

**KARDİYAK MİYOZİN BAĞLAYICI PROTEİN-C TAYİNİ  
İÇİN OPTİK TEMELLİ SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF OPTICAL-BASED SENSORS FOR  
THE DETERMINATION OF CARDIAC MYOSIN  
BINDING PROTEIN-C**

**MERT KORKMAZ**

**DOÇ. DR DUYGU ÇİMEN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Sevgili eşim Gözde'ye ve canım oğlum Mete'ye ithafen...

# ÖZET

## KARDİYAK MİYOZİN BAĞLAYICI PROTEİN-C TAYİNİ İÇİN OPTİK TEMELLİ SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

**Mert KORKMAZ**

**Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Duygu Çimen**

**Haziran 2024, 72 sayfa**

Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C (cMyBP-C), kalp kasının kasılmasında kritik bir rol oynar ve bu proteinin işlev bozuklukları ciddi kardiyovasküler hastalıklara yol açabilir. Bu tez, mevcut tanı yöntemlerinin sınırlamalarını ve kardiyak miyozine bağlı bozukluklarının teşhisinde karşılaşılan zorlukları ele alarak, optik temelli sensörlerin bu alandaki potansiyelini araştırmaktadır. Tez çalışmasının temel amacı, kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C proteinin tanımlanması ve analizi için yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerin geliştirilmesi ve optimizasyonudur. Bu bağlamda, mikrotemas baskılama yöntemi kullanılarak belirli moleküler hedefleri tanıyan ve bağlayabilen polimer matrisler oluşturulmaktadır. Mikrotemas baskılama yöntemiyle sensörlerin hassasiyet ve seçiciliğini artırmak için kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler, sensör yüzeyinde hedef molekülün yapısının baskılandığı bir polimerik kalıp oluşturularak, sensöre hedef molekül tanımlaması yapılır. Bu yaklaşım, hedef molekülün sensöre bağlanma olasılığını artırır ve böylece sensörün performansını iyileştirir. Mikrotemas baskılama yöntemi, tıbbi tanı, gıda güvenliği ve çevresel izleme gibi alanlarda yaygın olarak kullanılarak daha güvenilir biyolojik tespit sistemleri geliştirmeye olanak sağlar.

Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C tayini için hazırlanan cMyBP-C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) (poli(HEMA-MATrp)) polimerik film temelli SPR sensörler ile kinetik analizler, seçicilik ve yapay plazma gibi farklı kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. cMyBP-C proteini mikrotemas baskılanmış yöntemi kullanarak hazırlanmış SPR sensörlerin, cMyBP-C baskılanmamış SPR sensörlere göre daha fazla duyarlılık göstermiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin cMyBP-C'e tespit duyarlılığı, pH 7.4 fosfat tamponunda ve yapay plazma çözeltilerinde hazırlanan farklı derişimlerde cMyBP-C çözeltileri hazırlanarak adsorpsiyon kinetiklerinin belirlenmiştir. cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerde kinetik analiz verileri kullanılarak en düşük tayin limiti (LOD) 0.019 ng/mL ve en düşük miktar limiti (LOQ) 0.064 ng/mL olarak hesaplanmıştır. cMyBP-C proteini baskılanmış sensörlerin seçiciliğini göstermek için kardiyak troponin T(cTnT) ve kreatin kinaz-MB(CK-MB) yarışmacı ajanları kullanılmıştır. Seçicilik deneyleri sonucunda, cMyBP-C proteini baskılanmış SPR sensörlerin yüksek seçicilik ve duyarlılıkta olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, cMyBP-C tespiti alanında yeni ve etkili sensörlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C, yüzey plazmon rezonans (SPR), sensör, moleküler baskılama, mikrotemas baskılama, kardiyovasküler hastalıklar.

# **ABSTRACT**

## **PREPARATION OF OPTICAL-BASED SENSORS FOR THE DETERMINATION OF CARDIAC MYOSIN BINDING PROTEIN-C**

**Mert Korkmaz**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Doç. Dr. Duygu Cimen**

**June 2024, 72 pages**

Cardiac myosin binding protein-C (cMyBP-C) plays a critical role in the contraction of cardiac muscle, and dysfunctions in this protein can lead to severe cardiovascular diseases. This thesis addresses the limitations of current diagnostic methods and the challenges encountered in diagnosing disorders related to cardiac myosin. It explores the potential of optical-based sensors in this field. The primary objective of the thesis is to develop and optimize surface plasmon resonance (SPR) sensors for the identification and analysis of cardiac myosin binding protein-C. In this context, molecularly imprinted polymer matrices are created using microcontact printing methods to recognize and bind specific molecular targets. The methods used to enhance the sensitivity and selectivity of the sensors through microcontact printing are discussed. These methods involve creating a polymeric mold that imprints the structure of the target molecule onto the sensor surface, thus facilitating the identification of the target molecule. This approach increases the likelihood of the target molecule binding to the sensor, thereby improving the sensor's performance. Microcontact printing methods enable the development of more reliable

biological detection systems, which have broad applications in medical diagnostics, food safety, and environmental monitoring.

For the determination of cardiac myosin binding protein-C, kinetic analyses, selectivity studies, and various kinetic experiments in artificial plasma were conducted using cMyBP-C imprinted (MIP) and non-imprinted (NIP) poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-L-tryptophan) (poly(HEMA-MATrp)) polymeric film-based SPR sensors. The SPR sensors prepared using the microcontact printing method for the cMyBP-C protein exhibited greater sensitivity compared to the non-imprinted SPR sensors. The sensitivity of both imprinted and non-imprinted sensors for detecting cMyBP-C was determined by preparing cMyBP-C solutions at different concentrations in pH 7.4 phosphate buffer and artificial plasma solutions, and adsorption kinetics were analyzed. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for cMyBP-C imprinted SPR sensors were calculated to be 0.019 ng/mL and 0.064 ng/mL, respectively, based on the kinetic analysis data. To demonstrate the selectivity of the cMyBP-C imprinted sensors, competitive agents such as cardiac troponin T (cTnT) and creatine kinase-MB (CK-MB) were used. The results of the selectivity experiments showed that the cMyBP-C imprinted SPR sensors exhibited high selectivity and sensitivity. The findings of this study contribute to the development of new and effective sensors for the detection of cMyBP-C.

**Keywords:** Cardiac Myosin Binding Protein-C, surface plasmon resonance (SPR), sensor, molecular imprinting, microcontact imprinting, cardiovascular diseases.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yapma fırsatı sunan, engin bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Tez çalışmalarım süresince güler yüzüyle enerji veren, her türlü sorunuma zaman ayıran, ilgisi ve samimiyetinin yanında bilimsel katkı ve desteğini hep hissettiğim, sevgili hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Duygu Çimen'e,

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgi birikimini ve düşüncelerini benimle paylaşan, tüm sorunlarımda yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Nilay Bereli'ye,

Bu tezin ortaya çıkmasında ve diğer tüm başarılarımda en az benim kadar emeği olan, onun sayesinde girdiğim tüm zorlukları aştığım sevgili eşim Gözde Akbalık Korkmaz'a,

Bana dünyanın en şanslı babası olduğumu hissettiren canım oğlum Mete Korkmaz'a,

Her zaman bana inanan, destekleyen ve bugüne ulaşmam için elinden gelenin fazlasını yapan, her şeyi borçlu olduğum babam Ahmet Korkmaz'a ve annem Rahime Korkmaz'a,

Dünyanın en iyi iki ablası olan Nursel Korkmaz Sivaslıoğlu ve Aynur Korkmaz Uzunca'ya,

Her daim yanımda olduğunu hissettiren enişterim Serkan Uzunca ve Hakan Sivaslıoğlu'na,

İlk günden itibaren bana inanan ve her şekilde beni destekleyen ikinci ailem Recep Akbalık, Nurcan Akbalık, Anıl Akbalık ve Seda Aydın Akbalık'a,

Birbirinden tatlı yeğenlerim Elif Sivaslıoğlu, Sinem Uzunca, Mehmet Efe Sivaslıoğlu, Neris Uzunca, Enes Uzunca, Melih Sivaslıoğlu ve Nil Hüma Akbalık'a

Ailemden ayırt etmediğim arkadaşlarım Bekir Can Uğur, Sadrettin Burak Üngör, Ömer Gökhan Çınar ve Ozan Çobanoğlu'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mert Korkmaz

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Miyozin.....	4
2.1.1.Miyozin ve Özellikleri .....	4
2.1.2.Miyozin Sınıfları.....	7
2.1.3. Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein C (cMyBP-C) ve Yapısı .....	11
2.2.Moleküler Baskılama Yöntemi .....	14
2.2.1.Kovalent Baskılama .....	17
2.2.2.Kovalent Olmayan Baskılama .....	17
2.2.3.Mikrotemas Baskılama .....	18
2.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR).....	22
2.3.1.Uygulama Alanları.....	25
2.3.2. Kardiyovasküler Hastalıkların Tanısı .....	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. Kimyasal Malzemeler .....	28
3.2. SPR Sensör Çiplerin Yüzey Modifikasyonu .....	28
3.3. Cam Slaytların Temizlenmesi, Yüzey Modifikasyonu ve Protein Kalıbının Hazırlanması .....	28
3.4. Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein-C Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış (NIP) poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) Poli(HEMA- MATrp) SPR Sensörlerin Hazırlanması .....	30



3.5. Karakterizasyon Çalışmaları.....	32
3.5.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi .....	32
3.5.2. Temas Açısı Ölçümleri .....	33
3.5. Kinetik Analizi.....	34
3.5.1. İzoterm ve Bağlanma Kinetikleri .....	35
3.5.2. Yarışmacı Proteinler ile Seçicilik Çalışmaları.....	40
3.5.3. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları.....	42
3.5.4. Yapay Plazma Çözeltisi ile Kinetik Analizler .....	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	44
4.1. SPR Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu .....	44
4.1.1. Temas Açısı Ölçümleri .....	44
4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi.....	45
4.2. Kinetik Analizler.....	46
4.2.1. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri .....	51
4.2.2. Denge izoterm modelleri .....	53
4.2.3. Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein C (cMyBP-C) Tespitine Yönelik Literatürdeki Çalışmalar .....	55
4.2.4. SPR Sensörlerin Seçiciliklerinin İncelenmesi .....	57
4.2.5. Yapay plazma örneklerden kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C tayini ....	60
4.2.6. Tekrar Kullanabilirliğin İncelenmesi.....	63
5. YORUM.....	66
6. KAYNAKLAR .....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1-Miyozin II yapısının bir bölümü. Ağır zincirdeki atomlar pembe renkle, hafif zincirlerdeki atomlar soluk-turuncu ve soluk-sarı renklerle boyanmıştır. ....	4
Şekil 2.2-Miyozin Yapısı .....	6
Şekil 2.3-Miyozin içeren kardiyak sarkomer yapısı .....	8
Şekil 2.4-Yapı: (A) Sağlıklı Kardiyositlerde ve (B) Kardiyosit Hasarı Sırasında cMyBP-C ve Kardiyak Troponinler .....	12
Şekil 2.5 -Moleküler Baskılama Yönteminin Şematik Gösterim .....	15
Şekil 2.6-Mikrotemas baskılama yönteminin şematik gösterimi .....	19
Şekil 2.7-SPR Sensörün Şeması Gösterimi .....	22
Şekil 2.8 – GenOptics SPRiLab sistemi .....	23
Şekil 2.9-Sensör sisteminin temel bileşenleri .....	24
Şekil 3.1-Cam Slaytların Hazırlanması .....	29
Şekil 3.2- cMyBP-C baskılanmış SPR çip yüzey hazırlanmasının şematik gösterimi .....	31
Şekil 3.3 - SPR Sensör Analiz Cihazı .....	35
Şekil 4.1- KRUSS DSA100 cihazı .....	44
Şekil 4.2-SPR sensör yüzeylerinin temas açılarının fotoğrafı; Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), cMyBP-C baskılanmış (MIP) (B) ve Baskılanmamış NIP (C) SPR sensör yüzeyleri .....	45
Şekil 4.3- SPR sensör yüzeylerin yarı temas modunda alınan AFM görüntüleri; A) Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, B) MIP sensör yüzeyi, C) NIP sensör yüzeyi .....	46
Şekil 4.4- cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün 0.05-300.0 ng/mL (A) ve 0.05-1.0 ng/mL (B) arasındaki farklı derişimlerde hazırlanan cMyBP-C çözeltileri ile yapılan kinetik analizlerde ait SPR sensorgramları .....	48
Şekil 4.5 - 0.05-300 ng/mL aralığında hazırlanan cMyBP-C derişimleri ile % $\Delta R$ arasındaki ilişki .....	50
Şekil 4.6- Bağlanma kinetik yaklaşımı (A) ve Denge analiz yaklaşımı (B) .....	52
Şekil 4.7 - (A) Langmuir; B) Freundlich; (C) Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri ...	54
Şekil 4.8- cMyBP-C baskılanmış (MIP) (A) ve baskılanmamış (NIP) (B) SPR sensörlere ait seçicilik kinetik analizleri için SPR sensorgramları.....	58
Şekil 4.9- cMyBP-C baskılanmış SPR sensör ile farklı derişimlerde cMyBP-C ile yapay plazma örneklerinde cMyBP-C tayinine ait kinetik analiz sensorgramları .....	61
Şekil 4.10- cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirlik sensorgramı (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).....	63
Şekil 4.11- cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirlik sensorgramı .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1-Farklı Sensörlerin Avantajları ve Dezavantajları.....	26
Çizelge 3.1 - Seçicilik çalışmalarında kullanılan yarışmacı proteinler ve özellikler .....	41
Çizelge 4.1- Kinetik hız sabitleri .....	52
Çizelge 4.2- Adsorpsiyon izoterm modellerin parametreleri .....	54
Çizelge 4.3 - cMyBP-C Tespitine Yönelik Literatürdeki Çalışmalar .....	56
Çizelge 4.4 - Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	60
Çizelge 4.5 - cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerin yapay plazma örneklerindeki bulunan cMyBP-C analiz sonuçları (n:3).....	62

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

C : Analit derişimi

$k_a$  : Bağlanma hız sabiti

$k_d$  : Ayrılma hız sabiti

$K_A$  : Bağlanma sabiti

$K_D$  : Ayrılmaz sabiti

### Kısaltmalar

cMyBP-C      Kardiyak Miyozin-Bağlayıcı Protein C

MATrp      N-metakriloil-(L)-triptofan

ng/mL      Nanogram başına Mililitre

cTnT      Kardiyak Troponin T

CK-MB      Kreatin Kinaz-MB

MI      Miyokard Enfarktüsü

AMI      Akut Miyokard Enfarktüsü

SPR      Yüzey Plazmon Rezonans

MIP      Moleküler Baskılanmış Polimer

ELISA      Enzime Bağlı İmmünosorban Yöntem

LOD      En düşük tayin limiti

LOQ      En düşük miktar tayin limiti

# 1. GİRİŞ

Bu çalışma, kardiyak miyozin bozukluklarının tanısında karşılaşılan zorlukları ve mevcut tanı yöntemlerinin sınırlamalarını ele alarak, optik temelli sensörlerin bu alandaki potansiyelini keşfetmektedir. Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C (cMyBP-C), kalp kasının kasılmasında kritik bir rol oynar ve bu proteinin işlev bozuklukları, ciddi kardiyovasküler hastalıklara yol açabilir. Bu tez çalışmasının temel amacı, kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C proteinlerinin tayini için yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerin geliştirilmesi ve optimizasyonudur. Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C, kalp kasının kontraktıl fonksiyonlarında kritik bir rol oynayan bir motilite proteindir ve bu proteinin işlevsel bozuklukları çeşitli kardiyomiyopatilere ve diğer kalp hastalıklarına neden olabilir. Bu bağlamda, SPR teknolojisi kullanılarak kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C'in yapısal ve işlevsel parametrelerinin detaylı bir şekilde incelenmesi amaçlanmaktadır.

Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C, kalp kasının kasılmasını sağlayan temel motor proteinlerden biridir ve kalp fonksiyonlarının düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Kardiyak miyozinin genetik mutasyonları veya post-translasyonel modifikasyonları, hipertrofik kardiyomiyopati (HCM) gibi ciddi kardiyak hastalıklara yol açabilir. Bu nedenle, kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C yapısal ve fonksiyonel özelliklerini hassas bir şekilde belirlemek, erken teşhis ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için kritik önem taşır.

Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör, moleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı ve etiketleme gerektirmeyen analizini sağlayan güçlü bir araçtır. Bu teknoloji, özellikle protein-protein, protein-ligand gibi etkileşimlerinin kinetiklerini ve termodinamiklerini analiz etmek için kullanılmaktadır [1]. SPR, biyolojik bilimlerde, biyoteknolojide ve farmasötik alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir ve bu sensörler, hastalık biomarkerlarının tespiti, ilaç geliştirme ve biyomoleküler araştırmalar için vazgeçilmez hale gelmiştir [2].

SPR sensörlerinde mikrotemas baskılama yöntemi, özellikle kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C gibi belirli hedef proteinlerin sensör yüzeyine yerleştirilmesi için kullanılır. Sensör yüzeyi polimerik filmle kaplanır ve bu filmde hedef molekülün yapısının baskılandığı polimer kalıplar oluşturulur. Bu düzenleme, sensör yüzeyinin moleküler yapısı baskılanmış moleküllerle etkileşim kapasitesini, seçiciliğini ve SPR ile yapılan ölçümlerin hassasiyetini önemli ölçüde artırır.

Mikrotemas baskılama yöntemi, belirli bir molekülün yapısal özelliklerinin bir polimerik matris içinde yüzeyde oluşturulması ve düzenlenmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik genellikle sensörlerde ve nanoteknoloji uygulamalarında moleküler düzeyde kontrol ve düzenleme gerektiren alanlarda kullanılır [3]. Mikrotemas baskılama, özellikle bir yüzeyde belirli bir molekülün tanımlanması ve analizi için seçicilik ve hassasiyetin artırılması amacıyla kullanılır.

Bu yöntemde, sensör yüzeyine hedef molekülün yapısına uygun bir kalıp oluşturulur. Bu kalıp, genellikle bir polimerik matristen oluşur ve hedef molekülün spesifik yapısal özelliklerini taklit eder. Sonrasında, bu kalıp üzerine hedef molekülün bağlanması veya algılanması için uygun bir yöntem kullanılır. Bu şekilde, sensör yüzeyinde hedef molekülün tanımlanması ve analizi için özgüllük ve duyarlılık artırılır.

Bu çalışmada, kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C (cMyBP-C) tespiti için mikrotemas baskılama yöntemi kullanılarak baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) (poli(HEMA-MATrp)) polimerik film temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) hazırlanmıştır. Bu sensörler ile farklı derişimlerde hazırlana cMyBP-C çözeltileri ile kinetik analizler gerçekleştirilmiş ve cMyBP-C'nin tespit duyarlılığı belirlenmiştir. MIP sensöründe en düşük tayin limiti (LOD) ve en düşük miktar limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, mikrotemas baskılama yöntemi kullanılarak hazırlanan MIP sensörün, NIP sensöre göre daha yüksek duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Seçicilik çalışmaları için, MIP sensörünün cMyBP-C'yi diğer kardiyak belirteçler olan kardiyak troponin T (cTnT) ve kreatin kinaz-MB (CK-MB) ile karşılaştırmak için yarışmacı ajanlar kullanılmıştır. Bu deneyler sonucunda, MIP sensörünün yüksek seçicilik ve duyarlılık gösterdiği gösterilmiştir. MIP sensör üzerinde tekrarlanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar tutarlılık göstermiştir.

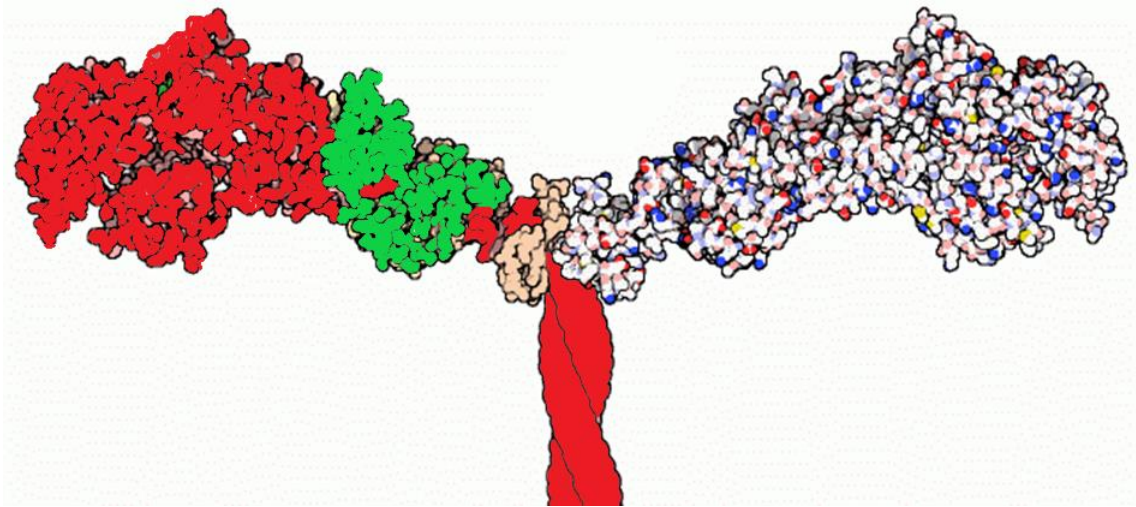
SPR sensörün performansını değerlendirmek için, yapay plazma çözeltisi kullanılarak elde edilen sonuçlar ile karşılaştırma yapılmıştır. Yapay plazma çözeltisi, gerçek biyolojik örneklerin analizine benzer fizyolojik koşulları taklit eden bir ortamdır. Bu karşılaştırma sonucunda, MIP sensörünün yapay plazma çözeltisi içinde de yüksek duyarlılık gösterdiği ve gerçek örneklerde elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi de yapılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırmalı bir değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Bu karşılaştırma, SPR sensör platformunun ELISA gibi standart yöntemlere göre performansını objektif bir şekilde değerlendirmek için yapılmıştır. Karşılaştırmalı analizler, MIP sensörlerinin yapay plazma çözeltisi ile hazırlanan örneklerde ELISA sonuçlarına göre cMyBP-C seviyelerini doğru ve güvenilir bir şekilde tespit edebildiğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları, cMyBP-C tespitinde yeni ve etkili sensörlerin geliştirilmesine katkı sağlamakta ve biyomedikal araştırmalarda ve tıbbi tanı uygulamalarında kullanılabilirliğini artırmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Miyozin

#### 2.1.1. Miyozin ve Özellikleri

Miyozin, birçok sınıfa gruplanmış üyeleri olan geniş ve çeşitli bir protein ailesidir. Miyozinler, aktinle etkileşen moleküler motorların bir ailesidir ve biyokimyasal olarak aktin-aktif  $Mg^{2+}$ -ATPazlar olarak tanımlanırlar. Bu fonksiyonellik, yaklaşık 80 kDa büyüklüğünde olan ve neredeyse tamamen N uçlarında bulunan motor domaininde yer alır; bu domain, tüm miyozinler arasında yüksek derecede korunmuştur. Motor domaini, kısa bir düzenleyici domain takip eder: şimdiye kadar incelenen tüm miyozinlerde, bu domain bir veya daha fazla kalsiyum bağlayıcı protein ailesi olan kalsimodulin üyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu proteinler, miyozin üzerinde 'IQ-motif' olarak adlandırılan bir bölgeye bağlanır; bu motifin konsensüs sıralaması Ile-Gln-x-x-x-Arg-Gly-x-x-x-Arg şeklindedir.



Şekil 2.1-Miyozin II yapısının bir bölümü. Ağır zincirdeki atomlar pembe renkle, hafif zincirlerdeki atomlar soluk-turuncu ve soluk-sarı renklerle boyanmıştır.

Miyozinler, ATP'ye bağlı, aktin temelli motor proteinlerin bir süper ailesidir. Kas kasılmasının yanı sıra, miyozinler hücrelerde intrasellüler kargo taşınması dahil olmak üzere bir dizi hareket işlevinde rol alır. Tipik olarak, miyozin molekülleri, bir kuyruk, menteşe ve baş bölgesine sahip ağır zincir ile miyozin başının yakınında bulunan ve



miyozin tarafından kuvvetin kalsiyuma bağlı iletimini modüle eden hafif zincirlerden oluşur. Miyozin başı, hem aktin bağlama hem de ATP bağlama ve ATPaz aktivitesine sahiptir. Dinlenme durumunda, miyozin aktine bağlıdır. ATP, miyozin başına bağlandığında, baş aktin filamentinden ayrılır. Bağlı ATP'nin ADP'ye hidrolizi ve fosfatın salınımı miyozinin rijor durumunu (miyozin-aktin etkileşimini yeniden kurar) oluşturur ve bu süreçte aktin filament boyunca yürüyerek kuvvet üretir. Miyozin başına yeni bir ATP molekülünün bağlanması, miyozini aktinden serbest bırakarak döngüyü tekrarlamasını sağlar. Miyozinin yapısı ve işlevi küresel olarak korunmuştur [4].

İlk keşfedilen miyozin (M2), 1864 yılında Wilhelm Kühne tarafından keşfedilmiştir. Kühne, iskelet kasından viskoz bir protein çıkarmış ve bu proteini kasın gerilim durumunu korumaktan sorumlu tutmuştur. Bu proteine miyozin adını vermiştir. Terim, çizgili kas dokusu ve düz kas dokusu hücrelerinde bulunan benzer ATPazlar grubunu içerecek şekilde genişletilmiştir. 1973 yılında, *Acanthamoeba castellanii*'de miyozin benzeri işlev gören enzimlerin keşfi ile birlikte, ökaryotların alanı boyunca çeşitli miyozin genleri keşfedilmiştir [5].

Başlangıçta miyozinin sadece kas hücreleri ile sınırlı olduğu düşünülse de (bu yüzden myo-(s) + -in), tek bir "miyozin" yoktur; bunun yerine, çok büyük bir gen süper ailesi, aktin bağlama, ATP hidrolizi (ATPaz enzim aktivitesi) ve kuvvet aktarımı gibi temel özellikleri paylaşan protein ürünlerini içerir. Neredeyse tüm ökaryotik hücreler miyozin izoformlarını içerir. Bazı izoformlar belirli hücre tiplerinde (örneğin kas) özelleşmiş işlevlere sahipken, diğer izoformlar yaygındır. Miyozin yapısı ve işlevi türler arasında küresel olarak korunmuştur, öyle ki bir tavşan kas miyozin II, bir amipin aktinine bağlanacaktır [6].

Çoğu miyozin molekülü, bir baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur. Baş bölge, filamentöz aktini bağlar ve ATP hidrolizini kullanarak kuvvet üretir ve tüylü (+) uca doğru filament boyunca "yürür" (miyozin VI'nın aksine, bu tür miyozinler sivri (-) uca doğru hareket eder). Boyun bölgesi, katalitik motor bölgesi tarafından üretilen kuvveti iletmek için bir bağlantı ve bir kaldıraç kolu olarak işlev görür. Boyun bölgesi ayrıca, genellikle düzenleyici işlevlere sahip olan ve makromoleküler bir kompleksin parçası

olan farklı proteinler olan miyozin hafif zincirleri için bir bağlanma yeri olarak da hizmet verebilir. Kuyruk bölgesi genellikle kargo molekülleri ve/veya diğer miyozin alt birimleri ile etkileşimi araçlarıdır. Bazı durumlarda, kuyruk bölgesi motor aktivitesini düzenlemede rol oynayabilir.



Şekil 2.2-Miyozin Yapısı

Çoklu miyozin II molekülleri, ATP hidrolizinden elde edilen enerji ile güçlendirilmiş bir güç vuruş mekanizması yoluyla iskelet kasında kuvvet üretir. Güç vuruşu, ATP hidrolizinden sonra miyozin molekülünden fosfatın salınımı sırasında gerçekleşirken miyozin aktine sıkıca bağlıdır. Bu salımın etkisi, molekülde aktine karşı çeken bir konformasyonel değişikliktir. ADP molekülünün salınımı, miyozin için sözde rijor durumuna yol açar. Yeni bir ATP molekülünün bağlanması, miyozini aktinden serbest bırakacaktır. Miyozin içindeki ATP hidrolizi, döngüyü tekrarlamak için onun tekrar aktine bağlanmasına neden olacaktır. Sayısız güç vuruşunun birleşik etkisi, kasın kasılmasına neden olur. Ökaryotik filumlarda bulunan miyozin genlerinin geniş çeşitliliği, keşfedildikleri farklı şemalara göre adlandırılmıştır. Bu nedenle, organizmalar arasında ve içinde miyozin proteinlerinin işlevlerini karşılaştırmaya çalışırken nomenklatür biraz kafa karıştırıcı olabilir.

Kas liflerindeki bolluğu nedeniyle miyozin süper ailesinin en belirgin üyesi olan iskelet kası miyozini ilk keşfedilenidir. Bu protein, sarkomerin bir parçasını oluşturur ve çok sayıda miyozin alt biriminden oluşan makromoleküler filamanlar şeklinde yer alır. Benzer filament oluşturan miyozin proteinleri, kardiyak kas, düz kas ve kas dışı hücrelerde bulunmuştur. Ancak 1970'lerde, araştırmacılar basit ökaryotlarda tek başına işlev gören proteinler kodlayan yeni miyozin genlerini keşfetmeye başladılar ve bu

proteinler Sınıf I miyozinler olarak adlandırıldı. Bu yeni miyozinler kolektif olarak "geleneksel olmayan miyozinler" olarak adlandırıldı ve kas dışındaki birçok dokuda bulundu. Bu yeni süper aile üyeleri, baş bölgelerinin amino asit dizilerinin karşılaştırılmasından türetilen filogenetik ilişkilere göre gruplandırılmıştır ve her sınıfa bir Roma rakamı atanmıştır. Geleneksel olmayan miyozinler ayrıca, benzersiz işlevler öneren farklı kuyruk bölgelerine sahiptir.

Farklı miyozinlerin amino asit dizilerinin analizi, kuyruk bölgeleri arasında büyük değişkenlik gösterirken, baş bölgesi dizilerinin güçlü bir korunumu olduğunu göstermektedir. Muhtemelen bu, miyozinlerin kuyrukları aracılığıyla birçok farklı kargo ile etkileşime girebilmesi içindir, ancak her durumda hedef aktin filamentleri boyunca hareket etmek – aynı kalmaktadır ve bu nedenle motorun aynı makineyi gerektirmektedir. Örneğin, insan genomu 40'tan fazla farklı miyozin geni içermektedir. Bu şekil farklılıkları ayrıca miyozinlerin aktin filamentleri boyunca hareket hızını da belirler. ATP'nin hidrolizi ve ardından fosfat grubunun serbest bırakılması, ağır zincirin "kaldıraç kolu" veya "boyun" bölgesinin ileri çekildiği "güç vuruşunu" meydana getirir. Güç vuruşu her zaman kaldıraç kolunu aynı açıyla hareket ettirdiğinden, kaldıraç kolunun uzunluğu, kargonun aktin filamentine göre yer değiştirmesini belirler. Daha uzun bir kaldıraç kolu, kaldıraç kolunun aynı açısal yer değiştirmesine rağmen kargonun daha büyük bir mesafe kat etmesine neden olur – tıpkı daha uzun bacaklara sahip bir kişinin her adımda daha fazla mesafe kat edebilmesi gibi. Bir miyozin motorunun hızı, tam bir kinetik döngü boyunca ATP'nin bağlanmasıyla ADP'nin serbest bırakılmasına kadar geçen süreye bağlıdır.

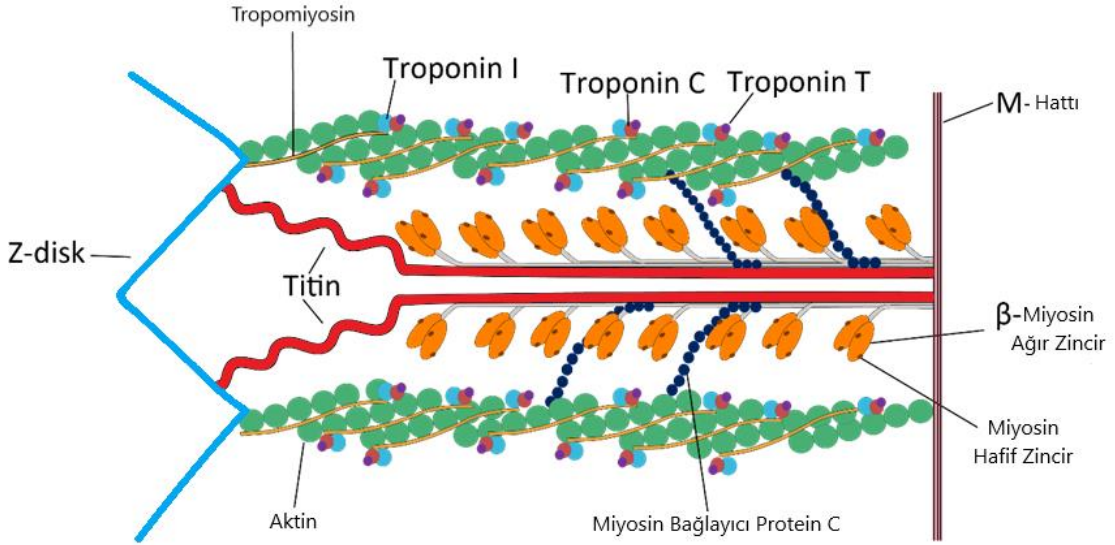
### **2.1.2.Miyozin Sınıfları**

#### **Miyozin I**

Miyozin I, yaygın bir hücre protein olarak, monomer olarak işlev görür ve vezikül taşınmasında görev alır. Adım boyutu 10 nm'dir ve iç kulaktaki stereosillerin uyum yanıtından sorumlu olduğu öne sürülmüştür [7].

## Miyozin II

Miyozin II (aynı zamanda geleneksel miyozin olarak da bilinir), çoğu hayvan hücre tipinde kas hücrelerinde kas kasılmasını üreten miyozin türüdür. Ayrıca, stres lifleri adı verilen kasılmaya yönelik demetlerde kas-dışı hücrelerde de bulunur [8]. Miyozin II, baş ve kuyruk bölgelerini oluşturan, her biri yaklaşık 2000 amino asit uzunluğunda iki ağır zincir içerir. Bu ağır zincirlerin her biri N-terminal baş bölgesini içerirken, C-terminal kuyrukları birbirine sarılmış iki yılanı andıran (kadüseus gibi) bir sarmal-sarmal morfolojiye sahiptir. Böylece, miyozin II'nin iki başı vardır. Ara boyun bölgesi, baş ile kuyruk arasındaki açığı oluşturan bölgedir [9]. Düz kaslarda, tek bir gen (MYH11) miyozin II'nin ağır zincirlerini kodlar, ancak bu genin dört farklı izoformu sonuçlanan dizi varyantları vardır. Ayrıca, baş başına ikişer olmak üzere 4 miyozin hafif zinciri (MLC) içerir; bunlar 20 (MLC20) ve 17 (MLC17) kDa ağırlığındadır. Bunlar, baş ve kuyruk arasındaki "boyun" bölgesinde ağır zincirlere bağlanır.



Şekil 2.3-Miyozin içeren kardiyak sarkomer yapısı

## Miyozin III

Miyozin III, miyozin ailesinin yeterince anlaşılmamış bir üyesidir. *Drosophila*'nın gözlerinde *in vivo* olarak incelenmiştir ve fototransdüksiyonda rol oynadığı düşünülmektedir. İnsanlara özgü miyozin III geni olan MYO3A, İnsan Genom Projesi aracılığıyla keşfedilmiştir.

## Miyozin IV

Miyozin IV, tek bir IQ motifi içerir ve sarmal-sarmal yapı oluşturan herhangi bir dizisi olmayan bir kuyruğa sahiptir. Miyozin VII ve XV'in kuyruk bölgeleri ile benzer homolojiye sahiptir [10].

## Miyozin V

Miyozin V, dimer olarak işlev gören ve adım boyutu 36 nm olan geleneksel olmayan bir miyozin motorudur. Aktin filamentleri boyunca tüylü uca (+ uç) doğru ilerler. Miyozin V, hücrenin merkezinden çevresine kadar kargo (örn. RNA, veziküller, organeller, mitokondri) taşınmasında görev alır, ancak ayrıca dinamik bir bağ olarak hareket ettiği ve vezikülleri ile organelleri hücrelerin aktin zengini çevresinde tuttuğu gösterilmiştir. Son yapılan tek molekül in vitro rekonstitüsyon çalışması, montaj halindeki aktin filamentleri üzerinde yapıldı ve bu çalışma, Miyozin V'nin yeni montajlanan (ADP-Pi zengini) F-aktin üzerinde daha uzun mesafeler kat ettiğini, eski (ADP zengini) F-aktin üzerindeki işleyici koşu uzunluklarının ise daha kısa olduğunu öne sürmektedir [11].

## Miyozin VI

Miyozin VI, esas olarak bir dimer olarak işleyen ancak aynı zamanda işlemeyen bir monomer olarak da hareket eden geleneksel olmayan bir miyozin motorudur. Aktin filamentleri boyunca yürür ve filamentlerin sivri ucuna doğru ilerler. Miyozin VI'nın, endositik vezikülleri hücre içine taşıdığı düşünülmektedir [12].

## Miyozin VII

Miyozin VII, kuyruk bölgesinde iki FERM domeni bulunan geleneksel olmayan bir miyozindir. Beş kalsiyum modülün bağlama IQ motifi ile devam eden tek bir alfa sarmalı (SAH) içeren uzatılmış bir kaldıraç koluna sahiptir. Miyozin VII, Dictyostelium discoideum'da fagositoz, C. elegans'ta spermatogenez ve fareler ile zebra balıklarında stereosilya oluşumu için gereklidir.

### Miyozin VIII

Miyozin VIII, hücre bölünmesiyle ilişkilendirilen bitki özgü bir miyozindir; özellikle, hücreler arasında sitoplazmanın akışını düzenlemede ve veziküllerin fragmoplasta yerleşiminde rol oynar.

### Miyozin IX

Miyozin IX, tek başlı motor proteinler grubudur. İlk olarak, eksi uca yönelik olduğu gösterilmişti [13], ancak daha sonraki bir çalışma, artı uca yönelik olduğunu ortaya koymuştur [14]. Bu miyozinin hareket mekanizması yeterince anlaşılmamıştır.

### Miyozin X

Miyozin X, dimer olarak işlevsel olan geleneksel olmayan bir miyozin motorudur. Miyozin X'in dimerizasyonunun antiparalel olduğu düşünülmektedir [15]. Bu davranış, diğer miyozinlerde gözlemlenmemiştir. Memeli hücrelerinde, motor filopodyalarda lokalize olduğu bulunmuştur. Miyozin X, filamentlerin tüylü uçlarına doğru yürür. Bazı araştırmalar, tek filamentler yerine aktin demetleri üzerinde tercihen yürüdüğünü öne sürmektedir [16]. Bu davranışı sergileyen ilk miyozin motorudur.

### Miyozin XI

Miyozin XI, bitki hücrelerinde plastidler ve mitokondri gibi organellerin hareketini yönlendirir [17]. Işık yoğunluğuna göre kloroplastların ışığa yönelik hareketinden ve farklı plastidler arasında stromüllerin oluşumundan sorumludur. Miyozin XI ayrıca, kutupsal kök ucu büyümesinde kritik bir rol oynar ve uygun kök saçı uzaması için gereklidir. *Nicotiana tabacum*'da bulunan özel bir Miyozin XI, aktin filament boyunca 35 nm adımlarla saniyede 7µm hızla hareket ederek bilinen en hızlı işleyen moleküler motor olarak keşfedilmiştir [18].

### Miyozin XIV

Bu miyozinin bilinen işlevleri arasında fagosomları çekirdeğe taşımak ve konjugasyon sırasında gelişimsel olarak düzenlenen makronükleusun eliminasyonunu bozmak yer alır.

## Miyozin XV

Miyozin XV, iç kulakta bulunan hareketsiz stereosilyaların aktin çekirdek yapısının gelişimi için gereklidir. Monomer olarak işlevsel olduğu düşünülmektedir.

## Miyozin XVIII

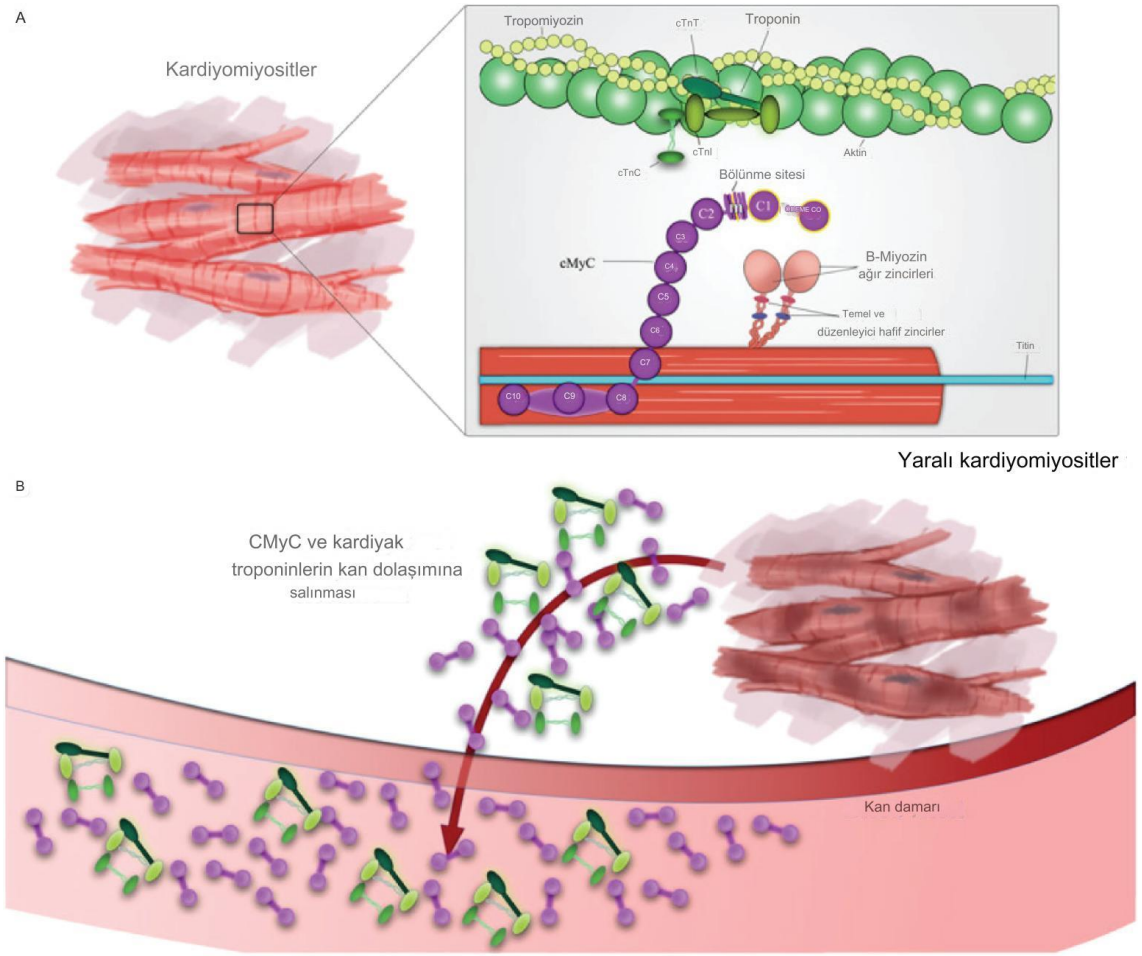
MYO18A, 17q11.2 kromozomunda bulunan bir gendir ve aktin tabanlı motor moleküllerini kodlar. Bu moleküllerin ATPaz aktivitesi bulunur ve hücreler arası temasın sürdürülmesi için gereken stromal hücre iskelesinin korunmasına katkıda bulunabilirler.

## Miyozin XIX

Geleneksel olmayan miyozin XIX (Myo19), mitokondri ile ilişkili bir miyozin motorudur [19].

### **2.1.3. Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein C (cMyBP-C) ve Yapısı**

Kardiyak miyozin bağlayıcı protein C (cMyBP-C), tüm çizgili kasların miyofibrillerinde bulunan miyozin bağlayıcı proteinler grubundan biridir. Bu protein, A bandında bulunan çapraz köprülerin olduğu bölgede (C bölgesi) 7 ila 9 enine çizgi boyunca 43 nm aralıklarla bulunur. cMyBP-C , molekülün C ucu terminusunda, üç izoformun (yavaş iskelet, hızlı iskelet ve kardiyak) hepsinde miyozin ve titin bağlama bölgeleri içerir. Kardiyak izoform, iskelet izoformlarında bulunmayan, fosforile edilebilir üç site ve N terminusunda ek bir immüoglobulin modülü içeren bir dizi amino asit kalıntısı da içerir. cMyBP-C'nin iki önemli işlevi bulunmaktadır. Miyozin ve titin'e bağlanma sonucunda sarkomerik miyofibrilin oluşumundaki rolü ve kardiyak izoformda, fosforilasyon yoluyla kasılmanın düzenlenmesi. İlk işlev, cMyBP-C'nin kalın filamentte miyozin paketlenmesine olan etkisi, miyofibrillogenenez sırasında sarkomerler ve cMyBP-C'nin ortaya çıkışının bir arada olması ve cMyBP-C'nin titin ve/veya miyozin bağlama yerlerinin eksik olduğunda sarkomerlerin hatalı oluşumu ile desteklenir. İkinci işlev, kardiyak cMyBP-C'deki özgül fosforilasyon yerleri, kalın filamentte cMyBP-C fosforilasyonu için özgül bir enzimin bulunması, cMyBP-C fosforilasyonu ile kalın filament yapısının değişimi ve cMyBP-C fosforilasyonunun kalpte inotropiyi modüle eden tüm önemli fizyolojik mekanizmalarla birlikte olması ile desteklenir [20].



Şekil 2.4-Yapı: (A) Sağlıklı Kardiyositlerde ve (B) Kardiyosit Hasarı Sırasında cMyBP-C ve Kardiyak Troponinler [21]

Hastalıklar ve miyozin düzeylerine dair genel bir değerlendirme yapmak gerekirse;

**Kalp krizi (Miyokard enfarktüsü):** Kalp krizinde genellikle kalp kası (miyokard) hasar görür ve bu durumda miyozin gibi kardiyak enzimlerin düzeyleri kan dolaşımında yükselir. Bu, hasar gören kardiyak hücrelerin içeriklerini dolaşıma salmaları nedeniyle olur.

**Kalp yetmezliği:** Kalp yetmezliği durumunda kalp kasının fonksiyonunda azalma görülür. Ancak miyozin seviyelerinin yükselip yükselmediği, hastalığın tipine ve şiddetine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Kronik kalp yetmezliği durumunda, kardiyak miyozin düzeyleri normal veya değişken olabilir.



İskemik kas hastalığı: İskemik durumlar, kas dokusunun yeterince kan akışı alamaması durumudur. Bu durumda kas hücreleri zarar görebilir ve miyozin gibi kas proteinlerinin serum düzeyleri artabilir.

Kas distrofisi: Kas distrofisi, kasların zayıflamasına ve işlev kaybına neden olan genetik hastalıklardır. Bu durumda, kas hücreleri zayıfladığı ve yıkıldığı için genellikle serumdaki kreatin kinaz gibi belirli kas enzimleri yükselebilir. Ancak miyozin seviyelerinin düşük olması, kas kütlesinin azalmasına bağlı olabilir.

Kas hasarı: Kas hasarı genellikle travma, aşırı kullanım veya kasılıtlardan sonra görülür ve kas hücrelerinin içeriklerini, miyozin dahil, kan dolaşımına salmasıyla sonuçlanır. Bu nedenle, kas hasarında serum miyozin düzeyleri genellikle yükselir.

### **2.1.3.1. Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein C (cMyBP-C) Yapısı**

İnsan, tavuk, tavşan ve fare gibi farklı canlılardan elde edilen cMyBP-C'nin birkaç farklı izoformu klonlanmış ve dizilenmiştir. Bu, yapıların derinlemesine karşılaştırılmasını sağlar. Proteinin üç izoformu bulunmaktadır: hızlı iskelet, yavaş iskelet ve kardiyak. cMyBP-C yalnızca çizgili kaslarda bulunur çünkü hızlı ve yavaş iskelet cMyBP-C'ye yönelik problemler insan pankreası, böbreği, karaciğeri, akciğeri, plasenta, beyni veya kalbi ile hibridize olmaz. Kardiyak izoform yalnızca kalpte bulunur. İnsanlarda bu üç izoform farklı kromozomlara haritalanmıştır: yavaş iskelet 12. kromozoma, hızlı iskelet 19. kromozoma ve kardiyak 11. kromozoma, bu izoformların alternatif dizi ekleme ürünleri olmadığını göstermektedir.

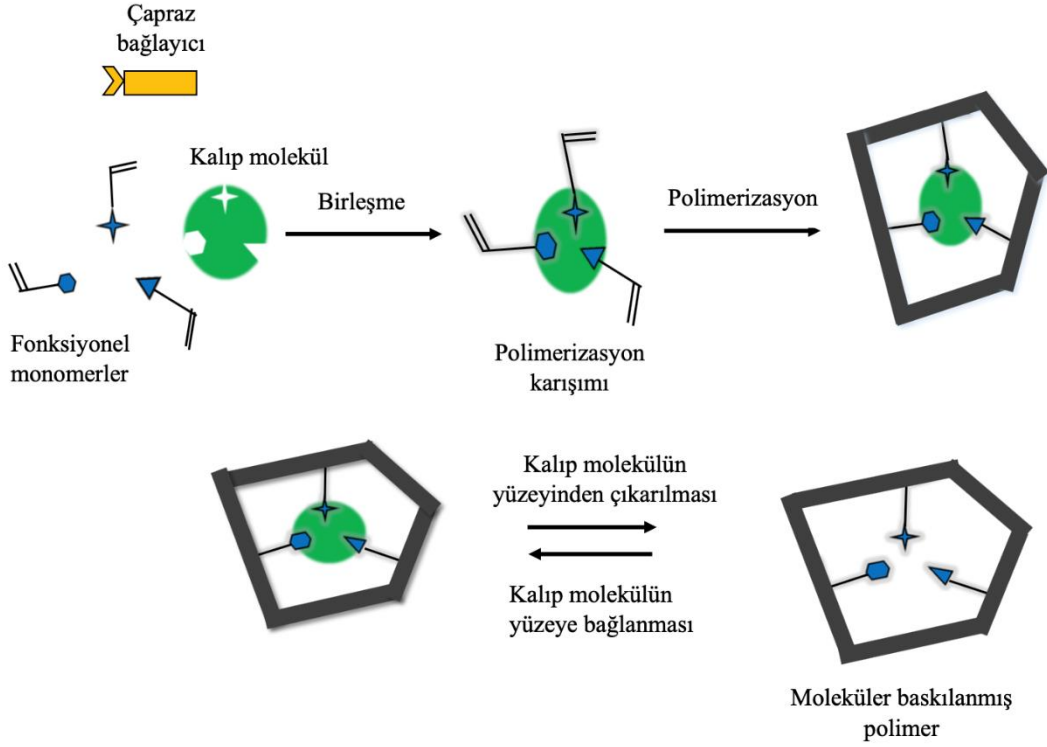
İnsanlardaki hızlı tip, 1142 amino asit içerir (cDNA dizisine dayanarak) ve tahmini moleküler kütlesi 128 kDa'dır, bu değer jel elektroforezinden çıkarılan değerden daha azdır. Her iskelet cMyBP-C, aynı sırayla dizilmiş 7 immüoglobulin (Ig) C2 motifleri ve 3 fibronektin (Fn) tip III motiflerinden oluşan 10 bölge içerir (Ig-Ig-Ig-Ig-Ig-Fn-Fn-Ig-Fn-Ig) (Modüller I'den X'e kadar tanımlanmıştır). cMyBP-C'nin elektron mikroskopik görüntüsü çubuk şekli, V şekli ve U şekli karışımıdır. İskelet izoformları 3 nm çapında ve 32 nm uzunluğundadır, buna karşın kardiyak izoform daha uzundur, 40 ila 44 nm arasında değişir ve aynı şekilleri gösterir. Moleküllerin dimerler oluşturabileceğine dair işaretler vardır. Kardiyak izoform, iki iskelet izoformundan üç önemli yönden farklılık gösterir.

C-terminal modülü (modül X, ayrıca CX olarak da bilinir), miyozine bağlanma yeri içerir ancak bu modül gerekli olmasına rağmen, miyozine maksimal bağlanma için yeterli değildir. cMyBP-C'nin miyozine olan afinitesi, C terminaline eklenen VII'den IX'a kadar olan üç bitişik modül ile giderek artar. Bu ek modüllerin miyozine bağlanmadaki önemi, modül X'i kodlayan bir peptidin cMyBP-C'yi miyozinden uzaklaştıramamasıyla da kanıtlanmıştır.

cMyBP-C'nin miyozin bağlama yeri dışında, C-terminalin son üç bölgesinde (VIII'den X'e kadar), titin'deki belirli immünooglobulin ve fibronektin bölgelerine bağlanan yerler bulunur. cMyBP-C, hem düzenlenmiş hem de düzenlenmemiş filamentlerde aktine bağlanabilir. Düzenlenmiş filamentlerde, kalsiyum cMyBP-C'nin bağlanma miktarını artırır, bu da kalsiyum olmadan meydana gelmeyen filamentin yan yana ilişkisini üretir. Düzenlenmemiş aktinde, stokiyometri yaklaşık olarak 1 cMyBP-C /3 ile 5 aktin arasındadır ve kalsiyum bağlamayı etkilemez. Dissosiasyon sabiti mikromolar aralığındadır, bu da bağlamanın belirli bir fizyolojik rolü olmasının olası olmadığını gösterir.

## **2.2.Moleküler Baskılama Yöntemi**

Moleküler baskılama yöntemi, belirli molekülleri tanıyabilen ve seçici olarak bağlayabilen polimerlerin tasarlanması ve üretilmesi sürecidir. Bu yöntem, spesifik hedef moleküllere yüksek derecede seçicilik sağlayan sentetik reseptörler oluşturmak için kullanılır. İlk olarak 1970'lerde ortaya çıkan bu teknoloji, hedef moleküllerin yapısal özelliklerini taklit eden monomerlerin polimerizasyonu ile işler. Bu süreçte, hedef molekül, monomerler arasına yerleştirilir ve ardından polimerleşme gerçekleştirilir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra, hedef molekül polimer matrisinden çıkarılır, böylece molekülün şekli ve boyutu ile uyumlu özgün boşluklar bırakılır [22] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 -Moleküler Baskılama Yönteminin Şematik Gösterim

Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) oluşturulması süreci, hedef molekülün uygun polimerizasyon monomerleri ile karıştırılmasıyla başlar. Bu monomerler, hedef molekülün etrafında belirli bir düzen içinde yer alarak polimerik bir ağ oluşturur. Süreç sırasında kullanılan çözücü, kalıp molekülü çözer ve sonrasında geriye, hedef molekülün üç boyutlu yapısına uyum sağlayacak şekilde oluşmuş polimer kaplı boşluklar bırakır. Bu boşluklar, molekülün özgül yük dağılımını ve yapısal hafızasını içerir, böylece yalnızca bu yapıya uygun moleküller bu boşluklara sığabilir.

Moleküler baskılanmış polimerlerin önemli avantajları arasında, hazırlanma sürelerinin kısa olması ve maliyetlerinin düşük olması yer alır; polimerizasyonda kullanılan monomerler ekonomiktir ve polimerler sert koşullarda dahi uzun süreli kararlılıklarını koruyabilir. Bazı yapılar, işlevlerini birkaç yıl boyunca sürdürebilir. Bu polimerlerin potansiyel kullanım alanlarından biri, kan gibi biyolojik sıvılardan istenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasıdır [23]. Örneğin, böbrek hastalığı olan bir hastanın kanı, zararlı maddeleri süzerek temizlemek için dışarı alınabilir ve özelleştirilmiş polimerlerle dolu bir kolondan geçirilir. Kan, kolondaki küreler tarafından seçilen maddeleri tutar ve

arındırıldıktan sonra hasta için tekrar kullanılabilir. Bu süreç, teorik olarak sürekli hemodiyaliz ihtiyacını azaltabilir.

Ayrıca, MIP'ler, vücudun diğer bölgelerinden istenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasında da kullanılabilir. Örneğin, kolesterolü kan dolaşımından çıkarmak için kolesterolle baskılanmış polimerler kullanılabilir. İlaç endüstrisinde ise, MIP'ler daha saf ilaç ürünleri elde etmek amacıyla kullanılabilir. İlaçların zararlı formunun yararlı formdan ayrılabilmesi sonucunda ciddi sağlık sorunları yaşanmıştır. İlaç üreticileri genellikle enantiyomerlerini ayrı olarak sentezlemeye çalışsa da, üretim süreçleri bazen istenmeyen moleküllerin de oluşmasına neden olabilir [24]. Bu nedenle, MIP'lerin bu alandaki kullanımı, ilaç güvenliğini artırabilir ve yan etkileri minimize edebilir.

Moleküler baskılanmış polimerlere dayalı yöntemler, tipik ticari uygulamalara kıyasla istenmeyen molekülleri teşhis etmek ve uzaklaştırmak için daha etkin bir alternatif sunar. Bu yöntemlerde, her bir polimer boşluğu sadece kendisine uygun olan moleküle mükemmel bir şekilde eşleşir. Bu özgünlük, terör tehditleri ve tanımlanamayan hastalıklarla mücadelede, özellikle toksinler ve patojenlerin algılanması için sensör bileşenleri geliştirilmesine imkan tanır. Moleküler baskılanmış polimerler, zararlı bileşiklerin teşhisinde kullanılmakta olup; bunlar arasında bitki öldürücü atrazin ve biyoterör silahı olarak kullanılan sinir gazı sarin yer almaktadır. Örneğin, 1990'ların ortalarında Japonya'da sarin gazı, terör saldırılarında kullanılmış ve bu saldırılar 19 kişinin ölümüne, binlerce kişinin de zehirlenmesine yol açmıştır. Ayrıca, 2001 yılında ABD'de bazı devlet memurlarına ve medya çalışanlarına gönderilen mektuplarda bulunan antraks sporlarının teşhisinde de moleküler baskılanmış polimerlerden faydalanılmıştır.

Daha etkileyici olan ise, çeşitli moleküler baskılanmış polimerlerle donatılmış bir sensörle tek seferde birden fazla bileşiğin tayin edilebilmesidir. Bu çok işlevli sensörler, bir elektronik çip üzerine entegre edildiğinde, hedef maddelerden biri algılandığında, çevresel varlığı hakkında alıcıya bir sinyal gönderir. Böylece, çok sayıda moleküler baskılanmış polimer içeren bölümler, istenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasında da kullanılabilir. Kamu ve sanayi sektörleri, göllerin, akarsu ve toprakların temizlenmesi amacıyla moleküler baskılanmış polimerlere artan bir ilgi göstermektedir [25] [26] [27].

### **2.2.1.Kovalent Baskılama**

Kovalent baskılama yöntemi, bir veya daha fazla polimerize edilebilir fonksiyonel monomerin kullanımıyla ayırt edilir. Bu monomerler, kuvvetli ve tersinir kovalent bağlar oluşturabilen kalıp moleküllere bağlanırlar. Bu yaklaşım, özellikle spesifik bir tanıma ve bağlanma yeteneği gerektiren hedef moleküllerin tespiti için etkili bir strateji sunar [28]. Polimerizasyon sürecinden sonra, kovalent bağlar kırılabilir ve bağlanma bölgesinde kalan işlevsellik, kovalent bağın yeniden kurulmasıyla hedef moleküle özgül bir şekilde etkileşime girebilir [29]. Bu yaklaşımın avantajı, işlevsel grupların yalnızca kalıp moleküle etkileşmesidir. Bu durum, baskılanmış polimerin sadece hedef moleküle özgül bir etkileşime girmesini sağlar. Ancak, bu yöntemle sınırlı sayıda bileşik, özellikle alkoller, ketonlar, aldehitler, karboksilik asitler ve aminler gibi belirli kimyasal grupları içeren hedef moleküller, başarıyla baskılanabilir [30]. Kovalent bağ olduğu için bağlanma kinetikleri genellikle daha yavaş bir şekilde gerçekleşir. Bu yavaş bağlanma kinetikleri, kovalent baskılama yönteminin bazen daha uzun analiz sürelerine ihtiyaç duyabileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, özellikle belirli hedef moleküllerin seçici tespiti gerektiği durumlarda, kovalent baskılama yöntemi, özgüllük ve seçicilik açısından yüksek performans sergileyebilen bir moleküler tanıma stratejisi olarak öne çıkar. Bu avantajlar, özellikle sensör uygulamalarında ve biyolojik analitlerin tespitinde kullanılmak üzere tasarlanan moleküler baskılanmış sensörlerinin geliştirilmesinde değerli bir yöntem olarak kabul edilir [31].

### **2.2.2.Kovalent Olmayan Baskılama**

Kovalent olmayan baskılama yöntemi, hedef molekülün spesifik tanınması ve tespiti için kullanılan etkili bir stratejidir. Bu yöntemde, fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasındaki etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve koordinasyon bağları gibi kovalent olmayan bağlanmalar aracılığıyla bir araya getirilir [32]. Fonksiyonel monomer, hedef molekül ile belirli kimyasal özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanır, bu da spesifik tanıma ve bağlanma yeteneğini sağlar. Bu etkileşimler, moleküler baskılama polimerinin oluşumunu başlatır ve özellikle hedef molekül ile monomer arasında kuvvetli bir ilişki oluşturulmasını mümkün kılar [33].

Polimerizasyon aşamasından sonra, elde edilen baskılanmış polimer matrisi, kalıp molekülü içerir [34]. Bu aşamada, kalıp molekül polimer matrisinden uygun çözücü

kullanılarak uzaklaştırılır. Kalıp molekülün çıkartılması, baskılanmış polimerin içerisinde hedef molekül ile birebir bağlantı kurmaya hazır hale gelmesini sağlar [35]. Ardından, hedef molekül ile baskılanmış polimer arasında kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla birleşim gerçekleşir. Bu bağlantılar, önceki etkileşimlerin devamı niteliğindedir ve hedef molekülün özgül algılanmasını ve tanınmasını sağlar [36].

Bu süreç, sonunda baskılanmış polimerin hedef molekül ile özgül bir kompleks oluşturduğu bir sensör elde edilmesini sağlar [37]. Moleküler baskılama yöntemi, özellikle biyolojik ve kimyasal analitlerin tespiti amacıyla yüksek seçicilik ve duyarlılık gerektiren birçok uygulamada kullanılmaktadır. Bu, özelleştirilebilir tasarımı ve geniş bir analit yelpazesi üzerinde etkili çalışabilme özelliği ile moleküler baskılamanın önemini vurgular [38].

### **2.2.3.Mikrotemas Baskılama**

Mikrotemas baskılama, moleküler tanıma bölgeleri oluşturmak için kullanılan bir yüzey desenleme yöntemidir [39] [40]. Mikrotemas baskılama, özellikle biyolojik moleküller, proteinler ve DNA gibi hedef moleküllerin tespiti ve tanınmasında etkili bir strateji sunar. Bu teknik, yüzey üzerinde yüksek çözünürlükte ve hassasiyette desenler oluşturarak, sensör uygulamaları için ideal bir yöntem olarak kabul edilir [41].

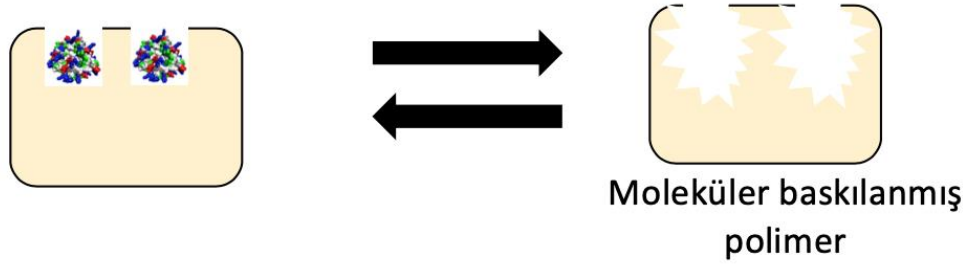
### 1 ) Kalıp molekülün adsorpsiyonu



### 2 ) Polimerizasyon



### 3 ) Kalıp molekülün uzaklaştırılması



Şekil 2.6-Mikrotemas baskılama yönteminin şematik gösterimi

Mikrotemas baskılama yöntemi 3 aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.6) [42] [43] :

1. Adım: İlk olarak hedef protein kalıbının oluşturulacağı cam yüzey temizlenip bu yüzeye kalıp protein adsorbe edilerek monomer karışımı ile ön muameleye tabi tutulur.
2. Adım: Protein kalıbı, monomer kaplı sensör yüzeyi ile temas ettirilerek UV-polimerizasyonu ile proteinin substrat üzerinde baskılanır.
3. Adım: Protein kalıbı yüzeyden uzaklaştırılır.

Bu yöntem, özellikle biyomoleküller ile çalışırken, geleneksel baskılama yöntemine göre baskılanan biyomolekülün aktivite kaybının minimuma indirgenmesi, baskılama için

oldukça düşük miktarda kalıp molekülün yeterli olması, proteinin baskılama sırasında monomer çözeltisi içinde bulunması gerekmediğinden proteinin konformasyonel bütünlüğünü koruması gibi önemli avantajlara bulunmaktadır.

Mikrotemas baskılama, çeşitli biyomoleküllerin yüzeye spesifik bir şekilde yerleştirilmesine olanak tanır [44]. Bu, sensörlerin ve tıbbi teşhis cihazlarının geliştirilmesinde büyük bir avantaj sağlar [45]. Özellikle, proteinlerin ve antikorların belirli bir düzen içinde yüzeye yerleştirilmesi, yüksek duyarlılıkla biyomoleküler etkileşimlerin izlenmesini mümkün kılar. Mikrotemas baskılama ile üretilen yüzeyler, biyolojik analizlerde ve hücresel araştırmalarda geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Mikrotemas baskılama yönteminin avantajları arasında düşük maliyet, yüksek çözünürlük, tekrarlanabilirlik ve hızlı üretim süreçleri yer alır [46]. Bu özellikler, yöntemin laboratuvar araştırmalarından endüstriyel uygulamalara kadar geniş bir yelpazede kullanılmasını sağlar [47]. Ayrıca, mikrotemas baskılama yöntemi, çeşitli yüzeyler üzerinde uygulanabilir ve bu da tekniğin çok yönlülüğünü artırır. Farklı yüzeylerde uygulanabilen mikrotemas baskılama, sensörlerin yanı sıra mikroelektronik cihazların üretiminde de kullanılabilir [48]. Bu baskılama yöntemi, ayrıca, çevresel izleme sistemlerinde de önemli bir rol oynar. Örneğin, mikrotemas baskılama ile üretilen sensörler, su kalitesinin izlenmesi, hava kirliliğinin tespiti ve toksik maddelerin belirlenmesi gibi çevresel analizlerde kullanılabilir [49]. Bu sensörler, düşük maliyetli ve taşınabilir olmaları sayesinde geniş bir kullanıcı kitlesine hitap eder [50]. Sonuç olarak, mikrotemas baskılama, biyolojik moleküllerin tespiti ve yüzey desenlemesi için etkili ve yenilikçi bir yöntemdir [51]. Yüksek çözünürlükte ve hassasiyette yüzeyler oluşturabilmesi, bu tekniğin sensörler, tıbbi teşhis cihazları ve çevresel izleme sistemlerinde geniş bir uygulama potansiyeline sahip olmasını sağlar [52].

### **2.2.3.1.Moleküler Baskılama Yönteminin Uygulama Alanları**

Sensörler: MIP'ler, yüksek seçicilikleri sayesinde çeşitli biyolojik ve kimyasal sensörlerde kullanılmaktadır. Bu sensörler, çevresel izlemeden hastalık teşhisine kadar geniş bir yelpazede uygulamalara sahiptir [53].



İlaç Salım Sistemleri: İlaçların kontrollü salımı için MIP teknolojisi, belirli ilaç moleküllerini hedef alacak şekilde tasarlanabilir. Bu, ilaçların daha etkin ve yan etkisiz bir şekilde kullanılmasını sağlar.

Gıda Güvenliği ve Tarım: Pestisit, herbisit gibi kimyasalların kalıntılarının tespit edilmesinde MIP'ler önemli rol oynar. Bu polimerler, gıda güvenliğinin sağlanmasında ve çevresel kontaminantların izlenmesinde kullanılır.

Klinik Diagnostik: MIP'ler, spesifik proteinler, hormonlar ve diğer biyomoleküller için yüksek seçicilik sunarak hastalıkların teşhisinde kullanılabilir.

### **2.2.3.2.Moleküler Baskılama Yönteminin Avantajları**

Yüksek Seçicilik: MIP'ler, moleküler tanıma özellikleri sayesinde çok yüksek seçiciliğe sahiptir.

Düşük Maliyet: Üretimi daha ekonomiktir.

Kimyasal ve Fiziksel Stabilitate: MIP'ler, sıcaklık ve kimyasal maddelere karşı yüksek dayanıklılık gösterir.

Yeniden Kullanılabilirlik: MIP'ler, birden fazla kez kullanılabilir ve kolayca yeniden işlenebilir.

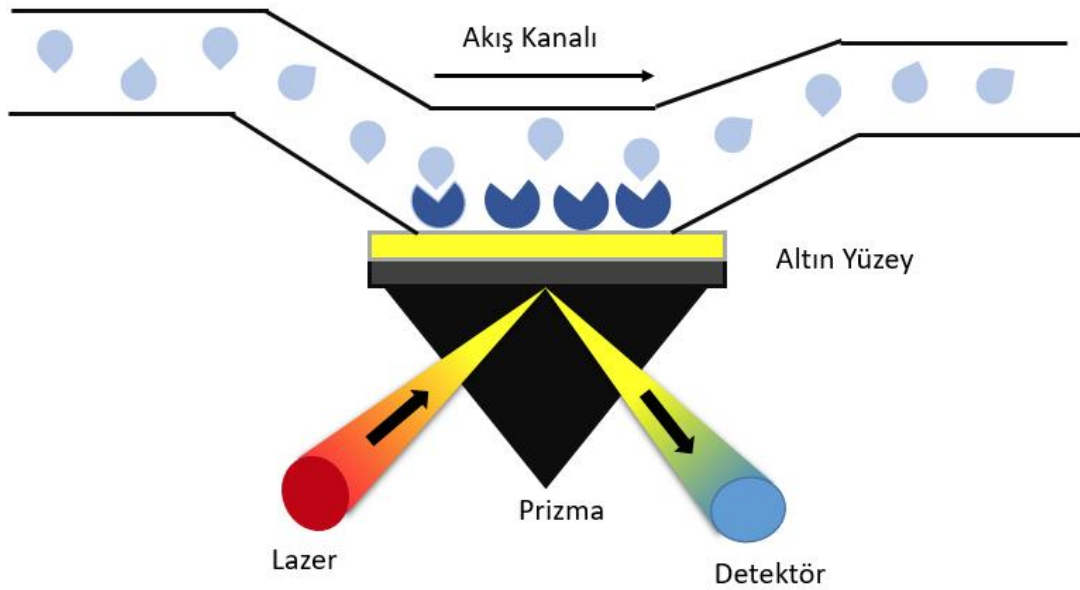
### **2.2.3.3.Zorluklar ve Sınırlamalar**

Kompleks Moleküllerle Uyum Sağlama: Yüksek karmaşıklığındaki moleküller için etkili MIP'lerin tasarlanması zor olabilir.

Bağlama Kapasitesi: Polimer matris içinde homojen olmayan bağlama bölgeleri oluşabilir, bu da düşük bağlama kapasitesine yol açabilir.

### 2.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Yüzey plazmon rezonansı (SPR), ışığın ince bir metal yüzeye uygun bir açıyla çarptığında, yüzeyde serbest elektronların (plazmonların) uyarılmasıyla meydana gelen bir optik olaydır. Bu olay, metalin yüzeyindeki elektron yoğunluğu dalgalarının harekete geçmesini sağlar. Bu uyarılmış elektron dalgaları, yüzeye paralel olarak yayılır ve belirli bir rezonans durumu oluşturur. SPR, ince bir metal levha üzerine yönlendirilen polarize ışığın, metalin serbest elektronlarıyla etkileşime girmesi ile çalışır. Işığın metal yüzeye girdiği açı (giriş açısı), çok önemlidir çünkü SPR sürecinin başlatılabilmesi için belirli bir açıda gelen ışık gereklidir. Bu açı, metalin malzeme özelliklerine, özellikle kırılma indisine bağlıdır. Bu, SPR'yi belirli maddeleri (analitleri) tespit etmek için önemli bir teknik haline getirmektedir ve çeşitli önemli biyomarkerları tespit üzere SPR sensörleri geliştirilmiştir [54] [55] [56].

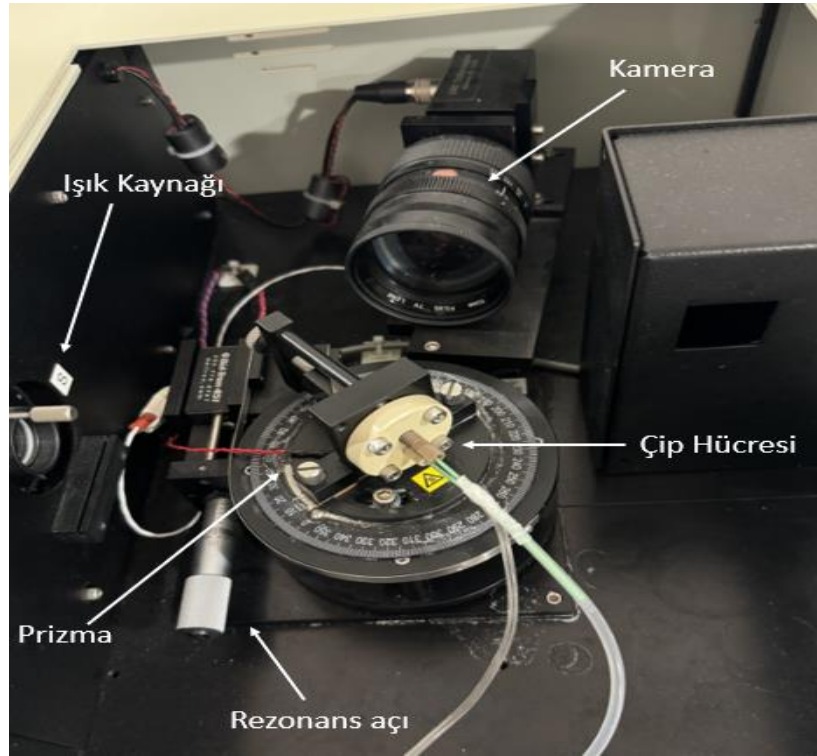


Şekil 2.7-SPR Sensörün Şeması Gösterimi

Şekil 2.7' de gösterildiği üzere, sistemde lazerden çıkan ışık önce prizmaya yönlendirilir. Prizma, lazer ışığını kritik bir açıda altın kaplı çip yüzeye yönlendirerek yüzeydeki serbest elektronların (plazmonların) uyarılmasına ve yüzey plazmon dalgalarının oluşumuna neden olur. Bu dalgalar, altın yüzey boyunca yayılır ve yüzey özelliklerine bağlı olarak değişir. [57].

Çip yüzeyinde meydana gelen bu plazmon dalgaları, yüzeyde mevcut olan veya yüzeye eklenen maddelerin özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu değişiklikler,

yansıyan ışığın kırılma indisinde farklılıklara yol açar. Yansıyan ışık daha sonra detektöre yönlendirilir ve burada, kırılma indisindeki değişiklikler tespit edilir. Bu değişiklikler, analiz edilen maddenin özellikleri hakkında bilgi verir ve bu bilgiler, çeşitli biyolojik ve kimyasal analizlerde kullanılır. Bu süreç, moleküler düzeyde etkileşimlerin ve bağlanmaların detaylı bir şekilde incelenmesine olanak tanır, böylece bilim insanları ve araştırmacılar, moleküller arası etkileşimleri ve bu etkileşimlerin dinamiklerini gerçek zamanlı olarak gözlemleyebilir. [58].

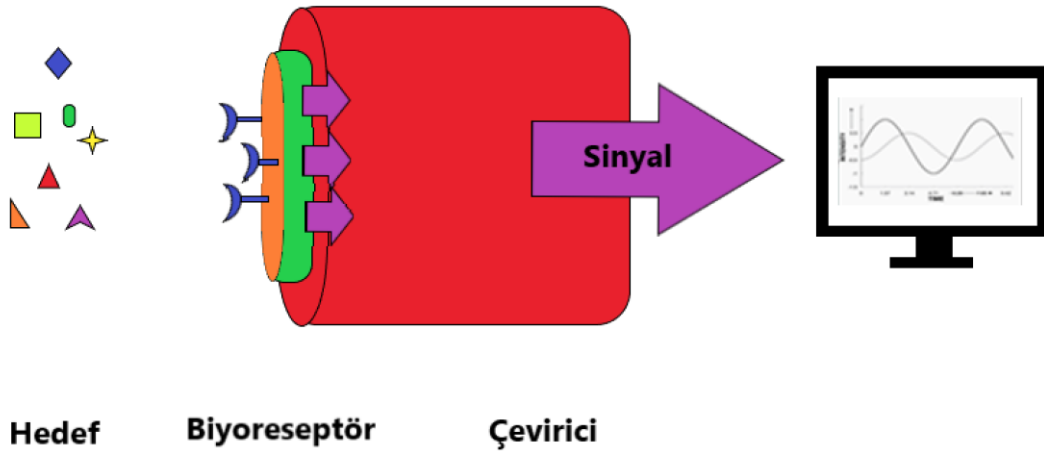


Şekil 2.8 – GenOptics SPRiLab sistemi

Şekil 2.8’de yüzey plazmon rezonansı (SPR) cihazının temel bileşenleri görülmektedir. Cihazın ana parçaları arasında ışık kaynağı, prizma, çip hücresi, kamera ve rezonans açısı ayarlama düzeneği bulunmaktadır. Işık kaynağı, genellikle bir lazerdir ve cihazın en kritik elemanlarından biri olarak işlev görür. Lazer ışığı, plazmonların uyarılması için gerekli olan belirli bir dalgaboyunda ve açıda prizmaya yönlendirilir. Prizma, lazer ışığını altın kaplı çip yüzeyine doğru yönlendirerek yüzey plazmonlarının oluşumunu sağlar. Bu yüzeyde, çeşitli biyolojik örnekler veya kimyasal maddeler bulunabilir ve bunların etkileşimleri SPR ile incelenebilir.

Rezonans açısı, lazer ışığının çip yüzeyine çarptığı açıdır ve sonuçların başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için doğru ayar yapılması büyük önem taşır. Bu açı, cihaz üzerindeki özel bir düzeneği kullanarak ayarlanabilir. Kamera, çip üzerinden yansıyan ışığı yakalar ve bu görüntü, analiz ve değerlendirme için incelenir.

Bu bileşenlerin bir araya gelmesiyle, SPR cihazı biyolojik ve kimyasal maddelerin yüzey plazmonları ile olan etkileşimlerini hassas bir şekilde algılayabilir ve bu verileri araştırmacılara sunabilir. Bu cihaz, özellikle biyomedikal araştırmalar ve kimyasal analizler için vazgeçilmez bir araçtır.



Şekil 2.9-Sensör sisteminin temel bileşenleri

Şekil 2.9'de gösterilen sensör yapısı, hedef moleküller, biyoreseptör ve çevirici olmak üzere üç ana bölümden oluşur. Hedef olarak adlandırılan kısım, sensör tarafından algılanacak molekülleri ifade eder ve bunlar arasında proteinler, virüsler, bakteriler gibi biyolojik öğeler veya çeşitli kimyasallar yer alabilir.

Biyoreseptör bölümü, hedef moleküllerle özgül bir şekilde etkileşime girecek biyolojik yapıları içerir. Bu yapılar genellikle antikorlar, enzimler veya reseptör proteinler gibi tanıma elemanlarından oluşur. Bu biyoreseptörler, hedef molekülü yakaladığında, bu etkileşimi çeviriciye iletir.

Çevirici ise, biyoreseptör ve hedef molekül arasında gerçekleşen etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştürür. Bu sinyal, genellikle elektriksel veya optik bir değişim şeklinde olabilir ve bu sinyal daha sonra bir ekran veya bilgisayar aracılığıyla izlenebilir. Bu sinyal, ölçülen moleküler etkileşimin şiddeti ve niteliği hakkında önemli bilgiler sağlar, dolayısıyla sensörün duyarlılığı ve doğruluğu bu bileşene bağlıdır. Bu yapı, spesifik hedef moleküllerin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlayarak biyolojik ve kimyasal analizlerde kritik bir rol oynar. Çeşitli sağlık teşhis uygulamalarından çevresel izlemeye kadar geniş bir uygulama yelpazesinde değerli bir araçtır.

### **2.3.1.Uygulama Alanları**

Yüzey plazmonları, floresans, Raman saçılması ve ikinci harmonik üretimi gibi çeşitli spektroskopik ölçümlerin yüzey duyarlılığını artırmak için kullanılmıştır. En basit haliyle, SPR yansıtma ölçümleri, polimerler, DNA veya proteinler gibi moleküler adsorpsiyonu tespit etmek için kullanılabilir. Teknik olarak, minimum yansıma açısını (maksimum absorpsiyon açısı) ölçmek yaygındır. Bu açı, ince (yaklaşık birkaç nanometre kalınlığında) film adsorpsiyonu sırasında yaklaşık  $0.1^\circ$  kadar değişir. Diğer durumlarda, absorpsiyon dalga boyundaki değişimler takip edilir [59].

Tespit mekanizması, adsorbe olan moleküllerin yerel kırılma indisini değiştirmesiyle, yüzey plazmon dalgalarının rezonans koşullarını değiştirmesine dayanır. Aynı ilke, kayıpsız dielektrik çok katmanlı (DBR) yapılarına dayanan ve daha keskin rezonanslı yüzey elektromanyetik dalgalarını destekleyen rekabetçi bir platformda da kullanılmaktadır (Bloch yüzey dalgaları) [60]. Yüzey farklı biyopolimerlerle desenlenmişse, uygun optik ve görüntüleme sensörleri (örneğin bir kamera) kullanılarak teknik, yüzey plazmon rezonans görüntüleme (SPRI) olarak genişletilebilir [61]. Bu yöntem, adsorbe olmuş moleküllerin miktarına dayalı olarak görüntülerin yüksek kontrastını sağlar.

Çizelge 2.1-Farklı Sensörlerin Avantajları ve Dezavantajları

<b>Biyosensör Türü</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
<b>Optik</b>	1. Gerçek zamanlı tespit	1. Güvenilir sistem gerektirir
	2. Hızlı sinyal alma süresi	2. Yüzey modifikasyonu zorluğu
	3. Yüksek hassasiyet	
<b>Elektrokimyasal</b>	1. Basit ve gerçek zamanlı sinyal alma	1. Zaman alıcı
	2. Sürekli analiz imkanı	2. Çevreden istenmeyen sinyaller
<b>Piezoelektrik</b>	1. Yüksek hassasiyet	1. Sıcaklık ve neme yüksek hassasiyet
	2. Hızlı	2. Sadece dinamik ölçüm
	3. Yüksek frekanslı yanıt	3. Pahalı
	4. Dayanıklılık	
<b>Akustik</b>	1. Basit üretim	1. Sıvılarda uygulanamaz
	2. Düşük maliyet	2. Sıcaklığa bağlı
	3. Düşük hız	
	4. İyi yanıt süresi	
<b>Yarı İletken</b>	1. Sınırlı algılama oranı	1. Düşük hassasiyet
	2. Hızlı yanıt	2. Neme duyarlı
	3. Hızlı iyileşme	3. Yüksek sıcaklıkta çalışma
	4. Çok yüksek hassasiyet	
<b>Konsol (Cantilever)</b>	1. Gerçek zamanlı tespit	1. Çevreye duyarlı
	2. Birden fazla analiti tespit etme yeteneği	2. Sıcaklığa duyarlı
	3. Yüksek hassasiyet	3. Hantal cihazlar gerekli

### 2.3.2. Kardiyovasküler Hastalıkların Tanısı

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), çoğu gelişmiş ülkede ölümün önde gelen nedeni olarak tanınmaktadır. Tıkanmış kan damarları, kalbe kan akışını engelleyebilir ve bu durum, oksijen yetersizliği nedeniyle kan pıhtıları oluşumu ve akut miyokard enfarktüsü (AME) oluşumuna yol açabilir. Dolayısıyla, AME'nin erken tespiti, enfarktüsün ilerlemesini ve ardından gelen kardiyak disfonksiyonu önlemek için hayati öneme sahiptir. Miyokard enfarktüsü (ME), çeşitli akut koroner sendromlara yol açabilir ve nihayetinde kalp dokusunda geri dönüşümsüz hasara neden olabilir. ME tanısı için yapılan çabalar büyük ölçüde elektrokardiyografiye dayanır, bu yöntem akut ME vakalarının sadece %50-57'sini doğru bir şekilde tespit edebilir. Bu nedenle, tanı hatalarından kaynaklanan ölümlerin sayısını azaltacak hızlı, hassas ve maliyet etkin bir tanı platformuna önemli bir ihtiyaç vardır.

Biyomarkerların kullanımı, klinik ve temel araştırmalarda büyük ilgi görmekte olup, kardiyak bozuklukların teşhisinde çok popülerdir. Gerçekten de, kardiyak aktivitedeki herhangi bir değişiklik her zaman kardiyak biyomarker seviyelerinde bir değişiklikle birlikte gerçekleşir. Bu nedenle, kandaki kardiyak biyomarker seviyelerinin ölçülmesi yoluyla yapılan kardiyak izleme, yaralanma türünü, yaralanma seviyesini ve kalp krizi olasılığını açıklığa kavuşturabilir. Bu bağlamda, çeşitli kardiyak biyomarker seviyelerinin yükseltilmesi, kardiyak miyositlerin disfonksiyonu ile tekrar tekrar ilişkilendirilmiştir. Aspartat aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz izoenzimleri, miyokard enfarktüsünün teşhisinde ilk olarak kullanılmıştır. Daha sonra, ME teşhisinde anahtar biyomarkerler olan miyogloblin, kardiyak miyozin bağlayıcı protein C, kreatin kinaz ve farklı türdeki troponinler kullanılmıştır [62]. Günümüzde kardiyak miyozin bağlayıcı protein C (cMyBP-C), ME tespiti için potansiyel bir biyomarker olarak kullanılmaktadır [63]. Şu ana kadar, kardiyak hastalık biyomarkerlerinin tanınması, yüzey plazmon rezonansı (SPR), kapasitif algılama, immünokromatografi, transistör dizileri, elektrokimyasal sensörler, kemilüminesans ve immünoassay gibi çeşitli yöntemlerle yapılmıştır [64] [65] [66].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kimyasal Malzemeler

Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein-C (cMyBP-C), kardiyak troponin T (cTnT), kreatin Kinaz (CK-MB), Glutaraldehit, 3-amino-propil-trietoksisilan (APTES),  $\alpha$ - $\alpha'$ -azobisisobutironitril (AIBN), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen-glikol-dimetakrilat (EGDMA) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Cam mikroskop slaytları (24 x 40 mm) (IsoLab), mikrotemas baskılama yönteminde proteinin immobilize edildiği protein kalıbı olarak kullanılmıştır. Diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead, D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROPure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18 M $\Omega$ /cm'dir.

#### 3.2. SPR Sensör Çiplerin Yüzey Modifikasyonu

Yüzey plazmon rezonans çip yüzeyine cMyBP-C baskılamadan önce (3:1 v/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oranında hazırlanan pirana çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra etil alkol ve deiyonize su ile yıkanarak sıcaklığı 40°C'de etüvde kurutulmaya bırakılmıştır. Bu işlemden sonra yüzey organik bağlamaya uygun hale getirilmiştir ve tiyol gruplarını bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tiyol grubunu (-SH) oluşturmak için allil merkaptan kullanılmıştır.

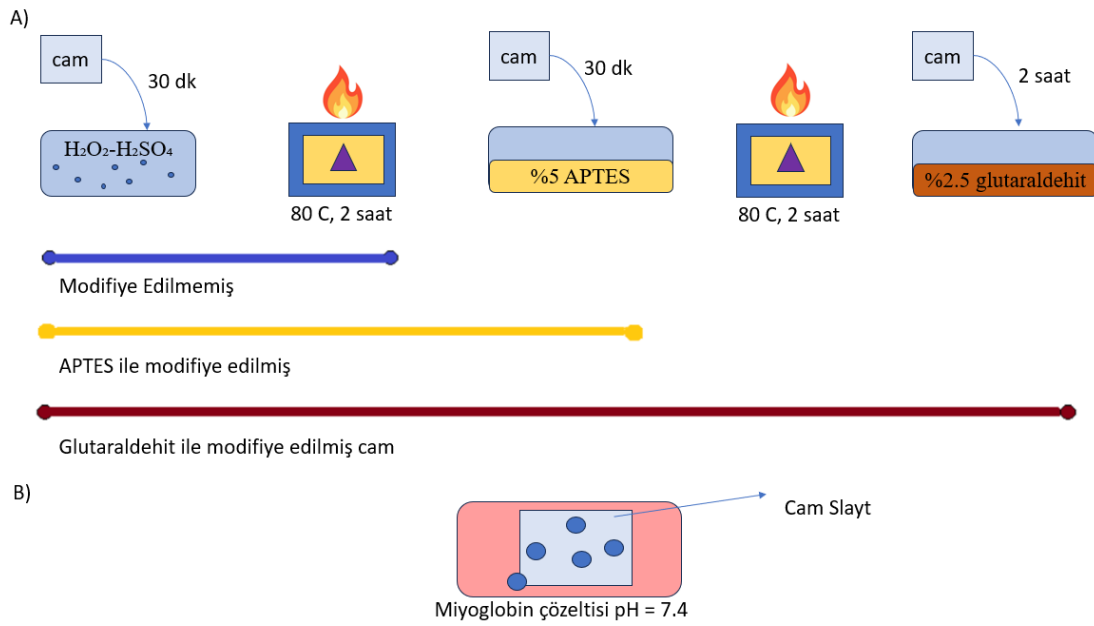
#### 3.3. Cam Slaytların Temizlenmesi, Yüzey Modifikasyonu ve Protein Kalıbının Hazırlanması

İlk olarak, cam slaytlar oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %10 v/v Hidrojen peroksit-Sülfürik asit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 70:30, v/v) çözeltisinde bekletilmiş, ardından saf su ile yıkanarak 80°C'de kurutulmuştur. Kurutulan cam slaytlar, aseton ile hazırlanmış %5 v/v APTES (3-aminopropiltrioksisilan) çözeltisinde 30 dakika bekletilmiş ve tekrar asetonla yıkanarak 80°C'de kurutulmuştur. Daha sonra, pH 7.4 fosfat tamponu ile



hazırlanmış %2.5 v/v glutaraldehit çözeltisinde 2 saat bekletilmiş ve pH 7.4 fosfat tamponu ile yıkanarak kurutulmuştur.

En son aşamada ise modifiye edilmiş cam yüzeyler 10 ml 300 ng/mL cMyBP-C çözeltisinde 24 saat boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Bu süreçte, pH 7.4 fosfat tamponu çözeltisi ile yıkanarak bağlanmayan proteinler yüzeyden uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1). Bu işlem, yüzey modifikasyonunun etkisini ve sensör performansını artırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sensörler, protein bağlanma yeteneklerinin optimize edilmesi için çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. Bu sensörlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler, SPR sensörlerinin güvenilirliğini ve performansını artırmak için titizlikle seçilmiştir.



Şekil 3.1-Cam Slaytların Hazırlanması

### **3.4.Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein-C Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış (NIP) poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) Poli(HEMA-MATrp) SPR Sensörlerin Hazırlanması**

- **cMyBP-C baskılanmış poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) (poli(HEMA-MATrp)) SPR Sensörün Hazırlanması**

Kardiyak miyozin bağlayıcı protein C (cMyBP-C), kalp kası fonksiyonlarında önemli rol oynayan bir proteindir. Bu proteinin tespiti ve analizi, kardiyak biyomarkerlar arasında yer almakta ve kalp sağlığının izlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bölümde, cMyBP-C'nin tespiti için SPR sensörlerinin hazırlanması üzerine odaklanılmıştır.

cMyBP-C: Kardiyak miyozin bağlayıcı protein C, hedef protein olarak kullanılırken 0.2 mmol miktarında kullanılmıştır.

MATrp: Açık adı N-metakriloil-amidotriptofan ise SPR çip yüzeyinde cMyBP-C tanıma bölgelerine sahip poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) P(HEMA-MATrp) polimerik film sentezinde monomer olarak 0.6 mmol miktarında kullanılmıştır.

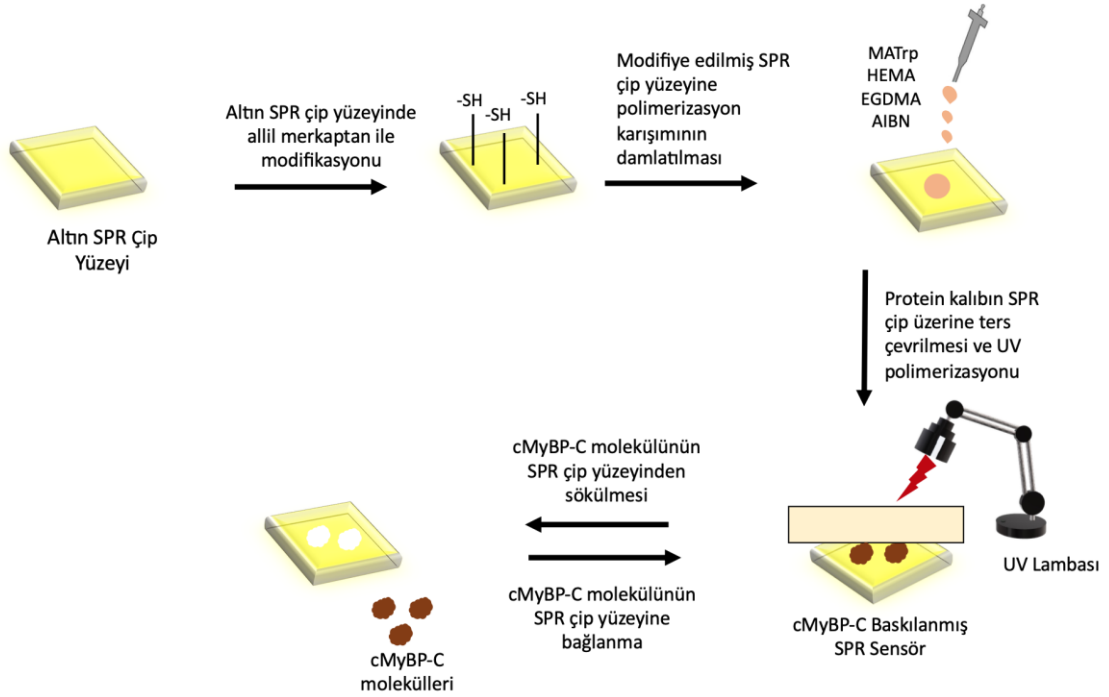
AIBN: Azobisisobutyronitril, polimerizasyon sürecinde radikal başlatıcı olarak kullanılırken 4 mg miktarında kullanılmıştır.

HEMA: 2-Hidroksietil metakrilat, sensör yüzeyinde polimerizasyon için fonksiyonel monomer olarak kullanılırken 0.2 mmol miktarında kullanılmıştır.

EGDMA: Etilen glikol dimetakrilat, çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılırken 0.4 mmol miktarında kullanılmıştır.

Protein kalıbı ile allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipi ile birleştirilmeden önce bir monomer karışımı hazırlanmıştır. İlk olarak, cMyBP-C baskılanmış poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) (poli(HEMA-MATrp)) polimerik film için 0.6 mmol MATrp monomeri, 0.2 mmol fonksiyonel monomer HEMA ve 0.4 mmol çapraz bağlayıcı EGDMA eklenerek polimerizasyon çözeltisi hazırlanmış ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu karışıma, polimerizasyon sürecini başlatmak için 4 mg AIBN eklenir. Bu monomer karışımından 4 µL SPR çip yüzeyine damlatılmıştır. Daha sonra hazırlanan protein kalıbının olduğu cam slayt SPR çip yüzeyine ters çevrilerek kapatılmış ve UV lambası altında (100 W, 365 nm) 20 dakika boyunca

polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. SPR çiplerin hazırlanması basamakları şekil 3.2’de verilmiştir. Polimerizasyon işleminden sonra protein kalıbı yüzey SPR çip yüzeyinden alınmıştır. Polimer kaplanmış SPR çipler 10 mM fosfat tamponu (pH 7.4), distile su ve etanol ile yıkanmıştır.



Şekil 3.2- cMyBP-C baskılanmış SPR çip yüzey hazırlanmasının şematik gösterimi

- **Baskılanmamış poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) (Poli(HEMA-MATrp)) SPR Sensörlerinin Hazırlanması**

Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) SPR sensörün hazırlanması içinde aynı polimerizasyon adımları uygulanmıştır. Sadece, protein kalıbın hazırlanmasında son aşamada modifiye edilmiş cam yüzeyler 10 ml 300 ng/mL cMyBP-C çözeltisinde bekletilmemiştir. Bu sayede, SPR çip yüzeyinde kalıp molekül cMyBP-C’e ait herhangi bir spesifik boşluk oluşmamış ve SPR çip yüzeyi sadece kalıp molekül içermeyen polimerik film bulunmaktadır.

### 3.5. Karakterizasyon Çalışmaları

#### 3.5.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), geniş materyal yelpazesi üzerinde nanometrik ölçekte yüksek çözünürlüklü görüntüleme sağlayan gelişmiş bir analitik teknolojidir. Bu cihaz, polimerlerden seramiklere, camdan biyolojik numunelere kadar çeşitli yüzeyleri detaylı bir şekilde analiz etmek, polimer yapıları gözlemlemek ve moleküler düzeydeki etkileşimleri incelemek için kullanılmaktadır [67]. Çalışmada, Nanomagnetics Instruments tarafından üretilen bir atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak modifiye edilmemiş, cMyBP-C molekülü ile baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) polimerik temelli SPR çip yüzeylerinin detaylı karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

SPR çipleri, yapısal bütünlüklerini korumak ve yüzey taraması sırasında stabil bir konumda tutmak için çift taraflı karbon bant kullanılarak örnek tutucuya sabitlenmiştir. Tarama işlemleri, hava ortamında yarı temas modunda yapılmıştır. Bu mod, örnekle prob arasındaki minimal etkileşimi sağlayarak yüzeyin doğal yapısını bozmadan detaylı görüntüler elde etmeye olanak tanır. Mikroskop, 341.30 kHz salınım rezonans frekansında çalıştırılmış olup, titreşim ve boş titreşim genlikleri sırasıyla 1 VRMS ve 2 VRMS olarak ayarlanmıştır. Bu parametreler, yüzeyin yüksek çözünürlükte taranmasını ve atomik düzeyde pürüzlülük ölçümlerinin yapılmasını sağlar.

Örneklerin taraması, yüksek çözünürlük gerektiren uygulamalar için uygun olan 256x256 piksel çözünürlükte gerçekleştirilmiştir. Tarama hızı 2  $\mu\text{m/s}$  olarak belirlenmiş olup, bu hız, yüzey özelliklerinin tarama sırasında yeterince ayrıntılı olarak kaydedilmesini sağlamak için optimize edilmiştir. Her bir örnek için 2x2  $\mu\text{m}^2$  lik alanlar taranarak, yüzeyin lokal heterojenliklerini ve nano ölçekteki yapısal farklılıkları gözleme imkanı sunulmuştur.

Bu detaylı tarama yöntemi sayesinde, modifiye edilmemiş, MIP ve NIP yüzeylerin pürüzlülük değerleri başarıyla elde edilmiş, böylece cMyBP-C molekülünün yüzeylere baskılama işleminin etkinliği ve polimer matrisin yapısal özellikleri üzerindeki etkileri moleküler düzeyde değerlendirilmiştir. Atomik kuvvet mikroskobu, yüzey

modifikasyonlarının nano ölçekteki etkilerini kapsamlı bir şekilde analiz etmek ve bu yüzeylerde gerçekleşen moleküler etkileşimleri anlamak için değerli bir araç olarak ön plana çıkmaktadır.

### **3.5.2. Temas Açısı Ölçümleri**

KRUSS DSA100 cihazı kullanılarak yürütülen su temas açısı ölçümleri, SPR sensör yüzeylerinin hidrofilik ve hidrofobik özelliklerinin belirlenmesinde temel bir yöntemdir. Bu analiz, Hamburg, Almanya'dan temin edilen ileri teknolojiye sahip bir cihaz aracılığıyla gerçekleştirilmekte olup, sensör yüzeylerinin su damlaları ile etkileşimini mikroskopik düzeyde incelemeyi mümkün kılar. Bu ölçümler, yüzey modifikasyonlarının su ile olan etkileşim kabiliyetleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve sensör performansını anlamak için kritik öneme sahiptir.

**Ölçüm Metodolojisi:**

**Yüzey Hazırlama ve Su Damlası Uygulama:**

SPR sensör yüzeylerine, dikkatle kontrol edilen miktarlarda su damlatılarak, her bir yüzey bölgesinde homojen damla dağılımı sağlanmıştır. Yüzey özelliklerine göre su damlasının yayılma şekli, yüzeyin hidrofilik veya hidrofobik karakteristiğini belirlemede temel bir gösterge olarak kullanılmıştır.

**Görsel Kayıt ve Analiz:**

Her bir damla için yüksek çözünürlüklü fotoğraflar çekilmiştir. Bu fotoğraflar, temas açısının belirlenmesinde kullanılmak üzere detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. KRUSS DSA100'e entegre edilen DSA2 yazılımı, bu fotoğraflardaki damlaların konturlarını analiz ederek, damlanın yüzey ile oluşturduğu açıyı otomatik olarak hesaplamaktadır.

**Temas Açısı Hesaplamaları ve İstatistiksel Analiz:**

Her bir yüzey bölgesi için yapılan en az on farklı ölçüm, istatistiksel bir analize tabi tutulmuştur. Bu ölçümlerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak, yüzeylerin nihai temas açıları belirlenmiştir. Bu istatistiksel işlemler, elde edilen verilerin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırmak için kritik öneme sahiptir.

### Ölçümlerin Değerlendirilmesi:

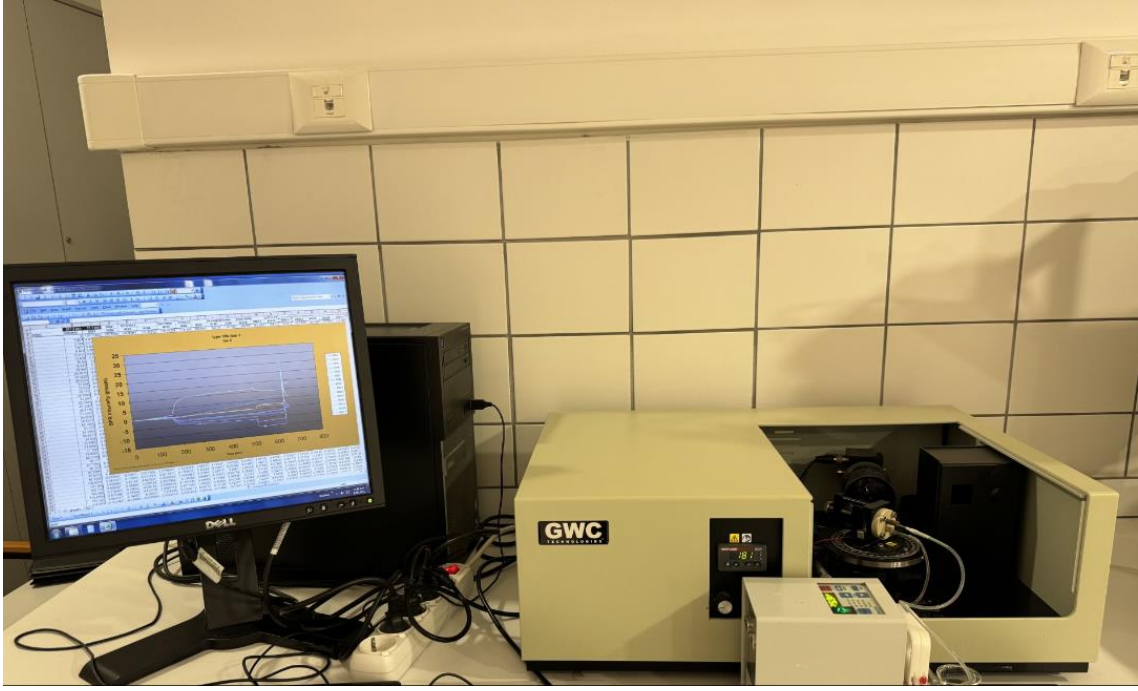
Yapılan bu ölçümler sayesinde, modifiye edilmemiş ve çeşitli yüzey modifikasyonlarına sahip SPR sensör yüzeylerinin suyla etkileşim kabiliyetlerindeki değişiklikler objektif bir şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen temas açısı verileri, yüzeylerin su damlaları ile olan etkileşimlerini ve bu etkileşimlerin biyomoleküler tespit sistemlerindeki potansiyel uygulamalarını aydınlatmaktadır. Sonuçlar, sensör yüzeylerinin performansının ve su itme özelliklerinin, yüzey modifikasyonlarına bağlı olarak nasıl değiştiğini göstermektedir, bu da yüzey tasarımı ve işlevselliği üzerine önemli etkiler yaratmaktadır. Bu tür detaylı yüzey karakterizasyonları, sensörlerin geliştirilmesi ve optimize edilmesi açısından vazgeçilmezdir.

### 3.5. Kinetik Analizi

cMyBP-C proteininin tayini için 0.05 ng/mL ile 300 ng/mL arasında geniş bir derişim aralığında cMyBP-C çözeltileri, 10 mM fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, biyolojik deneylerde sıklıkla kullanılan standart bir tampon çözeltilisi olan fosfat tamponu içinde hazırlanmış olup, pH 7.4 fosfat tamponu, cMyBP-C proteininin biyolojik aktivitesi için uygun bir ortam sağlamaktadır.

Belirtilen derişimlerde cMyBP-C çözeltileri titizlikle hazırlanmış ve belirlenen sıralama göre sistem üzerinden sekansiyel olarak geçirilmiştir (Şekil 3.3). Bu prosedür, her bir konsantrasyon için cMyBP-C moleküllerinin sensör yüzeyi ile etkileşiminin incelenmesine olanak tanımıştır.

Her bir konsantrasyon seviyesi için sensorgramlar gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir. Sensorgramlar, sensör yüzeyindeki cMyBP-C moleküllerinin bağlanma kinetiğini ve miktarını yansıtan ışığın kırılma indisi ( $\Delta R$ ) grafiksel olarak gösterir. Bu optik yoğunluk değişimleri, cMyBP-C proteininin yüzeye bağlanma kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir. Elde edilen  $\Delta R$  değerleri, cMyBP-C konsantrasyonlarına karşı grafiğe çizilmiştir. Bu işlem, düşükten yüksek konsantrasyona doğru kademeli olarak gerçekleştirilmiş, her bir derişim değeri için  $\Delta R$  değerleri belirlenerek bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 3.3 - SPR Sensör Analiz Cihazı

Kalibrasyon grafiği, 300, 150, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ve 0.05 ng/mL gibi spesifik konsantrasyon değerlerini içermekte olup, bu değerler cMyBP-C konsantrasyonunun hassas bir şekilde tespit edilmesine imkan tanımaktadır. Aynı zamanda farklı derişimler için ölçüm süreleri eşit tutulmuş ve karşılaştırma için birbiriyle eş ölçekte grafikler elde edilmiştir. Her farklı derişimin ölçümü için sistemden 2 dakika tampon çözeltisi, 6 dakika cMyBP-C çözeltisi ve son olarak 2 dakika desorpsiyon (%10'luk Etilen Glikol) çözeltisi geçirilmiş ve tüm analiz süresi toplam 10 dakikadır. Bu ölçüm ve değerlendirme yöntemi, cMyBP-C proteininin konsantrasyonunun doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesini sağlamakta olup, sensör yüzeyindeki moleküler etkileşimlerin kuantitatif olarak analiz edilmesine olanak vermektedir. Elde edilen kalibrasyon grafiği, sensör teknolojisinde cMyBP-C tespiti için bir referans noktası olarak kullanılabilir, böylece biyolojik örneklerde cMyBP-C konsantrasyonlarının hızlı ve etkin bir şekilde belirlenmesi mümkün hale gelmektedir.

### 3.5.1. İzotermler ve Bağlanma Kinetikleri

İzoterm modelleri, belirli bir biyomolekülün SPR sensör yüzeyine bağlanma davranışını anlamak için gereklidir. İzoterm modelleri, bu bağlanma süreçlerinin mekanizmalarını ve

yüzey özelliklerini detaylı bir şekilde analiz etmek için kullanılır. Her bir model, farklı yüzey bağlanma senaryolarını ve adsorpsiyon süreçlerini açıklamak için geliştirilmiştir.

Langmuir izoterm modeli, adsorpsiyon süreçlerinin homojen yüzeylerde ve tek katmanlı adsorpsiyonun gerçekleştiği durumlar varsayımına dayanır ve her bağlanma yerinin eşit enerjide olduğunu öngörür. Bu model, tek katmanlı (monolayer) adsorpsiyonun karakterize edilmesinde kullanılır. Modelin temel denklemi, adsorbanın yüzeyine bağlanan moleküllerin miktarını tanımlayan bir denge ilişkisidir.

$$\Delta R = \Delta R_{\max} C / K_D + C \quad (3.1)$$

$\Delta R$ : Sensör yüzeyinde bağlanan madde miktarı (genellikle yanıt veya sinyal birimi cinsinden).

$\Delta R_{\max}$ : Yüzeydeki maksimum bağlanma kapasitesi (sinyal birimi).

$K_D$ : Dissosiyasyon sabiti, bağlanma dengesi ile ilgili parametre (ng/mL).

$C$ : Çözelti konsantrasyonu (ng/mL).

Freundlich izoterm modeli, heterojen yüzeylerdeki ve çok katmanlı adsorpsiyon süreçlerinin analizinde kullanılır. Bu model, adsorpsiyonun yüzeydeki bağlanma yerlerinin heterojen olduğunu ve bu yerlerin farklı enerjilere sahip olabileceğini varsayar. Freundlich denklemi, genellikle yüzey üzerindeki adsorban yoğunluğunun logaritmik bir fonksiyonu olarak ifade edilir.

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \cdot C^{1/n} \quad (3.2)$$

$\Delta R$ : Sensör yüzeyinde bağlanan madde miktarı (sinyal birimi).

$1/n$ : Heterojenlik faktörü, adsorpsiyon yoğunluğunu gösterir

$C$ : Çözelti konsantrasyonu (ng/mL).



Langmuir-Freundlich izoterm modeli, Langmuir ve Freundlich modellerinin özelliklerini birleştirerek hem homojen hem de heterojen yüzeyler için uygulanabilir hale gelir. Bu model, hem tek katmanlı hem de çok katmanlı adsorpsiyonu açıklamada kullanılır.

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \frac{C^{1/n}}{K_D + C^{1/n}} \quad (3.3)$$

$\Delta R$ : Sensör yüzeyinde bağlanan madde miktarı (sinyal birimi).

$\Delta R_{\max}$ : Yüzeydeki maksimum bağlanma kapasitesi (sinyal birimi).

$1/n$ : Heterojenlik faktörü, adsorpsiyon yoğunluğunu gösterir.

$C$ : Çözelti konsantrasyonu (ng/mL).

$K_D$ : Dissosiyasyon sabiti, bağlanma dengesi ile ilgili parametre (ng/mL).

Bu izoterm modelleri, adsorpsiyon sürecinin doğasını ve yüzeyin bağlanma kapasitesini belirlemeye yardımcı olur. Deneysel olarak elde edilen veriler, bu modellerle uyumlu olduğunda, biyomolekülün bağlanma davranışı hakkında detaylı bilgi sağlanır. Bu bilgiler, sensör tasarımı ve geliştirilmesi sürecinde kritik öneme sahiptir ve sensörlerin performansını optimize etmek için kullanılır. Özetle, izoterm modellerinin kullanımı, biyomoleküllerin yüzeylere bağlanma davranışını anlamak, yüzey özelliklerini karakterize etmek ve adsorpsiyon süreçlerini optimize etmek için gereklidir. Bu deney, biyomolekül-sensör etkileşimlerini anlamak ve gelecekteki sensör uygulamalarında daha etkili çözümler geliştirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı ideal birinci derece koşullar altında, bağlanma aşağıdaki şekilde ifade edilir;

$$d\Delta R/dt = k_a \cdot C \cdot (\Delta R_{\max} - \Delta R) - k_d \cdot \Delta R \quad (3.4)$$

Burada,

$d\Delta R/dt$ , SPR sinyalinin değişim hızı;

$R$  ve  $R_{\max}$ , bağlanma ile ölçülen maksimum sinyal;

$C$ , analit derişimi (ng/mL),

$k_a$ , bağlanma hız sabiti (mL/ng.s) ve

$k_d$ , ayrılma hız sabiti (1/s)'dir.

Bağlanma sabiti  $K_A$  (mL/ng),

$k_a$  ve  $k_d$  sabitlerinin oranından hesaplanır ( $K_A = k_a / k_d$ )

Denge durumunda,  $d\Delta R/dt = 0$  alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{\text{denge}} / C = K_A \cdot \Delta R_{\text{max}} - K_A \cdot \Delta R_{\text{denge}} \quad (3.5)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti  $K_A$ ,  $\Delta R_{\text{denge}} / C$ 'ye karşı  $\Delta R_{\text{denge}}$  grafiğinden hesaplanır.

Ayrılma sabiti  $K_D$ ,  $K_A$ 'nın tersidir, yani  $K_D = 1/K_A$  şeklinde hesaplanır.

Eşitlik kullanılarak,  $K_D$  yerine  $k_d/k_a$  yazılırsa, denklem aşağıdaki şekilde yeniden düzenlenir:

$$d\Delta R/dt = k_a \cdot C \cdot \Delta R_{\text{max}} - (k_a \cdot C + k_d) \cdot \Delta R \quad (3.6)$$

Bu denklemden elde edilen doğrunun eğimi  $-(k_a \cdot C + k_d)$  olup, bu, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen  $d\Delta R/dt$ 'ye karşı  $\Delta R$  grafiğidir. Başlangıç bağlanma hızı analitiğinin doğrusallığının sağlanması, belirli bir analitin yüzeye bağlanma hızının başlangıç konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu gösterir. Bu nedenle, bir analitin belirli bir konsantrasyonu ile bağlanma hızı arasındaki ilişkiyi belirlemek için başlangıç bağlanma hızı analitiği kullanılabilir.

$\Delta R_{\text{max}}$  değeri bilindiğinde, tek bir sensorgram kullanarak  $k_a$  (bağlanma hızı sabiti) ve  $k_d$  (ayrılma hızı sabiti) değerleri belirlenebilir. Ancak, bu yöntemin uygulanabilmesi için genellikle yüzey doygunluğu sağlayacak yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulur. Bu, deneysel olarak  $\Delta R_{\text{max}}$ 'ın doğru bir şekilde belirlenmesini zorlaştırabilir. Bu nedenle, farklı analit konsantrasyonlarında alınan bağlanma sensorgramları tercih edilmektedir. Bu yaklaşım, çeşitli konsantrasyonlarda bağlanma hızlarının değerlendirilmesine ve sonrasında bu verilerin analiz edilmesine imkan tanır.  $d\Delta R/dt$ 'ye karşı  $\Delta R$  grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkilendirilen bir eğim değeri (S) sunar. Bu eğim, bağlanma ve ayrılma hız sabitleri ile ilişkilidir; dolayısıyla bu grafiklerin analizi, analitin bağlanma kinetiğinin daha detaylı anlaşılmasına yardımcı olabilir.

$$S = k_a \cdot C + k_d \quad (3.7)$$

Bu denklem, ilgili hız sabitlerinin bağlanma ve ayrılma süreçlerine etkilerini ve bu süreçlerin analizin geneline katkısını gösterir. S'ye karşı C grafiği, eğimi  $k_a$  olan bir doğru verir ve teorik olarak kesim noktası  $k_d$  değerini vermelidir. Ancak,  $k_a \cdot C / k_d$  olduğu durumlarda  $k_d$  hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir bir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d \cdot (t - t_0) \quad (3.8)$$

Burada,  $\Delta R_0$  ve  $\Delta R_t$ , ayrılma eğrisindeki  $t_0$  ve  $t$  anlarındaki SPR sinyal değerleridir.

Bağlanma kinetik analizi, belirli bir biyomolekülün (bu çalışma için cMyBP-C) yüzey plazmon rezonansı (SPR) sensör yüzeyine bağlanma hızını incelemek için kullanılır. Bu analiz, biyomolekül ve sensör yüzeyi arasındaki etkileşimlerin zaman içindeki dinamiklerini anlamak amacıyla gerçekleştirilir. Bağlanma kinetik yaklaşımı, cMyBP-C moleküllerinin farklı konsantrasyonlarda sensör yüzeyine nasıl bağlandığını ve bu bağlanma hızının nasıl değiştiğini belirlemek için kullanılır.

Bağlanma kinetiği analizi, SPR sensör yüzeyine bağlanan cMyBP-C moleküllerinin zaman içindeki miktarını belirlemek için kullanılır. Bu analizde, cMyBP-C derişimi arttıkça bağlanma kinetiğinde bir artış gözlenir. Bağlanma oranı, sensör yüzeyine bağlanan moleküllerin miktarına ve çözelti içindeki cMyBP-C derişimine bağlı olarak değişir. SPR sensörlerinin cMyBP-C moleküllerini tespit etme kapasitesini ve bağlanma kinetiğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bağlanma kinetiği analizi, aşağıdaki nedenlerle yapılmıştır:

**Bağlanma Hızını Belirlemek:** cMyBP-C moleküllerinin sensör yüzeyine bağlanma hızını belirlemek ve bu hızın cMyBP-C derişimi ile nasıl değiştiğini anlamak.

**Kinetik Parametreleri Elde Etmek:** Bağlanma kinetik eğrisinden kinetik parametreleri (örneğin, bağlanma hızı sabiti) elde etmek ve bu parametrelerin cMyBP-C tespiti üzerindeki etkisini değerlendirmek.

**Sensör Performansını Değerlendirmek:** SPR sensörlerinin cMyBP-C tespitinde ne kadar etkili olduğunu ve bağlanma kinetiğinin bu tespit üzerindeki rolünü incelemek.

Bağlanma kinetik analizi, biyomoleküllerin sensör yüzeyine bağlanma hızını ve bu hızın çözelti derişimine bağımlılığını anlamak için kritik öneme sahiptir. Bu analiz, SPR sensörlerinin biyomoleküler etkileşimleri tespit etme ve değerlendirme kapasitesini

belirlemek için kullanılır. Yüksek doğruluk ve güvenilirlik, bu tür kinetik analizlerin SPR sensörlerinin biyomoleküler etkileşimlerin izlenmesi ve değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini vurgular.

Bağlanma kinetik yaklaşımı, SPR sensörlerinin klinik ve araştırma uygulamalarında biyomolekül tespiti ve etkileşimlerinin analizinde etkin bir araç olduğunu doğrulamaktadır. Bu tür analizler, biyosensörlerin performansını optimize etmek ve biyomoleküler süreçlerin dinamiklerini anlamak için gereklidir.

### **3.5.2.Yarışmacı Proteinler ile Seçicilik Çalışmaları**

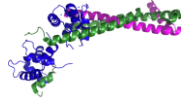
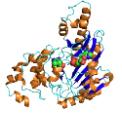

Bu tez çalışmasında, cMyBP-C baskılanmış sensörlerin yarışmacı proteinlere karşı seçiciliği değerlendirilmiştir. Kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C (cMyBP-C), kardiyak troponin T (cTnT) ve kreatin kinaz (CK-MB) gibi kalp hastalıklarında kritik öneme sahip proteinler bu analizler için kullanılmıştır. cMyBP-C baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörün seçiciliği için cMyBP-C molekülüne karşı benzer molekül yapısı ve molekül ağırlıklarına göre kardiyak troponin T (cTnT) ve kreatin kinaz (CK-MB) yarışmacı ajan olarak seçilmiş ve kinetik analizler yapılmıştır.

Her bir protein için, pH 7.4 değerinde 10 mM fosfat tamponu içerisinde 100 ng/mL konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde düzenlenerek sırasıyla cMyBP-C baskılanmış SPR sistemine enjekte edilmiştir. Çözelti kombinasyonları şunları içermektedir: cTnT, CK-MB, cMyBP-C, cTnT/cMyBP-C, CK-MB/cMyBP-C, cTnT/CK-MB ve cTnT/CK-MB/cMyBP-C. Seçicilik kinetik analizlerinde 2 dakika pH 7.4 fosfat tamponu, 6 dakika adsorpsiyon çözeltisi ve 2 dakika %10'luk etilen glikol desorpsiyon çözeltisi SPR sistemine verilmiş ve analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir.

cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerde, her bir protein ve protein kombinasyonu için sensorgramlar kaydedilmiştir. Bu sensorgramlar, sensör yüzeyinde gerçekleşen protein-protein etkileşimlerinin kinetiklerini ve bağlanma dinamiklerini detaylı bir şekilde görselleştirir. Sensorgramlar, yüzeydeki bağlanma olaylarını ve ilgili proteinlerin sensör üzerindeki dinamiklerini belgelemek için kullanılmıştır.

Elde edilen sensorgramlar üzerinden analiz yapılarak, cMyBP-C baskılanmış sensörlerin cTnT, CK-MB ve cMyBP-C'ye karşı gösterdiği bağlanma kapasitesi ve seçicilik değerlendirilmiştir. Bu analizler, tekli, ikili ve üçlü protein kombinasyonları arasındaki etkileşim gücünü ve özgülüğünü kapsamlı bir şekilde ortaya koymaktadır. Bağlı seçicilik katsayıları, yüzeylerin her bir protein veya protein kombinasyonuna olan spesifik bağlanma eğilimlerini belirlemekte ve yarışmacı proteinler arasındaki seçicilik katsayıları incelenmiştir.

Çizelge 3.1 - Seçicilik çalışmalarında kullanılan yarışmacı proteinler ve özellikler

Protein	Molekül Ağırlığı (kDa)	İzoelektrik Noktası (pI)	Şekil
<b>Kardiyak Troponin T (cTnT)</b>	37 kDa	5.2	
<b>Kreatin Kinaz (CK-MB)</b>	86 kDa	5.5	
<b>Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein-C (cMyBP-C)</b>	140 kDa	5.5	

Seçicilik katsayısı (k), bir sensörün belirli bir analite karşı duyarlılığını ve seçiciliğini belirlemek için kullanılır. Bu katsayı, hedef molekülün (analitin) sensör yüzeyine bağlanma yanıtının ( $\Delta R$ ) başka bir molekülün bağlanma yanıtına oranı olarak tanımlanır.

$$k = \frac{\Delta R_{\text{analit}}}{\Delta R_{\text{referans}}} \quad (3.9)$$

$\Delta R_{\text{analit}}$ : Hedef molekülün (analit) sensör yüzeyine bağlanma yanıtı.

$\Delta R_{\text{referans}}$ : Referans molekülün (yarışmacı molekül) sensör yüzeyine bağlanma yanıtı.

Bağıl seçicilik katsayısı, MIP ve NIP sensör arasındaki seçicilik farkını değerlendirmek için kullanılır. Bu katsayı, MIP sensöründeki seçicilik katsayısının NIP sensöründeki seçicilik katsayısına oranı olarak tanımlanır.

$$k' = k_{MIP} / k_{NIP} \quad (3.10)$$

$k_{MIP}$ : MIP sensöründeki seçicilik katsayısı.

$k_{NIP}$ : NIP sensöründeki seçicilik katsayısı.

### 3.5.3. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

cMyBP-C baskılanmış sensörlerin dayanıklılığı ve sürdürülebilirliği, tekrarlı kullanım ve uzun süreli performans testleriyle detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu çalışma, cMyBP-C baskılanmış sensörlerin klinik ve laboratuvar ortamlarında karşılaşılabilecek sık ve yoğun kullanım koşullarına uygunluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır.

cMyBP-C baskılanmış sensörlere, pH 7.4 olan 10 mM fosfat tamponu içinde çözülen 100 ng/mL konsantrasyonundaki cMyBP-C çözeltileri 4 kez art arda enjekte edilmiştir. Bu sıkı test süreci, sensörlerin sürekli kullanım sırasında karşılaşılabilecekleri zorlayıcı koşullar altında performansını değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu tez çalışması kapsamında, 1., 2., 4., ve 6. aylarda da cMyBP-C baskılanmış sensörlerin performansı tekrar tekrar değerlendirilerek, zaman içindeki performans değişiklikleri izlenmiştir. Farklı aylarda yapılan kinetik analizlerde ise 2 dakika dengeleme tamponu olan pH 7.4 fosfat tamponu, 6 dakika adsorpsiyon çözeltisi ve 2 dakika %10'luk etilen glikol desorpsiyon çözeltisi SPR sistemine verilmiş ve analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir.

Her bir enjeksiyon sonrasında ve belirlenen zaman dilimlerinde, sensörden alınan optik yanıtlar ( $\Delta R$ ) ölçülmüştür.  $\Delta R$  değerleri, sensör yüzeyine bağlanan cMyBP-C proteinlerinin miktarından kaynaklanan ışık yansımasındaki değişiklikleri temsil eder. Bu değerler, sensörün bağlanma kapasitesi ve işlevsel bütünlüğünün korunup korunmadığını göstermek için kullanılmıştır. Ölçülen  $\Delta R$  değerleri üzerinden, sensör yüzeyinin protein bağlanma etkinliğinin zamanla nasıl değiştiği detaylı bir şekilde analiz edilmiştir.

### 3.5.4. Yapay Plazma Çözeltisi ile Kinetik Analizler

cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün gerçek örnek olarak yapay plazma çözeltisinde cMyBP-C tayini test edilmiştir. Yapay plazma çözeltisi kullanılarak farklı derişimlerde

50 ve 100 ng/mL cMyBP-C çözeltiler hazırlanmış ve kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Yapay plazma çözeltisi kullanımı, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerinin hastalık örneklerindeki tespit kapasitesini standardize etmek ve doğrulamak amacıyla kritik öneme sahiptir.

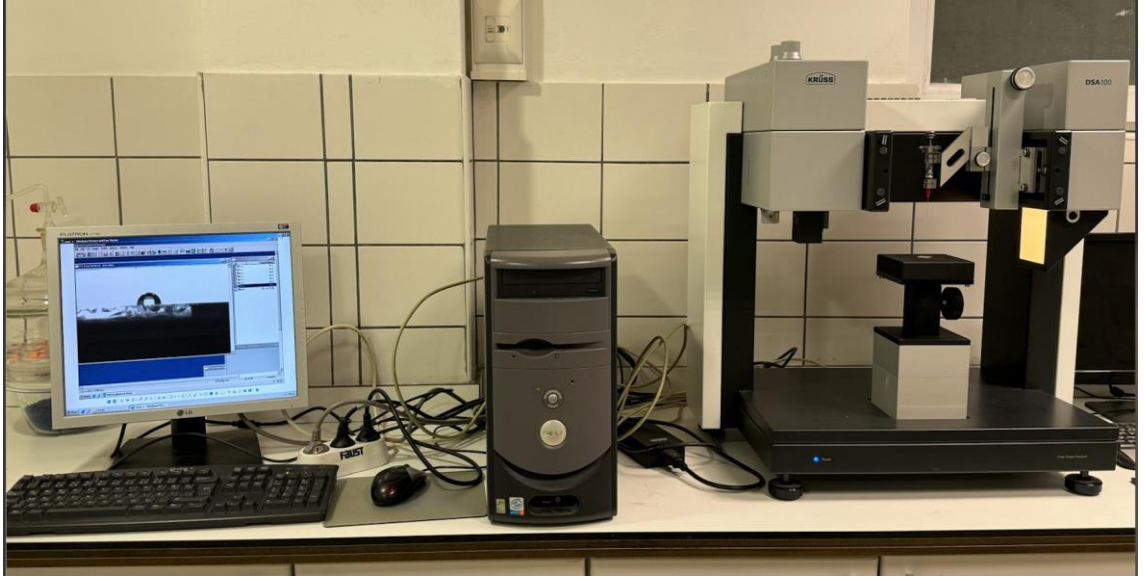
Yapılan ölçümler, enzim bağılı immünosorbent deneyi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma, SPR sensör platformunun ELISA gibi standart yöntemlere göre performansını objektif bir şekilde değerlendirmek için kullanılmıştır. Karşılaştırmalı analizler, cMyBP-C baskılanmış SPR çiplerinin, yapay plazma çözeltisi ile hazırlanan örneklerde ELISA sonuçlarına göre hastalık örneklerindeki cMyBP-C seviyelerini ne derecede doğru ve güvenilir bir şekilde tespit edebildiğini göstermektedir.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. SPR Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

#### 4.1.1. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi ve cMyBP-C baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin temas açıları yapışık damla yöntemi ile KRUSS DSA100 cihazı ile ölçülmüştür (Şekil 4.1).

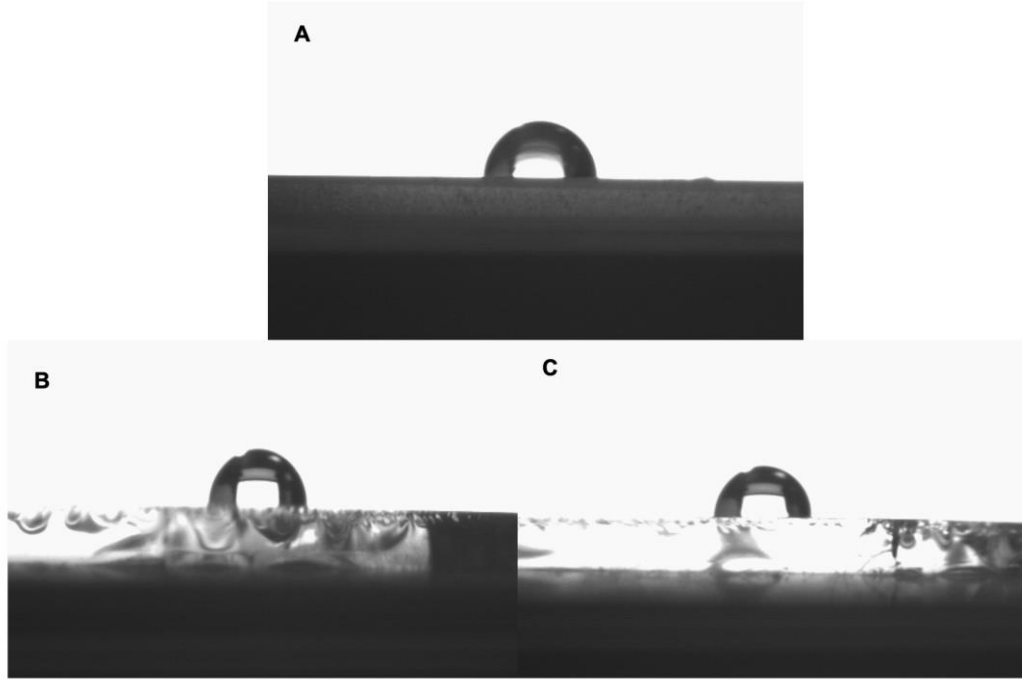


Şekil 4.1- KRUSS DSA100 cihazı

Bütün çip yüzeylerine bir damla su damlatılmış ve 5 farklı temas açısı ölçümlerini ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı  $79.1^\circ$  iken, cMyBP-C baskılanmış SPR sensör yüzeyinin (MIP) temas açısı  $83.3^\circ$  iken baskılanmamış SPR sensör yüzeyinin (NIP) temas açısı  $82.4^\circ$ 'dür (Şekil 4.2). Baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeyindeki polimerik filmin yapısında bulunan kalıp molekül cMyBP-C ve MATrp monomeri hidrofobik özelliklerindedir. Bu sebepten dolayı baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerinin temas açıları modifiye edilmemiş SPR çip yüzeye göre artmıştır. Bu sonuçlar, yüzey modifikasyonlarının etkinliğini ve cMyBP-C'nin yüzeye başarılı bir şekilde baskılandığını doğrulamaktadır. MIP yüzeyinin daha yüksek temas açısına sahip olması, yüzeyin suyu itme yeteneğini artırmış ve bu da hidrofobik karakterin belirginleştiğini



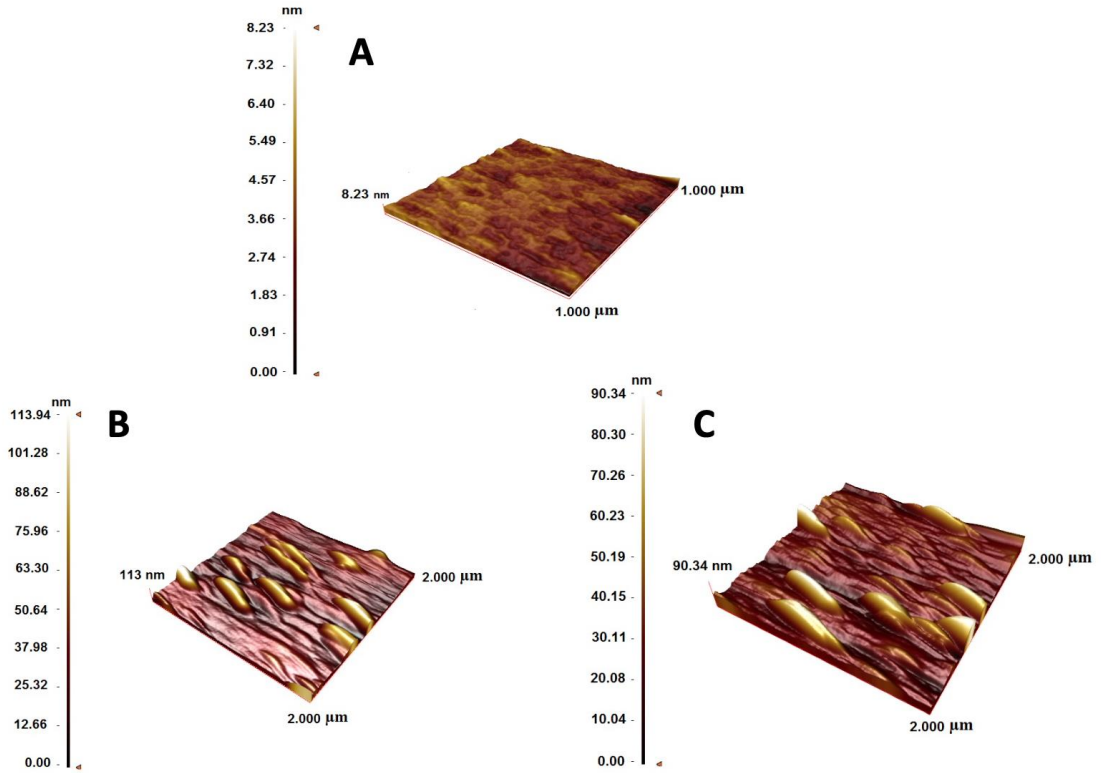
göstermektedir. Bu tür yüzey modifikasyonları, biyomoleküllerin tespiti ve sensör yüzeylerinin optimize edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.



Şekil 4.2-SPR sensör yüzeylerinin temas açılarının fotoğrafı; Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), cMyBP-C baskılanmış (MIP) (B) ve Baskılanmamış NIP (C) SPR sensör yüzeyleri

#### 4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, cMyBP-C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR sensör yüzeylerinin yüzey pürüzlülükleri AFM cihazı kullanılarak karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, cMyBP-C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR sensör yüzeylerinin pürüzlülüğü sırası ile 8.23 nm, 113.94 nm ve 90.34 nm bulunmuştur. AFM sonuçları incelendiğinde modifiye edilmiş SPR çip yüzeylerine cMyBP-C baskılamanın başarılı bir biçimde gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3- SPR sensör yüzeylerin yarı temas modunda alınan AFM görüntüleri; A) Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, B) MIP sensör yüzeyi, C) NIP sensör yüzeyi

## 4.2. Kinetik Analizler

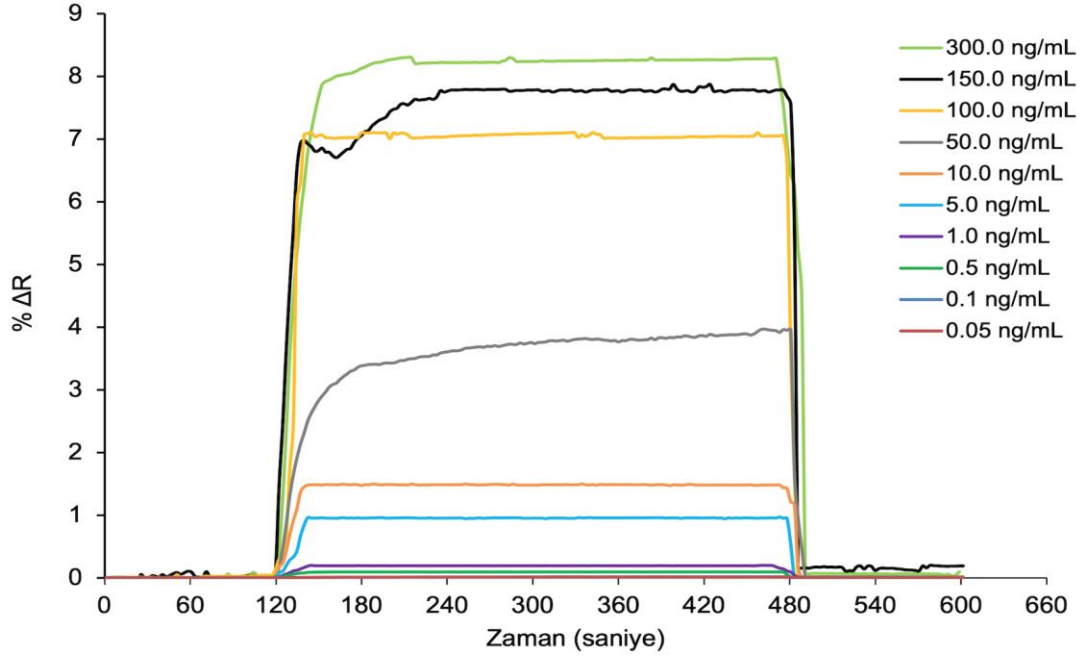
Farklı derişimlerde cMyBP-C sulu çözeltilerinden ve yapay plazma örneklerinden gerçek zamanlı olarak cMyBP-C tespit edebilmek için cMyBP-C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR sensörler hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasında, kinetik çalışmalar için GWC, SPRImager II (WI, ABD) marka SPR cihazı kullanılmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan sulu cMyBP-C çözeltileri sisteme ayrı ayrı verilerek SPRview programı ile rezonans frekansındaki değişimler anlık olarak kaydedilmiş ve kinetik analiz sonuçları Şekil 4.4’de verilmiştir. Kinetik analiz deneyleri üç ana adımdan oluşur:

İlk 2 dakika: pH 7.4 fosfat tamponu ile deney başlatılır. Bu adım, SPR sensör yüzeyinin dengelenmesi ve stabilize edilmesi amacıyla gerçekleştirilir. Fosfat tamponu, sensör yüzeyindeki herhangi bir geçmiş etkileşimin temizlenmesine ve yüzeyin yeni protein eklemeleri için uygun hale getirilmesine yardımcı olur.

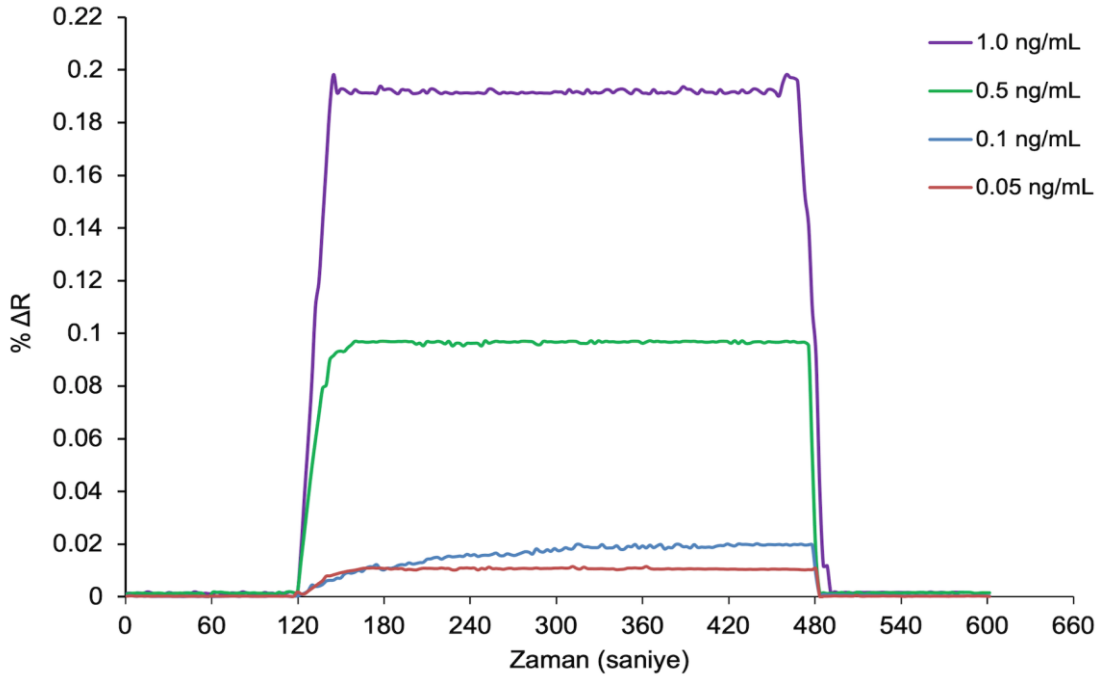
Ardından 6 dakika: Farklı derişimlerde cMyBP-C çözeltileri sensör yüzeyine uygulanır. Bu süreçte, proteinin sensör yüzeyine bağlanması ve bu bağlanmanın kinetiği incelenir. Daha yüksek derişimlerde daha fazla protein bağlanması ve bu bağlanmanın yüzeyde nasıl doygunluk yarattığı gözlemlenir.

Son 2 dakika: %10'luk etilen glikol içeren desorpsiyon sıvısı ile yıkama işlemi yapılır. Bu adım, bağlanmış proteinlerin yüzeyden çözülmesi ve desorbe edilmesi (yüzeyden ayrılması) için kullanılır. Bu işlem, bağlanmanın ne kadar güçlü olduğunu ve proteinin yüzeyden ne kadar kolay ayrılabilmesini değerlendirmek için önemlidir.

**A**



**B**

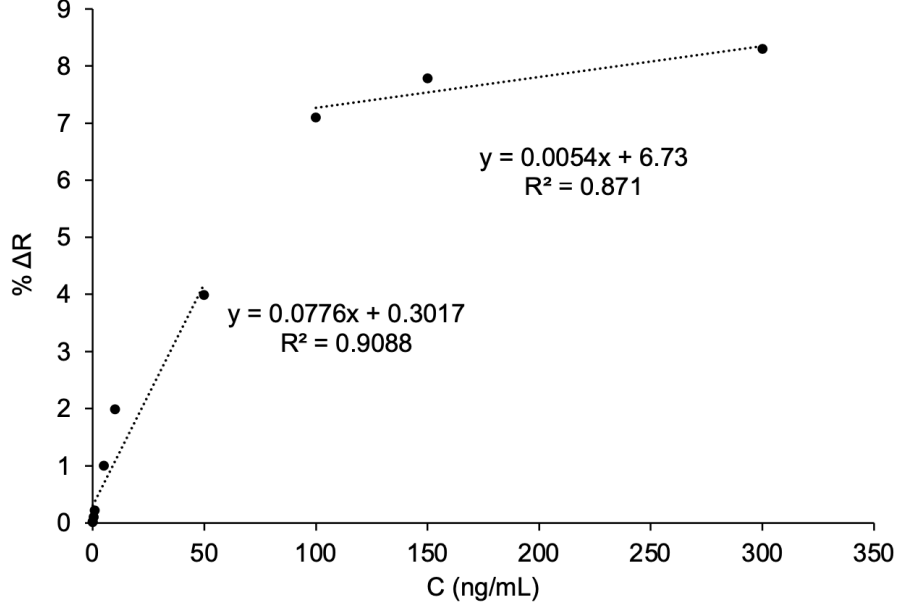


Şekil 4.4- cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün 0.05-300.0 ng/mL (A) ve 0.05-1.0 ng/mL (B) arasındaki farklı derişimlerde hazırlanan cMyBP-C çözeltileri ile yapılan kinetik analizlerde ait SPR sensorgramları

Şekil 4.4'deki veriler, sensör yüzeyindeki bağlanmanın derişimle doğrusal bir ilişki içinde olduğunu ve yüksek derişimlerde daha fazla cMyBP-C'nin bağlandığını göstermektedir. Ayrıca, yüksek derişimlerdeki hızlı artış ve sabitlenme, sensör yüzeyinin doygunluk kapasitesine ulaştığını göstermektedir. Bu kinetik analizler, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerinin geniş bir derişim aralığında cMyBP-C'yi yüksek duyarlılıkla tespit edebildiğini göstermektedir. Yüksek derişimlerde (300.0 ng/mL) sensör yüzeyinde doygunluğa ulaşan belirgin bir bağlanma gözlenirken, düşük derişimlerde (0.05 ng/mL) bile sensör duyarlı bir şekilde cMyBP-C'yi tespit edebilmiştir. Bu sonuçlar, SPR sensörlerinin cMyBP-C tespitinde potansiyel olarak yüksek performanslı ve güvenilir bir araç olduğunu göstermektedir.

Bu veriler, sensörlerin cMyBP-C tespiti için biyomoleküler etkileşimlerin kinetik analizlerini ve bu etkileşimlerin doğrusal bir bağlanma izoterm modeli ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sensör yüzeyindeki bağlanmanın hızının ve doygunluk seviyelerinin, cMyBP-C derişimi ile nasıl değiştiği detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu bulgular, cMyBP-C'nin klinik tespitinde SPR sensörlerinin uygulanabilirliğini desteklemektedir.

cMyBP-C derişimi (C, ng/mL) ile ışığın kırılma indisi değişimi (% $\Delta R$ ) arasındaki ilişki iki farklı doğrusal regresyon modeli ile temsil edilmektedir. Veriler iki farklı doğrusal bölgeyi göstermekte ve bu bölgeler için doğrusal regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları (doğrusallık katsayısı) ( $R^2$ ) hesaplanmıştır.



Şekil 4.5 - 0.05-300 ng/mL aralığında hazırlanan cMyBP-C derişimleri ile %ΔR arasındaki ilişki

0.05-50 ng/mL aralığında %ΔR değeri, cMyBP-C derişimi ile yüksek oranda doğrusal bir ilişki göstermektedir. Yüksek  $R^2$  değeri (0.9088), bu aralıktaki verilerin doğrusal modele iyi uyum sağladığını ve cMyBP-C derişiminin %ΔR değeri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Yani, 0.05-50 ng/mL aralığında cMyBP-C derişimi arttıkça, %ΔR değeri belirgin şekilde artmaktadır. Bu, sensörün düşük derişimlerde yüksek duyarlılıkla çalıştığını ve cMyBP-C'nin bu aralıktaki tespitinin doğrusal bir şekilde arttığını göstermektedir.

50-300 ng/mL aralığı %ΔR değeri, cMyBP-C derişimi ile daha düşük bir eğimle doğrusal bir ilişki göstermektedir.  $R^2$  değeri (0.871), bu aralıktaki verilerin doğrusal modele nispeten iyi uyum sağladığını, ancak önceki aralığa kıyasla biraz daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu, daha yüksek derişimlerde sensör yüzeyinin doyunluğa yaklaşmasıyla göstermektedir.

Sonuç olarak, SPR sensörlerinin cMyBP-C tespiti için geniş bir derişim aralığında etkili olduğunu ve cMyBP-C'nin düşük ve yüksek derişimlerde tespit edilebilirliğini doğrulamaktadır. Düşük derişim aralığında sensör yüksek duyarlılıkla çalışırken, yüksek

derişim aralığında sensör yüzeyi doygunluğa ulaşmakta ve % $\Delta R$  artış hızı azalmaktadır. Bu sonuçlar, cMyBP-C'nin klinik tespitinde SPR sensörlerinin kullanılabilirliğini desteklemekte ve sensörlerin farklı derişim aralıklarında performansını göstermektedir.

#### **4.2.1. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri**

##### **Bağlanma Kinetik Yaklaşımı (A)**

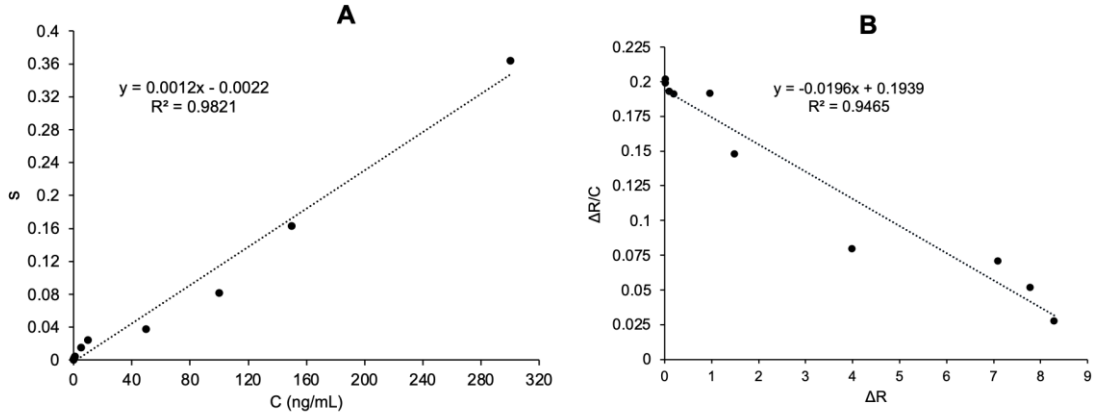
Şekil 4.6(A)'ya bakıldığında cMyBP-C derişimi arttıkça bağlanma kinetiğinin (% $\Delta R$ ) de arttığını göstermektedir. Bu, cMyBP-C moleküllerinin SPR sensör yüzeyine bağlanma oranının, çözelti içindeki cMyBP-C derişimine doğrudan bağlı olduğunu ortaya koyar. Yüksek derişimlerde, sensör yüzeyine daha fazla cMyBP-C molekülü bağlanmakta ve bu da % $\Delta R$ 'nin artmasına neden olmaktadır.

Denklem  $y = 0.0012x - 0.0022$ , cMyBP-C derişimindeki her bir ng/mL artış için % $\Delta R$ 'nin yaklaşık olarak 0.0012 birim arttığını göstermektedir.  $R^2$  değeri 0.9821, modelin verilerle oldukça iyi uyum sağladığını göstermektedir. Bu yüksek uyum değeri, bağlanma kinetiği analizinin güvenilirliğini ve doğruluğunu vurgular. Yüksek  $R^2$ , verilerin doğrusal modele iyi uyduğunu ve regresyon analizinin geçerli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, SPR sensörlerinin cMyBP-C tespitinde bağlanma kinetiğini başarılı bir şekilde gerçekleştirebildiğini göstermektedir. Sensör yüzeyinde bağlanma olaylarının dinamikleri, bu tür kinetik analizlerle etkili bir şekilde değerlendirilebilir. Yüksek doğruluk ve güvenilirlik, SPR sensörlerinin biyomoleküler etkileşimlerin izlenmesi ve değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini vurgular.

##### **Denge analiz yaklaşımı (B)**

Şekil 4.6 (B)'ye bakıldığında SPR sensörlerinde cMyBP-C tespiti için denge analizinin sonuçlarını göstermektedir. Grafik, kırılma indisi değışimi (% $\Delta R$ ) ile denge konsantrasyonu (y) arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Elde edilen doğrusal regresyon denklemi ve  $R^2$  değeri, bu ilişkinin kuvvetini ve doğruluğunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Çizelge 4.1'deki veriler, SPR sensörlerinin cMyBP-C tespiti için kinetik ve denge analizlerinin etkinliğini ve doğruluğunu değerlendirmek için kullanılır. Kinetik analiz verileri, cMyBP-C'nin bağlanma ve ayrılma hızlarını ve yüzeye bağlanma

afinitesini belirlerken, denge analiz verileri sensör yüzeyinin bağlanma kapasitesini ve bağlanma eğilimini gösterir. Her iki analiz de SPR sensörlerinin cMyBP-C tespiti için yüksek performans sergilediğini ve biyomoleküler etkileşimlerin değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.6- Bağlanma kinetik yaklaşımı (A) ve Denge analiz yaklaşımı (B)

Çizelge 4.1- Kinetik hız sabitleri

Bağlanma Kinetik Analizi	Denge Analizi (Scatchard)
$k_a, (\text{ng/mL})^{-1}\text{s}^{-1}$ : 0.0012	$\Delta R_{\text{maks}}$ : 9.89
$k_d, \text{s}^{-1}$ : 0.0022	$K_A, (\text{ng/mL})^{-1}$ : 0.0196
$K_A, (\text{ng/mL})^{-1}$ : 0.545	$K_D, (\text{ng/mL})$ : 51.02
$K_D, (\text{ng/mL})$ : 1.833	$R^2$ : 0.9465
$R^2$ : 0.9821	

Kırılma indisi değişimi (% $\Delta R$ ) arttıkça denge konsantrasyonunun azaldığını göstermektedir. Bu, yüzeydeki bağlanma yerlerinin dolması ile serbest cMyBP-C moleküllerinin azalması arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koyar. Bağlanma yerleri



doldukça, yüzeydeki serbest moleküllerin konsantrasyonu azalmakta ve bu durum negatif bir doğrusal ilişki olarak ortaya çıkmaktadır.

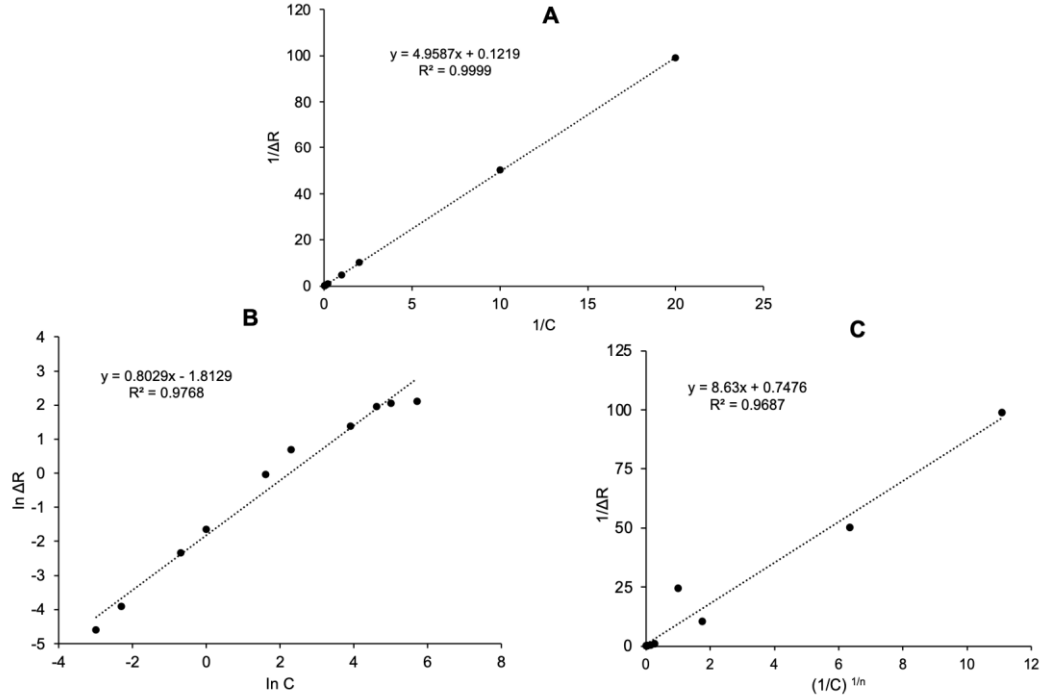
Bu sonuçlar, SPR sensörlerinin cMyBP-C tespitinde denge analizlerini başarılı bir şekilde gerçekleştirebildiğini göstermektedir. Sensör yüzeyinde bağlanma olaylarının dinamikleri ve dengeye ulaşma süreçleri, bu tür denge analizleri ile etkili bir şekilde değerlendirilebilir. Yüksek doğruluk ve güvenilirlik, SPR sensörlerinin biyomoleküler etkileşimlerin izlenmesi ve değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini vurgular.

Denge analiz yaklaşımı, SPR sensörlerinin cMyBP-C tespitinde yüzeydeki bağlanma yerlerinin dolma kapasitesini ve serbest molekül konsantrasyonlarındaki değişiklikleri anlamada kritik bir rol oynamaktadır. Grafik, yüzeydeki bağlanma yoğunluğunun artmasıyla birlikte denge konsantrasyonunun azaldığını ve bu ilişkinin yüksek doğrulukla temsil edildiğini göstermektedir. Bu analiz, SPR sensörlerinin cMyBP-C'nin klinik tespitinde ve biyomoleküler etkileşimlerin değerlendirilmesinde etkin bir araç olduğunu doğrulamaktadır.

#### **4.2.2. Denge izoterm modelleri**

3 farklı denge izoterm modelleri Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Modeli cMyBP-C'nin SPR sensör yüzeyine bağlanma davranışını açıklamak için kullanıldı ve her model farklı bağlanma mekanizmalarını temsil eder:

- Langmuir Modeli: Yüzeydeki bağlanma yerlerinin homojen olduğunu ve cMyBP-C'nin yüzeye monolayer olarak bağlandığını gösterir. Bu model, en yüksek  $R^2$  değeriyle verilerle mükemmel bir uyum sağlar.
- Freundlich Modeli: Yüzeydeki bağlanma yerlerinin heterojen olduğunu ve cMyBP-C'nin yüzeye çok katmanlı olarak bağlandığını gösterir. Bu model, yüksek  $R^2$  değeriyle verilerle iyi bir uyum sağlar.
- Langmuir-Freundlich Modeli: Her iki modelin özelliklerini birleştirir ve cMyBP-C'nin yüzeye hem monolayer hem de çok katmanlı olarak bağlandığını gösterir. Bu model, verilerle iyi bir uyum sağlar ve yüzeyin heterojenliği hakkında bilgi sağlar.



Şekil 4.7 - (A) Langmuir; B) Freundlich; (C) Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri

Çizelge 4.2- Adsorpsiyon izoterm modellerin parametreleri

Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
$\Delta R_{\text{maks}}$ : 8.203	$\Delta R_{\text{maks}}$ : 6.128	$\Delta R_{\text{maks}}$ : 1.337
$K_D$ , (ng/mL): 40.67	$1/n$ : 0.8029	$1/n$ : 0.8029
$K_A$ , (ng/mL) <sup>-1</sup> : 0.024	$R^2$ : 0.9768	$K_D$ , (ng/mL): 11.54
$R^2$ : 0.9999		$K_A$ , (ng/mL) <sup>-1</sup> : 0.086
		$R^2$ : 0.9687

Yapılan deneyler sonucunda, Şekil 4.7'e dayanarak elde edilen veriler, cMyBP-C'nin tayini için en uygun modelin Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli olduğunu göstermiştir. cMyBP-C baskılanmış sensörün yüzeyine kaplanan polimerik filmin tek tabakalı bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Çizelge 4.2'de hesaplanan  $\Delta R_{\text{maks}}$ ,  $K_A$  ve  $K_D$  kinetik sabitleri özetlenmiştir. Matematiksel hesaplamalara göre elde edilen

korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında, Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin ( $R^2=0.9999$ ) Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline ( $R^2=0.9768$ ) göre daha yüksek bir korelasyon katsayısına sahip olduğu gözlemlenmiştir.

#### **4.2.3. Kardiyak Miyozin Bağlayıcı Protein C (cMyBP-C) Tespitine Yönelik Literatürdeki Çalışmalar**

Çizelge 4.3’de özetlenen çalışmalar, cMyBP-C tespiti için çeşitli sensör tiplerinin ve yüzey modifikasyonlarının etkinliğini göstermektedir. Her bir sensör tipi, belirli derişim aralıklarında yüksek duyarlılık ve doğruluk sunmakta olup, klinik tanı ve biyomedikal araştırmalar için önemli avantajlar sağlamaktadır. Elektrokimyasal sensörler ve SPR sensörleri, geniş bir derişim aralığında yüksek duyarlılık gösterirken, nanopartikül bazlı ve floresan tabanlı sensörler de benzer şekilde etkili sonuçlar sunmaktadır. Bu çalışmalar, cMyBP-C tespiti için çeşitli sensör teknolojilerinin uygulanabilirliğini ve etkinliğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda kullanılan SPR sensörleri, cMyBP-C tespitinde yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlamaktadır. Mikrotemas baskılama yöntemi kullanılarak, cMyBP-C'nin geniş bir çalışma aralığında güvenilir bir şekilde tespit edilmesi mümkün kılınmıştır. Bu yöntem, modifiye edilmiş yüzeyler kullanarak, cMyBP-C'nin spesifik bağlanma bölgeleri oluşturmasını sağlar. Bu sayede, sensörlerimiz hem düşük saptama sınırı hem de yüksek seçicilik ile cMyBP-C'yi tespit edebilir.

Mikrotemas baskılama yöntemi, yüzey üzerinde kontrollü ve homojen bir protein yerleşimi sağlayarak, sensör performansını optimize eder. Bu yöntem, mevcut sensör teknolojilerine kıyasla daha yüksek doğruluk ve güvenilirlik sunar. Ayrıca, biyomedikal uygulamalarda, özellikle kalp sağlığının izlenmesi ve kardiyak olayların erken teşhisi açısından büyük potansiyele sahiptir. Bu sensörler, kan plazması ve serum örneklerinde etkin bir şekilde kullanılabilir, böylece klinik uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bulabilir.

Çizelge 4.3 - cMyBP-C Tespitine Yönelik Literatürdeki Çalışmalar

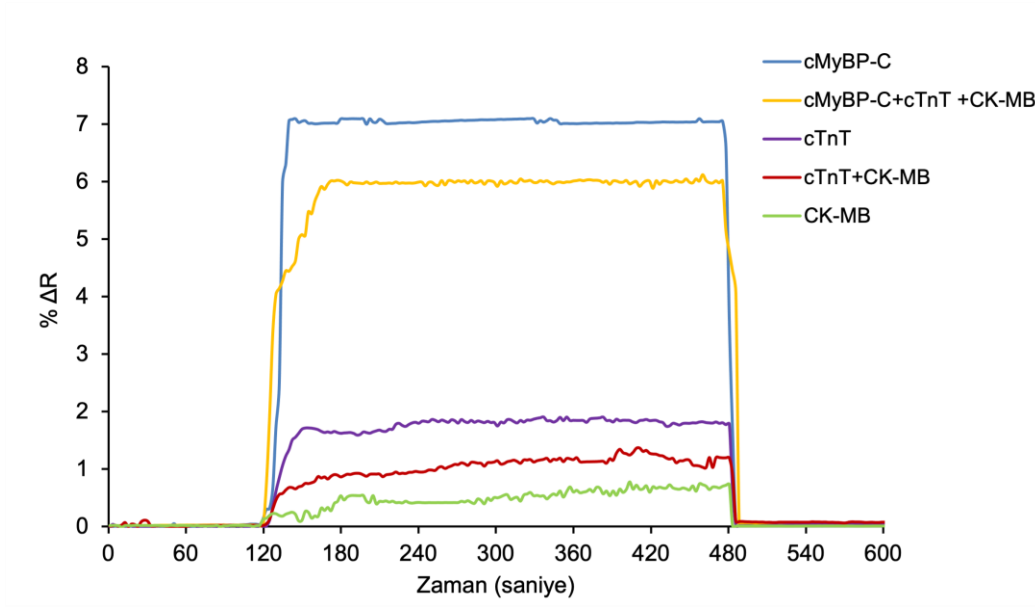
Sensör Tipi	Kinetik Çalışma Aralığı	Saptama Sınırı	Analiz Edilen Örnek	Yüzey Modifikasyonu	Kaynak
<b>Elektrokimyasal Sensörler</b>	1 pM - 10 nM	0.1 pM	Kan plazması, serum	Karbon Nanotüpler	[68]
<b>Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)</b>	10 nM - 10 µM	10 nM	Kan plazması, serum	Altın Nanopartiküller	[69]
<b>Nanopartikül Bazlı Sensörler</b>	0.01 - 1 µM	0.01 µM	Kan plazması, serum	Karbon Nanotüpler	[70]
<b>Optik Sensörler</b>	0.1 nM - 100 nM	1 nM	Kan plazması, serum	Silika Nanopartiküller	[71]
<b>Floresan Tabanlı Sensörler</b>	0.1 nM - 1 µM	0.1 nM	Kan plazması, serum	Floresan Boyalar	[72]
<b>Aptamer Tabanlı Biyosensörler</b>	0.01 pM - 1 nM	0.01 pM - 1 nM	Kan plazması, serum	Aptamer Tabanlı Biyosensörler	[73]
<b>Quantum Dot Biyosensörler</b>	10 nM to 100 µM	0.1 nM	Kan plazması, serum	Sinyal artırımı için kuantum noktaları	[74]

#### **4.2.4. SPR Sensörlerin Seçiciliklerinin İncelenmesi**

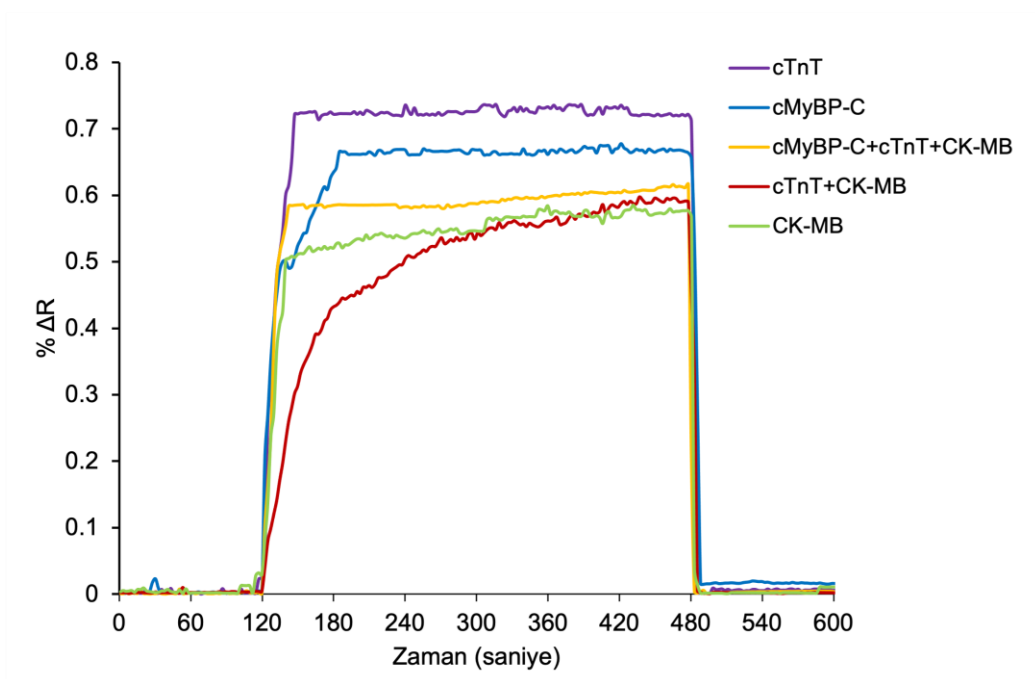
Yüzey plazmon rezonansı (SPR) sensörler, biyomoleküllerin yüzeylere bağlanma olaylarını gerçek zamanlı ve etiketlemesiz olarak izleme yeteneği sayesinde sensör alanında önemli bir yere sahiptir. Bu teknoloji, özellikle moleküler tanı ve biyomedikal araştırmalarda kullanılmaktadır. SPR sensörleri, hedef moleküllerin yüzeye bağlanmasını yüzeydeki kırılma indisi değişiklikleri üzerinden algılayarak çalışır. Bu çalışma, cMyBP-C molekülünün belirli ve spesifik bağlanma özelliklerini incelemek için tasarlanmıştır. Moleküllerin bağlanma afiniteleri ve seçicilikleri, moleküler tanımlama ve hastalık tespiti için kritik öneme sahiptir.

Moleküler baskılanmış (MIP) sensörler, özgül hedef moleküllere yüksek bağlanma kapasitesi ve seçicilik sunarken, baskılanmamış (NIP) sensörler daha genel bir bağlanma profili gösterir. Bu çalışmada, MIP ve NIP SPR sensörlerinin cMyBP-C, cTnT ve CK-MB gibi farklı biyomoleküllere karşı kinetik bağlanma ve seçicilik analizleri yapılmıştır.

**A**



**B**



Şekil 4.8- cMyBP-C baskılanmış (MIP) (A) ve baskılanmamış (NIP) (B) SPR sensörlere ait seçicilik kinetik analizleri için SPR sensogramları

Şekil 4.8’da görüldüğü gibi, cMyBP-C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR sensörlerin farklı biyomoleküllere karşı seçiciliklerini değerlendirmek için yapılan kinetik analiz sonuçlarını göstermektedir.

cMyBP-C baskılanmış (MIP) SPR sensör, cMyBP-C 'ye karşı yüksek spesiflik ve afinitesi ile en yüksek  $\% \Delta R$  değerlerini göstermektedir. Karışık biyomoleküllerin varlığında bile sensör, cMyBP-C’yi etkin bir şekilde tanıyabilmektedir. Diğer moleküller (cTnT ve CK-MB) sensör tarafından daha düşük afinitelerle tanınmaktadır. Baskılanmamış (NIP) SPR sensör, baskılanmamış yüzeyde cTnT'ye karşı daha yüksek bir bağlanma göstermekte olup, cMyBP-C'ye karşı daha düşük bir afinitesi vardır. Bu, sensör yüzeyinin spesifik bağlanma bölgelerinin eksik olduğunu ve yüzeydeki bağlanmanın daha genel ve spesifik olmayan etkileşimlerle gerçekleştiğini gösterir.

cMyBP-C baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında cMyBP-C SPR sinyalinin 7.08’den 0.67’ye düştüğü görülmüştür. Sonuçlar, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörünün cTnT ve CK-MB için tepkilerin Şekil 4.8'deki cMyBP-C daha düşük olduğunu göstermektedir. cMyBP-C/cTnT ve cMyBP-C/CK-MB için cMyBP-C baskılanmış SPR sensörünün bağıl seçicilik katsayıları ( $k'$ ), sırasıyla 4.18 ve 10.71 katıdır (Çizelge 4.4). Ayrıca cMyBP-C baskılanmış SPR sensörünün cMyBP-C baskılanmamış SPR nanosensöre göre seçiciliği,  $\Delta R_{MIP}/\Delta R_{NIP}$  olarak belirlenen baskılama faktörü (IF) 10.56 olarak hesaplanmıştır. cMyBP-C için baskılama faktörü, diğer yarışmacı moleküllerin IF'lerinden daha yüksek olduğu görünmektedir.

Bu sonuçlar, cMyBP-C baskılanmış (MIP) SPR sensörlerin, cMyBP-C’yi yüksek spesiflik ve afiniteleri ile tanıyabildiğini ve karışık biyomoleküllerin varlığında bile etkin bir şekilde tespit edebildiğini göstermektedir. Baskılanmamış (NIP) sensörler, spesifik bağlanma bölgelerinden olmaması düşük afiniteli bağlanmayı göstermektedir. Kinetik analizler, MIP SPR sensörlerin cMyBP-C tespitinde yüksek performans sergilediğini ve klinik uygulamalarda spesifik biyomoleküllerin tespiti için kullanılabilirliğini vurgulamaktadır. Sensörlerin seçicilik performansı, cMyBP-C baskılanmış yüzeylerin geliştirilmesi ve optimize edilmesiyle artırılabilir. Bu sonuçlar,

cMyBP-C'nin klinik tanısında MIP SPR sensörlerin etkinliğini ve güvenilirliğini doğrulamaktadır.

Çizelge 4.4 - Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

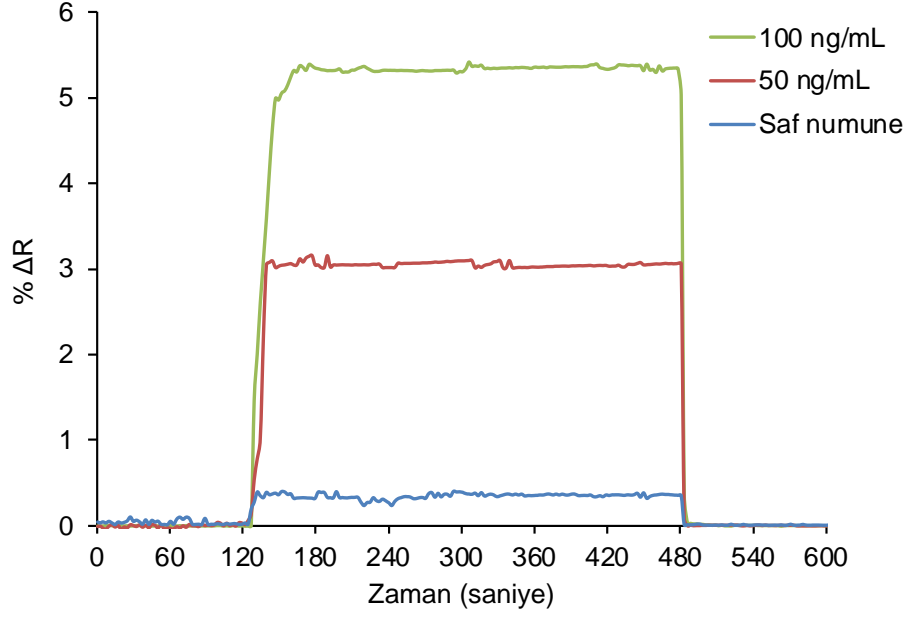
Kullanılan moleküller	MIP SPR sensör		NIP SPR sensör		k'
	$\Delta R$	k	$\Delta R$	k	
cMyBP-C	7.08	-	0.67	-	-
cTnT	1.84	3.85	0.73	0.92	4.18
CK-MB	0.56	12.64	0.57	1.18	10.71
cTnT+ CK-MB	1.27	5.57	0.58	1.16	4.80
cMyBP-C + cTnT+ CK-MB	5.97	1.19	0.60	1.12	1.06

Çizelge 4.4, cMyBP-C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR sensörlerin farklı biyomoleküllere karşı seçicilik ve bağıl seçicilik katsayılarını göstermektedir. Seçicilik katsayıları incelendiğinde, MIP SPR sensörlerin cMyBP-C'yi yüksek seçicilik ve afiniteleri ile tespit edebildiğini ve diğer biyomoleküllere kıyasla daha yüksek  $\Delta R$  değerleri ve seçicilik katsayıları gösterdiğini ortaya koymaktadır. NIP SPR sensörler ise, spesifik bağlanma bölgelerinden yoksun olup, daha düşük afiniteli ve daha düşük seçicilik performansı sergilemektedir.

#### 4.2.5. Yapay plazma örneklerden kardiyak miyozin bağlayıcı protein-C tayini

Şekil 4.9'da cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün yapay plazma örneklerinde cMyBP-C tayini için farklı derişimlerde (50 ng/mL ve 100 ng/mL) yapılan kinetik analiz sonuçlarını gösterilmektedir. Ayrıca, saf numune (kontrol) için de bir ölçüm yapılmıştır.





Şekil 4.9- cMyBP-C baskılanmış SPR sensör ile farklı derişimlerde cMyBP-C ile yapay plazma örneklerinde cMyBP-C tayinine ait kinetik analiz sensorgramları

Şekil 4.9'a göre, 100 ng/mL derişimde %ΔR değeri yaklaşık olarak 5.5 seviyesinde sabitlenmektedir. Bağlanma başlangıcında hızlı bir artış gözlemlenmekte ve ardından bu yüksek seviyede sabit kalmaktadır. Bu, sensörün yüzeyine yüksek derişimde cMyBP-C bağlandığını ve bağlanma doğunluğuna ulaşıldığını göstermektedir.

50 ng/mL derişimde %ΔR değeri yaklaşık olarak 3.0 seviyesinde sabitlenmektedir. Bağlanma kinetiği daha düşük derişimle uyumlu olup, yüzeyde orta seviyede bir bağlanma yoğunluğunu göstermektedir.

Saf Numunesi için %ΔR değeri sıfıra yakın olup, bu sensör yüzeyinde cMyBP-C bağlanmasının gerçekleşmediğini doğrulamaktadır. Bu, kullanılan sensörün spesifikliğini ve doğru çalıştığını gösterir.

Çizelge 4.5 - cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerin yapay plazma örneklerindeki bulunan cMyBP-C analiz sonuçları (n:3)

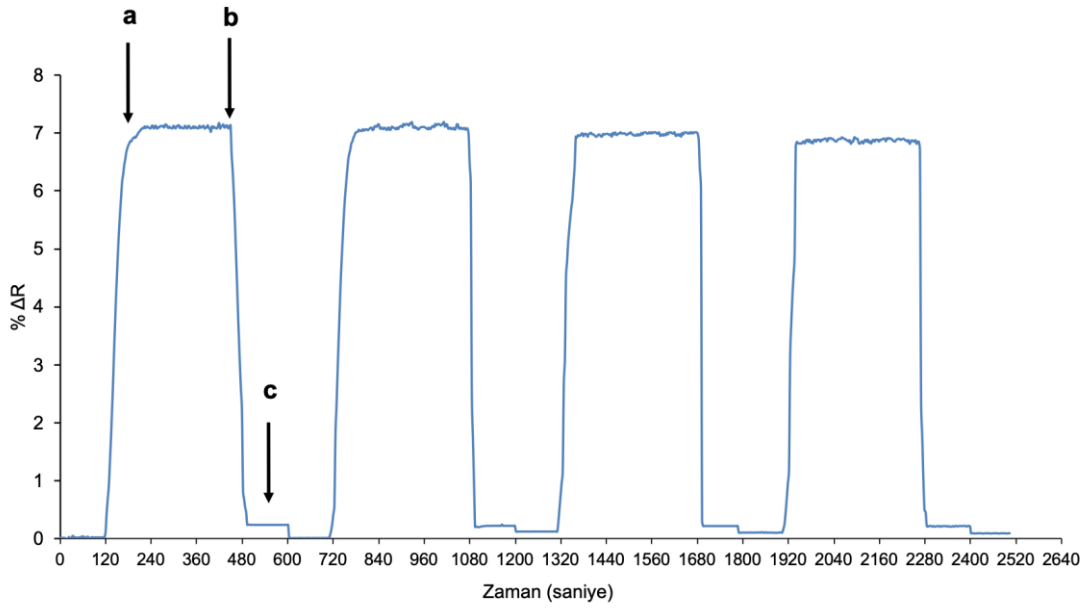
Eklenen cMyBP-C Miktarı (ng/mL)	Bulunan cMyBP-C Miktarı (ng/mL)		Geri Kazanım (%)	
	SPR	ELISA	SPR	ELISA
50 ng/mL	49.71±0.271	49.15±0.092	99.42±0.093	98.29±0.185
100 ng/mL	97.94±0.0096	97.93±0.0095	97.93±0.010	97.94±0.010

Yapay plazmada hazırlanan 50 ng/mL ve 100 ng/mL derişimlerinde cMyBP-C çözeltileri ile yapılan kinetik analizler hem SPR hemde ELISA sonuçları karşılaştırılmış ve geri kazanım değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Geri kazanım oranları yapay plazmada hazırlanan 50 ng/mL cMyBP-C için SPR için %99.42 ± 0.093 ve ELISA için %98.29 ± 0.185 iken 100 ng/mL cMyBP-C için SPR için %97.93 ± 0.010 ve ELISA için %97.94 ± 0.010’dur. Bu sonuçlar, yüksek derişimlerde de SPR ve ELISA yöntemlerinin güvenilirliğini ve doğruluğunu doğrulamaktadır.

Bu sonuçlar, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerin, yapay plazma örneklerinde cMyBP-C tespitinde yüksek doğruluk ve güvenilirlik sergilediğini göstermektedir. Farklı derişimlerde yapılan analizler, sensörlerin geniş bir derişim aralığında etkili olduğunu ve geri kazanım oranlarının yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. SPR sensörlerinin ELISA yöntemi ile karşılaştırılması, her iki yöntemin de yüksek doğruluk ve güvenilirlikle çalıştığını ve cMyBP-C’nin doğru bir şekilde tespit edilebildiğini göstermektedir. Bu veriler, SPR sensörlerinin biyomoleküler tespit ve analizlerde klinik uygulamalar için uygun ve güvenilir bir araç olduğunu doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, cMyBP-C’nin klinik tanısında SPR sensörlerin etkinliğini ve güvenilirliğini desteklemektedir.

#### 4.2.6. Tekrar Kullanabilirliğin İncelenmesi

cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini 100 ng/mL cMyBP-C çözeltisi sisteme peş peşe 4 kez verilerek gerçek zamanlı SPR sisteminde kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik için kinetik analiz için ilk olarak 2 dakika pH 7.4 fosfat tamponu, sonrasında 6 dakika boyunca 100 ng/mL cMyBP-C çözeltisi ve en son da 2 dakika %10'luk etilen glikol desorpsiyon çözeltisi ile SPR sisteminden geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi cMyBP-C baskılanmış SPR sensör, 4 döngü sonrasında SPR sensörün yüzde olarak verimi 96.46 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerin tekrar kullanılabilirliğini ve rejenerasyon süreçlerinin etkinliğini doğrulamaktadır. Bu, SPR sensörlerinin uzun süreli ve tekrarlı kullanımlar için uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10- cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirlik sensorgramı (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).

#### Tekrar Kullanılabilirlik Avantajları:

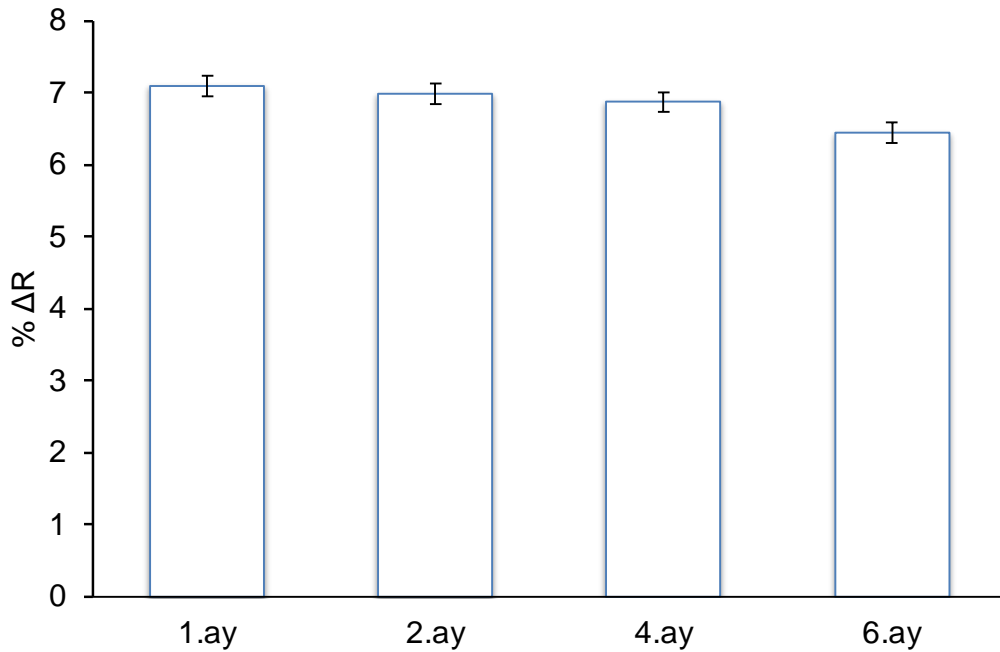
**Ekonomiklik:** Sensörlerin tekrar kullanılabilir olması, maliyetlerin azaltılmasını sağlar.

**Sürdürülebilirlik:** Tekrar kullanılabilir sensörler, atık miktarını azaltır ve çevresel sürdürülebilirliği destekler.

**Verimlilik:** Hızlı rejenerasyon süreçleri, sensörlerin daha hızlı ve verimli bir şekilde kullanılmasına olanak tanır.

Bu analizler, SPR sensörlerinin biyomoleküler tespit ve analizlerde yüksek performans sergilediğini ve cMyBP-C'nin klinik tanısında güvenilir bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Tekrar kullanılabilirlik, bu sensörlerin pratik uygulamalarda avantajlarını artırmakta ve kullanıcılar için önemli bir özellik sunmaktadır.

cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirliği incelenmiş ve 100 ng/mL cMyBP-C derişimde sulu çözeltiler kullanılarak hazırlanan örneklerle kinetik analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11) Elde edilen kinetik analiz sonuçlarına göre cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün verimliliğinin %91 olarak hesaplandığını göstermiştir. Bu bulgular, cMyBP-C baskılanmış SPR farklı zamanlarda tekrar tekrar kullanılabilirlik açısından yüksek kinetik kararlılık ve verimlilik göstermiştir.



Şekil 4.11- cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirlik sensorgramı

Performans Stabilitesi: İlk altı ay boyunca sensörün  $\% \Delta R$  değerlerinde minimal azalmalar gözlemlenmiştir. Bu, sensör yüzeyinin zamanla stabil kaldığını ve etkinliğini koruduğunu göstermektedir.

Uzun Süreli Kullanım: Sensör yüzeyi, altı ay boyunca tekrar kullanılabilirliğini korumuş ve yüksek performans sergilemiştir. Bu, SPR sensörlerinin uzun süreli ve tekrarlı kullanımlar için uygun olduğunu ve biyomoleküler tespitlerde güvenilir bir araç olduğunu doğrulamaktadır.

Bu grafik, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerin zaman içinde tekrar kullanılabilirliğini ve performans stabilitesini değerlendirmek için önemlidir. Farklı zaman dilimlerinde yapılan ölçümler, sensör yüzeyinin uzun süreli kullanımda bile yüksek duyarlılık ve bağlanma kapasitesini büyük ölçüde koruduğunu göstermektedir.

## 5. YORUM

Bu tez çalışmasında, kardiyak miyozin bağlayıcı protein C (cMyBP-C) kardiyak işlev ve yapısal bütünlük açısından kritik öneme sahip bir protein olarak bilinmektedir. cMyBP-C, özellikle kardiyak kas hücrelerindeki kontraktıl protein komplekslerinin düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Bu proteinin modifikasyonu veya işlevselliğindeki herhangi bir bozulma, çeşitli kardiyomiyopatiler dahil olmak üzere kardiyak hastalıkların patojenezinde önemli bir faktör olarak kabul edilir. Bu bağlamda, cMyBP-C'nin doğru şekilde tespit edilmesi, hastalık teşhisinde erken ve hassas biomarkerlar kullanılmasına olanak sağlamakta ve kardiyak hastalıkların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır.

SPR sensör ve mikrotemas baskılama yönteminin avantajları birleştirilerek gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, cMyBP-C'nin SPR sensör yüzeylerine baskılanması, bu proteinin yüzeyler üzerinde spesifik olarak tanınmasını ve bağlanmasını sağlamıştır. Bu sensörler, cMyBP-C ile zenginleştirilmiş yüzeyler (MIP) üzerinde yüksek bağlanma kapasitesi ve spesifiklik göstermişlerdir. Kinetik analizler, cMyBP-C'nin çeşitli konsantrasyonlarına karşı yanıtın, düşük konsantrasyonlardan yüksek konsantrasyonlara doğru doğrusal bir ilişki gösterdiğini ortaya koymuştur. 0.05-300 ng/mL derişim aralığında hazırlanan cMyBP-C çözeltileri ile kinetik analizler gerçekleştirilmiş ve en düşük tayin limiti (LOD) 0.019 ng/mL ve en düşük miktar limiti (LOQ) 0.064 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu, sensörlerin kardiyak hastalıkların erken teşhisi ve izlenmesi için potansiyel olarak yararlı araçlar olabileceğini göstermektedir.

SPR sensörün seçicilik analizlerinde, cMyBP-C'nin yanı sıra diğer kardiyak markerlar olan Troponin T ve kreatin kinaz gibi yarışmacı moleküller ile karşılaştırıldığında, cMyBP-C 'ye özgü yüksek seçicilik gösterdiğini ortaya koymuştur. cMyBP-C baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında cMyBP-C SPR sinyalinin 7.08'den 0.67'ye düştüğü görülmüştür. cMyBP-C/cTnT ve cMyBP-C/CK-MB için cMyBP-C baskılanmış SPR sensörünün bağıl seçicilik katsayıları ( $k'$ ), sırasıyla 4.18 ve 10.71 katıdır. Bu yüksek seçicilik değerleri, cMyBP-C baskılanmış (MIP) yüzeylerin, diğer proteinlerin (yarışması moleküller) varlığında bile cMyBP-C'yi etkin bir şekilde tanıyabilmesine olanak tanır. Bu özellik, klinik örneklerdeki karmaşık matrisler içerisinde

cMyBP-C'nin doğru tespitini sağlar, böylece kardiyak hastalıkların teşhis ve izlenmesinde önemli bir rol oynar.

cMyBP-C baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği, gerçek zamanlı SPR sisteminde kinetik analizler yapılarak değerlendirilmiştir. cMyBP-C baskılanmış SPR sensör, aynı gün içinde yapılan 4 kinetik analiz döngüsü sonrasında SPR sensörün yüzde olarak verimi 96.46 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, cMyBP-C baskılanmış SPR sensörlerin tekrar kullanılabilirliğini ve rejenerasyon süreçlerinin etkinliğini doğrulamaktadır. Bu, SPR sensörlerinin uzun süreli ve tekrarlı kullanımlar için uygun olduğunu göstermektedir.

Yapay plazmada hazırlanan farklı derişimlerde cMyBP-C çözeltileri ile yapılan kinetik analizler sonucunda hem SPR sensör hem de ELISA sonuçları karşılaştırılmış ve geri kazanım değerleri incelenmiştir. Bu sonuçlar, yüksek derişimlerde de SPR sensör ve ELISA yöntemlerinin güvenilirliğini ve doğruluğunu doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, cMyBP-C tayini için yapılan bu çalışma, SPR sensör teknolojisinin, kardiyak biyomarkerlerin tespiti konusunda ne kadar etkili ve güvenilir olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, kardiyak hastalıkların erken teşhisi, yönetimi ve tedavisinde SPR sensörlerinin kullanımının genişletilmesine zemin hazırlamaktadır. Bu çalışmalar, kardiyak biyoloji ve hastalıkların moleküler temellerini anlama konusunda da yeni kapılar açabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Q. Wang, Z.H. Ren, W.M. Zhao, L. Wang, X. Yan, A.S. Zhu, F.M. Qiu, K.K. Zhang, *Nanoscale*, 14 (2022) 564-591.
- [2] S.K. Barrick and M.J. Greenberg, *Journal of Biological Chemistry*, 297 (2021) 101297.
- [3] M. S. Marber, N.L. Mills, D.A. Morrow, Christian Mueller, *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 10 (2021) 963–965.
- [4] J. R. Teerlink, *Heart Failure Reviews*, 14 (2009) 289–298.
- [5] S. Khan, A. Hasan, F. Attar, M. Sharifi, R. Siddique, F. Mraiche, and M. Falahati, *ACS Biomaterials Science Engineering*, 6 (2020) 6460–6477.
- [6] T.E. Kaier, B. Alaour, M. Marber, *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 33 (2019) 221-230.
- [7] S. Govindan, A. McElligott, S. Muthusamy, N. Nair, D. Barefield, J.L. Martin, E. Gongora, K.D. Greis, P.K. Luther, S. Winegrad, K. K. Henderson and S. Sadayappan, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52 (2012) 154–164.
- [8] M. Vicente-Manzanares, X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (2009) 778-790.
- [9] H. N. Aguilar, and B. F. Mitchell, *Human Reproduction Update*, 16 (2010) 725-744.
- [10] J. R. Sellers, *Biochimica Biophysica Acta* 1496 (2000) 3-22.
- [11] D. Zimmermann, A. Santos, D.R. Kovar and R.S. Rock, *Current Biology* 25 (2015) 2057-2062.
- [12] F. Buss, G. Spudich, and J. Kendrick-Jones, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (2004) 649-676.
- [13] R.S. Kanassatega, T.A. Bunch, V.C. Lepak, C. Wang, B.A. Colson, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 166 (2022) 116–126.
- [14] A. Inoue, J. Saito, R. Ikebe, and M. Ikebe, *Nature Cell Biology* 4 (2002) 302-306.
- [15] Q. Lu, F. Ye, Z. Wei, Z. Wen, and M. Zhang. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 17388-17393.



- [16] V. Ropars, Y. Zhang, I. Tao, B. Fourniol, Z. Kollman, L. Thomas, *Nature Communications* 7 (2016) 12456.
- [17] A. Sattarzadeh, K. J. Goto, A. H. Matsuoka, and S. H. Matsuoka, *Molecular Plant*, 2 (2009) 1351-1358.
- [18] M. Tominaga, K. Yokota, E. Orii, H. Nakano, R. Kato, E. Kuroda, *The EMBO Journal*, 22 (2003) 1263-1272.
- [19] C. Hettmann, H. A. Groves, A. F. Bannister, B. S. Curtis, E. S. Tomley, *Molecular Biology of the Cell*, 11 (2000) 1385-1400.
- [20] A. Pearce, S. Ponnampalnam, M.R. Holt, T. Randall, R. Beckingham, A.L. Kho, T. Kampourakis, and E. Ehler, *Journal of Biological Chemistry* *J. Biol. Chem.* 300 (2024) 105511.
- [21] N. Kozhuharov, D.W. Twerenbold, K.I. Sinning, S.S. Schaub, F.R. Stutz, and T.D. Flammer, *European Journal of Heart Failure* 23 (2021) 716-725.
- [22] H.Y. Lin, J. Rick, and T.C. Chou, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 3293-3301.
- [23] O. Bilgen, L. Uzun, N. Beşirli, and A. Denizli, *Materials Science and Engineering: C* 33 (2013) 3609-3614.
- [24] Z. El-Schich, Y. Zhang, M. Feith, L. Setterqvist, O. Malkoch, A. Sjöberg, and G. Wingren, *BioTechniques*, 69 (2020) 407-410.
- [25] N. Noman, A. Bakar, H. Malik, M. Ejaz, M. Naeem, and J. Nawaz, *Analytical Biochemistry*, 630 (2021) 114328.
- [26] B. Fresco-Cala, A.D. Batista, and S. Cárdenas, *Molecules*, 25 (2020) 4740.
- [27] Z. El-Schich, Y. Zhang, M. Feith, L. Setterqvist, O. Malkoch, A. Sjöberg, and G. Wingren, *BioTechniques*, 69 (2020) 407.
- [28] F. Yemiş, P. Alkan, B. Yenigül, M. Yenigül, and C. Bayar, *Polymers and Polymer Composites*, 21 (2013) 145-150.
- [29] S. Akgönüllü, S. Kılıç, C. Esen, and A. Denizli, *Polymers*, 15 (2023) 629.
- [30] M.P. Effting, A.U. Lima, E.M. Giacomelli, G.A.B. Moura, C.T.L. Farias, *Reactive and Functional Polymers*, 172 (2022) 15178.

- [31] B.M. S. Thomas, *Talanta Open*, 4 (2021) 100042.
- [32] F. Yemiş, P. Alkan, M. Yenigül, *Polymers and Polymer Composites*, 21 (2013) 145-150.
- [33] A.L. Ahmad, N.F.C. Lah, and S.C. Low, *Chemical Engineering Transactions* 45 (2015) 1483-1488.
- [34] C.C. Hwang, and W.L. Chang, *Journal of Chromatography A*, 962 (2002) 69-78.
- [35] S.N.N.S. Hashim, R.I. Boysen, L.J. Schwarz, B. Danylec, and M.T.W. Hearn, *Journal of Chromatography A*, 1369 (2014) 35-43.
- [36] S. Bakhtiar, A. A. Beye, and B. Salah, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6 (2019) 15.
- [37] M. Caldara, G. Wissen, T.J. Cleij, H. Diliën, B. Grinsven, K. Eersels, and J.W. Lowdon, *Advanced Sensor Research*, 2 (2023) 2200059.
- [38] D.A. Gkika, A.K. Tzia, and D.A. Loukopoulos, *RSC Applied Polymers* 2 (2024) 127-148.
- [39] P. Gorai, Y. Mizuno, M. Kimura, R. Jha, and J. Paik, *ACS Applied Nano Materials*, 6 (2023) 12946-12956.
- [40] S. Bhakta, and P. Mishra, *Sensors and Actuators Reports*, 3 (2021) 100061.
- [41] J.C. Yang, C.H. Cho, D.Y. Choi, J.P. Park, J. Park, *Sensors Actuators: B. Chemical* 364 (2022) 131916.
- [42] T. Hix-Janssens, S. Shinde, R. Abouhany, J. Davies, J. Neilands, G. Svensäter, and B. Sellergren, *ACS Omega* 8 (2023) 15259–15265.
- [43] H.S. Kim, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2006) 141-144.
- [44] Lars I. Andersson, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 745 (2000): 3-13.
- [45] L. Tang, L. Yang, Y. Wang, and R. Deng, *ACS Sensors*, 3 (2023) 956-973.
- [46] R. Vasapollo, S. Sole, M. Mergola, L. Ambrosio, S. Scardino, S. Scorrano, and G. Mele, *International Journal of Molecular Sciences* 12 (2011) 5908-5945.
- [47] G. Alberti, C. Zaramella, S. Sonato, L. Rizzi, M. Meneghello, and R. Bertoncello, *Chemosensors*, 11 (2023) 144.

- [48] S. Bahrani, E.S. Behbahania, M. Ghaedia, Y.A. Miandeh, A. Asfaram, *Microchemical Journal* 203 (2024) 110888.
- [49] H. Wu, G.Q. Lin, C. Liu, S. Cao, C. Chen, M. Luo, and H. Liu, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 36 (2022) 339.
- [50]. A. Kidakova, J. Reut, J. Rappich, A. Öpik, V. Syritski, *Reactive and Functional Polymers* 125 (2018) 47–56.
- [51] C. Alexander, H. Andersson, L. Andersson, R. A. Ansell, A. Kirsch, N. K. Nicholls, J. O'Mahony, and M. W. Whitcombe, *Journal of Molecular Recognition* 19 (2006) 106-180.
- [52] Z. Gerdan, Y. Saylan, and A. Denizli, *ACS Omega* 9 (2024) 9946-9960.
- [53] D. Çimen, N. Bereli, M. Andaç, and A. Denizli, *Separation Science Plus*, 1 (2018) 454-463.
- [54] D. Çimen, N. Bereli, and A. Denizli, *Biomedical Materials Devices*, 1 (2023) 202-212.
- [55] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, and A. Denizli, *Talanta*, 246 (2022) 123484.
- [56] Z.T. Kurt, D. Çimen, A. Denizli, and N. Bereli, *ACS Omega*, 8 (2023)18839-18850.
- [57] D. Çimen, S. Aslıyüce, T.D. Tanalp, and A. Denizli, *Analytical Biochemistry*, 632 (2021) 114221.
- [58] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, and A. Denizli, *Talanta*, 219 (2020) 121259.
- [59] D. Çimen, N. Bereli, and A. Denizli, *Biosensors*, 11 (2021) 21.
- [60] I. Göktürk, M. Bakhshpour, D. Çimen, F. Yılmaz, N. Bereli, and A. Denizli, *IEEE Sensors Journal*, 22 (2022) 14862-14869.
- [61] I. Göktürk, K. Çaktü Güler, F. Yılmaz, C. Oktar, G.E. Yılmaz, and A. Denizli, *Biomedical Materials & Devices*, (2024) 1-1.
- [62] D. Çimen, R. Üzek, S. Günaydın, and A. Denizli, *ChemistrySelect*, 6 (2021) 9435-9441.
- [63] S. Khan, A.H. Fathima, M.S. Raza, S.S. Farooq, M.F. Mohamed, *ACS Biomaterials Science Engineering*, 6 (2020) 6460-6477.

- [64] H.H. Nguye, J. Park, S. Kang, and M. Kim, *Sensors*, 15 (2015) 10481-10510.
- [65] M.S. Marber, *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 10 (2021) 963-965.
- [66] X.Y. Wang, F. Zhang, C. Zhang, L.R. Zheng, and J. Yang, *BioMed Research International*, (2020) 2018035
- [67] A.C. Payton, M.E. Homer, L. Picco, M.J. Miles, and O. Payton, *Physical and Engineering Sciences*, 467 (2011) 1801-1822.
- [68] R.S. Kanassatega, T.A. Bibby, V.C. Li, C.L. Collins, C.W. Baier, and A.C. Rebbecchi, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 166 (2022) 116-126.
- [69] C. Schulte, T. Bardeesy, A.J. Kwasnieski, Z.A. Zavodszky, J.B. Brennan, B.S. Nayak, A.S. Singh, J.T. Nguyen, N.T. Zafari, D.W. Stuart, and B.M. McDermott, *Circulation Research* 125 (2019) 328-340.
- [70] T. A. Bunch, P. Guhathakurta, *Journal of Biological Chemistry*, 297 (2021) 100840.
- [71] Cristina Polonschii, and M. Potara. *Biosensors*, 13 (2023) 632.
- [72] C. Yuan, Y. Gao, R.R. Kranias, P. N. Sadoshima, R. D. Rockman, N. J. Chan, A. McCulloch, *Proteomics*, 6 (2006) 4176-4186.
- [73] H. Yoo, H. Jo, and S.S. Oh, *Materials Advances*, 1 (2020) 2663-2687.
- [74] V. Naresh. *Sensors*, 4 (2021)

