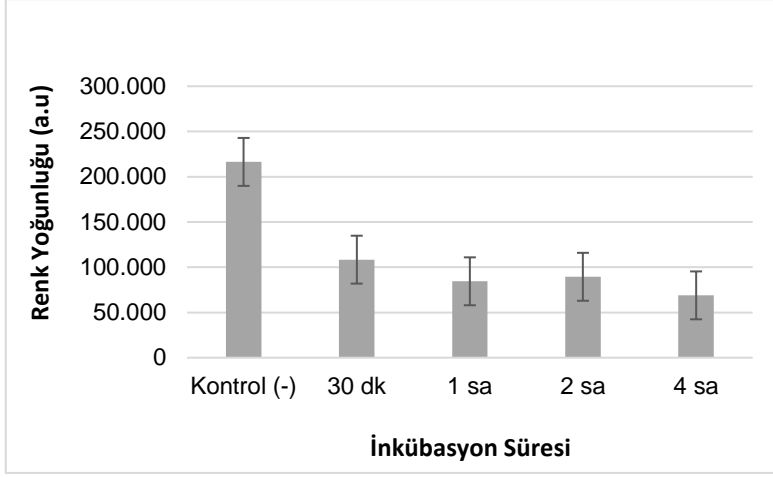
HER-2 belirleyici antikor miktarının (15, 20 ve 30 µl) cam yüzeydeki immobilizasyona etkisi Image J programı kullanılarak belirlenmiştir.

Kontrol (-) için, işlem görmemiş cam yüzeylere ait görüntülerin yoğunluğu Image J programında analiz edilerek, belirleyici antikor miktarına karşı renk yoğunluğu grafiği çizilmiştir. Buna göre, en etkili immobilizasyonun 30 µl HER-2 antikorunun kullanıldığı cam yüzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Farklı miktarlarda uygulanan HER-2 belirleyici antikorlarının cam yüzeyde görülen renk yoğunluğuna etkisi

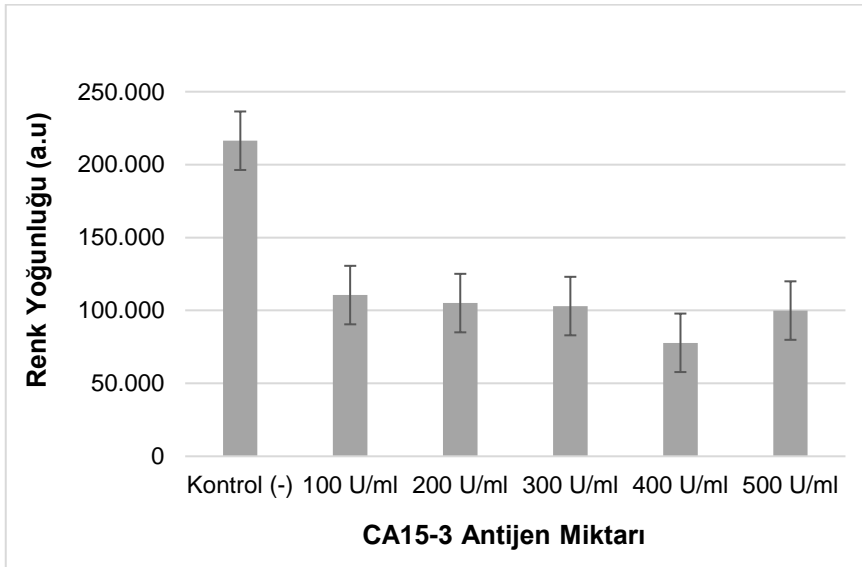
HER-2 belirleyici antikor inkübasyon süresinin (30 dk, 1, 2 ve 4 sa) cam yüzeydeki immobilizasyona etkisi Image J programı kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol (-) için, işlem görmemiş cam yüzeylere ait görüntülerin yoğunluğu Image J programında analiz edilerek, inkübasyon süresine karşı renk yoğunluğu grafiği çizilmiştir. Buna göre, en etkili immobilizasyonun 4 saat inkübasyona bırakılan cam yüzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. HER-2 belirleyici antikor inkübasyon süresinin renk yoğunluğuna etkisi

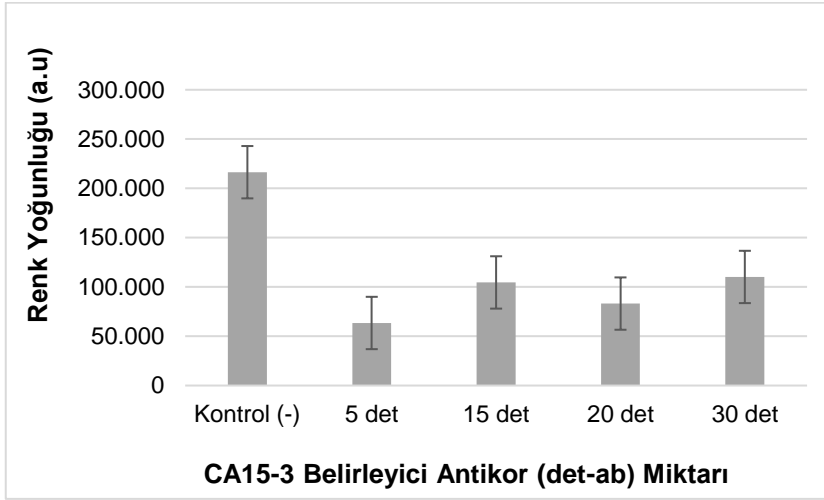
4.4.2. CA15-3 Teşhisine Yönelik Kolorimetrik Biyosensörün Optimizasyonu

CA15-3 antijen miktarının (100, 200, 300, 400 ve 500 U/ml) cam yüzeydeki immobilizasyona etkisi Image J programı kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol (-) için, işlem görmemiş cam yüzeylere ait görüntülerin yoğunluğu Image J programında analiz edilerek, antijen miktarına karşı renk yoğunluğu grafiği çizilmiştir. Buna göre, en etkili immobilizasyonun 400 U/ml CA15-3 antijeninin kullanıldığı cam yüzeyinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.28).



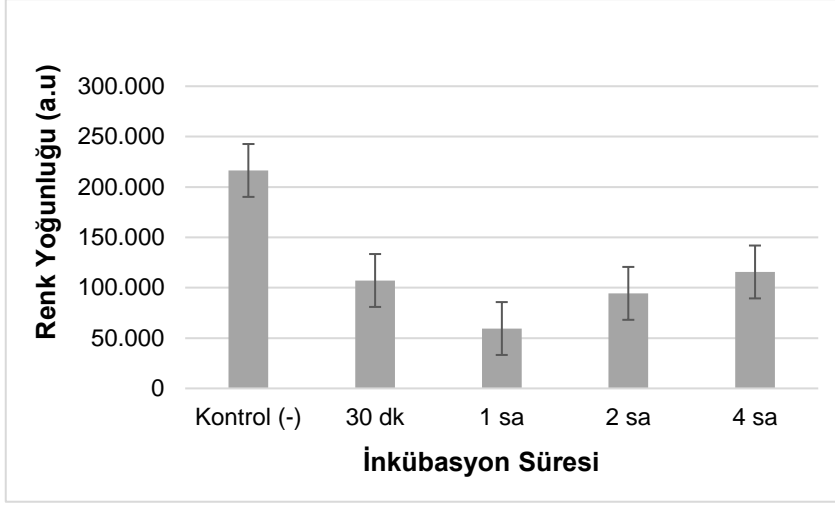
Şekil 4.28. Farklı miktarlarda uygulanan CA15-3 antijenlerinin renk yoğunluğuna etkisi

CA15-3 belirleyici antikor miktarının (5, 15, 20 ve 30 μ l) cam yüzeydeki immobilizasyona etkisi Image J programı kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol (-) için, işlem görmemiş cam yüzeylere ait görüntülerin yoğunluğu Image J programında analiz edilerek, belirleyici antikor miktarına karşı renk yoğunluğu grafiği çizilmiştir. Buna göre, en etkili immobilizasyonun 5 μ l CA15-3 antikorunun kullanıldığı cam yüzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Farklı miktarlarda uygulanan CA15-3 belirleyici antikorlarının renk yoğunluğuna etkisi

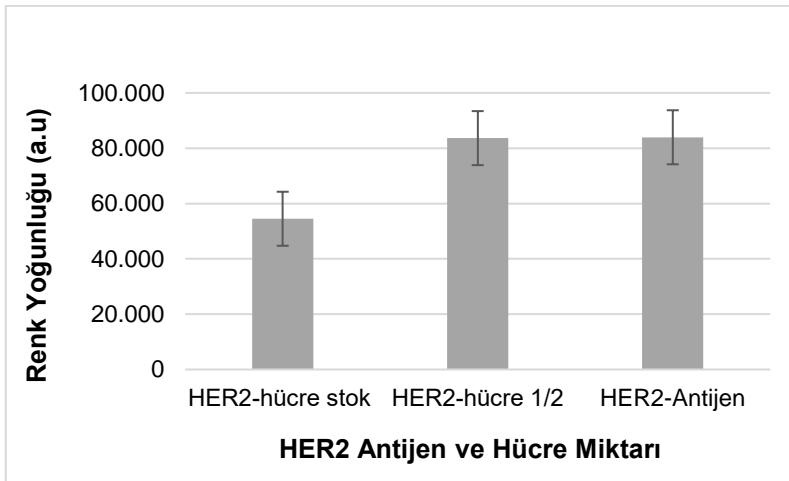
CA15-3 belirleyici antikor inkübasyon süresinin (30 dk, 1, 2 ve 4 sa) cam yüzeydeki immobilizasyona etkisi Image J programı kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol (-) için, işlem görmemiş cam yüzeylere ait görüntülerin yoğunluğu Image J programında analiz edilerek, inkübasyon süresine karşı renk yoğunluğu grafiği çizilmiştir. Buna göre, en etkili immobilizasyonun 1 saat inkübasyona bırakılan cam yüzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. CA15-3 belirleyici antikor inkübasyon süresinin renk yoğunluğuna etkisi

4.4.3. HER-2 (+) Hücreleri

Biyosensörün HER-2 (+) hücreleri ile çalışma prensibini değerlendirmek için hedef analit olarak, HER-2 antijeni yerine HER-2 (+) hücreleri kullanılmıştır. Cam yüzey üzerinde gerçekleşen immobilizasyon işlemi Image J programında analiz edilerek, HER-2 (+) hücreleri [stok (2×10^6 hücre/ml) ve $\frac{1}{2}$ oranında sulandırılmış] ve HER-2 antijeni (300 ng/ml) uygulanan camların renk yoğunluğu karşılaştırılmıştır (Şekil 4.31).



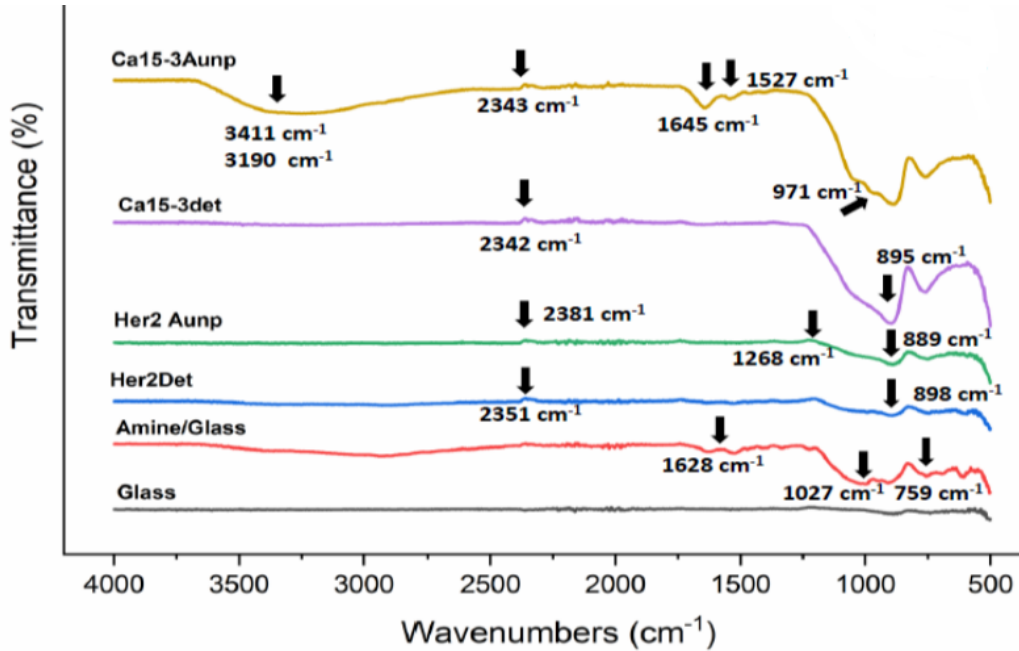
Şekil 4.31. HER-2 antijeni ve HER-2 (+) hücrelerinin cam yüzey üzerinde oluşturduğu renk yoğunluğu

Buna göre, en etkili immobilizasyonun HER-2 stok hücresi uygulanan cam yüzeyinde olduğu tespit edilmiştir. ½ oranında sulandırılmış HER-2 (+) hücrelerinin cam üzerinde oluşturduğu renk yoğunluğunun ise, HER-2 antijeni kullanılan cam yüzeyle birbirine çok yakın olduğu görülmüştür.

4.5. Tasarlanan Kolorimetrik Biyosensörün Validasyon Sonuçları

4.5.1. FTIR Analizi

- İşlem görmemiş cam,
- Aminlenmiş cam,
- HER-2 belirleyici antikoruyla muamele edilmiş cam (Her2Det),
- HER2 antikor -HER2 antijeni- HER2 antikoruyla kaplı AuNP' lerin bir araya getirilmesiyle immobilizasyonu tamamlanmış cam (Her2AuNP)
- CA15-3 belirleyici antikoruyla muamele edilmiş cam (CA15-3Det),
- CA15-3 antikor -CA15-3 antijeni- CA15-3 antikoruyla kaplı AuNP' lerin bir araya getirilmesiyle immobilizasyonu tamamlanmış cam (CA15-3AuNP) yüzeylerine FTIR analizi yapılmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Aminlenmiş, belirleyici antikor eklenmiş ve immobilizasyonu tamamlanmış camların FTIR analizi

- 2342 ve 2351 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler (N-H)
- 1628 cm^{-1} 'deki karakteristik pik (C=O) gerilmesine,
- 1027 cm^{-1} 'deki karakteristik pik (C-O/C-C) titreşimlerine,
- 759-762 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler (R1-CHNH₂-R2) alifatik aminlere,
- 889-971 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler (C-O ve C-C) gerilmesi,
- 1645 cm^{-1} 'deki karakteristik pik (C=O) gerilmesi (antikorun amid I grubundan kaynaklanır)
- 1527 cm^{-1} 'deki karakteristik pik, Amid II bandı
- 3190-3411 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler, (N-H ve OH) bağlarındaki 2. il aminlerin gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir.

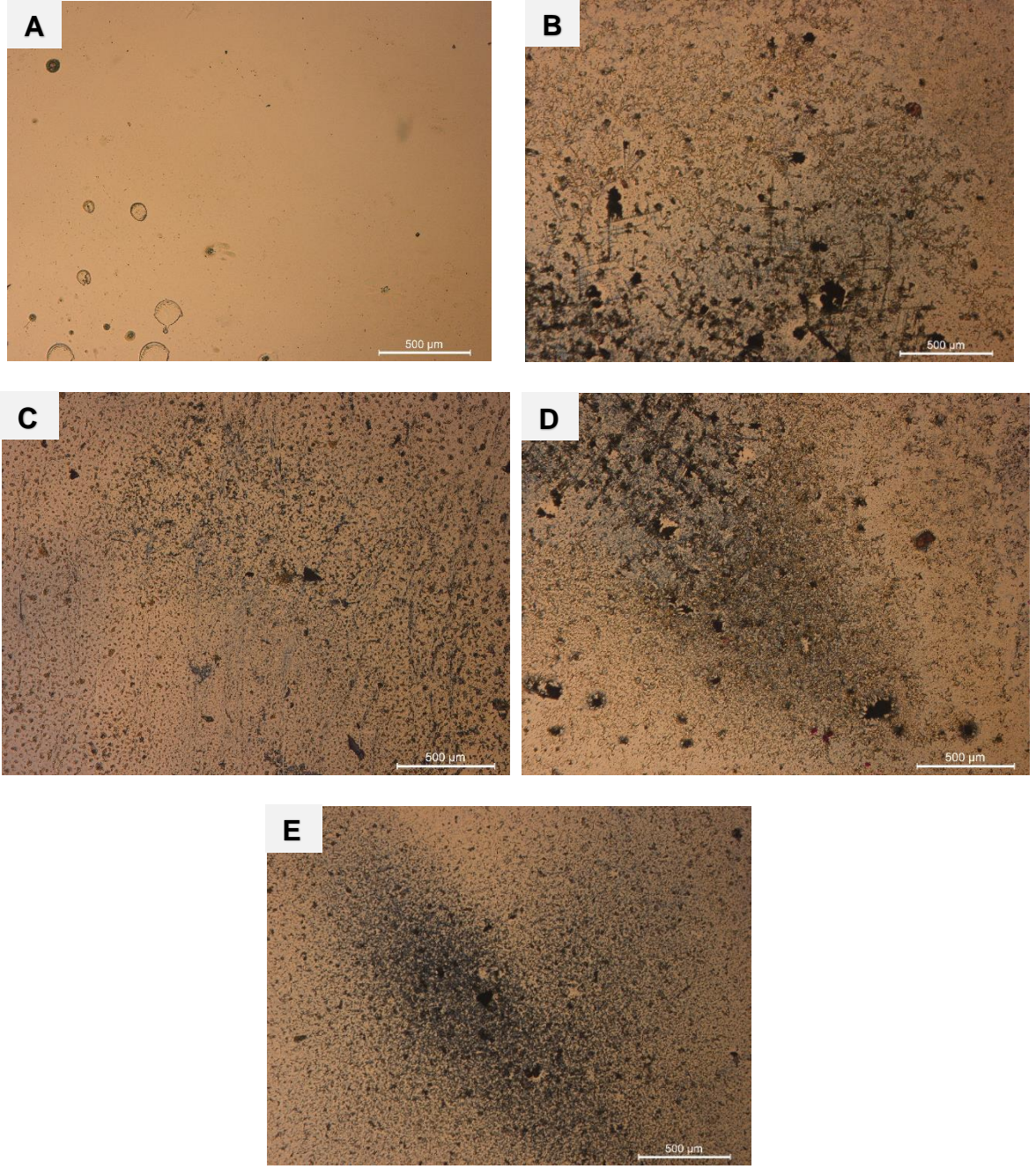
C-O ve C-C gerilmeleri, N-H pikleri, amid I ve II bantları antikor yapısındaki polisakkaritler ve amin gruplarıyla ilişkilidir. Tespit edilen bu karakteristik pikler antikorların cam yüzey üzerine immobilize olduğunu göstermektedir.

4.5.2. İmmobilize Edilmiş Cam Yüzeylerin Işık Mikroskopunda Görüntülenmesi

4.5.2.1. HER-2 İmmobilizasyon Görüntüleri

HER2 tespitine yönelik tasarlanan cam tabanlı kolorimetrik biyosensörünün ışık mikroskopu (5x büyütme) altındaki görüntüleri Şekil 4.33' te gösterilmiştir. Farklı antijen (50, 100, 200 ve 300 ng/ml) miktarları kullanılarak hazırlanmış immobilize (antikor-antijen-AuNP/antikor) cam yüzeylerin mikroskop altındaki görüntüleri, işlem görmemiş cam yüzey ile karşılaştırılmıştır.

İmmobilize cam yüzeylerin bir tabakayla kaplı olduğu tespit edilirken, işlem görmemiş cam yüzeyde bir tabakalaşma görülmemiştir. En yoğun tabakanın, 300 ng/ml antijen kullanılan cam yüzey üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.33-E)

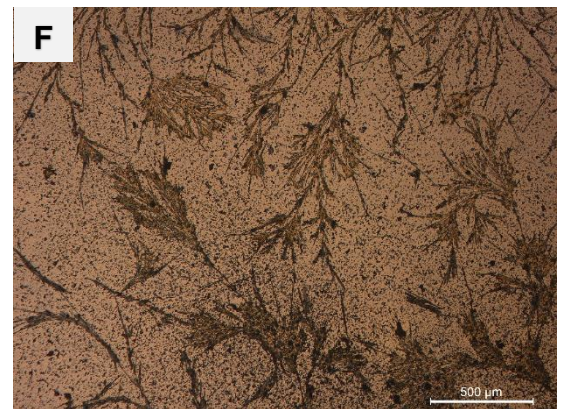
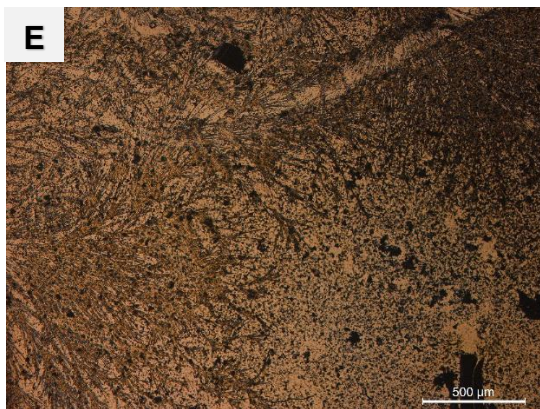
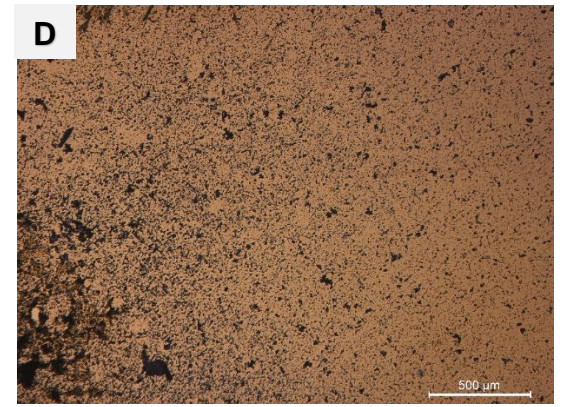
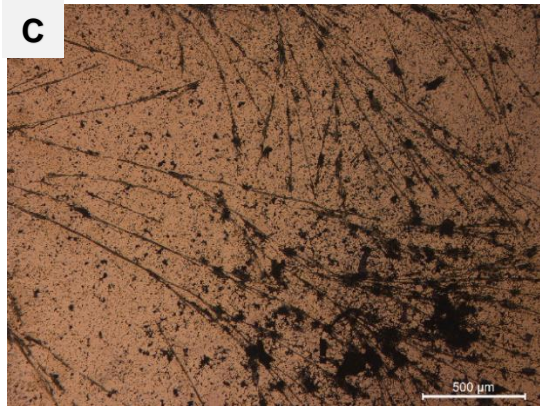
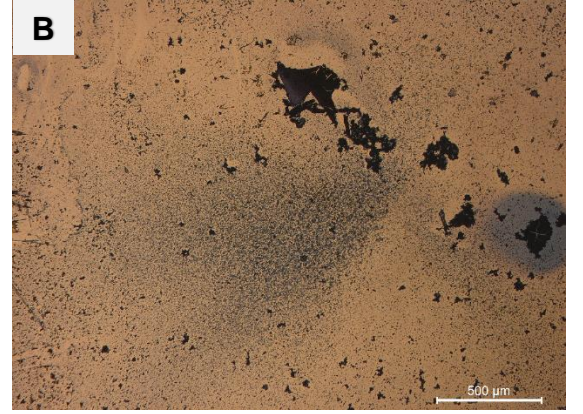
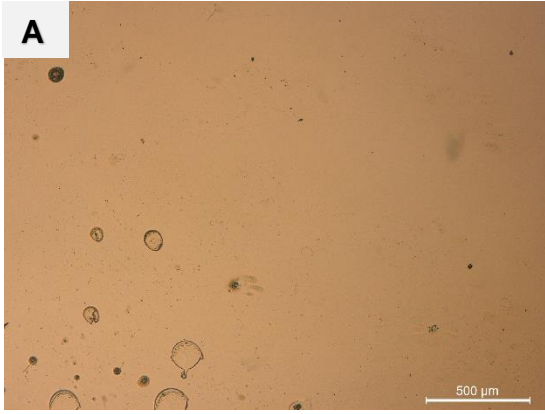


Şekil 4.33. Farklı antijen miktarlarıyla hazırlanmış HER-2' ye ait kolorimetrik biyosensörün ışık mikroskobu (5X) altındaki görüntüleri (A) İşlem görmemiş cam (B) 50 ng/ml HER2 (C) 100 ng/ml HER2 (D) 200 ng/ml HER2 ve (E) 300 ng/ml HER2

4.5.2.2. CA15-3 İmmobilizasyon Görüntüleri

CA15-3 tespitine yönelik tasarlanan cam tabanlı kolorimetrik biyosensörünün ışık mikroskobu (5x büyütme) altındaki görüntüleri Şekil 4.34' de gösterilmiştir. Farklı

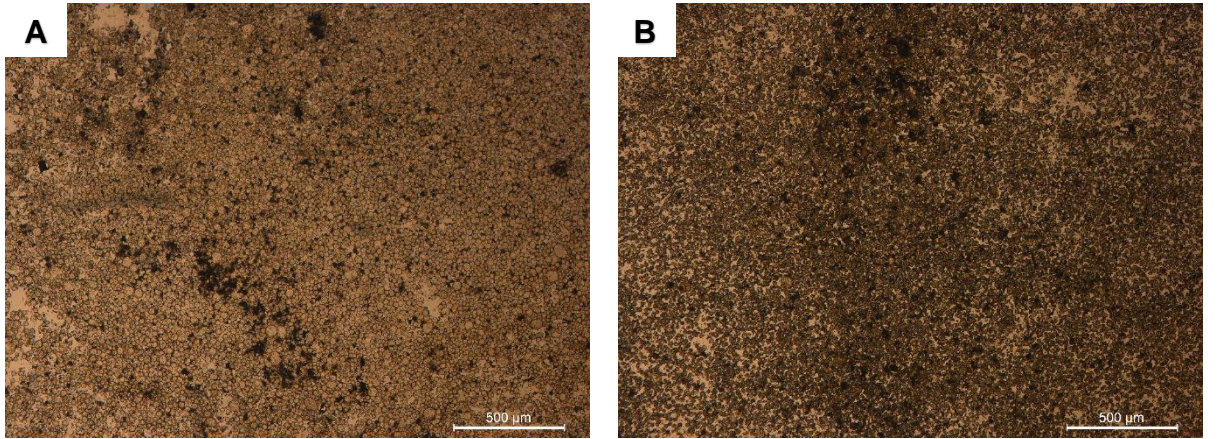
antijen (100, 200, 300, 400 ve 500 ng/ml) miktarları kullanılarak hazırlanmış immobilize (antikor-antijen-AuNP/antikor) cam yüzeylerin mikroskop altındaki görüntüleri, işlem görmemiş cam yüzey ile karşılaştırılmıştır. Immobilize cam yüzeylerin bir tabakayla kaplı olduğu tespit edilirken, işlem görmemiş cam yüzeyde bir tabakalaşma görülmemiştir. En yoğun tabakanın, 400 U/ml antijen kullanılan cam yüzey üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.34-E)



Şekil 4.34. Farklı antijen miktarlarıyla hazırlanmış CA15-3' e ait kolorimetrik biyosensörün ışık mikroskopu (5X) altındaki görüntüleri (A) İşlem görmemiş cam (B) 100 U/ml CA15-3 (C) 200 U/ml CA15-3 (D) 300 U/ml CA15-3 (E) 400 U/ml CA15-3 ve (F) 500 U/ml CA15-3

4.5.2.3. HER-2 (+) Meme Kanseri Hücrelerinin İmmobilizasyon Görüntüleri

HER2 (+) meme kanseri hücreleriyle yapılan immobilizasyon işleminin ışık mikroskopu (5x büyütme) altındaki görüntüleri Şekil 4.35' te gösterilmiştir. HER-2 antijeni kullanılarak yapılan immobilizasyona göre, HER-2 hücrelerinin cam yüzey üzerinde daha yoğun bir görüntü oluşturduğu görülmüştür. Stok HER-2 hücreleriyle muamele edilmiş cam yüzeyin ise, daha yoğun bir görüntüye sahip olduğu belirlenmiştir.

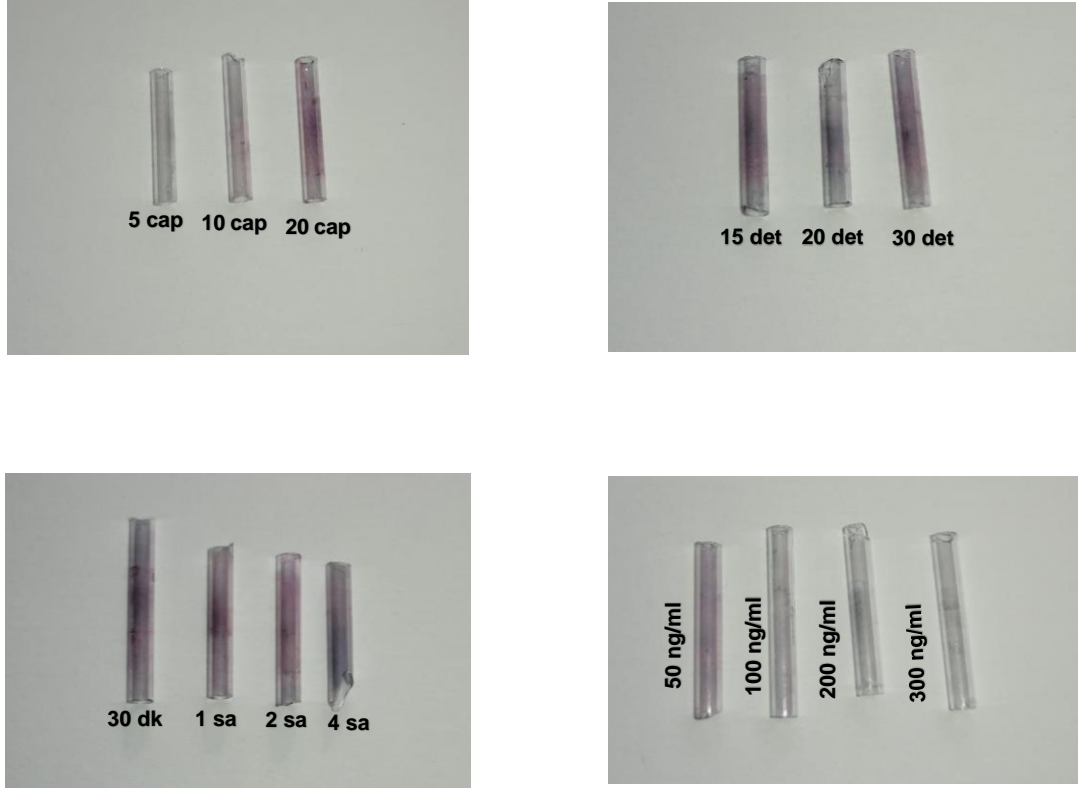


Şekil 4.35. Kolorimetrik biyosensör üzerine uygulanan HER-2 (+) Meme kanseri hücrelerinin ışık mikroskopu (5X) altındaki görüntüsü (A) 1/2 oranında sulandırılmış HER-2 hücreleri ve (B) Stok HER-2 hücreleri

4.5.3. Tasarlanan Kolorimetrik Biyosensörün Fotoğrafları

Antikor (det-ab), antijen ve antikor (cap-ab) kaplı AuNP' lerin cam kapiller yüzey üzerinde oluşturduğu immobilizasyon açık pembe, mor ve siyaha doğru değişen bir renk ölçeğinde gözlenmiştir.

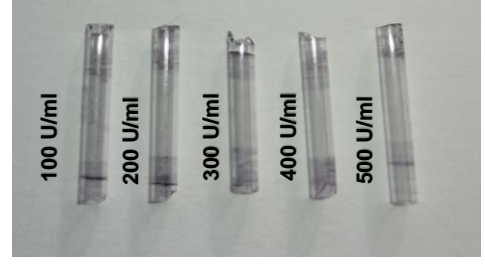
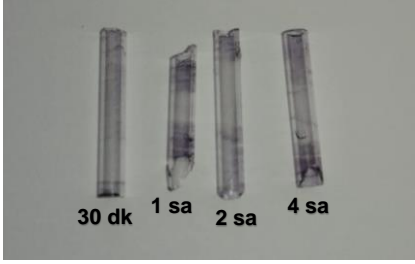
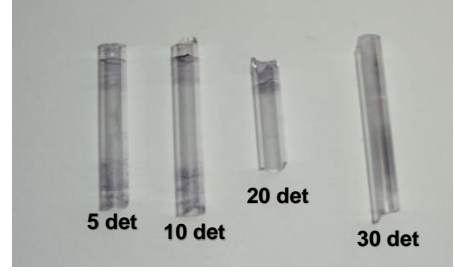
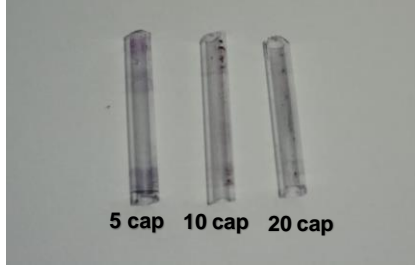
HER-2 antijen ve antikolarının kullanıldığı cam kapillerin yüzeylerde, immobilizasyonun cam yüzey boyunca gerçekleştiği ve renginin açık pembeden mora doğru değiştiği görülmüştür (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. HER-2 kanser biyobelirtecinin teşhisi için tasarlanan cam Kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensörün fotoğrafları

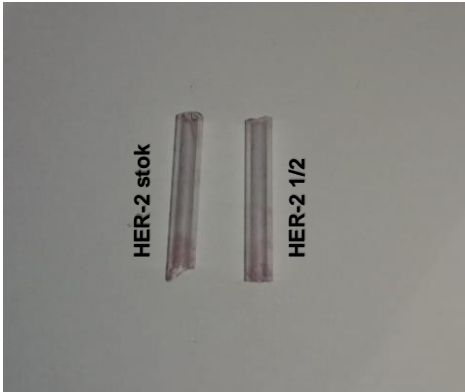
CA15-3 antijen ve antikoları kullanılan cam yüzeylerde ise, immobilizasyonun uç kısımlarda gerçekleştiği ve koyu mordan siyaha doğru bir renk verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.37).

Elde edilen bu görüntüler, cam kapiller yüzey üzerinde kanser teşhisine yönelik tasarlanan kolorimetrik biyosensörün çalışabilirliğini göstermektedir.



Şekil 4.37. CA15-3 kanser biyobelirtecinin teşhisi için tasarlanan cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensörün fotoğrafları

HER-2 (+) hücrelerinin (stok ve ½ oranında sulandırılmış) cam kapiller üzerindeki immobilizasyonun uç kısımlarda gerçekleştiği ve pembe bir renk verdiği görülmüştür (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. HER-2 (+) hücrelerinin (stok ve ½ oranında sulandırılmış) cam kapiller tabanlı kolorimetrik biyosensör üzerine immobilize edilmiş fotoğrafı

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya çapındaki kanser vakalarının yaklaşık %23'ünü oluşturan ve her yıl milyonlarca kadını etkileyen en önemli hastalıklardan biridir [3,4]. Kansere mücadelede başarılı bir tedavi için, erken teşhis oldukça önemlidir. Günümüzde kanser teşhisi için; çeşitli görüntüleme teknikleri (mamografi, MRI, BT gibi), dokuların veya hücrelerin morfolojik analizini içeren yöntemler ve biyobelirteç tespitine yönelik teknikler (ELISA, IHC gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır [6,9]. Bu teknikler, kanseri ancak dokuda gözle görülür bir değişiklik olduğunda tespit edebilme, kanser olmayan (benign) tümör lezyonlarını-kötü huylu (malign) tümör lezyonlarından ayırt edememe, kanseri metastazdan önce erken bir aşamada tespit edememe gibi çeşitli kısıtlamalara sahiptir [6,7].

Geleneksel teşhis yöntemlerinin sahip olduğu kısıtlamalar, yüksek maliyet ve uzman kişiye duyulan ihtiyaç, araştırmacıları kullanımı kolay, hızlı, basit tasarıma sahip ve hasta bakım noktasında (POC) uygulanabilir, nanoteknolojik tabanlı yeni teşhis yöntemlerinin geliştirilmesine yöneltmektedir [1].

Biyosensörler, ilgili analit ve biyolojik tanıma elemanı arasındaki etkileşimin ölçülebilir sinyale dönüştürüldüğü analitik cihazlar olup [11], yüksek özgüllük seçicilik, gerçek zamanlı yanıt, yeniden kullanılabilir, taşınabilir boyut, basit uygulama yöntemi ve uygun maliyet gibi özellikleriyle sağlık sektöründe öne çıkmaktadır. Biyosensörlerin sahip olduğu avantajlar, araştırmacıları biyosensör tabanlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesine yöneltmektedir. Biyosensörler arasında optik biyosensörler çeşitli kanser türlerinin teşhisi için büyük bir potansiyele sahiptir [95].

Kanser teşhisine yönelik; floresan, kolorimetrik, yüzey plazmon rezonans ve elektrokemilüminesans biyosensörleri gibi bir dizi optik biyosensör tasarlanmış

olup [40,41] mikroakışkan temelli optik immünosensörler; küçük boyutları, düşük maliyetleri ve basit kullanımlarıyla öne çıkmaktadır [6,7].

Mayer ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, dolaşımdaki tümör hücrelerini (HER2 amplifikasyonu) yakalayabilen mikroakışkan bazlı bir teknolojiyi test etmişlerdir [96]. Ahirwar ve Nahar 2016 yılında yaptıkları çalışmada, iki farklı meme kanseri saptamak için AuNP' lere dayalı bir kolorimetrik aptasensör geliştirmişlerdir [97]. Xiao ve arkadaşları 2017 yılında, kanser biyobelirteçleri CEA (karsinoembriyonik antijen), α -fetoprotein ve PSA (prostat spesifik antijeni) tespiti için AuNP' ler ve bizmut selenit (Bi₂Se₃) nano tabakalara dayalı bir kolorimetrik sensör geliştirmişlerdir [98]. Wang ve arkadaşları 2019 yılında, MCF7 tarafından salınan iki tür eksozomun düşük konsantrasyonunu saptamak için Au filmli ve AuNP' lere dayalı SPR (yüzey plazmon rezonans) aptasensörü geliştirmişlerdir [99]. Loyez ve arkadaşları ise, 2021 yılında yaptıkları çalışmada meme kanserini tespit etmek için, HER-2 biyobelirtecini kullanarak fiber optik bir sensör tasarlamışlardır [100]. Mollasalehi ve Shajari 2021 yılında yaptıkları çalışmada, çeşitli kanserli hücre hatları tespiti için altın nanoprobaları içeren kolorimetrik bir nano-biyosensör tasarlamışlardır [101]. Yapılan bu çalışmalar, kanser teşhisine yönelik yenilikçi yaklaşımların geliştirildiğini ve biyosensörlerin öne çıktığını göstermektedir.

Biyosensör teknolojisindeki gelişmeler göz önünde bulundurularak bu çalışma kapsamında, meme kanseri teşhisine yönelik yeni nesil kolorimetrik bir biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensör tasarımında tespit analiti (hedef molekül) olarak, HER-2 ve CA15-3 kanser biyobelirteçleri seçilmiştir.

Kanser biyobelirteçleri kanser hücreleri veya vücut tarafından salgılanan; kan, tükürük, idrar gibi vücut sıvılarında veya dokularında bulunabilen, kanserin vücutta var olduğunu gösteren protein, karbonhidrat veya nükleik asit gibi ölçülebilir biyolojik moleküllerdir [13,14].

Kanser biyobelirteçleri; kanserin teşhisi, izlenmesi, sınıflandırılması, uygun tedavinin belirlenmesi ve tedavi etkinliğinin takip edilmesinde kullanılmaktadır

[82]. Bu nedenle, belirli bir kanser türünün teşhisinde, o kansere özgü biyobelirteci tespit edebilen biyosensörler oldukça önemlidir [86].

Kearney ve Murray 2009 yılında yaptıkları çalışmada, kanser teşhisi için yüzey biyobelirteç proteinlerine dayalı kandaki hücreleri tespit edebilen, invaziv olmayan bir yöntem kullanmışlardır [1]. Ali ve arkadaşları ise, 2016 yılında yaptıkları çalışmada agresif meme kanseri türlerinin izlenmesi için protein biyobelirteçlerini kullanmışlardır [102].

Meme kanseri teşhisinde BCRA1 ve BRCA2 genleri gibi genomik; miRNA 9, miRNA-21 gibi transkriptomik ve HER ailesi, p53, CA125, CA19–9, CA15–3 gibi proteomik belirteçler kullanılmaktadır [82]. HER-2, meme kanserlerinin %20-30'unda aşırı ifade edilen spesifik bir biyobelirteç olup, meme kanseri hastalarında HER-2' nin belirlenmesi tedavi seçiminde standart uygulama olarak kabul edilmektedir [95]. CA15-3 ise, meme kanserinin teşhisinde kullanılan bir diğer önemli biyobelirteçtir. Serumdaki konsantrasyonu, tümörün büyüklüğü veya hastalığın evresiyle ilişkili olarak değişmektedir [88].

Yapılan tez çalışmasında “HER-2 ve CA15-3” kanser biyobelirteçleri kullanılmış ve bu belirteçlerin seçilmesinde meme kanseri teşhisindeki önemleri baz alınmıştır.

Gohring ve arkadaşları 2010 yılında, opto-akışkan halka rezonatörü (OFRR) kullanılarak insan serum örneklerinden HER-2 meme kanseri biyobelirteçlerinin saptanmasına yönelik yeni ve etiketsiz bir yaklaşım üzerine çalışmışlardır [103]. Chen ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, meme kanseri serumunda kanser antijeni 15-3 (CA15-3) ve bakır düzeyinin belirlenmesi için, altın nanoçubuk (GNR) tabanlı plazmonik sensör geliştirmişlerdir [92]. 2020 yılında Hartati ve arkadaşları ise, serumdaki HER-2 antijenini tespit etmek için karbon-altın nanoparçacık elektrotlarını kullanarak elektrokimyasal bir analiz yöntemini araştırmışlardır [104]. Wu ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada,

CA15-3' ü tespit etmek için prizmatik içi boş metal-polidopamin çerçeveleri (PHMPF) ve 6-karboksiflorescein (FAM) etiketli protein aptameri (FAM-Apt) arasındaki floresan rezonans enerji transferine (FRET) dayalı bir floresan biyosensör oluşturmuşlardır [105]. Nasrollahpour ve arkadaşları ise, 2021 yılında yaptıkları çalışmada metastatik biyobelirteç olarak HER-2 proteini kullanılarak meme kanserinin ölçümü için elektrokemilüminesans özellikte bir immünosensör geliştirmişlerdir [106]. Yapılan bu çalışmalar, kanser biyobelirteçlerinin biyosensör tasarımlarında sıklıkla tercih edildiğini göstermektedir.

Cam kapiller aktif yüzey alanına sahip stabil ortam, uygun maliyet, kolay taşınabilir ve depolanabilir boyut gibi özellikleriyle mikroakışkan teknolojisinde öne çıkan malzemelerdir. Cam kapiller, sahip oldukları yüzey/hacim oranı sayesinde optik algılama için biyosensör uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Cam kapiller, biyosensör tasarımında çeşitli biyobelirteç, patojen ve çevresel kirleticinin tespit edilmesi için önemli bir geleceğe sahiptir. Özellikle kanser teşhisi için cam kapiller sistemlerin kullanıldığı, optik biyosensörler oldukça popüler hale gelmektedir [31,60].

Guzman ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada, biyolojik belirteçlerin hızlı tespiti için, gözenekli hidrojel ve immüno-kompleks partiküller içeren kapiller tüplerden basit bir kolorimetrik tanı cihazı geliştirmişlerdir [60].

Mikroakışkan teknolojisindeki gelişmeler göz önünde bulundurularak, bu çalışma kapsamında sensör platformu olarak cam kapiller tüpler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cam kapiller yüzeylerin işlevsel hale getirilmesinde silanizasyon (aminleme) yöntemi tercih edilmiştir.

Silanizasyon, organik bir katmanın inorganik katmana bağlanmasını sağlamak için yapışkan ajan olarak “silan bileşiklerinin” kullanıldığı işlemidir. Biyomoleküllerin, inorganik substratlara (cam, silika, kuvars, bakır v.b) kovalent

olarak bağlanmasını sağlayan ticari olarak temin edilebilen birçok silan bağlama (birleştirme) ajanı vardır [46].

APTES en popüler silan bağlama reaktiflerinden biri olup, inorganik bir yüzey üzerinde fonksiyonel grup oluşturulmasında tercih edilmektedir [107]. Amin grubuyla gerçekleşecek bir reaksiyon, ilave moleküllerin yüzeye bağlanması sürecinde ilk adımı oluşturmaktadır [70].

Çalışmada cam yüzeylerin fonksiyonel hale getirilmesinde, silanlama ajanı olarak APTES kullanılmıştır.

APTES ile muamele edilen camlar; antikör, protein, oligonükleotid gibi biyomolekülleri sahip oldukları kimyasal gruplar sayesinde yüzeye bağlayabilmektedir [46].

Qin ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, proteinleri cam yüzey üzerinde immobilize etmek için APTES kullanmışlardır [61].

Biyolojik tanıma elemanı olarak kullandığımız meme kanseri (HER-2 ve CA15-3) antikörleri cam yüzeye, APTES kullanarak oluşturduğumuz yeni kimyasal gruplarla (NH₂-amin grubu) etkileşime girerek bağlanmıştır (Şekil 3.4).

Çalışma sırasında aminleme işleminden önce, cam yüzeyler "temizleme-piranha çözültisi ile muamele" adını verdiğimiz bir ön işlemden geçirilmiştir. Bu temizleme, silanizasyon sürecini etkileyebilecek kirleticileri (Na, K ve Ca gibi her yerde bulunabilecek metal iyonlarını) uzaklaştırmak ve yüzey üzerinde (-OH) grupları oluşturmak için yapılmıştır. Cam yüzey üzerinde (-OH) gruplarının oluşması, APTES' in yüzeye bağlanması için oldukça önemlidir. Cam yüzey üzerindeki (-OH) grupları ile APTES' in yapısında bulunan metil (-CH₃) grupları arasında bir

bağ oluşmakta ve bunun sonucunda cam yüzey amin (-NH₂) grupları ile fonksiyonel hale getirilmiş olmaktadır [46].

Halliwell ve Cass 2001 yılında yaptıkları çalışmada, oligonükleotitlerin cam yüzeylere immobilizasyonu için sıvı fazda silanizasyon kullanmışlardır [67]. Kamisetty ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada, cam yüzeyleri sıvı fazda aminleme yöntemi ile fonksiyonel hale getirmişlerdir [74].

Sıvı fazda aminleme işlemi çalışmalarda sıklıkla kullanılmasına rağmen çeşitli dezavantajlara sahiptir.

Sıvı fazda silanizasyonun dezavantajları:

- Sıvı fazda silanizasyon yöntemi birçok basamaktan oluşmakta olup, amin ile fonksiyonel hale getirilecek yüzeyler çeşitli kimyasallar ve koşullar altında işlem gördüğü için kontamine olma olasılığı oldukça yüksektir.
- Sıvı fazda silanizasyon işlemi sırasında çeşitli kimyasal maddelere ihtiyaç duyulmakta olup, daha maliyetlidir.
- Uygulanan prosedür birçok basamaktan oluşmaktadır.
- Sıvı fazda silanizasyon sırasında kullanılan kimyasallar çevresel atık meydana getirmektedir[46,67].

Gaz fazında silanizasyon işlemi ise, desikatör içerisinde ve basınç altında gerçekleşmektedir.

- Desikatör içerisindeki ortam, dış etkenlere karşı daha stabil ve sterildir. Bu durum aminleme işleminin doğru bir şekilde gerçekleşmesi, kontaminasyon riskinin azalması ve örneklerin uzun süre saklanması için oldukça önemlidir.
- Kullanılan gaz fazında silanizasyon prosedürü basit adımlardan oluştuğu için hem iş gücü hem de zaman açısından oldukça avantaj sağlamaktadır.
- Gaz fazında silanizasyon, kullanılan kimyasal çeşidi ve miktarı bakımından sıvı faza göre daha ekonomiktir.

- Gaz fazında kullanılan kimyasallar, buharlaşıp aminle fonksiyonel hale getirmek istediğimiz yüzeye bağlandığı için çevresel atık oluşturmamaktadır [46,67].

Ebner ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, gaz fazında aminleme yöntemini tercih etmişlerdir [73]. Munief ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada, farklı silan türlerine uyarlanabilen pratik ve güvenilir, gaz fazı buharlaştırma tekniğini uygulamışlardır [108].

Literatüre bakıldığında yüzeylerin aminle fonksiyonel hale getirilmesinde, genellikle sıvı fazda aminleme yönteminin tercih edildiği görülmüştür. Yapılan tez çalışması sırasında en etkili aminleme yöntemini belirlemek için hem sıvı hem de gaz fazında aminleme (silanizasyon) yöntemi kullanılmıştır. Aminlenen yüzeyler, XPS (X-ışını spektrofotometrisi) ile analiz edilmiştir.

XPS spektrum grafiklerinde, N1s pikinin görülmesi cam yüzeyin aminle fonksiyonel hale getirildiğini göstermektedir. Sıvı fazda yapılan aminleme için N atomunun yüzdesi 0.5, gaz fazında ise 0.6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Elde ettiğimiz sonuçlar ve yaptığımız sıvı-gaz fazı karşılaştırması sonucunda, cam yüzeylerin aminlenmesi için “gaz fazında aminleme” yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Gaz fazında silanizasyon için kullanılan desikatörler genellikle ortam basıncını kontrol etmemektedir. Çalışmamızda basıncın aminlemeye olan etkisini de araştırılmıştır. Elde edilen XPS verilerine göre, en iyi aminlemenin 0.06 Mpa basınç altında ve 50 µl APTES kullanılan cam yüzeyde gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Buna göre XPS grafiğinde,

C1s pikine ait spektrumda; 284.9 eV (C-C veya C-H bağlarını içeren pik), 286.3 eV (C-N bağı) ve 287.7 eV (halka yapıdaki O-C-O veya C=O bağı içeren pik) değerinde 3 adet pik tespit edilmiştir (Şekli 4.14).

N1s pikine ait spektrumda; 399.9 eV (C-NH₂ nötr amin gruplarını içeren bağ) ve 401.5 eV (protonlanmış amino gruplarını içeren bağ (NH₃⁺)) değerinde 2 adet pik görülmüştür (Şekil 4.15). C atomunun yüzdesi 51.15, N atomunun yüzdesi ise 7.39 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). N1s ve C1s zirvesinde görülen bu sinyal artışları, cam yüzeyin APTES ile kaplandığını doğrulamaktadır.

O1s pikine ait spektrumda; 532.1 eV (O-Si) değerinde bir pik belirlenmiştir (Şekil 4.16).

Si2p pikine ait spektrumda; 102.1 ve 102.7 eV (Si-O) değerinde iki pik görülmüştür (Şekil 4.17).

Qin ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, cam yüzeyi APTES ile sıvı fazda silanize etmişlerdir. XPS spektrum analizinde N1s için 400 eV; C1s için 287 eV; O1s için 532 eV ve Si2p için 106 eV değerinde pikler elde etmişlerdir. %C değeri 42.40 ve %N değeri 6.32 olarak tespit etmişlerdir [61]. Dharanivasan ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, cam yüzeyleri sıvı fazda silanizasyon yöntemiyle fonksiyonel hale getirmişlerdir. XPS spektrumunda C1s için 284.4 eV, 285.4 eV ve 287 eV değerinde üç pik; N1s içinse 400.5 eV değerinde bir pik tespit etmişlerdir. C atomunun yüzdesi 53.67, N atomunun ise 1.25 olarak belirlemişlerdir [109].

Literatürdeki çalışmalar ile elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırıldığında, çalışmada kullanmış olduğumuz gaz fazında aminleme yönteminin en yüksek N yüzdesi değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç, ortam basıncı ve APTES miktarı gibi parametrelerin aminleme işlemi için önemli olduğu göstermekte ve gaz fazında aminlemenin daha etkili olduğunu kanıtlamaktadır.

Biyosensörlerin tasarımında farklı şekil, yapı, boyut ve özellikte nanopartiküller kullanılmaktadır. Nanopartiküller büyük yüzey / hacim oranı nedeniyle yüzeyinde çok sayıda antikör, aptamer ve diğer bağlayıcı molekülleri işlevselleştirilebilmekte ve kanser hücrelerinin daha spesifik olarak saptanmasına izin vermektedir [95].

Metal nanopartiküller içerisinde “Altın nanopartiküller (AuNP)” benzersiz yüzeyleri kimyasal eylemsizlikleri, yüksek elektron yoğunlukları ve güçlü optik absorpsiyonları nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. AuNP’ ler genomik, klinik kimya, aşı geliştirme, immünoassay biyosensörler, teşhis, mikroorganizmaların kontrolü, kanser hücresi görüntüleme ve ilaç dağıtımı gibi çeşitli alanlarda uygulanmaktadır [110]. AuNP, çok sayıda çalışmada renk geliştirme parçası olarak kullanılmaktadır. Renk geliştirmeye dayalı araştırmalar, basit yorumlama ve kolay kullanımları nedeniyle ticarileştirme amacıyla tercih edilmektedir. Hedef molekül-biyoreseptör kompleksinin bir araya gelmesiyle renk değişimi meydana gelmekte ve oluşan kompleksin miktarı, renk yoğunluğuyla orantılı olarak değişmektedir. Bu renk gelişimi ve yoğunluğu anti hedef antikörlerin veya aptamerlerin belirlenmesi için kullanılabilir [7].

Çalışmada sinyal verici olarak benzersiz optik özelliklere sahip AuNP’ ler kullanılmıştır. AuNP’ ler sitrat indirgeme yöntemine göre sentezlenerek, çeşitli karakterizasyon yöntemleriyle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; boyutu 25 nm (Şekil 4.2), zeta potansiyel değeri -33.4 mV (Şekil 4.3) olan ve UV-VIS ölçümü 523 nm’ de pik veren (Çizelge 4.1) AuNP’ ler sentezlenmiştir. FTIR sonuçları, 1573 cm^{-1} (karboksilat asimetrik gerilmesi) 1455 ve 1375 cm^{-1} ’ de (karboksilat simetrik gerilmesi) ana pikler görülmüştür (Şekil 4.8). TEM sonuçlarına göre, küresel şekilde ve çapı 14 ile 16 nm arasında değişen AuNP’ ler elde edilmiştir (Şekil 4.6).

Nghiem ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, sitrat indirgeme metoduyla AuNP sentezleyerek, UV-VIS ve FTIR yöntemleri ile karakterize etmişlerdir. AuNP’ ler FTIR analizinde 1589 cm^{-1} ve 1403 cm^{-1} ’de ana pik, UV-VIS spektrumunda ise 519 nm’ de absorbans vermişlerdir [111]. Shi ve arkadaşları 2011 yılında, sitrat indirgeme yöntemiyle 519 nm’ de pik veren, zeta potansiyel değeri -30.4 mV olan AuNP’ ler sentezlemişlerdir [93]. Dharanivasan ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada, UV-VIS spektrumunda 520 nm’ de pik veren ve TEM görüntülerinde çapı 13 nm olan küresel şekle sahip AuNP’

ler elde etmişlerdir [109]. Yapılan bu çalışmalar bizim sonuçlarımızı doğrular niteliktedir.

Çalışmada, AuNP' lerin HER-2 ve CA15-3 antikorları ile konjugasyonunda EDC/NHS çapraz bağlayıcıları kullanılmıştır. Farklı antikor miktarlarının AuNP yüzeyine bağlanma kapasitesi, zeta potansiyel (yük dağılımı) ve UV-VIS spektrofotometri ile analiz edilmiştir.

Yüzey yük dağılımı sonuçlarına göre; en iyi bağlanma HER-2 için 10 µl (-36,8 mV) (Şekil 4.19) ve CA15-3 için 5 µl (-42,5 mV) antikorun (Şekil 4.21) kullanıldığı yüzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyel değerinde görülen bu negatif yük artışı, komşu parçacıklar arasındaki elektrostatik itmeden dolayı meydana gelmekte ve antikor kaplı AuNP' e daha yüksek stabilite sağlamaktadır. UV-VIS ölçümlerine göre; HER2 kaplı AuNP' ler 527 nm ve CA15-3 kaplı AuNP' ler 529 nm' de pik vermiştir (Şekil 4.24). Absorbans değerinde görülen bu kayma, yüzeydeki yük miktarının değiştiğini göstermektedir. Yüzey yük miktarındaki artış ve UV-VIS absorbans değerindeki kayma AuNP' lerin antikorlar ile immobilize olduğunu kanıtlamaktadır.

Shi ve arkadaşları 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada, 535 nm' de pik veren ve zeta potansiyel değeri -41.7 mV olan IgG ile konjuge edilmiş AuNP' ler sentezlemişlerdir [93]. Aldewachi ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada, AuNP' leri çeşitli peptitler ile fonksiyonel hale getirerek, 524 nm' de pik veren ve zeta potansiyel değeri -39 mV olan peptit kaplı AuNP' ler sentezlemişlerdir [112]. Raja Gopal Rayavarapu yaptığı çalışmada, HER-2' ye özgü fare monoklonal antikorunu, AuNP' lere bağlamak için EDC/NHS çapraz bağlayıcılarını kullanmıştır [110]. Yapılan bu çalışmalar AuNP yüzeyine antikorların konjuge edilmesinde, EDC/NHS bağlayıcılarının kullanıldığını göstermektedir.

AuNP ve antikor arasında gerçekleşen konjugasyon, antikor yüzeyindeki (+) yüklü gruplar (amino asitler- N-terminali) ile AuNP yüzeyindeki (-) yüklü gruplar arasında gerçekleşmektedir. AuNP' ler MUA ile muamele edildiğinde yüzeyleri karboksil gruplarınca zengin ve (-) yüklü hale gelmektedir (Şekil 3.1). EDC/NHS kovalent bağ oluşumunu sağlayan önemli çapraz bağlayıcı ajanlar olup, karboksil gruplarıyla karşılaştıklarında reaktif NHS esterleri oluşturmaktadır. Antikorda (veya protein) bulunan birincil amin grubu NHS esteri ile temas ettiğinde, AuNP ve antikor arasında kovalent bir bağ meydana gelmektedir (Şekil 3.3).

Elde ettiğimiz sonuçlar literatürler ile benzer olup, AuNP yüzeyine antikorlar başarılı bir şekilde bağlanmıştır.

Bu çalışmada biyolojik tanıma elemanı olarak HER-2 ve CA15-3 antikorları kullanılmıştır. Oksidasyon işlemi ile aktive edilen antikorlar, cam yüzey üzerine immobilize edilmiş ve tasarlanan kolorimetrik biyosensör validasyon için hazır hale getirilmiştir. Validasyon için, antikorlar ile fonksiyonel hale getirilmiş cam kapillere sırasıyla antijen ve antikor ile konjuge edilmiş AuNP' ler eklenerek, 4 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5). Biyosensörün çalışma etkinliğini doğrulamak ve göstermek için, FTIR analizi ve ışık mikroskobu altında görüntüleme yapılmıştır.

FTIR analizi ile kolorimetrik biyosensörün yüzeyi üzerinde, antikor yapısındaki polisakkaritler ve amin gruplarıyla ilişkili olan N-H pikleri, amid I ve II bantları tespit edilmiştir (Şekil 4.32). Elde edilen bu sonuçlar, cam yüzey üzerindeki antikor-antijen-AuNP/antikor immobilizasyonu ve biyosensörün çalıştığını kanıtlamaktadır.

Elde edilen ışık mikroskopu görüntüleri ise, cam yüzey üzerinde gerçekleşen tabakalaşmayı görünür kılmaktadır (Şekil 4.33 ve 34).

Çalışmada biyosensörün HER-2(+) hücreleri üzerindeki etkinliği de araştırılmıştır. Elde edilen fotoğraf ve mikroskop görüntüleri, cam yüzey üzerinde bir renk değişimi ve tabakalaşma olduğunu göstermiştir. HER-2(+) hücreleri kullanılan

camlarda, HER-2 antijeni kullanılanlara kıyasla daha açık bir pembe renk görülmüş ve mikroskop görüntülerinde oldukça yoğun bir tabakalaşma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 35 ve 38).

Kolorimetrik biyosensörler hedef molekülün algılanması sırasında herhangi bir cihaza ihtiyaç duymadan, çıplak gözle görüntüleme gerçekleştiren biyosensörler olduğu için yapılan bu çalışmada, biyosensör üzerinde gerçekleşen immobilizasyonun gözle görülebilir değişim ortaya koyması amaçlanmıştır. Fotoğraflarda görülen cam kapiller üzerindeki pembeden-siyaha doğru değişen renk oluşumları, yüzey üzerinde gerçekleşen reaksiyonu görünür kılmıştır. Elde edilen fotoğraf görüntüleri bu amaca ulaştığımızı kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.36 ve 37).

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması ile meme kanser teşhisi cam kapiller tabanlı kolorimetrik bir biyosensör tasarlanmıştır. Sensör platformu olarak tercih edilen cam kapiller maliyet, boyut ve küçük hacimli reaktif gereksinimi açısından oldukça kullanışlı malzemeler olup, gelecekte yapılacak çalışmalar için avantajlı bir alternatif olacaktır.

Yapılan bu çalışmanın taşınabilirlik, uygun maliyet, hızlı uygulama, kolay sonuç verme gibi çeşitli avantajlara sahip, sağlık hizmetleri ve kaynakların sınırlı olduğu yerler ile hasta bakım noktasında kullanılabilen, yeni biyosensörlerin tasarımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] R. Salahandish, A. Ghaffarinejad, S.M. Naghib, K. Majidzadeh-A, H. Zargartalebi, A. Sanati-Nezhad, *Biosensors and Bioelectronics*, 117 (2018) 104–111.
- [2] A. Azzouz, L. Hejji, K.H. Kim, D. Kukkar, B. Souhail, N. Bhardwaj, R.J.C. Brown, W. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics*, 197 (2022) 113767.
- [3] M. Cejuela, B. Martin-Castillo, J.A. Menendez, S. Pernas, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022) 1–19.
- [4] A.B. Nassif, M.A. Talib, Q. Nasir, Y. Afadar, O. Elgendy, *Artificial Intelligence in Medicine*, 127 (2022) 102276.
- [5] N. Harbeck, F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K. Ruddy, J. Tsang, F. Cardoso, *Breast Cancer*, 2019.
- [6] Y. Zhang, M. Li, X. Gao, Y. Chen, T. Liu, *Journal of Hematology and Oncology*, 12 (2019) 1–13.
- [7] S. Mittal, H. Kaur, N. Gautam, A.K. Mantha, *Biosensors and Bioelectronics*, 88 (2017) 217–231.
- [8] H.J. Hathaway, K.S. Butler, N.L. Adolphi, D.M. Lovato, R. Belfon, D. Fegan, T.C. Monson, J.E. Trujillo, T.E. Tessier, H.C. Bryant, D.L. Huber, R.S. Larson, E.R. Flynn, *Breast Cancer Research*, 13 (2011) 1–13.
- [9] X. Huang, Y. Liu, B. Yung, Y. Xiong, X. Chen, *ACS Nano*, 11 (2017) 5238–5292.
- [10] R. Viswambari Devi, M. Doble, R.S. Verma, *Biosensors and Bioelectronics*, 68 (2015) 688–698.
- [11] G. Luka, A. Ahmadi, H. Najjaran, E. Alocilja, M. Derosa, K. Wolthers, A. Malki, H. Aziz, A. Althani, M. Hoorfar, *Sensors (Switzerland)*, 15 (2015) 30011–30031.
- [12] S. Nahavandi, S. Baratchi, R. Soffe, S.Y. Tang, S. Nahavandi, A. Mitchell, K. Khoshmanesh, *Lab on a Chip*, 14 (2014) 1496–1514.

- [13] G. Ghosh, *Sensors International*, 1 (2020) 100050.
- [14] B. Purohit, P.R. Vernekar, N.P. Shetti, P. Chandra, *Sensors International*, 1 (2020) 100040.
- [15] M. Sharifi, M.R. Avadi, F. Attar, F. Dashtestani, H. Ghorchian, S.M. Rezayat, A.A. Saboury, M. Falahati, *Biosensors and Bioelectronics*, 126 (2019) 773–784.
- [16] S. Song, Y. Qin, Y. He, Q. Huang, C. Fan, H.Y. Chen, *Chemical Society Reviews*, 39 (2010) 4234–4243.
- [17] R. Sardar, A.M. Funston, P. Mulvaney, R.W. Murray, *Langmuir*, 25 (2009) 13840–13851.
- [18] M.E. Germain, M.J. Knapp, *Chemical Society Reviews*, 38 (2009) 2543–2555.
- [19] B. Li, S. Dong, E. Wang, *Chemistry - An Asian Journal*, 5 (2010) 1262–1272.
- [20] S.N. Sawant, *From Biopolymer Composites*, Elsevier Inc., 2017.
- [21] F.W. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke, F. Lisdat, *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2001) 35–40.
- [22] D. Liu, J. Wang, L. Wu, Y. Huang, Y. Zhang, M. Zhu, Y. Wang, Z. Zhu, C. Yang, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 122 (2020) 115701.
- [23] P. Arora, A. Sindhu, N. Dilbaghi, A. Chaudhury, *Biosensors and Bioelectronics*, 28 (2011) 1–12.
- [24] J.A. Goode, J.V.H. Rushworth, P.A. Millner, *Langmuir*, 31 (2015) 6267–6276.
- [25] J.S. Wilson, *Sensor Technology Handbook*, Y.H. Lee and R. Mutharasan (Eds.), Elsevier, Amsterdam, Chapter 6, 2005.
- [26] U. Chadha, P. Bhardwaj, R. Agarwal, P. Rawat, R. Agarwal, I. Gupta, M. Panjwani, S. Singh, C. Ahuja, S.K. Selvaraj, M. Banavoth, P. Sonar, B. Badoni, A. Chakravorty, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 109 (2022) 21–51.
- [27] R. Raghav, S. Srivastava, *Biosensors and Bioelectronics*, 78 (2016) 396–

403.

- [28] N.S. Fracchiolla, S. Artuso, A. Cortelezzi, *Sensors (Switzerland)*, 13 (2013) 6423–6447.
- [29] S. Lepinay, A. Staff, A. Ianoul, J. Albert, *Biosensors and Bioelectronics*, 52 (2014) 337–344.
- [30] S. Hosseini, F. Ibrahim, I. Djordjevic, L.H. Koole, *Analyst*, 139 (2014) 2933–2943.
- [31] S.M. Borisov, O.S. Wolfbeis, *Chemical Reviews*, 108 (2008) 423–461.
- [32] M.M. Calabretta, L. Montali, A. Lopreside, F. Fragapane, F. Iacoangeli, A. Roda, V. Bocci, M. D’Elia, E. Michelini, *Analytical Chemistry*, 93 (2021) 7388–7393.
- [33] D. Dey, T. Goswami, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011 (2011).
- [34] N.O.T. Peer-reviewed, 31 (2018) 1–74.
- [35] T. Hu, S. Lu, C. Chen, J. Sun, X. Yang, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 243 (2017) 792–799.
- [36] Y. Tao, M. Li, B. Kim, D.T. Auguste, *Theranostics*, 7 (2017) 899–911.
- [37] Y. Yin, Y. Cao, Y. Xu, G. Li, *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2010) 5077–5094.
- [38] X.M. MA, M. SUN, Y. LIN, Y.J. LIU, F. LUO, L.H. GUO, B. QIU, Z.Y. LIN, G.N. CHEN, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46 (2018) 1–10.
- [39] A.I. Barbosa, N.M. Reis, *Analyst*, 142 (2017) 858–882.
- [40] R. Hong, H. Sun, D. Li, W. Yang, K. Fan, C. Liu, L. Dong, G. Wang, *Life*, 12 (2022).
- [41] P. Patel, *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 3 (2017).
- [42] G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa, P. V. Baptista, *Sensors*, 12 (2012) 1657–1687.
- [43] A. Atapour, H. Khajehzadeh, M. Shafie, M. Abbasi, S. Mosleh-Shirazi, S.R. Kasaei, A.M. Amani, *Materials Today Communications*, 30 (2022) 103181.

- [44] F. Arduini, S. Cinti, V. Scognamiglio, D. Moscone, *Nanomaterial-Based Sensors*, Elsevier Inc., **2019**.
- [45] M. Yüce, H. Kurt, *RSC Advances*, 7 (**2017**) 49386–49403.
- [46] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, Chapter 2, **2008**.
- [47] J. Bart, R. Tiggelaar, M. Yang, S. Schlautmann, H. Zuilhof, H. Gardeniers, *Lab on a Chip*, 9 (**2009**) 3481–3488.
- [48] T. Kamra, S. Chaudhary, C. Xu, L. Montelius, J. Schnadt, L. Ye, *Journal of Colloid and Interface Science*, 461 (**2016**) 1–8.
- [49] J.A. Phelps, S. Morisse, M. Hindié, M.C. Degat, E. Pauthe, P.R. Van Tassel, *Langmuir*, 27 (**2011**) 1123–1130.
- [50] S. Srivastava, P.R. Solanki, A. Kaushik, M.A. Ali, A. Srivastava, B.D. Malhotra, *Nanoscale*, 3 (**2011**) 2971–2977.
- [51] K. Omidfar, F. Khorsand, M. Darziani Azizi, *Biosensors and Bioelectronics*, 43 (**2013**) 336–347.
- [52] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, *Talanta*, 184 (**2018**) 537–556.
- [53] H. Bridle, *Nanotechnology for Detection of Waterborne Pathogens*, Elsevier, **2013**.
- [54] G. Maduraiveeran, W. Jin, *Functional Nanomaterial-Derived Electrochemical Sensor and Biosensor Platforms for Biomedical Applications*, Elsevier Inc., **2019**.
- [55] K.S. Siddiqi, A. Husen, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40 (**2017**) 10–23.
- [56] J. Wang, Y. Cao, Y. Xu, G. Li, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (**2009**) 532–536.
- [57] N. Zohora, D. Kumar, M. Yazdani, V.M. Rotello, R. Ramanathan, V. Bansal, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 532 (**2017**) 451–457.
- [58] J.H. Kang, Y. Asami, M. Murata, H. Kitazaki, N. Sadanaga, E. Tokunaga, S. Shiotani, S. Okada, Y. Maehara, T. Niidome, M. Hashizume, T. Mori, Y.

- Katayama, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1869–1874.
- [59] M. V. Bandulasena, G.T. Vladislavljević, B. Benyahia, *Journal of Colloid and Interface Science*, 542 (2019) 23–32.
- [60] J.M.C.C. Guzman, S.M. Hsu, H.S. Chuang, *Biosensors*, 10 (2020).
- [61] M. Qin, S. Hou, L.K. Wang, X.Z. Feng, R. Wang, Y.L. Yang, C. Wang, L. Yu, B. Shao, M.Q. Qiao, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60 (2007) 243–249.
- [62] C. Fan, G.P. Lopinski, *Surface Science*, 604 (2010) 996–1001.
- [63] J.A. Howarter, J.P. Youngblood, *Langmuir*, 22 (2006) 11142–11147.
- [64] S.K. Vashist, E. Lam, S. Hrapovic, K.B. Male, J.H.T. Luong, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 11083–11130.
- [65] M. Phaner-Goutorbe, V. Dugas, Y. Chevolut, E. Souteyrand, *Materials Science and Engineering*, C 31 (2011) 384–390.
- [66] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C.M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angewandte Chemie - International Edition*, 47 (2008) 9618–9647.
- [67] C.M. Halliwell, A.E.G. Cass, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 2476–2483.
- [68] P. Saengdee, C. Promptmas, S. Thanapitak, A. Srisuwan, A. Pankiew, N. Thornyanadacha, W. Chaisriratanakul, E. Chaowicharat, W. Jeamsaksiri, *Talanta*, 207 (2020) 120305.
- [69] E. Yilmaz, M. Soylak, *Functionalized Nanomaterials for Sample Preparation Methods*, Elsevier Inc., 2019.
- [70] S.M. Kanan, W.T.Y. Tze, C.P. Tripp, *Langmuir*, 18 (2002) 6623–6627.
- [71] A.R. Yadav, R. Sriram, J.A. Carter, B.L. Miller, *Materials Science and Engineering*, C 35 (2014) 283–290.
- [72] J. Xu, C. Wang, S. Zhou, R. Zhang, Y. Tian, *Ceramics International*, 45 (2019) 16670–16675.
- [73] A. Ebner, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, *Ultramicroscopy*, 107 (2007) 922–927.
- [74] N.K. Kamisetty, S.P. Pack, M. Nonogawa, K.C. Devarayapalli, T. Kodaki,

- K. Makino, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 1649–1655.
- [75] M. Mousavi, E. Fini, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8 (2020) 3231–3240.
- [76] M. Terracciano, I. Rea, J. Politi, L. De Stefano, *Journal of the European Optical Society*, 8 (2013) 1–6.
- [77] X. Sun, W. Wei, *Langmuir*, 26 (2010) 6133–6135.
- [78] J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss, *Progress in Polymer Science*, (Oxford) 32 (2007) 698–725.
- [79] M.E. Marques, A.A.P. Mansur, H.S. Mansur, *Applied Surface Science*, 275 (2013) 347–360.
- [80] J. Landoulsi, M. J., K. El, C. Richard, S. Pulvin, P. G., *Biomaterials - Physics and Chemistry*, (2011).
- [81] R. Xu, *Particuology*, 6 (2008) 112–115.
- [82] I.M. Mostafa, Y. Tian, S. Anjum, S. Hanif, M. Hosseini, *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 365 (2022) 131944.
- [83] N.M. Grogan Fleege, E.F. Cobain, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, (2022).
- [84] S. Chupradit, S.A. Jasim, D. Bokov, M.Z. Mahmoud, A.B. Roomi, K. Hachem, M. Rudiansyah, W. Suksatan, R. Bidares, *Analytical Methods*, 14 (2022) 1301–1310.
- [85] R.C.B. Marques, E. Costa-Rama, S. Viswanathan, H.P.A. Nouws, A. Costa-García, C. Delerue-Matos, M.B. González-García, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 255 (2018) 918–925.
- [86] V.S.P.K.S.A. Jayanthi, A.B. Das, U. Saxena, *Biosensors and Bioelectronics*, 91 (2017) 15–23.
- [87] A.M. Kabel, *Journal of Oncological Sciences*, 3 (2017) 5–11.
- [88] S.K. Metkar, K. Girigoswami, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17 (2019) 271–283.
- [89] M.A. Owens, B.C. Horten, M.M. Da Silva, *Clinical Breast Cancer*, 5 (2004)

63–69.

- [90] P. Chandra, *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, 05 (2013).
- [91] M. Hasanzadeh, S. Tagi, E. Solhi, A. Mokhtarzadeh, N. Shadjou, A. Eftekhari, S. Mahboob, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114 (2018) 1008–1017.
- [92] S. Chen, Q. Zhao, L. Zhang, L. Wang, Y. Zeng, H. Huang, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 221 (2015) 1391–1397.
- [93] H. Shi, L. Yuan, Y. Wu, S. Liu, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3788–3793.
- [94] C.K. Dixit, S.K. Vashist, B.D. MacCraith, R. O’Kennedy, *Nature Protocols*, 6 (2011) 439–445.
- [95] B. Kaur, S. Kumar, B.K. Kaushik, *Biosensors and Bioelectronics*, 197 (2022) 113805.
- [96] J.A. Mayer, T. Pham, K.L. Wong, J. Scoggin, E. V. Sales, T. Clarin, T.J. Pircher, S.D. Mikolajczyk, P.D. Cotter, F.Z. Bischoff, *Cancer Genetics*, 204 (2011) 589–595.
- [97] R. Ahirwar, P. Nahar, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408 (2016) 327–332.
- [98] L. Xiao, A. Zhu, Q. Xu, Y. Chen, J. Xu, J. Weng, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9 (2017) 6931–6940.
- [99] Z. Luo, Y. Wang, Y. Xu, X. Wang, Z. Huang, J. Chen, Y. Li, Y. Duan, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 284 (2019) 582–588.
- [100] M. Loyez, M. Lobry, E.M. Hassan, M.C. DeRosa, C. Caucheteur, R. Wattiez, *Talanta*, 221 (2021).
- [101] H. Mollasalehi, E. Shajari, *Bioorganic Chemistry*, 107 (2021) 104605.
- [102] M.A. Ali, K. Mondal, Y. Jiao, S. Oren, Z. Xu, A. Sharma, L. Dong, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8 (2016) 20570–20582.
- [103] J.T. Gohring, P.S. Dale, X. Fan, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 146 (2010) 226–230.

- [104] Y.W. Hartati, L.K. Letelay, S. Gaffar, S. Wyantuti, H.H. Bahti, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 27 (2020) 100316.
- [105] Y. Wu, X. Chen, X. Wang, M. Yang, F. Xu, C. Hou, D. Huo, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 329 (2021) 129249.
- [106] H. Nasrollahpour, I. Isildak, M.R. Rashidi, E.A. Hashemi, A. Naseri, B. Khalilzadeh, *Cancer Nanotechnology*, 12 (2021) 1–16.
- [107] J.J. Gutiérrez Moreno, K. Pan, Y. Wang, W. Li, *Langmuir*, 36 (2020) 5680–5689.
- [108] W.M. Munief, F. Heib, F. Hempel, X. Lu, M. Schwartz, V. Pachauri, R. Hempelmann, M. Schmitt, S. Ingebrandt, *Langmuir*, 34 (2018) 10217–10229.
- [109] G. Dharanivasan, T. Rajamuthuramalingam, D. Michael Immanuel Jesse, N. Rajendiran, K. Kathiravan, *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 5 (2015) 39–50.
- [110] M.H. Jazayeri, H. Amani, A.A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, B. Sedighimoghaddam, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9 (2016) 17–22.
- [111] T.H.L. Nghiem, T.H. La, X.H. Vu, V.H. Chu, T.H. Nguyen, Q.H. Le, E. Fort, Q.H. Do, H.N. Tran, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 1 (2010).
- [112] H. Aldewachi, N. Woodroffe, P. Gardiner, *Applied Sciences (Switzerland)*, 8 (2018).

EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. Çelebier, İ., Malekghasemi S., Keskin N., Denkbaşı E. B., "Characterization Of Gold Nanoparticles Synthesized By Different Methods" 15th Nanoscience and Nanotechnology Conference. Antalya, Türkiye. 2019 (Poster Sunumu)