

**Bir Meme Kanseri Biyomarkeri
Olan HER3 Analizi İçin
Biyosensör Sisteminin
Geliştirilmesi**

Mehmet Çetin CANBAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Mustafa
Kemal SEZGİNTÜRK**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİR MEME KANSERİ BİYOMARKERİ OLAN HER3 ANALİZİ İÇİN BİYOSENSÖR
SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Mehmet Çetin CANBAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2013

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Mehmet Çetin CANBAZ tarafından hazırlanan” Bir Meme Kanseri Biyomarkeri Olan Her3 Analizi İçin Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK *İmza :*

Üye : Doç. Dr. Ümit GEÇGEL *İmza :*

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİR MEME KANSERİ BİYOMARKERİ OLAN HER3 ANALİZİ İÇİN BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet Çetin CANBAZ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Bu tezde, meme kanserinin erken teşhisine yönelik bir biyosensör sistemi tasarlanmıştır. Bunun için indinyum kalay oksit (ITO) elektrot yüzeyinde 3-aminopropiltrioksilan (3-APTES) ile kendinden oluşan monotabaka (KOT) oluşturulmuştur. Bu yöntem ile anti-HER3'ün yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Her bir immobilizasyon adımı ve tasarlanan biyosensörle elden edilen HER3 ölçümleri döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Anti-HER3, HER3, kanser biyomarkerleri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), biyosensör, ITO elektrot,

ABSTRACT

MSc. Thesis

DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR SYSTEM TO ANALYSIS OF A BREAST CANCER BIOMARKER HER3

Mehmet Çetin CANBAZ

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

In this thesis, a new biosensor system is designed for the early diagnosis of breast cancer. For this, on the surface of indiumtin oxide (ITO) electrode was formed by self assembled monolayers (SAM) with (3-aminopropyl)triethoxysilane (3-APTES). With this method, the anti-HER3 was provided to bind covalently on the surface. Immobilization steps and determination of HER3 by designed biosensor were analyzed by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). All steps of the biosensor has been optimized to succeed results.

Keywords: Anti-HER3, HER3, Electrochemical impedance spectroscopy (EIS), biosensor, ITO electrode, cancer biomarkers

2013, Pages 64

TEŞEKKÜR

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

Varlıkları ile yaşama sevincim olan, maddi manevi her türlü desteği hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili aileme,

Laboratuvar çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, her türlü moral ve motivasyon sağlayan çalışma arkadaşlarım Çiğdem SAYIKLI ŐİMŐEK, Münteha Nur SONUÇ ve Őükran Gül den YEŐİLLER'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Kanserın Moleküler Özellikleri.....	3
2.2. Kanser Biyomarkerleri	5
2.3. HER3 (ErBB3).....	8
2.4. Biyosensörler.....	9
2.5. Elektrokımyasal İmpedans Spektroskopisi	13
2.6. Elektrokımyasal İmpedans Spektroskopisi'nin Temel ilkeleri.....	14
2.7. Elektrokımyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler	17
2.7.1. Enzim temelli impedimetrik biyosensörler	17
2.7.2. İmmunokımya temelli impedimetrik biyosensörler	20
2.7.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler	27
2.7.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM	34
3.1. Materyal	34
3.2. Elektrokımyasal Ölçümler.....	34
3.3. Ölçüm Prosedürleri	34
3.4. İmmobilizasyon Süreci.....	35
3.4.1. PET/ITO elektrotların hazırlanması	35
3.4.2. Anti-HER3'ün ITO elektrot yüzeye kovalent olarak bağlanması	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	38
4.1. İmmobilizasyon Basamakları	38
4.2. Optimizasyon Basamakları	43
4.2.1. Anti-HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi.....	43

4.2.2. HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi	44
4.2.3. Anti-HER3 inkübasyon süresinin optimizasyonu	45
4.2.4. HER3 inkübasyon süresinin optimizasyonu.....	47
4.2.5. Tekrarlanabilirlik.....	48
4.2.6. Depo kararlılığı	50
4.2.7. Yapay Serum örneği.....	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser kutusu	5
Şekil 2.2. HER ailesi	8
Şekil 2.3. HER3	9
Şekil 2.4. Biyosensörün işleyiş şeması.....	10
Şekil 2.5. Biyosensörün yapısı ve çalışma prensibi.....	10
Şekil 2.6. Kanser teşhis biyosensörü tasarlamak için gerekli olan bileşenler.	13
Şekil 2.7. İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi	14
Şekil 2.8. Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli	16
Şekil 2.9. Sitokrom c oksidaz'ın lipid tektabaka içinde yerleşimi.....	20
Şekil 2.10. Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları	23
Şekil 2.11. Çok tabakalı biyolojik reseptör immobilizasyon adımlarının şematize edilmiş hali	24
Şekil 2.12. Artan VEGF konsantrasyonlarına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumlarının gösterilmesi	24
Şekil 2.13. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi	25
Şekil 2.14. Ultrince platin film immunosensörün şematik gösterimi	26
Şekil 2.15. İki elektrot arasındaki elektriksel devre modeli	31
Şekil 2.16. IDE temelli biyoçip'in kanallarının SEM görüntüsü ve bir mikro akışkanlı biyoçip'in resmi.....	33
Şekil 3.1. Hidroksil grupları oluşturulmuş ITO yüzeyinin AFM görüntüsü	35
Şekil 3.2. Hidroksil grupları oluşturulmuş ITO elektrotun CV ve EİS ölçümü ...	36
Şekil 3.3. Anti-HER3 immobilizasyonu sonrasında döngüsel voltametri (A) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (B) ölçümleri	37
Şekil 4.1. 3-APTES immobilizasyonu sonrasında ITO elektrot yüzeyinin CV (A) ve EIS (B) ölçümleri.....	39
Şekil 4.2. BSA immobilizasyonu sonrasında CV (A) ve EIS (B) ölçümleri	40
Şekil 4.3. HER3 immobilizasyonu sonrasında CV (A) ve EIS (B) ölçümleri	41
Şekil 4.4. Anti-HER3 ve HER3 bağlı ITO yüzeylerinin AFM görüntüsü	42
Şekil 4.5. İmmobilizasyon basamakları.....	42

Şekil 4.6. İmmobilizasyon için uygun AntiHER3 konsantrasyonunun belirlenmesi	44
Şekil 4.7. İmmobilizasyon için uygun HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi	45
Şekil 4.8. İmmobilizasyon için uygun AntiHER3 inkübasyonunun belirlenmesi	46
Şekil 4.9. Uygun HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi	47
Şekil 4.10. HER3 miktarı ile ΔR_p arasındaki grafik	48
Şekil 4.11. Tekrarlanabilirlik ölçümleri sonrası CV ve EİS spektrumları	49
Şekil 4.12. 1 haftalık raf ömrü sonunda CV ve EİS spektrumları	50
Şekil 4.13. 1 haftalık raf ömrü sonunda ΔR_p ile eklenen HER3 miktarı arasındaki grafik	51
Şekil 4.14. 3 haftalık raf ömrü sonunda ΔR_p ile eklenen HER3 miktarı arasındaki grafik	51
Şekil 4.15. 3 haftalık raf ömrü sonunda CV ve EİS spektrumları	52
Şekil 4.16. Yapay serum örneği sonrası ΔR_p – HER3 arasındaki grafik	53
Şekil 4.17. Yapay serum örneği ile alınan CV ve EİS spektrumları	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Kanser tayinindeki biyomarkerler: Farklı yaklaşımların kullanımı	6
Tablo 2.2. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları	15
Tablo 4.1. Optimizasyon için belirlenmiş AntiHER3 konsantrasyonlarına ait ΔR_p değerleri....	43
Tablo 4.2. Optimizasyon için belirlenmiş HER3 konsantrasyonlarına ait ΔR_p değerleri.....	45
Tablo 4.3. AntiHER3 inkübasyon sürelerine ait ΔR_p değerleri.....	46
Tablo 4.4. HER3 inkübasyon süresine ait R_p ve ΔR_p değerleri.....	47
Tablo 4.5. İmmobilizasyon aşamaları ve R_p değerleri.....	48
Tablo 4.6. Tekrarlanabilirlik ve R^2 değerleri	49
Tablo 4.7. Yapay serum örneği ile alınan R_p değerleri.....	53

KISALTMALAR DİZİNİ

APTES	Aminopropil trietoksi silan
CV	Döngüsel voltametri
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FcPF6	Ferrosen hekzafloro fosfat
IgG	İmmunoglobulin G
ISFET	İyon duyarlı alan etkili transistör
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
PET/ITO	Polietilenterafilat İndinyum Kalay Oksit
PPy	İletken polipirol
SELDİ	Yüzey-gelişmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon
t-BLM	Peptit bağlı lipit membran
VEGF	Vaskular endotaryal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde, hücre büyümesi ve farklılaşmasında değişiklikler olur. Bu değişiklikler, DNA ve dolayısıyla gen seviyesinde mutasyona neden olabilir. Bu değişikliklerden etkilenen genler onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılmaktadır. Onkogenler normal genlerin yüksek seviyede eksprese olması ile oluşur. Tümör baskılayıcı genler ise; hücre bölünmesi, hayatta kalma ya da kanser hücrelerinin diğer özelliklerini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler genellikle genetik değişiklikleri indüklemek için kanserli hücreler tarafından devre dışı bırakılır. Bu genlerin, transkripsiyonları sonucu oluşan proteinlerle etkilerini ortaya koyarlar **(Porter 2008)**.

Genel kullanımda insan kanseri olarak adlandırılmasına rağmen aslında kanserin 200 farklı çeşidi bulunmakta ve batı dünyasında ölümlerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra dünya nüfusunun 3te 1'i hayatının bir bölümünde kanser tedavisi görmektedir. Almanya gibi tipik bir batı endüstri ülkesinde her yıl 400 bin'den fazla kişi kansere yakalanmakta, yaklaşık 200 bin civarı kişi de bu sebepten ölmektedir. Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yıl zarfında iki kattan daha fazla artmıştır. 2008'de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030'a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenebilir **(Parkin 2006)**.

Meme kanseri, kadınların en sık görülen kanser çeşidi olup, tüm kadın kanserlerinin %23'ünü teşkil etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1990 yılında yaptığı çalışmada, 796 bin yeni meme kanserli olgu ve 314 bin meme kanserinden ölüm saptanmışken, yine WHO'ya bağlı International Agency on Cancer for Research'ün (IARC) 2002 yılındaki değerlendirmesinde; 1.152.000 yeni meme kanserli olgu ve 411 bin meme kanserinden ölüm hesaplanmıştır. 1990-2002 arasındaki on iki yıllık süre içerisinde, dünyada meme kanserinin sıklık ve mortalite (ölüm) oranlarında %25'lik artış görülmektedir. Ancak, bunun aksine

gelişmiş olan ülkelerden ABD’de son 25 yıl içerisinde mortalitede meydana gelen %50 azalma tarama ile erken tanı ve etkin tedaviye bağlanmaktadır (**Shyyan 2006**).

Meme kanseri sıklığı ciddi bir coğrafi farklılık göstermektedir. Gelişmiş olan ülkeler en sık, Asya ve Afrika’daki az gelişmiş ülkeler ise en az meme kanseri görülen ülkelerdir. Yaşa göre standardize edildiğinde, Kuzey Amerika’daki oran 99.4/100.000 iken, Orta Afrika’da bu oran 16.5/100.000 kadardır. Bununla birlikte orta ve alt gelir düzeyindeki ülkelerde meme kanseri sıklığında belirgin artışlar görülmektedir. Dünya’daki meme kanseri sıklığı, 1990 yılından itibaren her yıl %0,5’lik artış göstermektedir. Çin’deki yıllık artış oranı ise, %3-4 civarındadır. Hindistan’da 15 yıl önce serviks kanseri en sık kanser iken, bugün meme kanseri en sık görülen kadın kanseri olmuştur. Meme kanserli hastalarda tüm evrelere göre 5 yıllık sağ kalım oranları, gelişmiş ülkelerde %83 iken, gelişmekte olan ülkelerde %53 olarak bildirilmektedir. Aradaki bu önemli fark, gelişmiş olan ülkelerde tarama mamografisi sayesinde erken tanı ve daha iyi tedavi olanakları ile açıklanabilir. Meme kanseri mortalite oranı; gelişmiş olan ülkelerde %30 (190.000 ölüm / 636.000 olgu), az gelişmiş ülkelerde ise %43’dür (221.000 ölüm / 514.000 olgu) (**Houssami 2006**).

Kanser tanısı ve tedavisi için erken teşhisin bu derece önemli olması erken tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır. Bunun için belirli kanser türlerinde tespit edilen kanser biyomarkerleri ile çalışmak yarar sağlamaktadır. Biyosensörlerin bu alanda kullanımı da son yıllarda sıklaşmıştır. Bu çalışmanın amacı olarak da HER3 (Human Epidermal Growth Factor) biyomarkeri kullanılarak hassas ve seçici bir biyosensör tasarlanması planlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

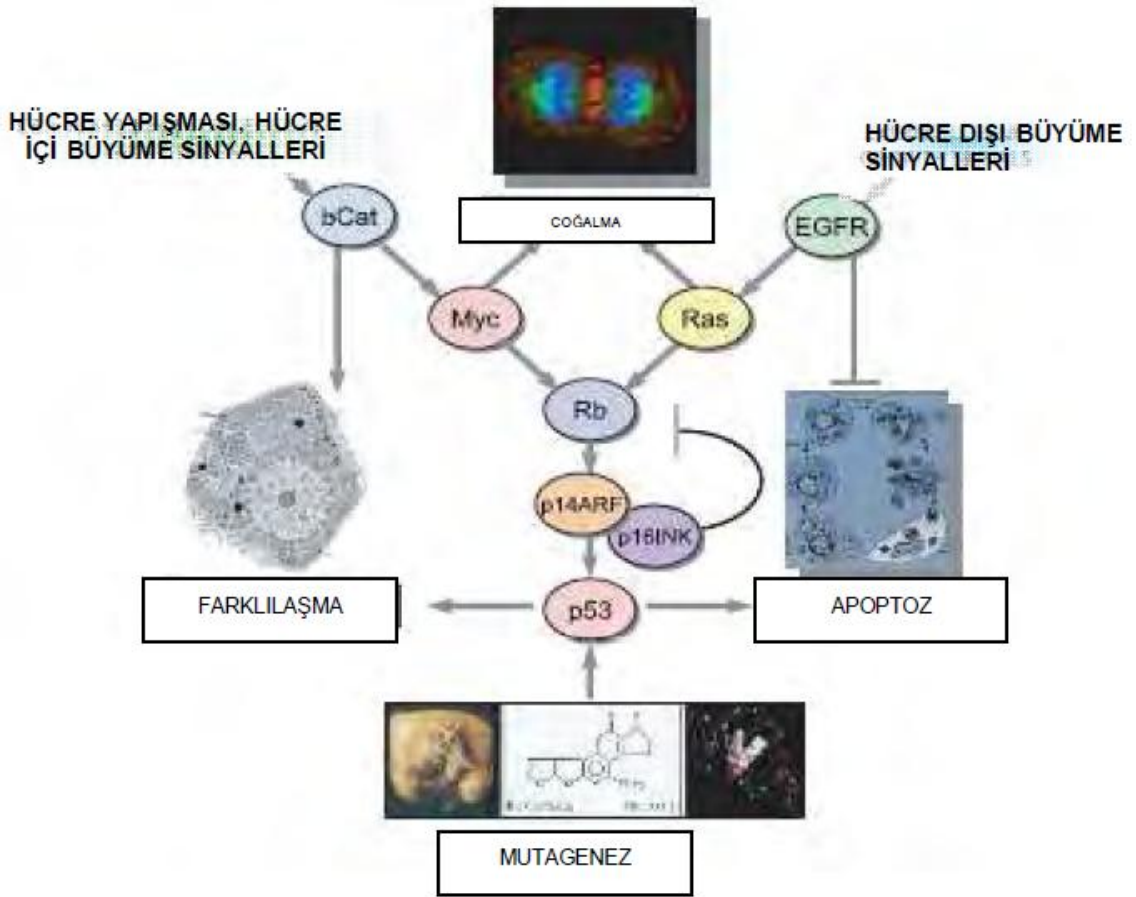
2.1. Kanserin Moleküler Özellikleri

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için “asi” olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna neden olur. Böylesi bir kitle uzun bir süre asemptomatik olabilir. Bununla birlikte, sonunda büyüyerek, fizyolojik işlevleri altüst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda belirtilere ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır (**Boyle ve Levin 2008**). Kanserin hedeflediği genetik programlar insan genomuna dağılmış genlerde yazılıdır. İnsan DNA’sının 23 bin kadar gen içerdiği düşünülmektedir. Bu genlerin 3 bin–5 bin kadarı kanserde regülasyonu bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. İşlevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde üretimine (çok az ya da çok fazla), anormal bir protein üretimine (işlev kazanmış ya da kaybetmiş), ya da bir proteinin hiç olmamasına sebep olabilir (**Boyle ve Levin 2008**).

Çoğu kanser sadece tek bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) doğar. Bu hücre kanserli olmak için onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmelidir. Bu süreç “asi” hücrelerden oluşan bir klonun oluşumuna yol açar. Eğer organizma bu klonu tolere ederse ve rahatsız edilmeden kalırsa, çoğalmaya devam edebilir ve bu süreç içinde içerdiği hücreler gittikçe artan sayıda modifikasyon biriktirir. Böylesi bozulmuş bir süreçte, sadece en uygun ve en saldırgan hücreler hayatta kalacak ve daha örgütsüz olan hücrelerin yerini alacaktır. Tümörler bu şekilde zararlı hale gelirler. Bu aynı zamanda kanser tedavisinin bu denli zor olmasının da nedenidir: hastalara kanser hücrelerini etkin olarak öldüren bir ilaç verildiğinde, hayatta kalan az sayıdaki hücre, kendilerini ilaca karşı dirençli kılan değişiklikler geçirmiş olanlardır. Geride kalan bu ufak hücre grubu kanserin başlangıçtaki biçiminden daha kötü bir biçimde dönmesi için yeterli olabilir (**Herceg 2007**).

Tümörün yayılması çoğu zaman kanser hücrelerinin anjiyogenezi, yani tümör vaskülarizasyonuna yönelik yeni, küçük kan hücrelerinin sentezini artırması ve tümöre oksijen ve besin sağlaması sonucu kolaylaşır (**Boyle ve Levin 2008**). DNA diziliminde mutasyon meydana geldiğinde kanser başlayabilir. Bu mutasyonlar tek bir baz değişikliği olabilir ve bu durumda bir kodonu tanımlayan 3 bazdan biri değişmiş olur ve bir proteine farklı bir proteinin eklenmesine yol açar. Bazı durumlarda, bu, söz konusu proteinin aktivitesini değiştirmek için yeterlidir. Başka DNA mutasyonları ise, çok sayıda bazı etkileyebilir ve genomdan birkaç gen içeren bir DNA parçası kopar; ya da bu DNA parçası genomda başka bir yere yerleşerek bitişik olmayan DNA parçalarının birleşmesiyle oluşan yeni genler oluşarak yeni, anormal proteinlerin sentezine yol açar. Büyüklükleri ne olursa olsun böylesi değişiklikler “genetik değişimler” ya da “mutasyonlar” olarak adlandırılır. Bu değişiklikler kanserli hücrelerin DNA diziminin saptanmasıyla belirlenebilir. “Kapalı” olan DNA alanları (bunlar düzeltmeye ve kopyalanmaya kapalıdır) ve açık DNA alanları (hücre bunları kopyalayabilir, okuyabilir ve RNA ile proteinleri üretmek için kullanabilir) vardır. Dolayısıyla, hücrelerin program değiştirmenin DNA mutasyonu dışındaki bir yolu, açık alanlardaki genleri kapatmak, ya da kapalı alanlardakileri açmak için genel paketlemeyi değiştirmektir. Bu gibi değişiklikler sadece DNA diziliminin saptanması ile belirlenmez. DNA’nın okunabilirliğini ve DNA’ya erişilebilirliği düzenleyen kimyasal modifikasyonların da analizi gerekmektedir. Bunlar *epigenetik değişiklikler* olarak adlandırılmaktadır (**Nowell 1976**).

Hücreler, içsel farklılıklarına karşın, hücre çoğalmasını ve ölümünü kontrol eden temel süreçlerin gerçekleştirilmesinde ortak planlar doğrultusunda hareket ederler. Bunun bir sonucu olarak, birçok kanserde, organın yeri ya da hastalığın nedenine bağlı olmaksızın, bazı onkogenler ve tümör baskılayıcılar değiştiği sıklıkla görülür. Bu genlerin ürünleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını kontrol etmek üzere birlikte çalışan bir öğeler ağının bir parçasıdır. Şekil 2.1, tüm kanserli hücrelerde değiştirilmesi gereken gen ve süreç ağının çekirdeği olarak tanımlanabilecek “kanseri kutusunu” göstermektedir. Bu kanser kutusu, başlıca üç sinyal verme süreci içerir. Bunların ikisi büyümeyi artıran süreçlerdir; biri ise büyümeyi baskılayan bir mekanizmadır (**Boyle ve Levin 2008**).



Şekil 2.1. Kanser kutusu (Boyle ve Levin 2008)

2.2. Kanser Biyomarkerleri

Biyomarkerler, normal, normal olmayan ya da biyolojik proseslerle gerçekleşen hücresel, biyokimyasal ya da moleküler değişikliklerdir. Bunlar, tedavi sonucu biyolojik prosesleri, patolojik prosesleri ya da farmakolojik yanıtları ölçme ve değerlendirmede kullanılmaktadırlar. Kanser araştırması ve tayininde bir biyomarker kanserin vücutta olduğunu belirtir. Biyomarker miktarları biyolojik dokuda, hücrede ya da sıvıda tayin edilebilir. Görüntüleme ücretini en aza indirebilmek ve faydayı en yüksek miktarda tutabilmek için biyomarkerler serum, üre ve tükürükte de ölçülebilmektedirler. Genomik, proteomik ve epigenomik biyomarker örnekleri Tablo 1’ de verilmektedir.

Tablo 2.1. Kanser tayinindeki biyomarkerler: Farklı yaklaşımların kullanımı (Stearns 1998)

Biomarker türleri	Yaklaşım
Genomik	
ERBB2, IGFBP2 (synovial kanseri)	Mikroarray analiz
Mikrosatalit değişkenlik (mesane, ve gırtlak kanseri)	Nükleotit sıralama, SNP
Uzun DNA (kolon kanseri)	jel elektroforezi
Mitokondriyal DNA mutasyonu (mesane, ve gırtlak, akciğer, böbrek)	Nükleotit sıralama
Proteomik	
Protein profil (prostat kanseri)	SELDİ
Protein profil (yumurtalık kanseri)	SELDİ
Haptoglobin-alfa subunit (yumurtalık kanseri)	SELDİ ve protein elektroforezi
pGP9.5 (Akciğer kanseri)	İki boyutlu jel elektroforezi
Mammoglobin (meme kanseri)	İki boyutlu jel elektroforezi
CA125, Osteopontin, Prostatin (yumurtalık kanseri)	Jel elektroforezi
Galectin-3 (kolon kanseri)	protein elektroforezi
Des-gamma carboxy-prothrombin (karaciğer kanseri)	protein elektroforezi
Epigenomik	
APC, CDH1, DAPK, TIMP-3, GSTP1, MGMT, p16, RAR (meme, özofajiyal, kolon, ve gırtlak, böbrek, akciğer, prostat kanseri)	Metilasyon analizi

Kanser biyomarker teknolojisi, oldukça üretken, kullanım alanları yeniliğe açık teknolojiler içeren bir alandır. Buna karşın biyomarkerlerin keşfinden kullanılabilirliğine kadar geçen süre oldukça yavaş ve dolayısıyla bir biyomarkerin kanser teşhisinde kullanılabilirliğine kadar geçen süre oldukça uzundur. Bunun yanı sıra sınırlı sayıda biyomarker kanser tayininde kullanılabilir. Bir biyomarkerin laboratuarda belirlenip klinik ortamda kanser tayininde kullanılmasına kadar geçen süre beş farklı adımdan oluşmaktadır.

Bunlardan “keşif adımı” olarak da geçen ilki, potansiyel olarak uygun biyomarkerlerin belirlenmesi aşamasıdır. Bu aşamada normal hücre ile tümörlü hücrelerin protein ekspresyonları karşılaştırılarak baskılanmış ya da yok edilmiş oldukları tespit edilir. İkinci aşama “doğrulama” aşamasıdır. Bu aşamada ilk basamakta elde edilen çıplak protein alınarak diğer bir örnekten elde edilmeye çalışılır. Üçüncü aşamada dokulardan elde edilen biyomarkerlerin kanser teşhis etme kapasiteleri ölçülür. Dördüncü aşamaya gelindiğinde biyomarkerin kanseri erken teşhis edip edemediği ölçülür. Bu ölçümlerin spesifikliğı ve tekrar edilebilirliğı oldukça önemlidir. Ve son aşama olarak biyomarkerin insanlar üzerinde işe yarayıp yaramadığı test edilir.

Tümör markerları kanserin biyokimyasal belirleyicileridir. Enzimler, hücre yüzeyi antijenleri ve hormonlar gibi sitoplâzma proteinleri kanser markerları olabilirler. Klinik uygulamalarda, marker terimi plazma, vücut sıvıları, katı tümörler, tümör hücreleri, lenf nodları ve kemik iliğinde tayin edilebilen bir molekülü tanımlamaktadır (**Stearns 1998**). Bazı tümör markerları sadece bir kanser tipine spesifik iken bazıları birçok kanser türünde ortaya çıkabilen moleküllerdir. Tümör hücreleri tarafından üretilen antijenler de spesifik tümör markerları arasında bulunurlar ve bu hücreler, normal hücrelerden antijenik olarak farkedirilebilirler. Tümör hücrelerinin herhangi bir proteini potansiyel bir antijen olabilir. Bu antijenler spesifik olarak diagnoz, prognozun belirlenmesi, tedavinin şekillenmesi ve izlenmesi gibi çok önemli noktalarda kullanılabilirler (**Maciosek 2006**).

Kanser izlenmesi, semptomlardan dolayı medikal bulguların gözlenmediğı bireylere uygulanan sistematik testleri kapsamaktadır. Kanserden ölüm riski kanserin yayılımı ve fazın derecesinin artmasına paralel olarak artmaktadır. Kanser izlenmesinin amacı onu erken dönemde yani asimptomatik fazda belirlemektir. Bu aşamadaki problem çoğı kanser izleme testi kısmen yetersiz olması ve kanserler izlenme sonucu belirlenmeden önce metastaz yapmış olabilmektedirler. Kanser izleme testleri arasındaki hassasiyet farklıdır. %100 hassas bir test yöntemi izlenen popülasyondaki tüm kanserleri belirlemektedir. Hassasiyetliğın derecesinin hesaplanması beklenen kanser türlerinin oranına bağlıdır. Bu hesabı yaparken kanser türünün iyi belirlenmiş olması şarttır. Hassasiyet ayrıca neoplazi olmaksızın bireyler üzerinde yapılan testlerde ortaya çıkan negatif sonuçların oranıdır (**Maciosek 2006**).

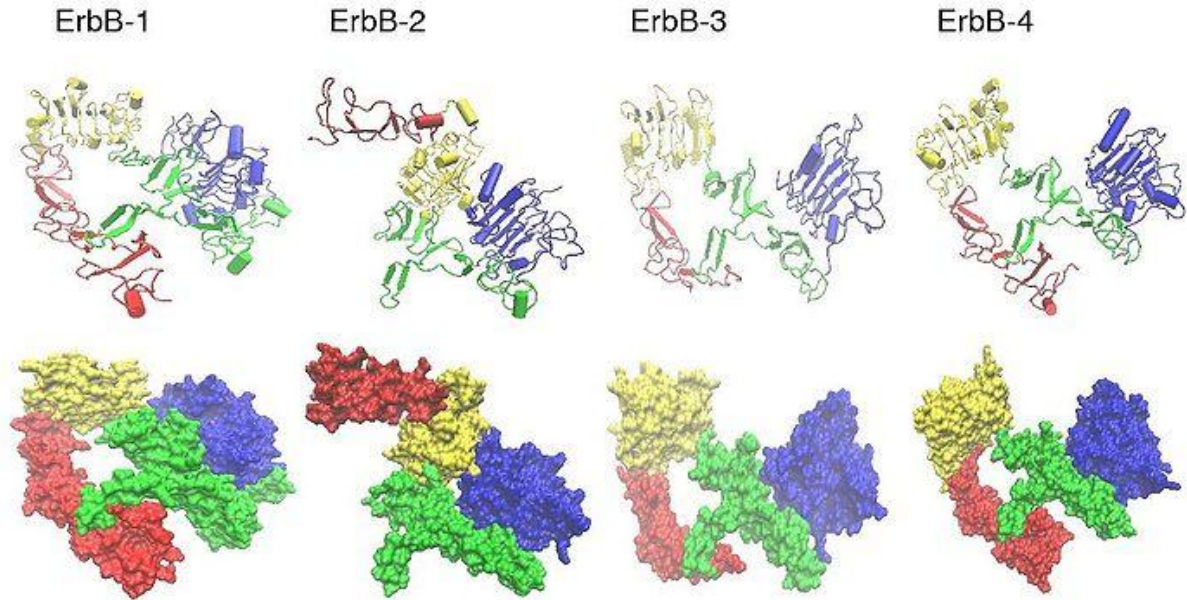
İzlenmenin avantaj ve dezavantajları çok ciddi bir şekilde tartışılmalıdır ve bu durum kanser türleri ve testlerine göre oldukça farklılık göstermektedir. Bu noktada hemen tüm kanser izleme testleri için 3 temel problem göze çarpmaktadır; gecikme zamanı, periyot ve

seçim eğilimi. Bu faktörlerin tümü, bir kanserin ölümcüllüğünün azaltılmasında kullanılan bir methodun izlenmesinin etkinliğini bozmaktadır (**Pinsky 2007**).

Bir biyomarker için en önemli iki özellik seçiciliği ve hassaslığıdır. Hassaslık, kanser hastalarının tümünü içeren bir parametredir. Seçicilik parametresi ise kanserli hastayı sağlıklı hastadan ayıran ve tüm insanları içeren bir parametredir. İdeal bir biyomarker, %100 hassaslığa ve seçiciliğe sahip olmalıdır. Bu çalışmada HER3 (Human Epidermal Growth Factor) biyomarkeri kullanılarak hassas ve seçici bir biyosensör tasarlanması planlanmıştır.

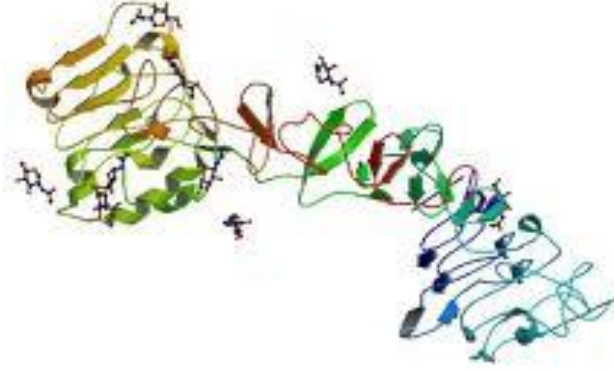
2.3. HER3 (ErBB3)

Şekil 2.2’de belirtilen HER ailesi, hücre yaşamında, hücre çoğalmasında, birleşme ve ayrılmasında önemli rol oynamaktadır. Tirozin reseptör kinaz HER ailesi, dört alt transmembran reseptöründen oluşurlar. Bunlar HER1 (EGFR ya da *c-erbB1*), HER2 (HER2neu ya da *c-erbB2*), HER3 (*c-erbB3*), ve HER4 (*c-erbB4*) (**Arteaga 2002, Berchuck 1990, Tovey ve ark. 2004, Witton ve ark. 2003, Woodburn ve ark. 1999**). Ailenin bu üyelerinin hepsi hücre dışı ligand bağlanma domaini, transmembran domaini ve sitoplazmik tirozin kinaz domaini içerirken HER3 bunları içermez (**Arteaga ve ark. 2002, Woodburn ve ark. 1999**).



Şekil 2.2. HER ailesi (**Arteaga ve ark. 2002**)

Şekil 2.3’de belirtilen HER3 proteini erişkin bir insanda ve hasta dokularında bulunur ve birincil tümör materyali ve tümörlü hücre dizilerinde mRNA ve protein düzeyinde yer alır. 6.2 kB uzunluğunda olduğu belirtilmiştir. Meme, yumurtalık ve mide kanseri gibi kanser tiplerinde aşırı ekspere olduğu rapor edilmiştir. (**Lemoine ve ark. 1992, Rajkumar ve ark. 1993**).

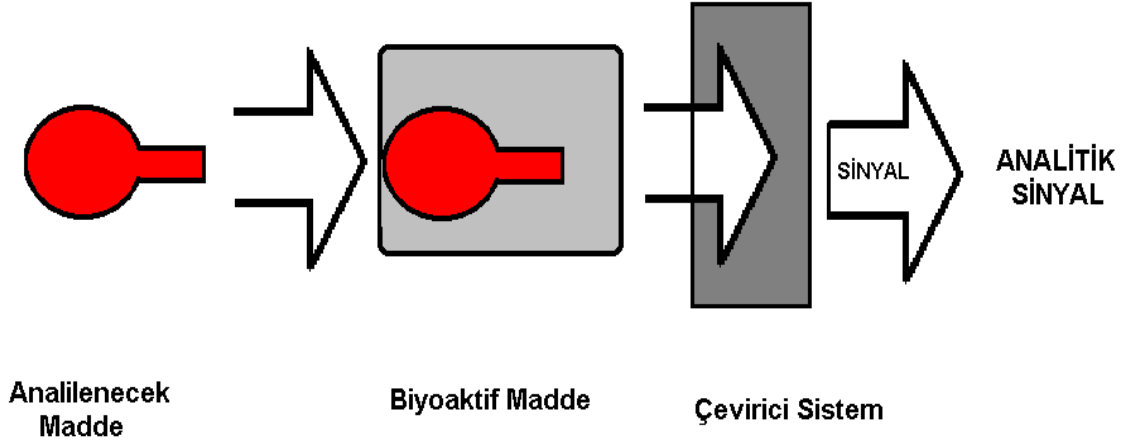


Şekil 2.3. HER3(Arteaga ve ark. 2002)

HER3 tayin yöntemlerinin arasında ELİSA (enzyme linked immuno assay) testi (**Hsieh ve ark. 2011**), imminohistokimyasal testler (**Hilbe ve ark. 2003**), ve Western Blot (**Ozaki ve ark. 2012**) gösterilebilir. Son zamanlarda elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltametrinin (CV) yardımı ile tanımlama, biyosensör geliştirme ve üretiminde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

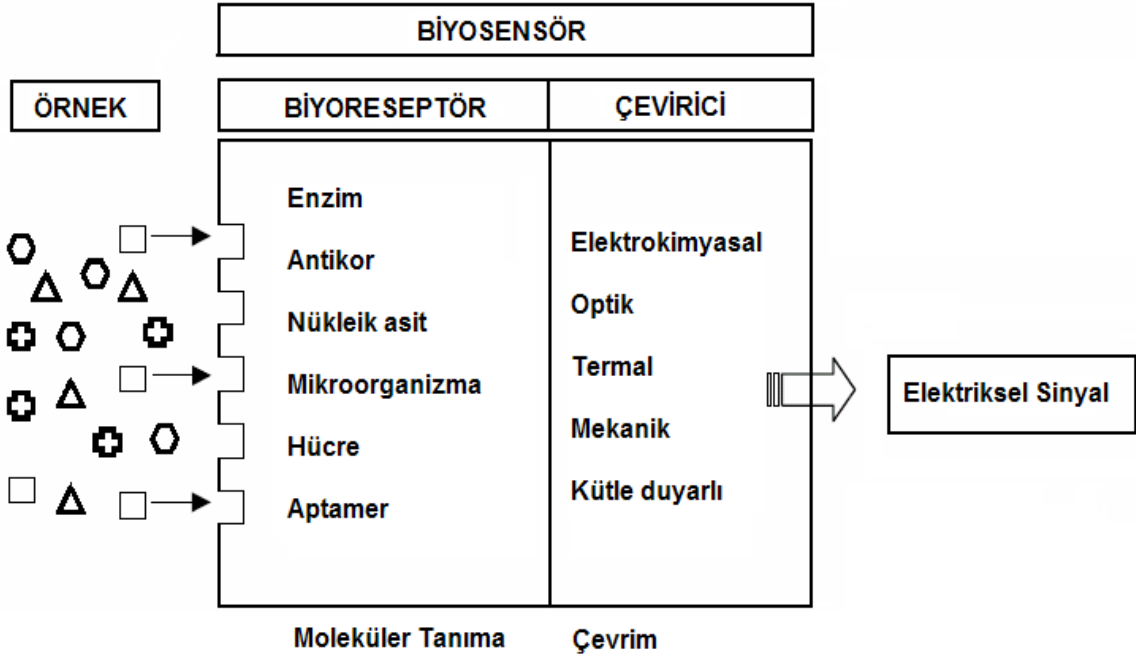
2.4. Biyosensörler

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımdır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (**Coulet 1991 ve Turner 1987**).



Şekil 2.4. Biyosensörün işleyiş şeması

Biyosensörün tanıyıcı tabakasına takılmış bulunan ligand (“algılayıcı”) ile tayini gerçekleşecek olan analit (“tanınan”) arasında, sensör yüzeyinde yüksek düzeyde seçici ve özgün etkileşme gerçekleşir. Etkileşmenin sonucunda oluşan değişiklik, örneğin, kimyasal bir ürün olabileceği gibi, başlangıçta ortamda bulunan ve etkileşme ile kaybolan bir kimyasal madde olabilir. Bunun yanı sıra, etkileşim sonucu, elektrokimyasal değişiklik olabilir, ısı açığa çıkabilir veya kaybolabilir; optik özellikler değişebilir; veya kütle değişimi gözlenebilir. Cihazdaki “çevirici” birimi bu değişimi algılar ve elektrik sinyaline çevirir, ki bu da elektronik bölüm tarafından değerlendirilir ve sayısal okunabilir verilere dönüştürülür.



Şekil 2.5. Biyosensörün yapısı ve çalışma prensibi (Temiz ve ark. 2006)

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler: (Hall 1990)

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksiği giderecek uzun ek işlemler gerekir.

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

Kalibrasyon Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Stabilite: Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek Duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

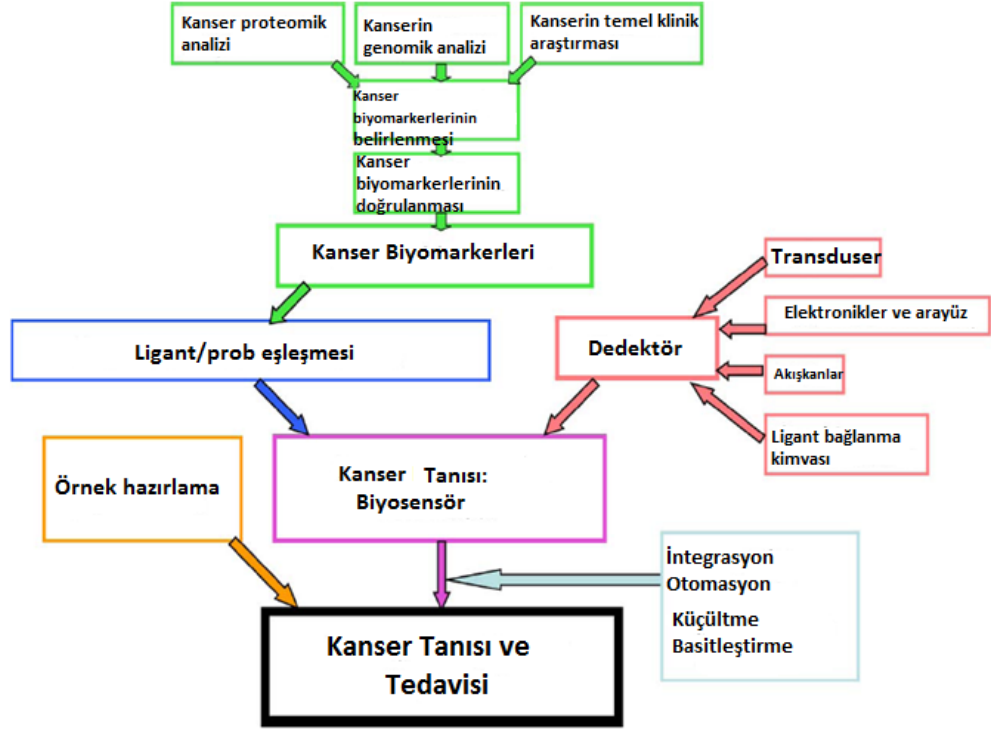
Hızlı Cevap Zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

Hızlı Geriye Dönme Zamanı: Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

Son birkaç yıldır, artan uyum ve küçültülmüş sistemlerle yüksek verimde ve moleküler seviyede ölçüm almak oldukça popüler olmaktadır. Bu durum birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Örneğin yüksek kapasitede cihazlar üretme eğilimi, kullanımı daha basit sistemler, daha ucuz maliyetler ve daha hızlı yanıt zamanları bu avantajlar arasındadır. Kanserin klinik olarak teşhisi için hazırlanması gereken bir biyosensörün temel bileşenleri şekil 2.6'da görülmektedir. Bu yeni teknoloji için verilebilecek örneklerden bir tanesi katı bir yüzeyin üzerine iki boyutlu olarak yerleştirilmiş antibadilerin bulunduğu antibadi dizileridir. Bu diziler, çeşitli antijenlerin kendilerine uygun antikorlara bağlanması ile tanımlanmalarında kullanılabilirler (Taitt ve ark. 2005, Ligler ve ark. 2003).



Şekil 2.6. Kanser teşhis biyosensörü tasarlamak için gerekli olan bileşenler.

2.5. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottur. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük aktarımı ve membran/çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda çok sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda ise biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır (Macdonald 1997, Rubinstein 1995, Krause 2007).

EIS'nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesinin yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu

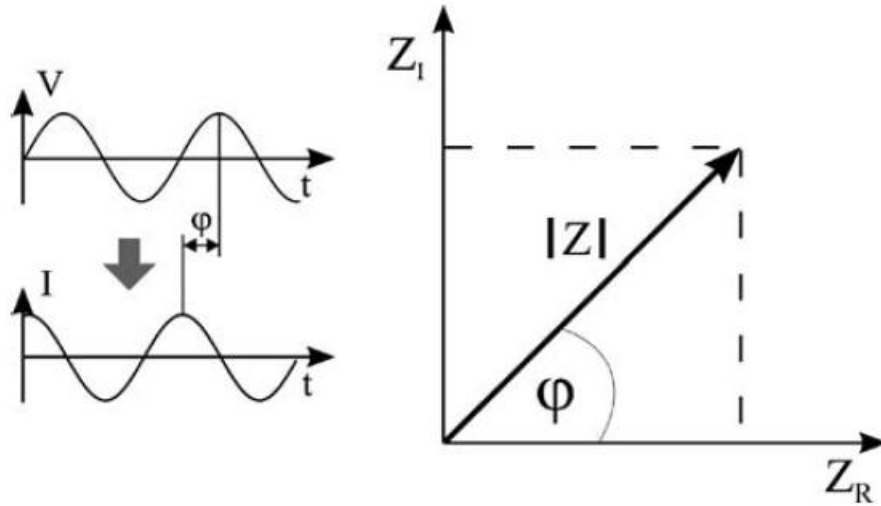
gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır (Macdonald 1997, Rubinstein 1995, Krause 2007).

2.6. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi'nin Temel ilkeleri

Bir sistemin impedansı genellikle küçük bir genlikli potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. Bu tanımdan yola çıkarak impedans; potansiyel-zaman fonksiyonun $V(t)$ akım-zaman $I(t)$ fonksiyonuna bölümüdür. V_0 ve I_0 maksimum değere ulaştıklarında, f ; frekans, t ; zaman, ϕ potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi ft)}{I_0 \sin(2\pi ft + \theta)}$$

İmpedans kompleks bir değerdir; çünkü akım sadece genlik açısından farklılık göstermekle kalmaz, potansiyel-zaman fonksiyonuyla kıyaslandığında faz kayması da gösterir. Bu yüzden değer ya $|Z|$ ve faz kayması ϕ ya da reel Z_R ve imgesel Z_I olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.7. İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi

Bu durum, şekil 2.7.'de gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir: Bode grafiği ($\log f$ 'nin fonksiyonu olarak $\log Z$ ve ϕ) veya Z_R ve Z_I 'nin olduğu Nyquist grafiği şeklindedir.

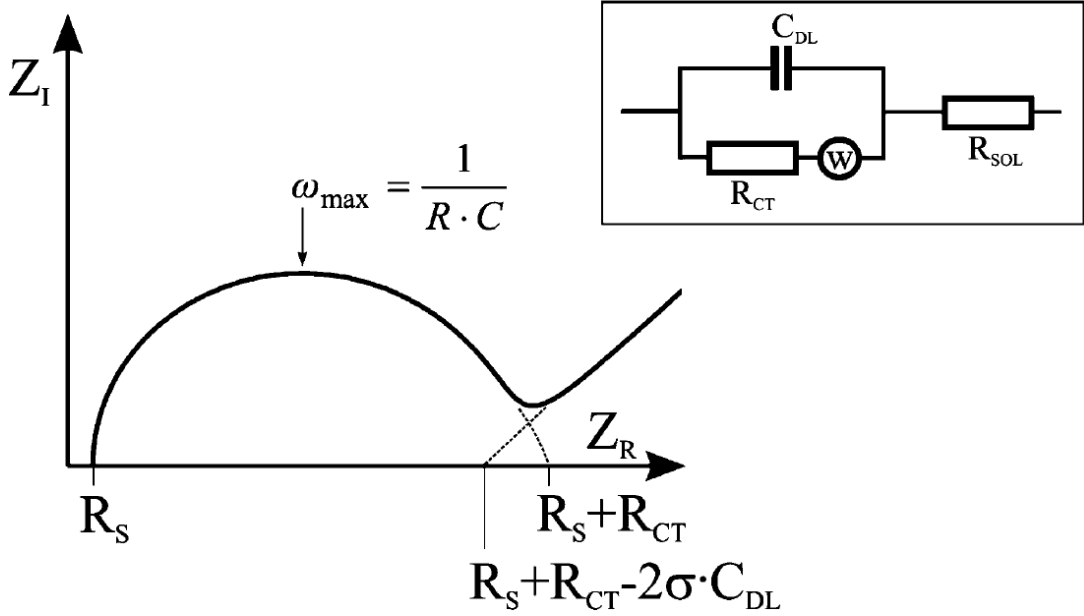
İmpedans “spektroskopisi” adı, impedansın tek bir frekanstan ziyade farklı frekansları tayin edebilme gerçeğinden türemiştir. Bu sayede bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların veya membranların değişim ve difüzyon prosesleri ve karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır. Bu bilgilere ulaşmak için, impedans spektrumu genellikle eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle direnç ve kapasitans oluşan bu devre incelenen sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini açıklar. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partiyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda bir impedans elementinin –direnç veya kapasitans- değişimi çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Bazı durumlarda, tüm impedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki kurmak mümkündür (**Macdonald 1997, Rubinstein 1995, Krause 2007**).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde, elektrolit çözeltisi sistemin tek bileşeni olarak incelendiğinde, impedans davranışı açıklamak için 4 unsur kullanılır: ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg impedans. Bu unsurlar ve tanımlamalarının özeti tablo 2.2’ de verilmiştir.

Tablo 2.2. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları

İmpedans Elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans Bağımlılığı
R	$Z = R$	0°	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^a}$	$0 - 90^\circ$	Evet
W (sonsuz)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} (1 - j)$ $\sigma = \frac{RT}{F^2 n^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_0} C_0} + \frac{1}{\sqrt{D_{RC} R}} \right)$	45°	Evet

Eşdeğer devreler, deneysel impedans verilerini seri ve/veya paralel düzenlenmiş ideal impedans unsurlarla yaklaşık olarak belirlemek için kullanılır. Çoğu elektrokimyasal sistem bu prosedüre göre analiz edilir. Bir elektrolitle bir elektrodun temasta olduğu bir sistem – Randles devresi- çözelti direnci, R_s , yük transfer direnci R_{ct} , çift tabaka kapasitans C_{dl} ve Warburg impedans, W ’dir. Şekil 2.8’ de gösterilen Nyquist grafiğinde R_s ve R_{ct} değerleri kolaylıkla belirlenebilir. Çift tabaka kapasitansı ise yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekanstan hesaplanabilir.



Şekil 2.8. Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli

Biyolojik bir materyali karakterize etmek için (antikor gibi) elektrotlar sisteme uygulanmalı böylece elektrokimyasal hücre elde edilmelidir. AC potansiyel uygulanması ile birlikte, akım tüm sistem elemanlarını –çalışma elektrodu, biyolojik materyal, çözelti ve karşıt elektrot- dolaşmaya başlayacaktır. Ölçülen impedans, esasen bu elemanların bireysel katkılarının bir özetidir.

a) Biyolojik bir materyalin impedansı ya belirli bir analitin konsantrasyonunun fonksiyonu ya da zamanın bir fonksiyonudur. Her iki durumda da her iki elektrodun impedansı, ölçülecek impedansa kıyasla küçük olmalıdır. Bu da geniş yüzey alanları kullanılarak sağlanabilir. Ayrıca, çözülden kaynaklanabilecek biyolojik materyalin nonspesifik bağlanmalarından kaçınılmalıdır, çünkü bu durum ara yüzey impedansı artırır.

b) Çalışma elektroduna biyolojik bileşen immobilize edilir ve analitle ilişkisi tayin edilir. Bu, tipik bir biyosensör uygulamasıdır. Burada duyar elektrotun impedansı (yani biyolojik materyalle modifiye edilmiş çalışma elektrodu) aslında tüm impedansı kontrol eder. Bu yüzden, karşıt elektrodun impedansı belirgin şekilde küçük olmalıdır. Bu da duyar elektroda göre en az 10 kat daha büyük (alan) elektrot kullanılarak sağlanabilir (**Moritz 1992, Friebe ve ark. 1993**).

2.7. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler

Bütün elektrokimyasal biyosensörlerde olduğu gibi, impedimetrik biyosensörler biyomoleküllerin kondüktif bir (veya yarı kondüktif) transduser yüzeyiyle etkileşimini kullanan bioelektronik cihazlardır. Ölçüm prosesleri, reseptör biyomolekül ile analit arasında oluşan algılama yüzeyinin, elektronik transduserin elektriksel özelliklerini direkt veya indirekt şekilde değiştirmesine dayanır. Antijen-antikor veya DNA-DNA etkileşimleri gibi sınırlı katalitik aktiviteye sahip bileşiklerin analizi için geliştirilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli biyosensörlerin sayısı literatürde her geçen gün daha da artmaktadır. Son yıllarda, EIS, birçok kimyasal ve fiziksel proseslerin çalışılmasında da kullanılan çok etkili bir yöntem haline gelmiştir. EIS, birçok proses için analitik çözümler sunmaktadır. Bunun yanı sıra membran özelliklerinin belirlenmesi, biyosensör karakterizasyon ve fabrikasyonu gibi bilimsel araştırmalar için de etkili bir teknik olan EIS ile gerçekleştirilebilmektedir. Enzim-substrat etkileşimlerinin tersine, bağlanmadan sonra herhangi bir reaksiyonun meydana gelmediği antijen-antikor veya DNA-DNA, protein-protein gibi afinite etkileşimlerinden sonra yük transfer değişimleri meydana gelir ve bu değişimler EIS ile çok etkili bir şekilde izlenebilir. Çeşitli spesifik ve hassas ölçümler , elektrot materyaline (metaller, metal oksitler, camsı karbonlar, yarı iletkenler) elektrot geometrisine (klasik elektrot düzenlenmesi veya interdiijite-birbirine geçmiş- elektrotlar), analite (proteinler, antikorlar, nükleik asitler vs) veya kullanılan amplifikasyon protokolüne (label-free –tabakasız-, enzim labeller enzim tabakalar-, iletken polimer filmler nanopartiküller vs..) göre sınıflandırılabilir (**Katz ve ark. 2003, Guan ve ark. 2004, Daniels ve ark. 2007, Berggren ve ark. 2001, Saby ve ark. 1993**).

2.7.1. Enzim temelli impedimetrik biyosensörler

İmpedans spektroskopisi, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektriksel özelliklerinin ölçülmesi için etkin bir yöntemdir. Ancak geniş bir frekans aralığında bütün impedans spektrumunun taranması zaman alıcıdır. Bundan dolayı impedimetrik teknikler, enzim temelli bir biyosensörün karakterizasyonu için kullanılmaktadır.

Enzim sensörleri içerisinde amperometrik elektrotlar en çok ilgi çeken

transdüserlerdir. Bununla birlikte, bir enzimin dönüşümünden (turnover) dolayı redoks-aktif bileşiminde meydana gelen değişim, yük aktarım direnciyle belirlenebilir. Bu durum, glukoz oksidazın ve mediatör olarak benzokinonun kullanıldığı glukoz tayini çalışmalarında gösterilmiştir (**Shervedani ve ark. 2006**).

İmpedans spektroskopisiyle, substrat ve enzim inhibitörlerinin tayini yapılmakla birlikte enzimin kendi aktivitesi de analiz edilebilmektedir. Bu duruma ilginç bir yaklaşım, parçalanabilir polimer filmlerin kullanılmasıdır. Bu polimerler elektrot üzerine kaplanırlar ve biyokatalitik reaksiyon vasıtasıyla polimer parçalanma ya polimer zinciri üzerinde enzimin direkt etkisiyle ya da enzimatik dönüşüm sonucu oluşan ürünün indirekt etkisiyle oluşur. Parçalanmaya başlayan filmin kalınlığı impedans ölçümleriyle kolaylıkla takip edilir. Bu yöntem; üre, glukoz, kimotripsin veya lipaz gibi enzimlerin tayininde gösterilmiştir. İmpedansın kullanıldığı bir diğer yol, elektrot yüzeyindeki lipit tabakasına “sinyalizasyon” proteinin katılması ve spesifik analitle etkileşimi sonucu konformasyonel değişiminin değerlendirilmesine dayanır (**McNeil ve ark. 1995, Cortina ve ark. 2006, Gooding ve ark. 1996, Sumner ve ark. 2001, Cornell ve ark. 1997**).

Substrat ve inhibitör sensörlerinin kullanımına dair bir çalışma Naumann ve ark.’larına aittir. Bu çalışmada, sitokrom oksidaz destekli altın yüzeyde peptit bağlı lipit membran kullanılmış ve membran boyunca proton taşınımını çalışılmıştır. İmpedans spektrumları, inhibitör ve enzim substratların konsantrasyonlarıyla ilişkili olabilmektedir. Paraokson, kinakrin veya bakteriyal toksin streptolizinin tayini verilebilecek bir diğer örneklerdir (**Naumann ve ark. 1999, Schasfoort ve ark. 1994, Tong ve ark. 2003, Wilkop ve ark. 2007**).

Neticede, algılama molekülünün konformasyonel değişiminin impedans ölçümlerle belirlenmesi analitik tayinde uygulanabilir bir yöntemdir. Örneğin, galaktoz/glukoz reseptör protein kullanılarak glukozun belirlenmesi çalışmasında efektif protein tabakasının kalınlığı nanogözenek formunda dizayn edilen uygun elektrotlar kullanılarak impedans analiziyle takip edilmiştir.

Aşağıda EIS temelli bazı enzim biyosensör örnekleri açıklanmıştır.

Jelatin kaplanmış altın elektrot yüzeyindeki proteolitik aktivite değişiminin sebep olduğu impedans farklanmalarının ölçüldüğü, kollegenaz tayini için bir biyosensör geliştirilmiştir (**Saum ve ark. 1998**). Bu sistemde, tabaka kritik bir kalınlığa ulaştığında,

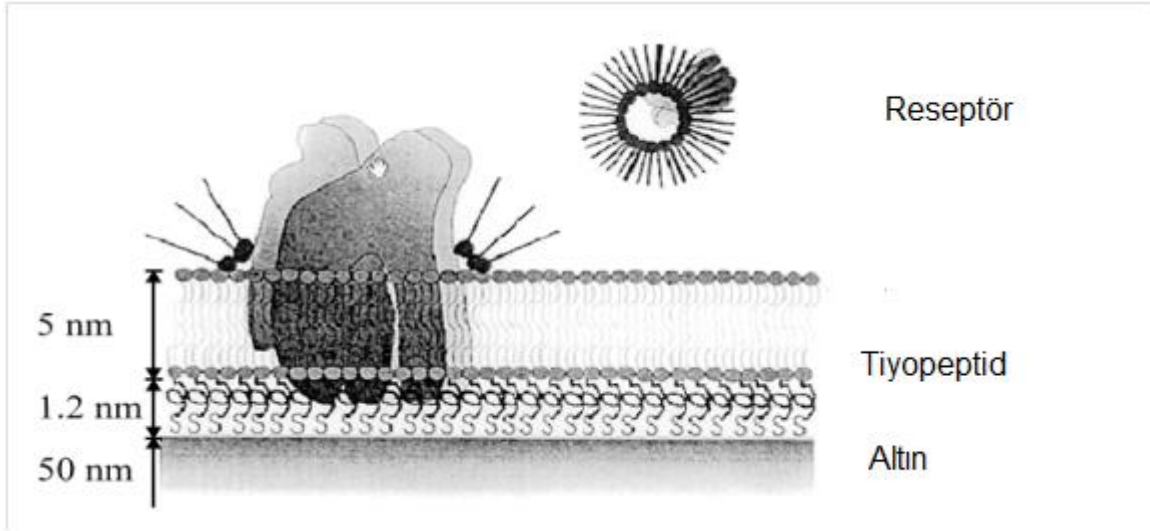
tabakanın enzim tarafından degradesyonu ile oluşan impedans hızla artar. Protein yıkımı ile impedansta oluşan farklanma, elektrot yüzeyinden jelatin tabakasının ayrılma hızı ile orantılıdır. Potansiyostatın cevap süresi çözeltinin karıştırılması ile düşürülebilmektedir ve bu biyosensör sisteminin kollagenaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanışlı bir yöntem olduğu gözlenmektedir. Ancak sensör yüzeyine kaplanmış jelatinin biyosensör tarafından saptanma yeteneği elektrolitlerin varlığında ciddi bir şekilde azalmaktadır. Bu bulgular **Saum ve ark. (1998)** tarafından başka bir biyosensör çalışmasında da ortaya atılarak tartışılmıştır.

Birçok enzim temelli biyosensörde, LB filmlerin karakterizasyonu için uygun olduğundan, elektrotların Lagmuir-Blodgett (LB) yöntemleri ile modifikasyonlarında da impedimetrik teknikler kullanılmışlardır (**Abdelmalek ve ark. 2001**).

Örneğin; sudaki organofosfor pestisitlerinin saptanması için iyon seçimli bir alan-etkin transistör (ISFET) kullanılarak Bütirikolinesteraz (BuChE) içeren LB filmler oluşturulmuştur. Enzim/stearilamin karışımı LB filmleri, filmlerin kararlılığını arttırmak için glutraldehit buharı uygulamasından sonra ISFET boşlukları üzerine immobilize edilir. Önerilen eşdeğer modeli Si/SiO₂/LB film-elektrolit ara yüzeyi ile uyumludur. LB filmin kalınlığı, elipsometri sonuçları ile uyumlu olan bir ayarlama programı tarafından yaklaşık 60 nm olarak belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör Triklorofonun saptanması için kullanılabilir (**Yea ve ark. 2003**), desteklenmiş bir çift tabakalı lipid membran (s-BLM) platinyum nanopartiküller ile birleştirerek bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çıplak camı karbon (GC) elektrodun ve s-BLM ile (hem Pt nanopartikülsüz hem de nanopartiküllü) modifiye edilmiş elektrodun [Fe(CN)₆]^{3-/4-} varlığındaki impedans spektrumları, çıplak GC elektrot elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü adımı için karakteristik olan neredeyse doğrusal bir çizgi şeklinde çıktığını göstermektedir. Modifiye elektrotlar da ise Pt nanopartikül eklenmiş ve eklenmemiş s-BLM'lerin Nyquist kompleks düzlem eğrileri, yüksek frekans alt birimindeki tek bir yarı devre ile karakterize edilir. Bu, s-BLM'leri Pt nanopartiküller ile birleştirmenin membran kapasitansında bir artmaya, membran direncinde de azalmaya sebep olduğu anlamına gelir. S-BLM'ler içerisindeki Pt nanopartikül arrayleri, glukoz biyosensörü yapımında, ortamda bulunan oksijenin indirgenmesi ile elektrokatalize olurlar.

Altın destek üzerindeki peptid bağlı lipid membranlar (t-BLMs) integral membran proteinlerinin araştırılması için bir biyomimetik sistem olarak dizayn edilmiştir (Şekil2.9) (**Naumann ve ark. 1999**). Örneğin, sıgır kalbinden elde edilmiş sitokrom C oksidaz (COX)

önceden oluşturulmuş peptid t-BLM içerisine immobilize edilmiştir. İmpedans spektroskopisi hem lipid filmlerin kalitesini hem de iyonların filmlerden geçişini izlemek için kullanılmıştır. Spektrumlar, elektrot kısmen (% 70) çift tabakalı ve yaklaşık %30 bozulmuş tek tabaka peptid veya, peptid-lipid altbirimleri ile kaplandığı zaman, düşük kaliteli peptid destekli lipid tek- ve çift- tabakaları olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.9. Sitokrom c oksidaz'ın lipid tektabaka içinde yerleşimi (Naumann ve ark. 2002)

İmpedans spektrumları, inhibitör ve substrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Aynı çalışma grubu tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kloroplasttan elde edilen H^+ -ATP sentaz t-BLM içerisine yerleştirilmiştir (Naumann ve ark. 2002). Proteinin aktivitesi impedans spektroskopisi ile gösterilmiştir. ATP hidrolizi sonucunda gerçekleşen lipid tabakadan proton transferinden dolayı direnç azalır. ATP eklenmesinden dolayı oluşan impedans değişimleri tamamen geri dönüşlüdür.

2.7.2. İmmunokimya temelli impedimetrik biyosensörler

İmpidimetrik immünosensörlerin geliştirilmesinde itici güç, basit ekipmanların kullanıldığı tanı sistemlerine olan talep ve potansiyel moleküler etiketsiz analizlerdir. İmmüsensörler için iki immobilizasyon stratejisi çok sıklıkla kullanılır; Sensör, ya ilgili antijeni bağlayan antikorlarla modifiye edilebilir ya da antijenin kendisi immobilize edilebilir. Her iki durumda da, bağlanma olayı elektriksel yüzey özelliklerinin değişimiyle sonuçlanacak olmasına rağmen, ikinci durumda (antijen immobilizasyonunda) antikorların yüksek molekül

ağırlıkları ve düşük dielektrik katsayılarından ötürü daha büyük değişimler açığa çıkarabilir ki bu impedimetrik olarak çok daha etkili bir şekilde izlenebilir.

Kapasitif sensörler tercihen immün reaksiyonların belirlenmesinde oldukça sık bir şekilde kullanılmışlardır. Örneğin yük transferi, uzun zincirli SAM tabakaları kullanılarak azaltılabilmekteydi. Daha sonra şu da gösterilmiştir ki, bağlanma davranışlarının matematiksel tanımlanması devamlı surette bir bağlanma analizini mümkün kılar (**Taira ve ark. 1993, Berggren ve ark. 1998, Bataillard ve ark. 1998**).

Nonspesifik bağlanmaların etkisinin önüne geçmek için (spesifik etkileşimlere benzer yollarla kapasitansı etkilerler), ölçümlere diferensiyel bir mod önerilmiştir. Antikorlar bağlanma özellikleri korunarak Langmuir-Blodgett filmlerine birleştirilebilir ve oldukça düzenli algılama yapıları elde edilebilir. İnterleukin-6 için, epoksisilan işlevselleştirilmesi kullanılarak veya interferon γ için SAM modifikasyonu ile antikor immobilizasyonunda oldukça hassas kapasitif ölçümler gerçekleştirilmiştir (**Berggren ve ark. 1997, Hedstrom ve ark. 2005**).

Bunun yanı sıra, direnç temelli sensörler de geliştirilmiştir. Örneğin, insan meme tümörü ilişkili glikoprotein, spesifik antikorların altın yüzeye kendiliğinden immobilizasyonu ile belirlenmiştir. Bütünleyici antijenin bağlanması yük transfer direncinin (R_{ct}) nin değişimiyle neticelenir. Direnç temelli ölçüm yöntemleri, reseptör-ligand etkileşimleri ve kokulu moleküllerin belirlenmesinde de kullanılır. İmmün analizler için bir diğer sistem, çok ince platin tabakaların kullanıldığı ve impedans model analizlerinin temel alınıp iletkenlik değişimlerinin değerlendirildiği sistemlerdir. Polipirol gibi iletken polimerler kullanılarak algılama biriminin immobilizasyonunda özel yaklaşımlar sergilenmesi, söz konusu immunosensörlerin hassasiyetini iyileştirilebilir. Polimerik ağın iletkenliği, bağlanma olaylarının tetiklediği konformasyonel değişikliklerden güçlü bir şekilde etkilendiği için alınan cevap da o derece yükselir. Biotinli polipirol filmler, biyotinli antikorların avidin ile immobilizasyonunda kullanılmıştır (**Hleli ve ark. 2006, Jie ve ark. 1999, Pak ve ark. 2001, Hou ve ark. 2007**).

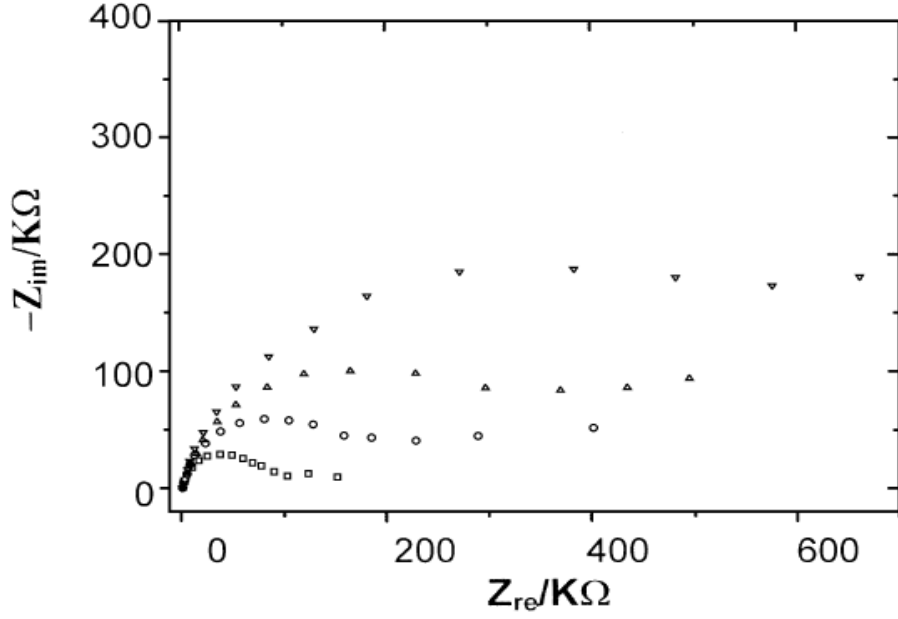
Aşağıda EIS temelli bazı immunosensör örnekleri açıklanmıştır.

Direkt olarak ölçüme olanak tanıdıklarından, işaretleme yapılmadığından, hızlı olduklarından ve çoklu analiz sistemlerine olanak sağladığından dolayı, affinite bağlama esaslı immünosensörler ile her geçen gün daha çok çalışılmaktadır. Son yıllarda, birçok yeni immün temelli impedimetrik biyosensör tasarımına ilişkin çalışma yayınlanmıştır.

Ma ve ark. (1999) insan meme kanserine ilişkin glikoproteininin tayinine yönelik bir impedans immüno sensörü çalışması yayınlamışlardır. Antikor, altın elektrot yüzeyine kendiliğinden adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir. Elektrokimyasal karakteristiklerdeki değişim, spesifik antijen bağlandığı sürece gerçekleşmiştir. Nyquist eğrisindeki yarım daireden hesaplanan yük transfer direnci, kararlı bir antijen-antikor kompleksi olduğundan dolayı artmıştır.

İletken polimerler de biyomoleküllerin immobilizasyonu için iyi birer matrikstir. **Sargent ve Sadık (1999)**, iletken polipirol (PPy) film üzerindeki antikor-antijen (Ab-Ag) etkileşimlerinin mekanizmasını araştırmışlardır. Heterojen polimerik arayüzey içerisindeki yük oluşumunun ve taşınımının teorisi, Ab-Ag bağlanması sırasında oluşan akım akışını açıklamak için öne sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre, antikor immobilize edilmiş iletken polimer temelli elektrotlarda elde edilen akım, dört adımda ortaya çıkar: (1) iyonların elektroda difüzyonu (2) porlu PPy/membran arayüzeyinde yük transferi, (3) polimer PPy membran boyunca göç (4) Antijenin PPy arayüzeyinde adsorpsiyonu veya desorpsiyonu. Dördüncü adımdaki adsorpsiyon ve desorpsiyon süreci, hız sınırlayıcı adımdır. Bu adım uygun elektriksel potansiyel seçimi ile kontrol edilebilir. Bu da Ab-Ag etkileşiminin, uygulanan potansiyelden büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir.

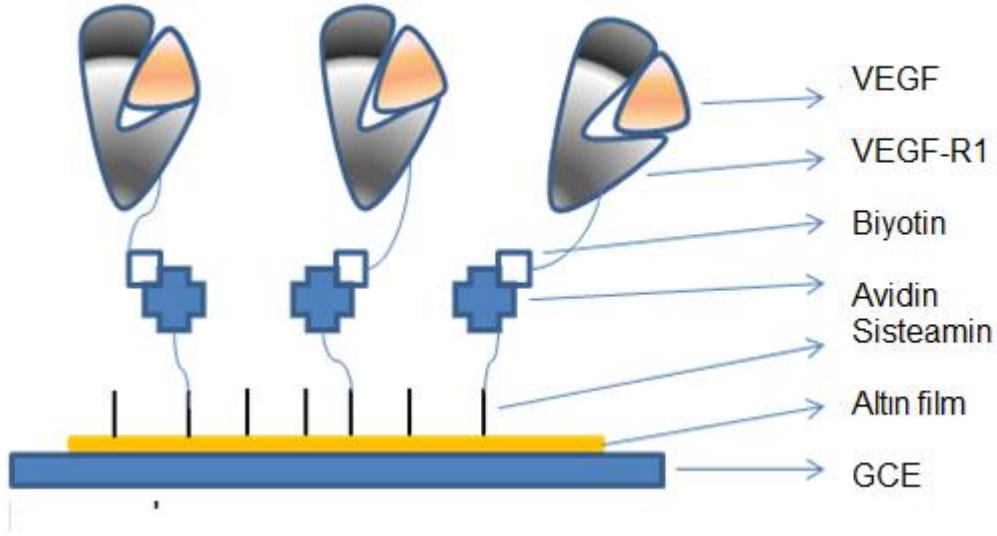
Elektrobiriktirme ile oluşturulmuş biyotinli polipirol film, impedimetrik immüno sensörler için bir immobilizasyon matriksi olarak tanımlanmıştır (**Ouerghi ve ark. 2002**). Biyotinlenmiş antikor (anti Human IgG) iletken polimer üzerindeki serbest biyotin gruplarına avidin vasıtasıyla bağlanır. Aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi, Nyquist eğrilerindeki ikinci yarım daire çapı, özellikle de konsantrasyon bağımlı impedans ölçümlerinde tercih edilen düşük frekanslarda, artan antijen konsantrasyonu ile artmıştır. Bu immobilizasyon yöntemi tekrarlanabilir ve kararlı bir sisteme olanak sağlamaktadır. Biyosensörün doğrusal aralığı 10-80 ng/mL antijen ve dedeksiyon limiti 10 pg/mL'dir.



Şekil 2.10. Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları (**Ouerghi ve ark. 2002**)

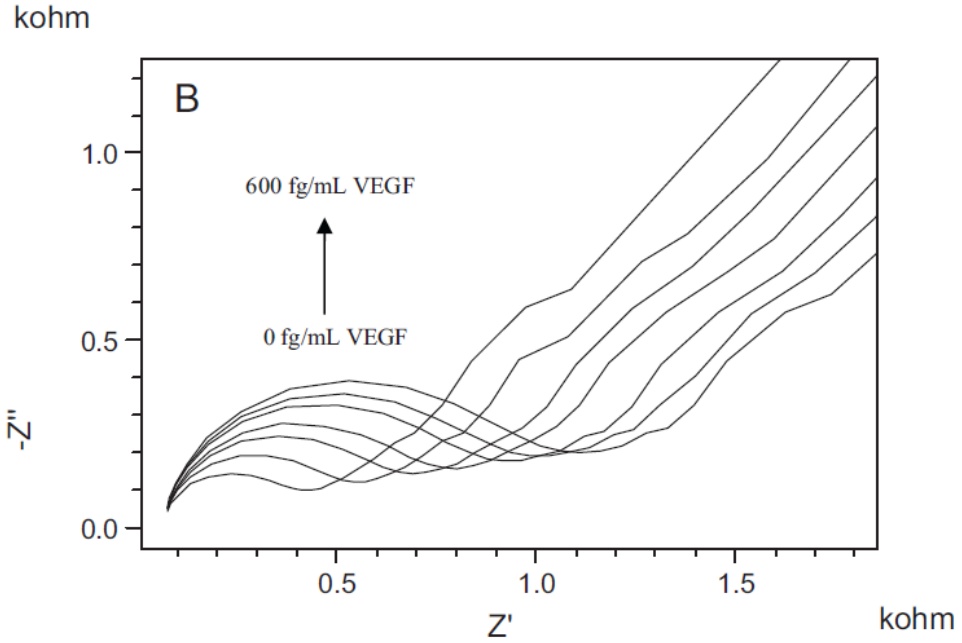
Başka bir polipirol immobilizasyon matriksi kullanılan çalışma da, **Geoffrey ve ark. (2001)** tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada impedans temelli reaktifsiz biyoafinite biyosensörü geliştirmiştir. Antikor-yüklenmiş polipirol filmlerde, düşük frekanslarda polaronik iletim ve yüksek frekanslarda elektriksel iletim olmak üzere iki tane yük transfer prosesi gözlenmiştir. Affinite reaksiyonu Bode eğrisinde hiçbir farklılaşmaya sebep olmamıştır. Ancak, Redoks döngüsü (-0,1'den -0,9'a ve -0,9'dan -0,1'e) olduğunda, pik polaronik faz açısı olarak gözlenen muhtemel bir bağlanmaya bağlı cevap oluşur. Bu sonuç, bağlanma sonrasında protein etrafındaki polimer zincirin tekrardan sıralanmasına dayandırılmaktadır. Bu nispeten karmaşık bir prosestir.

Protein çoklu tabakalar da, redoks probu varlığında impedans spektroskopisi ile araştırılmışlardır (Şekil 2.11). Bu prensibin kullanıldığı bir çalışmada, özellikle meme kanseri biyomarkeri olarak değerlendirilebilen, vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF) tayini gerçekleştirilmiştir (**Uygun ve ark. 2011**). Tabaka-tabaka oluşturma yöntemiyle hazırlanmış çoklu tabaka film, bir altın tabaka üzerinde biyotin-işaretli antikor (bio-Ab) ile avidinden oluşmuştur. Multitabakaların adım adım oluşumu sırasında impedans spektrumundaki belirgin bir farklanma gözlenmiştir. Sensör yüzeyine ilave edilen her tabaka, kendi elektriksel özelliklerine bağlı olarak elektron transfer rezistansını değiştirmektedir. Bu adımların sonunda biyo-reseptörün ve onun ligandının (VEGF) bağlanması R_{ct} değerini artırmıştır.



Şekil 2.11. Çok tabakalı biyolojik reseptör immobilizasyon adımlarının şematize edilmiş hali (Uygun ve ark. 2011)

Böyle bir sistemde artan VEGF derişimlerine karşı elde edilen biyosensör yanıtları (Nyquist diyagramında) aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

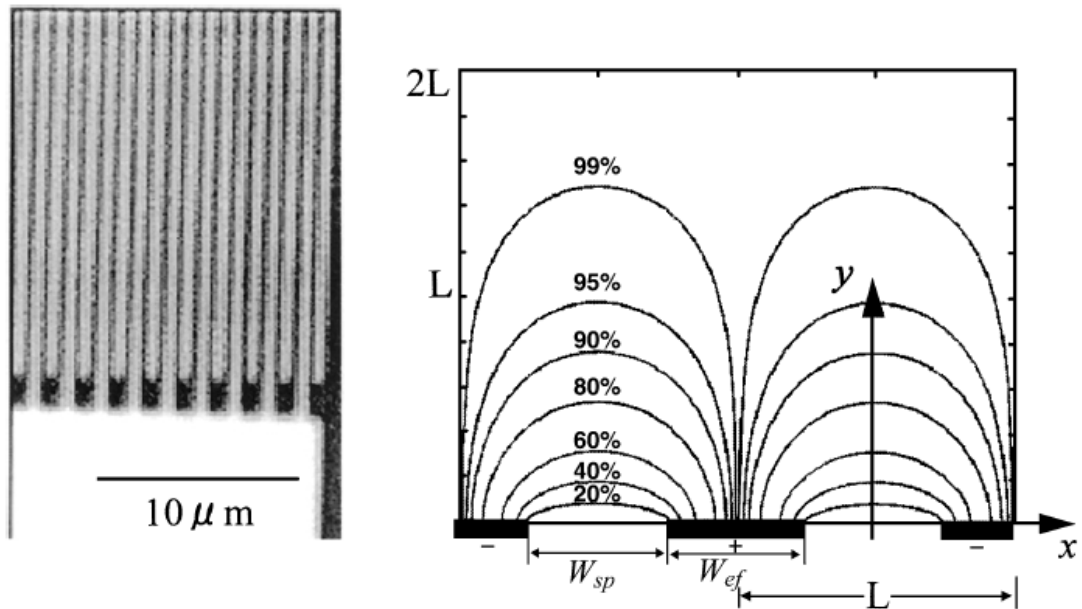


Şekil 2.12. Artan VEGF konsantrasyonlarına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumlarının gösterilmesi (Uygun ve ark. 2011)

İmpedans spektroskopisi, ISFET cihazlarının gözenekli yüzeyleri üzerindeki biyomateryal tabakalarının yapısını karakterize etmek ve oyuk ara yüzeyindeki antijen-antikor

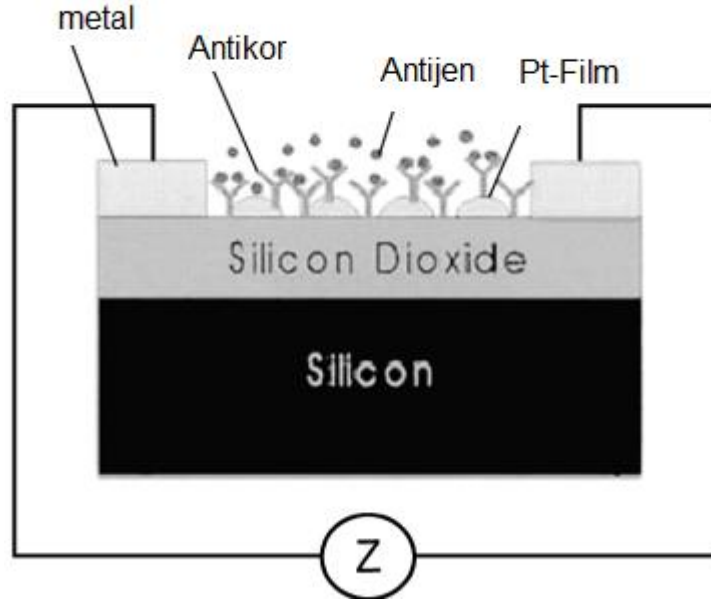
etkileşimlerini açıklamak için de kullanılır (Kharitonov ve ark. 2001). ISFET cihazlarının oyuk ara yüzeyleri üzerindeki protein tabakalarının kalınlığını karakterize edebilme yeteneği impedans spektroskopisinin sadece yapısal karakterizasyonlara olanak sağlamadığını, aynı zamanda ISFET oyukları üzerinde gerçekleşen biyo algılama olaylarını ölçen ve saptayan bir analitik yöntem olduğunu göstermektedir.

Nano boyutlarda sensör geliştirmek, impedimetrik biyosensörlerin cevap performansını arttırabilir (Van Gerwen ve ark. 1998). Nano boyutta kenetlenmiş (interdigitated) elektrot arrayleri ile impedimetrik biyosensörler geliştirmişlerdir (Şekil 2.13). Bu sistemde 500 den 250 nm ye kadar değişen elektrot genişliği ve boşlukları elde edilmiştir. Nano boyutlardaki elektrotlar, yüzeyden sadece 100 nm yukarıdaki bir alanı tararlar. Bundan dolayı diğer elektrotlara kıyasla duyarlılıkları daha fazladır. Bu etki teorikte, interdigitated elektrotlar arasındaki elektriksel alanın hesaplanması ile değerlendirilebilir. Örneğin genişliği ve aralıkları 250 nm olan elektrotlar için akımın %80'i yüzeyden 250 nm daha yüksek olmayan bir tabakaya yayılır. Farklı KCl çözeltilerindeki model ve karakterizasyon çalışmaları, impedansın neredeyse tamamının yüzeye yakın bir süreçte hesaplandığını ve çözelti karakteristiklerinin sinyalde gözükmediğini göstermiştir. Biyomoleküler yapıların, affinite bağlanmalarının impedans ile saptanması için, glukoz oksidaz silanlanmış bir yüzeye bağlanmıştır.



Şekil 2.13. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi (Van Gerwen ve ark. 1998)

Silanlama sonrasında, sensörün çift tabakalı impedansı, bir sabit faz elemanı ile gösterilir. Bu parametrenin ölçümü GOD immobilizasyonunun in situ izlenmesini kolaylaştırmaktadır. Nano boyuttaki platin tabaka temeline dayanan yeni bir immüno-biyosensör **Pak ve ark. (2001)** tarafından geliştirilmiştir.



Şekil 2.14. Ultrathin platin film immunosensörün şematik gösterimi (**Pak ve ark. 2001**)

Film 25 Å kalınlığında tabakalardan oluşmuş ve 20-30 Å kalınlığında aralıklı kanallar içermektedir. Monoklonal antikorlar sensör yüzeyine, silanizasyon yardımıyla immobilize edilmişlerdir. Bu çalışmada, film boyunca sabit frekansta ölçülen impedans değerleri, modifikasyon ve yüzeye bağlanmayı ölçmek için kullanılmıştır. 20 Hz'deki impedans, yüzeyin anti-alkalen fosfataz ile (anti-AP) aktivasyonu süresince % 55 artmıştır. Devamında Alkalin fosfatazın bağlanması da %12'lik bir artışa sebep olmuştur.

Katz ve ark (2001) tarafından dedeksiyon için yeni konsept bir impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Çözünmeyen bir maddenin, elektrot yüzeyinde biyokataliz ile çöktürülmesi, immüno-sensörler için önemli bir prensiptir. Çöktürme prosesini takiben, faradaik impedans spektroskopisi ve kronopotansiyometri yöntemleri kullanılır. Bu çalışmada, elektrot yüzeyine, dinitrofenil antikorunun tayinine için, spesifik bir antijen immobilize edilmiştir. Enzim reaksiyonu sonucu oluşan çözünmeyen ürünü oluşturmak için, Antikor-HRP konjugatı biyokatalist olarak kullanılmış ve uygulanmıştır. İmpedans analizleri, çözünmeyen maddenin elektrot yüzeyinde çöktüğünü ve elektron transferine engel olan yalıtkan bir tabaka oluşturduğunu, bunun da elektron transfer direncini arttırdığını çok net bir şekilde göstermektedir.

Biyolojik reseptörlerin biyosensörlerde kullanımının, biyolojik maddelerin düşük kararlılığı, küçük antijenlerin immünizasyonunun zorlukları ve düşük kimyasal-termal kararlılıklar gibi iyi bilinen sınırlayıcı faktörleri vardır. Bundan dolayı doğal reseptörleri taklit edebilen, yapay resptörlerin geliştirilmesine yönelik yeni eğilimler ortaya çıkmaya başlamıştır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) kararlı ve dirençli, ekstrem basınç, sıcaklık, pH altında veya organik solventler içerisinde kolaylıkla uygulanabilen materyallerdir. MIP ler analitin “negatif”i yönünde davranan bir yüzey sağlarlar ve böylelikle karışımın içindeki analit belirlenir. Kimyasal yapılarından ötürü, farklı formatlarda tekrar üretilebilirler ve farklı çevresel koşullarda uzun zaman stabil kalabilirler. Kromatografik ayırmalarda kullanılmalarının yanı sıra, sensör uygulamalarına dair de ilginç çalışmalar mevcuttur. İnce yüzey filmleri özellikle bağlanma olayının impedimetrik transdüksiyonuna çok uygundur. Bu sayede, hücre ve virüslerde olduğu gibi organik moleküller için de kapasitif sensörler geliştirilmiştir. Ayrıca ucuzdurlar ve katı (kuru) halde saklanabilirler. MIPs sadece pestisit, aminoasit, steroid ve şekerler gibi organik moleküller için değil; hücre ve proteinler için de sentezlenebilirler (**Andersson ve ark. 2000**). **Panasyuk-Delanet ve ark. (2001)** yılında MIP temelli bir biyosensör geliştirmişlerdir Bu çalışmada bir herbisit olan desimetrim kalıp olarak kullanılmıştır. UV ışığa maruz kalan benzofenonun ışığı adsorblamış tabakası, yüzeye yakın bölgede radikal polimerizasyonunu başlatır. Elektrotların, desimetrimini spesifik bir şekilde tanıyan ve bağlayan MIP ile kaplanması, elektrodun kapasitansında düşmelere sebep olur. Terbumeton veya atrazin eklendiğinde kapasitansta küçük bir düşme varken, metribuzin eklendiğinde desimetriminkine benzer bir düşüş gözlenir. Moleküler baskılama (kalıp polimerizasyonu) ümit vadeden ve pahalı olmayan bir alternatif yöntemdir. Ancak analitlerin ince MIP içerisine yavaş difüzyonu, yavaş reaksiyon kinetiğinin oluşmasına sebep olur.

2.7.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler

Nükleik asitlerin impedimetrik yolla belirlenmesi de bu alanda gerçekleştirilen araştırmalar arasındadır. ssDNA ve dsDNA ayrımı damlayan civa elektrot ile belirlenmiştir (**Hason ve ark. 2002, Strasak ve ark. 2002**). Hibridizasyonun voltammetrik analizi için pek çok sayıda çalışma mevcuttur.

Elektrot yüzeyinde ss- veya ds-DNA'nın bulunması durumunda, farklı moleküler yapılar, farklı spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir. Bu durum, oligonükleotit konsantrasyonunun ve baz çifti uyumsuzluklarının impedimetrik yöntemle

belirlenmesinin temelini oluşturmaktadır. Özellikle DNA tayininde, hibridizasyon boyunca meydana gelen yük birikimi, redoks aktif bir maddenin dönüşümünü gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Bu tür biyosensörlerde hassasiyeti modifiye etmek için interkalasyon kullanılabilir. Prob DNA'nın yüzey konsantrasyonu, sensör performansında önemli bir etkiye sahiptir. Performans, dendrimerlerin kullanılmasıyla da kuvvetli bir şekilde artırılabilir. Polielektrolit ile modifiye edilen Screen-printed elektrotların da bu çalışmalar için bir alternatif olduğu ve tanıyıcı moleküller olarak ss-PCR ürünleri ile birlikte kullanıldığı da gösterilmiştir. Bu alanda, kapasitif ölçümlerin, direnç temelli metotlara göre daha düşük hassasiyette olduğu bulunmuştur (**Xu ve ark. 2006, Li ve ark. 2007, Davis ve ark. 2007**).

DNA analizinde önemli bir nokta, tek baz çifti yanlış eşleşmelerin belirlenmesidir. İmpedans spektroskopisi bu alanda da kullanılmaktadır (**Cho ve ark. 2006**). Transdüksiyon yöntemleri, ligasyon (bağlanma) gibi spesifik biyokimyasal protokollerle kombine edilebilir. Yani, sensör yüzeyindeki farklı DNA yapılarını (B- veya M-DNA konformasyonları gibi) impedimetrik olarak analiz etmek mümkündür ki bu oldukça ilginç bir uygulama alanını da ortaya çıkaracaktır (**Long ve ark. 2003**).

Benzer şekilde, iletken polimerler kullanılan sensörlerde, prob DNA, hedef DNA bağlanması sonrasında ara yüzeydeki değişikliklerin belirlenebilmesi için bu tip polimer filmlere bağlanabilir. Bu durumda, dirençte bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca doymamış yan zincirleri olan fonksiyonel polipirol türevlerinin sensör uygulamalarında üstün olduğu gösterilmiştir (**Li ve ark. 2005, Wang ve ark. 1999**).

Elektropolimerizasyon yöntemi, DNA'nın mikroelektrotlara immobilizasyonunda ve bu sayede *dizi* üretiminde çok uygun bir metottur. Polipirole alternatif olarak, kinon içeren polimerler de geliştirilmiştir (**Li ve ark. 2005**).

DNA-DNA bağlanmasının belirlenmesinin yanı sıra impedans tekniği DNA-analit etkileşimlerinin analizinde de kullanılmaktadır. Pek çok küçük organik molekül ve büyük proteinler DNA ile spesifik etkileşim meydana getirirler. Bu sayede bu maddelerin analitik tayini mümkün olmaktadır. Cisplatin ve mitramisin'in protein bağlanması, spesifik DNA-protein bağlanmasına örnek olarak verilebilir. Aptamerler, algılama moleküllerinin yeni bir sınıfı olarak karşımıza çıkmakta ve impedimetrik transdüksiyon ile kombinasyonu, çok sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (**Radi ve ark. 2006, Cai ve ark. 2006, Rodriguez ve ark. 2005, Zayats ve ark. 2006**).

Aşağıda EIS temelli bazı nükleik asit biyosensör örnekleri açıklanmıştır.

Damlayan civa elektrot, nükleik asitlerin ve sentetik polinükleotidlerin tek iplikli ve çift iplikli konformasyonları arasındaki konformasyon farkını algılamak için kullanılmıştır (**Strašák ve ark. 2002**). Elektrot çift tabakasının impedansının, frekans bağımlılığı kompleks bir impedans eğrisi göstermesinden dolayı, DNA kaplı elektrodun elektrik eşdeğer devre modeli belirlenebilir. Denatüre ss-DNA'nın desorbsiyonu, ds-DNA'nın desorbsiyonuna nazaran daha yüksek bir dielektrik kayıba neden olur. Bu ss-DNA'nın, ds-DNA'dan daha esnek olması ile açıklanır. Çift iplikli ve tek iplikli DNA'yı AC impedans spektroskopisi ile karakterize etmek için sıklıkla elektroaktif indikatörler kullanılır.

Zhao ve ark. (1999) çıplak altın elektrodun, ds-DNA/Au ve ss-DNA/Au elektrotlarının $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ çözeltisi içerisindeki impedans spektrumlarını araştırmışlardır. Sonuçlar $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ 'nın, dsDNA ve ssDNA ile olan etkileşimlerinden dolayı, DNA modifiye elektrotlarda biriktiğini ve DNA'nın altın yüzeylere adsorpsiyonla bağlanabildiğini göstermektedir. Ferrosen hekzafloro fosfat (FcPF6) da başka bir çalışmada elektroaktif indikatör olarak kullanılmıştır (**Ye ve ark. 2003**). Tek iplikli hepatit B virüsü (HBV) DNA'sı, tiyoglikolik asit (TGA) kendiliğinden oluşan tek tabakasının karboksil grubu ile ester bağı yapılması yoluyla altın elektrot yüzeyine immobilize edilmişlerdir. Yüzeydeki Fc^+ 'nın, ss-DNA ve ds-DNA etkileşiminin ispatı olan immobilizasyon ve hibridizasyon reaksiyonları, AC impedans spektroskopisi ile izlenmiştir. FcPF6 ile HBV'nin elektrot yüzeyine immobilize edilen ss-DNA veya ds-DNA'ları arasındaki etkileşim mekanizmasının, tahmin edileceği üzere elektrostatik olduğu bulunmuştur.

Brett ve ark. (1999) elektrot yüzeyindeki DNA üçlü heliks oluşumunu, bir impedimetrik teknik ile karakterize ederek tanımlamışlardır. Immobilize ds-DNA içeren camı karbon elektrot, ss-DNA içeren bir çözeltiliye daldırılıp 0,0 veya +1,4 V potansiyel uygulandığında, ss-DNA göçü meydana gelir. Ds-DNA ve ss-DNA arasındaki etkileşim, DNA konformasyonunda modifikasyonlara sebep olur. Çözeltideki ss-DNA ile yüzeye bağlı ds-DNA arasındaki etkileşimin, elektrot yüzeyinde üçlü heliks DNA yapılarının oluşmasını sağlaması muhtemeldir. Bu durum, impedans ve voltammetrik veriler ile desteklenmiştir.

Yüzey-aktif (surfaktan) moleküllerden oluşmuş çift tabakalı lipid tabakalar (BLMs) doğal hücre membranları ile biyoyumludurlar. Altın elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan yüksüz surfaktan Brij-52 membranları çok kararlıdır ve affinite etkileşimlerinin saptanmasında impedimetrik transduser olarak kullanılabilirler (**Vagin ve ark. 2002**). Yüzey

aktif çift tabakanın hidrofobik bölgesine, oligonükleotid pentadecatimidilat (dT15) bağlı bir hidrokarbon zincirinin girişi veya çift tabaka yüzeye antikor adsorpsiyonu ile antikor veya oligonükleotidlerin immobilizasyonları gerçekleştirilir. Spesifik DNA eşlenmesi impedansın reel bölümünde bir düşüşe ve antikor-antijen etkileşimleri de yine reel kısımda bir yükselmeye sebep olur. Bundan dolayı, modifiye oligonükleotidlerin, hidrokarbon zincirlerinin iç kısımlarında sebep olduğu lokal bozulmalar, membran direncinde azalmaya neden olur. Aynı zamanda, elektrot yüzeyindeki, yüzeyler arası tabakanın kalınlığını arttıran antijen bağlanması, iyon geçişini engeller. Bu etki impedansın reel kısmını artırır. Sonuçlar klinik analizler veya çeşitli çevresel kirliliklerin saptanması için tasarlanmış impedimetrik affinite biyosensörlerinin geliştirilmesini kolaylaştırabilir.

Hipoksantin ve inosin-5-fosfat üzerine elektrokimyasal çalışmalar, elektrot yüzeyindeki pürin bazlarının ve pürin nükleozidlerinin oksidasyon mekanizmasının ve adsorpsiyonunun anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Bu alanda artan bilgiler DNA biyosensörlerinin geliştirilmesine ve zehirli bileşiklerin, DNA'ya nasıl hasar verdiğinin anlaşılmasına yardım etmiştir. Hipoksantin için gerçekleştirilmiş bir impedans spektroskopisi çalışmasında, hipoksantin oksidasyonuna karşılık gelen potansiyelde, düzgün, karakteristik yarım daireler elde edilmiştir (**Oliveira-Brett ve ark. 2003**). Oksidasyon bölgesinde bir potansiyel uygulandığında, R_{ct} başlangıç değerine göre üç kat artmıştır. Ancak açık devrede R_{ct} de küçük bir artış olur. Bu durum, adsorpsiyonun spontane olmadığını ve adsorpsiyon için bir potansiyel uygulamasının da gerekli olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı buradaki adsorpsiyon, oksidatif proses ile ilişkilendirilebilmektedir. Adsorblanan türler, oksidasyon sonucu oluşan elektroaktif oligomer ürünlerdir ve bunlar elektrot yüzeyini bloke etmişlerdir. Bu çalışmada oksidasyon mekanizmasının aydınlatılması, sulu ortamda bu maddelerin tayin edilmesine olanak sağladığı gibi, impedans spektroskopisinin elektrot proseslerinin aydınlatılmasında da kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

2.7.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler

Maddelerin biyolojik etkilerini geniş bir alanda gözlemlemek ve spesifik analitlerin tayini için hücre temelli analizlerde son zamanlarda hızlı bir artış vardır. Herhangi bir hücre ya da mikroorganizma durumunda, tüm biyolojik sistemin cevabını rapor edebilecek parametrelere ihtiyaç duyulur. İmpedans bu parametrelerden biridir; çünkü metabolik aktivite, yüzeydeki hücre adezyonu, potansiyel ilaçlardan alınan yanıt ve sitotoksitite testlerinin indirekt analizinde kullanılabilmektedir (**Hug ve ark. 2003, Yotter ve ark. 2004**). Hücre

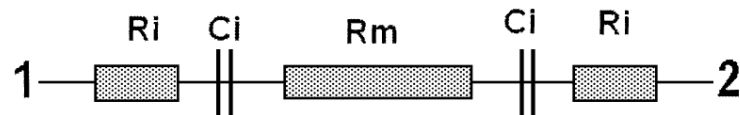
kültüründe veya tek bir hücreye ait çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, insan kolon kanseri HT-29 hücre şeklinin apoptosis indüklü değişiklikleri bu şekilde araştırılmıştır (**Yin ve ark. 1996**).

İmpedans, sadece yüzeyde sabit hücreler hakkında bilgi edinmek için değil aynı zamanda çözeltideki hücrelerin sayısını belirlemek için de kullanılır. Bu yöntemin yoğun bir şekilde, mikrobiyolojide bakterilerin tanımlanmasında, sayımında ve belirlenmesinde kullanıldığı gösterilmiştir. İmpedans ayrıca, spesifik bakteriyal hücreler, antikolar ve bakteriyofajlar için de kullanılabilir. İmpedimetric analiz lösemi hücrelerin belirlenmesinde de kullanılmıştır (**Jonsson ve ark. 2006, Yang ve ark. 2006, Maalouf ve ark. 2007, Silley ve ark. 1997**).

Aşağıda EIS'nin kullanıldığı, bazı hücre ve mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri açıklanmıştır.

Elektrokimyasal impedansın mikrobiyoloji alanında genel uygulaması mikroorganizmaların tayin edilmesi ve tanımlanmasıdır (**Felice ve ark. 1999**). Mikrobiyal büyümeler sonucu elde edilen impedans ölçümleri, mikrobiyal büyümenin hızlı ve düzenli takibine olanak sağlamaktadır. Aşağı yukarı $1 \times 10^3 - 3 \times 10^7$ hücre/mL, impedans eğrilerinde saptanabilir bir değişim üretebilir (**Madrid ve ark. 1999**).

Bakteriyel büyüme süresince elektrot-elektrolit ara yüzeyinin teorik analizi, birçok bilim adamı tarafından çalışılmıştır. İmpedans mikrobiyolojisinin temel prensibi şekil 2.15'de gösterilmiştir. Burada iki elektrot arasındaki impedans bir seri devre ile modellenir. Devre modeli; ortam iletkenliğini (G_m), ara yüzey iletkenliğini (G_i), her elektrodun kapasitansı (C_i) ve toplam iletkenlik (G) yi kapsar. Genel anlamda C_i elektrot-elektrolit arayüzeyinin çift tabaka kapasitesini göstermektedir.



$$|Z_{1,2}| = \sqrt{(R_m + 2R_i)^2 + (1/\pi \cdot f \cdot C_i)^2} \quad R = R_m + 2R_i$$

Şekil 2.15. İki elektrot arasındaki elektriksel devre modeli (**Madrid ve ark. 1999**)

Mikroorganizma büyümesi boyunca oluşan metabolik ürünler, ortamın bileşimini değiştirir, bununla birlikte iyonik içeriğin de farklılaşması, kültür ortamının iletkenliğinin değişmesine sebep olur (**Cady ve ark. 1978**). Ayrıca değişmeler elektrot-elektrolit arayüzeyinde de gerçekleşir. İmpedimetrik tekniklerle izlenebilen bunun gibi modifikasyonlar canlı mikroorganizma konsantrasyonu ile orantılıdır.

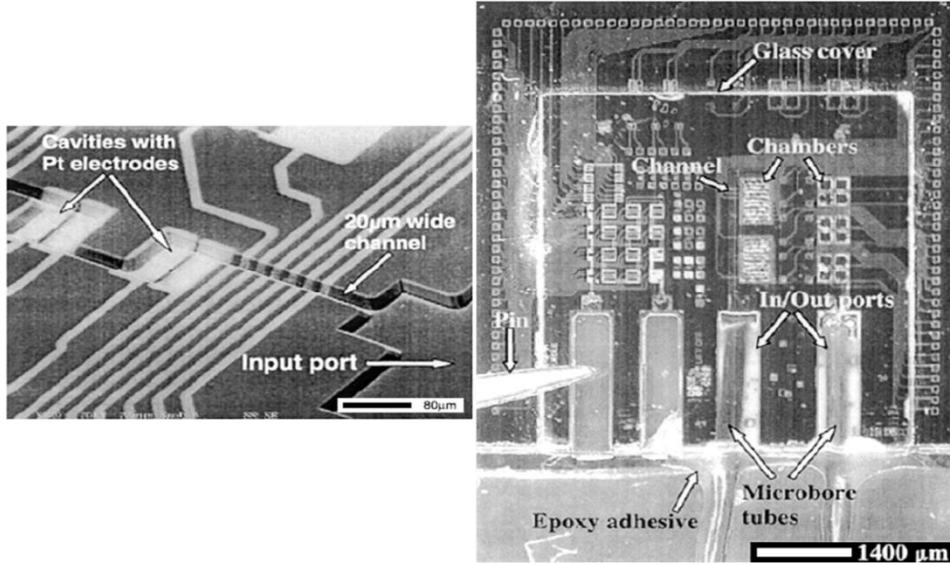
Mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler, mikroorganizmaların günlük ürünler ve süt içerisinde saptanması ve tayin edilmesinde kullanılmaktadır. **Cady (1978), Gnan ve ark. (1982)** sütün mikrobiyal içeriğinin hızlı izlenmesi için petri'deki m/o saymasına alternatif bir impedimetrik yöntem geliştirmiştir. Bundan sonra, günlük ürünler için, Bactomer, Malthus System ve BacTrac gibi birçok ticari sistem geliştirilmiştir. Ayrıca balıkta, ette, şarapta, meyve suyunda ve içilebilir sudaki toplam mikroorganizma sayısını izlemeye yönelik impedimetrik teknikler de geliştirilmiştir (**Pirovano ve ark. 1995, Neaves ve ark. 1988, Flint ve ark. 2001, Van Spreken ve ark. 1986, Russell ve ark. 1994, Henschke ve ark. 1988, Deak ve ark. 1993, Colquhoun ve ark. 1995, Depaola ve ark. 2001**).

Endotelyal tek tabakaların elektriksel impedansları, dinamik akış şartları altında Depaola ve ark. Tarafından araştırılmıştır (**Wegener ve ark. 2000**). Tek tabakaların impedanslarındaki farklılıklar, endotelyal hücre morfolojisi ve fonksiyonundaki değişimlerle doğru orantılıdır. Bu sonuçlar endotelyal tek tabakaların impedansının, hücre tabakasındaki işlevsel ve/veya morfolojik değişimlerle dinamik olarak değiştiğini göstermektedir.

İmpedansın yeni bir uygulaması da memeli hücresi ile yapay yüzeyler arasındaki etkileşimlerin incelendiği, hem bilimsel hem de medikal açıdan çok önemli bir çalışmadır. ECIS olarak bilinen yöntem, petri kabı üzerine biriktirilmiş küçük bir altın elektrodun AC impedansındaki değişmelerin ölçülmesi esasına dayanır ve bir büyüme substratı olarak kullanılır. Bu yöntem memeli hücrelerinin gerçekte yayılmasının ve yapışmasının sayısal olarak izlenmesinde kullanılır. Epitelyal MDCK hücrelerinin farklı protein kaplamaları üzerindeki yapışması ve yayılması Wegener ve ark. Tarafından bulunmuştur (**Gómez ve ark. 2001**).

Biyoçip veya lab-on-a-chip, biyolojik türlerin işlenmesi için kullanılan mikro ölçüde üretilmiş cihazlardır. Bunlar biyosensörler için en cazip araştırma alanı haline gelmiştir.

Gomez ve ark. (1992) mikroorganizmaların impedans spektroskopisi için mikroelektronik bir biyoçip fabrikasyon ve karakterizasyonu geliştirmişlerdir



Şekil 2.16. IDE temelli biyoçip'in kanallarının SEM görüntüsü ve bir mikro akışkanlı biyoçip'in resmi

Geliştirilen cihaz akışkan kanallar, düzlemsel akışkan arayüzey portlar, entegre metal elektrotlar ve cam bir kapaktan ibarettir. Toplam akışkan yol hacmi yaklaşık 30 nanolitredir. Biyoçip içerisine enjekte edilen canlı bir mikroorganizma (*Listeria innocua*) süspansiyonu için alınan elektriksel impedans ölçümleri, bakteri hücrelerinin canlılığının saptanması için kolay bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyel metabolizmanın sebep olduğu iyonik şiddetteki değişim, düşük iletkenlikteki süspansiyon ortamının elektriksel karakteristiklerini çok ciddi bir şekilde farklılaştırmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneyde kullanılan tüm reaktifler, HER3 ve anti-HER3 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır. Tüm seyreltme işlemleri pH 7' de 0.01M olarak hazırlanan fosfat tampon ile yapıldı. Anti-HER3 ve HER3 belli konsantrasyonlarda porsiyonlama yaparak -20°C' de muhafaza edilmiştir. Çalışma elektrotu olarak 3-20 mm boyutlarında poli etilen terafilat kaplı İndinyumtinoksit (PET/ITO) elektrot, referans elektrot olarak KCl ile doygunlaşmış 3 M Ag/AgCl elektrot ve yardımcı elektrot olarak ise 10 mm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Tüm elektrotlar iBAS, Warwickshire, UK firmasından getirilmiştir. Ölçümler ise döngüsel voltametri 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) cihazında alınmıştır.

3.2. Elektrokimyasal Ölçümler

PET/ITO elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu ölçmek için döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. CV için potansiyel aralığı -0,5 – 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır.

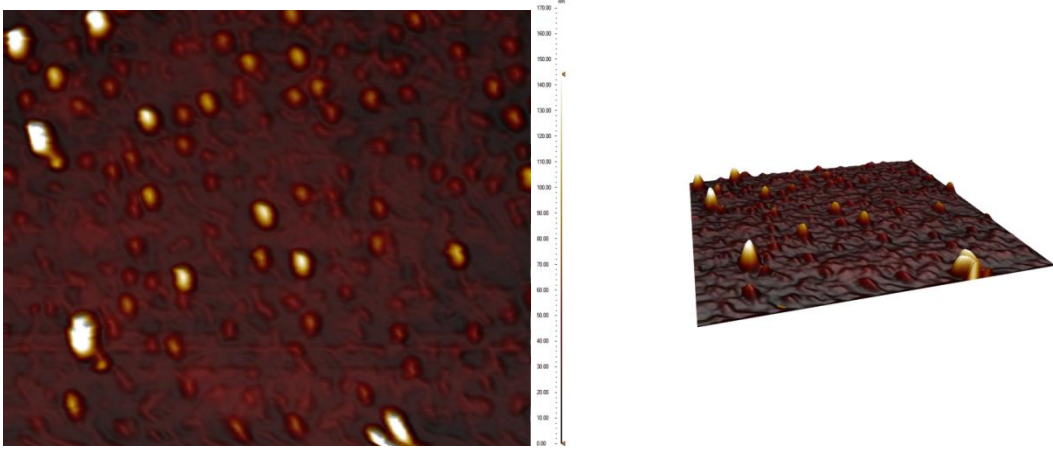
3.3. Ölçüm Prosedürleri

Anti-HER3' ün elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki aşama HER3' ün elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlamaktır. Standart HER3 konsantrasyonu 40 fg/ μ L olarak alınarak elektrot 100 μ L'lik ependorflarda bulunan numune içerisine daldırılmıştır. Her inkübasyon periyodundan sonra elektrot yüzeyinde fiziksel olarak absorblanmış HER3' ü uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkanarak ve $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede CV ve EIS ölçümleri alınmıştır.

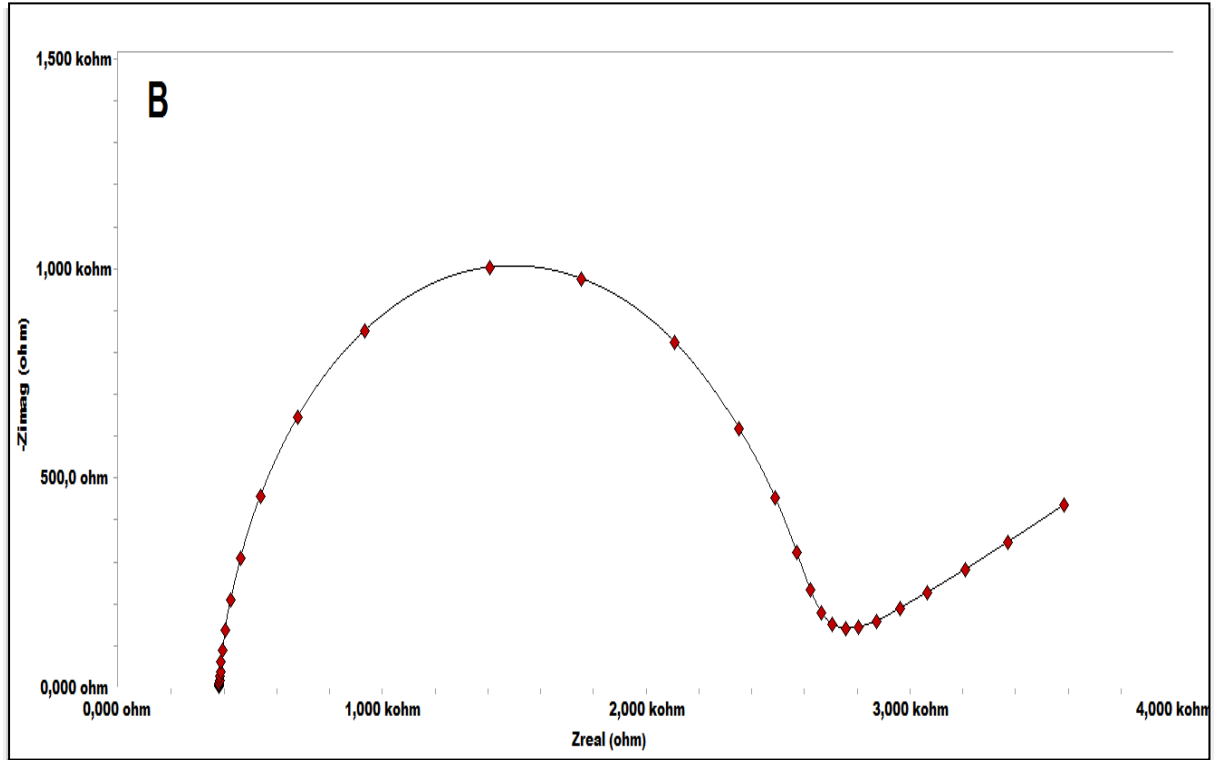
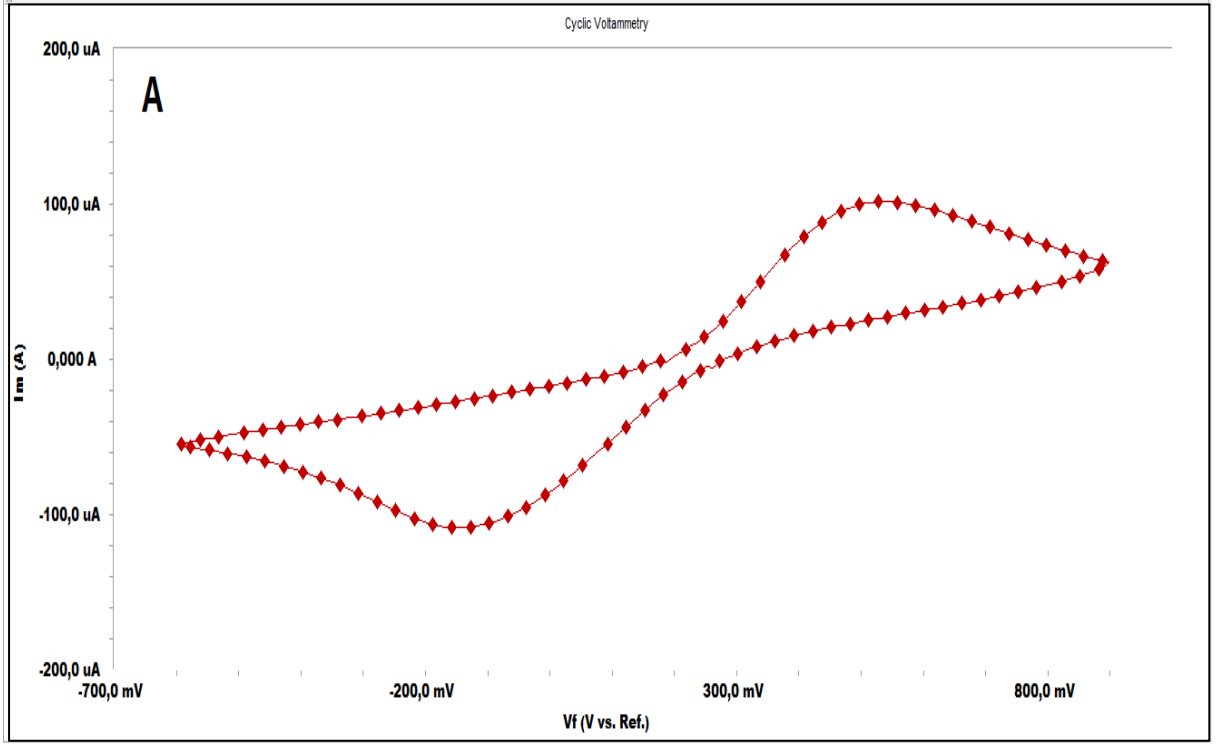
3.4. İmmobilizasyon Süreci

3.4.1. PET/ITO elektrotların hazırlanması

3 mm – 20 mm boyutlarında ITO elektrot kesilmesi işleminden sonra, elektrotlara temizlik prosedürü için 10 dakika aseton, 10 dakika sabun çözeltisi ve 10 dakika saf su içerisinde sırasıyla sonikasyon cihazıyla işlem yapılmıştır. Daha sonra, ITO elektrotların yüzeyinde immobilizasyon yapabilmek için yüzeyde hidroksil grupları oluşturulmuştur. Bu işlem (5:1:1) H₂O, H₂O₂ ve NH₄OH içerisinde 1 saat muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. Hidroksil gruplarının oluşup oluşmadığı döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak gösterilmiştir.



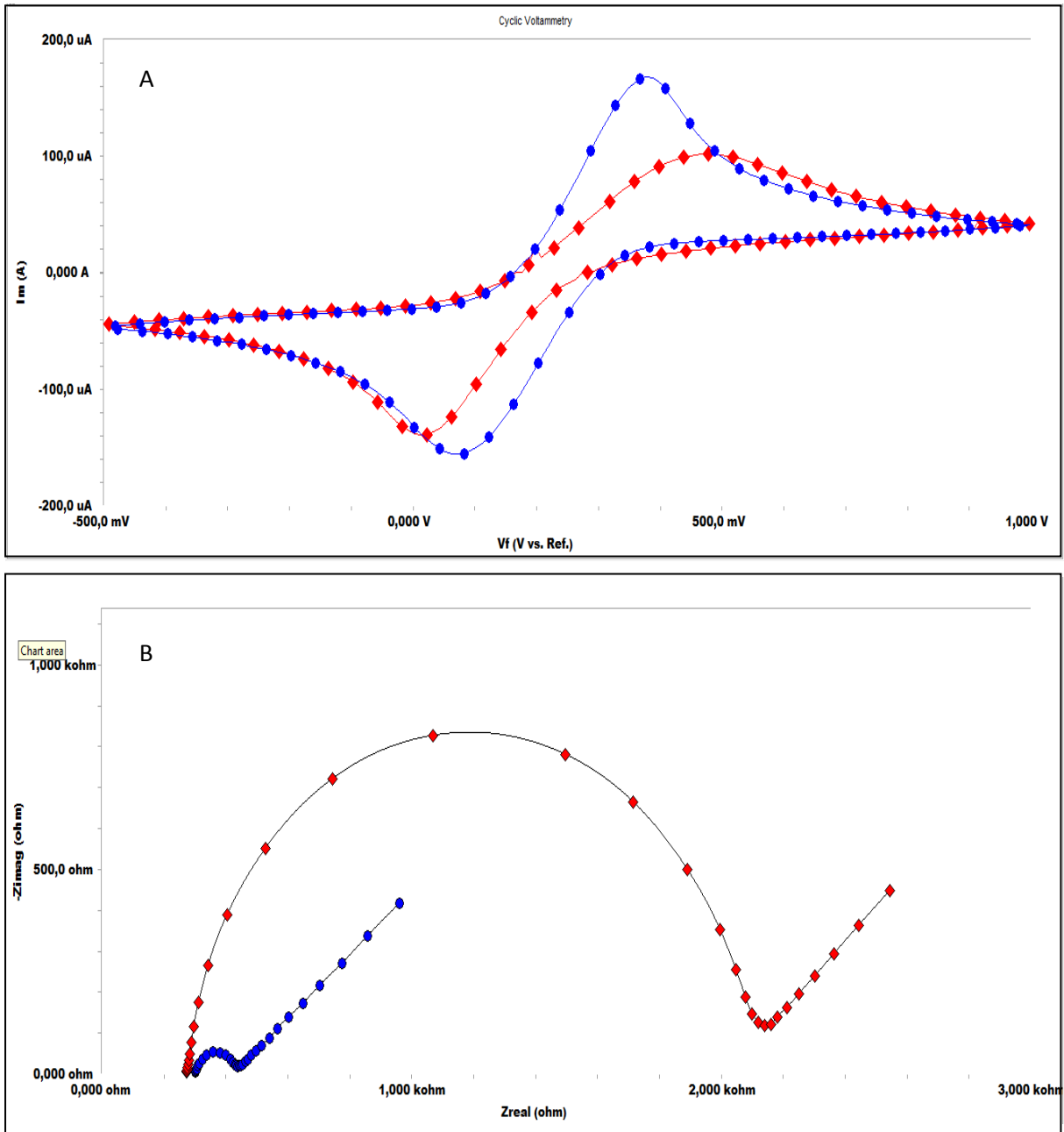
Şekil 3.1. Hidroksil grupları oluşturulmuş ITO yüzeyinin AFM görüntüsü



Şekil 3.2. Hidroksil grupları oluşturulmuş ITO elektrotun CV ve EIS ölçümü

3.4.2. Anti-HER3'ün ITO elektrot yüzeye kovalent olarak bağlanması

Yüzeyinde hidroksil grupları oluşan elektrot % 1'lik (3-Aminopropil) trietoksi silan (APTES) ile gece boyu bekletilmiştir. Yüze hidroksil uçları ile kovalent bağlanan APTES'in CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Sonrasında Anti-HER3'ü, oluşan APTES'li yüze bağlamak için antikor ve APTES'in amino grup uçlarını çapraz bağlayabilen glutaraldehit kullanılmıştır. % 0.1 lik glutaraldehit ile 15 dakika muamele edilen ITO elektrot, Anti-HER3 eklenerek 1 saat immobilizasyon için bekletilmiştir. 1 saatin sonunda elektrotun CV ve EIS ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.3. Anti-HER3 immobilizasyonu sonrasında döngüsel voltametri (A) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (B) ölçümleri (● ITO/OH/APTES, ◆ ITO/OH/APTES/AntiHER3)

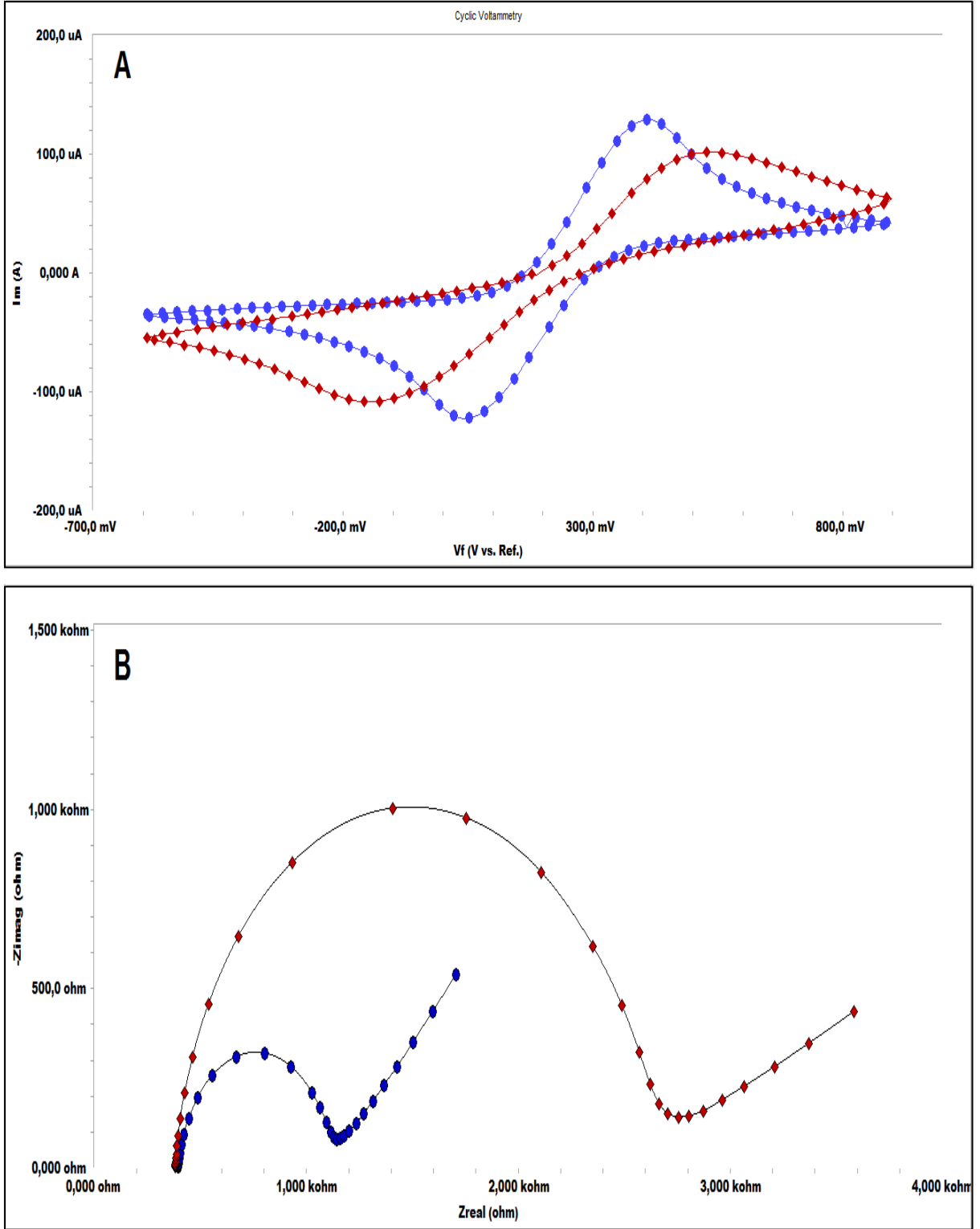
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. İmmobilizasyon Basamakları

İmmobilizasyon aşamalarından önce yalın PET/ITO elektotlar ile alınan CV ve EIS ölçümleri redoks probu olarak kullandığımız çözeltimizin karakteristik piklerini vermemiştir. Bu yüzden yüzeydeki organik kirlilikleri gidermek için temizleme işlemi ve hidroksil grubu oluşturulma işlemleri yapılmıştır.

PET/ITO elektot yüzeyinde hidroksil grupları oluşturulduktan sonra alınan CV ve EIS ölçümlerin spektrumları değerlendirildiğinde, elektrotun yüzeyinde sadece –OH gruplarının olmasından dolayı yüzeyin nispeten iletken bir tabakaya sahip olduğunu söylenebilir.

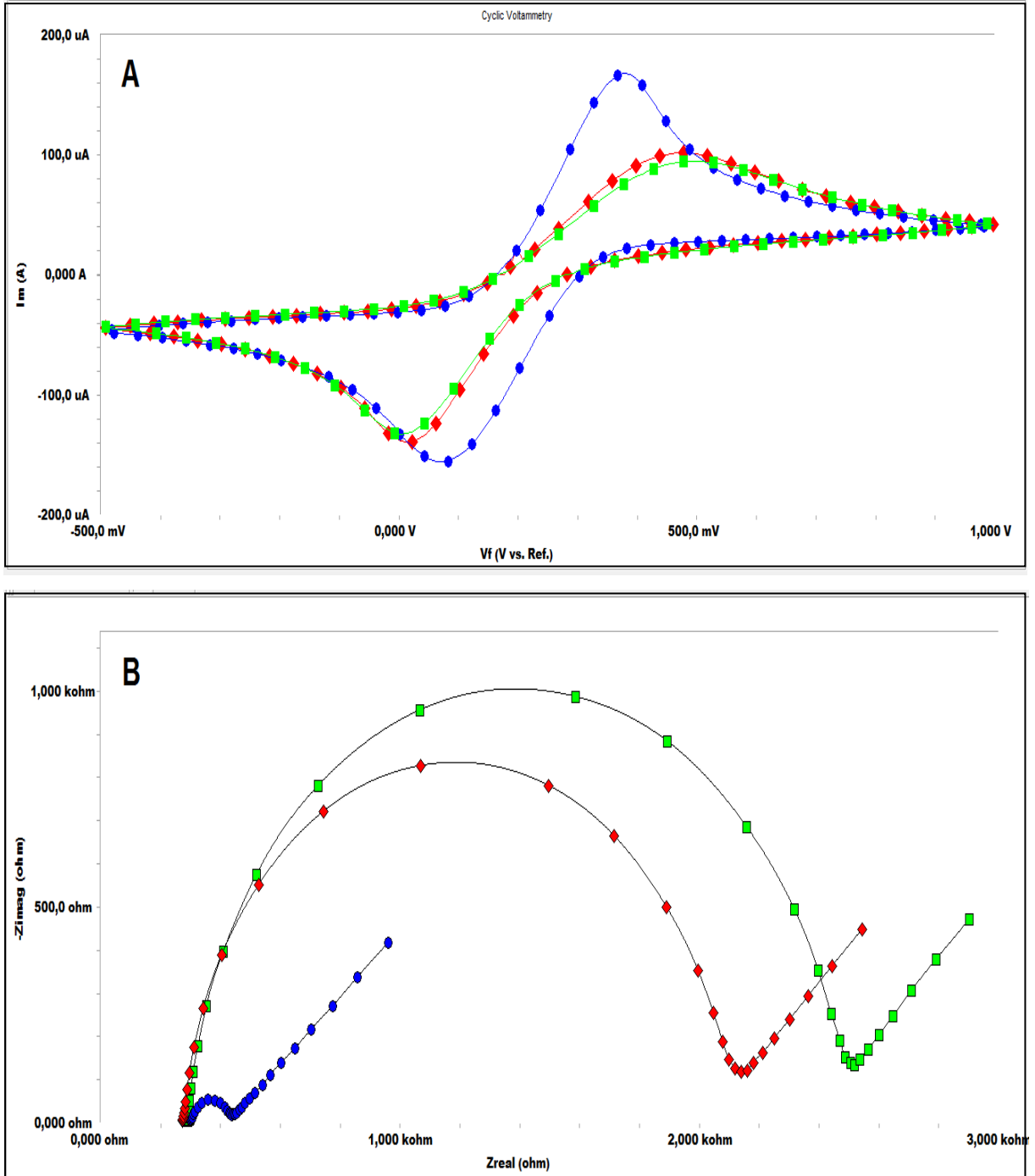
Daha sonra 3-APTES ile gece boyu inkübasyon ile kendiliğinden oluşan tabakalar (SAM) sayesinde en uç kısımda –NH₂ grupları bulunur. Bu uçların –OH gruplarına göre iletkenlikleri daha fazladır. Bu yüzden ilk EIS ölçümüne göre daha küçük bir spektrum vermesi beklenir. CV ölçümünde ise iletkenliğin artmasından dolayı voltamogram daha da artmıştır.



Şekil 4.1. 3-APTES immobilizasyonu sonrasında ITO elektrot yüzeyinin CV (A) ve EIS (B) ölçümleri (● ITO/OH/APTES, ◆ ITO/OH)

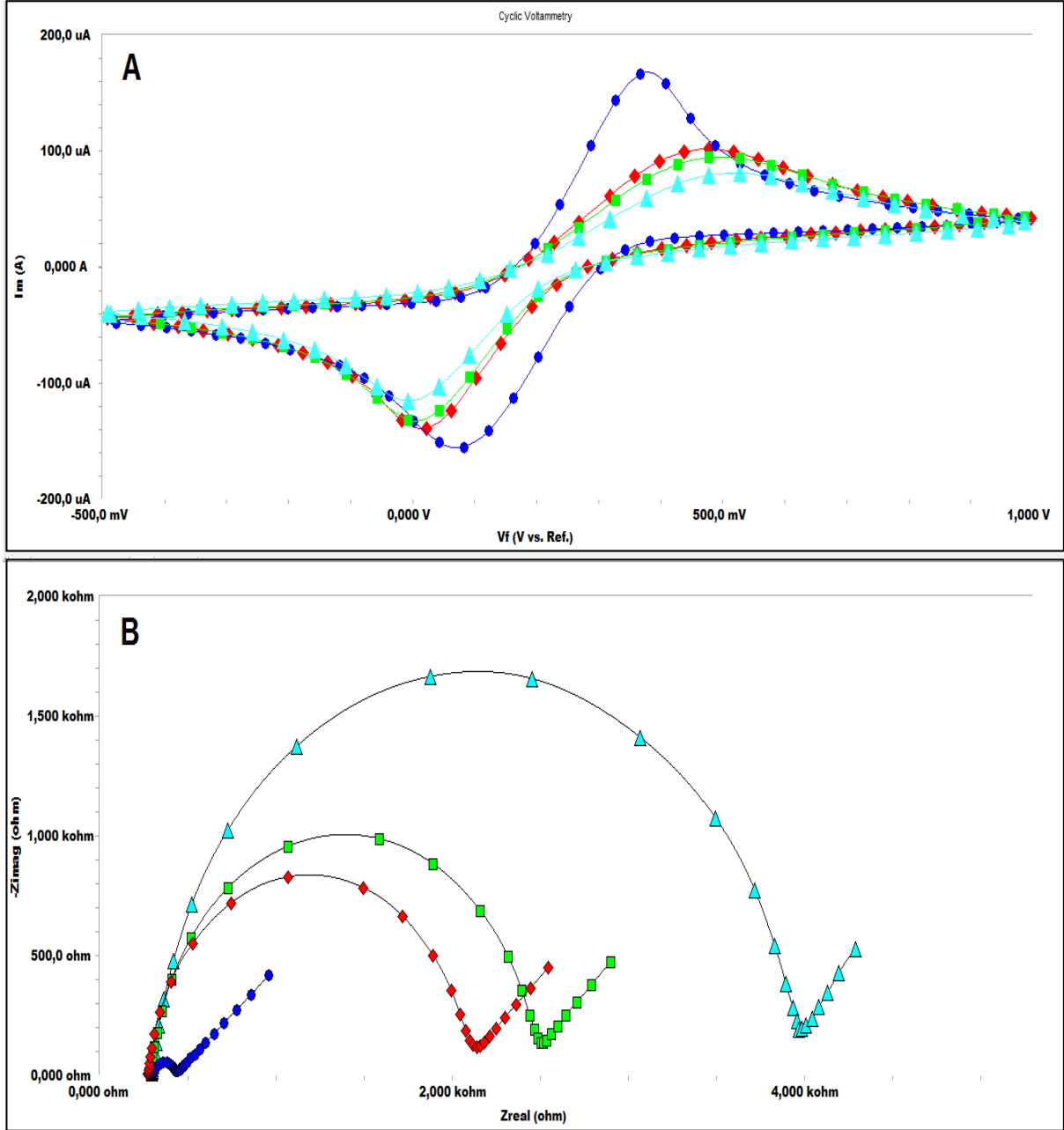
Bu işlemin ardından glutaraldehit ve Anti-HER3 eklenmesiyle amino uçları bağlanmıştır. Bu da EIS ve CV ölçümlerinde bir önceki adıma göre, EIS’de artış CV’de ise bir azalış olarak görünür. Bunun sebebi, aktif uçların kapanması ve iletkenliğin azalmasıdır. İletkenliğin azalmasıyla elektron transfer direncide artmıştır.

Antikoron bağlayamadığı açık uçları kapatmak için yarım saat süreyle BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılmıştır. Bu aşamada da iletkenliğin biraz daha azalmasıyla BSA'nın bağlandığı, EIS ölçümünün artması ve CV ölçümünde ise biraz daha bir azalma olduğu görülmektedir.

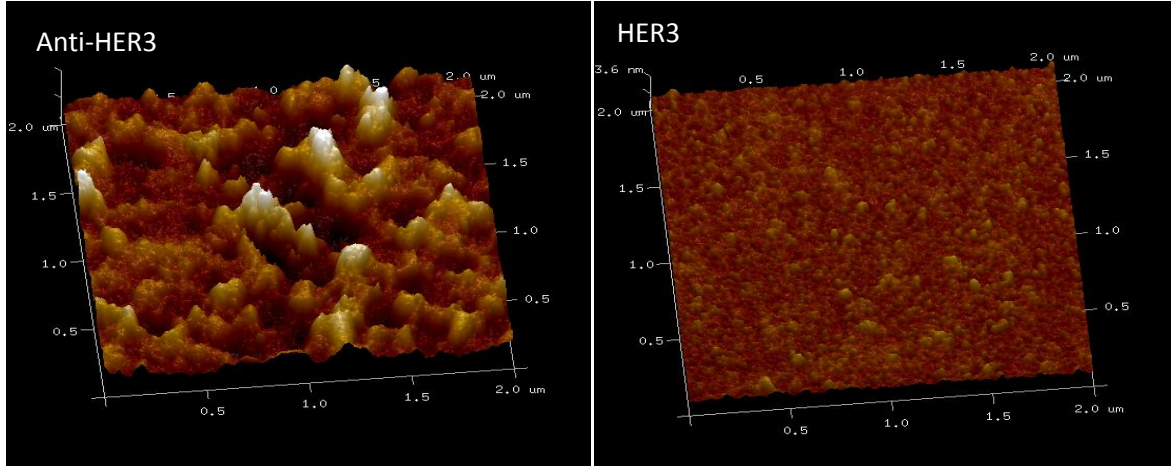


Şekil 4.2. BSA immobilizasyonu sonrasında CV (A) ve EIS (B) ölçümleri (●ITO/OH/APTES, ◆ ITO/OH/APTES/AntiHER3, ■ ITO/OH/APTES/AntiHER3/BSA)

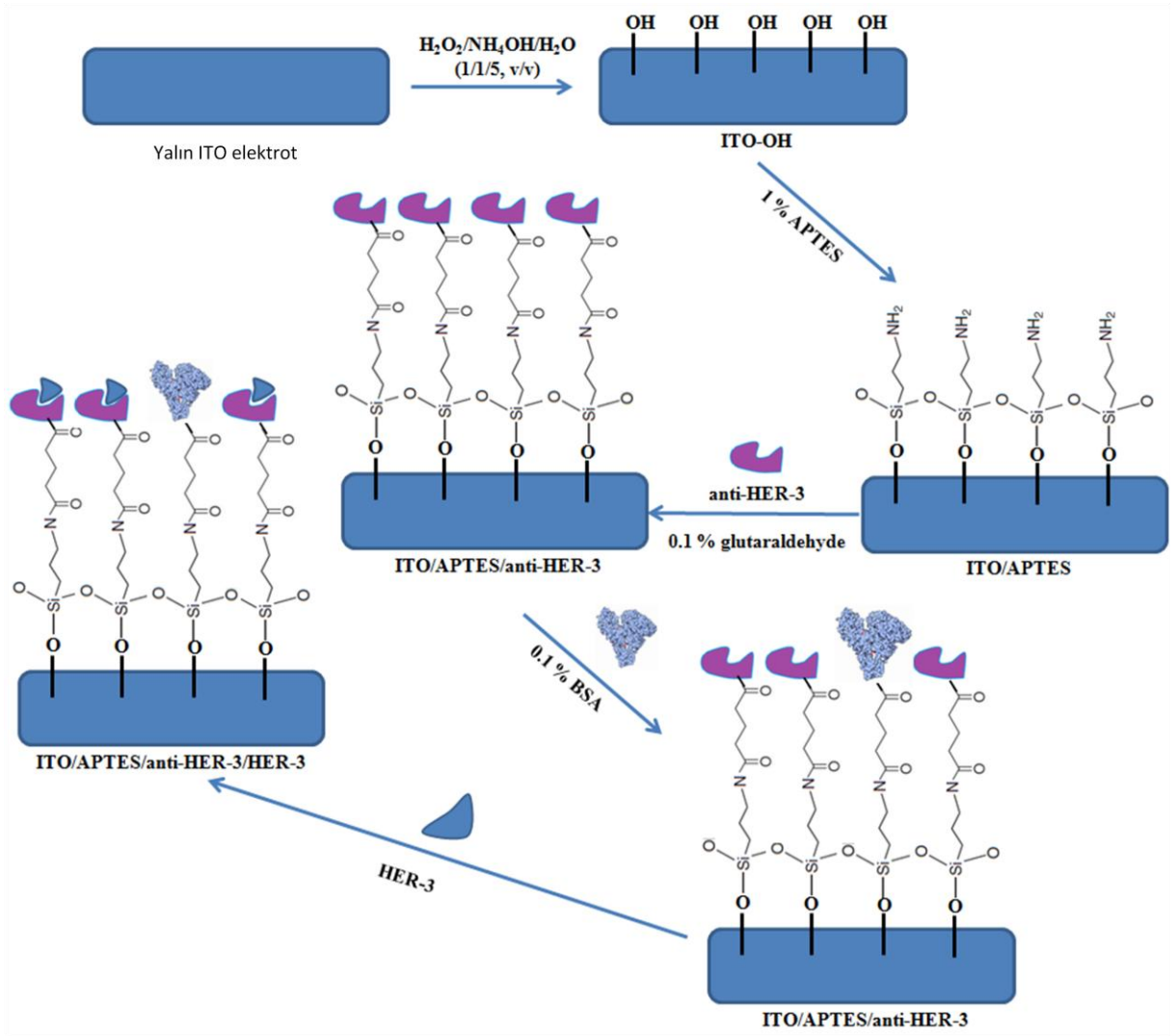
Artık markeri tespit etmek için biyosensör sistemi hazırlanmış olup 1 saat aralıklarla 5 kez HER3 inkübasyonuna bırakılan elektrotların alınan CV ve EIS sonuçları, bağlanmaların olup olmadığını gösterir. Her ekleden sonra EIS spektrumları yüzeyin direnci arttığından ve iletkenliğin azalmasından dolayı artış göstermiştir. Aynı sonuç, CV sonuçlarında da azalma olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.3. HER3 immobilizasyonu sonrasında CV (A) ve EIS (B) (● ITO/OH/APTES, ◆ ITO/OH/APTES/AntiHER3, ■ ITO/OH/APTES/AntiHER3/BSA, ▲ ITO/OH/APTES/AntiHER3/BSA/HER3)



Şekil 4.4. Anti-HER3 ve HER3 bağlı ITO yüzeylerinin AFM görüntüsü



Şekil 4.5. İmmobilizasyon basamakları

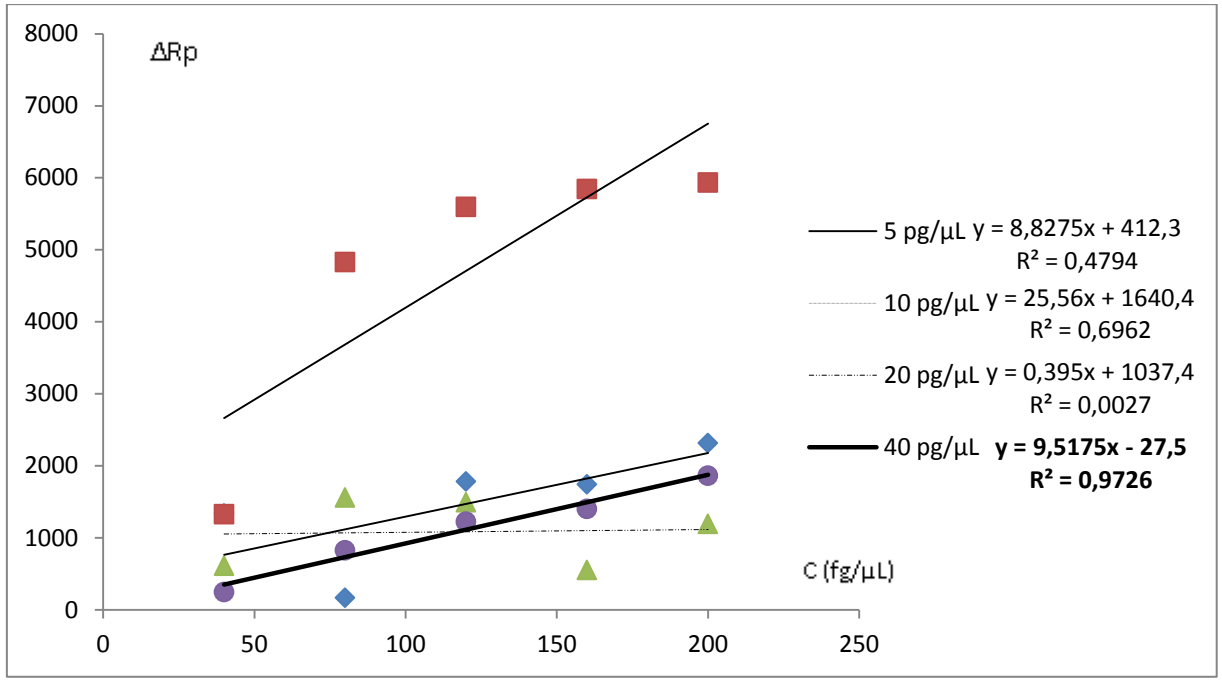
4.2 Optimizasyon Basamakları

4.2.1. Anti-HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi

Antikor eklenmesi için hazır hale getirilen elektrotlara farklı Anti-HER3 konsantrasyonlarında inkübasyon yapılmıştır. Bu konsantrasyonlar 5, 10, 20 ve 40 pg/ μ L olarak belirlenmiştir. 1 saatlik inkübasyonun ardından CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Anti-HER'ün dolduramadığı boşluklar BSA kullanılarak yarım saatlik inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra saatte bir olmak üzere her saat HER3 eklenerek en iyi antikor konsantrasyonunun bulunması için CV ve EIS ölçümlerinin sonuçlarına ve R_p değerlerine bakılmıştır. 5, 10 ve 20 pg/ μ L konsantrasyonlarındaki antikor eklemeleri sonucunda, antijen bağlayacak yeterli antikor konsantrasyonunun bulunmadığı gözlemlenmiştir. Konsantrasyon - ΔR_p değerlerine göre çizdiğimiz grafikler ve R^2 'leri sonucunda en uygun Anti-HER3 konsantrasyonunun **40 pg/ μ L** olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 4.1. Optimizasyon için belirlenmiş AntiHER3 konsantrasyonlarının ΔR_p değerleri

	5 pg/ μ L	10 pg/ μ L	20 pg/ μ L	40 pg/ μ L
C(fg/ μ L)	ΔR_p	ΔR_p	ΔR_p	ΔR_p
40	1340	1330	614	249
80	170	4831	1562	829
120	1785	5597	1496	1226
160	1745	5845	556	1404
200	2318	5935	1196	1865



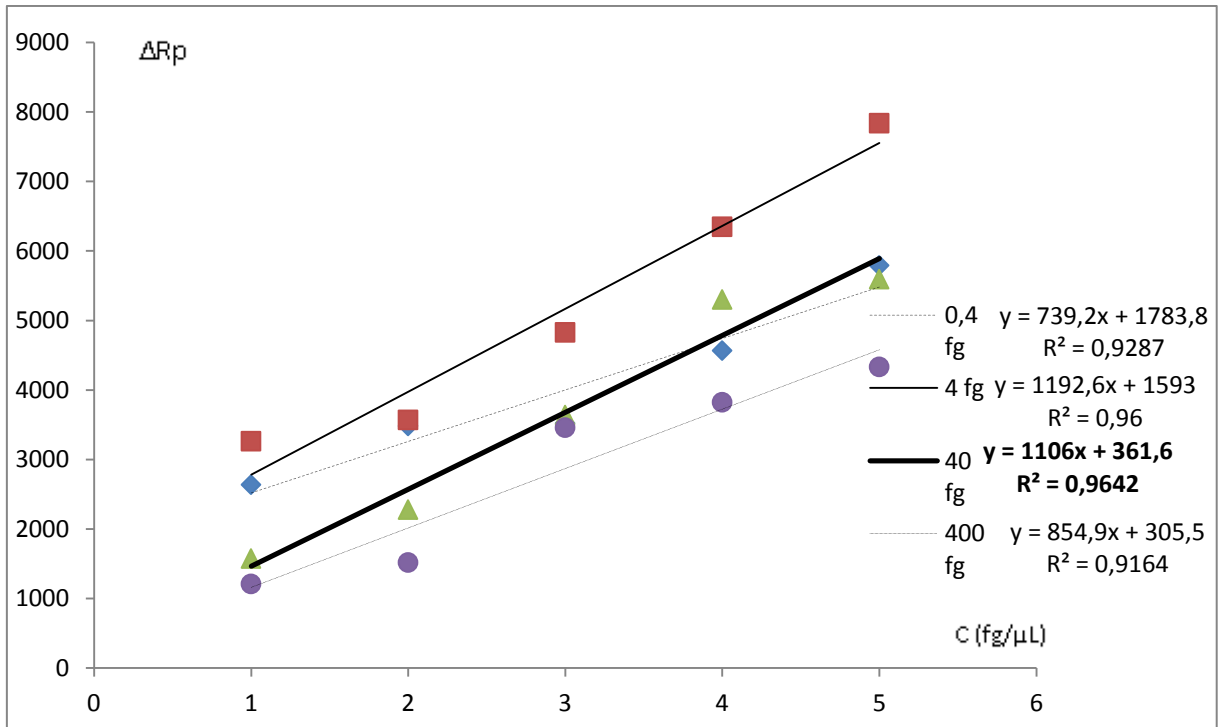
Şekil 4.6. İmmobilizasyon için uygun AntiHER3 konsantrasyonunun belirlenmesi
(■ 5 pg/μL, ◆ 10 pg/μL, ▲ 20 pg/μL, ● 40 pg/μL)

4.2.2. HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi

Anti-HER3 konsantrasyonunun optimizasyonu yapıldıktan sonra, bağlanabilecek HER3 miktarını belirlemek için antijen konsantrasyonunun optimizasyonu yapıldı. HER3 konsantrasyonunun optimizasyonu için denenen miktarlar 400, 40, 4, 0.4 fg/μL olarak uygulandı. 1'er saatlik 5 inkübasyonun her aşaması için CV ve EIS ölçümleri alındı. Konsantrasyon - ΔR_p değerlerine göre çizilen grafikler ve R^2 'leri sonucunda en uygun HER3 konsantrasyonunun **40 fg/μL** olduğuna karar verilmiştir. Yüksek antijen konsantrasyonu daha önceden belirlediğimiz antikor miktarına bağlı olarak sonuç vermemiştir. 4 ve 0.4 fg/μL ise elektrot yüzeyini tam dolduramadığı için yetersiz kalmış ve sonuçlar bu nedenle kötü çıkmıştır.

Tablo 4.2. Optimizasyon için belirlenmiş HER3 konsantrasyonlarına ilişkin ΔR_p değerleri

	0,4 fg/ μ L	4 fg/ μ L	40 fg/ μ L	400 fg/ μ L
C	ΔR_p	ΔR_p	ΔR_p	ΔR_p
1	2639	3265	1577	1212
2	3484	3571	2281	1520
3	3523	4830	3641	3460
4	4568	6349	5303	3825
5	5793	7839	5596	4334



Şekil 4.7. İmmobilizasyon için uygun HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi
(\blacklozenge 0.4 fg/ μ L, \blacksquare 4 fg/ μ L, \blacktriangle 40 fg/ μ L, \bullet 400 fg/ μ L)

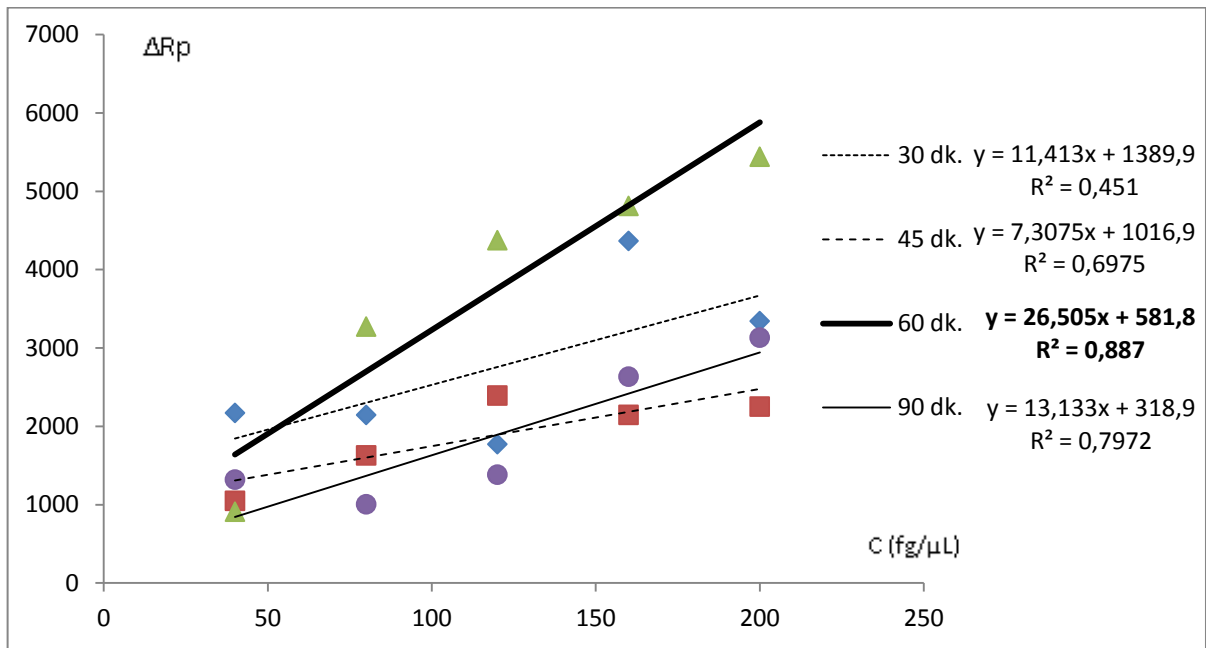
4.2.3. Anti-HER3 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Konsantrasyon optimizasyonlarından sonra, ne kadar sürede etkili bir bağlanma olacağını anlayabilmek ve daha sonrasında antijen bağlama kapasitesinin ne kadar sürede daha fazla olacağını görmek için Anti-HER3 süre optimizasyonu yapıldı. Süre olarak Anti-HER3 ekledikten sonra 30, 45, 60, 90 dakika sonrasında CV ve EIS ölçümleri alınarak, daha

sonrasında da antijen bağlama miktarları R_p değerleri hesaplanarak ölçüldü. Konsantrasyon - ΔR_p değerlerine göre çizilen grafikler ve R^2 'leri sonucunda en uygun sürenin **60** dakika olduğuna karar verildi. 30 ve 45 dakikalık inkübasyonların sonucunda antikorun tam bağlanamadığı, bunun sonucu olarak da sonraki aşamalarda antijen bağlanmalarının sağlıklı olmadığı gözlemlendi. 90 dakikalık inkübasyonda ise antikorun denatüre olduğu, bu yüzden antijen bağlama kapasitesinin düştüğü söylenebilir.

Tablo 4.3. AntiHER3 inkübasyon sürelerine ait ΔR_p değerleri

	30 dk.	45 dk.	60 dk.	90 dk.
C(fg/μL)	ΔR_p	ΔR_p	ΔR_p	ΔR_p
40	2171	1049	910	1320
80	2145	1629	3273	1005
120	1772	2393	4375	1383
160	4366	2146	4813	2634
200	3343	2252	5441	3132



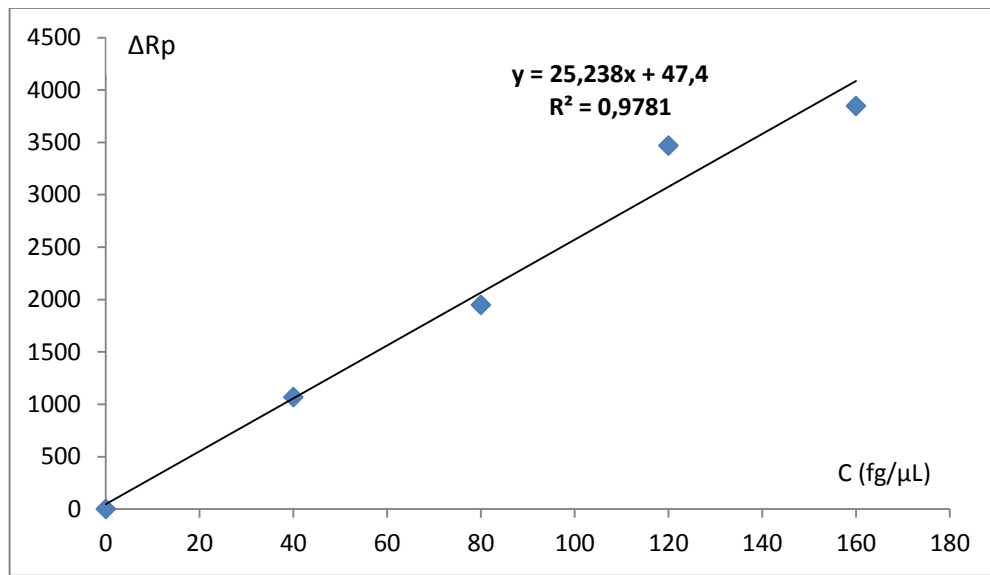
Şekil 4.8. İmmobilizasyon için uygun AntiHER3 inkübasyonunun belirlenmesi
(\blacklozenge 30 dk, \blacksquare 45 dk, \blacktriangle 60 dk, \bullet 90 dk)

4.2.4. HER3 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Antikoron bağlanması için uygun süreyi belirledikten sonra, Antijen için uygun bağlanma süresini denendi. Bu süreler için yine 30, 45, 60 ve 90 dakikalık inkübasyonlar uygulandı. Bu sürelerin sonunda CV ve EIS sonuçları alındı. 30 ve 45 dakikalık inkübasyon sonuçları antijen bağlanması konusunda yetersiz kalmıştır. Sürenin kısa olması antikor-antijen etkileşiminin tam gerçekleşemediğini gösterir. 90 dakikalık inkübasyon ise oda sıcaklığında bulunan elektrot yüzeyindeki proteinlerin deformasyona uğradığı sonucunu gösterir. Bu sonuçlardan yola çıkarak ve R_p değerleri hesaplanmasıyla, konsantrasyon - ΔR_p değerlerine göre çizilen grafikler ve R^2 'leri sonucunda antijen için en uygun sürenin **60** dakika olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 4.4. HER3 inkübasyon süresine ait R_p ve ΔR_p değerleri

60 dk	fg/ μ l	R_p	ΔR_p
AntiHER3		2,18E+03	
BSA	0	2,94E+03	0
HER3(1)	40	4,01E+03	1068
HER3(2)	80	4,89E+03	1948
HER3(3)	120	6,41E+03	3469
HER3(4)	160	6,78E+03	3847
HER3(5)	200	6,17E+03	3233



Şekil 4.9. Uygun HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi (◆60 dk)

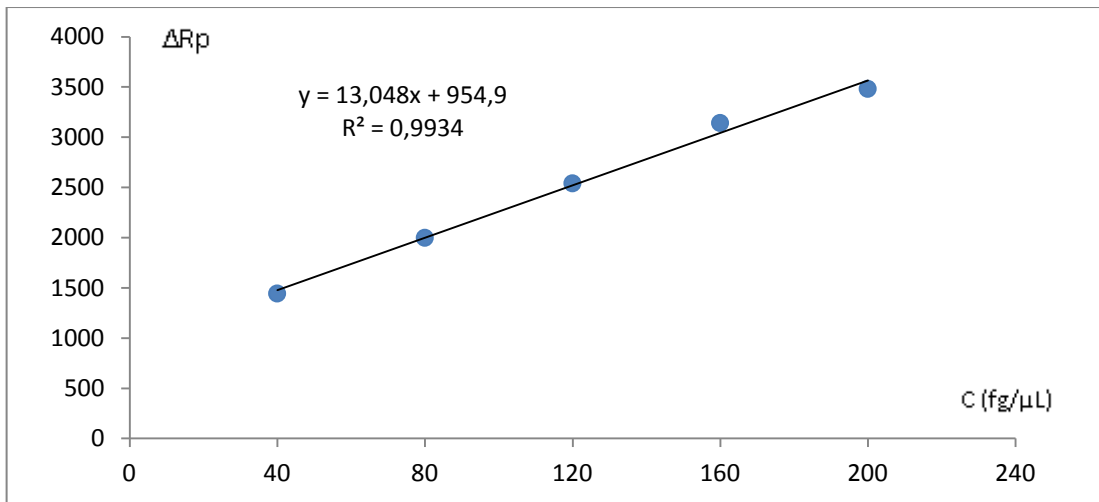
4.2.5. Tekrarlanabilirlik

Bütün basamakların optimizasyon koşulları sağlandıktan sonra uygun konsantrasyonlar ve zamanlarda tekrarlanabilirlik sonuçları alındı. Sonuçlara göre biyosensörün tekrarlanabilir bir sistem olduğu anlaşılmaktadır.

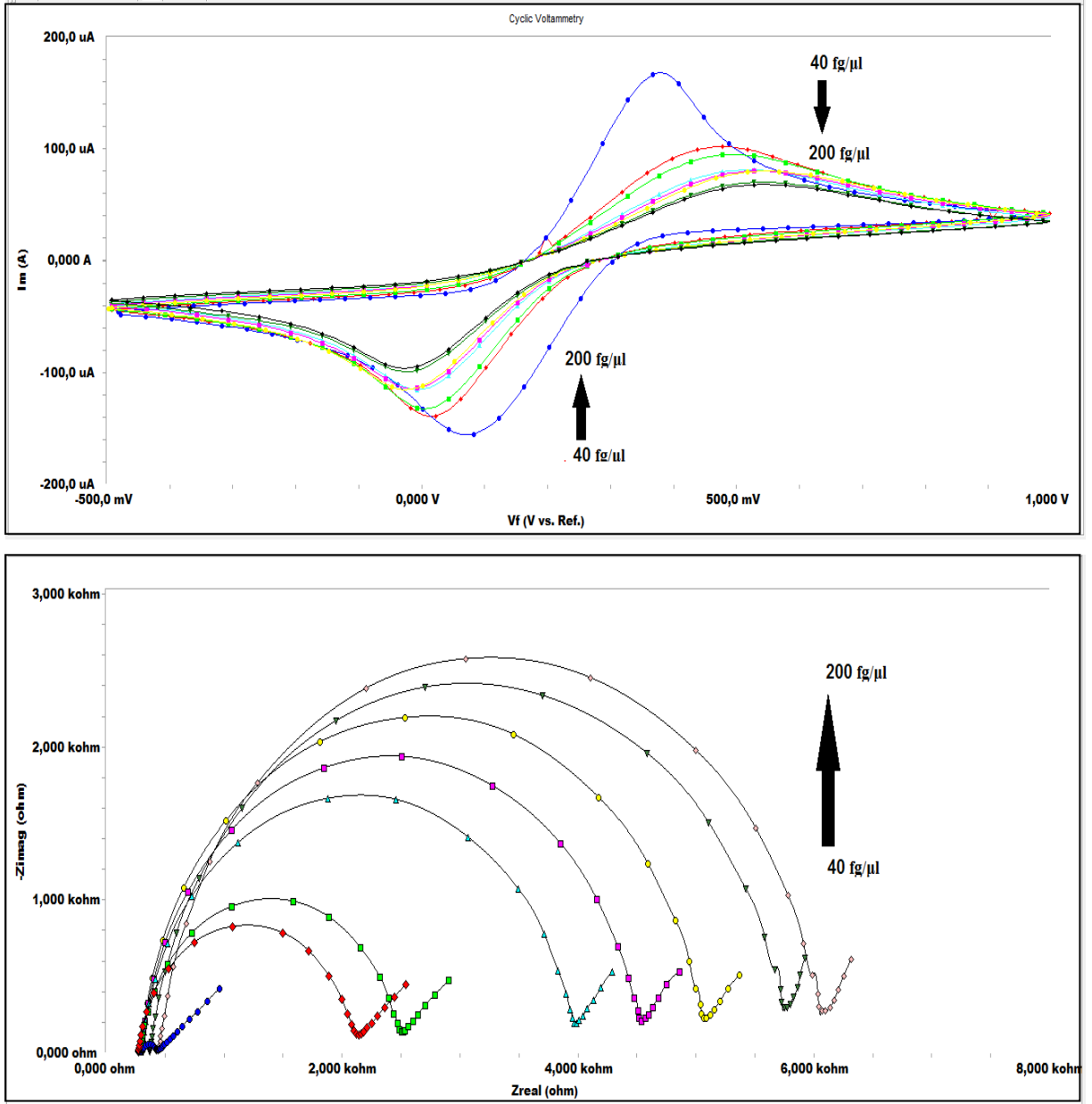
Tablo 4.5. İmmobilizasyon aşamaları ve Rp değerleri

İmmobilizasyon	Rp	fg/ μ l	Δ Rp
AntiHER3	1784	-	-
BSA	2160	-	-
HER3(1.ekleme)	3603	40	1443
HER3(2.ekleme)	4158	80	1998
HER3(3.ekleme)	4700	120	2540
HER3(4.ekleme)	5301	160	3141
HER3(5.ekleme)	5641	200	3481

Eklenen HER3 konsantrasyonu ile Δ Rp arasında çizilen grafik aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.10. HER3 miktarı ile Δ Rp arasındaki grafik



Şekil 4.11. Tekrarlanabilirlik ölçümleri sonrası CV ve EIS spektrumları

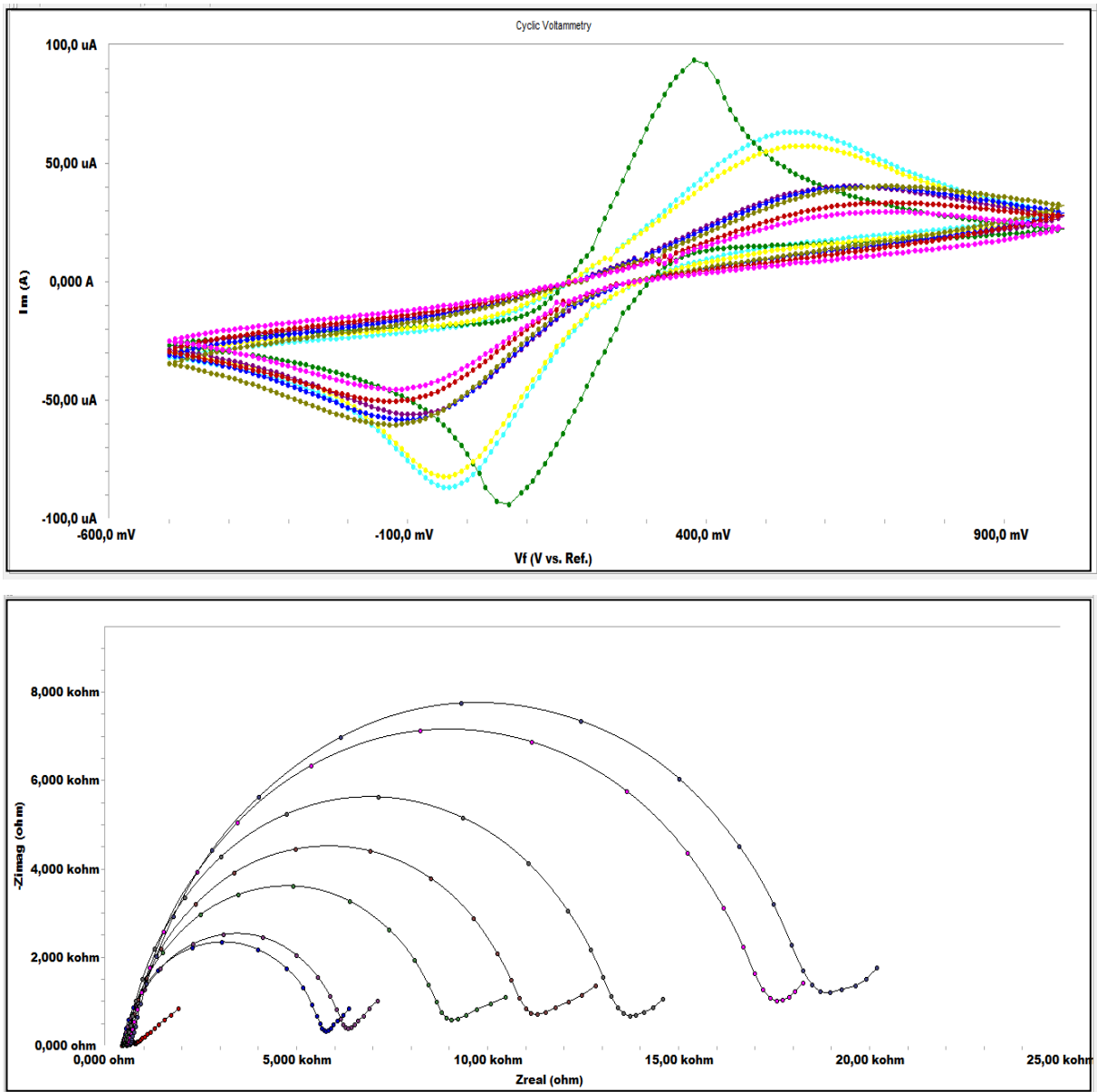
Tablo 4.6. Tekrarlanabilirlik ve R² değerleri

Biyosensör	R ²	y	Aralık (fg/ul)
1	0,9845	15,185x + 4	40-200
2	0,9854	16,785x + 872	40-200
3	0,9753	22,854x + 209,48	40-200
4	0,9808	23,609x + 274,9	40-200
5	0,9934	13,048x + 954,9	40-200
6	0,9893	10,24x + 2042,6	40-200
7	0,9911	25,115x + 155,8	40-200
8	0,9882	31,868x - 54,952	40-200
9	0,9904	32,863x - 790,7	40-200

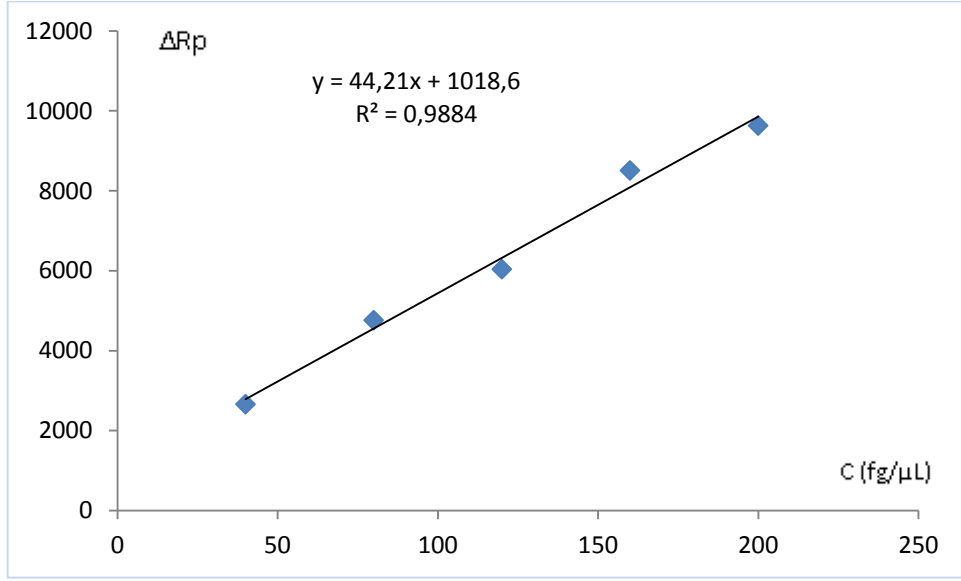
4.2.6. Depo kararlılığı

Biyosensörün en önemli özelliklerinden biri de raf ömrünün bulunmasıdır. Bu yüzden çalışmadaki biyosensörün raf ömrünü görebilmek için 1, 2, 3 ve 4 haftalık raf ömrü sonuçları alınmıştır. Anti-HER3 ve BSA eklendikten sonra +4 °C’de 1 – 4 hafta arasında bekletilen elektrotların her hafta sonunda antijen ekleme işlemi gerçekleştirildikten sonra CV ve EIS ölçümlerine bakılmıştır.

1.hafta sonunda alınan sonuçlar;

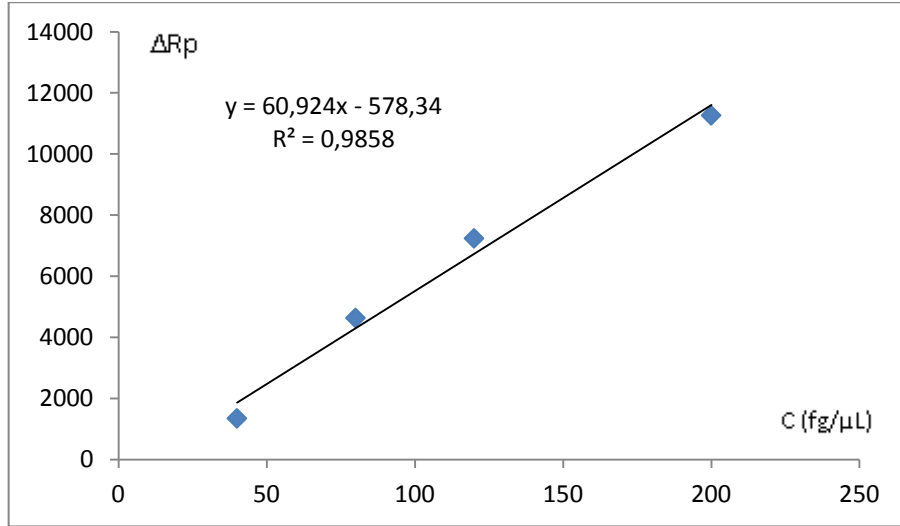


Şekil 4.12. 1 haftalık raf ömrü sonunda CV ve EIS spektrumları

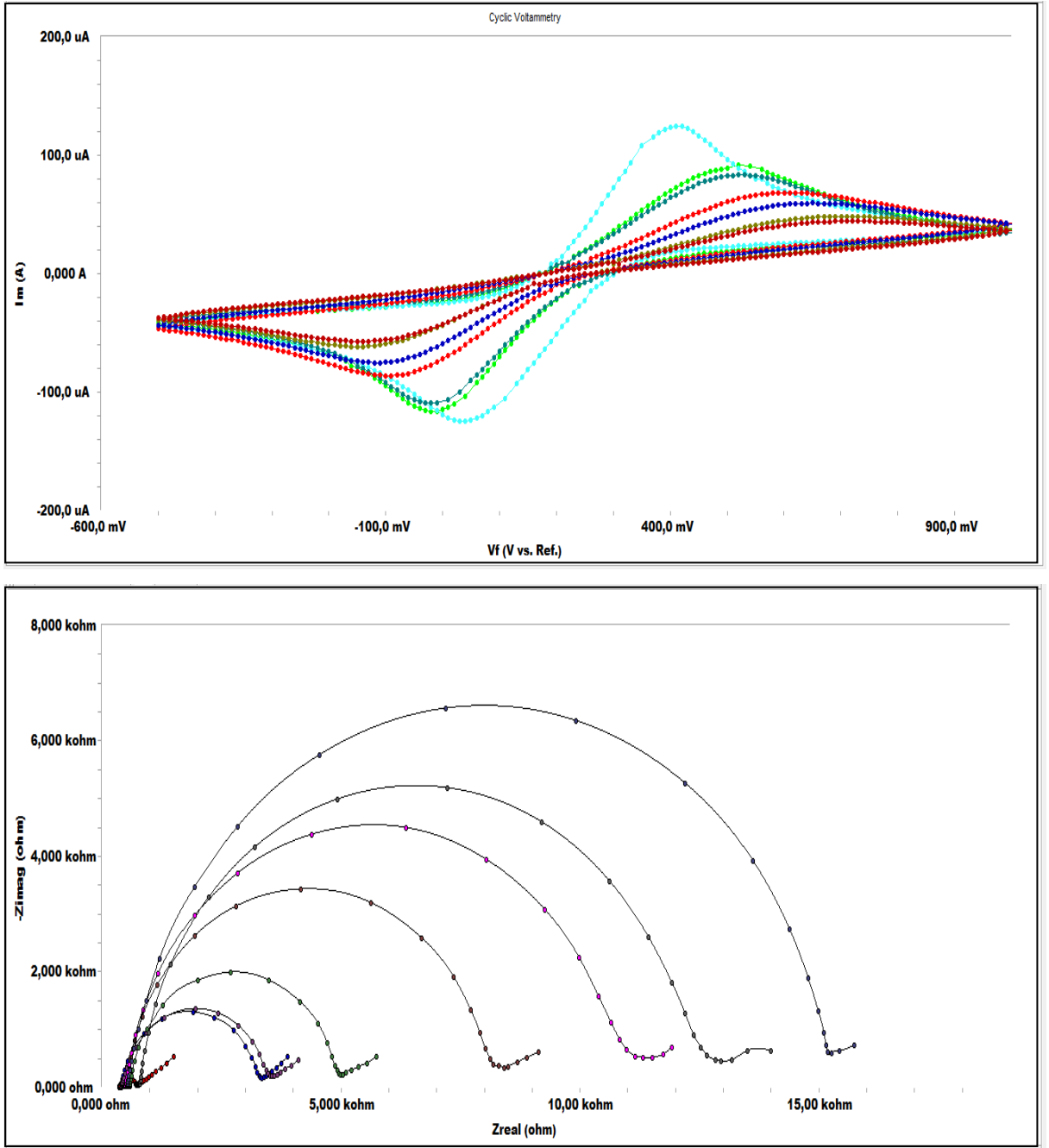


Şekil 4.13. 1 haftalık raf ömrü sonunda ΔR_p ile eklenen HER3 miktarı arasındaki grafik

3. hafta sonunda alınan sonuçlar;



Şekil 4.14. 3 haftalık raf ömrü sonunda ΔR_p ile eklenen HER3 miktarı arasındaki grafik



Şekil 4.15. 3 haftalık raf ömrü sonunda CV ve EİS spektrumları

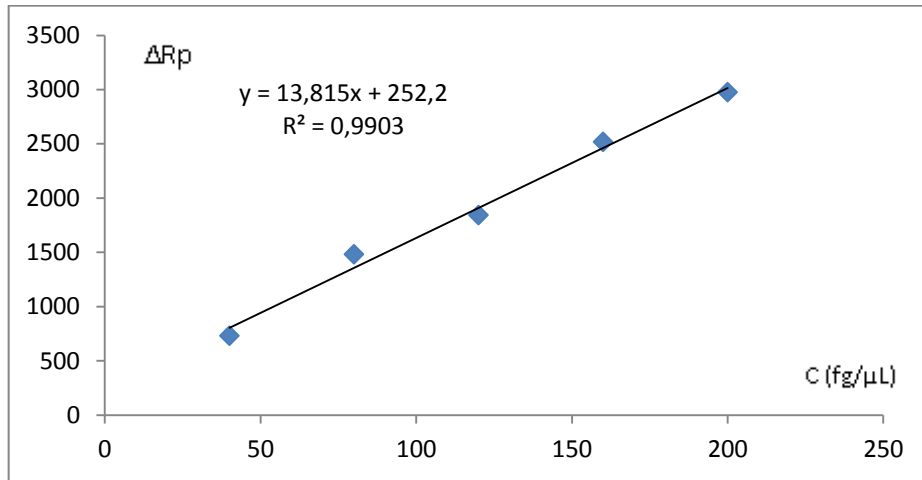
Sonuçlara bakıldığında 1, 2, 3 ve 4. haftalar sonunda elektrot yüzeyine immobilize olan anti-HER3'ün denatüre olmadığı eklenen HER3 sonrasında, anti-HER3 ile bağlandığı görülmüştür. Biyosensörün 3 haftalık bir raf ömrü olduğu söylenebilir.

4.2.7. Yapay Serum örneği

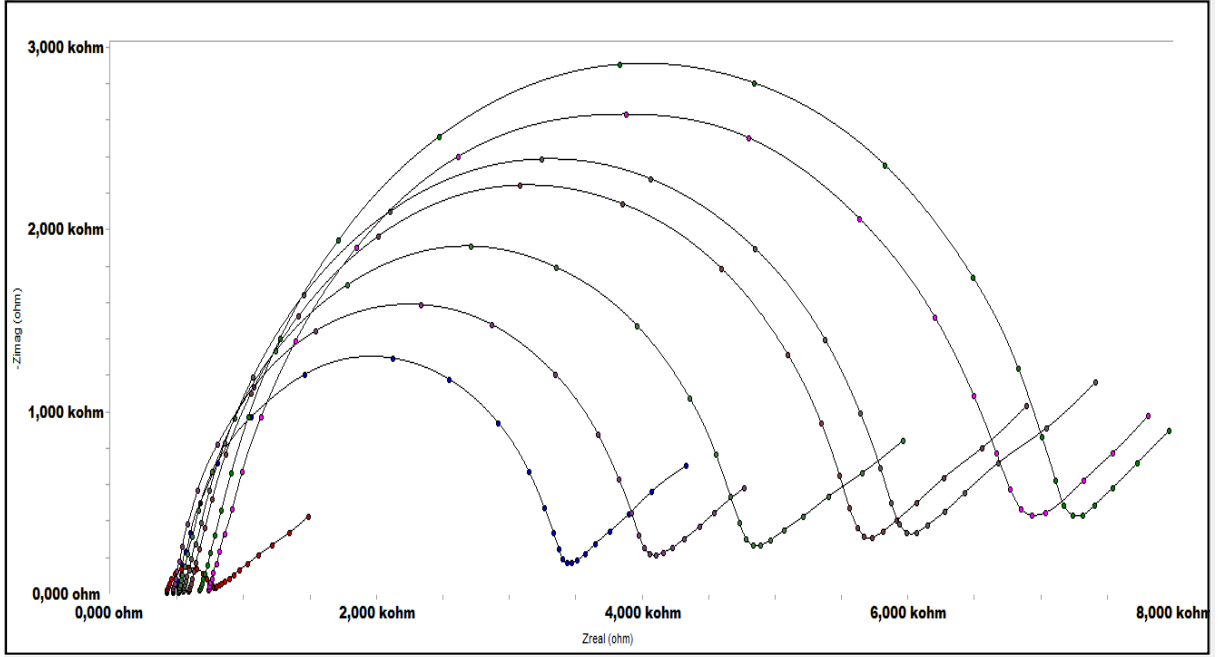
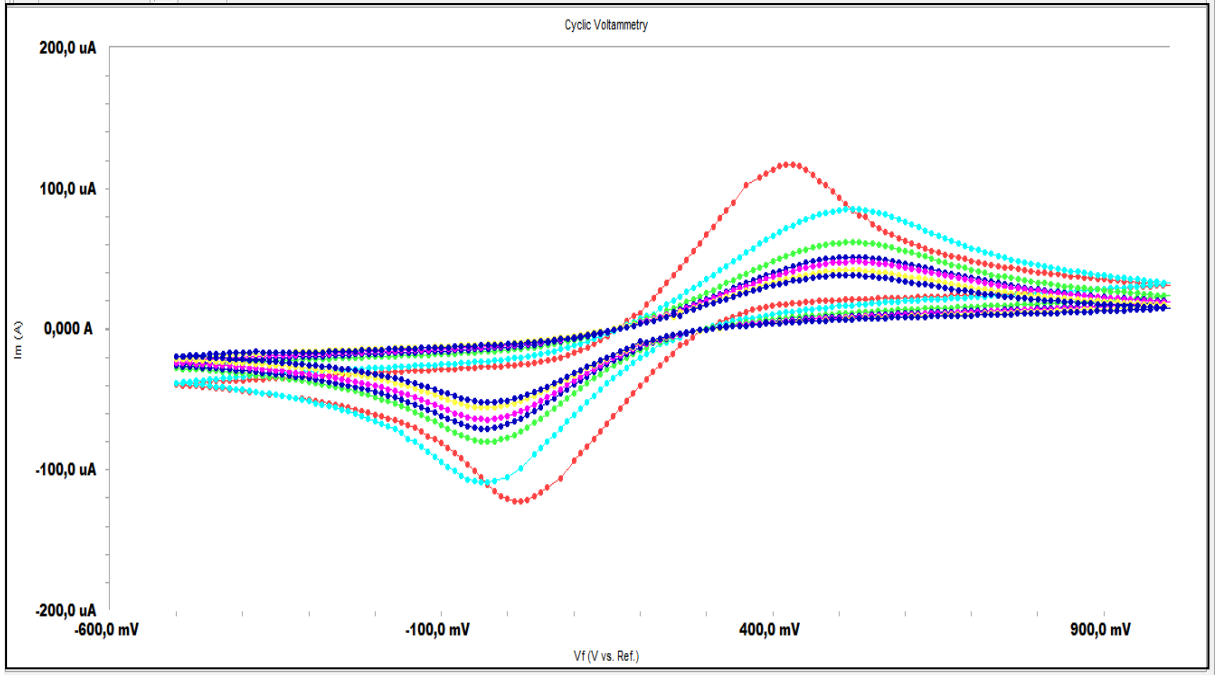
Yapay serum örneği ile antijen-antikor etkileşimlerinin serum içerisindeki tuzlardan etkilenip etkilenmeyeceği incelenmiştir. Yapay serum için, 4.5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1.6 mM MgCl₂, 4.7 mM (D+)-glukoz, 2.5 mM üre, % 0.1 BSA ve 145 mM NaCl'nin bulunduğu bir çözelti hazırlanmıştır. Anti-HER3 ve HER3 için yapılan bütün seyreltmeler hazırlanan yapay serum çözeltisi ile yapılmıştır. Bu şekilde optimize şartlarda olan biyosensör için CV ve EIS ölçümleri alınarak yapay serumun etkisine bakılmıştır.

Tablo 4.7. Yapay serum örneği ile alınan ölçümlerin R_p ve ΔR_p değerleri

İmmobilizasyon	R _p	fg/μl	ΔR _p
AntiHER3	2867	-	-
BSA	3538	-	-
HER3(1.ekleme)	4269	40	731
HER3(2.ekleme)	5020	80	1482
HER3(3.ekleme)	5381	120	1843
HER3(4.ekleme)	6056	160	2518
HER3(5.ekleme)	6514	200	2976



Şekil 4.16. Yapay serum örneği sonrası ΔR_p – HER3 arasındaki grafik



Şekil 4.17. Yapay serum örneği ile alınan CV ve EIS spektrumları

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yıl zarfında iki kattan daha fazla artmıştır. 2008’de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030’a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenebilir. Kanser, insanlığı bu kadar tehdit eden bir hastalık olmuşken onun daha kolay teşhis edilebileceği yeni yöntemler bulmak gerekmektedir.

Kanserde erken teşhis, uygulanacak tedavinin başarısı ve yaşama şansının artması bakımından hayati önem taşımaktadır. Bu sebeple hassas ve spesifik teşhis yöntemleri geliştirilmektedir. Biyomarkerlerin kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında analizi ile geliştirilen yöntemler, kanser teşhisi için alternatif yöntemler sunmaktadırlar. Bu çeşit analizler, sağlık çalışanlarına hasta ile ilgili gerekli bilgileri zamanında sunmakta, böylece kısa sürede tedavi yöntemi belirlenebilmekte ve hastanın yaşam süresi uzamaktadır.

Biyosensörler, fizikokimyasal transduser ile bütünleştirilmiş ya da alakalandırılmış moleküler tanımlama cihazıdır. Bu cihazlar point-of-care olarak sınıflandırılabilirler ve bu şekilde evde ya da klinikte kullanılabilme imkânına sahiptirler. Uygun bir biyosensör tasarlarırken cihazın spesifikliğini belli bir markere olan hassaslığı belirlemektedir. Biyosensörler, kolay kullanım, ucuzluk ve çabuk sonuç verme gibi avantajlar sağlamaktadırlar.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottur. Son yıllarda biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. EIS’nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980’lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesinin yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin

immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır.

Bu çalışmada, meme kanserine yönelik anti-HER3 bazlı ve HER3 tayini yapabilen yeni bir biyosensör tasarlanmıştır. Bunun için öncelikle döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve HER3' ün elektrot yüzeyine bağlanması incelenmiştir. Biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edilmiştir. Bu adımlardan anti-HER3 konsantrasyonu 40 pg/ μ L olarak belirlenmiştir. İkinci bir adım olarak HER3 konsantrasyonu ise 40 fg/ μ L olarak tespit edilmiştir. Marker konsantrasyonun fg düzeyinde olması biyosensör için oldukça avantajlı bir durumdur. Bu derece küçük konsantrasyonlarda yanıt alabilmek biyosensörün hassasiyet duyarlılığını göstermektedir. Yine biyosensör için ikinci önemli adım tekrarlanabilir bir sistem olmasıdır. Farklı zamanlarda alınan ölçümler sonucunda sistemin tekrarlanabilirliği tespit edilmiştir. Bir ay boyunca her hafta raf ömrünü belirlemek üzere alınan döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi sonuçları üzerine sistemin 3 haftaya kadar dayanıklı olduğu gösterilmiştir. Yapay serum örneği ile seyreltmeleri yapılan anti-HER3 ve HER3 porsiyonlarının serum içerisinde bulunan tuzlarla etkileşimde bulunmadığı yine CV ve EIS ölçümleri sonucunda tespit edilmiştir.

ITO elektrotların HER3 biyomarkeri ile kullanılması, farklı biyomarkerler ile yapılabilir biyosensör sistemlerine de olanak sağlamaktadır. Elektrotların kullan at şeklinde pratik kullanımı yine hızlı bir sistem olduğunu göstermektedir. ITO elektrodun bu avantajlarının bulunması bu yöndeki çalışmaları ITO elektrotlar üzerinde yoğunlaştırabilir.

Yine bu sistem ile gerçek serum örneklerinde tayin işlemleri yapılarak sistemin duyarlılığı tespit edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdelmalek F, Shadaram M, Boushriha H (2001). Ellipsometry measurements and impedance spectroscopy on Langmuir-Blodgett membranes on Si/SiO₂ for ion sensitive sensor. *Sensors and Actuators B: Chemicals.*, 72:208–213.
- Andersson LI (2000). Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *Journal of Chromatography B*, 745:3–13.
- Arteaga CL (2002). Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin. Oncol.*, 29: 3–9.
- Bataillard P, Gardies F, Jaffrezicrenault N, Martelet C, Colin B, Mandrand B (1988). Direct detection of immunospecies by capacitance measurements. *Analytical Chemistry*, 60: 2374-2379.
- Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A (1990). Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina *Obstet. Gynecol.*, 76: 381–387.
- Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (1998). An immunological Interleukine-6 capacitive biosensor using perturbation with a potentiostatic step. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 1061-1068.
- Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (2001). Capacitive biosensors. *Electroanalysis*, 13: 173-180.
- Berggren C, Johansson G (1997). Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system. *Analytical Chemistry*, 69: 3651-3657.
- Boyle P, Levin B (2008). Dünya Sağlık Örgütü Uluslar arası Kanser Araştırma Kurumu Dünya Kanser Raporu, Lyon.
- Brett CMA, Brett AMO, Serrano SHP (1999). An EIS study of DNA-modified electrodes. *Electrochimica Acta*, 44: 4233–4239.
- Cady P, Charles C (1978). Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms. *Thomas Publisher*, 7: 199–239.
- Cai H, Lee TMH, Hsing IM (2006). A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification. *Sensors and Actuators B*, 114: 433-437.
- Colquhoun KO, Timms S, Fricker C R (1995). Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 635–639.
- Cornell BA, Braach-Maksvytis VLB, King LG, Osman PDJ, Raguse B, Wieczorek L, Pace RJ (1997). A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, 387: 580-583.
- Cortina M, Esplandiú MJ, Alegret S, Valle M (2006). Urea impedimetric biosensor based on polymer degradation onto interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 118: 84-89.

- Coulet PR (1991). *Biosensor principles and applications*. Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
- Daniels JS, Pourmand N (2007). Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis*, 19: 1239- 1257.
- Davis F, Hughes MA, Cossins AR, Higson SPJ (2007). Single gene differentiation by DNA-modified carbon electrodes using an AC impedimetric approach. *Analytical Chemistry*, 79: 1153-1157.
- Deak T, Beuchat LR (1993). Identification of foodborne yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 546–550.
- Depaola N, Phelps JE, Florez L, Keese CR, Minnear FL, Giaever I, Vincent P (2001). Electrical impedance of cultured endothelium under fluid flow. *Annals of Biomedical Engineering*, 29: 648–656.
- Felice CJ, Valentinuzzi ME (1999). Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 46: 1483–1491.
- Flint SH, Brooks JD (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 205–208.
- Friebe A, Lisdat F, Moritz W (1993). Polymer Membranes on Chemical Semiconductor Devices-Their Electrical Influence on Sensor Characterization. *Sens Mater*, 5: 65-82,
- Geoffrey L, Peter P, Panka, V (2001). *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 78: 249–256.
- Gnan S, Luedecke LO (1982). Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *Journal of Food Protection*, 45: 4–7.
- Gómez R, Bashir R, Sarikaya A, Ladisch MR, Sturgis J, Robinson JP, Geng T, Bhunia AK, Apple HL, Wereley S (2001). *Biomedical Microdevices*, 3: 201–209.
- Gooding JJ, Hall E.A (1996). Practical and theoretical evaluation of an alternative geometry enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 11: 1031-1040.
- Guan JG, Miao YQ, Zhang QJJ (2004). *Bioscience and Bioengineering*, 97: 219-225.
- Hall EAH (1990). *Biosensors*, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; 3-30.
- Hason S, Dvorak J, Jelen F, Vetterl V (2002). Interaction of DNA with echinomycin at the mercury electrode surface as detected by impedance and chronopotentiometric measurements. *Talanta*, 56: 905-913.
- Hedstrom M, Galaev IY, Mattiasson B (2005). Continuous measurements of a binding reaction using a capacitive biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 41-48.
- Henschke PA, Thomas DS (1988). Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 123–133.

- Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Eisterer W, Ammann K, Schmid T (2003). Immunohistochemical typing of non-small cell lung cancer on cryostat sections: correlation with clinical parameters and prognosis. *J Clin Pathol*, 56: 736–741.
- Hleli S, Martelet C, Abdelghani A, Burais N, Jaffrezic-Renault N (2006). Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 113: 711-717.
- Hou YX, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Zhang AD, Minic-Vidic J, Gorojankina T, Persuy MA, Pajot-Augy E, Salesse R, Akimov V, Reggiani L, Penetta C, Alfinito E, Ruiz O, Gomilla G, Samitier J, Errachid A (2007). Gold surface functionalization and patterning for specific immobilization of olfactory receptors carried by nanosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1550-1555.
- Houssami N, Irwig L, Ciatto S (2006). Radiological surveillance of interval breast cancers in screening programmes. *Lancet Oncol*. 7: 259-65.
- Hsieh AC, Moasser MM (2007). Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer*, 97: 453–457.
- Hug TS (2003). Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery. *Assay and Drug Development Technologies*, 1: 479-488.
- Jie M, Ming CY, Jing D, Cheng LS, Na LH, Jun F, Xiang CY (1999). *Electrochemistry Communications*, 1: 425-429.
- Jonsson M, Welch K, Hamp S, Stromme M (2006). Bacteria counting with impedance spectroscopy in a micro probe station. *The Journal of Physical Chemistry*, 110: 10165-10169.
- Katz E, Alfonta L, Willner I (2001). Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry. *Sensors and Actuators B, Chemicals*, 76: 134–141.
- Katz E, Willner I (2003). Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *Electroanalysis*, 15: 913-947.
- Kharitonov AB, Wasserman J, Katz E, Willner I (2001). The use of impedance spectroscopy for the characterization of protein-modified ISFET devices: application of the method for the analysis of biorecognition processes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105: 4205–4213.
- Krause S (2007). *Encyclopedia of electrochemistry*. Wiley VCH, Weinheim.
- Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, Smith P, Dublin E, Prigent SA, Gullick WJ, Hurst HC (1992). *Br J Cancer*, 66(6): 1116–1121.
- Li CM, Sun CQ, Song S, Choong VE, Maracas G, Zhang XJ (2005). Impedance labelless detection-based polypyrrole DNA biosensor. *Frontiers in Bioscience*, 10: 180-186.
- Long YT, Li CZ, Kraatz HB, Lee JS (2003). AC impedance spectroscopy of native DNA and M-DNA. *Biophysical Journal*, 84: 3218-3225.

- Ma J, Chu YM, Di J, Liu SC, Li HN, Feng J, Ci YX (1999). *Electrochemistry Communications*, 1: 425–428.
- Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, Chebib H, Saikali Y, Vittori O, Errachid A, Cloarec J.P, Martelet C, Jaffrezic-Renault N (2007). Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry*, 79: 4879-4886.
- Macdonald JR (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 223: 25-50.
- Maciosek M, Edwards N, Coffield A (2006). Priorities among effective clinical preventive services. *Am J Prev Med*, 31: 90–96.
- Madrid RE, Felice CJ, Valentinuzzi ME (1999). Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *Medical & Biological Engineering & Computing.*, 37: 789–793.
- McNeil CJ, Athey D, Ball M, Ho WO, Krause S, Armstrong RD, Wright JD, Rawson K (1995). Electrochemical sensor for measurement of urea and creatinine in serum based on ac impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer transformation. *Analytical Chemistry*, 67: 3928-3935.
- Moritz W, Szeponik J, Lisdat F, Friebe A, Krause S, Hintsche R, Scheller F (2001). Diversiform applications of LaF₃ for chemical semiconductor sensors. *Sens Actuators B* 7: 497-501.
- Nauman, R, Schmidt EK, Jonczyk A, Fendler K, Kadenbach B, Liebermann T, Offenhäusser A, Knoll W (1999). *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 651–662.
- Naumann R, Baumgart T, Gräber P, Jonczyk A, Offenhäusser A, Knoll W (2002). *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 25–34.
- Naumann R, Schmidt EK, Jonczyk A, Fendler K, Kadenbach B, Liebermann T, Offenhäusser A, Knoll W (1999). The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form. *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 651-662.
- Neaves P, Waddell MJ, Prentice GA (1988). A medium for the detection of Lancefield Group D cocci in skimmed milk powder by measurement of conductivity changes. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 437–448.
- Oliveira-Brett AM, Silva LA, Farace G, Vadgama P, Brett CMA (2003). Voltammetric and impedance studies of inosine-5'-monophosphate and hypoxanthine. *Bioelectrochemistry*, 59: 49–56.
- Ouerghi O, Touhami A, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Ben Ouada H, Cosnier S (2002). Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization. *Bioelectrochemistry*, 56: 131–133.
- Ozaki M, Kishigami S, Yano R (1998). Expression of receptors for neuregulins, ErbB2, ErbB3 and ErbB4, in developing mouse cerebellum. *Neurosci Res*, 30: 351–354.

- Pak SC, Penrose W, Hesketh PJ (2001). An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 371–379.
- Panasyuk-Delaney T, Mirsky VM, Ulbricht M, Wolfbeis OS (2001). Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers. *Analytical Chimica Acta*, 435: 157–162.
- Parkin DM, Fernandez LM (2006). Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J*, 1: 70–80.
- Pinsky P, Andriole G, Graha E, (2007). Prostate-specific antigen velocity and prostate cancer. Gleason grade and stage. *Cancer*, 109: 1689–95.
- Pirovano F, Piazza I, Brambilla F, Sozzi T (1995). Impedimetric method for selective enumeration of specific yoghurt bacteria with milk-based culture media. *Lait*, 75: 285–293.
- Porter P (2008). “Westernizing” women’s risk? Breast cancer in lower income countries. *N Eng J Med* 358: 213-216.
- Radi AE, Sanchez JLA, Baldrich E, O’Sullivan CK (2006). Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1): 117–124.
- Rajkumar T, Gullick WJ (1994). *Br. J. Cancer*, 70: 459–465.
- Rodriguez MC, Kawde AN, Wang J (2005). Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge. *Chemical Communications*, 34: 4267-4269.
- Rubinstein I (1995) *Physical electrochemistry Methods and Principles*. Marcel Dekker, New York.
- Russell S.M, Fletcher D.L, Cox N.A. (1995). Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses. *Poultry Science*, 73: 1144–1148.
- Saby C, Jaffrezicrenault N, Martelet C, Colin B, Charles MH, Delair T, Mandrand B (1993). Immobilization of antibodies onto a capacitance silicon-based transducer. *Sensors and Actuators B:Chemicals*, 16: 458-462.
- Sargent A, Sadik OA (1999). The electrochemistry of antibody-modified conducting polymer electrodes. *Electrochimica Acta*, 44: 4667–4675.
- Saum AGE, Cumming RH, Rowell FJ (1998). Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 511–518.
- Schasfoort RBM, Niedziela T (1994). Detection of inhibitory compounds of acetylcholine esterase with a novel ion responding impedance sensor (IRIS). *Sensors and Actuators* 18: 175-177.

- Shervedani RK, Mehrjardi AH, Zamiri N (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor *Bioelectrochemistry*, 69: 201-208.
- Shyyan R, Masood S, Badwe RA, Errico KM, Liberman L, Ozmen V, Stalsberg H, Vargas H, Vass L (2006). Breast cancer in limited-resource countries: diagnosis and pathology. *Breast J.* 12 :27-37.
- Silley P, Forsythe S (1996). Impedance microbiology-a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 233-243.
- Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF (1998). Circulating tumour markers in breast cancer: accepted utilities a novel prospect. *Breast Cancer Res. Treat.*, 52: 239-259.
- Strasak L, Dvorak J, Hason S, Vetterl V (2002). Electrochemical impedance spectroscopy of polynucleotide adsorption. *Bioelectrochemistry*, 56: 37-41.
- Sumner C, Krause S, Sabot A, Turner K, McNeil CJ (2001). Biosensor based on enzyme-catalysed degradation of thin polymer films. *Biosensors and bioelectronics*, 16: 709-714.
- Taira H, Nakano K, Maeda M, Takagi M (1993). Electrode modification by long-chain, dialkyl disulfide reagent having terminal dinitrophenyl group and its application to impedimetric immunosensors. *Analytical Sciences*, 9: 199-206.
- Temiz H, Aykut U (2006). Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 51-59.
- Tong YH, Han XJ, Song YH, Jian, G, Wang EK (2003). *Biophysical Chemistry*, 105: 1-5.
- Tovey SM, Witton CJ, Bartlett JM (2004). Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1–4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res.*, 6: 246–251.
- Turner APF (1987). "Biosensors: Fundamentals and Applications", Oxford University Press, , Oxford, 5-7.
- Uygun ZO, Sezgintürk MK (2011). A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth. *Analytica Chimica Acta*, 706: 343-349.
- Vagin MY, Karyakin AA, Hianik T (2002). Electrochemical transducers based on surfactant bilayers for the direct detection of affinity interactions. *Bioelectrochemistry*, 56: 91–93.
- Van Gerwen P, Laureyn W, Laureys W (1998). Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sensors and Actuators B, Chemicals*, 49: 73–80.
- Van Sprecken KJA, Stekelenburg FK (1986). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24: 95–96.

- Wang J, Jiang M, Fortes A, Mukherjee B (1999). New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films. *Analytica Chimica Acta*, 402: 7-12.
- Wegener J, Keese CR, Giaever I (2000). Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*, 259: 158–166.
- Wilkop T, Xu DK, Cheng Q (2007). Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer–protein interactions with PDMS microfluidic chips. *Langmuir*, 23: 1403-1409.
- Witton CJ, Reeves JR, Going JJ (2003). Expression of the HER1–4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol.*, 200: 290–297.
- Xu Y, Yang L, Ye XY, He PG, Fang YZ (2006). Impedance DNA biosensor using electropolymerized polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes modified electrode. *Electroanalysis*, 18: 873-881.
- Yang LJ, Li YB (2006). Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. *Journal of Microbiological Methods*, 64: 9-16.
- Ye YK, Zhao JH, Yan F, Zhu YL, Ju HX (2003). Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 1–8.
- Yea JS, Ottovab A, Tienb HT, Sheu FS (2003). Impedimetric biosensors. *Bioelectrochemistry*, 59: 65–72.
- Yin HY, Wang FL, Wang AL, Cheng J, Zhou YX (1996). High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Analytical Letters*, 40: 85-94.
- Yotter R.A, Wilson D.M (2004). A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems. *IEEE Sensors Journal*, 4: 412-429.
- Zayats M, Huang Y, Gill R, Ma C, Willner I (2006). Label-free and reagentless aptamer-based sensors for small molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 128: 13666-13667.
- Zhao Y, Pang D, Hua S (1999). DNA-modified electrodes Part 3: spectroscopic characterization of DNA-modified gold electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 388: 93–101.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Çetin CANBAZ, 1989 yılında İzmir'in Bergama ilçesinde dünyaya gelmiştir. Lise öğrenimini Bergama Cumhuriyet Lisesi'nde 2006 yılında tamamladıktan sonra, 2007 yılında başladığı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümünden 2011 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.