

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMPEROMETRİK VE İMPEDİMETRİK
BİYOSENSÖRLER İLE FARKLI TİP KANSERLERİN
BİYOBELİRTECİ OLAN CD-105 (ENDOGLİN) TAYİNİ**

**Hazırlayan
Kazım Serkan SUNAL**

**Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Ebru SAATÇI**

Doktora Tezi

**Ekim 2021
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMPEROMETRİK VE İMPEDİMETRİK
BİYOSENSÖRLER İLE FARKLI TİP KANSERLERİN
BİYOBELİRTECİ OLAN CD-105 (ENDOGLİN) TAYİNİ
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan
Kazım Serkan SUNAL**

**Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Ebru SAATÇİ**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Doktora Tezi
ve Hızlı Destek Programı kapsamındaki FDK-2018-8421 ve FDH-2020-10239
kodlu projeler dahilinde desteklenmiştir.**

**Ekim 2021
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.


Kazım Serkan SUNAL

Amperometik ve Epidemetrik Biyosensörler İle Farklı Tip Kanserlerin Biyolelirteci olan CD-105 (Endoglin) Tayini adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Kazım Serkan SUNAL

Danışman

Dr.Öğretim Üyesi Ebru SAATÇI

Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Dr. Öğretim Üyesi Ebru SAATÇİ danışmanlığında **Kazım Serkan SUNAL** tarafından hazırlanan “**Amperometrik ve Empedimetrik Biyosensörler ile Farklı Tip Kanserlerin Biyobelirteci olan CD-105 (Endoglin) Tayini**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

05 / 10 / 2021

JÜRİ:

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ebru SAATÇİ

Üye : Prof. Dr. Şaban PATAT

Üye : Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK

Üye : Doç. Dr. Mesut ORTATATLI

Üye : Doç. Dr. Kutay İÇÖZ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 26/10/2021 tarih ve 2021/55-15 Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Dr. Öğretim Üyesi Ebru SAATÇİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesinden faydalandığım Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK ve Prof. Dr. Saban PATAT'a tesekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen canım eşim ve biricik kızıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Doktora Tezi ve Hızlı Destek Programı kapsamındaki FDK-2018-8421 ve FDH-2020-10239 kodlu projeler dahilinde desteklenmiştir.

Kazım Serkan SUNAL

Kayseri, Ekim 2021

AMPEROMETRİK VE İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖRLER İLE FARKLI TİP KANSERLERİN BİYOBELİRTECİ OLAN CD-105 (ENDOGLİN) TAYİNİ

Kazım Serkan SUNAL

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Ekim 2021

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ebru SAATÇİ

ÖZET

Son yıllarda, serumda düşük seviyelerde bulunan kanser biyobelirteçlerini kanserin erken evrelerinde saptamak için kritik ve hassas analitik yöntemlerin geliştirilmesi daha önemli hale gelmektedir. Elektrokimyasal biyosensörler bu doğrultuda kullanılan önemli tespit sistemlerini oluşturmaktadır. Bu doğrultuda manyetik boncukların ve ekran baskılı elektrotların, elektrokimyasal biyosensörlerde kullanımları yapılan analizlerin hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği açısından önem taşımaktadır. Dahası, sensörler üzerinde çoklu ölçümlere imkân sağlamaktadır.

Bu çalışmada, insan serumunda endoglin (CD-105) tayini için amperometrik ve empedimetrik elektrokimyasal immunosensör kitleri geliştirildi. Geliştirilen immun ölçüme dayalı immunosensörler, multipleks bir amperometrik ve tekli ölçüm yapabilen bir empedimetrik sistemler kullanılarak tasarlandı. Ölçüm metodunun oluşturulması için ekran baskılı multipleks karbon elektrotlar ve manyetik boncuklar kullanıldı.

Çalışmaların sonucunda, çalışma aralıkları amperometrik ve empedimetrik immunosensörler için sırasıyla 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml ve 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml CD-105 rekombinant antijen varlığında bulundu. Yine LOB, LOD ve LOQ ölçüm değerleri, amperometrik immunosensör için sırasıyla 0.6, 1.1 ve 4.1 ng/ml olarak bulundu. % CV=3.2 olarak gösterildi. Empedimetrik immünosensör için LOD ve LOQ ölçüm değerleri sırasıyla 0.2, 0.4 ve 2 ng/ml olarak bulundu. %CV=2.7 olarak gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Amperometrik İmmünosensör, Empedimetrik immünosensör, Endoglin, CD-105, Kanser

DETERMINATION OF DIFFERENT TYPES OF CANCER BIOMARKER CD-105 (ENDOGLIN) BY DEVELOPING AN AMPEROMETRIC AND IMPEDANCE BIOSENSORS

Kazım Serkan SUNAL

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Ph.D. Thesis, October 2021

Supervisor: Assit. Prof. Ebru SAATÇI

ABSTRACT

In recent years, it has become more important to develop critical and sensitive analytical methods to detect low levels of cancer biomarkers in serum in the early stages of cancer. Electrochemical biosensors constitute important detection systems used in this direction. Therefore, the use of magnetic beads and screen-printed electrodes in electrochemical biosensors is important in terms of sensitivity and reproducibility of the analyzes performed. Moreover, it allows multiple measurements on sensors.

In this study, amperometric and impedimetric electrochemical immunosensor kits were developed for the determination of endoglin (CD-105) in human serum. The developed immunosensors were designed using a multiplex amperometric and an impedimetric system capable of single measurement. Screen printed multiplex carbon electrodes and magnetic beads were used to establish the measurement method.

As a result of the studies, the working ranges were found for the presence of 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml and 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml CD-105 recombinant antigen for the amperometric and impedimetric immunosensors, respectively. Again, LOB, LOD and LOQ measurement values were found to be 0.6, 1.1 and 4.1 ng/ml for the amperometric immunosensor, respectively. It was shown as % CV=3.2. LOD and LOQ measurement values for the impedimetric immunosensor were found to be 0.2, 0.4 and 2 ng/ml, respectively. It was shown as %CV=2.7.

Keywords: Amperometric Immunosensor, Impedimetric immunosensör, Endoglin, CD-105, Cancer

İÇİNDEKİLER

AMPEROMETRİK VE İMPEDİMETRİK BİYOSENSÖRLER İLE FARKLI TİP KANSERLERİN BİYOBELİRTECİ OLAN CD-105 (ENDOGLİN) TAYİNİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	Error! Bookmark not defined.
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	Error! Bookmark not defined.
ONAY :	Error! Bookmark not defined.
ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
GİRİŞ	1

1.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser	4
1.2. Tümör Belirteçleri.....	5
1.2.1. Tümör Belirteci CD-105 (Endoglin)	8
1.3. Biyosensörler	11
1.3.1. Biyosensörlerin Tarihçesi	14
1.3.2. Kullanılan Biyoreseptör Elementine Göre Sınıflandırma	16
1.3.3. Kullanılan İletici Sisteme göre Sınıflandırma	19
1.3.3.1. Optik-Optoelektronik Biyosensörler	20
1.3.3.2. Piezoelektrik Biyosensörler	21

1.3.3.3. Termal Biyosensörler	21
1.3.4. Elektrokimyasal Biyosensörler	22
1.3.4.1. Potansiyometrik Biyosensörler.....	23
1.3.4.2.1. Amperometrik Biyosensörlerde Elektron Transfer Mekanizması	26
1.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi	27
1.5. Biyosensörlerin Uygulama Alanları	30
1.6. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	31
1.7. Belirleme Limiti (Limit of Detection: LOD)	33
1.8. Hesaplama Limiti (Limit of Quantification: LOQ)	33
1.9. Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonu	33
1.9.1. Adsorbsiyon	33
1.9.2. Tutuklama.....	33
1.9.3. Çapraz bağlama.....	34
1.9.4. Kovalent bağlama.....	34
1.9.5. Biyolojik bağlama.....	35
1.10. Biyosensörlerin Tıpta Kullanım Alanları	35
1.11. Manyetik Boncuklar ve Nanopartiküller.....	36
1.12. Baskılı Elektrotlar (Screen-Printed Electrodes: SPEs)	39
1.13. Enzim –Bağımlı İmmüno Ölçümler (ELİZA)	40

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler	42
2.1.1. Kimyasallar	42
2.2. Yöntemler.....	47
2.2.1. Amperometrik Yöntem.....	47

2.2.2. Amperometrik Endoglin İmmünosensör Optimizasyonu	48
2.2.2.1. Çalışma optimize değerleri	48
2.2.2.2. Uygulama Potansiyeli Optimizasyonu	48
2.2.2.3. HRP Aktivitesi Okuma Süresi Tespiti	48
2.2.2.4. Protein-G Kaplı Manyetik Boncuk Konsantrasyonu Denemeleri.....	48
2.2.2.5. Monoklonal Endoglin Antikor Konsantrasyonu Optimizasyonu	49
2.2.2.6. HRP ile konjuge Poliklonal Endoglin Antikoru Konsantrasyonu Optimizasyonu	49
2.2.2.7. Poliklonal antikorun HRP ile Konjugasyonu	49
2.2.2.8. EIS Ölçümleri	49
2.2.2.9. Serum içinde Rekombinant Endoglin proteini amperometrik ölçümleri.....	50
Uygulama prosedürü:	50
2.2.2.10. Serum içinde Rekombinant Endoglin proteini EIS ölçümleri	50
2.2.3. İstatistiksel analiz	51

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Optimizasyon Çalışmaları.....	52
3.1.1. Uygulama voltajının belirlenmesi	52
3.1.2. Reaksiyon süresi tespiti.....	53
3.1.3. Manyetik Boncuk Konsantrasyonu	53
3.1.4 Monoklonal Antikor.....	54
3.1.5. HRP işaretli Poliklonal Antikor konsantrasyonu	55
3.1.6. Antijen konsantrasyonuna bağlı amperometrik standart eğri grafikleri.....	56

3.1.7. Antijen konsantrasyonuna bağı Empedimetrik standart eğri grafikleri.....	58
3.1.8. Serum içi antijen konsantrasyonuna bağı Amperometrik ve Empedimetrik sinyal grafikleri.....	60
3.1.9. Amperometrik ve EIS metot karşılaştırmaları	61
3.1.9. Amperometrik ve EIS metotları için serum spike sonuçları.....	62
3.1.9.1. Amperometrik metot ile geri kazanım	62
3.1.9.2. Empedimetrik metot ile geri kazanım	62

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Tartışma	64
4.2. SONUÇ.....	71
4.3. Öneriler	72
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ.....	90

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
TGF	Transforming büyüme faktörü
CD-105	Endoglin
EIS	Elektrokimyasal dielektrik spektroskopisi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
SPE	Baskılı elektrotlar
RIA	Radyoimmünoassay
LIA	Lüminesan immünoassay
EIA	Enzim immünoassay
AFP	α -fetoprotein
CEA	Karsinoembriyonik antijen
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
ROC	Alıcı işlem karakteristikleri
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
YSI	<i>Yellow Springs Instrument</i>
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimerler
RNA	Ribonükleik Asit
Rs	Elektrolit direnci
Rct	Elektrolit arayüzünde yük aktarım direnci
Cdl	Çift katmanlı kapasitans
Rmt	Kütle transfer direnci
W	Warburg empedansı

LOD	Belirleme limiti
LOQ	Hesaplama Limiti
1-NP	1-naftilfosfat
ELİSA	Enzim –Bağımlı immüno Ölçümler
AChE,	Asetilkolin
TMB	Tetramethylbenzidine
MBs	Manyetik boncuk
NaCl	Sodyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
Mab	Monoklonal Antikor
MTS	Metastaz
PIN	Prostatik intraepitelyal neoplazi

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Biyosensörlerin bileşenleri [40].....	15
Tablo 1.2. Transduser seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması [50].....	19
Tablo 3.1. Amperometrik ve EIS metotları için LOB, LOD ve LOQ karşılaştırmaları .	61
Tablo 3.2. Amperometrik biyosensör ile serumdan CD-105 geri kazanım yüzdeleri	62
Tablo 4.1. Farklı hastalıklarda ölçülen serum endoglin seviyeleri	67
Tablo 4.2. Farklı Çalışmalarda Ölçülen Minimum Serum Endoglin Seviyeleri.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Tümör belirteçlerinin özellikleri [23]	6
Şekil 1.2. Endoglin yapısı; disülfid bağları ile bağlanan 95 kDa ağırlığında iki alt birimden oluşur [27].....	10
Şekil 1.3. Bir biyosensörü meydana getiren ana bileşenleri [35].....	12
Şekil 1.4. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi [38].....	14
Şekil 1.5. Biyosensörlerin sınıflandırılması [40]	16
Şekil 1.6. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi [57]	23
Şekil 1.7. Amperometrik enzim elektrotu jenerasyonları a) I. Nesil Amperometrik elektrotlar, b) II. Nesil Amperometrik elektrotlar, c) III. Nesil Amperometrik elektrotlar [60].	25
Şekil 1.8. Enzim ve elektrot arasında bulunan mediatörlü elektron transferi [63]	26
Şekil 1.9. Empedans Devresinin Grafikselsel İfadesi [73].....	29
Şekil 1.11. Kafes tipi tutuklama ve mikrokapsül tipi tutuklama [85]	34
Şekil 1.12. Çapraz bağlama yöntemi [85].....	34
Şekil 1.13. Biyosensörlerde biyobileşen immobilizasyonunda kullanılan yöntemler [87]	35
Şekil 1.14. Manyetik partiküllerin sematik gösterimi (A), fonsiyonel gruplarla aktivasyon (B) ve konjuge biyolojik moleküler (C) [80].....	38
Şekil 1.15. Manyetik boncukların modifikasyonu ve baskılı elektrotlar üzerinde biyosensör ölçümleri [111].	39
Şekil 1.16. SPE yapısı [112]	40
Şekil 2.1. Dropsens Çok Kanallı Potansiyostat.....	43
Şekil 2.2. Dropsens µSTAT-i400 Potansiyostat	43
Şekil 2.3. Çalkalamalı inkübasyon vorteksi.....	44
Şekil 2.4. Manyetik boncukları toplama ve yıkamada kullanılan magnet	44
Şekil 2.5. Dropsens 8x DRP amperometrik biyosensör elektrotu.....	45
Şekil 2.6. Dropsens 1x DRP empedans biyosensör elektrotu.	45
Şekil 2.7. Amperometri Sistemi: Potansiyostat, elektrot bağlantıları, 8x elektrot ve	46

bilgisayar bağlantısı	46
Şekil 2.8. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Sistemi: Potansiyostat, elektrot bağlantıları, 1x elektrot ve bilgisayar bağlantısı	46
Şekil 2.9. Amperometrik metot ile geliştirilen Endoglin immunosensör metodunun şematik gösterimi	47
Şekil 3.1. Uygulama potansiyeli voltametri grafiği	52
Şekil 3.2. Çalışma koşullarında TMB inkübasyon grafiği	53
Şekil 3.3. Çalışma koşullarında manyetik boncuk miktarı optimizasyon grafiği	54
Şekil 3.4. Çalışma koşullarında MAb dilüsyonu optimizasyon grafiği	55
Şekil 3.5. HRP işaretli poliklonal antikor konsantrasyonu optimizasyon grafiği	56
Şekil 3.6. 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml konsantrasyonlarında CD-105 rekombinant antijen varlığında, -200 mV sabit voltaj altında elde edilen amperometrik standart eğri grafiği.	57
Şekil 3.7. 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında amperometrik immunosensör standart eğri grafiği amperogram görüntüsü.	57
Şekil 3.8. 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml konsantrasyonlarında CD-105 rekombinant antijen varlığında elde edilen empedimetrik standart eğri grafiği.	59
Şekil 3.9. 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında empedimetrik immunosensör standart eğri grafiği bode görüntüsü	59
Şekil 3.10. Kör, 2, 4, 10, ng/ml CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında amperometrik immunosensör amperogram görüntüsü.	60
Şekil 3.11. 1, 2, 5, 10, 20, 40 ng/ml spike CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında empedimetrik immunosensör bode görüntüsü	61

GİRİŞ

Biyobelirteçler, normal, biyolojik ya da normal olmayan süreçlerle gerçekleşen hücresel, moleküler ya da biyokimyasal değişikliklerdir. Belirteçler, tedavi sonucu biyolojik, farmakolojik ya da patolojik süreçleri cevapları ölçme ve değerlendirmede kullanılmaktadırlar. Kanseri araştırması ve tespitinde biyobelirteç kanserin bedende olduğunu gösterir. Bir tümör belirteci, bir tümörü normal dokudan ayırt eden, bir tümöre yanıtta konak veya tümörün kendisi tarafından üretilen ya da kan veya salgıların ölçümüne dayalı bir tümör varlığını tespit etmek için kullanılan maddedir [1,2]. Biyobelirteç miktarları biyolojik dokuda, sıvıda ya da hücrede belirlenebilir. Görüntüleme ücretini minimuma indirebilmek ve faydasını en yüksek oranda tutabilmek için biyomarkerler serum, tükürükte ve üre de ölçülebilmektedirler [3].

Endoglin (CD-105) bir hücre yüzey glikoproteini olarak transforming büyüme faktörü beta-1 (TGF-beta1) veya TGF-beta3'un bağlanmasında görevli bir reseptördür, ve insan endotel hücrelerinin proliferasyonunda en uygun belirteçlerdendir. Endoglin etkin endotel hücrelerine bağlanmayı düşünür ve bunlarda tümör anjiyogenezinde görev alırlar. Bazo çalışmalarda CD-105'in damar oluşumunda yer aldığını ve bu şekilde birçok tümör tipinde kan damarlarının anormal gelişmesinin kuvvetli bir belirteci olduğu düşünülmektedir. CD-105 tümör dokusundaki yeni damarlarda güçlü bir şekilde ekspres olmaktadır [4].

Biyosensörler, biyolojik sistemler ve sistemlerden alınan bilgiyi analitik olarak kullanışlı bir sinyale dönüştüren iletici sistemlerden oluşur. Spesifik bir analit veya analitler grubunun yağunluğuna bağlı olarak sinyal oluşturur. Elektrokimyasal biyosensörler yaygın olarak kullanılan biyosensörlerdir. Düşük seviyelerde biyobelirteçler, düşük minimum tespit limitleri nedeniyle kanserin erken bir aşamada belirlenmesine yardımcı olabilecek fizyolojik numunelerde çeşitli biyosensörler tarafından ölçülebilmektedirler. Ayrıca, biyo-tanım moleküllerinin yeniden kullanılması ve numune hazırlama ile analizi arasında bir zaman atlamasından

kaçınılması da bu sistemler tarafından kolaylaştırılmıştır. Dahası, çoklu biyobelirteçlerin eşzamanlı tespiti için çoklu ölçümlü biyosensörler üretilmiştir [5].

Amperometrik biyosensörler duyarlı, güvenilir ve düşük maliyetli olmasının yanında çevre, endüstri ve klinik gibi çeşitli alanlardaki uygulamalarda da oldukça etkindirler. Amperometri yöntemi elektroaktif türlerin elektrokimyasal olarak indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu akımın belirlenmesine dayalıdır. Hassas ve kullanımının rahat olmasından dolayı en fazla tercih edilen biyosensördür. Genellikle biyolojik molekül elektrot üzerine immobilize edilir [6,7,8].

Biyolojik materyallerin birbirleriyle spesifik etkileşimlerinin izlenmesinde ve kantitatif analizlerinde, biyosensörlerin hazırlanmasındaki kolaylıklardan dolayı tercih edilen elektrokimyasal empedans spektroskopisi, (EIS, elektrokimyasal dielektrik spektroskopisi) immobilizasyon işlemi uygulanmış olan sistemlerin, miktarlarındaki değişimleri, yüzeylerindeki hassasiyetleri, kompleks elektriksel dirençlerini analiz etmek belirlemek için uygulanan hem kolay kullanışlı hem de oldukça etkili bir metottur. Empedans yöntemleri ile analiti ve biyoreseptörü arasındaki etkileşmesinin belirlenmesinin yanı sıra, immobilizasyon işleminin gerçekleşmesi ve yüzey modifikasyonunun karakterizasyonlarını da başarıyla gerçekleştirmek olasıdır. Bu özellikleri empedansa, görüntüleme tekniği kullanılarak yüzey morfolojisinin gözlenmesinde yardımcı olan önemli araçtır [9,10].

Elektrokimyasal immunosensörlerde [11] ve floresans [12] aracılığıyla DNA hibridizasyon tanısı uygulamalarında kullanılan manyetik boncuklar, belirli çap boyutuna sahiptirler ve sıvı ortamda mıknatıs aracılığıyla manyetik olarak ayrılmaya uygundurlar. Mıknatısın manyetik etkisi uzaklaştırıldığında ise manyetik boncukların tekrar çözelti içerisine dağılmaktadırlar [13].

Biyosensör uygulamalarında kullanılan bir diğer malzeme olan baskılı elektrotların (SPE) kullanımı gittikçe artmaktadır. Elektrotlar, seramik yüzeyler ya da yalıtkan plastiklerin değişik tiplerinde farklı iletken mürekkeplerin basılmasıyla elde edilmiş elektrotlardır. Küçük boyutlu bir şeritte çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrot ortak bir merkez etrafında düzenlenirler [14].

Elektrokimyasal metotlar içerisindeki boşluğu dolduran, güncellik sağlayan baskın bir analitik araçtır. Bu immünoşensör tasarımıyla endoglin (CD-105) tayini için yenilikçi bir ölçüm tekniğı geliştirilmiştir. Aynı zamanda immobilizasyon işlemi başlamakta olan sistemlerin, tutar değişimleri, yüzeylerindeki hassasiyetleri, kompleks elektriksel dirençlerini tahlil etmek için uygulanan hem kolay kullanışlı hem de oldukça etkileyici bir yöntem olan elektrokimyasal empedans spektroskopisi de bu tez çalışmamızda yer almaktadır. Yapılan literatür taramasında amperometrik biyosensör yöntemi ile kanser biyobelirteci olan CD-105 (Endoglin) tayininin yapıldığı bir çalışmaya tarafımızdan rastlanmamıştır. Çalışmamızın amacı amperometrik ve empedimetrik farklı iki tip biyosensör ile CD-105 tayinini gerçekleştirmektir. Bu yöntemlerle belirtecin, kolay ve güvenilir olarak kantitatif görünürlüğü çalışılmıştır.

Bu çalışmada, endoglin (CD-105) tayini için manyetik boncuklara dayalı elektrokimyasal iki farklı immünoşensör kiti geliştirildi. Geliştirilen immün ölçüme dayalı immünoşensör, multipleks bir elektronik donanıma sahip bir sistemde oluşturuldu. Ölçümler için amperometrik metotta baskılı multipleks elektrotlar (8x SPE'ler) ve empedimetrik metotta tekli karbon elektrotlar kullanıldı. Sistem, diğer sistemlere göre yüksek duyarlılıkta, multipleks analiz edilebilme yeteneğinde ve multipleks elektronik bir dizayna sahiptir.

1.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser

Kanser birlikte neden olduğu sağlık sorunlarının dışında, manevi ve maddi yönden uzun süreli ciddi çaba gerektiren bir hastalıktır. Dünyada her sene 14 milyon kişinin yakalandığı ve 8,2 milyon insanın ölümüne neden olan kanser; yaş, cinsiyet, dil, din, ırk ayırımı olmaksızın bütün insanları etkileyebilmektedir. Kanserde bu hızlı artış devam ettiği sürece, 2030 yılında yaklaşık 22 milyon yeni olayın olacağı tahmin edilmektedir [15].

Kanserin 200 tipi bulunmakta ve batı dünyasında ölümlerin takribî %50'sini oluşturmaktadır. Diğer bir yandan dünya nüfusunun 3'te 1'i hayatının bir aşamasında kanser tedavisi görmektedir. Kanser son 30 yılda iki kattan daha fazla artmıştır [16]. Tüm dünyada en hayati ölüm sebebi olmakla birlikte kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %30'u önlenebilmektedir. En fazla görülen kanser türleri kadınlarda ve erkeklerde farklılık göstermektedir [17]. Erkeklerde en çok görülen kanserler prostat ve akciğer kanseri iken sigarayla ilişik kanserler erkeklerde etkisini korumaya devam etmektedir. Kadınlarda en çok görülen kanser ise meme kanseridir. Hem erkeklerde hem de kadınlarda ortak olarak bağırsak (kolorektal) kanseri üçüncü sırada en fazla görülen kanser çeşitidir [15].

Kansere kalıtsal yatkınlık, moleküler tekniklerdeki gelişmeler sayesinde daha belirlenebilir olmaktadır. Bununla birlikte, kanserli hücrelerdeki mutasyonların basit şekilde analizi, karışık bir süreci açıklamak için yeterli olmayabilir. Kanser hücrelerinin çevredeki hücresel mikro ortamlarla karmaşık etkileşimi ve iletişimi hem kanser hücrelerinin hayatta kalması hem de bu hücrelerin yayılması için gerekli olabilir. Kanser %90 çevresel, %10 oranında ise kalıtsal etkenlere bağlı olarak ortaya çıkmakta ve çevresel faktörler arasında da tütün, obezite, alkol ve enfeksiyonlar ilk sıralarda yer

almaktadır. Kanserele savaşın en önemli adımı olan tedbir çalışmaları da bu ve diğere çevresel sebeplerle mücadeleyi ve bu mücadele konusunda modernleştirilen ülke politikalarını içermektedir [18].

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin denetimsiz ya da anormal biçimde büyümesi ve çoğalması olarak açıklanır. Bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde, hücrenin büyümesinde ve hücre farklılaşmasında değişiklikler olur. Bu değişiklikler, DNA ve gen seviyesinde mutasyona sebep olabilir. Bu değişikliklerden etkilenen onkogenler genler ve tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılmaktadır. Onkogenler normal genlerin yüksek seviyede eksprese olması ile oluşur. Tümör baskılayıcı genler ise; hücre bölünmesi, hayatta kalma ya da kanser hücrelerinin diğere özelliklerini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler çoğunlukla kalıtsal değişiklikleri indüklemek için kanserli hücreler tarafından devre dışı bırakılır. Bu genlerin, transkripsiyonları sonucu oluşan proteinlerle etkilerini ortaya koyarlar. Kanserin amaçladığı genetik planlamalar insan genomuna dağılmış genlerde yazılıdır. İnsan DNA'sının 23 bin civarında gen içerdiği belirlenmiştir. Bu genlerin 3 bin veya 5 bini kanserde düzeni bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. Görevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde üretimine, anormal bir protein üretimine veya bir proteinin hiç olmamasına neden olabilir [19].

1.2. Tümör Belirteçleri

Tümör belirteçleri, eğilimli tümör veya doku tarafından suprafizyolojik seviyelerde üretilen, biyokimyasal veya immünokimyasal yöntemlerle hastanın kan doku veya diğere vücut sıvılarında kantitatif ölçümleri yapılabilen hormon, enzim, metabolit, immünglobulin protein yapıdaki maddelerdir. Tümör belirteçlerinin tespitini, spektrofotometrik, nefelometrik, radyoimmnlm (RIA), lüminesan immnlm (LIA) ve enzim immnlm (EIA) yöntemleri ile yapılabilir [20].

Tümör belirteçleri potansiyel olarak erken malinitelerin taranmasında, aşama belirlemede, tedavi seçimi, prognoz tayini ve hastanın takibinde kullanışlı olabilen maddelerdir. Her ne kadar tümör belirteçlerinin yüksek seviyeleri malinitelerde görülse de birçok hormonal ve metabolik farklılık durumunda ve bening hastalıklarda rastlanabilir. Bazen de bir tümör ileri evreye kadar ilişkilili olduğu proteini üretmeyebilir. Bir belirteç tek bir tümör çeşidine özel olmayabilir. Fakat doku tanısı konmuş bir malinitenin gzetlenmesinde, tedavi seçimi ve ilerleme tahmininde yarar sağlarlar [21].

Tümör dokusunun mevcudluğunu gösteren ve dokuya ait biyolojik bir karakter olan tümör belirteçlerinin, hücre proliferasyonu ve hücre diferansiyasyonu ile alakası vardır bu yüzden özellikle kanser tanısı ile takip ve tedavi gören hastalarda, teşhisi desteklemek, tedaviye cevabı kıymetlendirmek, relapsları belirlemek ve erken aşama tümör taramalarında yararlanılan molekülüdür. Tümör belirteçlerinin hususi patolojiler; hepatoma, prostat kanseri ve yumurta kanseri dışında tarama amaçlı kullanımı önerilmemektedir. Neoplastik olmayan durumlarda yüksek düzeylere ulaşabileceğinden, özellikle asemptomatik olgularda belirteç taraması önerilmemektedir. Tanılama amaçlı kullanımı kısıtlıdır [22].

Genellikle üç kategoride incelenir:

- 1- Tümör ürünleri
- 2- Sitogenetik farklılıklar
- 3- Moleküler işaretleyiciler

Belirteçler özgünlükle serumda, idrarda ya da diğer vücut sıvılarında belirlenebilen enzim, hormon, hücre içi proteinler ya da hücre membran antijenlerinden doğmaktadır. Klinik olarak bir tümör belirteci %100 özellikli ve %100 hassas olmalıdır. Ayrıca tümör düzeylerini göstermeli, tanı değeri olmalı, üretilebilir ve kullanışlı ölçülebilir olmalıdır [22].

Tümör belirteçleri, tanı yardımcıları, progresif belirteçler, tedavi göstergeleri ya da tedavi sonrası izleme gibi kanser yönetimine yardımcı olabilir. Aynı zamanda bu belirteçler, vücut sıvılarında anormal derecede yüksek miktarlarda bulunabilen maddelerdir. Kanser heterojen yapısını yansıtan tümör belirteçleri, çeşitli tümör kaynaklı veya tümörle ilişkili molekül türlerini kapsar. Tümör belirteçleri farklı tümör çeşitleri tarafından oluşturulabilir (Şekil 1.1) [23].

- ⇒ Başka dokularda ve kanserlerde sentezi en az düzeyde olmalıdır.
- ⇒ Hasta olmayanlarda sentezi minimum olmalıdır.
- ⇒ Başka dokularda ve kanserlerde sentez edildiğinde immünolojik özellikleri farklı olmalıdır.
- ⇒ Tümörün kitlesi ile orantılı sentez edilmelidir.
- ⇒ Tümörün aktivitesi ile orantılı sentez edilmelidir.
- ⇒ Yarı ömrü çok uzun olmamalıdır.
- ⇒ Çok küçük bir kanser kütleinde bile ölçülebilir miktarlarda belirteç üretilmelidir.

Şekil 1.1. Tümör belirteçlerinin özellikleri [23]

Tümör belirteçleri, iyi karakterize edilmiş proteinler (örn. Hormonlar, enzimler vb), küçük basit moleküller olabildiği gibi, bunları ölçmek amacıyla kullanılan antikorlar tarafından ifade edilebilen çok büyük heterojen glikoproteinlere dek değişken yapılardır. Bazı hayati tümör belirteçleri; örneğin, α -fetoprotein (AFP), karsinoembriyonik antijen (CEA) ve insan koryonik gonadotropin (hCG)), normal gebelikte fetüste bulunan fakat bazı kanserlerin olduğu yetişkinlerin doku veya vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonlarda eksprese edilen onkofetal antijenlerdir. Tümör belirteçleri, hücrelerde, dokularda ya da vücut içeriklerinde bulunur ve kimyasal, immünolojik ya da moleküler biyolojik metotlar kullanılarak nitelik veya nicelik olarak ölçülebilir. Yapıları ve özellikleri geniş ölçüde değişirken, kanıta dayalı klinik uygulamalarını destekleyen kurallar tüm tümör belirteçleri için ortaktır [23].

Aktif kullanım şansı olan çok sayıda tümör belirteci tanımlanmıştır. Çok değişik yapılarda tümör belirteçleri olmasına karşın tek bir tümör çeşidine duyarlı ve özgün olanı bulunamamaktadır. Bununla birlikte şu anda kullanılmakta olan belirteçler evreleme, prognoz ve tekrarlama olasılığının saptanması konusunda yararlı olmaktadır [23].

Mevcut tümör belirteçleri, genellikle tümör ile ilişkili antijenlerdir. Bilinen ilk tümör belirteci, 1960'lı yıllarda karsinoembriyonik antijen (CEA) olarak tanımlanır. Bunun, gastrointestinal tümörlü hastaların serumunda mevcut olduğu, ancak normal dokuların içinde bulunmadığı belirlenmiştir. Bu ve diğer belirteçlerin söz konusu tümör için son derece özgül ve spesifik olacağı tahmin edilmiştir. 1847'de asitleştirilmiş idrardan bir proteinin çökmesi klinik olarak kullanılacak ilk tümör belirteci olan Bence Jones (1848) proteininin tanımlanmasını saptamıştır. Bir yüzyıldan daha uzun bir süre sonra, Nobel Ödüllü Porter, Edelman ve Poulik'in çalışmalarının, tümör plazma hücreleri tarafından salgılanan monoklonal hafif zinciri olarak karakterize edildiği, Bence Jones proteininin paraproteinler veya M-protein ölçülmesi birçok miyelomun tanısının temelini oluşturmaktadır. Yirminci yüzyılın ilk yarısında, çeşitli hormonların, enzimlerin ve izoenzimlerin ve kan grubu antijenlerinin varlığı veya yokluğu malignite ile ilişkili olduğu kabul edildi, ancak 1960'lı yıllarda radyoimmünoassay tekniğinin (RIA) gelişmesine kadar, bu gözlemlerin rutin klinik pratiğe dönüştürülebileceğini belirtmiştir [24].

Tümör belirteçleri hem keşif hem de teşhis aracı olarak daha fazla kullanılmaktadır. İlerlemiş biyoinformatiklerin desteklediği bu gelişmeler (örneğin, sinir ağları, destek vektörleri makineleri ve diğer algoritmalar) kanser teşhis, prognoz ve tedavi öngörüsü için çoklu parametrik analiz kullanımını özendirilmektedir. Tümörleri, iyi tanımlanmış belirli moleküler ölçütleri karşılayan hastaların alt gruplarında etkili olan yeni ve pahalı immünoterapilerin ortaya çıkmasıyla, tümör belirteçleri giderek daha önemli hale gelmektedir. Bu belirteçleri ölçmek için kullanılan yöntemler, belirteçlerin saptanması için yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahip olmalıdır. Tümör belirteçlerinin duyarlılığı-özgüllüğü, laboratuarlarda; ROC ve yeterlilik analizleri gibi analitik performans ölçütleri ile değerlendirilir. Testin istenen şekilde yapılmasını, test isteminde bulunanların herhangi bir analiz öncesi gereksinimin farkında olduğunu, bunların rutin pratikte yerine getirildiğini, analitik performansın titiz bir iç kalite kontrolü ve yeterlilik testi güvenilir olmasını sağlamak önemlidir [24].

1.2.1. Tümör Belirteci CD-105 (Endoglin)

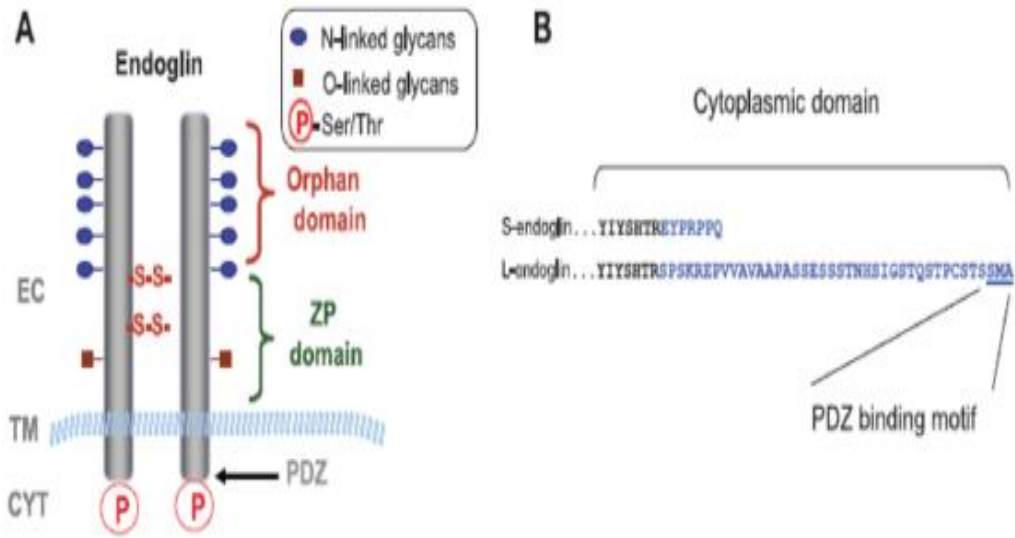
Hızlı çoğalan endotel hücrelerinde, malign dokuların anjiogenik damarlarındaki endotel hücrelerinde bol miktarda var olan hücre membran glikoproteinidir. Birinci olarak Haruta ve Seon tarafından 1986'da lösemi ile alakalı hücre yüzey glikoproteini olarak çıkmıştır. Çoğalma, migrasyon, ekstrasellüler matriks üretimi ve hematopoez gibi birçok hücresel fonksiyonu düzenleyen, yara iyileşmesi ve anjiogeneizde rol alan Transforming Growth Faktör β (TGF- β) familyasının bir üyesidir. Endoglin, TGF- β 1 ve TGF- β 3 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanır. Endotel hücresindeki TGF- β 1'in inhibitör etkisini antagonize ederek anjiogeneizde görev alır. TGF- β 2 reseptörüne bağlanmaz. Son yıllarda elde edilen bilgiler endoglin'in, anjiogenezin baskın bir belirteci olduğunu ve vasküler hastalıkların patogenezinde ve tümör ilerlemesinde hayati bir görev oynadığını göstermektedir [25].

CD-105 olarak da bilinen Endoglin, TGF- β süperfamilyasının 180 kDa'luk homodimerik bir ko-reseptördür. Endoglin, disülfidbağlı ekstrasellüler bir bölüme ve kısa, temel olarak fosforillenmiş bir sitoplazmik kuyruk içerir. Endoglin-S formu, 14 aminoasitlik bir sitoplazmik bölgesi olan 600 aminoasitten oluşuyorken endoglin-L formu 47 aminoasitlik bir sitoplazmik kısmı olan 633 aminoasitten oluşmaktadır. L-CD105 baskın olarak endotel hücrelerinde ifade edilmiştir [25].

CD-105'in fonksiyonu hakkında farklı bakış açıları mevcuttur. Birincisi, çok az bir yüzde ile TGF- β 'e bağlanmasıdır. İkincisi, TGF- β yokluğunda, sinyal bölümünün olmamasına rağmen CD-105 in aşırı ekspresyonu ile hücre morfolojisi ve adezyonunu etkilemesidir. Bu da TGF- β sinyalizasyonunda bağımsız bir fonksiyonun da olduğunu düşündürür. Diğer büyüme faktörleri de CD-105'e bağlanabilir ve endogline bağlanmak için reseptör II ye ihtiyaç duyarlar. CD-105 tüm yapısı ile ortamda TGF- β olmasa bile TGF- β 1 ve TGF- β 2 ye bağlanabilir. Her iki reseptör arasındaki etkileşim farklıdır. TGF- β R I, sadece kinaz bölümü inaktif olduğunda CD -105 ile etkileşir. TGF- β R II ise aktif veya inaktif olsada CD-105 ile ilişki halindedir. CD105 in sitoplazmik kısmı TGF- β R I ve II tarafından fosforilize olur. TGF- β R I, daha sonra kompleksten ayrılır. Ayrıca CD-105 in ekspresyonu, TGF- β R II fosforilizasyonunu inhibe ettiği halde, TGF- β R I' inkini ise artırır. Sonuç olarak Smad 2 proteinlerinin fosforilizasyonunu arttırır. Smad 2, gen transkripsiyonunu idare eden birçok sinyalinin tamamlayıcısı rolünü oynamaktadır. Özet olarak CD-105, TGF- β R I ve II ile etkileşerek TGF- β fonksiyonlarını düzenler ve Smad proteininin fosforilizasyonun ayarlar [26].

Endoglinin hereditör, hemorajik, telenjiektazi ve kanser anjiyogenezisi gibi birçok patolojik süreçte rol aldığı belirtilmiştir. Ayrıca son zamanlarda preeklampsi, hipertansiyon ve diabetes mellitus gibi metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur [27].

İnsan endoglini geni 9. kromozom uzun kolunda (9q34ter) yerleşmiştir ve 15 exondan oluşur. Disülfid bağları ile bağlanan 95 kDa ağırlığında iki alt birimden oluşur. Her bir alt birim tip 1 integral membran proteini olarak da bilinen endoglinin hücre dışı, transmembranöz ve sitozolik parçalardan oluşur. Sitozolik uçları farklı olan iki izoform tanımlanmıştır. Baskın olan L-izoformda sitozolik uç 47 aminoasit içerirken, minör izoform olan S-izoform 14 aminoasit içerir. Bu iki izoform farklı etkilere sahiptir; genel olarak L-endoglin proanjiyogenik etkilere sahipken, S-endoglin antianjiyogenik özelliklere sahiptir. Ayrıca yaşlılığa bağlı kardiyovasküler sistem bozukluklarının oluşumunda da S-endoglinin katkısının olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 1.2) [27].



Şekil 1.2. Endoglin yapısı; disülfid bağları ile bağlanan 95 kDa ağırlığında iki alt birimden oluşur [27]

Endoglin etkin endotel hücrelerine bağlanmayı tercih eder ve bunlarda tümör anjiyogenezinde rol alırlar. Birçok çalışmada CD- 105'in damar oluşumunda yer aldığını ve bu şekilde birçok tümör çeşitinde kan damarlarının anormal gelişiminin kuvvetli bir belirtici olduğu düşünülmektedir. CD-105 tümör dokusundaki yeni damarlarda güçlü bir biçimde eksprese olmaktadır [28].

Aterosklerozlu ve hiperkolesterolemili hastalarda serum endoglin seviyelerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Blann ve ark. ilk kez hiperkolesterolemili hastalarda endoglin seviyesini yüksek bulmuşlardır [29]. Buradan yola çıkarak S-endoglin seviyelerinin endotel hasarı ya da fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Blaha ve ark. ise hiperkolesterolemili hastalarda aferez sonrası S-endoglin seviyelerini aferez öncesine göre daha düşük bulmuşlardır [30]. Ancak S-endoglin seviyesi kolesterol seviyesi ile korelasyon göstermemiştir. Sonuç olarak azalmış S-endoglin seviyesinin, aferez yöntemi ile aterojenik maddelerin uzaklaştırılması sonrası endotel fonksiyon bozukluğundaki iyileşmenin ve immün sistemdeki azalmış aktivasyonunun bir belirtisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Diğer yandan Li ve ark. ise ağır koroner hastalığı olan hastaların S-endoglin ve TGF- β 1 (kuvvetli vazodilatör) seviyelerini kontrollere göre daha düşük tespit etmişlerdir. Bu durumu ise dolaşımdaki artmış S-

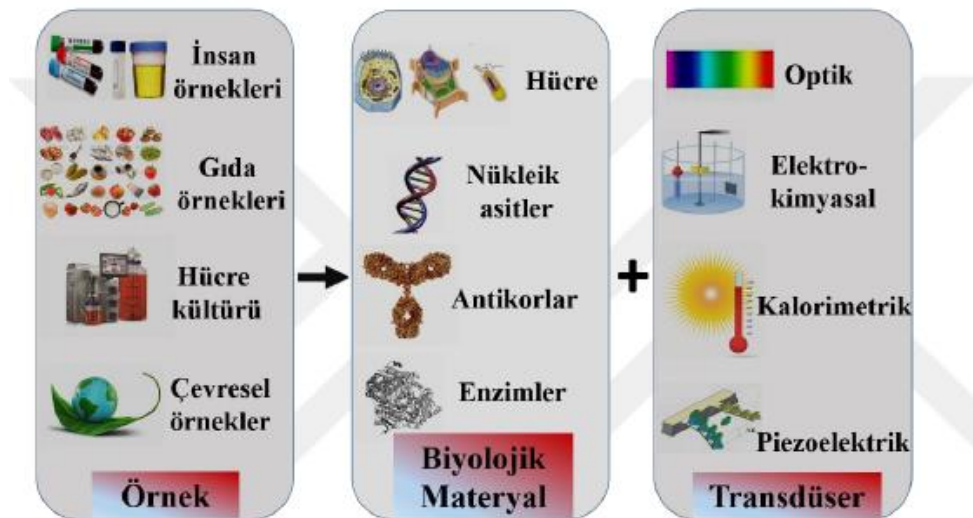
endoglin/TGF- β 1 kompleksi oluşumuna bağlamışlardır. Sonuç olarak, aterogenezin erken aşamalarında endotel hasarına bağlı S-endoglin seviyelerinin yüksek olduğunu, koroner arterde daha ağır seviyedeki aterosklerotik lezyonların varlığında ise bu molekülün seviyesinin düştüğünü ifade etmişlerdir. Hiperkolesteroleminin yanısıra miyokard infarktüsünde veya plak rüptüründe de S-endoglin molekülünün serum seviyesinin değiştiği belirtilmiştir. Yine bu molekülün kronik koroner hastalığına sahip bireylerde kardiyovasküler olayları öngörmede kullanılabilecek yeni bir belirteç olabileceği ileri sürülmüştür [31]. Yakın zamana kadar yapılmış olan çalışmalar, kan damarlarındaki endoglin ekspresyonunun; ilerlemiş aterosklerotik lezyonlardaki neoanjiogenezde, plak stabilizasyonunda, anti-inflamatuvar işlevlerde ve endotel fonksiyon bozukluğunun sınırlandırılmasında rol oynadığını düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, hiperkolesterolemi, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, diyabet ve hipertansiyon artmış kan S-endoglin seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur [32]. Diyabetli hastalarda kanda artmış çözünebilir endoglin seviyelerinin damar duvarında TGF- β sinyalizasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir [33]. Böylece endotel fonksiyon bozukluğunda, aterosklerozda ve sonuç olarak koroner arter hastalığı gelişiminde önemli olabilecek bir mekanizma tanımlanmıştır. Çözünebilir endoglin seviyesinin ölçümü aterosklerotik sürecin ilerleme hızı ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi anlamında yol gösterici olabilir. Bu nedenle kardiyovasküler sistem ile ilgili birçok hastalıkta tedavi açısından endoglinin potansiyel bir hedef haline gelebileceği ifade edilmektedir [33].

1.3. Biyosensörler

Canlıların çevrelerindeki değişimi anlama ve cevap verme sistemleri, biyosensörlerin ilerlemesi için temel oluşturmuştur. Biyosensörler; çoğunlukla biyolojik tahliller için kullanılan bir çeşit özel sensörlerdir ve "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren sistemler" olarak betimlenmektedir. Son yıllarda mikro veya nanoelektronik alanındaki çalışmalar ile biyolojik moleküllerin gerçeküstü duyarlılıktaki cevap verme kapasitelerinin keşfedilmesine ve biyosensör teknolojilerinin hızla gelişmesine sebep olmuştur. Bunun sonucunda; tıp, eczacılık, gıda güvenliği, çevre kirliliği ve askeri uygulamalar gibi

birçok alanda kullanılmak üzere farklı tipte biyosensörler geliştirilmeye başlanmıştır [34].

Biyosensörler, biyolojik bir reaksiyonu elektrik sinyaline dönüştüren analitik cihazlardır. Basit ve kullanımı kolay olan bu sistemler, karışık biyoanalitik ölçümlerin gerçekleştirilmesi için biyolojinin hassasiyetini ve spesifikliğini fizikokimyasal transdüserlerle birlikte kullanırlar. Genel olarak üç temel bileşenden meydana gelirler. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip biyomateriyaller, biyoajanların analit ile reaksiyonu sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren dönüştürücüler (transducer) ve elektrik ya da diğer sinyal işleyicilerdir. Bir biyosensörde biyolojik materyal olarak, katalitik özelliklere sahip olsun veya olmasın birçok biyolojik molekül kullanılabilir. Katalitik özellikteki materyaller enzimler, mikroorganizmalar ve dokular iken; katalitik olmayanlar antikorlar, reseptörler ve nükleik asitlerdir. Biyosensörlerin bileşenlerinden dönüştürücüler; elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, iletken), optik, piezoelektrik ve manyetik sistemlerden oluşur. Günümüzde, biyosensör sisteminin hazırlanmasında kuantum noktalar, altın nanopartiküller, dendrimerler, manyetik nanopartiküller ve nanoteller gibi sayısız nanomalzemeler kullanılmaktadır. Bunlar arasında, nanofiberler geniş yüzey alanı, kontrol edilebilir çapı ve kalınlığı, esnekliği ve gözenekli yapıda olması nedeniyle geniş bir yer bulmuştur (Şekil 1.3) [35].



Şekil 1.3. Bir biyosensörü meydana getiren ana bileşenleri [35]

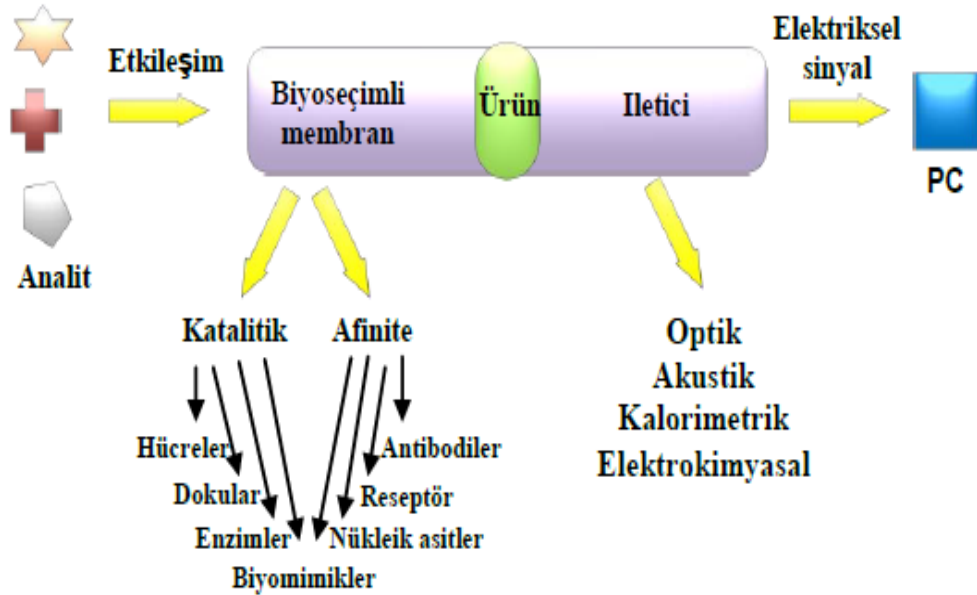
En başta biyosensör 1962 yılında Clarck ve Lyons tarafından enzim elektrot yardımı ile glikoz tespitine yönelik olarak yapılmıştır. Biyosensörlerin o yıllarda başlayan gelişimi devam etmektedir. Biyosensör araştırmalarının çıkış yapmasının arkasındaki yönlendirici güç, çoğunlukla dünyadaki önemli şirketlerin biyosensör teknolojisine derin ilgi göstermesi ve bu alanda dünya pazarında yer almak istemeleridir. Biyosensörlerin diğer geleneksel analitik aygıtlardan çok daha kârlı yönleri bulunmaktadır:

- 1- Küçük olabilme özellikleri (taşınabilir cihaz haline getirilebilme, az miktarda örnekle analiz bölgesinde çalışma olanağı)
- 2- Hızlı tepki zamanı
- 3- Yüksek seçicilik (karmaşık yapıli karışımlarda ayırma/safılaştırma yapılmaksızın analiz)
- 4- Kullanım kolaylığı (kullanımda uzman gerektirmemesi)
- 5- Maliyetinin az olması [36].

Bir biyosensörün fonksiyonu biyolojik aktif materyalin biyokimyasal özgülüğüne bağılıdır. Biyolojik materyalin seçimi özelliklik, depolama, operasyonel stabilite gibi birçok etkene bağılıdır. Aynı zamanda kimyasal bileşik, antijenler, mikroplar, hormonlar, nükleik asitler ya da tat ile koku parametrelerinin hangisinin tayin edileceğı biyolojik materyalin seçimini etkiler. Biyolojik sistem ve iletici sistemin iyi bir şekilde etkileşmesi yani başarılı bir immobilizasyon tekniğinin kullanılması etkili bir biyosensörün hazırlanmasında önemlidir [37].

Son yıllarda birçok biyosensör sistemi geliştirilmiştir ve bunlar klinik, medikal, çevresel görüntüleme, endüstriyel süreçlerin kontrolü ve diğer pek çok alanda çeşitli analizler çalışmalar için kullanılmıştır. Mikrosensör teknolojileri ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, biyosensörler konusundaki araştırma ve geliştirme çalışmaları hızlı bir yükseliş göstermektedir. Sensörlerde biyolojik materyalin kullanılmasının en önemli avantajlarından biri belirli bileşiklere olan seçiciliğinin artmasıdır. Diğer bir avantaj ise; biyolojik ilgisinin olduğı molekülü direk olarak tanınmasıdır. Birçok geleneksel metotta biyomolekülün tespiti için ön hazırlık gereklidir fakat çoğı zaman biyosensörlerde ön haazırlıklar gerek duyulmaz. Geleneksel yöntemlerin duyarlılığı yüksektir fakat bunların küçültülmesi zordur. Elektronik ya da

elektrokimyasal ölçüm metotları, bu yönleri ile diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Şekil 1.4) [37].



Şekil 1.4. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi [38]

1.3.1. Biyosensörlerin Tarihçesi

Biyosensör ifadesini ilk defa Clark ve Lyons (1962) belirtmişlerdir. Enzim-elektrot ilişkisini imal eden ikili, bu kompleksi glukoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-redüktaz enzim olan glukoz oksidazın platinyum elektrotta immobilize olmasından ibarettir. Platinyum elektrot enzim bölgesinden üretilen H_2O_2 tarafından +0,6 V'da polarize olur. Basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada *Yellow Springs Instrument* (YSI) olarak tanımlanmıştır. YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni membranlardır. Clark burada sandviç membran kullanmıştır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve selüloz asetat membran arasına hapsolmuştur. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer içerikleri elimine etmekte ve aracın duyarlılığını ve özgünlüğünü artırmaktadır. Mesela, Clark'ın kullandığı membran H_2O_2 'i diffüze ederken askorbat ve diğer parazitik kimyasalların geçişini engellemektedir [39].

Clark ve Lyons'un geliştirdiği ilk biyosensör dizaynı membran diyalizatör, reaksiyon bölgesi ve çeviricilerden oluşmaktadır. İkinci dizayn biyosensörlerde O₂ yerine, elektronları enzimin redoks merkezinden elektrodun yüzeyine aktarılan bir elektron akseptörü (redoks mediatörü) kullanılmıştır [39].

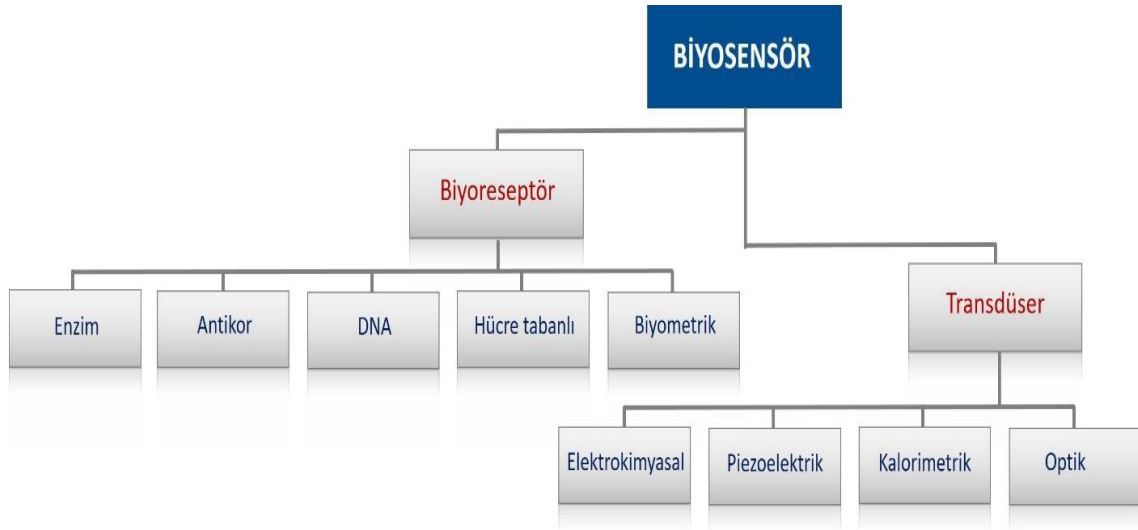
Biyosensörler 3 temel bileşenden oluşur; biyoreseptör, dönüştürücü ve sinyal süreç edici sistem. Biyotanıma elementi veya biyoreseptör, spesifik hedef analiti tanımaya yarayan immobilize biyokomponentten oluşur. Bu biyobileşenler sıklıkla antikorlar, enzimler ve nükleik asitlerdir. Transducer ise tanıma olayını ölçülebilir sinyale dönüştürürler (Tablo 1.1) [40].

Tablo 1.1. Biyosensörlerin bileşenleri [40]

Analit	Biyobileşen (Biyoreseptör)	Sinyal İletici Sistem (Transdüser)
Metaller	Enzimler	Elektrokimyasal Esaslı
Hormonlar	Antikorlar	Amperometri
Enzim-Koenzimler	Hücre-doku kesitleri	Potansiyometri
Substrat	Mikroorganizmalar	Yarı iletken esaslı
Aktivatör – İnhibitör	Nükleik asitler	Optik esaslı
Antikor- Antijen	Lipitler	Fotometri esaslı
Nükleik asit	Hücre organelleri	Fluorometri esaslı
Mikroorganizmalar	Reseptörler	Biyoluminesans
Virüsler		Piezoelektrik Kuartz kristal mikrobals

Analit ile biyoreseptör arasındaki reaksiyon yeni bir kimyasal ürün oluşumu, ısı salınımı, elektronların akışı, pH ve kütle değişimi gibi çeşitli kimyasal değişimlere sebep olmaktadır. Biyokimyasal sinyaller, elektriksel sinyallere çeviriciler aracılığıyla dönüşür. Sonuç olarak elektriksel sinyal güçlendirilir ve mikroelektroniklere ve veri

işleyiciye iletilir. Biyosensörler, kullanılan biyolojik sinyal verme mekanizmasına ve kullanılan sinyal ileticinin tipine göre gruplandırılır (Şekil 1.5) [40].



Şekil 1.5. Biyosensörlerin sınıflandırılması [40]

1.3.2. Kullanılan Biyoreseptör Elementine Göre Sınıflandırma

Biyotanıma elementleri, hedef analitleri tanımadaki görevinden dolayı biyosensörlerin hayati bölümleridir. Bu yüzden biyotanıma elementinin seçimi tam olarak hedef analite bağlıdır ve tanıma elementinin hedefe yüksek bağlanma affinitesine ve stabilitesine odaklanılır. Klasik tanıma elementleri enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve hücrelerdir. Ayrıca son zamanlarda fajlar, aptamerler, moleküler baskılanmış polimerler (MIP) ve affikorlar önemlidir [41].

- **Enzimler**

Enzimatik biyosensörlerde, enzim substratı ile belirli bir biçimde etkileşime girer. Enzimatik biyosensör sistemleri enzimlerin katalizini ya da hedef tarafından inhibisyonunu ölçebilirler.

a) Enzim analiti metabolize edebilir, böylece analit konsantrasyonu analitin katalitik transformasyonu ile ölçülür.

b) Enzim analit tarafından inhibe edilebilir, böylece analit konsantrasyonu enzimatik ürün oluşumunun azalması ile ilişkilendirilir.

Bu durumda, biyosensör sırasıyla tüketilen veya üretilen türleri belirler. Çoğunlukla, enzimatik biyosensörlerde sadece bir enzim kullanılır fakat multi-enzim sistemlerinde kombine enzimler aynı platformda bütünleştirilir [42].

- **Antikorlar**

Antikorlar biyosensörlerde kullanılan popüler affinite tanılama elementlerindendir. Gıda güvenliği, çevresel izleme, klinik analizler ve fiziki tanılama gibi bir dizi uygulamalarda genellikle kullanılmaktadırlar. Antikorlar, poliklonal (bir dizi immün hücre tarafından üretilen) veya monoklonal (tek kaynaktan; hücrenin benzer klonları tarafından üretilen) olabilir. Poliklonal antikorlar, antijenlere çeşitli yerlerden veya farklı affinite ile bağlanırlar ve monoklonal antikorlar epitop denen aynı hedef bölgeye eşit affinite ile bağlanırlar ve poliklonal antikorlara göre daha belirleyicidirler [43].

- **Nükleik asitler**

Biyotanıma elementi olarak nükleik asitler (DNA ve RNA) antikorlara göre kimyasal olarak daha belirlidir. Genosensörlerde, hedef DNA veya RNA, yüksek affiniteden dolayı DNA veya RNA elementinin hibridizasyonu ile tanınır. Hibridizasyon, tamamlayıcı DNA baz çiftinin eşleşmesi ile hedef DNA dizisinin spesifik bölgesinde oluşur [44].

- **Hücreler**

Canlı organizmalar mesela bakteri, fungi, maya, alg ve doku-kültür hücreleri teşhis elementi olarak biyosensörlerde kullanılırlar. Hücre temelli biyosensörlerde, analitik sinyal yaşayan canlı organizmanın genel metabolik durumunun ölçülmesi ile belirlenir. Böylece, büyümenin inhibisyonu, hücre canlılığı ve substrat alımı analitik sinyal olarak değerlendirilir. Biyotanıma elementi olarak hücrelerin enzimlere göre türlü üstünlükleri vardır. Bu avantajlar yüksek stabilite, azaltılmış saflaştırma basamakları gereksinimi, ekonomik hazırlama maliyeti, yeterli kofaktör rejenerasyonudur [45].

- **Fajlar**

Fajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir ve yüzeylerinde peptid ve protein bulundururlar bunun sonucunda patojenleri tespit etmede biyotanıma elementi olarak kullanılır. Ev sahibi bakteri üzerinde bulunan özellikli reseptör moleküllerin tanınması

ile olay gerçekleşir. Faj biyosensörleri, immunosensörlere göre çevre koşullarına daha sağlamdır. Ayrıca fajlar bakterilerin tespitinde bakterilere olan spesifikliğınden dolayı oldukça başarılıdır. Çünkü fajlar bakterilere özellikli olacak formda kalıtsal mühendislenmiştir ve sağlam, düşük maliyetli ve üretimi maliyetsizdir [46].

- **Aptamerler**

Aptamerler kısa zincirli 30-40 nükleobazdan oluşan in vitro ortamda hayvan ve hücre kültürüne gereksinim duyulmadan üretilen oligonükleotidlerdir (RNA ve tek iplikli DNA). Aptamerlerin hedeflerine yüksek affinitesi vardır. Tipik olarak benzersiz 3 boyutlu yapıya katlanır ve bu katlanma hedef analitlere özellikli bağlanmaya olanak sağlar. Termal olarak istikrarlı olmaları, tekrar kullanılabilir olmadan immobilizasyon için kolay modifiye edilebilir olmaları gibi avantajlara sahiptir. Kimyasal modifiye edilebilir olması analitin stabilitesini, affinitesini ve spesifikliğini artırır. Ek olarak, çok yönlülüğü ve üretim sırasında hayvan kullanımından kaçınması antikörlerle mukayese edildiğinde en büyük avantajlarından biridir. Aptamerler bir dizi hedef analitlere mesela toksinler, antibiyotikler ve biyobelirteçlere tutunabilir [47].

- **Affikörler**

Affikörler, rekombinant affinite proteinlerin yeni sınıfıdır ve izolasyonlarından sonra hedef protein veya peptidlere önemli derecede affinite ve spesifikliğıne sahip olurlar. Affikörlerin tek domainleri ve 3 heliks yapıları bulunur. Heliks üzerinde 13 adet aminoasit pozisyonu içerir. Affikörlerin izolasyonu non-immunoglobulin iskeletine dayanır. Affikörler görüntüleme, diagnostik ve terapötikler olarak sıklıkla kullanılmasına rağmen, biyotanıma elementi olarak biyosensörlerde kullanımı yeni başlamıştır. Fakat önümüzdeki günlerde hedef analite affinite ve spesifikliğı sayesinde kullanım açısından potansiyeli bulunmaktadır.

- **Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)**

Son yıllarda biyosensörlerin birçok prototipi örneğın, enzim ve antikörlerin aşırı koşullarda düşük stabiliteden dolayı ticari duruma gelememektedir. Bu yüzden biyotanıma elementi olarak MIP gibi sentetik matrikslerin kullanımı önemlidir. MIP'ler yüksek seçicilik, stabilite, sentezinde kısa zaman gereksinimi, yüksek termostabilite ve ucuz bedel gibi avantajlar içerir. MIP'ler, fonksiyonel monomerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu ile hedef analit ve çapraz bağlayıcı içeren bileşim içinde üretilir. Bu

yüzden, MIP'ler geometrilere dolaylı hedef moleküllerle olan etkileşimlerinde spesifiktir ve bağlanma spesifikliği tipik antikor-antijen etkileşimi ile farksızdır. Hedef analiti taklit eden kalıp molekül, moleküler oyuklara tanıma yerlerinin varlığında seçici olarak bağlanır. Bu durumda MIP'ler moleküler baskılanmış boşluklar ile sentetik çapraz bağlanmış materyaller olarak ifade edilirler. Bu boşluklarda yapay tanıma yerleri mevcuttur ve bu sayede doğal reseptörün (örneğin, antikor) biyolojik aktivitesini taklit ederler [48].

1.3.3. Kullanılan İletici Sisteme göre Sınıflandırma

Biyosensörler kullanılan iletici sisteme göre gruplandırılırlar. Transduser, biyosensörün bir bileşenidir ve sinyal tespit etme sürecinde hayati bir görevi vardır. Transduser, fiziksel, biyolojik ve kimyasal etkileri elektriksel sinyale yüksek hassasiyet ve en az bozulma ile dönüştüren aygıtlar olarak bilinirler. Araştırmalarda dört temel transduser deseni bulunmaktadır. Bunlar piezoelektrik, elektrokimyasal, kolorimetrik ve optiktir. Elektrokimyasal transduserlar, oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri sonucu üretilen akımı ölçer. Ölçülen bu akımın, elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile bağı bulunmaktadır. Optik transduser, biyotanıma elementi sonucunda oluşan absorpsiyon, floresans, fosforesans, refraksiyon ve dispersiyondaki farklılıkları ölçer. Piezoelektrik transduser, piezoelektrik materyalden oluşur ve biyomateryal piezoelektrik materyal ile örtülür. Bu materyal belli bir frekansta titreşir. Bu frekans dış kaynaklı elektriksel sinyal ile kontrol edilir ve bu sinyal belli bir seviyede akım üretir ve hedef analitin biyomateryale bağlanması frekansta kaymaya neden olur. (Tablo 1.2) [49].

Tablo 1.2. Transduser seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması [50]

Elektrokimyasal Temelli Biyosensörler	İmpidimetrik, Amperometrik, Potansiyometrik.
Optik Temelli Biyosensörler	Fotometrik, Biyoluminesans, Fluorometrik
Piezoelektrik Temelli Biyosensörler	Mikrokantileverlar, Kuartz kristal mikrobals
Kalorimetrik Temelli Biyosensörler	Termistörler

1.3.3.1. Optik-Optoelektronik Biyosensörler

Optik biyosensörler; tıbbi ürünler, ulusal güvenlik, biyomedikal incelemeler, çevre izlenmesi, sağlık hizmeti ve savaş alanlarında geniş uygulamalara sahip kuvvetli anlama ve analiz araçlarıdır. Elektromanyetik parazitlerden etkilenmedikleri, uzaktan algılama yapabildikleri ve tek bir aygıtta çoklu algılama sağlayabildikleri belirtilmektedir. Bu özellikler, optik biyosensörlerin avantajlarıdır. Optik transduserler; absorban, floresan-fosforesans, kemilüminesans, reflektans, ışık saçılımı ya da kırılma indisindeki değişiklikleri ortaya çıkarmaktadır. Genel olarak belirleme protokolleri; floresan temelli ve etiketsiz belirleme olmak üzere ikiye ayrılır. Floresan temelli belirlemede hem biyolojik hem de hedef tanımlayıcı boyalar gibi floresan etiketleriyle etiketlenmektedirler; floresan varlığı hedef moleküllerin varlığını ve hedefle biyoreseptör arasındaki ilişkinin gücünü ortaya koymaktadır. Etiketsiz belirlemede ise; hedef moleküller etiketlenmez ya da değiştirilmez ve gerçek formlarında belirleme yapılmaktadır. Bu tip belirleme kolay ve ekonomiktir ve moleküler etkileşimin niceleyici ve kinetik ölçümüne olanak sağlar [51].

Optik sensörler, ilk olarak oksijen, karbondioksit ve pH ölçümleri için geliştirilmiş, sonraları floresan ve ışıldayan optrodların yapımına kadar geliştirilmiştir. Seçici biyolojik bileşen, optik fiberin ucundan ve diğer uca yerleştirilmiş tavsiye ve belirleme bileşenleri immobilize olmuştur. Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance-SPR), kimyasal algılama alanında optik bir metot olup, metal yüzeyin optik aydınlatması esnasında ortaya çıkar ve bu biyomoleküler etkileşim analizi için uygulanabilmektedir. Yüzey plazmon rezonans için en iyi betimleme; zıt yüklü dielektrik sabitlerle iki ortam arasındaki ara yüzeyde yük yoğunluğunun salınımıdır. Plazmonlar, yüzey metal katmandaki uyarılmış serbest elektron kısmını ifade etmektedir. Yüzey plazmon rezonansı uyarmak için dört temel yöntem bulunmaktadır. Bunlar; prizma kuplajı, dalga kılavuzu kuplajı, fiber optik kuplaj ve ızgaralı kuplajdır. Uygun koşullar altında ince metal filmin yansıtma özelliği, ortamın bir tarafındaki optik farklılıklara karşı oldukça hassastır. Bunun nedeni ise yüzey plazmonlarının sınır koşullarının hassas problemleri içermesidir [51].

1.3.3.2. Piezoelektrik Biyosensörler

Bu tip biyosensörler, piezoelektrik gereçler aracılığıyla dalga yayılımındaki rezonans frekansındaki değişiklik için kullanılan cihazlardır. Bu kurallar, sensör yüzeyindeki kütle, viskozite veya yoğunluk değişimlerini belirlemek için var olmaktadır. Piezoelektrik dönüştürücüler, bağışıklık algılama uygulamalarında yaygın olarak kullanılan yapılardır. Bu tip dönüştürücü kullanmanın avantajları; gerçek zamanlı izleme, etiketsiz belirleme ve kullanım kolaylığı sağlamasıdır. Ancak bu yöntemin hassaslık ve spesiflik konularında eksikliklerinin bulunduğu da öne sürülmektedir. Ayrıca piezoelektrik biyosensörlerde biçim ve ölçümleme sorunları bulunmaktadır. Bu sebeple piezoelektrik biyosensörler, optik ve elektrokimyasal biyosensörlere göre daha az önemlidir [52].

Piezoelektrik tesirden yararlanmak için genel yaklaşım piezoelektrik kristali, antikorlar veya enzimler gibi biyolojik malzemelerle örneğin hedef molekül için yüksek seçiciliğe sahip bileşiklerle örtülmektedir. Piezoelektrik kuartz kristal sensörleri basitlikleri sebebiyle biyoanalitik analizler için ve biyomoleküler etkileşimlerin karakterizasyonu için rekabetçi cihazlar olarak büyük önem arz etmektedir. Bu sensörlerde biyoreseptör kuartz kristalde immobilize durumdadır ve bu da harici alternatif elektrik alanın uygulanmalarında rezonans üretmektedir. İki interaktif molekül arasındaki; biri yüzey üzerine immobilize edilmiş ve diğeri çözelti ya da gaz fazında serbest olan biyospesifik reaksiyon, gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir [52].

1.3.3.3. Termal Biyosensörler

Termal ölçümler, biyokimyasal tepkime sırasında verilen veya absorbe edilen ısıнын ölçümüyle ilişkidir. Toplam ısı verme veya absorpsiyonu, molar entalpi ile orantılıdır ve biyokimyasal reaksiyonda oluşturulan toplam ürün moleküllerinin sayısıdır. Termal sensörler, bu biyolojik reaksiyonların temel özelliklerinden yararlanmaktadır. Termal transduserler ayrıca antikor-antijen etkileşimlerinin belirlenmesi için de uygulanmıştır ve bu yöntem, Termometrik Elisa Testi olarak da ifade edilmektedir. Ancak kullanımı ve maliyetli enstrümantasyon bu tekniğin en büyük dezavantajlarından biridir [53].

1.3.4. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, analit konsantrasyonu ile ilişkili elektrik sinyalini üretmek için alakalı analit ile tepkimeye girerek kullanılmaktadır. Özgün bir elektrokimyasal sensör, algılayıcı elektrot (çalışma elektrodu) ve elektrolitten ayrılmış referans elektrot içermektedir. Çoğu uygulama için, üç elektrotlu sistem, yüksek girdi empedanslı bir potansiyostata bağlı referansla kullanılmaktadır ve hem akım hem de devrenin tamamlanması için bir karşıt elektrot bulunmaktadır. Bu sensörler, enzimler ve hücreler gibi biyolojik komponentlerin aksiyonuyla elektroaktif türlerin üretim ya da tüketimlerinin izlenmesine dayanmaktadır. Elektrokimyasal sensörler, özellikle glukoz izlenmesinde yüksek market payına sahip cihazlardır [54].

Potansiyometri, duyuşal analizlerde esaslı bir yere sahip olan en eski enstrümental yöntemlerdendir. Bu analitik teknik, farklı konsantrasyonlarda çeşitli iyonların belirlenmesini sağladığı ve ucuz ölçüm ekipmanı kullanıldığı için kolay uygulamalarda ilgi çekici bir cihazdır. Potansiyometrik sensörler, iyon seçici elektrotları biyolojik reaksiyonu bir elektrik sinyaline değıştirmek için kullanılmaktadırlar. Cam elektrotları, metal oksit esaslı sensörleri ve iyon seçici elektrotları içeren hemen hemen tüm potansiyometrik sensörler piyasada var olmaktadır.

Potansiyometrik biyosensörler; yüksek seçicikleri, düşük maliyetleri ve basit olmaları nedeniyle çevre, sağık ve endüstriyel uygulamalarda geniş olarak kullanılmaktadırlar [55].

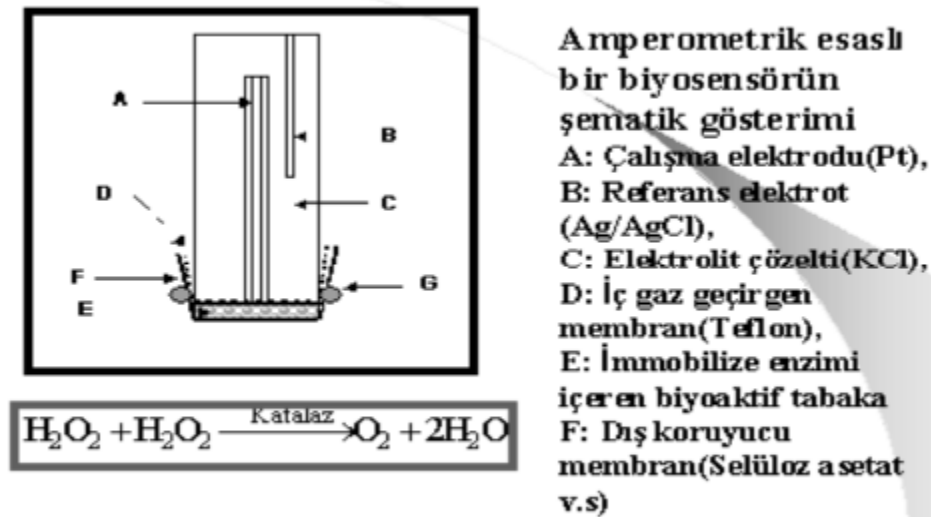
Amperometrik biyosensörler, heterojen elektron nakil reaksiyonlarını, yani elektroaktif maddelerin oksidasyonunu ve indirgenmesini temel alırlar. Transduser olarak amperometrinin kullanımı kapsamlıdır. Kural olarak amperometrik biyosensörlerin çalışması; çalışma ve referans elektrot arasında uygulanan potansiyel ile ifade edilmektedir. Yüklenen potansiyel, net bir akımın akmasına neden olan redoks reaksiyonlarını teşvik etmektedir. Akımın büyüklüğü, çözeltide bulunan elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile orantılıdır. Hem katodik (indirgeyici) hem de anodik (oksitleyici) reaksiyonlar amperometrik olarak bildirilmektedir. Amperometrik sensörlerin; çevresel, klinik ve endüstriyel amaçlar için uygun, yüksek hassaslıkta ve güvenilir olduğı belirtilmektedir. Clark ve Lyons'un yayınından itibaren, amperometrik biyosensörler yaygın ve perspektif eğilimlerden biri olmuştur [56].

1.3.4.1. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri tayinde, genellikle biyoreseptör içeren bir elektrokimyasal hedef içerisinde ya bir ürünün elektrokimyasal aktivitesi ya da elektrokimyasal tepkimedeki bir tepkimenin aktivitesinin gerilimi belirlenmektedir. Potansiyometrik kanılar açık akım akısı olmayan bir elektrot süreci içerir. Bir elektrot yüzeyinde yük fazlalığı birikimi sonucunda elektrot üzerinde önemli miktarda gerilim oluşumu prensibiyle çalışır. Potansiyometrik sensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu transdüserler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilimdeki değişiklikleri takip edilebilmektedir [57].

1.3.4.2. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik dönüşüm, elektro aktif türlerin elektrokimyasal olarak yükseltgenmesi ya da indirgenmesine bağlı oluşan, elektroaktif ürünün oluşturduğu akım değişiminin ölçümünü esas almaktadır. Çalışma metotunda bir referans elektroda karşı platin, altın, grafen ya da karbon çalışma elektroduna belirli bir potansiyel uygulanarak yapılır. Elde edilen akım, direk elektro aktif türlerin derişimi ya da biyokatalitik materyal içindeki üretim ya da tüketim hızlarının bir fonksiyonunu ifade eder. (Şekil 1.6) [57].

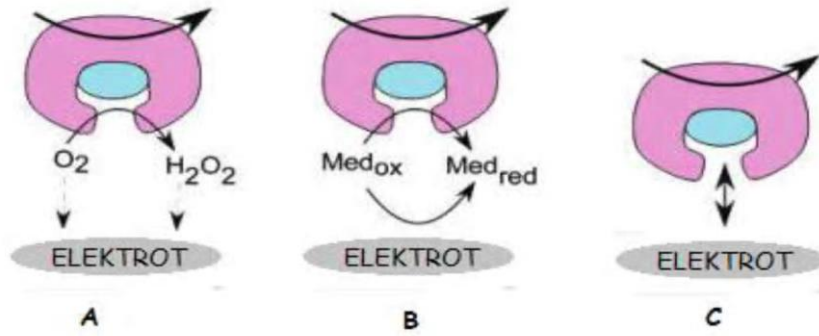


Şekil 1.6. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi [57]

Amperometrik metot, elektron nakil süreçlerin izlenmesi ve bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanan en eski elektrokimyasal yöntemlerdendir. Duyarlı ve kolay bir metot olmasından dolayı biyosensörlerde kullanılan en kapsamlı analiz yöntemlerindendir. Biyolojik element çoğunlukla elektrot üzerinde immobilize edilir. Amperometrik sensörler stabil potansiyel uygulandığında üretilen kararlı hal akımının belirlenmesini temel almaktadır. Bu biyolojik element tarafından üretilen ya da tüketilen elektrokimyasal türle ilişkilidir. Enzimatik reaksiyon sırasında, elektrokimyasal aktif tür enzim tarafından üretilirken ya da tüketilirken bu türler elektrotta indirgenir ya da yükseltgenirler. Amperometrik sensörler, biyokimyasal tepkimede üretilen ürünlerin reaksiyonu sonucu çalışma elektrodundaki akım değişikliğini ölçmektedir. Belirlenen akım şiddeti, çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur ve analit derişimi ile orantılıdır. Enzim esaslı biyosensör için en belli örnek glukoz oksidaz enzimi ile glukoz tespittir. Enzimatik tepkime esnasında oksijen harcanırken H_2O_2 üretilir ve her ikisinde amperometrik olarak tespit edilebilir. Amperometrik enzim sensörleri alanında birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan son çalışmalarda elektron aktarım aracısı olarak mediyatörler kullanılmış ya da enzimler kullanılarak aktif merkezden elektroda direk elektron transferi gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.7) [58].

Amperometrik biyosensörlerin oluşumu için, elektron alışverişinde görevli redoks enzimi ve elektrotlar arasındaki elektronik bağlantı ilişkisi 3 kuşak şeklinde gelişmiştir:

- Birinci kuşak amperometrik elektrotlar: Enzim substratının ya da ürünün elektro aktivitesi üzerine temellenir.
- İkinci kuşak amperometrik elektrotlar: Redoks medyatörlerinin serbest halde ya da immobilize edilmiş biyomoleküllerin kullanımı üzerine temellenir.
- Üçüncü kuşak amperometrik elektrotlar: Enzimin redoks aktif bölgesi ile elektrot yüzeyi arasında direk elektron taşınması üzerine temel oluşturur. Amperometrik elektrotların geliştirilmesinde çeşitli yaklaşımlar vardır [59].



Şekil 1.7. Amperometrik enzim elektrotu jenerasyonları a) I. Nesil Amperometrik elektrotlar, b) II. Nesil Amperometrik elektrotlar, c) III. Nesil Amperometrik elektrotlar [60].

I. Kuşak biyosensörlerin dezavantajlarının en önemlisi çok yüksek potansiyel uygulanmasıdır. Bu problem minik redoks aktif moleküller olan, enzimin redoks etkin kısmı ile elektrot yüzeyi arasında elektron taşınmasını gerçekleştiren mediyatörlerin (ferrosen türevleri, ferrosiyaniid, iletken organik tuzlar ve kinonlar) seçimi ve kullanımı ile sonuçlandırılır.

II. Kuşak biyosensörlerde birçok redoks enzimi temelli elektrotlar için medyatörlerin kullanımı uygulanan potansiyeli düşürür. Bunun yanı sıra, mediyatörler kullanıldıkları elektrotlarda lineer cevap aralığını arttırır. Ayrıca glukoz elektrotlarında, bilinen elektrot kullanım ömrünü uzatırlar çünkü enzim aktivitesi için zararlı olan hidrojen peroksit mediyatör kullanıldığı durumda üretilmez. Dezavantaj olarak mediyatörler sadece redoks enzimlerine bağ kurarak enzim ve elektrot arasında elektron transferini sağlamaz bununla beraber çeşitli reaksiyonlara da neden olabilmektedir [61].

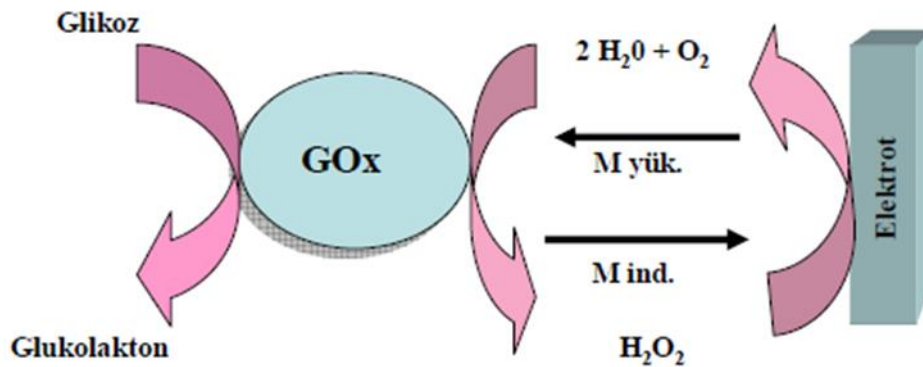
III. Kuşak biyosensörler elektron transferi substratın ürüne katalitik dönüştürülmesi ile ilişkilendirilmektedir. Reaksiyonda sorumlu enzimi elektrot ve substrat molekülü arasında mediyatör bulunmadan elektron transferini fazlalaştırarak, bir elektro katalizör vazifesi yapmaktadır. Bu tür sensörler, genellikle yüksek seçicilik gösterirler, çünkü başka reaksiyonlara başlatmadan enzimin redoks potansiyeline eş değer potansiyelde çalışırlar. Biyomolekül ve elektrot yüzeyi arasındaki ilişkinin kuvvetli olması bu tür biyosensörlerin hassaslığını olumlu etkiler. İlerlemiş çalışmalar yüksek performanslı amperometrik biyosensörler için redoks enzimi ve elektrot arasında elektron transferinin

arttırılması esasına dayanır. Bu düzenlerin geliştirilebilir başka bir özelliği ise, doğrudan elektron transferine dayalı enzim esaslı amperometrik araçlara hedef alınır [62].

1.3.4.2.1. Amperometrik Biyosensörlerde Elektron Transfer Mekanizması

Amperometrik biyosensörlerin tasarımında, redoks enzim ve elektrotlar arasındaki elektron transfer süreci; enzim substratının veya ürünün elektro aktivitesi, (birinci kuşak), redoks medyatörlerin serbest biçimde ya da immobilize olarak bulunması (ikinci kuşak), ya da enzimin redoks aktif bölgesi ile elektrot yüzeyi arasında direk elektron transferi (üçüncü kuşak) temel alınır [63].

Birinci nesil biyosensörler doğada, substratın oksidasyonu sonucu indirgenmiş duruma geçen enzimlerin birçoğunun prostetik grubunun serbestçe difüzlenebilen bir kosubstrat tarafından geri kazanılması prensibi kullanılmaktadır. Bazı kosubstratlar elektrot yüzeyinde indirgenip yükseltgenebildiğinden enzim ile çevirici arasında “elektron transfer ajanı” olarak ifade edilmektedir. Enzimin kosubstratının konsantrasyonundaki azalma veya kosubstrat ile prostetik grup etkileşimi sonucu oluşan ürün konsantrasyonundaki artış, substrat eklenmesiyle uygun bir çalışma potansiyeli altında ölçülen akım ile belirlenmektedir (Şekil 1.8) [63].



Şekil 1.8. Enzim ve elektrot arasında bulunan mediatörlü elektron transferi [63]

Direk elektron transferinde ise enzim ve çevirici yüzey arasında elektronik açıdan doğrudan bir iletişimin olduğu elektron transfer mekanizmasıdır ve elektron transferi substratın ürüne dönüşmesiyle eşzamanlı olarak gerçekleşir. Redoks enzimi bir elektrokatalizör gibi davranarak substrattan elektroda elektron transferini çabuklaştırmaktadır. Bu elektron transfer mekanizmasıyla çalışan biyosensörlerin

enzimin redoks potansiyeline yakın potansiyelde çalışması ile girişim yapan reaksiyonlardan daha az etkilenmesi daha seçici olmalarını sağlamaktadır. Ayrıca elektrot yüzeyi ile biyomolekül arasındaki yüksek bütünlük duyarlılığın artmasına da sebep olmaktadır [63].

İletken polimerler ile hazırlanan yüzeylerdeki konjuge π -sistemleri sayesinde prostetik grup ve elektrot arasında molekülerin kablolanması, enzimin prostetik grubunun çıkarılıp pirolkiolin kinon (PQQ) gibi iletken bir uzatma koluyla modifikasyonundan sonra elektroda bağlanıp apoenzimin aktive edilmesi direk elektron transferi sağlamak üzere üzerinde yoğun çalışılan metotlardandır [63].

1.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

Son zamanlarda empedans temelli immünosensörler biyomoleküllerin, proteinlerin, hücrelerin, patojenlerin ve virüslerin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Geliştirilen elektrokimyasal empedans biyosensörlerinin çoğu, antikorların elektrot yüzeyinde hareketsizleştirilmesine bağlıdır [64].

Empedans esas olarak, yüksek frekanslar uygulandığı zaman kapasitans ve indüktif değişikliklerden etkilenen bir direncin ölçümüdür. Elektriksel direnç, devre elemanlarının elektriksel akıma karşı gösterdiği dirençtir. Empedans ise elektrik akımına karşı devrenin gösterdiği direncin karşılığıdır. Bu empedans ile direnç arasındaki benzerliktir. Farkı ise; empedansın ideal direncin sahip olduğu basit özellikler ile değerlendirilmemesidir. Elektrik devresi ile yüzeydeki materyalin reaksiyon mekanizması birbirlerine benzetilebilir. Bundan ötürü Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) girdilerinin doğru olup olmadığı, kopya olduğu düşünülen bir elektriksel devre ile benzetilerek denet edilir. Model devrelerde en çok kullanılan devre elemanları ise dirençler (hücrede olan çözelti direnci), kapasitörler ve indüktörlerdir [65].

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve tutarlarındaki değişimleri tahlil etmek için kullanılan etkileyici ve kullanışlı bir yöntemdir. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük transferi ve çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda genellikle kullanılmaktadır. Biyosensörlerin hazırlanma evrelerinin ve biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve niceleyici tespiti için çok uygundur. Empedans yöntemleri ile biyoreseptör ve onun

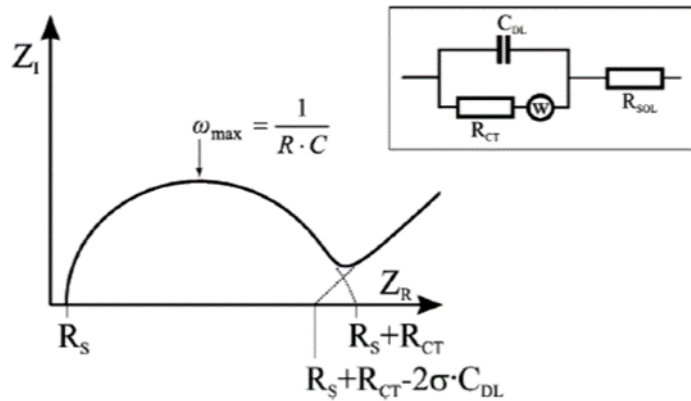
analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesi yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen yüzey modifikasyonlarının da takip edilebildiği avantajlı bir metottur [66]. Elektrokimyasal işlemlerin kantitatif parametrelerini belirlemek için kullanılabilen elektrot sistemlerinin hem yığın hem de arayüz elektriksel özelliklerinin araştırılması için elit bir teknik gibi görünmektedir. Değiştirilmiş yüzeylerde biyo-tanım olayları meydana gelirse, arayüz özellikleri değişir. Kısaca, EIS arayüz bölgesinin parmak izini sağlar [67].

Empedansın tek bir frekans dışında başka frekanslarının belirlenim edilebilmesi sebebi ile “empedans spektroskopisi” ismini alır. Bu farklı frekanslar sayesinde; yüzeylerin, tabakaların veya membranların üzerinde gerçekleşen değişimler hakkında bilgi alınabilir. Bu ön bilgilere ulaşım için genellikle eşdeğer devre sistemleri kullanılarak analizler yapılır. Çoğunlukla direnç ve kapasitans oluşturan bu devre ile sistemin farklı fizikokimyasal özellikleri de görülür. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partiyon gibi başlıca yasalardan türeyen nakil fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda direnç veya kapasitanstaki değişimler çözeltinin bir fonksiyonu olarak tanımlanabilir. Böylece empedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki oluşturulabilir [68,69].

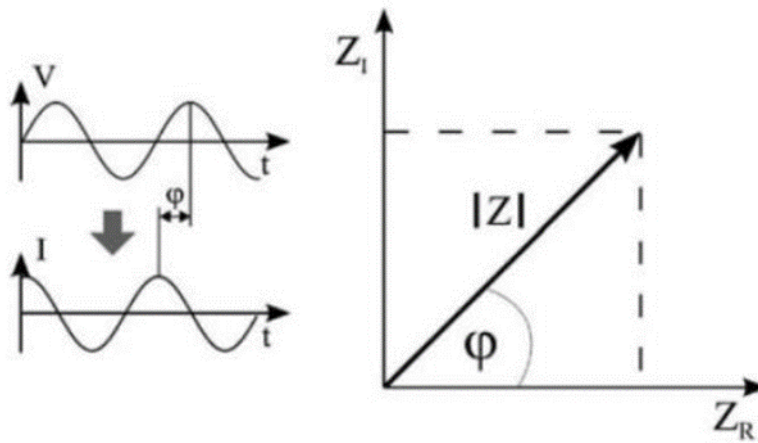
Empedansın birden fazla frekansı tayin etme özelliğinden dolayı difüzyon süreçleri, tabaka, membran veya yüzeylerin değişimleri hakkında bilgi edinilir. Bu bilgileri elde etmek için, empedans spektrumu eşdeğer bir devre kullanarak analiz işlemini gerçekleştirir. Bu devreler genellikle direnç ve kapasitanstan içerir. İncelenen sistemin farklı fizikokimyasal özellikleri de bu devre ile açıklığa kavuşur. Ayrıca bu sistem; partiyon, elektrokinetik, difüzyon gibi temel yasalardan türetilmiş olan transfer fonksiyonlarıyla da belirtilir. Bu durumdan dolayı çözelti bileşiminin fonksiyonu, empedans bileşenlerinin (direnç veya kapasitans) değişimlerinden meydana gelmektedir. Konsantrasyondaki değişimle tüm empedans arasında ilişki kurulabilir fakat bu olay bazı durumlarda gerçekleşmektedir [70,71,72].

Elektrot yüzeyinde elektron transferleri olarak bilinen elektrokimyasal reaksiyonlar, elektrolit direncini, elektroaktif türlerin adsorpsiyonunu, elektrot yüzeyinde yük transferini ve toplu çözeltiden elektrot yüzeyine kütle transferini içerir. Her reaksiyon süreci, paralel veya seri olarak birleştirilmiş direnç, kapasitörler veya sabit faz elemanlarından oluşan bir elektrik devresi ile ifade edilir. Basit bir elektrokimyasal

reaksiyon için en sevilen elektrik devresi modeli, elektrolit direnci (R_s), elektrot / elektrolit arayüzünde yük aktarım direnci (R_{ct}), çift katmanlı kapasitans (C_{dl}) içeren Randles-Ershler elektriksel eşdeğer devre modeli ve kütle transfer direnci (R_{mt}), ayrıca Warburg empedansı (W) modelleridir (Şekil 1.9) (Şekil 1.10) [67].



Şekil 1.9. Empedans Devresinin Grafikselsel İfadesi [73]



Şekil 1.10. Potansiyel-Zaman ve Akım-Zaman büyüklerine bağımlı olan bir empedansın matematiksel olarak gösterimi [74]

Çözelti direnci, çözelti iletkenliği ve reaksiyon hücresinin geometrisi, yani elektrotlar arasındaki mesafe ve elektrotları bağlayan çözelti kesit alanı tarafından oluşturulur. Çift katmanlı kapasitans, elektrot ve elektrolit arasındaki elektrostatik etkileşimi gösterir ve elektrot alanına, doğaya, elektrolit iyonik gücüne ve geçirgenliğe bağlıdır. R_{ct} ve W birlikte faradaik empedansı oluşturur. R_{ct} , yük transfer kinetiğini yansıtır ve kütle

transferi sınırlaması olmadığında aşırı potansiyelin akıma oranı olarak ifade edilebilir. Eşdeğer devre modelleri kısmen veya tamamen deneysel olabilir, her devre bileşeni elektrokimyasal hücredeki fiziksel bir işlemde gelir ve karakteristik bir empedans davranışına sahiptir [67].

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi'nin biyosensör uygulamalarında kullanılması avantajları açısından önemli büyüktür. Bunda EIS'ın analite çok az bir zarar ya da zarar vermemesi bu yöntemi cazip hale getiren başlıca etmenlerdendir. Bu zarar dengesi analizde kullanılan elektrotların ömrünü artırmaktadır ve tekrarlanabilirlik ihtimalini de arttırmaktadır. Duyarlı bir yöntem olmasının yanı sıra, modifiye yüzeylerin moleküllerin zarar görmeden karakterize olmasına neden olur. Çünkü uygulanan potansiyelin genliği oldukça düşüktür [75].

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi;

- Modifiye elektrotların yüzey özelliklerinin incelenmesinde,
- Korozyon çalışmalarında,
- Bataryalarda,
- Biyosensör çalışmalarında,
- Metal kaplamada,
- Yarı iletken elektrotlarda,
- pKa tayininde,
- Biyolojik sistemlerde,
- Yarı iletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesinde,
- İnce organik filmlerin özelliklerinin tespitinde,
- İletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesinde kullanılır [65].

1.5. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, savunma tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği ve birçok endüstriyel alanda çok hayati rol oynarlar [76].

Biyosensörlerin muamele alanları şunlardır:

Klinik diyagnostik, biyomedikal bölüm

Proses kontrolü: Biyoreaktör kontrol ve analitiği, gıda üretim ve analizi

Tarla tarımı, bağ– bahçe tarımı ve veterinerlik

Bakteriyel ve viral diyagnostik

İlaç tahlili

Endüstriyel atık su denetimi

Çevre koruma ve kirlilik kontrolü

Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri

Askeri işletimler

Son yıllarda diyabet hastalarında glikoz ölçümünde ve kandaki pek çok biyolojik içeriklerin in vivo tespitinde çevreyle ilgili olarak toprak, hava ve sudaki pestisit ve mikotoksin gibi toksiklerin tayinlerinde, patojen tayinlerinde, organofosfatların tayin ve tespitinde, ilaç sanayinde, gıda endüstrisinde, kimyasal ve biyolojik silahların algılanmasında kullanılmak amacıyla biyosensörler üretilmektedir [77,78,79,80].

1.6. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

Seçicilik: Gerçek bir biyosensörde en önemli değişkenlerinden birisi seçiciliktir. Bu da biyosensörlerdeki biyomolekül kısmı ile ilgili bir durumdur. Biyomolekülün çok özel olması girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında ön işlem yapılmaksızın analize olanak sağlar.

Kararlılık: Kararlılık kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Biyolojik molekülün azimli olması ise çok sayıda analize olanak vereceği için biyosensörün ucuz olmasını sağlar. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam O₂ yoğunluğu gibi fiziksel değişkenlerden olabildiğince az etkilenmesi istenir. Bu özellik fiziksel koşulların değişebildiği laboratuvar dışı şart ve ortamlarda da güvenilir analizlerin yapılabilmesine olanak sağlar.

Yüksek Hassasiyet: Biyosensöre sabitlenmiş biyolojik materyalin sadece belirli maddelere karşı hassas olması, biyosensörlerin özelliklerindendir. Hassaslık, biyolojik sistemlerden gelen maddeler kullanıldığı için genelde çoğu klasik yöntemden daha avantajlıdır.

Tekrarlanabilirlik: Gerçek bir biyosensör için, biyosensör yanıtlarının doğru ve tekrarlanabilir olması çok önem taşır. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o derecede iyi olduğu düşünülebilir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü sınırlayan en önemli faktör, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün ölçümleme sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer değişkenleri de etkilemektedir.

Sadelik ve Ucuzluk: Dizaynı sade ve ekonomik, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu sebeple ilk biyosensörlerdeki kompleks ve de pahalı olan yapılar, daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyetsizleştirilmiştir. Ayrıca ölçüm ünitesinin ucuz ve taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın kullanımına olanak tanır.

Ölçümleme Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az ölçümleme gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi değildir, kullanımda gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre olmalıdır.

Yeterli Seviyede Belirlenim Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün belirleme sınırının belirli bir konsantrasyon seviyesinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Çabuk Yanıt Zamanı: Bir biyosensör elektrodunun yanıt zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden belirlenebilir. Mesela elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun , tersi söz konusu ise cevap zamanı kısadır. Yanıt zamanının kısa olması ise bütün biyosensörlerin tercihli olarak kullanımlarına yol açan en önemli elemanlardandır.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının minimize edilmesi biyosensör dizaynında önemli yer tutar. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli değişkendir. Küçük ve biyoyumlu sistemlerin özellikle in vivo ölçümlere uyarlamada önemli üstünlükleri bulunmaktadır [81].

1.7. Belirleme Limiti (Limit of Detection: LOD)

Belirleme limiti (LOD), analitin test numunesindeki varlığının kesin olarak belirleyebilmek için ölçülebilen en küçük konsantrasyon değeridir. LOD'un belirlenmesi bilimsel olarak kabul edilen birkaç yol vardır. Bunların herhangi biri bilimsel gerekçe sağlandığı sürece kullanılabilir [82].

1.8. Hesaplama Limiti (Limit of Quantification: LOQ)

Doğruluk ve hassasiyet ile belirlenebilen bir analitin örnek içinde ölçülen en küçük içeriğidir. LOD'de olduğu gibi LOQ'yu belirlemek için bilimsel olarak kabul edilen birkaç yol vardır. Bunların herhangi biri bilimsel gerekçe olarak kullanılabilir [83,84].

1.9. Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonu

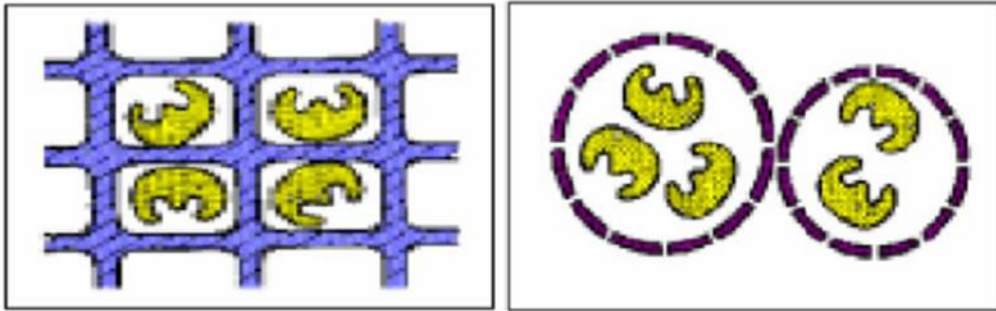
Bir biyosensör yapmak için uygun biyolojik ve fiziksel bileşen seçildikten sonra, bunların birbirine bağlanması sürecine biyolojik bileşen immobilizasyonu olarak açıklanır. Bağlanma işleminde çok başka metotlar kullanılabilir. Hangi metotun kullanılacağı, seçilen biyolojik ve fiziksel bileşene göre belirlenir. İmmobilizasyon, biyobileşenin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyobileşen immobilizasyonunda başlıca beş metot bildirmektedir [85].

1.9.1. Adsorbsiyon

İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve basit metottur. Temelde, biyobileşenin bulunduğu çözeltiye, yüzeyi membran ya da film ile örtülmüş fiziksel bileşen daldırılır ve belirli bir süre beklenir. Biyolojik bileşen hidrofilik, hidrofobik ya da iyonik etkileşim ile yüzeyde tutulur. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz asetat membranları, polistren, polivinil klorür ve silikadır. Sorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorbsiyon ile immobilizasyon sağlıklı bir yöntem değildir ama yine de biyosensörlerde başarılı uygulamaları yer alır [85].

1.9.2. Tutuklama

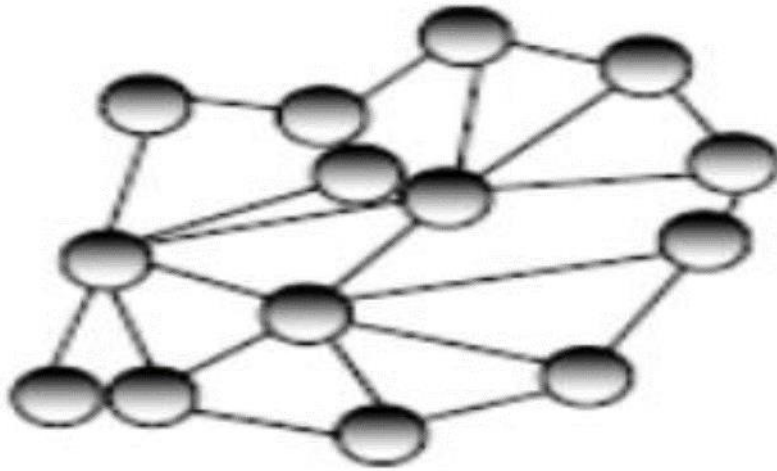
Biyobileşenin polimer jel matrikslerde tutulduğu metotudur. Biyomolekülü içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman, jelin donmasıyla biyomolekül jel matriks içinde hapsolmuş olur. Biyosensörlerde bu amaçla; poliakrilamid, nişasta, naylon ve siliastik jel kullanılabilir (Şekil 1.11) [85].



Şekil 1.11. Kafes tipi tutuklama ve mikrokapsül tipi tutuklama [85]

1.9.3. Çapraz bağlama

Bu metot biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin birleşimi şeklinde açıklanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, hekzametilen, di-izosiyanat, diflorodinitrobenzen yoğun kullanılır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler. Bu nedenle de çapraz bağlama biyosensörlerde çok kullanılan immobilizasyon yöntemlerindendir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Çapraz bağlama yöntemi [85]

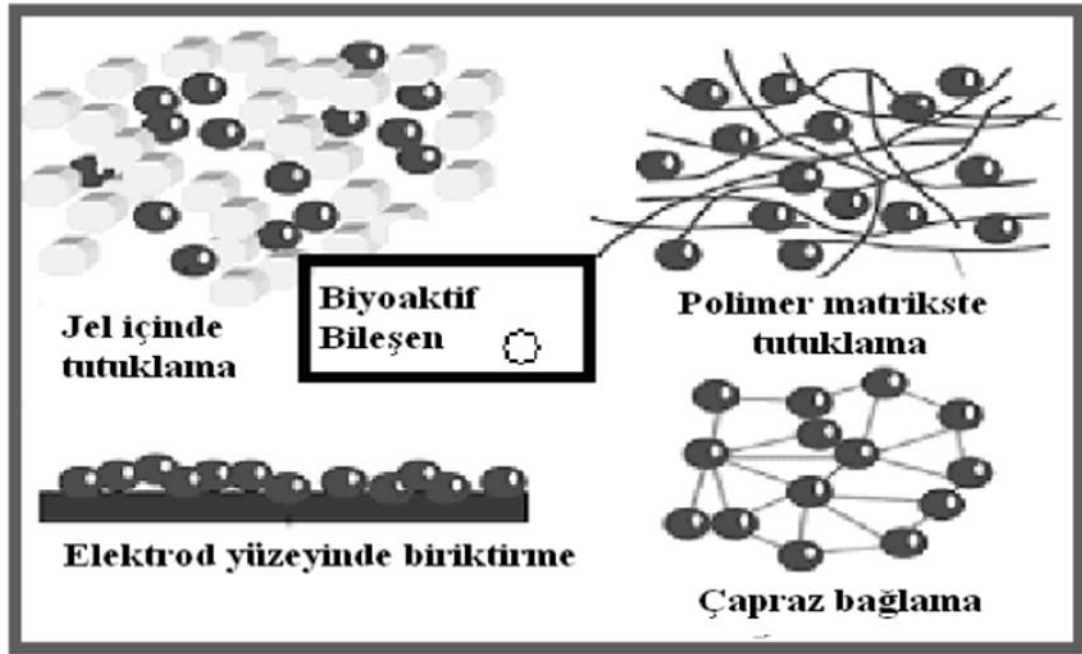
1.9.4. Kovalent bağlama

Bu immobilizasyon türünde biyobileşen, direk fiziksel bileşene ya da fiziksel bileşenin uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış formuna kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent olarak sabitlenir. Genellikle proteinlerin aminoasit yan zincirlerinde bulunan

amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent bağlama oluşturulur [86].

1.9.5. Biyolojik bağlama

Biyolojik bileşenin film ya da tabakaya biyokimyasal bağlama ile tutturulmasıdır (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Biyosensörlerde biyobileşen immobilizasyonunda kullanılan yöntemler [87]

1.10. Biyosensörlerin Tıpta Kullanım Alanları

Tıpta en çok kullanılan biyosensörler enzim biyosensörleridir. Bunun nedenleri arasında ölçümlerindeki yüksek hassaslık, işletim ve kurulumdaki kolaylık ve ticari uygun dönüştürücü tiplerinin fazlalığı yer almaktadır [88].

Tıp alanında sahiplik söz konusu olduğunda biyoyumumluluk çok önemli bir değişken haline dönüşmektedir. Vücut içi kullanımlar söz konusu olduğunda enzim içeren membran üzerinde fibrin birikimi ve platelet oluşumu meydana gelebilir veya vücut dokularında iltihaplanmalar gerçekleşebilir. Bu meselelerin önüne geçmek adına biyosensörün dokuyla ilişki edecek yüzeyleri özel malzemelerle örtülür. Diğer tıbbi biyosensörlere örnekler ise üre ve kreatinin elektrotları, kolesterol elektrotları,

asetilkolin elektrotlarıdır. Bu sensörler sayesinde çok önemli hastalıkların tanılması sağlanabilir. Mesela üre seviyesi böbrek işlevini takip etmekte, kolesterol seviyesinin gözetimde tutulması arterosklerozlarının engellenmesinde, asetilkolin elektrotu kas yorulmalarının değerlendirilmesinde kullanılır [89].

İmmünolojik tepkimelerin özgülüğünün yüksek olmasından dolayı, immünosensörler tıpta kullanılmaya çok uygundur. Bu sensörler ilaç etken madde ölçümünde geniş olarak kullanılırlar. Örneğin teofilin sensörü, hamilelik testi için HCG hormonu sensörü, kanser teşhisi için alfa-fetoprotein sensörü, hepatit B için yüzey antijen sensörü, tıpta kullanılan immünosensör çeşitleridir. Bunun yanında bu sensörlerin çalışması için sürekli substrat ilavesi gerektiğinden in vivo olarak kullanılamazlar. Antijen-antikor çiftinin oluşumu yavaştır ve türlü adımları kapsar, immünosensörler aralıklı çalışmaktadırlar ve devamlı kontrolü sağlayamazlar [90].

Son senelerde dünyada Çip Üzerinde Laboratuvar (Lab-on-Chip) teknolojisi olarak tanımlanan mikrosistemler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu yeni teknolojiyle, tek bir çipte tüm genomun izlenmesi ve binlerce gen arasındaki etkileşmenin aynı zamanda belirlenmesi sağlanabilir. Bu teknolojinin esası biyosensörlere dayanmaktadır ve bu çipler küçültülmüş DNA biyosensörleridir [91].

1.11. Manyetik Boncuklar ve Nanopartiküller

Biyosensör uygulamalarında elektrot yüzeylerinin hazırlığı için farklı malzemeler kullanılmaktadır [92]. Cam ve diğer oksit yüzeyler elverişli özelliklerinden dolayı çoğunlukla kullanılan malzemelerdir [93]. Ayrıca altın [94], mikrogözenekli altın, grafit [95] camsı karbon ve indium kalay oksit yaygın olarak kullanılan materyallerdir [96].

Nano ve mikropartiküller organik veya inorganik maddelerden yapılmış submikron parçalardır. Boyutları genellikle 1 mikron ile 1 nm arasında olabilmektedir. Partiküller, sahip oldukları essiz küçük boyutlu elektronik ve kimyasal özelliklerinden dolayı biyosensörler ve elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Farklı nanopartikül türleri enzim sensörleri, immünosensörler ve DNA sensörleri gibi çeşitli elektrokimyasal algılama sistemleri için kullanılmıştır [97]. Genellikle metal parçacıklar mükemmel iletkenlik ve katalitik özelliklere sahiptir, bu da onları enzimin redoks merkezleri ve elektrot yüzeyleri arasındaki elektron transferini artırmak için uygun hale getirir. Partiküllerin temel fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Biyomolekölün immobilizasyonunu kolaylaştırması (çoğunlukla oksit nanoparçacık)
- 2- Elektrokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi
- 3- Artan yüzey alanı üzerinden elektron transferinin geliştirmesi
- 4- Biyomoleküllerin etiketlenmesi

Manyetik boncuklar süpermagnetizma gösteren iyi sabitlenmiş malzemelerdir [98,99]. Bu özellikleri nedeniyle çok farklı uygulama alanlarında göze çarpmaktadır. Son zamanlarda biyoteknolojideki kullanımları çok popüler hale gelmiştir [100,101,102]. Manyetik boncukların biyobileşen immobilizasyonundaki bazı avantajları şöyledir:

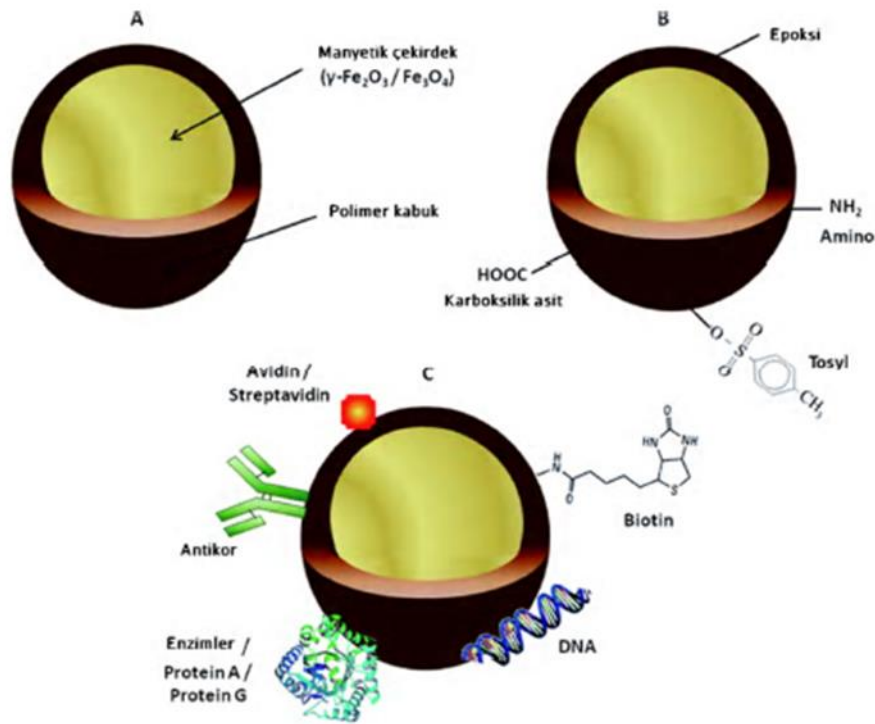
- 1- Daha fazla biyobileşen bağlanması için yüksek özgünlükte yüzey alanı sağlarlar.
- 2- Daha az kirlenme ve düşük ağırlıklı transfer direnci sağlarlar [103].

Manyetik boncukların sensör ve biyolojik uygulamaları hücreleri veya hedef biyomolekülleri bağlayabilmelerini gerektirir [104]. Bu amaçla yüzey tabakası uygun bağlama grupları içerecek şekilde oluşturulmaktadır. Böylece polimer kabuk karboksil, amin, tiyol veya karbonil gibi grupları içerir. Antikorlar, nükleik asitler ve afinite reaktifler (örneğin streptavidin) modifiye manyetik boncuklar ile konjuge olabilirler. Makrosiklik ligandlar, kriptanlar veya kaliksarenler gibi abiyotik reseptörler de aynı şekilde bağlanabilirler. Reseptör, manyetik parçacıklara tutturulan hedef analit ile etkileşime girer. Bağlanmamış analit molekülleri daha sonra kolayca yıkanır ve ortamdan uzaklaştırılır. Algılama tabakasındaki hedefin varlığı parçacıklar tarafından uyarılan ayrılmış manyetik alanda gösterilir. Örnek olarak immunosensör temelli sandviç immun ölçüm modelinde, farklı ligantları taşıyan manyetik boncuğa antikor bağlanır ve antijenin antikorun özgül bölgesine bağlanması sağlanır [105].

Son yıllarda, mikro ve nanomateriyallerin elektrokimyasal biyosensörlerde aktif kullanımı sıklıkla görülmektedir. Bu alanda manyetik partiküllerin sisteme katılması yeni nesil biyosensörlerde özel ilgi odağı olmuştur. Manyetik partiküller yıllardır satışıdır (örneğin, BioMag®, Dynabeads®, Adembeads® ve SiMAG®) ve laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Özellikle bir sıvıdan saflaştırılmak istenen biyolojik örneklerin eldesinde kullanılmaktadırlar. Manyetik materyallerden (demir, nikel, kobalt, neodim-demir-boron, samaryan-kobalt veya magnetit) olusan inorganik bir kor içerir. Bunun üzerinde polisteren, dekstran, poliakrilik asit veya silikadan oluşan bir polimer tabaka bulunmaktadır. Bu tabaka, fonksiyonel gruplarla (örneğin amino ve karboksilik

asit) modifiye edilir. Bu fonksiyonel gruplar sayesinde, manyetik partiküllerin yüzeyine peptitler, küçük moleküller, proteinler, antikorlar ve nükleik asitler bağlanabilmektedir (Şekil 1.14) [106].

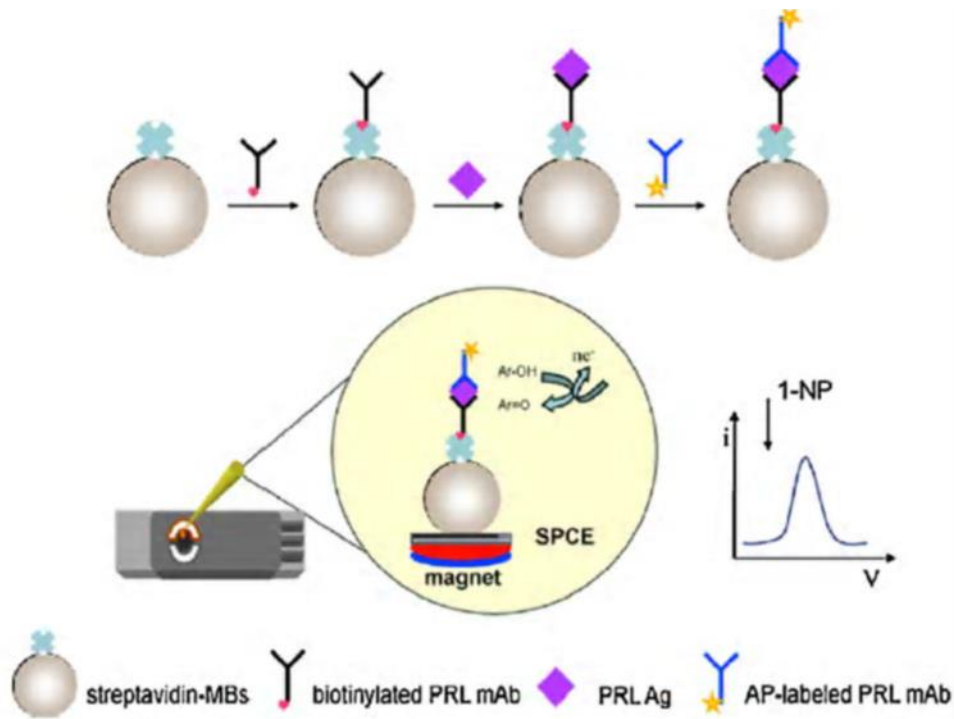
Manyetik partiküllerin büyüklükleri birkaç nanometre (5–50 nm) ile birkaç mikrometre (1–10µm) arasında değişir. Bu partiküller, etkili transport, hızlı ölçüm kinetikleri, bağlanma özgülüğünün arttırılması ve işaretleyici olarak etki eder. Küçük magnetler tarafından sıvı ortamdan çekilerek rahatlıkla toplanıp ayrıştırılabilir. Magnet çekilince tekrardan dağılırlar ve bu toplama ve dağılma ile istenmeyen örnek içerikleri rahatlıkla yıkanır ve uzaklaştırılır. Partiküller nükleik asit, protein, virüs, bakteri ve hücrelerin immunomanyetik seperasyonlarında kullanılır [107].



Şekil 1.14. Manyetik partiküllerin sematik gösterimi (A), fonksiyonel gruplarla aktivasyon (B) ve konjuge biyolojik moleküller (C) [80]

Biyosensörler ile ilgili pek çok çalışmada, screen printed elektrot (SPE) temelli biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli noktanın elektrot yüzeyi üzerine aktif formda biyolojik reseptörün immobilizasyonu olduğu belirtilmiştir [108,109,100]. Burada

sandviç tip immun ölçüm ile antijen miktarı ölçülmektedir. Bunun için öncelikle biyotinlenmiş yakalayıcı monoklonal antikör streptavidinle modifiye partikül üzerine bağlanmıştır. Sonrasında ortama antijen ilave edilerek, antijenin antikora bağlanması beklenmiş ve devamında alkalen fosfataz işaretli ikincil antikör ortama konularak antijene bağlanması sağlanmıştır. Sonuç olarak modifiye edilmiş manyetik partiküller altında magnet bulunan SPE'ler üzerine konularak stabilize edilmiş ve stabilize edilmiş modifiye partiküller üzerine enzimin substratı olan 1-NP (1-naftilfosfat) eklenerek, açığa çıkan elektro aktif ürün (1-naftol) differansiyel pulse voltametri ile ölçülmektedir (Şekil 1.15) [111].



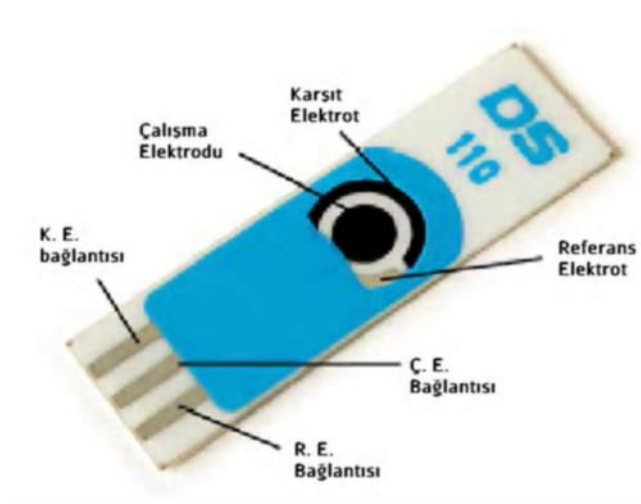
Şekil 1.15. Manyetik boncukların modifikasyonu ve baskılı elektrotlar üzerinde biyosensör ölçümleri [111].

1.12. Baskılı Elektrotlar (Screen-Printed Electrodes: SPEs)

Baskılı elektrotlar son zamanlarda biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve basitlik, hızlılık ve ucuzluk bakımından ümit verici olan malzemelerdendir. Baskılı elektrot temelli kullanılıp atılabilen biyosensörler biyomoleküllerin, pestisitlerin, antijenlerin, DNA, mikroorganizmalar ve enzimlerin miktar tayinlerinde yeni ufuklar açmaktadırlar. Bu durumun en önemli avantajı, örnek hacminin birkaç mikrolitreye

kadar küçültülmesidir. Bu da bu cihazların diyagnoz sistemlere kolaylıkla entegre edilmelerini sağlamaktadır. SPE yüzeyleri çok farklı analitleri ölçmek amacıyla kolaylıkla modifiye edilir. Bu sayede birçok analit az miktarlarda da olsa ölçülür [112].

SPE’lerde çalışma elektrotu karbon, altın, platin, gümüş veya karbon nanotüplerden yapılmaktadırlar. Elektrotun yapısında bir çalışma, karşıt ve referans elektrot bulunur. Genellikle çalışma elektrotu ve karşıt elektrot aynı maddeden yapılırken, referans elektrot farklı maddeden yapılmaktadır. Genellikle gümüş kullanılır. Bu kombinasyon elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmaktadır (Şekil 1.16) [112].



Şekil 1.16. SPE yapısı [112]

Amperometrik biyosensörlerin kullanım alanları, klasik elektrotların SPE’lerle değiştirilmesi sayesinde daha da genişlemiştir. SPE’ler özellikle eser seviyelerdeki madde analizlerinde bellek etkilerinin ortadan kaldırılması ve onların yerinde in situ tayin için cazip avantajları biyosensör çalışmalarına eklemiştir. SPE’ler yapısında düzlemsel seramik veya plastik destekler gibi farklı materyallerin baskısını içerir. Bu da SPE’lerin büyük esneklikte olmasına yardımcı olur [112].

1.13. Enzim –Bağımlı İmmüno Ölçümler (ELİZA)

İmmunosensörler, Antijen-antikor etkileşimini temel alan mükemmel seçicilik özellikleri olan yüksek özgüllükte biyosensördendir. Antijen ve antikorlar birbirlerinin tayini için biyolojik bileşen şeklinde kullanılabilmektedir. Hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisitler ve endüstriyel kirleticilerin tespitinde kullanılır.

İmmunosensörlerde transdüser olarak elektrokimyasal, optik, kütle ve termal yapılar yer alır [113,114].

İmmunosensörlerde, klasik ELİSA metotları biyosensör üzerine uyarlanmıştır. Örneğin, sandviç ELİSA kantitatif sandviç immünokimyasal ölçüm esasına dayanır. Kuyucularda bulunan primer antikor üzerine, önce antijen (numune), daha sonra enzim (HRP, AChE, Alkalen fosfataz) işaretli sekonder antikor eklenir. İnkübasyon sonrası reaksiyon ortamına eklenen enzimin substratı renkli reaksiyon vererek, okuma sağlanır [115].

ELİZA ölçümlerinde bir enzim ile konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile tepkimeye girerek renkli bir ürün oluşturmaktadırlar. ELİZA testleri antijeni veya antikoru (sınıfa özgül antikor da olabilir) belirlemek için kullanılmaktadırlar. ELİZA kompleks bir yöntem olmamasına rağmen, bu teknikte birçok değişken kontrol edilmektedir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir. Katı faz olarak çoğunlukla mikrotitrasyon plakları şeklinde plastik kullanılmaktadır [116].

Sandviç ELİZA niceleyici sandviç enzim immünokimyasal ölçüm temeline dayanır. Plaka kuyucuklarında bulunan antikor üzerine, önce işaretsiz antijen (numune), daha sonra işaretli antijen ardışık olarak eklenir. İşaretli ve işaretsiz antijen, antikorumun bağlanma bölgesi için yarışır. İnkübasyon sonrası reaksiyon ortamına eklenen enzim, antikor-işaretli antijen kompleksine bağlanır [117,118].

Bu çalışmada; Dropsens i400 ve Multipotentiostat cihazları kullanılarak, 1x ve 8x SPE'ler ile endoglin (CD-105) tayini elektrokimyasal sistemlere uyarlanmış ve bu şekilde manyetik boncuklara dayalı elektrokimyasal ELİZA kit içeriği tasarımı gerçekleştirilmiştir.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler

2.1.1. Kimyasallar

Abcam ab102890 HRP Konjugasyon Kiti

Manyetik boncuklar: Dynabeads-Protein G

HRP substratı: 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB)

Abcam CD-105 ab2529 monoklonal antikor (Bağlanma antikor)

Abcam CD-105 ab21224 monoklonal antikor (Ölçüm antikor)

Abcam ab54338 Rekombinant Human CD-105 Proteini (Antijen)

Çalışma tamponu: PBS pH: 7,4

2.1.2. Cihazlar

Dropsens Multichannel Potentiostat: Amperometri uygulamalarında kullanıldı (Şekil 2.1).

Dropsens μ STAT-i400 Potentiostat: EİS uygulamalarında kullanıldı (Şekil 2.2).

VORTEX MIXER (Labnet international, Inc.): Karışımların inkübasyonunda kullanıldı (Şekil 2.3).

MAGNET: Manyetik boncukları toplama ve yıkama kısmında kullanıldı (Şekil 2.4).

DROPSENS-DRP-CAST 8X ve 1X: Analizlerde kullanılan elektrotlar (Şekil 2.5 ve 2.6).

Amperometrik cihaz sistemi: Potentiostat, ara bağlantı kablosu, Dropview software, 8X elektrotlar, ve 8X magnet (Şekil 2.7)

Empedimetrik cihaz sistemi: Potentiostat (EIS), bağlantı kablosu, 1x Elektrotlar ve 1X magnet, Dropview software (Şekil 2.8)



Şekil 2.1. Dropsens Çok Kanallı Potansiyostat



Şekil 2.2. Dropsens µSTAT-i400 Potansiyostat



Şekil 2.3. Çalkalamalı inkübasyon vorteksi



Şekil 2.4. Manyetik boncukları toplama ve yıkamada kullanılan magnet



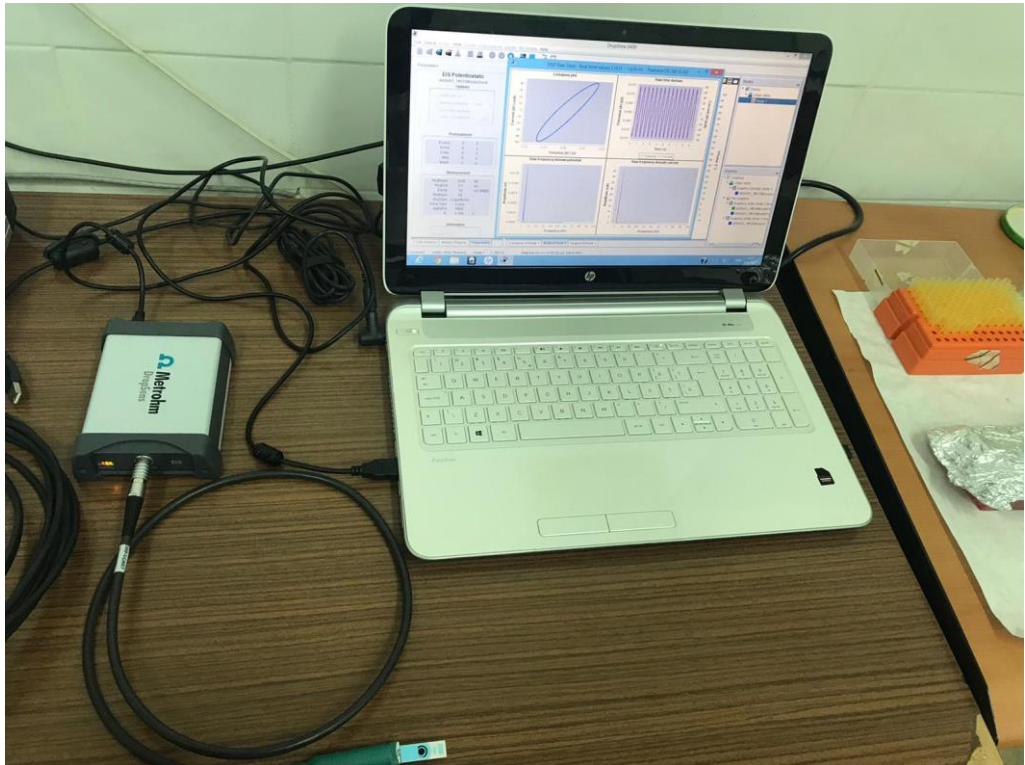
Şekil 2.5. Ddropsens 8x DRP amperometrik biyosensör elektrotu.



Şekil 2.6. Ddropsens 1x DRP empedans biyosensör elektrotu.



Şekil 2.7. Amperometri Sistemi: Potansiyostat, elektrot bağlantıları, 8x elektrot ve bilgisayar bağlantısı



Şekil 2.8. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Sistemi: Potansiyostat, elektrot bağlantıları, 1x elektrot ve bilgisayar bağlantısı

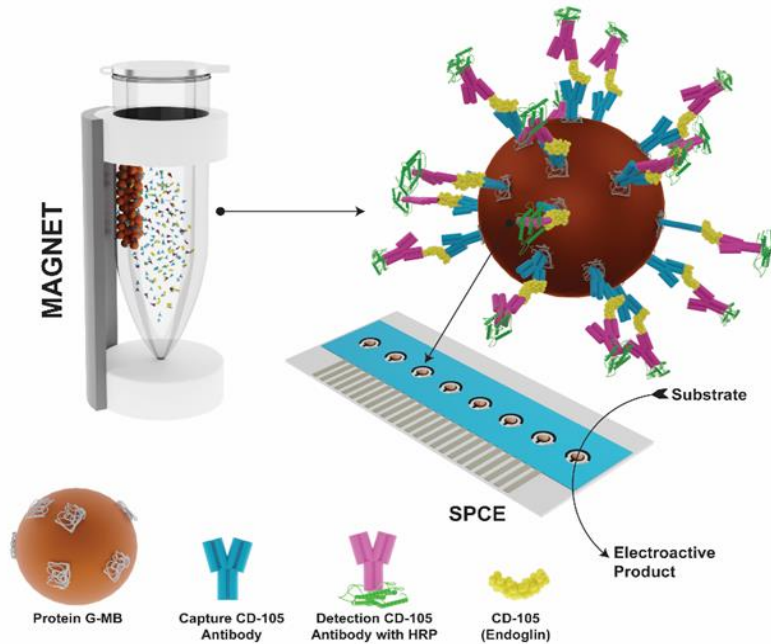
2.2. Yöntemler

2.2.1. Amperometrik Yöntem

Uygulama prosedürü:

1. Antijene (CD-105) karşı üretilmiş olan monoklonal antikor, CD-105 (rekombinant antijen) ve Protein G bağlı manyetik boncuk (MBs)'lar 45 dk karıştırılmalı olarak inkübe edildi. Magnet yardımı ile fazla antikor yıkandı.
2. Son olarak HRP ile konjuge CD-105'e karşı üretilmiş poliklonal antikor ortama konularak karışım 45 dk inkübe edildi. Devamında magnet üzerinde çalışma tamponu ile yıkandı.
3. Dışarıda bir 1,5 ml'lik eppendorf tüp içinde tamamlanan prosedür sonrasında antikorlar, antijen ve HRP bağlanmış manyetik boncuklar, 8x baskılı elektrotlar (SPE) üzerine konularak ölçüme geçildi. Bunun için MB lar üzerine HRP substratı (TMB) eklenerek reaksiyon başlatıldı.
4. SPE'ler üzerinde reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama uygun sabit voltaj (-200) uygulanmış ve akımdaki değişim değerleri sonuç olarak değerlendirildi.

Şekil 2.9. 'de metodun şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 2.9. Amperometrik metot ile geliştirilen Endoglin immunosensör metodunun şematik gösterimi

2.2.2. Amperometrik Endoglin İmmünosensör Optimizasyonu

2.2.2.1. Çalışma optimize değerleri

Çalışmada kullanılan Protein-G MB, Monoklonal antikor ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml, 0,29 ve 0,29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0,02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 10 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi.

2.2.2.2. Uygulama Potansiyeli Optimizasyonu

Sistem uygulama voltajını bulmak amacıyla, 50, 100, 150, 200, -100 ve -200 mV uygulama potansiyelleri ile amperometrik ölçümler yapıldı. 10 ve 25 ng/ml Endoglin konsantrasyonlarında denenerek karşılaştırıldı. Optimum uygulama voltajı -200 olarak bulundu. Enzim isaretli MB'lar 8'li grafen Dropsens elektrotlara 10 µl karışım + 10 µl TMB olacak şekilde yüklenerek, sabit voltaj altında elektrokimyasal reaksiyon izlendi. Akım değişimleri bulunarak grafikler çizildi.

2.2.2.3. HRP Aktivitesi Okuma Süresi Tespiti

HRP aktivitesi okuma süresi tayininde kullanılan substrat konsantrasyonu. 0.4 mg/ml TMB and 0,02% H₂O₂'dir. Okumalar 5, 10, 15 ve 20. dk'larda yapıldı. 10 ng/ml Endoglin konsantrasyonunda denenerek karşılaştırıldı. 10. dk optimum inkübasyon süresi olarak belirlendi.

2.2.2.4. Protein-G Kaplı Manyetik Boncuk Konsantrasyonu Denemeleri

Ana vialden (30 mg/ml) alınan protein-G bağlı manyetik boncuklar, 1.5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde magnet üzerinde hazırlandı. Manyetik boncuk konsantrasyonu 1,2; 0,06; 0,03; 0,015 mg/ml olacak şekilde kör (antijen hariç diğer bütün komponentler) ölçümleri yapıldı.

Kör: Antijen dışında geri kalan bütün reaksiyon ürünleri.

En düşük kör akım değeri (0,015 mg/ml) optimum olarak kabul edildi.

2.2.2.5. Monoklonal Endoglin Antikor Konsantrasyonu Optimizasyonu

Monoklonal Endoglin antikor konsantrasyonu optimizasyon çalışmasında. Denenen antikor konsantrasyonları 0,07, 0,2, 0,25 ve 0,29 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Çalışmalar 10 ng/ml Endoglin konsantrasyonunda denenerek karşılaştırıldı.

2.2.2.6. HRP ile konjuge Poliklonal Endoglin Antikoru Konsantrasyonu Optimizasyonu

Poliklonal antikor konsantrasyonları optimizasyon çalışmasında 0,04, 0,1, 0,15, 0,2 ve 0,29 $\mu\text{g/ml}$ antikor dilüsyonları yapıldı. Çalışmalar 10 ng/ml Endoglin konsantrasyonunda denenerek karşılaştırıldı.

Buraya kadar yapılan optimizasyon çalışmalarında 8x DRP SPE elektrotlar kullanılmıştır.

2.2.2.7. Poliklonal antikorun HRP ile Konjugasyonu

Kullanmadan önce tüm malzemeleri ve hazırlanan reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. Etiketlenecek her 10 μL antikora 1 μL Modifier reaktifi eklendi ve hafifçe karıştırıldı. HRP Konjugasyon Karışımı şişesinin içindeki liyofilize malzeme üzerine bu karışım pipetlendi ve süspanse edildi. Oda sıcaklığında (20-25 ° C) karanlıkta 3 saat bekletildi. 3 saat inkübasyondan sonra, kullanılan her 10 μL antikor için 1 μL Quencher reaktifi eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Konjugat 30 dakika sonra kullanılabilir hale geldi. +4°C'ye konuldu.

2.2.2.8. EIS Ölçümleri

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri amperometrik ölçümlerdeki optimum değerler göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Amperometrik metot içinde tamamlanan MB reaksiyon karışımı aynı şekilde empedans ölçümlerinde de kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Protein-G MB, Monoklonal antikor ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml, 0,29 ve 0,29 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. 0.4 mg/ml TMB and 0,02% H_2O_2 HRP substratı olarak kullanıldı.

Direkt akım (DC) etkisinin empedans ölçüm sonuçları üzerindeki etkisinin araştırılması için, OPC (open circuit potential) üzerinden, kör ve 5 ng/ml rekombinant antijen ölçümü alındı. Son olarak, enzimin ilgili substratları eklendi ve 5 dakika reaksiyona

sokuldu, ürün elektrokimyasal empedans analizörü ile ölçüldü ve empedans değeri Z (Ω) kaydedildi. Ölçüm için, empedans analizörü i400 Dropsens elektrokimyasal iş istasyonunun parametreleri şu şekilde ayarlandı: uyarma voltajı 165 mV ve algılama aralığı 0.1-10⁴ Hz. Ölçüm, iki kez tekrarlandı.

Düzlemsel elektrotta 165 mV öngerilim voltajında, 1 Hz'de empedans değeri çıkarıldı ve empedans değerleri ile antikor konsantrasyonları arasındaki ilişki Bode eğrileri ile gösterildi.

2.2.2.9. Serum içinde Rekombinant Endoglin proteini amperometrik ölçümleri

Uygulama prosedürü:

1. Antijene (CD-105) karşı üretilmiş olan monoklonal antikor, serum içine eklenmiş CD-105 (rekombinant antijen) ve Protein G bağlı manyetik boncuk (MBs)'lar 45 dk karıştırmalı olarak inkübe edildi. Magnet yardımı ile fazla antikor yıkandı.
2. Son olarak HRP ile konjuge CD-105'e karşı üretilmiş poliklonal antikor ortama konularak karışım 45 dk inkübe edildi. Devamında magnet üzerinde çalışma tamponu ile yıkandı.
3. Dışarıda bir 1,5 ml'lik eppendorf tüp içinde tamamlanan prosedür sonrasında antikorlar, antijen ve HRP bağlanmış manyetik boncuklar, 8x baskılı elektrotlar (SPE) üzerine konularak ölçüme geçildi. Bunun için MB lar üzerine HRP substratı (TMB) eklenerek reaksiyon başlatıldı.
4. 8x SPE'ler üzerinde reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama uygun sabit voltaj (-200) uygulanmış ve akımdaki değişim değerleri sonuç olarak değerlendirildi.

2.2.2.10. Serum içinde Rekombinant Endoglin proteini EIS ölçümleri

1. Antijene (CD-105) karşı üretilmiş olan monoklonal antikor, serum içine eklenmiş CD-105 (rekombinant antijen) ve Protein G bağlı manyetik boncuk (MBs)'lar 45 dk karıştırmalı olarak inkübe edildi. Magnet yardımı ile fazla antikor yıkandı.
2. Son olarak HRP ile konjuge CD-105'e karşı üretilmiş poliklonal antikor ortama konularak karışım 45 dk inkübe edildi. Devamında magnet üzerinde çalışma tamponu ile yıkandı.

3. Dışarıda bir 1,5 ml'lik eppendorf tüp içinde tamamlanan prosedür sonrasında antikorlar, antijen ve HRP bağlanmış manyetik boncuklar, 8x baskılı elektrotlar (SPE) üzerine konularak ölçüme geçildi. Bunun için MB lar üzerine HRP substratı (TMB) eklenerek reaksiyon başlatıldı.
4. 1x SPE'ler üzerinde MB süspansiyonu (20 µl) ve TMB (20 µl)'ler konularak, 5 dk inkübe edildi.
5. Ölçüm için, empedans analizörü i400 Dropsens elektrokimyasal iş istasyonunun parametreleri şu şekilde ayarlandı: uyarma voltajı 165 mV ve algılama aralığı 0.1-104 Hz. Ölçüm, iki kez tekrarlandı.
6. Düzlemsel elektrotta 165 mV öngerilim voltajında, 1 Hz'de empedans değeri çıkarıldı ve empedans değerleri ile antikor konsantrasyonları arasındaki ilişki Bode eğrileri ile gösterildi.

2.2.3. İstatistiksel analiz

CD-105 analitik eğrisi, amperometrik immunosensör için akıma karşı CD-105 konsantrasyonları ve empedimetrik immunosensör için empedansa karşı CD-105 konsantrasyonları grafikleri çizilerek elde edildi. Regresyon analizi, örnek ortalamaları ve standart sapmaları (SD) hesaplamak için Microsoft Excel kullanıldı.

3. BÖLÜM

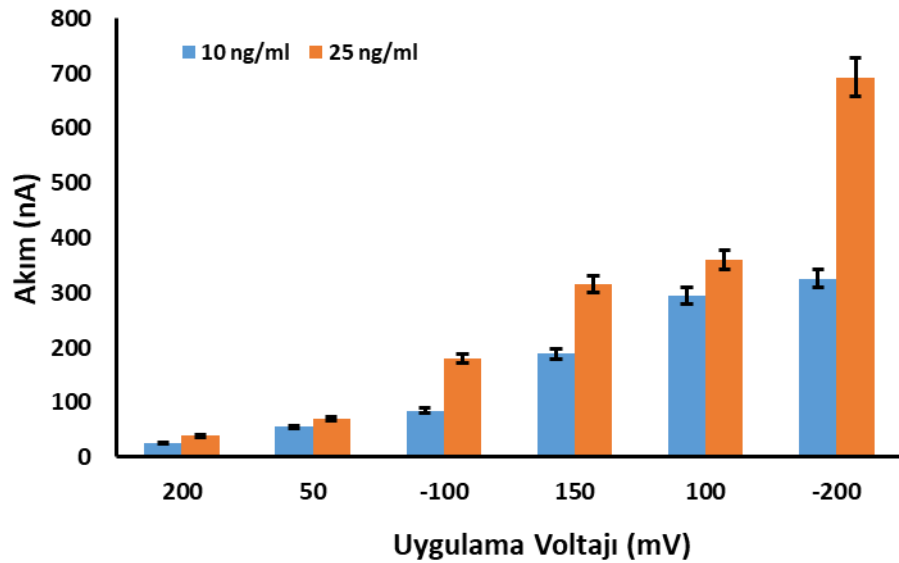
BULGULAR

3.1. Optimizasyon Çalışmaları

Antikor ve antijen optimizasyonunda monoklonal ve poliklonal antikor konsantrasyonları, okuma süresi, manyetik boncuk konsantrasyonu ve akım değerleri gibi birden fazla parametre göz önünde bulundurularak çalışmalar yapıldı.

3.1.1. Uygulama voltajının belirlenmesi

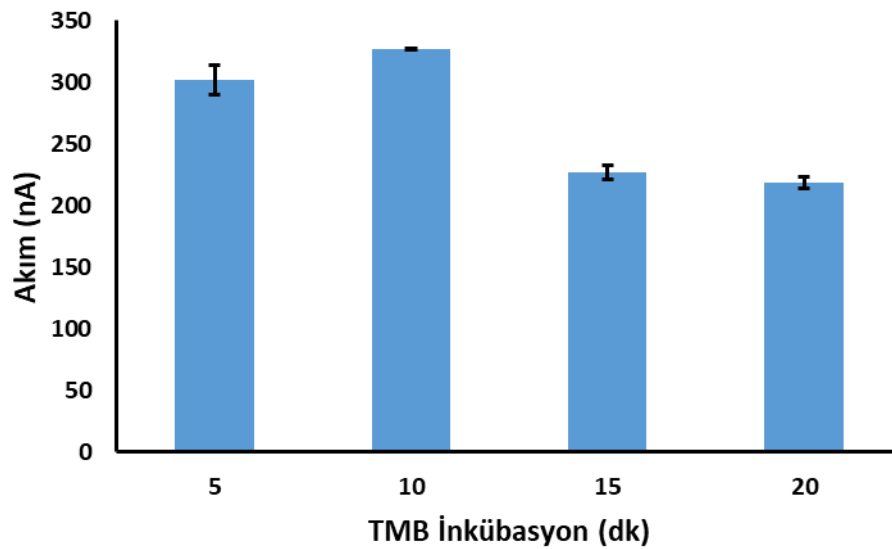
Sabit uygulama voltajının belirlenmesinde +100, +150, +200, -100, -150, ve -200 mV arasındaki voltaj değerleri sisteme uygulandı ve sonuç olarak -200 mV optimum uygulama potansiyeli olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan Protein-G MB, Monoklonal antikor ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml, 0.29 ve 0.29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. 0.4 mg/ml TMB and 0.02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 10 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Uygulama potansiyeli voltametri grafiği

3.1.2. Reaksiyon süresi tespiti

Reaksiyon (okuma) süresinin belirlenmesi aşamasında, reaksiyonun 5, 10, 15 ve 20 dk'larında okumalar gerçekleştirildi ve en uygun okuma süresi 10 dk olarak kabul edildi. Çalışmada kullanılan Protein-G MB, Monoklonal antikor ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml, 0.29 ve 0.29 µg/ml'dir. Antijen konsantrasyonu 10 ng/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0.02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı (Şekil 3.2).

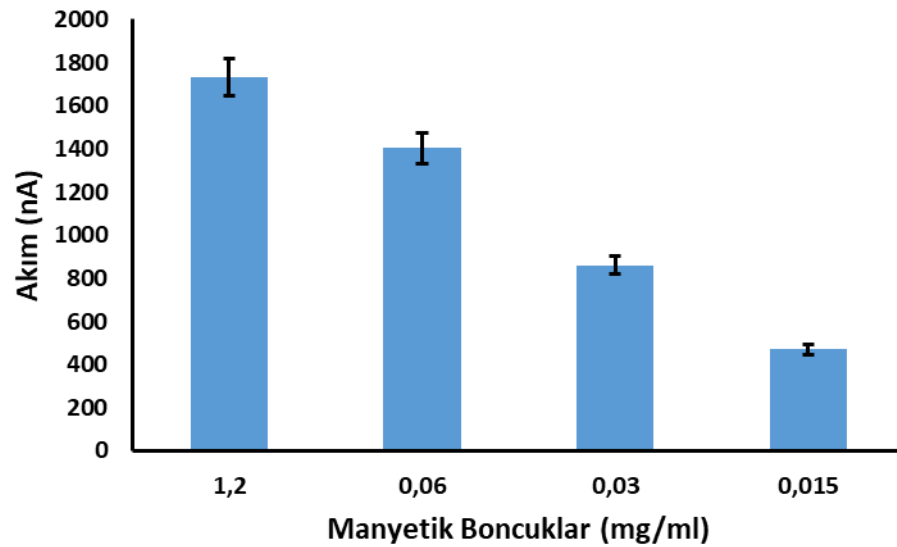


Şekil 3.2. Çalışma koşullarında TMB inkübasyon grafiği

3.1.3. Manyetik Boncuk Konsantrasyonu

Ana vialden (30 mg/ml) alınan protein G bağlı manyetik boncuklar, 1.5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde magnet üzerinde hazırlandı. Manyetik boncuk konsantrasyonu 1.2; 0.06; 0.03; 0.015 mg/ml olarak denendi. Optimum değer olarak 0,015 mg/ml kabul edildi. Çalışmada kullanılan Monoklonal antikor ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.29 ve 0.29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0.02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 10 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi (Şekil 3.3).

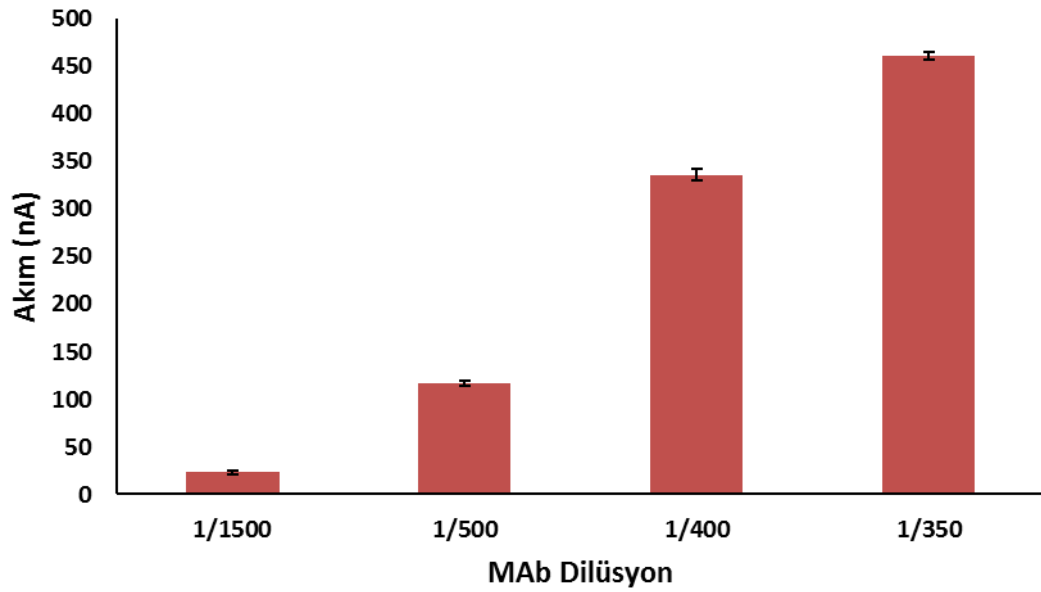
Manyetik boncuk konsantrasyonu kör değerleri göz önünde bulundurularak yapıldı. Amaç, en düşük kör değeri elde ederek ölçüm limitini olabildiğince aşağıya çekmekti. Çünkü poliklonal antikorun da Protein G'ye bağlanmasından dolayı kör değeri yüksek çıkmış ve çalışmayı etkilemiştir. Bu sebeple MB konsantrasyon optimizasyonu kör değerleri üzerinden yapılmıştır.



Şekil 3.3. Çalışma koşullarında manyetik boncuk miktarı optimizasyon grafiği

3.1.4 Monoklonal Antikor

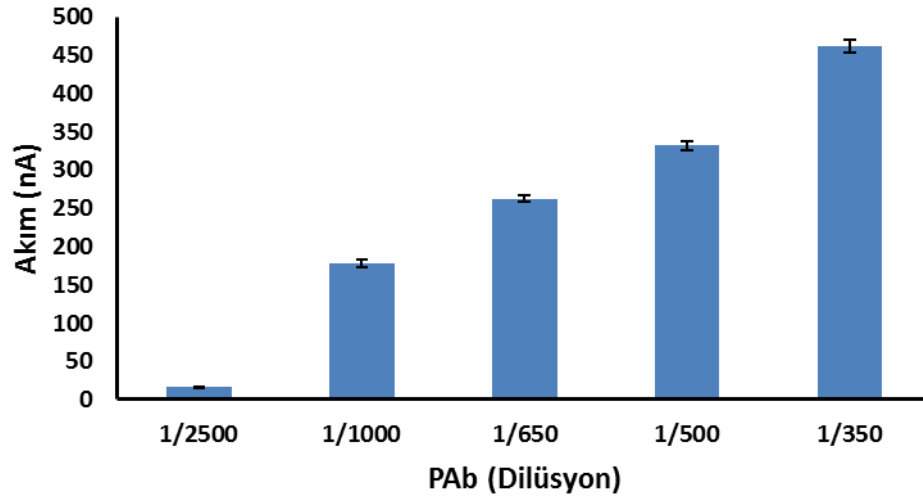
1/1500, 1/500, 1/400 ve 1/350 dilüsyonlarında 10 ng/ml antijen konsantrasyonunda çalışıldı. Optimum değer 1/400 dilüsyon, yani 0,29 µg/ml olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan Protein-G MB ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml ve 0.29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0.02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 10 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Çalışma koşullarında MAb dilüsyonu optimizasyon grafiği

3.1.5. HRP işaretli Poliklonal Antikor konsantrasyonu

1/2500, 1/1000, 1/650, 1/500 ve 1/350 dilüsyonlarında 10 ng/ml antijen konsantrasyonunda çalışıldı. Optimum değer 1/350, yani 0.29 µg/ml olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan Protein-G MB ve Monoklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml ve 0.29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0,02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 10 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi (Şekil 3.5).



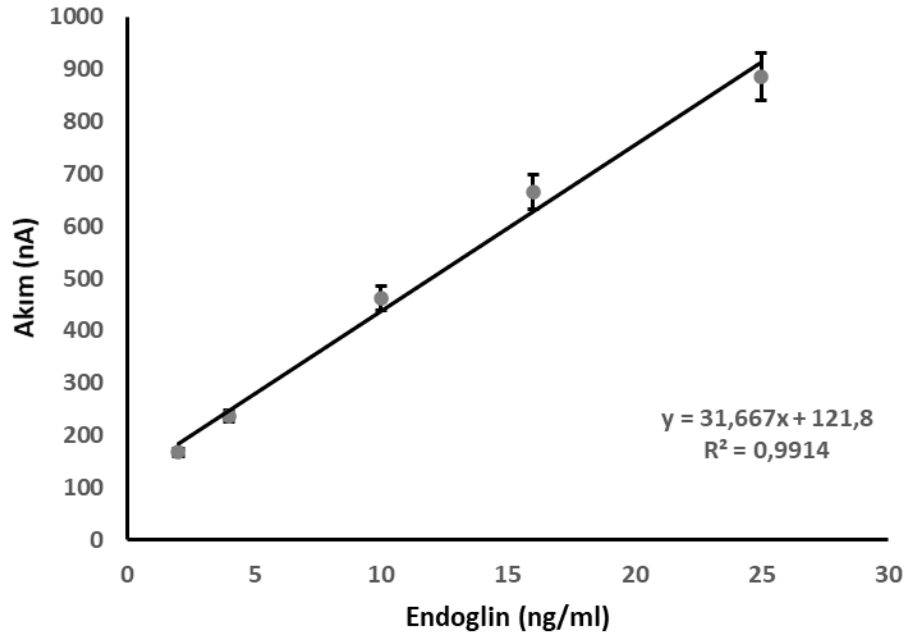
Şekil 3.5. HRP işaretli poliklonal antikor konsantrasyonu optimizasyon grafiği

3.1.6. Antijen konsantrasyonuna bağlı amperometrik standart eğri grafikleri

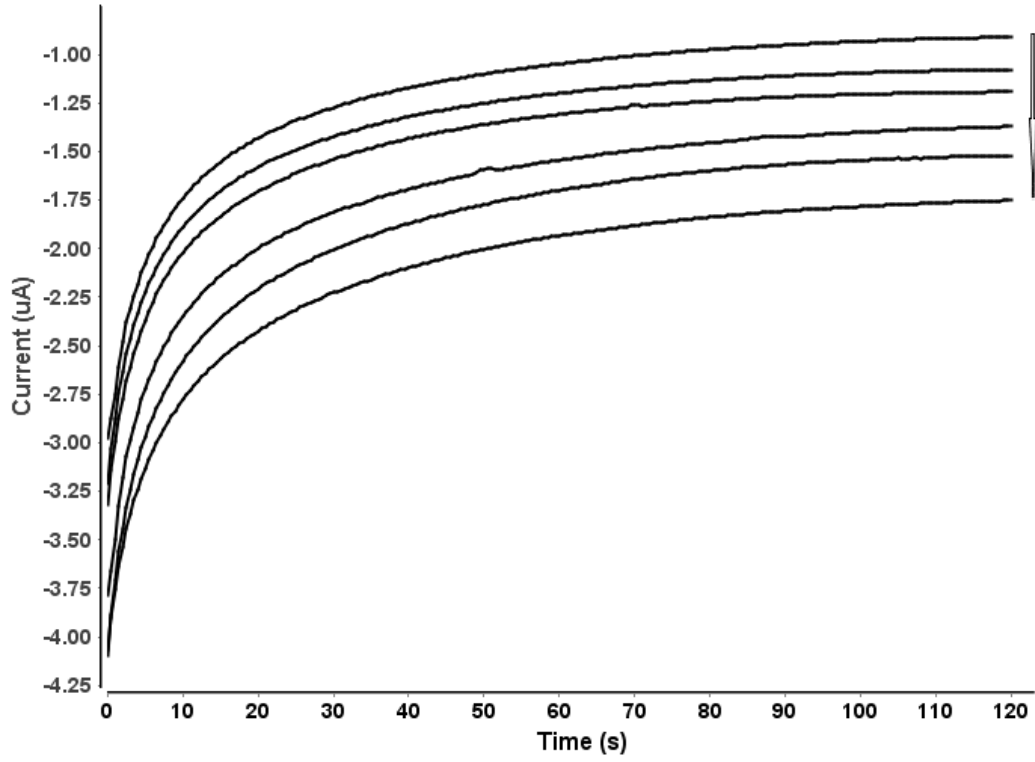
Amperometrik metotta 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml konsantrasyonlarında CD-105 rekombinant antijen miktarı denenerek standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.6)). Çalışmada kullanılan Protein-G MB, Monoklonal antikor ve Poliklonal antikor miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml, 0.29 ve 0.29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0,02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 10 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi.

Ölçüm aralığı 2-25 ng/ml olarak bulundu. LOB, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.6, 1.1 ve 4.1 ng/ml olarak bulundu. %CV=3.2 olarak gösterildi.

Standart eğrilere ait amperogram eğrileri Şekil 3.7'de verilmektedir. Şekle göre akım değerinde düzenli bir artış gözlenmiştir.



Şekil 3.6. 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml konsantrasyonlarında CD-105 rekombinant antijen varlığında, -200 mV sabit voltaj altında elde edilen amperometrik standart eğri grafiği.



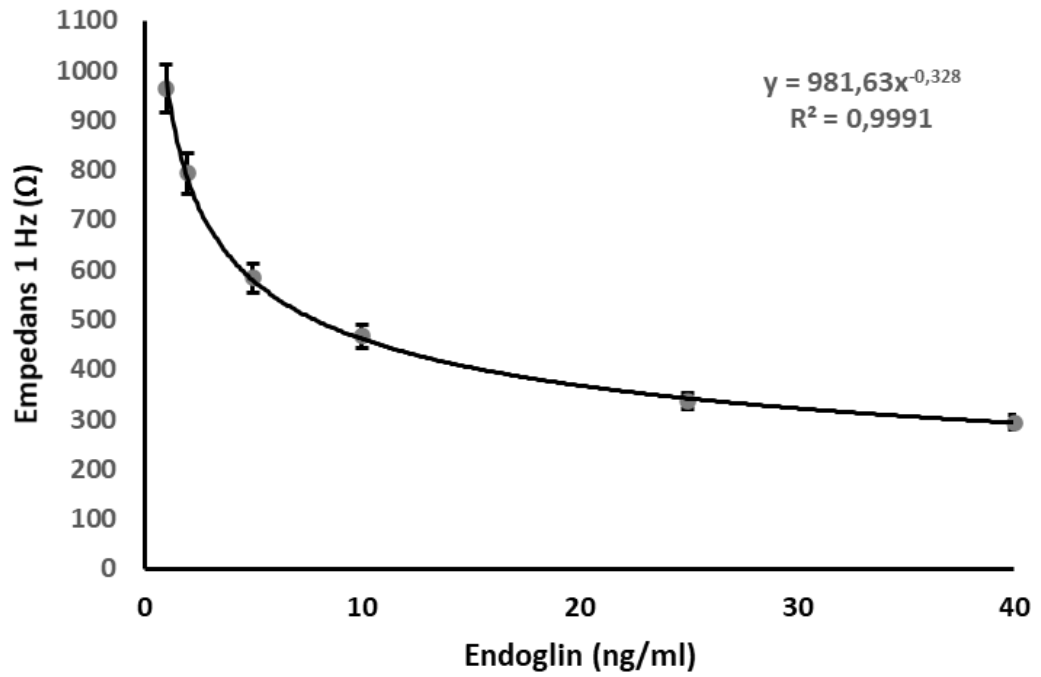
Şekil 3.7. 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında amperometrik immunosensör standart eğri grafiği amperogram görüntüsü.

3.1.7. Antijen konsantrasyonuna bağımlı Empedimetrik standart eğri grafikleri

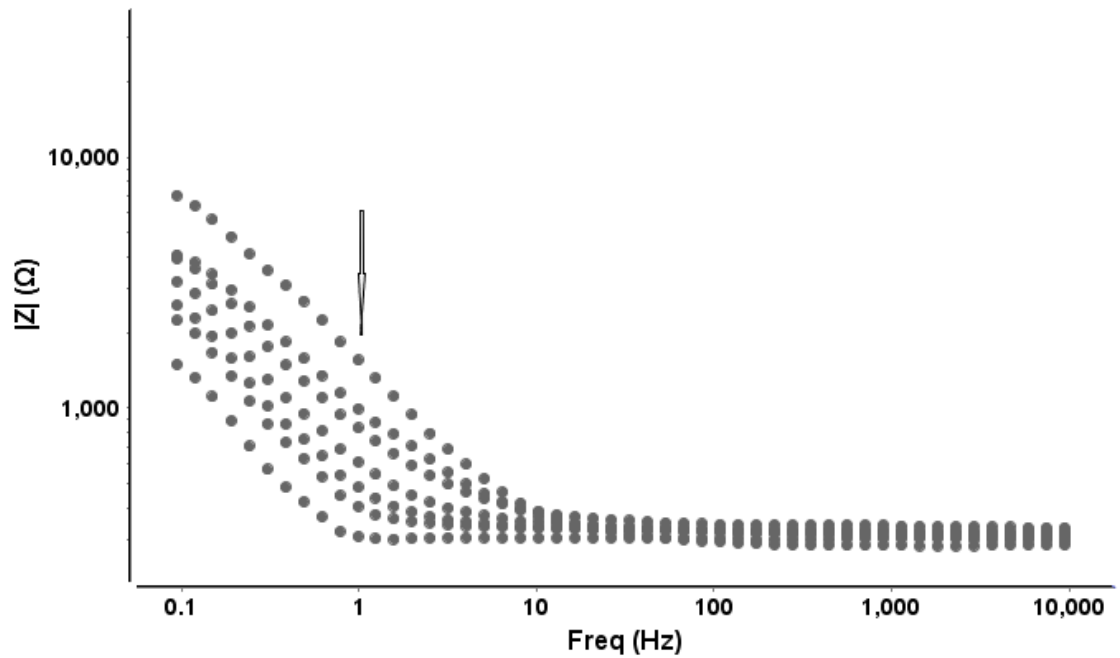
Empedimetrik metotta 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml konsantrasyonlarında CD-105 rekombinant antijen miktarı denenerek standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.8.). Çalışmada kullanılan Protein-G MB, Monoklonal antikör ve Poliklonal antikör miktarları sırasıyla 0.015 mg/ml, 0.29 ve 0.29 µg/ml'dir. Çalışma tamponu 0.01M PBS; 0.138M NaCl, 0.0027M KCl, pH:7.4'dür. Uygulama potansiyeli olarak -200 mV sisteme uygulanmıştır. 0.4 mg/ml TMB and 0,02% H₂O₂ HRP substratı olarak kullanıldı. Okumalar 5 dk inkübasyondan sonra gerçekleştirildi (Şekil 3.8).

Ölçüm aralığı 1-40 ng/ml olarak bulundu. LOB, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.2, 0.4 ve 2 ng/ml olarak bulundu. %CV=2.7 olarak gösterildi.

Standart eğrilere ait bode eğrileri Şekil 3.9'da verilmektedir. Şekle göre 1 Hz frekansta elde edilen, standart konsantrasyonuna bağımlı empedans değerlerinde düzenli bir azalma gözlenmiştir. Çalışmanın değerlendirilmesi için Nyquist eğrileri kullanılmamıştır. Bode grafiği, devre kapasitörler ve indüktörler gibi frekansa bağımlı bileşenleri içerdiğinde direnci ifade etmek için çok yararlı bir araç olduğu için tercih edilmiştir. Çalışmamız da Nyquist eğrisinde kinetik bölgede bir direnç göstermediği ve difüzyon bölgesinde bir direnç gözüktüğü için Bode eğrisi kullanıldı. Reaksiyonun kinetik kontrollü değil difüzyon kontrollü olduğu belirlendi.



Şekil 3.8. 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml konsantrasyonlarında CD-105 rekombinant antijen varlığında elde edilen empedimetrik standart eğri grafiği.

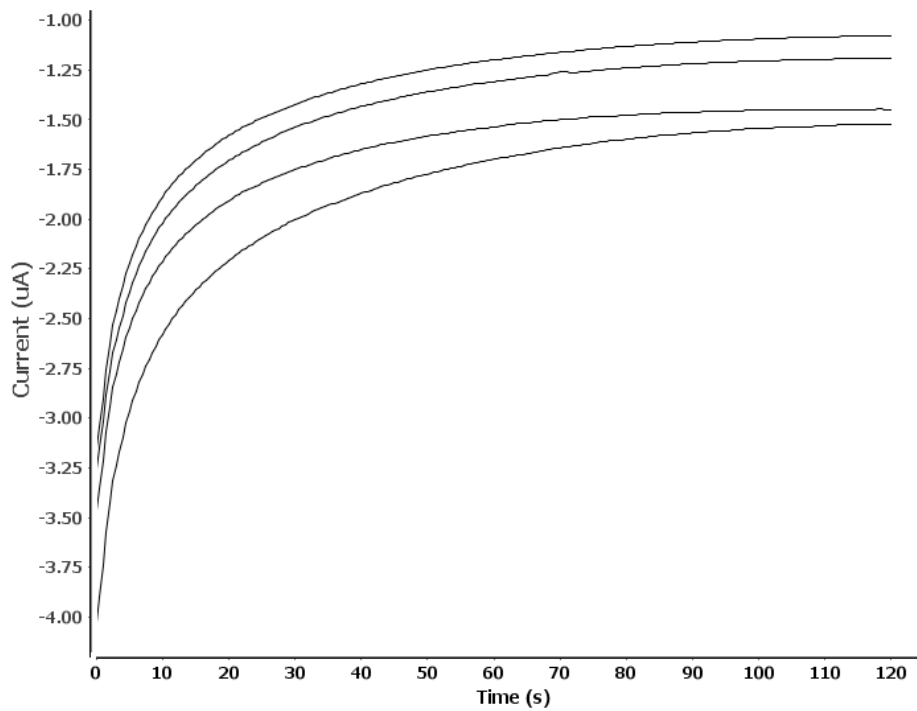


Şekil 3.9. 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında empedimetrik immunosensör standart eğri grafiği bode görüntüsü.

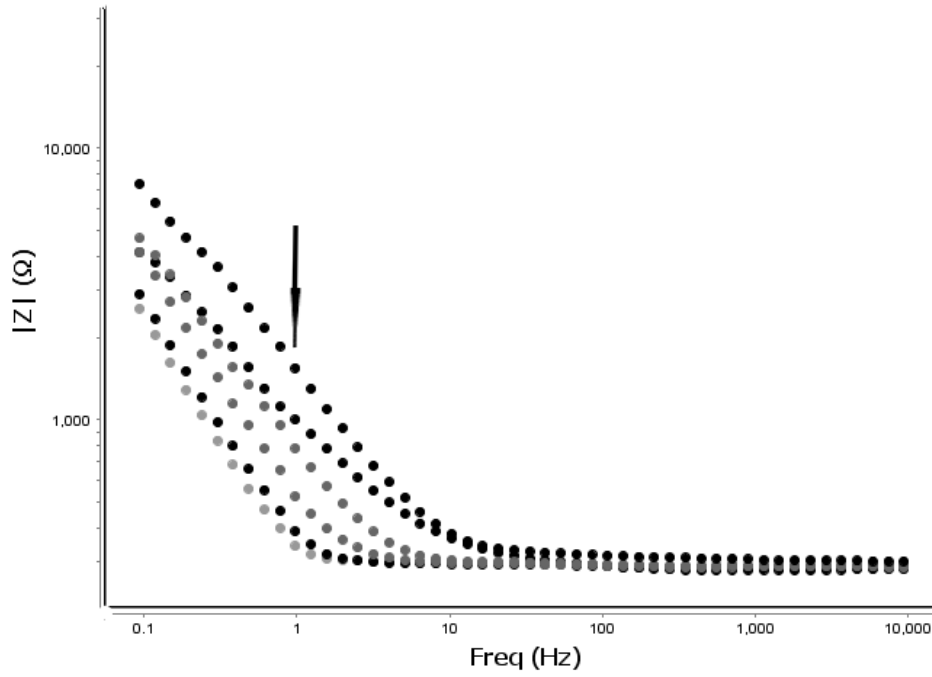
3.1.8. Serum içi antijen konsantrasyonuna bağlı Amperometrik ve Empedimetrik sinyal grafikleri

Kör, 2, 4 ve 10 ng/ml spike konsantrasyonlarına karşı amperogram eğrileri Şekil 3.10'da verilmektedir. Şekle göre akım değerinde düzenli bir artış gözlenmiştir.

Kör, 1, 5, 10, 20 ve 40 ng/ml spike konsantrasyonlarına karşı bode eğrileri Şekil 3.11'de verilmektedir. Şekle göre 1 Hz frekansta elde edilen, standart konsantrasyonuna bağlı empedans değerlerinde düzenli bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.10. Kör, 2, 4, 10, ng/ml CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında amperometrik immunosensör amperogram görüntüsü.



Şekil 3.11. 1, 2, 5, 10, 20, 40 ng/ml spike CD-105 rekombinant antijen konsantrasyonlarında empedimetrik immunosensör bode görüntüsü.

3.1.9. Amperometrik ve EIS metot karşılaştırmaları

Her iki metot için Limit of Blank, Limit of Detection ve Limit of Quantification değerleri Tablo 3.1’de verilmektedir. Sonuçlar karşılaştırıldığında EIS’in daha hassas (pg/ml) olduğu görülmektedir.

Tablo 3.1. Amperometrik ve EIS metotları için LOB, LOD ve LOQ karşılaştırmaları

	LOB	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	%CV
Amperometri	0.6	1.1	4.1	3.2
Empedans	0.2	0.4	2	2.7

3.1.9. Amperometrik ve EIS metotları için serum spike sonuçları

3.1.9.1. Amperometrik metot ile geri kazanım

Hazır serum içerisine üç farklı konsantrasyonda CD-105 eklenerek geri kazanım sağlanmıştır. Geri kazanım, eklenen miktarın yüzdesi olarak ifade edildi. Denklem şu şekildedir:

$$\text{Geri kazanım (\%)} = (\text{ölçülen konsantrasyon} / \text{zenginleştirilmiş konsantrasyon}) \times 100.$$

Tablo 3.2’de amperometrik sonuçlar için elde edilen CD-105 geri kazanım yüzdeleri verilmektedir.

Tablo 3.2. Amperometrik biyosensör ile serumdan CD-105 geri kazanım yüzdeleri

Serum içi CD-105 (ng/ml)	% Geri kazanım
2	74.53
4	93.71
10	108.22
Ortalama	92.15

Sonuçlar doğrultusunda, amperometrik biyosensör ile serum içerisinden CD-105 geri kazanım ortalama yüzdesi 92,15 olarak bulunmuştur. Düşük konsantrasyonlarda elde edilen geri kazanım yüzdesi, yüksek konsantrasyonlara göre daha düşüktür.

3.1.9.2. Empedimetrik metot ile geri kazanım

Hazır serum içerisine 5 farklı konsantrasyonda CD-105 eklenerek geri kazanım sağlanmıştır. Geri kazanım, eklenen miktarın yüzdesi olarak ifade edildi. Denklem şu şekildedir:

$$\text{Geri kazanım (\%)} = (\text{ölçülen konsantrasyon} / \text{zenginleştirilmiş konsantrasyon}) \times 100.$$

Tablo 3.3’de empedimetrik sonuçlar için elde edilen CD-105 geri kazanım yüzdeleri verilmektedir.

Tablo 3.3. Empedimetrik biyosensör ile serumdan CD-105 geri kazanım yüzdeleri

Serum içi CD-105 (ng/ml)	% Geri kazanım
1	112
5	97.2
10	89.9
20	94.25
40	81.2
Ortalama	90.64

Sonuçlar doğrultusunda, amperometrik biyosensör ile serum içerisinde CD-105 geri kazanım ortalama yüzdesi 90.64 olarak bulunmuştur.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Kanser, dünya çapında insanları etkileyen ve hayatı tehdit eden bir hastalıktır. Çeşitli aşamalardan oluşan, karmaşık genomik veya epigenomik değişiklikleri içeren bir hastalıktır. Tümörejenik malignite ve transformasyona neden olmaktadır. Şu anda 200'den fazla kanser türü tanımlanmıştır ve hastalık, tüm dünyada ölümlerin önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir [119, 120].

Kanser türleri için vücut sıvılarında ve histolojik örneklerde çeşitli tanısal ve prognostik belirteçler bulunmaktadır. İdeal biyobelirteç özgül ve kolayca erişilebilen bir biyolojik sıvıda saptanabilir olmalıdır. Ek olarak, belirteç tekrarlanabilir bir test ile ölçülebilir olmalı ve yeterince ikna edici korelatif klinik verilere sahip olmalıdır [121].

Bir hücrede belirli biyobelirteçlerin düzeyindeki, varlığındaki veya yokluğundaki değişiklik, genellikle kanser gelişiminin bir göstergesidir. Bu biyobelirteçlerin kansere özgü tespiti ve tanımlanması, hastalığın ilerlemesinin erken izlenmesi ve teşhisine yardımcı olmaktadır. Biyobelirteç tespiti için geleneksel enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı yöntemler kullanılmaktadır. Her test pahalı reaktiflerin kullanımı ve tespit süre uzunluğu gibi teknolojik sınırlamalara maruz kalırlar. Ayrıca, manuel teknikler olan bu yöntemler, tedavi sırasında hastanın sürekli izlenmesinde yeterli değildir. Kanserde hücre içinde birden fazla olay, birden fazla molekülü içeren metabolik reaksiyonlar meydana geldiğinden, doğru teşhis ve prognoz için birden fazla biyobelirtecini eşzamanlı tespiti gereklidir [122].

Esas olarak kanser biyobelirteçleri, prognostik (iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki ayırt edici özelliklere ve klinik tedavileri etkileyebilen tümörlerin farklılaşma durumuna dayalı olarak) ve hastalık durumuna atıfta bulunarak sınıflandırılabilirler. Bu

sınıflandırmaya göre öngörücü (uygulamanın etkisini belirlemek için), farmakodinamik (belirli bir tümör-hasta durumu için kemoterapötik ajanların dozlarını seçmek için kullanılır) ve teşhisler (bir tümörün evresini ve nüksünü belirlemeye yardımcı) şeklinde sınıflamalar bulunmaktadır [123]. Proteinler, kanser türlerinin en güvenilir ve en önemli biyolojik belirteçleridir. Normal ve habis hücrelerdeki moleküler yolların sonuçları oldukları için hastalık durumu, başlaması ve ilerlemesi ile ilişkilidirler [124].

Son zamanlarda anjiyogenezde önemli olan biyobelirteçlerden biri endoglin'dir. CD105 olarak da bilinen endoglin, normal dokuların vasküler endotelyumunda zayıf veya negatif ekspresyonla, tümör anjiyogenezine katılan aktive edilmiş endotel hücrelerine tercihli olarak bağlanan büyüme faktörü- β 1 molekülünü dönüştürmek için bir reseptördür. Endoglin, hipoksi tarafından indüklenir. Bu nedenle, malign neoplazmların neo-anjiyogenezinin değerlendirilmesi için çok önemlidir [125].

Endoglin, esas olarak proliferasyon yapan vasküler endotelial ve düz kas hücrelerinde eksprese edilir ve tümör anjiyogenez ve enflamasyon sırasında endotel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Normal dokularda zayıf veya negatif ekspresyonu vardır. Prostat kanseri ile bağlantılı olarak prostat mikro damar sisteminde eksprese edilir ve kolorektal, meme ve akciğer kanseri metastazı olan hastaların serumlarında artar. Endoglinin, anjiyogenez için gerekli olduğu [126], proliferasyon yapan vaskülatürde yoğun eksprese edildiği [127,128] ve hipoksi ile up-regüle edildiği gösterilmiştir [129].

Ayrıca, akciğer, meme, kolorektal, gastrik, karaciğer, endometrial, böbrek hücresi, baş ve boyun ve over kanserlerinde tümör damarlarının proliferasyon yapan endotel hücrelerinin plazma membranlarında yüksek düzeyde eksprese olduğu bildirilmiştir [130]. Bu durumda, serum CD-105'in, katı tümörleri ve diğer anjiyogenik hastalıkları olan hastaların uzun vadeli takip çalışmalarında, erken metastaz belirtilerini ve kanser nüksünü izlemek için yararlı bir belirteç olabileceği öngörülmüştür.

Tümör metastazının erken tespiti son derece önemlidir [131]. Son zamanlarda, birkaç çalışmada, proliferasyonla ilişkili ve hipoksiyle indüklenebilir bir protein olarak CD-105'in (EDG, endoglin) iyi bir tümör metastaz belirteci olabileceği gösterilmiştir. Bir tümör metastaz belirteci olarak CD-105'in potansiyel faydası, Norihiko ve diğerleri tarafından değerlendirilmiştir [132]. Diğer yandan, katı tümörleri ve diğer anjiyogenik hastalıkları olan hastalarda, uzun süreli bir takip çalışmasında serum CD-105'in metastazın erken tanısı için yararlı bir belirteç olabileceği gösterilmiştir [133].

Kolorektal kanserde immünohistokimyasal olarak değerlendirilen endoglinin sadece tümör mikrodamar yoğunluğu ile değil, aynı zamanda hayatta kalma ile de ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, artmış metastatik hastalık geliştirme riski olan hastaları öngören değerli bir parametre olarak bildirilmiştir [134].

Normal dokulara kıyasla kolon, meme, beyin, akciğer, prostat ve rahim ağzı kanseri dahil olmak üzere çok çeşitli endotelyal tümörlerde daha fazla CD-105 ekspresyonu bulunmaktadır. Hastalardan alınan biyolojik sıvılarda artan CD-105 seviyeleri, hastalığın ilerlemesi, metastaz riski, kemoterapi ve dolayısıyla bunların izlenmesi, hastaların özellikle antianjiyojenik tedavilere tepkisinin değerlendirilmesi için bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Artmış CD-105 seviyeleri ayrıca iltihaplı dokularda da tespit edilmektedir. Protein, TGF-beta ile indüklenen üretimi modüle ettiği için sadece kanserle ilgili değil, preeklempsi, romatoid artrit ve epidermolizis bülloza gibi anjiyogenezele ilgili diğer önemli hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde de tespit edilmektedir [135, 136].

Yetişkin insan dokularında endoglin ekspresyonu, proliferasyon gösteren endotelyal hücreler, aktive monositler ve kırmızı kan hücrelerinin öncüleri olan proeritroblastlarla sınırlıdır [137].

Metastatik meme ve kolorektal tümörlü hastalar kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek serum endoglin seviyeleri sergilemiştir [138,139]. Serum endoglin düzeylerinin de kemoterapi ile azaldığı gösterilmiştir [140]. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar serum endoglin düzeylerinin ileri hastalığı olan hastaları ve metastaz gelişme riski taşıyan hastaları sınıflandırmak için kullanılabileceğini göstermektedir. Endoglinin ayrıca, kemoterapi sonrası kanser hastalarında nüksü izlemek için kullanılabileceği de bildirilmiştir. İdrar ve serumdaki endoglin düzeylerinin prostat kanserinin saptanması ve takibinde yardımcı olabileceği gösterilmiştir [141]. Farklı hastalık tiplerinde görülen Endoglin serum düzeyleri Tablo 4.1’de verilmektedir.

Tablo 4.1. Farklı hastalıklarda ölçülen serum endoglin seviyeleri

Hastalıklar	Standart Değer	Hasta Değer	Kaynak
Şiddetli Olmayan Preeklampsi	2.08 ± 0.56 ng/mL	10.21 ± 0.86 ng/mL	[142]
Şiddetli Preeklampsi	2.08 ± 0.56 ng/mL	14.94 ± 0.89 ng/mL	[142]
Paraganglioma Hastaları	4.81± 0.58 ng/mL	8.02 ± 1.67 ng/mL	[143]
Prostat Kanseri	2.353 ng/mL	28.8 ng/mL	[144]
SSc Olmadan Yükseltilmiş sPAP	4.52 ng/dL	6.89 ng/dL	[145]
SSc ile Yükseltilmiş sPAP	4.52 ng/dL	7.07 ng/dL	[146]
Diyabetik Periferik Nöropatisi	20.6 ng/mL	25.2 ng/mL	[147]
Kolorektal Kanser	3,90 ng/mL	6,71 ng/mL	[148]
Akciğer Alveol Peritümöral	2.2 ng/mL	12.3 ng/mL	[149]
Akciğer Alveol İntratümöral	2.2 ng/mL	26.2 ng/mL	[149]
Akciğer Kanseri	111 pg/ml	4112 pg/ml	[150]

CD-105'in saptanması için geleneksel immünoanaliz yöntemleri arasında radyoimmünoanalizleri (RIA) ve enzime bağlı immünosorbant analizleri (ELİZA) ve immünohistokimyasal analiz yöntemleri bulunmaktadır [151]. Bunların dışında biyosensör temelli sistemlerde ölçümlerde yer almaktadır.

Elektrokimyasal immünosensörler, boyut, maliyet ve analiz süresinde azalma gibi avantajları olan spesifik, basit, etiketsiz ve doğrudan tespit yetenekleri ile büyük ilgi görmektedirler. Geleneksel immünoassay teknikleriyle karşılaştırıldığında, elektrokimyasal immünosensörler, antikorlar ve antijenler arasındaki yüksek düzeyde spesifik tanıma olaylarının uygun dönüştürücülerle birleştirilmesinden yararlanır. Bu

nedenle, birçok türde elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Özellikle, nanopartiküllere dayalı gelişmiş malzemeler, elektrot yüzeyinde daha geniş bir yüzey alanı, iyi biyo-uyumluluk ve stabilite sağladıkları için şu anda temel araştırma alanlarından biridir [152].

Manyetik boncuklar ve elektrokimyasal saptamanın kombinasyonu, analitleri hızlı ve hassas bir şekilde algılanması için etkili bir strateji sağlamaktadır. Çünkü manyetik boncuklar, hedeflerin yakalanması için homojen taşıyıcılar olarak kullanılmaları nedeniyle bağlanmalarda ve baskılı elektrotlar ile birlikte kullanımlarda çok etkilidirler. Manyetik boncukların kullanılması elektrot modifikasyonlarını önlemekte ve örnek matriks adsorpsiyonu etkisini azaltmaktadır [153,154].

Günümüzde klasik immobilizasyon yöntemleri terk edilmiş ve bunların yerine yeni geliştirilen mikro ve nanomateryal teknolojiler açılmıştır. Klasik olanlar, algılama yüzeyinin özelliklerini etkiler veya spesifik olmayan adsorpsiyonlar yoluyla elektrot yüzeyinin tekrar kullanılmamasına neden olur. Mikro teknoloji, biyomoleküler saptamada çalışan elektrot yüzeyindeki biyo bileşeni sabitlemek için gelişmiş bir teknolojidir. Ekran baskılı elektrot (SPEs) teknolojisi ile birleştirildiğinde, hedef analitin belirlenmesi için daha verimli, hızlı, seçici ve hassas hale gelir [155].

Ekran baskılı elektrotlar (SPE'ler) karbon, altın veya gümüş çalışma elektrotlarına sahip olabilir. Karbon, mikro boncuklarla (MB'ler) çalışmak için daha makul bir çalışma elektrotudur. Elektrot, daha yüksek sinyal / gürültü yanıtlarına ve buna bağlı olarak daha düşük algılama sınırına yol açan özelliklere sahiptir. Bu kombinasyon, yüzeyin kolay değiştirilmesine izin verir ve çalışılan numune miktarını azaltır (sadece birkaç mikrolitre). Ayrıca, MB'lere ayrı bir destek üzerinde biyo-bileşenin immobilizasyonunu yapmamıza izin verilir. Bu durumlarda, elektrot yalnızca bir ölçüm cihazı olarak işlev görür. Tek sorun, tanıma elemanının yüzey elektrodu ile doğrudan temas halinde olmamasıdır. Bunu önlemek için, SPE elektrotlarının yüzeyindeki MB'lerin stabilizasyonu için manyetik parçalara sahip küçük ekipman kullanılır. Bu strateji kullanılarak, biyosensörün hassasiyeti arttırılmaktadır [156,157,158].

Manyetik boncuklara (MB) dayalı algılama stratejileri, MB'a dayalı olmayanlara kıyasla gelişmiş duyarlılık, düşük tespit limiti, yüksek sinyal oranı ve daha kısa analiz süresi gibi analitik değerler açısından avantajlar sunmaktadır [159,160] Bu özelliklerinden dolayı, özellikle çevresel, klinik ve gıda numunelerindeki farklı

analitleri duyarlı bir şekilde ölçmek için MB'lar yeni nesil biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Rocha-Santos (2014) yaptığı çalışmada, çoklu analit tespiti için tek bir cihazda tespit ve analiz, numune hazırlama, moleküler etiketleme gibi birkaç adımın kombinasyonuna olanak tanıyacağından manyetik partikül esaslı cihazların ve mikroakışkan yapıların tekli çiplere entegrasyonunu önermektedir [161].

Biyoalgılayıcıların elektrot yüzeyine etkili bir şekilde hareketsizleştirilmesi, biyosensörlerin geliştirilmesindeki en önemli adımlardan biridir. En iyi immobilizasyon yöntemi, maksimum hassasiyet veya stabilite gerektiren biyosensör uygulamasıyla ilgilidir. Biyoalgılayıcılar ile (strept)avidin, lektinler veya şekerler arasındaki afinite etkileşimlerine dayanan bağlanma teknikleri, bunların düzenli ve bölgeye özgü bir şekilde hareketsizleştirmeye ve böylece verimli biyosensörler geliştirmeye izin verir. Bu bağlanma özellikleri manyetik boncuklarda da kullanılmaktadır [162].

Elektrokimyasal sensörler, yüksek hassasiyet ve düşük maliyetli cihazlar gibi avantajlarını sergilemektedir ve patojen tespiti için uygulanmıştır [163,164] Çıkış sinyallerinin türlerine bağlı olarak, elektrokimyasal analiz yöntemleri potansiyometri, amperometri, voltametri, empedans, iletkenlik ve benzerlerinden oluşur. Bunlar arasında, amperometri ve empedanstan türetilmiş immünosensörler, daha düşük tespit limitleri ve minyatürleştirme kolaylığı nedeniyle artan bir ilgi çekmektedirler [165,166].

İmmünosensörler, bir dönüştürücü yüzeyinde antikor ve antijen arasındaki etkileşimlere dayanır. Bu moleküller arasındaki güçlü bağlanma nedeniyle, oldukça seçici ve hassastırlar [167]. İmmünosensörler genellikle seçici konjuge enzime dayalı enzim aktivitesi saptamaları ile tamamlanırlar. Enzim aktivitesinin ölçülme aşaması, immünosensör tasarımı için son aşamadır [168].

İmmünosensörler ayrıca elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi için çok yararlı araçlardır. Bu nedenle, kolaylıkla taşınabilir bir sensöre dönüşebilirler. Bu özelliğinden dolayı, genellikle tek kullanımlıktırlar ve yerinde veya otomatik tespit gerçekleştirebilirler [89]. Amperometrik elektrokimyasal algılama, mükemmel bir hassasiyete ve geniş doğrusal aralığa sahiptir. Tespit yöntemi son yıllarda elektrokimyasal enzim bazlı immunoölçümlerin gelişmesiyle dikkat çekmiştir [168].

Son yıllarda, biyomoleküllerin, proteinlerin, hücrelerin, patojenlerin ve virüslerin saptanması için empedans immünosensörleri geliştirilmişlerdir. Geliştirilen elektrokimyasal empedans biyosensörlerinin çoğu, antikorların elektrot yüzeyinde hareketsizleştirilmesine bağlıdır, bu da zaman alıcıdır ve tekrarlanabilirliği düşüktür. Ayrıca, elektrot yüzeyindeki numune matrisinin adsorpsiyonu, saptama doğruluğunun, hassasiyetin ve kararlılığın azalmasına neden olur [169]. Bu nedenle, elektrot immobilizasyonuna ve örnek matris adsorpsiyonuna dayanmayan bir immünosensör, geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Empedimetrik immünosensörlerde antikorlar elektrotlar, optik fiber veya yarı iletken çipler üzerinde hareketsiz hale getirilir ve çeşitli alanlarda umut verici uygulamaları nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür [170].

Empedans spektroskopisi, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektrik özelliklerini araştırmak için etkili bir yöntem sağlar. Bununla birlikte, geniş bir frekans bölgesi içinde tam bir empedans spektrumunun kaydedilmesi zaman alıcıdır. Bu nedenle, empedimetrik teknikler yalnızca enzim bazlı empedimetrik biyosensörlerin çoğu için bir karakterizasyon yöntemi olarak kullanılır ve genellikle dolaylı izleme stratejileri benimsenir [171].

Afinite bağlayıcı tabanlı empedimetrik biyosensörler, doğrudan ve laboratuvarından bağımsız elektrokimyasal immünosensörler oldukları ve hız, vasıfsız analistlerin kullanımı ve çoklu analit sensörlerinin potansiyel gelişimi açısından birçok potansiyel avantaja sahip oldukları için artan ilgi çekmektedir. Son yıllarda, afinite-bağlanmaya dayalı empedimetrik biyosensörlerin birçok yeni tasarımları rapor edilmiştir [172].

CD-105 tayininde kullanılan yöntemler genellikle spektrofotometriktir [173]. Bizim kullandığımız amperometrik yöntem ise biyokimyasal reaksiyonda oluşan ürünlerin reaksiyonu sonucu çalışma elektrodundaki akım değişikliğini ölçer [174]. Tablo 4.2 de farklı çalışmalarda spektrofotometrik ve amperometrik yöntemler ile ölçülen serum endoglin seviyeleri gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı Çalışmalarda Ölçülen Minimum Serum Endoglin Seviyeleri

Kullanılan Yöntemler	Serum Endoglin Seviyeleri	Kaynak
Spektrofotometri	12.4 (pg/mL)	[175]
Spektrofotometri	0.001 ng/mL	[176]
Spektrofotometri	10 pg/mL	[177]
Spektrofotometri	10 pg/ml	[178]
Amperometri	7.07 ng/dL	[179]
Amperometri	6.26 ng/mL	[180]

Rodriguez ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada klinik uygulamalarda biyobelirteç olan insan endoglininin (CD105) belirlenmesi için bir immünoanaliz yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada baskılı karbon elektrotlarda (SPCE'ler) amperometrik algılamayı içeren hassas ve hızlı bir yöntem sunulmaktadır. Mikro boyutlu manyetik parçacıklar ve HRP etiketli antikörle daha da sıkıştırılmış olan hedef proteini seçici olarak yakalamak için spesifik bir antikörle modifiye edilerek endoglin ölçümü geliştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda 5 pmol endoglinin tespiti gerçekleştirilmiştir [181].

Coral ve ark. (2010) ve Sachan ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ise amperometrik yöntemle CD-105 (Endoglin) ölçümleri gerçekleştirilmiş olup minimum endoglin seviyesi sırasıyla 7.07 ng/dL ve 6.26 ng/mL olarak tespit edilmiştir [179,180].

4.2. SONUÇ

Çalışmamız temelinde iki farklı yöntem geliştirilerek karşılaştırılmaları yapıldı. Bunların sonucunda her iki yöntem içinde Endoglin (CD-105) ölçüm metotları oluşturuldu. Karşılaştırma sonucunda EIS metodunun daha hassas olduğu görüldü. Çalışma sırasında geliştirilen empedimetrik metot yeni bir uygulamadır.

Çalışmaların sonucunda, çalışma aralıkları amperometrik ve empedimetrik immunosensörler için sırasıyla 2, 4, 10, 16, 25 ng/ml ve 1, 2, 5, 10, 25, 40 ng/ml CD-105 rekombinant antijen varlığında bulundu. Yine LOB, LOD ve LOQ ölçüm değerleri,

amperometrik immünosensör için sırasıyla 0.6, 1.1 ve 4.1 ng/ml olarak bulundu. % CV=3.2 olarak gösterildi. Empedimetrik immünosensör için LOD ve LOQ ölçüm değerleri sırasıyla 0.2, 0.4 ve 2 ng/ml olarak bulundu. %CV=2.7 olarak gösterildi.

Sonuçların, Tablo 4.2. ile karşılaştırması sonucunda görüldüğü üzere geliştirilen her iki biyosensörde diğer geliştirilen amperometrik biyosensörlerden daha hassastır. Bununla birlikte spektrofotometrik (ELİZA) yöntemlerinin hassasiyetleri daha yüksektir. Fakat elektrokimyasal biyosensörlerin kullanılabilirliği, taşınabilirliği ve ucuzluğu söz konusu olduğunda, spektrofotometrik yöntemlere göre daha avantajlıdır.

Geliştirilen her iki tip immünosensörde serumdan CD-105 tayini ve kanser biyobelirteci olarak ölçümü için yeterli hassasiyettedir.

4.3. Öneriler

Çalışmalar doğrultusunda geliştirilen immünosensör metotlarıyla farklı biyobelirteçler için de immünosensörlerin tasarlanabileceği öngörülmektedir. Ayrıca geliştirilen bu biyosensörler klinik uygulamalarda da kullanılabilirler.

Her iki tip biyosensörün geliştirilmesinde piyasada bulunan antikorlar kullanılmıştır. Eğer imkanlar doğrultusunda antijen bağlama hassasiyetleri daha yüksek olan antikorların elde edilir ise hassasiyet daha da arttırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Diamandis EP, Fritche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications. AACC Press, Washington, DC, USA, 2002.
2. Sturgeon CM, Lai LC, Duffy MJ. Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ* 2009; 339: 3527.
3. Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF 1998. Circulating tumour markers in breast cancer: accepted utilities a novel prospect. **Breast Cancer Res. Treat.**, 52: 239-259.
4. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17:984-92.
5. Sankara VSPK, Jayanthi A, Das AB, et al. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;91(15):15–23.
6. Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., et al. 2008. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. **IRBM**, 29: 171.
7. Belluzo, M.S., Ribone, M. É. and Lagier, C.M. 2008. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. **Sensors**, 8: 1367.
8. Canh, T.M. 1993. Biosensors. Chapman&Hall, London.
9. Orazem, M. E., Tribollet, B., (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc
10. Sezgintürk M. K. Uygun Z.O. (2012). An impedimetric VEGF biosensor based PAMAM/cysteamine modified gold electrodes for monitoring of tumor growth, **Analytical Biochemistry**, 423,277-285.
11. Gehring A.G., Brewster J.D., Irwin P.L., Tu S.I., Van Houten L.J., (1999). 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry, *J. Electroanal. Chem.* 469: 27.
12. Dequaire M., Degrand C., Limoges B., 1999. An immunomagnetic electrochemical sensor based on a perfluorosulfonate-coated screen-printed electrode for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *Anal. Chem.* 71: 2571-2577.

13. Sole S., Merkoci A., Alegret S., (2001). New materials for electrochemical sensing III. Beads. Trends Anal. **Chem.** **20**: 102-110.
14. Jan Krejci, J.P., Fucik, L., et al. 2004. Screen-printed sensors with graphite electrodes-Comparison of properties and physical method of sensitivity enhancement. **Microelectron. Int**, **21**: 20-24.
15. 1-<https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/8635,kanser-istatistikleridocx.docx?0>. Web. 3 Haziran 2018 tarihinde erişilmiştir.
16. Parkin DM, Fernandez LM (2006). Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J*, 1: 70–80.
17. Yardım N, Mollahaliloğlu S, Bora Bağara B. Türkiyede Kanser Durumu ve Uluslararası Göstergeler İle Uyumun Değerlendirilmesi. İçinde: Türkiye’de Kanser Kontrolü. Eds. Tuncer AM, Özgül N, Olcayto E, Gültekin M. T.C. Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Koza Matbaacılık, Ankara, 2009; 51-63.
18. Tatarinov YS. 1963. Detection of embryospecific alpha-globulin in serum of patients with primary liver cancer. In: 1st All-Union Biochem Congress Abstract Book. **Moscow – Leningrad**; p.274.
19. Porter P 2008. “Westernizing” women’s risk? Breast cancer in lower income countries. **N Eng J Med** 358: 213-216.
20. Yasasever V, Oğuz H. Moleküler Tıpta Tümör Belirleyiciler. *Türk Onkoloji Dergisi* 2004; 19: 8-36.
21. Duffy MJ. Evidence for the clinical use of tumour markers. **Ann Clin Biochem** 2004;41:370-77
- 22-Maggino T, Gadducci A. Serum markers as prognostic factors in epithelial ovarian cancer:an overview. **Eur J Gynaecol Oncol** 2000;21:64-9
23. Srivastava S, Gopal-Srivastava R. Biomarkers in cancer screening: a public health perspective. *J Nutr.* **2002 Aug**;132(8 Suppl):2471S-2475S
24. Zhang Z. 2002. Combining multiple biomarkers in clinical diagnostics: A review of methods and issues. In: Diamandis EP, Fritsche HR, Lilja H, et al., editors. Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications. **Washington D.C.: AACC Press**; p. 133–9.

25. Balza E, Castellani P, Zijlstra A ve ark. Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels. **Int J Cancer**, **94**: 579-85, 2001.
26. Li, C., Garland, J. M., and Kumar, S. 2001. Role of transforming growth factor signalling in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**; 93, 555–556
27. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H959-H974.
28. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **FASEB J** 2003;17:984-92
29. Blann, A.D., Wang, J.M., Wilson, P.B., and Kumar, S. (1996). Serum levels of the TGF β receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 120(1-2), 221-6.
30. Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., Andrys, C., and Blazek, M. (2008). Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, **197**(1), 264-
31. Ikemoto, T., Hojo, Y., Kondo, H., Takahashi, N., Hirose, M., and Nishimura, Y. 2012. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. **Heart and vessels**, **27**(4), 344-51.
32. Blazquez-Medela, A.M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M.A., Recio-Rodriguez, J.I., Sanchez-Rodriguez, A., Lopez-Novoa, J.M. 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. **Biomed central medicine**, **8**, 86.
33. Nachtigal, P., Pospisilov, N., Vecerova, L., Micuda, S., Brackova, E., and Pospisilova, K. (2009). Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, **16**(3), 265-74.
34. K. Arshak, Z. Mohamed, E. Souna, T. Anthony, Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. New York: Springer Science and Business Media, 2008.

35. Matlock-Colangelo, L., Baeumner, A. J., 2012, Recent progress in the design of nanofiber-based biosensing devices, **Lab on a Chip**, **12** (15), 2612p.
36. Castillo, J.; Gaspar, S.; Leth, S.; Niculescu, M.; Mortari, A.; Bontidean, I.; Soukharev, V.; Domeanu, S. A.; Ryabov, A. D.; Csoregi, E., (2004). Biosensors for life quality - Design, development and applications **Sensors and Actuators B**, **102**: 179-194.
37. Balasubramanian, K. and Burghard, M., 2006, Biosensors based on carbon nanotubes, **Anal. Bioanal. Chem.**, **385**: 452–468.
38. Karube, I. and Nakanishi, K., 1994, Microbial biosensors for process and environmental control, **IEEE Eng. Med. Biol.**, **13**: 364-374.
39. Zhai, J., Cui, H., Yang, R., 1997. DNA based biosensors. **Biotechnology Advances**, **15** (1): 43-58.
40. Perumal, V., Hashim, U., 2014. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **J. App. Biomed.** **12**:1, 1-15.
41. Justino, C.I., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A., 2015a. Analytical applications of affibodies. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **65**, 73-82.
42. Crew, A., Lonsdale, D., Byrd, N., Pittson, R., Hart, J.P., 2011. A screen-printed, amperometric biosensor array incorporated into a novel automated system for the simultaneous determination of organophosphate pesticides. **Biosens. Bioelectron.** **26**:6, 2847-2851.
43. Luo, X., Davis, J.J., 2013. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chem. Soc. Rev.* **42**:13, 5944-5962.
44. Labuda, J., Brett, A.M.O., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Paleček, E., Wang, J., 2010. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry** **82**:5, 1161-1187.
45. de Carvalho, C.C., 2011. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. **Biotechnol. Adv.** **29**:1, 75-83.
46. Tawil, N., Sacher, E., Mandeville, R., Meunier, M., 2014. Bacteriophages: biosensing tools for multi-drug resistant pathogens. **Analyst** **139**:6, 1224-1236.

47. Justino, C.I., Rocha-Santos, T.A., Duarte, A.C., 2010. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **29**(10), 1172-1183.
48. Chen, L., Xu, S., Li, J., 2011. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chem. Soc. Rev.* **40**:5, 2922-2942.
49. Perumal, V., Hashim, U., 2014. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. App. Biomed.* **12**:1, 1-15.
50. Novotny, P. (2009). An overview of selected Lux-Marked biosensors and its application as a tool to ecotoxicological analysis. **Nova Science Publishers, Inc.**, 1–24.
51. **Velasco-Garcia, M. N. 2009.** Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **20**(1): 27–33.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.013>
52. **Marrazza, G. 2014.** Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. *Biosensors*, **4**(3): 301–317.
<https://doi.org/10.3390/bios4030301>
53. **Luong, J. H. T., Male, K. B, Glennon, J. D. 2008.** Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*, **26**(5): 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.007>
54. Towseef, W., Amin, Q. A., Quadir, N. 2013. Role of biosensors in agro-food technology. *Asian Journal of Home Science*, **8**(1): 347–352.
55. Chaplin, M. F. (Martin F. ., Bucke, C. 1990. Enzyme Technology, Cambridge University Press. <http://www.e-booksdirectory.com/details.php?ebook=1870> (Erişim tarihi: 18.11.2017).
56. Clark, L. C., Lyons, C. 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals New York Academy of Sciences*, 29–45. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x/epdf>

57. Li, Y., 2006. CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering. **ASABE**, pp. 52-93
58. Belluzo, M.S., Ribone, M.É. and Lagier, C.M., 2008, “Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics”, *Sensors*, 8, 1367.
59. Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., Kubota, L. T., 2003. Direct electrontransfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14 (2):230-243.
60. Li´ebana, S., Brandão, D., Alegret, S., Pividori, M. I., 2014. Electrochemical immunosensors, genosensors and phagosensors for Salmonella detection, **Analytical Methods**, 6: 8858-8873.
61. Russell, R.. M., Robertson, J. L.,Savin, N. E., 1977. POLO: A new computer program for probit analysis. **Bulletin of the Entomological Society of America**, 23 (3): 209-213.
62. Jusoh, N., Aziz, A. A., 2006. Immobilization of Glucose Oxidase and Ferrocene Redox Polymer in Cross-Linked Poly (Vinyl Alcohol) with Bovine Serum Albumin as Protein Stabilizer, pp. 1-5. **Regional Postgraduate Conference On Engineering and Science**, 26 -27 July 2006, Malaysia.
63. **Ramanavicius A., Ramanaviciene A., Malinauskas A.** 2006. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole *Electrochimica Acta* 51 6025–6037.
64. Wang S., Sun C., Hu Q., Li S., Wang C., Wang P., Zhou L., A homogeneous magnetic bead-based impedance immunosensor for highly sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 **Biochemical Engineering Journal Volume 156**, 15 April 2020, 107513
65. Guzel, R., Ustundag, Z., Eksi, H., Keskin, S., Taner, B., Durgun, Z. G., Isbir-Turan, A. A., Solak, A.O., (2010), Effect of Au and Au@Ag core-shell nanoparticles on the SERS of bridging organic molecules Effect of Au and Au@Ag core-shell nanoparticles on the SERS of bridging organic molecules **Journal of Colloid and Interface Science** 351 35–42

66. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, **Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, Sensors and Actuators, B4**, 239-304, (1983).
67. Bahadır E.B. & Sezgentürk M.K. A review on impedimetric biosensors, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, (2016) 44:1, 248-262
68. M. E. Orazem, B. 2008. Tribollet, *Electrochemical impedance spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA.
69. J. R. Macdonald, Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes, **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 223(1-2), 25-50, (1987).
70. Macdonald, J. R. (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steadystate AC response of solid and liquid electrolytes, **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 223, 25-50.
71. Rubinstein, I. 1995. *Physical electrochemistry Principles, Methods and Applications*, New York: CRC Press.
72. Barsoukov, E., Macdonald, J.R. (2005). *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, USA: John Wiley & Sons, Inc.
73. Durmaz T., Kanser teşhisine yönelik impedans temelli biyosensör geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Edirne 2016
74. Aydın U.D. Tiroid uyarıcı hormon tayini için impedans spektroskopisi temelli bir biyosensör geliştirilmesi, yüksek lisans tezi, Edirne-2019
75. Gupta, V. K., Yola, M. L., Atar, N., Üstündağ, Z., Solak, A. O., (2014), Electrochemical studies on graphene oxide-supported metallic and bimetallic nanoparticles for fuel cell applications **Journal of Molecular Liquids** 191 172–176
76. Rodriguez-Mozaz, S., et al., 2004. Biosensors for environmental applications: Future development trends, **Pure Appl. Chem.**, 76 (4): 723–752. (113)
77. Lin, T.Y., Hu, C.H., Chou, T.C., (2004). Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor, **Biosensors and Bioelectronics**, 20, 75-81. (73)
78. Lucarelli, F., Marazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascici, M., (2002). Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E,

Anal. Chim. Acta, **469**: 93-99.

79. Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M., (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, **56**: 949-957.
80. Marazza, G., Chianella, I., Macsini, M., Anichini, M., (2000). Detection of human apolipoprotein E genotypes with DNA electrochemical biosensor coupled with PCR, *Clin. Chim.*, **46**: 31-37. (82)
81. Hall, E.A.H., 1990. Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, **Open University Press, İngiltere**; s.3-30.(47)
82. David A Armbruster, Terry Pry. 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. **The Clinical Biochemist Reviews** 29(1):49–52.
83. B. Magnusson and U. Örnemark (editors). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2014.
84. CS Ho, CWK Lam, MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, KF Ng, MWM Suen, HL Tai. 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews** **24**(1):3–12.
85. Burak, D. (2012). Anti-miyelin temelli protein tayini için impedimetrik immünosensör geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Ankara).
86. Sharma S. K., Sehgal N., Kumar A., 2003, Biomolecules for Development of Biosensor and their Applications, **Current Applied Physics**, **(3)**, 307-316.
87. sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm
88. Dinçkaya E. Biyosensörler. İzmir, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, 1999.
89. D'Souza SF. 2001. Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications. **Appl Biochem Biotech.** 96:225-38.
90. Rainina EI, Efremenco EN, Varfolomeyev SD, Simonian AL. The development of a new biosensor based on recombinant E. coli for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. *Biosens Bioelectron.* 1996; 11:991-1000.
91. McGlennen RC. 2001. Miniaturization technologies for molecular diagnostics. **Clin Chem.** 47:393-402.

92. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., and Reimhult, E. 2008. Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures. **Sensors 8**: 1400-1458.
93. Pavlickova, P., Schneider, E.M., and Hug, H.2004. Advances in recombinant antibody microarrays. **Clin. Chim. Acta**, **343**: 17-35.
94. Song, Y., Wang, L., et all. 2006. A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized in DNA films on a gold electrode. **Sens. Actuators B Chem**, **114**: 1001-1006.
95. Compton, S.R.G., and Hallaj, R. 2004. Glucose biosensor prepared by glucose oxidase encapsulated sol-gel and carbon-nanotube-modified basal plane pyrolytic graphite electrode. **Anal. Biochem**, **333**: 49-56.
96. O'Neill, R.D., Chang, S-C., Lowry, J.P., and McNeil, C.J. 2004. Comparisons of platinum, gold, palladium and glassy carbon as electrode materials in the design of biosensors for glutamate. **Biosensors and Bioelectronics**, **19**: 1521-1528.
97. Schrand, A.M., Rahman, M.F., et all. 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2**: 544-568.
98. Steckel, J.S., Snee, P., et all. 2006. Color-saturated gren-emitting QD-LEDs. **Angew. Chem. Int. Edn**, **45**: 5796-5800.
99. Peng, R., Zhang, W., et all. 2011. Magnetically switchable bioelectrocatalytic system based on ferrocene grafted iron oxide nanoparticles. **Langmuir 27**: 2910-2916.
100. Hyeon, T. 2003. Chemical synthesis of magnetic nanoprticles. **Chem. Commun**, 927-934.
101. Chou, S. W., Shau, Y.H., et all. 2010. In vitro and in vivo studies of FePt nanoparticles for dual modal CT/MRI molecular imaging. **J. Am. Chem. Soc. 132**: 13270-13278.
102. Shi, X., Wang, S.H., et all. 2008. Dendrimer-functionalized shell-crosslinked iron oxide nanoparticles for in vivo magnetic resonance imaging of tumors. **Adv. Mater 20**: 1671-1678.
103. Taboada, E., Solanas, R., et all. 2009. Supercritical-fluid-assisted one-pot synthesis of biocompatible core (γ -Fe₂O₃)/shell(SiO₂) nanoparticles as high relaxivity T₂-contrast agents for magnetic resonance imaging. **Adv.**

Funct. Mater, **19**: 2319-2324.

104. Gardimalla, H.M.R., Mandal, D., et al. 2005. Superparamagnetic nanoparticlesupported enzymatic resolution of racemic carboxylates. **Chem. Commun**, 4432-4434.
105. Thode, C. J., and Williams, M.E. 2009. Approaches to the biofunctionalization of spherical and anisotropic iron oxide nanomaterials, in *Magnetic Nanomaterials*, (ed. C.S.S.R. Kumar), **Wiley-VCH, Weinheim**, pp. 507-550.
106. Banica, F. G. 2012. *Chemical Sensor and Biosensors: Fundamentals and Applications*. **Wiley&Sons**, pp. 135-138.
107. Liébana, S., Brandão, D., Alegret, S., Pividori, M. I., 2014. Electrochemical immunosensors, genosensors and phagosensors for Salmonella detection, **Analytical Methods**, **6**: 8858-8873.
108. Hart, J. P., Wring, S. A., 1997. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, **16** (2): 89-103.
109. Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S., 2000. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **69** (1): 153-163.
110. Albareda-Sirvent, M., Merkoçi, A., Alegret, S., 2001. Thick-film biosensors for pesticides produced by screen-printing of graphite–epoxy composite and biocomposite pastes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **79** (1):48-57.
111. Moreno-Guzmán, M., González-Cortés, M. A., Yáñez-Sedeno, P., Pingarrón, J. M., 2011. A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles. **Analytica Chimica Acta**, **692** (1-2): 125-30.
112. Taleat, Z., Khoshroo, A., Ardakani, M. M., 2014. Screen-printed electrodes for biosensing: a review. **Microchimica Acta**, **181**: 865–891.
113. Malhotra, B. D., Chaubey, A., 2003. Biosensor for clinical diagnostics industry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **91**: 117-127.
114. Otlu, B., 2011. Biyosensörler: biyoreseptör moleküller. 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11). 16-18 Mayıs, **Bildiriler Kitabı** Sayfa: 5-7.

115. Sunal K.S., Romatoid Artrit’li Hastalarda Osteolitik ve Antiosteolitik Etkiye Neden Olan Ç Çeşitli Faktörlerin Araştırılması , Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri, 2012.
116. Tarbiyotek Agricultural Geneworks, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa), <http://tarbiyotek.blogspot.com.tr/2015/08/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa.html>
117. Abbas, K., Lichtman, A., Pober, J., 2011. Quantitation of Antigen. In: Cellular and Molecular Immunology, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 560p.
118. Sunal K.S., Romatoid Artrit’li Hastalarda Osteolitik ve Antiosteolitik Etkiye Neden Olan Ç Çeşitli Faktörlerin Araştırılması , Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri, 2012.
119. Altintas Z, Tothill I. 2013. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer. **Sensors and Actuators B: Chemical. 188**:988–998.
120. Del Sol A, Balling R, Hood L, et al. 2010. Diseases as network perturbations. **Curr Opin Biotechnol. 21**(4):566–571.
121. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin 57**: 43–66.
122. Carpelan Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, et al. 2002. CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. **Anticancer Res. 2**(4):2311–2316.
123. J. L. Harris, M. Stocum, L. Roberts, C. Jiang, J. Lin, and K. Sprott, *Drug Development Research* **74**, 138 (2013).
124. I. J. Majewski and R. Bernards, **Nat. Med. 17**, 304 (2011).
125. Dallas Na, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray Mj, Lim Sj, Ellis Lm. (2008). Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. **Clin Cancer Res, 14**: 1931–1937.
126. Burrows Fj, Derbyshire Ej, Tazzari Pl, Amlot P, Gazdar Af, King Sw, Letarte M, Vitetta Es And Thorpe Pe 1995. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. **Clin Cancer Res, 1**: 1623-1634.

127. Paauwe M, Ten Dijke P, Hawinkels Lj 2013. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets**, **17**: 421–435.
128. She X, Matsuno F, Harada N, Tsai H, Seon Bk 2004. Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endo-thelial cells. **Int J Cancer**, **108**(2): 251–257.
129. Shan Q, Dwyer M, Rahman S, Gadjeva M 2014. Distinct susceptibilities of corneal *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to neutrophil extracellular trap-mediated immunity. **Infect Immun**, **82**: 4135–4143.
130. Welch, D.R.; Rinker-Schaeffer, C.W. 1999. What defines a useful marker of metastasis in human cancer. **J. Nat. Cancer Inst. (Bethesda)** **91**, 1351–1353.
131. Ree, A.H.; Tvermyr, M.; Engebraaten, O.; Rooman, M.; Rosok, O.; Hovig, E.; Meza-Zepeda, L.A.; Bruland, O.S.; Fodstad, O. 1999. Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. **Cancer Res.** **59**, 4675–4680.
132. Norihiko, T.; Rika, K.; Akinao, H.; Masahiro, T.; Yuro, H.; Hilda, T.; Ben, K.S. 2001. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum Endoglin. **Clin. Cancer Res.** **7**, 524–532.
133. Myśliwiec P, Pawlak K, Kukliński A, Kedra B. 2008. Combined perioperative plasma endoglin and VEG F-A assessment in colorectal cancer patients. **Folia Histochem Cytobiol.** **46**: 487–92.
134. E. Duff, C. Li, J.M. Garland, S. Kumar, 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications, **FASEB. J.** **17**; 984e992.
135. F. Nassiri, M.D. Cusimano, B.W. Scheithauer, F. Rotondo, A. Fazio, G.M. Yousef, L.V. Syro, K. Kovacs, R.V. 2011. Lloyd, Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy, **Anticancer Res.** **31**; 2283e2290
136. Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, et al. 1995. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. **J Immunol.** **154**:4456–65.
137. LI J, Zhang YP, Kirsner RS 2003. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech**, **60**: 107–

- 114.
- 138.Takase Y, Kai K, Masuda M, Akashi M, Tokunaga O 2010. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer. **Pathol Res Pract**, **206**: 725-730.
- 139.Fujita K, Ewing Cm, Chan Dys, Mangold La, Partin Aw, Isaacs Wb, Pavlovich CP 2009. Endoglin (CD105) as a Urinary and Serum Marker of Prostate Cancer **Int J Cancer**, **124(3)**: 664–669.
- 140.Markowitz Sd, Bertagnolli Mm (2009). Molecular Origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. **N Engl J Med**, **361**: 2449–2460.
- 141.Sachan R., Patel M.L., Dhiman S., Gupta P., Sachan P., Shyam R., Diagnostic and prognostic significance of serum soluble endoglin levels in preeclampsia and eclampsia November 18, 2019, IP: 193.255.88.134
- 142.Litwiniuk M., Niemczyk K., Bielińska J., Grzela t., 2017. Soluble Endoglin (CD105) Serum as a Potential Marker in the Management of Head and Neck Paragangliomas *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* Vol. **126(10)** 717–721 © The Author(s) 2017
143. Karam J., Svatek R., Karakiewicz P., Gallina A., Roehrborn C., Slawin K., Shariat S., 2017. Use of Preoperative Plasma Endoglin for Prediction of Lymph Node Metastasis in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer May 1, © 2008 American Association for Cancer
- 144.Karam J., Svatek R., Karakiewicz P., Gallina A., Roehrborn C., Slawin K., Shariat S., 2017. Use of Preoperative Plasma Endoglin for Prediction of Lymph Node Metastasis in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer May 1, © 2008 American Association for Cancer
- 145.Coral P.X., Garces M.F., Caminos J.E., Gamarra A.I., Restrepo J.F., Quintana G. SerumEndoglin Levels in Patients Suffering fromSystemic Sclerosis and Elevated Systolic Pulmonary Arterial Pressure Hindawi Publishing Corporation International Journal of Rheumatology Volume 2010, Article ID 969383, 6 pages doi:10.1155/2010/969383
- 146.Bilir B., 2006. Diyabetik Periferik Nöropatisi Olan Hastalarda Anjiogenez İle Endotel Disfonksiyonun; Endocan, Apelin Ve Endoglin Üzerinden Değerlendirilmesi, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi(Nkübp) Bilimsel Araştırma Projesi.

- 147.Özşener G., 2019. Kolorektal Kanser Hastalarında Endoglin Düzeyleri İle Enflamatuvar Mikroçevre İlişkisinin Araştırılması, Disiplinlerarası Klinik Eczacılık Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara
- 148.Takase Y., Kai K., Masuda M., Akashi M., Tokunaga O., 2010. Endoglin (CD105) expression and angiogenesis status in small cell lung cancer, **Pathology – Research and Practice** 206; 725–730
- 149.Kopczyńska E., Dancewicz M., Kowalewski J., Makarewicz R., Kardymowicz H., Kaczmarczyk A., Tyrakowski T., 2012. Influence Of Surgical Resection On Plasma Endoglin (Cd105) Level In Non-Small Cell Lung Cancer Patients , experimental oncology.
- 150.Nikolaos, A.D.; Shaija, S.; Ling, X.; Fan, F.; Michael, J.G.; Sherry, J.L.; Lee, 2008. M.E. Endoglin (CD105): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy. **Clin. Cancer Res.** **14**, 1931–1937.
- 151.Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. 2011. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol Adv.** **30**:489–511.
- 152.Justino, C.I.L., Rocha-Santos, T.A.P., and Duarte, A.C. 2013. Strategies for enhancing the analytical performance of nanomaterial-based sensors. **Trends Anal. Chem.** **47**: 27-36.
- 153.Justino, C.I.L., Rocha-Santos, T.A.P., and Duarte, A.C. 2010. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **Trends Anal. Chem.** **29**: 1172-1183.
- 154.Fanjul-Bolado, P., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2005). Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. **Analytical and Bioanalytical chemistry**, **382**(2), 297-302.
- 155.Rahman, M. A., Son, J. I., Won, M. S., & Shim, Y. B. 2009. Gold nanoparticles doped conducting polymer nanorod electrodes: ferrocene catalyzed aptamerbased thrombin immunosensor. **Analytical chemistry**, **81**(16), 6604-6611.
- 156.Ho, H. K., Pok, S., Streit, S., Ruhe, J. E., Hart, S., Lim, K. S., ... & Ullrich, A. 2009. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, antiapoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. **Journal of hepatology**, **50**(1), 118-127.

157. Gamero, M., Pariente, F., Lorenzo, E., & Alonso, C. 2010. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, **25**(9), 2038-2044.
158. Justino, C.I.L., Rocha-Santos, T.A.P., and Duarte, A.C. 2013. Strategies for enhancing the analytical performance of nanomaterial-based sensors. **Trends Anal. Chem**, **47**: 27-36.
159. Justino, C.I.L., Rocha-Santos, T.A.P., and Duarte, A.C. 2010. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **Trends Anal. Chem**, **29**: 1172-1183.
160. Rocha-Santos, T.A.P. 2014. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **Trends Anal. Chem**, **62**: 28-36.
161. Y. Lin, Q. Zhou, Y. Lin, D. Tang, R. Niessner, D. Knopp, Enzymatic hydrolysate-induced displacement reaction with multifunctional silica beads doped with horseradish peroxidase-thionine conjugate for ultrasensitive electrochemical immunoassay, *Anal. Chem.* **87** (2015) 8531–8540
162. N. Reta, C.P. Saint, A. Michelmore, B. Prieto-Simon, N.H. Voelcker, 2018. Nanostructured electrochemical biosensors for label-free detection of water- and food-borne pathogens, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**; 6055–6072
163. W. Dou, W. Tang, G. Zhao, 2013. A disposable electrochemical immunosensor arrays using 4-channel screen-printed carbon electrode for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Enterobacter sakazakii*, *Electrochim. Acta* **97**; 79–85.
164. J. Kim, H. Cho, S.-I. Han, K.-H. Han, 2016. Single-cell isolation of circulating tumor cells from whole blood by lateral magnetophoretic microseparation and microfluidic dispensing, *Anal. Chem.* **88**; 4857–4863.
165. S. Gupta, P.K. Kilpatrick, E. Melvin, O.D. Velev, 2012. On-chip latex agglutination immunoassay readout by electrochemical impedance spectroscopy, *Lab Chip* **12**; 4279–4286.
166. Jenkins, D. M., & Delwiche, M. J. 2002. Manometric biosensor for on-line measurement of milk urea. **Biosensors and Bioelectronics**, **17**(6-7), 557-563.
167. Marcus, R. A., & Sutin, N. 1985. Electron transfers in chemistry and biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics**, **811**(3),

265-322.

168. G. Tsekenis, G.-Z. Garifallou, F. Davis, P.A. Millner, D.G. Pinacho, F. Sanchez-Baeza, M.-P. Marco, T.D. Gibson, S.P.J. Higson, 2008. Detection of fluoroquinolone antibiotics in milk via a labelless immunoassay based upon an alternating current impedance protocol, **Anal. Chem.** **80**; 9233–9239
169. Hou L, Cui Y, Xu M, Gao Z, Huang J, Tang D. 2013. Graphene oxide-labeled sandwich-type impedimetric immunoassay with sensitive enhancement based on enzymatic 4-chloro-1-naphthol oxidation. **Biosens Bioelectron.** **47**:149–156.
170. Saum, A.G. E., Cumming, R. H., and Rowell, F. J.: 1998. Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity. **Biosens. Bioelectron.**, **13**, 511–518.
171. Ma, J., Chu, Y. M., Di, J., Liu, S. C., Li, H. N., Feng, J., and Ci, Y. X.: 1999. An electrochemical impedance immunoanalytical method for detecting immunological interaction of human mammary tumor associated glycoprotein and its monoclonal antibody. **Electrochem. Commun.**, **1**, 425–428.
172. Belluzo, M.S., Ribone, M.É. and Lagier, C.M., 2008, Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics, **Sensors**, **8**, 1367.
173. Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., Kubota, L. T., 2003. Direct electrontransfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **14** (2):230-243.
174. Balza E, Castellani P, Zijlstra A ve ark. 2001. Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels. **Int J Cancer**, **94**: 579-85,
175. Li, C., Garland, J. M., and Kumar, S.. 2001. Role of transforming growth factor signalling in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**; **93**, 555–556
176. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **299**: H959-H974.
177. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **FASEB J** **17**:984-92
178. Blann, A.D., Wang, J.M., Wilson, P.B., and Kumar, S. 1996. Serum levels of the TGFbeta receptor are increased in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, **120**(1-

2), 221-6.

179. Paola Ximena Coral Alvarado Maria Fernanda Garces, 2010. Jorge Eduardo Caminos, Antonio Iglesias-Gamarra, Jos'E F'Elix Restrepo, And Gerardo Quintana, Serum Endoglin Levels In Patients Suffering Fromsystemic Sclerosis And Elevated Systolic Pulmonary Arterial Pressure Hindawi Publishing Corporation International Journal Of Rheumatology Volume Article ID 969383, 6 Pages
180. Rekha Sachan, Munna Lal Patel, Soniya Dhiman, Pooja Gupta, Pushplata Sachan, 2019. Radhey Shyam Diagnostic and prognostic significance of serum soluble endoglin levels in preeclampsia and eclampsia <http://www.advbiores.net> on Monday, **November 18, IP: 193.255.88.134]**
181. Rebeca M Torrente-Rodríguez , Susana Campuzano , Víctor Ruiz-Valdepeñas-Montiel , María Pedrero , M Jesús Fernández-Aceñero , Rodrigo Barderas 2016. José M Pingarrón Rapid Endoglin Determination In Serum Samples Using An Amperometric Magneto-Actuated Disposable Immunosensing Platform **J Pharm Biomed Anal. Sep 10;129:288-293**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Kazım Serkan SUNAL

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 25 Nisan 1988, Ankara

Medeni Durumu: Evli

email: kasesu_1988@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Strateji Geliştirme Dairesi Başkanlığı 38039
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya	2013
Lisans	SÜ Eğitim Fakültesi	2010
Lise	Prof. Dr. Ş.R. Hatipoğlu Lisesi, Ankara	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2010- Halen	Milli Eğitim Bakanlığı	Biyoloji Öğretmeni

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Sunal K.S., Romatoid Artrit’li Hastalarda Osteolitik ve Antiosteolitik Etkiye Neden Olan Ç Çeşitli Faktörlerin Araştırılması , Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri, 2012.