



MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ALDEHİT FONKSİYONELİTESİNE SAHİP  
POLİMERİK YÜZEYE ANTİKORLARIN  
KOVALENT OLARAK İMMOBİLİZASYONU**

MAKBULE PELİN MUHSİR  
(520614005)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Programı

**DANIŞMAN**  
Doç.Dr.Serap DEMİR

**İKİNCİ DANIŞMAN**  
Yrd.Doç.Dr.Emrah ÇAKMAKÇI

İSTANBUL, 2017

## TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ortaya çıkan her türlü probleme getirmiş olduğu bakış açısı ve yaklaşımları ile bana yol gösteren, bir akademik çalışmanın nasıl yapılması gerektiğini öğreten ve kılavuzluk eden çok değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Serap DEMİR ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Emrah ÇAKMAKÇI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Biyokimya Programı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Yüksek Lisans tez çalışmamı FEN-C-YLP-100616-0279 numaralı proje kapsamında destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Bana evlerini açan ve yüksek lisans eğitim boyunca benden hiçbir desteği esirgemeyen çok sevgili teyzem Mahcube AKAT ve çok sevgili eniştem Abdurrahman AKAT'a

Tüm hayatım boyunca her daim desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olacaklarını bildiğim canım aileme, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

**Temmuz, 2017**

**Makbule Pelin MUHSİR**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	vi
SEMBOLLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ .....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1.GİRİŞ .....	1
1.1 Prostat ve İşlevi .....	3
1.2 Prostat Kanseri .....	5
1.2.1 Prostat Kanseri Teşhisinde PSA'nın Yetersizlikleri .....	7
1.3 Engrailed 2 (EN2) Biyolojisi.....	8
1.3.1 EN2'nin Prostat Kanseri Teşhisinde Kullanımı .....	9
1.4 Antijenler.....	11
1.5 Antikorlar .....	13
1.5.1 Antijen-Antikor Etkileşimi.....	16
1.6 Antikor İmmobilizasyonu .....	17
1.6.1 İmmobilizasyon Yöntemleri.....	18
1.6.1.1 Kovalent İmmobilizasyon .....	18

1.6.1.2 Fiziksel İmmobilizasyon .....	19
1.6.2 ELISA Yöntemi.....	19
1.7 Manyetik Nano Boyutlu Parçacıkların (MNP'lerin) Sentezi .....	21
1.7.1 MNP'lerin Yüzey Modifikasyonu ve İşlevleştirilmesi .....	22
1.7.2 Su Bazlı Tiyol-en Süspansiyon Fotopolimerizasyonu .....	24
1.8 İlgili Literatür Işığında Çalışmanın Önemi .....	25
MATERYAL VE YÖNTEM .....	27
2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	27
2.2 Araştırma Araçları.....	27
2.3 Deneysel Yöntemler.....	28
2.3.1 Amin Fonksiyonlitesine Sahip MNP'lerin Hazırlanması.....	28
2.3.1.1 MNP'lerin Sentezi.....	28
2.3.1.2 MNP'lere Amin Fonksiyonlitesi Kazandırılması.....	28
2.3.2 MNP'lerin Karakterizasyonu .....	30
2.3.3 MNP'lerde Amin Miktarının Ninhidrin Testiyle Saptanması.....	30
2.3.4 Protein Tayini .....	31
2.3.5 Antikorların Fiziksel Olarak İmmobilizasyonu.....	31
2.3.5.1 Aynı Konsantrasyonda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu .....	31
2.3.5.2 Farklı Konsantrasyonlarda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu .....	32
2.3.6 Antikorların Kovalent Olarak İmmobilizasyonu.....	33
2.3.6.1 Aynı Konsantrasyonda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu .....	33

2.3.6.2 Farklı Konsantrasyonlarda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu .....	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	34
3.1 MNP Karakterizasyonu .....	34
3.2 MNP'lerdeki Amin Miktarının Ninhidrin Testiyle Saptanması.....	37
3.3 MNP Üzerine Fiziksel ve Kovalent Olarak anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu.....	38
3.4 Aynı Konsantrasyonda anti-EN2 Antikor Fiziksel ve Kovalent İmmobilizasyonu .....	39
3.5 Farklı Konsantrasyonlarda anti-EN2 Antikor Fiziksel ve Kovalent İmmobilizasyonu .	40
4.SONUÇLAR .....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ .....	50

## ÖZET

### **Aldehit Fonksiyonelitesine Sahip Polimerik Yüze Antikorların Kovalent Olarak İmmobilizasyonu**

Prostat kanseri, erkeklerde en sık tanı konan kanser türüdür. Erken tanı konan prostat hastasının iyileşme oranı oldukça yüksektir. Günümüzde prostat kanserine yönelik genel kabul görmüş biyobelirteç kan serumundaki Prostat Spesifik Antijen (PSA) düzeyinin belirlenmesidir. Prostat kanseri için bir serum belirleyicisi olarak klinik yararı açık bir şekilde kanıtlanmış olan PSA, hassas ve özgül olmasına rağmen mükemmel bir tarama testi değildir. Prostat kanserinin varlığını kesin olarak belirleme özgülüğü ve duyarlılığı düşüktür HOX-genlerinin kanser durumunda Engrailed-2 ekspresyonu üzerinde çalışmalar yapılmış ve bu genin ürünü olan proteinin sadece prostat kanseri hücreleri tarafından salgılandığı gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında yapılan çalışmaların ilk sonuçları idrarda EN2 protein varlığının prostat kanseri için tanıs bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. İdrardaki EN2 miktarının prostat kanserine yüksek oranda bağlı olduğu %88,2 spesifiklik ve %66 oranında duyarlılık ile prostat kanserini belirlediği rapor edilmiştir.

Tez çalışmasında tiyol-en süspansiyon fotopolimerizasyon yoluyla amin fonksiyonelitesine sahip manyetik nano boyutlu parçacıkları (MNP) sentezlendi. Sentezlenen MNP'lerin bir kısmı glutaraldehit ile aktive edilerek aldehit fonksiyonelitesine sahip parçacıklar elde edildi. Amin ve aldehit fonksiyonelitesine sahip MNP'lerin yapısal özellikleri ve yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskop, taramalı geçirimli elektron mikroskop, termogravimetrik analiz, zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi ile incelendi. Tiyol-en süspansiyon fotopolimerizasyondan sonra, düzgün manyetit nanoparçacıklarının ortalama çapının ~ 15 nm'den ~ 32 nm'ye yükseldiği görüldü. Amin ve aldehit fonksiyonelitesine sahip MNP'lere, prostat kanseri teşhisinde üstünlükleriyle öne çıkan EN2 proteinin tayin edilmesinde kullanılmak üzere EN2'nin antikoru immobilize edildi. Hazırlanan yapay çözeltilerdeki biyobelirteç seviyesi enzim bağlı immünosorbent yöntemi ile saptandı. Çalışmamızda fiziksel immobilizasyonda bağlanma 0,54 mg antikor/g MNP, kovalent immobilizasyonda bağlanma 1,775 mg antikor/g MNP olarak hesaplandı. Bu şekilde tez çalışmamızda farklı özelliklerde polimerik destekler kullanarak elde edilen EN2 sonuçları tartışılarak olası biyobelirteç yapımında uygun destek ortamı tayin etmeye çalışıldı.

**Temmuz, 2017**

**Makbule Pelin MUHSİR**

## **ABSTRACT**

### **Covalent Immobilization of Antibodies on Aldehyde-Functionalized Polymeric Surface**

Prostate cancer is the most common type of cancer diagnosed in men. The rate of healing of early diagnosed prostate is very high. The currently accepted biomarker for prostate cancer is the determination of the level of prostate specific antigen (PSA) in the blood serum. PSA, which has been clinically proven as a serum marker for cancer, is not a perfect screening test, although it is sensitive and specific. It has been shown that the expression of HOX-genes in cancer (EN2) expression is specific and the sensitivity of the prostate cancer is precisely determined and the protein of this gene product is secreted only by the prostate cancer cells. The first results of studies on these findings indicate that the EN2 protein presence in the urine is diagnostic for prostate cancer. It has been reported that EN2 in the urine is highly associated with prostate cancer, with 88.2% specificity and 66% sensitivity to prostate cancer.

In the thesis study, magnetic nano-sized particles (MNP) with amine functionality were synthesized through thiol-ene suspension photopolymerization. Some of the synthesized magnetic nano-sized particles were activated with glutaraldehyde to obtain aldehyde functionalized particles. Structural properties and surface morphologies of amine and aldehyde functionalized MNPs were investigated by scanning electron microscopy, scanning transmission electron microscopy, thermogravimetric analysis, attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy. After thiol-ene suspension photopolymerization, the average diameter of the neat magnetite nanoparticles increased from ~15 nm to ~32 nm. The MNPs with amine and aldehyde functionality were immobilized to the EN2 antibody for use in determining the EN2 protein, which was distinguished by their superiority in diagnosing prostate cancer. The biomarker level in the artificial solutions prepared was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. In our study, binding in physical immobilization was calculated as 0,54 mg antibody/g MNP, binding in covalent immobilization 1,775 mg antibody/g MNP. In this way, we tried to determine the appropriate support medium for possible biomarkers by discussing EN2 results obtained using polymeric supports in different aspects of our thesis study.

**July, 2017**

**Makbule Pelin MUHSİR**

## SEMBOLLER

<b>%</b>	:Yüzde
<b>°C</b>	:Santigrad Derece
<b>dk</b>	:Dakika
<b>emu</b>	:Manyetik Moment Birimi
<b>fg</b>	:Femtogram
<b>g</b>	:Gram
<b>kDa</b>	:Kilo Dalton
<b>kg</b>	:Kilogram
<b>M</b>	:Molar
<b>mg</b>	:Miligram
<b>mM</b>	:Milimolar
<b>mm</b>	:Milimetre
<b>mmol</b>	:Milimol
<b>mL</b>	:Mililitre
<b>ng</b>	:Nanogram
<b>nm</b>	:Nanometre
<b>W</b>	:Watt
<b><math>\alpha</math></b>	:Alfa
<b><math>\gamma</math></b>	:Gama
<b><math>\delta</math></b>	:Delta

$\varepsilon$	:Epsilon
$\kappa$	:Kappa
$\lambda$	:Lambda
$\mu$	:Mü
$\mu\text{L}$	:Mikrolitre
$\mu\text{g}$	:Mikrogram
$\mu\text{m}$	:Mikrometre



## KISALTMALAR

<b>4SH</b>	:Pentaeritritol Tetrakis (3-merkaptopropionat)
<b>ABTS</b>	:2,2'-Azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
<b>ATR-FTIR</b>	:Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>BPH</b>	:İyi Huylu Prostat Büyümesi
<b>BRCA1</b>	:Meme Kanseri Geni 1
<b>BRCA2</b>	:Meme Kanseri Geni 2
<b>BSA</b>	:Sığır Serum Albumini
<b>CIA</b>	:Kemilüminesans İmmünoassay
<b>CDR</b>	:Tamamlayıcılık Belirleme Bölgeleri
<b>DAB</b>	:3,3'-diaminobenzidin
<b>DRE</b>	:Dijital Rektal Muayene
<b>ECL</b>	:Elektrokemilüminesans İmmünoassay
<b>ELISA</b>	:Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay
<b>EMSA</b>	:Elektroforetik Kayma Deneyi
<b>EN2</b>	:Engrailed-2
<b>En</b>	:Engrailed Gen Ailesi
<b>FDA</b>	:Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
<b>FIA</b>	:Floresan İmmünoassay
<b>GA</b>	:Glutaraldehit

<b>HER2</b>	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
<b>HOX</b>	:Homeobox Gen Ailesi
<b>HRP</b>	:Yaban Turpu Peroksidaz
<b>Ig</b>	:İmmünoglobulin
<b>LNCaP</b>	:İnsan Prostat Adenokarsinom Hücre Kültürü
<b>MHC</b>	:Majör Histokompatibilite Kompleksi
<b>MNP</b>	:Manyetik Nano Boyutlu Parçacıklar
<b>MR</b>	:Manyetik Rezonans
<b>MS</b>	:Doymuş Mıknatıslanma
<b>PAA</b>	:Poli (akrilasit)
<b>PAP</b>	:Prostatik Asit Fosfataz
<b>PAX</b>	:Paired Box Gen Ailesi
<b>PBP</b>	:Prostatik Bağlayıcı Protein
<b>PBS</b>	:Fosfat Tamponu
<b>PEG</b>	:Polietilen Glikol
<b>pI</b>	:İzoelektrik Nokta
<b>PSA</b>	:Prostat Spesifik Antijen
<b>PSMA</b>	:Prostat Spesifik Membran Antijeni
<b>PVA</b>	:Polivinil Alkol
<b>PVP</b>	:Polivinilpirrolidon
<b>SDS</b>	:Sodyum Dodesil Sülfat

<b>SEM</b>	:Taramalı Elektron Mikroskop
<b>SPR</b>	:Yüzey Plasmon Rezonans Tabanlı İmmünoassay
<b>SNP</b>	:Tek Nükleotit Polimorfizm
<b>STEM</b>	:Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskop
<b>TESP</b>	:Tiyol-en Süspansiyon Fotopolimerizasyon
<b>TGA</b>	:Termogravimetrik Analiz
<b>TMB</b>	:3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
<b>TRUS</b>	:Transrektal Ultrason
<b>TTT</b>	:1,3,5-Triazol-1,3,5-triazin-2,4,6 (1H, 3H, 5H) –trion

## ŞEKİL LİSTESİ

## SAYFA

Şekil 1.1. IgG molekülünün şematik gösterimi .....	16
Şekil 2.1. MNP varlığında TESP metodu ve monomer ile reaktiflerin kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.2. TMB ile HRP arasında oluşan reaksiyon .....	32
Şekil 2.3. MNP'lerin GA ile aktivasyonu ve anti-EN2 birincil antikor kovalent bağlanması. 33	
Şekil 3.1. Çıplak ve modifiye edilmiş MNP'lerin SEM görüntüleri .....	34
Şekil 3.2. Çıplak ve modifiye edilmiş MNP'lerin STEM görüntüleri .....	35
Şekil 3.3. Çıplak ve modifiye edilmiş MNP'lerin FTIR spektrumları.....	36
Şekil 3.4. Çıplak ve modifiye edilmiş MNP'lerin TGA spektrumları .....	37
Şekil 3.5. MNP'lerdeki amin miktarının hesaplanmasında kullanılan ninhidrin kalibrasyon grafiği .....	37
Şekil 3.6. Bradford yöntemine göre hazırlanan protein standart grafiği.....	38
Şekil 3.7. HRP-TMB standart grafiği .....	39
Şekil 3.8. EN2 konsantrasyonu etkisi .....	39
Şekil 3.9. Antikor konsantrasyonu etkisi .....	40

**Tablo 2.1.** TESP için monomer ve reaktif miktarları ..... 30



# 1.GİRİŞ

Kanser, bir organ ya da dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalması ile oluşan hastalıktır. Erken tanı ile zamanında tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara ve ölüme neden olmaktadır. Prostat kanseri, erkeklerde en sık tanı konan kanser türüdür. Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alır. Bir erkekte 0-39 yaş arasında prostat kanseri gelişmesi olasılığı %0,01; 40-59 yaş arasında %2,58; 60-79 yaş arasında %14,7 ve yaşam boyu bir erkekte klinik önemi olan prostat kanseri gelişme olasılığı %17,8 gibi yüksek oranlardadır (Polat ve ark., 2009). Tüm kanser türlerinde olduğu gibi erken teşhis prostat kanseri için de çok önemlidir. Erken tanı konan prostat hastasının iyileşme oranı oldukça yüksektir.

Günümüzde prostat kanserine yönelik genel kabul görmüş biyobelirteç kan serumundaki Prostat Spesifik Antijen (PSA) düzeyinin belirlenmesidir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1994 yılından itibaren erkeklerde parmakla rektal muayene ile birlikte PSA taramalarının kullanımı yaygınlaşmış ve erken tanı sayesinde prostat kanseri mortalitesi yaklaşık 1/3 oranında azalmıştır (Jemal ve ark., 2007).

PSA, androjen-düzenleyici serin proteaz fonksiyonuna sahip normal ve malignant prostat epitel hücreleri tarafından salınan kallikrein ailesine ait bir glikoproteindir (Rebelo ve ark., 2016). Prostat kanser için bir serum belirleyicisi olarak klinik yararı açık bir şekilde kanıtlanmış olan PSA, hassas ve özgül olmasına rağmen mükemmel bir tarama testi değildir. Prostat kanserinin varlığını kesin olarak belirleme özgüllüğü ve duyarlılığı düşüktür. Çünkü iyi huylu prostat büyümesi gibi diğer prostat ile ilgili hastalıklarda da prostat kanserinde görülen ürolojik belirtiler gözlenmekte ve PSA seviyesi serumda artmaktadır (Murthy ve ark., 2016). Serbest PSA'nın total PSA'ya olan oranı (f/T PSA), klinik prostatın selim büyümesi ile prostat kanserinin ayırt edilmesi üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Ancak serbest PSA'nın oda sıcaklığında ve 4°C'da stabil olmayan bir molekül olması değerlendirme zorluklarını beraberinde getirmektedir (Stephan ve ark., 2000).Yapılan araştırmaların sonucunda, Avrupa Üroloji Birliği rehberlerinde rektal muayenesi negatif bulgu veren ve PSA oranı 4-10 ng/mL olan hastalarda f/T PSA oranı kullanılması önerilmektedir (Heidenreich ve ark., 2012).

PSA ve türevlerinin kandaki düzeyleri biyobelirteç olarak anlamlıdır; fakat kan numunelerinin alımında ve saklanmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle daha kolay elde edilebilecek numuneler araştırılmaktadır. Bu açıdan en çok çalışılan numune idrar örneğidir. İdrar üzerinde

çalışmak biyobelirteçlerin daha rahat test edilmesi ve kolay sonuç elde edilmesi açısından yararlıdır.

Genetik alanındaki gelişmelerin sonucunda, erken embriyolojik gelişim sırasında görev alan ve kanserlerde tekrar eksprese oldukları saptanan birçok gen tespit edilmiştir. Bu genlerden bir grubunu içeren HOX-genlerinin disregülasyonunun birçok kanserde meydana geldiği gösterilmiştir. Son olarak bu gruba ait olan Engrailed-2 (EN2) ekspresyonu üzerinde çalışmalar yapılmış ve bu genin ürünü olan proteinin sadece prostat kanseri hücreleri tarafından salgılandığı gösterilmiştir (Bose ve ark., 2008). Bu bulgular ışığında yapılan çalışmaların ilk sonuçları idrarda EN2 protein varlığının prostat kanseri için tanısal bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (Bose ve ark., 2008; Morgan ve ark., 2011). Morgan ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarına dayanılarak, EN2 düzeyi kontrolünün rektal muayeneye duyulan ihtiyacı ortadan kaldıracak şekilde ileri sürülmüştür. Yapılan başka çalışmalarda ise, idrardaki EN2 miktarının prostat kanserine yüksek oranda bağlı olduğu; %88,2 spesiflik ve %66 duyarlılık ile prostat kanserini belirlediği rapor edilmiştir (Pin ve ark., 2013). Morgan ve ark., (2011) idrarda EN2 proteininin 42,5 µg/L seviyesinin üzerinde olmasının yüksek oranda prostat kanserine işaret ettiğini ortaya koymuştur. Prostat kanseri teşhisinde kullanılmak üzere, EN2 belirlenmesine yönelik, yüksek duyarlılıkta, elektrokimyasal bir biyosensörün tasarlandığı çalışmalar da vardır (Lee ve ark., 2015). Son yıllarda prostat kanserinin teşhisine yönelik klinik çalışmaların büyük çoğunluğunda EN2 proteini standart bir biyobelirteç olarak bulunmaktadır (Morgan ve ark., 2011; Pandha ve ark., 2012; Pin ve ark., 2013). Bunun yanında literatürde idrardaki EN2 proteini düzeyinin tümör büyüklüğü ile orantılı olduğu sonucunun elde edildiği çalışmalar da mevcuttur (Pandha ve ark., 2012).

Yapılan klinik çalışmalar idrardaki EN2 derişiminin prostat kanseri erken tanısı için f/t PSA oranından daha etkin bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir ve bu konu araştırmacıların ilgisini çeken araştırma alanlarından biri olmaya devam etmektedir.

Tez çalışmasında tiyol-en süspansiyon fotopolimerizasyon (TESP) yoluyla amin fonksiyonelitesine sahip manyetik nano boyutlu parçacıkları (MNP) sentezlendi. Sentezlenen MNP'lerin bir kısmı glutaraldehit (GA) ile aktive edilerek aldehit fonksiyonelitesine sahip parçacıklar elde edildi. Amin ve aldehit fonksiyonelitesine sahip MNP'lerin yapısal özellikleri ve yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskop (SEM), taramalı geçirimli elektron mikroskop (STEM), termogravimetrik analiz (TGA), zayıflatılmış toplam yansıma fourier

dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile incelendi. Amin ve aldehit fonksiyoneliğine sahip MNP'lere prostat kanseri teşhisinde üstünlükleriyle öne çıkan EN2 proteinin tayin edilmesinde kullanılmak üzere EN2'nin antikoru immobilize edildi. Hazırlanan yapay çözeltilerdeki biyobelirteç seviyesi (EN2) enzim bağlı immünosorbent yöntemi (ELISA) ile saptandı. Bu şekilde tez çalışmamızda, farklı özelliklerde polimerik destekler kullanarak elde edilen EN2 sonuçları tartışılarak olası biyobelirteç yapımında uygun destek ortamı tayin edilmeye çalışıldı.

## 1.1 Prostat ve İşlevi

Prostat erkek üreme sistemine ait, fibromusküler glandüler bir organdır. Ters çevrilmiş bir piramit şeklinde olup idrar torbası ve pelvik taban arasına yerleşmiştir. Bezin bir tabanı ve bir tepesi, anterior, posterior ve inferolateral yüzeyleri vardır. Taban, preprostatik idrar yoluna ve mesane boynuna bitişik üst yüzeydir; kör tepe ise en alçak kısımdır. Arka alt yüzey rektumun önüne uzanır. Ağırlığı ortalama 20 g'dır. Tabanı çapraz olarak 4 cm, ön-arka çapı 2 cm, dikey çapı ise 3 cm'dir. Prostat, serozaaltı bağ dokudan üretilen ince fakat sağlam bir fibröz kapsül tarafından sarılmıştır. (Nickel, 1999; Hafez ve ark., 2003).

Glandüler prostat histolojik olarak üç ana bölüme ayrılır: 1. Prostatın glandüler bölümünün yaklaşık %70'ini temsil eden periferik bölge; organın lateral ve posterior bölümünü oluşturur. Prostatın tepe noktasını distal olarak oluşturan ve merkez bölgenin distal bölümünü karşılamak için açılan bir huni olarak kabul edilebilir. Periferik bölgenin kanalları distal prostatic uretranın içine açılır. 2. Glandüler prostatın %25'ini oluşturan merkezi bölge; kama biçimli olup, ejakülatör kanalları çevreler. Böylece, merkezi bölge en azından distal parçasında çevresel bölge ile çevrelenmiştir ve kanalları, boşalma kanallarına çok yakın olan prostatic uretra içine açılmıştır. Merkezi bölge de periferik bölge gibi uretranın proksimal bölümünü barındıracak şekilde huni şekline sahiptir. 3. En küçük glandüler kısım olan transizyonel bölge; prostatın yalnızca %5-10'unu kapsar ve geçiş bölgesi olarak adlandırılır. Geçiş bölgesinin ana kanalları, sfinkterin distal sınırı boyunca lateral olarak uzanır ve yanal olarak yayılır (Nickel, 1999).

İnsan prostatında farklı anatomik ve histolojik lobların veya bölgelerin belirlenmesi, prostat hastalığı ile bezin farklı kısımları arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılmasına ve bölgelerin hormonal olarak baskılanabilmesine olanak vermiştir. İyi huylu prostatic hiperplazi, büyük

oranda preprostatik glandüler dokuda ve preprostatik üretrada ortaya çıkmaktadır. Prostat kanserine ise en sık olarak periferik bölgede rastlanmıştır (Nickel, 1999).

İnsan prostatının sekresyonlarının biyokimyasal yapısı ve salgı fonksiyonunun düzenlenmesi, prostat hastalıklarının teşhisi için uygun belirteçlerin araştırılması ve adli tıptaki uygulamaları nedeniyle son 60 yıl içinde yoğun bir araştırmanın konusu olmuştur. Buna rağmen, erkek üreme fizyolojisinin bir parçası olarak prostatik sekresyonların kesin biyolojik rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Mevcut bilgiler ışığında, erkek fertilitesi/infertilite durumu ve erkek kontrasepsiyonunda kullanılabilen moleküllerin araştırılması ile ilgili olarak seminal plazma parametrelerinin korelatif bir değerlendirmesinden çok şey çıkarılmaktadır. Bu nedenle, mevcut buluş, işlevsel öneme sahip olduğu düşünülen normal insan prostat sekresyonunun yönlerine odaklanmaktadır. Prostat; kalsiyum, sitrat iyonları, fosfat iyonları, pıhtılaşma enzimi ve profibrinolizin içeren ince, sütümsü bir sıvıyı salgılar (Hafez ve ark., 2003). Salgı hem çözünür hem de partiküler madde formundadır. Çözünür bölüm; protein, karbohidrat, elektrolit, poliamin, hormonlar, lipitler ve büyüme faktörleri içerir. Sağlıklı erkeklerin prostat sıvısındaki ortalama protein miktarı 42,6 mg/mL olup, 52,2 mg/mL seminal plazmadan biraz düşüktür. İki boyutlu elektroforez analiz sonucunda, 27'si serum proteini olmayan (muhtemelen prostata özgü) 57 protein ana grubu belirlenmiştir. Prostata özgü başlıca proteinler hem pubertalde hem de erişkin insan prostatlarında eksprese olan prostatik asit fosfataz (PAP), PSA ve prostatik bağlayıcı proteindir (PBP) (Nickel, 1999). Boşalma esnasında, prostatik kapsül, vaz deferensdeki birikmeyle eşzamanlı olarak daralır; böylece prostat salgısı semene daha çok katılabilir. Prostatik sıvının hafif alkali özelliği, başarılı dölleme için önemli olabilir, çünkü vaz deferens sıvısı sitrik asit ve spermlerin metabolik nihai ürünlerinin varlığı dolayısıyla nispeten asidiktir; bu da spermlerin dölleme yeteneğini düşürür. Ayrıca dışının vajinal sekresyonları asidiktir (pH 3,5-4,5). Çevre sıvılarının pH'sı 6,0-6,5'e ulaşmaya kadar sperm optimal bir şekilde hareket edemez. Hafif alkali prostatik sıvı, boşalma sırasında diğer sperm sıvılarının asiditesini nötralize ederek sperm hareketliliğini ve dölleme şansını artırır. Prostat sıvısındaki pıhtılaşma enzimi, seminal vezikül sıvısının fibrinojeninin servikste vajinanın daha derin bölgelerinde spermi tutan zayıf bir fibrin koagulumu oluşturmasına neden olur. Koagulum daha sonra fibrinolizin ile parçalanması nedeniyle 15-30 dakikada erir. Pıhtı giderilirken, sperm oldukça hareketli hale gelir ve yumurta kanalındaki folikül sıvısına ulaştığında yumurta penetrasyonu ve fertilizasyonu için gerekli bir motilite kalıbı olan "hiperaktivasyon" a uğrar (Hafez ve ark., 2003).

Prostatın normal glandüler aktivitesinin androjenler tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir (Snell, 2008). Fetal gelişmede androjenler farklılaşmayı düzenler, ancak neonatal gelişme sürecinde androjenler prostatik büyüme ve baskıda işlev görür. Ergenlik döneminde, androjenler vücudu ve cinsel olgunlaşmayı tetikler ve hayat boyunca aksesuar cinsel bezlerini korur. Androjenler, prostat büyümesini düzenlemek için hem aktif hem de mecburi olarak işlev görürler, bu nedenle prostat kanseri tedavisi ile ilgili araştırma hedefi olamamaktadırlar (Hafez ve ark., 2003).

## 1.2 Prostat Kanseri

Prostat kanseri, prostatta ölümcül olabilen habis kanserli hücrelerin agresif bir büyümesidir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki erkeklerde akciğer ve kolon kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür (Cramer ve ark.,2007). 2015 Sağlık İstatistikleri Yıllığı'na göre ülkemizdeki erkeklerin yaklaşık %60'ında trakea, akciğer ve bronş kanser tipine rastlanırken, %32,9'luk bir oranla prostat kanseri ikinci sırada yer almaktadır.

Prostat kanserinin çeşitli risk faktörleri vardır. İlerleyen yaş, prostat kanserinde başlıca risk faktörüdür. 2005-2009 yılları arasında tanıların ortalama yaşı 67 olup teşhislerin yaklaşık %90'ı 55 yaş üstü hastalara konulmuştur. Bunun yanında prostat kanseri insidansı ve mortalite oranları, farklı etnik gruplar arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Prostat kanserinin hem insidansı hem de bu hastalıktan ölüm oranları İskandinav ülkelerinde yüksek ve Doğu Asya ülkelerinde düşüktür. Bununla birlikte, Japon-Amerikalılar Japonya'daki ölüm oranlarına kıyasla daha yüksek ölüm oranlarına sahiptir. Prostat kanseri riski, çevreden etkilenir ve göç ile birlikte kültürel değişiklikler riski değiştirebilir. Aile geçmişi de en güçlü risk faktörlerinden biridir. Prostat kanserli hastaların erkek akrabalarında prostat kanseri insidansı artar. Klinik açıdan önemli prostat kanseri insidansının yüksek olduğu aileler, ortak çevresel faktörlere maruz kalma veya benzer bir genetik yapıyla birlikte daha yüksek risk altında olabilir. Prostat kanseri riski, birinci dereceden prostat kanseri olan akrabaya sahip bir erkek için iki katına çıkar. Birden fazla akrabası prostat kanseri olan erkekler için risk daha da artar. Birinci derece akrabalarındaki prostat kanseri başlangıç yaşı da önemlidir, çünkü başlangıç yaşının daha genç olması riskin artmasıyla da ilişkilidir. Beslenmenin prostat kanserine etkisi araştırıldığında ilginç veriler elde edilmiştir. Japon erkeklerinin diyetleri hayvan yağı ve lif içeriği bakımından zengindir. Bu diyet, Doğu Asya'da batı ülkelerine nazaran daha düşük olan insidans ve mortalite ile ilişkilidir. Geleneksel Asya diyeti fasulye, soya fasulyesi, mercimek ve nohut gibi yüksek bir bakla içeriğine sahiptir. Bu sebzeler lifin ana kaynağı olarak kabul edilir. Japon

diyetinin yağ içeriği batılı seviyelere doğru arttıkça, Japonya'daki prostat kanseri insidansının yükselmeye başladığı saptanmıştır. Prostat kanserinin genetik faktörleri incelendiğinde ise tek-nükleotid polimorfizmleri ile BRCA1/BRCA2 mutasyonları göze çarpar. BRCA1 (17q21) veya BRCA2 (13q12) mutasyonu varsa prostat kanseri gelişme riski artar. BRCA1 mutasyonları prostat kanseri riskini ortalama iki katına çıkarır. BRCA2 mutasyon taşıyıcıları riskin 5-7 kat artmasına, erken başlangıçlı hastalığa yol açar. Hormonların da prostat kanseri riskine etkisi araştırılmıştır. Androjenler prostat bezinin normal gelişimi için önemlidir ve prostat kanseri oluşumunda da muhtemelen önemlidir. Prostat kanseri önleme çalışmasının sonuçları, bir 5 $\alpha$ -redüktaz inhibitörü olan finasterid ile testosteronun dihidrotestosterona dönüştürülmesi inhibe edildiğinde prostat kanseri insidansının önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Ancak, 18 çalışmanın meta-analizi, serum androjen düzeylerindeki normal değişikliklerin, prostat kanseri gelişme riski ile ilişkili olmadığını göstermiştir (Hafez ve ark., 2003; Tewari ve ark., 2013). Genellikle erken prostat kanseri ile ilişkili herhangi bir belirti yoktur ve iyi huylu prostat büyümesi de (BPH) aynı semptomları verir. İdrara çıkarken zorluk veya ağrı, idrara daha sık çıkma ihtiyacı, idrar akışı öncesinde uzun süre bekleme, idrar geçişinde artan ziyaretler nedeniyle uyku bölünmeleri, mesanenin tamamen boşalmadığı hissi başlıca belirtilerdir. Hastalığın ileri safhasında ise idrarda kan, pelvis ağrısı veya spermdeki kan kayıkları, genel kemik ağrısı, kilo kaybı gibi daha ciddi şikayetler oluşabilmektedir (Mason ve Moffat, 2010). Prostat kanseri teşhisinin kesin olarak koyulabilmesi için dijital rektal muayene (DRE), serum PSA ölçümü ve transrektal ultrason (TRUS) rehberli sistematik biyopsi gibi daha sofistike tanı teknikleri kullanılmaktadır. 1990'ların başlarına kadar, prostat kanseri tipik olarak semptomatik metastazların bir sonucu olarak veya üriner şikayetler ile başvuran bir hastada DRE sırasında tespit edilirdi. Ayrıca biyobelirteç "prostatik asit fosfataz" kemik metastazlarında artardı. Bununla birlikte, Kuriyama ve ark. (1980) tarafından 1980'lerde geliştirilen PSA kan testinin ortaya çıkışı prostat kanseri için tanı konseptini değiştirmiş ve PSA modern tıpta en çok kullanılan biyobelirteçlerden biri olmuştur (Tewari ve ark., 2013).

PSA, prostat bezinin sekresor epitelinde üretilen 33 kDa'lık, 240 aminoasitten oluşan tek zincirli bir glikoprotein olup, prostat tarafından semen içine salınan ve seminal koagulumun parçalanmasına neden olan serin proteazdır. Kanserli doku içerisinde PSA üretimi arttığı için prostat kanserli erkeklerde PSA artar ve ayrıca prostat bezi lümeni ile kılcıl damar arasındaki doku engelleri bozulur ve serum içine daha fazla PSA salınır. Prostat kanserinin erken teşhisi ve evrelendirilmesinin yanında cerrahi, hormonal ve radyasyon tedavisine yanıtı izlemek için serum PSA kullanılır (Hafez ve ark., 2003; Tewari ve ark., 2013).

Anormal bir PSA seviyesi için geleneksel sınır 4,0 ng/mL olarak kabul edilir. Bir teşhis testinin performansını gözden geçirirken birkaç parametrenin değerlendirilmesi gerekir. Bunlar arasında duyarlılık (gerçek pozitiflerin belirlenme olasılığı), özgüllük (gerçek negatiflerin saptanma olasılığı) ve pozitif/negatif prediktif değerler sayılabilir. Amerikan Kanser Derneği'ne göre, 4,0 ng/mL'lik bir PSA sınırının tahmini duyarlılığı herhangi bir prostat kanseri tespiti için %21 ve yüksek dereceli kanserlerin tespiti için %51'dir. 3,0 ng/mL'lik bir sınır kullanmak duyarlılıkları sırasıyla %32 ve %68'e yükseltir. Tahmini özgüllük, 4,0 ng/mL'lik bir PSA sınırı için %91 ve 3,0 ng/mL'lik bir sınır için %85'dir. Bununla birlikte, PSA testi, semptomatik BPH'li erkeklerde daha kötü ayırma kabiliyetine sahiptir. Genel olarak, >4,0 ng/mL PSA düzeyi için pozitif prediktif değer, yaklaşık %30'dur. Bu değer yükselmiş PSA'lı üç erkekten birinde en az birinin biyopsi sonucuna göre prostat kanseri olabileceği anlamına gelir. 4,0 ve 10,0 ng/mL arasındaki PSA düzeyleri için, pozitif prediktif değeri yaklaşık %25'tir ve bu, PSA seviyeleri >10 ng/mL için %42-64'e yükselir. Ölçülen serum PSA düzeyini etkileyen BPH, DRE, fiziksel egzersiz, ejakülasyon, prostatit, teşhis muayeneleri gibi faktörlerin PSA kan testinin özgüllüğünü etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca PSA düzeylerinin, prostat hacmi ve hastanın yaşıyla korele olduğu gösterilmiştir (Tewari ve ark., 2013).

### **1.2.1 Prostat Kanseri Teşhisinde PSA'nın Yetersizlikleri**

Prostat kanseri gelişimi diyet ve yaşam biçimiyle ilişkilendirilmiştir; ancak bu faktörlerden hiçbiri (veya birkaçı bir arada) henüz belirli bir müdahaleyi önermek için yeterli prediktif güce sahip değildir. Pozitif bir aile öyküsü ve tek-nükleotid polimorfizmlerin (SNP) varlığı artan prostat kanseri riskine işaret eder. Yine, DNA tamirinde rol alan genler olan BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar daha erken yaşta ve daha agresif bir hastalığa sahip olma riskini ciddi oranda artırır. Bu bilgi sadece daha fazla PSA ölçümü yapılmasına yol açar; başka bir yaklaşım sağlayamaz (Kote-Jarai ve ark., 2011; McGrath ve ark., 2013).

PSA, 1986'da FDA tarafından prostat kanseri tedavisi sonrası gözleme aracı olarak onaylanmış serum esaslı bir biyobelirteçtir. Bilindiği gibi, klinik öykü ve muayene ile birlikte 20 yılı aşkın bir süredir de prostat kanseri tanısı için kullanılmıştır. Duyarlılık, yani gerçek pozitif oran, doğru olarak tespit edilen gerçek pozitiflerin oranını ölçer. Özgüllük, diğer bir deyişle, gerçek negatif oran, doğru olarak tanımlanan gerçek negatiflerin oranını ölçer. Birkaç ilgi çekici çalışmaya rağmen, PSA'nın düşük duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle bir tarama biyobelirteci olarak kullanılması önerilmez. Yanlış pozitiflik, anormal yüksek PSA'nın histolojik muayene

ile teyit edilmemesiyle ortaya çıkar. Artmış PSA, benign prostat hiperplazisi, enfeksiyon ve enflamasyon gibi benign koşullarla ilişkili olabilir. Yalancı pozitif oran genel olarak test hassasiyetini düşürür. Tersine, bazı agresif prostat kanserleri PSA üretmez. Optimal PSA sınırı hakkında devam etmekte olan bir tartışma vardır. Maalesef; düşük riski yüksek riskten, düşük dereceli hastalığı ileri dereceli hastalıktan etkin şekilde ayırabilecek bir değer yoktur. Prostatın yaşla ilişkili büyümesinden dolayı, yaşlı erkeklerde gereksiz prostat biyopsilerini azaltmak için PSA sınırlarının düzeltilmesi önerilmiştir (McGrath ve ark., 2013). Fakat; prostat kanseri önleme çalışması sonuçları 0,5 ng/mL'den küçük PSA konsantrasyonlarında kanser oranının %6,6; 0,6-1,0 ng/mL PSA konsantrasyonu aralığında kanser oranının %10,1; 1,1-2,0 ng/mL PSA konsantrasyonu aralığında kanser oranının %17,0; 2,1-3,0 ng/mL PSA konsantrasyonu aralığında kanser oranının %23,9 ve 3,1-4,0 ng/mL PSA konsantrasyonu aralığında ise kanser oranının %26,9 olduğunu ve çok düşük PSA konsantrasyonlarında bile kanser gelişimine rastlanabileceğini göstermiştir (Thompson ve ark., 2004; Shariat ve ark., 2011).

Prostat kanseri tanısı ve izlenmesi için yeni biyolojik belirteçlere yoğun ilgi vardır. Birçok potansiyel biyobelirteç önerilmiş olsa da bunların çoğu PSA'nın tamamlayıcılarıdır. Bunlara tek işaretleyiciler ve paneller, farklı örnek türleri (serum ve idrar), protein, RNA ve DNA gibi çeşitli hedefler de dahildir. PSA haricinde, prostat kanseri tanısı ve izlenmesi için rutin olarak kullanılan bir test yoktur, ancak ilgi çoktur. Ağrısız prostat kanseri olan pek çok hastada hemen tedaviye başlanmamakta; ancak hastalar PSA izleme ve prostat biyopsisini içeren "aktif gözetim" programına alınmaktadır. Birçok kurum bu yaklaşımı desteklemektedir; çünkü tanıyla birlikte hemen tedaviye başlamanın bir getirisi olmadığını gösteren kanıtlar vardır. Bu nedenle, bilim camiasının zor görevi prostat kanserini hem saptayan hem de hastalığın "kayda değer" olduğunu gösteren biyobelirteçleri keşfetmektir (McGrath ve ark., 2013).

### **1.3 Engrailed 2 (EN2) Biyolojisi**

Homeobox genler adı verilen bir grup gen, embriyonik gelişmede hayati önem taşıyan transkripsiyon faktörlerini kodlar (Bonhomme ve ark., 2003) Bu genler üzerlerinde 'homeobox' olarak isimlendirilmiş, 183 baz çiftlik bir DNA dizisine sahiptir. Bu dizi, transkripsiyon faktörünün DNA motifine bağlandığı bölge olan 'homeodomaini' kodlar (Cillo ve ark., 2001). Homeobox transkripsiyon faktörleri bu bölgeden DNA'ya bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler ve gelişimi koordine eder (Choi ve ark., 2011).

Homeobox genleri, HOX geni, PAX gen ve Engrailed (En) gen aileleri gibi bireysel gruplara ayrılmıştır. Şu anda, homeobox genlerinin tüm omurgalı genomunun % 0,1-0,2'sini temsil ettiği düşünülmektedir (Stein ve ark., 1996). Omurgalı embriyonik gelişiminde homeobox bölgesi içeren genlerin rolü incelenmiş ve bu genlerin hücre kimliği, hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşimleriyle ilgili olduğu belirlenmiştir. Memelilerde bu, merkezi sinir sistemi, iskelet ve uzuv gelişiminin yanı sıra organogenezi de kapsar. Birçok genetik bozukluk, bu nedenle homeobox genlerinin disregülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Manak ve Scott, 1994; McGrath ve ark., 2013).

En, homeobox gen ailesinin bir başka üyesidir. Halkalı solucanlar, yumuşakçalar, böcekler, derisidikenlilerde, kordalılarda ve omurgalılarda tanımlanmıştır. Omurgalılarda, işlevi biraz farklı olan iki En geni keşfedilmiştir. EN1, kromozom 2'de (2q14.2) ve EN2, kromozom 7'de (7q36.3) bulunur. EN2 proteini insan fetuslarının gelişmekte olan beyinde, özellikle mezensefalit dopaminerjik nöronların hayatta kalmasında etkiye bulunduğu orta beyin-arka beyin sınır bölgesinin dorsal hücrelerinde belirlenmiştir. EN2 ekspresyonuna omurilik soğanının ventral yüzeyinde bulunan ve kardiyovenilatuvar aktivite ve kan basıncının kontrolünde rol alan kavimli çekirdeğin içinde de rastlanmıştır. Yüksek EN2 ifadesi doğumdan kısa bir süre sonra bu anatomik alanların birçoğunda halen belirgindir; ancak düzeyler sonrasında çarpıcı bir şekilde azalmaktadır (McGrath ve ark., 2013).

Günümüzde, normal yetişkin EN2 ekspresyonunun bilinen tek yeri, serebellumdaki purkinje nöronlarının çekirdeği ve böbrek tübül epitel hücrelerinin sitoplazmasıdır. Genin neden bu bölgede kalmayı sürdürdüğü veya amacının ne olduğu açık değildir (Sillitoe ve ark., 2008; Guan ve ark., 2014).

### **1.3.1 EN2'nin Prostat Kanseri Teşhisinde Kullanımı**

Belirli gen profillerinin doku özgüllüğüne sahip olması, karsinogenezin ilk evresi ve kötü prognozla sonuçlanan tedaviye dirençli hastalıkla ilişkisi sebebiyle birçok çalışma grubu homeobox genlerini tanısal ve öngörücü biyobelirteçler olarak rapor etmiştir. Bu çalışmaların çoğu HOX gen ailesiyle gerçekleştirilmiştir (McGrath ve ark., 2013).

EN2 ve prostat kanseriyle ilgili ilk çalışmalar normal prostat epitel hücrelerinde EN2 ekspresyonu olmazken kanserli prostat hücrelerinde EN2 ekspresyonu olduğunu göstermiştir (Bose ve ark., 2008). Normal prostatta ve kanser dışı prostat bozukluklarına karşı prostat

kanseri dokusunda seçici EN2 protein ekspresyonunun teyidi ise 2011’de yapılmıştır (Morgan ve ark., 2011).

Morgan ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada prostatik adonokarsinomda EN2 belirlemişlerdir. Buna karşın normal prostat dokusunda, kansere komşu sağlıklı dokuda, iyi huylu prostat büyümesinde, yüksek derece prostatik intraepitelyal neoplazide veya premalign lezyonda EN2’ye rastlamamışlardır. Hastaların tümör biyopsilerinin immünohistokimyasal boyaması sonucunda EN2 protein ekspresyonunun tümörün duktal yapılarında en yoğun olduğunu, sitoplazma ve bazal zarda da EN2 bulunduğunu; fakat çekirdekte EN2 ekspresyonunun yapılmadığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada prostat kanseri olduğu biyopsi ile kesinleştirilmiş 82 prostat kanseri hastasından oluşan bir kohortla, EN2’nin muhtemel bir tümör-spesifik idrar biyobelirteç olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Prostat kanserini önleme çalışması güncel standartlar olarak PSA’nın duyarlılığını %24, özgüllüğünü ise %93 olarak açıklamıştır. Biyopsi gerekliliğini azaltmak için PSA ile EN2’nin birlikte kullanılabileceği belirtilmiştir (McGrath ve ark., 2013).

EN2’nin bir biyobelirteç olarak potansiyelinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir. Pandha ve ark. (2012), radikal prostatektomi geçirmiş 125 hastanın ameliyattan önce alınmış idrar örneklerinde EN2 aramışlardır. Çalışmanın amacı idrardaki EN2 miktarıyla kanser hacmi arasındaki bağlantının saptanmasıdır. İdrar EN2 seviyesiyle kanser hacmi arasında lineer regresyon analizi aracılığıyla güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Ancak PSA seviyesinin hem tümör evresiyle hem de kanser hacmiyle korele olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca serum PSA seviyesiyle idrar EN2 seviyeleri arasında da istatistiksel bir bağlantı bulunamamıştır. Bu bulgular benzer bir çalışmayla güçlendirilmiştir. 57 radikal prostatektomi hastasıyla yürütülen bu çalışmada idrardaki EN2 seviyesinin tümör evresi ve hacmi ile korele olduğu gösterilmiş, prostatik masaj yapılmadan alınan idrar örnekleri ELISA ile 42,5 µg/L sınırı noktası kullanılarak analiz edilmiştir. Prostatektomili hastaların %85’inde saptanabilir idrar EN2 bulunmuş ve bu EN2 değerlerinin artmış tümör evresi ve hacmi ile korele olduğu doğrusal regresyon analizi ile gösterilmiştir. Önemli hastalığı belirlemek için 0,5, 1,3 ve 2,5 mL’lik tümör hacimleri kullanıldığında, her seviye için EN2’nin arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da PSA, tümör veya prostat hacmi ile korelasyon göstermemiştir (Pandha ve ark., 2013). Bu iki çalışma EN2’nin prostat kanserini teşhis etme ve hastalığın durumunu tümör hacmine göre değerlendirmede potansiyel yararını vurgulamaktadır (McGrath ve ark., 2013). Prostat masajı gerekmemesi nedeniyle toplama kolaylığı, düşük maliyetli ve dayanıklı bir analiz yöntemiyle belirlenebilmesinden ötürü EN2’nin, yalnızca hangi hastaların prostat

kanseri olduğunun saptanmasında değil; tümör hacimlerini saptayarak risk kademelendirilmesine olanak sağlayacak yararlı bir biyobelirteç olabileceği belirlenmiştir (Morgan ve ark., 2011).

#### **1.4 Antijenler**

Çevredeki çok sayıda organizma ve molekül insan vücuduna saldırmak üzere hazır bulunmaktadır. Saldırganlar vücuda dışardan girebildiği gibi (virüs, bakteri, mantar, toksin, portozoa, parazitik kurtlar, kimyasal maddeler vb.) vücut içinde oluşan zararlı değişimler sonucunda da (normal hücrelerin habisleşmesi ile kanser hücresine dönüşümü) oluşabilir. Bağışıklık sisteminin (immün sistemin) tanıdığı ve savaştığı bu tür organizma, molekül veya molekül parçaları “antijen (immünojen)” olarak adlandırılır. Bağışıklık sisteminin görevi izolasyon, engelleme veya sindirme ile ya da bunların kombinasyonları ile tehdit edici unsurları ortadan kaldırmaktır (Bereli, 2010; Doan ve ark., 2012).

Vücutta doğal ve edinsel bağışıklık olmak üzere iki tür bağışıklık vardır. Doğal bağışıklık, hücrel ve biyokimyasal bileşenleriyle savunmanın ilk hattını oluşturur. İleri aşamada edinsel bağışıklık devreye girer. Edinsel bağışıklığın cevabı humoral ve hücrel bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılır. Humoral (sıvısal) bağışıklık, mukozal salgılarda ve kanda, B lenfositleri tarafından üretilmiş antikor adı verilen moleküllerce gerçekleştirilir. Hücrel bağışıklık ise T lenfositler tarafından gerçekleştirilir. Sitotoksik ve fagositik mekanizmalar kullanılır (Abbas ve ark., 2014; Bereli, 2010).

Organizmada reaktif immün cevap oluşturabilen maddelere genel olarak “immünojen” denir. Böyle bir immün cevap sonucu kendilerine karşı oluşmuş spesifik antikorlar ile veya hücrel bağışıklığın aktive olmuş hücrel bileşenleriyle reaksiyona giren moleküller de antijen olarak tanımlanır. Buradan her antijenin immünojen olmadığı sonucu çıkmaktadır. Aralarında böyle bir fark olmasına rağmen iki terim sıklıkla birbirleri yerine kullanılır (Kılıçturgay, 2003; Shetty, 2005). Farkı daha iyi anlamak için haptenler örnek verilebilir. Haptenler antijenik olan (yani uygun koşullarda kendilerine karşı oluşmuş spesifik antikorlarla birleşebilen) fakat immünojenik olmayan (kendilerine karşı doğrudan immün cevap oluşturulmayan) kimyasal gruplardır. Bir hapteni immünojenik yapmak için, immünojenik bir taşıyıcı moleküle bağlamak gerekmektedir. Teknik olarak hatalı olsa da immünojen ve antijen sözcükleri eş anlamlıymış gibi kullanılırlar (Kılıçturgay, 2003; Doan ve ark., 2012).

Bir antijen molekülünde molekülün tümü, antikora gerçekleştirilen spesifik birleşmeden sorumlu değildir. Molekül antikora belirli yerleri aracılığıyla bağlantı kurar. Bu bölgeler epitop (antijenik determinant) olarak adlandırılır (Kılıçturgay, 2003). Epitoplar, antijenin üzerindeki antikora veya lenfosit üzerindeki antijen-spesifik membran reseptörüne bağlanmayı sağlayan bölgelerdir. Bir epitopun büyüklüğü protein antijenlerinde genellikle 6-8 aminoasit; polisakkarit antijenlerinde ise genellikle 6-8 monosakkarit birimi arasında değişir. Epitop boyutları bu aralıkta sınırlıdır; çünkü daha büyük epitoplar antikor üzerindeki antijen-bağlayıcı bölgelere sığmazlar (Khan, 2009). Bir antijenin taşıdığı epitop sayısı ise antijenin büyüklüğüne ve kompleksliğine bağlıdır (Kılıçturgay, 2003). Antijen olarak davranan makromoleküllerin yüzeylerinde tipik olarak birden fazla antijenik determinant bulunur. Aynı antijenik determinant sıklıkla tekrarlanabilir (polisakkaritlerde olduğu gibi) veya determinantların birkaçı birbirinden farklı (proteinde olduğu gibi) olabilir. Antijenik determinantlar normalde uzaysal olarak iyi ayrılır ve iki ayrı antikor molekülü diğerinin bağlanmasını etkilemeksizin aynı antijen molekülüne bağlanabilir. Bu tür determinantlara örtüşmeyen determinantlar denir. Bazen de iki determinant o kadar yakındır ki bir antikorum bağlanması diğer antikorum bağlanmasını sterik olarak engeller. Bu gibi durumlarda determinantların çakıştığı söylenir (Khan, 2009).

Neredeyse tüm önemli makromoleküler maddeler (tüm proteinler, polisakkaritler ve nükleoproteinler) bir bağışıklık tepkisi uyandırma yeteneğine sahiptir. Fakat çok ilginç bir şekilde DNA ve RNA antijenik değildir ya da çok zayıf antijeniktir. Bunun sebebi; beş nükleotitlik bir nükleotit serisinin meydana getirebileceği sadece 625 olası seri kombinasyonu oluşturabilmesidir. Çünkü beş nükleotit, bir antikor üzerinde antijen bağlanma yerine sığabilir. 20 farklı aminoasit içeren proteinlerde ise sadece yedi kalıttan oluşan milyonlarca olası kombinasyon vardır. Çok fazla alternatifi bulunması sayesinde birçok kombinasyon canlının kendi dokularında görülmez; yabancı maddelerde görüldüğünde de epitop olarak tanınabilir (Khan, 2009).

Herhangi bir molekülün bir immünojen olarak nitelendirilmesi için birinci ve temel gereklilik, maddenin genetik olarak konağa yabancı olmasıdır. Ancak otoimmün hastalıklarda vücut kendi bileşenlerini yabancı olarak değerlendirilir. Normalde beden kendinden olanla olmayanı ayırır. Bazı parçacıklar bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmazlar sadece fagositoza uğrarlar. Moleküler büyüklük, bir dereceye kadar immünojenikliğini belirler. Genel kural, 10 kDa'dan daha düşük bir molekül ağırlığına sahip olan parçacıkların zayıf şekilde immünojenik veya hiç immünojenik olmadığıdır. En güçlü immünojenler molekül ağırlığı 10 kDa'dan daha fazla olan

makromoleküler proteinlerdir (Shetty, 2005). Bir immünojenik molekülün organizma ile uygun biyolojik ilişki kurabilmesi için belirli bir derecede kimyasal karmaşıklığa da sahip olması gerekir. Kesin bir eşik oluşturmak zordur; ancak genel kural geçerlidir. Yalnızca saf lipidler immünojenik değildir. Monomerik proteinler aslında toleransı indükleyebilir, ancak polimerik durumda oldukça immünojeniktirler. Saf formda bir bağışıklık tepkisi oluşturmayan birçok immünojen, daha büyük bir parçacığın parçası olduğunda bunu yapar. Bu nedenle, immünojenikliğini arttırmak için adjuvanlar kullanılır (Kılıçturgay, 2003; Shetty, 2005). Deneyler, bir molekülün konformasyonunun antijenite açısından önemli olabileceğini göstermiştir. Örneğin, lizozim molekülü, bir disülfid bağı yardımıyla bir halkaya katlanmış birkaç aminoasitten oluşan doğal formunda iyi bir antijendir. Disülfid bağı bozulmuş, böylece halka konformasyonu artık mevcut değilse, molekülün antijenikliğini ciddi oranda azalacaktır (Shetty, 2005). İyi bir antijen olabilmek için molekül elektrik yükü de taşımalıdır. Elektrik yüklü gruplar moleküle sulu ortamda çözünürlük kazandırarak çevre ile daha iyi temas etmelerini sağlarlar. Böylece molekül immün sistem hücrelerine rahatlıkla girebilir (Kılıçturgay, 2003). Çalışmalar, aminoasit sekansının antijen için önem taşıdığını göstermiştir. Yapısında belirgin bir karmaşıklığa sahip olmayan belirli moleküller, kısa, fakat önemli aminoasit aralıklarının dağılmamış bir şekilde mevcut olması koşuluyla antijen olarak görev yapabilir. Ayrıca, küresel yüzeyden belirgin şekilde çıkıntı yapan peptid zincirlerinin parçaları yüksek epitop yoğunluğuna sahip yerler olma eğilimindedir. Bu nedenle, bu yüksek epitop yoğunluk alanlarının tanıma sistemine erişebilirliği bağışıklık tepkisinin sonucunu belirler (Shetty, 2005).

## **1.5 Antikorlar**

Antikorlar, antijenler olarak bilinen yabancı yapılara maruz kalmaya yanıt olarak omurgalılarda üretilen dolaşımdaki proteinlerdir. Antikorlar, humoral bağışıklığın araçlarıdır; yabancı moleküler yapıları tanıma konusunda inanılmaz derecede çeşitlilik gösterir ve spesifiktirler. Bu proteinler, difteri toksinine karşı koruma sağlayan serum molekülleri olarak keşfedildiğinden başlangıçta antitoksin olarak adlandırılmıştır. Benzer proteinlerin sadece mikrobik toksinlere değil birçok maddeye karşı üretilebileceği keşfedilince bu moleküllere genel olarak antikor ismi verilmiştir. Antikorum üretimine yol açan veya antikor tarafından tanınan madde daha sonra antijen olarak adlandırılmıştır. Antikorlar, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülleri ve T hücre antijeni reseptörleri, adaptif bağışıklık sisteminin antijenleri bağlamak için kullandığı üç molekül sınıfıdır. Bu üç sınıftan antikorlar ilk

keşfedilen sınıftır. Antijenler arasında ayırım yapma yeteneği ve antijenleri bağlama kuvveti bu sınıfta en yüksektir (Abbas ve ark., 2014).

Antikorlar organizmada membrana bağlı veya salgılanmış şekilde bulunur. Membran-bağlı antikor, B lenfositlerinin yüzeyinde bulunur ve antijen reseptörü olarak görev yapar. Salgılanan antikorlar, toksinleri nötralize eder, patojenlerin girmesini ve yayılmasını önler ve mikropları yok ederler. Salgılanmış antikorlar plazma hücreleri tarafından üretilir. Membrana bağlı antikorlar tarafından antijenin tanınması lenfositleri aktive eder ve humoral bir bağışıklık cevabı başlatılır. Aktive edilen B hücreleri, antijen reseptörü ile aynı özgüllükteki antikorları salgılayan plazma hücrelerine farklılaşır. Antikorların salınmış formları, kan plazmasında, mukozal sekresyonlarda ve interstisyel sıvıda bulunur. Humoral bağışıklığın efektör fazında, bu salgılanmış antikorlar antijenlere bağlanır ve antijenleri ortadan kaldıracak çeşitli efektör mekanizmalarını tetikler (Coico ve Sunshine, 2009; Abbas ve ark., 2014).

Kan veya plazma bir pıhtı oluşturduğunda, antikorlar serum denilen artık sıvıda kalır. Serum pıhtılaşma faktörlerinden yoksundur; ancak plazmada bulunan diğer tüm proteinleri içerir. Plazma veya serum proteinleri elektroforezle ayrıldığında çoğu antikor gama globulinler adı verilen, globulinlerin üçüncü en hızlı göç eden grubunda yer alır. Antikor için kullanılan diğer bir isim olan immünoglobülin (Ig), gama globulin fraksiyonunun bağışıklık kazandırma bölümüne atıfta bulunan bir adlandırmadır. Ig ve antikor terimleri birbirlerinin yerine kullanılırlar. Sağlıklı, 70 kg erişkin bir insan, her gün yaklaşık 2-3 g immünoglobülin üretir. Bunun neredeyse üçte ikisi, gastrointestinal ve solunum yollarının duvarlarındaki aktive B hücreleri ve plazma hücreleri tarafından üretilen IgA adı verilen bir antikor olup epitel hücreleri üzerinden bu yolların lümenlerine aktif olarak taşınmaktadır. Bu organların yüzey alanlarının büyüklüğü IgA miktarının fazla oluşunu açıklar (Abbas ve ark., 2014).

Antikorlar, üyeleri önemli yapısal ve işlevsel özellikleri paylaşan bir glikoprotein familyasıdır. İşlevsel olarak, hem antijenlere hem de bağışıklık sisteminin özel hücrelerine veya proteinlerine bağlanma yetenekleri ile karakterize edilebilirler. Yapısal olarak antikorlar, Y şekli olarak görülebilen karakteristik birimin bir veya daha fazla kopyasından oluşur. Her Y dört polipeptid içerir; ağır zincir (H) olarak bilinen bir polipeptitin iki özdeş kopyası ve hafif zincir (L) adı verilen bir polipeptitin iki özdeş kopyası vardır (Harlow ve Lane, 1988). Monomerik ünite, zincirlerin kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede iki ağır zincir arasında (ki gövde zaten sadece ağır zincirlerden meydana gelir) oluşan disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmasıyla oluşur. Hafif zincirler  $\kappa$  (kappa) veya  $\lambda$  (lambda) olmak üzere

sırasıyla 2. ve 22. kromozomlar üzerinden kodlanmaktadır. Ağır zincirin, tümü 14. kromozomda kodlanan  $\mu$  (mü),  $\delta$  (delta),  $\gamma$  (gama),  $\epsilon$  (epsilon) ve  $\alpha$  (alfa) olarak adlandırılan 5 tipi vardır (Bereli, 2010; Doan ve ark., 2012). Antikorlar, içerdikleri ağır zincir polipeptit türüne bağlı olarak beş sınıfa; IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD'ye ayrılır (Harlow ve Lane, 1988).

Hafif ve ağır zincirler değişken bölge ( $V_H, V_L$ ) ve sabit bölgeye ( $C_H, C_L$ ) ayrılırlar. Bir antikorun kollarında bulunan L ve H zincirlerinin bir uçları  $-NH_2$  ile (amin uçları) bir uçları  $-COOH$  ile (karboksil uçlar) sonlanır. Her polipeptit zincirinin amin uca yakın kısımları aminoasit sırası açısından zincirin kalan kısmına göre değişkenlik gösterir; değişken bölge adını almalarının sebebi budur. Ig molekülünün üç boyutlu yapısı molekülün dümdüz olmadığını göstermektedir. Her zincir üzerinde disülfid bağlarıyla ilmiklenmek suretiyle oluşturulan bölgeler bulunur. Bu bölgeler domain (büklüm) olarak adlandırılır. Hafif zincir domainleri  $V_L$  ve  $C_L$ ; ağır zincir domainleri ise  $V_H$  ve birleşerek  $C_H$  adı verilen sabit bölgeyi oluşturan  $C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}$ 'tür. IgM ve IgE globülinlerinde  $C_{H4}$  domaini de bulunur. Her domain yaklaşık 110 aminoasitten meydana gelmiştir (Bereli, 2010).

Hafif ve ağır zincirdeki değişken büklümler birlikte Ig'nin antijen bağlanma bölgesini meydana getirirler. 2 hafif ve 2 ağır zincir eş olduğundan, Ig'de bulunan iki antijen bağlanma bölgesi de eşittir. Değişken bölgelerin aminoasit dizilerindeki çeşitlilik, bir B hücresinden diğerine oluşan ağır ve hafif zincirin rastgele eşleşmesi ile birlikte çok sayıda farklı epitoplara tanıyabilen bir bağlanma bölgesi havuzu oluşturur (Doan ve ark., 2012).

Antikorların önemli yapısal özelliklerinin birçoğunu, yalnızca bir yapısal Y birimi içeren ve aynı zamanda serumda en bol olan IgG antikorlarını göz önüne alarak tartışmak kolaydır (Harlow ve Lane, 1988). IgG molekülü, papain enzimi ile proteolitik olarak kesildiğinde kesim Y'nin kollarının gövdeye birleştiği yerden olur ve yaklaşık olarak eşit boyuttaki üç parçaya bölünür ( $F_{ab}, F_{ab}, F_c$ ). Bu üç parçadan ikisi  $F_{ab}$  (antijen bağlayan parça) olarak adlandırılan ve antikorun antijene spesifik olarak bağlanma yeteneğini taşıyan bölgedir.  $F_{ab}$ , parça olarak tek başlarına çözüldükten antijen bağlayamaz; sadece bütün bir antikor molekülünde işlevseldir. Üçüncü fragman  $F_c$  (kristalize olabilen parça) antijen bağlayamaz; antikor molekülünün  $F_{ab}$  bölümüne bağlanma gerçekleştiikten sonra molekülün biyolojik işlevlerinden sorumludur.  $F_{ab}$  parçalarında hem H hem de L polipeptit zincirleri bulunurken  $F_c$  parçasında yalnız H bulunur (Coico ve Sunshine, 2009; Bereli, 2010; Doan ve ark., 2012).



etkileşimler bir kovalent bağdan zayıf olduğundan, çok küçük bir mesafe ( $1 \times 10^{-7}$  mm) içinde etkilidirler. Bu nedenle güçlü bir antijen-antikor etkileşimi, antijen ve antikor arasındaki yakınlığa bağlıdır. Antijen-antikor etkileşimlerinin tersinir olmasının sebebi de kovalent olmayan bağlar sonucunda meydana gelmeleridir (Bhattacharya, 2006).

Antijen-antikor birleşmesinde kilit ve anahtar modeli geçerlidir. Antijen-antikor etkileşiminin X-ışını kristalografisi analizi, antijenik determinantın antikorda antijen bağlama bölgesi tarafından üretilen bir yarığa yerleştiğini göstermiştir. Yarığa 4-7 aminoasit veya şeker kalıntısı sığabilir (Bhattacharya, 2006). Antijen bağlama bölgesi antikorda ağır ve hafif zincirdeki değişken bölgeler tarafından oluşturulur. İki değişken bölge yakından ilişkilidir ve birbirleriyle kovalent olmayan etkileşim içindedirler. Ağır ve hafif zincirlerin geri kalanının oluşturduğu diğer bölgeler antijen bağlanmasına katılmaz. Antijen bağlanma bölgesini oluşturan aminoasitler, hem ağır hem hafif zincirlerin hiperdeğişken bölgelerinin aminoasitleridir. Hiperdeğişken bölgeler, tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR'ler) olarak bilinir (Harlow ve Lane, 1988; Bhattacharya, 2006).

Antijen-antikor bağlanmasını tanımlamak için afinite ve avidite şeklinde iki kavramdan daha bahsetmek gerekir. Afinite, bir antikor üzerindeki tek bir antijen bağlama yeri (paratop) ile tek bir epitop arasındaki bağlanmanın gücüdür. Yüksek afiniteye sahip antikorlar, antijeni daha sıkı bağlarlar ve antijenle ayrışmazlarken düşük afiniteli antikor antijene zayıf bir şekilde bağlanır ve kolayca ayrışır. Avidite, çok sayıda antijenik determinanta sahip antijenlerle multivalan antikorlar arasındaki bağlanmanın toplam gücüdür. Hem antijenin hem antikorun valanı aviditeyi etkiler. Avidite, bireysel afinitelerin toplamından daha büyüktür (Harlow ve Lane, 1988)

## **1.6 Antikor İmmobilizasyonu**

İmmünoassayler, antikorların ve antijenlerin moleküler tanınmasına dayanan; proteinler, hormonlar ve ilaçlar gibi biyomoleküllerin yanı sıra mikroorganizmaların da hassas şekilde algılanmasını sağlayan uygulamalardır. Son yıllarda bu yöntemlerin uygulama pratikliklerinde ve özgüllüklerinde gelişmeler kaydedilmiştir. Şimdilerde optik analizler tahrip edici olmayan çalışma metotları, hızlı sinyal üretimi ve okunması ve optik sinyaller kullanmanın basitliği nedeniyle biyoanaliz için en popüler protokollerden biridir. Enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA), kemilüminesans immünoassay (CIA), floresan immünoassay (FIA), yüzey plasmon rezonans tabanlı immünoassay (SPR) ve elektrokemilüminesans immünoassay (ECL) yaygın

olarak kullanılan optik immünoassaylardır. Optik immünoassaylar, güvenilirliği, duyarlılığı, seçiciliği ve optik sinyaller kullanmanın basitliği nedeniyle klinik immünoloji, gıda endüstrisi ve çevresel analiz alanlarında kullanılmaktadır. FIA, ELISA ve floresans polarizasyon immünoassay gibi etiketli yaklaşımlarda sinyaller kromoforlar ve floroforlar gibi sinyal oluşturan moleküllerden üretilir (Yu ve ark., 2015).

Antikorum sağlam bir destek üzerine immobilizasyonu optik immünoassayların uygulanmasında çok önemli bir adımdır. Tam işlevselliğe ulaşmak için, immobilizasyon sırasında antikorumların konformasyonları değiştirilmemelidir ve aktif bölgeleri kapanmamalıdır. İmmobilizasyonda kuvars, cam, altın, demir oksit, silika ve polimerler gibi destek materyalleri kullanılmaktadır. Bu materyallerin yüzeyleri genellikle antikorumların doğrudan bağlanabileceği yeterli aktif gruptan yoksundur. Bu yüzden, immobilizasyonu kolaylaştırmak için yüzeyde, antikorumun  $F_{ab}$  veya  $F_c$  kısmındaki spesifik kısımlarla reaksiyona girebilen organik bağlayıcı noktalar oluşturmak gerekir. Antikorum immobilizasyonunda en önemli noktalardan biri, antikorumların bağlanma bölgelerinin numune solüsyonuyla etkileşecek şekilde yönlendirilmesidir. Bu nedenle, antikorum immobilizasyonundaki en hassas nokta antikorumları üç boyutlu yapılarını, işlevlerini ve bağlanma yerlerini koruyarak immobilize etmektir (Yu ve ark., 2015).

### **1.6.1 İmmobilizasyon Yöntemleri**

Antikorum immobilizasyon teknikleri, erken adsorpsiyon prosesleri, daha iyi kontrol edilen kovalent bağlanma, biyoafinite immobilizasyonu ve yeni potansiyel metotlar olmak üzere çeşitlilik göstermektedir. Bir destek üzerindeki antikorumların oryantasyonu ve aktivitesi, birçok immünoassay ve biyosensör uygulaması için özel bir önem taşımaktadır. Antikorum immobilizasyonu çalışmalarında önemli olan, destek yüzeyinde yüksek yoğunlukta aktif antikorumların bulunmasını sağlamaktır (Yu ve ark., 2015). Tez çalışmamızda fiziksel ve kovalent antikorum immobilizasyon teknikleri kullanıldı.

#### **1.6.1.1 Kovalent İmmobilizasyon**

Kovalent bağlanma, bir antikordaki aminoasitlerin erişilebilir işlevsel grupları tarafından bir yüzeye tutturulmasıdır. Geri döndürülemez bağlama ve yüksek oranlarda yüzey kaplaması sağladığından tercih edilen bir yöntemdir. Destek materyalinde veya antikorda ya da her ikisinde bulunan fonksiyonel gruplar, söz konusu bileşenleri daha reaktif bir forma dönüştürülebilen bir kimyasal işlemle oluşturulur. Aldehit-, epoksi- ve amin- modifiye

edilmiş cam plakalar gibi önceden hazırlanmış yüzeyler ticari olarak mevcuttur (Yu ve ark., 2015). Antikorların kovalent immobilizasyonu ilk olarak Bhatia ve ark. (1989) tarafından gerçekleştirilmiştir.

### **1.6.1.2 Fiziksel İmmobilizasyon**

Katı bir yüzeye antikor adsorpsiyonu, antikorların immobilizasyonu için en kolay yöntemdir. Antikorlar ile hedef katı destek materyali arasındaki hidrofilik, hidrofobik veya her iki tür etkileşim sonucunda oluşur. Kullanılan katı destekler arasında plastik yüzeyler (polistiren ve silikon), membranlar (nitroselüloz ve naylon) ve çeşitli metalik yüzeyler bulunur. Bununla birlikte, adsorbe edilmiş antikorlar rastgele yönlendirilir ve denatürasyon ile antijen bağlama yeteneklerini kaybedebilir. Bir örnekte, pasif adsorpsiyonu takiben bağlanmış antikorların %10'dan azının antijen bağlanması için aktif kalabildiği belirlenmiştir. Dahası, yüzeyler çoğunlukla herhangi bir proteini yakalamak için tasarlandığından, arka plan sinyalleri genellikle yüksektir. Antikor adsorpsiyonu bu dezavantajlarına rağmen, basit prosedürü ve yüksek antikor bağlama kapasitesi nedeniyle, ELISA (enzim bağlantılı immunosorbent assay), immüno-sensörler ve daha birçok uygulamada kullanılmaktadır. Son zamanlarda, birçok çalışma için daha yüksek oryantasyonlu immobilizasyon sağlayan yüzeyler önerilmektedir. Kaliksaren türevleri ile kaplı katı yüzeylerin antikorları uygun oryantasyonla yakaladığı gösterilmiştir. Hedef proteine bağlı olarak, 1-10 fg/mL kadar düşük konsantrasyondaki bir analit proteini standart bir sandviç floresan yöntem kullanılarak bu kaliksaren yüzeylerinde tespit edilebilir. Katı destekler üzerindeki antikor adsorpsiyonu için çeşitli metal kompleksleri de önerilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin kısmen yönlendirilmiş antikor adsorpsiyonunu nasıl sağladığı açık değildir (Jung ve ark., 2008).

### **1.6.2 ELISA Yöntemi**

İmmunoassay, klinik tanı ve yaşam bilimi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. ELISA, en yaygın olarak kullanılan immunoassay biçimidir. Bu immünoassay grubu, immüno-reaktiflerin (antijen veya antikor) birinin immobilizasyonu ve enzim belirteçlerinin kullanımı üzerine kurulmuştur. Farklı katı destekler kullanılabilir; en yaygın olanları 96 kuyucuklu polistiren plakalar, plastik tüpler ve manyetik parçacıklardır. Format tasarımı ile ilgili olarak şu adımları takip ederek bir ELISA gerçekleştirilir: İlk olarak reaktif (antijen veya antikor) bir desteğe (rijit polimer, membran, parçacık vb.) sabitlenir. Daha sonra hareketsiz reaktif, tamamlayıcısı ile (antikor veya antijen içeren numune karışımı) inkübe edilir. Son

olarak, reaksiyonun derecesi doğrudan veya ikinci aşamada enzim izleyici ve substratı ile gösterilir. Çalışma desteğinin yüzeyinde bir antijenin veya antikorun immobilizasyonu, genellikle 96-kuyucuklu bir polistiren mikropalakasına doğrudan adsorpsiyon (kaplama) ile gerçekleştirilir. Bununla birlikte, kovalent bağlama, anti-antikor, protein A veya avidin-biyotin etkileşimi yakalama gibi diğer yöntemler de kullanılmaktadır. Çoğu durumda, bu işlemler adsorpsiyona dayalı olanlardan daha iyi bir performans (hassasiyet, seçicilik, daha düşük spesifik olmayan adsorpsiyon) gösterir (Sun, 2008).

Analit, ELISA'nın algılaması ve çoğu zaman da miktarının belirlenmesi gereken hedefdir. Yaygın analitler proteinler (antikorlar dahil), steroid hormonları gibi doğal küçük maddeler, ilaçlar ve diğer sentetik bileşiklerdir. Analitin özelliklerini ELISA yöntemi geliştirme bağlamında anlamak özellikle önemlidir. Analitlerin özellikleri literatür ve patent incelemeleri yoluyla bulunabilir. Bu bilgiler yapıyı, moleküler ağırlıkları, izoelektrik nokta (pI) değerini, antijenite, çözünürlük ve termal kararlılığı içerir. ELISA için iki önemli husus, analitin immünojenitesi (bir antikor oluşumunu tetikleme kabiliyeti) ve antijenitedir (antikora bağlanma kabiliyeti). Bunlar iki farklı ancak birbirleri ile ilgili özelliktir. Bu, uygun antikorları edinmenin veya üretmenin ne kadar zor olacağına işaret eder. Analit üzerindeki epitopların (antijenik belirleyicilerin) boyutunu ve uzamsal ilişkisini anlamak, antikorların seçiminde çok yararlıdır ve tahlil performansını büyük ölçüde etkileyebilir. Doğrusal epitoplar, protein analitlerinde aminoasitlerin sürekli bir diziliminden oluşur ve aminoasitlerin süresiz kesitleri bir antijenik determinant oluşturduğunda konformasyonel epitoplar meydana gelir. Epitopların dağılımı ve değişkenliği, ELISA reaktif formülasyonu için de bilgilendirici niteliktedir. ELISA'ların spesifik antikorları algılaması gerekiyorsa, ölçülecek antikorun sınıfını veya alt tiplerini tanımlamak gerekir. Bazen toplam antikorları ölçmek için ELISA kullanılmaktadır (Wild, 2013).

Analit-antikor bağlanmasının boyutunu ölçmek için kullanılan yardımcı sisteme bağlı olarak, ELISA'lar yarışmalı veya yarışmasız olabilir. Yarışmalı konseptte analit ile analogik benzer bir molekül arasında antikorun bağlanma yerleri için rekabet gerçekleşir. Bu konsept de uygulamadaki farklılığa göre direkt ve indirekt olarak ikiye ayrılır. Direkt ELISA'da hem analit hem de etiketli hapten veya antijen çözeltidedir ve antikora bağlanmak için yarışır. İndirekt formda, antijen veya hapten immobilizedir; analit ve antikor çözeltidedir. Saptayıcı olarak enzim işaretli ikinci bir antikor kullanılır (Sun, 2008).

Yarışmasız formatlarda, aşırı antikor kullanılır ve bağlanan bölgelerinin ölçümü yapılır. Antijene son derece spesifik olan birincil antikor katı desteğe immobilize edilir. Analit ihtiva eden numuneler daha sonra eklenir, ardından bir enzime konjuge edilmiş saptama antikoruna ilave edilir. Sonuç olarak, analit iki antikor arasında “sandviç” edilir. Testin son aşamasında, üretilen sinyal numunede bulunan hedef analitin miktarı ile orantılıdır. Diğer formatlarla karşılaştırıldığında bu hassas ve sağlamdır; şaşırtıcı olmayan bir şekilde en yaygın kullanılan yöntemdir. Bununla birlikte, bu format yalnızca hedef analit iki veya daha fazla farklı antijenik determinanta sahip olduğunda gerçekleştirilebilir. Analit molekülünün iki ayrı antijenik bölgeye sahip olması için yeterince geniş olması (>6000 Da) gerekir (Sun, 2008; Wild, 2013).

Yaban turpu peroksidaz (HRP), ELISA’da antikorlara konjuge edilen ve en yaygın kullanılan enzimdir. Hedef moleküle konjugasyon için dört lizin kalıntısı içeren, 44 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Uygun substrat ile inkübe edildiğinde renkli ürünler verir. Ayrıca, nispeten kısa bir sürede güçlü sinyaller üretilmesini sağlayan yüksek bir turnover sayısına sahiptir. HRP, substratına göre geniş bir pH aralığında (pH 4,0-8,0) aktiftir. HRP sitrat tamponunda fosfat tamponunda olduğundan daha kararlıdır. Yüksek molariteli fosfat tamponları düşük pH’da HRP’ye özellikle zarar verici olabilir. Noniyonik deterjanlar enzimin kararlılığını etkileyebilir. 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB), 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) sıklıkla kullanılan HRP substratlarıdır (Wild, 2013).

### **1.7 Manyetik Nano Boyutlu Parçacıkların (MNP’lerin) Sentezi**

Son yıllarda nanoteknoloji, biyomedikal uygulamalarda ve teşhis için nanoparçacıklara işlevsel özelliklerin kazandırılması ve parçacıkların karakterize edilmesi gibi konularda oldukça gelişmiştir ve gelişmeye devam etmektedir. Moleküler ve katı haller arasındaki ara maddeler olarak, anorganik nano parçacıkların çözültideki kimyasal erişilebilirliği, yığın fazının fiziksel özellikleri bakımından nano yapıları materyallerin yapımı için ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip ideal araçlardır. *In vitro* teşhiste küçük demir oksit parçacıklarının kullanılması yaklaşık 40 yıldır uygulanmaktadır. Son on yılda, MNP’lerle (çoğunlukla tek parçacık çapı 5-20 nm) yürütülen çalışmaların çoğunda demir oksit çeşitleri olan magnetit ( $Fe_3O_4$ ) ve magemit ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) kullanılmıştır (Gupta ve Gupta, 2005). Bu malzemeler, manyetik olarak kontrollü ilaç salınımı, hücre etiketleme, kontrast ajan olarak manyetik rezonans görüntüleme, doku onarımı ve biyolojik sıvıların detoksifikasyonu gibi

biyomedikal uygulamaların yanı sıra potansiyel bir biyomateryal özellik de sunmaktadır (Rahman ve ark., 2011).

Son yıllarda, demir oksit nano boyutlu parçacık sentezi için birçok araştırma yapılmaktadır. Şekil kontrollü, kararlı, biyoyumlu ve tek dağılımlı demir oksit nano parçacıklar üretmek için birlikte çöktürme, termal dekompozisyon, hidrotermal sentez, mikroemülsiyon, sonokimyasal sentez gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca elektrokimyasal sentez, lazer piroliz teknikleri, mikroorganizma veya bakteriyel sentez (özellikle magnetotaktik bakteriler ve demir indirgeyen bakteriler) gibi diğer yöntemlerle de çalışmalar yapılmaktadır (Wu ve ark., 2008).

Birlikte çöktürme, oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıkta inert bir atmosfer altında bir baz ilavesi ile sulu  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  tuz solüsyonlarından demir oksitleri ( $Fe_3O_4$  veya  $\gamma-Fe_2O_3$ ) sentezlemek için kolay ve kullanışlı bir yoldur. MNP'lerin boyutu, şekli ve bileşimi, kullanılan tuzların tipine (örn., klorürler, sülfatlar, nitratlar),  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  oranına, tepkime sıcaklığına, pH değerine ve ortamın iyonik mukavemetine bağlıdır. Bu sentez yolu ile koşullar optimize edildiğinde aynı kalitede MNP'ler elde edildiği saptanmıştır (Lu ve ark., 2007).

Genellikle, iyonik konfigürasyonlarda herhangi bir değişiklik meydana gelmemesi koşuluyla, nano yapıları malzemelerde bulunan doymuş mıknatıslanma (MS) değerleri genellikle ilgili yığın fazından daha küçüktür. Buna göre, manyetik demir oksit nano parçacıklarındaki MS için deneysel değer, yığın manyetik değeri 100 emu/g'den düşük, 30-80 emu/g aralığında belirlenmiştir. Buna ek olarak,  $Fe_3O_4$  nano parçacıklar çok kararlı değildir ve kolayca  $Fe_2O_3$ 'e oksitlenirler veya asidik bir ortamda çözünürler. Havadaki muhtemel oksidasyonu önlemek için,  $Fe_3O_4$  nano parçacıkların sentezi anaerobik koşullarda yapılmaktadır (Wu ve ark., 2008).

### **1.7.1 MNP'lerin Yüzey Modifikasyonu ve İşlevleştirilmesi**

Protein, polipeptit, antikor, biyotin ve avidin gibi çeşitli biyolojik moleküller uygun bir yüzeyle modifiye edilmiş demir oksit nano parçacıkların yüzeyine doğrudan veya fonksiyonel uç gruplar vasıtasıyla kimyasal bağlarla dolaylı olarak bağlanabilirler. Böylece nano parçacıklar hedef-spesifik hale getirilir (Wu ve ark., 2008). Fonksiyonel özellik kazanan nano parçacıklar hücrel ve doku görüntüleme, hedef ilaç taşınmasında ve terapötik uygulamalarda kullanılmaktadır (Mahmoudi ve ark., 2011).

Uygun yüzey kaplamasıyla kaplanan manyetik demir nano parçacıklar uygun bir çözücüde disperse edildiğinde ferro akışkan adımlar alırlar. Ferro akışkanlar, genellikle organik bir solvent

veya su olan bir taşıyıcı sıvı içinde süspansiyon edilmiş nano ölçekli manyetik parçacıklardır. Manyetik demir oksit nano parçacıklar büyük bir yüzey/hacim oranına sahiptir ve bu nedenle yüzey enerjileri yüksektir. Sonuç olarak, yüzey enerjilerini en aza indirmek için bir araya toplanma eğilimindedirler. Üstelik çıplak demir oksitler yüksek kimyasal aktiviteye sahiptirler ve havada (özellikle manyetit) kolayca oksitlenirler ve bu durum manyetizma ve dispersibilite kaybına neden olur. Bu nedenle, uygun yüzey kaplama sağlanması ve manyetik demir oksit nano parçacıkların stabilitesinin sağlanması gerekmektedir. Demir oksit parçacıklarının stabilizasyonu hem biyolojik bir ortamda hem de manyetik alanda aglomerasiyona karşı kararlı manyetik koloidal ferro akışkanların elde edilmesi için çok önemlidir (Gupta ve ark. 2007; Laurent ve ark., 2008). Manyetik nano parçacıkların modifiye edilmesi; sürfaktanlar, polimerler gibi organik moleküllerin aşılması veya yüzeyin bunlardan biriyle kaplanması ve yüzeyin silis, metal, ametal olmayan madde, metal oksit veya metal sülfür gibi anorganik bir tabaka ile kaplanmasını kapsar. Pratik olarak, birçok durumda koruyucu kovanlar sadece manyetik demir oksit nano parçacıkları stabilize etmekle kalmaz aynı zamanda yukarıda bahsedildiği gibi modifiye edilmiş parçacıklara antikor, protein gibi moleküllerin tutturulmasıyla ileri işlevsellik kazanması için de kullanılır. Günümüzde polimer-fonksiyonelleştirilmiş demir oksit nano parçacıkları, polimerlerin manyetik ve Van der Waals kuvvetlerini dengeleyecek ve itici kuvvetleri arttıracak özellikte olması sebebiyle daha fazla ilgi görmektedir. Dahası, polimer fonksiyonelleştirilmiş demir oksit nano parçacıkları, eşsiz fiziksel veya kimyasal özelliklere sahiptir. Bu materyallerin uygulamalarda kullanılabilmesi için kimyasal modifikasyonlarla özellikleri ayarlanabilen, iyi tanımlanmış nano parçacık numunelerine erişim gereklidir. Bazı durumlarda, pasifleştirici ve aktive edici polimerlerin ve/veya reaksiyon koşullarının dikkatle seçilmesiyle, uyarlanmış ve arzu edilen özelliklere sahip nano parçacıklar üretilebileceği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2008).

Polimerlerle stabilizasyon için yerinde (*in situ*) kaplamalar ve sentez sonrası kaplamalar da dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar vardır. Birinci yaklaşımda, nano parçacıklar sentez sırasında kaplanır. Sentez sonrası kaplama yöntemi, sentezlenen manyetik parçacıklar üzerine polimeri aşılardan ibarettir. Literatürde en yaygın kaplamalar dekstran, karboksimetilatlanmış dekstran, karboksi dekstran, nişasta, arabinogalaktan, glikozaminoglikan, sülfonatlanmış stiren-divinilbenzen, polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), poloksamerler ve polioksaminlerdir. Polimetakrilik asit, poli (etilenoksit)-b-poli (metakrilik asit), polivinilpirrolidon (PVP), poli (akrilasit) (PAA), polialkilsilanoakrilat, poli (laktik asit), etilselüloz, poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) da sıklıkla kullanılan diğer polimerlerdir.

Arabinogalaktan kaplı demir oksit nano parçacıkları, normal hepatositlerde bulunan asialoglikoprotein reseptörleri tarafından tanınmaktadır. PAA kaplamaları, parçacıkların stabilitesini ve biyouyumluluk derecesini artırır ve aynı zamanda biyo yapışmada da yardımcı olur (Laurent ve ark., 2008). Antikorlar yüksek afiniteleri sebebiyle sıklıkla hedefleme ajanları olarak kullanılmaktadırlar. Monoklonal antikorlar demir oksit nano partiküllere bağlanarak immüno nano parçacıklar denilen yapıları meydana getirirler. Bu yapıların biyo-bozunurlukları, uzun sirkülasyon zamanları, biyo-uygunlukları gibi özellikleri sonucu hedeflenen dokuya ilaç taşınmasında nano taşıyıcı olarak kullanılacakları bildirilmiştir (Pathak ve Benita, 2012). Antikorlar, proteinler, hedefleme ligandları gibi çeşitli biyolojik moleküller nano parçacıklar üzerindeki polimer kaplamaya amit veya ester bağları aracılığıyla kimyasal olarak bağlanarak spesifik hale getirilebilirler (Gupta ve Gupta, 2005).

### **1.7.2 Su Bazlı Tiyol-en Süspansiyon Fotopolimerizasyonu**

Tiyol-en süspansiyon fotopolimerizasyonu (TESP), mikron ya da nano boyutlu polimer boncukların sentezi için önerilmiş, TESP'in (step-growth) polimerizasyon mekanizmasıyla su bazlı süspansiyon fotopolimerizasyonunu birleştiren görece yeni bir yöntemdir.

1900'lerin başından beri bilinen ve tiyollerin reaktif  $-C=C-$  çift bağlarına katıldığı tiyol-en klik reaksiyonları gerek polimerlerin sentezi, gerekse de çeşitli malzemelerin modifikasyonu için oldukça uygundur. Kolay ve çok yönlü olması, yöntemi araştırmacılar için özellikle cazip hale getirmektedir. Tiyollerin en'lerle reaksiyonu, radikal mekanizma ile veya anyonik bir zincirle ilerleyebilmektedir. Radikal reaksiyon sistemi genellikle fotokimyasal olarak indüklenir; bu koşullar altında başlama, ilerleme ve sonlanma adımlarıyla bir zincir mekanizması gelişir. Nükleofiller, asitler veya bazlar tarafından aracılık edilen katalitik işlemler vasıtasıyla gerçekleşen radikal bir yol da dahil olmak üzere çeşitli koşullar altında yürütülebilmektedirler. Su veya dimetilformamid gibi son derece polar çözücülerde ilave bir katalizöre gerek duyulmaz (Perale ve Hilborn, 2016).

Tiyol-en polimerleşme mekanizması, radikal ara maddeleri kullanmasına rağmen, molekül ağırlığı gelişimi basamaklı mekanizma izler. Bu, zincir (chain-growth) polimerizasyonlarından elde edilenden daha homojen ağ yapılarına ve dolayısıyla daha iyi tanımlanmış termomekanik özelliklere neden olmaktadır (Hoyle ve ark., 2004).

Durham ve ark. (2012), tiyol-en polimerizasyonunu su bazlı süspansiyon fotopolimerizasyonu ile gerçekleştirdikleri bu yeni yöntemde su bazlı süspansiyon polimerizasyonu ile tiyol-en

reaksiyonlarının basamaklı mekanizmasını birleştirmişler ve tiyol-en fotopolimerizasyonu ile çeşitli monomerler için %100 dönüşüm verebilen nano ya da mikron boyutta polimer parçacıkların sentezlenebileceğini göstermişlerdir (Durham ve ark., 2012).

### **1.8 İlgili Literatür Işığında Çalışmanın Önemi**

Prostat kanseri erkeklerde en sık tanı konan kanser türüdür ve Sağlık Bakanlığı verilerine göre kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Erken teşhis edilebilirse hastaların iyileşme oranı yüksektir. PSA prostat kanserinin tanısında, evrelendirilmesinde ve hastaların izlenmesinde büyük kolaylık sağlamıştır. PSA tam olarak prostat kanserine özel bir biyobelirteç olmamasına karşın tanı biyopsisinin PSA düzeyi ölçüm sonucuna göre yapılması standart bir uygulamadır. Bununla beraber prostat kanseri için daha spesifik biyobelirteç tespitine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Son araştırmalara göre rektal muayeneye ihtiyaç bırakmayacak bir biyobelirteç olarak idrardaki EN2 proteini düzeyi umut vaat etmektedir.

Genetik alanındaki gelişmelerin sonucunda, erken embriyolojik gelişim sırasında görev alan ve kanserlerde tekrar eksprese oldukları saptanan birçok gen tespit edilmiştir. Bu genlerden bir grubunu içeren HOX-genlerinin disregülasyonunun birçok kanserde meydana geldiği gösterilmiştir. Son olarak bu gruba ait olan EN2 ekspresyonu üzerinde çalışmalar yapılmış ve bu genin ürünü olan proteinin sadece prostat kanseri hücreleri tarafından salgılandığı gösterilmiştir (Bose ve ark., 2008). Bu bulgular ışığında yapılan çalışmaların ilk sonuçları idrarda EN2 protein varlığının prostat kanseri için tanısal bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (Bose ve ark., 2008; Morgan ve ark., 2011). Öyle ki Morgan ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, EN2 düzeyi kontrolünün rektal muayeneye olan ihtiyacı ortadan kaldırmabileceğini göstermiştir. Pin ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada idrardaki EN2 miktarının prostat kanserine yüksek oranda bağlı olduğu, prostat kanserinin idrardaki EN2 miktarı aracılığıyla %88,2 spesifiklik ve %66 duyarlılık ile belirlenebildiği rapor edilmiştir. Morgan ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada idrarda EN2 proteininin 42 µg/L seviyesinin üzerinde olmasının yüksek oranda prostat kanserine işaret ettiğini ortaya koyulmuştur. Son yıllarda prostat kanserinin teşhisine yönelik klinik çalışmaların büyük çoğunluğunda EN2 proteini standart bir biyobelirteç olarak bulunmaktadır (Morgan ve ark. 2011; Pandha ve ark., 2012; Pin ve ark., 2013; Truong ve ark., 2013). Bunun yanında idrardaki EN2 proteini düzeyinin tümör büyüklüğü ile orantılı olduğu sonucunun elde edildiği çalışmalar da mevcuttur (Pandha ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada, EN2 için homeodomain-spesifik DNA problemleri ile arasındaki etkileşime dayanan hassas bir impedimetrik biyosensör tasarlanmış, DNA problemlerinin hedef proteinlere olan güçlü afinitesi, elektroforetik hareket kayma deneyleri (EMSA), yüzey plazmon rezonansı (SPR) ve kantitatif floresan deneyleri ile tayin edildi ( Lee ve ark., 2015).

Prostat spesifik membran antijeni (PSMA), ağırlıklı olarak tümörlerin neovasküler sisteminde ve prostat hücrelerinin yüzeyinde eksprese olur ve androjen yoksunluğu tedavisini takiben ekspresyon artar. Serda ve ark. (2007), biyotinlenmiş anti-PSMA antikorunu, streptavidin etiketli demir oksit nanopartiküllerine konjuge etmişler ve LNCaP prostat kanseri hücreleri kullanılarak manyetik rezonans (MR) görüntüleme ve konfokal lazer tarama mikroskop görüntüleme çalışmalarında kullanmışlardır. Böylece PSMA üzerinden prostat kanseri hücrelerini hedeflemenin MR görüntülerini zenginleştirmek için özel ve duyarlı bir teknik sunduğunu göstermişlerdir.

Xu ve ark. (2011) tarafından kandaki tümör hücrelerinin demir oksit manyetik nano parçacık tabanlı immüno manyetik ayırımını kullanarak oldukça etkili bir proses geliştirilmiştir. 30 nm boyutundaki polimer kaplı nano parçacıklar, kanserli hücrede aşırı eksprese olan hücre zar proteini epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'ye (HER2) karşı anti-HER2 ile modifiye edilmiş, model hücre olarak anti-HER2'ye tepki veren meme kanseri hücre hattı olan SK-BR3 kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda antikorla modifiye edilmiş MNP'lerin kanserli hücrelerin yüzeyine sağlıklı hücrelere göre çok daha yüksek oranlarda bağlanmasından yararlanılarak manyetik alanda kanserli hücrelerin tercihli yakalanmasının gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Demir oksit nano parçacıkların sentezlenmesi ve su bazlı tiyol-en süspansiyon fotopolimerizasyonu ile kaplanması için kullanılan kimyasallar; pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropionat) (4SH); 1,3,5-trialil-1,3,5-triazin-2,4,6(1H,3H,5H)-trion (TTT); amonyum hidroksit (% 25); etil alkol; kloroform; sodyum dodesil sülfat (SDS);  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  ve  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  Sigma Aldrich Chemical Co.'dan (St., Louis, ABD), fotobaşlatıcı 1-hidroksisikloheksil fenil keton (IRGACURE 184) ise Ciba Specialty Chemicals'dan (Basel, İsviçre) satın alınmıştır.

Antikor immobilizasyonu ve ELISA için kullanılan kimyasallar; anti-EN2 birincil antikoru; EN2 peptidi; keçi anti-insan IgG H & L (HRP); 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) ELISA substratı Abcam'dan (Cambridge, MA), sığır serum albumini (BSA) ve yaban turpu (horseradish) peroksidaz ise Sigma Aldrich Chemical Co.'dan (St., Louis, ABD) temin edilmiştir.

Kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup ileri bir saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır.

### 2.2 Araştırma Araçları

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometre: Perkin Elmer Spektrum 100ATR-FTIR Spektrometre (A.B.D)

Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı: Philips, XL30SEM FEG (Hollanda)

Santrifüj: Sigma, 3K 30 Yüksek devirli, soğutmalı (A.B.D.)

Spektrofotometre: ThermoScientific, Helioszeta UV-VIS (A.B.D.)

Hassas Terazisi: Sartorius Analytic, A200S  $\pm 0,0001$ (Almanya)

-80 °C Derin Dondurucu: ThermoElectronCorp., Forma (A.B.D.)

Buzdolabı: Regal (Türkiye)

Su Banyosu: Wasserbad WB Serisi (Almanya)

Vorteks Karıştırıcı: Fisons, Whirlimixer (İngiltere)

Destile Su Cihazı: Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)

Manyetik Karıştırıcı: VelpScientifica, ARE (İtalya)

Etüv: Genlab, midi/2/AL (0-100) (İngiltere)

pH metre: Mettler Toledo (İsviçre)

Orbital Karıştırıcı: IKA-Werke, OS 10 B(Almanya)

Termogravimetrik Analizör: Perkin-Elmer, Pyris 1 TGA (A.B.D)

## **2.3 Deneysel Yöntemler**

### **2.3.1 Amin Fonksiyonlitesine Sahip MNP'lerin Hazırlanması**

#### **2.3.1.1 MNP'lerin Sentezi**

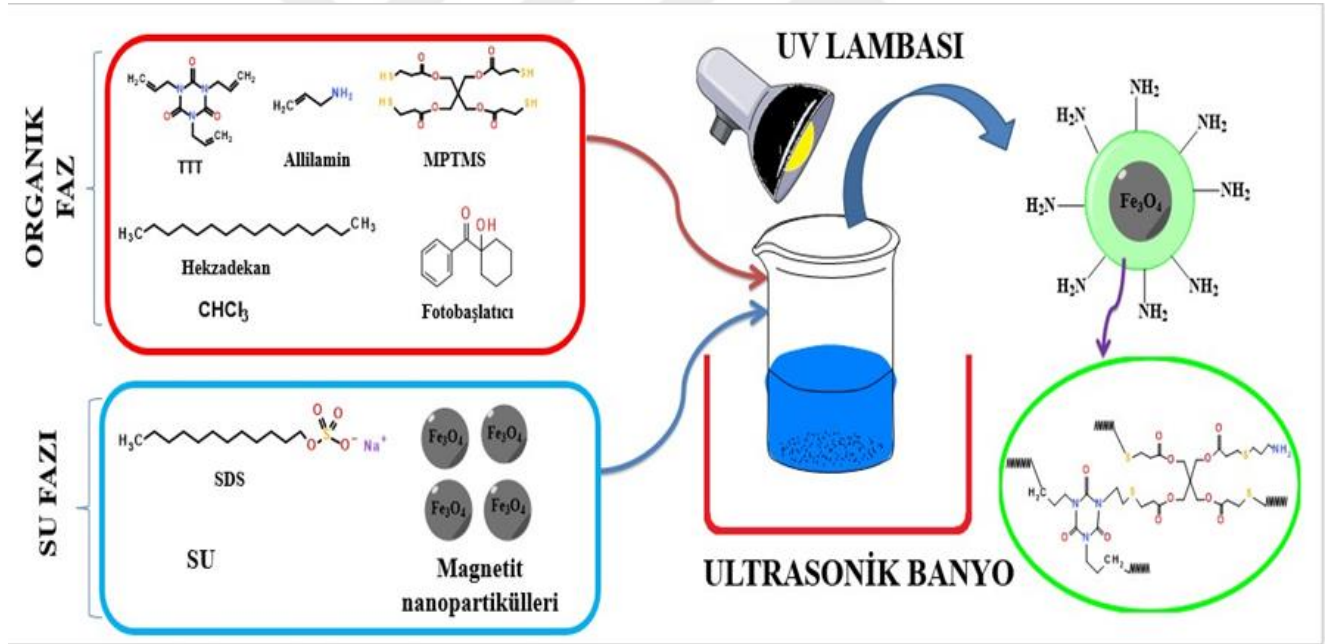
MNP'ler, daha önce yayınlanmış birçok çalışmaya benzer şekilde birlikte çöktürme metodu kullanılarak sentezlendi (Roque ve ark., 2009; Petcharoen ve Sirivat, 2012; Rana ve ark., 2016). 1,9881 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve 5,406 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1:2) 100 mL distile suda çözüldü. Çözünmüş oksijenin giderilmesi için reaksiyondan önce distile sudan 15 dakika boyunca azot gazı geçirildi. Bu sulu karışım  $90^\circ\text{C}$ 'ye ısıtılarak yine azot gazı varlığında 30 dakika boyunca karıştırıldı. 30 dakika sonunda  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  çözeltilisine 25 mL %25'lik  $\text{NH}_4\text{OH}$  çözeltisi eklendi ve çözelti renginin aniden siyaha döndüğü gözlemlendi. 2 saatlik bir karıştırmanın ardından MNP'ler manyetik olarak (mıknatıs yardımıyla) dekante edildi. Su ve etanolle defalarca yıkanan parçacıklar  $80^\circ\text{C}$ 'de vakum etüvünde kurutuldu. Böylece kaplamaya hazır  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  formülüne sahip manyetik nano parçacıklar elde edilmiş oldu.

#### **2.3.1.2 MNP'lere Amin Fonksiyonlitesi Kazandırılması**

MNP'lerin amin grupları ile kaplanması, tiyol-en süspansiyon fotopolimerizasyonu (TESP) ile gerçekleştirildi. TESP daha önce yayımlanmış çalışmalara benzer şekilde gerçekleştirildi (Amato ve ark., 2015; Durham ve Shipp, 2015). Alüminyum folyoya sarılmış bir beher içerisinde 2,4333 g 4SH; 1,2464 g TTT; 0,2854 g allilamin ve 0,5 g heksadekan tartıldı. Fotobaşlatıcı olarak 1-hidroksisikloheksil fenil keton (IRGACURE 184) eklendi. Karışım 10

mL kloroformda çözüldü. Böylelikle tiyol:en sitokiyometrik molar oranının 1:1 olduğu organik faz elde edilmiş oldu. Beher folyoyla sarıldı ve ışık almamasına dikkat edilerek manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı.

Ayrı bir beherde sürfaktan olarak 0,3 g SDS 5 mL distile suda çözüldü. 0,6 g MNP sürfaktan çözeltisine eklendi ve beher nano parçacıkların disperse olması için 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. MNP'lerin bu sulu dispersiyonuna yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan organik faz eklendi. Elde edilen süspansiyon 5 dakika boyunca karıştırıldı. Ultrasonik banyo buzla dolduruldu ve süspansiyon 15 dakika boyunca yine ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra ultrasonik banyoda bulunan süspansiyon 10 dakika boyunca UV ışınlarına (OSRAM 300 W,  $\lambda_{max}=365$  nm) maruz bırakıldı. İşlem sonunda kaplanmış MNP'ler manyetik olarak dekante edildi ve MNP'ler vakum etüvünde 50°C'de kurutuldu. MNP varlığında TESP metodu, monomerlerin ve reaktiflerin kimyasal yapılarıyla birlikte Şekil 2.1'de gösterildi. Monomer ve reaktif miktarları ise Tablo 2.1'de özetlendi.



Şekil 2.1. MNP varlığında TESP metodu ve monomer ile reaktiflerin kimyasal yapısı

**Tablo 2.1.** TESP için monomer ve reaktif miktarları

	Bileşen Adı	Kütle (g)
Organik Faz	4SH	2,4433 (5 mmol)
	TTT	1,2464 (5 mmol)
	Allilamin	0,2854 (5 mmol)
	IRGACURE 184	0,04
	Hekzadekan	0,5
	Kloroform	10,0
Sulu Faz	SDS	0,3
	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,6
	Su	5,0

### 2.3.2 MNP'lerin Karakterizasyonu

Kaplamadan önceki ve sonraki MNP'lerin yapısal özellikleri ve yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskop (SEM), taramalı geçirimli elektron mikroskop (STEM), termogravimetrik analiz (TGA), zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile incelendi. Infrared spektrumu, Perkin-Elmer Spectrum 100 ATR-FTIR'de 400-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında kaydedildi. MNP'lerin termogravimetrik analizleri (TGA), Pyris 1 TGA modeli Perkin-Elmer Termogravimetrik analizör kullanılarak gerçekleştirildi. Numuneler azot atmosferi altında 10°C/dk'lık ısıtma hızı ile 30 °C'den 750°C'ye ısıtıldı. MNP'lerin SEM ve STEM görüntüleri Philips XL30 ESEM-FEG / EDAX ile alındı.

### 2.3.3 MNP'lerde Amin Miktarının Ninhidrin Testiyle Saptanması

MNP'lerin nano parçacıklarının amino grup içeriği ninhidrin yöntemi ile belirlendi (Kaiser ve ark., 1970). %0,5'lik glisin ve %0,2'lik ninhidrin çözeltileri distile su kullanılarak hazırlandı. 4 ayrı tüpe %0,2'lik ninhidrin çözeltilisinden 0,1 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL alındı. Üzerlerine son hacim 1 mL olacak şekilde distile su eklendi. Her tüpe %0,5'lik glisin çözeltilisinden 1 mL ilave edildikten sonra tüpler vortekste karıştırıldı ve 100°C'lik su banyosunda 15 dakika ısıtıldı. İşlem sonunda tüpler soğutuldu. 570 nm'de 1:1 seyreltilmiş %0,5'lik glisin çözeltilisine karşı absorban ölçümü yapıldı. Ninhidrin konsantrasyonuna karşı absorban grafiği çizildi ve standart grafiği olarak kullanıldı. MNP'lerde amin miktarı tayini

için 10 mg MNP 1,5 mL su içine dağıtıldı ve daha sonra 0,5 mL % 0.2'lik ninhidrin çözeltisi ilave edildi. Karışım 100 °C'lik su banyosunda 15 dakika ısıtıldı ve daha sonra oda sıcaklığına soğutuldu. MNP'ler manyetik dekantasyon ile ayrıldı ve süpernatantın absorbanı spektrofotometrik olarak 570 nm'de ölçüldü.

#### **2.3.4 Protein Tayini**

MNP'lerin fiziksel ve kovalent olarak immobilize ettikleri EN2 birincil antikor miktarları Bradford metoduna göre hesaplandı (Bradford, 1976). Standart olarak 0,1 mg/mL konsantrasyonunda ovalbumin çözeltisi kullanıldı. Tüplere değişen hacimlerde (20-80 µL) ovalbumin çözeltileri otomatik pipet yardımıyla konuldu. Son hacimleri distile su ile 800 µL'ye tamamlandı. Her bir tüpe 200 µL Bradford reaktifi eklendi ve tüpler vorteks ile kuvvetlice karıştırıldı. 15 dakikalık beklemenin sonunda 595 nm'de referans çözeltisine (800 µL distile su +200 µL Bradford reaktifi) karşı absorbanı ölçüldü. Absorbansa karşı ovalbumin konsantrasyon grafiği çizildi.

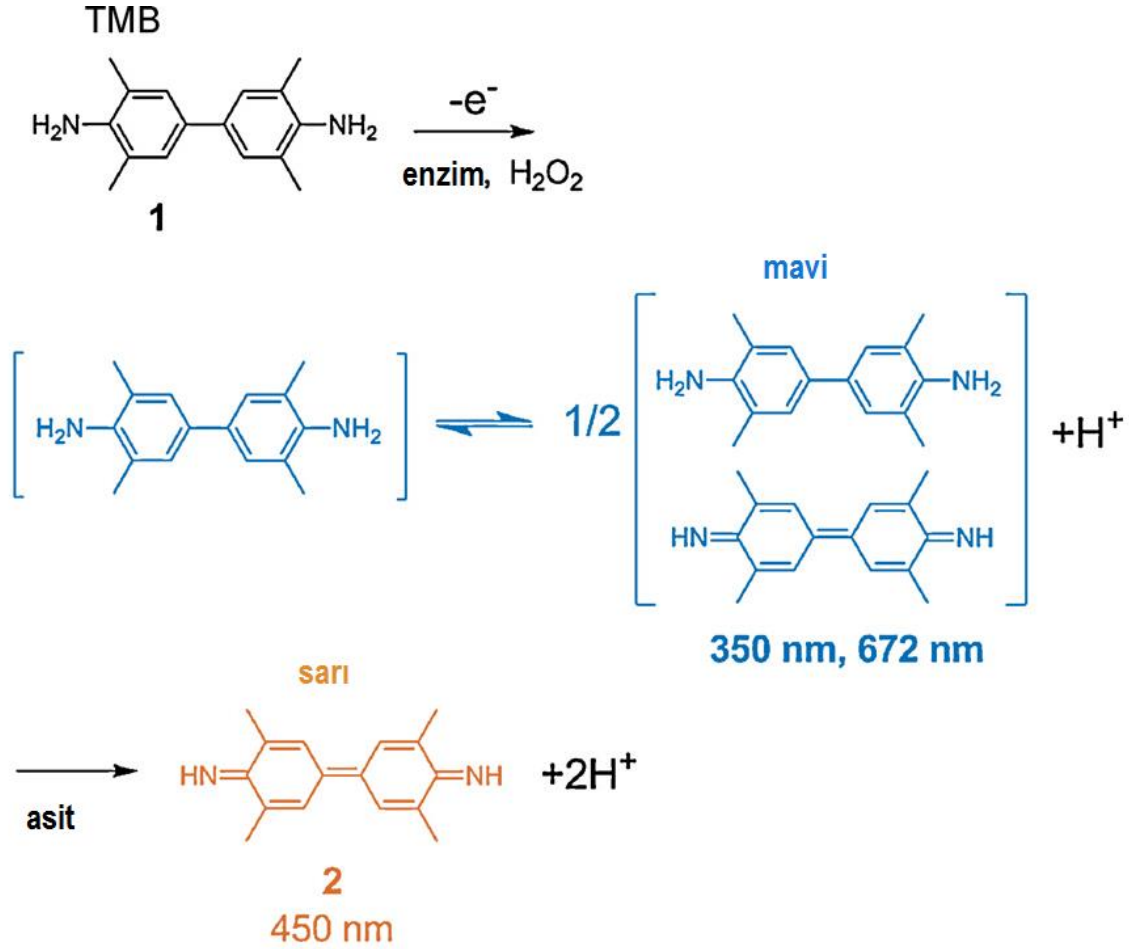
#### **2.3.5 Antikorların Fiziksel Olarak İmmobilizasyonu**

##### **2.3.5.1 Aynı Konsantrasyonda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu**

5 mg MNP üzerine 30 µg/mL'lik anti-EN2 birincil antikor çözeltiden 50 µL (1,5µg) eklendi ve 37°C'lik su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Antikor bağlı MNP'ler manyetik dekantasyon ile ayrıldı ve MNP'ler üç kez 10 mM'lik fosfat tamponu (PBS) (pH 7,4) ile yıkılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Bağlanan antikor miktarı Bradford protein tayin yöntemine göre tayin edildi (Bradford, 1976). Antikor modifiye edilmiş MNP'ler, spesifik olmayan bağlanma etkileşimini gidermek ve kalan bölgeleri bloke etmek için oda sıcaklığında 1 saat boyunca 10 µL %0,1'lik BSA çözeltisi ile inkübe edildi. İşlem sonunda MNP'ler manyetik dekantasyonla ayrılarak 3 kez fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4) ile yıkandı. Antikor bağlı MNP'ler üzerine 50 µL farklı dilüsyonlarda (3, 5, 7, 9 ve 12 µg) EN2 peptidi eklendi ve 37°C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. İşlem sonunda MNP'ler manyetik dekantasyon ile ayrıldı ve 10 mM'lik fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkandı. Modifiye MNP'lere 10 µL keçi anti-insan IgG H & L (HRP) eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. MNP'ler manyetik dekantasyon ile ayrıldı ve distile su ile yıkandı.

HRP aktivite ölçümleri, Iype ve ark. (2017) yaptığı çalışmaya göre, substrat olarak 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) kullanılarak yapıldı. MNP'ler üzerine 740 µL 10 mM PBS tamponu

(pH 7,4), 5  $\mu$ L %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ve % 0,075'lik TMB stok çözeltisinden 50  $\mu$ L ilave edildi. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edildi. Reaksiyon 200  $\mu$ L 0,6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek durduruldu, oluşan sarı rengin şiddeti 450 nm'de substrat içermeyen referans çözeltisine karşı ölçüldü. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TMB çözeltilerinden elde edilen standart grafiğe göre ürün hesabı yapıldı.



**Şekil 2.2.** TMB ile HRP arasında oluşan reaksiyon (Li ve ark., 2009)

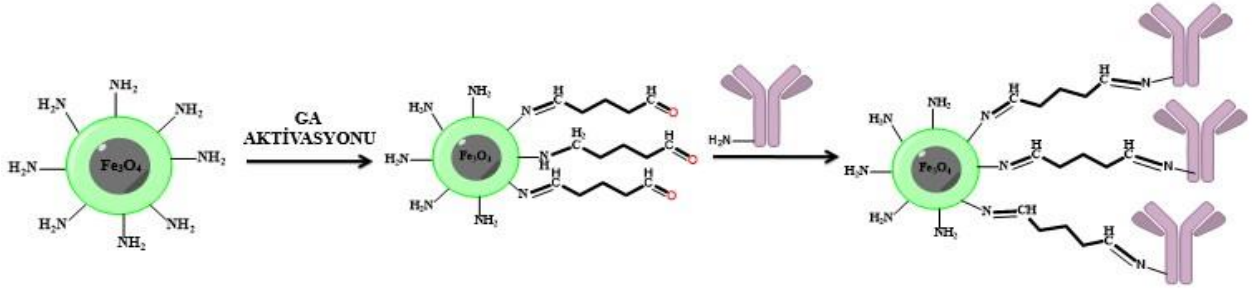
### 2.3.5.2 Farklı Konsantrasyonlarda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu

Tüplere 5 mg MNP konuldu, üzerlerine 50  $\mu$ L çözeltide 0,01  $\mu$ g-1,5  $\mu$ g aralığında değişen konsantrasyonlarda anti-EN2 birincil antikor eklendi. Anti-EN2 birincil antikor üzerine EN2

peptidi eklenme basamağına kadar 2.3.5.1’de anlatılan işlemler uygulandı. Antikor bağlı MNP’ler üzerine 2 µg/50 µL olacak şekilde aynı konsantrasyonda EN2 peptidi eklendi ve 37°C’de 2 saat süreyle inkübe edildi ve sonrasında 2.3.5.1’de anlatıldığı şekilde denemeye devam edildi.

### 2.3.6 Antikorların Kovalent Olarak İmmobilizasyonu

Bu bölümde Şekil 2.3’te gösterildiği gibi MNP’ler öncelikle GA ile aktive edildi ve daha sonra antikor immobilizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 2.3. MNP’lerin GA ile aktivasyonu ve anti-EN2 birincil antikor kovalent bağlanması

#### 2.3.6.1 Aynı Konsantrasyonda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu

Yaklaşık 100 mg MNP 50 mL GA (%25) içinde süspansiyon edildi. Karışım, oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. GA ile modifiye edilmiş MNP’ler manyetik dekantasyon ile ayrıldı ve distile su ile iyice yıkandı. Oluşan nihai ürün kurutuldu. Antikor immobilizasyonu ve HRP aktivitesi, 2.3.5.1’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

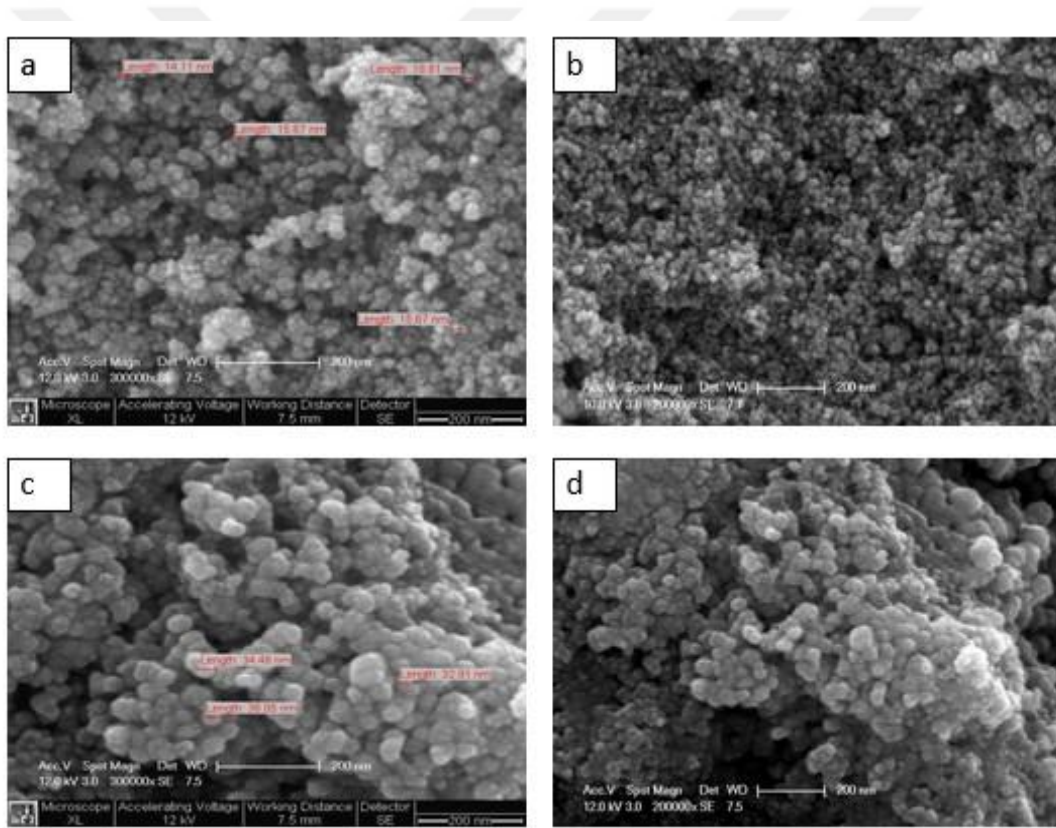
#### 2.3.6.2 Farklı Konsantrasyonlarda anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu

GA ile aktifleştirilmiş MNP’lerden 5 mg konulan tüplere 0,01 µg-1,5 µg aralığında değişen konsantrasyonlarda anti-EN2 birincil antikor eklendi ve 37°C’lik su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Daha sonraki işlemler 2.3.5.1’de anlatıldığı gibi yapıldı.

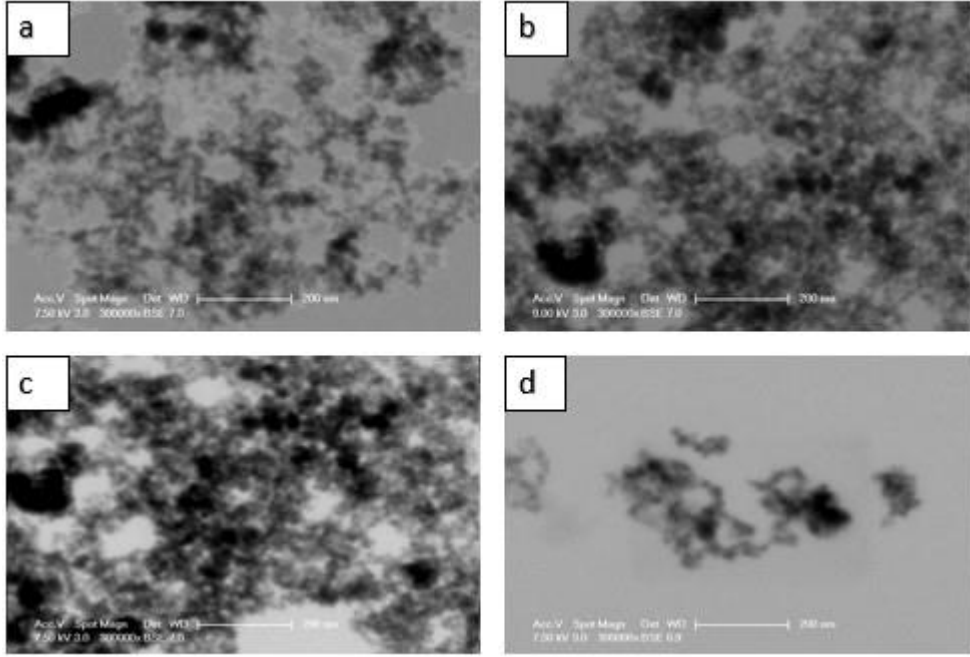
### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 MNP Karakterizasyonu

MNP'lerin modifikasyon öncesi ve sonrası SEM ve STEM görüntüleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de sırasıyla gösterilmiştir. Görüntüler incelendiğinde sentezlenen  $Fe_3O_4$  parçacıkların ortalama çapının  $15 \pm 3$  nm olan tek tip küresel şekilde olduğu bulunmuştur. Modifikasyondan sonra ortalama parçacık çapı SEM görüntülerinde kanıtlandığı şekilde  $35 \pm 4$  nm'ye çıkmıştır. Bu, kaplamanın başarılı olduğunu göstermektedir. SEM bulgularını desteklemek için yapılan STEM analizinde MNP'lerin bazı bölgelerde kümeleştiği de gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1. Çıplak (a,b) ve modifiye edilmiş (c,d) MNP'lerin SEM görüntüleri

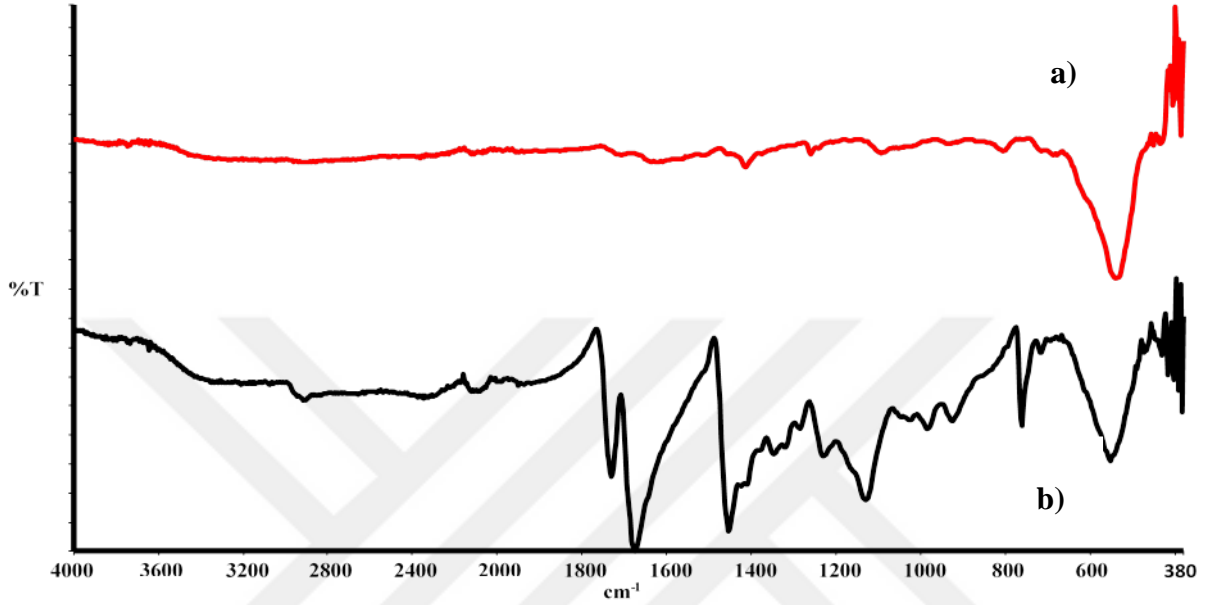


**Şekil 3.2.** Çıplak (a,b) ve modifiye edilmiş (c,d) MNP'lerin STEM görüntüleri

MNP'leri kaplamak için emülsiyon, süspansiyon veya miniemülsiyon polimerizasyon tekniklerinin kullanıldığı çalışmalar vardır (Zaitsev ve ark., 1999; Ramirez ve Landfester, 2003; Horák ve ark., 2003; Boguslavsky ve Margel, 2008; Wang ve ark., 2012). Örneğin, Ramirez ve Landfester (2003) miniemülsiyon yöntemi ile 60 nm parçacık boyutuna sahip polistiren kaplı manyetik nano parçacıkları elde etmiştir. Horák ve ark. (2003), toluen içerisinde hidroksietil metakrilatın dispersiyon polimerizasyonu yoluyla MNP'leri kaplayarak mikro parçacıklar hazırlamışlardır. MNP'lerin çapları  $10 \pm 5$  nm iken, kaplama üzerine çekirdek-kabuk yapıları parçacıkların boyutunun  $0,3-4 \mu\text{m}$ 'ye yükseldiğini tayin etmişlerdir. Benzer şekilde Zaitsev ve ark. (1999), termal olarak başlatılan serbest radikal polimerizasyonu ile manyetik parçacıklarının varlığında metakrilik asit ve hidroksietil metakrilatı polimerize ederek polimer manyetik parçacıklar hazırlamışlardır.

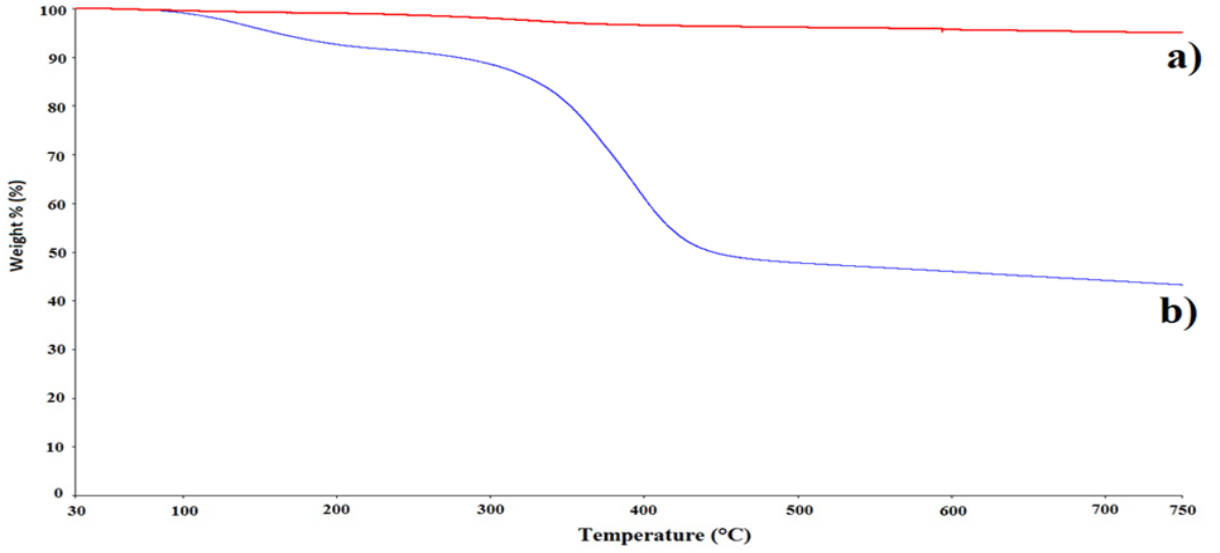
MNP'lerin yapısal karakterizasyonu ise FTIR analiziyle gerçekleştirilmiştir. Çıplak ve modifiye edilmiş MNP'lerin FTIR spektrumları Şekil 3.3'te verilmiştir. Çıplak MNP'lerin spektrumunda  $580 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki güçlü bant, Fe-O gerilme titreşimine aittir (Petcharoen ve Sirivat, 2012). Kaplanmış MNP'lerin spektrumunda TTT ve 4SH bileşiklerinin karbonil gruplarının gerilme titreşimleri sırasıyla  $1674 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1731 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir (Çakmakçı ve ark., 2017). Sırasıyla allil ve -SH gruplarına karşılık gelen  $1644 \text{ cm}^{-1}$  ve  $2571 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bantların gözlenmemesi çapraz bağlanmanın tamamlandığına dair bir delildir. Ek olarak,  $2960 \text{ cm}^{-1}$  ve  $2850 \text{ cm}^{-1}$  arasındaki bantlar da alifatik -CH bağlarının gerilme titreşimlerine aittir.

FTIR spektrumundaki bu bantların varlığı MNP'lerin başarıyla kaplandığını kanıtlar. Amin gruplarına ait piklerin gözlenememesi düşük allilamin miktarıyla ve görece zayıf absorpsiyon bantları vermeleriyle açıklanabilir. Karakteristik Fe-O bandı modifikasyondan sonra magnetit ile organik matris arasındaki etkileşimler sonucunda  $553\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır.



**Şekil 3.3.** a) Çıplak b)Modifiye edilmiş MNP'lerin FTIR spektrumları

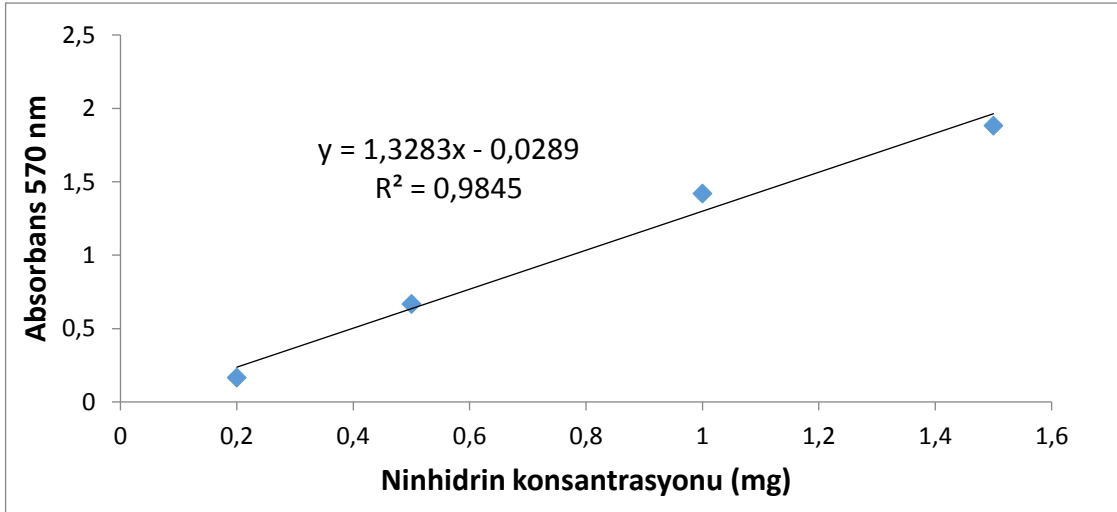
Modifiye edilmiş MNP'lerdeki organik içerik miktarı ise TGA ile belirlenmiştir. Şekil 3.4'de verilen termogramdan da görüleceği gibi azot altında,  $750\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de çıplak nano parçacıkların toplam ağırlığında %5'lik bir kayıp olmuştur. Bu kayıp absorbe edilmiş fakat artan sıcaklıkla uzaklaşan neme karşılık gelmektedir. Modifiye edilmiş MNP'lerde ise aynı koşullarda %57'lik bir ağırlık kaybı gerçekleşmiştir. Buradan modifiye edilmiş MNP'lerdeki magnetit yüzdesinin yaklaşık olarak %40 olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.4. a)Çıplak b) Modifiye edilmiş MNP'lerin TGA spektrumları

### 3.2 MNP'lerdeki Amin Miktarının Ninhidrin Testiyle Saptanması

MNP'lerdeki amin miktarı 2.3.3'te anlatıldığı gibi ninhidrin testiyle belirlenmiştir. Şekil 3.5'te verilen ninhidrin standart grafiğine göre 0.0354 mmol NH<sub>2</sub>/g MNP olarak hesaplanmıştır.



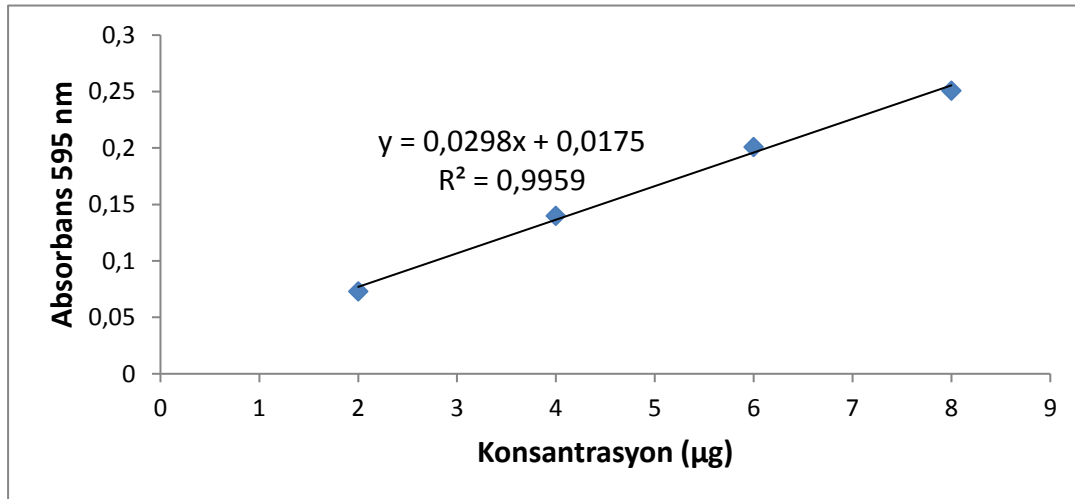
Şekil 3.5. MNP'lerdeki amin miktarının hesaplanmasında kullanılan ninhidrin kalibrasyon grafiği

### 3.3 MNP Üzerine Fiziksel ve Kovalent Olarak anti-EN2 Antikor İmmobilizasyonu

Modifiye edilmiş MNP'ler üzerine anti-EN2 birincil antikorunu fiziksel ve kovalent olarak 2.3.5 ve 2.3.6'de anlatıldığı gibi immobilize edilmiştir. İyonik bağlar, hidrofobik ve polar etkileşimler gibi moleküller arası kuvvetler antikorların katı yüzeylere adsorbe edilmesine yol açarlar. Fiziksel olarak bağlanma antikor immobilizasyonu için kullanılan en basit ticari işlemdir. Fakat bu yöntemle antikor bağlanmasının heterojen ve gelişigüzel olduğu bildirilmiştir. Yıkamalar sırasında kayıplar olduğu ve antikorların stabilitelelerini de kayb ettikleri ve denaturasyona uğradıkları gösterilmiştir (Yu ve ark., 2015). Tez çalışmamızda fiziksel immobilizasyon sonucunda bağlanmanın 0,54 mg antikor/g MNP olduğu Şekil 3.6'da verilen, Bradford yöntemine göre hazırlanan protein standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

Kovalent bağlanmanın, bir antikordaki aminoasitlerin erişilebilir işlevsel grupları tarafından bir yüzeye geri dönüşümsüz bağlanması ve yüksek oranda yüzey kaplaması sağladığından tercih edilen bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Yu ve ark., 2015). Tez çalışmamızda kovalent immobilizasyon neticesinde bağlanma 1,775 mg antikor/g MNP olarak hesaplanmıştır.

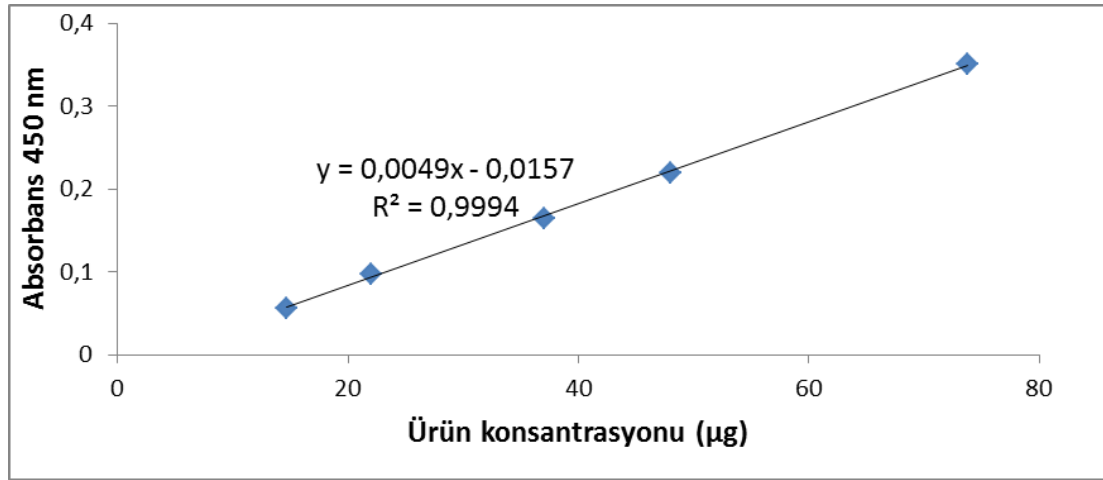
Kovalent immobilizasyon yöntemiyle, aynı miktar MNP üzerine fiziksel immobilizasyona göre daha fazla antikorun immobilize olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni olarak fiziksel immobilizasyonda antikor ve MNP arasındaki zayıf etkileşimler gösterilebilir.



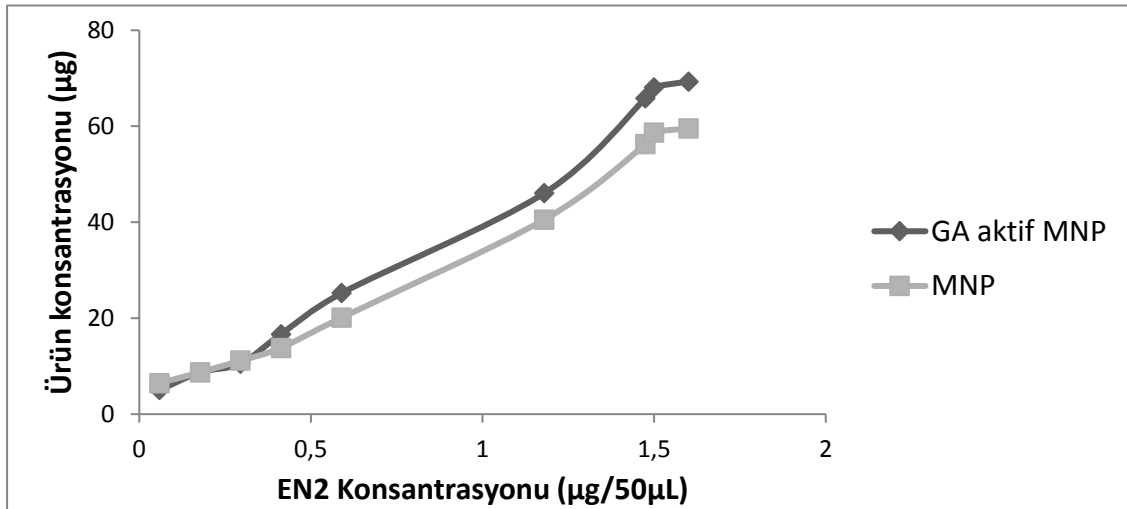
Şekil 3.6. Bradford yöntemine göre hazırlanan protein standart grafiği

### 3.4 Aynı Konsantrasyonda anti-EN2 Antikor Fiziksel ve Kovalent İmmobilizasyonu

2.3.5.1 ve 2.3.6.1’de anlatıldığı gibi, aynı miktardaki MNP üzerine aynı konsantrasyonda anti-EN2 birincil antikor immobilize edilmiş ve farklı dilüsyonlarda EN2 peptidi eklendiğinde elde edilen sonuçlar Şekil 3.7’de verilen HRP-TMB standart grafiği kullanılarak ürün miktarları hesaplanmıştır. Böylece dolaylı yoldan EN2 konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Şekil 3.8’de görüldüğü üzere EN2 peptidinin konsantrasyonu arttıkça antijen-antikor arasındaki etkileşim artmış ve doygunluğa ulaştıktan sonra sabit kalmıştır.



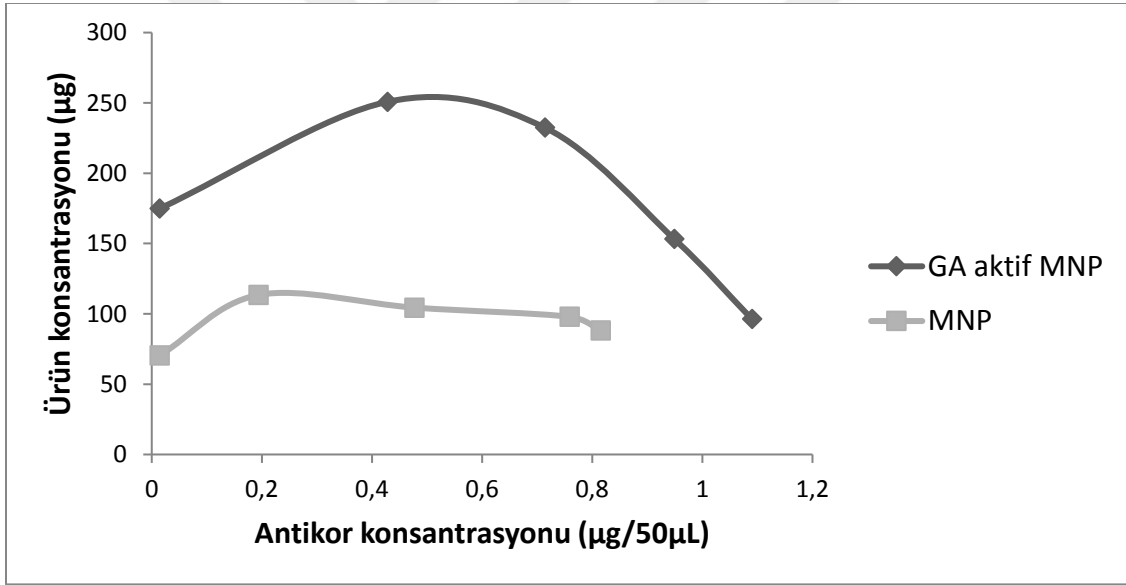
Şekil 3.7. HRP-TMB standart grafiği



Şekil 3.8. EN2 konsantrasyonu etkisi

### 3.5 Farklı Konsantrasyonlarda anti-EN2 Antikor Fiziksel ve Kovalent İmmobilizasyonu

2.3.5.2 ve 2.3.6.2’de anlatıldığı gibi aynı miktardaki MNP üzerine farklı konsantrasyonlarda anti-EN2 birincil antikor immobilize edilmiş ve aynı konsantrasyonda EN2 peptidi eklendiğinde elde edilen sonuçlar Şekil 3.7’de verilen HRP-TMB standart grafiği kullanılarak ürün miktarları hesaplanmak suretiyle dolaylı yoldan antikor konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Şekil 3.9’da görüldüğü üzere anti-EN2 antikor konsantrasyonu arttıkça antijen-antikor arasındaki etkileşim konsantrasyonla birlikte artarken belli bir değerden sonra azalmaya başladığı görülmüştür. Genel olarak, antikor konsantrasyonu arttıkça antijen ile verdiği reaksiyon da artarak devam eder ve belli bir platoya ulaşıktan sonra (doyum noktası) antijen-antikor arasında etkileşimin azaldığı görülür (Jacobs ve ark., 2015). Bu durum üst üste sıkışık bağlanmalar olması nedeni ile antijen-antikor etkileşiminin sterik olarak etkilenmiş olabileceği şeklinde açıklanabilir.



Şekil 3.9. Antikor konsantrasyonu etkisi

## 4.SONUÇLAR

Tez çalışmamızda birlikte çöktürme metoduyla MNP sentezlenmiş, MNP'ler TESP metoduyla polimer kaplanarak parçacıklara amin fonksiyonelitesi kazandırılmıştır. Kaplanan MNP'lerin bir kısmı glutaraldehit ile aktive edilerek aldehit fonksiyonalitesine sahip parçacıklar elde edilmiştir. Amin ve aldehit fonksiyonalitesine sahip MNP'lerin yapısal özellikleri SEM, STEM, TGA ve ATR-FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir.

Amin ve aldehit fonksiyonelitesine sahip MNP'lere, prostat kanseri teşhisinde üstünlükleriyle öne çıkan EN2 proteinin tayin edilmesinde kullanılmak üzere EN2'nin antikoru fiziksel ve kovalent olarak immobilize edilmiştir. Çalışmamızda fiziksel immobilizasyonda bağlanma 0,54 mg antikor/g MNP, kovalent immobilizasyonda bağlanma 1,775 mg antikor/g MNP olarak hesaplanmıştır.

Aynı miktardaki MNP üzerine aynı konsantrasyonda anti-EN2 birincil antikor immobilize edilmiş ve farklı dilüsyonlarda EN2 peptidi eklendikten sonra antijen-antikor arasındaki etkileşim ELISA metoduna göre incelenmiştir. EN2 peptidi konsantrasyonu arttıkça antijen-antikor arasındaki etkileşimin de arttığı ve doygunluğa ulaştıktan sonra etkileşimin sabit kaldığı bulunmuştur.

Aynı miktardaki MNP üzerine farklı konsantrasyonlarda anti-EN2 birincil antikor immobilize edilmiş ve aynı konsantrasyonda EN2 peptidi eklendiğindeki antijen-antikor etkileşimi incelenmiştir. Anti-EN2 antikor konsantrasyonu arttıkça antijen-antikor arasındaki etkileşimin konsantrasyonla birlikte arttığı ve belli bir değerden sonra azalmaya başladığı görülmüştür.

## KAYNAKLAR

Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H., Pillai, S. (2014). Cellular and Molecular Immunology, 8. Baskı, Elsevier Saunders, Boston.

Amato, D.V., Amato, D.N., Flynt A.S., Patton, D.L. (2015). Functional, sub-100 nm polymer nanoparticles via thiol–ene miniemulsion photopolymerization, Polymer Chemistry, 6(31), 5625-5632.

Bereli, N. (2010). Monoklonal Antibadi Saflaştırılması İçin Eşboyutlu Partiküllerin Hazırlanması. Doktora Tezi, Ağustos, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Bhatia, S.K., Shriver-Lake, L.C., Prior, K.J., Georger, J.H., Calvert, J.M., Bredehorst, R., Ligler, F.S. (1989). Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces, Analytical Biochemistry, 178(2), 408-413.

Bhattacharya, J.K.S S. (2006). A Text Book of Immunology, Academic Publishers.

Boguslavsky, Y., Margel, S. (2008). Synthesis and characterization of poly (divinylbenzene)-coated magnetic iron oxide nanoparticles as precursor for the formation of air-stable carbon-coated iron crystalline nanoparticles, Journal of Colloid and Interface Science, 317(1), 101-114.

Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak K., Chenard M., Keding M., Beck F., Freund, J., Domon-Dell, C. (2003). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development, Gut, 52(10), 1465-1471.

Bose, S.K., Bullard, R.S., Donald C. D. (2008). Oncogenic role of engrailed-2 (en-2) in prostate cancer cell growth and survival, Translational Oncogenomics, 3,37.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Choi, J., Kamdar, S., Rahman, T., Matteson, P.G., Millonig, J.H. (2011). ENGRAILED 2 (EN2) genetic and functional analysis, *Autism Spectrum Disorders-From Genes to Environment*, InTech.

Cillo, C., Cantile, M, Faiella, A., Boncinelli E. (2001). Homeobox genes in normal and malignant cells, *Journal of Cellular Physiology*, 188(2), 161-169.

Coico, R., Sunshine, G. (2009). *Immunology: A Short Course*, Wiley.

Cramer, S.D., Alcamo, I.E, Heymann, D.L. (2007). *Prostate Cancer*, Chelsea House Publishers.

Çakmakçı, E., Yuce-Dursun, B., Demir, S. (2017). Maleic anhydride functionalization of OSTE based coatings via thiol-ene “Click” reaction for the covalent immobilization of xylanase, *Reactive and Functional Polymers*, 111, 38-43.

Doan, T., Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh C. (2012). *Immunology*, Wolters Kluwer Health.

Durham, O.Z., Krishnan, S., Shipp, D.A. (2012). Polymer microspheres prepared by water-borne thiol-ene suspension photopolymerization, *ACS Macro Letters*, 1(9), 1134-1137.

Durham, O.Z., Shipp, D.A. (2015). Suspension “click” polymerizations: thiol-ene polymer particles prepared with natural gum stabilizers, *Colloid & Polymer Science*, 293(8), 2385.

Guan, R., Xu, Y., Lei, H., Gao, Z., Xin, Z., Guo, Y. (2014). A novel protein is lower expressed in renal cell carcinoma, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7398-7408.

Gupta, A.K., Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.

Gupta, A.K., Naregalkar, R.R., Vaidya, V.D., Gupta M. (2007). Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine*, 2(1), 23.

Hafez, B., Hafez, S.E., Hafez S.D. (2003). *An Atlas of Reproductive Physiology in Men*, Taylor & Francis.

Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.

Heidenreich, A., Bastian, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., Mottet, N., Van der Kwast, T., Wiegand, T. (2012). Guidelines on prostate cancer. 2012. European Association of Urology.

Horák, D., Semenyuk, N., Lednický, F. (2003). Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of a ferrofluid, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(12), 1848-1863.

Hoyle, C.E., Lee, T.Y., Roper, T., (2004). Thiol-enes: chemistry of the past with promise for the future, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(21), 5301-5338.

Iype, T., Thomas, J., Mohan, S., Johnson, K.K., George, L.E., Ambattu, L.A., Bhati, A., Ailsworth, K, Menon, B., Rayabandla, S.M (2017). A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking. *Analytical Biochemistry*, 519, 42-50.

Jacobs, J.F., van der Molen, R.G., Bossuyt, X., Damoiseaux, J. (2015). Antigen excess in modern immunoassays: to anticipate on the unexpected, *Autoimmunity Reviews*, 14(2),160-167.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Thun, M.J. (2007). Cancer Statistics, 2007 *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 57(1),43-66.

Jung, Y., Jeong, J.Y., Chung, B.H., (2008). Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports, *Analyst*, 133(6), 697-701.

Kaiser, E., Colescott, R., Bossinger, C., Cook, P. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Analytical Biochemistry*, 34(2), 595-598.

Khan, F.H. (2009). *The Elements of Immunology*, Pearson Education.

Kılıçturgay, K. (2003). *İmmünoloji*, 3. Baskı, Nobel & Güneş, İstanbul, Türkiye.

Kote-Jarai, Z., Leongamornlert, D., Saunders, E., Tymrakiewicz, M., Castro, E., Mahmud, N., Guy, M., Edwards, S., O'Brien, L., Sawyer, E. (2011). BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients, *British Journal of Cancer*, 105(8),1230-1234.

Kuriyama, M., Wang M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shamino, T., Venezuela, L., Nishura, T., Murphy, G. P., Chu, T.M. (1980). Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay, *Cancer Research*, 40(12),4658-62.

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst L., Muller R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chemical Reviews*, 108(6), 2064-2110.

Lee, S., Jo H., Her J., Lee H. Y., Ban C., (2015). Ultrasensitive electrochemical detection of engrailed-2 based on homeodomain-specific DNA probe recognition for the diagnosis of prostate cancer, *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 32-38.

Li,B., Du, Y., Li, T., Dong, S. (2009). Investigation of 3,3,5,5-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNzyme, *Analytica Chimica Acta*, 651, 234–240

Lu, A.H., Salabas, E.L., Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.

Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1): 24-46.

Manak, J.R., Scott, M.P. (1994). A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Development*, 1994(Supplement), 61-77.

Mason, M., Moffat, L. (2010). *Prostate Cancer*, OUP Oxford.

McGrath, S.E., Michael, A., Morgan, R., Pandha, H., (2013). EN2: a novel prostate cancer biomarker. *Biomarkers in Medicine*, 7(6), 893-901.

Morgan, R., Boxall, A., Bhatt, A., Bailey, M., Hindley, R., Langley S., Whitaker, H.C., Neal D.E, Ismail M., Whitaker H. (2011). Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer, *Clinical Cancer Research*, 17(5), 1090-1098.

Murthy, V., Rishi, A., Gupta, S., Kannan, S., Mahantshetty, U., Tongaonkar, H., Bakshi, G., Prabhash, K., Bhanushali, P., Shinde, B. (2016). Clinical impact of prostate specific antigen (PSA) inter-assay variability on management of prostate cancer, *Clinical Biochemistry*, 49(1), 79-84.

Nickel, J.C. (1999). *Textbook of Prostatitis*, Taylor & Francis.

Pandha, H., Javed, S., Sooriakumaran, P., Bott, S., Montgomery, B., Hutton, A., Eden, C., Langley, S. E., Morgan, R. (2013). Correlation of Urinary Engrailed-2 Levels to Tumour Volume and Pathological Stage in Men Undergoing Radical Prostatectomy, *Journal of Cancer Therapy*, 4, 726-733.

Pandha, H., Sorensen, K.D., Orntoft T.F., Langley, S., Hoyer, S., Borre, M., Morgan R (2012). Urinary engrailed-2 (EN2) levels predict tumour volume in men undergoing radical prostatectomy for prostate cancer, *BJU International*, 110(6b).

Pathak, Y., Benita, S. (2012). *Antibody-Mediated Drug Delivery Systems: Concepts, Technology and Applications*, Wiley.

Perale, G., Hilborn, J. (2016). *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications: From Fundamentals to Translational Medicine*, Elsevier Science.

Petcharoen, K., Sirivat, A. (2012). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Materials Science and Engineering: B*, 177(5), 421-427.

Pin, E., Fredolini, C., Petricoin, E.F. (2013). The role of proteomics in prostate cancer research: biomarker discovery and validation, *Clinical Biochemistry*, 46(6), 524-538.

Polat, K., Tüzel, E., Aktepe, F., Akdoğan, B., Güler, C., Uzun, İ. (2009). Türkiye’de otopsi serisinde latent prostat kanseri ve yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi sıklığının araştırılması. *Türk Üroloji Dergisi*, 35(2), 96-100.

Rahman, M.M., Aisiri, A.M., Jamal, A., Faisal M., Khan, S.B. (2011). Iron oxide nanoparticles, INTECH Open Access Publisher.

Ramirez, L.P., Landfester, K. (2003). Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 204(1), 22-31.

Rana, S., Shetake, N.G., Barick, K., Pandey, B., Salunke, H., Hassan, P. (2016). Folic acid conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Dalton Transactions*, 45(43), 17401-17408.

Rebelo, T. S., Noronha, J. P., Galesio, M., Santos, H., Diniz, M., Sales M.G.F., Fernandes M. H., Costa-Rodrigues J. (2016) Testing the variability of PSA expression by different human prostate cancer cell lines by means of a new potentiometric device employing molecularly antibody assembled on graphene surface, *Materials Science and Engineering: C*, 59, 1069-1078.

Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder H., Frew A.J., Weyand C.M. (2012). *Clinical Immunology E-Book: Principles and Practice*, Elsevier Health Sciences.

Roque, A., Bispo, S., Pinheiro, A., Antunes, J., Gonçalves, D., Ferreira, H. (2009). Antibody immobilization on magnetic particles, *Journal of Molecular Recognition*, 22(2), 77-82.

Serda, R.E., Adolphi, N.L., Bisoffi, M., Sillerud, L.O. (2007). Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging, *Molecular Imaging*, 6(4), 7290.2007. 00025.

Shariat, S.F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage C., Vickers, A.J, Bjartell A. (2011). Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncologica*, 50(sup1), 61-75.

Shetty, N. (2005). *Immunology: Introductory Textbook*, New Age International(P) Limited, Publishers.

Sillitoe, R.V., Stephen, D., Lao, Z, Joyner, A.L. (2008). Engrailed homeobox genes determine the organization of Purkinje cell sagittal stripe gene expression in the adult cerebellum, *Journal of Neuroscience*, 28(47), 12150-12162.

Snell, R. S. (2008). *Clinical Anatomy by Regions*, Lippincott Williams & Wilkins.

Stein, S., Fritsch, R., Lemaire, L., Kessel, M. (1996). Checklist: Vertebrate homeo genes. *Mechanisms of Development*, 55(1), 91-108.

Stephan, C., Jung, K., Lein, M., Sinha, P., Schnorr, D., Loening, S.A. (2000). Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(11), 1133-1147.

Sun, D.W. (2008). *Modern Techniques for Food Authentication*, Elsevier Science.

Tewari, A.K., Whelan, P., Graham J.D. (2013). *Prostate Cancer: Diagnosis and Clinical Management*, Wiley.

Thompson, I., Pauler D., Goodman P. , (2004). Prostate cancer with low PSA levels. *N Engl J Med*, 2004(351), 1802-1803.

Truong, M., Yang, B., Jarrard, D.F (2013). Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis, *The Journal of Urology*, 189(2), 422-429.

Wang, K., Xing, J., Li X., Fu,Q., Li, W., (2012). Fabrication of novel magnetic nanoparticles-coated P (styrene-itaconic acid-divinylbenzene) microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2712-2717.

Wild, D. (2013). *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, Elsevier Science.

Wu, W., He, Q., Jiang C., (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397.

Xu, H., Aguilar, Z.P., Yang, L., Kuang, M., Duan, H., Xiong, Y., Wei, H., Wang, A. (2011). Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood, *Biomaterials*, 32(36): 9758-9765.

Yu, Q., Wang, Q., Li, B., Lin, Q., Duan, Y. (2015). Technological development of antibody immobilization for optical immunoassays: progress and prospects. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(1), 62-75.

Zaitsev, V.S., Filimonov, D.S, Presnyakov, I.A., Gambino, R.J., Chu, B. (1999). Physical and chemical properties of magnetite and magnetite-polymer nanoparticles and their colloidal dispersions, Journal of Colloid and Interface Science, 212(1), 49-57.

<http://www.saglik.gov.tr/TR,11588/istatistik-yilliklari.html> (e.t:13.08.2017).



## ÖZGEÇMİŞ

Ad,Soyad : Makbule Pelin MUHSİR  
Doğum tarihi : 13.02.1989  
E-posta : pelinmuhsir@marun.edu.tr

## EĞİTİM

Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi – Biyokimya Programı (2015-2017)
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi – Kimya Bölümü (2008-2014)
Lise	Kanuni Anadolu Lisesi

## YAYINLAR

Emrah Çakmakçı, Pelin Muhsir, Serap Demir “ Physical and covalent immobilization of lipase onto amine groups bearing thiol-ene photocured coatings” Appl Biochem Biotechnol (2017) 181:1030–1047 DOI 10.1007/s12010-016-2266-6

## BİLDİRİLER

Makbule Pelin Muhsir, Basak Yüce-Dursun, Özkan Danış, Serap Demir, Emrah Çakmakçı “Antibody immobilization on to amine functional magnetic nanoparticles” 3rd International Conference on New Trends in Chemistry, 28-30 Nisan 2017, Helsinki/Finlandiya (poster)

Emrah Çakmakçı, Pelin Muhsir, Serap Demir “ Physical and Covalent Immobilization of lipase onto amine groups bearing thiol-ene photocured coatings”, 28. Ulusal Kimya Kongresi, 15-21 Ağustos 2016, Mersin/Türkiye (poster)

