

**MELANOMA ANTJEN-1'İN HASSAS ve EKONOMİK  
TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL  
BİR BİYOSENSÖR**

**Ash GÜNDOĞDU**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK**

**2015**

**T.C.**

**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MELANOMA ANTİJEN-1'İN HASSAS ve EKONOMİK TAYİNİ İÇİN  
ELEKTROKİMYASAL BİR BİYOSENSÖR**

**ASLI GÜNDOĞDU**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK**

**TEKİRDAĞ-2015**

**Her hakkı saklıdır**

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Aslı GÜNDOĞDU tarafından hazırlanan ‘Melanoma antijen-1’in hassas ve ekonomik tayini için elektrokimyasal bir biyosensör’ isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK *İmza :*

Üye : Prof. Dr. Yusuf DİLGİN *İmza :*

Üye : Yrd. Doç. İbrahim İsmet ÖZTÜRK *İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MELANOMA ANTİJEN-1'İN HASSAS ve EKONOMİK TAYİNİ İÇİN  
ELEKTROKİMYASAL BİR BİYOSENSÖR

**Ash GÜNDOĞDU**

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Bu tez çalışmasında, kanserde erken teşhis için hedeflenen tek kullanımlık anti-MAGE-1 bazlı, MAGE-1 kanser antijeninin konsantrasyonunu belirleyen yeni bir biyosensör geliştirildi. Bunun için, tek kullanımlık İndiyum Tin Oksit (ITO) Pet elektrot yüzeyine karboksietilsilanetriol ile kendiliğinden oluşan mono tabaka (SAM) oluşturuldu ve ardından EDC-NHS muamele edilerek karboksietilsilanetriol tabakasındaki karboksil uçları aktif hale getirildi. Böylece anti-MAGE-1'in elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanması sağlandı. Döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve MAGE-1'in elektrot yüzeyine bağlanması incelendi. Biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-MAGE-1, MAGE-1, kanser biyomarkerları, biyosensör, tek kullanımlık biyosensör sistemleri, ITO-Pet elektrot

**2015, 55 sayfa**

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

### MELANOMA ANTİGEN-1 DETERMINATION OF PRECISION and ECONOMIC FOR ELECTROCHEMICAL BİOSENSOR

**Ash GÜNDOĞDU**

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

In this study, we described a novel biosensor to detect MAGE-1 biomarker constructed on modified Indium Tin Oxide (ITO) disposable electrodes. Anti-MAGE1 was immobilized through covalent with carboxyethylsilane etriol which formed a self-assembled monolayers (SAMs) on modified ITO electrodes. The activation of COOH group was carried out using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) couple. Cyclic voltammetry (CV,) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques were employed to characterize the immobilization process and to detect MAGE-1. To achieve reproducible and repeatable biosensor system, all parameters were optimized.

**Keywords:** anti-MAGE-1, MAGE-1, cancer biomarkers, biosensor, disposable biosensor systems, ITO-Pet electrode

**2015, 55 pages**

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
2.1 Kanser.....	3
2.1.1 Kanser Tedavisi ve Kanserde Erken Teşhisin Önemi .....	4
2.2 Kanser Biyomarkerları .....	5
2.3 Melanoma Kanser Antijeni- 1 (MAGE-1).....	6
2.3.1 MAGE gen ailesi ve MAGE-1 geni .....	6
2.4 Biyosensörler.....	8
2.4.1 Biyosensör Yapısı.....	9
2.4.2 İmpedans spektroskopisinin biyosensör sistemlerinde kullanımı .....	13
2.4.3 Döngüsel voltametrimin biyosensör sistemlerinde kullanımı .....	14
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>15</b>
3.1 Materyal.....	15
3.1.1 OH tabakası için karışım hazırlanması.....	15
3.1.2 Kendiliğinden oluşan monotabaka (SAM) için karboksietilsilanetriol sodyum tuzu(CTES) çözeltisinin hazırlanması .....	15
3.1.3 EDC-NHS çözeltisinin hazırlanması .....	16
3.1.4 Elektrokimyasal ölçümler .....	16
3.1.5 Ölçüm prosedürleri .....	16
3.2 Yöntem .....	17
3.2.1 İmmobilizasyon basamakları .....	17
3.2.2 Optimizasyon basamakları .....	19
3.2.3 Geliştirilen biyosensör için ideal tayin aralığı belirlenmesi .....	20
3.2.4 İdeal tayin aralığının SWV ölçümleri.....	20

3.2.5 Tekrarlanabilirlik .....	20
3.2.6 Tekrar üretilebilirlik .....	20
3.2.7 Geliştirilen biyosensörün depo ömrü.....	21
3.2.8 Rejenerasyon .....	21
3.2.9 Sabit frekansta MAGE-1'in bağlanması .....	21
3.2.10 Gerçek serum örneklerinden MAGE-1 tayini .....	22
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>23</b>
4.1 İmmobilizasyon Basamaklarının Bulguları .....	23
4.2 Optimizasyon Basamaklarının Bulguları.....	24
4.2.1 CTES miktar optimizasyon bulguları .....	24
4.2.2 AntiMAGE miktar optimizasyon bulguları .....	27
4.2.3 AntiMAGE süre optimizasyon bulguları.....	29
4.3.4 MAGE-1 inkübasyon süre optimizasyon bulguları .....	32
4. 2 Tayin Aralığı Bulguları .....	35
4.3 Karedalga Voltametri ile Ölçüm Bulguları.....	37
4.4 Tayin Aralığının CV Sonuçları İle Hesaplanması.....	38
4.5 Tekrarlanabilirlik Bulguları .....	39
4.6 Tekrar Üretilebilirlik Bulguları .....	40
4.7 Geliştirilen Biyosensörün Depo Ömrü Bulguları .....	42
4.8 Rejenerasyon Bulguları .....	43
4.9 Sabit Frekans İle Ölçüm Bulgular .....	44
4.10 İmmobilizasyon ve Bağlanmış MAGE-1'in SEM Görüntüleri.....	45
4.12 Gerçek Serum Örnekleri ile Çalışmaların Bulguları .....	47
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>55</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı antikör bazlı kanser biyomarkerlarına ve kullanılma amaçlarına örnekler.....	6
Çizelge 3. 1 İmmobilizasyon basamakları.....	18
Çizelge 4.1 Farklı CTES miktarı ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	26
Çizelge 4.2 Farklı antiMAGE-1 konsantrasyonları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	28
Çizelge 4.3 Farklı antiMAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları.....	30
Çizelge 4.4 Farklı MAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri sonuçları.....	33
Çizelge 4.5 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğri değerleri.....	41
Çizelge 4.6 AntiMAGE 1 temelli biyosensörün farklı aşamalarında Kramers-Kronig transformu .....	45
Çizelge 4.7 Geliştirilen biyosensör ile, 10 sağlıklı bireyin kan serumunda, MAGE-1 miktar tayininden elde edilen, MAGE-1 konsantrasyon (pg/mL) sonuçları.....	46



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1 Basit bir biyosensörün çalışma mekanizması.....	10
Şekil 2.2 Transduserların, algıladıkları değişimlere göre sınıflandırması.....	11
Şekil 4. 1 Şematik olarak ITO-Pet elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen işlemler.....	23
Şekil 4. 2 İmmobilizasyon adımlarına ait EIS (A) ve CV (B) eğrileri.....	24
Şekil 4.3 Farklı CTES miktarları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri.....	25
Şekil 4.4 %0,5'lik CTES ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS (A) ve CV (B) ölçümleri.....	26
Şekil 4.5 Farklı antiMAGE-1 konsantrasyonları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri.....	27
Şekil 4.6 5,5ng/mL antiMAGE-1 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS (A) ve CV (B) ölçümleri.....	29
Şekil 4.7 Farklı antiMAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri.....	30
Şekil 4.8 30 dakika antiMAGE-1 ile hazırlanan farklı ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS (A) ve CV (B) ölçümleri...	31
Şekil 4.9 Farklı MAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri.....	32
Şekil 4.10 45 dakika MAGE-1 ile hazırlanan farklı ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS ölçümleri (A) ve CV ölçümleri (B).....	34
Şekil 4.11 Optimum koşullar altında belirlenen tayin aralığı standart grafiği.....	36
Şekil 4.12 Belirlenen tayin aralığının EIS ile ölçümleri.....	36
Şekil 4.13 SWV sonuçlarından elde edilen standart grafik.....	37
Şekil 4.14 Belirlenen tayin aralığının SWV ile ölçümleri.....	38
Şekil 4.15 CV ölçümlerine dayalı anodik ve katodik değerlerin standart grafikleri.....	39
Şekil 4.16 Belirlenen ideal tayin aralığının CV ile ölçümleri.....	39
Şekil 4.17 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğrileri.....	41
Şekil 4.18 Haftalık depo ömrü sonuçları.....	43
Şekil 4.19 Rejenerasyon çalışmasının sonuçlarının grafikteki görünümü.....	44
Şekil 4.20 Sabit frekansta biyosensör yüzeyine MAGE-1 bağlanışının ölçümleri: mavi; sabit frekans ölçümü, kırmızı; faz açısı ölçümü. ....	44
Şekil 4. 21 SEM cihazı ile biyosensörün yüzeyinin görüntüleri.....	46
Şekil 4.22 Tasarlanan biyosensörün Kramers-Kronig sonuçları.....	47

## KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovine albümin serum
CTES	: Karboksietilsilanetriol sodyum tuzu
CV	: Döngüsel voltametri
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EIS	: İmpedans spektroskopisi
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$	: Ferri-Ferrosiyonür çözeltisi
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen peroksit
ITO-Pet	: İndiyum tin oksit polietilen elektrot
MAGE-1	: Melanoma kanser antijeni-A1
$\text{NH}_4\text{OH}$	: Amonyum hidroksit
NHS	: N-hidroksi süksinimid
SAM	: Kendiliğinden oluşan monotabaka
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SWV	: Karedalga voltametrisi

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım ve tez hazırlama sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Maddi manevi her türlü desteęi hiçbir zaman benden esirgemeyen, mutluluęumun ve gururumun sebebi sevgili aileme,

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen arkadaşım Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu araştırma kapsamında kullanılan tüm kimyasal, cihaz ve donanım, **113Z678** numaralı TÜBİTAK projesi tarafından sağlanmıştır. Katkılarından dolayı TÜBİTAK'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

## 1. GİRİŞ

Kanser çağımızın önemli hastalıklarının başında gelmektedir. Gittikçe çoğalan kanser hastası sayısı, bilim insanlarının bu hastalığa yönelik çalışmalarını arttırmıştır.

Kanser; hücre yapılarının mutasyona uğraması ve anormal şekilde kontrolsüz olarak çoğalmasıdır. Kanser hastalıklarının büyük bir kısmı çevresel faktörlerinden meydana gelmekte ve aynı zamanda kalıtım yoluyla da meydana gelebilmektedir. Kanser belli bir bölge hastalığı olmayıp vücudumuzun her tarafında gelişebilen bir habis hastalık türüdür.

Dünyada her yıl 11 milyondan fazla insan kanser hastalığına yakalanmaktadır. 2020 yılında dünyadaki kanser hastası sayısının 16 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir. Ülkemizde ise her yıl yaklaşık 175 bin hastaya kanser teşhisi konulmaktadır. Dünya çapında 2015 yılında kanser sebepli ölümlerin sayısı 9 milyon olarak tahmin edilirken 2030 yılında bu sayının yaklaşık 12 milyona yükselmesi beklenmektedir (Cho 2007).

Kanserde erken teşhis de iyileşme oranı oldukça yüksek olmasından dolayı, bilim insanları kanserde erken teşhis üzerine çalışmalarını arttırmıştır. Bu çalışmalar arasında önemli yer edinen kanser biyomarkerlarına hastalık teşhisinde kliniksel olarak ihtiyaç çok fazladır. Bu nedenle bu yöndeki çalışmalar hızlandırılmış ve kanser biyomarkerlarına spesifik biyosensörler geliştirilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında; meme kanseri, akciğer kanseri, mesane kanseri, gastrit kanseri, mide kanseri, baş-boyun kanseri gibi birçok kanser hastalığında rastlanan melanoma-1 (MAGE-1) kanser antijeninin anormal konstrasyonunun belirlenmesi amaçlı tek kullanımlık elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, çalışma elektrodu ve transduser olarak indiyum tin oksit (ITO-pet) elektrodu kullanılmıştır. Elektrot yüzeyi ilk olarak temizleme aşamalarından geçmiştir ve daha sonra daha iletken bir yüzey için OH tabakası oluşturulmuştur. Kendiliğinden oluşan tabaka(SAM) karboksietilsilanetriol sodyum tuzu(CTES) ile gece boyu inkübe edilen ITO-Pet elektrot daha sonra EDC-NHS ile muamele edilerek SAM' deki karboksil uçları peptit bağı yapabilecek aktifliğe getirilmiştir. İmmobilizasyonu son adımı olarak anti-MAGE-1 ITO-pet yüzeyine peptit bağı ile kovalent olarak bağlanmıştır. Böylece MAGE-1 kanser antijenine özel tek kullanımlık elektrokimyasal biyosensör hazırlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir ve bu çalışma literatürde MAGE-1 için geliştirilen ilk biyosensör örneği olmuştur. Bu çalışma gelecek zaman için oldukça önem taşımaktadır. Eğer bu çalışma için gelecekteki hedefler gerçekleştirilebilirse insanlar artık kolaylıkla ve kendi kendilerine kanser testi uygulayabilecekler, kanser tedavisine geç kalınmayacak ve iyileşme oranları artıracığına inanılmaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Kanser

Hücre, vücudumuzun canlılık özelliği taşıyan en önemli yapı taşıdır. Tüm organ ve dokular hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler zaman içinde binlerce kez bölünüp çoğalırlar ve yaşlandıklarında arkalarında çok sayıda yeni hücre bırakarak ölürlər. Vücudumuzdaki hücreler biz farkında olmadan çok hızlı bir şekilde bu işlemleri sorunsuz bir şekilde gerçekleştirirler. Hücrelerin anormal gelişmesi ve kontrolsüz şekilde çoğalması kanser hastalığına sebep olur.

Hücreler DNA'ları gereği nerde, nasıl ve kaç kez bölünecekleri bilgisine sahiptirler. Hücrelerin DNA'larında oluşan mutasyonlar, hücrelerin bu bilgilerini kaybetmesine ve kontrolsüz şekilde büyüüp çoğalmasına neden olmaktadır. Böyle hücreler kanser hücresi olarak adlandırılmaktadır.

Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerden daha hızlı bölünüp çoğalma özelliklerine sahiptirler. Çok hızlı bölünerek tümör adı verilen yapıları oluşturarak vücuttaki dokulara zarar vermeye başlarlar. Kanser hücreleri vücudun herhangi bir bölgesinde olabilir. Vücudun herhangi bir bölgesinde oluşan kanser hastalığı vücudun farklı bölgelerine de yayılabilir. Kanser hücrelerinin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması işlemine metastaz (*yayılma*) adı verilir.

Aslında kanser hücrelerinde her insanda bulunmaktadır fakat vücudumuzdaki tamir sistemleri ve antikorlar sayesinde kanserli hücrelerin tümör oluşumu engellenir. Kanserli hücreler genellikle değişime uğramış genler sebebiyle normal olmayan proteinler oluşturur. Oluşan proteinler vücudun bağışıklık sistemini uyarır ve uyarılan bağışıklık sistemi vücutta antikor üreterek veya kanserli hücreye karşı duyarlılık kazanmış lenfositler oluşturarak kanserli hücrenin yok edilmesini sağlar.

Kanserli tümörler, buldukları dokulara, vücut kısımlarına ve mikroskopik görünümüne göre isimlendirilirler. Oluştukları bölgeye adlandırılmış çok sayıda kanser çeşidi bulunmaktadır, bunlar; kan kanseri, akciğer kanseri, deri kanseri, mide kanseri, baş-boyun kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, rahim ağzı kanseri gibi...

Kanser çeşitleri arasında en çok rastlanan türler; meme kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, kan kanseri, kalın bağırsak kanseri, rahim kanseri, mesane kanseri, deri kanseridir (**Özgür 2007**).

En son resmi verilere göre ülkemizde her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır. Aynı verilere dayanarak; ülkemizdeki

erkekler de en çok görülen kanser türü akciğer kanseri iken ülkemizdeki kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme kanseridir.

Kanser hastalığının en sık görüldüğü ülkeler, gelişmiş ve sanayileşmenin olduğu ülkelerdir (**Cho 2007**). Uluslararası kanser ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 2012 verilerine göre; Avrupa ülkelerindeki her 100 bin kişiden yaklaşık olarak 550'si kanser hastası iken Amerika da bu sayı 650 ye yükselmektedir. Aynı veriler göre ülkemizdeki her 100 bin kişiden 450'si kanser hastasıdır.

### **2.1.1 Kanser Tedavisi ve Kanserde Erken Teşhisin Önemi**

Kanser hastalığında en yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Daha az sıklıkla hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler kullanılır. Bu tedavi yöntemleri tek başına veya birlikte uygulanmaktadır. Genelde kanser hastalarına radyoterapi ve kemoterapi aynı anda uygulanmaktadır. Uygulanan tedavi yöntemlerinin hastalığın evresine bağlı olup, erken teşhislerde oldukça iyi sonuçlar göstermektedir.

Kanser hastalığının teşhisinde; manyetik rezonans görüntüleme (MRG), ultrason, doku örnekleme, tomografi gibi yöntemler günümüzde kullanılmaktadır. Fakat kanser türü değiştikçe teşhis yöntemleri de değişmektedir. Örneğin; meme kanseri teşhisinde mammogram testi uygulanırken, baş-boyun kanserinin net teşhisi MRG sonuçlarına bakılarak söylenmektedir. Bu farklılıklar nedeni ile maalesef erken teşhiste geç kalınma olasılığı artıyor. En yaygın bir şekilde kullanılan teşhis yöntemlerinin çoğu yüksek risk altındaki kişilerde sık görülen kanser biçimlerini bulacak şekilde tasarlanmıştır. Kanser tarama testleri pratik olmalıdır. Yapılan test, kanseri, tamamen iyileşme şansının hâlâ yüksek olacağı şekilde erken belirlemelidir. Ölçümlerin çok pahalı olması ve devlet hastanelerinin hasta yoğunluğu gibi nedenlerden dolayı insanlar hastalıklarını erken evrelerde anlayamamaktadırlar. Modern tıp dünyası bu durumu ortadan kaldırmak için çalışmaktadır. Çalışılan yöntemlerde başarılı olunursa basit bir kan serumu testi ile birçok kanser hastalığı anlaşılacaktır.

Erken teşhis birçok hastalıkta olduğu gibi kanserde de hayat kurtarmaktadır. Erken teşhisle kanser hastalığının %80 yenmek mümkündür. Bilim insanlarının kanser hastalığı üzerinde çalışmaları sadece tedaviye yönelik değil aynı zaman da erken teşhise yönelik çalışmalar vardır. Tıp dünyasındaki gelişmeler çok hızlı ilerlese de bu hastalık için henüz, basit, ucuz, tehlikesiz (sağlığa zarar vermeyen) teşhis yöntemleri yoktur.

## 2.2 Kanser Biyomarkerları

Kanser biyolojisi ve son on yılda meydana gelen moleküler teknolojideki hızlı değişimler olmasıyla kanser hakkında bilgi muazzam artış görülür, kanser biyomarker çalışmaları neredeyse günlük olarak yayınlanmaktadır. Çünkü hastalığın fazla olması bilim insanlarının bu konulardaki araştırmalarını arttırmış ve hastaların rutin kontrollerinde bu biyomarkerlar kullanılarak erken teşhis hedeflenmiştir (**Henry ve ark. 2012**).

Peki, biyomarker nedir? Ulusal Kanser Enstitüsü göre, bir biyomarker " normal veya anormal işleminin işareti ya da bir durum ya da hastalığın belirtici olarak kanda veya diğer vücut sıvıları ya da dokularda bulunan biyolojik bir moleküldür". Biyomarkerlar hastalıklı bir kişi ile sağlam kişi arasındaki değişikliği belirleyebilmektedir (**Henry ve ark. 2012**). Biyomarkerlar büyük çeşitlilik içerir; çoğu protein yapılıdır (örneğin; enzim, reseptör), diğer bir kategoride ise antikorlar ve peptitler bulunmaktadır. Biyomarkerlar; dolaşımda ( tam kan, serum, plazma vb.) kolayca tespit edilebilir, ayrıca salgılarda ( idrar, balgam, dışkı, meme ucu sıvısı gibi) non invaziv olarak tespit edilebilir ve ya dokularda ise özel görüntüleme yöntemleri ile de tespit edilebilmektedirler (**Henry ve ark. 2012**).

Kanser biyomarkerları: kanser teşhisi konulmuş hastaların iyileşme oranını tespitite, kanser riskini anlamakta ve birincil kanser teşhisin de kullanılan önemli kliniksel yöntemdir. Yüksek risk barındıran hastalarda kullanılan faydalı yöntemlerden biridir. Biyomarkerlar bireyin kansere yakalanma riskini tespitite de kullanılır. Örneğin, Easton ve ark., 1995 yaptıkları çalışmada, yumurtalık kanseriyle ilgili güçlü bir aile öyküsü olan bir kadının meme veya yumurtalık kanserine yakalanma riskini BRCA1 biyomarkerını kullanarak, bir taşıyıcı olup olmadığını belirlemek amaçlı genetik test uygulamışlardır.

Antikor bazlı kanser biyomarkerları (kanser proteomları); kanser hücreleriyle, kanser dokusu mikroçevresiyle, kanser hücresi konak ilişkileriyle doğrudan etkileşim halindedir ve belkide kanser hastalığının her süreci hakkında bilgiler içermektedir. Kanserini tanı ve kanserini önceden habercisi olarak hizmet veren bazı önemli kanser antijenleri tabloda özetlenmiştir.



<b>Kanser Antijeni Bazlı Biyomarkerlar</b>	<b>Tümör</b>	<b>Uygulama</b>	<b>Numune Türü/ Tespit Yöntemi</b>
Prostat Spesifik Antijen (PSA)	Prostat Kanseri	Tanı ve Prognostik (önceden hastalığın iyileşme oranını ölçme)	Serum / Immünoanaliz
Alfa-foetoprotein (AFP)	Hepatosellüler Karsinom	Tanı ve Prognostik	Serum / Immünoanaliz
BRCA-1, BRCA-2	Meme Kanseri	Tanı	Tümör Doku Örneği
Karsinoembriyonik Antijen (CEA)	Kolonektal Kanseri	Tanı ve Prognostik	Serum/ Elisa
İnsan Koryonik Gonadotropin (hCG)	Üreme Hücreli Tümörler (yumurtalık ve testis)	Tanı	Serum / Elisa

**Çizelge 2.1** Bazı antikor bazlı kanser biyomarkerlarına ve kullanılma amaçlarına örnekler (Henry ve ark. 2012)

## 2.3 Melanoma Kanser Antijeni- 1 (MAGE-1)

### 2.3.1 MAGE gen ailesi ve MAGE-1 geni

Proteinler, DNA üzerine bulunan şifreler esas alınarak vücutta üretilirler. DNA; tüm canlıların yaşam sırlarını içinde barındıran, yaşamın devamı için gerekli genetik bilgileri nesilden nesile aktarımını görev olarak üstlenmiş, nükleik asitlerden oluşmuş bir sarmaldır. Her canlı bir DNA'ya sahiptir. DNA üzerinde bulunan genlerin birçoğunun anlamı çözülmüş olmasına rağmen hala çözümlenememiş genler de vardır. Bu genler veya gen aileleri birçok proteinin oluşum şifrelerini taşımaktadır. mRNA'ya kopyalanan genetik şifre protein sentezinde, proteinleri oluşturan aminoasitlerin diziliş şeklini belirlemektedirler. Dolayısıyla her protein kendine özgü aminoasit dizilimine ve genetik şifreye sahiptir.

Proteinler, hücre organellerini, hücreleri, dokuları, organları oluştururlar, kısaca canlıların bütününe ortaya çıkarırlar. Her hücre ne tür protein oluşturacağı hücre DNA'sından dolayı bilmektedir. Dolayısıyla her protein farklı amaçta kullanılmaktadır.

MAGE de DNA üzerindeki gen ailelerinden birisidir (**Smet ve ark. 1996**). İlk olarak 1991 yılında Van der Bruggen tarafından keşfedilmiştir (**Barker ve ark. 2002**) ve ilerleyen yıllarda MAGE'nin 60 genden oluşan bir gen ailesi olduğu saptanmıştır (**Sanga ve ark. 2011**). Bu gen ailesi 12 alt aileye ayrılır: MAGE-A...MAGE-L (**Smet ve ark. 1996**).

MAGE geni X kromozomunda bulunan bir gen ailesidir (**Ladelfa ve ark. 2012**). MAGE genleri 309-369 aminoasitten oluşan 12'den fazla homolog proteinler oluşturabilirler (**Weber ve ark. 1994**).

MAGE-1(melanoma antijeni kodlayan gen-1) geni, MAGE-A gen alt ailesinin 12 üyesinden bir tanesidir (**Wischnewski ve ark. 2006**). MAGE-1 geni 1991 yılında Thierry Boon ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. İlk olarak MAGE-1 olarak adlandırılmış, fakat daha sonra MAGE-A ailesine ait olduğu bulununca MAGE-A1 olarak adlandırılmıştır (**Sanga ve ark. 2011**).

MAGE-A gen ailesi X kromozomunda yer alır, MAGE-1 geni ise Xq28 de yer alır (**Simpson ve ark. 2005**). MAGE-1 transkripsiyonel ifadesi esas olarak epigenetik (irsi gen ifadesi değişimi) olay olarak düzenlenir (**Wischnewski ve ark. 2006**).

### 2.2.1.2 MAGE Proteinleri ve MAGE-1 Proteini

MAGE genlerinin kodladığı proteinler tümör habercisi olmasına rağmen, testis ve bazı plasenta normal dokularında da bulunduğu tespit edilmiştir. Melanoma antijeni: meme kanseri, akciğer kanseri, mesane kanseri, gastrit kanseri gibi çeşitli tümörlerde antijen görevi almaktadır (**Wischnewski ve ark. 2006**). MAGE proteini, hastada kendiliğinden sitotoksik T lenfosit(kanser hücrelerini yok eden akyuvar hücresi) tepkisi oluşmasını sağlar (**Sanga ve ark. 2011**).

MAGE-1 proteini 250-267 aminoasit, 257-273 aminoasitten oluşabilir. Molekül kütlesi 45 kilodaltondur (**Rimoldi ve ark. 2000**).

MAGE-1 proteini, 45 tümör çeşidinde araştırılmış ve 18 tümörden pozitif sonuç alınmıştır: baş-boyun kanseri, mide kanseri gibi çeşitli kanser tümör dokuları buna örneklerdir (**Ogata ve ark. 2011**).

MAGE-1, histon ve DNA metilasyon durumuna oldukça son derece duyarlıdır; bu nedenle, DNA metilasyonunu baskılayarak kanser hücrelerinin artımını engeller (**Ladelfa ve ark. 2012**).

MAGE-1 proteini, Ets ve Sp1 transkripsiyon faktörleri için bağlanma yerleri içerir ve bu özelliğiyle DNA metilasyonunu baskılar (**Wischnewski ve ark. 2006**).

MAGE-A antijenleri immunoterapide en çok kullanılan proteinlerdir. Bunun yanı sıra bu antijenler tıpta tümör markeri olarak kullanılmaktadır (**Wischnewski ve ark. 2006**). Günümüzde MAGE-1 antijeni, onkoloji alanında tümör spesifik model sentezlemede son derece cazip bir antijendir. Belirlenemeyen tümör kitlesinin tanımlanmasında MAGE-1 proteini kullanılmaktadır. MAGE-1 proteini prognoz (tıpta, hastanın iyileşme oranını ölçme) markeri olarak kullanılmaktadır (**Ladelfa ve ark. 2012**).

MAGE-1 transkripsiyonel ifadesi esas olarak epigenetik (irsi gen ifadesi değişimi) olay olarak düzenlenir (**Wischnewski ve ark. 2006**). MAGE-1 proteininin her tümördeki işlevi aydınlatılmadığından yeterli bilgiye sahip olunamamış ve bu da çalışmalara olumsuz bir engel olmuştur (**Smet ve ark. 2004**).

MAGE-1 proteini ilgili olarak, Juhong Jiang ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada MAGE-1 ve HSp 70 proteini kullanılarak kanser hastalığına karşı aşı gelişmesi hedef alınmıştır (**Jiang ve ark. 2013**). Diğer bir çalışma ise 2014 yılında Sayeema Daudi ve arkadaşları MAGE proteininin, bağışık sistemindeki önemini ve yumurtalık kanserindeki prognostik önemini ortaya çıkarmak hedeflenmiştir (**Karbach ve ark. 2014**). Literatürde, MAGE-1 ve MAGE proteinleri ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen MAGE-1 antijenine özel bir biyosensör çalışması bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması ile beraber laboratuvarımızda MAGE-1 proteinine özel biyosensör geliştirilmesi için çalışılan toplam üç çalışma bulunmaktadır. Eğer çalışmalarda istenilen hedefler tutturulabilirse literatüre, MAGE-1 proteine spesifik ilk biyosensör olarak girmeye hak kazanacaklardır.

## 2.4 Biyosensörler

Biyosensörler; biyolojik analizlerde kullanılan 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 cihazlar" olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda mikroelektronik alanındaki gelişmeler, biyolojik moleküllerin mükemmel duyarlılıktaki yanıt verme olasılıklarının keşfedilmesi, biyosensör teknolojilerinin hızlı gelişmesini sağlamıştır. Bu gelişmelerin sonucunda; tıp, eczacılık, gıda güvenliği, çevre kirliliği gibi birçok alanda kullanılan farklı çeşitlerde biyosensörler geliştirilmiştir (**Rasooly 2005**).

Biyosensörler tarihte ilk olarak 1950’li yılların ortasında L.C. Clark’ın Cincinnati Hastanesi’nde (Ohio, ABD ) ameliyat sırasında kanın oksijen miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamıştır. 1962 yılında Clark ve Lyons, Glukozoksidaz (GOD) enzimini O<sub>2</sub> elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşturularak biyosensör biliminin temeli atmışlardır. kurdukları sistem bir yanıyla biyolojik yapının yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel yapının (elektrot) tayin duyarlılığını bir araya getirmiş ve geniş bir uygulama olanağı oluşturmuştur ( **Bulut 2011**).

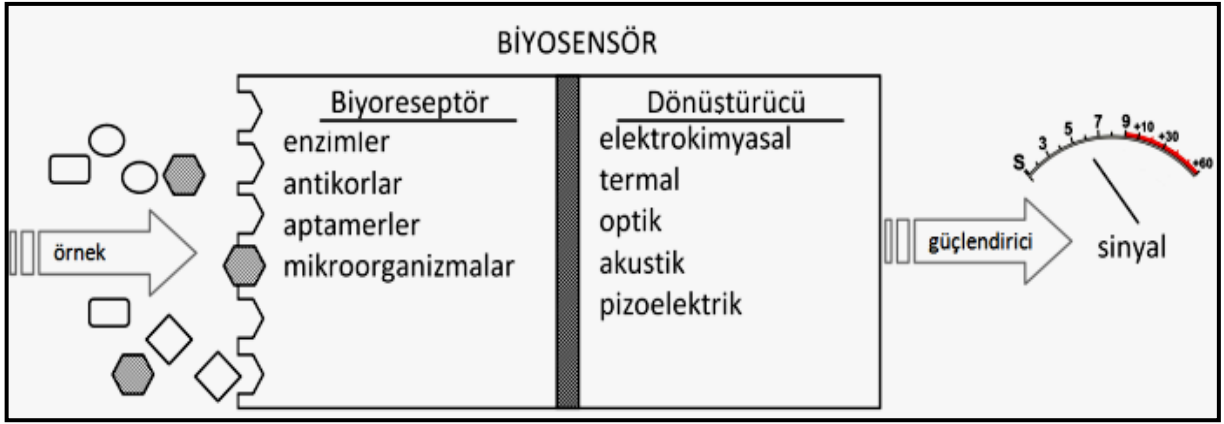
Sağlık alanında biyosensörler, kandaki şeker, üre gibi moleküllerin ya da ilaç düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilen, vücuda yerleştirilebilecek kadar küçük olan kan şekeri biyosensörleri sayesinde kan şekerini sürekli ve hassas bir şekilde ölçmek mümkün olmuştur (**Şenel 2013**).

Biyosensörler hava ve sudaki zehirli maddelerin tayinlerinde de oldukça sık kullanılmaktadır. Sağlığa zararlı moleküler yapılar çok düşük yoğunlukta olsalar bile çeşitli biyosensörler sayesinde algılanabilmektedir. Biyolojik silah olarak kullanılan zehirli gazların, bakteri ya da virüslerin saptanmasında çeşitli biyosensörler etkilidir. Biyosensörler gıdaların içeriğinde yer alan moleküllerin tanımlanmasında da kullanılıyor (**Şenel 2013**).

Biyosensörlerin son yıllardaki en önemli kullanım alanı ise kanser de erken teşhistir. Kanser hastalığında, tümörün bulunduğu dokuda veya vücut sıvılarında kanser biyomarkerları gibi biyolojik moleküllerin konsantrasyonu değişiklik göstermektedir. Eğer bu biyolojik moleküle özel geliştirilen biyosensör varsa vücut sıvılarından kolaylıkla konsantrasyon değişikliği belirlenebilmektedir.

#### **2.4.1 Biyosensör Yapısı**

Çoğu biyosensör üç kısımdan oluşmaktadır: hedef biyomolekülün yakalandığı biyolojik bağlanma bölgesi *biyoreseptör*, bağlama sonucu oluşan etkileşimleri anlamlı sinyallere dönüştüren *transduser* (dönüştürücü)dır (**Chambers ve ark. 2008**).

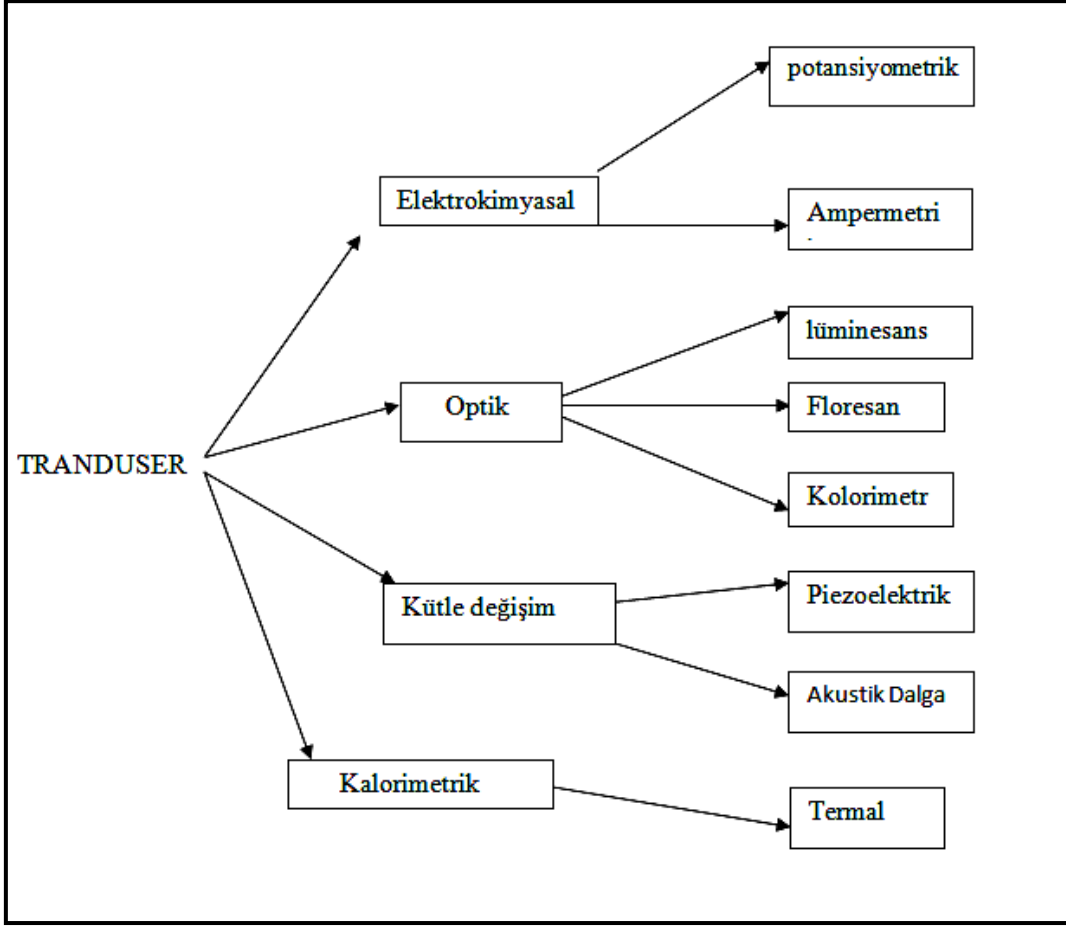


Şekil 2. 1 Basit bir biyosensörün çalışma mekanizması (Otlu 2011)

#### 2.4.1.1 Transduser

Transduser yani dönüştürücüler, biyoreseptörün analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp bu değişikliği ölçülebilir anlamlı sinyallere dönüştürerek detektöre aktaran yapılarıdır.

Transduserlar, algıladıkları değişimleri algıladıkları sinyallere göre farklı türlere ayrılmaktadırlar. Transduser çeşitleri şekil 1.2’de gösterilmiştir (Bohunicky ve ark. 2011).



**Şekil 2. 2** Tranduserların, algıladıkları değişimlere göre sınıflandırması

Geleneksel dönüştürücüler 2 çeşittir:  $H_2O_2$  veya  $O_2$  ölçümlerine odaklanan ampermetre, pH veya iyon ölçümleri yapan potansiyometridir. Biyotanıma reaksiyonları genel olarak kimyasal ürünler üretir ve bu ürünler elektrokimyasal metotlar ile kolayca tespit edilebilmektedirler.

Piezoelektrik materyalleri ve yüzey akustik dalga cihazları kütle değişimine karşı oldukça hassastırlar. Bu tarz dönüştürücüler, biyoreseptörlerde tanıma reaksiyonu ardından kütle değişimi oluyorsa, kullanımı oldukça uygundur (Abasıyanık ve ark. 2009).

Biyoreseptörde gerçekleşen bazı biyomoleküler değişimler sıcaklık artışına neden olabilmektedir. Bu tarz değişimlerin olduğu biyosensör yapılarında termal dönüştürücülerin kullanılması uygun görülmektedir.

#### 2.4.1.2 Biyoreseptörler

Biyoreseptör molekülü olarak, biyolojik moleküller (antikor, enzim, protein, nükleik asitler v.b) veya canlı biyolojik yapılar (hücre, doku ve mikroorganizmalar v.b) kullanılmaktadır. Biyoreseptör moleküllerin en önemli özelliklerinden bir tanesi tespit

edilmesi hedeflenen biyomoleküle karşı yüksek afinite ve özgüllük göstermesidir (**Rasooly 2005**). Biyoreseptör kaynağı olarak en çok kullanılan biyolojik sistemler; enzimler, antikorlar, aptamerler ve mikroorganizmalardır.

Enzimlerin biyoreseptör olarak kullanılan yaygın bir biyomolekül olmasının nedeni, enzimlerin kimyasal reaksiyona girmesiyle birden fazla ölçülebilir reaksiyon ürünü (proton, elektron, ışık ve ısı gibi) oluşturmalarıdır (**Chambers ve ark. 2008**). Ferrer-Miralles ve arkadaşları 2001 yılında, kan serumunda HIV antikorlarını tespit etmek amaçlı, zarf glikoproteinlerine ait epitopları, *E. Coli* beta-galaktozidaz enzimin aktif bölgesinin yanına ilavesiyle hibrid enzim tasarlamışlardır ve beta-galaktozidaz enzimi substratları renkli ürünlere dönüştürebilen enzim olduğundan bu enzim molekülünü biyoreseptör olarak kullanmışlardır.

Antikorlar 1950'li yıllardan bu yana birçok alanda kullanılmaya başlanmış ve yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ile sıkça kullanılan biyoreseptörlerden biri olmayı başarmıştır. Antikorlar, bütünüyle mikroorganizmayı tanıyıp algılayabildikleri gibi mikroorganizmaya ait toksinleri, enzimleri, peptid parçalarını algılayabilmektedirler (**Proske ve ark. 2008**). Kullanım amacına bağlı olarak, antikorların çeşitli şekillerde modifiye edilebilmeleri en önemli avantajlarıdır. E. Gosselin ve arkadaşları (2012), çok düşük seviyelerde bile olsa kapalı evlerde küf oluşumunda bulunan, insanların sağlığını bozan toksik triketesen mikotoksin olan Verrucarın A2 (VERA) virüsüne karşı duyarlı antikor esaslı spektroskopik bir biyosensör geliştirmişlerdir.

Aptamerler; peptidler, vitaminler, ilaçlar, mikroorganizmalar, bakteri sporları gibi çok çeşitli moleküllere yüksek affinite ve özgüllükte bağlanabilen oligonükleotidlerdir (**Shiping ve ark. 2008**). Aptamerler, 1990'lı yılında SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) yöntemi olan, *in vitro* seleksiyon ve amplifikasyon tekniği ile keşfedilmişlerdir, Bu yöntem bir dizi tekrarlanan işlemde oluşmaktadır. Aptamerlerin, biyomoleküler tanıda kullanılması yöntemler arasındaki yeri ve önemi giderek yükselmektedir. Aptamer temelli biyosensörler, antikor ve enzim temelli olanlarla karşılaştırıldıklarında; oda sıcaklığına daha uzun süre dayanabilme, kolayca sentezlenebilme, yüksek kararlılık gibi bir çok avantaja sahiptirler. Pawan Jolly ve arkadaşları 2014 yılında, DNA aptamer bazlı, prostat kanseri antijenine (PSA) spesifik elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmiştir.

Mikroorganizmalar birçok alanda biyoreseptör olarak kullanılabilirler ve çoğunlukla inorganik veya organik toksik kimyasal maddelerin tespitinde kullanılmaktadırlar. Diğer biyoreseptör moleküllerine göre daha fazla çeşitlilikte ve kimyasal yapı saptayabildiklerinden oldukça avantajlılardır. Genetik modifikasyonlara uyumlu olmaları, farklı pH ve sıcaklıklarda işlem görebilmeleri, mikroorganizmaları biyosensörlerde kullanılacak ideal biyoreseptörler haline getirmiştir (**D'Souza 2001**). Priti Mulchandani ve arkadaşları 2005 yılında, *Moraxella sp.* modifiye karbon pasta elektrot kullanarak p-nitrofenole karşı hassa ampermetrik mikrobiyal biyosensör geliştirmişlerdir.

#### **2.4.2 İmpedans spektroskopisinin biyosensör sistemlerinde kullanımı**

Devredeki toplam tüm dirence impedans adı denir. İmpedans temel olarak yüksek frekanslar maruz kalındığında kapasitans ve indüktif farklılıklardan etkilenen direncin ölçümünü esas almaktadır. Sistemlerin impedansı genellikle küçük bir potansiyel sarsımı uygulanması ve akım cevabının belirlenmesi ile tespit edilmektedir.

Elektriksel direnç, devrede bulunan bir elemanın elektrik akıma karşı gösterdiği dirençtir. İmpedans ile direnç arasındaki en önemli benzerlik; impedansın da direnç gibi elektriksel akıma karşı devrenin direnç göstermesiyle ölçülmüş bir değer olmasıdır. İmpedansın dirençten en önemli farkı ise; ideal direncin sahip olduğu basit özellikler ile sınırlandırılmamasıdır. İmpedans spektroskopisi, yapıların kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmekte sıkça kullanılan bir yöntemdir.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinin genele kullanım alanları şöyledir: korozyon çalışmaları, metal kaplama çalışmaları, yarı iletken elektrotların özelliklerinin incelenmesi, biyosensör, iletken polimer özelliklerinin incelenmesi, biyolojik sistemler, ince organik film özelliklerinin tespiti, bataryalar, yarı iletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesi (**Tekin 2008**).

Biyosensörde ise impedans spektroskopisi, transduser yüzeyindeki bağlanma olaylarının gözlenmesinde avantajlı bir yöntemdir. Biyomoleküllerin tanımlama olaylarını gözlemlenmede kullanılmasının yanı sıra, transduser üzerine biyomoleküllerin immobilizasyonu olaylarının her basamağını, meydana gelen olayları, yüzey modifikasyonun karakterizasyonunun incelenmesinde kullanılan önemli yöntemlerden biridir.



### 2.4.3 Döngüsel voltametrimin biyosensör sistemlerinde kullanımı

İletken bir maddeyi bulunduran bir çözeltide, çalışma elektrotuna zamanla doğrusal bir şekilde artan bir potansiyel uygulandığında akım-potansiyel eğrisinin bir pik şekli oluştuğu görülmektedir. Bu yöntemde potansiyel taraması ileri yönde belli potansiyel değerine ulaşınca tekrardan doğrusal bir şekilde azalarak ters çevrilirse, bu teknik dönüşümlü voltametri (CV) olarak adlandırılır. Dönüşümlü voltametriye ileri ve geri yöne doğru potansiyel tarama hızları aynı tutulabilir ve istenilirse farklı tarama hızları da kullanılabilir. Ayrıca ileri ve geri yöne doğru olan taramalar bir kez yapılabilir ya da istenilirse birçok kez uygulanabilir.

CV yöntemi birçok alanda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları: kantitatif analizler, yüzey modifikasyonu, elektrot reaksiyonlarının kinetiklerinin incelenmesi, çeşitli fizikokimyasal sabitlerin bulunması (D, n, i, K, E,  $\alpha$ ...), adsorpsiyon olaylarının incelenmesi, elektrot reaksiyonlarının mekanizmalarının incelenmesi, kompleks yapıların belirlenmesi, biyosensörlerde immobilizasyon basamaklarının incelenmesi gibi kullanım alanlarına sahiptir (Tekin 2008).

Dönüşümlü voltametrimin biyosensör alanındaki kullanımları, immobilizasyon basamaklarının incelenmesi ve biyoanalitin bağlamadığını gözleme amaçlıdır. Dönüşümlü voltametri yöntemi ile yapılan ölçümlerde oluşan anodik ve katodik pikler, biyosensör üzerinde yapılan her işlem sonucu farklılık göstermektedir. Pik farklarının artması veya azalması, elektrot yüzeyinde yapılan işlemin doğruluğu ya da yanlış gidişatı hakkında net bilgiler sunmaktadır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

Deneyle esnasında kullanılan tüm kimyasallar ve MAGE-1 antijeni ile anti-MAGE-1 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır. MAGE-1 ve antiMAGE-1'in tüm seyreltme işlemleri 0,01M pH=7,4 fosfat tamponu ile gerçekleştirilmiştir ve belli konsantrasyonda seyreltme işleminden sonra -20°C' de saklanmıştır. Çalışma elektrodu olarak 30 cm en, 30 cm boy boyutlarındaki film tabaka halinde bulunan ITO-Pet elektrotlardan, 1 cm<sup>2</sup> (eni 0,5 cm, boyu 2 cm) yüzey alanına sahip elektrotlar kesilerek, kullanılmıştır. Referans elektrot olarak, KCl ile doygunlaşmış Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Yardımcı elektrot olarak 5 cm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Referans ve yardımcı elektrotlar iBAS, Warwickshire, UK firmasından getirilmiştir. ITO-Pet çalışma elektrodu Sigma–Aldrich' den getirilmiştir. Ölçümler için, akım voltmetresi ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı kullanılmıştır.

##### **3.1.1 OH tabakası için karışım hazırlanması**

Her bir ITO-Pet elektrot 1cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip olacak şekilde kesildikten sonra temizlenmiştir ve yüzeyde aktif –OH uçları elde etme amaçlı 90 dakika oda sıcaklığında OH karışımı ile inkübe edilmiştir. Her elektrot için ayrı ayrı hazırlanan OH karışımı için % 94'lük NH<sub>4</sub>OH (amonyum hidroksit), %99'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) ve ultra saf su kullanılmıştır.

Her bir elektrot için ayrı hazırlanan OH karışımı formülü: 80µL NH<sub>4</sub>OH, 80µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 400 µL ultra saf su olmak üzere toplam 560µL'lik bir karışım elde edilir.

OH tabakası için kullanılan tüm kimyasallar Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır.

##### **3.1.2 Kendiliğinden oluşan monotabaka (SAM) için karboksietilsilanetriol sodyum tuzu(CTES) çözeltisinin hazırlanması**

Her bir ITO-Pet elektrot OH tabakası oluşturduktan sonra, kendiliğinden oluşan monotabaka (SAM) oluşturmak karboksietilsilanetriol çözeltisi ile elektrotlar gece boyu, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. SAM çözeltisi hazırlamak için, %25'lik karboksietilsilanetriol sodyum tuzu(CTES) ve çözücü olarak ultra saf su kullanılmıştır.

Hazırlanan % 0,5'lik 2,87 mM SAM çözeltisi için, 100 µL % 25'lik karboksietilsilanetriol sodyum tuzu ve 4900 µL ultra saf su kullanılmıştır. Her bir elektrot için 500 µL SAM çözeltisi kullanılmıştır.

% 25'lik karboksietilsilanetriol sodyum tuzu sudaki çözeltisi, abcr GmbH & Co.KG (Almanya)'den temin edilmiştir.

### **3.1.3 EDC-NHS çözeltisinin hazırlanması**

Elektrot yüzeyine SAM tabaka oluştuktan sonra, CTES'in karboksil uçları aktif hale getirebilmek adına EDC-NHS çözeltisi kullanılmıştır. Elektrotlar EDC-NHS çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

0.04 mM EDC, 0.01 mM NHS çözeltisi hazırlamak için: 10mg katı EDC tartılıp 1mL 0,01 M pH=7 fosfat tamponunda çözülmüştür. 2mg katı NHS tartılıp 1mL 0,01 M pH=7 fosfat tamponunda çözülmüştür. Daha sonra 6 µL EDC çözeltisinden alınarak üzerine, 3 µL NHS çözeltisinden ve 4991 µL 0,01 M pH=7 fosfat tamponu eklenmiştir. Her bir elektrot için 500 µL EDC-NHS çözeltisi kullanılmıştır.

### **3.1.4 Elektrokimyasal ölçümler**

Elektrotlar temizlendikten sonra OH tabakası oluşturulmuştur ve OH tabakası oluşumundan sonra bütün immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımlarının takibi için döngüsel voltametri (CV) ve impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. Ayrıca, sadece bir çalışmada kare dalga voltametrisi (SWV) kullanılmıştır. Ölçümler 0,1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. CV' de potansiyel aralığı 0 ila 500 mV arasında (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s) seçilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri 5 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Impedans spektrumları 50.000 ila 0.05 Hz aralığındadır. Kare dalga voltametrisinde (SWV), potansiyel aralığı 0 ila 1,2 V arasında (puls büyüklüğü: 25 mV, frekans: 25 Hz) seçilmiştir.

### **3.1.5 Ölçüm prosedürleri**

Anti-MAGE-1' in elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki adım, elektrot yüzeyinde anti-MAGE-1' in bağlanmadığı kısımlara BSA ( bovine serum albümin) ajanının bağlanmasıyla biyosensör sistemi tamamlanmıştır. Son işlem olarak MAGE-1'in elektrot yüzeyine bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bağlanma işlemi 45 dakika, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Her elektrot, farklı 100 µL'lik MAGE-1

konsantrasyonuna daldırılarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Her elektrotun, fiziksel olarak absorblanmış MAGE-1' i uzaklaştırmak amaçlı ultra saf su ile yıkanarak,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücre içerisinde CV ve EIS ölçümleri alınmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 İmmobilizasyon basamakları**

Elektrotlar üzerindeki ilk işlem elektrotların temizlenmesi işlemidir. Elektrotları temizlemek için her elektrot ayrı ayrı işlem ultrasonik banyoda 10'ar dakika işlem görür. Sırayla: % 90'lık 1,5 mL aseton, 1,5 mL sabun çözeltisi, 1,5 mL ultra saf su içerisinde işlem görmüştür. Temizleme işleminden sonra her bir elektrot immobilizasyon işlemleri için hazır hale gelmiştir.

İmmobilizasyon basamakları ayrıntılarıyla birlikte çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Elde edilen immobilizasyon koşulları bir dizi optimizasyon çalışmalarından sonra belirlenmiştir.

Her işlem basamağının sonrasında elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak argon gazı ile kurutulmuştur. İmmobilizasyon basamaklarının her bir aşaması EIS ve CV ölçümleri alınarak kontrol edilmiştir.

Yapılan tüm çalışmalarda 8 farklı ITO-Pet elektrotla çalışılmış, her bir elektrot aynı koşullar altında immobilizasyon işlemlerine tabii tutulmuştur.

İşlem Sırası	Yapılan İşlem ve Koşulları
1	OH tabakası oluşturma. Elektrot yüzeyinde aktif - OH uçları oluşturmak amacıyla, hazırlanan OH çözeltisi ile her elektrot 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyon işlemine tabii tutulmuştur.
2	SAM tabakası oluşturma. Elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan monotabaka oluşturmak için, hazırlanan %0,5'lik CTES ile her elektrot gece boyu (yaklaşık 16-17 saat) oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
3	EDC-NHS ile muamele. Elektrot yüzeyine kaplanan CTES tabakasındaki karboksil uçlarını daha aktif bir rol oynamasını sağlamak ve heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak hazırlanan EDC-NHS çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti ile her elektrot 1 saat, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
4	Anti-MAGE-1' in bağlanması. Elektrot yüzeyine anti-MAGE-1'in peptit bağı yapabileceği koşullar sağlandıktan sonra, elektrot, pH=7,4 0,01M Fosfat tamponu ile seyreltilmiş 5,5 ng/mL konsantrasyonuna sahip anti-MAGE-1 ile oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5	BSA ajanının bağlanması. Açık uçları bloklama ajanı olarak, pH=7 0,01M fosfat tamponuyla hazırlanmış %0,5'lik BSA proteini kullanılır. 1 saat, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3. 1** İmmobilizasyon basamakları

### **3.2.2 Optimizasyon basamakları**

#### **3.2.2.1 CTES miktar optimizasyonu**

CTES miktar optimizasyonu için 3 farklı miktar ile biyosensör oluşumu denenmiştir. 3 farklı çalışmada diğer şartlar aynı tutularak sadece CTES miktarı değiştirilmiştir. Her çalışmada 8 farklı elektrot ile çalışılmıştır. Optimizasyon için kullanılan CTES miktarları; %0,25'lik, %0,5'lik, %0,75'lik CTES'dir. CTES miktarı, EIS ölçüm Rct sonuçlarında farklılık oluşturduğu gözlenmiştir. Çıkan sonuçları grafiği çizilerek en uygun CTES miktarı çalışmanın devamı için seçilmiştir.

#### **3.2.2.2 AntiMAGE-1 miktar optimizasyonu**

AntiMAGE-1 konsantrasyon optimizasyonu için 3 farklı miktar ile biyosensör oluşumu denenmiştir. Aynı şartlar altında sadece antiMAGE-1'in konsantrasyonu değiştirilmiştir. Bu optimizasyon çalışması için 3 farklı çalışma gerçekleştirilmiştir ve her çalışmada 8 elektrot immobilizasyon basamaklarına tabii tutulmuştur. Optimizasyon için kullanılan konsantrasyonlar; 5,5 ng/mL, 11 ng/mL, 33 ng/mL'dir. AntiMAGE-1 konsantrasyonları, EIS ölçüm Rct sonuçlarında farklılık oluşturup oluşturmadığı gözlenmiştir ve çıkan sonuçları grafiği çizilerek en uygun antiMAGE-1 konsantrasyonu çalışmanın devamı için seçilmiştir.

#### **3.2.2.3 AntiMAGE-1 süre optimizasyonu**

AntiMAGE-1 inkübasyon süresi optimizasyonu için 3 farklı zaman dilimi ile biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılan elektrotların tüm immobilizasyon şartlar aynı tutularak sadece antiMAGE-1'in inkübasyon süresi değiştirilmiştir. Optimizasyon için kullanılan inkübasyon süreleri; 30 dakika, 45 dakika, 1 saattir. AntiMAGE-1 inkübasyon sürelerinin değiştirilmesiyle elde edilen MAGE-1 EIS sonuçları ile BSA EIS ölçüm Rct sonuçları karşılaştırılarak grafiği çizilmiş ve en uygun antiMAGE-1 süresi çalışmanın devamı için seçilmiştir.

#### **3.2.2.4 MAGE-1 süre optimizasyonu**

MAGE-1 inkübasyon süresi optimizasyonu için 4 farklı zaman dilimi ile biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Her bir çalışmada 8 elektrot kullanılmıştır ve tüm immobilizasyon basamakları aynıdır. Optimizasyon için değiştirilen MAGE-1'in inkübasyon süreleri; 30 dakika, 45 dakika, 1 saat ve 75 dakikadır. MAGE-1 inkübasyon sürelerinin değiştirilmesiyle, EIS ölçüm sonuçları, BSA EIS ölçüm Rct sonuçları karşılaştırılarak sinyallerdeki farklılıklar

gözlenmiştir. Çıkan sonuçları grafiği çizilerek en uygun MAGE-1 süresi çalışmanın devamı için seçilmiştir.

### **3.2.3 Geliştirilen biyosensör için ideal tayin aralığı belirlenmesi**

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu geliştirilen biyosensör için ideal şartlar belirlenmiştir. Son aşama olarak, biyosensörün belirlenen şartlar altında hangi tayin aralığında MAGE-1'i bağlayabildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada için üç farklı tayin aralığı denenmiş, yani 3 farklı tayin aralığına sahip çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmaların sonunda en uygun tayin aralığı EIS, CV ve SWV ölçümleri ile teyit edilmiştir. Bu çalışmada 8 elektrot ile çalışılmış.

### **3.2.4 İdeal tayin aralığının SWV ölçümleri**

En uygun tayin aralığı CV, EIS ölçümleri alınarak sonuç elde edilmesine rağmen SWV ölçümleri ile tayin aralığının ideallliği teyit edilmiştir. Diğer ölçümlerle farklı olarak, sadece BSA ve MAGE-1 inkübasyonundan sonra SWV ölçümü alınmıştır. Sonuçlar MAGE-1 ile BSA, SWV ölçümleri sonuçlarının farkı alınarak hesaplanmıştır.

Karedalga voltametri (SWV) ile sadece 1 çalışma yapılmıştır ve bu çalışmada 8 biyosensör sisteminin BSA ve MAGE-1 ile inkübasyonu sonucu ölçüm alınmıştır.

### **3.2.5 Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik çalışmalarında, tüm biyosensör sistemlerine aynı konsantrasyondaki MAGE-1 ile çalışılmıştır. Bu çalışmada tayin aralığında çizilen grafik esas alınmıştır. Elde edilen sonuçlar tayin aralığının grafiğindeki denklem esas alınarak karşılaştırılma yapılmıştır. Kullanılan MAGE-1 konsantrasyonları arasından 0,08 pg/mL seçilerek, 20 elektrotla çalışma gerçekleştirilmiştir. Yani 20 adet aynı biyosensör sistemi geliştirilmiş ve EIS ölçümleri sonucunda gerekli hesaplamalar yapılarak çalışmanın doğruluğu teyit edilmiş, standart sapması hesaplanmıştır.

### **3.2.6 Tekrar üretilebilirlik**

Tekrar üretilebilirlik çalışmalarında aynı biyosensör sisteminin, aynı tayin aralığını belirleyebilme kararlılığı ölçülmüştür. Bir tekrar üretilebilirlik çalışması için; belirlenen optimum koşullarda 8 elektrottan oluşan biyosensör sistemleri geliştirilmiş ve en son belirlenen tayin aralığındaki konsantrasyonlara sahip MAGE-1 ile muamele edilerek, EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu çalışmada tayin aralığında çizilen grafik esas alınmıştır, çalışmanın doğruluğu için bu grafiğe en yakın değerlerin bulunması hedeflenmiştir. Tekrar

üretilebilirlik sonuçları için 10 farklı çalışma gerçekleştirilmiş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

### **3.2.7 Geliştirilen biyosensörün depo ömrü**

Yapılan bu çalışmanın ideal bir çalışma olabilmesi ve geleceğe yönelik vaatlerinin olabilmesi için, biyosensörün depo ömrünün iyi bir zaman dilimine denk gelmesi istenmektedir. ITO-pet üzerinde yapılan immobilizasyon işlemlerinin, 10 hafta, +4°C saklama koşulları altındaki ömrü incelenmiştir. 11 elektrot üzerine optimum koşullarda immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve her aşamada EIS, CV ölçümleri kaydedilmiştir. İlk elektrot 0,08 pg/mL konsantrasyona sahip MAGE-1 ile muamele edilerek ölçüm sonucu kaydedilmiştir. Her hafta aynı konsantrasyon ile farklı bir elektrodun EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu işlem 10 haftada gerçekleştirilmiş ve antiMAGE-1 modifiyeli ITO-Pet elektrotların depo ömrü, çıkan EIS Rct sonuçları esas alınarak hesaplanmıştır. Depo hesaplamalarında, tayin aralığında çizilen grafiğin denklem değerleri esas alınmıştır.

### **3.2.8 Rejenerasyon**

Rejenerasyon işlemi, üzerinde immobilizasyon basamakları tamamlanmış tek bir biyosensör üzerinde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör ilk olarak 45 dakika 0,08 pg/mL MAGE-1 ile inkübe edilmiş ve EIS ölçümleri alınmıştır. Daha sonra 10 mM HCL içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra EIS ölçümü alınmış ve sonrasında 45 dakika 0,08 pg/mL MAGE-1 ile inkübe edilmiştir. Bu işlem 5 defa tekrarlanmıştır.

Rejenerasyon işleminin amacı, biyosensörün bağladığı MAGE-1 proteinini yüzeyden kopararak, tekrar tekrar MAGE-1 proteinini bağlayabildiğini gözlemlemektir.

### **3.2.9 Sabit frekansta MAGE-1'in bağlantısı**

Sabit frekanslı çalışmanın amacı, MAGE-1'in biyosensör yüzeyine zamanla bağlantı sinyallerini anlık görüntüleyebilmektir. Sabit frekans ölçümü için 45Hz frekansı seçilmiş ve ölçüm pH=7,4 0,01 M fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir ve tamponun üzerine MAGE-1 çözeltisi eklenerek 0,16 pg/mL MAGE-1 elde edilmiştir. 30 dakika ölçüm alınarak MAGE-1'in biyosensör üzerine bağlantısı takip edilmiştir.



### **3.2.10 Gerçek serum örneklerinden MAGE-1 tayini**

Bu çalışmada, MAGE-1 biyomarkerının kantitatif tayinine yönelik elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörün MAGE-1'i tayin edebilmesi için tüm şartlar optimize edilmiştir ve kan serumunda spesifik bir şekilde MAGE-1'in tayinini gerçekleştirdiği test edilmiştir.

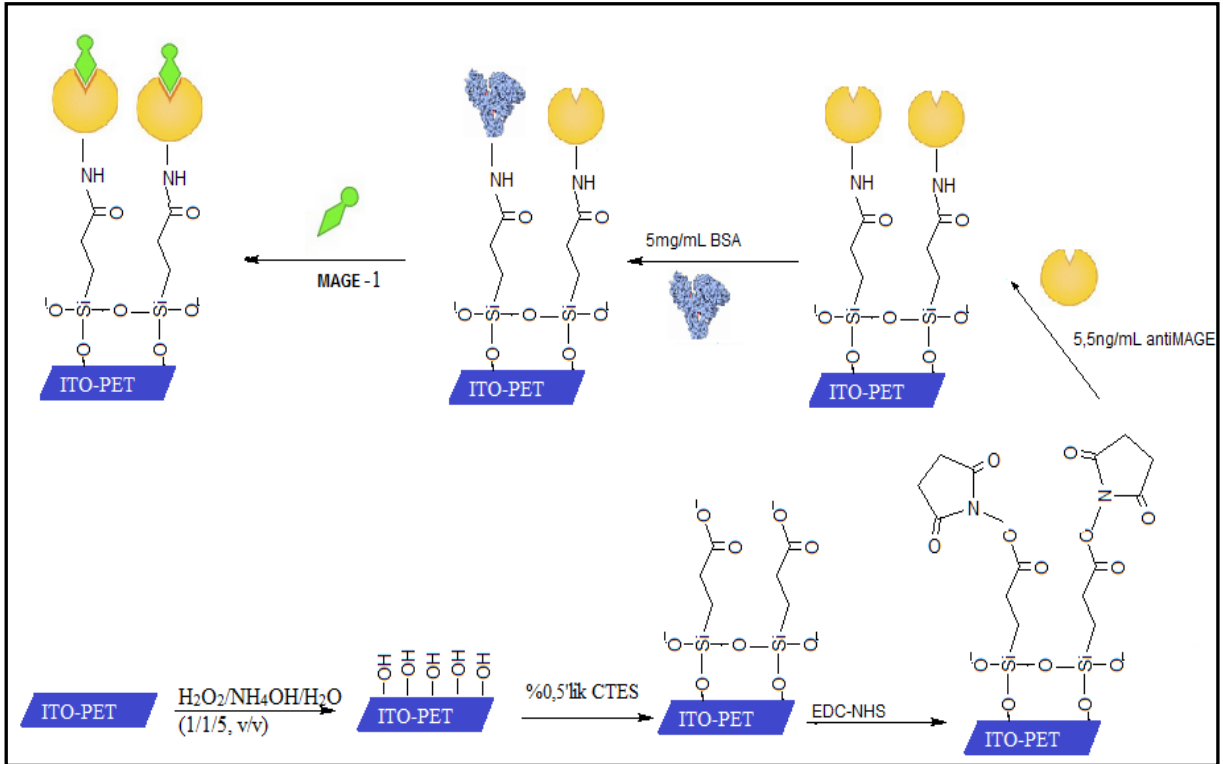
Geliştirilen biyosensör ile kan serumunda MAGE-1 tayini için 10 sağlıklı bireyin kan örneklerinden elde edilen serumlar kullanılmıştır. MAGE-1 biyomarkerının sağlıklı bireylerin kan serumlarında 0-50 pg/mL konsantrasyonda olduğunu belirten literatür bilgileri mevcuttur **(Oya ve ark. 2015)**. Serumlar pH=7,4 fosfat tamponu ile 300 kat seyreltilmiş ve anti MAGE-1 temelli MAGE-1 biyosensörüyle 45 dakika, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1 İmmobilizasyon Basamaklarının Bulguları

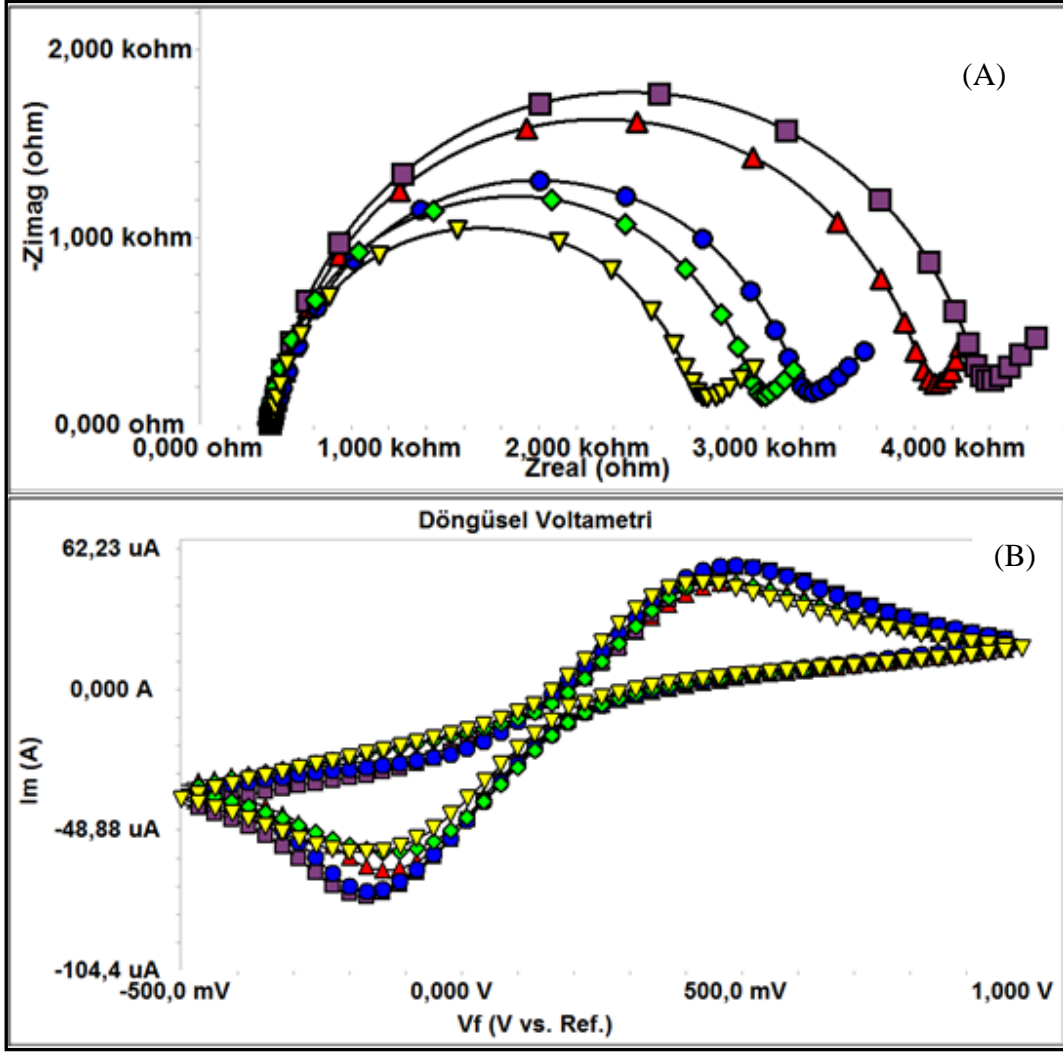
İmmobilizasyon basamakları, bir dizi optimizasyon aşamalarından geçerek belirlenmiş ve ideal bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen tüm immobilizasyon basamakları ve MAGE-1 kanser antijeninin biyosensöre bağlanması temsili olarak şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 Şematik olarak ITO-Pet elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen işlemler

Her immobilizasyon basamağından sonra EIS ve CV ölçümleri alınmış ve işlemin gidişatının doğruluğu kontrol edilmiştir. Bir elektrot için immobilizasyon basamaklarının CV ve EIS ölçüm sonuçları şekil 4.2’de gösterilmektedir. Her bir immobilizasyon basamağından sonra EIS ölçüm sinyallerinde artış gözlenmiştir. Bu da, OH tabakası oluşturarak iletken hale getirdiğimiz ITO-Pet elektrodun yüzeyine diğer tabakaların en uygun şekilde bağlanarak daha yalıtkan yüzey oluşturduğunu göstermektedir. CV ölçümlerin anodik ve katodik piklerin küçülmesi, yüzeye moleküllerin bağlandığını bize göstermektedir.



Şekil 4. 2 İmmobilizasyon adımlarına ait EIS (A) ve CV (B) eğrileri, (-▲-▲-) sarı: ITO/OH, (-◆-◆-) yeşil: ITO/OH/CSET, (-●-●-) mavi: ITO/OH/CTES/EDC-NHS, (-▲-▲-) kırmızı: ITO/OH/CSET/EDC-NHS/anti-MAGE, (-■-■-) mor: ITO/OH/CSET/EDC-NHS/anti-MAGE/BSA.

Yapılan optimizasyonlar sonucu belirlenen bu ideal immobilizasyon basamakları geri kalan çalışmalarda kullanılmış ve her biri aynı koşullar altında hazırlanmış farklı biyosensörler geliştirilmiştir.

## 4.2 Optimizasyon Basamaklarının Bulguları

### 4.2.1 CTES miktar optimizasyon bulguları

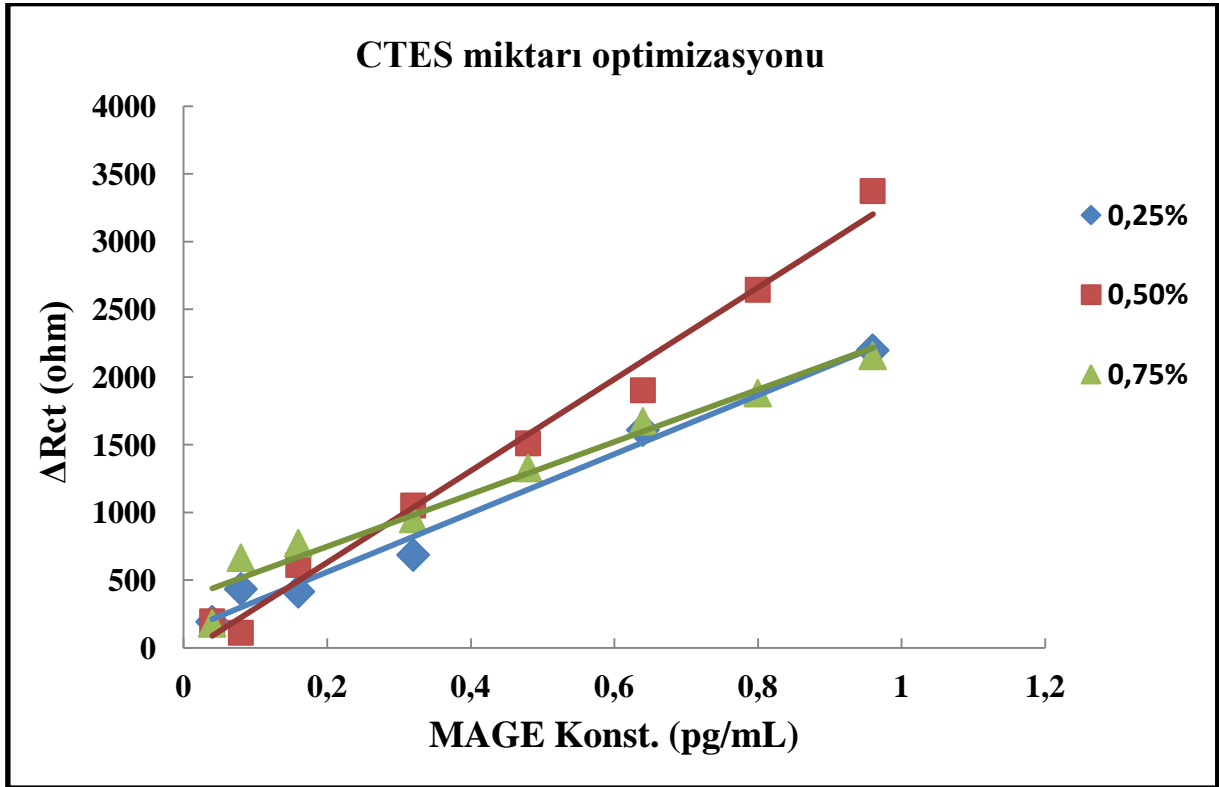
Denenmiş olan 3 farklı CTES miktarı ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda % 0,5'lik CTES miktarının ideal SAM tabakası oluşturmak için en uygun miktar olduğu gözlenmiştir. Optimizasyon sırasında yapılan her çalışmada 8 elektrot sistemi geliştirilmiş ve farklı MAGE-1 konsantrasyonu (0,04-0,96 pg/mL) ile inkübe edilerek sonuçlar elde edilmiştir. Her

çalışmada çizilen grafikteki  $R_{ct}$ (ohm) değerleri her bir elektrodun BSA ve MAGE-1 ile inkübasyonu sonucunda alınan EIS impedans eğrilerinin çap farklarının değerleridir.

% 0,5'lik CTES miktarı ile hazırlanan 8 elektroda farklı konsantrasyonlarda MAGE-1 bağlanmasından sonra alınan EIS ve CV ölçüm sonuçları şekil 4.3'de gösterilmiştir. Her bir elektrot kendi BSA ölçümü ile kıyaslanarak sonuçlar elde edilmiş ve grafiğe yansıtılmıştır. Şekil 4.4'de gösterilen EIS ve CV ölçümleri temsili olarak gösterilmiştir.

Farklı CTES miktarı ile yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlara göre çizilen grafikler şekil 4.3'de, grafik denklemleri ve  $R^2$  değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Çizilen tüm grafikler EIS ölçümlerinin  $R_{ct}$  sonuçlarına göre çizilmiştir.

Grafığın bize gösterdiği, % 0,5 CTES miktarı kullanıldığında elde edilen sinyallere, % 0,25'lik CTES'in yaklaşmadığı ve % 0,75'lik CTES miktarının bu sinyallerde bozulma yaparak değerlerin düşmesine sebep olduğudur. Bu nedenlerden dolayı ideal CTES miktarı olarak %0,5 seçilmiştir.

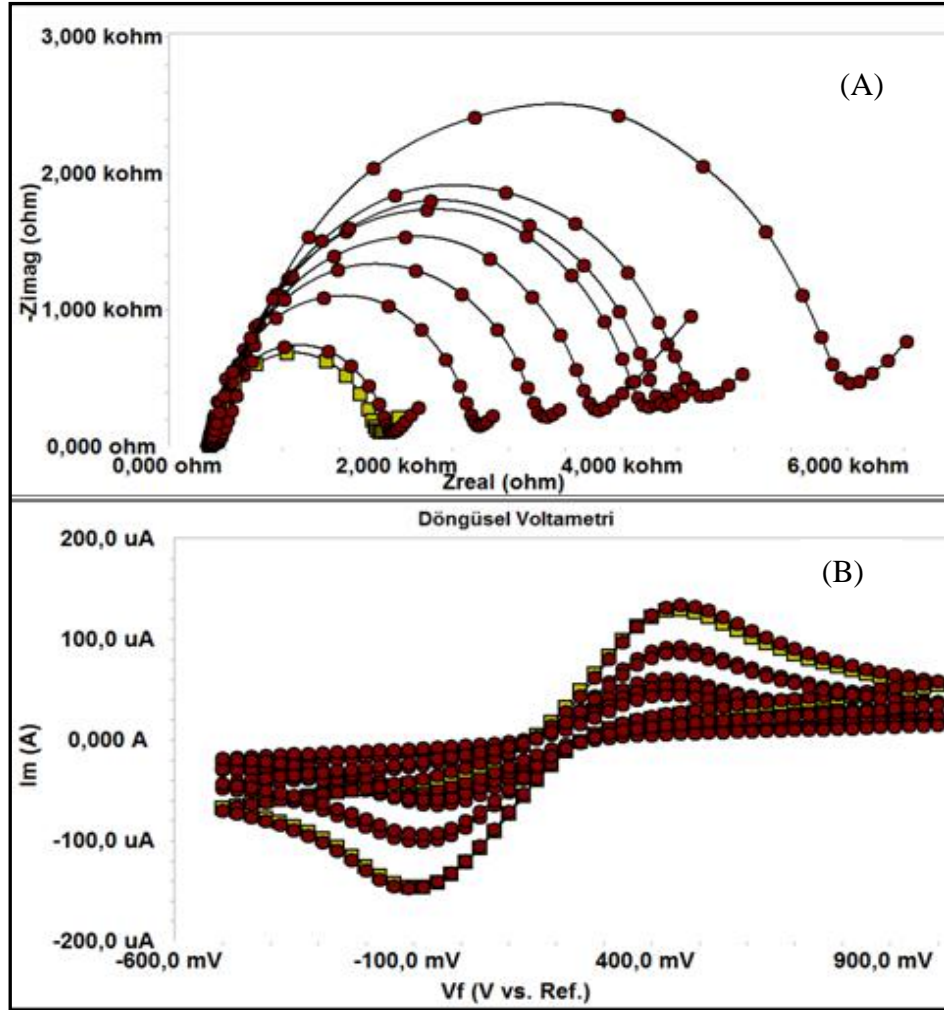


Şekil 4.3 Farklı CTES miktarları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

CTES Miktarı	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R <sup>2</sup> Değeri
% 0,25'lik CTES	$y = 3384x - 46,173$	$R^2 = 0,9875$
<b>% 0,5'lik CTES</b>	<b><math>y = 177,7x + 124,68</math></b>	<b><math>R^2 = 0,9846</math></b>
% 0,75'lik CTES	$y = 931,7x + 361,96$	$R^2 = 0,9647$

**Çizelge 4.1** Farklı CTES miktarı ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

Grafik R<sup>2</sup> değerlerine göre, iyi bir doğrusallığa sahip grafikler elde edilmesine rağmen, sinyallerdeki farklılık % 0,5'lik miktarı diğer sonuçlardan ayırmış ve çalışmanın geri kalanı için doğru miktarı göstermiştir.



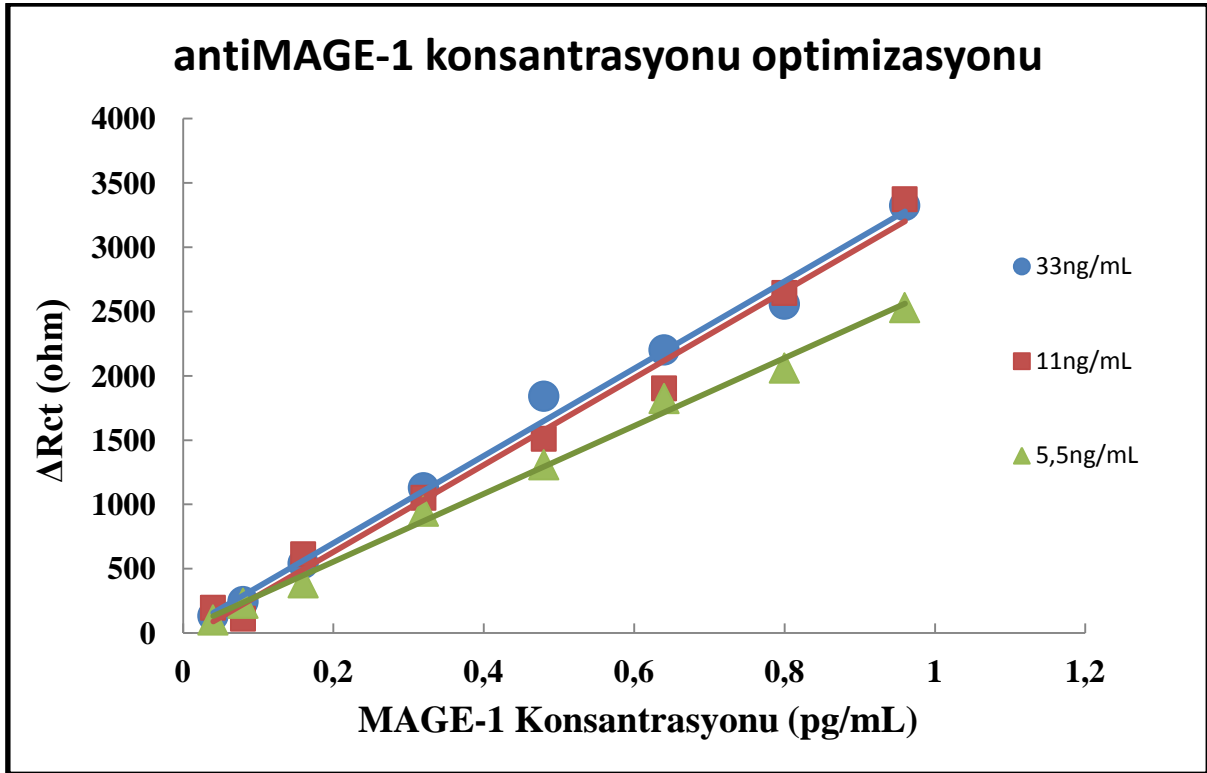
**Şekil 4.4** %0,5'lik CTES ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS (A) ve CV (B) ölçümleri: (-♦-♦-) sarı: BSA ölçümü, (-●-●-) kırmızı: 0,04 pg/mL-0,96pg/mL MAGE-1 ölçümleri.

Yukarıdaki şekilde tüm EIS sonuçları kendi BSA, EIS sonuçları ile karşılaştırılmış olsa da, artan MAGE-1 konsantrasyonu ile yalıtkanlığın arttığını bize temsili olarak göstermiştir. CV ölçümlerinde kapanan anodik ve katodik pikler, temsili olarak biyosensörün daha fazla MAGE-1'i yüzeyine bağladığını göstermektedir.

#### 4.2.2 AntiMAGE miktar optimizasyon bulguları

Denenmiş olan 3 farklı antiMAGE miktarı ile elde edilen sonuçların göstergesinde 5,5 ng/mL antiMAGE miktarının immobilizasyon basamağı için en uygun konsantrasyon olduğu gözlenmiştir. Optimizasyon sırasında yapılan her çalışmada 8 elektrot sistemi geliştirilmiş ve 0,04-0,96 pg/mL MAGE-1 konsantrasyona sahip MAGE-1 ile inkübe edilerek sonuçlar elde edilmiştir. Her çalışmada çizilen grafikteki  $R_{ct}$ (ohm) değerleri her bir elektrodun BSA ve MAGE-1 ile inkübasyonu sonucunda alınan EIS impedans eğrilerinden elde edilmiştir.

Farklı çalışmanın sonuçlarına göre çizilen grafikler şekil 4.5'de, grafik denklemi ve  $R^2$  değerleri çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı antiMAGE-1 konsantrasyonları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

Grafiklerde görüldüğü gibi, 5,5 ng/mL antiMAGE miktarı kullanıldığında elde edilen sinyaller, 11 ng/mL antiMAGE ve 33 ng/mL antiMAGE miktarlarının kullanıldığında elde edilen  $R_{ct}$  sinyallerin yakın olduğu gözlenilmiştir. Kimyasal kullanımından tasarruf edilme

amaçlı ve bir süre sonra yüksek konsantrasyonda olsa elektrot yüzeyindeki SAM tabakasının gerektiğinden fazla antiMAGE bağlanmadığı yorumlanılmıştır. Bu nedenlerden dolayı ideal antiMAGE miktarı olarak 5,5 ng/mL seçilmiştir.

AntiMAGE-1 Konst.	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R <sup>2</sup> Değeri
5,5 ng/mL antiMAGE-1	$y = 2639,8x + 26,436$	$R^2 = 0,995$
11 ng/mL antiMAGE-1	$y = 3384x - 46,173$	$R^2 = 0,9875$
33 ng/mL antiMAGE-1	$y = 3392,4x + 21,54$	$R^2 = 0,9922$

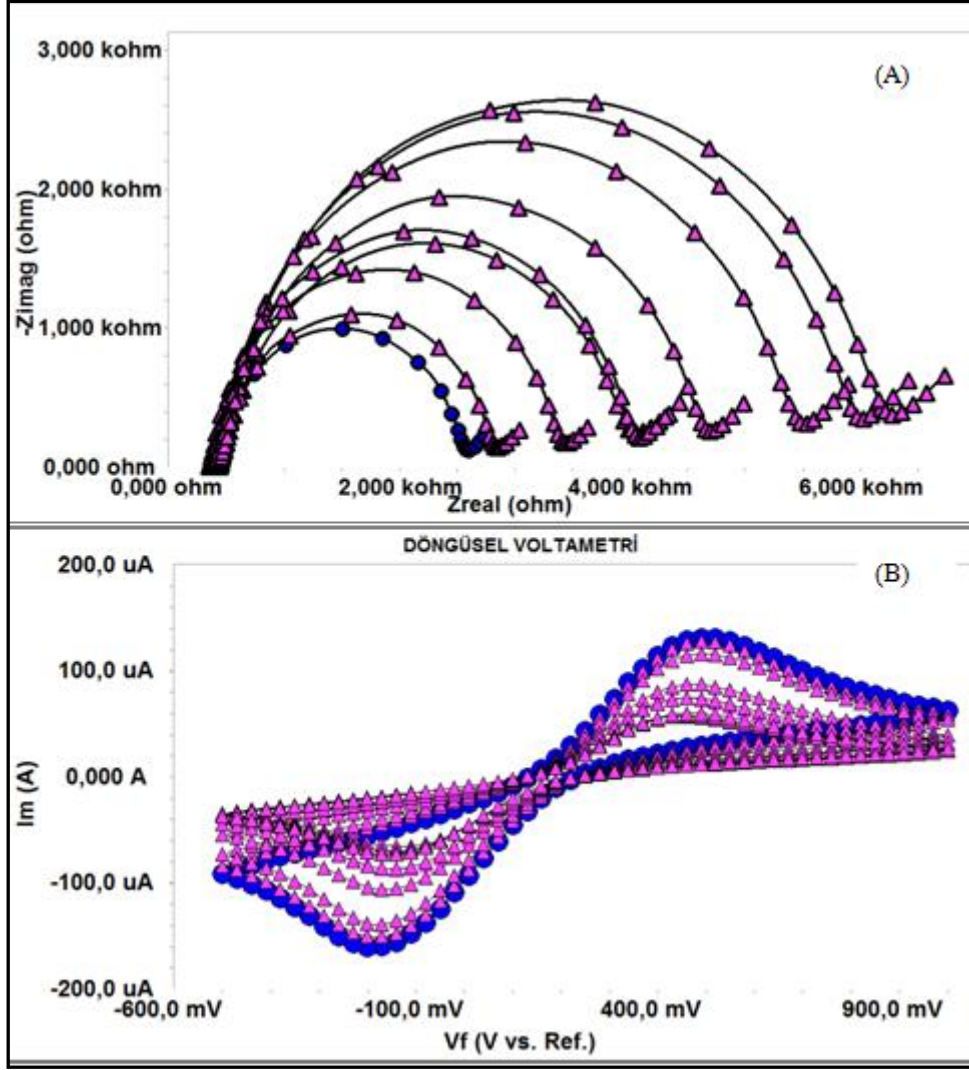
**Çizelge 4.2** Farklı antiMAGE-1 konsantrasyonları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

Çalışılan tüm miktarlardan elde edilen sonuçların grafikleri ve R<sup>2</sup> değerleri incelendiğinde hepsinin ideal doğrusallıkta ve bir birine çok yakın değerlerde olduğu görülmektedir. 5,5 ng/mL konsantrasyonlu çalışmada sinyaller az da olsa azalmıştır. Fakat bu çalışmanın gidişatını sarsacak bir azalma olmadığından göz ardı edilmiş ve antiMAGE miktar tasarrufu düşünülerek, çalışanın geri kalanı için çalışılacak miktar olarak seçilmiştir.

Optimizasyon sırasında yapılan çalışmalar arasından 5,5 ng/mL konsantrasyonuna sahip antiMAGE-1 ile hazırlanan 8 biyosensör sistemlerine farklı konsantrasyonlarda MAGE-1 bağlanmasından sonra alınan EIS ve CV ölçüm sonuçları şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Her bir elektrot kendi BSA’sının EIS ölçümü Rct değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar elde edilmiş ve grafiğe yansıtılmıştır. Şekil 3.6’da gösterilen EIS ve CV ölçümleri temsili olarak gösterilmiştir.

Aşağıdaki şekilde tüm EIS ölçümleri kendi BSA, EIS sonuçları ile karşılaştırılmış olsa da, artan MAGE-1 konsantrasyonu ile yalıtkanlık artmış ve sinyaller yükselmiştir. CV ölçümlerinde kapanmış anodik ve katodik pikler, temsili olarak yüzeye daha fazla MAGE-1’in bağladığını gözlemlememizi sağlamıştır.



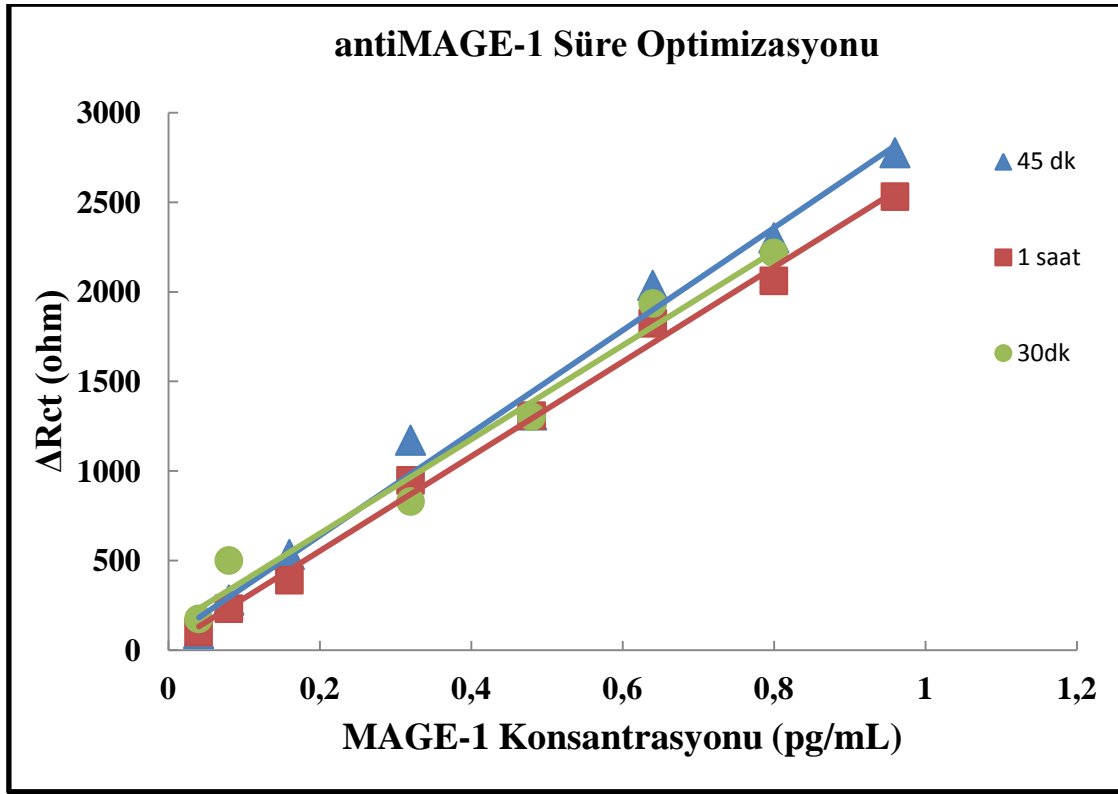
Şekil 4.6 5,5ng/mL antiMAGE-1 ile hazırlanan ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS (A) ve CV (B) ölçümleri: (-●-●-) mavi: BSA ölçümü, (-▲-▲-) mor: 0,04 pg/mL-0,96 pg/mL MAGE-1 ölçümleri.

#### 4.2.3 AntiMAGE süre optimizasyon bulguları

Süre optimizasyonu için 3 farklı çalışmada elektrotlar, 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika antiMAGE ile inkübe edilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Çalışmalar sırasında 8 elektrot sistemi geliştirilmiş ve 0,04-0,96 pg/mL konsantrasyon aralığındaki MAGE-1 ile inkübe edilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Her çalışmada çizilen grafikteki  $R_{ct}$ (ohm) değerleri her bir elektrodun BSA ve MAGE-1 ile inkübasyonu sonucunda alınan EIS impedans eğrilerinden elde edilmiştir.

Çıkan sonuçlara göre çizilen grafikler şekil 4.7’de, grafik denklemi ve  $R^2$  değerleri çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Çizilen tüm grafikler EIS ölçümlerinin sonucuna göre çizilmiştir.





**Şekil 4.7** Farklı antiMAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

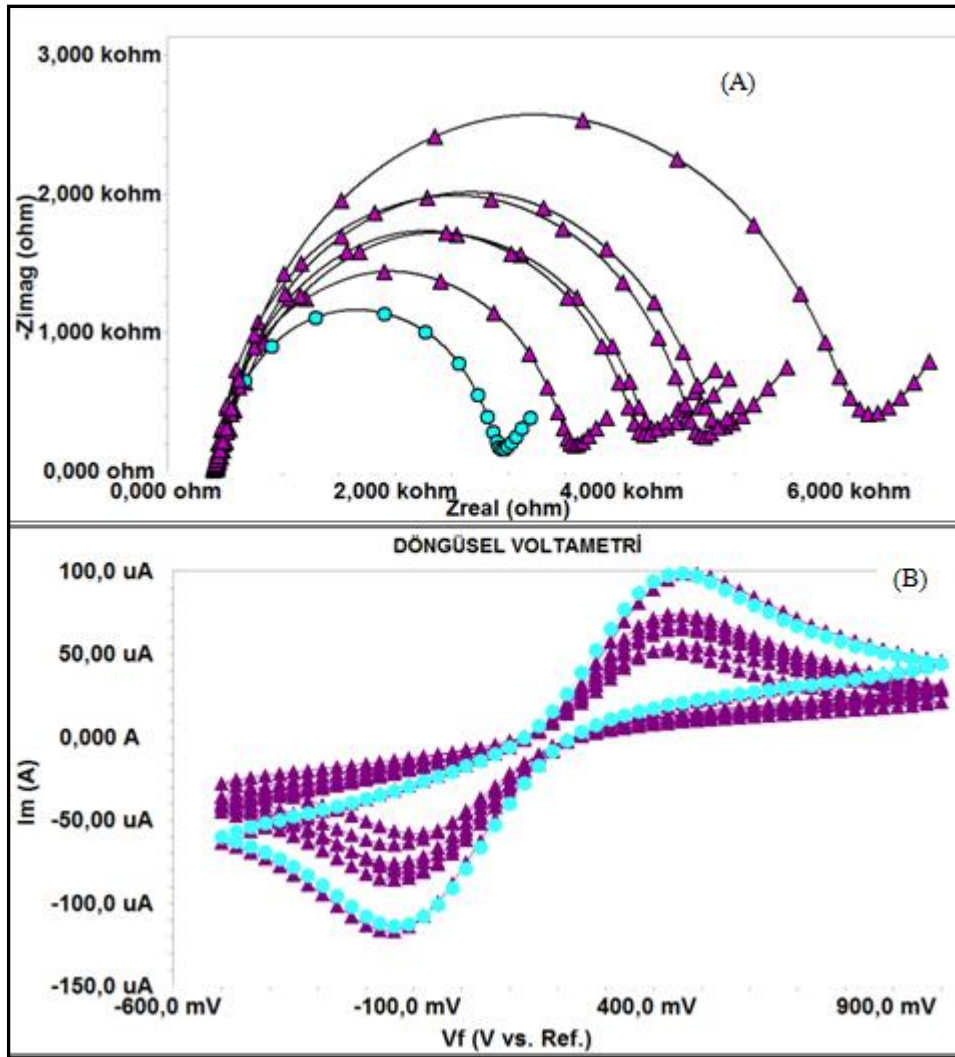
AntiMAGE-1 İnkübasyon Süresi	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R <sup>2</sup> Değeri
30 Dakika	$y = 2622,9x + 128,5$	$R^2 = 0,9777$
45 Dakika	$y = 2859,9x + 69,079$	$R^2 = 0,9877$
60 Dakika	$y = 2639,8x + 26,436$	$R^2 = 0,995$

**Çizelge 4.3** Farklı antiMAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi yapılan 3 çalışmanın sonucunda çizilen standart grafiklerin eğimlerinin ve sinyallerinin bir birine çok yakın değerde olması, antiMAGE' nin 30 dakika gibi kısa bir sürede de, 60 dakika gibi bir sürede de aynı oranlarda elektrot yüzeyine immobilize olduğunu yorumlamamızı sağlamamıştır. Her bilimsel çalışma gibi bu çalışmanın da olabilecek minimum süreye sahip olması adına 30 dakikalık çalışma en uygun zaman dilimi olarak seçilmiştir.

Optimizasyon sırasında yapılan çalışmalar arasından 30 dakika inkübasyon süresine sahip antiMAGE-1 ile hazırlanan 6 adet biyosensör sistemlerine farklı konsantrasyonlarda MAGE-1 bağlanmasından sonra alınan EIS ve CV ölçüm sonuçları şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Şekil 4.8’de EIS ölçümlerinde görülen 6 elektrodun, BSA ölçümü farklı olduğundan dolayı görülen konsantrasyona göre artan sinyaller düzenli görülememektedir. Her bir elektrot kendi BSA ölçümü ile kıyaslanarak sonuçlar gözlenmiş ve grafiğe yansıtılmıştır. Şekil 4.8’de gösterilen EIS ve CV ölçümleri temsili olarak gösterilmiştir.



**Şekil 4.8** 30 dakika antiMAGE-1 ile hazırlanan farklı ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS (A) ve CV (B) ölçümleri: (-●-●-) mavi: BSA ölçümü, (-▲-▲-) mor: 0,04 pg/mL-0,96 pg/mL MAGE-1 ölçümleri.

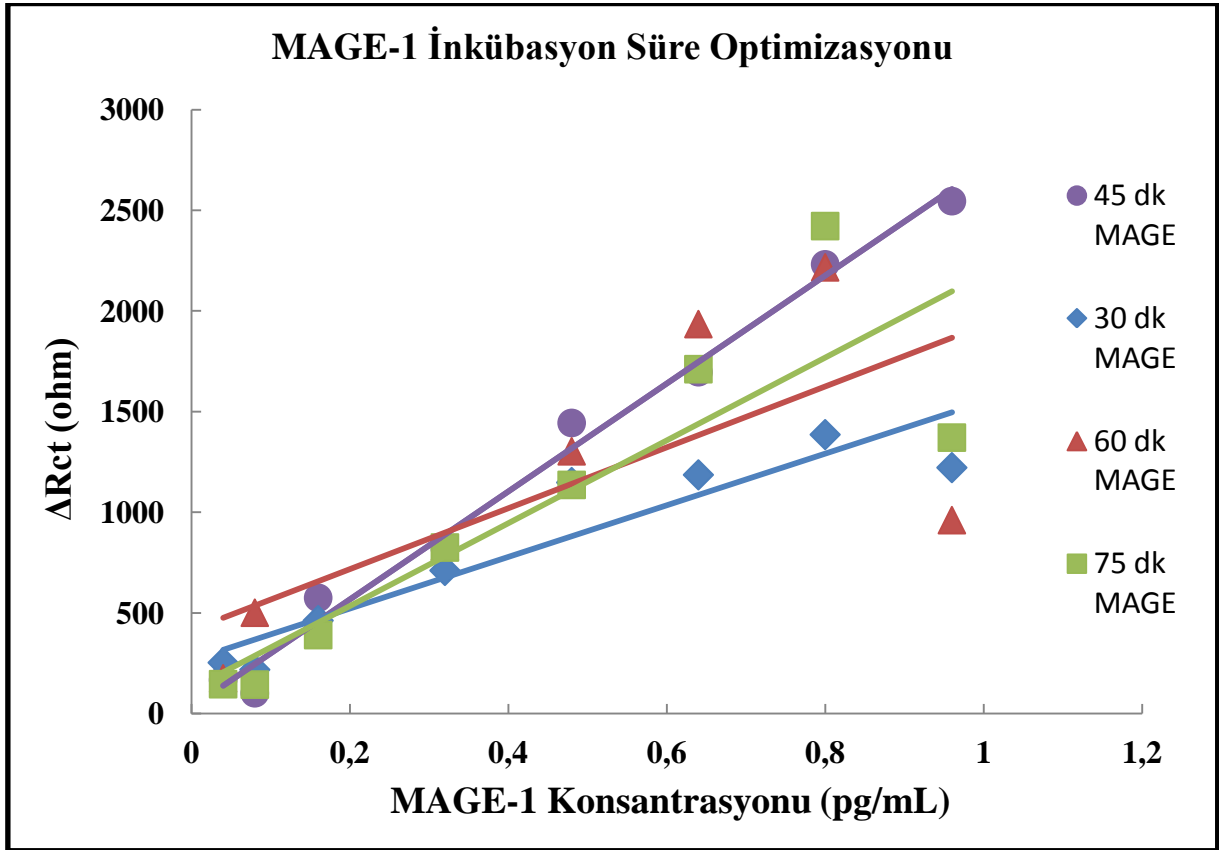
Yukarıdaki şekilde görülen 6 elektrodun MAGE-1 EIS sonuçları kendi BSA, EIS sonuçları ile karşılaştırılmış olsa da, artan MAGE-1 konsantrasyonu ile yalıtkanlık ve

sinyaller yükselmiştir. CV ölçümlerinde kapanan anodik ve katodik pikler, temsili olarak yüzeye daha fazla MAGE-1'in bağladığını görmemizi sağlamıştır.

#### 4.3.4 MAGE-1 inkübasyon süre optimizasyon bulguları

MAGE-1 süre optimizasyonu için 4 farklı çalışmada elektrotlar, 30 dakika, 45 dakika, 60 dakika ve 75 dakika MAGE-1 ile inkübe edilmiş. Çalışmalarda 8 elektrot sistemi geliştirilmiş ve 0,04-0,96 pg/mL konsantrasyon aralığına sahip MAGE-1 antijenleri ile inkübe edilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Her çalışmada çizilen grafikteki Rct(ohm) değerleri her bir elektrodun BSA ve MAGE-1 ile inkübasyonu sonucunda alınan EIS impedans eğrilerinin çap farklarının değerleridir.

Çıkan sonuçlara göre çizilen grafikler şekil 4.9'de, grafik denklemleri ve R<sup>2</sup> değerleri çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Çizilen tüm grafikler EIS ölçümlerinin sonucuna göre çizilmiştir.



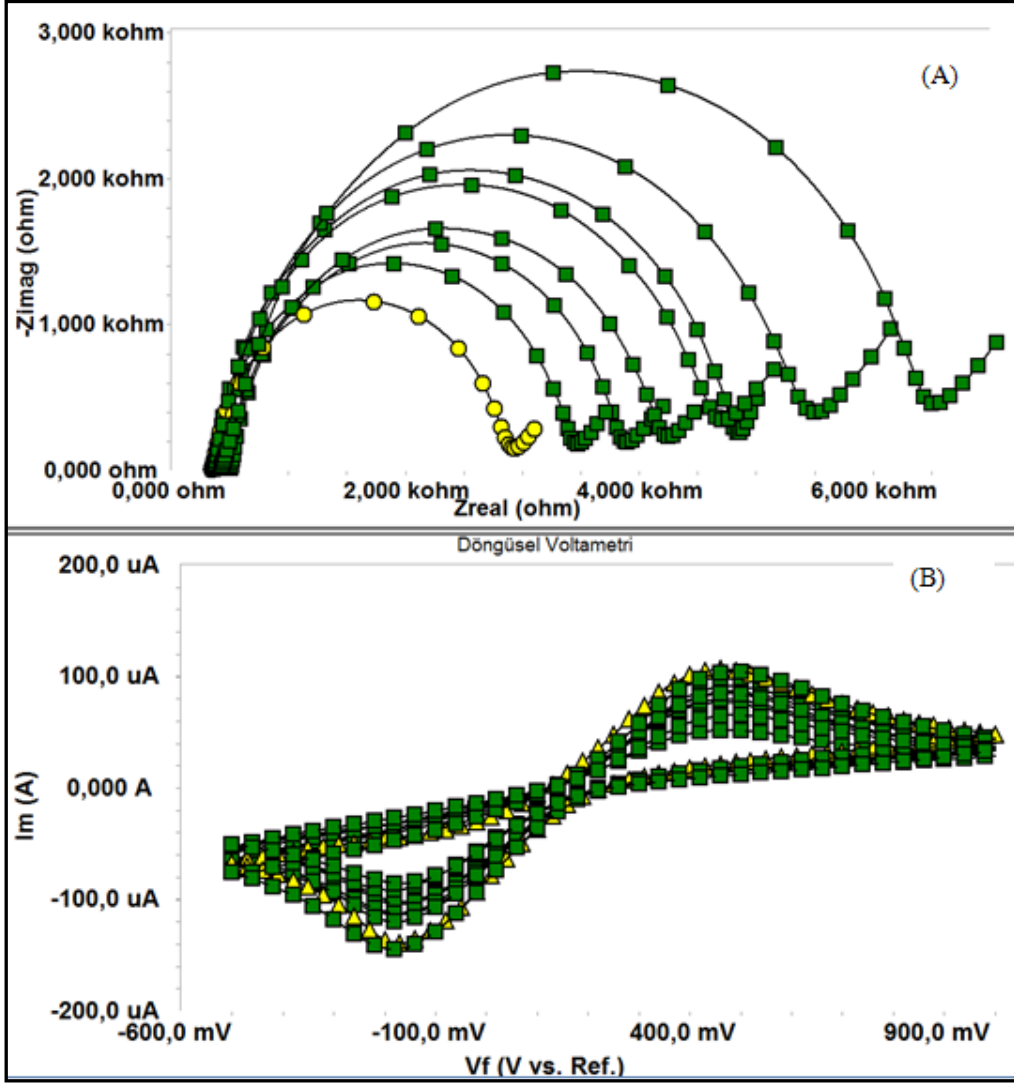
Şekil 4.9 Farklı MAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri

MAGE-1 ile İnkübasyon Süresi	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R <sup>2</sup> Değeri
30 Dakika	$y = 1282x + 265,59$	$R^2 = 0,875$
45 Dakika	$y = 2682,7x + 30,418$	$R^2 = 0,9891$
60 Dakika	$y = 1512,7x + 414,28$	$R^2 = 0,5135$
75 Dakika	$y = 2057,3x + 123,22$	$R^2 = 0,767$

**Çizelge 4.4** Farklı MAGE-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri sonuçları

Şekil 4.9’da görülen standart eğrilere bakılarak ideal MAGE-1 inkübasyon süresi 45 dakika olarak belirlenmiştir. 30 dakikalık çalışmada, MAGE-1’in bağlanması için yetersiz bir süre kullanıldığından sinyallerde ve standart grafiğin eğiminde ciddi bir düşüş olmuştur. 75 ve 60 dakikalık çalışmalarda fazla sürenin bozulmalara neden olmasıyla en yüksek MAGE-1 konsantrasyona sahip sensörlerde bozulmalar olmuş ve sinyal düşmüştür. Fakat 45 dakika inkübasyonda, sinyallerin yüksek ve doğrusal olması bu sürenin optimum olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.

Optimizasyon sırasında yapılan çalışmalar arasından 45 dakika inkübasyon süresine sahip MAGE-1 ile hazırlanan 7 biyosensör sistemlerine farklı konsantrasyonlarda MAGE-1 bağlanmasından sonra alınan EIS ve CV ölçüm sonuçları şekil 4.10’da gösterilmiştir.



**Şekil 4.10** 45 dakika MAGE-1 ile hazırlanan farklı ITO-Pet elektrot biyosensör sistemlerinin farklı MAGE-1 konsantrasyonlardaki EIS ölçümleri (A) ve CV ölçümleri (B): (-▲-▲-) sarı: BSA ölçümü, (-■-■-) yeşil: 0,04pg/mL-0,96 pg/mL MAGE-1 ölçümleri.

Şekil 4.10'da EIS ölçümlerinde görülen 7 elektrodun, BSA ölçümü farklı olduğundan dolayı görülen konsantrasyona göre artan sinyaller düzenli görülememektedir. Her bir elektrot kendi BSA Rct değeri ile kıyaslanarak sonuçlar gözlenmiş ve grafiğe yansıtılmıştır. Şekil 4.10'da gösterilen EIS ve CV ölçümleri temsili olarak gösterilmiştir.

Yukarıdaki şekil 4.10'da görülen 7 elektrodun MAGE-1 EIS sonuçları kendi BSA, EIS sonuçları ile karşılaştırılmış olsa da, artan MAGE-1 konsantrasyonu ile yalıtkanlık ve sinyaller yükselmiştir. CV ölçümlerinde anodik ve katodik piklerin kapanışı temsili olarak yüzeye daha fazla MAGE-1'in bağladığını görmemizi sağlamıştır.

### 3.2 Tayin Aralığı Bulguları

Optimum immobilizasyon koşullarını belirledikten sonra en uygun tayin aralığını belirlemek için 3 farklı aralıkta çalışma gerçekleştirilmiş fakat sadece bir tane aralıkta olumlu sonuçlar elde edilmiş ve çalışmanın kalan kısımları için bu aralık kullanılmıştır.

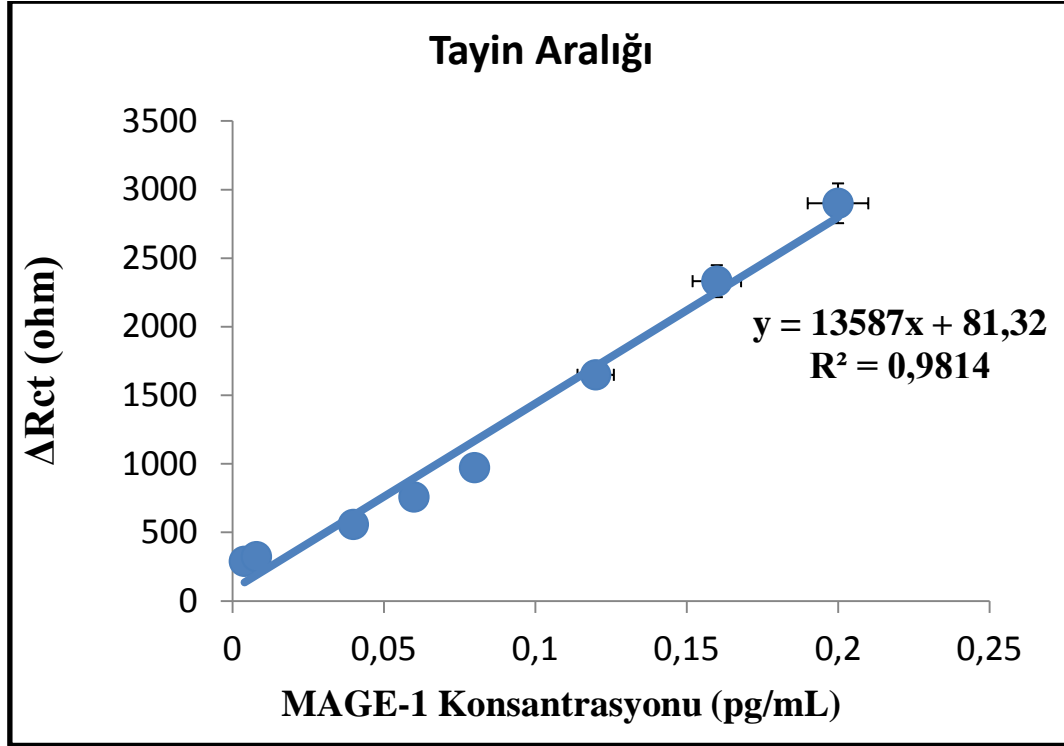
Yapılan bu bilimsel çalışmanın amacı kan serumundaki MAGE-1 tayini olmasından dolayı, tayin aralığı oldukça geniş tutulmak istenilmiş fakat çalışmalarında en sağlıklı sonuç veren tayin aralığı seçilmiştir.

0,004 pg/mL-0,96 pg/mL MAGE-1 konsantrasyonu aralığında sekiz sensör denenmiş, fakat olumlu bir yanıt alınamamıştır.

0,004 pg/mL-0,32 pg/mL MAGE-1 konsantrasyonu aralığında sekiz sensör denenmiş, fakat sağlıklı sonuçlar alınamamıştır.

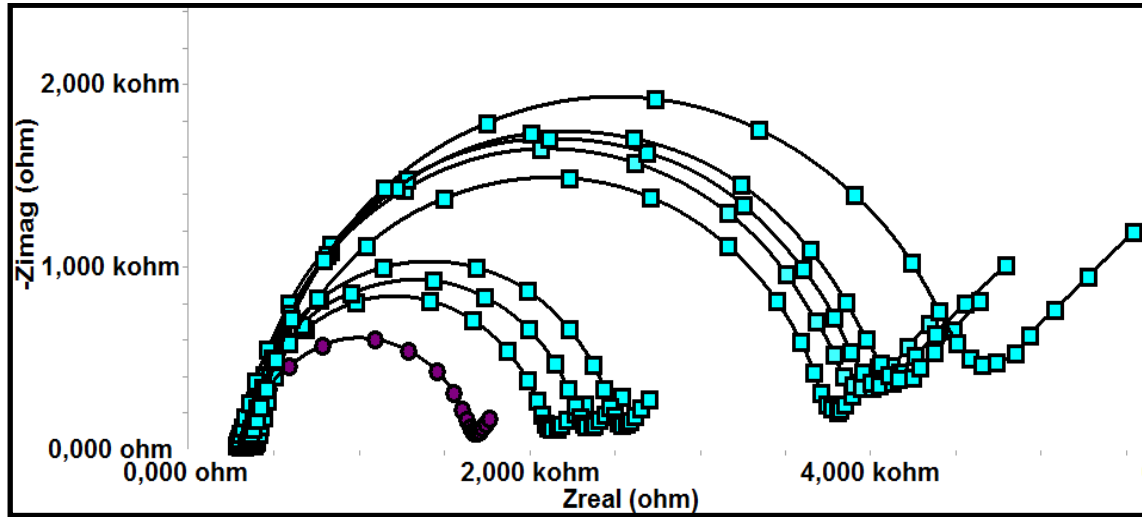
Son olarak 0,004 pg/mL- 0,2 pg/mL MAGE-1 konsantrasyonu aralığında sekiz sensör denenmiş ve en iyi yanıtlar alınmıştır. Bu tayin aralığı için tayin limiti (LOD) değeri  $9,86.10^{-7}$  ve ölçüm limiti (LOQ) değeri  $3,29.10^{-6}$  olarak hesaplanmıştır.

EIS sonuçlarına göre çizilmiş standart grafik şekil 4.11'de gösterilmiştir. Çıkarılan tüm sonuçlar, MAGE-1 ile BSA, EIS ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinin farkı alınarak hesaplanmıştır. 0,004-0,2 pg/mL konsantrasyon aralığına sahip MAGE-1 çözeltileri ile inkübe edilmiş biyosensörlerin EIS ölçümleri şekil 4.12 'de temsili olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.11 Optimum koşullar altında belirlenen tayin aralığı standart grafiği

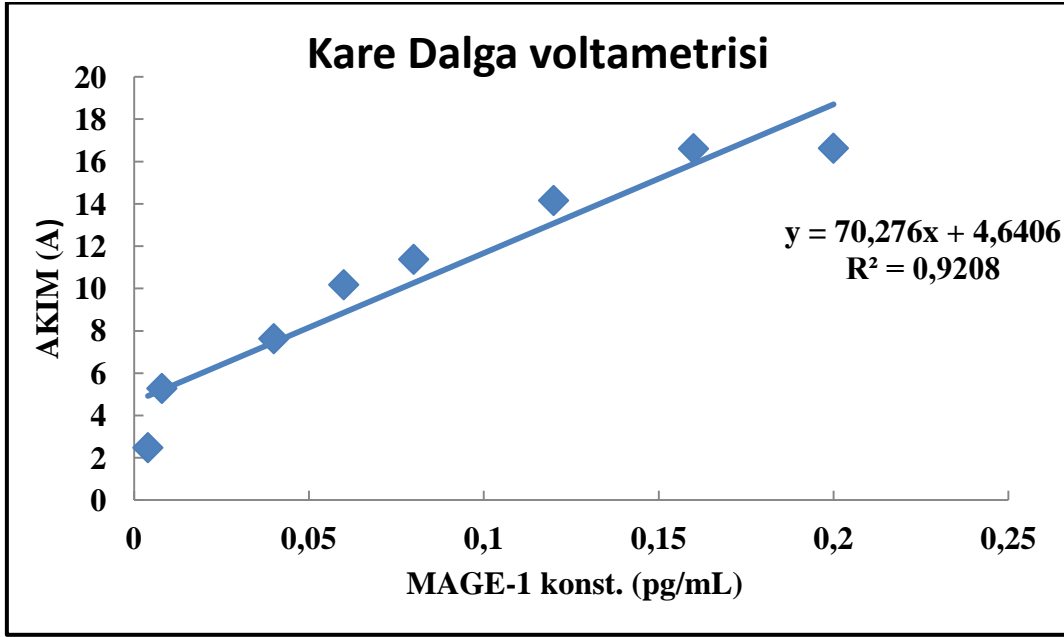
Belirlenen tayin aralığı, çalışmanın kalan tüm kısmında kullanılmıştır. Tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, karedalga voltametri, gerçek serum örnekleri, rejenerasyon çalışmaları bu tayin aralığına göre çalışılmıştır.



Şekil 4.12 Belirlenen tayin aralığının EIS ile ölçümleri: (-●-●-) BSA, (-■-■-) mavi: 0,004-0,2 pg/mL MAGE-1

### 4.3 Kare Dalga Voltametri ile Ölçüm Bulguları

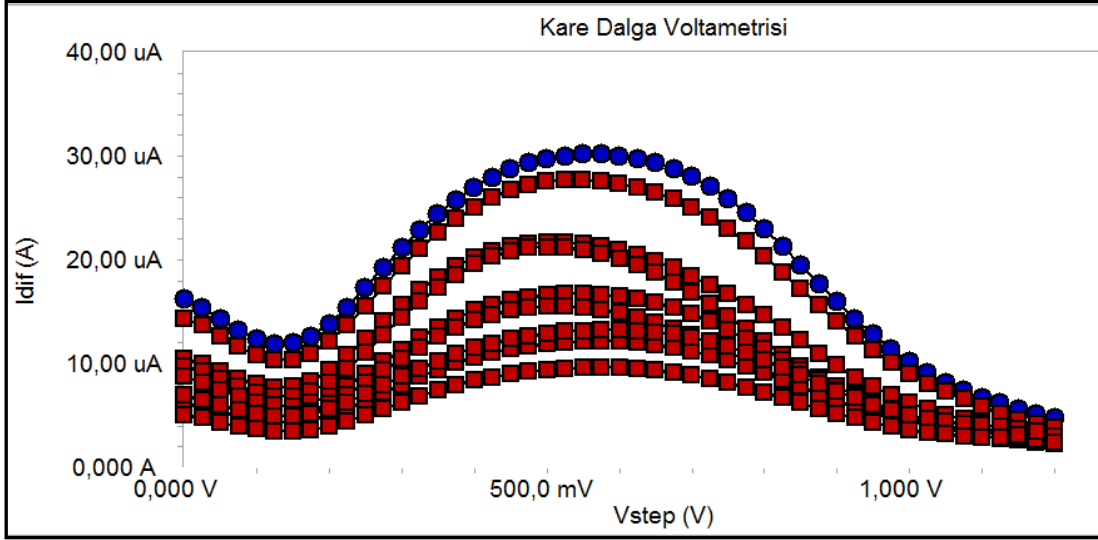
Her çalışmada sadece EIS ve CV ölçümleri alınmış olsa da geliştirilen sensörün diğer ölçümlerde de olumlu sonuç verebildiğini görmek için karedalga voltametri ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. BSA ve MAGE-1 ile inkübasyonundan sonra sırasıyla 8 elektrodun SWV ölçümü alınmıştır. Her bir elektrot için hesaplama yapılırken kendi BSA pikleri ile MAGE-1 pikleri arasındaki fark ele alınmış ve şekil 4.13'deki grafik elde edilmiştir. Belirlenen tayin aralığının SWV ölçümüne verdiği yanıtlardan oluşan olumlu sonuçlar aynı biyosensör sisteminin sadece EIS değil diğer ölçümlerde de kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır.



Şekil 4.13 SWV sonuçlarından elde edilen standart grafik

Şekil 4.14'de optimal koşullarda 0,004-0,2 pg/mL tayin aralığındaki MAGE ölçümüne ait kare dalga voltamogramlarının kalibrasyon grafiğini göstermektedir. SWV ölçümlerinde elektrotların verdiği yanıtlarda en küçük konsantrasyona sahip MAGE-1 gözlenen pik en büyük değere sahiptir ve artan MAGE-1 konsantrasyonu ile pik değerlerin de küçülmeler olduğu tespit edilmiştir ve dolayısıyla BSA ile MAGE-1 voltagramlarının arasındaki fark artmıştır. Bu durum da doğrusal olarak artan akım farkın ile birlikte daha fazla MAGE-1 proteinin yüzeye bağlandığını göstermiştir.





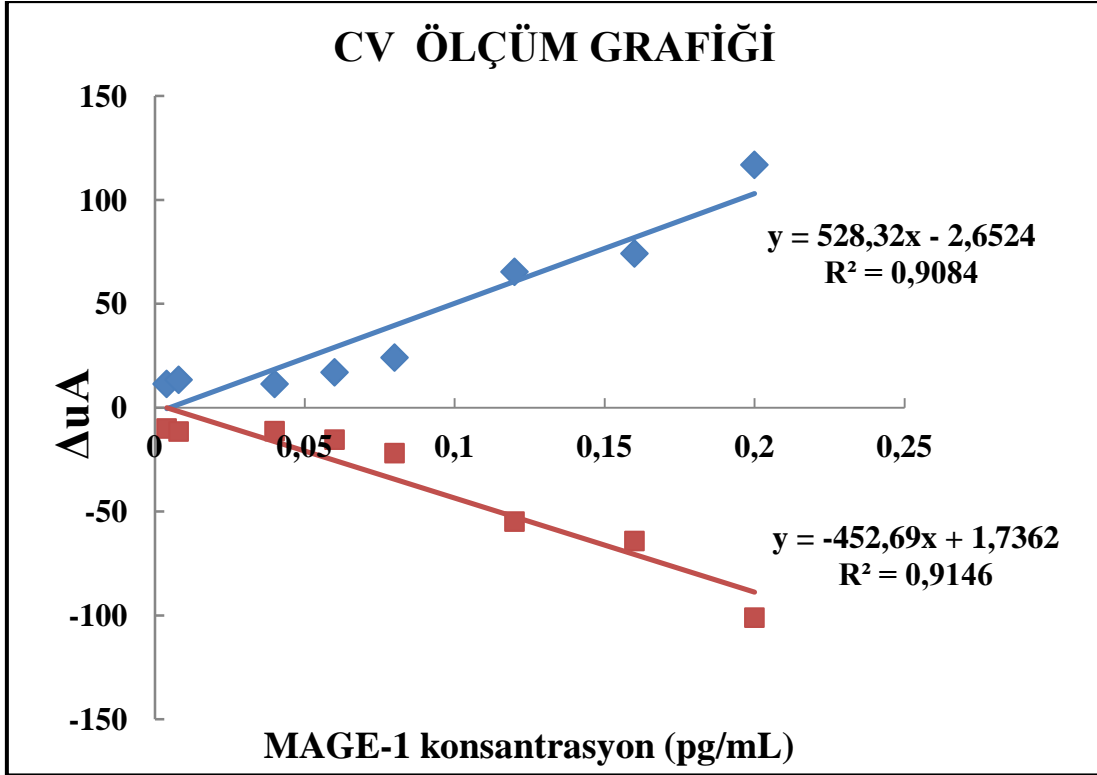
**Şekil 4.14** Belirlenen tayin aralığının SWV ile ölçümleri: (-●-●-) mavi: BSA ölçümü, (-■-■-) kırmızı: 0,004-0,2 pg/mL MAGE-1 ölçümleri.

#### 4.4 Tayin Aralığının CV Sonuçları İle Hesaplanması

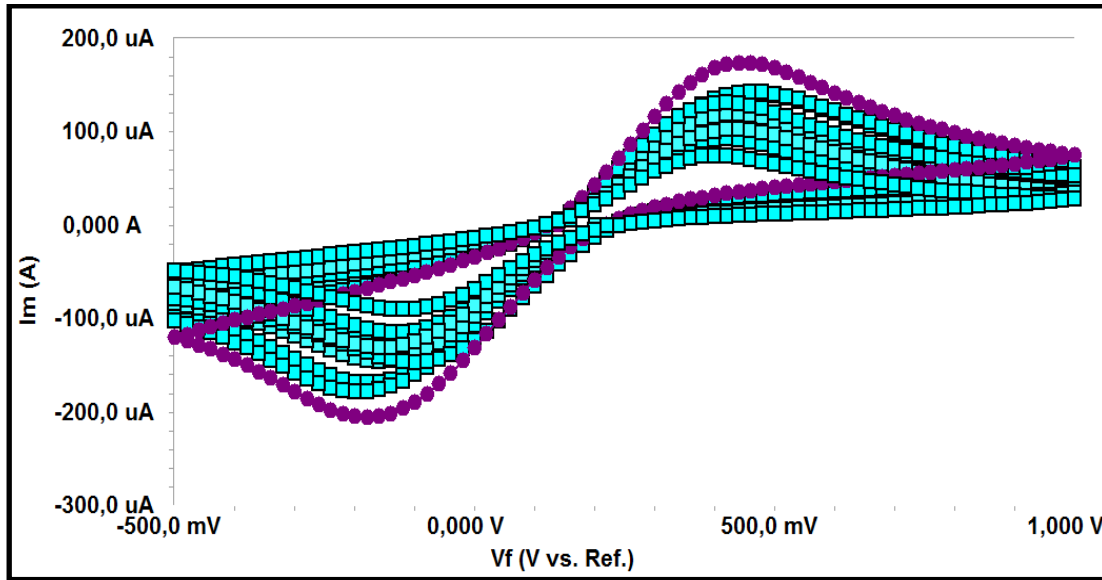
Çalışmanın her basamağında EIS ölçümleri ile birlikte CV ölçümleri de alınmaktadır. Standart grafikler EIS ölçümleri temel alınarak çizilmiş olsa da SWV çalışmasında olduğu gibi, geliştirdiğimiz biyosensörün doğruluğu CV ölçümleri ile de kanıtlanmıştır.

Şekil 4.15’de görülen, CV ölçümleri baz alınarak, anodik ve katodik piklerin farklılıklarına göre standart grafik çizilmiştir. Her biyosensöre ait değerler, kendi BSA ve MAGE-1, CV ölçümlerindeki pik farkları ele alınarak hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir. 0,004-0,2 pg/mL konsantrasyon aralığına sahip MAGE-1 çözeltileri ile inkübe edilmiş biyosensörlerin CV ölçümleri şekil 4.16 ‘de temsili olarak gösterilmektedir.

Şekilde aynı zamanda anodik ve katodik pik değer farkları ile çizilen standart eğrilerin grafik değerleri bulunmaktadır. Bu verilerde de görüldüğü gibi iyi birer doğrusallığa sahip standart eğriler elde edilmiş ve geliştirilen biyosensörün tayin aralığı bir başka elektrokimyasal ölçüm tekniğiyle doğruluğu ispatlanmıştır.



Şekil 4.15 CV ölçümlerine dayalı anodik ve katodik değerlerin standart grafikleri



Şekil 4.16 Belirlenen ideal tayin aralığının CV ile ölçümleri: (-●-●-) mor: BSA ölçümü, (-■-■-) mavi: 0,004-0,2  $pg/mL$  MAGE-1 ölçümleri

#### 4.5 Tekrarlanabilirlik Bulguları

Tekrarlanabilirlik çalışmasında optimum koşullar altında, 20 elektroda aynı immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve her bir sensör 0,08  $pg/mL$  MAGE-1

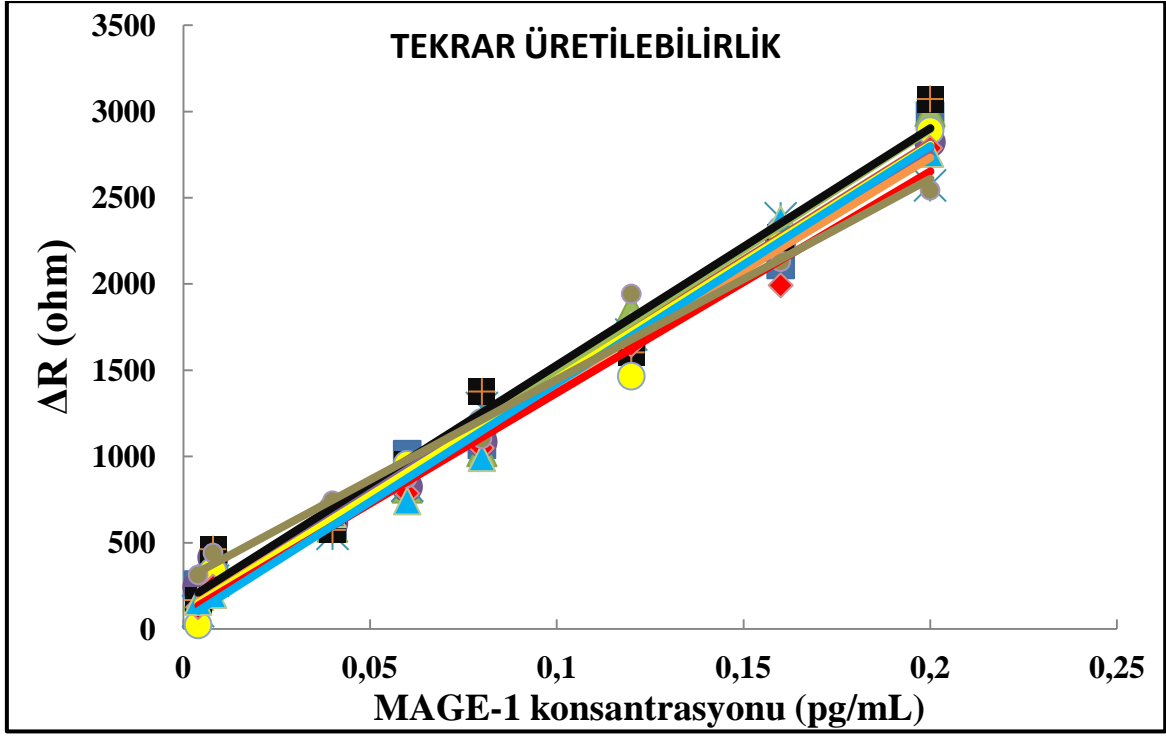
konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir. Her bir elektrodun BSA- EIS ölçümü ve MAGE-EIS ölçümünden elde edilen Rct değerleri karşılaştırılmış ve birbirine oldukça yakın sinyaller elde edilmek amaçlanmıştır. Hedeflenen değer büyük ölçüde tutturulmuş olsa da her elektrot kendi sinyalini ortaya koymuş ve sonuç olarak %5,54'lik bir yüzde sapma gözlenmiştir. Bu durum geliştirilen sensör için oldukça olumlu bir sonuçtur. Her defasında farklı bir sensör ile aynı konsantrasyonu ölçebildiğimizi bizlere kanıtlamıştır.

Analitik hesaplamalar neticesinde ortalama değer 0,0806 pg/mL , standart sapma ise 0,004467 pg/mL'dir. Varyasyon katsayısı % 5,54'tür. Bu durum, biyosensörün aynı standart MAGE-1 çözeltisi konsantrasyonu için tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini net bir şekilde göstermektedir.

#### **4.6 Tekrar Üretilirlik Bulguları**

Tekrar üretilebilirlik çalışması, tayin aralığında 8 elektrot ile yapılan sensör sistemlerinin aynısını defalarca geliştirebildiğimizi göstermek amaçlı gerçekleştirilmiştir. 10 ayrı çalışma yapılarak sistemler geliştirilmiş ve oldukça güzel sonuçlara varılmıştır. Her bir çalışmanın sonunda çizilen standart grafikler şekil 4.17'de gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi sinyaller ve standart grafiğin eğimleri birbirlerine çok çok yakındır. Her bir grafik iç içe geçmiş olduğundan hangi eğri hangi çalışmaya ait olduğunu seçmek oldukça zordur. Bu durum yaptığımız çalışmanın doğruluğunu ve defalarca ve her istediğimizde aynı sistemi geliştirebildiğimizi göstermektedir.

Çizelge 4.5'de her bir çalışmanın standart grafiği verileri bulunmaktadır. Bu verilerde de görüldüğü gibi eğimler (m değerleri) ilk belirlenen tayin aralığındaki 13587 eğim değerine ve kendi aralarında birbirlerine oldukça yakın değerlerdir. Bu da bir kez daha çalışmanın başarısını kanıtlamıştır.



Şekil 4.17 Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğrileri

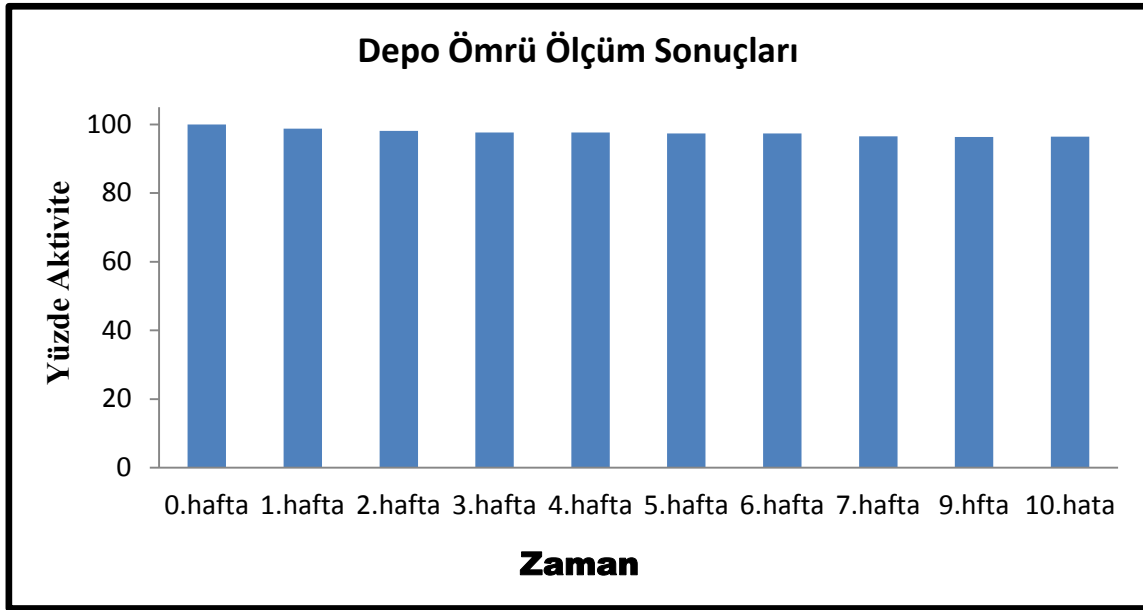
STANDART EĞRİ TÜRÜ	GRAFİK DENKLEMİ	GRAFİĞİN R <sup>2</sup> DEĞERİ	TAYİN ARALIĞI
Tekrar Üretilirlik 1	$y = 13227x + 143,91$	0,9844	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 2	$y = 13547x + 108,32$	0,9933	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 3	$y = 13956x + 105,68$	0,9821	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 4	$y = 12988x + 152,41$	0,9901	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 5	$y = 13110x + 111,55$	0,9853	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 6	$y = 13748x + 154,96$	0,9781	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 7	$y = 13562x + 94,668$	0,9827	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 8	$y = 12846x + 84,028$	0,9901	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 9	$y = 13751x + 50,318$	0,9893	0,004-0,2 pg/mL
Tekrar Üretilirlik 10	$y = 11641x + 282,88$	0,9791	0,004-0,2 pg/mL

**Çizelge 4.5** Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğri değerleri

### 3.7 Geliştirilen Biyosensörün Depo Ömrü Bulguları

Her bilimsel çalışmada olduğu gibi, yaptığımız bu çalışmanın da daha verimli bir çalışma olması için raf ömrünün uzunluğu oldukça önemlidir. Depo çalışması 10 haftalık bir çalışmadır ve 11 farklı sensör ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işlemleri tamamlanan 10 elektrot +4°C kapalı ve karalılık ortamda saklanmış ve depo günün başladığı tarihten itibaren her hafta bit tane sensör 0,08 pg/mL MAGE-1 inkübe edilerek oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. 0. Haftadan itibaren (başlangıçtan itibaren) ölçülen EIS ölçümlerinin  $y=13587x + 81,32$  denklemine göre sonuçları hesaplanmıştır. Gerekli hesaplamaların sonucunda, 10 haftalık depo ömrünü tamamlamış sensörlerde ilk haftaki MAGE-1 ölçümlerindeki sonuçlardan kaybının %3.58 olduğu sonucuna ulaşılmıştır. İdeal bir

biyosensör karakteri olan uzun raf ömrü özelliğini taşıyan sensörler geliştirdiğimiz bu çalışma ile kanıtlanmıştır. Hesaplamalara göre çizilen depo ömrü grafiği şekil 4.18'de gösterilmiştir.

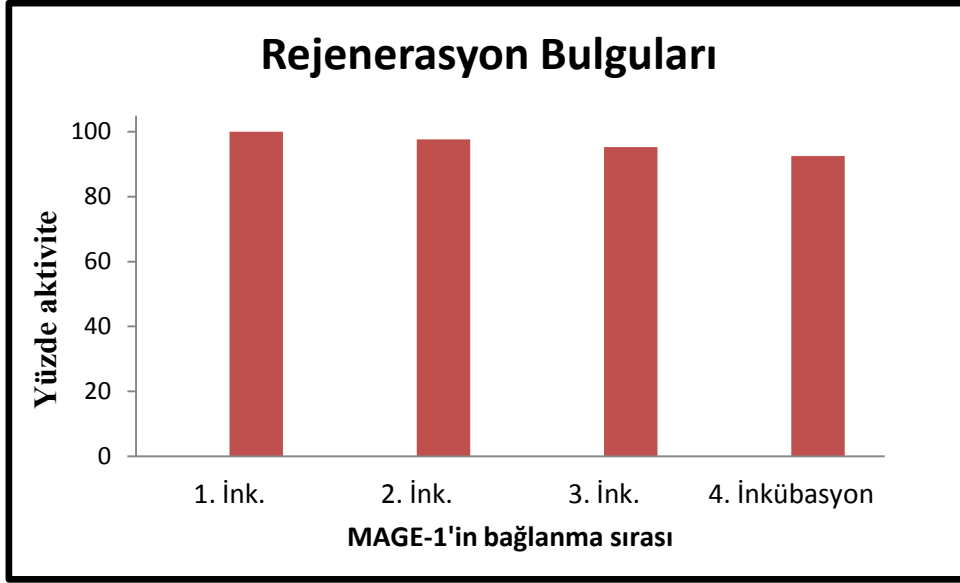


Şekil 4.18 Haftalık depo ömrü sonuçları

#### 4.8 Rejenerasyon Bulguları

Yapılan çalışmada geliştirilen biyosensör tek kullanımlık olsa da rejenerasyon işlemi gerçekleştirilerek biyosensörün 4 defa MAGE-1 ölçümünde kullanılabildiği ispatlanmıştır. 10 mM HCl asit çözeltisinin içerisinde 5 dakika bekletilerek rejenere edilen sensörler 4 defa rejenere olarak 5 defa MAGE-1 bağlamış, 4. bağlanmada da % 93'lük bir kazanç ile MAGE-1'i bağlayabildiği gözlenmiş ve 5. Bağlanmada bozulmalar meydana gelmiştir. Sonuçların grafiğe dökülmüş hali şekil 4.19'da görülmektedir.

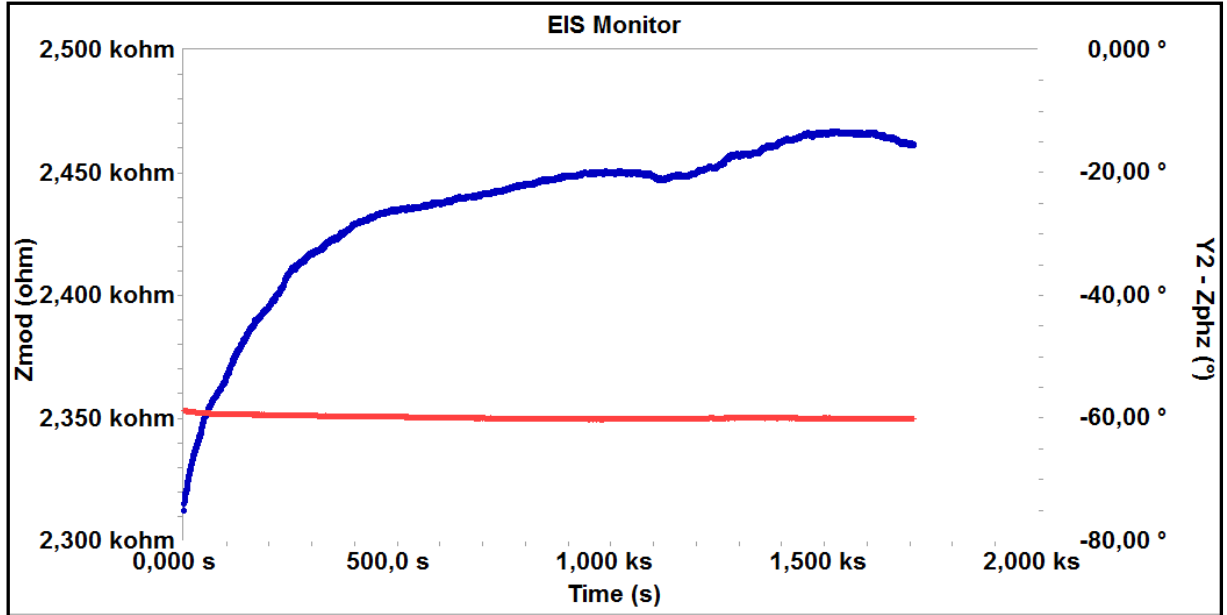
Geliştirdiğimiz bu biyosensörün gerçek tıbbi uygulamalarda daha kullanışlı ve ekonomik olması için depo ömrünün yanında birden fazla kullanım özelliğine de sahip olması çok önemlidir. Yapılan rejenerasyon işleminde elektrotların 4 kez yüksek verimle aynı biyosensörün kullanılabildiği gözlenmiş ve tıbbi uygulamalarda kullanılacağı düşünülürse oldukça ekonomik özelliğe sahip olacağı kanıtlanmıştır.



Şekil 4.19 Rejenerasyon çalışmasının sonuçlarının grafikteki görünümü

#### 4.9 Sabit Frekans İle Ölçüm Bulgular

Geliştirilen biyosensörün MAGE-1'i bağlayışını anlık olarak izleyebilmek adına gerçekleştirilen sabit frekans çalışmasında frekans olarak 45 Hz seçilmiş ve 0,16 pg/mL konsantrasyona sahip MAGE-1 çözeltisinde ölçüm alınmıştır. Ölçüm yaklaşık 30 dakika sürmüştür ve faz açısının ve sabit frekanstaki Zmod (ohm) değerleri şekil 4.20'de görüldüğü gibidir.



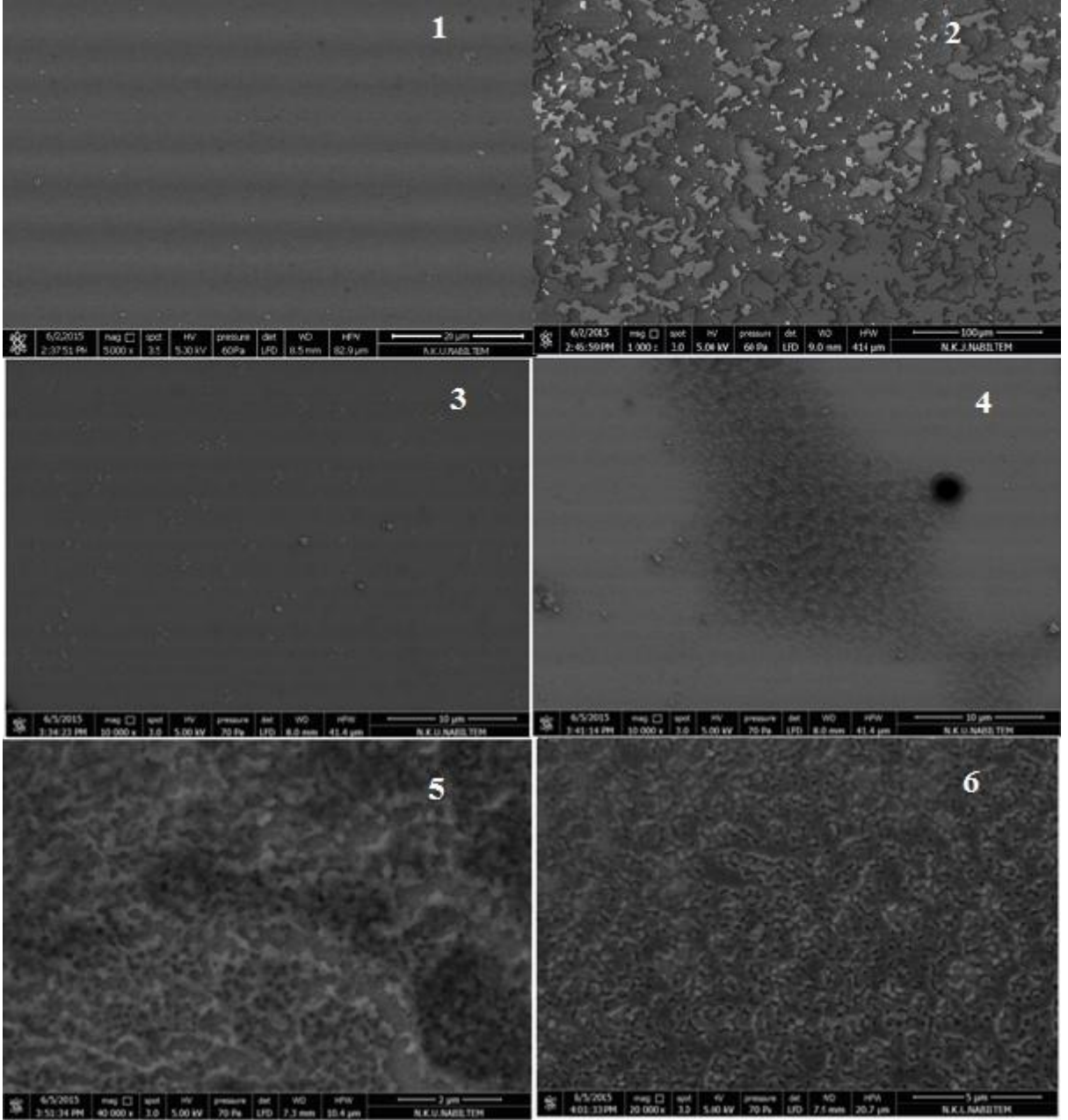
Şekil 4.20 Sabit frekansta biyosensör yüzeyine MAGE-1 bağlanışının ölçümleri: mavi; sabit frekans ölçümü, kırmızı; faz açısı ölçümü.

Şekilde de görüldüğü üzere ilk 500 saniyede elektrot yüzeyine MAGE-1 bağlanması hızlı daha sonraki süre zarfında ise daha yavaş bir artışla ölçüm ilerlemiştir.

#### **4.10 İmmobilizasyon Basamakları ve Bağlanmış MAGE-1'in SEM Görüntüleri**

SEM tekniği biyosensörün optimum koşullarda hazırlanırken her bir aşamasında yüzeyde meydana gelen değişiklikleri morfolojik olarak incelemek için kullanılan bir tekniktir. SEM cihazı ile biyosensörün yüzeyindeki CTES, antiMAGE-1, BSA ve MAGE-1 görüntüleri şekil 4.21'de görülmektedir.



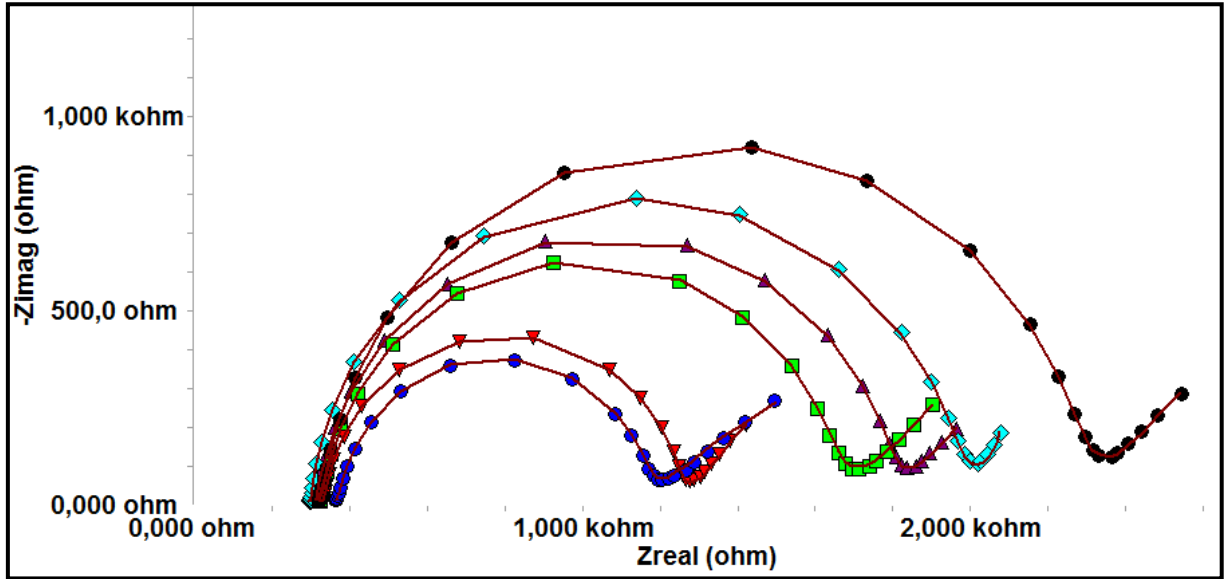


**Şekil 4.** 21 SEM cihazı ile biyosensörün yüzeyinin görüntüleri: 1: ITO-Pet, 2: ITO/OH, 3: ITO/OH/CTES, 4: ITO/OH/CTES/EDC-NHS/antiMAGE-1, 5: ITO/OH/CTES/EDC-NHS/antiMAGE-1/BSA, 6: ITO/OH/CTES/EDC-NHS/antiMAGE-1/BSA/MAGE-1

#### 4.11 MAGE-1 Temelli Biyosensörün Kramers-Kronig Sonuçları

Kramers Kronig transformu, geliştirilen biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kullanılır. Kramers Kronig yöntemi, elektrokimyasal impedans

spektroskopisinin yorumlanması ve analizi için oldukça önemlidir. Çalışmanın her aşaması için analiz edilmiş her bir Kramers Kronig transformu şekil 4.22’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.22** Tasarlanan biyosensörün Kramers-Kronig sonuçları: mavi (-●-●-): ITO/OH. kırmızı(-▼-▼-): ITO/OH/CTES, yeşil(-■-■-):ITO/OH/CTES/EDC-NHS, mor(-▲-▲-): ITO/OH/CTES/EDC-NHS/Anti-MAGE-1, turkuaz (-◆-◆-): ITO/OH/CTES/EDC-NHS/Anti-MAGE-1/BSA, siyah (-●-●-): ITO/OH/CTES/EDC-NHS/AntiMAGE-1/BSA/MAGE-1

Şekil 4.22’deki impedans spektrumlarından elde edilen Kramers Kronig transformunun fit değerleri Tablo 4.6 da verilmiştir.

Biyosensör Yüzeği	Fit değerleri ( $e^6$ )
ITO/ OH	11,22
ITO/ OH/CTES	2,605
ITO/ OH/CTES/EDC-NHS	2,798
ITO/ OH/CTES/EDC-NHS/Anti-MAGE-1	1,324
ITO/ OH/CTES/EDC-NHS/Anti-MAGE-1/BSA	3,821
ITO/ OH/CTES/Anti-MAGE-1/BSA/MAGE-1	0,62

**Çizelge 4.6** AntiMAGE 1 temelli biyosensörün farklı aşamalarında Kramers-Kronig transformu

#### 4.12 Gerçek Serum Örnekleri ile Çalışmaların Bulguları

Analitik çalışmaların son basamağında; hazırlanan biyosensörler gerçek serum örneklerinde MAGE-1 tayini için kullanılmıştır. 10 tane bireyden alınan serum örnekleri MAGE1 tayini için hazırlanmıştır. Sağlıklı bireylerin kanında bulunan MAGE-1

konsantrasyon değeri 0-50 pg/mL aralığındadır. Bu aşamada her bir bireyden alınan serum örnekleri 300 kat seyreltilerek elektrotlara uygulandı. Lineer denklem kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Hesaplamalar sonucu elde edilen her bir bireyin kan serumundaki MAGE-1 değerleri çizelge 4.7' de gösterilmektedir.

Kan Serumu Örnek Numarası	MAGE-1 Konsantrasyonu (pg/mL)	Sağlıklı Bireylerin Kan Serumlarında Bulunan MAGE-1 konsantrasyonu
1	40,16	0-50 pg/mL
2	27,59	0-50 pg/mL
3	9,91	0-50 pg/mL
4	3,11	0-50 pg/mL
5	12,80	0-50 pg/mL
6	16,00	0-50 pg/mL
7	8,05	0-50 pg/mL
8	11,28	0-50 pg/mL
9	22,48	0-50 pg/mL
10	10,39	0-50 pg/mL

**Tablo 4.7** Geliştirilen biyosensör ile, 10 sağlıklı bireyin kan serumunda, MAGE-1 miktar tayininden elde edilen, MAGE-1 konsantrasyon (pg/mL) sonuçları

Sonuçlarda da görüldüğü gibi hazırladığımız biyosensör spesifik olarak MAGE-1 antijenini bağlamış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Her bir sağlıklı bireyin kan serumundaki MAGE-1 değeri, literatür bilgisine uygun olarak 0-50 pg/mL aralığındaki konsantrasyon değerlerine sahiptir.

## 5. SONUÇ

Günümüzde artan kanser hastalığı ve kanser yapıcı etmenlerin giderek artması, hayatımızda kanser hastalığının daha kötü bir konuma getirmektedir. Erken teşhis ile hastalıktan kurtulma şansı fazla olsa bile maalesef günümüzde hala kanser hastalığı sebebi ile ölümler oldukça yüksek yüzdelerle sahiptir. Ülkemizde ve dünyadaki ölüm sebeplerinin arasında ikinci sırayı alan kanser hastalığı her nesli tehdit eden bir hastalık haline gelmiştir.

Bilim dünyası kanser hastalığı tedavileri ve ilaçları üzerine yüklenmiş olsa da hastalığın erken teşhisi için oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Kanser biyomarkerlarının keşfi bu çalışmaları hızlandırmış ve bilim dünyasının yeni bir yöntem kapısı açılmıştır. Kanser biyomarkerları günümüzde prognoztaik yöntemlerde aktif olarak kullanılmaktadır. Biyomarkerların aktif olarak kullanımlarının artması ile kanserde erken teşhis yüzdelerinin artması beklenmektedir.

Bu tez çalışmasında antiMAGE-1 temelli biyosensör ile kantitatif tayini hedef alınmış MAGE-1 kanser biyomarkerı, bir çok kanser tümöründe etki eden bir antijendir. Kendiliğinden oluşan akyuvar hücrelerinin oluşumunu destekler ve kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamaktadır.

Literatürde MAGE protein ailesi ile bir çok çalışma bulunsa da MAGE proteinin kantitatif analizinin yapıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. MAGE-1 antijeni gerçek serumdaki değerini ölçmeye dayalı tasarladığımız biyosensör sistemi literatürde bir ilk olmaya adaydır.

Tasarlanan bu biyosensörün temeli olarak ITO-Pet elektrot kullanılması tercih edilmiştir. İndiyum kalay oksit ile kaplı yüzeyi bulunun polietilen tereftalat oldukça kullanışlı bir malzemedir. Uygun fiyatı ve kullan at özelliği ile tasarlanan biyosensöre önemli avantajlar katmıştır. İmmobilizasyon işlemleri indiyum kalay oksit yüzeyine gerçekleştirilmiştir ve ITO-Pet elektrotların başarılı bir şekilde biyosensör olarak kullanılabilceği gözlenmiştir.

Yani yapılan bu tez çalışmasında MAGE-1 kanser antijeninin tayinine özel antiMAGE-1 temelli biyosensör sistemi geliştirilmiştir. ITO-Pet elektrot yüzeyindeki her bir immobilizasyon basamağı optimize edilmiştir. Gerekli tüm koşullar sağlandıktan sonra, biyosensör MAGE-1 kanser antijenini spesifik olarak bağlanabildiği gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda MAGE-1 antijenini; kantitatif analizini gerçekleştiren, yüksek hassasiyete, uzun depo ömrüne sahip, tekrar edilebilirliği ve tekrar üretilebilirliği yüksek, tek

kullanımlık, uygun ekonomik değerlere sahip ve literatürde benzeri bulunmayan bir biyosensör tasarlanmıştır.

Yapılan tüm sonuçların olumlu cevabı, gerçek serum örneklerinde, biyosensörün MAGE-1 antijenini bağlayabilmesi ile alınmıştır. Bu çalışmanın tıp dünyasında ve gündelik hayatta kullanımı, kanserde erken teşhis de farklı bir olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. Ekonomik ve kolay bir uygulama ile hayata geçirilebilirse insanlar doktor sırasında beklemeden hastalık teşhisini evlerinde gerçekleştirebilecekleri ön görülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abasıyanık M. F, Şakalar E., Şenel M. (2009) Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan biyosensörler.
- Anonim (2012). Kanser Çeşitleri <http://www.kanserdesifresi.com/Kanser-Cesitleri.php>. Erişim Tarihi: 03.04.2015
- Anonim (2013). Kanser İnsidansları [http://kanser.gov.tr/dosya/ca\\_istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_istatistikleri.pdf](http://kanser.gov.tr/dosya/ca_istatistik/Turkiye_Kanser_istatistikleri.pdf). Erişim Tarihi: 03.04.2015
- Barker P A, Salehi A, (2002). The MAGE Proteins: Emerging Roles in Cell Cycle Progression, Apoptosis, and Neurogenetic Disease. *Journal of Neuroscience Research* 67: 705–712.
- Bohunicky B, Mousa S. A. (2011). Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol Sci Appl*. 4: 1-10
- Bulut Y, (2011). Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış. 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11)
- Chambers J. P, Arulanandam B. P, Matta L L, Weis A, Valdes J J, (2008). Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol* 10(1-2): 1-12
- Cho W (2007). Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer*. 6: 25
- D'Souza S. F, (2001). Microbial biosensors. *Biosens Bioelectron*, 16(6): 337-353
- Easton, D.F., Ford, D., Bishop, D.T., (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet*. 56: 265-271.
- Ferrer-Miralles N, Feliu J.X, Vandevuer S, Muller A, Cabrera-Crespo J, Ortmans I. (2001). Engineering regulable *Escherichia coli* beta-galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera. *J Biol Chem* 276(43): 40087-40095.
- Fikret Özgür (2007). En Sık Görülen Kanser Türleri, İlgili Tarama ve Tanı Yöntemleri <http://bilheal.bilkent.edu.tr/aykonu/ay2007/nisan07/kanser.html>. Erişim Tarihi: 03.04.2015

- Gosselin E, Denis O, Cauwenberge A. V, Conti J, Vanden Eynde J.J, Huygen K, Coninck J. D. (2012). Quantification Of The Trichothecene Verrucarin-A In Environmental Samples Using An Antibody-Based Spectroscopic Biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166–167: 549–555
- Henry L N, Hayes D. F, (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology* 6: 140–146
- Jiang J, Xie D, Zhang W, Xiao G, Wen J, (2013). Fusion of Hsp70 to Mage-a1 enhances the potency of vaccine-specific immune responses. *Journal of Translational Medicine* 11: 300-310
- Jolly P, Formisano N, Estrela P, (2014). DNA aptamer-based detection of prostate cancer. *Chemical Papers*, 69(1): 77–89
- Karbach J, Gnjatic S, Biskamp M, Atmaca A, Weidmann E, Brandt K, Wahle C, Bernhard H, Knuth A, Jager E, (2014). Long-term Complete Remission following Radiosurgery and Immunotherapy in a Melanoma Patient with Brain Metastasis: Immunological Correlates. *American Association for Cancer Research* 2(5): 404-409
- Ladelfa M. F, Peche L Y, Toledo M F, Laiseca J E, Schneider C, Monte M, (2012). Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function. *Cancer Letters* 325: 11–17
- Mulchandani P, Hangarter C. M, Lei Y, Chen W, (2005). Ashok Mulchandani Amperometric microbial biosensor for *p*-nitrophenol using *Moraxella* sp.-modified carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3): 523–527
- Ogata K, Aihara R, Mochiki E, Ogawa A, Yanai M, Toyomasu Y, Ando H, Ohno T, Asao T, Kuwano H, (2011). Clinical Significance of Melanoma Antigen-Encoding Gene-1 (MAGE-1) Expression and its Correlation with Poor Prognosis in Differentiated Advanced Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 18: 1195–1203
- Otlu B. (2011) Biyosensörler: Biyoreseptör Moleküller. 6<sup>th</sup> International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 May 2011, Elazığ, Türkiye
- Oya H, Kanda M, Koike M, Iwata N, Niwa Y, Shimizu D, Takami H, Sueoka S, Hashimoto R, Ezaka K, Nomoto S, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Fujiwara M, Kodera Y, (2015). Detection of serum melanoma-associated antigen D4 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Diseases of the Esophagus* 2: 188-195

- Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A, (2008). Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69(4):367-74
- Rasooly A, (2005). Biosensor technologies. *Methods* 37(1):1-3
- Rimoldi D, Salvi S, Schultz-Thater E., Spagnoli G C., Cerottini J C (2000). Anti-MAGE-3 antibody 57B and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family. *Int. J. Cancer*: 86: 749–751
- Sanga M, Lian Y, Zhou X, Shana B, (2011). MAGE-A family: Attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine* 29: 8496– 8500
- Shiping S, Lihua W, Jianlong Z, Chuhai F, (2008). Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(2):108-117
- Simpson A. J. G, Caballero O L, Jungbluth A, Chen Y T, Old L J, (2005). Cancer/Testis Antigens, Gametogenesis And Cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 615-625
- Smet C. D, Backer O. D, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boont T, (1996). The activation of human gene MAGE-I in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93: 7149-7153.
- Smet C D, Loriot A, Boon T, (2004). Promoter-Dependent Mechanism Leading to Selective Hypomethylation within the 5' Region of Gene *MAGE-A1* in Tumor Cells. *Molecular And Cellular Biology* 11: 4781–4790
- Şenel F, (2013). Biyosensörler. *Bilim Teknik Dergisi* 12: 44-45
- Tekin Ş. (2008). Platin elektrot yüzeylerine tutturulmuş organik moleküllerin elektrokimyasal tekniklerle pKa değerlerinin tayini. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Weber J, Samid S, Johnson B, Herlyn M, Lassam N, Treisman J, Rosenberg S. A. (1994). Expression of the MAGE-1 Tumor Antigen Is Up-Regulated by the Demethylating Agent 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Cancer Research* 54: 1766-1771
- Wischniewski F, Pantel K, Schwarzenbach H, (2006). Promoter Demethylation and Histone Acetylation Mediate Gene Expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in Human Cancer Cells. *American Association for Cancer Research* 4: 339-349



Yanbin L. (2006). Biosensors. of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Information Technology, 6: 52-93.

## ÖZGEÇMİŞ

Aslı GÜNDOĞDU, 1990 yılında Kırklareli/ Lüleburgaz'da dünyaya gelmiştir. 1996-2004 yılları arasında Emrullah Efendi İlköğretim Okulu'nda ilköğretim eğitimini tamamlamış, 2004-2007 yılları arasında Lüleburgaz Lisesi'nde lise öğrenimini bitirmiştir. 2008-2013 yıllarında Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı'nda lisan eğitimini tamamlamış, 2013 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır