

**PROSTAT KANSERİNİN TANISI
İÇİN SARKOZİN HAFIZALI
NANOPARTİKÜLLERİN KULLANIMI**

**Okan Uslu
Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı
Temmuz-2012**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Okan USLU'nun "**Prostat Kanserinin Tanısı İçin Sarkozin Hafızalı Nanopartiküllerin Kullanımı**" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 13.07.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr Sibel EMİR DİLTEMİZ	
Üye	: Prof. Dr. Rıdvan SAY	
Üye	: Doç. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**PROSTAT KANSERİNİN TANISI
İÇİN SARKOZİN HAFIZALI
NANOPARTİKÜLLERİN KULLANIMI**

Okan USLU

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Yard. Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ

2012, 66 sayfa

Bu çalışmada, erkeklerde en sık görülen ve ikinci sıklıkla ölüme neden olan prostat kanserinin idrar numunelerinden tanısı yolu ile erken teşhisi hedeflenmiştir. Bu amaçla sarkozin hafızalı nanopartikül sistemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen moleküler baskılanmış polimer (MIP) tabanlı nanopartiküllerin Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FT-IR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Zeta Potansiyeli Boyut Analizi ile karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve nanopartiküllerin boyutları yaklaşık 190 nm olarak bulunmuştur. Sarkozin hafızalı nanopartiküller Reflektometrik İnterferans Spektroskopi (RİfS) sensör yüzeylerine immobilize edilmiş ve hazırlanan nanosensörün tayin sınırı 0.010 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, hazırlanan nanosensörün sarkozine olan seçiciliği, sarkozin yapısına çok benzeyen L-Alanin aminoasidi kullanılarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sarkozin, Biyosensör, Moleküler Baskılanmış Polimer (MIP), Reflektometrik İnterferans Spektroskopisi (RİfS), Prostat Kanseri.

ABSTRACT**Master of Science Thesis****THE USE OF SARCOSINE NANOPARTICLES
FOR THE DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER****Okan USLU****Anadolu University****Graduate School of Science****Chemistry Program****Supervisor: Assoc.Prof. Sibel EMİR DİLTEMİZ****2012, 66 pages**

In this study, it has targeted the early detection of prostate cancer which is the most common and second most common cause of death in men from urine samples. For this purpose, sarcosine memory nanoparticle systems have been developed. The molecular imprinted polymer (MIP)-based nanoparticles have been characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Size Analysis Zeta Potential and dimensions of nanoparticles has found to be approximately 190 nm. Sarcosine imprinted nanoparticles have been immobilized on Reflectometric Interference Spectroscopy (RIfS) sensor surfaces and the detection limit has calculated as 0.010 mM. In addition, the selectivity of sarcosine nanosensor has investigated using L-Alanine amino acid which has very similar structure to the sarcosine structure.

Key Words: Sarcosine, Biosensor, Molecularly Imprinted Polymers (MIP), Reflectometric Interference Spectroscopy (RIfS), Prostate Cancer.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, değerli bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, güler yüzünü eksik etmeyen, çalışmayı, öğrenmeyi ve üretmeyi öğreten değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bilime olan sevgisini kendime örnek aldığım her zaman yardımlarını ve desteğini eksik etmeyen, engin bilgi birikimiyle bana yol gösteren Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü değerli hocam Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a

Laboratuvar çalışmalarında ve deneylerimde Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarları olanaklarından yararlanmamızı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Adnan ÖZCAN'a

Çalışmalarım boyunca bilgi birikimi ve yardımları ile yanımda olan Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ ve Sayın Doç. Dr. Deniz HÜR'e

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Yard. Doç. Dr. Ayça ÖZCAN, Sayın Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ, Sayın Araş. Gör. Dr. Ali ÖZCAN, Sayın Araş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER, Sayın Araş. Gör. Elif Mine ÖNCÜ'ye,

TEM analizlerinin gerçekleştirilmesinde Sayın Arzu İŞCAN ve Sayın Dr. Sibel BÜYÜKTİRYAKİ'ye,

Bu süreçte katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen Özlem YALÇINKAYA, Almila ŞENAT, Gülnur DÖNMEZ, Nilgün ŞİDE, Araş. Gör. Fatih SAYIN ve tüm arkadaşlarıma,

Hayatımın en önemli aşamalarında sevgi, emek ve desteği ile daima yanımda yer alıp, sabırla sonsuz hoşgörü ve özveride bulunan Dr. Pınar UZUN'a

Bugüne gelmemi sağlayan, öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli ANNEM ve BABAM'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Okan USLU

Temmuz-2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	5
2.2. Prostat bezi	6
2.3. Prostat Kanseri	8
2.4. Prostat Kanserinde Risk Faktörleri	9
2.4.1. Kalıtım	10
2.4.2. Yaş	10
2.4.3. Irk	10
2.4.4. Diyet	10
2.4.5. Kimyasal Maddeler	10
2.5. Prostat Kanserinin Oluşumu	11
2.6. Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar	11
2.7. Moleküler Baskılı Polimerler	13
2.7.1. Moleküler baskılama yöntemi	13
2.7.2. Farklı MIP hazırlama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	18
2.7.3. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan fonksiyonel monomerler	20
2.7.4. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çapraz	

bağlayıcılar	23
2.7.5. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan başlatıcılar	26
2.7.6. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çözücüler	27
2.7.7. Moleküler Baskılı Polimerlerin Özellikleri	27
2.7.8. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları	28
2.8. Nanoteknoloji	29
2.8.1. Nanopartiküller	29
2.9. Emülsiyonlar	31
2.9.1. Miniemülsiyonlar ve Özellikleri	32
2.10. Biyosensörler	33
2.11. Reflektometrik İnterferans Spektroskopisi (RİfS)	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	38
3.1.2. Kullanılan cihazlar	38
3.2. Yöntem	39
3.2.1. MIP nanopartiküllerin hazırlanması	39
3.2.2. MIP nanopartiküllerin karakterizasyonu	39
3.2.3. Sarkozin baskılı RİfS nanosensörün hazırlanması	40
3.2.4. Sarkozin baskılı RİfS nanosensörün karakterizasyonu	40
3.2.5. RİfS nanosensörün performansının görüntülenmesi	41
4. BULGULAR	42
4.1. Sarkozin baskılanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu	42
4.1.1. FTIR Analizi	43
4.1.2. Zeta-Sizer Ölçümleri	44
4.1.3. TEM Analizleri	44
4.1.4. SEM Analizleri	46
4.2. Sarkozin baskılı RİfS nanosensörün karakterizasyonu	47
4.3. RİfS performans ölçümleri	49

4.4. RIfS sensörün seçicilik denemesi	53
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR	56
KAYNAKLAR	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Sarkozin molekülünün yapısı.....	2
2.1. Prostatın anatomik yapısı.....	8
2.2. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.....	16
2.3. AIBN'in termal bozunma reaksiyonu.....	16
2.4. Radikal polimerizasyonunda oksijen ile başlatıcı radikal reaksiyonları.....	17
2.5. Moleküler baskılanmış polimerlerde kalıp-fonksiyonel monomer etkileşimleri	19
2.6. Metakrilik asit yapısı	22
2.7. Nanopartikül tabanlı algılama için hedef örnekleri ve nanopartikül tabanlı algılama sisteminin şematik gösterimi	30
2.8. Klasik emülsiyonların şematik görünüşü	31
2.9. Miniemülsiyon polimerizasyonu ile proteinin yüzeye baskılanması	32
2.10. Biyosensörlerin yapısı.....	34
2.11. Biyosensörlerin genel şematik gösterimi	35
2.12. RİfS'da kullanılan çip yüzeyine gelen ve yansıyan ışınların.....	36
2.13. Reaksiyon aşamalarının RİfS yüzeyindeki değişiklikleri ve sensogramdaki karşılığı.....	37
4.1. Sarkozin baskılanmamış polimerin FTIR spektrumu	42
4.2. Sarkozin baskılanmış MIP nanopartiküle ait FTIR spektrumu	43
4.3. Nanopartiküllerin zeta-sizer analiz sonucu	44
4.4. Sarkozin baskılı nanopartiküllerin TEM görüntüleri	45
4.5. Yıkama öncesi nanopartiküllerin SEM görüntüsü	46
4.6. Yıkama sonrası sarkozin uzaklaşmış nanopartiküllerin SEM görüntüsü	47
4.7. Hazırlanan RİfS nanosensörün AFM görüntüleri	48
4.8. a) 0.5 mM sarkozin için elde edilen sensogram b) 1 mM sarkozin için elde edilen sensogram c) 1.5 mM sarkozin için elde edilen sensogram d) 3 mM sarkozin için elde edilen sensogram	50
4.9. Kanserli hastadan alınan idrar numunesindeki sarkozin tespiti	52
4.10. Sağlıklı insandan alınan idrar numunesindeki sarkozin tespiti	53

4.11. Artan sarkozin derişimlerine karşı sinyal verileri	53
4.12. Derişime karşı sinyal verisi kalibrasyon grafiğı	54
4.13. L-Alaninin molekül yapısı	54
4.14. L-Alanine karşı RİfS sensörün seçicilik denemesi	55
5.1. 3 mM sarkozin için hesaplanan k_a , k_d ve K_A değerleri	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Türkiye’de görülen ilk 10 kanser türü	5
2.2. Türkiye’de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü.....	6
2.3. MIP’ler ve biyolojik reseptörler arasındaki farklar.....	15
2.4. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler.....	21
2.5. Moleküler baskılamada kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar.....	23
2.6. Moleküler baskılamada kullanılan başlıca başlatıcılar.....	26
2.7. Polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri.....	28
5.1. Hesaplanan gözlenebilirlik sınırı ve tayin sınırı.....	56
5.2. 3 mM Sarkozin için k_a ve k_d ve K_A değerleri	57

ŞİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik Güç Mikroskobu
AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
FT-IR	: Fourier Transform İnfrared Spektrometre
IUPAC	: Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer
PAP	: Prostatik Asit Fosfataz
PCa	: Prostat Kanseri
PEI	: Polietilenimin
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
RİfS	: Reflektometrik İnterferans Spektroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	: Geçirgenlik Elektron Mikroskobu
UV-Vis	: Mor ötesi-Görünür Bölge

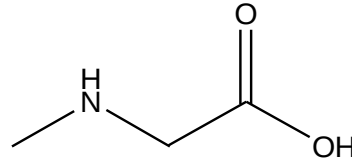
1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, vücudun herhangi bir hücre veya hücre topluluğunun kontrolsüz bir şekilde çoğalması, büyümesi ve diğer dokulara yayılarak işlev görmesini engelleyen bir hastalıktır. Kanserin erken ve doğru tespiti, vücut içinde bulunduğu çevredeki diğer organlara yayılma olasılığı ve hastalığın başarılı bir tedavi süreci için çok önemlidir. Kanser metabolomikleri, kanser hücreleri tarafından ya da kansere cevap olarak diğer dokular tarafından üretilen düşük molekül kütleli biyomoleküllerdir. Kansere yanıt olarak üretilen bu metabolomiklerin tayini kanser tanısı için en sık kullanılan yöntemdir.

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ve ikinci sıklıkta ölüme neden olan bir hastalıktır. Prostat kanserine erken dönemde tanı konulduğu takdirde, ameliyat yapılabilir ve hastalık tedavi edilebilir. Kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer alan prostat kanserini (PCa) diğer üro-onkolojik hastalıklardan ayıran en önemli özellik; 1980’li yılların ikinci yarısında prostat spesifik antijen’in (PSA) bir tümör belirteci olarak tanımlanıp kullanıma girmesidir. PSA ilk olarak 1970 yılında insan prostat dokusu ekstratlerinde tespit edilmiştir. 1979 yılında özellikleri tanımlanarak saflaştırılmış ve nihayet 1980 yılında serumda saptanmıştır. 1980’li yılların sonlarına doğru PSA yaygın bir şekilde klinik kullanıma girmiş ve prostat kanseri için en önemli tümör belirteci haline gelmiştir. Bu nedenle prostat kanseri biyokimyasal olarak taranabilir ve tanısı çok erken evrelerde konulabilir bir hastalık durumuna gelmiştir. PSA organa özgü bir antijen olsa da, kansere özgü değildir. Serum PSA düzeylerinin sağlıklı kişilerde yaş, ırk ve prostat hacmine bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Eşik değer 4.0 ng/ml olarak kabul edilen PSA’nın duyarlılığı bu değerde % 72 - % 90 arasında değişmektedir. Fakat PSA’nın özgünlüğü yeterince yüksek değildir. Bunun sebebi prostat kanseri ile ilişkisiz bazı faktörlerin serum PSA seviyesini etkileyebiliyor olmasıdır. Normal serum PSA değerinde üst sınır genel olarak 4.0 ng/ml olarak kabul edilir. Ancak, prostat kanserli olguların yaklaşık % 20 kadarında serum PSA düzeyi 4.0 ng/ml’den düşüktür. Diğer bir deyişle, PSA değeri < 4.0 ng/ml olan her beş erkekten birisindeki kanser için tanı konulmamaktadır. Fakat diğer taraftan, serum PSA değeri 4.0 - 10 ng/ml arasında

olan erkeklerden alınan biyopsilerde kanser tespit etme oranının yaklaşık sadece % 25 olması da PSA'nın özgünlüğü konusunda akıllarda soru işaretleri bırakmaktadır (Tosun 2007). PSA'nın düşük spesifikliği, kanser tanısı için gerekli tanı aralığının yetersizliği, prostat biyopsisi için önemsiz olmayan yanlış negatif aralık gibi sorunları içeren çok sayıda problem vardır (Trock 2011).

Glisinin sentezi ve indirgemesi sırasında yan ürün olarak meydana gelen ve son zamanlarda doğal, çok bulunan ve protein olmayan amino asit N-metil glisin olarak bilinen sarkozin, yeni kabul edilen prostat kanseri markırı olarak araştırılmıştır (Cernei ve ark. 2012). Şekil 1.1'de sarkozine ait molekül formülü yer almaktadır.



Şekil 1.1. Sarkozin molekülünün yapısı (N-metil glisin)

Prostat kanseri Avrupa'da erkekler arasında son 20 yıldaki artan görülme sıklığı ile en yaygın kanser türlerinden biridir (Bianchi ve ark. 2011). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılında 240.000 erkek prostat kanserine yakalanacağı ve 33000 den fazla insan ise bu hastalık yüzünden hayatını kaybedeceği belirtilmiştir. Dünya çapında prostat kanser vakalarının sayısı 1 milyona ulaşmaktadır (Trock 2011). Tüm bunların yanında hastaların küçük bir kısmı genç yaştaki erkekleri etkileyen hızlıca metastaz olan ve ölüme neden olan prostat kanserinin agresif türünden etkilenmektedir. Erken ve doğru teşhis özellikle bu tür hastalarda hayattır.

Bu amaçla yapılan çalışmada, yüzeye bağlanan moleküllerin etkileşimlerini belirlemek amacıyla kullanılan, hızlı ve kolay bir yöntem olan reflektometrik interferans spektroskopisi, miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan sarkozin baskılanmış nanopartiküller kullanılarak bir nanosensör hazırlanmıştır. Çalışmada kanserle mücadele eden insanların kan verme, gereksiz biyopsi yaptırma gibi sıkıntılı süreçlerini azaltmak amacı ile nanopartiküller ve

MIP'lerin avantajlarını içinde barındıran, tekrar kullanılabilen, ucuz, hızlı ve sarkozine seçici olan sensör sistemi geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Bütün vücut dokularında hücreler kendilerini belirli bir kontrol mekanizması içerisinde yenilerler. Böylece zedelenen doku tamir edilir, yenilenir. Kontrol dışı kalan ve gerekmediği halde çoğalan hücreler tümör adı verilen hücre topluluklarını oluşturur. Bazı tümörler büyümelerine karşılık köken aldıkları dokuda sınırlı kalırlar ve komşu organlara ilerleyemezler. Bunlara benign (iyi huylu) tümörler denir. Bazıları ise sadece büyümekle kalmayıp komşu organlara uzanma ve onları da tahrip etme potansiyeline sahiptir. Bu tür tümörler kan ve lenf dolaşımı ile köken aldıkları yerlerden uzaktaki organlara da sıçrayabilirler. Bu tür tümörlere malign (kötü huylu) tümör ya da kanser denir. Kanser hücreleri köken aldıkları lokalizasyondan ayrılabilir, vücutta dolaşarak yeni yerleştikleri yerlerde de çoğalabilirler. Bu şekilde köken aldıkları organ dışına sıçramış ve oralarda büyümekte olan tümörlere metastaz yapmış tümörler denir (Tuna 2005).

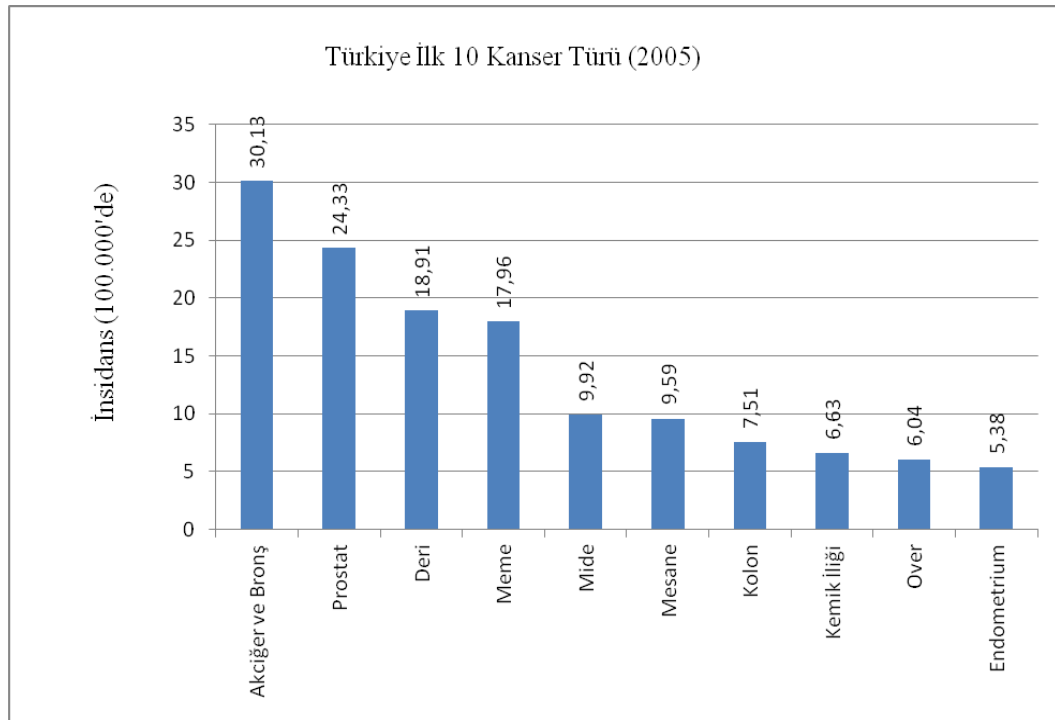
Son yıllarda kanser tüm dünyada artış gösteren bir hastalık olmuştur. İngiltere’de 2006 yılında kanser nedeniyle 154162 ölüm olmuştur (Tothill 2009). Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’nın verilerine göre 2008 yılında dünya genelinde 12 milyon kişiye kanser teşhisi konulurken, bu rakamın 2030 yılında 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Önümüzdeki yıllarda karşılaşacağımız bu artışın önemli bir bölümü ne yazık ki gelişmekte olan ülkelerde görülecektir. Gelişmekte olan ülkelerde sadece kanser sıklığı değil aynı zamanda kansere bağlı ölümler daha fazla artış gösterecektir. Hastalık yükü ve insan gücü kayıpları ile beraber ortaya çıkacak ekonomik kayıplar da düşünüldüğünde önümüzdeki yıllar içerisinde gelişmiş ülkeler ile gelişmekte olan ülkeler arasındaki farkın daha da belirginleşeceği tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü’ne göre, kanserde görülen bu artışın temel üç sebebi; yaşlı nüfusta meydana gelen artış, tütün kullanımı ve obezite salgınıdır. 21. Yüzyıl içerisinde kanserle mücadelede ülkelerin bu faktörleri yerinde değerlendirip, akılcı kanser mücadele politikaları geliştirmesi gerekmektedir. Kanser sadece pahalı ilaç vb. tedaviler ile kontrol altına alınabilecek bir hastalık değildir. Bu nedenle, ülkelerin

finansal kaynaklarına uygun şekilde esas yatırımlarını kanseri önleme ve erken teşhise yönlendirmeleri gerekmektedir (Anonim 2012)

Günümüzde çevresel karsinojenlerin artışına ve tanı yöntemlerinin gelişimine bağlı olarak görülme sıklığı giderek artan kanser, dünyada geniş kitleleri etkileyen önemli ve ciddi bir sağlık sorunudur. Ülkemizde kanser, ölüm nedenleri arasında, kardiyovasküler hastalıkların ardından % 22'lik bir oranla ikinci sırada yer almaktadır (Budan 2009).

2005 yılında yapılan istatistiğe göre ülkemizde görülen ilk on kanser türleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. (Anonim 2012)

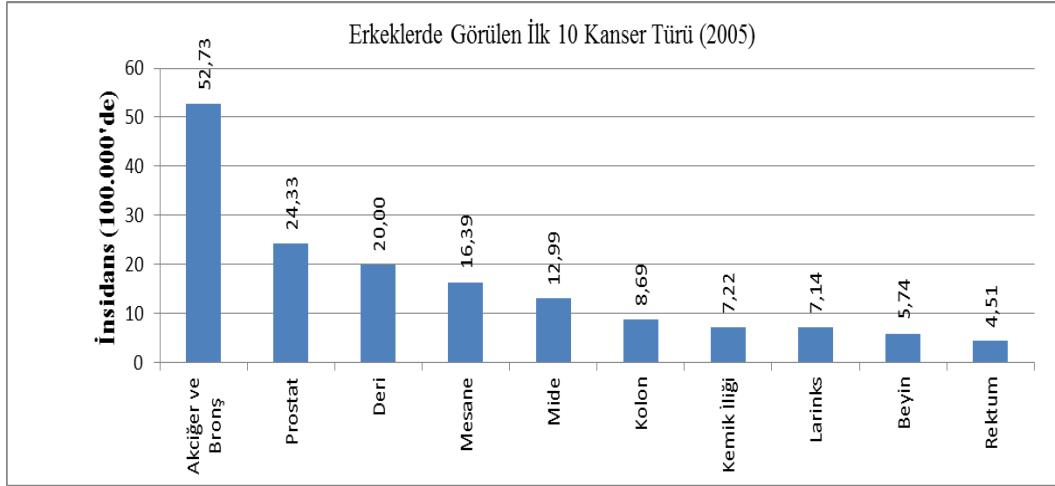
Çizelge 2.1. Türkiye'de görülen ilk 10 kanser türü (Anonim, 2012).



Çizelge 2.2'de Türkiye'de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü incelendiğinde, dünyadaki benzerleri gibi prostat kanserinin de akciğer kanserinden sonra erkekleri etkileyen en önemli tür olduğu görülmektedir. Prostat kanseri istatistiksel açıdan tüm kanserlerin % 32'sini oluşturur. Prostat kanseri bir yaşlılık hastalığı olup 40 yaş altı erkeklerde nadiren oluşur. Görülme sıklığı 40

yaşlarından 80'li yaşlara gidene kadar giderek artar (Emil ve ark. 2004). Amerika'da erkeklerde en sık görülen kanser, prostat kanseridir (İzmirli 2010).

Çizelge 2.2. Türkiye'de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü (Anonim 2012).

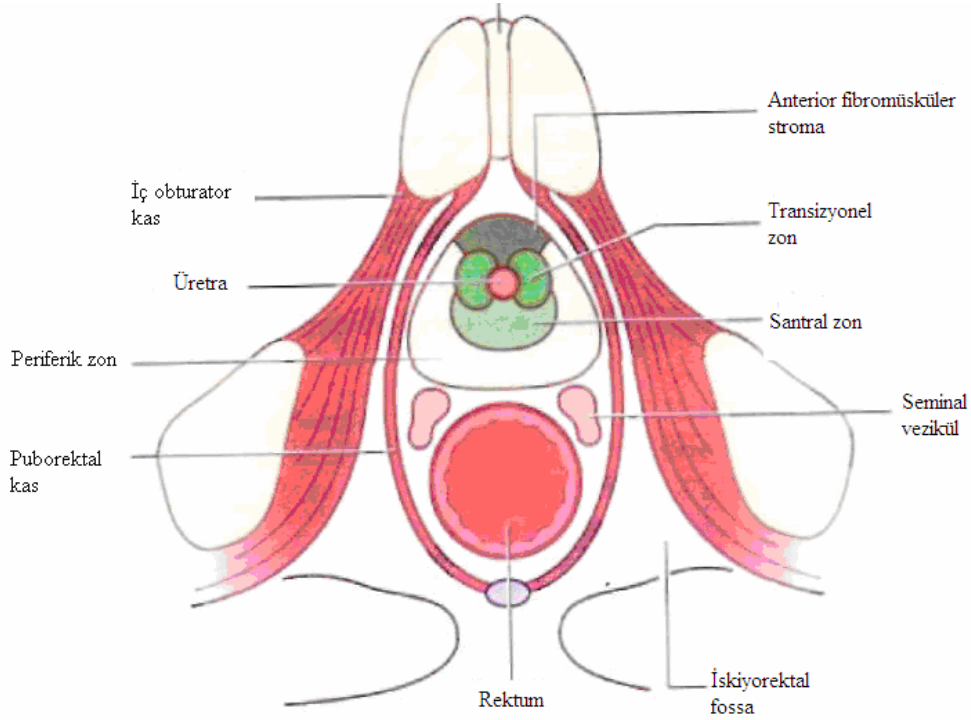


2.2. Prostat Bezi

Prostat bezi erkeğin üreme sisteminin önemli bir parçasıdır. Erkeklerde üreme sistemine ait yardımcı bezlerden biri olup, seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunur. Üst - alt ve ön - arka boyutları yaklaşık 4 cm ve 2,5 cm, genişliği ise ortalama 3 cm olan prostat, mesanenin aşağı kısmında yerleşmiş olan ve erkek üretrasının başlangıç kısmını çevreleyen fibromusküler ve glandüler bir organdır (Horoz 2006). Şekli ters çevrilmiş ve sıkıştırılmış koni olarak da tarif edilebilir (Tanagho 1992). Erişkinde normal ağırlığı 20 gram kadardır (Tanagho 1995). Prostatın tam merkezinde üretra denilen mesaneden idrarı boşaltmaya yarayan kanal bulunur. Erkeklerde yaş arttıkça prostat bezi büyüyebilir ve çevrelemiş olduğu üretrayı, yani idrar kesesinin çıkış yerini tıkayabilir. Bu durum idrar yapmada güçlük ile kendini gösterir. Prostat kanseri de aynı şikayetlere neden olabileceğinden, bu belirtinin kansere ait olmadığı gösterilmelidir. Prostat bezinden salgılanan hafif asidik (pH 6.5) seröz sıvıda tanımlanmış olan başlıca salgı ürünleri; asit fosfataz, sitrat, çinko, çözünür fraksiyon proteinleri, karbonhidratlar, elektrolitler, poliaminler, hormonlar, lipitler ve büyüme faktörleridir. Prostata özgü proteinler ise; prostat spesifik antijen (PSA), prostatik

asit fosfataz (PAP) ve prostat bağlayıcı proteindir. Prostat hücrelerinden salgılanan PSA adı verilen bir proteinin kandaki normal değeri 4'ten küçüktür (Tuna 2005).

Prostat bezi hücrelerinde benign ve malign karakterde olmak üzere iki tip büyüme şekli görülmektedir. Bunlardan birincisi, ileri yaşlardaki erkeklerde rastlanan, benign prostat hiperplazisi (BPH)'dir ve genellikle bezin üretrayı çevreleyen geçiş zonunda meydana gelir. Prostat bezi hücrelerinin aşırı çoğalma gösterdiği BPH'de, çoğalan hücreler, ilerlemiş evrelerde dahi bez içinde lokalize olarak kalır ve çevre dokulara yayılım göstermezler. Prostat içinde genişleyen kitlenin, üretra üzerine yaptığı baskı, idrar yapmada zorluk, sık idrar yapma ihtiyacı, mesanenin tam olarak boşaltılamaması gibi belirtilere neden olmaktadır. Prostat bezinde görülen ikinci büyüme tipi olan tümöral büyüme sonucunda ise, prostat kanseri meydana gelmektedir. Prostat kanseri, hastalarda BPH ile benzer şikayetler oluşturmalarına rağmen, % 75'lik bir oranla bezin periferal zonundan gelişmekte ve ileri evrelerinde vücudun diğer bölgelerine yayılım gösterebilmektedir (Scardino ve Kelman 2005; Altun 2009). Şekil 2.1'de prostatın anatomik yapısı verilmiştir.



Şekil 2.1. Prostatın anatomik yapısı (İspir 2010).

2.3. Prostat Kanseri

Prostat kanseri için prostat spesifik antijen (PSA) taramaları bu kanserden dolayı olan ölüm hızlarını azaltmıştır. 4 ng mL^{-1} den daha az olan PSA testlerinin sonuçları genellikle normal olarak kabul edilir, aslında prostat kanseri tespit edilen kişiler arasında PSA değerleri $4.0\text{--}9.9 \text{ ng mL}^{-1}$ arasındadır. Ancak şuan, yüksek ilerleyiş riski bulunan tümörler için belirleme hala çok zordur. Bundan dolayı, hastaları gruplandırmak için uygun tarama testlerinin sunulması biyopsi gibi invaziv prosedürler ya da agresif tedavi yaklaşımlarının kullanımını azaltabilir. Net olarak, tıbbi bir karar verilirken biyobelirteçlerin kullanılmasından önce belirtecin ne kadar doğrulukla sınıflandırdığı ya da sonuç tahmininde ne kadar doğru olduğu önemlidir. (Bianchi ve ark. 2011).

Prostat kanserinin tam olarak sebebi bilinmese de yaş, ırk ve genetik faktörlerin büyük rol oynadığı tespit edilmiştir. Nedeni her ne olursa olsun, prostat kanserinde bugün için kabul edilen en önemli risk faktörü yaşlanmadır. Prostat kanserine nadiren 40 yaşın altında tanı konulmaktadır ve genellikle de 50 yaşından genç kişilerde sık olarak tespit edilememektedir. Prostat kanserini 40

yaşın altında görülme olasılığı 1/10.000, 40-59 yaş arasında 1/103 iken, bu oran 60-79 yaşları arasında ise 1/8'dir (İspir 2010).

Amerika Birleşik Devletler'inde 2006 yılında 235.000' in üzerinde kişiye prostat kanser tanısı konulmuş ve yaklaşık 27.000 kişi bu hastalık nedeniyle yaşamını yitirmiştir. Serumdaki PSA düzeyi ile erken teşhis ve cerrahi müdahale ile radyasyon terapisi ölüm oranını önemli ölçüde azaltmaktadır. Bununla birlikte teşhisi ile ilgili yeterince biyolojik belirtecin tanımlanmamış olması erken tanı ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. Ayrıca PSA seviyesinin de birçok olguda hatalı pozitif veya hatalı negatif sonuç verdiği bilinmektedir (Shen ve ark. 2000).

Son yıllarda, gelişmiş ve kontrollü denemeler yapan Avrupa'da ERSPC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer), ABD'de PLCO (Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian) kanser tarama deneme çalışmaları açık şekilde PSA'ya dayalı taramalarda aşırı tanı ve tedavi uygulamalarının riskini göstermiştir. Bu endişelerden temel alarak, prostat hastaları için erken, invaziv olmayan ve güvenilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesinin önemi büyüktür ve özellikle son günlerde ilerleyici hızlı ve metastaz eğilimli tümör ile yayılımcı olmayan tümörlerin ayrımının yapılması ve kolay tanı koyulabilmesi oldukça önemlidir. Bu sebepten yeni biyobelirteçlerin aranması daha da önem kazanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda prostat kanserinin metastazlı ilerleyişinde oldukça yüksek oranda bulunan ve glisin N-metil esteri olan ayırıcı metabolit olarak sarkozin seçilmiştir (Jiang ve ark. 2010; Bianchi ve ark. 2011; Cavaliere ve ark. 2011; Cernei ve ark. 2012).

2.4. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Prostat kanseri gelişmesinde etkili faktörler kesin bir şekilde belirlenememekle beraber prostat kanserinin oluşumunda etkili olan bazı risk faktörleri tanımlanmıştır. Bu faktörleri kalıtım, yaş, ırk, diyet ve kimyasal maddeler olarak sıralamak mümkündür.

2.4.1. Kalıtım

Birinci derece akrabalarında prostat kanseri bulunan kişilerde risk 2-3 kat artar. Prostat kanser vakalarının % 9'unda genetik yatkınlık saptanmıştır (İspir 2010).

2.4.2. Yaş

Prostat kanseri tanısı alan hastaların yaklaşık % 95'inde tanı 45 ile 89 yaşları (ortalama 72 yaş) arasında konulmaktadır (Begun 1993).

2.4.3. Irk

Siyah ırkta beyaz ırka göre daha fazla görülme olasılığı vardır (Dalsuna 2007).

2.4.4. Diyet

Hayvansal yağlardan zengin diyetin kolesterol dengesini değiştirerek prostat kanserine yol açtığı düşünülmektedir. Prostat kanserinin, yüksek yağ içerikli diyetle beslenme alışkanlığı olan toplumlarda daha sık, soya ürünlerinin bol tüketildiği uzak doğu ülkelerinde ise daha az görüldüğü gözlenmiştir. Ayrıca vitamin E, selenyum, özellikle domateste bol miktarda bulunan bir antioksidan madde olan likopen ve yeşil çay tüketiminin prostat kanseri olasılığını azalttığı öne sürülmüştür (Dalsuna 2007; İspir 2010).

2.4.5. Kimyasal maddeler

Kimyasal maddelerden kadmiyumlu maddelerle çalışılırken kadmiyum buharının solunmasının prostat kanserine yol açtığı bildirilmiştir. Prostat kanserinin neden ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemekle beraber, cinsiyet hormonları ile ilgilidir. Günümüzde elde edilen bilgiler doğrultusunda

testosteronun prostat bezindeki hücrelerde aşırı uyarı yaparak kansere yol açabileceği söylenmekte, ancak tek etkenin bu hormon olmadığı düşünülmektedir (Dalsuna 2007).

2.5. Prostat Kanserinin Oluşumu

Prostat kanseri hücreleri prostat bezi hücrelerinden gelişir. Prostat kanserinde ilk odak bez içerisinde küçük bir nodül şeklindedir. Daha sonraki aşama da tümör prostat bezini kaplar ve prostat bezi kapsülünü geçerek çevreye yayılır. Seminal veziküllere ilerler. Ayrıca kan ya da lenf yoluyla vücudun diğer organlarına yayılır. Kan veya lenf yoluyla sıklıkla vertebralar, pelvik kemikler, kafatası ve diğer kemiklere, karaciğer ve akciğerlere yayılır (İspir 2010).

2.6. Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar

Kanser metabolomikleri, kanser hücreleri tarafından ya da kansere cevap olarak diğer dokular tarafından üretilen düşük molekül kütleli biyomoleküllerdir. Hastalarda bu kanser metabolomiklerinin tespiti, hastalığın teşhis ve tedavisi için etkili bir yol olarak kullanılmaktadır. Kanser metabolomikleri kanser hastalarının kan, idrar veya diğer vücut sıvılarında tespit edilebilir moleküler değişikliklerdir. Büyük molekül kütleli kanser biyobelirteçleri ise protein biyobelirteçleri, enzim biyobelirteçleri, hormon biyobelirteçleri, küçük molekül ağırlıklı biyobelirteçler ve hücre yüzey reseptör biyobelirteçleri olarak sınıflandırılabilir. Biyobelirteçlerin tayini için spektrofotometri, radyoimmünoassay, lüminesan immünoassay, enzim immünoassay ve sensör teknolojisi en sık kullanılan yöntemler arasındadır (McShane ve ark. 2005; Kulasingam ve ark. 2008; Rusling ve ark. 2010; Wulfschle ve ark. 2003; Ferrari ve ark. 2005 ve Giljohann ve ark. 2009).

Sensörler, biyolojik özellikteki maddelerin tanınma ve tayininde kullanılan, biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektrik sinyallerine dönüştürebilen analitik cihazlardır. Biyosensörler basit ve düşük maliyetli hazırlanmaları, hızlı cevap verme süresi, kısa süreli numune hazırlama ön işlemleri gibi pek çok avantaja sahiptirler. Sensör teknolojisi ve mikroplatformlar alanındaki son

gelişmeler, analitlerin farklı ortamlardan tayinini kolaylaştırmış ve bu amaçla kullanılan cihazların pratikliğini arttırmıştır. Bu nedenle, biyolojik belirteçlerin tayini için biyosensör teknolojisi yaygın olarak kullanılmaktadır (Tothill ve ark. 2009; Teramura ve ark. 2006 ve Jang ve ark. 2009). Biyosensörler, biyokimyasal bir sinyali ölçülebilir bir elektrik sinyalline dönüştüren transduser ve bu transduser ile temas halinde bulunan biyolojik bir moleküler tanıma biriminden oluşan analitik cihazlardır (Peter ve ark. 2005; Sharma ve ark. 2003; Walton ve ark. 1993). Kullanımlarının kolay olması, ucuz olmaları, hızlı ve sağlam yapılarının yanı sıra çoklu analit testlerine olanak sağlamaları nedeni ile biyobelirteç analizleri için avantajlı platformlar oluştururlar (Peter ve ark. 2005; Uludağ ve ark. 2010).

Kojima ve ark. yapmış oldukları biyosensör teknolojisi temelli çalışmada elektrokimyasal özellikte bir biyosensör kullanarak karaciğer kanseri oluşumu ile serum içerisinde miktarı artan α -fetaprotein (AFP) biyobelirtecini tespit etmişlerdir (Kojima ve ark. 2003). Yine Liang ve ark. serum içerisindeki CA15-3 biyobelirtecini tayin ederek meme kanserini elektrokimyasal özellikte bir biyosensör ile belirlemişlerdir (Liang ve ark. 2004). Optik özellikteki SPR sensörü kullanılarak yapılan yumurtalık kanserine ait hCG biyobelirtecini tespiti (Chou ve ark. 2004), piezoelektrik özellikte QCM sensörü kullanılarak yapılan prostat kanserine ait PSA biyobelirtecini tespiti (Wee ve ark. 2005), elektrokimyasal özellikteki cam karbon elektrodu kullanılarak yapılan kolon kanserine ait CA19-9 biyobelirtecini tespiti (Du ve ark. 2003) gibi pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. İdrarda sarkozin belirlenmesinde kullanılan pek çok yöntem vardır bunlar arasında başlıcaları ayırma teknikleri olarak LC ve GC gibi kütle spektroskopisi yöntemlerine dayanmaktadır. LC-MS/MS'e dayanan hızlı bir teknik, Jiang ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Bianchi 2011).

Sreekumar ve arkadaşlarının çalışmasında, sarkozin idrarda belirlenebilen, prostat kanserinin metastaz aşamasında oldukça yükselen ayırıcı bir metabolit olarak tanımlanmıştır (Cernei 2012).

Jiang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada prostat kanseri teşhisinin daha doğru olması için metazistik prostat kanser idrarlarında bulunan altı metabolit; sarkozin, prolin, kinurenin, urasil, gliserol-3-fosfat ve kreatininin idrardaki

konsantrasyonlarının ölçümü için sıvı kromatografi /tandem kütle spektroskopisi ile bir teknik geliştirilmiştir (Jiang ve ark. 2010).

Cernei ve ark. idrar veya kan plazması gibi biyolojik örneklerde iyon değişimli sıvı kromatografisi, UV-VIS spektrometre ve son olarakta elektrokimyasal bir metotla sarkozinin tayinini gerçekleştirmişlerdir.

2.7. Moleküler Baskılı Polimerler

2.7.1. Moleküler baskılama yöntemi

Moleküler etkileşim oldukça eski bir kavram olup ilk kez 1874’de Fischer’in enzim-substrat etkileşimiyle ortaya koyduğu anahtar-kilit modeliyle birlikte modern teknikler ortaya çıkmıştır. Fisher’ın yaptığı tanıma göre enzim molekülünün yüzeyinde substrat molekülünün şeklini tamamlayan uygun yapılar bulunmaktadır. Bu sayede substrat enzimin aktif bölgeleriyle etkileşir. Moleküler etkileşimin büyük ilgi gören uygulamalarından birisi de moleküler baskılama yöntemidir. Moleküler baskılama, moleküler kalıp kullanarak sentetik polimerler içerisinde seçici bağlanma bölgeleri yapmak için kullanılan bir yöntemdir. (Ersöz ve ark. 2005)

Moleküler baskılı polimerlerin (MIPs) etkinliği, kendi yükleme kapasitesi ve seçiciliği artırılarak geliştirilebilir. Optimal bir konuk-fonsiyonel monomer etkileşimi başarılı baskılama üzerine belirleyici bir etkiye sahip olduğundan, uygun monomer seçimi başarılı baskılama sürecinde kritik bir rol oynamaktadır (Hiratania ve Alvarez-Lorenzo, 2004).

Moleküler baskılama (bellekleme) yöntemi farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin seçiciliği yüksek olarak ayrılması için akıllı polimer elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir malzeme geliştirme yöntemidir.

Moleküler baskılama yönteminin en önemli avantajı, sentez basamağının kolay ve ucuz olmasıdır. Elde edilen moleküler baskılanmış polimerler (MIP), yüksek seçicilik ve mekanik dayanıklılık gösterdikleri için MIP’ler yapay afinite ortamı olarak görülürler. Isıya, basınca olan dirençleri, asitler, bazlar, organik

çözücüler gibi kimyasalların varlığında kararlılıkları nedeniyle de biyolojik benzerlerine göre daha üstündürler. Bu karakteristik özelliklerinden dolayı MIP'in yaşam, farmasötik, kimya ve çevre bilimleri gibi alanlarda tanıma ve ayırma amaçlı olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Odabaşı, Say ve Denizli 2007; Şener 2009).

Moleküler baskılamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır. Moleküler baskılama tekniği temel üç basamaktan oluşur (Şekil 2.1.):

I.basamak: ön-kompleksleşme

Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp (hedef) moleküle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

II.basamak: polimerleşme

Monomer-kalıp kompleksi uygun bir çapraz bağlayıcı kullanılması ile fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

III. Basamak: Kalıp (hedef) molekülünün uzaklaştırılması

Polimerizasyondan sonra yapıda hedef moleküle uygun boşluklar oluşturmak amacıyla kalıp molekül uzaklaştırılır. Bağlanma bölgeleri büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak kalıp molekülüne tamamlayıcı bir boşluk oluşturur. Böylece esas kalıp molekülüne seçici tekrar bağlanabilen polimer üzerine bir molekül “bellek” baskılanır. Moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerin en önemli iki özelliğine yani tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahiptirler. Fakat moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerden Çizelge 2.3'de görülen özellikleri bakımından farklıdır.

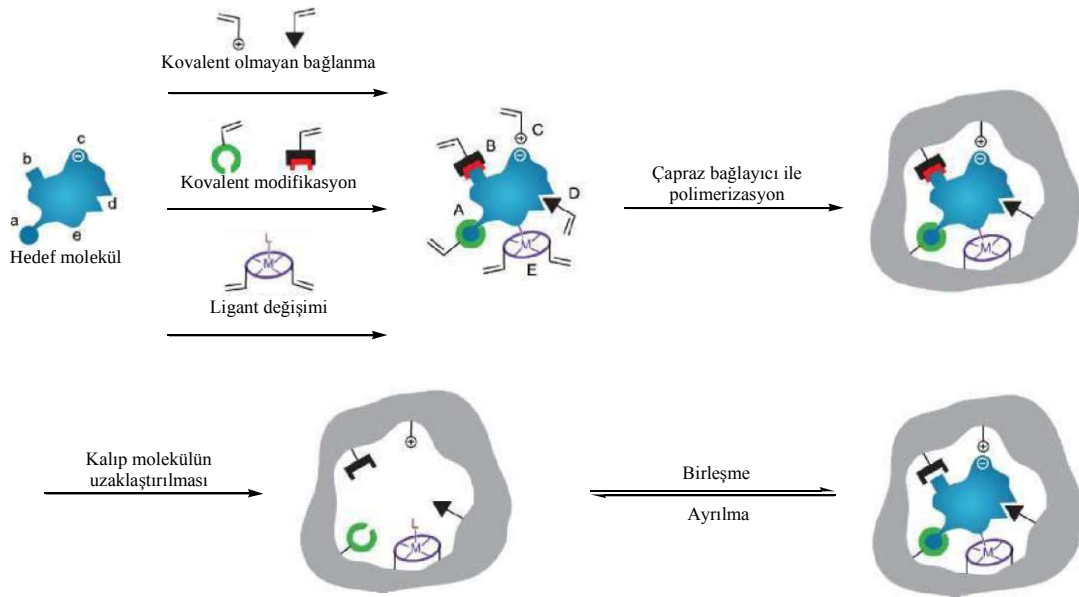
Çizelge 2.3. MIP'ler ve biyolojik reseptörler arasındaki farklar.

Moleküler baskılanmış polimerler	Biyolojik reseptörler
Çok büyük, katı ve çözünmezdirler.	Daha küçük, esnek ve çoğu durumlarda çözünürdürler.
Büyükliklerine bağlı olarak MIP'ler binlerce veya milyonlarca bağlanma bölgesine sahiptirler.	Çok az veya sadece bir tane bağlanma bölgesine sahiptirler.
Moleküler baskılanmış polimerlerdeki bağlama bölgelerinin popülasyonu heterojendir.	

Ayrıca baskılama için kullanılan pek çok polimerin karmaşık yapısı, heterojen gözenek büyüklüğü dağılımı ve bağlama bölgelerinin katı materyal boyunca bulunması genellikle kütle aktarımını yavaşlatır. Her zaman problem olmamasına karşın bu özellikler moleküler baskılanmış polimerlerin genel uygulamalarda doğal reseptörlerin yerini almalarını önler.

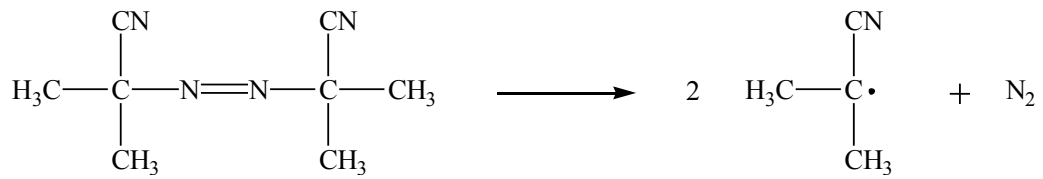
Moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, fiziksel dayanıklılıkları sayesinde birkaç yıl boyunca performansında değişim olmaksızın saklanabilir. Bu ve benzer özelliklerinden dolayı MIP'ler yapay afinite ortamı olarak düşünülebilirler.

Moleküler baskılamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Temel olarak monomerler kovalent veya non-kovalent etkileşimler yoluyla yuva molekül ile bir kompleks oluşturur (Diltemiz 2006; Şener 2009). Şekil 2.2'de Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2.2. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi

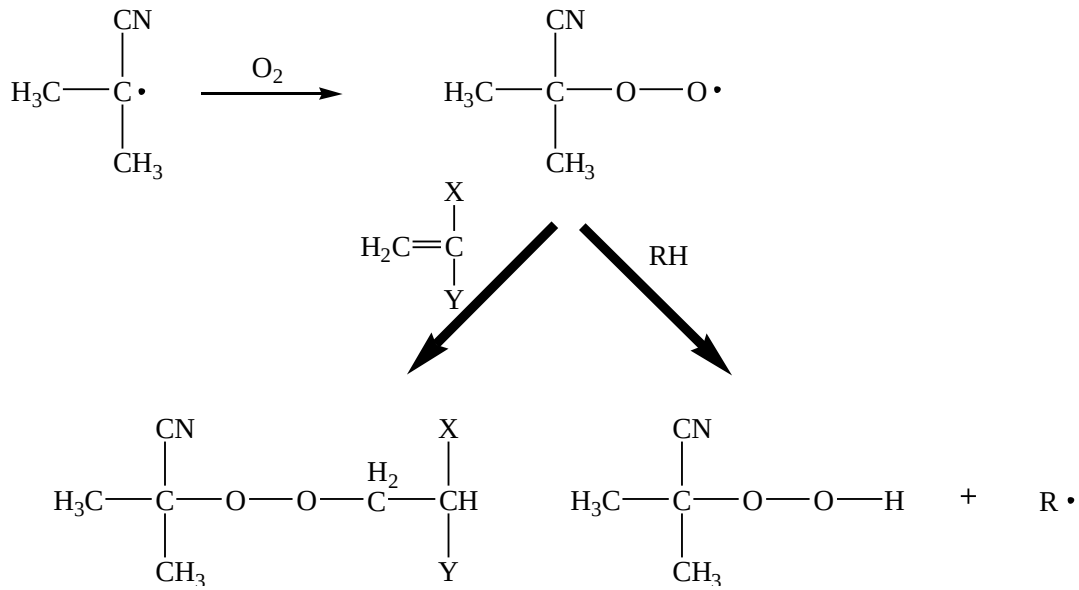
Serbest radikal polimerizasyonu, çok yönlü uygulamaları ve deneysel kolaylığının yanında ekonomik bir yöntem olduğu için MIP'lerin hazırlanmasında en çok kullanılan tekniktir. Günümüzde endüstride en çok bu teknik tercih edilir (Komiyama ve ark. 2002). Polimerizasyon 2,2'-azobis(izobutironitril) (AIBN) gibi bir radikal başlatıcının termal bozulmasıyla başlatılabilir. Şekil 2.3'de sıklıkla kullanılan başlatıcı olan AIBN'nin termal bozunma reaksiyonu verilmiştir.



Şekil 2.3. AIBN'in termal bozunma reaksiyonu

Serbest radikaller elde etmenin bir diğer yolu da foto başlatıcılar kullanmaktır. Özellikle yüksek sıcaklıklarda kalıp ve fonksiyonel monomerler arasında kararsız non-kovalent bağlanmalar olması durumunda kullanılırlar. Fotokimyasal polimerizasyon başlatıcılarının kullanıldığı polimerizasyon işlemlerinde, polimerizasyon UV ışığının yoğunluğuna, ışık kaynağından uzaklığa ve radikal ürünün içine ulaştığı mesafeye bağlıdır.

Serbest radikal polimerizasyonunda oksijenin ortamdan uzaklaştırılması son derece önemlidir. Çünkü oksijen serbest radikale peroksi radikal formunda bağlanır. Bunun sonucunda da ya bu peroksi radikal başlatıcı bir başka başlatıcı molekülü ile etkileşir ya da ortamda bulunan polimer, monomer ve diğer bileşenlerle reaksiyona girer (Şekil 2.4). Ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak için azot veya argon gazı kullanılabilir.



Şekil 2.4. Radikal polimerizasyonunda oksijen ile başlatıcı radikal reaksiyonları

Bu zamana kadar yapılan pek çok moleküler baskılanmış polimer çalışması radikal polimerizasyonu ile hazırlanan organik polimerleri açıklamaya yöneliktir.

Organik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan monomerler:

- Bazik (vinilpiridin)
- Asidik gruplar (metakrilik asit)
- Yüklü gruplar (3-akrilamidopropiltrimetilamonyum klorür)
- Hidrofobik (sitiren)
- Hidrojen bağı gösteren (akrilamit) vb sayılabilir.

Moleküler baskılanmış polimer hazırlamak için kullanılan yöntemlerin başlıcaları:

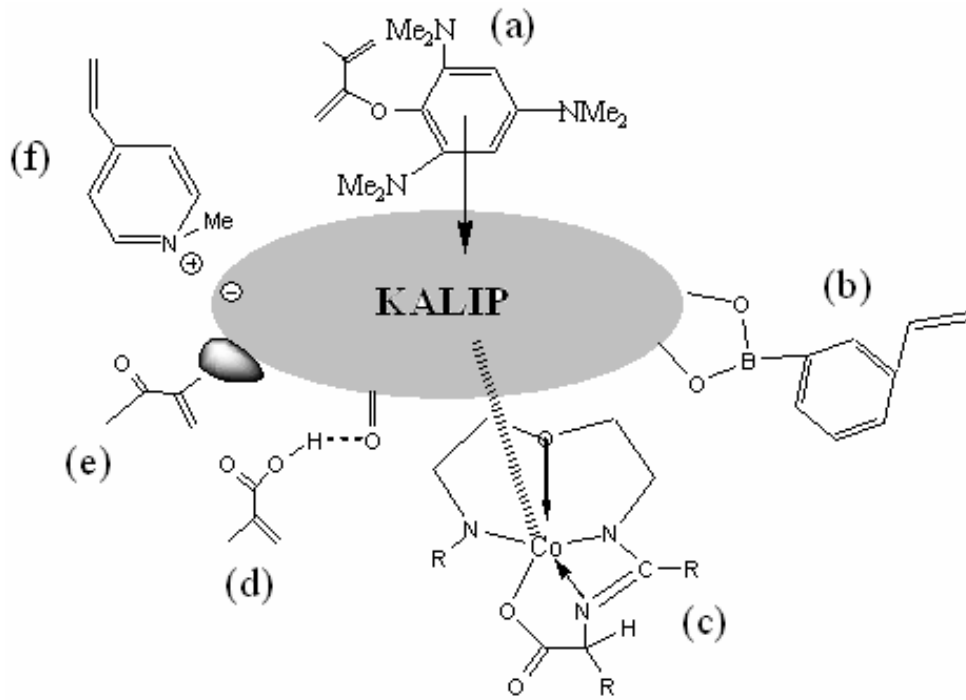
- Yığın polimerizasyonu
- Süspansiyon polimerizasyonu
- Kimyasal grafting
- Yumuşak litografi
- Moleküllerin kendilerini yönlendirmesi yaklaşımı
- Elektropolimerizasyondur.

2.7.2. Farklı MIP hazırlama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin her ikisinde avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Haupt ve ark. 2002). Günümüzde pek çok araştırmacı baskılanmış polimer hazırlamak için kovalent olmayan yaklaşımı kullanmaktadır (Kriz ve ark. 1997; Zhong ve ark. 2001). Kovalent olmayan yaklaşım polimerizasyon öncesinde non-kovalent etkileşimlerle kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesine imkan tanıdığından basit ve sorunsuzdur. Kalıp molekülün kovalent modifikasyonuna gerek yoktur ve kalıp-monomer kompleksi oluşturmak için farklı bağlanma etkileşimleri kullanılabilir. Kovalent olmayan bağlanma kinetiği kovalent bağlanmayla kıyaslandığında enzim-substrat bağlanmalarına benzer (Sellergren 1988). Baskılanmış polimerler, kalıp molekülün yapısı ve reaktivitesi hakkında spesifik bilgi gerektirmeksizin hazırlanabilir. Bununla birlikte kovalent olmayan baskılamada kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimler spesifik değildir. Kovalent olmayan polimerlerde bağlanma bölgelerinin dağılımı heterojendir ve bu da nonspesifik bağlanmalara ve kalıp molekülün zayıf moleküler tanınmasına neden olur (Katz ve Davis 1999; Dong ve ark. 2002). Eğer hazırlanan polimer kromatografi çalışmalarında kullanılacaksa pik genişlemesi meydana gelebilir (Malik ve ark. 1994; Yoshizako ve ark. 1998).

Kovalent yaklaşımda baskılama işlemi öncesinde kararlı kalıp-monomer kompleksi oluşturulduğu için bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı sağlanır (Ikegami ve ark. 2004). Bununla birlikte dezavantajlarının çokluğu nedeniyle

kovalent yaklaşımın kullanımı daha sınırlıdır. Kovalent yaklaşımda polimer ağ örgüsü içindeki monomer-kalıp molekül arasındaki kovalent bağları kırıp kalıbın polimerden uzaklaştırılması işlemi oldukça zordur (Kriz ve ark. 1997; Sellergren 1988). Ayrıca polimeri kullanarak kalıp tanıma basamağında kalıp ile polimer arasında kovalent bağ oluşumu genellikle yavaş bir basamakta gerçekleştiği için ve kromatografik ayırmalarda polimer sabit fazı ve analit arasında hızlı bir etkileşim gerçekleştiğinden zayıf kromatografik sonuçlar elde edilir (Diltemiz, 2006). MIP hazırlama yönteminde kullanılan farklı kalıp-monomer etkileşimleri Şekil 2.5’de görülmektedir.

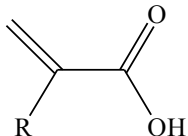
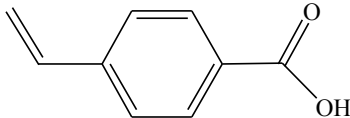
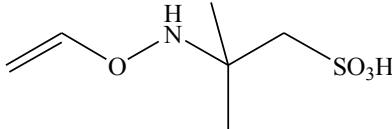
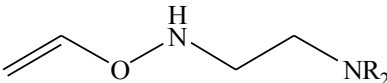
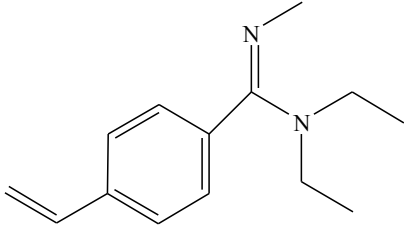
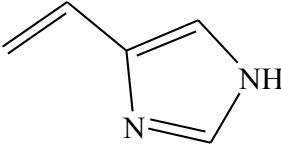


Şekil 2.5. Moleküler baskılanmış polimerlerde kalıp-fonksiyonel monomer etkileşimleri: (a) π - π etkileşimi, (b) kovalent etkileşim, (c) metal-ligand etkileşimi, (d) hidrojen bağı ile etkileşim, (e) hidrofobik ya da van der Waals etkileşimi, (f) iyonik etkileşim

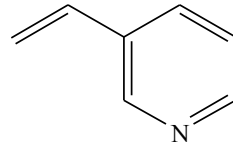
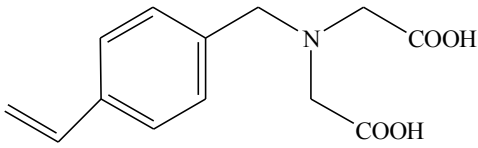
2.7.3. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan fonksiyonel monomerler

Moleküler baskılı polimerlerde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki geri-bağlanma basamağı çok önemli olduğu için fonksiyonel monomerlerin seçimi kritiktir. Fonksiyonel monomer için anahtar eleman, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun bağlanma bölgelerinin sayısıdır. MIPS'in etkinliği kendi yükleme kapasitesi ve seçiciliği artırılarak geliştirilebilir. Optimal bir konuk-fonksiyonel monomer etkileşimi başarılı baskılama üzerine belirleyici bir etkiye sahip olduğundan, uygun monomer seçimi başarılı baskılama sürecinde kritik bir rol oynamaktadır (Hiratania ve Alvarez-Lorenzo, 2004). MIP'lerin sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerlerin listesi Çizelge 2.4'de verilmiştir.

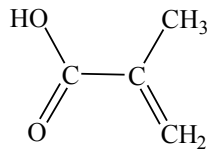
Çizelge 2.4. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler (Dmitrienko ve ark. 2004).

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısı
Akrilik asitler (R=H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	
Vinilbenzoik asitler	
Akrioloamidosülfonik asitler	
Aminometakril amidler	
N,N'-Dietil-4-vinilbenzamin	
Vinilimidazoller	

Çizelge 2.4. (devam) Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler (Dmitrienko ve ark. 2004).

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısı
Vinilpiridinler	
N-(4-vinil)-benzil iminodiasetik asit	

Kovalent olmayan moleküler baskılamada hidrojen bağı oluşturma özelliğine sahip olması nedeniyle metakrilik asit yapısında da bulunan karboksilik asit grupları kullanılır (Lanza ve Sellergren 1999; Takeuchi ve ark. 1999). Şekil 2.6’de metakrilik asit yapısı görülmektedir.



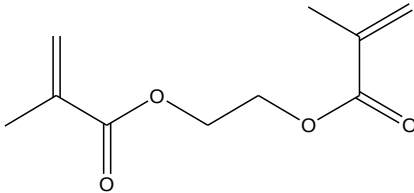
Şekil 2.6. Kovalent olmayan MIP hazırlamada kullanılan metakrilik asit(MAA) yapısı

Metakrilik asit hidrojen bağı oluştururken donör ve akseptör olarak davranabilmektedir ve bu özelliği geri-bağlanma çalışmalarında pek çok analitin tutulması için avantaj sağlamaktadır (Andersson ve ark. 1994; Sellergren 2000). MAA temel fonksiyonel gruplarla güçlü etkileşimler yapabilmesine karşın, polar çözücülerde hidrojen bağı oluşturma yeteneği çok güçlü değildir. Bu nedenle asetonitril gibi kloroformdan daha polar çözücülerde gerçekleştirilen moleküler baskılamalarda fonksiyonel monomer olarak MAA yerine akrilamid monomerleri tercih edilir. Akrilamid, MAA’dan daha az asidik olmasına karşın daha polardır ve kalıpla polar ortamda güçlü hidrojen bağı oluşturur.

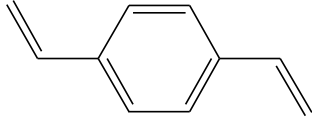
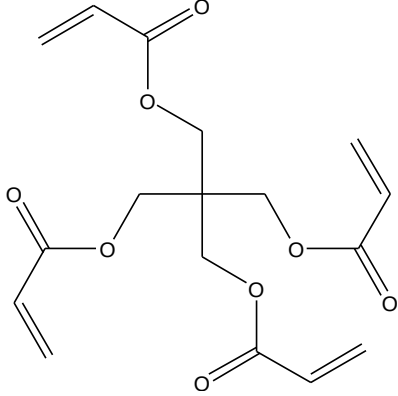
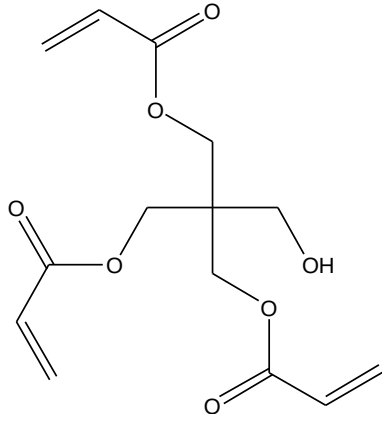
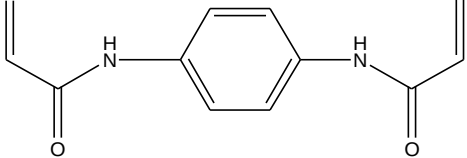
2.7.4. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

MIP hazırlarken bir diğer önemli nokta çapraz bağlayıcının seçimidir. Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılmasından sonra kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer ağ örgüsü oluşturmak için kullanılır (Idziak ve ark. 2001). Çizelge 1.2’de yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcıların listesi verilmiştir. Etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinil benzen (DVB) en çok kullanılan çapraz bağlayıcılardır. Etkin bir baskılama için, çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomerler uyum içinde olmalıdır. Aksi takdirde fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkar ve kopolimerizasyon gerçekleşmez. Çizelge 2.5’de moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar gösterilmiştir.

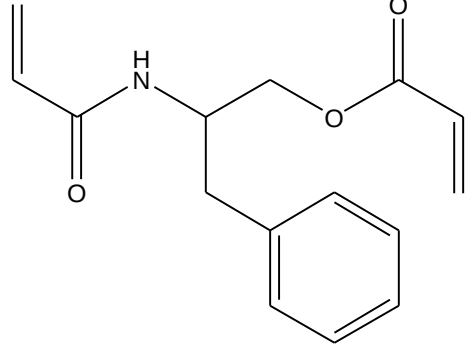
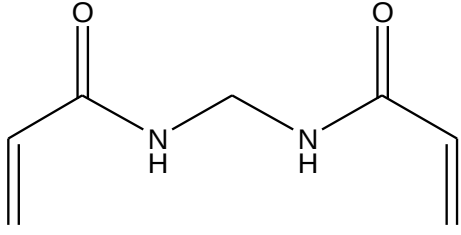
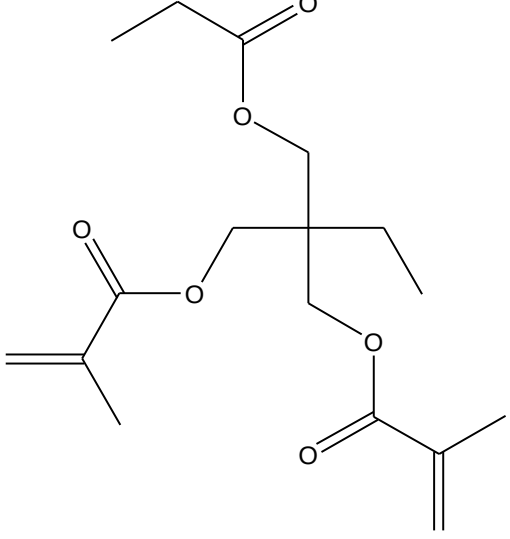
Çizelge 2.5. Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar.

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Molekül Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	

Çizelge 2.5. (devam) Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar.

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Molekül Yapısı
p-Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetrakrilat	
Pentaeritrol triakrilat	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	

Çizelge 2.5. (devam) Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar.

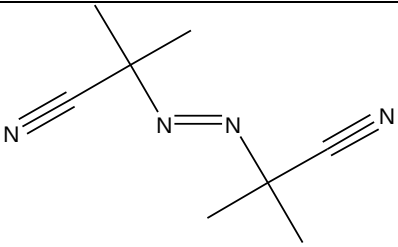
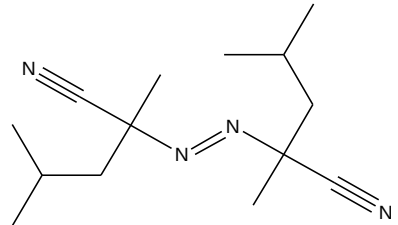
Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Molekül Yapısı
N,O-bisakriloil-L-fenilalaninol	
N,N'-metilendiakrilamid	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	

MIP’lerde polimer ağ-örgüsü içinde analite seçici oyuk oluşumu uygun çapraz bağlayıcı ve çapraz bağlayıcı / fonksiyonel monomer derişim oranına bağlıdır. Farklı çapraz bağlayıcı / fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılı polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur ve bu da seçiciliği etkiler (Diltemiz 2006).

2.7.5. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan başlatıcılar

Radikal polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısı bozunmasıyla başlatılabilir. Genellikle Çizelge 2.6’de yaygın olarak kullanılan başlatıcıların listesi verilmiştir. 2,2’-azobis(izobutironitril) (AIBN) ve 2,2’-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADV N) kullanılır. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Bu koşullarda, ısı bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

Çizelge 2.6. Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca başlatıcılar.

Başlatıcılar	Başlatıcıların Molekül Yapısı
2,2’-azobis(izobutironitril) (AIBN)	
2,2’-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADV N)	

2.7.6. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çözücüler

Çözücü, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını, gözenekli polimerde ise gözeneklerin oluşmasını sağlar. Genellikle MIP'ler çözücü bazlı ortamlarda hazırlanır ve kullanılır. Bu nedenle MIP'lerin sentezinde önemli bir nokta da çözücü seçimidir. Çözücü polimerizasyon bileşenlerini çözmesine, tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasına ilaveten gözenek oluşumunu ve sıcaklık dağılımını sağlar. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir (Yu ve Mosbach 1997).

Hazırlanan polimerin analite seçiciliği için oluşan kavitenin analite tam uygun boyutta olması yani ne çok dar ne de çok gevşek olması çözücü seçimine bağlıdır. Ayrıca MIP'ler farklı çözücülerde farklı şişme özellikleri gösterirler. Şişme fonksiyonel grupların üç boyutlu yapısını değiştirdiği için ve bu MIP'in seçiciliğinin değişmesine yol açtığından analit tanıma basamağında daha zayıf bağlanmalar oluşmaktadır (Diltemiz 2006).

Polimerizasyon çözücüsü, monomerlerle baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimlerin oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik olmalıdır (Chapuis, F. ve ark. 2004). Normalde toluen gibi protik olmayan çözücüler hidrojen bağı kararlı kıldığı için tercih edilir. Bununla birlikte, kompleksleşmede hidrofobik kuvvetler kullanılıyor ise çözücü olarak su seçilebilir (Biçen 2009).

2.7.7. Moleküler baskılı polimerlerin özellikleri

MIP'ler, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar, metal iyonlar ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları nedeniyle oldukça dayanıklıdır. Ayrıca polimerlerin depolama dayanıklılıkları da çok yüksektir. Dönüşümlü derecelerde onlarca yıl muhafaza edilebilme performansı gösterir yani polimer uzun süre özelliğini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilir. Çizelge 2.7'de polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri verilmiştir.

Çizelge 2.7. Polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri

Özellikleri	Karakteristikleri
Fiziksel Dayanıklılığı	Mekanik baskıya, yüksek basınca ve yüksek ısıya dayanıklı
Kimyasal Dayanıklılığı	Asitlere, bazlara, çeşitli organik çözücülere ve metal iyonlara dirençli.
Depolama Dayanıklılığı	Performansı kaybetmeden çok uzun süre dayanabilir.
Kapasitesi	0.1-1 mg baskılanmış molekül/g polimer
Geri Dönüşümlülüğü	>99%

2.7.8. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları

Molekül baskılanmış polimerler aşağıdaki alanlarda kullanılmaktadırlar.

- Moleküler tanımlama çalışmalarında,
- MIP'lerin ayrılması ve izolasyonunda,
 - Kiral ayırmalar
 - Substrat-seçici ayırmalar
- Polimerin antibadi ve reseptör taklidi olarak bağışıklık sistemi analizlerinde,
 - Ligand bağlı analizlerde rakip olarak
 - Tanı kullanımlarında
- Polimerlerin katalitikte enzim taklidi olarak,
- Biyosensör olarak,
- Katı faz ekstraksiyonunda,
- Sıvı kromatografisinde,
- Kapiler elektroforezde,
- Kapiler elektorkromatografide,
- Kimyasal sensörlerde (Biçen 2009).

2.8. Nanoteknoloji

Günümüzde birçok sektörde devrim niteliğinde bir potansiyele sahip olan ve heyecan verici bir hızla gelişen nanoteknoloji bilim ve teknolojiye yeni hedeflerin en önemlilerinden biridir. Genel bir ifadeyle, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, düzenlenmesi ve yaratılması olarak tanımlanmaktadır. Nano birimi ile aslında 100 - 0.1 nanometre (nm) (10×10^{-6} metre ile 10×10^{-9} metre) arasındaki herhangi bir büyüklük ifade edilmektedir. 100 nm ve daha küçük olan yapıların oluşturulması ve bu şekilde özellikleri önemli derecede değişebilen çeşitli materyallerin sentezlenmesi ile değişik uygulamalar için daha üstün özelliklere sahip malzemeler yapılabilir.

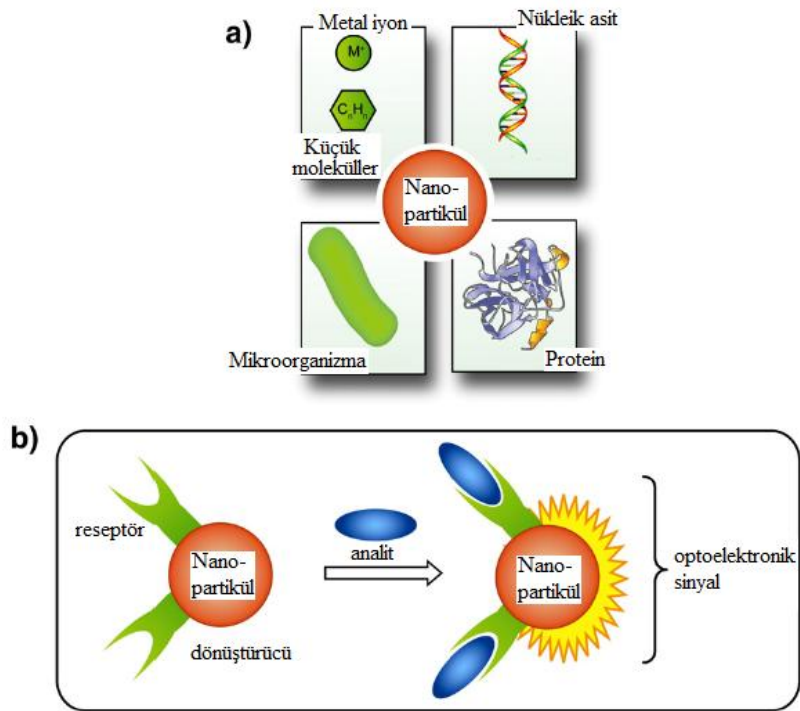
2.8.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan partiküler sistemlerdir. Geleneksel baskılanmış MIP'lere küçük partiküllerin elde edilmesi için öğütme işlemi uygulanmalıdır. Son zamanlarda yüksek verimi, boyutunun ve boyut dağılımının kolay kontrol edilebilmesi nedeniyle MIP nanopartiküllerin hazırlanması, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Kempe ve Kempe, 2006; Ciardelli ve ark., 2006). Li ve arkadaşları MIP nanopartiküllerin sentezinde kullanılabilecek bir çeşit blok kopolimer tasarlamışlardır. Fonksiyonel gruplara sahip bloklardan biri, kalıp molekül ile hidrojen bağı etkileşimini ve eşzamanla mikromisel oluşumunu sağlarken, polimerleşebilen grupları içeren diğer blok, düzgün nanopartiküllerin oluşumunda çapraz bağlama ajanının görevini üstlenmektedir.

Sonuçlar, nanopartiküllerin boyut ve biçiminin baskılama verimi için oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Daha küçük boyutlu olmalarından dolayı MIP nanopartiküller, daha yüksek afinite, seçicilik ve bağlanma bölgelerine erişim kolaylıklar sağlamaktadır. MIP nanopartiküllerin (100 nm), normal partiküllerden (5 μ m) tam 2.5 kat daha fazla bağlanma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2006). Tan ve arkadaşları miniemulsiyon polimerizasyonu ile yaklaşık 40 nm boyutunda ribonükleaz A (RNase A), sığır

serum albümini (BSA) ve lizozim (Lys) yüzey baskılanmış nanopartiküller sentezlemişler ve bunların seçicilik ve tekrar kullanılabilirliklerini incelemişlerdir. Hazırlanan baskılanmış nanopartiküllerin hedef moleküllere karşı yüksek seçicilik göstermişlerdir. Bu yüksek seçiciliğin nedeni ise yüzey arttırıcı moleküller ile proteinler arasındaki etkileşim olduğunu belirtmişlerdir (Tan ve ark., 2008).

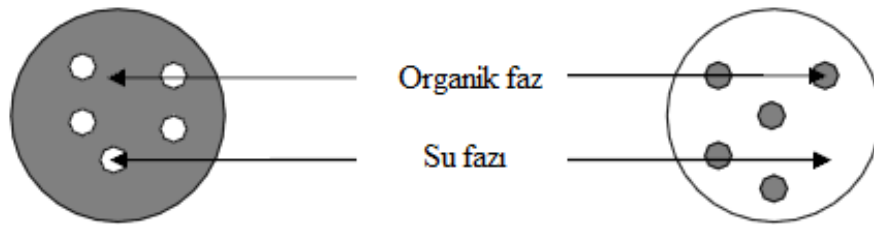
Kimyasal ve biyolojik ajanlar tıp, adli tıp, tarım ve çevre bilimlerinde önemli rol oynar. Hassas metotlar, protein ve nükleik asit gibi biyobelirteçlerin hastalığın erken aşamalarında tespitine olanak sağlayarak daha iyi sağlık ve daha iyi bir tedavi için umut verir. Teknoloji platformları sensörler yüksek seçicilik, hassasiyet ve kararlılık sağladığı için yüksek talep vardır. Nanopartiküllerin (NPs) birçok farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmalarından dolayı yeni kimyasal ve biyolojik algılama sistemleri yaratmak için umut vermektedir (Agasti, 2010) Şekil 2.7’de nanopartikül tabanlı algılama için hedef örnekler ve nanopartikül tabanlı algılama sistemlerinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.7. a) Nanopartikül tabanlı algılama için hedef örnekleri b) Nanopartikül tabanlı algılama sisteminin şematik gösterimi

2.9. Emülsiyonlar

Emülsiyonlar, basit bir tanımlama ile, birbiri ile karışmayan en az iki sıvının birbirleri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Bu sistemler bir hidrofilik bir de lipofilik iki fazdan oluşurlar. Basit veya klasik emülsiyonlarda en az iki faz bulunur. Bu iki faz, emülsiyonun iç ve dış fazı olarak adlandırılmaktadır. Dış faz aynı zamanda sürekli faz olarak da adlandırılabilir. Şekil 2.8’de emülsiyonların klasik görünümü verilmiştir.



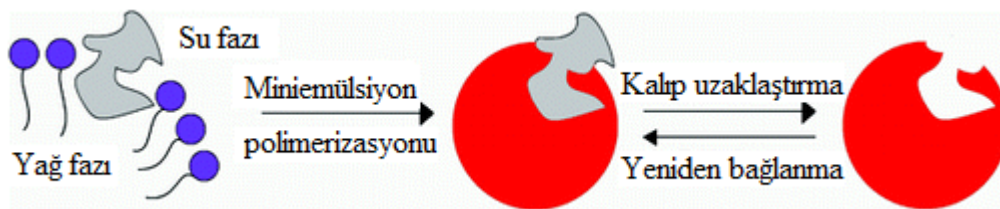
Şekil 2.8. Klasik emülsiyonların şematik görünüşü

Stabil bir emülsiyon elde etmek için boyut küçültme işleminden sonra yeni oluşan sınır yüzeyler hemen stabilize edilmelidir (Özcan 2011). Ayrıca yeni sınır yüzeyi yaratmak için uygulanan boyut küçültme işleminde sarf edilecek enerji, sınır yüzey geriliminin azaltılması ile düşürülebilmektedir. Stabilizasyon, emülgatör kullanımı ile sınır yüzey geriliminin azaltılması sonucunda sağlanabilmektedir. Literatürde miniemülsiyon çalışmalarının çoğu, anyonik emülgatör olan sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılarak yapılmıştır. Emülgatör çeşidinin emülsiyon stabilizasyonu üzerine etkisinin yanı sıra aynı zamanda emülgatör miktarının da emülsiyon stabilizasyonu üzerine büyük etkisi vardır. Emülsiyon içerisindeki emülgatör miktarı arttıkça damlacık boyutunda azalma olur. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta, gereğinden az ya da fazla emülgatör kullanılması miniemülsiyon polimerizasyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Eğer emülgatör miktarı aşırı derecede artırılırsa emülgatör molekülleri bağlanacak serbest ara yüzey bulamazlar. Bu fazla emülgatörler bir araya gelerek misel yapılarını

oluştururlar. Bu oluşum miniemülsiyon polimerizasyonunda istenmeyen bir durumdur.

2.9.1. Miniemülsiyonlar ve özellikleri

Miniemülsiyonlar; yağ, su, emülgatör ve bir hidrofobtan oluşan güçlü bir etkileşim sonucu 50-500 nanometre büyüklüğünde stabil ve homojen damlacık üretilmesini mümkün kılan ideal sistemlerdir (Landfester, 2001). Bu boyutta üretilen damlacıklar partikül büyümesinin ve partikül nükleasyonun kontrol edilmesini sağlamaktadır. Çekirdek-kabuk nanopartikül üretiminde ya da inorganik nanopartikülleri polimer içerisine çöktürülmesinde miniemülsiyon polimerizasyonu çok elverişli bir tekniktir (Hecht ve ark., 2011). Çok düşük miktarda emülgatör kullanımı ile polimerizasyon öncesi ve sonrasında kararlı emülsiyon üretilmektedir. Miniemülsiyonların stabilizasyonu sadece emülgatör kullanımı ile değil aynı zamanda etkin bir emülgatör/hidrofob (ya da hidrofil) kullanımı ile sağlanabilmektedir. Suda hiç çözünmeyen bu maddeler emülsiyonun difüzyonsal stabilitesini artırmak diğer bir deyişle emülsiyon polimerizasyonunda görülen monomer difüzyonunu engellemek için miniemülsiyonda kullanılırlar. Genellikle hegzadekan gibi uzun alkan zincirleri veya setil alkol gibi uzun alkol zincirleri kullanılmaktadır (Özcan, 2011). Şekil 2.9'de miniemülsiyon polimerizasyonu yoluyla proteinin yüzeye baskılanması gösterilmiştir (Tan ve ark., 2008).



Şekil 2.9. Miniemülsiyon polimerizasyonu ile proteinin yüzeye baskılanması

Hidrofofların zincir uzunluğunun artması ve sürekli fazda çözünürlüğünün azalması miniemülsiyonun stabilitesini artırmaktadır (Ugelstad ve ark., 1980; Landfester, 2001). Kullanılan bu yardımcı emülgatörler sürekli faza difüze olmadıkları için dispers faz damlacığının ozmotik basıncını artırarak Ostwald damlacık büyümesini etkin bir şekilde engellemektedirler. Örneğin hegzadekan kullanımı monomer fazının serbest enerjisini azaltır ve bu da monomer damlacıkları içerisinde monomer konsantrasyonunu artırmaktadır (Landfester, 2001).

2.10. Biyosensörler

Geçtiğimiz yıllarda, birçok farklı tipte biyosensör, biyomedikal, çevresel araştırmalar ve başka birçok alanda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Halen günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmosötik ve kimya endüstrilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. (Asav, 2009).

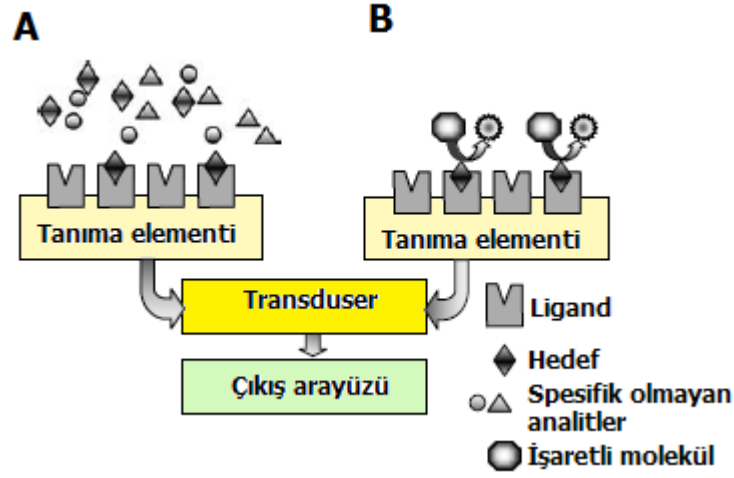
Uluslararası saf ve uygulamalı kimya (IUPAC) tarafından biyosensör için yapılan tanım şöyledir ; “Biyosensörler izole edilmiş enzimler, immunosistemler, organlar, organeller veya tüm hücrelerce meydana getirilen spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanarak kimyasal bileşikler elektriksel, termal veya optik sinyaller aracılığıyla algılayan cihazlardır”. Bundan dolayı, neredeyse tüm biyosensörler iki-bileşenli sistemden oluşur: hedefle spesifik bağlanma yapan veya biyokimyasal reaksiyona giren bir biyolojik tanıma kısmı (ligand) ve bir sinyal dönüştürme ünitesi (transduser). Şekil 2.10’de biyosensörlerin yapısı gösterilmiştir (Asav, 2009).



Şekil 2.10 Biyosensörlerin yapısı

İlk biyosensör olarak gösterilen ve Dr. Leland C. Clark tarafından 1960'lı yıllarda geliştirilen, glikoz konsantrasyonunu glikoz oksidaz enzimiyle ölçmeye yarayan, karbonhidrat metabolizması ile ilgili hastalıklarda teşhis ve tedavi yönünden önemli olan “enzim elektrodu” ile ortaya çıkmıştır. Bugün hala, en sık kullanılan biyosensörler glikoz analizi için kullanılanlardır (Kılıç, 2011).

Virüsleri, membranları ve protein komplekslerini içeren birçok biyolojik sistemin nanometre boyutlarında olduğu düşünüldüğünde, nanomalzemelerin biyomedikal ve biyoanalitik cihazlardaki kullanımının ne denli önemli olduğu bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Şekil 2.11'de biyosensörlerin genel şematik gösterimi, tanıma elementinin etiketsiz olduğu doğrudan tanıma yapan ve analitin etiketli bir molekülle indirek yoldan tayin yapıldığı biyosensörler gösterilmiştir (Asav, 2009).

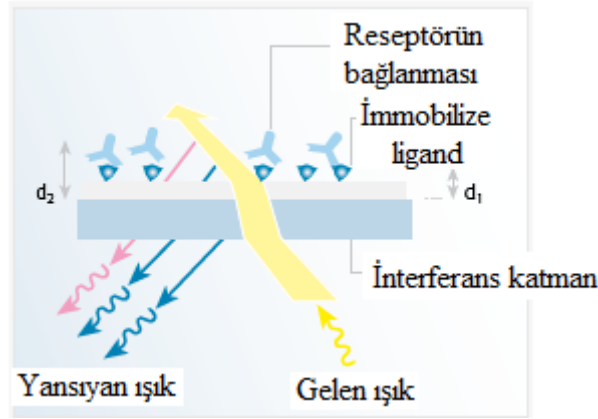


Şekil 2.11 Biyosensörlerin genel şematik gösterimi (a) doğrudan deteksiyon yapan, tanıma elementi etiketsiz olan biyosensörler (b) analitin etiketli bir molekülle tayin edildiği indirekt biyosensörler

2.11. Reflektometrik İnterferans Spektroskopisi (RİfS)

Reflektometrik interferans spektroskopisinde (RİfS) düz bir cam substrat yüzeyine titanyum oksit (TiO_2) ve silisyum oksit (SiO_2) gibi yansıtıcı tabakaların, kimyasal buharlaştırma yöntemi ile kaplanması ile hazırlanan sensör sistemleridir. Bu optik tayin yönteminde, polarize olmayan beyaz ışık cam substrat yüzeyine belli bir açıda gönderilir ve optik tabakanın kalınlığındaki değişim ile orantılı olarak yansıtılır. Yansıma miktarı cam substrat yüzeyine bağlanma miktarı ile değişir. Bu yöntemle optik kalınlıktaki 2 pm'den daha az bir artış dahi belirlenebilmektedir (Mace, 2008; Alvarez, 2008).

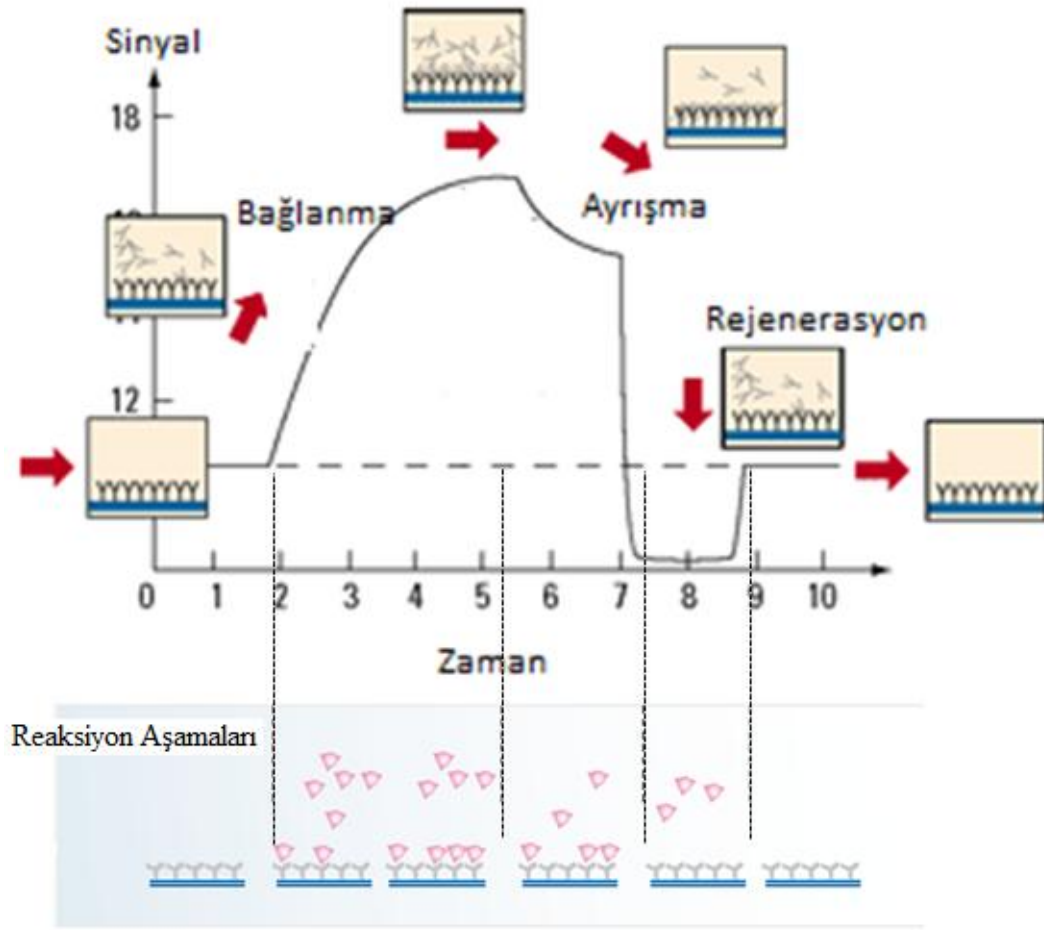
Şekil 2.12'de reflektometrik interferans spektroskopisinde kullanılan cam substrat yüzeyine gelen ve yansıyan ışınların kırılma açılarının nasıl değiştiğini gösteren temsili şema verilmiştir.



Şekil 2.12. RİfS’da kullanılan çip yüzeyine gelen ve yansıyan ışınların doğrultularının nasıl değiştiğini gösteren temsili şema.

RİfS yönteminde kullanılan cam substratlara farklı fonksiyonel grupların bağlanması ile yüzeyler fonksiyonlandırılabilir. Bu şekilde biyoyumluluğu yüksek, spesifik olmayan bağlanmaların ise minimum olduğu biyosensör yüzeyler elde edilebilir. Proteinler, peptitler, nükleik asitler ve DNA oligonükleotidleri, karbonhidratlar, lipidler ve küçük ilaçlar, karboksil amino veya tiol grupları ile fonksiyonelize edilmiş ve biyomoleküller herhangi bir etiketle veya ihtiyaç duymadan pg düzeyinde tayin edilebilir (Yazar, 2010).

Ligand molekül ile hedef molekül arasındaki etkileşim sonucu oluşan bağlanma, sensör yüzeyindeki ortamın bileşimini değiştirir. Bu değişiklik RİfS’da yansıyan ışının açısında bir kaymaya neden olur. İşte RİfS’ da amaç ışığın açısındaki bu kayma miktarını tespit etmektir. Şekil 2.13’de reaksiyon aşamalarının RİfS yüzeyindeki değişiklikleri ve bu değişikliklere bağlı olarak sensogramda oluşturdıkları cevaplar verilmiştir.



Şekil 2.13. Reaksiyon aşamalarının RİFS yüzeyindeki değişiklikleri ve sensogramdaki karşılığı.

RİFS yöntemi, hızlı ve basit bir yöntemdir. Ayrıca sıcaklık değişimlerinden etkilenmez. pg/mm^2 'den daha az bağlanmalara dahi yüksek hassasiyete sahiptir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Etilenglikoldimetakrilat (EDMA) Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmış ve hidrokinonin inhibitörü ile vakum altında distile edilerek kullanılmadan önce 4°C’da saklanmıştır. 2,2’-azobis(2-metilpropionitril) (AIBN), hegzadekan, polietilen imin (PEI, MN~60,000), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve L-Alanin Sigma–Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm’dir. Tüm cam malzemeler kullanımdan önce seyreltilmiş nitrik asitle yıkanmıştır. Tampon ve örnek çözeltileri 0.2 µm membran’dan (Sartorius, Gottingen, Germany) geçirilerek filtre edilmiştir.

Diğer çözelti hazırlamada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından elde edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

FTIR spektrumları Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer cihazı ile alınmıştır. pH ölçümleri InoLab WTW Series pH730 model pH metre ile yapılmıştır. Spin kaplayıcı Delta 10TT, Süss-MicroTec, Garching kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskopisi için Oxford Instruments-7430 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) cihazı kullanılmıştır. Polimerlerin Zeta-size analizleri için Zeta Sizer Nano Series (Nano- ZS) Malvern Instrument kullanılmıştır. Santrifuj işlemleri Cenrifuge MPW-251 ile gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon için Bandelin UW 2070 homejenizatör kullanılmıştır. Ultrasonik banyo için Bandelin Sonorex kullanılmıştır. AFM görüntüleri Ambious

technology quesant instrument corporation ile alınmıştır. Afinite ölçümleri (Analytik Jena, BIAffinity, Jena, Germany) markalı reflektometrik interferans spektrometresiyle gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. MIP nanopartiküllerin hazırlanması

MIP nanopartiküller literatürde yer alan Belmont ve ark. yapmış oldukları miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır (Belmont ve ark.2007). Öncelikle 0,5 mmol sarkozinin 1ml'lik çözeltisi hazırlanmış. 1,72 mmol Metakrilik asit (MAA), 6.9 mmol Etilenglikoldimetakrilat (EDMA), 80 µL hegzadekan ve 30 mg 2,2'-azobisizobütironitril (AIBN) bu çözeltinin üzerine eklenerek organik faz hazırlanmıştır. Daha sonra organik faz; 18ml su içerisinde hazırlanmış 38,5 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren sulu faza eklenerek kalıp molekülün çözünmesine yardımcı olmak için 1 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur. Ardından hazırlanmış polimer karışımı polimerizasyonun gerçekleşmesi için 18 saat boyunca 65 °C'de su banyosunda bekletilmiştir. Polimerleşme gerçekleşikten sonra sudan SDS'yi uzaklaştırmak için 3 kez 5 saat boyunca diyaliz edilmiştir. Kalıp molekülü uzaklaştırmak için ise 3 kez 2 saat süreyle metanol:asetik asit (4:1) ile çözeltisi ardından da 3 defa saf metanol ile yıkanmıştır. Partiküllerin boyutları su içerisinde 30 µg/ml süspanse edilerek ölçülmüştür.

3.2.2. MIP nanopartiküllerin karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu için zeta-sizer, TEM, SEM ve FT-IR analizler gerçekleştirildi. Partiküllerin boyutları 30 µg/ml su içerisinde süspanse edilerek Malvern Instruments Zeta Sizer ile dinamik ışık saçılması yoluyla saptanmıştır. TEM analizi için, baskılı nanopartikül örnek karbon kaplı bakır üzerine bırakılmış ve oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. TEM görüntüleri 200 kV TEM mikroskobu (FEI, Tecnai G2 F30, Oregon, ABD) kullanılarak

alınmıştır. Sarkozin baskılı ve baskılanmamış MIP nanopartiküllerin SEM görüntüleri için, taramalı elektron mikroskobu (FESEM ZEISS ULTRA PLUS) kullanılmıştır. FTIR ölçümleri için, 2 mg sarkozin baskılanmış ve baskılanmamış nanopartikül 98 mg potasyum bromürle karıştırılmış ve daha sonra karışım ince bir toz elde edilene kadar öğütülmüştür. Toz bir pelet formu içine preslenerek FTIR spektrumları Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer ile alınmıştır.

3.2.3. Sarkozin baskılı RfS nanosensörün hazırlanması

RfS nanosensör literatürde yer alan ve Belmont ve ark. yapmış oldukları çalışma temel alınarak hazırlanmıştır. (Belmont ve ark. 2007). Reflektometrik interferans spektroskopisi ile uyumlu transdüser yüzey ($1 \times 1 \text{ cm}^2$ cam substrat üzerine 10 nm Ta_2O_5 ve 325 nm silika kaplı) Analytik Jena GmbH, Jena firmasından elde edilmiştir. Sarkozin baskılı nanopartiküllerin immobilizasyonundan önce RfS transdüserler asidik pirana çözeltisi ile (30% hidrojen peroksit ve 95–97% sülfürik asit, 1:3, v/v) 2 dk. boyunca muamele edilerek temizlenmiştir. Ardından su içerisinde hazırlanan 2 mg/ml polietilenimin (PEI) çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Transdüserler deiyonize su içerisinde üç kez yıkanarak vakumlu fırın içerisinde 200 mmHg, 40 °C’de kurutulmuştur. Nanopartiküllerle kaplamak için hazır hale gelen transdüser yüzey dispers edilmiş nanopartikül çözeltisi (1 mg nanopartikül/15ml su) ile spin kaplayıcı (Delta 10TT, Süss-MicroTec, Garching, Germany) kullanılarak 3 kez 5µl çözelti ile 2500 rpm’ de 1 dk. boyunca kaplanmıştır. Son olarak da, sarkozin baskılanmış RfS sensörler üç kez deiyonize su ile yıkanarak vakum altında (200 mmHg, 40 °C’de) kurutulmuştur.

3.2.4. Sarkozin baskılı RfS nanosensörün karakterizasyonu

RfS nanosensörlerin karakterizasyonu için Atomik Güç Mikroskobu (AFM) kullanılmıştır. Standart silikon konsollu (Quesant) bir kuvvet sabitiyle $\sim 40 \text{ Nm}^{-1}$ rezonans frekansı $\sim 137 \text{ kHz}$ ve eğriliği $< 10 \text{ nm}$ olarak kullanılmıştır.

Topografisi ve faz görüntüleri eş zamanlı olarak 2 Hz tarama hızında laboratuvar koşullarında elde edilmiştir.

3.2.5. RIfS nanosensörün performansının görüntülenmesi

RIfS nanosensörün hazırlanması ve karakterizasyonunun ardından sarkozin baskılı nanopartiküle immobilize sensörler RIfS sistemine takılmış ve (Analytik Jena, BIAffinity, Jena, Germany) sulu sarkozin çözeltileri sistemden geçirerek gerçek zamanlı sarkozin tayini gerçekleştirilmiştir. Bütün RIfS ölçümleri oda sıcaklığında, filtre edilmiş, degaze yapılmış bir şekilde fosfat tamponunda (10 mM, pH: 7.4 fosfat tamponu % 0.5 SDS içeren) akış hızı 5 $\mu\text{L dk}^{-1}$ olacak şekilde sürekli sistemde gerçekleştirilmiştir. 200 μL hazırlanan sarkozin çözeltileri akış hızı 10 $\mu\text{L dk}^{-1}$ uygulanmış ve yansımadaki değişiklikler anlık olarak izlenmiştir.

Rejenerasyon işleminin gerçekleştirilmesi içinde hazırlanan 0.1 mM Glisin (100 μL) ve 10 mM HCl (50 μL) çözeltileri kullanılmış ve bir sonraki ölçüm için sensör çip hazır hale getirilmiştir.

Prostat kanseri hastasından ve sağlıklı insandan alınan idrar örnekleri ise analiz yapılana kadar % 0.1 sodyum azit ve %1 EDTA eklenerek derin dondurucuda (-22 °C'de) saklanmıştır. Analiz yapılmadan önce, örnekler oda sıcaklığında çözünmüş 10 μL hacimde alınan numune fosfat tamponu (10 mM, pH: 7.4) ile 200 μL 'ye seyreltilerek analiz sürecine geçilmiştir.

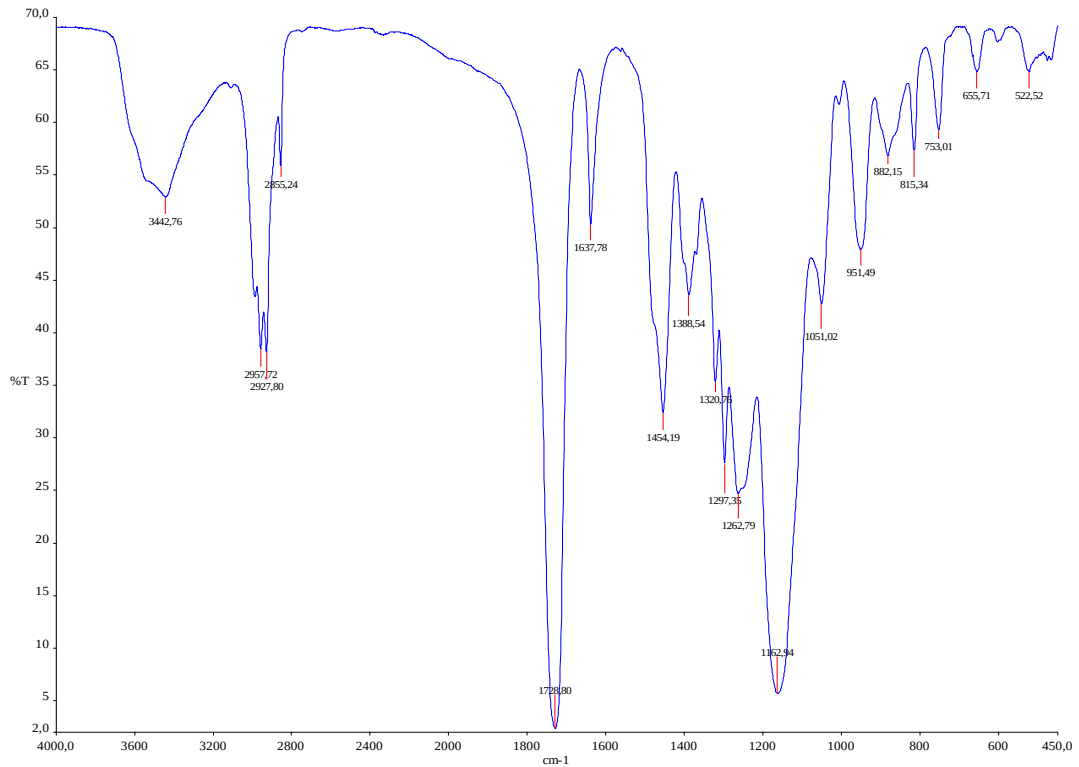
4. BULGULAR

4.1. Sarkozin baskılanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu

Sarkozin baskılı nanopartiküller iki faz miniemülsiyon polimerizasyonu metoduyla hazırlanmıştır. Tekniğin prensibi polimerizasyon stabil yağ fazından sulu faza yürütülerek gerçekleştirilir.

4.1.1. FTIR analizi

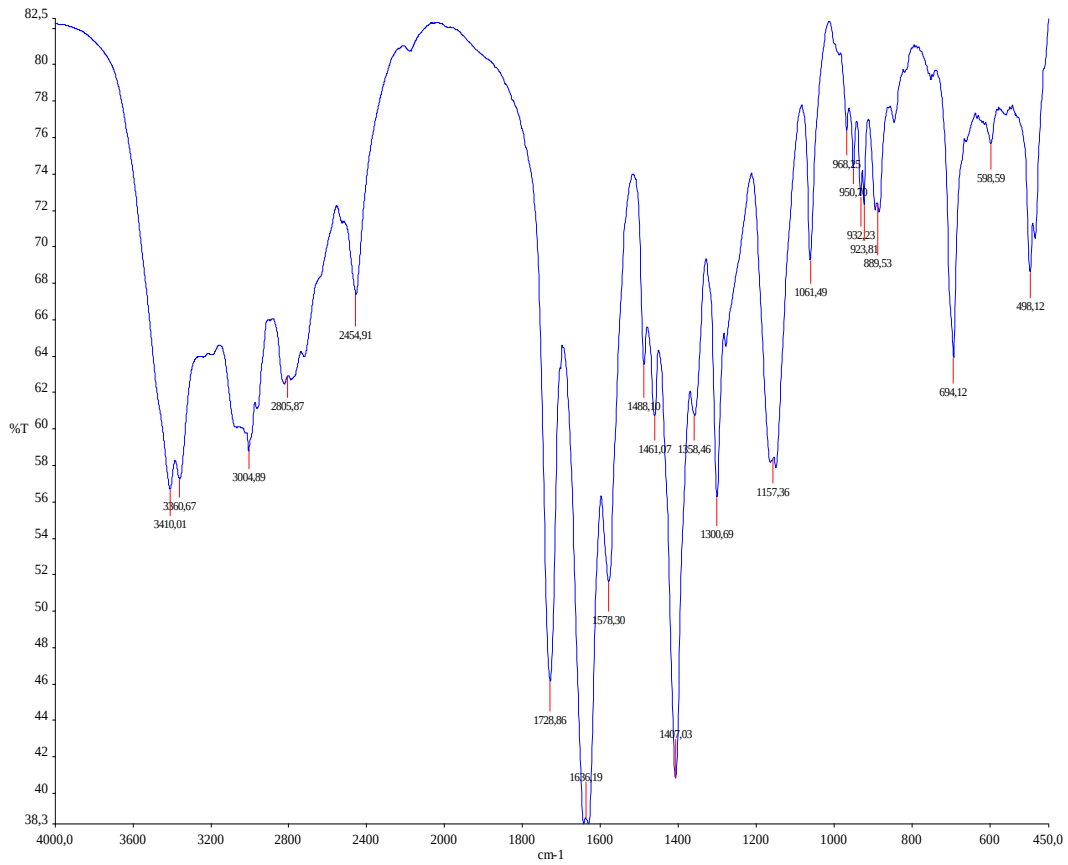
Sarkozin baskılanmış ve baskılanmamış miniemülsiyon polimerlerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum 100) kullanılarak elde edilmiştir. Kuru polimerler KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir. Şekil 4.1’de sarkozin baskılanmamış polimerin FTIR spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.1. Sarkozin baskılanmamış polimerin FTIR spektrumu

Polimerin FT-IR spektrumunda yapıya ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler; 3442 cm^{-1} 'de karboksilik aside ait O-H bandı; $2920\text{ cm}^{-1} - 2960\text{ cm}^{-1}$ aralığında C-H gerilmesine; 1728 cm^{-1} 'de karbonil piki (C=O) görülmektedir.

Şekil 4.2 'de sarkozin baskılanmış MIP nanopartiküle ait FTIR spektrumu yer almaktadır.



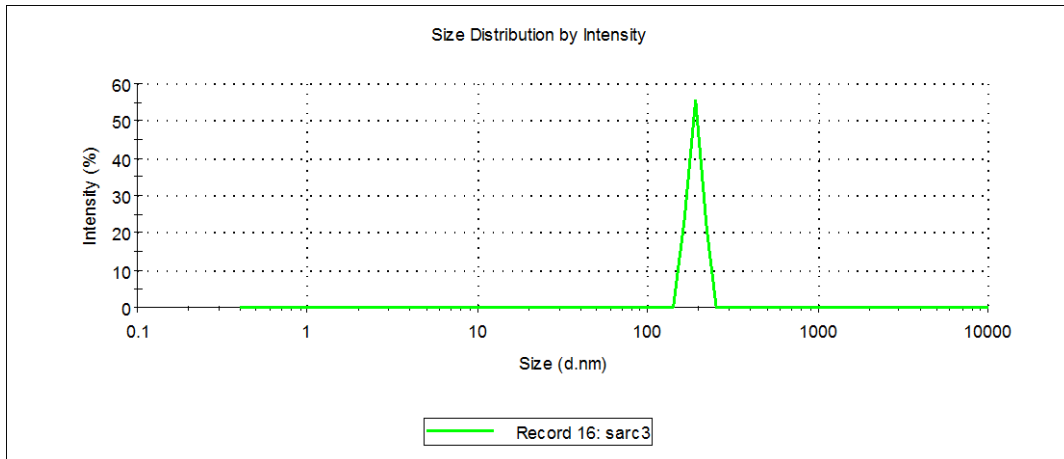
Şekil 4.2. Sarkozin baskılanmış MIP nanopartiküle ait FTIR spektrumu

Şekil 4.2'de görülen sarkozin ile oluşturulmuş moleküler baskılanmış polimere ait FT-IR spektrumundaki karakteristik pikler ise; 3360 ve 3410 cm^{-1} 'de görülen amin (N-H) pikine ait gerilme bandı; 1636 ve 1578 cm^{-1} 'de amine ait eğilme bandları; 1407 cm^{-1} 'de ise alkana ait C-H gerilmesi piki ve 1728 cm^{-1} 'de karbonil piki görülmektedir. NIP ve MIP FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında 1407 cm^{-1} 'de görülen C-H gerilmesine ait pikin MIP spektrumunda görülüp, NIP

spektrumunda görülmediği anlaşılmıştır. Bu pikin sarkozinde bulunan metil grubuna ait C-H gerilmeleri olduğu düşünülmektedir.

4.1.2. Zeta-Sizer ölçümleri

Sarkozin baskılanan nanopartiküllerin boyut analizi için, nanopartiküller 30 µg/ml olacak şekilde deiyonize su içerisinde süspanse edilmiş ve Zeta Sizer Nano Series (Nano- ZS) Malvern Instrument cihazı ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan nanopartiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6nm-6.0µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının ($1 \times 10^3 - 2 \times 10^7$ aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Şekil 4.3 'de ölçüm sonucu elde edilen analiz sonucu görülmektedir.



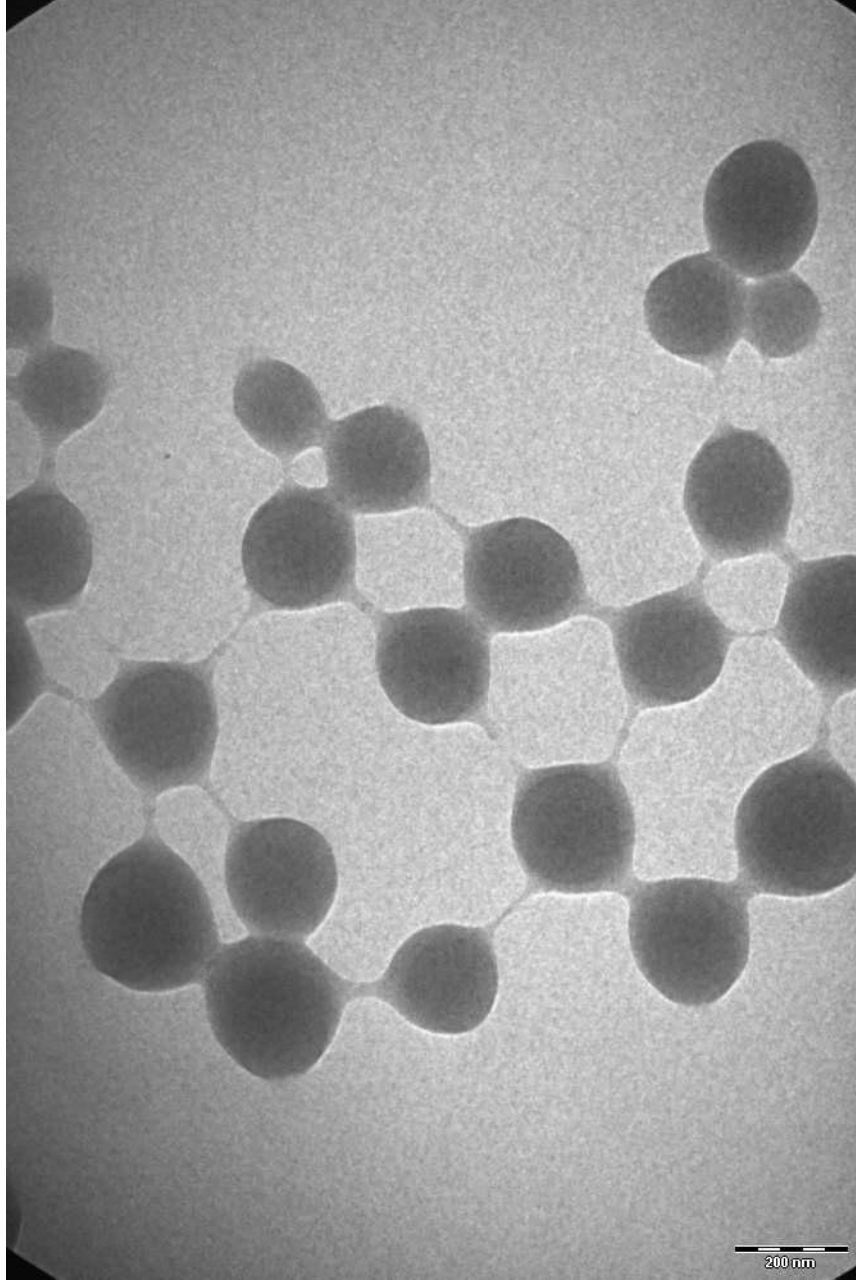
Şekil 4.3. Nanopartiküllerin zeta-sizer analiz sonucu

Elde edilen nanopartiküllerin ortama boyutları 190 nm olarak bulunmuştur.

4.1.3. TEM analizleri

Hazırlanmış nanopartiküllerin yüzey morfolojisi TEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Görüntülerinin alınması için hazırlanan süspansiyon grid üzerine damlatılarak TEM mikrografları 200 kV TEM mikroskobu ile (FEI, Tecnai G2

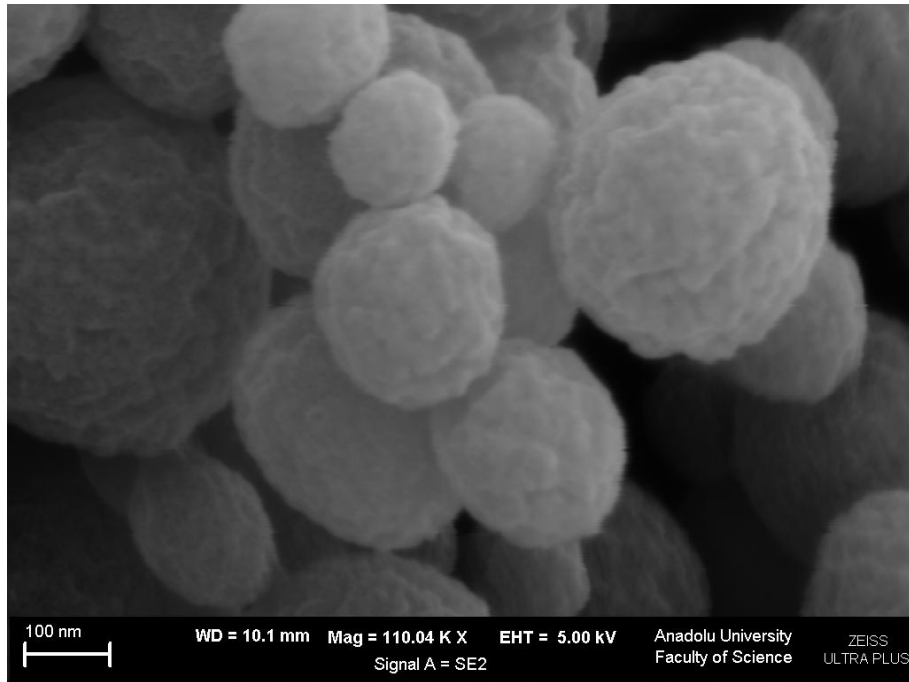
F30, Oregon, ABD) çekildi. Şekil 4.4' de elde edilen görüntüler verilmiştir. Sarkozin baskılı nanopartiküller küresel formda olup yaklaşık boyutlarının 150-190 nm arasında olduğu ve sonuçların zeta-boyutlandırıcıdan elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir.



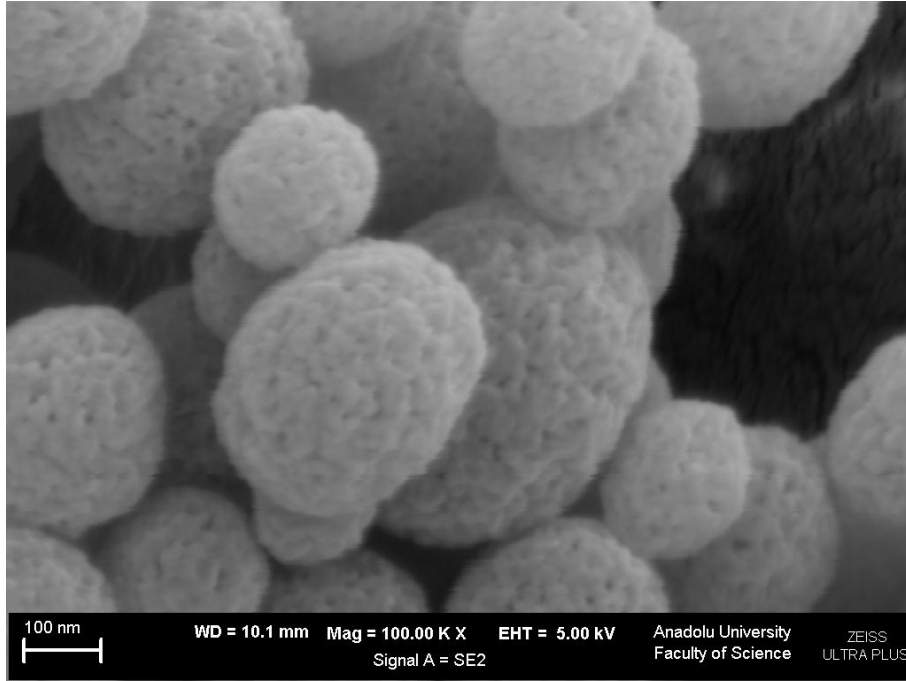
Şekil 4.4. Sarkozin baskılı nanopartiküllerin TEM görüntüleri

4.1.4. SEM analizleri

SEM görüntülemesiyle moleküler baskılanmış nanopartiküllerin yapısındaki gözenek dağılımı, gözenek boyutları hakkında bilgiler elde edilmektedir. SEM ile karakterize etmek için ilk önce sarkozin baskılı nanopartiküller kurutulmuş ve ardından altın ile kaplama yapılmıştır. Şekil 4.5’de kalıp molekül uzaklaştırılmadan önce nanopartiküllerin SEM görüntüsü yer almaktadır. Kalıp molekülü uzaklaştırmak için 3 kez 2 saat süreyle metanol:asetik asit (4:1) ile çözeltisi ardından da 3 defa saf metanol ile yıkanmıştır. Şekil 4.6’da ise yıkama sonrası sarkozin uzaklaşmış nanopartiküllerin SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.5. Yıkama öncesi nanopartiküllerin SEM görüntüsü



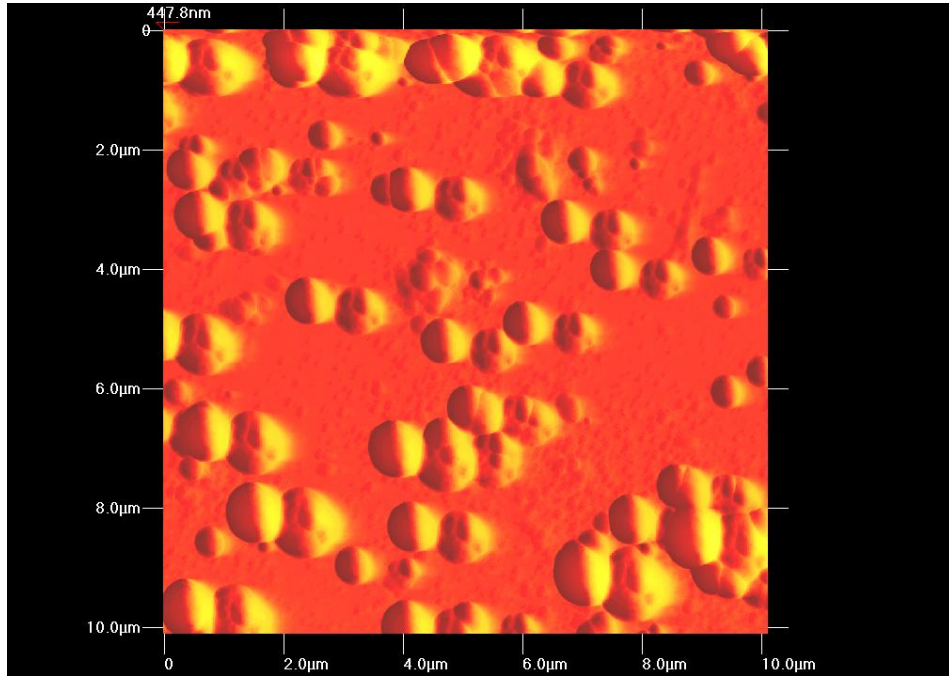
Şekil 4.6. Yıkama sonrası sarkozin uzaklaşmış nanopartiküllerin SEM görüntüsü

Görüntüler incelendiğinde yıkama sonrasında nanopartiküllerin gözenekliliğinin yıkama öncesindeki partiküllere oranla arttığı görülmektedir. Buda kalıp molekül sarkozinin yapıdan uzaklaştırıldığını ve nanopartiküllerin sarkozine seçici hale geldiğini göstermektedir.

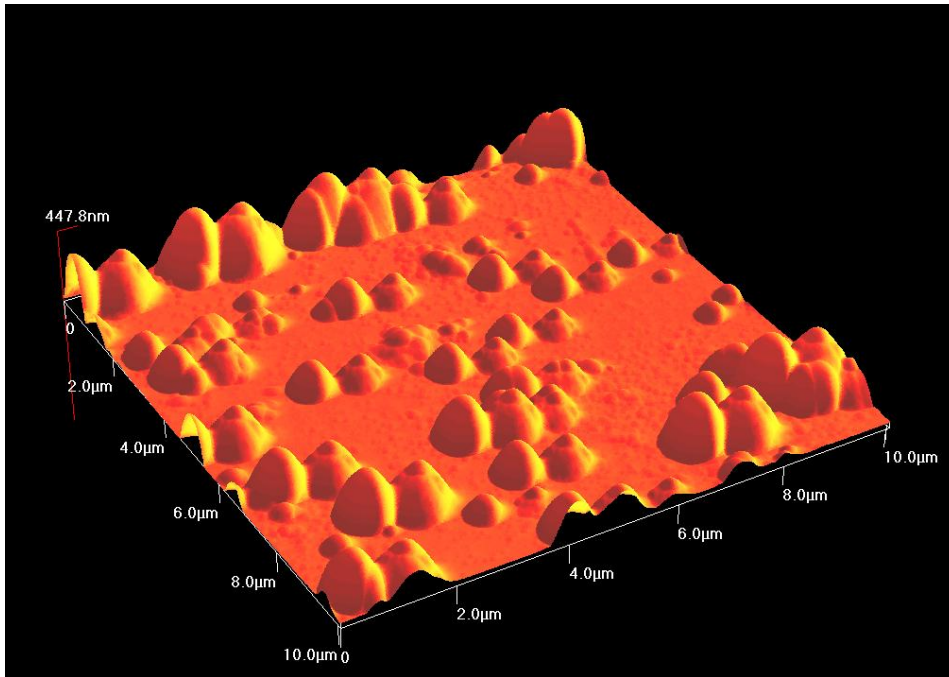
4.2. Sarkozin baskılı RI fS nanosensörün karakterizasyonu

RI fS nanosensörlerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi için Atomik Güç Mikroskobu (AFM) kullanılmıştır. Şekil 4.7’den görüldüğü gibi sarkozin baskılanmış nanopartiküller eş boyutlu olarak elde edilmiş ve polietilenimin ile modifiye edilen RI fS sensör yüzeyine homojen olarak kaplanmıştır. Hazırlanan RI fS nanosensörler sulu çözeltilerden ve gerçek örneklerden sarkozin tayini için kullanılmıştır.

a)



b)

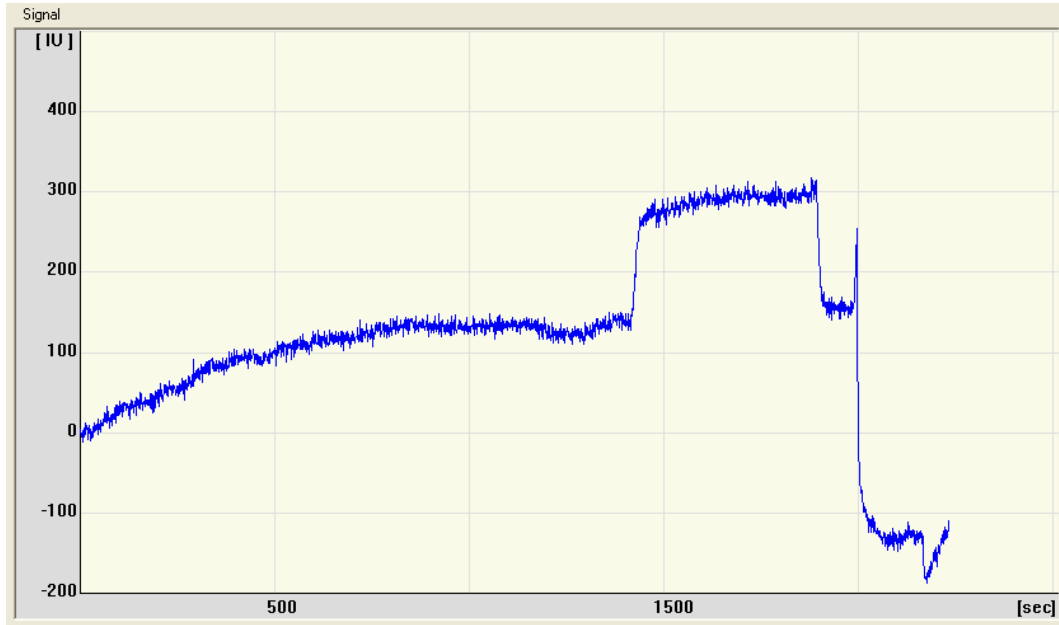


Şekil 4.7 (a,b). Hazırlanan RfS nanosensörün AFM görüntüleri

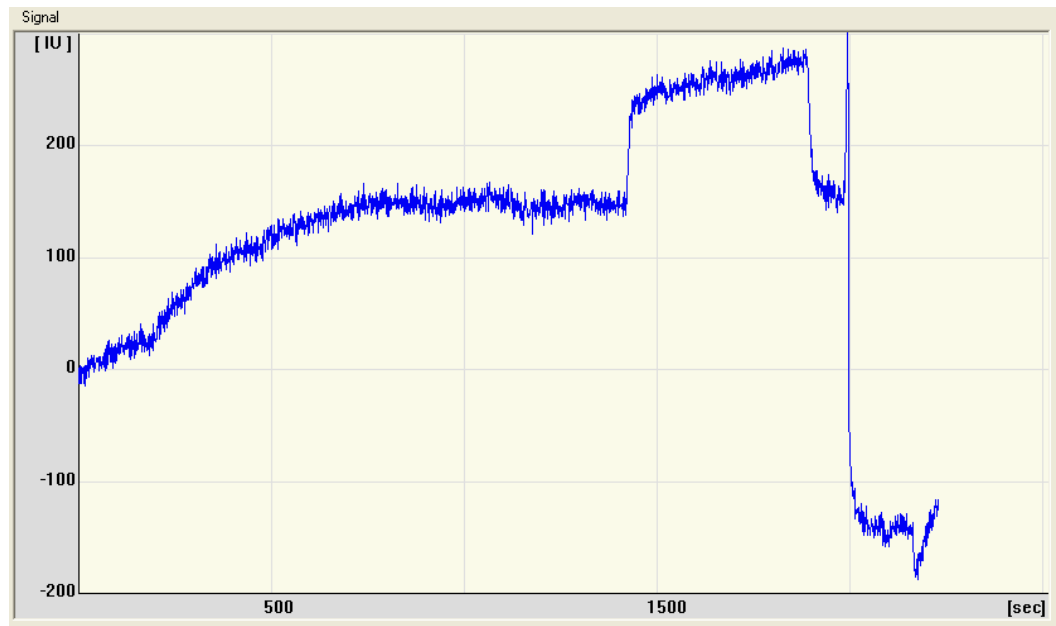
4.3. RIfS performans ölçümleri

Filtre edilmiş ve degaze yapılarak çözünmüş gazları uzaklaştırılmış fosfat tamponu (10 mM, pH: 7.4 fosfat tamponu % 0.5 SDS içeren) kullanarak gerçekleştirilen RIfS ölçümleri artan derişimlere karşılık yansıyan ışığın açısındaki değişimin ölçülmesi prensibi ile elde edilmiştir. Hazırlanan sarkozin baskılı nanopartiküle immobilize edilmiş Sensörler RIfS sistemine takılmış ve öncelikle baseline verileri elde edilmiştir. Ardından hazırlanan sensörün bağlanma özelliklerini incelemek için artan derişimlerde sarkozin çözeltileri RIfS sisteminden geçirilmiştir. Bunun için su içerisinde derişim değerleri 500 μ M – 3000 μ M olacak şekilde sarkozin çözeltileri hazırlanmıştır. Düzgün baseline verilerinin elde edilmesinin ardından 0.5 mM’lık sarkozin çözeltisi sisteme verilmiştir. Bağlanan sarkozinin uzaklaştırılması ve sensörün rejenerasyonu için 0.1 mM Glisin / 10 mM HCl çözeltisi sistemden geçirilmiş ve son olarak tampon çözeltisi geçirilerek baseline elde edilmiştir. Aynı işlem sırasıyla diğer derişimler içinde tekrarlanmıştır. Elde edilen sensogramlar şekil 4.8 (a - d) görülmektedir.

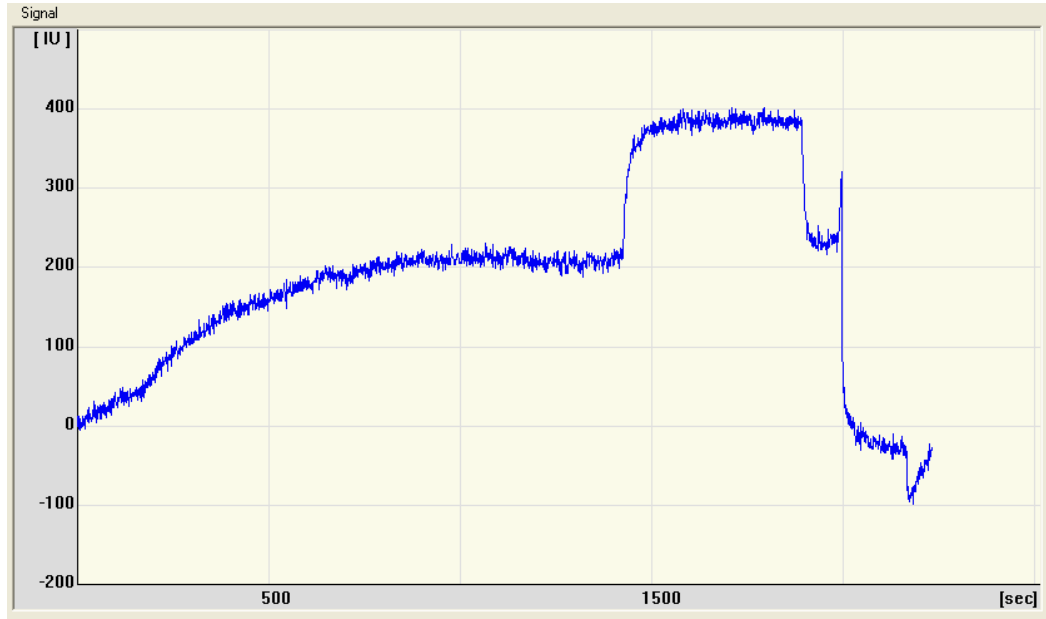
İnterferogramlardan da görüldüğü gibi sarkozin molekülünün, baskılı nanopartiküllere bağlanması ile sinyal artmış ve yaklaşık 30 dk.’da dengeye ulaşmıştır. Aynı zamanda artan sarkozin derişimi ile sinyal şiddetinde de artış meydana gelmiştir.



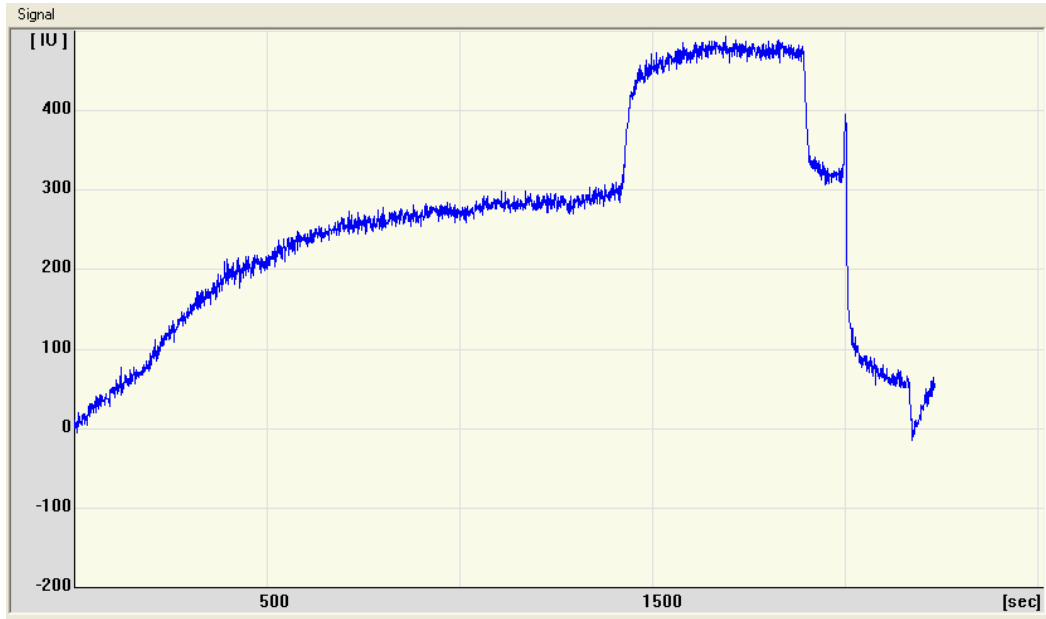
a. 0.5 mM sarkozin için elde edilen sensogram



b. 1 mM sarkozin için elde edilen sensogram



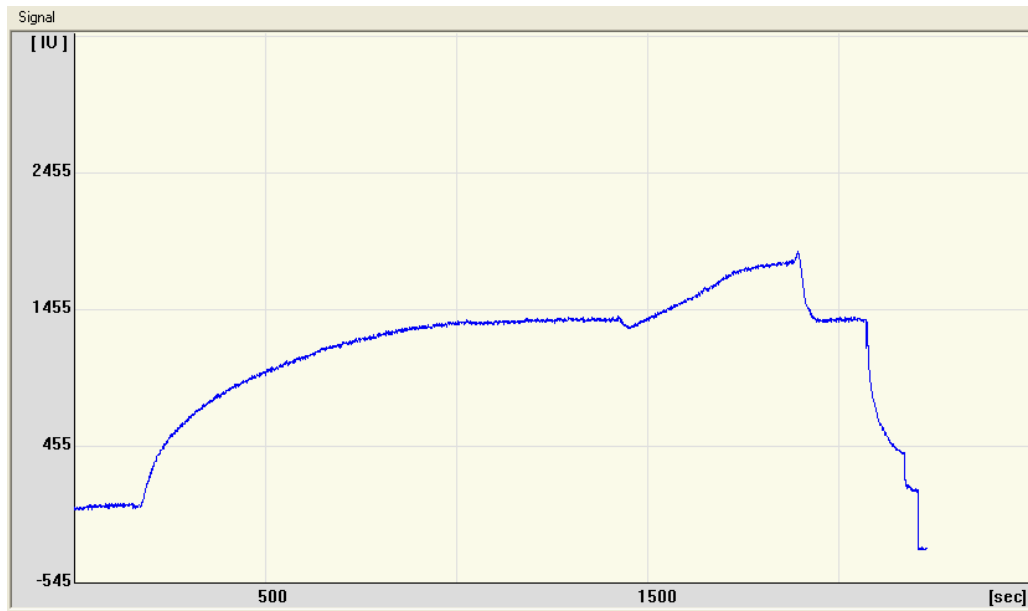
c. 1.5 mM sarkozin için elde edilen sensogram



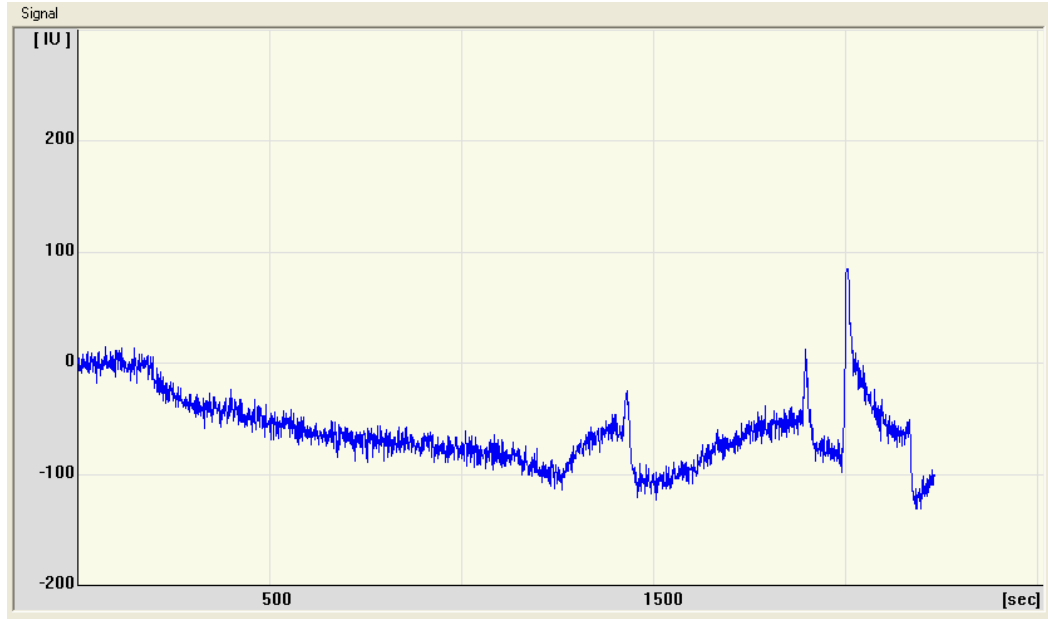
d. 3 mM sarkozin için elde edilen sensogram

Şekil 4.8. a) 0.5 mM sarkozin için elde edilen sensogram b) 1 mM sarkozin için elde edilen sensogram c) 1.5 mM sarkozin için elde edilen sensogram d) 3 mM sarkozin için elde edilen sensogram.

Sulu ortamda hazırlanan sarkozin çözeltilerin analizlerinin ardından her seferinde rejenerasyon işlemi yapılmıştır. Ayrıca cihaz içerisinde kirlilik kalması ihtimaline karşın reflektometrik interferans spektrometre cihazı gerekli temizleme işlemleri yapılarak gerçek numunelerle analize hazır hale getirilmiştir. Öncelikle prostat kanseri hastasına ait idrar numunesi 10 μL hacimde alınarak pH 7.4 10 mM fosfat tamponuyla 200 μL 'ye seyreltilmiştir. Sistemde kalma ihtimali olan safsızlıkların giderilmesi için sensör çip 10 dk. süre ile tampon geçirilerek yıkanmıştır. Aynı işlem sağlıklı insandan alınan idrar numunesi içinde tekrarlanmış ve 10 μL hacimde alınan örnek 200 μL 'ye fosfat tamponu kullanılarak seyreltilmiştir. Hazırlanan RIfS nanosensör ile gerçek numunelerdeki sarkozin tespit işlemi gerçekleştirilmiş elde edilen sensogram Şekil 4.9'de verilmiştir. Şekil 4.10'da ise sağlıklı insan idrarının analizi neticesinde elde edilen sensogram görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi kanser hastasına ait idrar örneğinin sensogramında artan bir sinyal elde edilmişken, sağlıklı kişiye ait idrar örneğinde herhangi bir bağlanma gerçekleşmemiştir. Bu sonuç hazırlanan sarkozin baskılı nanopartiküle immobilize sensörlerin prostat kanseri hastalığının erken tanısı amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

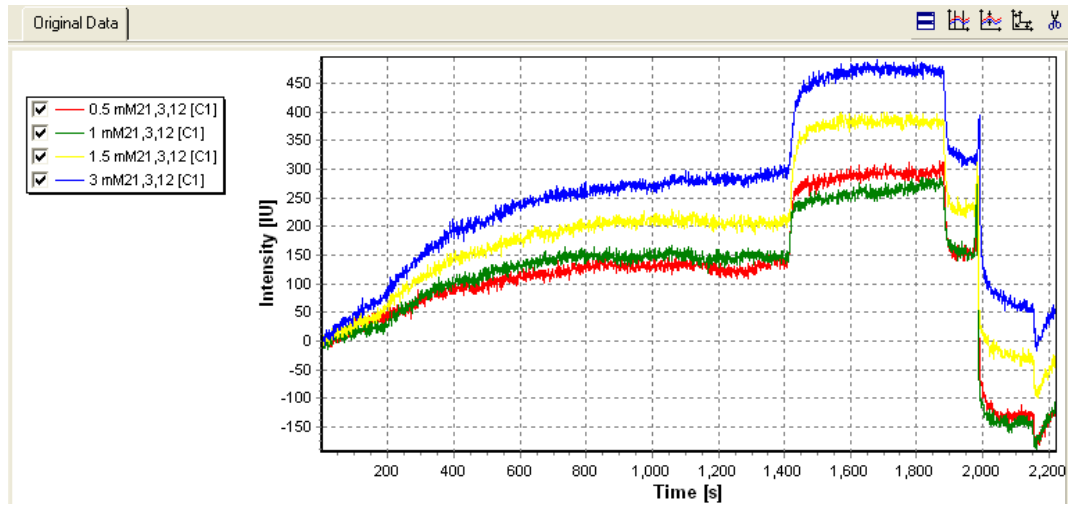


Şekil 4.9. Kanserli hastadan alınan idrar numunesindeki sarkozin tespiti



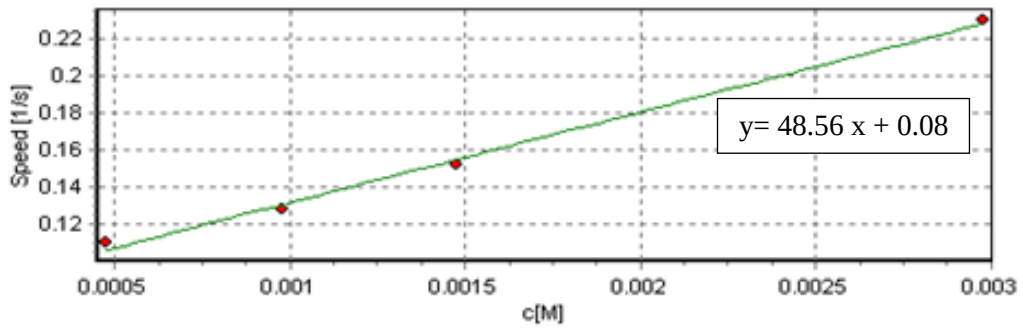
Şekil 4.10. Sağlıklı insandan alınan idrar numunesindeki sarkozin tespiti

Şekil 4.11’de Artan sarkozin derişimlerine karşı sinyal verilerinin kullanılması ile elde edilen sensogram eş zamanlı olarak görölmektedir.



Şekil 4.11. Artan sarkozin derişimlerine karşı sinyal verileri

Şekil 4.12’de derişime karşı sinyal verilerinin grafiğe geçirilmesi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği görölmektedir.



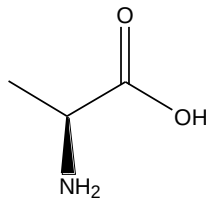
Şekil 4.12. Derişime karşı sinyal verisi kalibrasyon grafiğı

Elde edilen kalibrasyon grafiğinin R^2 değeri 0.9965 olarak bulunurken sarkozin baskılı nanosensörün tayin sınırı 0.06 μM olarak bulunmuştur.

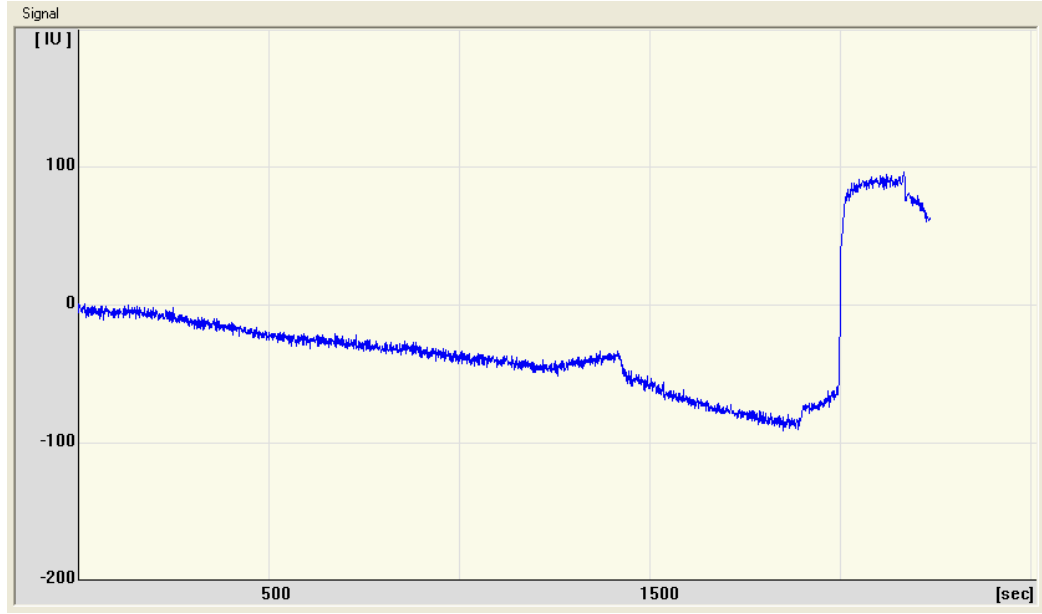
4.4. RİfS sensörün seçicilik denemesi

RİfS sensörün farklı derişimlerde sarkozin tayini deneylerinin ardından, +4 °C’de saklanan RİfS çip seçicilik deneyleri için kullanılmıştır. Bu amaçla 3 mM derişimde hazırlanan L-Alanin çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 4.13’de L-Alaninin molekül yapısı gösterilmiştir.

Yüzeydeki bağlanma olaylarını mükemmel bir şekilde analiz eden bu yöntemle sarkozine yüksek oranda benzeyen L-Alanin molekülüne seçicilik deneylerinde elde edilen sensogram Şekil 4.14’de görölmektedir.



Şekil 4.13. L-Alaninin molekül yapısı.



Şekil 4.14. L-Alanine karşı RIfS sensörün seçicilik denemesi

Elde edilen sensogramdan görüldüğü gibi hazırlanan sensör yüzeyine L-Alanin molekülü bağlanmamıştır. Bu da hazırlanan RIfS nanosensörün sarkozine karşı seçiciliğini göstermektedir.

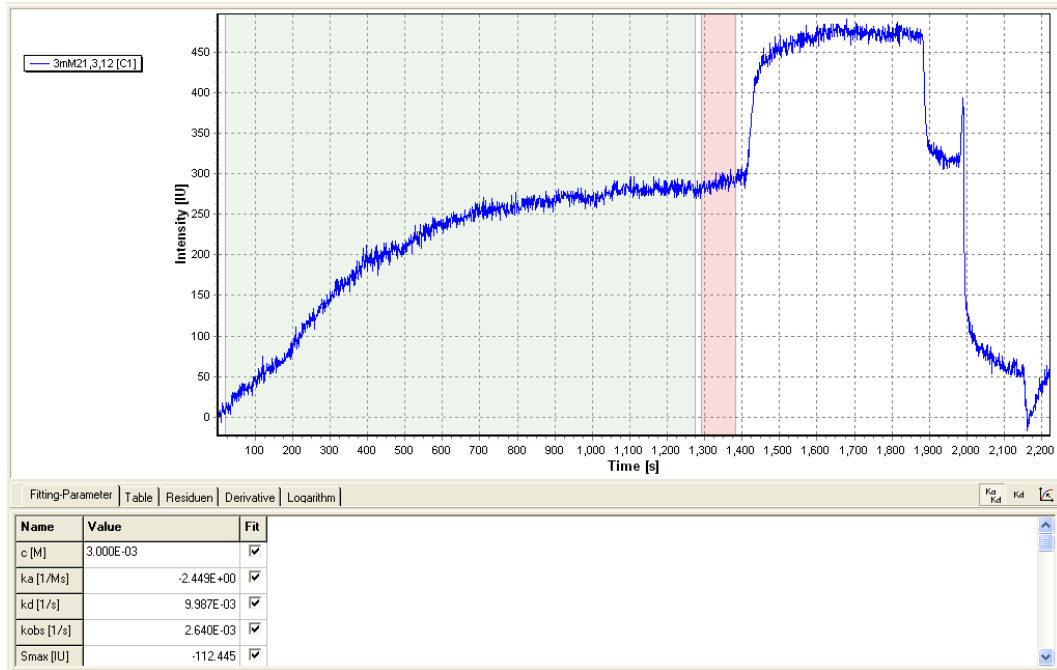
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Prostat kanseri erkekler arasında son yirmi yıl içerisinde artan insidansı ile en çok görülen kanser türü olmuştur. Her ne kadar PSA testinin kullanılmaya başlamasından beri ölüm oranlarında ciddi bir azalma yaşansa da, PSA'nın birçok olguda hatalı sonuçlar verdiği bilinmektedir. Diğer tüm kanser türleri gibi prostat kanserinin erken teşhisi hayat kurtarıcı olabilmektedir. Bu doğrultuda, gerçekleştirilen çalışmada reflektometrik interferans spektroskopisi ile prostat kanserinin erken teşhisine yönelik nanosensör geliştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan biyosensörün sulu çözeltilerinden ve gerçek örneklerden sarkozin molekülünü bağlama miktarı hesaplanmış ve sensörün tayin sınırı 0.01 mM olarak bağlanma sabiti (K_A) ise $0.245 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Çizelge 5.1'de hesaplanan gözlenebilirlik sınırı ve tayin sınırı verilmiştir.

Çizelge 5.1: Hesaplanan gözlenebilirlik sınırı ve tayin sınırı.

Kör için Standart Sapma	Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)	Tayin Sınırı (LOQ)
0.001	0.003 mM	0.010 mM

3 mM sarkozin için k_a ve k_d değerleri hesaplanmış ve Şekil 5.1'de, 3.10^{-3} derişimde sarkozin çözeltisinin sensogramı kullanılarak k_a , k_d ve K_A değerleri hesaplanmış ve Çizelge 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.1. 3 mM sarkozin için hesaplanan k_a ve k_d değerleri

Çizelge 5.2. 3 mM Sarkozin için k_a ve k_d ve K_A değerleri

3 mM Sarkozin için k_a ve k_d ve K_A değerleri	
k_a	$-2.449 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_d	$9.987 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$
K_A	$0.245 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

Literatürde sulu çözeltilerden ve gerçek örneklerden sarkozin tayinine yönelik olarak yapılmış çalışmalara baktığımızda Cernei ve ark.'nın (2012) yapmış oldukları spektrometrik ve elektrokimyasal temelli çalışmada türevlendirme yaparak sarkozin tayini gerçekleştirmişler ve tayin sınırını $0.10 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır. Cavaliere ve ark.'nın (2011) yapmış oldukları katı faz mikroekstraksiyon – gaz kromatografisi – kütle spektrometresi temelli bir başka çalışmada da yine sarkozin tayini için türevlendirme yapılmış ve gerçek örneklerle tayin sınırını 211 ng/mL ($2.37 \mu\text{M}$) olarak bulmuşlardır. Jiang ve ark.'nın (2010) yaptıkları sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi temelli çalışmada ise prostat kanseri tanısı için kullanılabilen altı farklı metabolit iç standart kullanılarak analiz

edilmiş ve sarkozin için tayin sınırı 0.004 μM olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi literatürde sarkozin tayini için türevlendirilme yapılmadan mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar, gerçek örneklerden sarkozin tayini için ve aynı zamanda prostat kanserinin erken teşhisi için yüksek bağlanma sabiti ve düşük tayin sınırına sahip bir biyosensörün geliştirildiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Altun, S. (2009), *Dunning sıçan prostat tümör sıvısının MAT-LyLu hücreleri üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Alvarez, S.D. (2008), *Stability and biocompatibility of porous silicon and porous alumina for cell and biomolecular sensing*, Doktora Tezi, University Of California, San Diego.
- Andersson, L.I., Nicholls, I.A. ve Mosbach, K. (1994), “Molecular imprinting a versatile technique for the preparation of separation materials of predetermined selectivity,” *Highly Selective Separations in Biotechnology*, **9**, 207-224.
- Anonim (2012), *Dünya ve Türkiye’de Kanser, Sağlık Bakanlığı*.
<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-15486/dunya-ve-turkiyede-kanser.html?vurgu=kanser+istatistikleri>
- Anonim (2012), *Sağlık Bakanlığı Resmi Web Sitesi*,
<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-15486/dunya-ve-turkiyede-kanser.html?vurgu=kanser+istatistikleri>
- Asav, E. (2009), *Altın elektrot yüzeyinde tek tabaka oluşumuna dayalı çift enzimli biyosensör sistemi geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Begun, F.P. (1993), “Epidemiology and natural history of prostate cancer,” Lepor, H., Lawson, R.K. (Ed.). *Prostate Disease* (s. 257-268), Philadelphia, WB Saunders Company.
- Belmont, A.S., Stefanie Jaeger, S., Knopp, D., Niessner, R., Gauglitz, G., Haupt, K. (2007), “Molecularly imprinted polymer films for reflectometric interference spectroscopic sensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 3267–3272.
- Bianchi, F., Dugheri, S., Musci, M., Bonacchi, A., Salvadori, E., Arcangeli, G., Cupelli, V., Lanciotti, M., Masieri, L., Serni, S., Carini, M., Careri, M., Mangia, A. (2011), “Fully automated solid-phase microextraction–fast gas chromatography-mass spectrometry method using a new ionic liquid

- column for high-throughput analysis of sarcosine and N-ethylglycine in human urine and urinary sediments,” *Analytica Chimica Acta*, **707**, 197–203.
- Biçen, Ö. (2009), *Moleküler baskılamış polimer tabanlı kriyojel ayırma sistemleri ve biyo-ayırma uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Bugan İ. (2009), *Dunning sıçan prostat tümör sıvısının Mat-lylu hücreleri üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Cavaliere B., Macchione B., Monteleone M., Naccarato A., Sindona G. ve Tagarelli A. (2011), “Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 2903-2912.
- Cernei, N., Zitka, O., Ryvolova, M., Adam, V., Masarik, M., Hubalek, J. ve Kizek, R., (2012), “Spectrometric and Electrochemical Analysis of Sarcosine as a Potential Prostate Carcinoma Marker,” *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7**, 4286-4301.
- Chapuis, F. Pichon, V. ve Hennion, M. C. (2004), “Molecularly imprinted polymers: Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials,” *LC-GC Europe*, **17 (7)**, 408-417.
- Chou, S.F., Hsu, W.L., Hwang, J.M., Chen, C.Y., (2004), “Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance,” *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 999–1005.
- Ciardelli, G., Borrelli, C., Silvestri, D., Cristallini, C., Barbani, N., Giusti, P. (2006), “Supported imprinted nanospheres for the selective recognition of cholesterol,” *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 2329-2338.
- Dalsuna, S. (2007), *Prostat Kanseri Tedavisinde Konvansiyonel ve Konformal Radyoterapi Tekniklerinin Karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

- Diltemiz, S.E. (2006), *DNA'yı tanıma bölgelerine sahip moleküler baskılanmış polimer tekniğine dayalı biyosensör geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Dmitrienko, S.G., Irkha, V.V. ve Kuznetsova, A.Y. (2004), "Use of Molecular Imprinted Polymers for the Separation and Preconcentration of Organic Compounds," *J. Anal. Chem.*, **59**, 808-817.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Liu S.X. ve Wang, N. (2002), "Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance," *Analyst*, **127**, 1427–1432.
- Du, D., Yan, F., Liu, S., Ju, H. (2003), "Immunological assay for carbohydrate antigen 19-9 using an electrochemical immunosensor and antigen immobilization in titania sol-gel matrix", *Journal of Immunological Methods*, **283**, 67– 75.
- Emil, A., Tanogho, J., ve Mcaninch, J.W. (2004), Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi, Kazancı, G., Smith *Genel Üroloji*, 16. baskı, Nobel Kitabevleri, İstanbul, 410-418.
- Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., ve Say, R. (2005), "Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance," *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 2197–2202.
- Ferrari, M. (2005), "Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges," *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 161–171.
- Giljohann, D.A. ve Mirkin, C.A. (2009), "Drivers of biodiagnostic development", *Nature*, **426**, 461–464.
- Haupt, K., Cormack, P.A.G. ve Mosbach, K. (2002), "Imprinted Polymers As Tailor- Made Stationary Phases for Affinity Separation," *Biochromatography*, **419**, 419-431.
- Hecht, L., Wagner, C., Landfester, K. and Schuchmann, H. P. (2011), Surfactant Concentration Regime in Miniemulsion Polymerization for the Formation of MMA Nanodroplets by High Pressure Homogenization, *Langmuir*, **27**, 2279–2285.

- Hiratania, H., Alvarez-Lorenzo, C. (2004), "The nature of backbone monomers determines the performance of imprinted soft contact lenses as timolol drug delivery systems," *Biomaterials*, **25**, 1105–1113.
- Horoz R. (2006), *Prostat kanseri tanısında prostat masajı sonrası PSA dinamiğinin diagnostik değeri*, Uzmanlık Tezi, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Idziak, L., Benrebouh, A. ve Deschamps, F. (2001), "Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-ethynylestradiol molecularly imprinted polymer," *Anal. Chim. Acta*, **435**, 137–140.
- Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai H. ve Takeuchi, T. (2004), "Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting," *Anal. Chim. Acta.*, **504**, 131–135.
- İspir, E.B. (2010), *Prostat kanseri tedavisinde yoğunluk ayarlı radyoterapi planlamalarının kalite kontrolü ve 3 boyutlu konformal radyoterapi ile doz dağılımlarının karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- İzmirli M. (2010), *Prostat kanserinin ELAC2 ve SRD5A2 genlerindeki polimorfizmler ile ilişkisinin araştırılması*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Jang, H.S., Park, K.O., Kang, C.D., Kim, J.P., Sim, S.J. ve Lee, K.S. (2009), "Optical fiber SPR biosensor with sandwich assay for the detection of prostate specific antigen", *Opt. Commun.*, **282**, 2827–2830.
- Jiang, Y., Cheng, X., Wang, C.C., ve Ma, Y., (2010), "Quantitative Determination of Sarcosine and Related Compounds in Urinary Samples by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, **82**, 9022-9027.
- Katz, A., Davis, M.E. (1999), "Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers," *Macromolecules*, **32**, 4113-4121.
- Kempe, H., Kempe, M. (2006), "Development and evaluation of spherical molecularly imprinted polymer beads," *Anal. Chem.*, **78**, 3659-3666.
- Kılıç, T., (2011), *Antikanser İlaç Olan Mitomycin-C'nin DNA'ya Etki Mekanizmasının Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensörler İle*

Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- Kojima, K., A. Hiratsuka, A., Suzuki, H., Yano, K., Ikebukuro K. ve Karube, I. (2003), "Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in a plasma-polymerized film," *Anal. Chem.*, **75**, 1116–22.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Asanuma, H. (2002), "Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications," *WILEY-VCH*, New York.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K. (1997), "Molecular imprinting: new possibilities for sensor technology," *Anal. Chem.*, **69**, 345 A-349 A.
- Kulasingam, V. ve Diamandis, E.P. (2008), "Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies" *Nat. Clin. Prac. Oncol.*, **5**, 588–599.
- Landfester, K. (2001), "Polyreactions in Miniemulsion," *Macromolecular Rapid Communications*, **22**, 896- 936.
- Lanza, F. ve Sellergren, B. (1999), "Method for synthesis and screening of large groups of molecularly imprinted polymers," *Anal. Chem.* **71**, 2092–2096.
- Li, X., Husson, S.M. (2006), "Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study," *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 336-348.
- Li, Y., Yang, H.H., You, Q.H., Zhuang, Z.X., Wang, X.R. (2006), "Protein recognition via surface molecularly imprinted polymer nanowires," *Anal. Chem.*, **78**, 317-320.
- Li, Z., Ding, J., Day, M., Tao, Y. (2006), "Molecularly imprinted polymeric nanospheres by diblock copolymer self-assembly," *Macromol.*, **39**, 2629-2636.
- Liang R.P., Qiu, J.D., Zou, X.Y., Cai, PX. (2004), "Breast cancer antigen immunosensor based on the functional sol–gel film," *Chem J Chin Univ.*, **25**, 425-429.
- Mace, C.R. (2008), *Development of Arrayed Imaging Reflectometry as a Tool to Monitor Human Immunological Responses to Pathogens*, Doktora Tezi, University of Rochester, NY.

- Mallik, S., Plunkett, S.D., Dhal, P.K., Johnson, R.D., Pack, D.W., Shnek D.R. ve Arnold, F.H. (1994) "Towards materials for the specific recognition and separation of proteins," *New Journal of Chemistry*, **18**, 299-304.
- McShane, L.M., Altman, D.G., Sauerbrei, W., Taube, S.E., Gion, M. ve Clark, G.M. (2005), "Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies," *J. Clin. Oncol.*, **20**, 9067-9072.
- Odabaşı, M., Say, R. ve Denizli, A. (2007), "Molecular imprinted particles for lysozyme purification," *Materials Science and Engineering C*, **27**, 90–99.
- Özcan, Ö., (2011), *Hibrit nanopartiküllerin miniemülsiyon polimerizasyonu ile üretilmesinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Peter T. Kissinger. (2005), "Biosensors a perspective," *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 20, Issue 12, 15 June, 2512-2516.
- Rusling, J.F., Kumar, C.V., Patel, V. ve Gutkind, J.S. (2010), "Measurement of Biomarker Proteins for Point-of-Care Early Detection and Monitoring of Cancer (Review)," *Analyst*, **135**, 2496–2511.
- Scardino, P.T., Kelman, J. (2005), "*Prostat Kitabı*," Vatan Kitap, İstanbul, 975-885-725-8.
- Sellergren, B. (2000), "Imprinted polymers with memory for small molecules, proteins, or crystals," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1031-1037.
- Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K. (1988), "Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions - NMR and chromatographic studies on the nature of recognition," *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5853–5860.
- Sharma, S.K., Sehgal, N. ve Kumar, A. (2003), "Biomolecules for development of biosensors and their applications," *Current Applied Physics*, **3**, 307–316.
- Shen, C.A. ve Shen, M.M. (2000), "Molecular genetics of prostate cancer," *Genes & Dev.*, **14**, 2410-2434
- Şener, G. (2009), *Nanopartiküllerle duyarlılığı artırılmış yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Takeuchi, T., Fukuma, D. ve Matsui, J. (1999), "Combinatorial molecular imprinting: an approach to synthetic polymer receptors," *Anal. Chem.*, **71**, 285–290.
- Tan, C.J., Wangrangsimakul, S., Bai, R., Tong, Y.W. (2008), "Defining the interactions between proteins and surfactants for nanoparticle surface imprinting through miniemulsion polymerization," *Chem. Mater.*, **20**, 118-127.
- Tan, C.J., Chua, H.G., Ker, K.H., Tong, Y.W. (2008), "Preparation of bovine serum albumin surface-imprinted submicrometer particles with magnetic susceptibility through core-shell miniemulsion polymerization," *Anal. Chem.*, **80**, 683-692.
- Tanagho, E.A. (1992), "Anatomy of the lower urinary tract," Walsh, P.C., Retik, A.B., Stamey, T.A. ve Vaughan, E.D.(Ed.). *Campbell's Urology* (s. 40-69). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Tanagho, E.A. (1995), "Anatomy of the genitourinary tract," Tanagho, T.A., McAninch, J.E. (Ed.). *Smith's General Urology*, (s. 1-16). Nonvalk: Appleton & Lange.
- Teramura, Y., Arima, Y. ve Iwata, H. (2006), "Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification", *Anal. Biochem.*, **357**, 208–215.
- Tosun Ç. (2007), *Antibiyoterapi sonrası serum psa değerlerindeki değişim düzeyinin prostat kanseri tespit etme oranı ile ilişkisi*, Uzmanlık Tezi, Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Tothill, I.E. (2009), "Biosensors for cancer markers diagnosis," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **20**, 55–62.
- Trock B.J. (2011), "Application of metabolomics to prostate cancer," *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* Vol. 29, 5, 572-581.
- Tuna B. (2005), Patoloji dernekleri federasyonu, http://www.turkpath.org.tr/index.php?category_id=22#k1
- Ugelstad, J., Mork, P. C., Kaggerud, K. H., Ellingsen, T. and Berge, A., (1980), "Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of

- emulsions and polymer dispersions." *Adv. Colloid Interface Sci.*, **13**, 101-140.
- Uludağ Y., Tothill I.E. (2010), "Development of a Sensitive Detection method of Cancer Biomarkers in Human Serum (75%) using a Quartz Crystal Microbalance Sensor and Nanoparticles amplification system," *Talanta*, **82**, 277-282.
- Walton, P.W., O'Flaherty, M.R., Butler, M.E., ve Compton, P. (1993), "Gravimetric biosensors based on acoustic waves in thin polymer films," *Biosensors and Bioelectronics*, **8**, 401-407.
- Wee, K.W., Kang, G.Y., Park, J., Kang, J.Y., Yoon, D.S., Park, J.H. ve Kim, T.S. (2005), "Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing microcantilevers" *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1932–1938,.
- Wulfkühle, J.D., Liotta, L.A. ve Petricoin, E.F. (2003), "Proteomic applications for the early detection of cancer", *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 267-275.
- Yazar, S. (2010), *Romatoid Artrit hastalığının proinflatuvar sitokini olan TNF-alfa tabanlı nanoteranostik geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K. ve Tanaka, N. (1998), "Porogen imprinting effects," *Anal. Chem.*, **70**, 386–389.
- Yu, C. ve Mosbach, K. (1997), "Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers," *J. Org. Chem.*, **62**, 4057–4064.