

**HSP70'İN HASSAS VE EKONOMİK
ANALİZİ İÇİN FULLEREN C₆₀ TEMELLİ
BİR BİYOSENSÖR**

Burçak DEMİRBAKAN

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal
SEZGİNTÜRK
2015**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HSP70'İN HASSAS VE EKONOMİK ANALİZİ İÇİN FULLEREN C₆₀
TEMELLİ BİR BİYONSENSÖR**

Burçak DEMİRBAKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2015

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Burçak DEMİRBAKAN tarafından hazırlanan” HSP70’in Hassas ve Ekonomik Analizi İçin Fulleren C₆₀ Temelli Bir Biyosensör ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

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

Üye : Prof. Dr. Yusuf DİLGİN *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

HSP70'İN HASSAS VE EKONOMİK ANALİZİ İÇİN FULLEREN C₆₀ TEMELLİ BİR BİYSENSÖR

Burçak DEMİRBAKAN

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, “fullerene C₆₀” karbon materyali yüksek hassasiyetli biyosensörlerin üretiminde ilgi odağı olmuştur. Bunun yanısıra, fullerene C₆₀ dayanıklılık, küresel yapı ve elektrik iletkenliği gibi özelliklere sahiptir. HSP’ler birçok kanser türlerinde gereğinden fazla üretilirler. Bu protein ailesi arasında, HSP70 neredeyse tüm hücrelerde bulunan stresle-uyarılabilir ana proteindir. Bu çalışmada heat shock protein (HSP70)’in tayini için bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, ilk olarak camı karbon elektrot yüzeyi fullerene C₆₀ ile kaplandı. Fullerene C₆₀ ile kaplanmış yüzey üzerine EDC/NHS kullanılarak antiHSP70 kovalent olarak immobilize edildi. HSP70 tayini ve anti-HSP70’in immobilizasyonunu karakterize etmek için döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) teknikleri kullanıldı. Geliştirilen biyosensör iyi tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik gösterdi. Pratik analizlerde biyosensörün uygulanabilirliğini doğrulamak için, gerçek serum numularına uygulandı.

Anahtar kelimeler: Fullerene C₆₀, ısı şok protein (HSP70), döngüsel voltametri (CV).

2015, 65 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

A BIOSENSOR BASED ON FULLERENE C₆₀ FOR SENSITIVE AND ECONOMIC ANALYSIS OF HSP70

Burçak DEMİRBAKAN

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Due to special physicochemical characteristics, the novel carbon material “fullerene C₆₀” adds a new dimension to the construction of highly sensitive biosensors. Moreover, fullerene C₆₀ has properties such as durability, spherical structure and electric conductivity. Among this protein family, HSP70 is the major stress-inducible protein that is abundantly and ubiquitously expressed in all cells. In this study, antiHSP70 was covalently immobilized onto fullerene C₆₀ layer by using EDC/NHS. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques were applied to characterize the immobilization of antiHSP70 process and to detect HSP70. The biosensor has exhibited good repeatability and reproducibility. To verify the feasibility of the biosensor in practical analysis, the human blood serum samples were experienced.

Keywords: Fullerene C₆₀, heat shock protein (HSP70), cyclic voltametry (CV).

2015 , 65 page

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ivi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TEŞEKKÜR	ix
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 FULLEREN	3
2.1.1 Fullerenler : Karbonun Moleküler Allotropları.....	3
2.1.2 Fulleren C ₆₀ (Buckminsterfulleren)'in Keşfi.....	6
2.1.3 Fulleren C ₆₀ 'in Özellikleri.....	7
2.1.4 Fulleren C ₆₀ 'in İndirgenmesi.....	10
2.1.5 Fulleren C ₆₀ 'in Yükseltgenmesi	10
2.1.6 Fulleren Kimyasının Geleceği.....	11
2.2. Kanser Biyomarkerları	12
2.2.1 HSP (Isı Şok Protein) Ailesi.....	12
2.3 Elektrokimya	16
2.3.1 Voltametri.....	17
2.3.2 Voltametrik Cihazlar	18
2.3.3 Voltametrik Yöntemler	18
2.4 Biyosensörler.....	20
2.4.1 Elektrokimyasal Biyosensörler	22
2.5 HSP70 ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	23
3. MATERYAL ve METODLAR	25
3.1 Materyal	25
3.2 Elektrokimyasal Ölçümler.....	25
3.3 Ölçüm Prosedürleri	25
3.4 Biyosensörün İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	28
3.4.1 Fulleren C ₆₀ miktarının belirlenmesi.....	28
3.4.2 H ₂ SO ₄ konsantrasyonunun biyosensör üzerindeki etkisi.....	28
3.4.3 EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör üzerindeki etkisi	29
3.4.5 En uygun anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenmesi	29
3.4.6 Anti-HSP70'in inkübasyon süresinin belirlenmesi	29
3.4.7 HSP70'in inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	30
3.5. Biyosensörün Analitik Çalışmalarına İlişkin Bulgular	30
3.5.1 Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün kalibrasyon grafiği	30
3.5.2 Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün tekrarlanabilirliği	30
3.5.3 Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği.....	30

3.5.4 Anti-HSP70 Temelli HSP70 Biyosensörünün Geliştirilmesinde Fulleren C ₆₀ 'ın Etkisi	31
3.5.5 Single frequency -sabit frekansta impedans ölçümleri-	31
3.5.6 Fulleren C ₆₀ Temelli anti-HSP70 Biyosensörün SEM Görüntüleri	31
3.5.7 Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi	32
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33
4.1 Fulleren C ₆₀ Temelli Biyosensörün İmmobilizasyon Basamakları	33
4.2 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular.....	35
4.2.1 Fulleren C ₆₀ konsantrasyonunun belirlenmesi	35
4.2.2. Anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenmesi	39
4.2.3. Anti-HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu	42
4.2.4. HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu.....	45
4.3. Biyosensörün analitik Çalışmaları	48
4.3.1. Biyosensörün kalibrasyon grafiği.....	48
4.3.2. Biyosensörün tekrarlanabilirliği	50
4.3.3. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği	50
4.3.5. Sabit frekansta impedans ölçümleri	52
4.3.6. Fulleren C ₆₀ Temelli AntiHSP70 Biyosensörün SEM Görüntüleri	53
4.3.7. Anti-HSP70 Temelli Biyosensörün Kramers-Kronig Sonuçları	56
4.3.8. Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi	57
5. SONUÇ	57
6.KAYNAKÇA	61
ÖZGEÇMİŞ.....	63

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2. 1 Çeşitli çözücülerde C ₆₀ 'ın çözünürlüğü (Ruoff ve ark.,1993)	9
Tablo 2. 2 Bazı HSP'ler, yerleşim yerleri ve işlevleri	15
Tablo 2. 3 İmmobilizasyon metotları	22
Tablo 3. 1 Anti-HSP70 temelli biyosensörün hazırlanma prosedürü.....	27
Tablo 4. 1 Fulleren konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R ² 'leri ve denklemleri.....	35
Tablo 4. 2 Anti-HSP70 konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R ² 'leri ve denklemleri.....	40
Tablo 4. 3 Anti-HSP70'in inkübasyon süre optimizasyonunun grafiklerinin R ² 'leri ve denklemler.....	43
Tablo 4. 4 HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonunun grafiklerinin R ² 'leri ve denklemleri.....	46
Tablo 4. 5 Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R ² 'leri ve denklemleri.....	51
Tablo 4. 6 Fulleren C60 karakterizasyonuna ait standart grafiklerinin R ² 'leri ve denklemleri.....	52
Tablo 4. 7 Anti-HSP70 temelli biyosensörün farklı aşamalarında Kramers-Kronig transformu.....	57
Tablo 4.8 Serum örneklerinde HSP70 analizi (pg/mL HSP70)	55
Tablo 5. 1 Anti-HSP70 temelli biyosensörün seçilen en uygun optimizasyon değerleri	59
Tablo 5.2 HSP70'in başka yöntemlerle belirlenen tayin aralıkları.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.C ₆₀ 'ın şematik gösterimi.	4
Şekil 2. 2.C ₇₀ 'ın şematik gösterimi	5
Şekil 2. 3.Corannullene (1), Fullerene C ₆₀ (2)	6
Şekil 2. 4.En düşük enerjili Kekule yapısının Schlegel diyagramı ve moleküldeki iki farklı bağın uzunluğu ile [60-Ih]fullerenin şematik gösterimi	7
Şekil 2. 5.HSP27, HSP70, HSP90 ve HSP60'ın mitokondrideki yerleşim bölgesi	13
Şekil 2. 6.HSP70 ve HSP90 komplekslerinin şematik gösterimi	14
Şekil 2. 7.Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltomogram.....	17
Şekil 2.8.Biyosensörün şematik gösterimi.....	21
Şekil 3.1.Ölçüm düzeneği.....	26
Şekil 4. 1.İmmobilizasyon adımlarına ait CV (B) ve EIS (A) eğrileri.....	34
Şekil 4. 2.Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik görüntüsü.....	35
Şekil 4. 3.Fulleren C60 konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4. 4.Seçilen fulleren C60 konsantrasyonuna (4 mg/mL) ait EIS (A-B)ve CV(C-D) spektrumları.....	38
Şekil 4. 5.En uygun Anti-HSP70 konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	40
Şekil 4. 6.Seçilen Anti_HSP70 konsantrasyonuna (40 µg/mL) ait EIS (A-B) ve CV (C-D) spektrumları.....	41
Şekil 4.7.Anti-HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu.....	43
Şekil 4.8.Seçilen Anti-HSP70 süre optimizasyonuna (45dakika) ait EIS (A-B) ve CV (C-D) spektrumları.....	44
Şekil 4.9.HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu.....	46
Şekil 4. 10.Seçilen HSP70'in inkübasyon süre optimizasyonuna (30dakika) ait EIS (A-B) ve CV (C-D) spektrumları	47
Şekil 4.11.Optimal şartlardaki Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	48
Şekil 4.12.Tasarlanan biyosensörün artan HSP-70 konsantrasyonuyla elde edilen EIS (A) spektrumu ve CV (B) voltamogramı.....	49
Şekil 4. 13.Fulleren C60 varlığında ve yokluğunda geliştirilen HSP70 biyosensörüne ait standart grafik.....	52
Şekil 4. 14.Anti-HSP70 temelli biyosensöre HSP70 bağlanmasının gerçek zamanlı ve tek frekansta yapılan single frequency ölçümü.....	53
Şekil 4. 15.GCE yüzeyindeki SEM görüntüleri.....	55
Şekil 4. 16.Tasarlanan biyosensörün Kramers-Kronig sonuçları.....	56

KISALTMALAR DİZİNİ

AFP	: Alfa fetö protein
ATPaz	: Adenozin trifosforaz
BSA	: Bovin serum albumin
CV	: Döngüsel voltametri
DC	: Doğru akım
DCE	: Damlayan civa elektrot
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FCC	: Yüzey merkezli kübik
GCE	: Camı karbon elektrot
HSP70	: Isı şok protein
IPR	: İzole edilmiş beşgen kuralı
LOD	: Tayin limiti
LOQ	: Ölçüm limiti
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NHS	: N-hidroksisüksinimid
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PSA	: Prostat spesifik antijen
PTH	: Paratiroit hormon
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden beri, engin deneyimi ve bilgi birikimi ile yol haritamın oluŐmasını sağlayan, fikirleri ve yol gostericiliği ile bana her konuda yardımcı olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Bu yolda daima bana destek olup koŐsulsuz sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olarak bana gÜç veren aileme,

Laboratuvar çalıŐmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, her tÜrlÜ moral ve motivasyon sağlayan çalışma arkadaşlarım iđdem SAYIKLI ŞİMŞEK, MÜnteha Nur SONUÇ KARABOĐA ve çok kıymetli dostum Burcu ÖZCAN'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma kapsamında kullanılan tÜm kimyasallar, cihaz ve donanım **113Z678** numaralı TÜBİTAK projesi tarafından sađlanmıŐtır. Katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teŐekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu madde ile etkileşimi sonucu ortaya çıkardığı sinyalin, ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bu etkileşim ürünlerinin bir ölçüm sistemi ile ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Daha genel bir ifade ile, bir biyosensör; biyolojik bir ajanla birleştirilmiş olan fiziko-kimyasal detektördür ve bu yapı istenilen ürünün analizi amacıyla kullanılmaktadır (**Turner 1994**).

Doğada bulunan tüm canlılar, yaşamlarını devam ettirebilmek için, çevresel değişimleri hızla algılayıp, bu değişimlere adapte olmaya çalışırlar. Canlılardaki çevreyi “hızla algılama ve adapte olma mekanizmaları” biyosensörlerin in vitro olarak geliştirilmesi ve kullanımı için model oluşturmuştur. Canlılar çevrelerine karşı insanların hayal edemeyeceği bir duyarlık gösterirler. Örneğin; köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar. Canlılar bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörlerin temel kurgusunu oluşturmuştur (**Otlu 2010**).

İlk biyosensörün keşfi, 1950’lerin ortasında, Cincinnati’deki Çocuk Hastanesi Araştırma Vakfı’ndan Leland C. Clark’ın, ameliyat sırasında hasta kanındaki çözülmüş oksijeni ölçmek üzere bir elektrot dizayn etmesiyle gerçekleşti. Clark, standart platin elektrot ve referans elektrodu gaz geçirgen bir polimerik membranla kapladı. Platin elektrodun voltaj değeri sabit tutuldu ve böylelikle devreden geçen akım hızı dış ortamdaki oksijen konsantrasyonuyla doğrudan orantılı olan membrandan difüzlener oksijen hızına bağlı oldu (**Schultz 1992**).

Biyosensörlerin laboratuvarından genel kullanıma geçişindeki temel etken ise biyomoleküllerin aktivitelerini uzun süre koruyabilmeleri olup, bu amaçla çeşitli yüzeylere tutturulmalarını içeren yöntemler geliştirmesidir.

Kusursuz bir işleyişe sahip olan biyolojik sistem ile teknolojinin birlikteliğinin ürünü olan biyosensörler günümüzde bile göz alıcı bir düzeydedir. Hiç şüphesiz, gerek biyolojide her gün yeni bir bilginin ortaya konması, gerekse teknolojide gelişmelerin hız kesmeden devam etmesi, yeni biyosensörlerin yakın zamanda geliştirileceğinin habercisi olarak değerlendirilmelidir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında kanser biyomarker analizi için GCE kullanılarak biyogölleme diagnostiklerine yönelik yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Geliştirilen bu biyosensörün amacı, düşük maliyetli, pratik uygulamaya olanak sağlayan, güvenilir sonuçlar veren ve hassas amperometrik esaslı biyosensörlerin oluşturulması ve hazırlanan amperometrik temelli biyosensörlerin karakterizasyonu, optimizasyonu ve uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1 Fulleren

2.1.1 Fullerenler : Karbonun moleküler Allotropları

Yeni bir maddenin oluşumu ve şekillenmesiyle ilgilenen sentezci kimyagerler için, karbon elementi ilk başlarda küçük bir role sahipti. Bu durum, klasik grafit ve elmas yapılarının yerini fullerenler tarafından zenginleştirilen karbon allotrop ailesi aldığı anda önemli ölçüde değişti. Grafit ve elmasın aksine fullerenler küresel yapıya sahip moleküllerdir ve kimyasal manipülasyonlar için önemli bir özellik olan çeşitli organik çözücülerde çözünebilirlik özelliğine sahiptirler. Fullerenler beşgen ve altıgenlerin birleşiminden oluşmuştur. Beşgenler, grafit yokluğunda bükülme sağlarlar. Fullerenlerin en çok bilinen ve en az karbona sahip olan yapısı fulleren I_h -simetrik Buckminsterfullerene C_{60} 'dır (Şekil 2.1). Buckminsterfullerene bir futbol topu şekline sahiptir. Bir sonraki kararlı yapısı C_{70} ' dir (Şekil 2.2). Sonraki yapıları C_{74} , C_{76} , C_{78} , C_{80} , C_{82} , C_{84} gibi daha yüksek karbon sayısına sahip fullerenler takip eder. Fullerenlerin oluşum prensibi , $n=1$ ayırık sayısı ile, n tane altıgenin her bir küresel ağının kapatılması için 12 beşgene ihtiyaç duyulduğunu öne süren Euler teoreminin bir sonucudur.

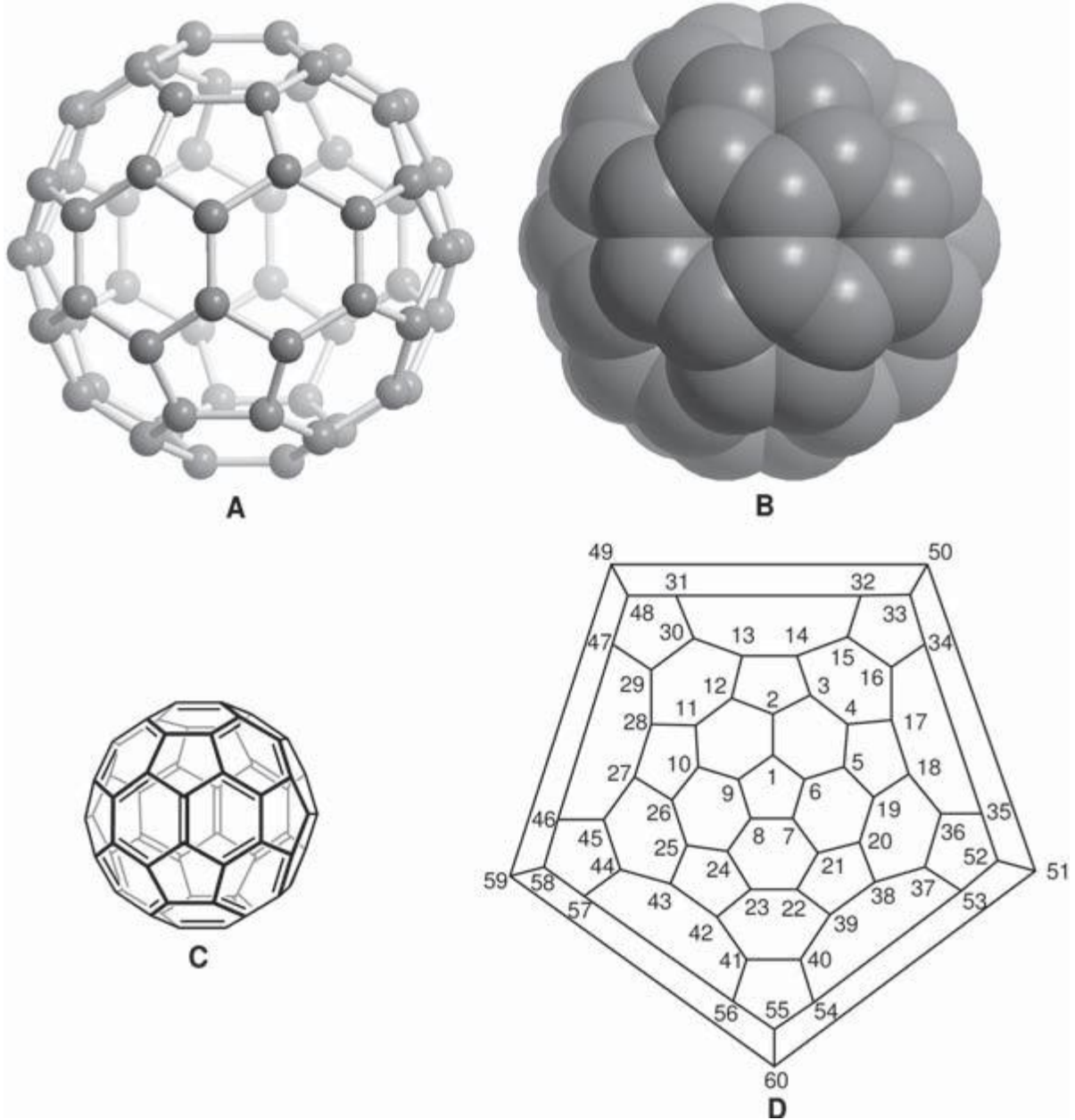
Bu üç boyutlu sistemlerin yapısı, küçük iki boyutlu moleküllerle kıyaslandığında daha estetik bir görünüme sahiptir. Bir çok bilim adamının da dikkatini çeken nokta o zamana kadar görülmemiş bu estetiğe sahip moleküler kafeslerin küresel mimarisidir. Nitekim bu sebeple Buckminsterfullerene C_{60} çok kısa bir zamanda en yoğun olarak araştırılan moleküllerden birisi haline geldi. Buckminsterfullerenin genel kullanım için çok uzun ve karmaşık olan IUPAC adlandırılması aşağıda verilmiştir:

Hentriacontacyclo[29.29.0.0.2,14.03,12.04,59.05,10.06,58.07,55.08,53.09,21.011,20.013,18.015,30.016,28.017,25.019,24.022,52.023,50.026,49.027,47.029,45.032,44.033,60.034,57.035,43.036,56.037,41.038,54.039,51.040,48.042,46]hexaconta-1,3,5(10),6,8,11,13(18),14,16,19,21,23,25,27,29(45),30,32,(44),33,35(43),36,38(54),39(51),40(48),41,46,49,52,55,57,59-triacontane

(Kroto ve ark. 1991).

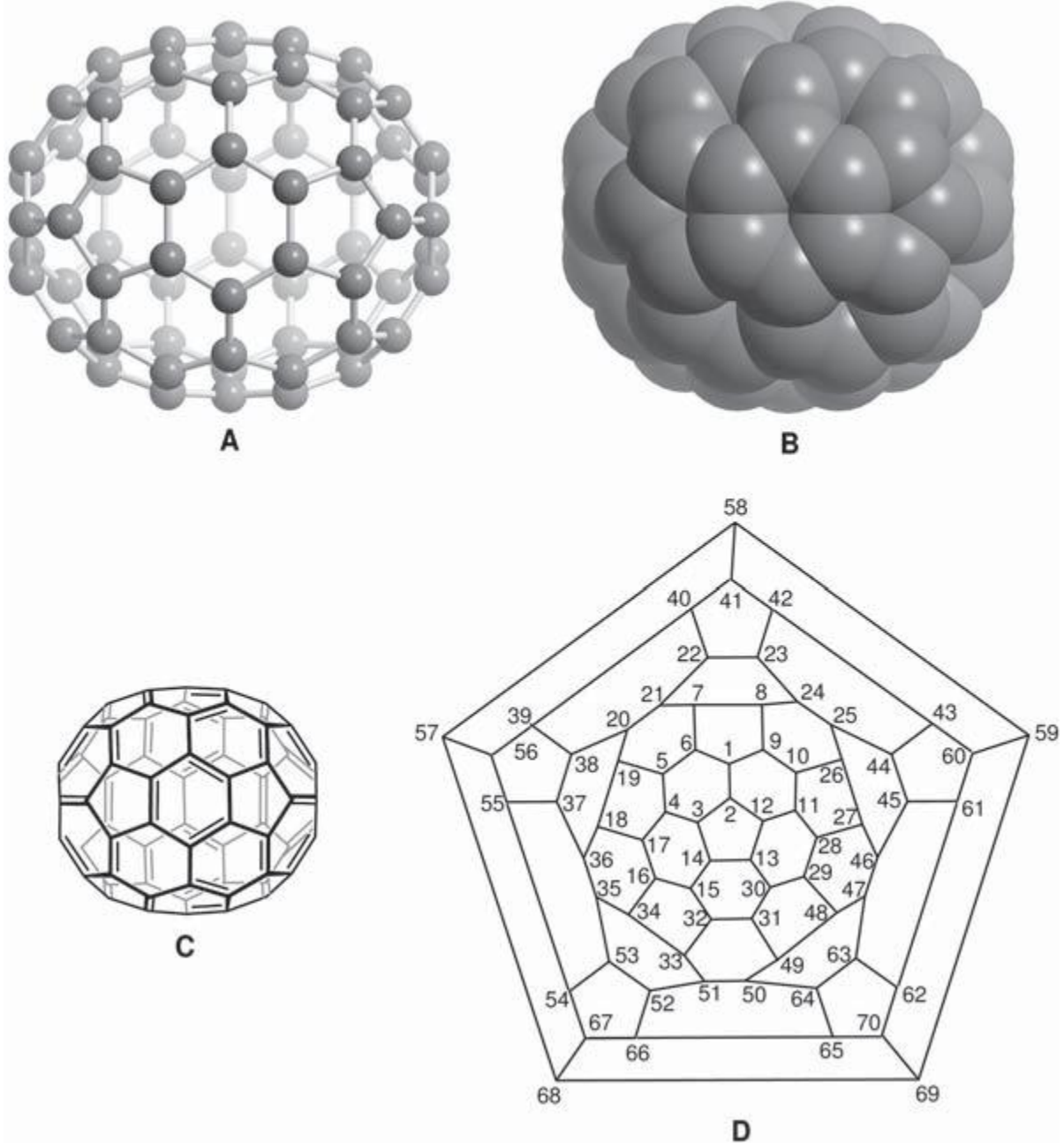
Bunun yanısıra, çok sayıda olası regioizomerler gibi çok büyük olan oldukça fazla türevleri vardır. Kimyasal modifikasyonlar için basit bir adlandırma gereklidir. Bunun için izohedral Buckminster fullerene C_{60} ($C_{60}-I_h$) [5,6] fulleren olarak ,daha büyük olan kararlı yapısı C_{70} ise ($C_{70}-D_{5h}$) [5,6] fulleren [2,3] olarak adlandırılır. Köşeli parantez içerisindeki sayılar fullerenlerdeki halka boyutlarını, parantez içerisindeki sayılar ise C-atomlarının sayısını ve nokta

grup sembolünü ifade eder. Fullerenlerin beşgenler ve altıgenlerden başka diğer halkalarıda içeren yapıları mevcuttur (fullerene [4] gibi). Numaralandırma sistemi, ekzohedral katılma reaksiyonlarıyla oluşan bir çok regioizomerik türevlerin tam olarak tanımlanabilmesi için önemlidir. Fullerenlerdeki atom numaralandırılması için bir takım kurallar dizisi kabul edilmiştir. Şekil 2.1’de bu kurallar doğrultusunda adlandırılmış C_{60} yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.1. C_{60} 'ın şematik gösterimi.(A) top ve çubuk modeli, (B) uzay boşluğu modeli, (C) VB(değerlik bağı) formülü, (D) Scglegel diyagramı ile C-atomlarının numaralandırılması ([4]'e göre) (Godly ve ark. 1997).

Çok sayıda C-atomlu fullerenlere çok sayıda izomer ve nokta grup simetrisi eşlik eder. Bu durum özellikle daha büyük fullerenler için önemlidir. Çok sayıda C-atomlu fullerenlere örnek olarak C_{70} [70- D_{5h}]fullerene Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



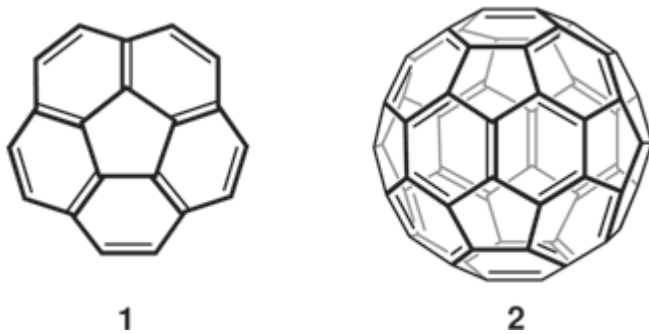
Şekil 2. 2. C_{70} ‘ın şematik gösterimi .(A) top ve çubuk modeli, (B) uzay boşluğu modeli, (C) VB(değerlik bağı) formülü, (D) Scglegel diyagramı ile C-atomlarının numaralandırılması ([4]’e göre) (Godly ve ark.,1997).

Birbirine paralel olan Şekil 2.1 ve Şekil 2.2 'den anlaşılacağı üzere fulleren C_{70} ile fulleren C_{60} 'ın kimyası bir çok benzerliğe sahiptir (**Godly ve ark. 1997**). Değerlik bağ formülleri veya Schlegel diagramları fullerenler ve türevlerinin basit şematik gösterimi için kullanılır. Değerlik bağ formülleri fulleren ailesi ya da kafes yapılu küçük bir modifikasyon ile türevleri için çok sık kullanılır. Bir Schlegel diyagramı ise iki boyutta birleşmiş olan fullerenin her bir C-atomunu gösterir.

Kimyasal fulleren türevleri katılma reaksiyonları verirler. Bir çok uygun reaksiyon bölgesine bakılmaksızın ,uygun bir bölgesel-seçicilikte katılma reaksiyonu gösterir. Bu da moleküler kürelerle çalışan sentezci kimyagerlerin fullerene karşı ilgisini arttıran bir özelliktir.

2.1.2 Fulleren C_{60} (Buckminsterfulleren)'in Keşfi

1966'da D.E.H Jones olarakta bilinen Deedalus, günümüzde fulleren olarak adlandırılan büyük delikli karbon kafeslerinin yapılmasının mümkün olabileceğini ileri sürdü. Ancak bu fikir bilim komitesinden çok fazla ilgi görmedi. 4 yıl sonra, 1970 'de, kase şeklindeki 'corannulene'nin senteziyle ileri sürülen fikrin benzediği görüldü. Osawa ilk defa C_{60} molekülü için küresel I_h -simetrik futbol topu yapısını önerdi (**Barth ve ark. 1966**). Yeni üç boyutlu süperaromatik Π -sistemlerini bulmaya çalıştığı süre zarfında, 'corannulene'ni futbol topunun yapısının bir bölümü olarak tanımladı. Ardından, C_{60} üzerinde Hückel hesaplamaları olarakta bilinen, diğer grupların bazı teoriksel makalelerde varolduğu rapor edildi (**Bochvar ve ark. 1971**).



Şekil 2. 3. Corannulene (1), Fullerene C_{60} (2)

1984'de görüldü ki, grafitin lazer üzerinde buharlaşması, büyük tek karbonlu kümeler C_n ile $n=30-190$ üretilebilir. Bu kümelerin kütle dağılımları uçuş zamanlı kütle spektrometresi tarafından belirlendi. Geniş karbon kümelerinin spektrumunda yalnızca iyonlar ve çok sayıda karbon atom çiftleri gözlemlenebildi. Bu kümeler arasında C_{60} ve C_{70} bulunmasına rağmen

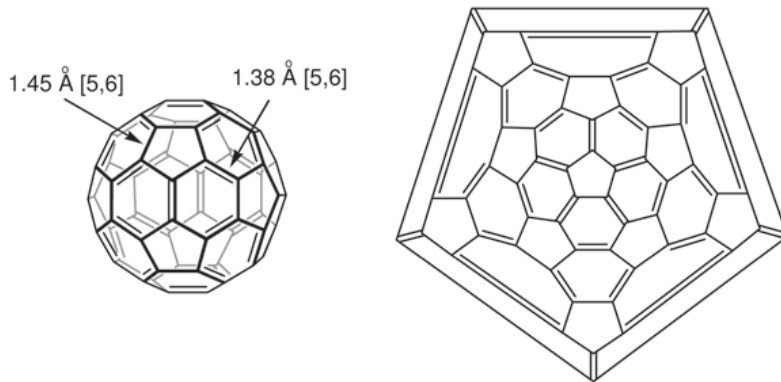
kimlikleri tanımlanamadı. Fullerenlerin deneysel keşfindeki buluş 1985 'de Kroto Houston'daki Rice Üniversitesini ziyaret ettiğinde geldi (**Kroto ve ark. 1985**). Burada, Smalley ve arkadaşları kütle spektrometresiyle ısıya dayanıklı kümelerle çalışmak için, bir katı (grafit gibi) üzerinde lazer ışığına odaklanarak bir plazmada meydana gelen bir teknik geliştirdiler (**Dietz ve ark. 1981**). Aslında, küme ışın çalışmaları HC₇N ve HC₉N gibi uzayda bulunan siyanopolin türlerinin laboratuvar çalışmalarıyla benzer olabileceğini gösterdi (**Heath ve ark. 1987**). Bu çalışmalarda, C₇₀ deki zayıf sinyal pikinin aksine ,720'de şiddetli bir kütle spektrumu pikiyle fulleren C₆₀ gözlemlendi. Kroto ve Smalley bu deneysel buluşların sonucunu hemen kaydettiler. Bu sonuçlar ışığında Buckminsterfulleren olarak bilinen C₆₀ keşfedildi. I_h simetrisiyle bir yirmiyüzlü olan küresel yapısından dolayı C₆₀ çok karardır (**Kroto ve ark. 1985**). Bu molekül benzer prensiplerle oluşan jeodezik kubbeye tanınan mimar Buckminster Fuller'den sonra adını aldı.

2.1.3 Fulleren C₆₀ 'ın Özellikleri

2.1.3.1 Fulleren C₆₀ 'ın Yapısı

Futbol topu şeklindeki C₆₀ izomeri [60-I_h]fulleren en küçük kararlı fullerendir. [60-I_h]fullerenin yapısı teoriksel ve deneysel olarak belirlenmiştir (**Schulman ve ark. 1987**). Yapılan araştırmalar [60-I_h]fullerenin izohedral yapısını doğrular. Bu C₆₀ yapısının iki önemli özelliği vardır:

- 1) 12 beşgenin tümü altıgenler tarafından izole edilir
- 2) İki altıgenin ([6,6]bağları) bağlanma noktalarındaki bağlar, tek bir altıgen ve tek bir beşgenin ([5,6]bağları) bağlanmasındaki bağlardan daha kısadır. (Şekil 2.4)



Şekil 2. 4.En düşük enerjili Kekule yapısının Schlegel diyagramı ve moleküldeki iki farklı bağın uzunluğu ile [60I_h]fullerenin şematik gösterimi

Fullerenlerdeki beşgenler bir eğri oluşturmaya ihtiyaç duyarlar, çünkü altıgenlerden oluşan bir ağ sadece düzlemseldir. [60-Ih]fulleren, tek C₆₀ izomeri ve aynı zamanda ‘‘izole edilmiş beşgen kuralına’’(IPR) uyan en küçük fullerendir (**Seitz ve ark. 1986**). IPR, komşu beşgen yapılarına karşı kararlı olan altıgenlerden izole edilmiş tüm beşgenlerle fulleren yapılarına dair bilgi verir.En düşük enerjili Kekule yapısına sahip olan [60-Ih]fullerende görünen birbirini izleyen uzun bağlarda, beşgen halkalarda çift bağ bulunmazken altıgenlerin ([6,6] çift bağları) bağlanma yerlerinde çift bağlar yer alır. [60-Ih]fullerendeki her bir altıgen sikloheksatrien karakter ve her bir beşgende radialene karakter sergiler. [60-Ih]fullerenin çapı ise NMR ölçümleriyle belirlenir (**Wudl 2004**).

2.1.3.2 Fulleren C₆₀’ın Fiziksel ve Spektroskopik Özellikleri

Katı haldekinin yanısıra çözeltideki fiziksel özelliklerin araştırmaları çoğunlukla C₆₀ üzerinden yapılır. Fullerenin C₆₀ şeklinin ısısı kalorimetri aracılığıyla teoriksel ve deneysel olarak C-atomu başına düşen ısı 10.16 kcal.mol⁻¹ olarak belirlenmiştir (**Murry ve ark. 1994**). C₆₀’ın C-atomu başına düşen bağlanma enerjisi ise grafitten daha küçük olan bir bağlanma enerjisi yaklaşık 0.4-0.7 eV olarak hesaplanmıştır (**Dresselhaus ve ark. 1996**).

Fullerenleri kimyasal olarak modifiye etmek için çoğu zaman çözelti olmaları gerekmektedir. Kromotografik ayırma yöntemleri veya ekstraksiyonlar için çözünürlük önemli bir role sahiptir. Çeşitli organik çözücülerde C₆₀’ın çözünürlüğü sistematik olarak araştırılmıştır (Tablo 2.1) (**Sivaraman ve ark. 1992**).

Aseton, tetrahidrofuran veya metanol gibi polar ve H-bağlı çözücülerde C₆₀ çözünmezken atom sayısı artan çözücülerde ve alkanlarda az çözünür. Aromatik çözümlerde ve karbon disülfidlerinde ise oldukça çok çözüldüğü gözlemlenmiştir. Çözünürlüğün belirli düzeyde artışı benzenden naftaline geçişte önemli bir rol oynar. C₆₀’ın çözelti davranışı eğilimler olmasına rağmen, n kırılma indisine benzer belli bir çözücü parametresiyle çözünürlüğe direk bağlı değildir. Çözünürlük mol fraksiyon birimlerinde belirtildiğinde Tablo 2.1 ‘de listelenen en iyi çözücülerde bile C₆₀’ın çözünmesi çok iyi değildir. Fullerenler, özellikle C₆₀, reaksiyon merkez modeller ve fotosentetik antenlerin yapısı için çok çekim gücü olan yapıları engeller (**Guldi ve ark. 2000**). C₆₀ ‘ın katı hali oda sıcaklığında yüzey-merkezli-kübik (FCC) bir yapıdadır (**Dresselhaus ve ark. 1996**).

Tablo 2. 1 Çeşitli çözücülerde C₆₀'ın çözünürlüğü (Ruoff ve ark. 1993).

Çözücü	C ₆₀ (mg/mL)	Mol fraksiyonu (10 ⁴)	N
n- Pentan	0,005	0,008	1,36
n- Hekzan	0,043	0,073	1,38
Siklohekzan	0,036	0,059	1,43
n- Dekan	0,071	0,19	1,41
Dekalinler	4,6	9,8	1,48
Diklorometan	0,26	0,27	1,42
Karbon disülfid	7,9	0,22	1,63
Diklorometan	0,26	0,40	1,42
Kloroform	0,16	0,000	1,45
Tetraklorometan	0,32	2,1	1,46
Tetrahidrofuran	0,000	4,0	1,41
Benzen	1,7	2,1	1,50
Toluen	2,8	4,0	1,50
Tetralin	16	31	1,54
Benzonitril	0,41	0,71	1,53
Anisol	5,6	8,4	1,52
Klorobenzen	7,0	9,9	1,52
1,2- Diklorobenzen	27	53	1,55
1-Metilnaftalin	33	68	1,62
1-Kloronaftalin	51	97	1,63
Aseton	0,001	0,001	1,36
Metanol	0,000	0,000	1,33

Katı haldeki yoğunluğu 1,72 g.cm⁻³ 'dir (Stephens ve ark.,1991). Yüzey merkezleri ve orjinde, köşe uzunluğu a=14,17 Å olan bir birim küp 4 ekivalent molekülü içerir. Bu plastik

kristaldeki küresel moleküller, moleküllerarası zayıf etkileşimleri sebebiyle oda sıcaklığında nerdeyse serbest halde bulunurlar.

2.1.4 Fulleren C₆₀ 'ın İndirgenmesi

C₆₀ ile yapılan ilk kimyasal dönüşümler indirgenme reaksiyonlarıydı. Sonrasında fullerenlerin , elektrokimyasal ve fotokimyasal indirgenmelerinin yanısıra güçlü organik donör moleküller, organometalik bileşikler,elektropozitif metallerle eletron transfer özelliğini ifade eden elektrofilik özelliği tanımlandı. Fonksiyonlanmış fullerid anyonları ve tuzları çoğu zaman hidrofollerenlerden proton kopararak ya da karbanyonlarla reaksiyona girerek oluşurlar. Bu sistemlerden bazıları, ya C₆₀ dan ya da C₆₀ türevlerinden , moleküler ferromanyetizm veya süperiletkenlik gibi bilinen katı hal özellikleri sergiler. Fulleridler fotolüminesans materyalleri artırmak ve doğrusal olmayan optik materyaller için gelecek vadeden yapılardır. Bu durum C₆₀ molekülünün iç yapısal özellikleriyle ilişkilidir. Organik moleküller arasında, kimyasal olarak modifiye edilmiş şekilleriyle C₆₀ özel bir yere sahiptir. Fullerenlerin indirgenme dönüşümleri fullerid tuzlarını hazırlamak için kullanılmaz. Fullerid iyonları kendi başlarına reaktif türlerdir ve kolayca bir sonraki reaksiyona geçebilirler. Bu yüzden , fullerid anyonları fulleren kimyası için eşsiz bir sentez gücü sağlar (**Wudl 2004**).

2.1.5 Fulleren C₆₀ 'ın Yükseltgenmesi

Fullerenlerin indirgenmesi yükseltgenmelerinden çok daha kolay olmasına rağmen , yine de elektrofilik katılmaların yanısıra uygulamalarının geniş bir bölümünde oksidatif fonksiyonlanma yer alır. C₆₀ kolay bir şekilde indirgenebilirken daha yüksek anodik potansiyellerde ancak yükseltgenme meydana gelebilir (**Echegoyen ve ark. 1998**). Teorik araştırmalar, fulleren C₆₀ ile naftalin karşılaştırıldığında C₆₀'ın ilk yükseltgenme potansiyelini öngörmüşlerdir (**Haddon ve ark. 1986**). Fullerenlerin anodik elektrokimyası çözeltidekilerin yanısıra C₆₀ filmleriyle uygulanmaktadır (**Bard ve ark. 1991**). Kontrollü oksijenlenme ve asimilasyon, bilinen katılma tepkimlerine sebep olur. Oksijenlenmiş C₆₀ 'ın iridyum kompleksleri ve asimile edilmiş fullerenlerin tekli ve çoklu katılma tepkimelerinin her ikisinde X-ray kristalografi ve NMR spektroskopisiyle tamamen karakterize edilebilmektedir. C₆₀⁺ⁿ'nin tüm karbon katyonlarının araştırması ilerleme katetmektedir. Son günlerde, oldukça kararlı C₆₀⁺ tuzu izole edildi, fulleren C₆₀⁺² ve C₆₀⁺³ katyonlarının redoks potansiyelleri ölçülebildi. C₆₀⁺ tuzunun sentezi ,ölçülen katyon özelliğinin bir ayrışma ürünü mü yoksa bir katyon mu olup olmadığının

belirsizliğine açıklık getirdi. Lewis asitleriyle fullerenlerin etkileşimi, C_{60} 'a halojenlemiş hidrokarbonların veya aromatik fullerenlere katılması uygulanmasının yanısıra C_{70} 'den C_{60} ' 1 ayırmak içinde kullanılır (Wudl 2004).

2.1.6 Fulleren Kimyasının Geleceği

Daha yeni bir alan olmasına rağmen fulleren kimyası kendisine çoktan disiplinli bir çalışma platformu elde etmiştir. Fullerenler, kimyacıların sentezlerinde rutin olarak kullandıkları benzeri görülmemiş özellikleriyle organik yapıları bloke eder. 10 yıl önce çözülmeyen 4 tane sentez problemi gelecekte fulleren kimyasının en önemli 4 konu başlığı olarak belirlenmiştir (Hirsch 1994) :

- a) Belirlenen üç boyutlu bir yapıyla çoklu katılma reaksiyonu verilmesi
- b) Heterofullerenler
- c) Endohedrallerin sentezinde ;halka açılması ve ayrılma reaksiyonları
- d) Daha büyük fulleren yapılarıyla kimya

Tüm bu alanlardaki beklenen ilerleme süreci başarılmıştır. Homofullerenler (fulleroidler) gibi modifiye edilmiş fulleren kümelerinin katılma kimyası, katılma reaksiyonlarının farklı türlerinin kombinasyonu, yeni katılma örneklerinin gelişmesi gibi yeni araştırmalar için çok yer olmasına rağmen oldukça ayrıntılı bir şekilde düşünülebilir. Daha büyük fullerenlerin kimyası tonla ölçülecek fullerenler üretildiğinde daha geniş ölçüde yarar sağlayacaktır. Bu durum, heterofullerenler ve modifiye edilmiş kümelere giriş sağlayan C_{60} için geliştirilen prosedürlerin uygulamasına da izin verecektir. Bunun yanısıra, heterofullerenler ve modifiye edilmiş fulleren kümeleri anlaşılması güç potansiyeli gibi göze çarpan fiziksel ve kimyasal özellikleriyle muazzam yapılardır.

Eşsiz elektronik ve kimyasal özellikleri sayesinde fullerenler ; moleküler mühendislik, yeni moleküler materyaller ve supramoleküler kimya için devasa bir potansiyel güce sahiptir (Diederick 1999). Medikal uygulamalarda veya nanoteknolojide kullanılan fulleren türevlerinin bir çok örneği umut vadeci gelişmelerle uzun süredir sentezlenmeye devam etmektedir.

2.2. Kanser Biyomarkerları

Biyomarker, teşhis edilmiş ya da görüntülenmiş normal, anormal ya da biyolojik sürecin hücresel, biyokimyasal, moleküler ve genetik değişiklikleridir. DNA, RNA ya da protein molekülleri olan biyomarkerlar doku, hücre ya da kan, üre ve serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılardan ölçülebilmektedir. Biyomarkerların aşırı konsantrasyonları vücut içerisinde kanser indikatörleri olarak kullanılır. Biyomarkerlar aynı zamanda metabolizmanın kanser varlığına verdiği spesifik bir karşılık olan molekül de olabilir.

Bir biyomarker, salgılanan malign bir molekül olduğu gibi kanser varlığında vücudun verdiği spesifik bir cevap da olabilmektedir (**Wagner ve ark. 2004**). 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. Kanser biyomarker teknolojisi, oldukça üretken, yeniliğe açık, 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 (**Şimşek 2012**).

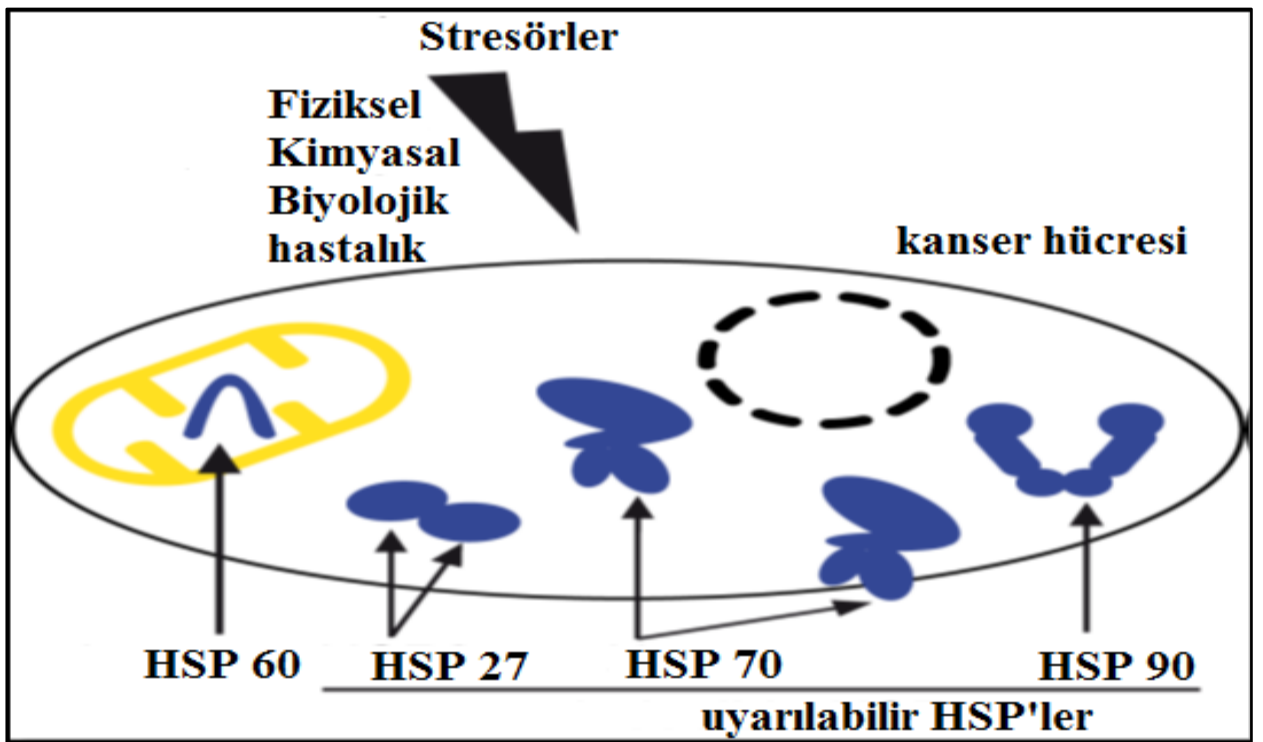
Bir çok kanser türüne ait spesifik biyomarker vardır. AFP (karaciğer kanseri), BCR-ABL (kronik miyoleid lösemi), BRCA1/BRCA2 (meme/yumurtalık kanseri), HER2 (meme kanseri), PSA (prostat kanseri), PTH (paratiroid kanseri), HSP70 bunlardan sadece bir kaçıdır (**Molinora ve ark. 2011**).

Tezin çalışmasında kullanılan HSP70 biyomarkerıda HSP (ısı şok protein) ailesinden olup stres varlığında vücutta artış gösteren bir proteindir. Diğer alt başlıklarda detaylı olarak anlatılmıştır.

2.2.1 HSP (Isı Şok Protein) Ailesi

HSP'ler ilk kez türlerinin geniş bir aralığında kimyasal ve fiziksel streslerle ısı şokuyla güçlü bir şekilde uyarılmış olan proteinlerin bir takımı olarak keşfedildi(**Linguist 1988**). Daha sonra bu HSP'ler diğer proteinlerin etkileşimlerini ve yapılarını modifiye edebilen proteinler, moleküler şaperonlar olarak adlandırıldı (**Beckmann ve ark. 1990**). Proteinlerin gerekli yüksek

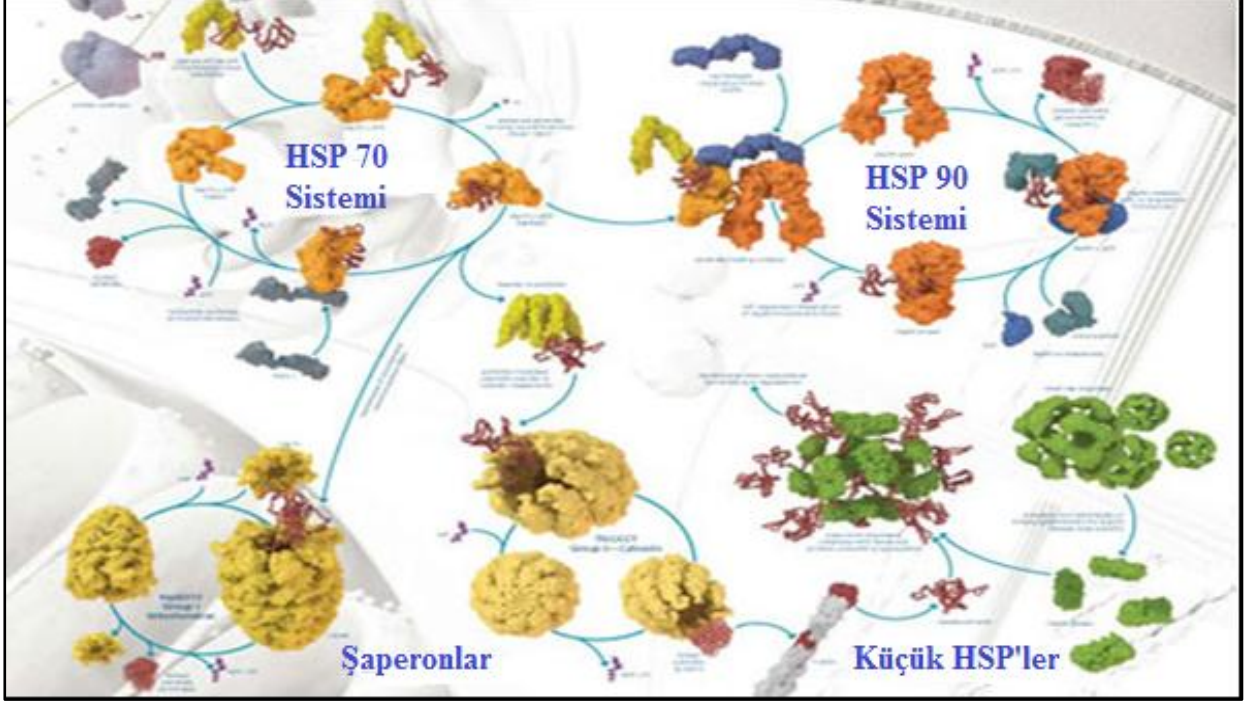
hücre içi konsantrasyonları, substratları ile stokiometrik bir biçimde sıkça etkileşen HSP'lerle moleküler şaperon fonksiyonunu etkiler (Lindquist ve ark. 1988). HSP'ler özellikle ,proteinler oksidatif stres , ısı şokuyla ya da proteine zarar veren başka olaylara maruz kaldığında ortaya çıkarlar (Hightower 1991). Bu sebeple HSP28, 40, 70, ve 110 genleri, seçici mRNA transkripsiyonu , etkili mesajcı RNA (mRNA) kararlılığı, güçlü transkripsiyon aktivasyonu ile stres esnasında kütle sentezi için yüksek etkili bir mekanizmaya sahiptirler (Voellmy 1994). Kanser hücrelerinin hayatta kalmak için gerekli ısı şok proteininin birikmesi kanser gibi hastalıkların yanısıra fiziksel, kimyasal veya biyolojik merkezli stres etkenlerinin tetikleyebilir (Şekil2.6) (Seigneuric 2011).



Şekil 2. 5. HSP27, HSP70, HSP90 ve HSP60'ın mitokondrideki yerleşim bölgesi (Seigneuric ve ark.,2011).

Stres sonrasında belirtilen HSP27, 70, 90 ve 110 proteinlerinde belirgin bir artış olur (Hickey ve ark. 1982). HSP gen transkripsiyonu, stresde ve iyileşme sonrasında hızlı bir şekilde transkripsiyon aktivasyonunu korumaya alan ısı şok faktörü ailesine ait transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (Sorgner 1988). Ayrıca ısıyla uyarılmış HSP'lerin çok geniş bir kısmını hücrelerde de içerir (Tang ve ark. 2005). Son çalışmalar temel HSP'lerin, multiprotein komplekslerinde HSP ve kofaktörlerin her ikisinde de bulunan bir çeşidinde bulunduğunu

göstermişlerdir (**Buchner 1999**). Hücreyle birlikte anahtar düzenleyici proteinlerle ilişkili spesifik olarak protein katlanmasında ara rol oynayan HSP10 ve HSP60 komplekslerini ve genel protein katlanması yolunda yer alan HSP70 ve HSP90 komplekslerini içerir (**Netzer ve ark. 1998**).



Şekil 2. 6.HSP70 ve HSP90 komplekslerinin şematik gösterimi

HSP90, hücre düzenlenmesinde, çok geniş sayıda hücreyel kinazlar, transkripsiyon faktörleri ve diğer molekülerlerle kompleks oluşumunda çok önemli bir rol oynar. HSP ailesine ait bazı proteinlerin işlevi ve buldukları yerler Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2. 2 Bazı HSP'ler, yerleşim yerleri ve işlevleri

HSP	LOKALİZASYON	İŞLEV
HSP 27	Sitoplazma	Protein agregasyonunun engellenmesi, hücre büyümesi
HSP 40	Sitoplazma	HSP 70'in koşaperonu
HSP 60	Sitoplazma, mitokondri	Protein agregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
HSP 70	Sitoplazma	Protein agregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
HSP 75	Mitokondri	Bilinmiyor
HSP 90	Sitoplazma	Protein agregasyonunun engellenmesi, protein stabilizasyonu
HSP 104	Sitoplazma	Proteinlerin agregatlardan serbestleştirilmesi

2.2.1.1 HSP70 (Isı Şok Protein)

HSP70, protein homeostazisinde kritik bir rolü olan yaklaşık 70 kDa ağırlığındaki moleküler şaperonlardan meydana gelen ısı şok protein ailesindedir. Bunlar, katlanmamış, düzgün katlanmış ,adenozin trifosfatları katlanmamış, hatalı katlanmış ya da denatüre edilmiş proteinleri saklayabilirler. Ayrıca HSP70ler protein homeostazlarının korunmasında genel bakım rolünü üstlenir, prototoksik protein agregatlarını indirger, proteinlerin organellere ya da hücrelere taşınmasına yardımcı olur ve taşınan proteinleri de korur. HSP70 tüm ökaryotik canlılar içerisinde evrendeki en çok korunan protein ailesidir. Bu ailenin bazı üyeleri spesifik organellere veya spesifik doku fonksiyonlarına hizmet eder. Bunun yanı sıra bir çok durumda bu üyeler fazladan görev yapar. HSP70, ribozoma bağlanan şaperonlardan biridir. Sitoplazmada yer alır ve işlevi protein katlanması protein agregasyonunun engellenmesidir. HSP70, stres durumlarında sentezlenerek sitozele salınır. Katlanma sırasında ATPaz ve kofaktör kullanır. HSP70'in fazla miktarda üretilmesi hücrede tümör oluşumuna sebep olurken HSP70'in azalışı ise bazı tümör hücrelerini apoptoza sürükler. Normal hücrelerde HSP70'in azalışıyla yaşama yeteneklerini yitirmezler. Kanser ilerlemesinde HSP70'ler kofaktörlerle beraber çalışabilirler. Tüm HSP70 ailesinin içten dışa uyarılmasını hücresel sistemler için dengeleyen potansiyel bir güç olarak düşünebiliriz. Bu aile , hücredeki önemli bir fonksiyon olan hayatta kalma görevine hizmet eder (Murphy 2013).

Miyako Abe ve arkadaşları (2004), HSP70'in prostat kanserinde potansiyel bir biyomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Çalışma sonuçları HSP70 seviyesinin prostat kanserli hastalarda artmış olduğunu göstermiştir. Ancak yine de hastalık riskinde marker olarak PSA (prostat spesifik antijen)'ya üstün değildir. Bununla ilgili daha fazla çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

2.2 Elektrokimya

Elektrokimya; elektrikle kimyasal değişimler arasındaki ilişkiyi inceleyen bilim dalıdır. Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini, bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine, elektrik enerjisinin de kimyasal enerjiye dönüşümünü inceler. Elektrokimya redoks olayıyla ilgilenir, yani bu tip tepkimeler yükseltgenme ve indirgenmenin gerçekleştiği tepkimelerdir. Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi;

1. Analiz edilecek maddeyi içeren bir çözeltiyi,
2. Maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı genellikle üçlü olan bir elektrot sistemini,
3. Elektrotları birbirine bağlayan bir çevrim sistemini gerektirir.

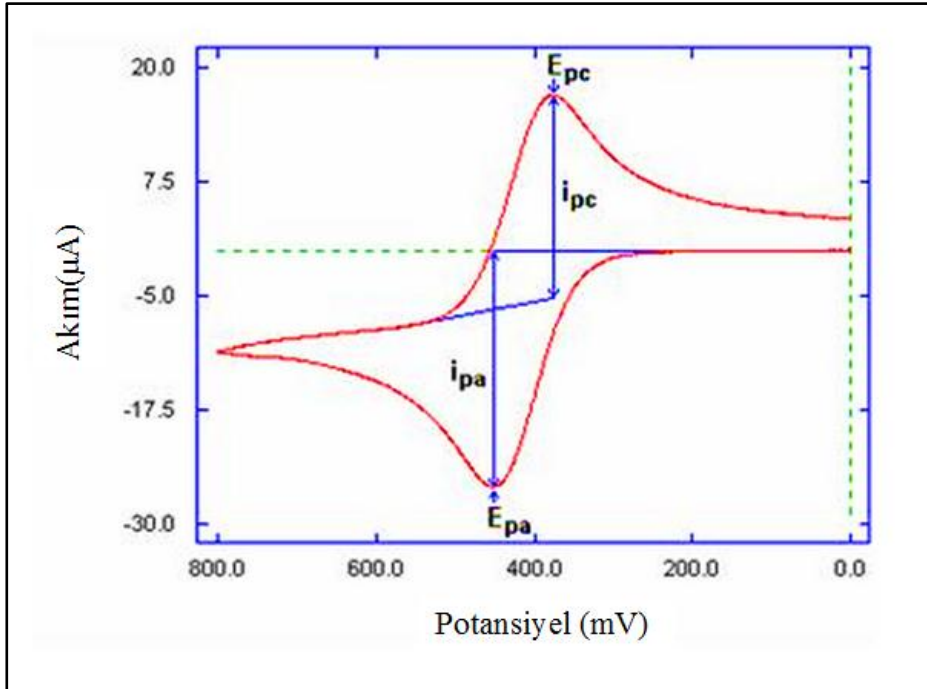
Analiz işlemlerinde, maddenin elektrokimyasal özelliklerinin kullanıldığı yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir. Elektroanalitik yöntemlerle analiz edilecek maddenin çok düşük tayin sınırlarına ulaşılması mümkündür. Bu yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı üstünlüklere de sahiptirler. Elektrokimyasal ölçümler bir elemente, moleküle ya da oluşan ürüne ait özel bir yükseltgenme basamağı için spesifiktirler (Brett 1992). Ayrıca, bu yöntemlerde kullanılan cihazlar diğerlerine göre çok daha ucuzdur. Elektroanalitik yöntemler, kimyasal türlerin derişimlerinden ziyade aktiflikleri hakkında bilgi verirler (Brett 1992).

Çeşitli elektroanalitik yöntemleri kullanılarak, doğru akım (DC), diferansiyel puls (DPV), dönüşümlü voltametri (CV) vb. uygulamalarla belirli potansiyel aralığında tarama yapılır ve meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Difüzyona bağlı olarak meydana gelen bir akım söz konusu olduğundan, burada ölçülen akım difüzyon akımıdır ve difüzyon hızı ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınında yer alan difüzyon tabakasında oluşur (Brett 1992). Ölçüm sırasında elektrot yüzeyi ile analiz edilecek maddeyi içeren çözelti arasında heterojen tabakalar meydana gelir. Meydana gelen bu tabakalar; türbülent akış tabakası, laminar akış bölgesi ve nernst difüzyon tabakası olarak adlandırılır.

2.2.1 Voltametri

Çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü ve buna bağlı olarak analit hakkında bilgi edinildiği elektrokimyasal yöntem voltametri, uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine de voltomogram denir. Voltametri çalışılacak potansiyel aralığının sınırları, kullanılacak çalışma elektroduna, kullanılan çözücüye ve elektrolit türlerine bağlıdır.

Voltametri, Çek kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında ve voltametrimin polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Bu tekniğin diğerlerinden en büyük farkı çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodun (DCE) kullanılmasıdır. Voltametri, çeşitli ortamlarda oluşan redoks tepkimelerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron akatari mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlarla da sıkça kullanılmaktadır. Voltametri kullanılan uyarma sinyalleri elektrokimyasal hücreye değiştirilebilen potansiyelde uygulanmaktadır. Bunun sonucunda, uyarma sinyallerinin türüne göre farklı akım cevapları elde edilmektedir. Voltametri en çok kullanılan uyarma sinyalleri; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalga sinyalleridir.



Şekil 2.7. Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltomogram (Compton ve ark. 1987).

2.2.2 Voltametrik Cihazlar

Bir voltametrik analizde kullanılacak cihazlar ; elektro kimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan meydana gelir. Bu elektrotlar;

a. Çalışma elektrodu (yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrot)

b.Referans elektrot (deney süresince potansiyeli sabit kalan elektrot, çalışmalarda genellikle Ag/AgCl referans elektrot kullanılır.)

c.Yardımcı elektrot (elektriğin çözelti içinden çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrot. Bu elektrot, çalışma elektrodu ile bir çift oluşturmakta ancak ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamamaktadır.)

2.2.3 Voltametrik Yöntemler

2.2.3.1 Dönüşümlü Voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri tekniği potansiyel farkın bir fonksiyonuna karşı akım ölçer. Bu teknikte ilk olarak başlangıç ve bitiş potansiyellerini içeren bir aralık belirlenir. Daha sonra başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru sabit bir hızda potansiyel farkı uygulanır. Bu potansiyel fark yükseltgenme ve indirgenme yönünde olabilir. Uygulanan bu uyarma sinyali üçgen şekilli dalga hareketiyle bir maksimuma doğru doğrusal olarak artar ve aynı eğilimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Başlangıç taramasının yönü, analiz edilecek örneğe bağlı olarak negatif veya pozitif olabilir. Negatif potansiyel yönündeki taramalar ileri tarama, zıt yöndeki taramalar ise ters tarama olarak adlandırılır. Uygulanan potansiyel fark sabit hızda bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru tekrarlanır. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşılıklı belirli aralıklarda, akımda meydana gelen değişim grafiğe geçirilerek ‘‘dönüşümlü voltamogram’’ elde edilir. Dönüşümlü voltametriyle durgun sistemde, üçlü elektrot sistemiyle çalışılır ve buradaki hız difüzyon tarafından tayin edilir. Analite ait yükseltgenme ve indirgenme elde edilen voltamogramdan gözlenebilmektedir. Bu teknik çoğunlukla elektrokimyasal bir analizde kullanılacak olan maddelerin elektriksel davranışlarını saptamak için tercih edilir. Bu sayede elektroaktif türlerin redoks tepkimelerine ait mekanizmalar kolaylıkla aydınlatılabilir. Miktar tayinine dayalı analizlerde dönüşümlü voltametri tekniği tercih edilmemektedir (**Genç ve ark. 1993**).

2.2.3.2 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi farklı araştırma alanlarında oldukça geniş bir alanda kullanılan önemli bir tekniktir. Kullanılan bu metot potansiyel ya da akımın küçük bir sarsımının uygulanmasının içerir. Bu sarsım tekli bir sinüs dalgası veya üst üste eklenmiş farklı frekanslardaki çok sayıda sinüs dalgasıdır. Uygulanan sarsımdan ve ölçülen yanıtından, impedansın büyüklüğü ve faz kayması belirlenir. Spektroskopi olarak adlandırılan bu teknikle parametreler uygulanan sarsımın frekansının bir fonksiyonu olarak ölçülür (**Autolab 2005**).

Elektriksel rezistans; bir devre elemanının, elektriksel akım devaranına karşı direnebilme gücüdür. Rezistans, potansiyel (E) ve akım (I) arasındaki orantıya dayanarak Ohm kuralları tarafından belirlenir. Buradan yola çıkarak oldukça iyi bilinen şu bağıntı yazılabilir (**2.1**).

$$R(\text{Ohm}) = E (\text{Volt}) / I (\text{Amper}) \quad (2.1)$$

Ancak bu bağıntının kullanımı ideal rezistör olarak adlandırılan sadece bir devre elemanı ile sınırlandırılır. İdeal bir rezistör birtakım sadeleştirici özellikler (Ohm Kanunları) tarafından sınırlandırılmıştır. Bunlar;

-Tüm akım ve potansiyel düzeylerinde Ohm kurallarına bağlı kalır. Rezistansı, frekanstan bağımsızdır.

-Bir rezistöre bağlı AC akım ve voltaj sinyalleri birbirleriyle es evrelidir. Gerçek hayatta devre elemanları çok daha kompleks davranışlar sergilerler. Bu elemanlar bizi rezistansın basit konseptini terk etmek durumunda bırakırlar.

İşte bu noktada rezistans yerine daha genel bir devre parametresi olan impedans kullanılmaktadır. İmpedanstaki rezistans gibi bir devre elemanının, elektriksel akım devaranına karşı direnç gösterme yeteneğinin ölçümüdür. Rezistansın farklı olarak birtakım sadeleştirici özellikler tarafından sınırlandırılmamaktadır. Elektrokimyasal impedans genellikle elektrokimyasal hücreye bir AC potansiyelin uygulanmasıyla ölçülür. Bu işlemde hücre içerisindeki akım ölçülmektedir. Bir sinüsoidal potansiyel sarsımı uygulanır ve bu potansiyele karşı alınan yanıt sarsım frekansıyla bunun oranlarını içeren bir AC akım sinyalidir. Bu akım sinyali, sinüsoidal fonksiyonların bir toplamı olarak analiz edilebilir. Elektrokimyasal impedans normalde küçük bir uyarma sinyali olarak kullanılarak ölçülür. Bunun nedeni linear bir hücre yanıtı elde etmektir ve sistemden elde edilen hücre yanıtı psödo-lineardır. Linear bir sistemde bir

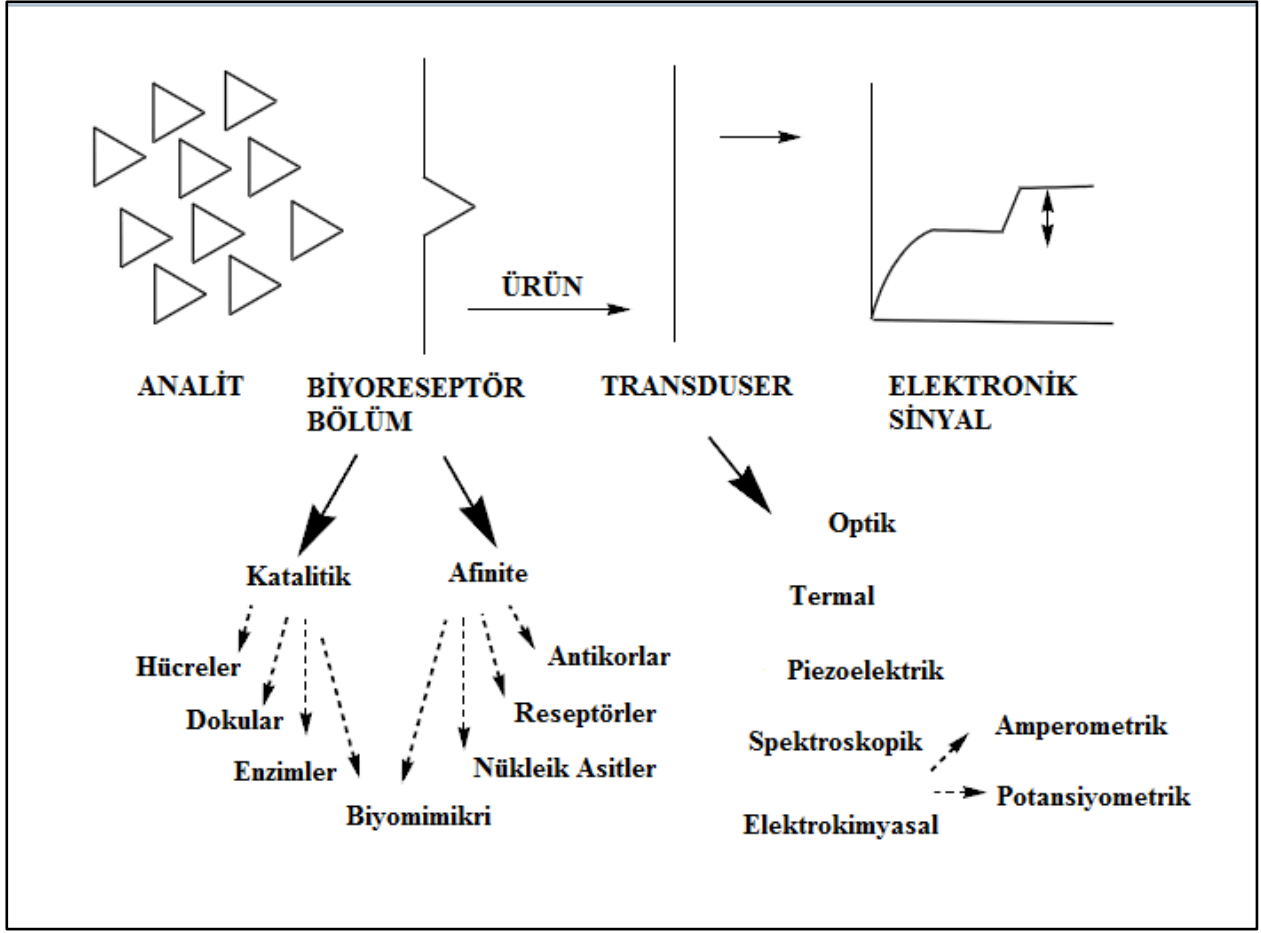
sinüsoyidal potansiyele karşılık olan akım yanıtı, aynı frekansta bir sinüsoid olacaktır ancak bir faz kayması meydana gelecektir (**Autolab 2005**).

2.4 Biyosensörler

Biyosensörler (biyogılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensör, analitiksel olarak anlamlı bir sinyal ile spesifik bir analit konsantrasyonuyla ilişkili kimyasal bilgiyi dönüştüren cihazdır. Biyosensörler örnek matriksindeki analitin ölçümü için kullanılır (**Gerard ve ark. 2002**). Biyosensörler iki kısma ayrılır: biyokomponent/biyoreseptör ve transduser. Bu cihazın çalışma prensibi, analitin kimyasal konsantrasyonuyla doğrudan ilişkili olan bir elektronik sinyal üretimine bağlıdır (**Adeloju ve ark. 1996**). Bir biyosensörün asıl görevi, biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir (**Thevenot ve ark. 2002**). Genellikle bir biyosensör, uygun biyolojik tanımlayıcı element kullanarak analit hakkında analitiksel bilgi, tekrarlanabilir, hassasiyet, seçicilik sağlayan birleşmiş reseptör-transduser cihazı olarak düşünülebilir (**Turner ve ark. 1987**).

Biyosensörlerin ilk bölümü ‘‘biyoreseptör ‘‘ bölümüdür. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar. Biyoreseptör olarak kullanılan biyolojik materyaller önemlidir. Bu materyaller ezimler, dokular, bakteri, maya, antikorlar, antijenler, lipozomlar ve organeller olabilir (**Foulds ve ark. 1986**).

Biyosensörlerin ikinci kısmı ise ‘‘transduser’’ bölümüdür. Transduser reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürür. Şekil 2.8’de transduser varlığında biyolojik olayların gerçekleştiği bir biyosensörün şematik gösterimi verilmiştir. Elektrokimyasal, spektroskopik, termal, piezoelektrik en yaygın transduserlerdir (**Xiu-Ling ve ark. 2008**).



Şekil 2. 8. Biyosensörün şematik gösterimi. (Svorc ve ark. 1997).

Enzimler, hücreler gibi biyolojik moleküllerin çoğu çözelti durumundayken çok kısa ömürlüdürler, bu yüzden uygun bir matrikste bulunmak zorundadırlar (Gerard ve ark. 2002). İmmobilizasyon, hassas ve kararlı biyosensörlerin geliştirilmesinde biyosensörlerin biyoalgılama kısmının dizaynındaki çok önemli bir adımdır. Bir reaksiyonu katalizlemek için immobilize edilmiş biyomateryal tabaka seçilir (Bartlett ve ark. 1993). Biyosensörün başarısı, immobilize edilmiş moleküllerin aktivitesi özellikle immobilizasyon methodunda ve reaksiyon durumunda, immobilize edilmiş matriksin hidrofilik karakteri, gözeneklilik ve yüzey alanına bağlıdır (Gerard ve ark. 2002). Biyosensörün kararlılığı sağlanırken hassas yüzeyle biyolojik materyal arasında çok yakın bir ilişki oluşur (Tuncagül ve ark. 2010).

Biyosensör oluşturmak için elektrot yüzeyindeki biyolojik materyaller çok iyi immobilize edilebilmelidirler (Wang ve ark. 2009). Elektrot yüzeyindeki bazı fiziksel ve kimyasal immobilizasyon methodları Tablo 2.3' de gösterilmiştir.

Tablo 2. 3 İmmobilizasyon metotları

Methot	Avantajlar	Dezavantajlar	
Adsorpsiyon	Biyokatalizör modifikasyonu yoktur.Matriks rejenera edilebilir.Ucuzdur.	Bağlanma kuvvetleri,iyonik kuvvet, sıcaklık ve pH'daki değişimlerden kolay etkilenir.	
Entrapment	Sadece biyokatalizör transduserin fiziksel immobilizasyonunu içerir.Ucuzdur	Yüksek difüzyon bariyerinden dolayı substratın enzime ulaşılabilirliği düşüktür.	
Çapraz Bağlama	Biyokatalizörün kaybı minimumdur.Düşük difüzyonal direncine sahiptir.Olumsuz şartlar altında kararlıdır.Uygun fiyatlıdır.	Yüksek iç aktiviteye sahip olan immobilize edilmiş enzim çok azdır.	
Enkapsülasyon	Biyodegradasyon ve safsızlığa karşı korunmuş daha büyük bir katalizör sağlar.	Sadece küçük substrat moleküller bozulmamış membranla kullanılabilir.	

2.4.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Biyosensörün transduseri elektrokimyasalsa biyosensör elektrokimyasal biyosensör olarak adlandırılır. İletken, yarıiletken, iyonik iletken materyal bir biyolojik filmle kaplandığı için transduser genellikle kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot olarak düşünülür (**Durst ve ark. 2002**). Elektrokimyasal sensörler, bir elektrodun transdüksiyon element olarak kullanıldığı yerde kimyasal sensörlerin bir alt sınıfıdır. Elektrokimyasal biyosensörlerde biyolojik tanıma kısmının seçiciliği, spesifikliği ve elektrokimyasal tekniklerin analitik gücü bir araya gelir. Böylece elektrokimyasal biyosensörler, hızlı, basit ve biyolojik olaylar için düşük ücretle tayin sağlarlar (**Cosnier ve ark. 1999**). Transduser tipine bağlı olarak, elektrokimyasal sensörler; amperometrik, potansiyometrik ve impedimetrik olarak sınıflandırılabilirler. Amperometrik elektrokimyasal biyosensör , elektrokimyasal biyosensörlerin başarılı olarak ticarileştirilmiş en yaygın türüdür. Amperometrik tayin , iyi seçicilik, hassasiyet, hızlı cevap, çok küçük ve tekrarlanabilir sonuçlar verebilmesi sayesinde kantitatif tayinler için çok kullanışlıdır (**Wang ve ark.1999**). Amperometri, elektroaktif türlerin elektrokimyasal yükseltgenme ve indirgenmesindeki akım değerlerinin ölçümüne dayalıdır. Amperometrik biyosensörler, üretimi kolay, çalışması basit, sinyal verilerinde hızlı ve kendi analitlerine spesifiktirler. Üç şekilde

incelenebilirler. İlk biyosensör tipinde, biyokatalizör bir membranda tutulmuş ya da bağlanmış ve bunun bir sonucu olarak biyokatalizör transduserin yüzeyinde sabitlenir. Substratların elektroaktifliği ve üretimleri bu amperometrik biyosensör türlerinde çok önemlidir. Bu biyosensör türü elektroaktif nonspesifik partikülleri yükseltgeyebilen veya indirgeyebilen yüksek potansiyelden dolayı arayüzeyde probleme sebep olur. İkinci tip biyosensörler genellikle elektron taşıyıcıları olarak medyatörleri kullanırlar. Medyatörler yardımıyla uygulanan potansiyel azaltılabilir. Üçüncü tip biyosensörlerde ise biyokatalizör doğrudan transdusere bağlanır. Biyolojik materyaller ile elektrot arasında doğrudan elektron transferi kullanılır. Bu yüzden, genellikle arayüzey problemi meydana gelmez (**Toht ve ark. 2002**).

Biyolojik tanıma bölgesine bağlı elektrokimyasal biyosensörlerin 2 genel sınıfı mevcuttur: biyokatalizör tanıma elementi ve biyoafinite (antikor-antijen etkileşimi) tanıma elementi. Biyokatalizör-bazlı biyosensörler , biyosensörler arasında en iyi bilinenlerdir. Biyokatalizörlerin 3 tipi yaygın olarak kullanılır;

- ✓ Enzimler (en yaygın ve gelişmiş olanı)
- ✓ Tüm hücreler (mikroorganizmalar,bakteri gibi) ya da hücre organelleri (mitokondri gibi)
- ✓ Dokular

2.5 HSP70 ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Imamoto ve arkadaşları , stresli koşullar altında stozolik şaperon HSP70 'in nükleer fonksiyonlarını ve mekanizmasını araştırdılar (**Imamoto ve ark. 2014**).

Farklı zaman aralıklarında boyun ve başı pullu hücre kanserli hastalardan biyopsiler ve kan örnekleri toplandı. HSP70 membranı varlığında , akış sitometrisiyle referans dokular ve tümör biyopsilerinin tek hücreli süspansiyonlarında ,astanın periferal kan lenfositlerinde HSP70'lerin varlığıyla ilişkili olan NK hücre markerları ve ELISA ile sağlıklı donörler ve hastaların serumlarındaki HSP70 proteinleri ve antikor seviyeleri belirlendi (**Gehrmann ve ark. 2014**).

Prostat kanseri durumu ile HSP70'in plazma seviyeleri arasındaki ilişki araştırıldı. Bu ilişkiye yönelik prostat kanserli hastaların serum örneklerinde çalışıldı (**Abe ve ark. 2004**).

Mesanedeki kanser üroteliyalinin ilerlemesi ve klinik davranışıyla HSP70 in yardımı araştırıldı (**Garg ve ark. 2009**).

HSP70'in tayininde sağlıklı hayvanın lizatları kullanıldı. lizatları kullanılan hayvanın gelişmesinin HSP70'e bağlı olduğu gözlemlendi (**Arrigo ve ark. 1991**).

3. MATERYAL ve METODLAR

3.1 Materyal

Deneyde kullanılan tüm reaktifler, Fulleren C₆₀, anti-HSP70 ve HSP70 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır. Tüm seyreltme işlemleri pH 7' de 50 mM olarak hazırlanan fosfat tamponu ile yapıldı. HSP70 belli konsantrasyonlarda porsiyonlama yapılarak -20°C' de muhafaza edilmiştir. Çalışma elektrotu olarak camsı karbon elektrot (GCE), 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 getirtilmiştir. Ölçümler ise döngüsel voltametri, kronoamperometri 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.

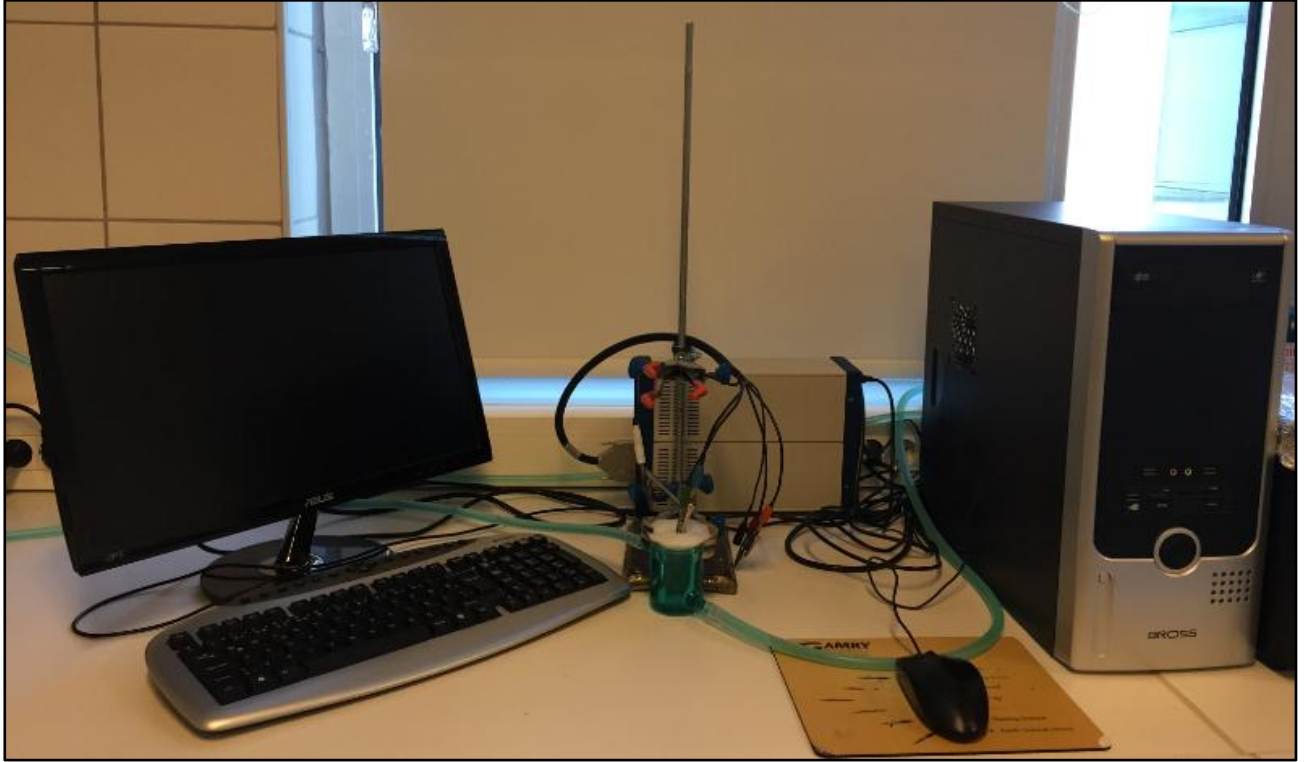
3.2 Elektrokimyasal Ölçümler

GCE elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu ölçmek için döngüsel voltametriden (CV), kronoamperetriden, 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 K₃[Fe(CN)₆]/K₄[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. Kronoamperometri ölçümlerinde potansiyeli 0,01 V (3600 saniye), frekansı 1200Hz seçilmiş olup ölçümler pH 7' de 50 mM olarak hazırlanan fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.3 Ölçüm Prosedürleri

Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camsı karbon elektrottur. Sabit potansiyelde sistemden geçen akım miktarındaki değişimler kullanılan HSP70 biyomarkeri konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğu için camsı karbon çalışma elektrodu ile akım değişimlerini belirlemek mümkündür. Bu sebeple her bir işlem aşamasında camsı karbon çalışma elektrotlarının EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Alınan ilk ölçüm camsı karbon çalışma elektrodunun temiz ölçümüdür. Temizlik aşamasında çalışma elektrodu olan camsı karbon

elektrot 0.05 μm alumina ile temizlendi ve ultra saf su ile yıkanıp 1 ml %65 lik HNO_3 ve 1 ml saf aseton karışımında 180 sn ultrasonik banyoda bekletildi. Tekrar ultra saf su ile yıkandıktan sonra elektrotların CV ve EIS ölçümleri alındı. Bu işlemden sonraki ölçüm sırası; elektrot yüzeyinde fulleren C_{60} ile oluşturulan SAMs ölçümlerinin alınması, H_2SO_4 çözeltisinde inkübasyona bırakıldıktan sonra ölçüm alınması, EDC/NHS ölçümlerinin alınması, anti-HSP70 ölçümünün alınması, BSA ölçümünün alınması ve son olarak HSP70 ölçümünün alınması şeklindedir. Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan ölçüm düzeneği Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. Ölçüm düzeneği

Anti-HSP70 temelli biyosensörün hazırlanmasında izlenen yol HSP70 biyosensörü için Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Tablolarda belirtilen değerler; oldukça hassas olarak çalışılan optimizasyon çalışmalarının sonucudur. Hazırlanan biyosensörler her aşamada mutlaka önce ultra saf su ile yıkanmış, çok dikkatli bir şekilde saf argon gazıyla kesinlikle elektrot yüzeyine zarar vermeyecek şekilde kurutulmuş ve inkübasyon sırasında karanlık ve nemli bir ortamda bekletilmiştir.

Tablo 3. 1 Anti-HSP70 temelli biyosensörün hazırlanma prosedürü

İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	Temizlenen elektrot yüzeyinde iletken yapmak için 200 µl toluen içerisinde çözülmüş 0.4 mg fulleren hazırlandı. Hazırlanan bu fulleren çözeltisinden 10 µl elektrot yüzeyine damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Bekleme işleminden sonra ultra saf su ile yıkanan elektrodun CV ve EIS ölçümleri alındı.
2	İnkübasyona bırakılmak üzere camsı karbon çalışma elektrotlarının her biri fullerenle kaplanmış yüzeydeki –COOH uçlarını açığa çıkarmak için 0,018 M lık 500 H ₂ SO ₄ ile hazırlanmış çözeltiye daldırıldı ve gece boyu (18 saat) bekletildi. İnkübasyon sonrası tekrar EIS ve CV ölçümleri alındı.
3	Ölçümden sonra biyosensör, 0,4 mM lık EDC ve 0,1 mM lık NHS içeren 2 ml'lik çözeltiye daldırılarak karanlık ve nemli ortamda 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda ultra saf sudan geçirilerek tekrar EIS ve CV ölçümleri alındı.
4	Bu işlemlerden sonra elektrotların yüzeyine 5 µl anti-HSP70 (40 µg/ml) damlatılarak nemli ve karanlık ortamda 45 dk boyunca bekletildi. Bekletilme sonrasında elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak fiziksel olarak yüzeye absorbe olmuş anti-HSP70 uzaklaştırıldı. Elektrotlar saf argon gazı ile kurutularak EIS ve CV ölçümleri alındı.
5	Bir sonraki işlemde ise aktif uçları bloke etmek için her bir elektrot yüzeyine %1 lik 10µL BSA çözeltisi damlatılarak yine karanlık ve nemli ortamda 30 dakika bekletildi. Bekleme sonrası elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp argon gazı ile kurutuldu. EIS ve CV ölçümleri alındı
6	Anti-HSP70' in elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki aşama HSP70' in elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlamaktır. Lineer aralığı genişletebilmek adına elektrota uygulanacak olan HSP70 derişimleri her bir eklemede farklı olacak şekilde belirlendi. Toplamda 7 farklı derişim eklendi. İlk eklenen konsantrasyon 0,8 pg/ml son eklenen konsantrasyon ise 12,8 pg/ml dir. Toplam HSP70 konsantrasyonu 16 pg/ml dir.
7	Her bir elektrot yüzeyine eklenen HSP70 hacmi 5 µl dir .1 saat boyunca nemli ve karanlık ortamda bekletilir. Her inkübasyon periyodundan sonra elektrotlar, yüzeyinde fiziksel olarak absorblanmış HSP70' i uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra argon gazı ile kurutuldu. EIS - CV ölçümleri alındı. Bütün bu işlemler Fe(CN) ₆ ^{4-/3-} redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede yapıldı.

3.4 Biyosensörün İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün, en üst düzeyde performansla çalışmasını sağlamak amacıyla öncelikle biyoaktif tabakasını oluşturan bileşenlerin optimizasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla fulleren C₆₀ konsantrasyonunun, anti-HSP70 konsantrasyonunun, anti-HSP70 inkübasyon süresinin, HSP70 konsantrasyonunun, HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkileri araştırılmıştır. Her bir immobilizasyon parametresinin optimum miktarının tayin edilmesi için, diğerleri sabit tutularak optimizasyonu yapılacak parametre değiştirilip biyosensörler hazırlandı ve ölçümler alındı. Yapılan bu çalışmalar aşağıdaki alt başlıklarda anlatılmıştır.

3.4.1 Fulleren C₆₀ miktarının belirlenmesi

Fulleren C₆₀ miktarının Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörü üzerindeki etkisini incelemek amacıyla diğer tüm bileşenler sabit tutulup, fulleren C₆₀ miktarı değiştirilerek biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerdeki fulleren C₆₀ konsantrasyonları sırasıyla; 0,5 , 2 , 4 , 6 ve 8 mg/mL 'dir. Bu belirtilen miktarlarda biyosensörler hazırlanarak HSP70 biyosensörüne ilişkin standart grafikler oluşturuldu. Oluşturulan standart grafikler karşılaştırılıp, yorumlanarak elde edilen verilerden en uygun fulleren C₆₀ miktarı belirlendi.(Çalışma koşulları; 5mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] çözeltilisi içerisinde , T=25 °C)

3.4.2 H₂SO₄ konsantrasyonunun biyosensör üzerindeki etkisi

Anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik biyosensör sistemi için, elektrot yüzeyindeki çok kararlı ve düzenli bir yapıya sahip fulleren C₆₀ H₂SO₄ ile rahatsız edilerek fulleren C₆₀ yapısındaki karboksil grupları elektrot yüzeyinde açığa çıkarıldı. H₂SO₄ 'in geliştirilen biyosensör üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 3 farklı konsantrasyonda biyosensör hazırlandı. Seyreltik H₂SO₄ konsantrasyonu karboksil gruplarını açığa çıkarmada yetersiz kalırken derişik H₂SO₄ konsantrasyonununsa yüzeyi bozduğu görüldü. Hazırlanan biyosensörlerdeki H₂SO₄ konsantrasyonları sırasıyla; 100 µL 0,018 M , 500 µL 0,018 M , 1000 µL 0,018 M 'dır. Bu konsantrasyonlarda alınan sinyal ölçümleri yorumlanarak en uygun H₂SO₄ konsantrasyonu belirlendi.(Çalışma koşulları; 5mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆], T=25 °C)

3.4.3 EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör üzerindeki etkisi

Anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik biyosensör sisteminde elektrot yüzeyindeki karboksil gruplarını aktifleştirmek için kullanılan EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) ve NHS(N-hidroksisüksinimid) çiftinin geliştirilen biyosensör üzerindeki etkisi incelendi. İki farklı konsantrasyonda hazırlanarak biyosensör üzerindeki etkisi incelenen EDC/NHS 'nin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

- **0,04 mM EDC / 0,01 mM NHS (2,4 µL EDC+ 1,2 µL NHS + 1996,4 µL fosfat tamponu)**
- **0,4 mM EDC/ 0,1 mM NHS (24 µL EDC+ 12 µL NHS + 1964 µL fosfat tamponu)**

Hazırlanan biyosensörlerde kullanılan her iki konsantrasyonunda alınan impedans ölçüm sinyallerine bakılarak en uygun EDC/NHS konsantrasyonu belirlendi. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde , T=25 °C)

3.4.5 En uygun anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenmesi

Anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemi için, en uygun anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenebilmesine yönelik olarak, optimum hazırlanma koşullarında hazırlanmış biyosensörle, farklı konsantrasyonlarda anti-HSP70 içeren impedans ölçümleri gerçekleştirildi. Bu konsantrasyonlar sırasıyla; 10, 20 ,40 ve 80 µg/mL 'dir. Belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan biyosensörlerden standart grafikler oluşturularak doğrusal tayin aralıkları ve R^2 değerleri belirlendi. Bu veriler birbirleriyle karşılaştırılarak en uygun anti-HSP70 konsantrasyonuna karar verildi. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde , T=25 °C)

3.4.6 Anti-HSP70'in inkübasyon süresinin belirlenmesi

En uygun anti-HSP70 konsantrasyonu belirlendikten sonra, geliştirilen biyosensöre yönelik antikorun elektrot yüzeyine en verimli olarak bağlandığı süreyi optimize etmek için, en uygun anti-HSP70 inkübasyon süresi belirlendi. Bu amaçla 30, 45, 60 ve 90 dakika olmak üzere 4 farklı anti-HSP70 süresi ile biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerin standart grafikleri çizildi ve R^2 değerleri belirlendi. Bu veriler birbirleriyle karşılaştırılarak anti-HSP70

temelli HSP70 biyosensörü için en uygun inkübasyon süresine karar verildi. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde , T=25 °C)

3.4.7 HSP70'in inkübasyon süresinin belirlenmesi

Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensöründeki en son optimizasyon aşaması en uygun HSP70 'in inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Buna bağlı olarak 30, 45, 60 ve 90 dakika olmak üzere 4 farklı inkübasyon süresi ile biyosensörler hazırlanarak impedans ölçümleri alındı. Bu ölçümlerden elde edilen standart grafikler çizildi ve çizilen standart grafikler birbirleriyle kıyaslandı. Elde edilen veriler ışığında HSP70 için en uygun inkübasyon süresine karar verildi. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde , T=25 °C)

3.5. Biyosensörün Analitik Çalışmalarına İlişkin Bulgular

HSP70 biyosensörüne yönelik olarak gerçekleştirilen oldukça detaylı optimizasyon çalışmalarından sonra önemli bazı parametrelerin de aydınlatılması için karakterizasyon denemeleri yapıldı. Bu denemeler aşağıdaki alt başlıklarda anlatılmıştır.

3.5.1 Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Çalışmaların bu aşamasına gelinene kadar gerçekleştirilen optimum hazırlanma koşullarında biyosensör hazırlandı. Bu biyosensörle, saptanan en uygun çalışma koşullarında ölçümler alınarak anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik biyosensörün kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Oluşturulan bu grafikten elde edilen veriler doğrultusunda HSP70 biyosensörünün doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.5.2 Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında 4,8 pg/mL HSP70 kullanılarak ardarda 8 ölçüm gerçekleştirildi. Bu ölçüm sonuçları vasıtasıyla ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplandı. Bu veriler ışığında biyosensörün tekrarlanabilirliği hakkında bilgi sağlandı.

3.5.3 Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi amacıyla denemeler gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda aynı koşullarda ve bileşimlerde 11 adet biyosensör hazırlandı. Hazırlanan bu biyosensörlere ait standart grafikler oluşturuldu. Bu standart grafiklerin tayin aralıkları ve R^2 değerleri karşılaştırılarak geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliği değerlendirildi.

3.5.4 Anti-HSP70 Temelli HSP70 Biyosensörünün Geliştirilmesinde Fulleren C_{60} 'ın Etkisi

Geliştirilen anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensöründe elektrot yüzeyini kaplayarak iletken hale getiren fulleren C_{60} 'ın etkisi incelendi. Tüm optimizasyon işlemleri tamamlanmış olan biyosensör hem fulleren C_{60} varlığında hem de fulleren C_{60} olmadan hazırlandı. Belirtilen şekilde hazırlanan her iki biyosensöründe impedans ölçümleri alınarak standart grafikleri oluşturuldu ve bu grafiklerden elde edilen R^2 değerleri hesaplandı. Elde edilen bu veriler ışığında fulleren C_{60} 'ın HSP70 biyosensörü üzerindeki etkisi değerlendirildi.

3.5.5 Single frequency -sabit frekansta impedans ölçümleri-

Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensör yüzeyinde meydana gelen zamana bağlı değişiklikleri açıklığa kavuşturabilmek için single frequency tekniği kullanıldı. Zamana karşı sabit bir frekansın ölçümüne dayanan bu yöntem sayesinde zaman dilimlerinde ve toplam zamanda meydana gelen impedans değişimleri değerlendirildi. Ayrıca anti-HSP70 –HSP70 kinetik bağlanmasıyla ilgili olarak elde edilen kronoamperometrik ölçüm sayesinde değerlendirme yapıldı.

3.5.6 Fulleren C_{60} Temelli anti-HSP70 Biyosensörün SEM Görüntüleri

Fullerene C_{60} temelli anti-HSP70 biyosensörünün tüm optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) SEM görüntüleri alındı. Bu sayede elektrot yüzeyine yaptığımız her bir immobilizasyon aşaması ve elektrot yüzeyinde bağlanma gerçekleştikten sonra nasıl bir görüntü oluştuğuda oldukça net bir şekilde gözlendi.

3.5.7 Biyosensörün gerçek örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi

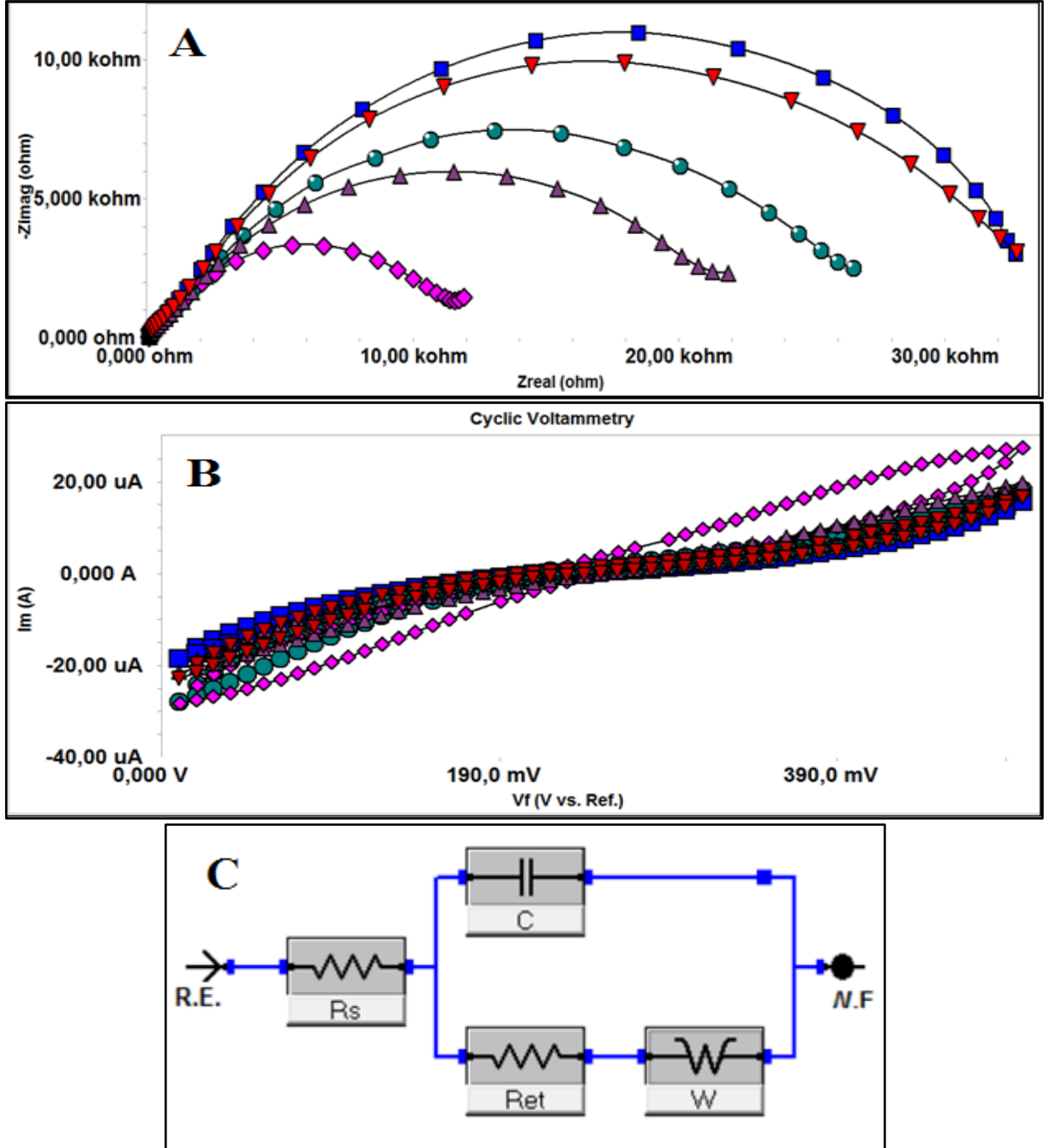
Tez projesinin son kısmında anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensör sistemleri gerçek serum örneklerinde denendi. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar değerlendirildi.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Fulleren C₆₀ Temelli Biyosensörün İmmobilizasyon Basamakları

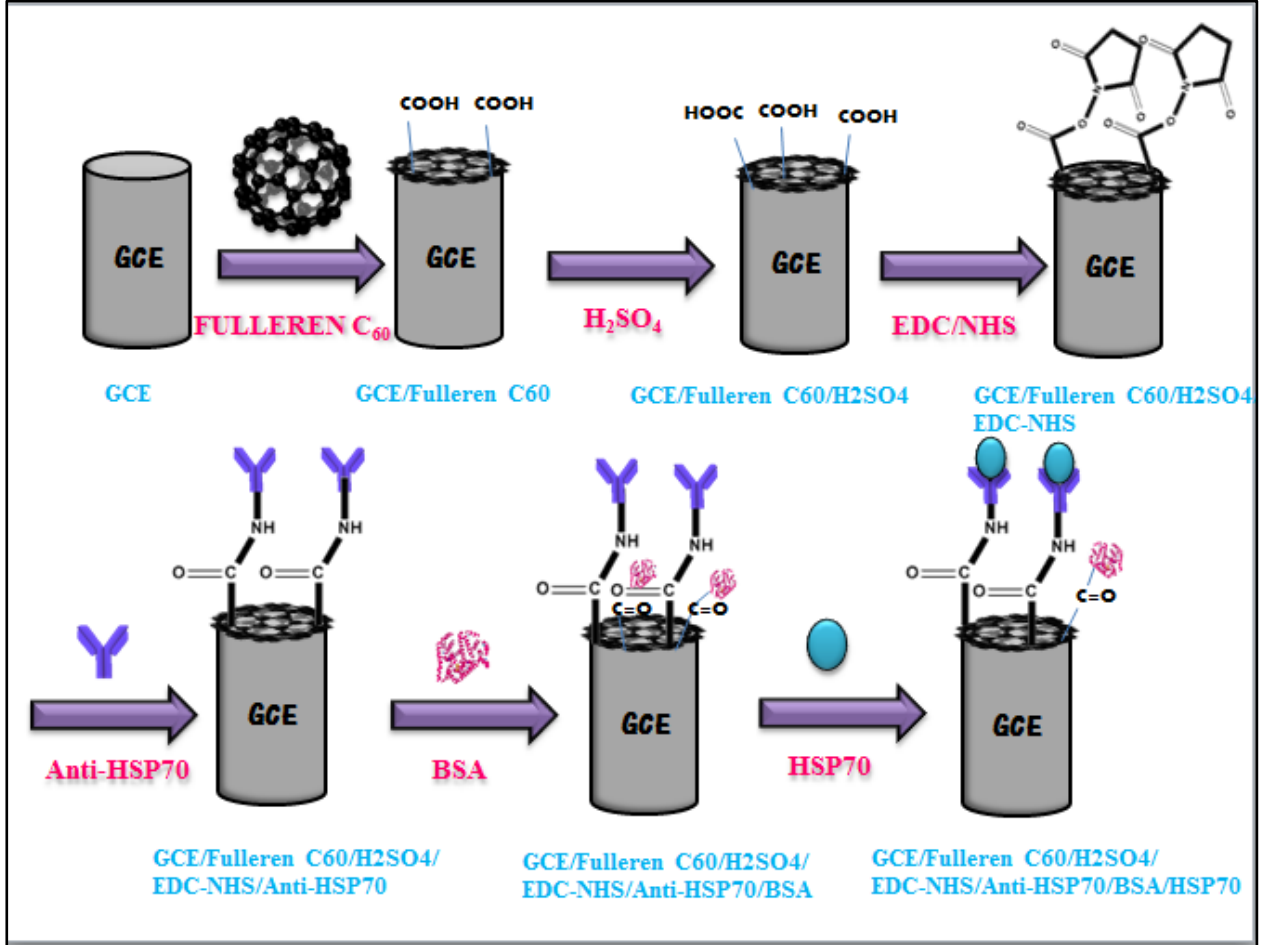
Çalışmanın bu kısmında HSP70 tayinine yönelik fulleren C₆₀ temelli biyosensörün immobilizasyon adımları incelenmiştir. İlk adım temiz ölçümü alınmış camı karbon elektrot yüzeyinin fulleren C₆₀ ile kaplanmasıdır. Daha sonraki aşama ise yüzeyi fulleren C₆₀ ile kaplanmış elektrodun H₂SO₄ ile inkübasyona bırakılmasıdır. Bundan sonraki tüm aşamalar sırasıyla; EDC/NHS , Anti-HSP70 ve BSA 'nın elektrot yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmesidir. Hazırlanan biyosensör için geliştirilen eşdeğer devre modeli ve tüm immobilizasyon işlemlerinin K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] ' de alınan EIS-CV spektrumları Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Şekil 4.1 A'da impedans eğrisi incelendiğinde GCE yüzeyinin fulleren C₆₀ ile kaplanması neticesinde COO⁻ fonksiyonel uçları K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] redoks probunun yüzeye kolaylıkla difüze olmasını engellemekte ve elektron transferini güçleştirmektedir. Ayrıca fulleren C₆₀ ın kompleks yapısı yüzeyin yalıtkan olmasına artı katkı sağlamaktadır. Fulleren C₆₀ yüzeyindeki kapalı karboksil gruplarını fazlaca açığa çıkartmak ve neticede başarılı bir immobilizasyon adımı elde edebilmek için elektrot yüzeyi gece boyu H₂SO₄ ile inkübasyona bırakıldı. Bu durum EIS eğrilerine net bir şekilde yansımaktadır. Daha sonra karboksil gruplarını aktifleştirmek için 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid(EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) çifti kullanıldı. Fulleren C₆₀ ile kaplanan camı karbon elektrot yüzeyinin ideal şartlara getirilmesinden sonra anti-HSP70 çözeltisi yüzeye damlatılarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Anti-HSP70'in immobilizasyonunun başarıyla gerçekleştiğini Şekil 4.1(A)'daki impedans spektrumundan şu şekilde yorumlamak mümkün: antikor tabakası yüzeydeki fulleren C₆₀ tabakası ile kovalent bağ yaptıktan sonra yüzeyde bir nevi bariyer etkisi oluşturmakta ve bu da yalıtkanlıkla sonuçlanmaktadır. İmmobilizasyon işleminin son aşamasında ise antikor ile efektif bir şekilde kapatılmayan ve sinyalde bozukluklara yol açabilme ihtimali olan bu durumun önüne geçebilmek için elektrot yüzeyi BSA ya daldırılarak karboksil uçlarını kapatılır ve yük transfer direncinin daha çok arttığı gözlenir. Şekil4.1 (B) incelendiğinde döngüsel voltametri sonuçlarının impedans spektrumlarıyla uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Fulleren C₆₀ ile camı karbon elektrot yüzeyinde oluşturulan iletken tabakanın CV voltomogramıyla takip edilmesi pik akımlarının yorumlanmasıyla mümkündür. Fulleren C₆₀ hem yüzeyindeki karboksil gruplarından hem de hacimli bir moleküler yapıya sahip olmasından ötürü ferri/ferro redoks çiftinin yüzeye yaklaşması engellenmekte ve dolayısıyla anodik katodik

pik akımları net bir şekilde düşmektedir. Aktif karboksil uçlarının kantitatif olarak arttırılmasını sağlamak amacıyla kullanılan H_2SO_4 in elektrot yüzeyine eklenmesinden sonra pik akımlarının yukarıda belirtilen sebepten dolayı düştüğü görülmektedir.



Şekil 4. 1. İmmobilizasyon adımlarına ait CV (B) ve EIS (A) eğrileri. Pembe (-◆-◆-): GCE/FULLEREN C_{60} , mor(-▲-▲-):GCE/FULLEREN C_{60}/H_2SO_4 , turkuaz (-●-●-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4/EDC-NHS$, kırmızı(-▼-▼-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4/EDC-NHS/Anti-HSP70$, lacivert (-■-■-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4/EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA$ (C) Hazırlanan biyosensör için geliştirilen eşdeğer devre modeli

Bir önceki adımda kantitatif olarak arttırılan COO^- uçlarının EDC/NHS çiftiyle aktive edilmesiyle CV voltamogramındaki pik akım farklarında daha da azalma gözlenmiştir. Anti-HSP70 in başarılı bir şekilde immobilizasyonunun ispatı anodik katodik pik akımları farkının bir önceki adıma göre daha da düşmesiyle ve impedans spektrumuyla örtüşmesiyle açıklanabilir. Immobilizasyonun son adımı olan elektrot yüzeyine BSA eklenmesiyle yüzey çok daha yalıtkanlaşmış ve tasarlanan biyosensör HSP70 in tayini için hazır hale gelmiştir.



Şekil 4. 2. Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik görüntüsü

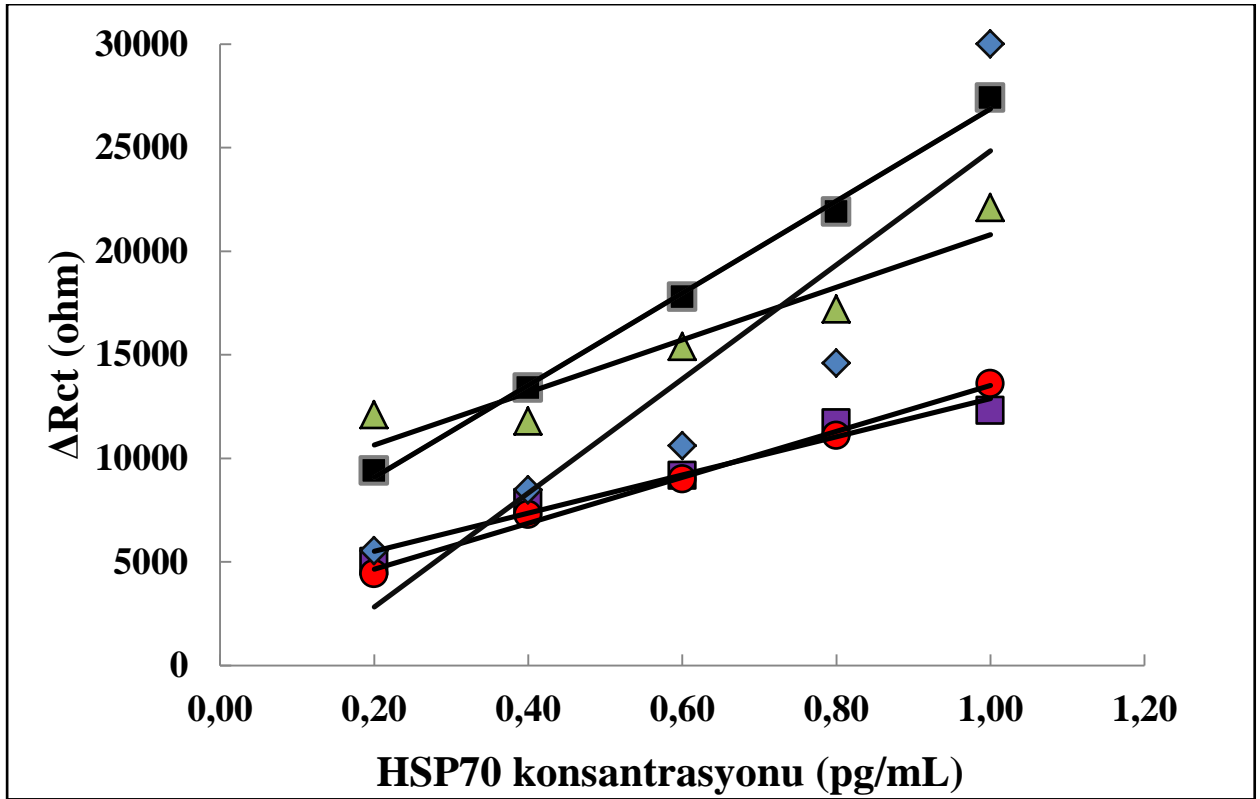
4.2 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1 Fulleren C₆₀ konsantrasyonunun belirlenmesi

Bu çalışmada HSP70 tayinine yönelik olarak geliştirilen fulleren C₆₀ temelli immünosensörünün, biyoaktif tabakasındaki fulleren C₆₀ konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, fulleren C₆₀ miktarının hazırlanan immünosensörün

aktivitesinin tayinini hangi düzeyde etkilediğini saptamaktır. Bu amaç doğrultusunda farklı konsantrasyonlarda (mg/mL) fulleren C₆₀ kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle HSP70'e ait standart grafikler oluşturulmuş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Buna ilişkin fulleren C₆₀ konsantrasyonları ile biyosensörlerin cevapları arasındaki ilişkiye ait standart grafikler Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

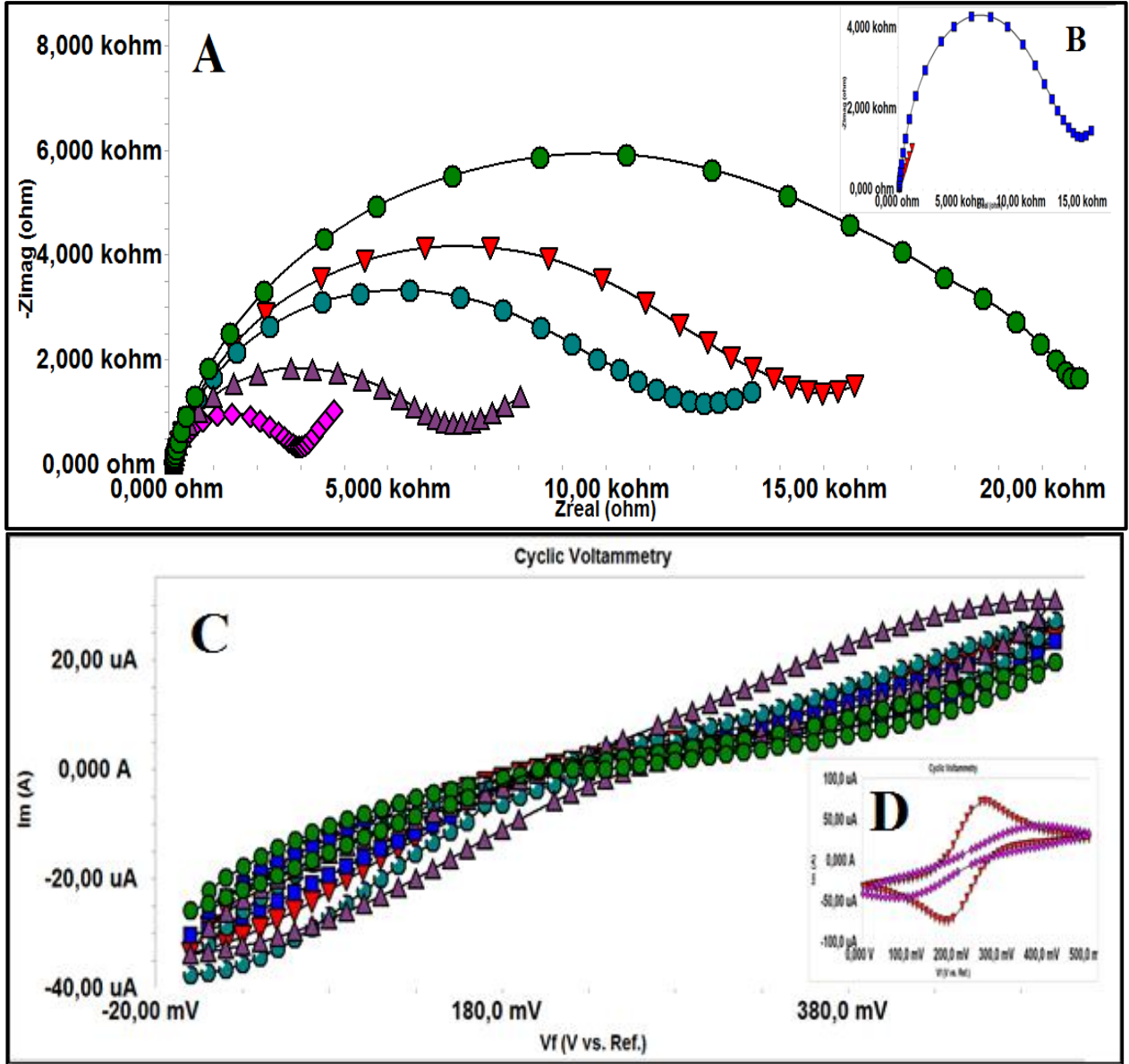
Yapılan bu çalışmalarda 5 farklı fulleren C₆₀ konsantrasyonu denenmiştir. Denenen konsantrasyonlar sırasıyla; 0,5 , 2 , 4 , 6 ve 8 mg /mL 'dir. İlk olarak 0,5 mg fulleren C₆₀ ile bir biyosensör oluşturulmuş ve oluşturulan bu biyosensörde düzensiz sinyaller elde edilmiştir. Bunun sebebi 0,5 mg/mL fulleren C₆₀ konsantrasyonunun elektrot yüzeyini iletken yapmada yetersiz kalması olarak açıklanabilir. Hassas bir biyosensör tasarlanırken çalışmanın düzensiz sinyallerden arındırılması istenir. 2 mg/mL fulleren C₆₀ ile biyosensör hazırlandığında matematiksel bir parametre olan R² değeri yüksek çıkmasına rağmen sinyallerin azaldığı görülmüştür. Bunun yanısıra elde edilen sinyallerin 4 mg/mL fulleren C₆₀ ile hazırlanan biyosensöre kıyasla azaldığı saptanmıştır. 6 mg/mL fulleren C₆₀ ile biyosensör hazırlandığında ise görülmüştür ki elde edilen sinyaller 2 mg/mL konsantrasyonundaki fulleren C₆₀ ile birbirine çok yakındır. Dolayısıyla 6 mg/mL konsantrasyonundaki fulleren C₆₀ kullanıldığında gerçekleşecek madde sarfiyatıda göz önünde bulundurulduğunda uygun bir miktar olarak seçilmemiştir. 8 mg/mL konsantrasyonundaki fulleren C₆₀ ile hazırlanan biyosensörde sinyallerin diğer 4 optimizasyona kıyasla en çok arttığını söylemek mümkündür. Ancak 4 mg/mL konsantrasyonundaki fulleren C₆₀ ile kıyaslandığında elde edilen sinyallerde çok fazla bir fark olmadığı ve yine harcanacak fulleren C₆₀ düşünüldüğünde ciddi bir madde sarfiyatı olacağı için seçilen konsantrasyon olmamıştır. 4 mg/mL konsantrasyonundaki fulleren C₆₀ biyosensörünün sinyallerine baktığımızda ise düzgün artışlar sonucu ortaya çıkmış bir standart grafik görülmektedir. Bunun yanısıra 0,5 ,2 ve 6 mg/mL konsantrasyonundaki fulleren C₆₀ ile kıyaslandığında daha yüksek sinyallere sahip olduğunu söyleyebiliriz. Optimizasyonu yapılan fulleren C₆₀ konsantrasyonlarının standart grafiklerinden elde edilen R² değerleri ve denklemleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Sonuç olarak doğrusal tayin aralığı, biyosensörün hazırlanma kolaylığı ve alınan sinyallerin büyüklüğünden dolayı en uygun fulleren C₆₀ konsantrasyonunun 4 mg/mL olmasına karar verilmiştir. Seçilen fulleren C₆₀ konsantrasyonuna ait EIS ve CV spektrumları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 3.Fulleren C₆₀ konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.mavi (-♦-♦-): 0,5mg/mL, mor (-■-■-) : 2mg/mL, yeşil (-▲-▲-) : 4mg/mL, kırmızı (-●-●-): 6mg/mL, siyah (-■-■-) : 8mg/mL

Tablo 4. 1 Fulleren C₆₀ konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R² leri ve denklemleri

Fulleren C ₆₀ konsantrasyonu (mg/mL)	R ²	Denklem
0,5	0,8194	y = 27535x - 2681
2	0,9639	y = 9215x + 3677
4	0,9027	y = 12700x + 8100
6	0,9944	y = 11090x + 2426
8	0,9965	y = 22250x + 4630

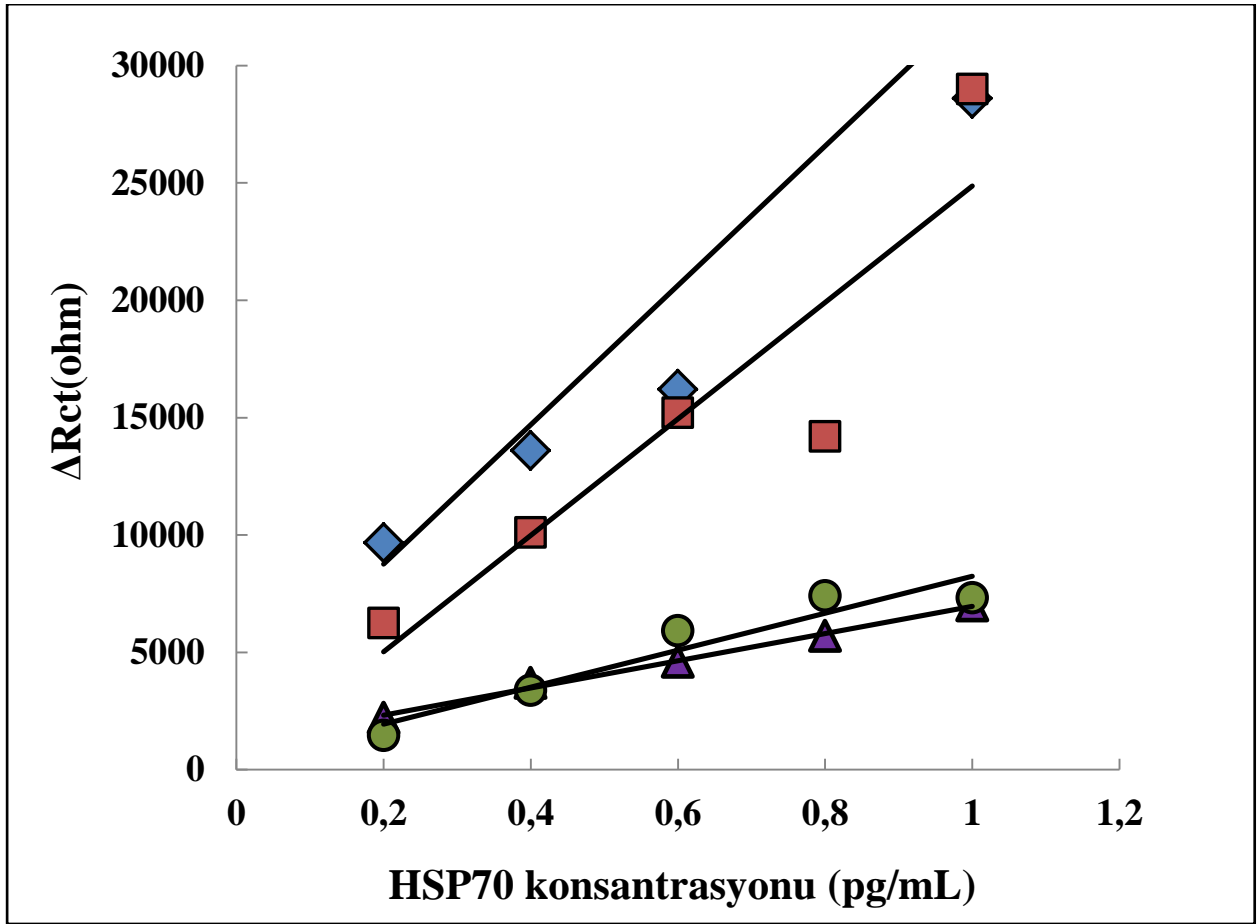


Şekil 4.4.Seçilen fulleren C_{60} konsantrasyonuna (4 mg/mL) ait EIS (A-B)ve CV(C-D) spektrumları. kırmızı(-▼-▼-): GCE, pembe (-◆-◆-): GCE/FULLEREN C_{60} ,mor(-▲-▲-):GCE/FULLEREN C_{60}/H_2SO_4 , turkuaz (-●-●-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4/EDC-NHS$, kırmızı(-▼-▼-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4 /EDC-NHS/Anti-HSP70$, lacivert (-■-■-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4 /EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA$, yeşil(-●-●-):GCE/FULLEREN/ $H_2SO_4 /EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA/HSP70$

4.2.2. Anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenmesi

Hassas bir biyosensör sistemi dizayn edebilmek için optimize edilmesi gereken önemli parametrelerden bir tanesinde antikor konsantrasyonudur. Bu optimizasyon, biyosensörün yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilbilirlik ölçütlere sahip olması yönünden de oldukça önemlidir. En uygun anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar doğrultusunda 4 farklı anti-HSP70 konsantrasyonu denenmiştir. Bu konsantrasyonlar sırasıyla 10, 20, 40 ve 80 µg/mL'dir. Her bir konsantrasyon hazırlanan anti-HSP70 çözeltilerinden elektrot yüzeyine eklenerek 1 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda elektrotların EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Buna ilişkin anti-HSP70 konsantrasyonları ile biyosensörlerin cevapları arasındaki ilişkiye ait standart grafikler Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

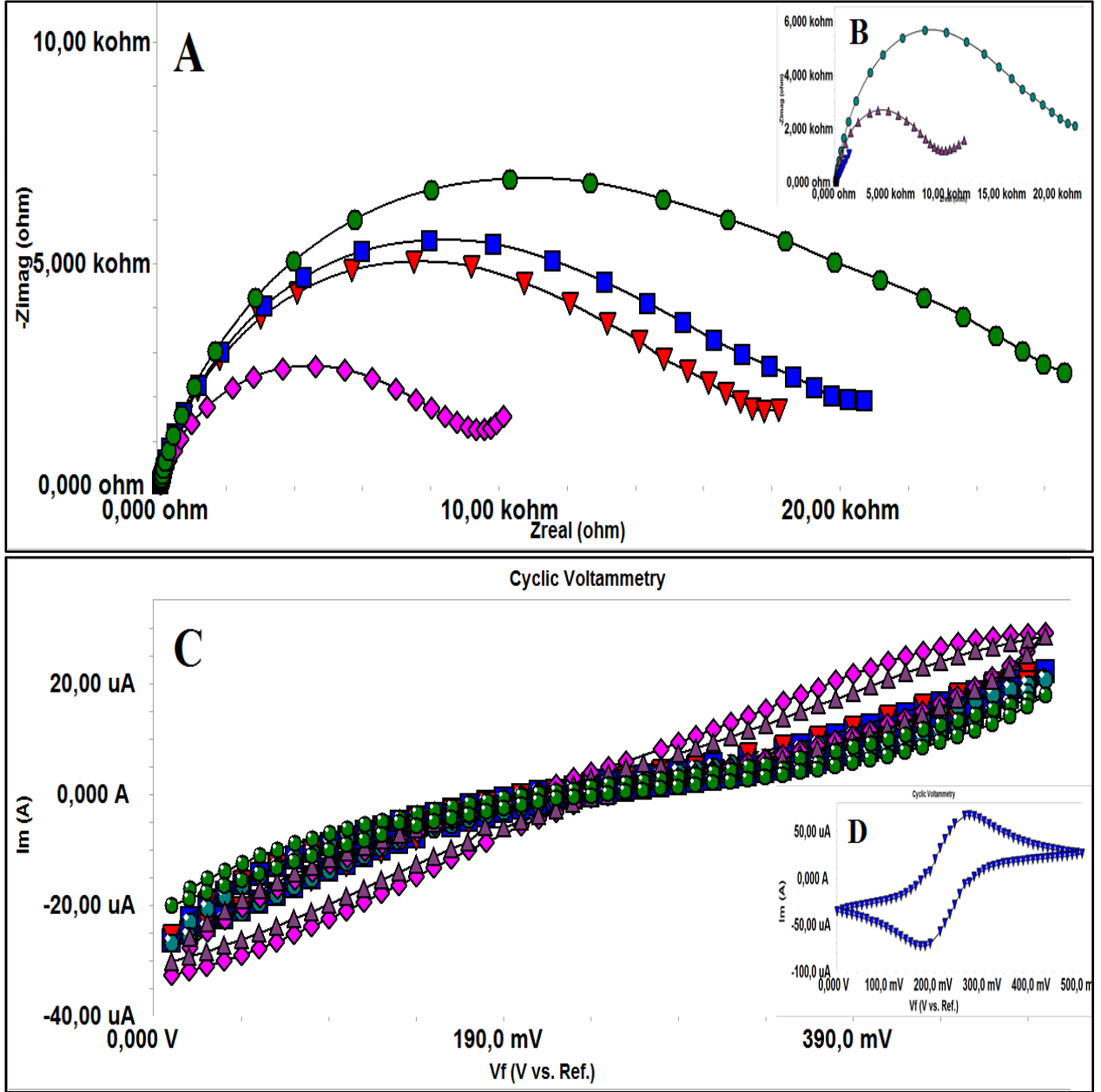
İlk olarak denenilen 10 µg/mL'lik anti-HSP70 konsantrasyonunda yüksek sinyaller elde edilmesine karşın tutarlı bir sinyal artışı gözlemlenmemiştir. Bunun bir sonucu olarak optimizasyonun standart grafiğini çizdiğimizde 0,7626 gibi düşük bir R^2 değeri hesaplanmıştır. Optimizasyonların R^2 değerleri ve denklemleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Denenen bir sonraki konsantrasyon 20 µg/mL'lik anti-HSP70 konsantrasyonudur. Bu optimizasyon çalışmasında da 10 µg/mL'lik anti-HSP70 optimizasyonundaki gibi yüksek ama tutarsız bir sinyal artışı gözlemlenmiştir. Biyosensörün en doğru ölçümleri yapabilmesi açısından oldukça önemli olan antikor optimizasyonunda sinyallerin birbirleriyle tutarlı olması beklenmektedir. Bu sebeple denenilen ilk 2 konsantrasyon en uygun anti-HSP70 konsantrasyonu olarak seçilmemiştir. Denenen diğer iki konsantrasyon sırasıyla 40 ve 80 µg/mL'dir. Antikor ekleme noktasında çok yüksek konsantrasyonlar istenmemektedir çünkü bağlanma yapılabilecek uç sayısı sınırlıdır. Buna karşın çok az konsantrasyonda antikor ile çalışıldığında da istenen sinyaller alınmamaktadır. Şekil 4.5'teki anti-HSP70 'in 40 ve 80 µg/mL'lik konsantrasyonları sonucu çizilen standart grafikleri verilmiştir. Burada da görülüyor ki 2 konsantrasyon arasında çok fazla bir sinyal farkı olmamıştır. Bunun yanısıra 40 µg/mL'lik konsantrasyonun 80 µg/mL'lik konsantrasyona kıyasla daha yüksek bir R^2 değerine sahip olması ve antikor sarfiyatı açısından da daha avantajlı olması sebebiyle en uygun anti-HSP70 konsantrasyonu 40 µg/mL olarak seçilmiştir. Seçilen anti-HSP70 konsantrasyonuna ait EIS ve CV spektrumları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil.4.5.En uygun Anti-HSP70 konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.mavi (-♦-♦-): 10 μg/mL,pembe (-■-■-): 20 μg/mL mor (-▲-▲-): 40 μg/mL, yeşil (-●-●-):80 μg/mL

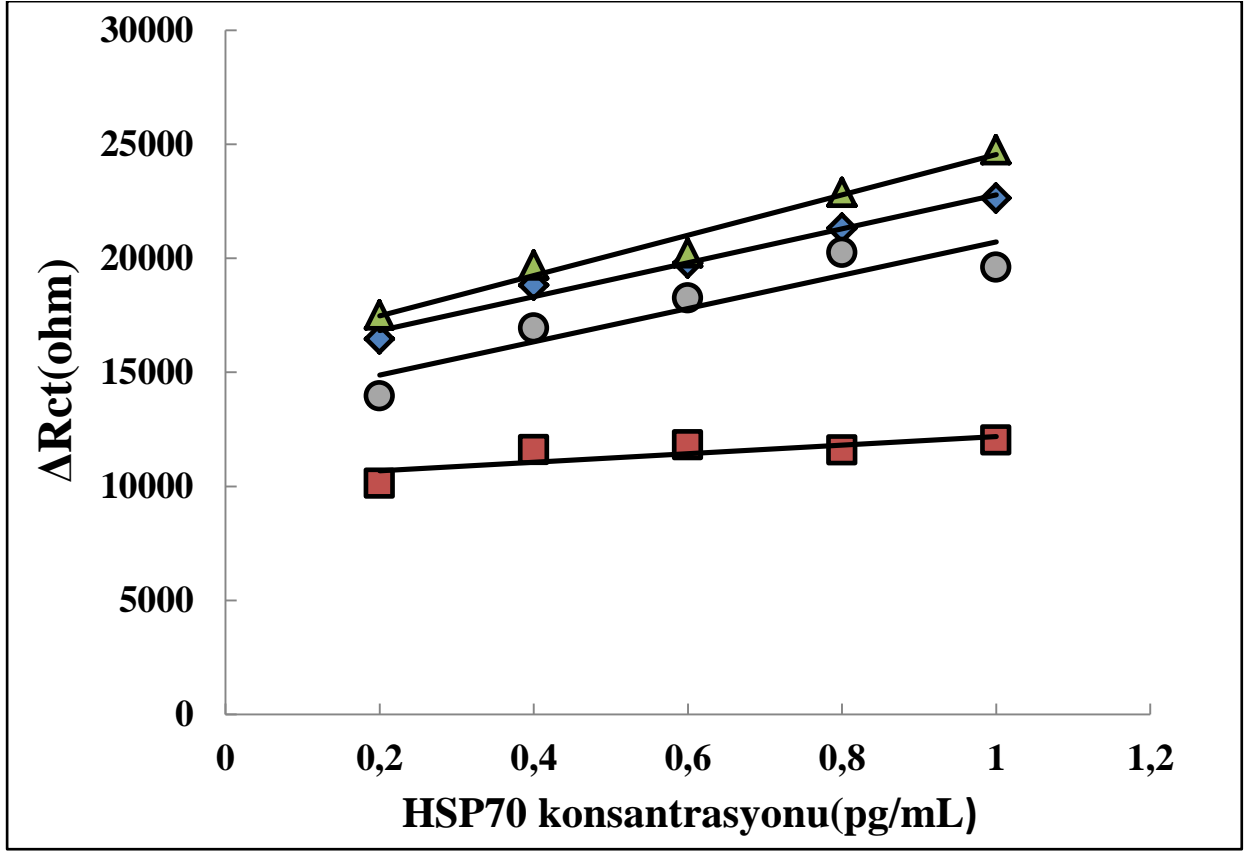
Tablo 4. 2 Anti-HSP70 konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R² leri ve denklemleri

Anti-HSP70 konsantrasyonu (μg/mL)	R ²	Denklem
10	0,7626	y = 29680x + 2826
20	0,8279	y = 24810x + 62
40	0,9944	y = 5800x + 1160
80	0,9141	y = 7880x + 366



4.2.3. Anti-HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu

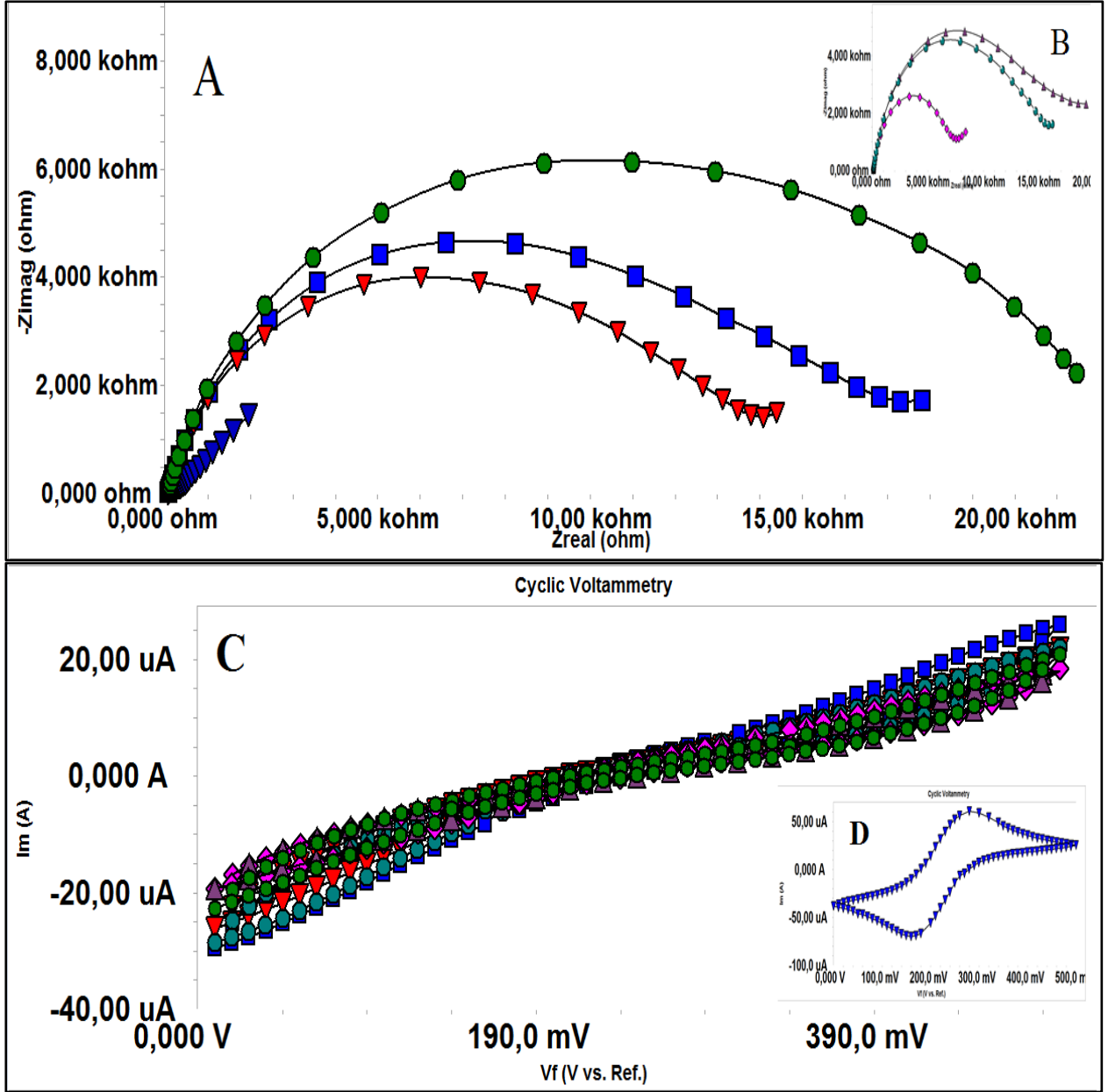
Anti-HSP70 konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, antikorun hem yüksek verimde hem de en elverişli zaman aralığında yüzeye immobilizasyonunu belirleyebilmek için inkübasyon süre optimizasyonu yapılmıştır. 4 farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Bunlar sırasıyla; 30,45,60 ve 90 dakikadır. Belirtilen bu sürelerde yüzeye immobilize edilen anti-HSP70, ultra saf su da yıkanıp saf argon altında dikkatlice kurutulduktan sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümler sonucunda elde edilen standart grafikler Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Standart grafikler incelendiğinde 30 dakikalık inkübasyon süresinde sinyallerin oldukça azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebi düşük zaman dilimlerinde antikorun yüzeye yeterince immobilize olamadığı ve dolayısıyla biyomarkerın ölçümlerinde net sonuçlar veremediği olarak açıklanabilir. 45 dakikada sinyallerin 30 dakikaya göre daha çok artması da bu açıklamayı destekler. Düşük zaman dilimlerinde antikorun yüzeye yeterince bağlanmamasının yanısıra çok yüksek sürelerde de protein-protein etkileşimlerinden kaynaklı bozulmalar meydana gelmesinde sinyal artışını olumsuz yönde etkiler. 90 dakikalık inkübasyon süresindeki sinyallerin 60 dakikadakilere göre daha düşük olmasını bu şekilde yorumlayabiliriz. 45 dakika ve 60 dakikalık inkübasyon süreleri kıyaslandığında ise sinyal artışlarında çok fazla bir fark olmaması ve çalışmada zaman tasarrufu açısından pozitif bir yöne sahip olması açısından en uygun inkübasyon süresi 45 dakika olarak seçilmiştir. Seçilen inkübasyon süresine ait EIS ve CV spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 7. Anti-HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu. pembe (-■-■-): 30 dakika, gri (-●-●-):45 dakika , yeşil (-▲-▲-): 60 dakika, mavi (-◆-◆-): 90 dakika

Tablo4.3. Anti-HSP70'in inkübasyon süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 'leri ve denklemleri

Anti-HSP70 Süre Optimizasyonları (dk)	R^2	Denklem
30	0,6289	$y = 1880x + 10306$
45	0,8541	$y = 7300x + 13420$
60	0,9728	$y = 8835x + 15715$
90	0,9822	$y = 7435x + 15341$

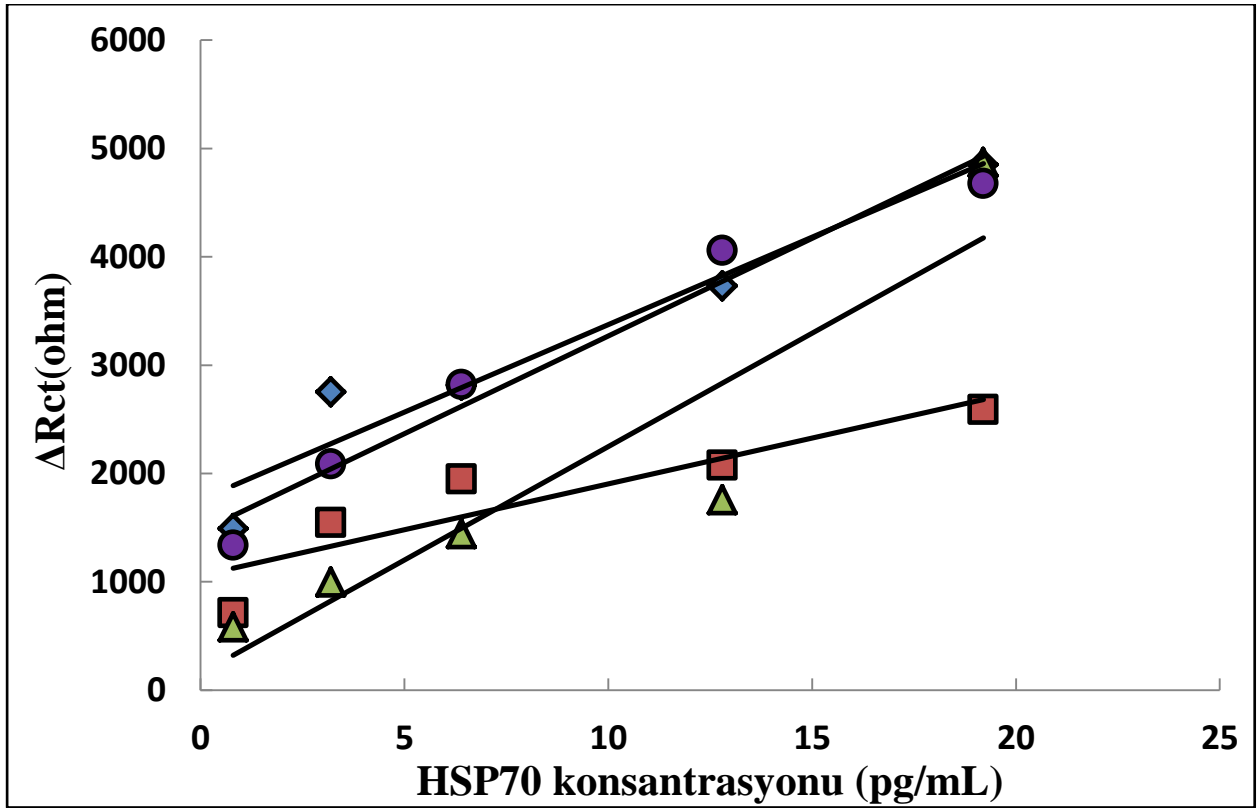


Şekil 4. 8.Seçilen Anti-HSP70 süre optimizasyonuna (45dk) ait EIS (A-B) ve CV (C-D) spektrumları. mavi(-▼-▼-): GCE, pembe (-◆-◆-): GCE/FULLEREN C₆₀,mor(-▲-▲-):GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄, turkuaz (-●-●-):GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS, kırmızı(-▼-▼-):GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄ /EDC-NHS/Anti-HSP70, lacivert (-■-■-):GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄ /EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA , yeşil(-●-●-):GCE/FULLEREN/H₂SO₄ /EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA/HSP70

4.2.4. HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu

HSP70 için en uygun konsantrasyon belirlendikten sonra HSP70 biyomarkerının tayinininde optimal süreyi bulmak adına inkübasyon süresi optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma doğrultusunda 4 farklı inkübasyon süresi denenmiştir. Bu inkübasyon süreleri sırasıyla 30, 45, 60 ve 90 dakikadır. Denenen bu sürelerle ait standart grafikler Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. İlk olarak 30 dakikalık inkübasyon süresi optimizasyonu yapılmıştır. Yapılan optimizasyon sonucunda da standart grafikte de görüldüğü gibi oldukça yüksek ve düzenli sinyaller gözlemlenmiştir. Bunun aksine bundan sonra denenen diğer 3 sürede de (45,60 ve 90 dakika) sinyallerin azaldığı ve buna bağlı olarak daha düşük R^2 değerlerinin elde edildiği gözlemlenmiştir. Optimizasyonların R^2 değerleri ve denklemleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

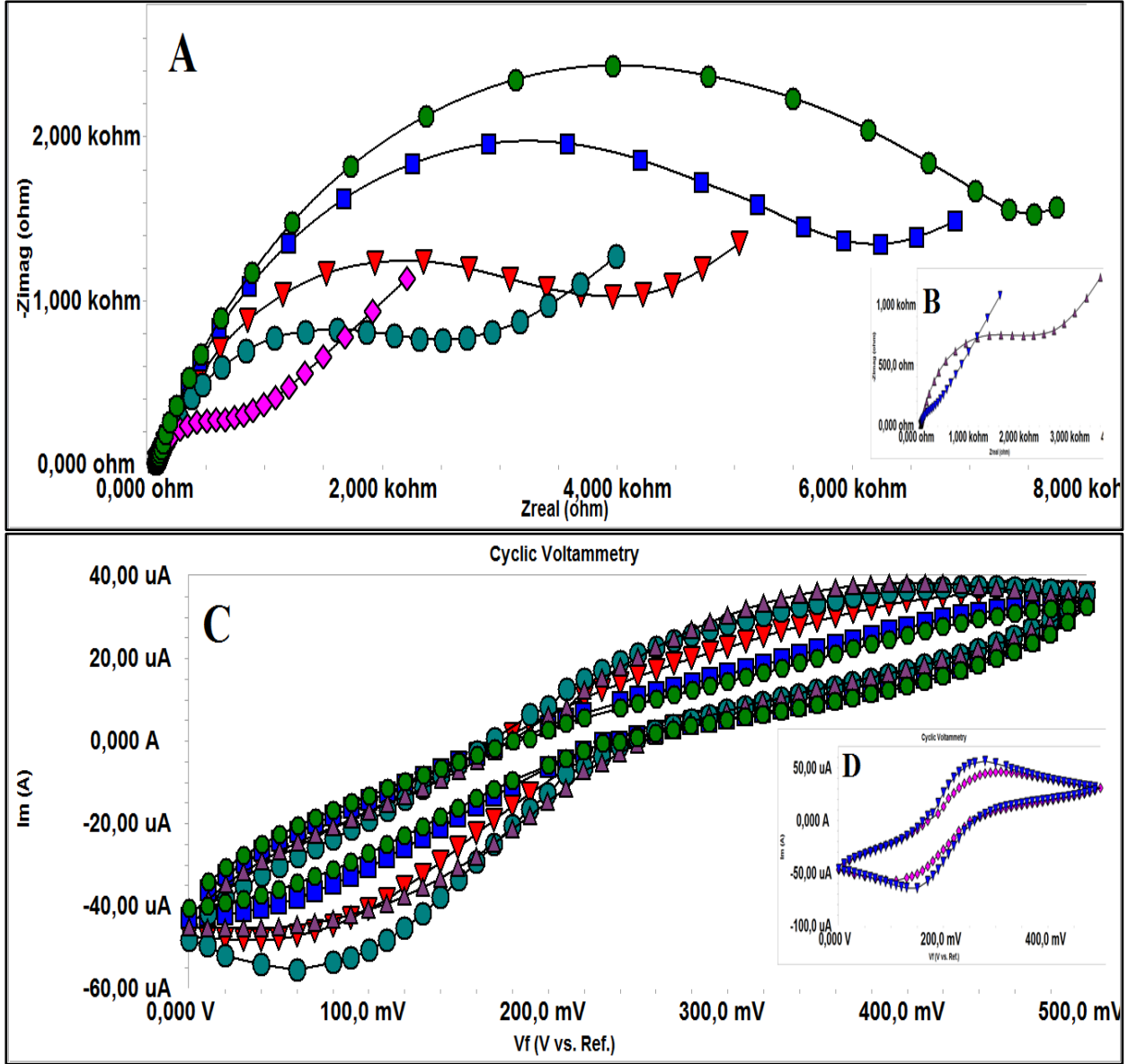
45 ve 60 dakikalık denemelerde sinyallerin 30 ve 90 dakikaya göre çok daha düşük olması sebebiyle en uygun HSP70 inkübasyon süresi olarak seçilmemiştir. 30 ve 90 dakikalık inkübasyon sürelerini kıyasladığımızda ise sinyallerin birbirlerine çok yakın oldukları görülmektedir. Buna bağlı olarak impedans sinyalleri arasında çok fazla bir fark olmaması ve çalışma sırasındaki zaman tasarrufunda göz önünde bulundurulduğunda HSP70 için en uygun inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Seçilen HSP70'in inkübasyon süre optimizasyonuna ait EIS ve CV spektrumları Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 9. HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonu. mor (-●-●-):30 dakika, pembe (-■-■-) : 45 dakika, yeşil (-▲-▲-): 60 dakika, mavi (-◆-◆-): 90 dakika

Tablo 4. 4 HSP70'in inkübasyon süresi optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

HSP70 Süre Optimizasyonları (dk)	R^2	Denklem
30	0,9657	$y = 180,3x + 1466,1$
45	0,821	$y = 84,639x + 1056,9$
60	0,8492	$y = 209,33x + 154,49$
90	0,9369	$y = 161,53x + 1757,4$

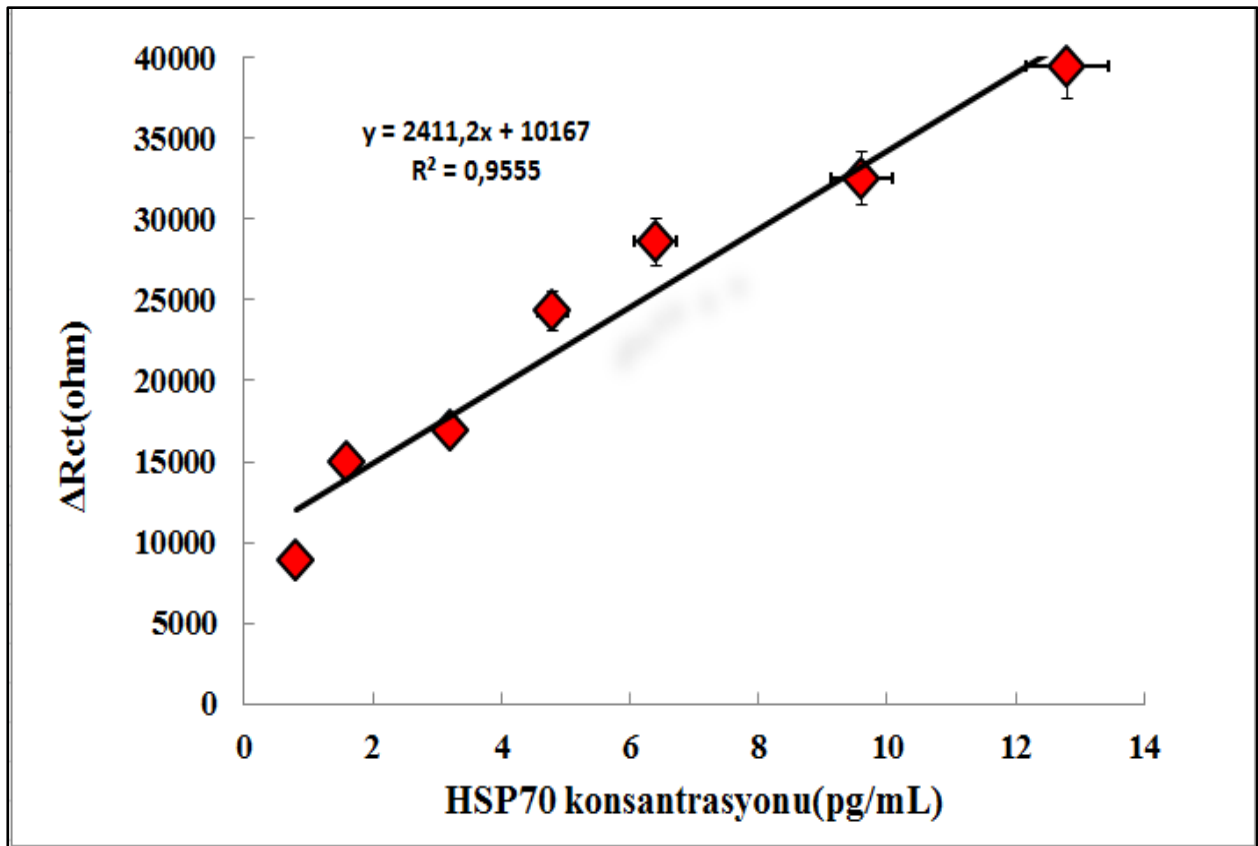


Şekil 4. 10. Seçilen HSP70'in inkübasyon süre optimizasyonuna (30dakika) ait EIS (A-B) ve CV (C-D) spektrumları. mavi(-▼-▼-): GCE, pembe (-◆-◆-): GCE/FULLEREN C_{60} ,mor(-▲-▲-):GCE/FULLEREN C_{60}/H_2SO_4 , turkuaz (-●-●-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4/EDC-NHS$, kırmızı(-▼-▼-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4 /EDC-NHS/Anti-HSP70$, lacivert (-■-■-):GCE/FULLEREN $C_{60}/H_2SO_4 /EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA$, yeşil(-●-●-):GCE/FULLEREN/ $H_2SO_4 /EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA/HSP70$

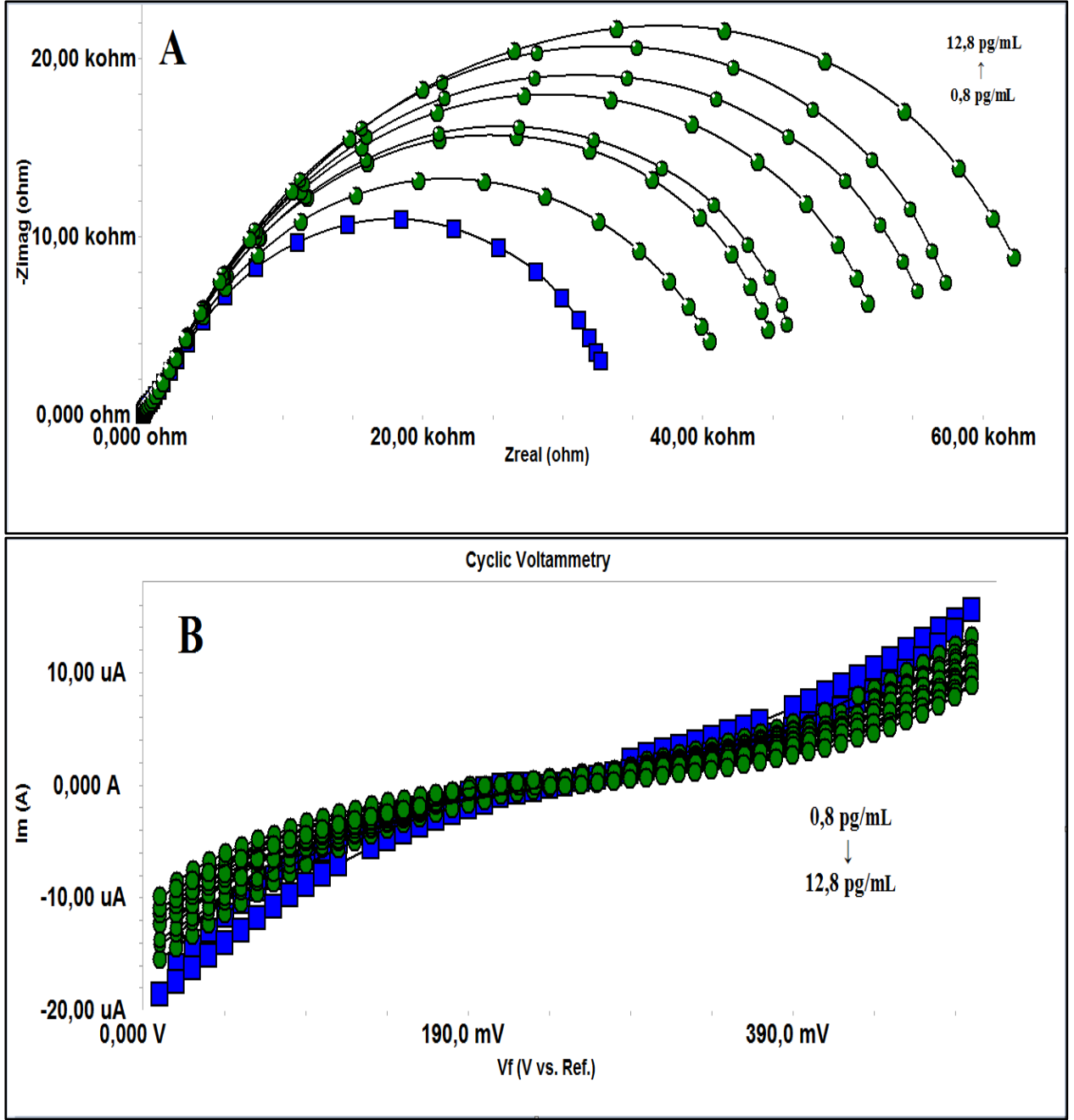
4.3. Biyosensörün Analitik Çalışmaları

4.3.1. Biyosensörün kalibrasyon grafiği

Optimizasyon çalışmaları tamamlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Buna göre tasarlanan bu biyosensörün HSP70 biyomarkeri için lineer tayin aralığı 0,8 pg – 12,8 pg/mL , LOD (Tayin Limiti) 0,000273 pg/mL, LOQ (Ölçüm Limiti) ise 0,0000912 pg/mL olarak belirlenmiştir. Şekil 4.11’ de ise optimize edilmiş ve tayin aralığı 0,8 pg – 12,8 pg/mL olan, Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün kalibrasyon grafiği görülmektedir. Şekil 4.12’de ise optimal şartlardaki biyosensör sisteminin EIS spektrumu ve CV voltamogramı gösterilmiştir.



Şekil 4. 11. Optimal şartlardaki Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün kalibrasyon grafiği grafiği



Şekil 4.12. Tasarlanan biyosensörün artan HSP-70 konsantrasyonu ile elde edilen EIS (A) spektrumu ve CV (B) voltamogramı. mavi (-■-■-): GCE/FULLEREN_{C60}/H₂SO₄/EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA, yeşil (-●-●-): GCE/FULLEREN_{C60}/H₂SO₄/EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA/HSP70

4.3.2. Biyosensörün Tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik ideal bir biyosensör için son derece önemli karakterize edici bir parametredir. Karakteristik özellikleri çok ayrıntılı bir şekilde bilinen bir biyomarker kullanılması durumunda bile sensör hazırlama aşamaları, çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde oldukça büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu nedenle her ne şekilde olursa olsun hazırlanan biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti aynı bir örnekte ardarda ölçüm yapılması ve elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıdır. 4,8 pg/mL'lik HSP70 standart çözeltisine ilişkin elde edilen istatistiksel veriler; ortalama değer, 4,92 pg/mL, standart sapma $\pm 0,22$ pg/mL ve varyasyon katsayısı ise % 4,47 olarak hesaplanmıştır.

4.3.3. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği

Yeni bir biyosensör geliştirildikten sonra incelenmesi gereken en önemli karakteristik özelliklerinden bir tanesi de o biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin ne düzeyde standart olabildiğidir. Üretilen biyosensörün, doğru, güvenilir ve aynı standartta tekrar tekrar üretilebilmesi beklenir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün Tablo 4.5'de ise elde edilen R^2 değerleri ve denklemleri gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre aşağıdaki tabloda verilen doğru denklemleri kullanılarak, eğim ve intercept verilerine ilişkin bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalara göre elde edilen doğru denklemlerinin intercept ve eğilimlerine ilişkin RSD değerleri sırasıyla; % 1.34 ve % 1.46'dır.

Tablo 4. 5 Biyosensörün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R² leri ve denklemleri

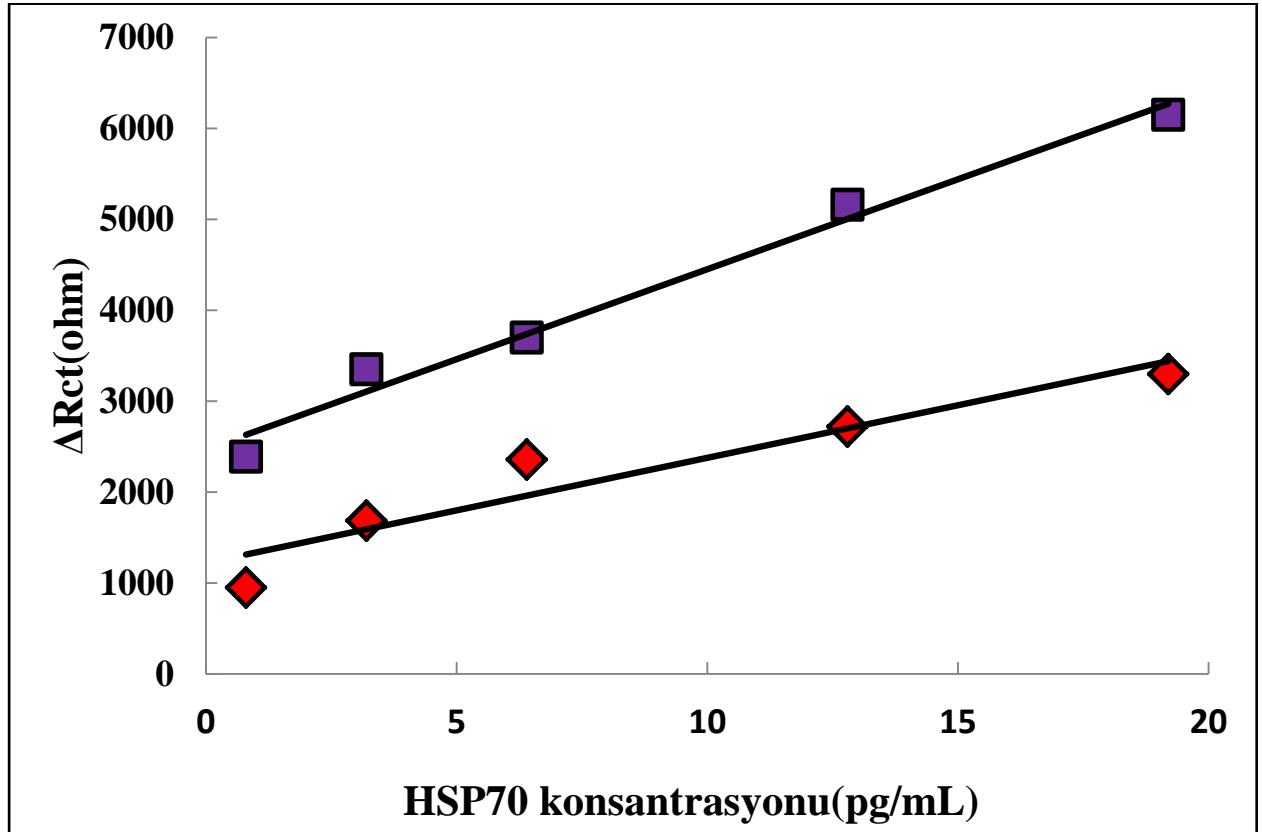
Tekrar üretilebilirlik	R ²	Denklem	Aralık (pg/mL)
1	0,9876	y = 140,17x + 891,99	0,8 – 12,8
2	0,9728	y = 328,89x + 2392,9	0,8 – 12,8
3	0,967	y = 420,49x + 2518,1	0,8 – 12,8
4	0,9651	y = 366,05x + 2583,9	0,8 – 12,8
5	0,9636	y = 153,18x + 744,27	0,8 – 12,8
6	0,9402	y = 190,72x + 1484,7	0,8 – 12,8
7	0,9365	y = 385,39x + 2961,10	0,8 – 12,8
8	0,8966	y = 269,33x + 3052,1	0,8 – 12,8
9	0,8771	y = 365,38x + 3339,6	0,8 – 12,8
10	0,8767	y = 265,36x + 3427,7	0,8 – 12,8
11	0,8196	y = 258,48x + 2504,1	0,8 – 12,8

4.3.4. Anti-HSP70 Temelli HSP70 Biyosensörünün Geliştirilmesinde Fulleren C₆₀'ın Rolü

Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün dizaynında SAMs olarak kullanılan fulleren C₆₀ 'ın hassas bir biyosensör sistemi geliştirilebilmesindeki rolünü anlamak için yapılan bütün işlemler fulleren C₆₀ olmadanda yapıldı. Böylelikle tüm optimizasyon basamakları tamamlanmış olan HSP70 biyosensöründeki fulleren C₆₀ 'ın camı karbon elektrot yüzeyinde gerçekleştirdiği karakterizasyonu incelendi. Bu işlem sonucunda fulleren C₆₀ kullanılarak yapılan çalışmadan elde edilen standart grafik ile fulleren C₆₀ kullanılmadan yapılan çalışmadan elde edilen standart grafik kıyaslandı. Şekil 4.13'de de görüldüğü gibi fulleren C₆₀ varlığında biyosensör impedans ölçümlerinde yüksek sinyal artışı gözlemlenmiştir. Fulleren C₆₀ kullanılmadığında ise oldukça düşük sinyaller elde edilmiştir. Buna bağlı olarak SAMs olarak kullanılan fulleren C₆₀'ın elektrot yüzeyine iletken bir yapı kazandırarak daha çok anti-HSP70 ve HSP70 bağlanmasını sağladığını söyleyebiliriz. Bu çalışmaya ait elde edilen R² değerleri ve denklemleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4. 6 Fulleren C₆₀ karakterizasyonuna ait standart grafiklerinin R² leri ve denklemleri

Fulleren C ₆₀	R ²	Denklem
Var	0,9824	y = 197,89x + 2471,9
Yok	0,9036	y = 115,71x + 1219,2

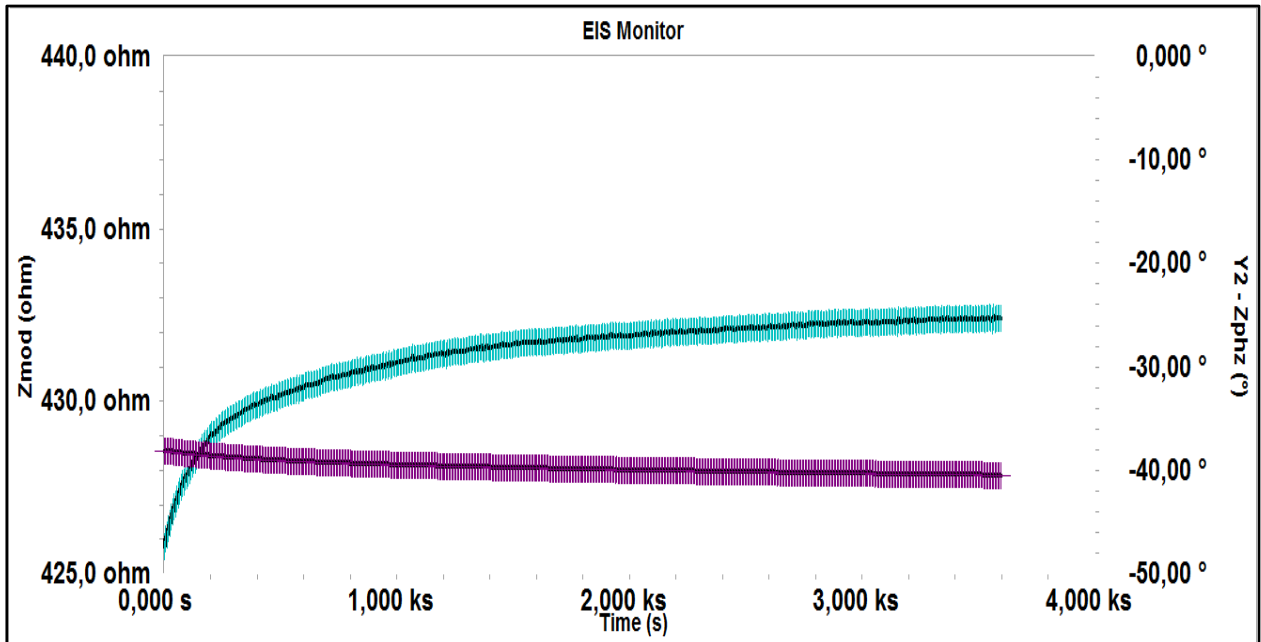


Şekil 4. 13. Fulleren C₆₀ varlığında ve yokluğunda geliştirilen HSP70 biyosensörüne ait standart grafik. mor (-■-■-) : fulleren C₆₀ varlığında standart grafik ,kırmızı (-◆-◆-): fulleren C₆₀ olmadan elde edilen standart grafik

4.3.5. Sabit frekansta impedans ölçümleri

Anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörünün değerlendirilmesi ve karakterizasyonu için single frequency tekniği kullanıldı. Bu teknik biyosensör yüzeyinde meydana gelen zamana bağlı değişiklikleri açıklığa kavuşturabilen bir tekniktir. Zamana karşı sabit bir frekansın ölçümüne

dayanan bu yöntem sayesinde zaman dilimlerinde ve toplam zamanda meydana gelen impedans değişimleri kontrol edilebilmektedir. Bu amaç doğrultusunda 1200 Hz sabit frekans ile impedans ölçümü zamanın ve faz açısının fonksiyonları olarak ölçüldü. Şekil 4.15 sabit frekanstaki EIS spektrumunu göstermektedir. 48 ng/mL 'lik HSP70 konsantrasyonu ile , 1 saat ve 1200 Hz sabit frekansla pH 'ı 7 olan fosfat tamponunda impedans ölçümü alındı. Şekil 4.14'de de görüldüğü gibi bu çalışma bize aynı zamanda antikor – antijen etkileşiminin kinetik bağlanmasıyla ilgili çok önemli bilgiler vermektedir. Başlangıçta artan, zamanın bir fonksiyonu olarak impedanstaki değişimi ifade eden mavi eğri yaklaşık 30 dakikadan sonra sabitleşmiştir. Sabitleşen bu eğri doyumluğa ulaşan HSP70'e aittir. Bu sonuç en uygun HSP70 inkübasyon süresinin 30 dakika olarak seçilmesinide destekleyen bir sonuçtur.

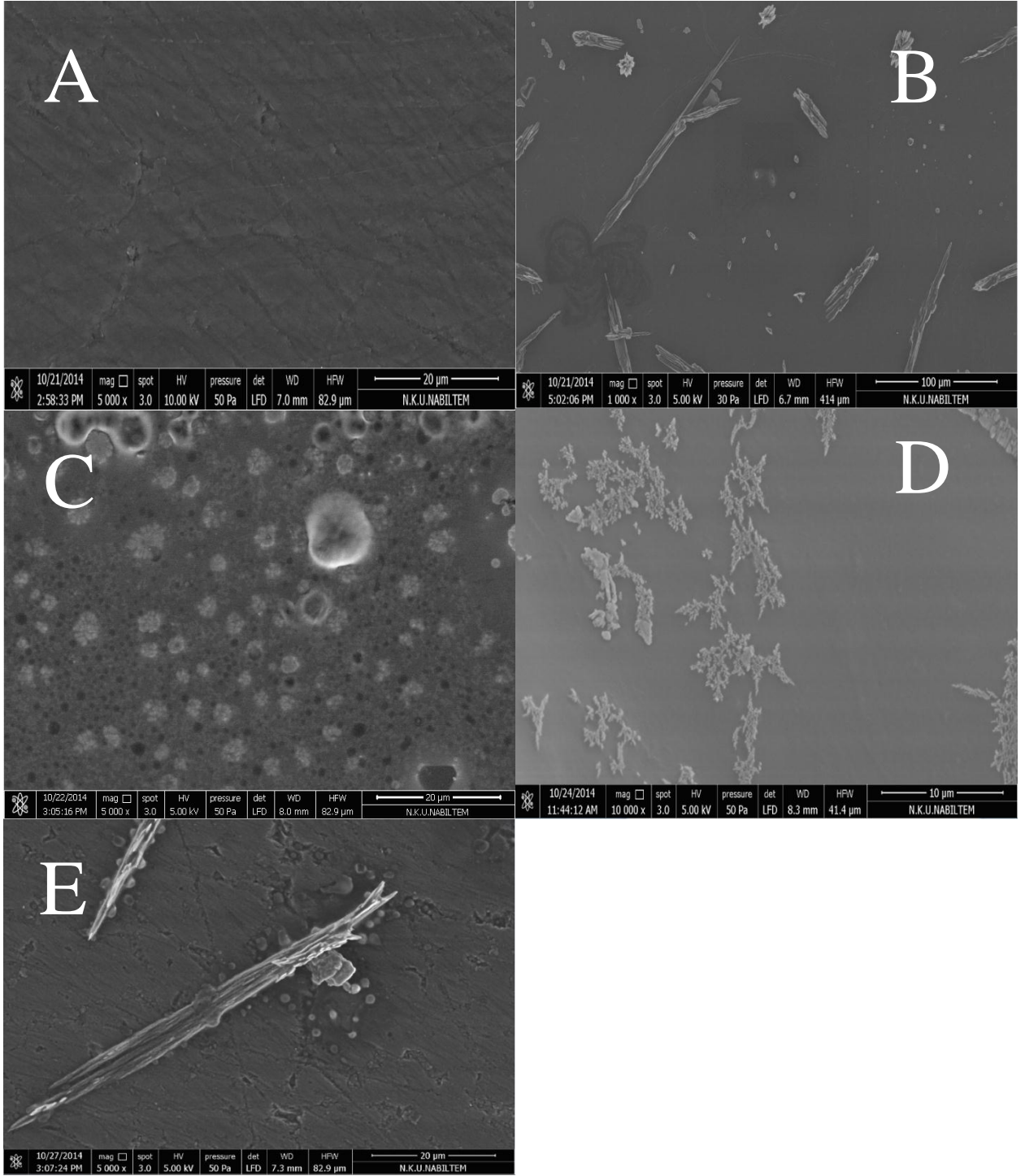


Şekil 4. 14. Anti-HSP70 temelli biyosensöre HSP70 bağlanmasının gerçek zamanlı ve tek frekansta yapılan single frequency ölçümü

4.3.6. Fulleren C₆₀ Temelli Anti-HSP70 Biyosensörün SEM Görüntüleri

Geliştirilen biyosensörün tüm optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra SEM görüntüleri alındı. Alınan bu biyosensör yüzeyine ait SEM görüntüleri Şekil 4.15'de gösterilmektedir. A'da camsı karbon elektrodun hiçbir işlem yapılmamış temiz yüzeyi görülmektedir. B'de ise yüzeydeki fulleren C₆₀ ile oluşturulan SAMs tabakası görülmektedir. C'de anti-HSP70 molekülleri net bir şekilde görülmektedir. D'de yüzeyde anti-HSP70

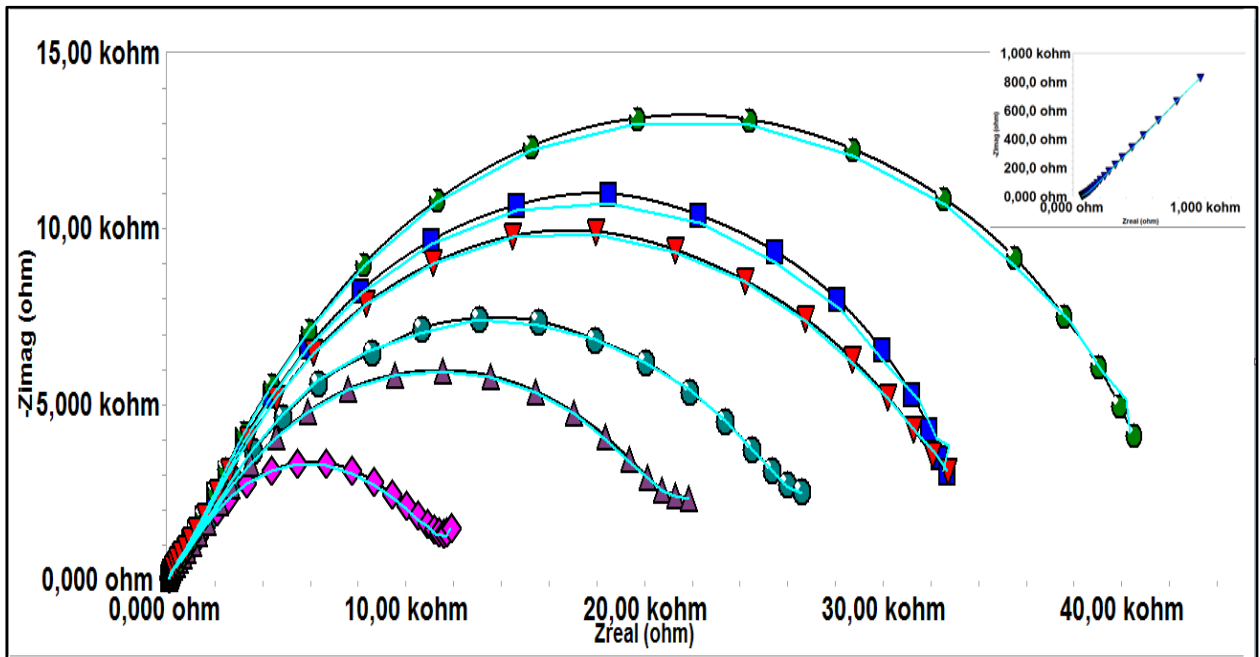
moleküllerinin yanı sıra farklı olarak yüzeydeki aktif uçların kapanması için kullanılan BSA moleküllerinin yüzeye bağlanması görülmektedir. Son olarak E'de ise camı karbon elektrot yüzeyinde anti-HSP70 molekülleri ile etkileşime giren HSP70 molekülleri oldukça net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4. 15. GCE yüzeyindeki SEM görüntüleri: A (5000 kat büyütülmüş), temiz GCE; B (1000 kat büyütülmüş), GCE/FULLEREN C₆₀; C (5000 kat büyütülmüş), GCE/FULLEREN C₆₀/anti-HSP70; D (10,000 kat büyütülmüş), GCE/FULLEREN C₆₀/anti-HSP70/BSA; E (5000 kat büyütülmüş), GCE/FULLEREN C₆₀/anti-HSP70/BSA/HSP70

4.3.7. Anti-HSP70 Temelli Biyosensörün Kramers-Kronig Sonuçları

Kramers-Kronig transformu, geliştirilen biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kullanılır. Bu yöntem elektrokimyasal impedans spektroskopisinin yorumlanması ve analizi için oldukça önemlidir (Orazem ve ark. 2008). Kramers-Kronig ilişkileri elektrokimyasal sistemlere, denklemlerin doğrudan entegrasyonu, kararlılık ve lineerliğin deneysel gözlemlenmesi, spesifik elektrik devre modellerinin regresyonu ve oluşan ölçüm modellerinin regresyonuyla uygulanmaktadır (Huang ve ark. 2007). Kramers-Kronig ilişkilerinin doğrudan entegrasyonu, impedansın bir bileşeninden diğerinin hesaplanmasını içerir. Ölçülen impedansın sanal bileşeninden gerçek bileşenin hesaplanması bunun bir örneğidir. Sonrasında sonuçlar elde edilen deneysel verilerle kıyaslanır (Orazem ve ark. 2008). Bu tez çalışmasında da anti-HSP70 temelli biyosensörün Kramers-Kronig transformu Şekil 4.16’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Tasarlanan biyosensörün Kramers-Kronig sonuçları. mavi(-▼-▼-): GCE, pembe (-◆-◆-): GCE/FULLEREN C₆₀, mor(-▲-▲-): GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄, turkuaz (-●-●-): GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS, kırmızı(-▼-▼-): GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS/Anti-HSP70, lacivert (-■-■-): GCE/FULLEREN C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA, yeşil(-●-●-): GCE/FULLEREN/H₂SO₄/EDC-NHS/Anti-HSP70/BSA/HSP70

Şekil 4.16'daki impedans spektrumlarından elde edilen Kramers-Kronig transformunun fit değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7 Anti-HSP70 temelli biyosensörün farklı aşamalarında Kramers-Kronig transformu

Biyosensör Yüzeyi	Fit değerleri
GCE	15,53
GCE/ Fulleren C ₆₀	41,83
GCE/ Fulleren C ₆₀ /H ₂ SO ₄	4,563
GCE/ Fulleren C ₆₀ /EDC-NHS	544,4
GCE/ Fulleren C ₆₀ /Anti-HSP70	2,787
GCE/ Fulleren C ₆₀ /Anti-HSP70/BSA	42,75
GCE/ Fulleren C ₆₀ /Anti-HSP70/BSA/HSP70	13,95

4.3.8. Biyosensörün gerçek örnekler üzerine uygulanabilirliğinin incelenmesi

Yüksek lisans tez çalışmasının son bölümünde geliştirilen anti-HSP70 temelli HSP70 biyosensörü hem yapay serum örneklerine hem de gerçek serum örneklerinde denenmiştir. Bu çalışmalara ilişkin elde edilen bulgular Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8 Serum örneklerinde HSP70 analizi (pg/mL HSP70)

Yapay serum örneklerinde HSP70 analizi (pg/mL HSP70)					
<i>İlave edilen</i>	<i>Bulunan</i>	<i>%Geri kazanım</i>	<i>%Hata</i>		
8	7.66	95.75	4.25		
Gerçek insan serum örneklerinin HSP70 analizi (pg/mL HSP70)					
<i>Örnek</i>	<i>Biyosensörle bulunan</i>	<i>İlave edilen HSP70</i>	<i>Total bulunan</i>	<i>%Hata</i>	<i>% Bağlı Hata</i>
1	4.34	3.2	7.84	104	4

5. SONUÇ

Araştırmalar, son yıllarda dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakasının bulunduğunu gösteriyor. Türü ne olursa olsun, kişinin ve yakın çevresinin tüm hayatına etki eden, bu çok zorlu ve yıpratıcı hastalıkta “**erken teşhis**” bazı durumlarda ölümle yaşam arasındaki mutlak sonucu değiştirebilmektedir. Kanserde erken teşhis, uygulanacak tedavinin başarısı ve yaşama şansının artması bakımından hayati önem taşımaktadır. Bu sebeple hassas ve spesifik teşhis yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir. Biyomarkerlerin kan, idrar , tükürük gibi vücut sıvılarında analizi ile geliştirilen yöntemler, kanser teşhisi için çeşitli yöntemler sunmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilen biyomarker HSP70 (ısı şok protein) dir. Bu Isı şok proteinler hücrel stres cevaplarının moleküler işaretleyecileridirler ve protein katlanması, agregasyon, taşınma ve stabilizasyon da önemli görevleri mevcuttur. Literatür bilgileri strese bağlı olarak vücutta artış gören bu biyomarkerin özellikle idrar kesesi kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, meme kanseri, endometriyal kanser ve karaciğer kanseri gibi pek çok kanser türüyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu potansiyel biyomarkerin, pratik yöntemler erken teşhisi günümüzün en büyük tehdidi olan kanser tedavisinin erken tanısında kolaylık ve üstünlük sağlamada umut vadecidir.

Yapılan bu çalışma günümüzün en büyük problemi olan kanser hastalığının erken tanısında rol oynayacak kanser biyomarkerlerinin tayinine yönelik bir biyosensör geliştirilmesini hedeflemiştir. Bu hedef biyosensör teknolojilerine pek çok kanser türünün başka biyomarkerlarla ve tekniklerle koordineli bir şekilde teşhisinde kolaylık ve üstünlük sağlayacaktır. Yapılan tez çalışmasın anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik bir biyosensör geliştirilmiştir. Hassas bir HSP70 biyosensörü dizayn edebilmek için biyosensörün immobilizasyon aşamasındaki her bir adım için optimizasyon yapılmıştır. Yapılan bu optimizasyonlar sonucu belirlenen değerler Tablo 5.1 ‘de verilmiştir.

Tablo 5. 1 Anti-HSP70 temelli biyosensörün seçilen en uygun optimizasyon değerleri

Optimizasyonlar	Seçilen değerler
Fulleren C ₆₀ konsantrasyonu	4 mg/mL
Anti-HSP70 konsantrasyonu	40 µg/mL
Anti-HSP70 inkübasyon süresi	45 dakika
HSP70 inkübasyon süresi	30 dakika
Tayin aralığı	0,8 pg – 12,8 pg/mL

Geliştirilen biyosensörün elektrokimyasal impedans spektroskopisi karakterizasyonu da yapıldı ve çalışma neticesinde ürettiğimiz biyosensör sistemi gerçek örneklerle uygulandı. Elde edilen sonuçlar, kullanılan biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğinin mevcut olduğunu ve ileriki çalışmalarda da bu özelliğinin kullanılabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında Anti-HSP70 temelli HSP70 tayinine yönelik geliştirilen biyosensör başka yöntemlerle belirlenen HSP70 in tayin aralıklarıyla kıyaslanmıştır ve sonuçlar Tablo 5.2 de verilmiştir.

Tablo 5.2 HSP70 'in başka yöntemlerle belirlenen tayin aralıkları

Metot	Ölçüm prensibi	Belirlenen aralık	Referanslar
ELİZA	Ticari kit	0.20-12.5 ng/mL	(Cui et al. 2015)
ELİZA	Ticari kit	780 – 50000 pg/mL	(Njemini et al. 2005)
LSPR	SPR	0.92 – 4000 ng/mL	(Denomme 2012)
SPR	SPR temelli manyetik mikrobuncuklar	0.3 – 30 µg/mL	(Sun et al. 2007)
Piezoelektrik sensör	Biyomimetik peptitler	60 – 200 nM	(Mascini et al. 2006)

HSP70 biyosensörünün tekrar üretilbilirlik sağlamış olması da oldukça önemli bir avantajdır. Bu avantaj biyosensörün üretilbilir olması açısından da büyük önem taşımaktadır. Hazırlanışının kolay oluşu, geniş bir tayin aralığına sahip olması ve pikogram (10^{-12}) gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda ölçüm alabilmesi gibi özelliklerinden dolayı tercih edilir kılmaktadır.

6.KAYNAKLAR

- Abe M, Manola J, Oh W.K, Parslow D.L, George D.J, Austin C.L, Kantoff P.W. (2004). ‘‘ Clinical Prostate Cancer ‘’. The Lank Center for Genitourinary Oncology. Department of Statistical Science Dana- Farber Cancer Institute. Boston. 3: 49-53.
- Adeloju S.B, Wallace G.G. (1996). ‘‘Conducting polymers and the bioanalytical sciences: New Tools for Biomolecular Communications’’. Analyst, 21 : 699.
- Anonim (2011). İnternet : "Cancer Biomarkers: Surviving the journey from bench to bedside" http://en.wikipedia.org/wiki/cancer_biomarkers. (Eriřim tarihi 24.02.2015)
- Autolab User Manuel (2005). ‘‘ Eco Chemie ‘’. The Netherlands.
- Barth W.E, Lawton R.G. (1966). J. Am. Chem. Soc. 88: 380.
- Bartlett P.N, Cooper J.M. (1993). ‘‘ A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films’’. Journal of Electroanalytical Chemistry. 362: 1.
- Bochvar D.A, Gal’pern E.G. (1973). Doki. Akad. Nauk SSSR. 209: 610.
- Brett C.M.A. (1992). ‘‘ Electrochemistry’’. Oxford University Press, 3. Baskı.
- Buchner J. (1999). Trends Biochem. Sci. 24: 136-142.
- Compton R.G, Bamford C.H. (1987). ‘‘ Electrode kinetics : principles and methodology ‘’.
- Cosnier S. (1999). ‘‘ Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films’’. Biosensors and Bioelectronics. 14: 443.
- Cozzi F, Thilgen C, Powell W.H. (2004). Personal communication.
- Cui M, Wei H. (2015). ‘‘ Protein microarray analysis for detection of serum anti-Helicobacter pylori antibodies after eradication therapy: a clinical follow-up’’. Hepatogastroentology
- Denomme M. (2012). ‘‘ Compromised fertility disrupts Peg1 but not Snrpn and Peg3 imprinted methylation acquisition in mouse oocytes’’. Frony Genet., 3: 129.
- Diederich F. (1997). Pure Appl. Chem. 69: 395.
- Dietz T.G, Duncan M.A., Powers D.E, Smalley R.E. (1981). J. Chem. Phys. 74: 6511.
- Dresselhaus M.S, Dresselhaus G, Eklund P.C. (1996). ‘‘Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes’’. Academic Press. San Diego.
- Foulds N.C, Lowe C.R. (1986). ‘‘Enzyme entrapment in electrically conducting polymers’’. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. 82: 1259.

- Garg M, Kanojia D, Seth A, Kumar R, Gupta A, Surolia A, Suri A. (2009). ‘‘National Institute of Immunology’’. ‘‘ Department of Urology. All India Institute of Medical Sciences’’. ‘‘ Institute of Rotary Cancer Hospital ‘’. ‘‘ Department of Pathology’’. New Delhi. India.
- Genç Ö, Yıldız A. (1993). ‘‘ Enstrümental Analiz ‘’. Hacettepe Yayınları. 64: 289-384.
- Gerard M, Chaubey A, Malhotra B.D. (2002). ‘‘ Application of conducting polymers to biosensors ‘’. Biosensors and Bioelectronics. 17: 345.
- Godly E.W, Taylor R. (1997). Pure Appl. Chem. 69: 1411.
- Guldi D.M., Kamat P.V. (2000). ‘‘Fullerenes’’ : Chem. Phys. Technol., 225.
- Hamdi N, Wang J.J, Walker E, Maidment N.T, Monbouquette H.G. (2006). ‘‘ An electroenzymatic L-glutamate microbiosensor selective against dopamine’’. Journal of Electroanalytical Chemistry. 591: 33.
- Heath J.R, Zhang Q, O’Brien S.C, Curl R. F, Kroto H.W, Smalley R.E. (1987). J. Am. Chem. Soc. 109: 359.
- Hickey E, Weber LA, Schlesinger M, Ashburner M, Tissieres A. (1982). ‘‘Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells’’. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY. 199-206.
- Hightower L.E. (1991). ‘‘Heat shock, stress proteins, chaperons and proteotoxicity’’. 66: 191-197.
- Hirsch A. (1994). ‘‘Chemistry of the Fullerenes’’. Georg Thieme Veriag, Stuttgart.
- Huang Q.A, Hu, R, Wang B, Zhang J. (2007). ‘‘ Electrochim. Acta.’’. 52: 8144-8164.
- Kose S, Imamoto N. (2014). ‘‘ Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems.
- Kroto H.W, Heath J.R, O’Brien S.C, Curl R. F, Kroto H.W, Smalley R.E. (1985). Nature. 318: 162.
- Kroto H.W, Allaf A.W, Balm S.P. (1991). Chem. Rev. 91: 1213.
- Linquist S, Craig E.A. (1988). ‘‘The heat shock proteins’’. Ann Rev Genet. 22: 631-637.
- Mascini (2006). ‘‘ Aptamers in Bioanalysis’’.

Multhoff G, Stang S, Sievert W, Schilling D, Sedelmayer M, Schmid T. E, Sagel E, Phi V, Lehnerer S, Hube K, Breuninger S, Duma M, Chizzali B, Brandstetter M, Bayer C, Specth M.H., Gehrman M. (2014). ‘‘ HSP70- a biomarker for tumor detection and monitoring of outcome of radiation therapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck’’.

- Murry R.L, Scuseria G.E. (1994). *Science*. 263: 791.
- Murphy E.M. (2013). "Carcinogenesis". *Advance Access publication*. 34: 1181-1188.
- Netzer W.F, Hartl F.U. (1998). "Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and-independent mechanisms". *Trends Biochem. Sci.* 23: 68-74.
- Njemini (2005). "Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes". *Cell Stress&Chaperons*. 15 : 959-964.
- Orazem M.E, Tribollet B. (2008). "Electrochemical Impedance Spectroscopy". New Jersey.
- Otlu B. (2010). "Biyosensörler (Biyoalgılayıcılar)". XXXIV Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 54-55.
- Powell W.H, Cozzi F, Moss G.P, Thilgen C, Hwu J.R., Yerin A. (2002). *Pure Appl. Chem.* 74: 629.
- Ruoff R.S, Tse D.S, Malhotra, Lorents D.C. (1993). *J. Phys. Chem.* 97: 3379.
- Sadik O, Wallace G.G. (1993). "Pulsed Amperometric Detection of Proteins-Using Antibody containing Conducting Polymers". *Analytica Chimica Acta.* 279: 209.
- Schmalz T.G, Seitz W.A, Klein D. J, Hite G.E. (1986). *Chem. Phys. Lett.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 130 : 203.
- Schulman J.M, Disch R.L, Miller M.A, Peck R.C. (1987). *Chem. Phys. Lett.* 45: 141.
- Schultz J.J. (1992). "Biyosensörler". *Tübitak Bilim Teknik.* 293 : 14-16.
- Seigneuric R. (2011). "Heat shock proteins as danger signals for cancer detection". doi: 10.3389/fonc.2011.00037.
- Shi Q, Wang P, Jiang Y, Kan J. (2009). *Biocatalysis and Biotransformation.* 27: 5459.
- Shirley S, Mjahed H, Gobbo J, Joly A-L, Berthenet K, Seigneuric R, Garrido C. (2011). "Heat shock proteins as danger signals for cancer detection". doi: 10.3389/fonc.2011.00037.
- Sivaraman N, Dhamodaran R., Kaliappan I, Srinivasan T.G, Rao P.R.V, Mathews C.K. (1992). *J. Org. Chem.* 57: 6077.
- Sorger P.K, Pelham HRB. (1988). "Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation". *Cell* 54: 855-864.
- Stephens P.W, Mihaly L, Lee P.L, Whetten R.L, Huang S.M, Kaner R., Deiderich F, Holczer K. (1991). *Nature.* 351: 632.
- Sun Y. (2007). "PtdIns (4,5) P2 turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin- dependent endocytic internalization". *J Cell Biol.* 177: 67-355.

- Svorc J, Miertu S, Katrlík J, Stred'ansk M. (1997). "Composite transducer for amperometric biosensors. The glucose sensor". *Analytical Chemistry*. 69: 2086.
- Tang D, Khaleque A.A, Jones E.R., Theriault J.R. Li C, Wong W.H, Stevenson M.A, Calderwood S.K. (2005). "Expression of heat shock proteins and HSP messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo". *Cell Stress Chaperones*. 10: 46-59.
- Thevenot D.R, Toth K, Durst R.A, Wilson G.S. (2002). "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Biosensors and Bioelectronics*. 16: 121.
- Tuncagil S, Kayahan S.K, Bayramoglu G, Arica M.Y, Toppare L. (2009). "L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 58: 187.
- Tuncagil S, Varis S, Toppare L. (2010). "Design of a biosensor based on 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1H pyrrole". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 195.
- Turner A.P.F, Karube I, Wilson G.S. (1987). "Biosensors, fundamentals and applications". Oxford University Press. Oxford.
- Turner A.P.F. (1994). "Biosensors". *Curr Opin Biotechnol*. 5: 49-53.
- Voellmy R. (2004). "On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells". *Cell Stress Chaperones*. 9: 122-133.
- Wagner P, Verma M, Srivastava S. (2004). "Challenges for biomarkers in cancer detection". *Ann NY Acad Sci*. 1022: 9-16.
- Wang J. (1999). "Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19: 47.
- Xiu-Ling M, Jian W, Yi-Bin Y. (2008). "Application of Electrochemical Biosensors in Fermentation". *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 36: 12.

ÖZGEÇMİŞ

Burçak DEMİRBAKAN, 30 Ağustos 1990 Bakırköy/İSTANBUL doğumludur. İlköğrenimini Kuleli İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Çobançeşme Lisesi'nde 2007 yılında, lisans öğrenimini ise Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde 2012 yılında tamamlamıştır.