

**PROSTAT KANSER TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER
BASKILAMA TEMELLİ YÜZEY PLAZMON REZONANS
(SPR) SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF MOLECULAR IMPRINTING BASED
SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) SENSOR FOR
PROSTATE CANCER DETECTION**

GİZEM ERTÜRK

PROF. DR. M. AŞKIN TÜMER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

GİZEM ERTÜRK' ün hazırladığı “**Prostat Kanseri Tayini İçin Moleküler Baskılama Temelli Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörlerinin Hazırlanması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan

.....

Prof. Dr. M. Aşkın TÜMER

Danışman

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye

.....

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Üye

.....

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevgili aileme ve canım Arya'ma...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17.09.2015

GİZEM ERTÜRK

ÖZET

PROSTAT KANSER TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILAMA TEMELLİ YÜZEY PLAZMON REZONANS (SPR) SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Gizem ERTÜRK

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Aşkın TÜMER

Eylül 2015, 153 sayfa

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörleri biyomoleküler etkileşimleri karakterize etmek ve ölçmek için kullanılmaktadır. Eş-zamanlı ve hızlı ölçüm, yüksek hassasiyet ve özgüllük, işaretleyici kullanımına gerek olmaması SPR biyosensörlerinin eşsiz özellikleridir. SPR biyosensörleri çeşitli analitlerin tayini için kullanılmaktadır. Günümüzde, moleküler baskılama teknolojisi SPR biyosensörlerinde tanıma bölgelerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır.

Moleküler baskılama; baskılanan moleküle özgü, dayanıklı tanıma bölgelerine sahip malzemelerin tasarlanması için kullanılan teknolojidir. Ekstrem koşullar altında karmaşık matrislerdeki kararlılığı, hazırlama kolaylığı, ucuz fiyatı, tekrar kullanılabilirliği, kalıp moleküle olan yüksek tanıma kapasitesi ve doğal moleküllerdeki kadar yüksek bağlanma özelliklerinden dolayı moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler) kataliz, ayırma, katı faz ekstraksiyonları ve biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, prostat spesifik antijen (PSA) tayini için SPR sensörü hazırlanmıştır. PSA, önceden modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyine mikrotomas baskılama yöntemiyle baskılanmıştır. PSA baskılanmış (PSA-MIP) SPR sensörlerinin atomik kuvvet mikroskobu (AFM), ellipsometre, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Raman, FT-IR ve temas açısı ölçümleri ile detaylı karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. PSA tayin çalışmaları, standart PSA

  zelteleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PSA-MIP SPR sensörlerinin PSA'ya karşı seçiciliği, yarışmacı proteinler olarak insan serum albümini (HSA), immunoglobulin G ve lizozim kullanılarak test edilmiştir. Bağlanma kinetik analizleri ile kinetik ve izoterm parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca dışarıdan PSA eklenen insan serum örneklerinden ve prostat kanserli hastaların serum örneklerinden PSA tayini gerçekleştirilmiştir. Prostat kanserli hastaların serum örneklerinden yüzde geri kazanım oranı belirlendikten sonra, elde edilen sonuçlar, yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini test etmek amacıyla ticari bir yöntem olan ve günümüzde merkezi laboratuvarlarda, hastanelerde PSA tayini için kullanılan EL ZA sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Son aşamada, PSA-MIP SPR sensörlerinin tekrar kullanılabilirliği test edilmiştir. Tez  alışması sonucunda elde edilen bulgular, geliştirilen PSA-MIP sensörün, nitelikli biyosensörlerde olması gereken tüm özellikleri taşıyan bir sensör olarak, günümüzde mevcut EL ZA yöntemine göre birçok avantajı ile üstün, alternatif bir yöntem olarak PSA tayininde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: yüzey plazmon rezonans, moleküler baskılama, prostat spesifik antijen, mikrotemas baskılama

ABSTRACT

PREPARATION OF MOLECULAR IMPRINTING BASED SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) SENSOR FOR PROSTATE CANCER DETECTION

Gizem ERTÜRK

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. M. Aşkın TÜMER

September 2015, 153 pages

Surface plasmon resonance (SPR) biosensors are used to characterize and quantify biomolecular interactions. Real-time and fast measurement, high sensitivity and specificity, no need of labeled reagents are the unique properties of SPR biosensors. SPR biosensors have been used for detection of several analytes. Recently, molecular imprinting technology is used for creation of biorecognition surfaces on the SPR biosensors.

Molecular imprinting is the technology of designing materials with robust recognition sites suitable for interaction with the print molecule. Due to their stability in complex matrices under tough conditions, ease of preparation, low cost, reusability, high recognition capacity to the template molecule and binding characteristics as high as those of natural binders, molecularly imprinted polymers (MIPs) are extensively used in a variety of areas, such as catalysis, separations, solid-phase extractions and biosensors.

In this study, an SPR biosensor was prepared for prostate specific antigen (PSA) detection. PSA was imprinted onto the modified SPR sensor surface via microcontact imprinting. Detailed characterization studies of PSA imprinted (PSA-MIP) SPR sensors were performed by observation using atomic force microscope (AFM), ellipsometry, scanning electron microscope (SEM), Raman, FT-IR and

contact angle measurements. PSA detection studies were performed by using standard PSA solutions. Selectivity of PSA-MIP SPR sensors against PSA was tested by using human serum albumin (HSA), immunoglobulin G (IgG) and lysozyme as competitive proteins. Kinetics and isotherm parameters were calculated by applying association kinetics analysis. Furthermore, PSA detection was also carried out from PSA-spiked human serum samples and prostate cancer patients' serum samples. Recovery % was calculated and to determine the accuracy and reliability of the developed method, results were compared with the ELISA method which is currently used in central laboratories and hospitals for PSA detection. In the last step, reusability of the PSA-MIP SPR sensors was tested. The results obtained from the study show that the developed PSA-MIP sensor could be used as an alternative and superior method to ELISA with its unique properties that must be in a well qualified biosensor.

Keywords: surface plasmon resonance, molecular imprinting, prostate specific antigen, microcontact imprinting

TEŞEKKÜR

2008 yılında yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden beri desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, kendisinden lisans süreci de dahil olmak üzere tüm akademik çalışmalarım süresince çok şey öğrendiğim ve öğrenmeye de devam edeceğim, çok sevdiğim, değerli hocam, akademik danışmanım *Prof. Dr. M. Aşkın Tümer'e*,

Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren beni laboratuvarına kabul eden, bana bambaşka bir dünyanın kapılarını açan, bilimi bu kadar çok sevmemde çok büyük katkısı olan, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, kendisinden bilimsel olarak çok fazla şey öğrendiğim, akademik kariyerimdeki çok büyük, değerli katkılarından ötürü, çok sevdiğim, değerli hocam *Prof. Dr. Adil Denizli'ye*,

Doktora tez deneylerim sırasında İsveç'te Lund Üniversitesi'nde bulunduğum süreçte bana çok destek olan ve bundan sonra da desteğini esirgemeyen, kendisinden bilimsel anlamda çok fazla şey öğrendiğim, doktora tez sürecinde bilgisinden ve tecrübesinden çok yararlandığım, akademik kariyerime çok büyük katkısı olan, en zor zamanları çok rahat bir şekilde atlatmamı sağlayan değerli hocam *Prof. Dr. Bo Mattiasson'a*,

Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda her zaman huzurlu, sevgi ve saygı dolu bir ortamda çalışmamı sağlayan, kendilerinden her anlamda çok şey öğrendiğim, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, kendilerine çok sevgi ve saygı duyduğum, değerli hocalarım *Prof. Dr. Mehmet Ali Onur'a*, *Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar'a* ve *Uzm. Remma Pamir Gülsoy'a*,

Sadece iş anlamında ya da tez sürecinde değil, her zaman, her anımda yanımda olan, çalışma ortamındaki en büyük huzur kaynağım, çok sevdiğim, canım arkadaşlarım *Arş. Gör. Handan Sevim'e*, *Arş. Gör. Esin Akbay'a*, *Arş. Gör. Hanife Güler Tanır Dönmez'e*, *Arş. Gör. Seçil Karahisar'a*, *Arş. Gör. Sevcan Aldemir'e*, *Arş. Gör. Merve Özcan'a* ve *Arş. Gör. Neslihan İdil'e*,

Her anımda yanımda olan, en zor zamanları birlikte geçirdiğimiz, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşım, değerli dostum *Arş. Gör. Sevgi Aslıyüce Çoban'a*,

2008 yılında yüksek lisansa başladığım tarihten beri maddi anlamda bana çok büyük destek olan *Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)*'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 013D04601008 numaralı ve FDK-2015-7776 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

Bu günlere gelmemde en büyük katkıyı sağlayan, maddi, manevi her türlü desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim *değerli aileme* sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER	xii
ÇİZELGELER	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xviii
1.GİRİŞ.....	1
1.2. Prostat Kanseri İçin Kullanılan Belirteçler.....	7
1.2.1. İnsan Prostatik Asit Fosfatazı (PAP).....	7
1.2.2. Total Prostat Spesifik Antijen (PSA)	7
1.2.3. PSA Yoğunluğu	9
1.2.4. PSA Hızı	9
1.2.5. PSA Katlanma Zamanı	9
1.2.6. Serbest PSA.....	10
1.2.7. Pro PSA.....	11
1.2.8. Erken Prostat Kanseri Antijeni (EPCA) ve EPCA-2	11
1.2.9. DD3PCA3/UPM-3.....	11
1.2.10. İnsan Kallikrein-İlişkili Peptidaz 2.....	12
1.2.11. Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA)	12
1.2.12. Diğer Doku Kallikreinleri	12
1.2.13. α -Metilaçıl-KoA Rasemaz (AMACR)	12
1.2.14. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü ve Reseptörü.....	13
1.2.15. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve Bağlanma Proteinleri	13
1.2.16. TMPRSS2:ERG ve TMPRSS2:ETV1 Gen Füzyonu.....	13
1.2.17. Transforming Büyüme Faktörü (TGF β 1).....	14
1.2.18. E-Kadherin	14
1.2.19. Anneksin A3	14
1.2.20. Prostat Kök Hücre Antijeni (PSCA).....	15
1.2.21. Hepsin	15
1.2.22. İnterlökin-6 Ligandı ve Reseptörü.....	15

1.3. Prostat Spesifik Antijen (PSA)	15
1.3.1. PSA'nın Keşfi	16
1.3.2. Biyokimyası ve Fonksiyonu	17
1.3.3. PSA Ekspresyonu.....	18
1.3.4. PSA'nın Prostat Kanserinde Bir Belirteç Olarak Kullanımının Biyolojik Temeli	18
1.3.5. Kan Dolaşımındaki PSA'nın Kompleks Oluşturması ve Metabolizması	19
1.4. PSA'nın Prostat Kanseri İçin Tümör Belirteci Olarak Kullanılması.....	20
1.4.1. Erken Kanser Teşhisinde Total PSA	20
1.4.2. Primer Tedaviye Verilen Cevabın Anlaşılmasında PSA	21
1.4.3. Tekrar Eden Prostat Kanserinin Erken Teşhisinde PSA.....	22
1.5. Günümüzde PSA Analiz Yöntemleri-ELİZA.....	22
1.5.1. ELİZA Tarihçesi	22
1.5.2. ELİZA'nın Tipik Basamakları	23
1.5.3. ELİZA Tayin Yöntemleri.....	24
1.5.3.1. Doğrudan ELİZA.....	24
1.5.3.2. Dolaylı ELİZA (Doğrudan olmayan ELİZA)	25
1.5.3.3. Yarışmacı ELİZA	25
1.5.3.4. Sandviç ELİZA.....	25
1.5.4. Farklı Biyokimyasal Reaksiyonlara Göre ELİZA Varyasyonları	26
1.5.4.1. Kromojenik Analiz.....	26
1.5.4.2. Kemifloresan Analiz.....	27
1.5.4.3. Kemilüminesans Analiz	27
1.5.5. Sinyal Çıktısı ve Analizin Performansı.....	28
1.6. Biyosensör Geliştirilmesi: PSA'nın POCT (Point of Care Testing) Ölçümü İçin Bir Yaklaşım	28
1.6.1. Biyosensörler.....	29
1.6.1.1. Nitelikli Biyosensörlerde Aranan Özellikler	31
1.6.1.2. Biyosensör Tasarımında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	32
1.6.1.3. Biyosensörlerde Dönüştürücü Çeşitleri ve Özellikleri	32
1.6.1.4. Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	34
1.6.2. PSA İçin Biyosensör Uygulamaları	35
1.6.2.1. İşaretleyici Temelli Sinyal Transdüksiyonu	35
1.6.2.2. Elektrokimyasal Sinyal Transdüksiyonu	35

1.6.2.3. Elektriksel ve Elektromekanik Sinyal Transdüksiyonu	36
1.6.2.4. İşaretleyici Kullanımını Gerektirmeyen Sinyal Transdüksiyonu	36
1.7. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörleri	37
1.7.1. Yüzey Plazmon Rezonans Nedir?	37
1.7.2. Dip Noktasından Eş-Zamanlı Ölçüme	38
1.7.3. Bir SPR Analizinin Basamakları.....	40
1.7.4. Kalibrasyon Grafiği	42
1.7.5. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi.....	44
1.7.6. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi.....	45
1.7.7. SPR Biyosensörlerin Tarihçesi	47
1.7.7.1. SPR Biyosensörlerinin Erken Tarihi.....	47
1.7.7.2. 1990 Yılından Sonra SPR Biyosensörlerinin Tarihçesi.....	49
1.8. Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Biyomimetik Sensörlerde Kullanımı	50
1.8.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi	51
1.8.1.1. Temel Prensipler	51
1.8.1.2. Baskılanan Polimerlerin Fiziksel Formları.....	53
1.8.1.3. Kalıp Moleküller ve Uygulamaları	54
1.8.2. Sensör Uygulamalarında Moleküler Baskılama Yöntemi.....	55
1.8.2.1. Yığın Baskılama (Bulk Imprinting)	56
1.8.2.2. Yüzey Baskılama (Surface Imprinting)	57
1.8.2.3. Baskılanmış Nanopartiküller	59
1.8.3. Gerçek Hayatta MIP Temelli Biyosensör Uygulamaları	60
1.8.3.1. Çevresel Uygulamalarda MIP Sensörleri.....	61
1.8.3.2. Pestisit Tayininde MIP Sensörleri	61
1.8.3.3. Biyolojik Görüntülemelerde MIP Sensörleri	62
2. DENEYSEL YÖNTEMLER	65
2.1. Kimyasal Maddeler	65
2.2. Mikrotemas Baskılama Yöntemi İle PSA Baskılanmış SPR Çiplerinin Hazırlanması	65
2.2.1. Cam Slaytların Temizlenmesi, Yüzey Modifikasyonu ve Protein Kalıbının Hazırlanması	66
2.2.2. SPR Çiplerinin Temizlenmesi, Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonunun Yapılması	68
2.3. SPR Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonu.....	70

2.3.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	70
2.3.2. Elipsometre	70
2.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	70
2.3.4. Dispersif Raman Analizi	71
2.3.5. FT-IR (ATR) Ölçümü	71
2.3.6. Temas Açısı Ölçümü	71
2.4. PSA Baskılanmış (PSA-MIP) SPR Çipler ile Kinetik Ölçümler	71
2.4.1. Desorpsiyon Çözeltilsinin PSA Tayini Üzerine Etkisi.....	73
2.4.2. Sulu Çözeltiden PSA Tayini.....	74
2.4.3. Yarışmacı Proteinler ile Yarışmalı Kinetik Analizler	74
2.4.4. PSA Baskılanmış Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	74
2.4.5. PSA Eklenen Sağlıklı İnsan Serum Örneklerinden PSA Tayini	75
2.4.6. Prostat Kanseri Hasta Serumundan PSA Tayini ve Elde Edilen Sonuçların ELİZA ile Karşılaştırılması	75
2.4.7. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	75
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	76
3.1. SPR Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonu.....	76
3.1.1. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Analizi.....	76
3.1.2. Elipsometre Analizi	76
3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	77
3.1.4. Dispersif Raman Analizi	77
3.1.5. FTIR-ATR Analizi:.....	88
3.1.6. Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Ölçümü	91
3.2. PSA Baskılanmış SPR Çipleri ile Kinetik Analizler	93
3.2.1. Desorpsiyon Çözeltilsinin PSA Tayini Üzerine Etkisi.....	93
3.2.2. Sulu Çözeltiden PSA Tayini.....	94
3.2.2.1. Kinetik Analizler	98
3.2.2.2. Denge İzoterm Modelleri	101
3.2.3. Yarışmalı Kinetik Analizler.....	104
3.2.4. PSA Baskılanmış Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	109
3.2.5. PSA Eklenen Sağlıklı İnsan Serum Örneklerinden PSA Tayini	115
3.2.6. Prostat Kanseri Hasta Serumundan PSA Tayini ve Elde Edilen Sonuçların ELİZA ile Karşılaştırılması	117
3.2.7. PSA Baskılanmış Sensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	120

KAYNAKLAR.....	128
ÖZGEÇMİŞ	152

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. 1995-1999 yılları arasında İsveç'te prostat kanserinin yaşa bağlı görülme sıklığı.....	4
Şekil 1.2. Antikor ile kompleks oluşturmuş insan prostat spesifik antijeninin kristallografik yapısı.....	17
Şekil 1.3. Kan dolaşımına katılan PSA formları	20
Şekil 1.4. ELİZA yöntemi ve tipik aşamaları	24
Şekil 1.5. ELİZA tayin yöntemleri.....	25
Şekil 1.6. Kromojenik analiz yöntemi	26
Şekil 1.7. Kemifloresan analiz yöntemi.....	27
Şekil 1.8. Kemilüminesans analiz yöntemi.....	28
Şekil 1.9. Biyosensörün şematik gösterimi	30
Şekil 1.10. Biyosensörlerde kullanılan dönüştürücüler	34
Şekil 1.11. Optik dönüştürücü temelli biyosensörlerin çalışma prensibi	37
Şekil 1.12. Yüzey plazmon rezonans oluşumunun şematik gösterimi	38
Şekil 1.13. Zamana karşı SPR açısının değişimini gösteren sensorgram	39
Şekil 1.14. SPR ile doğrudan tayin yönteminin şematik gösterimi	40
Şekil 1.15. SPR'de bir analiz döngüsünün basamaklarını gösteren sensorgram .	41
Şekil 1.16. Farklı derişimdeki analit çözeltilerinden elde edilen sensorgramların üst üste çakıştırılmış görüntüsü.....	42
Şekil 1.17. SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemleri (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi, (d) sandviç ölçüm yöntemi	43
Şekil 1.18. SPR sisteminde 3 ana birimin şematik gösterimi: (1) optik birim, (2) sıvı yükleme birimi, (3) sensör çipi	46
Şekil 1.19. Moleküler baskılama yöntemi	52

Şekil 1.20. Moleküler baskılama için iki yöntem; kovalent ve kovalent olmayan baskılama	53
Şekil 1.21. Biyosensörlerde reseptör olarak kullanılan biyomoleküller ve dönüştürücülerin çeşitleri.....	55
Şekil 1.22. Yığın baskılama yöntemi	56
Şekil 1.23. Yüzey baskılama yöntemi	57
Şekil 1.24. Mikrotemas baskılama yöntemi	59
Şekil 1.25. a) MIP nanopartikül ile kaplı cam yüzeyin AFM görüntüsü, b) MIP nanopartikül ve ince film ile kaplı QCM'in sensör cevabı.....	60
Şekil 1.26. Sensör yüzeyine baskılanan eritrositlerin AFM görüntüsü	63
Şekil 2.1. Cam slaytların yüzey modifikasyonu ve protein kalıbının hazırlanması; A) APTES ile modifikasyon, B) Glutaraldehit ile aktivasyon, C) PSA immobilizasyonu.....	67
Şekil 2.2. SPR çiplerinin allil merkaptan ile modifiye edilmesi ve allil gruplarının yönelmesi	68
Şekil 2.3. Mikrotemas baskılama yöntemi ile PSA baskılanmış (PSA-MIP) SPR çiplerinin hazırlanması; A) Protein kalıbının hazırlanması, B) SPR çipinin yüzey modifikasyonu ve monomer çözeltisi ile muamele edilmesi, C) Mikrotemas baskılama yöntemi ile PSA'nın SPR çip yüzeyine baskılanması	69
Şekil 2.4. SPR imager II (GWC Technologies, Madison, ABD) cihazı.....	72
Şekil 3.1. Modifiye edilmemiş SPR çipinin yarı temas modda alınan AFM görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü.....	78
Şekil 3.2. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipinin yarı temas modda alınan AFM görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü	79
Şekil 3.3. PSA-MIP SPR çipinin yarı temas modda alınan AFM görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü	80
Şekil 3.4. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipinin elipsometre görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü.....	81

Şekil 3.5. PSA-MIP SPR çipinin elipsometre görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü	82
Şekil 3.6. Modifiye edilmemiş SPR çiplerine ait SEM görüntüsü; A) 5000X, B) 25000X, C) 50000X.....	83
Şekil 3.7. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çiplerine ait SEM görüntüsü; A) 5000X, B) 25000X, C) 50000X	84
Şekil 3.8. PSA-MIP SPR çiplerine ait SEM görüntüsü; A) 5000X, B) 25000X, C) 50000X, D) 100000X.....	85
Şekil 3.9. SPR çiplerine ait Raman analiz sonuçları; A) Modifiye edilmemiş SPR çipi, B) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipi	86
Şekil 3.10. Raman analiz sonuçları; A) PSA-MIP SPR çipi, B) Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çipine ait çakışık Raman analiz sonucu	87
Şekil 3.11. A) Modifiye edilmemiş SPR çipine ait FT-IR analiz sonucu, B) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipine ait FT-IR analiz sonucu	89
Şekil 3.12. A) PSA-MIP SPR çipine ait FT-IR analiz sonucu, B) Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerine ait çakışık FT-IR görüntüsü	90
Şekil 3.13. A) Modifiye edilmemiş, B) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş, C) PSA-MIP SPR çipine ait temas açısı görüntüleri	92
Şekil 3.14. Desorpsiyon çözeltisinin PSA tayini üzerine etkisi (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C)	94
Şekil 3.15. PSA çözeltileri ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar; (A) denge tamponu, B) 0.1 ng/mL, C) 1.0 ng/mL, D) 2.0 ng/mL, E) 5.0 ng/mL, F) 10 ng/mL, G) 20 ng/mL, H) 50 ng/mL (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C).....	96
Şekil 3.16. A) PSA çözeltileri ile PSA-MIP SPR sensörü arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar, B) PSA-MIP SPR sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki (kalibrasyon grafiğı)	97

Şekil 3.18. Adsorpsiyon modelleri; A) Langmuir, B) Freundlich, C) Langmuir-Freundlich.....	103
Şekil 3.19. HSA, IgG, Lyz ve PSA proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (protein derişimi: 10 ng/mL; denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C)	106
Şekil 3.20. A) Yarışmacı proteinler ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşime ait zamana karşı ΔR değişimini gösteren sensorgramların çakışık görüntüsü, B) PSA-MIP SPR sensör ile yarışmacı proteinler arasındaki ilişki (Protein derişimleri; HSA: 1.20×10^{-9} M, IgG: 2.71×10^{-9} M, Lyz: 0.26×10^{-9} M, PSA: 0.61×10^{-9} M)	109
Şekil 3.21. A) NIP sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki (kalibrasyon grafiği), B) PSA-MIP SPR sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki ile NIP sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişkinin karşılaştırılması	110
Şekil 3.22. PSA çözeltileri ile NIP sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar; A) 2.0 ng/mL, B) 5.0 ng/mL, C) 10 ng/mL, D) 20 ng/mL, E) 50 ng/mL, F) çakışık sensorgramlar (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C).....	111
Şekil 3.23. HSA, IgG ve Lyz proteinleri ile NIP sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C).....	113
Şekil 3.24. A) NIP sensör ile yarışmacı proteinler arasındaki ilişki, B) PSA-MIP ve NIP sensörün yarışmacı proteinlere karşı gösterdiği ΔR cevabının karşılaştırılması	114
Şekil 3.25. PSA-MIP sensöre ait serum örnekleri ile ΔR arasındaki ilişki (kalibrasyon grafiği)	115
Şekil 3.26. Serum örnekleri ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar; A) ¼ serum, B) ¼ serum+0.1 ng/mL PSA, C) ¼ serum+1.0 ng/mL PSA, D) ¼ serum+5.0 ng/mL PSA, E) ¼ serum+10 ng/mL PSA, F) toplu (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C)	116

Şekil 3.27. A) Prostat kanserli hastalara ait serum örnekleri ile PSA-MIP sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar, B) ELİZA ve PSA-MIP sensöre ait derişim ile ΔR değerlerinin karşılaştırılması (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)	118
Şekil 3.28. PSA-MIP SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği (PSA derişimi: 10 ng/mL; denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C).....	120

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1.1. En sık kullanılan kinetik parametreler: assosiasyon ve dissosiasyon sabitleri	44
Çizelge 1.2. Denge assosiasyon ve dissosiasyon sabitleri.....	45
Çizelge 3.1. Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çipine ait temas açısı ölçümleri	93
Çizelge 3.2. Kinetik hız sabitleri.....	101
Çizelge 3.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	104
Çizelge 3.4. Seçicilik çalışmalarında kullanılan yarışmacı proteinler ve özellikleri	107
Çizelge 3.5. PSA'ya göre HSA, IgG ve Lyz için PSA-MIP ve NIP sensörlerin seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	113
Çizelge 3.6. Prostat kanserli hastalara ait serum örneklerinden % geri kazanım oranı	119
Çizelge 3.7. PSA tayini açısından ELİZA ve SPR yönteminin istatistiksel olarak karşılaştırılması	119

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔR Sensör cevabı

Kısaltmalar

PSA	Prostat Spesifik Antijen
ELİZA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
POCT	Point of Care Testing
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
PAP	Prostatik Asit Fosfatazı
DRE	Dijital Rektal Muayene
BPH	Benign Prostatik Hiperplazi
PSAD	PSA Yoğunluğu
PSAV	PSA Hızı
PSADT	PSA Katlanma Zamanı
fPSA	Serbest PSA
ACT	α_1 -Antikimotripsin
PCI	Protein C İnhibitörü
API	α_1 -Antitripsin
AMG	α_2 -Makroglobulin
EPCA	Erken Prostat Kanseri Antijeni
KLK/hK	İnsan Kallikrein ilişkili Peptidaz
PSMA	Prostat Spesifik Membran Antijeni
AMACR	α -Metilaçil-KoA-Rasemaz
IGF	insülin Benzeri Büyüme Faktörü

IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteini
TGF	Transforming Büyüme Faktörü
ANXA	Anneksin
PSCA	Prostat Kök Hücre Antijeni
IL-6	İnterlökin-6
RIA	Radio-immunoassay
BSA	Bovine Serum Albumin
HRP	Horse Radish Peroxidase
QCM	Quartz Crystal Microbalance
FET	Field Effect Transistors
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
μ CP	Mikrotemas Baskılama
APTES	3-aminopropil-trietoksisilan
GA	Glutaraldehit
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
MAA	Metakrilik Asit
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
AIBN	α - α' -azobisisobutironitril
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PSA-MIP	PSA Baskılanmış
IgG	İmmunoglobulin G
HSA	Human Serum Albumin
Lyz	Lizozim

NIP	Non-imprinted
NaCl	Sodium Klorür
LOD	Limit of Detection
LF	Langmuir-Freundlich
CLI-ELİZA	Chemiluminescent Immunoassay-ELISA

1.GİRİŞ

Prostat kanseri dünyada en yaygın görülen altıncı kanser türü, erkekler arasında en yaygın görülen üçüncü kanser türüdür [1]. Günümüzde hastalığın görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Prostat kanserinin erken teşhisi için kullanılabilecek çeşitli belirteçler mevcuttur. Bunlar arasından serumdan ölçülebilen bir glikoprotein olan prostat spesifik antijen (PSA), hastalığın erken teşhisinde, tedavi sonrasında lokal tedavinin etkinliğinin araştırılmasında, primer radikal prostatektomi veya radyasyon tedavisi sonrasında hastalığın yeniden tekrar edip etmediğinin araştırılmasında kullanılan, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US, FDA) tarafından onaylı bir biyolojik belirteçtir. Günümüzde PSA ölçümü için ELİZA temelli yöntemler kullanılmaktadır. ELİZA popüler bir yöntemdir, otomasyona uyumludur. Ancak, ELİZA kitlerinin tek kullanımlık olması, bu yüzden maliyetinin yüksek olması, analize başlamadan önce hazırlık aşamasının uzun olması, analiz için gereken basamak sayısının fazla olmasından dolayı analiz süresinin uzun olması, işaretleyici kullanımını gerektirmesi, eş-zamanlı ölçüme izin vermemesi gibi özellikler yöntemin dezavantajları arasındadır.

PSA testlerinin çoğu, günümüzde merkezi laboratuvarlarda, örnek taşınımını, uzun bekleme sürelerini, artan uygulama ve tıbbi masraf gerektiren büyük, otomatik analizörlerde yapılmaktadır. Hasta-yanı (near patient) ve laboratuvar dışında özel cihazlarla yapılan nokta bakım analizleri (Point of Care Testing-POCT), klinik ziyaretlerin sayısının azalmasında, hastaya ve sağlık sistemine düşen maliyetin azalmasında, hasta memnuniyetini arttırmada ve klinik verilerin iyileştirilmesinde yararlı olacaktır. Biyosensör teknolojisindeki son gelişmeler, PSA için POCT uygulamasını, hayalden gerçeğe dönüştürecektir

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörleri, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçmek için kullanılan kusursuz bir yöntemdir [2]. SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye gerek olmaksızın biyomoleküller arasındaki etkileşimleri eş-zamanlı, doğrudan ölçmede kullanılmaktadır. Bu sayede kinetik veya termodinamik parametrelerin, analit derişiminin veya ligand-analit arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesi mümkün olmaktadır. SPR temelli biyosensörler ELİZA gibi enzim veya radyoişaretleme temelli yöntemler ile karşılaştırıldığında, hızlı cevap süreleri ve yüksek seçicilikleri sayesinde, protein-protein, antijen-antikor, reseptör-ligand etkileşimlerinden, düşük molekül ağırlıklı

bileşiklerin tanımlanmasına kadar çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılmaktadır [2].

Moleküler baskılama yöntemi, bir biyomolekül ya da sentetik bir bileşikten oluşan bir kalıp moleküle tamamlayıcı olan özgül tanıma ve bağlanma bölgeleri içeren polimer ağı oluşturma teknolojisidir. Moleküler baskılanmış polimerler sentetik polimer reseptörleri ya da yapay antikorlar (plastibadiler) olarak bilinirler. Kolay uygulanabilirlikleri, yeniden kullanılabilirlikleri, sağlam polimer ağı oluşturabilmeleri, ucuz olmaları gibi avantajlarından ötürü bilimsel ve endüstriyel çevrelerce dikkati üzerine çekmiştir [3, 4]. Şimdiye kadar şekerler, steroidler, pestisitler, çeşitli ilaçlar, amino asitler, proteinler gibi çeşitli moleküllerin baskılanmasına yönelik birçok yayın yapılmıştır. Böylece moleküler baskılanmış polimerlerin kalıp moleküle özgül yüksek oranda özgül tanıma yeteneğine sahip olduğu ve uygulamalı ve analitik ayırmalarda, katı faz ekstraksiyonlarında, kimyasal sensörlerde, enzim benzeri katalizör çalışmalarında, ilaç taşıma uygulamalarında ve kütüphane görüntüleme araçları olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [5-8].

Bu çalışma kapsamında, prostat kanserinin erken teşhisi için, mikrotemas baskılama yöntemi ile PSA baskılanmış SPR temelli biyosensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan PSA baskılanmış sensör çiplerinin detaylı yüzey karakterizasyonu yapılmıştır. Sulu çözeltiden PSA tayini gerçekleştirildikten sonra, yarışmacı proteinler ile seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiş ve PSA baskılanmadan hazırlanan NIP (non-imprinted) çipler ile baskılama yönteminin seçiciliği gösterilmiştir. Dışarıdan PSA eklenen sağlıklı insan serum örneklerinden PSA tayini gerçekleştirildikten sonra, prostat kanserli hastalara ait serum örneklerinden PSA tayini gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre %geri kazanım oranı hesaplanmıştır. Çalışmanın en önemli aşamalarından biri olan son aşamada, prostat kanserli hastalara ait serum örneklerinden SPR kullanımı ile elde edilen sonuçlar, ELİZA yönteminden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. İki yöntem arasında PSA tayini açısından % 98.6'lık bir uyum saptanmıştır. İki yöntem arasında PSA tayini açısından anlamlı bir fark olup olmadığının kanıtlanması amacıyla, sonuçlara student-T testi uygulanmıştır. Hesaplanan p değeri ($p=0.751$, $p>0.05$) iki yöntem arasında, PSA tayini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

1.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, dünyada en yaygın görülen altıncı kanser türü, erkekler arasında en yaygın üçüncü kanser türü ve Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'nın bazı bölgelerinde erkekler arasında en yaygın görülen kanser türüdür [1]. 2000 yılında, tüm dünya genelinde 513.000 yeni prostat kanseri teşhisi konmuştur [9] ve bu kanser türünün erkekler arasında tüm kanserden ölümlerin % 7.9'undan sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu oran gelişmiş ülkelerde % 15.3 iken, gelişmekte olan ülkelerde % 3.4'tür. Hastalığın görülme sıklığı, dünya genelinde her geçen yıl artmaktadır [1].

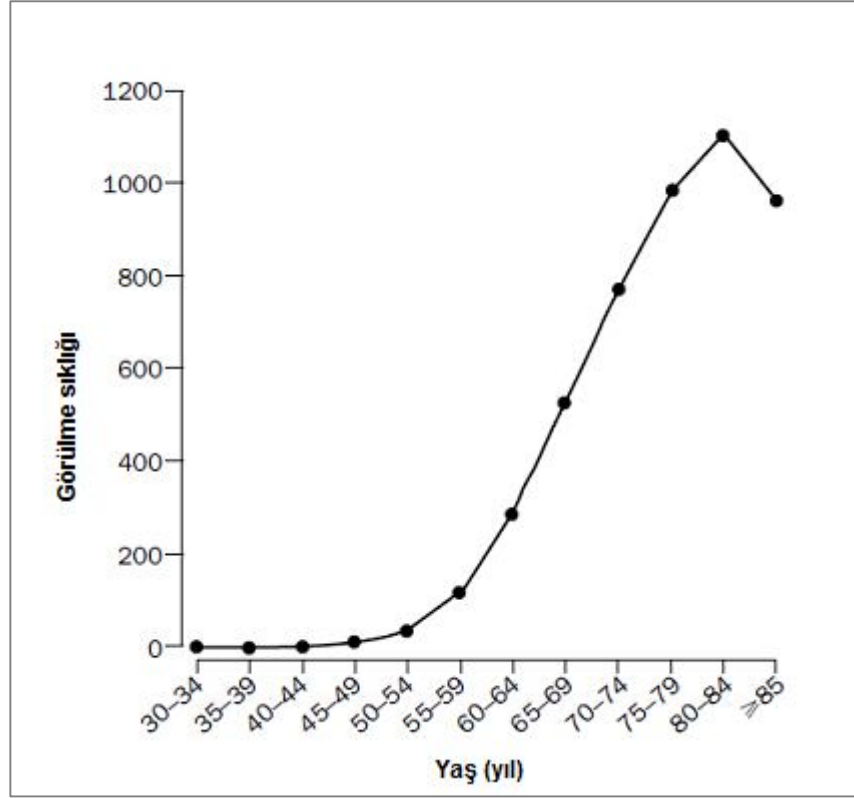
1.1.1. Prostat Kanserinin Görülme Sıklığı

50 yaşından küçük erkeklerde prostat kanseri teşhisi nadiren konulmaktadır, bu oran tüm teşhislerin yaklaşık % 0.1'i kadardır. Hastalığın esas yaş ortalaması 72-74 yaşları arasındadır ve % 85 oranında 65 yaş üstü kişilere kanser teşhisi konmaktadır (Şekil 1.1). 85 yaşındaki bireylerde, prostat kanserinin kümülatif risk oranı % 0.5 ile % 20 arasındadır [9]. Yapılan otopsi çalışmaları, 85 yaşının üstündeki erkeklerin çoğunda histolojik düzeyde prostat kanseri varlığını göstermiştir [10]. Detroit, MI, ABD'de 600 erkek üzerinde yapılan çalışmalarda, latent prostat kanseri oranının tüm yaşlarda oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir; 30'lu yaşlarda yaklaşık % 30, 50'li yaşlarda yaklaşık % 50, 85 yaş üstünde % 75'in üstünde [10].

Prostat kanserinin görülme sıklığı, etnik popülasyonlara ve ülkelere göre yüksek oranda değişim göstermektedir. Popülasyonlar arasında da hastalığın görülme oranı 90 kata varan değerlerde farklılık göstermektedir. En düşük oran genellikle Asya'da iken en yüksek oran Kuzey Amerika ve İskandinavya'dadır [9]. Bu farklılıkların genetik yatkınlık, bilinmeyen dış risk faktörlerine maruz kalma, kanser kayıtlarında yapılan hatalar veya sağlık sistemindeki farklılıklar gibi birçok etkenin kombinasyonu ile ortaya çıktığı belirtilmektedir [1].

Sağlık hizmetine erişim ve hizmetin kalitesi, kanser kayıtlarının güvenilirliği, prostat kanseri oranının nasıl rapor edildiğini etkiler. Afrika ülkelerinden güvenilir veriler elde edilene kadar, bu ülkelerde kanser oranının, tıpkı Asya'daki gibi olduğu düşünülmüştür. Göç çalışmaları, Japon erkeklerin, hastalığın görülme oranının çok

düşük olduğu bir ülke olan Japonya'dan, hastalık sıklığı oldukça yüksek olan ABD'ye göç ettiklerinde, bu kişiler arasında hastalığın sıklığında artış gözlemlendiğini göstermiştir. Bu bulgular, etnik popülasyonlar arasındaki farkın gerçek olduğunu ve bunun sadece kanser kayıtları ve sağlık hizmetleri ile açıklanamayacağını göstermektedir [1].



Şekil 1.1. 1995-1999 yılları arasında İsveç'te prostat kanserinin yaşa bağlı görülme sıklığı

1.1.1.1 Genetik Faktörler

Aileler arasında prostat kanserinin bir arada görülme nedeni; genetik yatkınlık, ortak çevresel faktörlere maruz kalma veya zaten bu kanserin görülme sıklığının çok yüksek olmasından kaynaklı bir şans olabilir. Prostat kanser hastalarının (beyaz, Afrika'lı veya Asya'lı) % 10-15'inde en az bir akrabasının etkilendiği [11, 12], hastaların birinci dereceden akrabalarında ise hastalık riskinin 2-3 kat fazla olduğu bilinmektedir. Prostat kanserli bir erkek kardeşe sahip olan bireylerde hastalığın görülme oranı, sadece hastalıktan etkilenen bir babaya sahip bireylere

göre daha yüksektir. Bu da hastalığın resesif veya X kromozomuna bağlı kalıtıldığını göstermektedir [13].

1.1.1.2. Diyet Faktörleri

Ekolojik çalışmalar prostat kanserinin yağlı et ve süt ürünlerinin fazla tüketimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir [14, 15]. Diyet faktörleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki, 30-40 popülasyonda yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları genellikle çelişkilidir [16-18], fakat bazı diyet bileşenlerinin prostat kanseri ile kesin ilişkisi olduğu gösterilmiştir; α -linolenik asit [19-23] ve kalsiyumun fazla tüketimi gibi [24]. 1012 hasta üzerinde yapılan çalışmalarda, süt ürünlerinden her gün düzenli 600 mg kalsiyum (Ca^{+2}) alan erkeklerde, her gün 150 mg veya daha az kalsiyum tüketen erkeklere kıyasla prostat kanseri riski 1.32 kat yüksek bulunmuştur [24]. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, yüksek miktarda yağ asiti ve bunların metabolitlerini tüketmenin prostat kanseri ile ilişkisi olduğunu göstermektedir.

Prostat kanser sıklığının Asya'da daha az olma sebeplerinden bir tanesi olarak, fito-östrojene bağlı diyet görülmektedir. Soya fasulyesi yüksek miktarda fito-östrojen kaynağıdır ve fito-östrojenin prostat kanseri üzerinde pro-filaktik etkiye sahip olduğu bilinmektedir [25-28]. Fareler üzerinde, insan androjene-duyarlı prostat kanseri hücreleri ile yapılan deneylerde, çavdar ekmeği ve soya proteinine dayalı diyetin tümör boyutunu azalttığı, apoptozisi artırdığı ve salgılanan PSA miktarını azalttığı gösterilmiştir [29, 30].

Domates kökenli ürünlerin, özellikle domates suyunun veya sosunun sık tüketimi, prostat kanseri riskini azaltmaktadır. Domates, bir karotenoid ve potansiyel antioksidan olan likopen içermektedir. 2481 erkek üzerinde yapılan çalışmalarda, az miktarda likopen tüketen kişilere kıyasla, yüksek miktarda likopen tüketen erkeklerde kansere yakalanma oranı % 16 oranında daha düşük bulunmuştur [31]. Lokalize prostat kanseri bulunan erkeklerde, radikal prostatektomi öncesinde, üç hafta boyunca domates suyu tüketen kişilerde, serumda ve prostatta derişimi artan likopenin, PSA seviyesinde azalmaya ve prostatta oksidatif hasarda düşüşe neden olduğu gösterilmiştir [32]. Bu yüzden likopen, önemli bir kimyasal bileşendir.

Selenyum ve E vitamini, en önemli mikronütrientler arasındadır. Selenyum, metal olmayan eser elementtir ve insan gelişimi için gereklidir. Ayrıca tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir [33]. 1312 hasta üzerinde yapılan çalışmalarda, deri kanseri teşhisi konulduktan sonra 4,5 yıllık takip sonrasında, plasebo ve selenyum verilen kişiler arasında hastalığın gerilemesi açısından herhangi bir fark gözlenemezken, prostat kanserli hastalarda selenyum grubunda plasebo grubuna göre % 66'lık düşüş saptanmıştır [34, 35]. E vitamini (α - tokoferol), yağda çözünen bir vitamindir ve antioksidan etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar, plasebo verilen kişilere kıyasla α - tokoferol alan erkeklerde, prostat kanseri sıklığı ve ölüm oranında % 40 azalma saptanmıştır [36].

1.1.1.3. Hormonlar ve diğer risk faktörleri

Androjenler, sağlıklı prostat gelişiminde ve prostat kanserinin tedavisinde önemli rol oynamaktadır. 1941 yılında C. Huggins [37] bu hastalıkta androjenlerin rolü ile ilgili yaptığı çalışmalar sonucunda Nobel Ödülü kazanmıştır. Prostat, testosteronu downstream hormon metabolizmasında önemli bir substrat olan dihidrotestosterona dönüştürür. Metastatik kanser hastalarının % 75-80'inde testosteronun tıbbi müdahale ile uzaklaştırılmasının etkili bir tedavi yöntemi olduğu bulunmuştur. Hayvanlarda yapılan çalışmalar ile testosteron ve dihidrotestosteronun prostat kanserini indüklediği gösterilmiştir. Östrojen, insülin ve leptin hormonları ile yapılan çalışmalarda, bu hormonların kanser ile olan ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır [38, 39].

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1); proliferasyonu, farklılaşmayı ve kanser hücrelerinin apoptozunu düzenleyen bir hormondur. Yapılan çalışmalarda, ortalamanın üstünde IGF-1 taşıyan kişilerde, düşük IGF-1'e sahip kişilere kıyasla, prostat kanseri riskinin 1.7-4.3 kat yüksek olduğu bulunmuştur [40-42]. Fazla yağ tüketimi insülin üretiminde artışa, bu da IGF-1 üretiminde artışa neden olur. Bu durum IGF-1'in kanser için nasıl bir risk faktörü olduğunu da açıklar.

Prostat kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, sigara [43] ve alkol [44] tüketiminin, vazektomi [45] ve fiziksel aktivitenin [46] kanser riski üzerine bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

1.2. Prostat Kanseri İçin Kullanılan Belirteçler

Prostat kanseri tanısı, çoğunlukla henüz semptomların görülmediği, hastalığın erken evresindeki kişilere konmaktadır. Hastalığın teşhisinde odak noktası, erken tanıdan ziyade, erken evre tümörlerinin klinik öneminin belirlenmesidir. Teşhiste ana yaklaşım, metastaz yeteneğine sahip hücrelerin, diğer kanser hücrelerinden ayrılmasıdır. Günümüzde radikal prostatektomi ile uzaklaştırılan tümörlerin yaklaşık % 30'unun klinikte önemsiz olduğu, invaziv tedaviyi gerektirmediği gösterilmiştir. Prostat kanserinin kontrolü, erken teşhis ve uygun tedavinin seçilmesiyle mümkün olacaktır; ancak henüz bu aşamaya erişilememiştir [47].

1.2.1. İnsan Prostatik Asit Fosfatı (PAP)

Prostat kanseri için kullanılan ilk belirteç, insan prostatik asit fosfatı (PAP)'dır [48]. 1930'ların başlarında, araştırmacılar, prostat kanserli hastalarda kemiğe metastaz durumunda, hem metastaz bölgesinde PAP aktivitesinin arttığını, hem de proteinin serum seviyesinin arttığını rapor etmişlerdir [49, 50]. Bu bulgular, PAP'ın hem kanser ilerlemesinde, hem de androjen-yoksunluk tedavisine verilen cevabın gözlenmesinde bir biyo-belirteç olarak kullanımına izin vermiştir [37].

Ameliyat öncesinde yükselmiş bulunan PAP düzeyine sahip erkeklerde, lenf nodülü hastalığı görülmesi ve normal PAP'lı bireylere göre metastaz gelişimi olasılığı daha yüksek bulunmuştur [51]. Prostat spesifik antijen (PSA) testinin bulunmasıyla birlikte, kanser teşhisi, evresi ve ilerleme durumunu göstermesi açısından PSA'dan daha basit bir test olduğu için, serum PAP testi artık kullanılmamaya başlanmıştır [52]. Fakat PAP ile devam eden birtakım çalışmalar, yeniden nüks etme veya kötüye gitme riski yüksek olan agresif kanser hastalarında iyi bir prognostik biyo-belirteç olarak PAP'ın kullanılabilirliğini göstermiştir [53, 54].

1.2.2. Total Prostat Spesifik Antijen (PSA)

İnsan semeninden tayin edilen bir biyo-belirteç olarak PSA'nın ilk kez kullanımı, adli bilimlerin alanında olmuştur [55]. PSA, ilk kez 1970'lerde prostat ekstraktlarından saflaştırılmıştır [56]. Daha sonraki çalışmalar, PSA'nın serumdan

da tayin edilebileceğini ve serum PSA seviyesinin prostat kanserli kişilerde yüksek olduğunu göstermiştir [57].

İlk çalışmalar, prostat kanseri teşhisi konmuş olan erkeklerde hastalığın gözlenmesi için, serum PSA seviyesinin ölçülmesi ile başlamıştır [58]. PSA günümüzde de tedavi sonrasında, hastalığın nüks edip etmediğinin gözlenmesi açısından ideal bir biyo-belirteçtir. Radikal prostatektomi uygulanan erkeklerde, ölçülemeyen serum PSA düzeyi, hastalığın tekrarlamadığının bir göstergesidir [59]. Radyasyon tedavisi uygulanan erkeklerde, hastalığın biyokimyasal olarak tekrarı, en düşük serum PSA düzeyinin ve daha sonraki yükselmelerinin incelenmesiyle anlaşılır.

PSA ile yapılan sonraki çalışmalarda, PSA, kanserin gözlenmesi ve teşhisi için potansiyel olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1989'da Catalona ve ark.'ları [60], yüksek ölçekli, popülasyon temelli bir çalışma başlatarak, dijital rektal muayene (DRE) ve PSA'yı kanser taraması için kullanmışlardır. Bu çalışma ile PSA'nın kanser tespiti için DRE ile birlikte kullanımının yararlı olduğu gösterilmiştir. Cooner ve ark.'ları [61], PSA'nın DRE ve transrektal ultrason ile birlikte kanser teşhisi için kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US, FDA), 1994 yılında PSA'nın prostat kanseri için kullanımının resmi olarak onayını vermiştir ve normalin en üst sınırı olarak 4.0 ng/mL belirlenmiştir. ABD ve diğer ülkelerde PSA temelli tanının yaygınlığı, prostat kanserine bağlı ölüm oranlarında düşüşe neden olmuştur [62]. Ancak ölüm oranındaki düşüş ile PSA taraması arasındaki ilişkinin net bir kanıtı olmadığı için, bu test ile alakalı anlaşmazlıklar devam etmektedir.

PSA, sadece hastalığın teşhisi için kullanılmamaktadır. PSA seviyesi ayrıca hastalığın agresiflik seviyesi ile de ilişkilidir [63]. Daha düşük PSA düzeyi ile teşhis edilen kanserin iyileşme olasılığı daha yüksek olduğu için, hekimler 2.5-3.0 ng/mL PSA düzeyinde biyopsi önermektedir [64, 65].

PSA kullanımında zamanla birtakım sınırlamalar ortaya çıkmıştır. Erkeklerde yaş ile birlikte ortaya çıkan, Benign Prostatik Hiperplazi (BPH) ve prostatit gibi malign olmayan süreçlerde de serum PSA düzeyinin artması, PSA'nın kansere olan özgüllüğünü sınırlandırmaktadır [66]. Prostatik manipülasyon ve sistoskopi (mesane içinin gözle muayenesi) gibi tıbbi müdahaleler de PSA düzeyinde artışa

yol açabilir. Ayrıca çok düşük PSA seviyesine sahip erkeklerde de kanser görülebilir, bu yüzden kanserin yok sayılabileceği alt sınır PSA değeri bulunmamaktadır [67].

1.2.3. PSA Yoğunluğu

Artan PSA yoğunluğu (PSAD) değeri, BPH'ye kıyasla yüksek kanser riskini gösterir. Tanıda kullanımının yanında, PSAD aynı zamanda kanserin agresifliğini de gösterir [68].

1.2.4. PSA Hızı

PSA hızı (PSAV), PSA'nın yıl içindeki değişimini ifade eder (ng/mL/yıl). Total PSA düzeyi 4.0-10 ng/mL arasında değerlere sahip erkeklerde, PSAV değerinin 0.75 ng/mL/yıl'dan büyük olması kanser ile ilişkilidir [69]. PSA ve PSAV arasındaki yakın ilişkiden dolayı, ikisinin etkisini birbirinden ayırmak zordur [70].

Yapılan çalışmaların çoğunda, PSAV ve kanserin agresifliği arasında çok sıkı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. D'Amico ve ark.'ları [71] ameliyat öncesinde 2.0 ng/mL/yıl'dan yüksek PSAV değerine sahip kişilerde, radikal prostatektomi sonrasında kanserden ölüm riskinin 9 kat yüksek olduğunu göstermişlerdir. Tedavi öncesinde 2.0 ng/mL/yıl'dan büyük PSAV değeri, eksternal ışın tedavisi sonrasında kansere özgü mortalite hızında artışı [72] ve tedavi sonrasında hastalığın tekrar görülme oranında artışı işaret eder [73]. PSAV'ın hayatı potansiyel olarak tehdit eden prostat kanserinin ayırt edilmesi bakımından önemli olduğu vurgulanmaktadır [74].

1.2.5. PSA Katlanma Zamanı

PSA katlanma zamanı (PSADT), serum PSA seviyesinin iki katına çıkması için gereken zamanı ifade eder. Pound ve ark.'ları [59], ameliyat sonrasında PSADT değerinin 10 aydan küçük olmasının, metastazdan bağımsız olarak, yaşama oranının oldukça düşük olduğunu göstergesi olduğunu rapor etmişlerdir.

Sengupta ve ark.'ları [75], ameliyat öncesinde PSADT değerinin 18 aydan küçük olmasının, radikal prostatektomiye takiben, kansere özgü ölüm oranı açısından 6.22 kat daha tehlikeli olduğunu göstermiştir. Ancak yapılan bir çalışmada, tedavi öncesinde PSADT değeri ile klinik akıbet arasında bir ilişki saptanamamıştır [76].

1.2.6. Serbest PSA

1990'larda PSA'nın birçok moleküler formu keşfedilmiştir. Dolaşımdaki PSA'nın iki şekilde metabolize olduğu bilinmektedir. PSA'nın bir kısmı (% 40 - % 50) salgılandıktan sonra, serin proteaz inhibitörleri [α_1 -antikimotripsin (ACT), protein C inhibitörü (PCI), α_1 -antitripsin (API)] ve α_2 -makroglobulin (AMG) gibi serum anti-proteazları ile kompleks oluşturamaz [77]. Bu PSA, bağlanmamış veya serbest PSA (fPSA) olarak bilinir [78]. Kanserli kişilerde, serbest PSA'nın total PSA'ya oranı (% fPSA) daha düşüktür. Yapılan çalışmalar, % 14-28 arasındaki % fPSA değerinin gereksiz biyopsi oranını % 19-64 oranında düşürdüğünü ve % 71 ile % 100 arasında hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir [79-81].

fPSA ve PSA, FDA tarafından onay verilen iki testtir. Catalona ve ark.'ları [82], prostat biyopsisi öncesi, normal DRE'li 773 erkekte fPSA ve total PSA ölçümü yapmışlardır. % fPSA değerinin, % 25'ten küçük olduğu durumların, % 95 hassasiyet oranıyla, gereksiz biyopsiyi % 20 oranında düşürdüğü bulunmuştur.

Son zamanlarda fPSA ile yapılan çalışmalarda, başlangıçtaki çalışmalardan elde edilen fPSA performansına göre daha etkisiz sonuçlar elde edilmiştir [83, 84]. Bu durum, PSA'nın özellikleri ile ilişkili olabilir. % fPSA değeri, hastanın yaşı ve prostat hacmi ile orantılı olarak artar ve total PSA artışıyla azalır. Bu yüzden farklı populasyonlar ile yapılan çalışmalar, farklı sonuçlar verir [85]. Serum fPSA değeri çok stabil değildir ve örnek alımından 24 saat sonra işlem görülmesini gerektirir [86]. Ayrıca prostatik manipülasyon (DRE, biyopsi, üretral enstrümantasyon) total PSA'nın fPSA bileşiminde artışa neden olur [87].

1.2.7. Pro PSA

Serbest PSA'nın farklı moleküler formları vardır. İ-PSA, enzimatik olarak inaktif olan izoformudur. B-PSA (BPH-ilişkili PSA), BPH'lı hastaların dokularında daha yüksek bulunan bir izoformdur [88].

Üçüncü izoform, pro-PSA, kanser ile olan ilişkisi nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiş olan izoformdur. Pro-PSA, kan dolaşımında doğal formunda ya da kesilmiş formda bulunabilir. Pro-PSA yüzdesinin, kanserli durum ile benign koşulları ayırmada etkili olabileceği bulunmuştur. Sokoll ve ark.'ları [89], 2.5-4.0 ng/mL arasındaki total PSA düzeyine sahip kişilerde, % pro-PSA seviyesinin gereksiz biyopsiyi önlediğini göstermiştir. Benzer olarak total PSA düzeyi 4.0-10 ng/mL arasında olan bireylerde, % pro-PSA'nın kontrol grubuna kıyasla kanserli hastalarda daha yüksek olduğu bulunmuştur [90].

1.2.8. Erken Prostat Kanseri Antijeni (EPCA) ve EPCA-2

Prostat kanseri biyo-belirteçleri içinde, serumdan ölçülen bir protein olan EPCA, en çok ümit vaad edendir. Getzenberg ve ark.'ları [91], prostat kanserinde gözlenen nükleer matriks ve nükleer pleiomorfizm değişiklikleri arasındaki korelasyonu göstermiştir. Protein profillemeye çalışmaları ile normal sıçan prostat nükleusunda bulunan, kanserli sıçan nükleusunda bulunmayan ve sadece kanserli sıçan nükleusuna özgü olan proteinler tanımlanmıştır.

Böylece erken prostat kanser antijeni (EPCA) olarak adlandırılan özel bir protein sınıfı karakterize edilmiştir. EPCA immün-boyama çalışmaları, boyamanın sadece kanserli dokuda pozitif olduğunu göstermiştir [92].

Leman ve ark.'ları [93], prostat kanseri ile ilişkili nükleer yapısal bir protein olan EPCA-2 ile yaptıkları çalışmada, EPCA-2 ELİZA testi ile % 92 özgüllük ve % 94 hassasiyet oranı ile kanser hastalarının ayırt edilebildiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada PSA özgüllüğünün % 65 olduğu belirtilmiştir.

1.2.9. DD3PCA3/UPM-3

İdrardan tespit edilebilen tek biyo-belirteç DD3'tür. DD3 cDNA tümör işaretleyicisinin benign prostatik dokuya kıyasla, 56 prostat kanserinin 53'ünde

yüksek derecede ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, 18 normal prostat kontrol grubunun hiçbirinde rT-PCR analizi ile DD3 ifadesi tanımlanamamıştır [48].

FDA tarafından hala onay alamamış olmasına rağmen, ABD'deki çeşitli referans laboratuvarları DD3 testini kullanmaktadır.

1.2.10. İnsan Kallikrein-İlişkili Peptidaz 2

İnsan kallikrein-ilişkili peptidaz 2 (KLK2, hK2), PSA ile aynı gen ailesinden salgılanan bir serin proteazdır. Çalışmalar, prostat kanseri sürecinde kanserli dokuda KLK2'nin arttığını, bu yüzden de bir biyo-belirteç olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Serum çalışmalarında, KLK2 ile total PSA [94] ve fPSA [95] bir arada kullanıldığında, kanser tanısında ilerleme kaydedilmiştir.

1.2.11. Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA)

Prostat spesifik membran antijeni (PSMA), sağlıklı ve kanserli bireylerde yüksek derişimde bulunan bir membran glikoproteinidir. PSMA'nın kanserli dokularda, epitelial hücrelerdeki üretiminde göreceli bir artış saptanmıştır. PSMA, tedavide bir hedef olarak kullanılmaktadır [96].

1.2.12. Diğer Doku Kallikreinleri

KLK2'ye ek olarak, diğer kallikreinlerin de prostat kanserinde ve diğer hastalıklarda biyo-belirteç olarak işe yaradığı gösterilmiştir [97]. Sekiz tane kallikreinin prostat dokusunda yüksek derişimde bulunduğu rapor edilmiştir; KLK 2-4, KLK 10-13, KLK 15. Bunlar arasından KLK 11, serum biyo-belirteci olarak ümit vaad edicidir. KLK 11'in total PSA ve % fPSA ile birlikte, kanser tanısında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir [98].

1.2.13. α -Metilaçil-KoA Rasemaz (AMACR)

α -Metilaçil-KoA Rasemaz (AMACR), süt ürünlerinde ve kırmızı ette bulunan, dallanmış-zincirli yağ asitlerinin sentezinde ve oksidatif metabolizmada görevli bir enzimdir. Kanserli dokuda oldukça yüksek miktarda bulunmasının yanı sıra,

enzim, kanser ile ilişkili polimorfizmleri içeren bölgeye yerleşmiş olan bir gen tarafından kodlanmaktadır. Çalışmalar, prostat kanserinde bu genin ifadesinde artış olduğunu göstermektedir [99].

1.2.14. Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü ve Reseptörü

Plazminojen, bir serin proteaz olan ürokinaz plazminojen aktivatörünün aktivasyonu ve reseptörüne bağlanması sonucunda, aktif formu olan plazmine dönüştürülür. Prostat kanserinde ürokinaz plazminojen aktivatörü reseptörünün dokudaki artışı, osteoblastik metastaz ve kanserin ilerlemiş olduğunun göstergesidir [100].

1.2.15. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve Bağlanma Proteinleri

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) ve onların bağlanma proteinlerinin (IGFBP'ler) prostat kanseriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. IGF ailesi iki ligand (IGF-1, IGF-2), iki reseptör (IGFR-1, IGFR-2) ve altı adet bağlanma proteini (IGFBP 1-6) içerir. Artan IGF-1 ve azalan IGFBP-3 derişimlerinin prostat kanseri riski ile orantılı olduğu gösterilmiştir [40].

Prostat tarafından üretilen esas IGFBP olan IGFBP-2 derişimi, lokalize tümörlerde tümör boyutu ve kanser gelişimi ile ters orantılı olarak değişmesine karşın, prostat kanserinde kanser gelişimi ile orantılı olarak artış göstermektedir.

1.2.16. TMPRSS2:ERG ve TMPRSS2:ETV1 Gen Füzyonu

Gen düzenlenmelerinin kanserde, özellikle hematolojik durumlarda önemli olduğu rapor edilmiştir. Bu tarz bir düzenlenmeye örnek olarak, transkripsiyon faktörü genleri ERG ve ETV-1'in, membrana bağlı serin proteaz olan TMPRSS2 geni ile yaptığı füzyon verilebilir. Bu düzenlenmenin kanser profili gösteren hastaların % 80'inde bulunduğu saptanmıştır [101]. Bu genlerin füzyon ürünlerinin kanserli hastaların % 42'sinde, prostatik intraepitelyal neoplazi'li hastaların % 20'sinde ve BPH'lı hastaların çok azında bulunduğu rapor edilmiştir [102]. TMPRSS2:ERG füzyonunun, Floresan In-situ Hibridizasyon (FISH) analizlerinde kanserli dokuların % 80-95'inde bulunduğu gösterilmiştir.

1.2.17. Transforming Büyüme Faktörü (TGF β 1)

TGF- β 1, hücresel farklılaşma, immün cevap, anjiyogenez ve proliferasyon gibi çok çeşitli moleküler süreçlerde rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Yapılan çalışmalar, kanser gelişiminde TGF- β 1'in rol oynadığını göstermektedir. TGF- β 1 derişimindeki artışın, tümör evresi, lenf nodülüne metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [103]. TGF- β 1'in plazma derişimini ölçmek için yapılan ELİZA çalışmaları ile prostat kanserli hastalarda TGF- β 1 derişiminin arttığı [104] ve bu artışın ekstrakapsüler genişleme, seminal vezikül invazyonu, metastaz ve biyokimyasal nüks etme ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [105]. Bu yüzden, TGF- β 1 kanser için iyi bir teşhis belirtecidir.

1.2.18. E-Kadherin

E-kadherin; hücre-hücre adezyonunda, patolojik olmayan doku bütünlüğünde ve karsinogenezde önemli rol oynar. Epitel hücreleri tarafından üretilen hücre adezyon molekülüdür ve bu hücrelerce üretilen E-kadherinin kanser gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İmmünohistokimya çalışmaları, prostat kanseri hastalarının % 50'sinde, prostat dokusu tekdüze bir görünüm sergilese bile, E-kadherin miktarının düştüğünü göstermiştir [106]. Yapılan çalışmalarda, E-kadherin miktarının tümör evresi ve hayatta kalma ile de ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Azalmış E-kadherin üretiminin, prostat kanserli hastalarda daha kısa hayatta kalma süreci ile ilişkisi olduğu saptanmıştır [107].

1.2.19. Anneksin A3

Anneksin A3 (ANXA3), anneksin ailesine ait, kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. ANXA3'ün immün cevabın aktivasyonu, membran trafiği ve lenfosit göçü ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. ANXA3 immünohistokimya çalışmaları, ANXA3'ün kanser tespiti için umut vaat eden bir doku belirteci olduğunu, BPH, PIN ve sağlıklı dokuya kıyasla, kanserli dokuda daha az üretildiğini göstermektedir [108]. ANXA3, orta-risk grubundaki hastalar ile yüksek ve düşük risk gruplu hastalar arasında ayırım yapmada kullanılmaktadır.

1.2.20. Prostat Kök Hücre Antijeni (PSCA)

PSCA, özgül olarak prostatta üretilen bir membran glikoproteinidir. PSCA, immünohistokimya çalışmalarında prostat kanserli dokuda tespit edilmiştir ve PSCA RNA'nın kan örneklerinde bulunduğu saptanmıştır. Artan PSCA üretimi, artan kanser riski, yüksek Gleason skoru, ilerlemiş kanser evresi ve metastaz ile ilişkilidir [109].

1.2.21. Hepsin

İlk olarak insan karaciğerinde, cDNA kütüphanelerinden tanımlanan bir membran serin proteazdır ve prostat dokusunda yüksek derişimde üretilir. Ekspresyon profillemeye çalışmaları, tümörlerin % 90'ında hepsin geninin yüksek derecede ifade edildiğini göstermektedir [110].

1.2.22. İnterlökin-6 Ligandı ve Reseptörü

İnterlökin-6 (IL-6), immün ve akut-faz cevaplarında görevli, değişik hücre tiplerinden salgılanan bir sitokindir. Artan IL-6 ve reseptörü derişiminin, metastaz ve androjen-bağımsız kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [111]. IL-6'nın TGF- β 1 ile birlikte kullanımı, kanser tanısı için umut vaad edici sonuçlar vermektedir [112].

1.3. Prostat Spesifik Antijen (PSA)

Serum PSA düzeyi, prostat kanserinin erken teşhisi için en sık kullanılan biyobelirteçtir [113]. Yüksek PSA düzeyi, kanser riski ile doğrudan ilişkilidir [114]. Aynı zamanda kanserin evresinin de yine yüksek PSA düzeyi ile ilişkisi vardır. Prostat kanserinin göz ardı edileceği herhangi bir PSA değeri bulunmamaktadır [67, 115]. PSA düzeyi 4.0 ng/mL'nin altında olan erkeklerde kanser riski % 15'tir ve bu hastaların %15'inde de hastalık ilerlemiş evrededir [67]. 1.0 ng/mL'nin altında PSA düzeyinde kanserin ilerlememiş olduğu söylenebilir. 4.0 ng/mL üzerindeki PSA değerlerinde kanser riskinin çok yüksek olduğu belirtilse de, bu kişilerin ancak % 25-30'unda biyopsi örneklerinde kanser saptanmıştır.

PSA'nın herhangi bir kanser için mevcut olan en iyi tümör belirteci olduğu, aynı zamanda birçok eksikliği de barındıran bir belirteç olduğu belirtilmektedir. PSA sadece prostat kanserine özgü değildir, benign prostatik hiperplazi (BPH) ve prostat hacminin büyümesinde de bir belirteç olarak görev yapmaktadır. PSA'nın belirteç olarak yetersizlikleri, iyi huylu tümörlerin gereksiz tedavisini engellemek için, yeni belirteçlere gereksinim duyulmasına neden olmuştur [47]. PSA'ya alternatif birtakım PSA modifikasyonları; PSA'nın zamanla değişim hızı (PSA hızı, PSAV), PSA'nın prostat hacmine oranı (PSA yoğunluğu, PSAD), yaşa bağlı PSA aralığı, PSA katlanma hızı (PSADT); geliştirilmiştir [116-119]. Ayrıca % serbest PSA (% fPSA), yüzde kompleks PSA ve PSA izoformları gibi yeni PSA analizleri geliştirilmiştir [120]. Fakat tüm bu PSA türevleri, PSA'ya herhangi bir üstünlük göstermemektedir [67, 121]. Ayrıca bu testlerin ölçümü PSA'ya göre daha zor olduğundan, bunların PSA'nın yerine geçmesi çok da mantıklı görünmemektedir [113].

PSA'nın keşfi, çok çeşitli bilim insanlarının semende ve prostatta antijen araması sonucunda ortaya çıkmıştır. Bugünkü adıyla PSA olarak bilinen bu antijen, prostat dokusunda ve semende keşfedildiğinde farklı isimler almıştır.

1.3.1. PSA'nın Keşfi

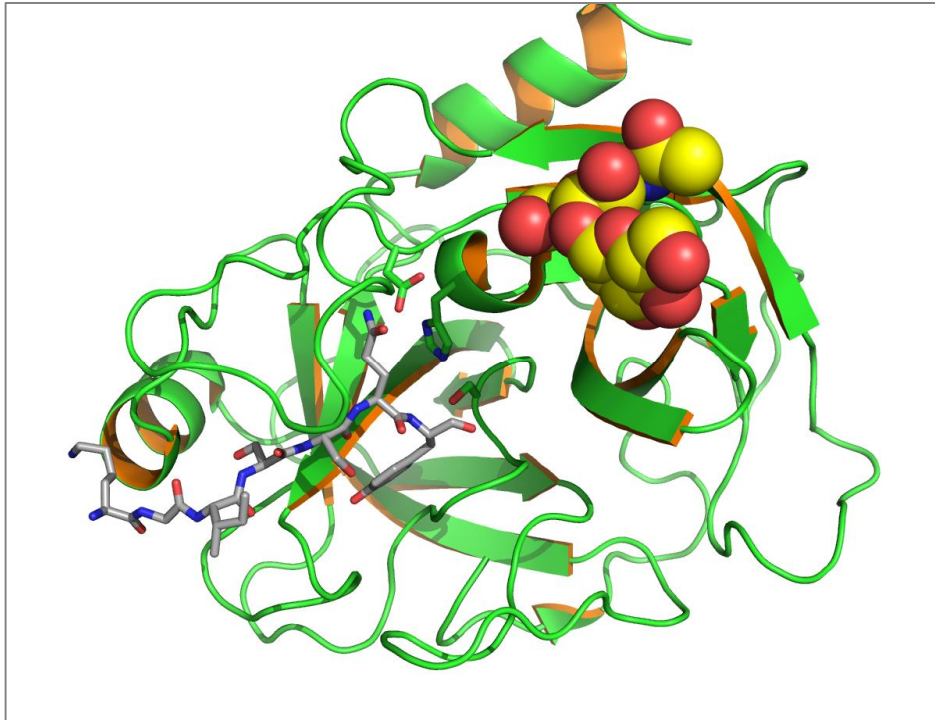
1960'ların sonlarında-1970'lerin başlarında immünoloji alanında hızlı bir ilerleme olmuştur. İlerlemiş biyokimyasal tekniklerle, çeşitli dokulardan ve vücut sıvılarından antijenler keşfedilmiştir [122-124]. Çok çeşitli organlardan, antijenlerin keşfedildiği bu dönemde, 1960'ların sonlarında, prostat dokusu bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Prostattan ziyade, aslında o dönemde bilim insanları insan semenindeki çeşitli antijenik proteinleri karakterize etmek ve bunların kısırlık ile olan ilişkisini ortaya koymak üzerine yoğunlaşmışlardı [125, 126]. Aynı zamanda, bu süreçte semene özgül olan ve tecavüz vakalarında adli bir belirteç olarak kullanılabilecek bir antijen keşfi üzerine de çalışmalar yapılmaktaydı [55]. Birbirinden farklı zamanlarda prostat dokusunda ve semende keşfedilen bu antijenlerin farklı isimler alması, bu antijenlerin keşfinde anlaşmazlıklara yol açmıştır [127]. Yapılan çalışmalar ile bu proteinlerin yapısal olarak PSA'ya benzediği gösterilmiştir.

1.3.2. Biyokimyası ve Fonksiyonu

Doğal PSA, 28.430 kDa moleköl ağırlığına sahip, 237 amino asitten oluşan, karbonhidrat zinciri içeren bir glikoproteindir [128]. PSA, proteazlardan kallikrein ailesine ait bir proteindir ve insan kallikrein-3 (hK3) olarak da bilinir [129-131].

PSA, seminal sıvıya 0.5 - 2.0 g/L derişiminde salgılanır [132]. İlk salgılandığında pro-enzim olarak salgılanır. Seminal sıvıdan izole edilen PSA, karbonhidrat kısımlarındaki sialik asit varyasyonları ve amino asit zincirlerindeki kesilmelerdeki değışimler nedeniyle heterojendir. İzoelektrik fokuslama ve iyon değışim kromatografisi ile 5-6 saf izoenzim elde edilir. Bütün halindeki iki izoenzim olan A ve B'nin izoelektrik noktaları (pI) 6.8 ve 7.3 iken kesilmiş izoenzimlerin daha asidik pI değeri vardır [133]. PSA'nın seminal sıvıdaki küçük bir kısmı protein C inhibitörü ile kompleks yapmış durumda bulunur [134].

PSA; IGFBP-3 proteininden lokal olarak IGF-1 salgılayarak [135], TGF- β 'nin aktivitesini modüle ederek [136], plazminojen aktivatörünü aktive ederek prostat kanserinde invazyona aracılık etmektedir [137].



Şekil 1.2. Antikor ile kompleks oluşturmuş insan prostat spesifik antijeninin kristallografik yapısı

1.3.3. PSA Ekspresyonu

PSA, normal ve neoplastik dokuda eksprese edilmektedir. İmmünohistokimya boyama çalışmaları ile prostat kanseri yönünde farklılaşma azaldıkça PSA ekspresyonunun azaldığı kanıtlanmıştır [138, 139]. PSA, prostata özgü olarak nitelendirilse de, bazı prostat dışındaki dokularda da (periüretral bezler, meme dokusu) az miktarda ifade edilmektedir [140]. PSA, meme kanserli kadınların serum örneğinde de az miktarda da olsa tayin edilmektedir [141].

PSA'nın prostat dışındaki ekspresyonunun, serum PSA düzeyi üzerine herhangi bir katkı yapmadığı prostatektomi uygulanan hastalarda serumda PSA'nın ölçülememesinden anlaşılmaktadır [142].

1.3.4. PSA'nın Prostat Kanserinde Bir Belirteç Olarak Kullanımının Biyolojik Temeli

PSA, organa-özgü bir belirteçtir ve PSA'nın serum seviyesi, prostatta hem inflamatuvar hem de neoplastik süreçlere ışık tutmaktadır. Serum PSA düzeyinin benign prostatik hastalıklarda da artması her ne kadar kanser özgüllüğünü azaltsa da, PSA prostat kanseri için oldukça kullanışlı bir belirteçtir [57, 143]. Bunun nedenleri şu şekilde sıralanabilir [57]:

- Prostat kanserinin yüksek görülme sıklığı,
- Radikal prostatektomi sonrasında PSA üretiminin durması,
- Prostat kanser dokusunun, PSA serum seviyesine yaptığı yüksek katkı.

PSA normalde sadece plazmaya göre bir milyon kat yüksek derişimde bulunduğu, glandüler kanalın sıvısı içine salgılanır. Normal prostatta ve BPH'lı kişilerde, PSA kan dolaşımına ancak geriye doğru ekstrasellüler sıvıya sızarak, böylece de dolaşıma diffüze olarak karışabilir. Fakat prostat kanserinde epiteliyal hücrelerin bütünlüğü ve polarizasyonundaki bozulma, prostatik kanala doğru olan normal salgı yolunun kaybına yol açar. Böylece PSA, aktif olarak ekstrasellüler boşluğa salgılanır, oradan da kan dolaşımına girer [144]. Bu durum, kanserli dokunun serum PSA düzeyine olan katkısının normal prostatik dokudan 30 kat, BPH'lı dokudan da 10 kat fazla olmasının nedenini açıklar [57].

1.3.5. Kan Dolaşımadaki PSA'nın Kompleks Oluşturması ve Metabolizması

Dolaşım içerisinde, enzimatik olarak aktif proteazlar, plazmadaki proteaz inhibitörleri ile kompleks oluşturarak inaktive edilirler. Bu yüzden de PSA'nın % 5-40'ının serbest formda bulunması, büyük kısmının da proteaz inhibitörü olan α_1 -antikimotripsin (ACT) ile kompleks oluşturması şaşırtıcı değildir. PSA'nın çok az bir kısmı da α_1 -proteaz inhibitörü (API, α_1 -antitripsin) ve α_2 -makroglobulin (A2M) ile kompleks oluşturur [145].

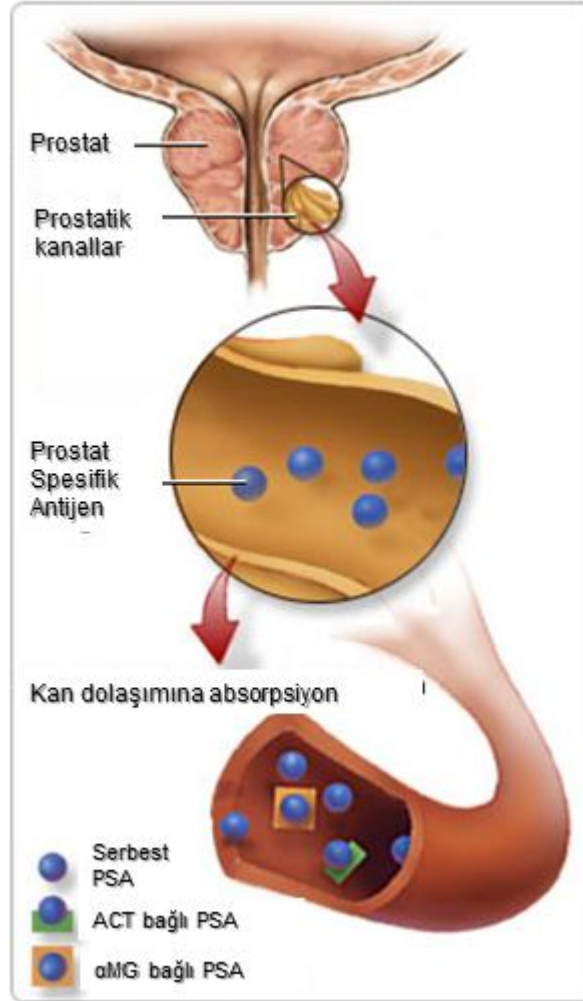
PSA'nın inhibitörleri ile reaksiyon hızı ve çeşitli formlarının metabolik klirens hızı, birlikte bu proteinin dolaşımdaki değişimini belirler. Proteaz-A2M kompleksleri, 2-5 dakikalık yarılanma ömrü ile dolaşımdan uzaklaştırılır [146]. Bu yüzden PSA'nın A2M ile oluşturduğu kompleksin, dolaşıma ulaşan PSA'nın en önemli metabolik yolağı olduğu bilinmektedir [147]. Serbest PSA, 1-2 saat gibi yarılanma ömrü ile metabolize edilirken, PSA-ACT'nin yarı-ömrü 2-3 gündür [148, 149]. Bu yüzden PSA'nın ACT ile oluşturduğu kompleks, plazmadaki esas form olmasına rağmen, PSA metabolizmasındaki en önemsiz yoldur [144].

Aktif PSA, inhibitörler ile reaksiyona girdiği için, serumdaki fPSA'nın enzimatik olarak inaktif olduğu söylenebilir. Bu PSA; pro-PSA'dan ya da olgun PSA'dan oluşur [147].

PSA'nın malign ve benign dokulardan dolaşıma hangi yolak üzerinden ulaştığı, kanserli dokunun neden dolaşıma çok fazla PSA taşıdığını ve serumdaki kompleks PSA oranının BPH'ye kıyasla prostat kanserinde yüksek olduğunu açıklamada yardımcı olacaktır. Bunun için çeşitli mekanizmalar önerilmektedir:

- Prostat kanserli dokuda, ACT'nin lokal ekspresyonunun yüksek olması, PSA-ACT kompleksi oluşumunu kolaylaştırıyor olabilir [150]. Fakat, ACT ekspresyonu normal prostatik ve malign dokuda benzer olmasına rağmen, serumdaki kompleks PSA oranı, prostatik hastalığı olmayan erkeklerde daha düşüktür.
- Ekstrasellüler boşluktan dolaşıma ulaşan PSA genellikle kesik formdadır. Doğrudan kan dolaşımına salgılanan formuna kıyasla, kompleks oluşturma yeteneğı daha azdır.
- Pro-PSA'nın prostat kanserine kıyasla BPH'li dokuda oranı daha yüksektir.

- Pro-PSA'nın aktif PSA'ya aktivasyonu, BPH'ya kıyasla, prostat kanserli dokuda daha yüksektir.



Şekil 1.3. Kan dolaşımına katılan PSA formları

1.4. PSA'nın Prostat Kanseri İçin Tümör Belirteci Olarak Kullanılması

1.4.1. Erken Kanser Teşhisinde Total PSA

Dünya genelinde yapılan geniş ölçekli çalışmaların sonuçları, serumdaki total PSA düzeyinin 4.0 ng/mL'den yüksek olmasının, prostat biyopsisi için eşik değer olduğunu göstermektedir [151]. Fakat tüm yaş gruplarındaki erkekler için tek bir değer kullanımı, erken evrede hastalık taşıyan çok sayıda klinik vakanın dışarıda kalmasına neden olur, çünkü ortalama % 20-50 oranında organla-sınırlı kanserli vakalarda serum total PSA düzeyi 4.0 ng/mL'nin altındadır. İlerlemiş kanserde

yüksek PSA düzeyi, fazla sayıda tümör hücresi varlığını açıkça işaret eder [152-154].

Serum PSA testinin ve dijital rektal muayene (DRE)'nin prostat kanser teşhisi için kullanılmasıyla birlikte, prostat kanserinin görülme sıklığında ciddi bir artış olmuştur. Amerikan Üroloji Birliği ve Amerikan Kanser Sosyitesi, özellikle hastalığın teşhisinden sonra on yıldan uzun bir hayat hedefleniyorsa, 50 yaşında ve daha büyük erkeklere her yıl PSA testini ve DRE'yi önermektedir [155].

4.0 ng/mL PSA değerini kanser teşhisi için minimum eşik değer olarak kullanmanın getirdiği kısıtlamalar, total PSA'nın daha doğru bir test olarak geliştirilmesi için birtakım adımlar atılmasına neden olmuştur. Serum PSA düzeyi, yaş ile birlikte arttığı için ve etnisiteden de etkilendiğinden dolayı hem yaşa bağlı hem de etnisiteye-özgü normal değerler oluşturulmuştur [156-158]. Yaşa bağlı değer aralığının genç erkeklerde PSA hassasiyetini arttıracak, yaşlı erkeklerde de özgüllüğü güçlendireceği, böylece genç popülasyonda tedavi edilebilecek kanser teşhisinde artışa, yaşlı erkeklerde de önemsiz vakaların dışarıda tutulmasına neden olacağı gösterilmiştir [68, 159].

1.4.2. Primer Tedaviye Verilen Cevabın Anlaşılmasında PSA

Prostat bezi haricinde serum PSA düzeyi için önemli bir kaynak bulunmadığından, serum PSA değeri aynı zamanda geçerli lokal tedavinin (radikal prostatektomi/radyasyon tedavisi) etkinliğini araştırmak için kullanılmaktadır. Radikal prostatektomi sonrasında, standart analiz yöntemleri ile tayin edilebilen serum PSA seviyesi, klinikte hastalığın tekrarladığının göstergesidir [160]. Tersine, radyasyon tedavisi uygulanan hastalarda her ne kadar çok düşük seviyede de olsa, PSA tayin edilebileceği için, bu grupta tedavinin etkinliğini ölçmek daha zordur. Bu yüzden American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO), radyasyon tedavisi sonrasında PSA artışı nedeniyle tereddütlü olsa da, genellikle en minimum seviyedeki PSA değeri hastalığın nüks ettiğinin habercisi olarak kullanılmaktadır [161, 162].

1.4.3. Tekrar Eden Prostat Kanserinin Erken Teşhisinde PSA

Primer radikal prostatektomi veya radyasyon tedavisi sonrasında PSA'nın prognostik önemi, hastaların % 92'sinde klinikte nüks etmeden önce PSA değerindeki artış ile anlaşılmıştır [163, 164]. Fakat ilk PSA artışının olduğu zamandan, klinik olarak geçerli artışa kadarki zaman değişkendir ve oldukça uzundur. Johns Hopkins'ten bir ürolojistin yapmış olduğu çalışmalarda, radikal prostatektomi sonrasında PSA'nın ilk tayin edildiği zamandan klinikte geçerli olan değerine ulaşması için geçen zaman 8 yıl olarak bulunmuştur [59]. Ayrıca klinik nüks zamanından ölüme kadar geçen süre 5 yıl olarak rapor edilmiştir. Ancak yine de PSA artışındaki hız, erken nüks olduğunun habercisidir.

1.5. Günümüzde PSA Analiz Yöntemleri-ELİZA

ELİZA (ELISA-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), analitlerin (ilaç alerjenleri, pestisitler, herbisitler, veteriner ilaç reziduları, vb.) tayini için sık kullanılan bir yöntemdir. ELİZA yöntemi, bilimsel araştırmalarda, veteriner ilaçlarında, çevresel ve tarımsal uygulamalarda, sağlık hizmetinde rutin kullanılmaktadır. ELİZA'nın temel prensibinde, hedef analit (antijen), immün sistem tarafından üretilen proteinler olan antikorlar tarafından yüksek özgüllükte tanınır. Hayvanların immün sistemi, antigen varlığına cevap olarak antikor ürettiği zaman, bu antikorlar antigenleri tanıyarak onlara bağlanır. Antijene bağlı olan antikorların işaretlenmesi, ELİZA testinin temelini oluşturur [165].

1.5.1. ELİZA Tarihçesi

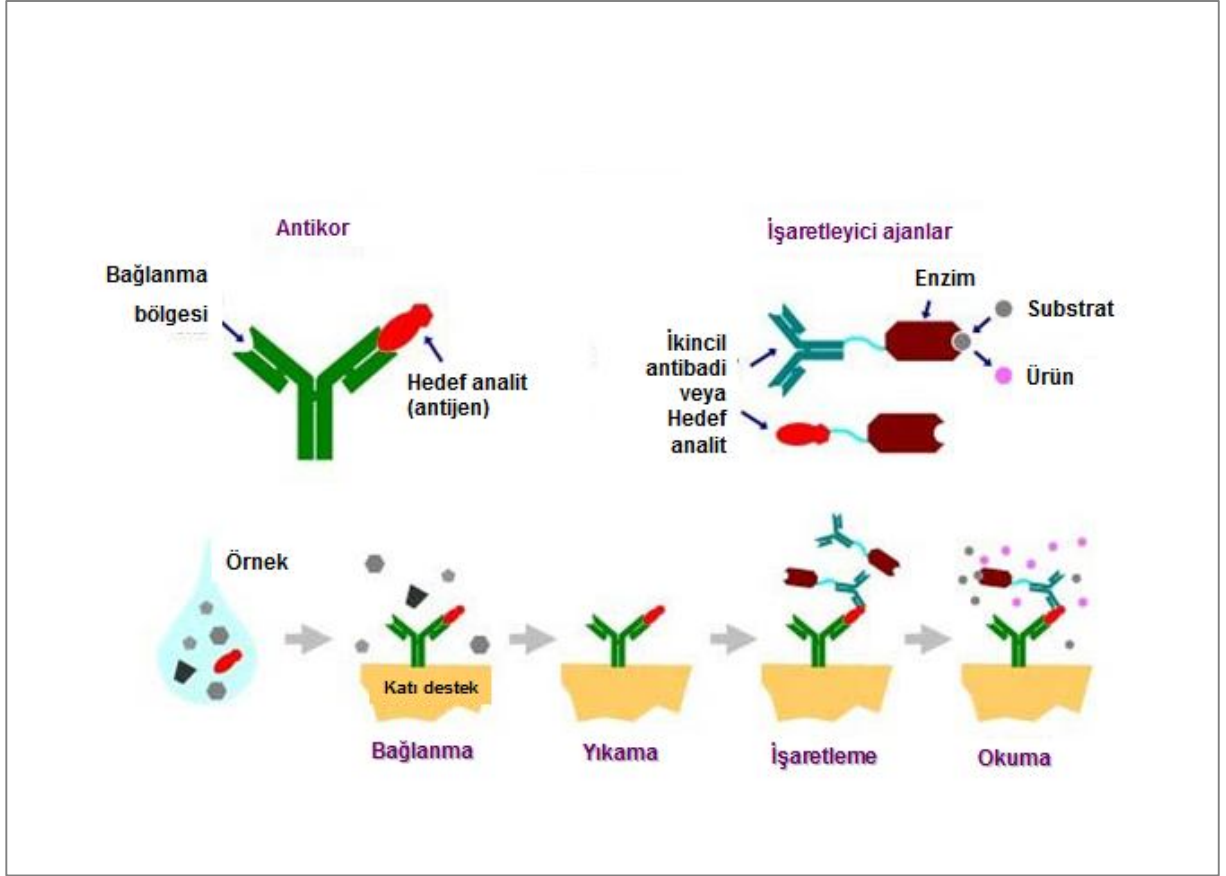
ELİZA yöntemi, 1960'lı yıllarda, birbirinden bağımsız bir şekilde iki araştırma grubu tarafından geliştirilmiştir; Stockholm Üniversitesi'nden Peter Perlmann ve Eva Engvall, Dutch araştırma grubundan Antan Schuurs ve Bauke van Weemen.

Geliştirilen yöntem bilinen, ticari RIA (radio-immunoassay) prensiplerine dayanmaktaydı, ikisi arasındaki tek fark ELİZA'da antikorların radyo-izotop yerine enzim ile işaretlenmesiydi.

1.5.2. ELİZA'nın Tipik Basamakları

ELİZA'nın başarısı antijene bağlanan ve antijeni tayin eden (sekonder) antikorların, hedef analite olan immüno-reaktivite seviyesine bağlıdır. İki farklı antikorun kullanıldığı yöntemde, ilk antikor hedef analiti tanımak ve bağlamak için kullanılırken, ikinci antikor bağlı hedefi tayin etmek için kullanılır (Şekil 1.4) [166].

Doğrudan tayin yönteminde; İlk basamakta, mikrotitre kuyucuklara antikorlardan biri ile kaplanır. Yakalayıcı antikor (capture antibody) olarak bilinen bu antikor, kuyucuklara pasif adsorpsiyon yolu ile bağlanır. Bu aşama +4 °C'de gece boyunca devam ettirilir. Ardından bir bloklama çözeltisi (süt proteini-kazein, BSA, balık jelatini) uygulanır. Bu proteinler, yakalayıcı antikor tarafından işgal edilmemiş kuyucukların plastik yüzeyi üzerindeki boş bölgelere tutunurlar, böylece inkübasyon aşaması sırasında kuyucuk yüzeyine farklı ajanların non-spesifik olarak bağlanması engellenmiş olur. Fazla bloklama ajanı uzaklaştırılır, kuyucuklar örnek ile muamele edilmeden önce yıkanır. Yıkama aşamaları, tüm inkübasyon aşamaları arasında, özgül olmayan bağlanmadan kaynaklı arka-plan sinyalini minimuma indirmek için tekrarlanır. Test örneği hedef analiti içeriyorsa, kuyucuğa bağlanmış olan yakalayıcı antikor tarafından tutulur. Test örneği ile inkübasyon aşamasından sonra, kuyucuk, enzim-bağlı tayin antikorunu eklenmeden önce yıkanır. Tayin antikorunu genellikle HRP (Horse Radish Peroxidase), alkaline fosfatase ya da β -D-galaktozidaz gibi bir enzim ile konjuge haldedir. Bu enzimler kromojenik bir substratın (3,3',5,5'-tetrametil benzidin veya 2,6-diklorofenolindofenol gibi) hidrolizini katalizler. Böylece belirli dalga boylarında spektrofotometrik kuyucuk-okuyucu kullanılarak ölçülebilen kolorimetrik bir değişime yol açar. Mikrotitre kabın her bir kuyucuğunun absorbansını ölçmeden önce bir stop çözeltisinin eklenmesi ile reaksiyon durdurulur.



Şekil 1.4. ELİZA yöntemi ve tipik aşamaları

Şekil 1.5’de gösterilen doğrudan tayin yöntemine ek olarak, ELİZA’da doğrudan olmayan tayin yöntemi de kullanılmaktadır. Bu durumda, Şekil 1.5’deki gibi, kullanılan sekonder antikor, antikorların ya da immunoglobulinlerin uygun türe özgü alt sınıfını tanıır ve bağlanır. Bu da primer antikor ile karşılıklı olacak şekilde, enzime konjuge sekonder tayin antikorudur. Bu yöntem değişkenlik göstermektedir. Yöntemin hassasiyeti, sekonder antikor poli-klonal ise yüksek olabilir, çünkü bu şekilde primer antikor üzerindeki çoklu epitopların tanınması yolu ile sinyalin güçlendirilmesi sağlanır.

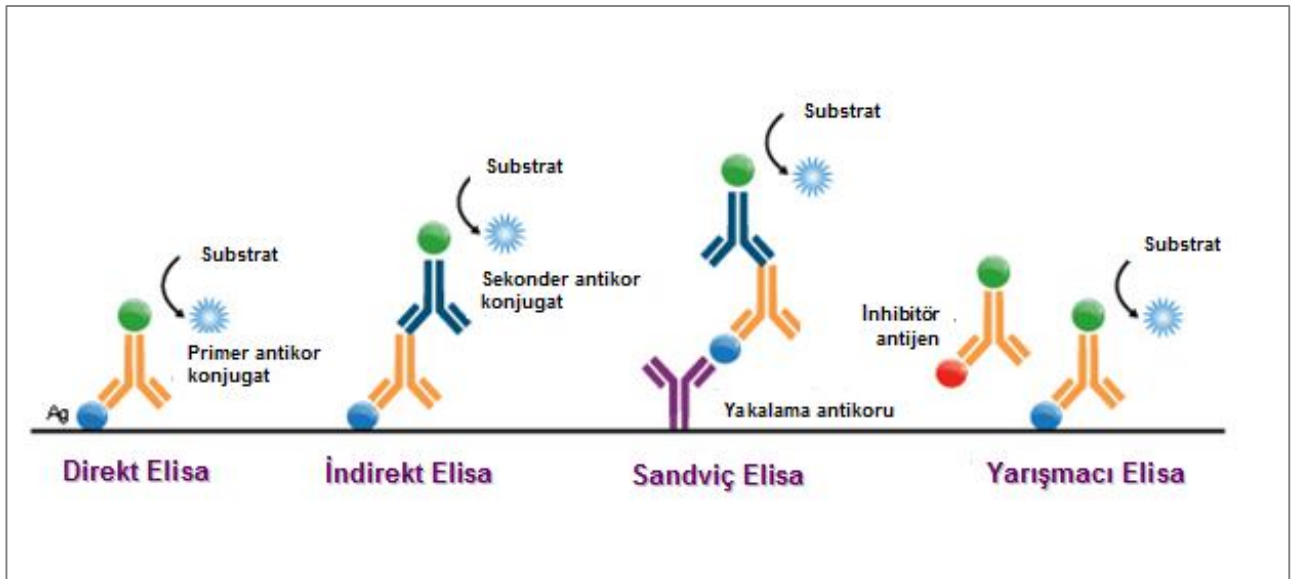
1.5.3. ELİZA Tayin Yöntemleri

1.5.3.1. Doğrudan ELİZA: Antijen ilk aşamada katı destek üzerine bağlanır. Enzim ile işaretli olan antikor yardımıyla tayin yapılır. İşlenmemiş örneklerin ölçümü bu yöntemle genellikle zordur çünkü örnek içindeki yarışmacı proteinler bağlanma bölgeleri için yarış halindedir.

1.5.3.2. Dolaylı ELİZA (Doğrudan olmayan ELİZA): Bir önceki yöntemdeki gibi, antijen katı destek üzerine bağlanır. Ancak bu sefer primer antikor enzim ile işaretlenmez. Enzim ile konjuge haldeki bir sekonder antikor yardımıyla primer antikor tayin edilir. Serumdaki özgül antikorların tayini için sıklıkla kullanılır.

1.5.3.3. Yarışmacı ELİZA: Yarışmacı proteinlerin veya antikorların eş-zamanlı olarak ortama eklenmesini içerir. İkinci bir antikorun veya proteinin eklendiği yerde örnek sinyalindeki azalma oldukça özgül bir sonuç verir.

1.5.3.4. Sandviç ELİZA: Katı faz desteğine yakalayıcı antikor bağlanır. Bilinmeyen ya da bilinen antijeni içeren örnek bir matriks veya tampon içinde ilave edilir. Enzim işaretli antikor daha sonra tayin için ortama eklenir.



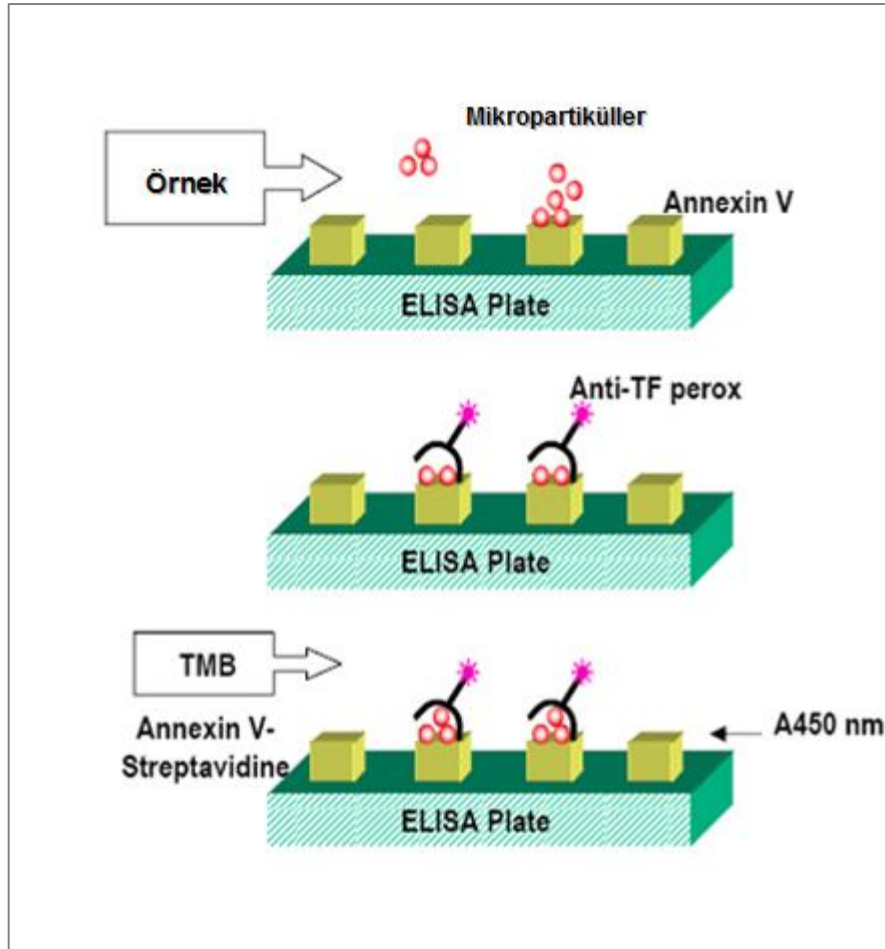
Şekil 1.5. ELİZA tayin yöntemleri

1.5.4. Farklı Biyokimyasal Reaksiyonlara Göre ELİZA Varyasyonları

Farklı substrat ve sonuçta oluşan sinyalin tayin şekline göre, ELİZA analizleri çeşitlidir. Aşağıda farklı biyokimyasal reaksiyon temeline dayalı analiz çeşitleri bulunmaktadır:

1.5.4.1. Kromojenik Analiz

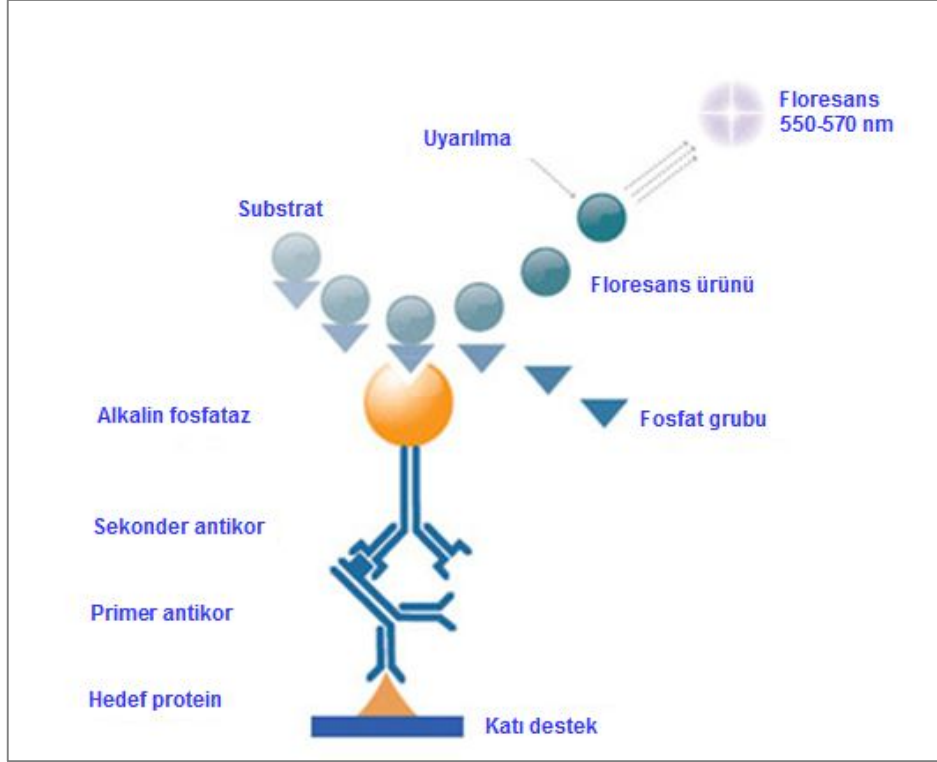
Kromojenik analizler sonucunda oluşan renkli reaksiyon ürünü, görünür bölgedeki ışığı absorbe eder. Katı destek üzerinde oluşan antijen-antikor kompleksi, diğer maddelerden yıkama ile ayrılır. Antikor daha önceden enzim ile işaretlenmiştir. Enzimin substratı eklendikten sonra, renkli bir ürün oluşur. Reaksiyon ürününün optik yoğunluğu, ölçülecek analitin derişimi ile doğru orantılıdır.



Şekil 1.6. Kromojenik analiz yöntemi

1.5.4.2. Kemifloresan Analiz

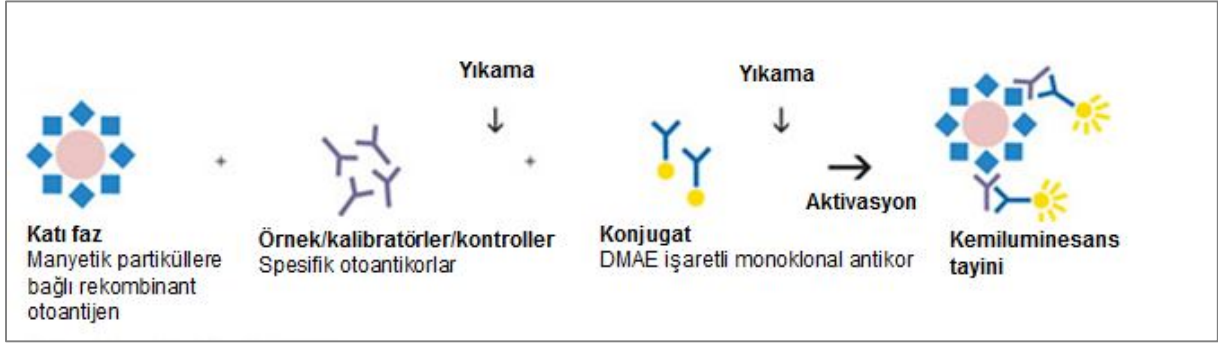
Floresan immüno-analizler kolorimetrik ELİZA'nın varyasyonlarından biridir. Enzim ile substrat etkileşimi sonucunda bir reaksiyon ürünü oluşur. Bu ürün belli bir dalga boyundaki ışık ile uyarıldığında ışımaya başlar. Floresan birimleri doğrudan, ölçülecek analit derişimi ile doğru orantılıdır. Kolorimetrik ELİZA'ya kıyasla, floresan immüno-analizler az bir miktar daha hassastırlar.



Şekil 1.7. Kemifloresan analiz yöntemi

1.5.4.3. Kemilüminesans Analiz

Enzim, substratı ile bir reaksiyon ürünü oluşturur. Bu ürünün özelliği, ışığın fotonlarını yaymasıdır. Lüminesant reaksiyonları, relatif ışık ünitelerinde (RLU) ölçülür. Bu da yine örnek içindeki analit derişimi ile doğru orantılıdır. Diğer ELİZA varyasyonlarına ve kolorimetrik ölçüme kıyasla, ultra yüksek hassasiyete sahiptir.



Şekil 1.8. Kemilüminesans analiz yöntemi

1.5.5. Sinyal Çıktısı ve Analizin Performansı

ELİZA'da florojenik substratlara karşı tayin edilebilir bir renk değişimi gösteren kromojenik substratlar çok kullanılmamaktadır. Geliştirilmiş kemilüminesans ajanlar da ayrıca ışık yaymak için kullanılırlar. Florojenik ve luminometrik yöntemler daha hassastır. Fentogram düzeyinde hassasiyete sahip olan bu substratlar, kromojenik substratlara kıyasla lineer tayin aralığını genişletirler.

Hedef analitin miktarının belirlenmesi, kalibrantların kullanımı ile internal/eksternal standardizasyon yolu ile kolaylaştırılmıştır. ELİZA testi, 2'li veya 3'lü tekrarlar şeklinde yapılır. Birçok analit için kitler ticari olarak mevcuttur. İlgilenilen analite karşı antikorlar ticari olarak mevcut ise, ELİZA kiti sonradan da yapılabilir. ELİZA'nın başarısı mevcut antikorların kalitesine bağlıdır. ELİZA popüler bir yöntemdir, otomasyona uyumludur. Ancak, ELİZA kitlerinin tek kullanımlık olması nedeniyle maliyetinin yüksek olması, analize başlamadan önce hazırlık aşamasının uzun olması, analiz için gereken basamak sayısının fazla olmasından dolayı analiz süresinin uzun olması, işaretleyici kullanımını gerektirmesi, eş-zamanlı ölçüme izin vermemesi gibi özellikler yöntemin dezavantajları arasındadır.

1.6. Biyosensör Geliştirilmesi: PSA'nın POCT (Point of Care Testing) Ölçümü İçin Bir Yaklaşım

PSA'ya onkolojik belirteç olarak önem verilmesinin nedeni, alternatif belirteçlerin eksikliğidir. PSA testlerinin çoğu, günümüzde merkezi laboratuvarlarda, örnek taşınımını, uzun bekleme sürelerini, artan uygulama ve tıbbi masraf gerektiren

büyük, otomatik analizörlerde yapılmaktadır. Hasta-yanı (near patient) ve laboratuvar dışında özel cihazlarla yapılan nokta bakım analizleri (Point of Care Testing-POCT), klinik ziyaretlerin sayısının azalmasında, hastaya ve sağlık sistemine düşen maliyetin azalmasında, hasta memnuniyetini arttırmada ve klinik verilerin iyileştirilmesinde yararlı olacaktır. Biyosensör teknolojisindeki son gelişmeler, PSA için POCT uygulamasını, hayalden gerçeğe dönüştürecek [167].

Günümüzde PSA testlerinin çoğu, merkezi laboratuvarlarda büyük, otomatik, yüksek işlem hacmi olan sistemlerle yapılmaktadır ve bunların önemli bir pazar alanı mevcuttur. Bu tarz sistemlerin avantajları; düşük tayin limiti (0.05-0.005 ng/mL), kanıtlanmış güvenilirlik ve örnekler için yüksek işlem hacmidir. Fakat önemli bir dezavantaj, bunların sadece merkezi laboratuvarlarda bulunmasıdır. Bu durum örneğin test merkezine taşınmasını gerektirdiği için, test sonuçlarının analiz edilmesi ve rapor edilmesi sürecinde gecikmeler yaşanmasına neden olmaktadır. Böylece test yaptırmaya karar verme ile terapötik sonucun ele geçmesi arasında geçen süre [168] bazen haftalarca sürmektedir. En ideal durum, sonuçların birkaç dakika içerisinde hastaya ulaşacağı POCT cihazlarının geliştirilmesidir. Bu cihazlar sayesinde klinik ziyaret sayısı azalacak, maliyet düşecek, hasta memnuniyeti artacak, klinik sonuçlar iyileştirilecek ve hatta adli vakalarda suç mahallinde analiz yapılabilecektir [169].

PSA ölçümü için geliştirilen biyosensörlerin çoğu, yüksek afiniteye sahip, intakt antikorların biyotanımadan sorumlu molekül olarak kullanıldığı sistemlerdir.

1.6.1. Biyosensörler

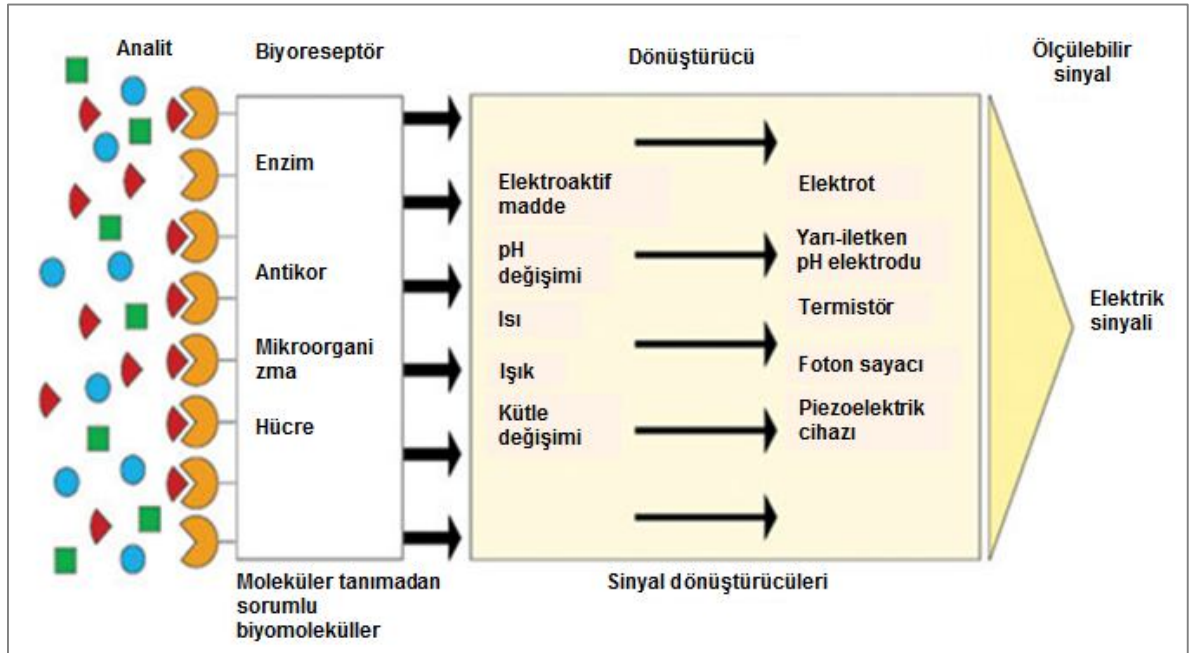
Canlılardaki çevreyi hızlı bir şekilde algılama ve adapte olma mekanizması, biyosensörlerin *in vitro* olarak geliştirilmesi ve kullanımı için model oluşturmuştur. Biyosensörlerin keşfi, 1950'li yılların ortalarında, Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) L.C. Clark'ın [170] kandaki O₂ miktarını bir elektrot yardımıyla tayin etmesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, O₂ elektrodu ile glukozoksidad enzimini birleştirerek, kandaki glukoz seviyesini ölçmüşlerdir. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyon tayinini mümkün kılan sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyolojik bir materyalin katılması ile birçok maddenin tayini mümkün olmuştur [171-174].

Biyosensörler, biyolojik bir ajanla birleştirilmiş olan fizikokimyasal dedektörlerdir. Biyosensörlerde ana prensip, analiz edilecek madde ile seçici bir şekilde etkileşime giren biyolojik olarak aktif bir bileşenin, bir iletici sistemle birleştirilmesi ve etkileşim ürünlerinin bir ölçüm sistemi ile ölçülmesidir [173-175].

Biyosensörler genel olarak 3 ana bölümden oluşmaktadır; seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyoreseptör”, bu biyoreseptörün tayin edilecek olan hedef analit ile etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektrik sinyaline dönüştüren “dönüştürücü” ve “dedektör” bölümüdür.

Biyoreseptör, hedef analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip olan kısmıdır. Biyoreseptör, biyosensörün hassasiyetinden ve seçiciliğinden doğrudan sorumludur. Biyosensörlerde biyoreseptör olarak enzimler, doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikörler, nükleik asitler kullanılmaktadır.

Dönüştürücüler, biyoreseptörün hedef analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp, bu değişimi ölçülebilir dijital sinyallere dönüştüren cihazlardır. Dönüştürücüler temelde dört grup altında incelenebilir: elektrokimyasal dönüştürücüler (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), optik dönüştürücüler, akustik dönüştürücüler ve termal dönüştürücüler.



Şekil 1.9. Biyosensörün şematik gösterimi

Biyosensörleri genel olarak çalışma prensiplerine göre; biyoafinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

Biyoafinite esaslı biyosensörler, iletici sistem üzerinde antijen-antikor etkileşimi gibi afinite etkileşimi temeline dayanarak ölçüm yapan sensörlerdir.

Biyokatalitik biyosensörler, enzim immobilizasyonu ile enzimin substratı, aktivatörü, inhibitörü veya koenzimi olan çeşitli kimyasal maddelerin tayini için kullanılan sensörlerdir.

Biyosensörleri, kullanılan dönüştürücünün çalışma prensibine göre doğrudan dedeksiyon biyosensörleri, dolaylı dedeksiyon biyosensörleri, entegre biyosensörler ve lab-on-çipler olarak sınıflandırmak mümkündür [174-176].

Biyosensörlerde esas amaç, analiz edilecek hedef analit miktarı ile orantılı olarak sürekli sinyal üretilmesidir.

1.6.1.1. Nitelikli Biyosensörlerde Aranan Özellikler

Biyosensörler aşağıdaki sekiz parametreye göre nitelendirilirler [171, 173, 175]:

- a) **Duyarlılık:** Geliştirilen biyosensörün tayini gerçekleştirecek olan analitin miktarının değişimine bire bir cevap vermesi demektir.
- b) **Seçicilik:** Geliştirilen biyosensörün, sadece analiz edilecek hedef analite olan özgüllüğünü ifade eder. Başka reaktiflere sinyal vermez, böylece hatalı sonuç vermez.
- c) **Ölçüm aralığı:** Geliştirilen biyosensörün ölçebildiği analit derişiminin aralığıdır.
- d) **Ölçüm süresi:** Sensörün ölçme hızını gösterir.
- e) **Tutarlılık:** Sensörün sonuçlarındaki tutarlılığı gösterir.
- f) **Tespit sınırı (Tayin limiti):** Sensör ile tayin edilebilecek en düşük analit derişimidir.
- g) **Ömrü:** Sensörün performansında gözle görülür bir azalma olmadan, verdiği hizmet süresidir.
- h) **Kararlılık:** Belirli bir süre içinde sensörün duyarlılığındaki veya baz çizgisindeki değişimleri dikkate alan kalite ölçüm değeridir [177, 178].

1.6.1.2. Biyosensör Tasarımında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Biyosensör tasarımlarında öncelikle biyosensörün tayin edeceği hedef analit belirlenmelidir. Bu aşamadan sonra, aşağıdaki maddelere göre biyosensörler tasarlanabilir:

- (i) Hedef analite uygun biyoreseptörün seçimi,
- (ii) Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemek için kullanılacak olan uygun immobilizasyon yönteminin seçimi,
- (iii) Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali uygun bir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve tasarımı,
- (iv) Ölçüm aralığının, duyarlılığın ve ölçüm sırasında oluşan parazitlerin dikkate alınması,
- (v) Cihazın kompakt bir hale dönüştürülmesidir.

1.6.1.3. Biyosensörlerde Dönüştürücü Çeşitleri ve Özellikleri

Geleneksel Dönüştürücüler: Geleneksel dönüştürücüler 3 çeşittir. Bunlar; H_2O_2 veya O_2 ölçümlerine dayanan amperometre, pH veya iyon ölçümleri yapan potansiyometre ve fiber optik kablo kullanan fotometrelerden ibarettir. Biyotanıma reaksiyonları sonucunda oluşan kimyasal ürünler elektrokimyasal metotlarla kolayca belirlenebilir. H_2O_2 veya reaktif O_2 bir çift elektrot ile kolayca ölçülür. Referans elektrodun karşısında olan elektroda (Ag/AgCl) uygun bir voltaj uygulandığı zaman, H_2O_2 veya O_2 elektrotta yükseltgenir, ardından bir akım oluşur. Oluşan bu akım amperometre ile ölçülür. Potansiyometre membranın iki tarafındaki H^+ farkına göre çalışır. Fotometre, oluşan ışığı sinyal olarak algılar [177].

Piezoelektrik Dönüştürücüler: Piezoelektrik malzemeleri ve yüzey akustik dalga cihazları, kütle değişimine karşı hassas bir ortam sunar. Biyoreseptörde tanıma reaksiyonu sonrasında kütle değişimi oluyorsa, bu tip dönüştürücüler kullanım için çok uygundur. Örneğin kuartz kristal mikrobals (QCM) piezoelektrik silikon kristalleri yüzey üzerinde pikogram düzeyindeki kütle değişimlerini bile algılayabilmektedir.

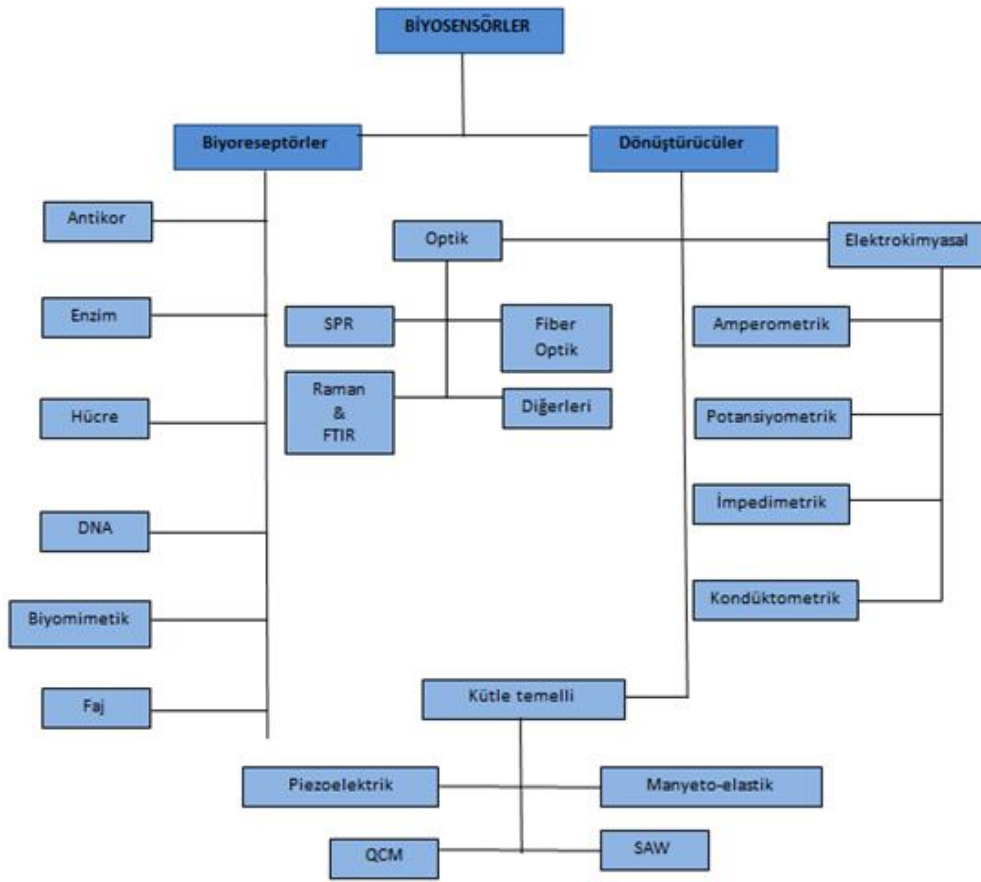
İletkensele Dönüştürücüler: Solüsyon iletkenliğindeki değişimler ile bir reaksiyonun hızı belirlenebilir. Oluşan iyonların yaptığı hareket sonucunda, solüsyon iletkenliğindeki değişimi baz alan bu teknik, birçok enzim ilişkili reaksiyon hızının ölçülmesinde kullanılmaktadır.

Elektrik Kapasitans Dönüştürücüleri: Kapasitans ölçüm yöntemi ile iki farklı elektrotlu levha üzerine antikorlar immobilize edildiğinde, bir antijen-antikor reaksiyonu oluştuğunda, iki levha arasındaki ortamın dielektrik sabitesinde oluşan değişim ölçülür.

Termometrik Dönüştürücüler: Biyotanıma reaksiyonları sırasında ortam ısısındaki değişimin ölçülmesi ile analit tayini yapılır.

FET (Field Effect Transistors: Alan Etkili Transistörler) Tipi Dönüştürücüler: İyon konsantrasyonundaki değişimi algılayan dönüştürücülerdir.

Optik Dönüştürücüler: Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayılımı sonucunda oluşur. Optik esaslı sensörler temelde absorpsiyon, floresans ya da biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde çalışır.



Şekil 1.10. Biyosensörlerde kullanılan dönüştürücüler

1.6.1.4. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Tıp: Metabolitlerin ölçülmesi, kanser belirteç tayini, klinik teşhis, insülin eksikliği belirtilerinin ölçülmesi, bakteriyel ve viral teşhis kitlerinin hazırlanması, ilaç üretimi, hastane koşullarının gözlenmesi, yapay pankreasın çalışma koşullarının kontrolünde kullanılmaktadır [170, 179, 180].

Endüstri: Endüstriyel süreçlerin kontrolü; biyoreaktör kontrolü, giren hammadde ve çıkan ürünlerin ölçülmesi, gıdalarda kalite kontrolü, endüstriyel atık su denetimi, tarım ve veterinerlikte tanı ve kalite kontrolünde kullanılmaktadır.

Çevresel Denetim: Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından hava ve su düzenli olarak tahlil edilmektedir [173].

Savunma Sanayisi: Herhangi biyolojik terör ve saldırı sonrasında erken tespit ve analiz için kullanılmaktadır.

1.6.2. PSA İçin Biyosensör Uygulamaları

1.6.2.1. İşaretleyici Temelli Sinyal Transdüksiyonu

Floresans İşaretleyiciler: Kuantum dot'lar ve luminofor içeren nanopartiküller gibi floresans nanopartiküller yüksek foto-stabilite ve dar emisyon piklerinden dolayı, biyosensör çalışmalarında özellikle tercih edilmektedir. Öropiyum (III) ve terbiyum (III)-içeren floresans polistiren ve zirkonyum nanopartikülleri PSA tayini için (< 1 pg/mL) kullanılmıştır [181-184].

Yüzey arttırımlı Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy-SERS): Floresans işaretlemeye alternatif olarak biyosensörlerde kullanılan bir yöntemdir. Raman boyları, altın nanopartikül problemlere tutturulmuş olan antikorları işaretlemek için kullanılır. Raman raporör molekülü (RRM)'nden saçılan ışık, molekülün vibrasyonel kuantum durumu hakkında bilgi verir. SERS, sandviç immuno-analiz formatında PSA tayini için kullanılmıştır (1 pg/mL) [185].

DNA işaretleyicileri: DNA işaretleyicileri uzun yıllardır biyosensörlerde sinyal güçlendirilmesi için kullanılmaktadır. Özellikle çoklu analit tayin sistemlerinde yüksek potansiyelleri vardır [167].

1.6.2.2. Elektrokimyasal Sinyal Transdüksiyonu

Elektrokimyasal cihazlar, ucuz, kolay ve hatasız bir platform sundukları için hedef analit ölçümünde, biyosensör alanında oldukça dikkat çekmektedir [186]. Elektrokimyasal sensörler, özgül bir biyotanıma reaksiyonu ile oluşan potansiyelde, akımda, kapasitansta, iletkenlikte ve dirençte oluşan değişiklik yolu ile analit miktarını tayin eder.

Kapasitans temelli PSA tayini için geliştirilen elektrokimyasal sensörde, elektrokimyasal çevirici pH'ya hassas bir polimer tabakası ile kaplanmıştır [187]. Böylece ortamdaki PSA'nın immobilize anti-PSA antikoruyla bağlanması ve anti-PSA antikoru-üreaz konjugatının, üreaz hidrolizini kataliz etmesi amonyak oluşumuna neden olur. Böylece reaksiyon çözeltisinin pH'sının artması yolu ile 10 ng/mL hassasiyette PSA tayini yapılmıştır. Dayanıklı ve ucuz olan bu sistemin

diğer bir avantajı, 11 µL örneğin sisteme yüklenmesinden ibaret olan tek bir manuel işlem gerektirmesidir.

Amperometrik biyosensörler, genellikle bir enzim işaretleyici ile üretilen elektrokimyasal olarak aktif bir tür ile işaretli akımın ölçülmesi prensibine göre çalışır. Enzim işaretleyicilerinin (etiketlerinin) amperometrik tayini, direnç ve kapasitans ölçümlerinden daha yüksek hassasiyete sahiptir ve bu sensörlerin üretilmesi ucuz ve kolaydır. PSA'nın amperometrik biyosensör ile tayini 1995'lere uzanmaktadır [188]. Bu dönemde, PSA'nın 0.25 ng/mL hassasiyette tayin edildiği, 3 elektrot sisteminden oluşan amperometrik sensör geliştirilmiştir [189].

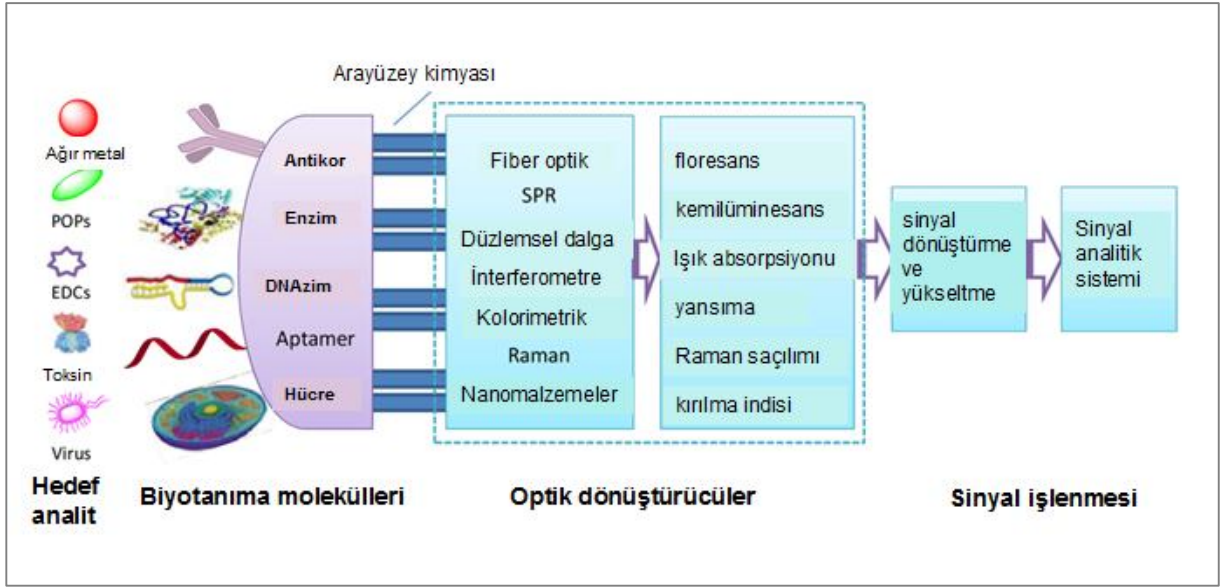
1.6.2.3. Elektriksel ve Elektromekanik Sinyal Transdüksiyonu

Nano temelli analiz yöntemleri hem dayanıklı ve ucuzdur hem de örnek hazırlama ve işaretleme basamaklarını elimine edeceği için önemlidir.

Mikro-destekli (Micro-cantilever) biyosensörler, sensör yüzeyi üzerindeki hedef analitin varlığını tayin etmek için bir işaretleyiciye ihtiyaç duymadan, modifiye edilmemiş örneklerle, eş-zamanlı ölçüme imkan verirler. Mikroterazi yöntemi ile, Kim ve ark.'ları [190, 191] anti-PSA antikoru immobilize edilmiş mikro-terazi (mikro-cantilever) yüzeyine PSA bağlandığı zaman oluşan rezonans frekansındaki değişimi elektriksel olarak ölçerek PSA'yı 10 pg/mL hassasiyetinde tayin etmişlerdir. Fakat mikroterazi yöntemi, ortamın viskozitesindeki değişimlerden dolayı, rezonans frekansında istenmeyen değişimlere ve sıvı ortamda cantilever'ın nemlenmesine neden olabilir. Ancak yine de mikroterazi teknolojisi, portatif biyosensör sistemlerine oldukça uygunluk gösterir; çünkü kolay, hassas, özgül, ucuz, işaretleme gerektirmeyen bir yöntemdir. Ayrıca bu sensörler, çoklu analitlerin eş-zamanlı ölçümü için de oldukça hassas bir yöntemdir [192].

1.6.2.4. İşaretleyici Kullanımını Gerektirmeyen Sinyal Transdüksiyonu

İşaretleyici kullanımını gerektirmeyen (label-free) transdüksiyon yöntemlerini kullanan biyosensörler, sensör yüzeyi üzerindeki hedef analitin varlığını tespit etmek için raportör molekül kullanımını gerektirmezler. Böylece, eş-zamanlı ölçüme olanak sağlarlar.



Şekil 1.11. Optik dönüştürücü temelli biyosensörlerin çalışma prensibi

1.7. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörleri

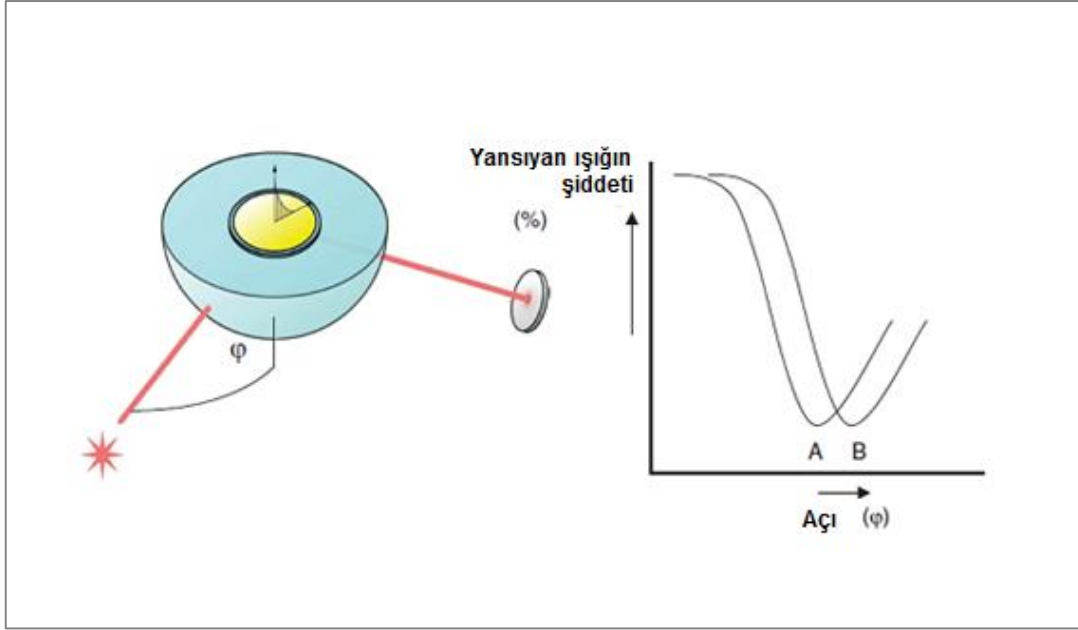
1.7.1. Yüzey Plazmon Rezonans Nedir?

1902 yılında Wood [193, 194] tarafından ilk kez gözlemlenmesinden sonra, yüzey plazmon rezonansın fiziksel olgusu hassas dedektörlerde, pratik uygulamalarda yerini bulmuştur. Wood, polarize ışığı ayna üzerinden yansıttığı zaman, yansıyan ışıkta koyulu-açıklı anormal bant motifleri gözlemlenmiştir. Bu olgunun fiziksel olarak yorumlanması, Lord Rayleigh [195] tarafından başlatılmış, daha sonra Fano [196] tarafından belirginleştirilmiştir. Ancak tamamen açığa kavuşturulması, 1968 yılında Otto [197] ve yine aynı yıl Kretschmann ve Raether [198] tarafından yüzey plazmonlarının uyarılması yayınlanana kadar mümkün olmamıştır. SPR temelli sensörlerin biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesi için uygulanması ilk kez 1983 yılında Liedberg ve ark.'ları [199] tarafından başlatılmıştır. Yüzey plazmonlarının uyarılması aşağıda basit bir örnek üzerinden açıklanmaktadır:

Şekil 1.12'deki deneysel şemaya göre; polarize ışık, yüzeyinde ince bir metal film ile kaplı bir sensör çipi üzerinden, bir prizma aracılığı ile yansıtıldığı zaman, ışık, ayna görevi gören metal film tarafından yansıtılır. Geliş açısı (angle of incidence) değiştirildiğinde ve yansıyan ışığın şiddeti gözlemlendiğinde, yansıyan ışığın bir

minimum üzerinden yansıdığı görülür. Bu geliş açısında, ışık yüzey plazmonlarını uyarır, bu da yansıyan ışığın şiddetinde bir düşüş oluşturur. P-polarize ışığın fotonları, serbest elektronların dalga benzeri salınımını indükleyerek ve böylece yansıyan ışığın şiddetini düşürerek, metal tabakanın serbest elektronları ile etkileşime girebilir [200].

Yansıyan ışığın şiddetinin maksimum olarak kaydedildiği açı, rezonans açısı veya SPR açısı olarak adlandırılır. SPR açısı sistemin optik özelliklerine bağlıdır; metalin her iki tarafındaki ortamın kırılma indisleri gibi. Prizma bölgesindeki kırılma indisi değişmezken, metal yüzeyin temas ettiği ortamdaki kırılma indisi yüzeye kütle birikimi (örn; protein adsorpsiyonu) oldukça değişecektir. Böylece yüzey plazmon rezonans koşulları değişir ve SPR açısı yüzey üzerindeki kinetik (örn; protein adsorpsiyonu) hakkında bilgi verecek şekilde uygun pozisyon alır.



Şekil 1.12. Yüzey plazmon rezonans oluşumunun şematik gösterimi

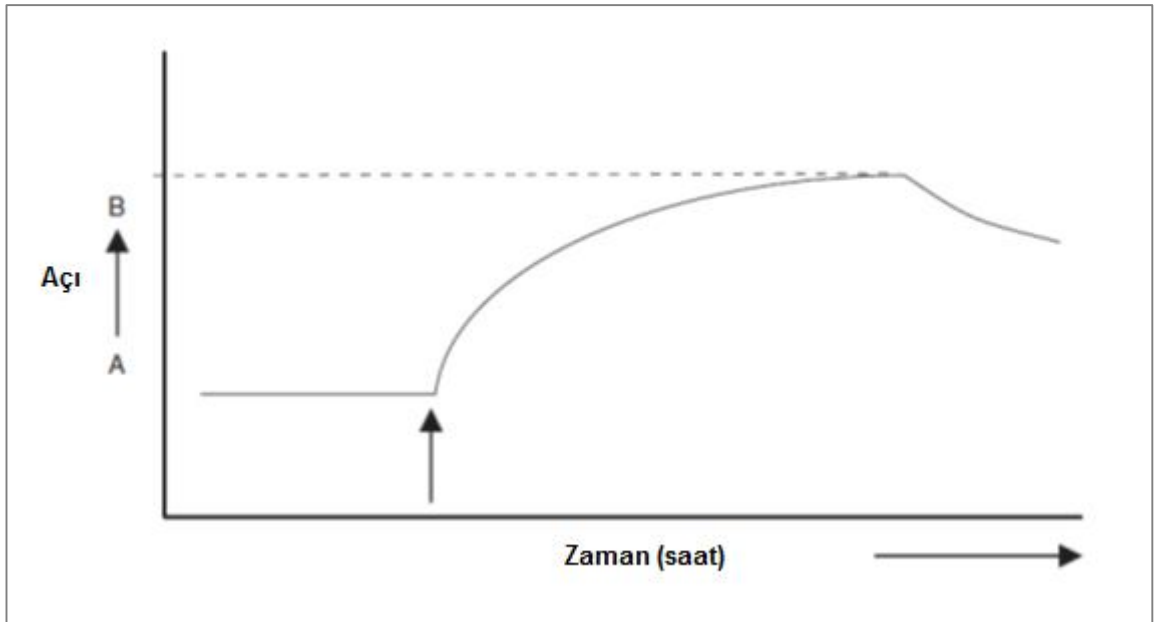
1.7.2. Dip Noktasından Eş-Zamanlı Ölçüme

Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeyin yakın çevresindeki kırılma indisindeki değişiklikleri gözlemek için mükemmel bir yöntemdir. Kırılma indisi değiştiği zaman, minimum şiddetin ölçüldüğü açı değeri Şekil 1.13'de gösterildiği gibi kayacaktır; (A) açı değerine karşılık yansıyan ışığın şiddetinin orijinal eğrisi, (B) kırılma indisinde değişim sonrasında gözlenen eğri. Yüzey plazmon rezonans

sadece bu iki durum arasındaki farkı ölçmek için kullanılmaz, eğer minimum değerinin gözlemlendiği rezonans açısının zamana karşı kayma değeri takip edilirse, zamana karşı olan değişimi gözlemlemek için de kullanılır. Şekil 1.13 zamana karşı SPR açı değerindeki kaymayı göstermektedir. Bu grafiğe sensorgram denilmektedir. Eğer bu değişim biyomoleküler bir etkileşime bağlı olarak olursa, etkileşimin kinetiği eş zamanlı olarak çalışılabilir.

SPR sensörleri, metal yüzeydeki sadece sınırlı bir mesafeyi ya da sabit bir hacmi incelemeye uygundur. Tipik olarak elektromanyetik alanın nüfuz etme derinliği (evanescent field) birkaç yüz nanometreyi aşmamaktadır. Sensör yüzeyindeki metal tabaka üzerindeki kalınlık arttıkça, sinyal eksponansiyel olarak azalmaktadır.

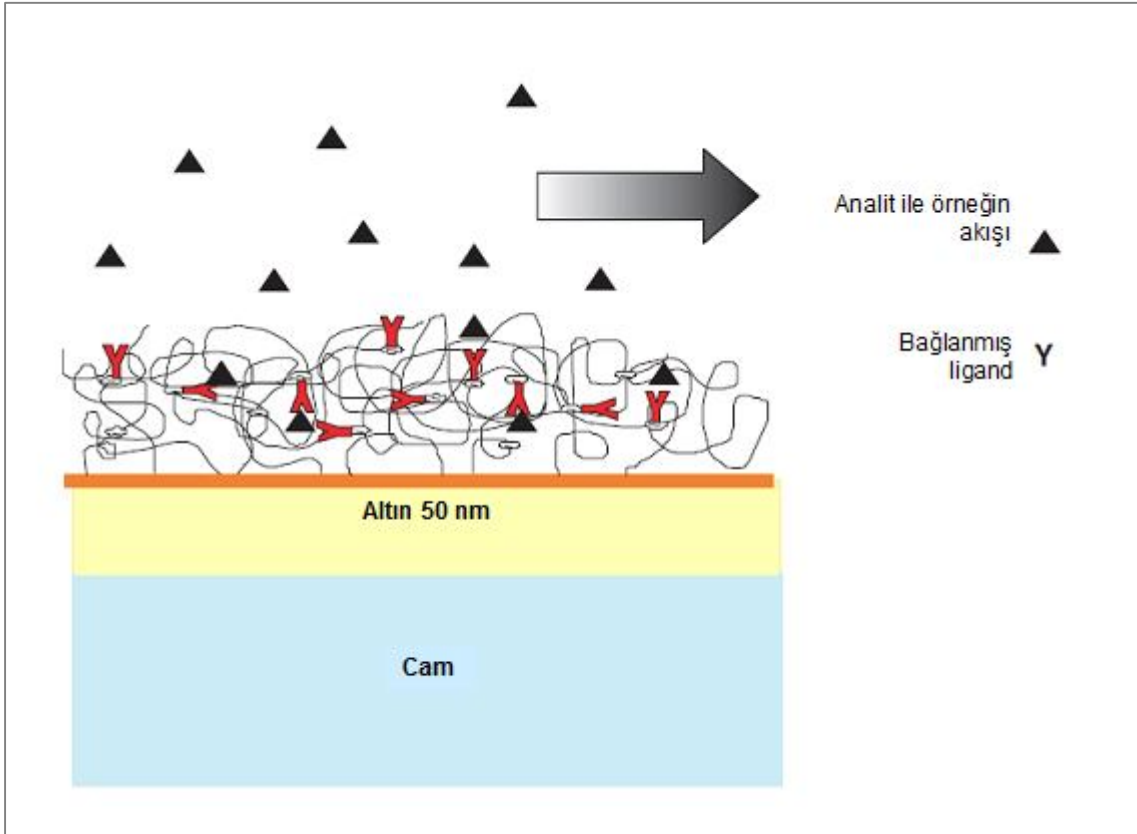
SPR sensörleri intrinsik seçicilikten yoksundurlar. Tüm kırılma indisi değişiklikleri sinyaldeki değişim olarak yansımaktadır. Bu değişiklikler, ortamın kırılma indisindeki değişimden dolayı olabilir, tampon bileşimindeki veya tampon derişimindeki değişimden dolayı olabilir ya da sensör yüzeyi üzerine madde adsorpsiyonu kırılma indisinde değişim yaratabilir. Adsorplanan madde miktarı, Şekil 1.13'de görüldüğü gibi orijinal baz çizgisi (baseline) tamponunun enjeksiyonundan sonra belirlenebilir. SPR ile seçici bir tayin yapabilmek için, sensör yüzeyinin, hedef bileşeni seçici olarak tanıyabilecek fakat örnek içindeki veya tampon ortamındaki mevcut diğer bileşenlerin hiçbirine afinitesi olmayan ligandlar ile modifiye edilmesi gerekir.



Şekil 1.13. Zamana karşı SPR açısının değişimini gösteren sensorgram

1.7.3. Bir SPR Analizinin Basamakları

En basit şekliyle bir SPR ölçümünde, hedef bileşen veya analit, tanıyan eleman veya ligand tarafından tanınır (Şekil 1.14). Ligand, ölçüm öncesinde sensör yüzeyi üzerine çeşitli yöntemlerle immobilize edilir. Immobilize edilmiş ligandlar ile birlikte bulunan modifiye edilmiş çeşitli sensör yüzeyleri ticari olarak mevcuttur, birçoğu da sipariş üzerine hazırlanmaktadır.

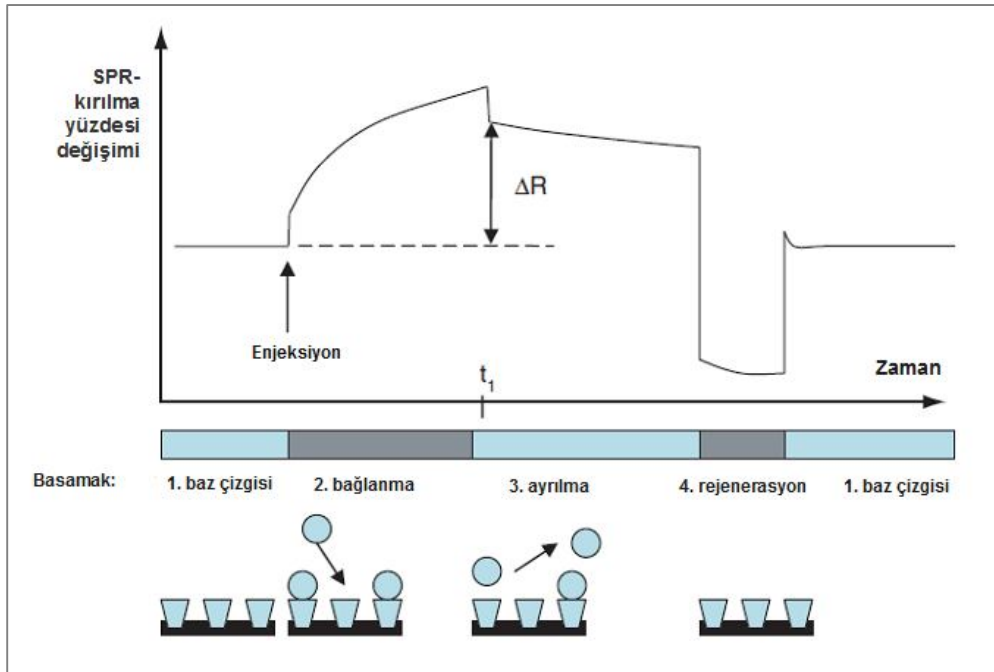


Şekil 1.14. SPR ile doğrudan tayin yönteminin şematik gösterimi

Ligand tarafından analitin tanınması, ölçülebilir bir sinyalin meydana gelmesini sağlar, buna doğrudan ölçüm denir. Şekil 1.15, doğrudan ölçüm yöntemine göre her bir basamakta sensör sinyalindeki değişimi göstererek bir ölçüm döngüsünü özetlemektedir. Her ölçüm, uygun tampon çözeltisiyle sensör yüzeyinin dengelenmesi ile başlar (1). Bu basamak, tanıma olayı gerçekleşmeden önce güvenilir bir baz çizgisi (baseline) elde edebilmek için çok önemlidir. Bu noktada, sensör yüzeyi hedef analiti bağlamaya hazır aktif ligandları içermektedir. Hedef analiti içeren çözelti sisteme enjekte edildiği zaman (2), hedef analit sensör yüzeyi üzerine bağlanır. Ayrıca bu sırada, örnek içindeki diğer bileşenler de ligand

tarafından bir seçim olmadan, non-spesifik olarak yüzeye tutunabilir. Bu bağlanma non-spesifik olduğu için, bağın kırılması da kolaydır. Bu aşamada, analit molekülünün adsorpsiyon kinetiği eş-zamanlı olarak belirlenebilir. Diğer aşamada, sensör yüzeyi üzerindeki özgül olmayan moleküllerin yıkanarak uzaklaştırılması için sisteme tampon çözelti enjekte edilir (3). Şekil 1.15’de görüldüğü gibi, yüzey üzerine biriken madde miktarı SPR cevabından (ΔR) anlaşılır. Ayrıca bu aşamada, analitin ayrılması (dissosiasyonu) da başlar, bu yüzden ayrılma kinetiği de çalışılabilir. Son aşamada, sisteme rejenerasyon çözeltisi enjekte edilir ve analit ile ligand arasındaki özgül bağlanma kırılır (4). Eğer sensör yüzeyi düzgün bir şekilde modifiye edilmişse, hedef analitler yüzeyden uzaklaşırken, ligand yüzey üzerinde kalır. Ligandın aktivitesini engellemeden, bir rejenerasyon çözeltisi ile aynı sensör çipi kullanılarak çoklu testler yapmak, yüzlerce hatta binlerce kez analiz yapmak mümkündür. Son olarak bir sonraki analiz döngüsü için yüzeyi dengelemek için sisteme yeniden tampon enjekte edilir. Eğer rejenerasyon tam anlamıyla yapılmamışsa, yüzeyde hala biriken kütle, baz çizgisi (baseline) seviyesinin bir öncekine göre artmasına neden olur.

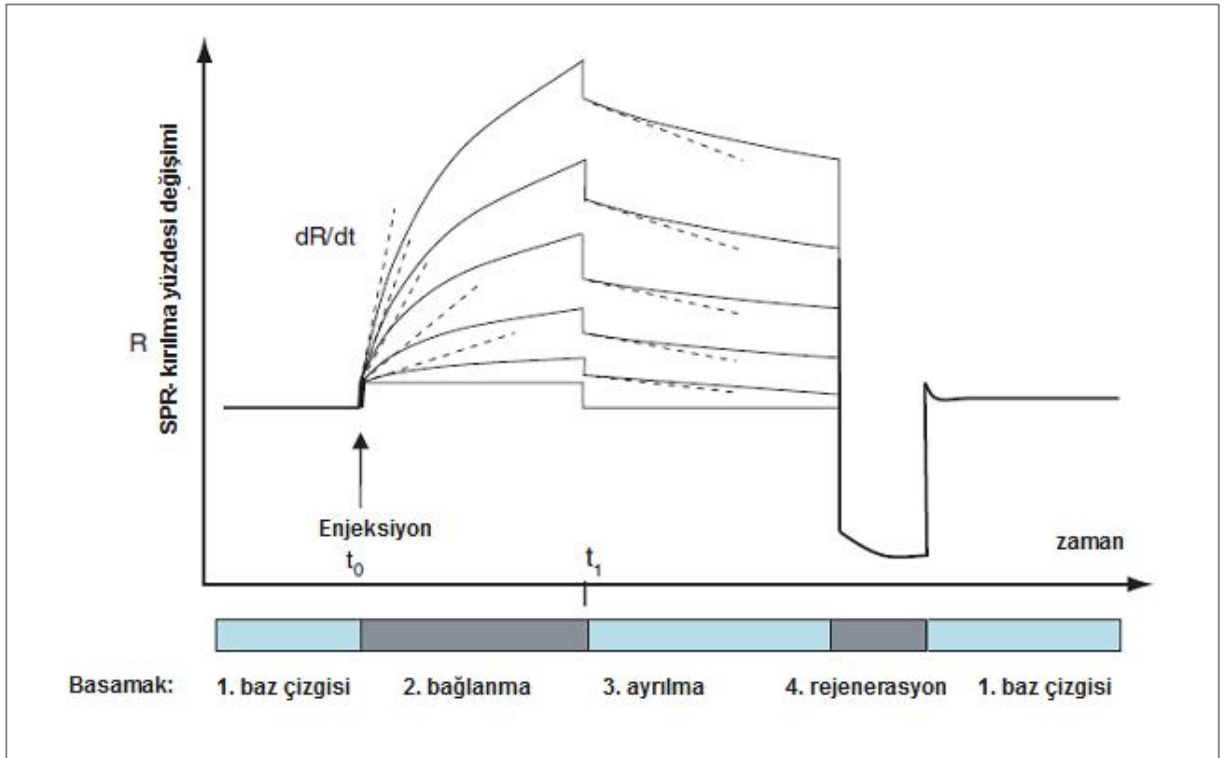
SPR ölçümleri bazen bağlanma sürecinin kinetiğini belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca kinetik ölçümler, termodinamik (sürecin bağlanma enerjisi) hakkında da bilgi verir.



Şekil 1.15. SPR’de bir analiz döngüsünün basamaklarını gösteren sensorgram

1.7.4. Kalibrasyon Grafiği

Kinetik ve termodinamik çalışmalar haricinde, SPR lmleri ayrıca bir örnek içindeki analit derişimini belirlemek için, kantitatif analizler için de kullanılır. Bu durumda ilk önce, farklı derişimdeki analit zeltelerinin her biri farklı analiz döngülerinde çalışılır. Farklı derişimlerden elde edilen sensorgramlar st üste çakıştırıldığında, şekil 1.16'daki gibi bağlanma (assosiasyon) basamağının plato değeri artan analit derişimi ile artacak şekilde bir görüntü sergiler [201].

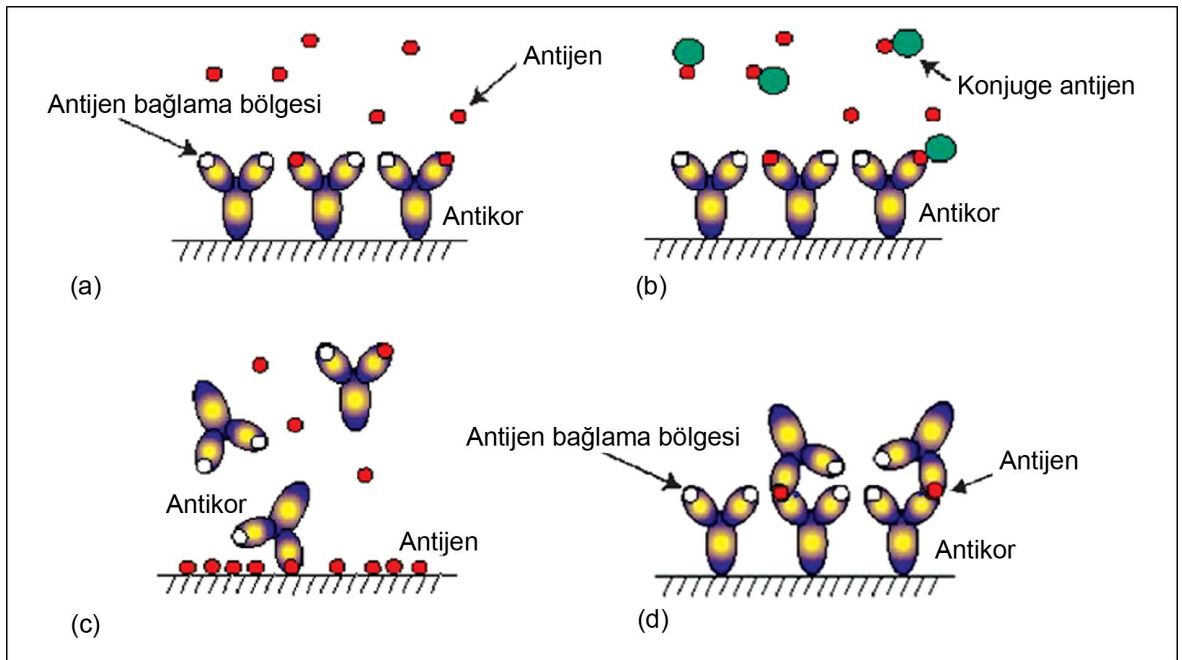


şekil 1.16. Farklı derişimdeki analit zeltelerinden elde edilen sensorgramların st üste çakıştırılmış görüntüsü

Kalibrasyon grafiği, belli bir zaman aralığından sonra derişime karşılık SPR cevabına (ΔR) göre oluşturulur. Bilinmeyen analit derişimi içeren örnekler analiz edilirken, genellikle çoklu seyreltmeler (rn; 10, 100, 1000 kez) yapılır ya da daha kesin sonuçlar için sulandırma faktörü 2 olacak şekilde seri sulandırma yapılır. Eğer rnek içindeki analit derişimi çok yüksekse, sulandırılmamış örnek, kalibrasyon eğrisinin en st plato aralığının çok üstünde sonuç verir. Fakat sulandırılmış zelteler, kalibrasyon eğrisinin aralığında herhangi bir yerde sonuç verecektir ve böylece analitin derişimi belirlenebilecektir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, SPR ölçümü sensör yüzeyindeki kırılma indisi tayini demektir. Bu da pratikte sensör yüzeyinde biriken madde miktarına çevrilir. Doğrudan ölçüm ancak analitin ligand tarafından tanınması, kırılma indisinde ölçülebilir bir değişim oluşturabiliyor ise mümkündür. Bu durum analitin molekül ağırlığı yüksek ise (M.A: 1000 Da veya daha yüksek) kolaydır. Fakat küçük moleküllerin ölçülebilir bir kırılma indisi değişimi oluşturabilmesi için, analitin derişiminin yüksek olması gerekir, bu da analizin hassasiyetini düşürecektir. Genellikle analit küçük bir molekül ise ($M.A < 1000$ Da), doğrudan ölçüm genellikle pek mümkün değildir.

Küçük moleküllerin tayini için genellikle farklı bir strateji izlenir. Küçük moleküller genellikle sandviç, yarışmacı veya inhibisyon analiz yöntemleri ile tayin edilir. Tüm analiz yöntemlerinde, sadece tayin edilebilecek en düşük analit derişimi sınırlı değildir, ayrıca sensör yüzeyi üzerine immobilize edilecek ligandın fiziksel sayısı da sınırlıdır.



Şekil 1.17. SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemleri (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi, (d) sandviç ölçüm yöntemi

1.7.5. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

SPR biyosensör teknolojisi kullanarak doğrudan tayinin en büyük yararı, (biyo)moleküler etkileşimlerin kinetiğinin belirlenmesidir. Reaksiyon hızı ve etkileşimlerin denge sabitleri belirlenebilir. Örneğin, $A+B \longrightarrow AB$ etkileşimi SPR teknolojisi ile eş zamanlı olarak takip edilebilir (A: analit, B: sensör yüzeyi üzerine immobilize edilmiş ligand).

Çizelge 1.1’de $A+B \longrightarrow AB$ eşitliği için bağlanma (assosiasyon) ve ayrılma (dissosiasyon) sabitleri gösterilmektedir. Assosiasyon sabiti, kompleks (AB) oluşumunun reaksiyon hızıdır, yani A ve B’nin birim konsantrasyonunda, belli bir zaman için oluşan kompleks (AB) sayısıdır. AB kompleksi oluşur oluşmaz dissosiasyon başlayabilir. Dissosiasyon hız sabiti de her birim zaman için dissosiyen AB kompleksi sayısını ifade eder.

Çizelge 1.1. En sık kullanılan kinetik parametreler: assosiasyon ve dissosiasyon sabitleri

	Assosiasyon hız sabiti, k_a	Dissosiasyon hız sabiti, k_d
Tanım	$A+B \longrightarrow AB$	$AB \longrightarrow A+B$
Açıklama	AB oluşumunun reaksiyon hızı: A ve B’nin birim konsantrasyonunda, birim zamanda oluşan AB kompleksi sayısı	AB kompleksinin dissosiasyon hızı: Birim zamanda dissosiyen AB kompleksi sayısı
Birim	$L\ mol^{-1}s^{-1}$	s^{-1}
Aralık	10^3-10^7	$10^{-1}-5 \times 10^{-6}$

Assosiasyon ve dissosiasyon hızları için birim ölçütleri farklıdır ve kompleksin stokiyometrisi ile değişiklik gösterebilir. Assosiasyon ve dissosiasyon sabitlerinin tipik aralığı geniş varyasyon gösterir ve birçok faktör yanında sıcaklığa bağlıdır.

A ve B’nin assosiasyonu başladığı zaman, henüz sensör yüzeyinde bir ürün yoktur. Bu noktada, assosiasyon reaksiyon hızı en yüksek iken, dissosiasyon reaksiyon hızı en düşüktür. Süreç ilerledikçe, gitgide daha fazla AB kompleksi

oluşur, böylece dissosiasyon hızı artar. Azalan A ve B derişimine bağı olarak, assosiasyon hızının azalması beklenir. Assosiasyon ve dissosiasyon hızları eşitlendiğı zaman, dengeye ulaşılır (Çizelge 1.2). Çizelgeden de görüldüğü gibi, denge assosiasyon ve dissosiasyon sabitleri, bir etkileşimin afinitesini gösterir ve birbiriyle ters ilişki içindedir.

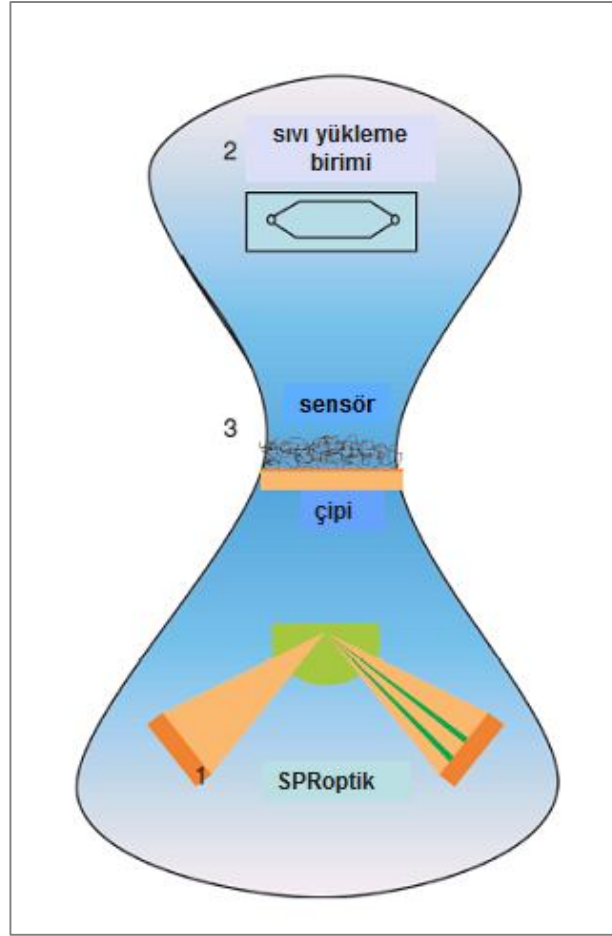
Çizelge 1.2. Denge assosiasyon ve dissosiasyon sabitleri

	Denge assosiasyon sabiti, K_A	Denge dissosiasyon sabiti, K_D
Tanım	$[AB]/[A][B]=k_s/k_d$	$[A][B]/[AB]=k_d/k_s$
Açıklama	Assosiasyona olan afinite: yüksek K_A , assosiyeye olma afinitesi yüksek	AB kompleksinin stabilitesi: yüksek K_D , AB kompleksinin stabilitesi az
Birim	$L\ mol^{-1}$	$mol\ L^{-1}$
Aralık	10^5-10^{12}	$10^{-5} \times 10^{-12}$

Biyomoleküler etkileşimlerin hız sabitleri (Çizelge 1.1) ve denge sabitleri (Çizelge 1.2) assosiasyonun kuvveti ve dissosiasyonun eğilimi hakkında bilgi verir.

1.7.6. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi

SPR kullanarak biyomoleküler etkileşimleri incelemek, fiziksel olgunun detaylı olarak anlaşılmasını gerektirmemektedir. SPR temelli cihazların sensör yüzeyi yakınındaki (yüzeye yaklaşık 200 nm kalınlıkta) kırılma indisini ölçmek için optik bir yöntem kullanan cihazlar olduğunu bilmek yeterlidir. SPR cihazları bir sisteme entegre olmuş 3 temel birimden oluşur: optik birim, sıvı yükleme birimi ve sensör yüzeyi (sensör çipi).



Şekil 1.18. SPR sisteminde 3 ana birimin şematik gösterimi: (1) optik birim, (2) sıvı yükleme birimi, (3) sensör çipi

Sensör çipinin özellikleri, ölçülen etkileşimin kalitesi üzerinde çok büyük öneme sahiptir. Sensör çipi, optik birim (kuru bölüm) ve akış hücresi (sıvı bölüm) arasında fiziksel bir bariyer oluşturur.

SPR cihazları SPR açısındaki kaymayı ölçmek için, farklı yöntemlerle yapılandırılır. Genellikle yüzey plazmonlarını uyarmak için 3 farklı optik sistem kullanılır: prizma sistemi, grating sistemi ve optik frekans (dalga) sistemi. En sık kullanılan sistem “Kretschmann konfigürasyonu” olarak da bilinen prizma sistemidir [202]. Bu sistem, Şekil 1.18’de görüldüğü gibi p-polarize ışık ile birleştirilmiş bir prizmadan oluşur. Işık dedektör üzerine yansıtılır, ışığın şiddeti dedektör tarafından ölçülür, bu da kamera yardımıyla gözlemlenir. Grating sisteminde [203], ışık en düşük kırılma indisli substratta yansıtılır. Yani,

ellipsometrik cihazlarda olduğu gibi fotonlar yüzey plazmon dalgaları oluşturmada önce, ışık, sıvı boyunca hareket eder [204]. Bazı cihazlar optik dalgaları kullanırlar veya biyomoleküler etkileşim sürecinin sonucu olarak SPR dalga boyu kaymasını ölçerler [205].

Tüm konfigürasyonlar aynı temel olguya sahiptir; sensör yüzeyindeki kırılma indisindeki değişimi doğrudan, işaretleyici kullanmadan, eş zamanlı ölçmek. SPR sensörleri, düşük derişimdeki kimyasal ve biyolojik molekülleri tayin edebilme yeteneğindedir. Biyomoleküller sensör yüzeyinde biriktiğinde ve arka plandaki elektrolit ile yer değiştirerek kırılma indisini değiştirdiğinde, biyomoleküler bağlanma olayının algısı oluşur.

1.7.7. SPR Biyosensörlerin Tarihçesi

Biyosensör terimi 1975 yıllarında, yüzeydeki biyomoleküllerin doğrudan tayini için dönüştürücü prensibini kullanan cihazlar olarak tanımlanmıştır. Günümüzde biyosensör için en geçerli örnek, seçici, enzimatik bir işlem sonrasında elektronik sinyal olarak glukoz derişimini gösteren glukoz sensörüdür. Bazı tartışmalarda, insan vücudundaki parametreleri (pH, sıcaklık, vb.) rapor etme yeteneğindeki tüm küçük cihazlar biyosensör olarak belirtilmiştir. Günümüzdeki tanıma göre, biyosensörlerde, sensörün tanımadan sorumlu elemanı (biyoreseptör/ligand) veya analitin biyolojik kökenli olması gerekmektedir.

Biyosensörler; bir biyolojik eleman (doku, mikroorganizma, organel, hücre reseptörü, enzim, antikor) ve bir fizikokimyasal dönüştürücüden oluşan cihazlardır. Hedef analit ve biyolojik materyal arasındaki özgül etkileşim, dönüştürücü tarafından algılanan fizikokimyasal bir değişikliğe neden olur. Dönüştürücü birim bu değişikliği, özgül analit ya da analit grubunun miktarı/derişimi ile orantılı olarak analog elektronik sinyale dönüştürür.

1.7.7.1. SPR Biyosensörlerinin Erken Tarihi

SPR temelli sensörlerin, biyomoleküler etkileşimlerin gözlenmesi için kullanımı, ilk kez 1983 yılında Lundstrom [199] önderliğinde, biyomoleküllerin işaretlenmesine gereksinim olmadan, eş zamanlı tayini için fiziksel yöntem olarak kullanılmıştır.

Moleküllerin intrinsik özellikleri [206] (kütle, kırılma indisi ve/veya yük dağılımı, vb.) ellipsometre, refraktometre, yüzey plazmon rezonans, fototermik tayin yöntemleri ve diğer yöntemlerle araştırılmıştır. İsveç Ulusal Savunma Araştırma Laboratuvarı'nda (National Defense Research Lab. of Sweden) elipsometri kullanılarak protein-protein etkileşimleri eş zamanlı olarak, herhangi bir işaretleyici kullanılmadan gözlemlenmiştir. Buradaki temel prensipte, ışık yansıtıcı yüzeydeki kırılma indisi değişimi, dönüştürücü mekanizmasının temelini oluşturmaktaydı. Optik dönüştürücü yüzeyi üzerinde, biyomoleküllerin bağlanmasına bağlı olarak kırılma indisindeki değişimi tayin etmede başarılı olmasına karşın, elipsometrenin bir dezavantajı; ışığın, örneği içeren çözelti içinden geçmesidir. Bu yüzden ışığı absorbe eden veya partikül içeren örnekler bu yöntemle kolaylıkla ölçülemezler.

Aynı dönemde diğer araştırma grupları arasında Twente Üniversitesi (Univ. of Twente, Hollanda) FET cihazlarında ve optik temelli yüzeylerde immünokimyasal reaksiyonları ölçmek için yeni dönüştürücüler üzerinde çalışmaktaydılar [207]. Elipsometre, SPR ve interferometrik prensipleri içeren optik dönüştürücüler [2] ile yaptıkları çalışmalar biyomoleküler etkileşimlerin doğrudan incelenmesinde oldukça iyi sonuçlar vermiştir. SPR kullanarak immünokimyasal reaksiyonların başarılı bir şekilde ölçülmesi 1980'lerin ortalarına denk gelmektedir [208].

Pharmacia Biosensor A.B (Uppsala, İsveç), moleküler etkileşimlerin doğrudan analizi için platform teknolojisi olarak SPR'yi seçmişlerdir. Kretschmann konfigürasyonu, sıvı yükleme sisteminin tasarımı için çok büyük avantaj sağlamıştır. Gümüşün fiziksel açıdan daha iyi SPR etkisi oluşturmaya rağmen, altın SPR için en iyi inert metal olarak seçilmiştir.

Daha sonraki yıllarda yüzey kimyası üzerine yapılan çalışmalar, altının, uzun zincirli tiyollerin oluşturduğu kendiliğinden yönelimli tabaka (self assembling monolayer) ile modifiye edilmesine olanak tanımıştır. Bu modifiye edilmiş yüzeye, biyomoleküllerin etkili bir şekilde kovalent olarak immobilizasyonuna bir substrat olarak olanak sağlayan ve çoğu biyomoleküler etkileşimler için uygun bir ortam hazırlayan karboksile-dekstran immobilize edilmiştir. 100 nm kalınlığındaki dekstran hidrojel, 200 nm'lik nüfuz etme derinliği ile mükemmel uyum göstermiştir. Böylece yüksek kalitede sensör çiplerinin üretimi, SPR cihazlarının başarılı bir şekilde piyasaya sürülmesine muazzam katkı yapmıştır.

Araştırma ve geliştirmedeki çabalar ve optik, mikroakışkan ve yüzey kimyası gibi alanlardaki ilerlemeler biyomoleküler etkileşimlerin analizinin enstrümental konseptinin başarılı bir şekilde gelişmesi ile sonuçlanmıştır.

1.7.7.2. 1990 Yılından Sonra SPR Biosensörlerinin Tarihçesi

1990 yılında Pharmacia Biosensor A.B (Uppsala, İsveç), ilk ticari SPR ürünü olan Biacore’u piyasaya sürmüştür [209]. Geliştirilen bu cihaz, en ileri düzeyde, hassas, güvenilir, hatasız ve yeniden üretilebilir, doğrudan ölçüm yapan biosensör idi ve bu sayede SPR eş zamanlı biyomoleküler etkileşimlerin ölçülmesinde dönüştürücülerin “altın standart”ı oldu. Daha sonra diğeri üreticiler, Biacore tarafından geliştirilen altın standartlara sahip bu cihazı geliştirmek için birbirleriyle yarış içine girmişlerdir [210].

1994 yılında, geliştirilmiş tayin kapasitesi ve farklı bir akış sistemi ile Biacore 2000 cihazı piyasaya sürülmüştür. Bu cihaz ile immobilize edilmiş protein ligandlar ile etkileşime giren küçük molekül ağırlığındaki analitlerin doğrudan etkileşimini incelemek de ayrıca mümkün olmuştur [211].

1995 yılında IBIS Teknoloji (Ibis Technologies, Hollanda) tarafından geliştirilen SPR sistemi, Biacore tarafından üretilen sensör çipleri ile uyumlu idi. 1997 yılında, IBIS II SPR sistemi geliştirilmiştir [212]. 1999 yılında, IBIS Technologies ile sensör çipi kaplama şirketi olan Ssens BV (Hollanda)’nin birleşmesi ile SPR görüntüleme cihazı üretimini IBIS Technologies eline almıştır. 2007 yılında IBIS-iSPR cihazının geliştirilmesi ile çoklu biyomoleküler etkileşimlerin (>500) microarray formatında görüntülenmesi için istenilen güvenilirlik ve doğruluk elde edilmiştir.

1996 yılında Biacore X, 1998 yılında Biacore 3000 geliştirilmiştir [213]. Biacore Q, 2000 yılında gıda analiz pazarında yerini bulmuştur. Biacore S51, tayin kapasitesi, akış hücresi tasarımı ve örnek kapasitesi açısından oldukça gelişmiş bir cihaz idi. 2004 yılında, 4 kanallı ve herbir kanalın 5 adet spot tayin kapasitesinin olduğu Biacore A100 geliştirildi. Cihaz çok üstün özelliklere sahipti, fakat teknoloji yüzeyin görüntülenmesine uygun değildi. 2005 yılında, Applied Biosystems (8500 Affinity Analyzer) ile birlikte geliştirilen, sensör yüzeyini görüntüleme kapasitesine sahip olan HTS-Biosystems, 2006 yılında piyasaya sürülmüştür [203].

İlk SPR sisteminin geliştirilmesinden itibaren geçen sürede, tayin kapasitesi en az 20 kat arttırılmış, artan hassasiyet ve veri analizindeki ilerlemelere bağlı olarak afinite ve kinetik veri aralığı en az 100 kat uzatılmıştır. İlk geliştirilen sensör yüzeyleri 1990 yılında 4 kanallı iken, sonraları IBIS SPR görüntüleme cihazlarında 500'e kadar çıkmıştır. Biyosensör teknolojisindeki başarının en iyi göstergelerinden biri, ticari biyosensörlerden toplanan verilerle her yıl 1000'den fazla yayının basılmasıdır.

Yeni SPR cihazlarının geliştirilmesi ve bir seri yeni sensör yüzeylerinin ve yüzey kimyalarının çalışılmasıyla, moleküler etkileşim çalışmalarında SPR biyosensör etkisi büyümeyi sürdürecektir. SPR görüntüleme cihazları ve ilerlemiş veri analizi metodlarını da içeren ilerlemiş deneysel tasarım ile biyomoleküler etkileşim olgusunun kinetik parametrelerinin belirlenmesi için yüksek kalitede veri elde edilebilir. Bu veriler ise, yaşayan türlerdeki önemli süreçleri açığa çıkarmak için yapılan fonksiyon-düzenleyici protein etkileşim çalışmaları için önemli olan moleküler bağlanma mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli olacaktır [200].

1.8. Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Biyomimetik Sensörlerde Kullanımı

Bir biyosensörün ana merkezinde tanımadan sorumlu, dönüştürücü ile yakın temasta olan biyoreseptör bulunmaktadır. Tanıma elemanı, genellikle kompleks ortamda bulunan analiti özgül olarak tanımadan ve bağlanmadan sorumludur. Dönüştürücü, analitin bağlanması ile oluşan kimyasal sinyali kolaylıkla kantifiye edilebilecek bir çıkış sinyaline dönüştürür. Biyosensörlerde tanıma elemanı olarak antikor, enzim, reseptör, bütün bir hücre gibi biyolojik yapılar kullanılır [214]. Rekombinant antikor [215] ve faj görüntüleme antikor kütüphanelerindeki [216] gelişmeler sayesinde, kendisi için doğal bir reseptörün mevcut olmadığı antikorlar için bile uygun bir tanıma elemanı bulunabilir. Doğal antikorları, daha küçük ve kararlı olan karşılıklarıyla değiştirmek için sürekli atılımlar yapılmaktadır. Genellikle biyomoleküller her ne kadar çevresel uygulamalarda ve kesintisiz süreçlerde biyosensörler için oldukça ilgi çekici olsalar da, kimyasal ve fiziksel stabilite sıkıntıları bunların ekstrem koşullarda kullanımını engellemektedir.

Alternatif bir yaklaşım, hedef moleküle yüksek afinite ve özgüllükte bağlanma özelliğine sahip biyomimetik reseptör sistemlerinin geliştirilmesidir. İnorganik

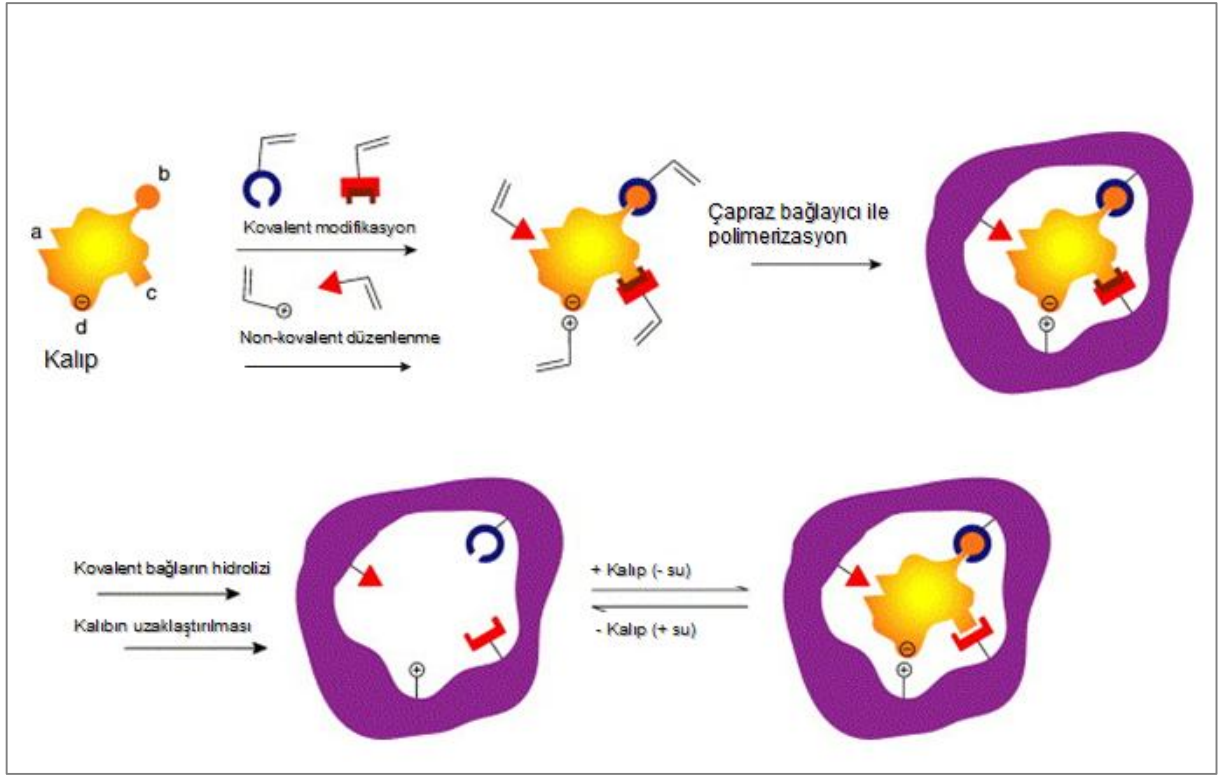
iyonlar, yapay reseptörler gibi küçük hedef moleküller için rasyonel tasarım ve kimyasal sentez yolu [217] ile biyomimetik reseptör tasarımı yapılabilse de, biraz daha büyük ve kompleks bir molekül için bunların tasarımı zordur. Kombinatoriyal kimya ile proteinler için biyomimetik ligand tasarımı veya hedef analit ile kalıplanma yolu ile özel hazırlanmış reseptör tasarımı gibi diğer yöntemler tercih edilebilir. Diğer bir teknik ise, sentetik polimerlerde moleküler baskılama tekniğidir. Baskılama süreci sırasında oluşturulan bağlanma bölgeleri, antikor-antijen sistemlerindeki gibi afinite ve özgüllüğe sahiptir, bu yüzden moleküler baskılanmış malzemeler, “antikor mimikleri” olarak da bilinir [218]. Bu yapılar, sensör teknolojisinde doğal antikorlara kıyasla ciddi avantajlara sahiptir. Bunlar:

- Yüksek oranda çapraz bağlı polimerik yapıları gereği, oldukça kararlı ve dayanıklıdır. Bu durum bu malzemelerin ekstrem koşullarda (yüksek sıcaklık ve basınç, organik çözücülerde, asit-baz varlığında) kullanımını kolaylaştırır.
- Bu malzemelerin üretimi ucuzdur.
- Uzun vadede, oda sıcaklığında, kuru bir fazda muhafaza edilebilirler.

1.8.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

1.8.1.1. Temel Prensipler

Sentetik polimerlerin moleküler baskılanması, bir moleküler kalıp olarak görev yapan hedef analitin (kalıp molekülün) varlığında, fonksiyonel ve çapraz bağlayıcı monomerlerin ko-polimerizasyonu sürecidir. Başlangıçta, fonksiyonel monomerler kalıp molekül ile bir kompleks oluşturur. Polimerizasyonu takiben kalıp molekülün sahip olduğu fonksiyonel gruplar, yüksek oranda çapraz bağlı polimerik yapı içinde tutulur. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması, analite boyut, şekil bakımından komplementer bağlanma bölgelerinin açığa çıkmasına neden olur. Bu şekilde, polimerde bir moleküler hafıza oluşturulur, daha sonraki uygulamalarda analit bu hafıza tarafından yüksek özgüllükle yeniden tanınır [214].



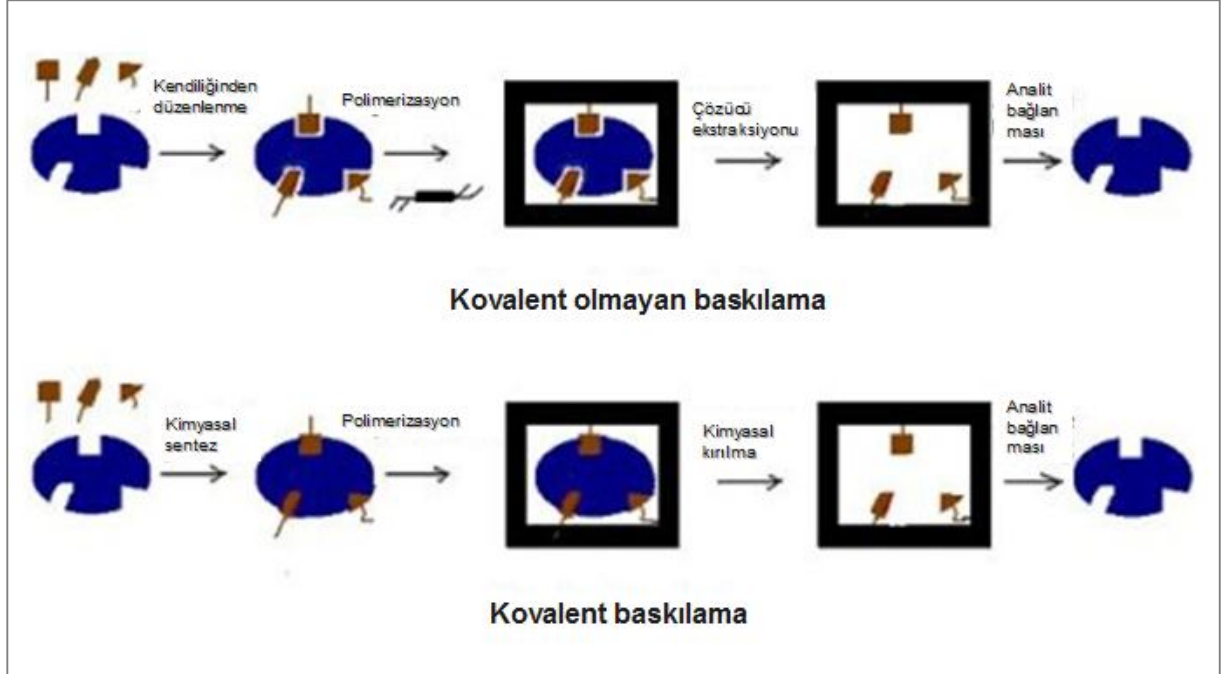
Şekil 1.19. Moleküler baskılama yöntemi

Şekil 1.19’da görüldüğü gibi, moleküler baskılama için iki yöntem mevcuttur:

- Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında ön-polimerizasyon kompleksi kovalent olmayan etkileşimler (self-assembly) yolu ile oluşur.
- Monomerler kalıp moleküle kovalent olarak bağlanabilir, böylece kalıp molekülün polimerize olabilen bir türevi sentezlenmiş olur.

Kovalent bağların yüksek kararlılığı nedeniyle, kovalent baskılama bağlanma bölgelerinin daha homojen olmasına neden olur. Ayrıca baskılanan moleküle karşılık gelen bağlanma bölgesi sayısı, verim açısından kovalent olmayan baskılamaya göre daha fazladır [219]. Bu yaklaşım ilk olarak Wulff ve ark.’ları [220] tarafından geliştirilmiştir. Diğer yandan Mosbach ve ark.’ları [221] tarafından geliştirilen kovalent olmayan baskılama, fonksiyonel monomer, kalıp molekül ve baskılanan malzemelerin kullanım alanı bakımından seçimde daha esnektir. Ayrıca doğal süreçlere de daha yakındır, çünkü doğadaki biyomoleküler etkileşimlerin çoğu non-kovalenttir. Ayrıca kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajlarını birleştiren hibrit protokoller de mevcuttur. Bu yöntemde,

kalıp molekülün yapıya yeniden bağlanması sırasında, kalıp molekül, polimer ile kovalent olmayan etkileşimler yolu ile etkileşime girer [222].



Şekil 1.20. Moleküler baskılama için iki yöntem; kovalent ve kovalent olmayan baskılama

1.8.1.2. Baskılanan Polimerlerin Fiziksel Formları

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), istenen son uygulamaya uygun olacak şekilde çeşitli fiziksel formlarda sentezlenebilir. Bu polimerlerin büyük kısmı, sentezde diğer organik polimerler ve silika da kullanılıyor olmasına rağmen, vinil veya akrilik grup taşıyan çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomerlerden, radikal polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen organik polimer temellidir. Vinil ve akrilik polimerlerin popüleritesinin bir nedeni, mevcut fonksiyonel monomerlerin geniş seçim aralığıdır. Bunlar pozitif veya negatif yüklü olabilirler, H^+ bağı veya metal koordinasyonu oluşturabilirler, ya da hidrofobik olabilirler. Genellikle polimerizasyon karışımı inert bir çözücü içerir, bu durum sadece tüm polimerizasyon içeriğinin çözünmesi açısından değil, ayrıca kalıp molekülün kolay elüsyonu ve analitin baskılanmış bölgelere kolay ulaşımı için oldukça önemli olan yüksek gözenekli yapının oluşması açısından da gereklidir. Kalıp molekülün

polimerizasyon öncesinde katı bir destek üzerine immobilizasyonu söz konusu ise, çözücü kullanımına gerek kalmamaktadır [223].

MIP'ler çözücü polimerizasyonu ile hazırlandıktan sonra, monolitik bloğun mekanik olarak öğütülmesi, mikrometre çapında küçük partiküllerin oluşmasını sağlar. Alternatif olarak, partiküller istenen çapta, kontrollü olarak küre şeklinde de hazırlanabilir [224-226]. İkili faz sisteminde, su yerine sürekli faz olarak sıvı perflorokarbonların kullanımı tercih edilmektedir. Çünkü su, kalıp molekül ve monomer arasındaki non-kovalent komplekse zarar verici etkiye bulunabilir [225]. Bu yolla sentezlenen kürelere demir oksit partiküllerinin ilavesi ile manyetik özellik kazandırılabilir [227]. Manyetik öğütme işlemine gerek duyulmadan baskılanmış malzemelerin hazırlanması için biraz daha kolay bir yöntem, dispersiyon polimerizasyonudur. Eğer sistem yeteri kadar sulandırılmış ise, bu yöntemle küre formunda, eş-boyutlu mikroküre agregatları hazırlanabilir [228]. Bazı uygulamalar için, polimerizasyon işlemi doğrudan bir kromatografi kolonu [229, 230] veya kapiller [231] içinde de gerçekleştirilebilir. Ayrıca, sensör uygulamaları için de uygun bir format olarak, baskılanmış membranlar hazırlanabilir. Bunlar, analit varlığında lineer polimerlerin çözeltiden çöktürülmesi yolu ile veya inert katı bir membranın porlarından baskılanmış polimer kalıbının dökülmesi ile ince, çapraz bağlı, baskılanmış polimerik filmler olarak hazırlanabilir.

1.8.1.3. Kalıp Moleküller ve Uygulamaları

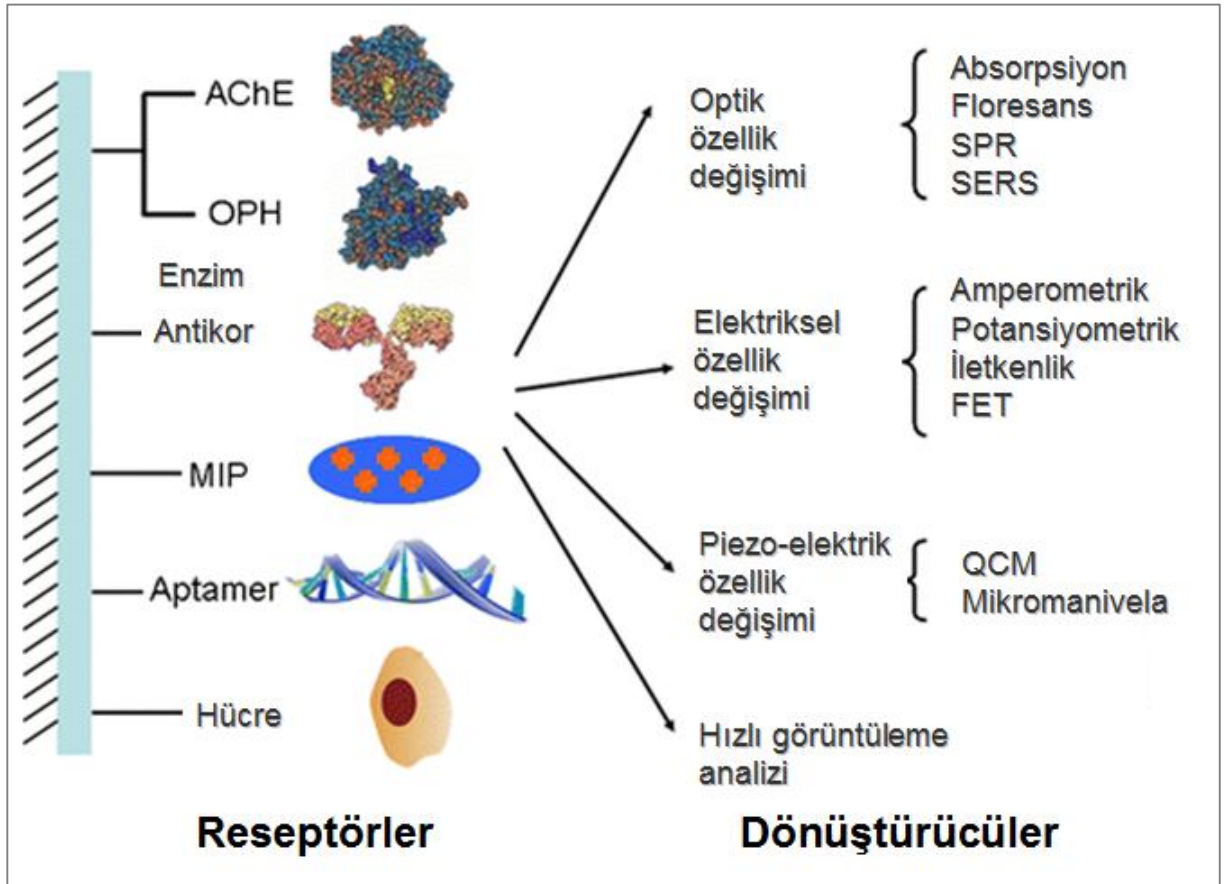
Moleküler baskılama yönteminin en ilgi çekici özelliklerinden biri, çok çeşitli analitlere uygulanabilmesidir. Küçük organik moleküllerin (farmasötikler, pestisitler, amino asitler, nükleotid bazları, steroidler, şekerler) baskılanması kolaydır ve rutin olarak uygulanmaktadır. Biraz daha büyük organik bileşikler (peptidler) benzer yaklaşımlarla baskılanabilir fakat proteinler [232, 233], hücreler [234] için protokoller mevcut olmasına rağmen bu tarz büyük yapıların baskılanması zordur.

Belirli bir hedef analit için optimize bir polimer elde etmek için, MIP sentezine kombinatoriyal yaklaşımlar getirilmiştir. Böylece baskılama reçetesindeki içeriklerin, özellikle de fonksiyonel monomerin molar oranı ve çeşidi, otomatik yöntemler ile çeşitlendirilebilir [235, 236].

MIP'ler çoğunlukla kiral ayrımlarda [237-239], HPLC'de sabit faz olarak kullanılırlar. Ayrıca ince tabaka kromatografisi [240], kapiller elektrokromatografi [231], katı faz ekstraksiyonu [241], immünoassay tarzında bağlanma analizlerinde [218] ve sensörlerde MIP'lerin kullanımı mevcuttur. Kombinasyonel kütüphanelerin görüntülenmesinde de moleküler baskılanmış yapay reseptörlerin kullanım alanı mevcuttur [242].

1.8.2. Sensör Uygulamalarında Moleküler Baskılama Yöntemi

Analit molekülüne bağlı olarak, iki farklı baskılama prosedürü sensör yüzeyi hazırlamak için kullanılmaktadır: yığın baskılama ve yüzey baskılama. Ayrıca MIP nanopartikülleri de artan ilgi oranı ile bu kapsamda kullanılmaktadır [243].

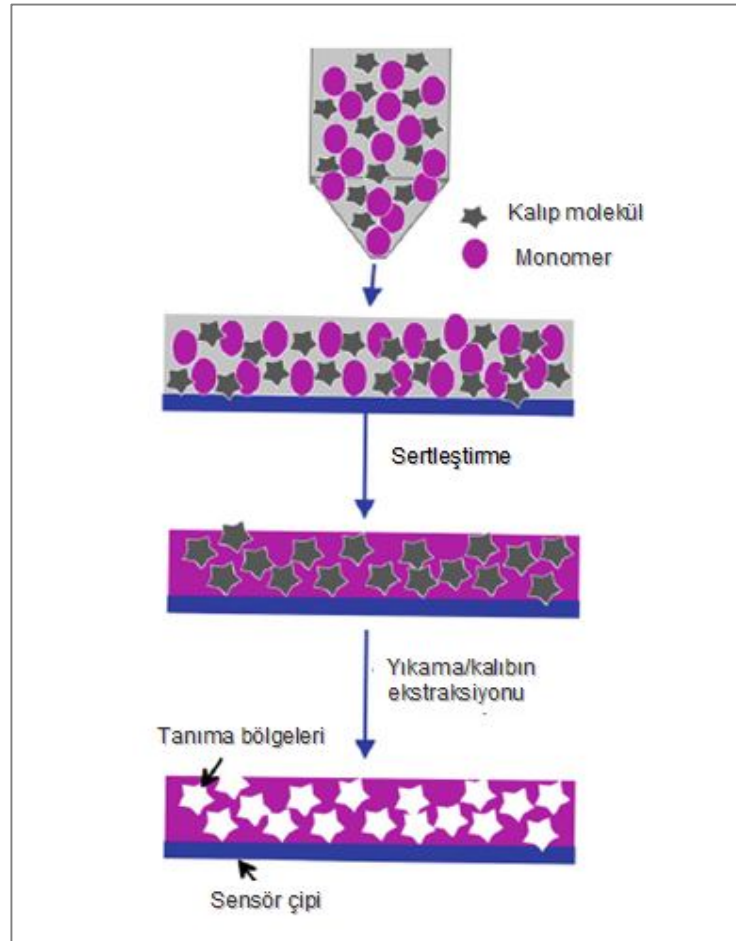


Şekil 1.21. Biyosensörlerde reseptör olarak kullanılan biyomoleküller ve dönüştürücülerin çeşitleri

1.8.2.1. Yığın Baskılama (Bulk Imprinting)

Yığın baskılama genellikle, uçucu organikler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, farmasötik olarak aktif bileşikler, çevresel kirleticiler, vb. gibi birkaç yüz atomik kütle birimine kadar olan moleküller için kullanılmaktadır.

Bu yöntemde, ilgili kalıp molekül polimerizasyon sırasında doğrudan monomer karışımına eklenir. Bu yüzden etkileşim bölgeleri sadece ilgili sensör malzemesinin yüzeyi üzerinde bulunmaz, ayrıca bütün matriks yığınının içinde dağılır, bu yüzden de “yığın baskılama” adını alır. Sonuçta oluşan yüzey, çoğu sadece polimerik matriks içerisindeki difüzyon yolları aracılığı ile erişilebilir olmasına rağmen, oldukça fazla sayıda etkileşim bölgesi içerir. Her ne kadar sensör yüzeyi üzerindeki tabaka yüksekliğine bağlı olarak sensör cevabının uzun olmasına neden olsalar da, küçük analit molekülleri ile çalışılırken gerekli hassasiyeti garanti eden bir yöntemdir. Yığın baskılama yöntemi şematik olarak Şekil 1.22’de gösterilmektedir [243].



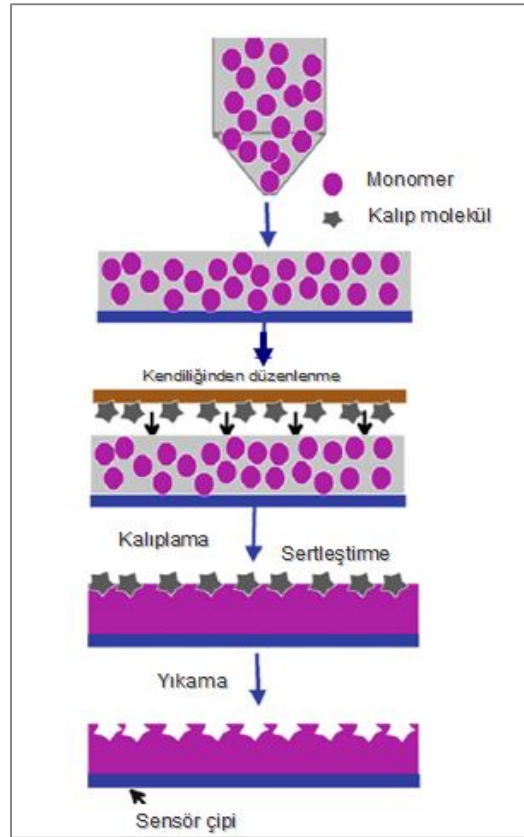
Şekil 1.22. Yığın baskılama yöntemi

1.8.2.2.Yüzey Baskılama (Surface Imprinting)

Proteinler, hücreler veya mikroorganizmalar gibi büyük kalıp yapılar ile çalışırken, yığın baskılamanın birtakım dezavantajları vardır. Bunlar:

- Sonuçta oluşacak olan sensör yüzeyi çok kalın olacaktır.
- Kalıp molekülü yapıdan tamamen uzaklaştırmak çok zor olacaktır.
- Mümkün olduğu düşünülse bile, sensör yüzeyinin altında kalan, uzaktaki kavitelere olan difüzyon, sterik olarak kısmen engellenecektir.

Bu kısıtlamaların üstesinden gelebilmek için Şekil 1.23’de görüldüğü gibi yüzey baskılama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda, ilgilenilen kalıp molekül bir yüzey üzerine immobilize edilir. Bu yüzey, daha sonra ilgili sensör yüzeyi üzerine kaplanan önceden polimerize edilmiş oligomerik karışım üzerine kapatılır. Bu işlem, kalıp molekülün sensör yüzeyi üzerine kaplanması ve kalıbın yıkanması aşamaları ile sonlandırılır. Böylece tıpkı yığın baskılamada olduğu gibi, ilgili kalıba şekil, boyut ve yüzey kimyası bakımından seçicilik gösteren “yapay antikörler” oluşturulmuş olur.



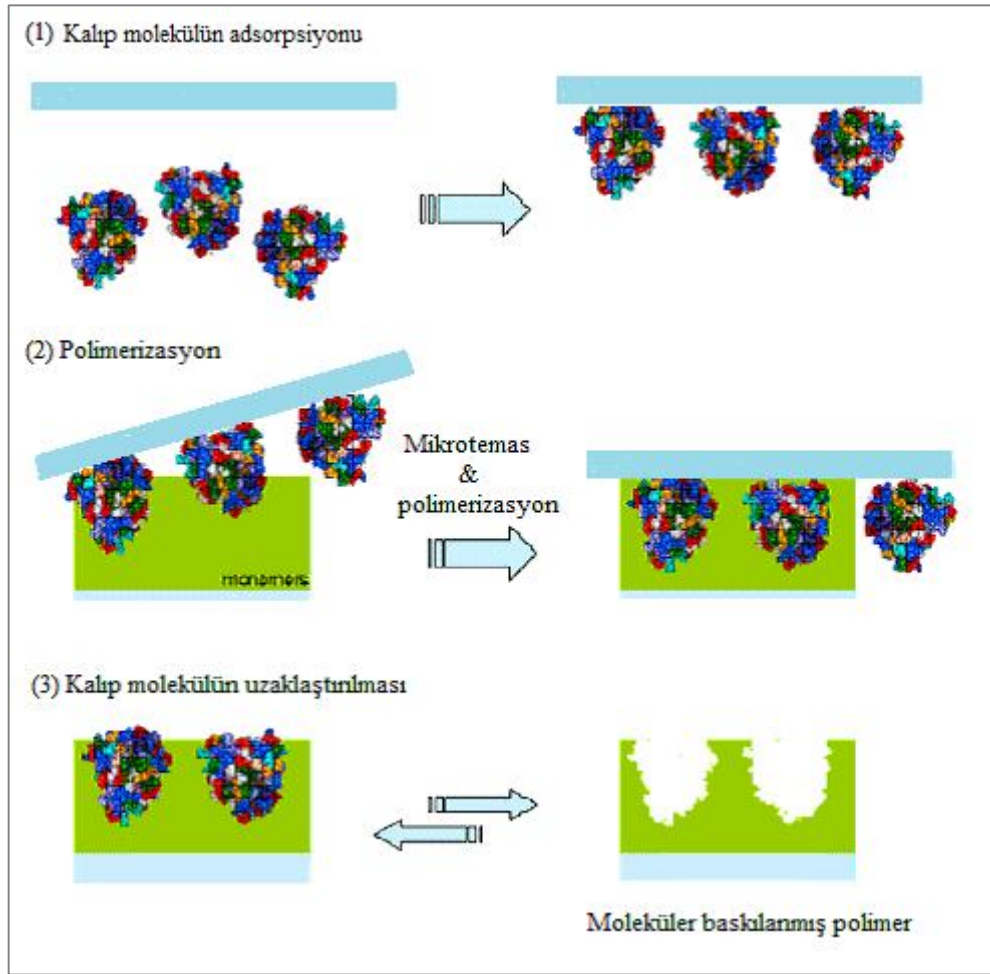
Şekil 1.23. Yüzey baskılama yöntemi

Son zamanlarda birçok araştırmacı antikorları doğrudan bir yüzeye immobilize etmek ya da yüzeyi antikorlar ile kaplamak üzerine yoğunlaşmışlardır. Oluşturulan bu yüzey (protein kalıbı) daha sonraki uygulamalarda özgül antikor tarafından tanınır [244, 245]. Mikrotemas baskılama (μ CP) olarak bilinen bu yöntemin temelinde, büyük molekülleri ve yapıları (protein, vb.) tanıyan baskılanmış yüzeylerin tasarlanması yatmaktadır [246]. Mikrotemas baskılama yöntemi kısaca, polisakkarit benzeri protein tanıma boşlukları hazırlamak için kullanılan yüzey kaplama tekniğidir [247].

Mikrotemas baskılama yöntemi 3 aşamadan oluşmaktadır [248]:

- Öncelikle protein kalıbının oluşturulacağı cam yüzey temizlenir, bu yüzeye kalıp protein adsorbe edilir ve monomer karışımı ile ön muameleye tabi tutulur.
- Protein kalıbı, monomer kaplı substrat (sensör yüzeyi) ile temas ettirilir ve UV-polimerizasyonu altında proteinin substrat üzerinde baskısı çıkarılır.
- Protein kalıbı yüzeyden uzaklaştırılır.

Bu yöntem, özellikle biyomoleküller ile çalışırken, geleneksel baskılama yöntemine göre birtakım avantajlara sahiptir; baskılanan biyomolekülün aktivite kaybının minimuma indirgenmesi, baskılama için oldukça düşük miktarda kalıp molekülün yeterli olması, proteinin baskılama sırasında monomer çözeltisi içinde bulunması gerekmediğinden proteinin konformasyonel bütünlüğünü koruması, vb [248-250]. Mikrotemas baskılama yöntemi Şekil 1.24'de şematik olarak gösterilmektedir.

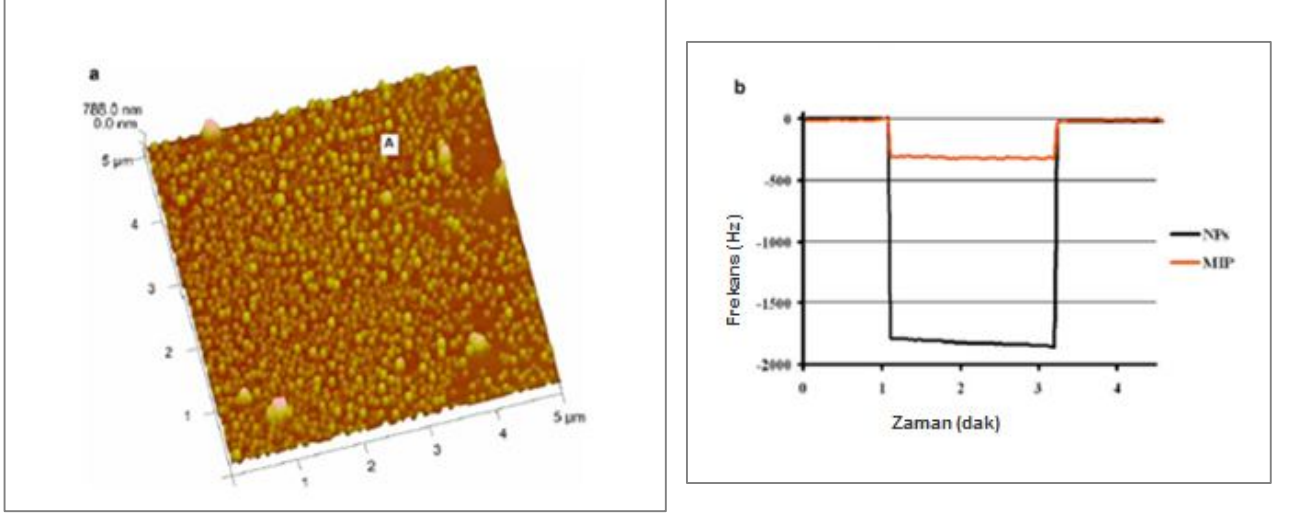


Şekil 1.24. Mikrote mas baskılama yöntemi

1.8.2.3. Baskılanmış Nanopartiküller

Kimyasal ve biyokimyasal tayinde en büyük çabalardan biri, bir sensörün eş analitine olan optimum hassasiyetini ve seçiciliğini yakalamaktır. Hassasiyet farklı yollarla artırılabilir, örneğin kütle duyarlı çevirici kullanılıyor ise cihazın frekansını artırma yolu ile yapılabilir [251]. Fakat malzeme açısından bakıldığında, ilgili tanıma yüzeyi üzerindeki etkileşim bölgelerinin sayısını arttırmak ya da bu bölgelere ulaşılabilirliği arttırmak diğer bir yaklaşımdır. Bu iki durumdan ikincisi pratikte daha kullanışlıdır [252], çünkü etkileşim bölgelerinin sayısını arttırmak fazla miktarda kalıp molekül kullanımını gerektirir, bu da polimerizasyonu engelleyebilir. Tanıma bölgelerine ulaşılabilirlik ince filmlerden ziyade nanopartiküllerin kullanımı ile artırılabilir. MIP nanopartikülleri, ince filmlere kıyasla, analit-reseptör etkileşimi için artan yüzey alanı sağlarlar. Şekil 1.25a baskılanmış nanopartikül ile kaplı cam yüzeyin atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

görüntüsü iken, Şekil 1.25b ince film ile kaplı ve MIP nanopartikül ile kaplı kuartz kristal mikrotezi (QCM)'nin kütle duyarlı sensör cevabını göstermektedir. Buradan da, nanopartikül-MIP kaplı yüzeyin daha kısa difüzyon yolağı ve ince filme kıyasla uygun etkileşim bölgelerinin artan sayısı nedeniyle daha fazla sensör cevabı verdiği görülmektedir.



Şekil 1.25. a) MIP nanopartikül ile kaplı cam yüzeyin AFM görüntüsü, b) MIP nanopartikül ve ince film ile kaplı QCM'in sensör cevabı

1.8.3. Gerçek Hayatta MIP Temelli Biyosensör Uygulamaları

Gerçek hayatta ve eş zamanlı tayinde bir analitik kimyacı için esas zorluk, kompleks ortamlardaki düşük derişimde bulunan analitler ile çalışmaktır. MIP'ler bu kapsamda ilgi odağı olmuştur. Fakat bu malzemelerin laboratuvar ortamından gerçek hayata aktarıldığı çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Bu tür çalışmalara örnek olarak, bitki özütlerinden virüs tayini [253], yağ matrikslerinde oksidatif degradasyon olgusunun gözlenmesi [254-256], bakteri [234], maya hücresi [257] ve uçucu organik bileşik tayini [251, 258-263] verilebilir. MIP'lerin çevresel uygulamalarda da yeri vardır; özellikle pestisit [264-266], endokrin bozucu bileşen, suda ve havada ağır metal ve toksik metal tayininde. Bu malzemeler ayrıca atık su uygulamalarında da kullanılmaktadır. MIP temelli sensör uygulamaları, sadece bir matriks içinde tek bir analit tayini ile sınırlı değildir. Ayrıca kompleks karışımlar içinden de tayin için kullanılabilir (motor yağı degradasyonu tayini gibi) [254-256]. Bu durumda sadece uygulama ilginç olmakla kalmaz, aynı zamanda tayin şekli de

oldukça sıra dışıdır. Kompleks bir matriksteki tüm değişiklikler, aslında detayda bunların ne olduğu bilinmeden, tek bir sensör cevabına dönüştürülür. Böylece matriksteki kimyasal değişikliklere dayalı bir sinyal oluşturulmuş olur. Ayrıca MIP temelli sensörlerle çeşitli bileşenlerin aynı anda tayini de mümkündür. Bu tarz çoklu bileşen tayini için array formatında sensörler mevcuttur.

1.8.3.1. Çevresel Uygulamalarda MIP Sensörleri

Genellikle çevresel olarak önemli kirleticilerin tayini, düşük analit konsantrasyonuna bağlı olarak yüksek hassasiyet ve seçicilik elde etmede zorluk yaşanmasına neden olur. Bu yüzden bu tarz uygulamalar ile ilgili olarak basılmış olan çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Bu çalışmalar farklı kaynaklardan alkol, ester, keton, aldehit, organik asit ve terpen tayinini içermektedir. Bunların çevre atmosferden kantitatif olarak tayini, çevresel, epidemiyolojik ve toksik çalışmalar için çok önemlidir [267]. MIP'lerin bu kapsamdaki avantajları şu şekildedir; geliştirilen sisteme seçicilik kazandırılırlar, böylece kayda değer tayin limitine ulaşılmasını sağlarlar ve oldukça ekstrem koşullara, haftalarca dayanıklı, yeniden kullanılabilir bir matriks oluşturulmasını sağlarlar.

MIP'ler tarafından oluşturulan seçicilik sayesinde birbirine çok benzer bileşikler arasında bile 3-10 kata varan seçicilikte ayırım yapılabilmektedir [259]. Terpenlerin atmosfere yayılması, troposferdeki -OH ve ozon ile reaksiyona girerek, global radyasyon dengesini etkiler. Geliştirilen MIP temelli sensör sistemi ile havadan 20 ppm tayin limiti altında terpen tayini yapılmıştır. Sensör sistemi ile GC-MS'den elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında mükemmel korelasyon gözlenmiştir.

Terpenler için geliştirilen diğer bir kütle duyarlı MIP sisteminde, sıvı fazdan D-mentol ve L-mentol ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve sudan 200 ppb tayin limiti ile L-mentol tayini yapılmıştır [268].

1.8.3.2. Pestisit Tayininde MIP Sensörleri

Pestisit tayinine yönelik sensör malzemelerinin geliştirilmesi 1999 yıllarına dek uzanmaktadır. Sergeyeva ve ark.'ları [269] hazırladıkları MIP membranlar ile sulu

çözeltiden atrazin tayini için kondaktometrik sensör geliştirmişlerdir. Hazırlanan sistem özellikle atrazine karşı yüksek seçicilik göstermiştir. Özellikle 5 nM gibi oldukça düşük tayin limiti ile geliştirilen sensör, gerçek yaşam uygulamaları açısından oldukça elverişlidir. Benzer olarak Pardieu ve ark.'ları [270] atrazin tayini için elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir ve hazırlanan MIP temelli sensör oldukça düşük tayin limiti (10^{-7} mol/L) ile triazin ailesine geniş bir aralıkta seçicilik göstermiştir (10^{-7} mol/L - 1.5×10^{-2} mol/L).

1.8.3.3. Biyolojik Görüntülemeye MIP Sensörleri

Moleküler baskılamanın başlangıcından beri sonuçta oluşan reseptör malzemeler genellikle “yapay antikor”lar olarak adlandırılır [218, 271, 272]. MIP’lerin biyolojik antikorların yerine kullanılabilmesi için yoğun ilgi olmasının nedenlerinden biri, antikorların oldukça maliyetli olması sebebiyle biyolojik malzemelerin düşük maliyetli ve seri üretilen polimerler ile yer değiştirmesinin mantıklı olmasıdır. Bu yaklaşım “MIA” olarak adlandırılan moleküler baskılanmış sorbent assay’lerin gelişimine neden olmuştur [271]. İlk MIA çalışması bir sedatif olan diazepam, ikincisi ise bir bronkodilatör olarak kullanılan theophylline tayinine yönelik olmuştur [218]. İki sistemde de hidrojen bağı yapabilme yeteneklerinden dolayı ve (met)akrilat monomerlerinin kolay polimerizasyon özellikleri nedeniyle akrilat temelli polimerler kullanılmıştır. Bu özellikler akrilik polimerlerini moleküler baskılama yönteminde en çok kullanılan matriks yapmıştır.

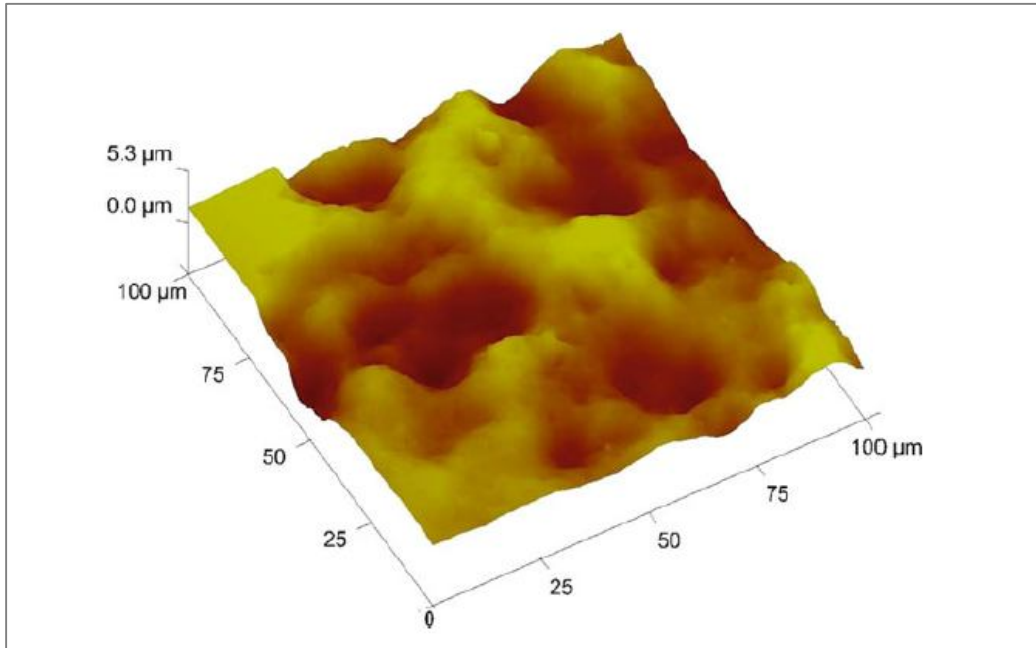
Özellikle küçük moleküller ile çalışırken MIP’ler doğal karşılıkları ile kıyaslandığında aşağıdaki gibi avantajlar sunarlar:

- Küçük bir moleküle karşı MIP üretmek, antikor üretmekten daha kolaydır,
- Antikorlar sadece sulu çevrede fonksiyoneldir, fakat MIP’ler hem sulu hem de susuz koşullarda aktiftir.
- Antikorlar hassastır, sadece belirli bir sıcaklık ve pH aralığında kararlıdır, fakat MIP’ler dayanıklıdır.

Baskılama tekniğinin önemli bir avantajı, bu yöntemin sadece moleküler analitler ile sınırlı olmaması, ayrıca daha büyük yapılar için de kullanılabilmesidir. Fakat bu durumda yığın baskılama mümkün değildir. Çünkü bu yöntemle, birkaç 10

mikrometre kalınlığında tabaka elde edilir ve analitin etkileşim bölgelerine difüzyonu neredeyse imkansız olmaktadır.

İlk asıl sensör çalışmaları, poli-üretan [259] ve sol-jel malzemeye [273] maya hücrelerinin yüzey baskılama yöntemi ile baskılanmasıyla başarılmıştır. MIP ve maya hücresi arasında bir tanıma olayı gerçekleşmiş, MIP'ler bakteri gibi sadece farklı mikroorganizmalara karşı değil, farkı maya türleri arasında da ciddi seçicilik göstermiştir. Bu da biyo-baskılama sırasında sadece ilgili türün morfolojisinin önemli rol oynamadığını, ayrıca yüzey kimyasının da önemli olduğunu kanıtlamaktadır. Bu gözlem daha sonraları ortak geometrik özellik taşıyan fakat yüzey kimyası bakımından farklı biyolojik türler için tasarlanan sensör sistemleri ile desteklenmiştir. Buna bir örnek olarak eritrositlerin yüzey baskılama yöntemi ile baskılandığı çalışma verilebilir. Burada oluşturulan boşluklar oldukça yüksek seçicilik göstermiştir, hazırlanan MIP'ler sadece farklı kan grupları arasında ayırım yapmakla kalmamış, hücre yüzeyindeki glikolipit miktarına bağlı olarak alt gruplar arasında da ayırım yapabilmıştır [274].



Şekil 1.26. Sensör yüzeyine baskılanan eritrositlerin AFM görüntüsü

Virüsler, hızlı bir şekilde tayin edilebilmeleri için günümüzde hiçbir analiz tekniği bulunmadığından kimyasal tayin için en önemli biyolojik türler arasındadır. Bunun en önemli sebebi, 10 nm ile 100 nm arasında değişen boyutlarıdır. Tütün Mozaik

Virüsü (TMV) baskılanmış poliüretanlar ile yapılan ilk sensör çalışması Dickert ve ark.'ları [275] tarafından yayınlanmıştır. Hazırlanan QCM temelli MIP sensörü, TMV'yi bitki özütü gibi oldukça kompleks bir ortamdan, seçici bir şekilde 1 mg/L tayin limiti ile tayin edebilmiştir.

Yapılan tez çalışması kapsamında, prostat kanseri tayininde önemli bir biyobelirteç olan PSA'nın klinik örneklerden eş zamanlı, ultra hassas ve seçici tayini için biyosensör geliştirilmesi ve geliştirilen biyosensörün günümüzde PSA tayini için rutin olarak kullanılan, ticari bir yöntem olan ELİZA yöntemi ile doğruluğunun ve güvenilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

2. DENEYSEL YÖNTEMLER

2.1. Kimyasal Maddeler

Prostat Spesifik Antijen (PSA, kat.no: A01238H) Meridian Life Science, Inc., Memphis, ABD firmasından temin edilmiştir. İnsan serum albümini (HSA, kat.no: A9511), insan İmmünoglobulin G (IgG from human serum, kat.no: I4506), lizozim (lysozyme from chicken egg white, kat.no: L6876) Sigma Aldrich (St Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Glutaraldehit %50 (W/V), 3-amino-propil-trietoksisilan (APTES) ve α - α' -azobisisobutironitril (AIBN) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından alınmıştır. Metakrilik asit (MAA) ve etilen-glikol-dimetakrilat (EGDMA) Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Altın çip yüzey modifikasyonunda kullanılan allil merkaptan Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından alınmıştır. Cam mikroskop slaytları (24 x 40 mm) (IsoLab), mikrotemas baskılama yönteminde proteinin immobilize edildiği protein kalıbı olarak kullanılmıştır. Diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnsteadt, D2731) ile ters ozmoz Barnsteadt (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnsteadt D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18 M Ω /cm'dir.

2.2. Mikrotemas Baskılama Yöntemi İle PSA Baskılanmış SPR Çiplerinin Hazırlanması

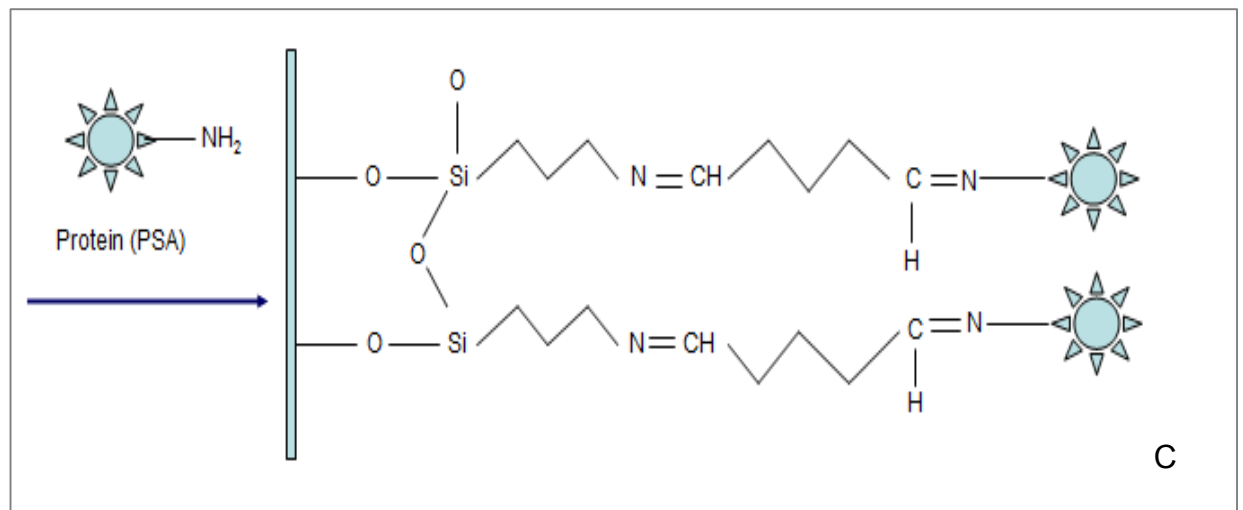
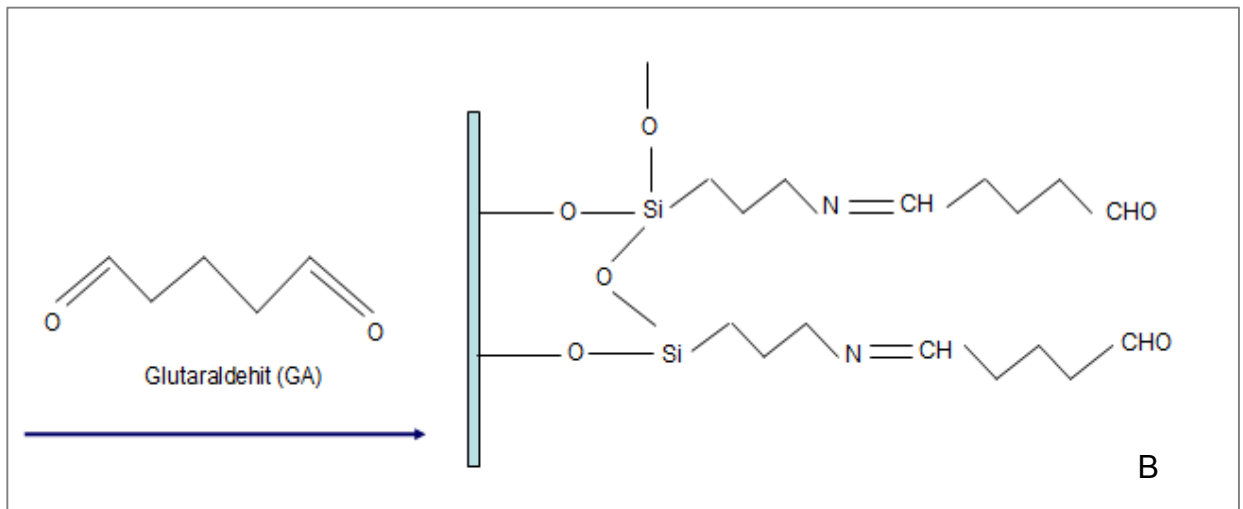
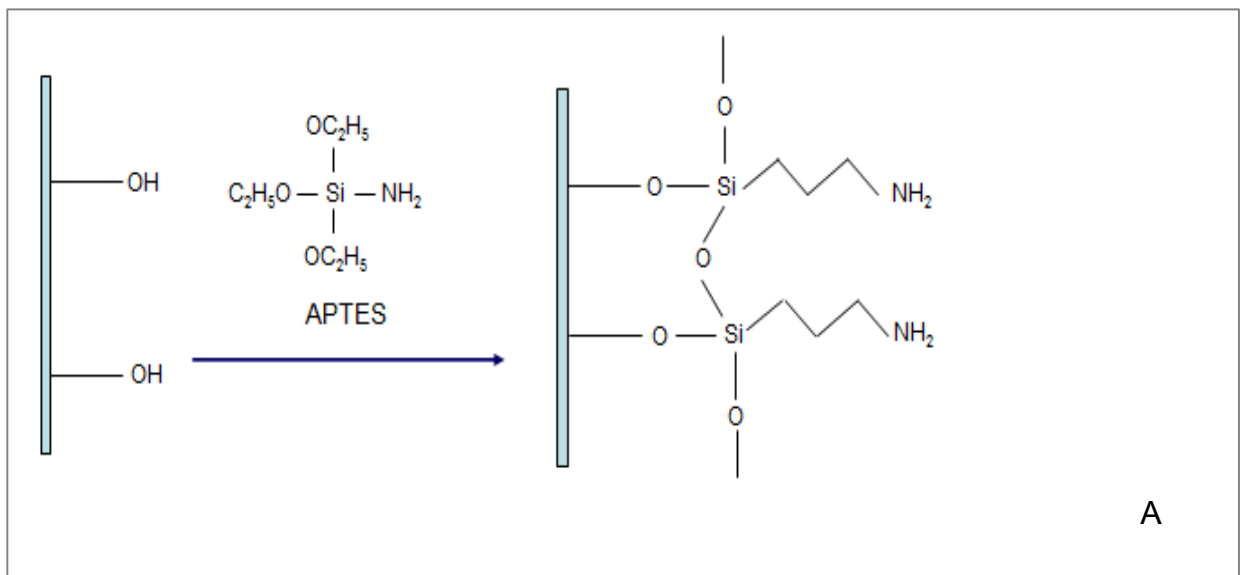
Mikrotemas baskılama yöntemi ile PSA baskılanmış SPR çipleri 3 aşamada hazırlanmıştır:

- a) Cam slaytların temizlenmesi, yüzey modifikasyonu ve protein kalıbının hazırlanması
- b) SPR çiplerinin temizlenmesi, allil merkaptan ile yüzey modifikasyonunun yapılması
- c) SPR çip yüzeyinde PSA baskılanmış polimerik filmin oluşturulması

2.2.1. Cam Slaytların Temizlenmesi, Yüzey Modifikasyonu ve Protein Kalıbının Hazırlanması

Mikrotemas baskılama yönteminde kalıp molekül olarak kullanılacak olan PSA'nın immobilizasyonu için 24 x 40 mm boyutlarında mikroskop camı kullanılmıştır. Cam slaytların temizlenmesi için, slaytlar sırasıyla 1 M HCl (10 mL), deiyonize su (10 mL), 1 M NaOH (10 mL), deiyonize su (10 mL) ve etanol (10 mL) içinde, ultrasonik sonikatörde, her bir aşamada 10 dakika bekletilmiştir. Temizlenme aşamasından sonra azot gazı ile kurutulan cam slaytların modifikasyonu aşamasına geçilmiştir. Öncelikle cam slaytlar etanol içerisinde hazırlanan % 10'luk APTES (3-amino-propil-trietoksisilan) (V/V) çözeltisinde, oda sıcaklığında, 1 saat bekletilmiştir. Bu şekilde, cam yüzey üzerinde amino grupları oluşturulmuştur. 1 saat sonunda çözelti içinden alınan cam slaytlar etanol ile temizlenip, azot gazı ile kurutulmuştur. Daha sonraki aşamada, 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanan % 5'lik Glutaraldehit (GA) (V/V) çözeltisinde, oda sıcaklığında 2 saat bekletilen cam slaytlarda, amino gruplarının aktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra fosfat tamponu ile temizlenen cam slaytlar, azot gazı ile kurutulduktan sonra PSA immobilizasyonu için hazır duruma getirilmiştir. PSA'nın cam slayt yüzeyine immobilizasyonu için, cam slaytlar 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanan 0.1 mg/mL PSA çözeltisinde, 4 °C'de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda protein çözeltisinden alınan slaytlar, fosfat tamponu ile temizlenmiş ve azot gazı ile kurutulmuştur. Bu şekilde PSA'nın yüzeye kovalent olarak immobilize edildiği protein kalıbı hazırlanmıştır.

Şekil 2.1'de cam slaytların modifikasyon aşamaları gösterilmektedir.

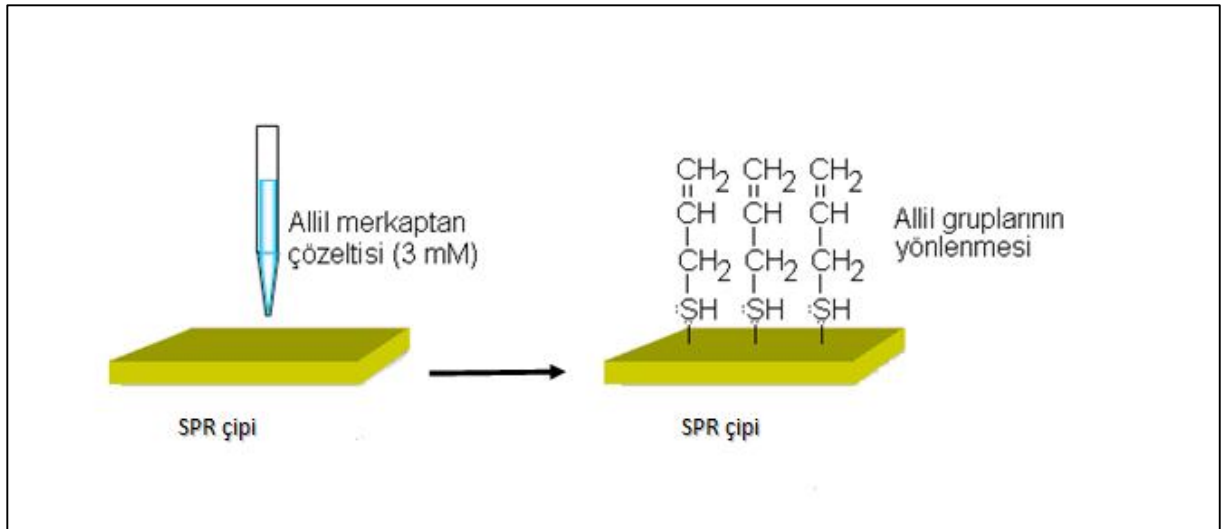


Şekil 2.1. Cam slaytların yüzey modifikasyonu ve protein kalıbının hazırlanması; A) APTES ile modifikasyon, B) Glutaraldehit ile aktivasyon, C) PSA immobilizasyonu

2.2.2. SPR Çiplerinin Temizlenmesi, Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonunun Yapılması

SPR çiplerinin altın kaplı yüzeyleri modifiye edilmeden önce, altın yüzey saf etil alkol (10 mL), amonyak (10 mL) ve distile su (10 mL) aşamalarından geçirilerek temizlenmiştir. Son olarak, asidik pirana çözeltisi (3:1 H₂SO₄:H₂O₂, V/V) içerisinde 2 dakika bekletilen çipler, etanol ve distile su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Yüzeyi temizlenen SPR çipler, 3 mM allil merkaptan (CH₂CHCH₂SH) içeren etanol çözeltisinde 12 saat süresince bekletilmiştir. Allil merkaptan çözeltisinden alınan SPR çipleri detaylı bir şekilde etanol, etanol:su karışımı (1:1, V/V) ve distile su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur. Modifikasyon ile, altın kaplı SPR çip yüzeyinde allil gruplarının yönlenmesi sağlanmıştır.

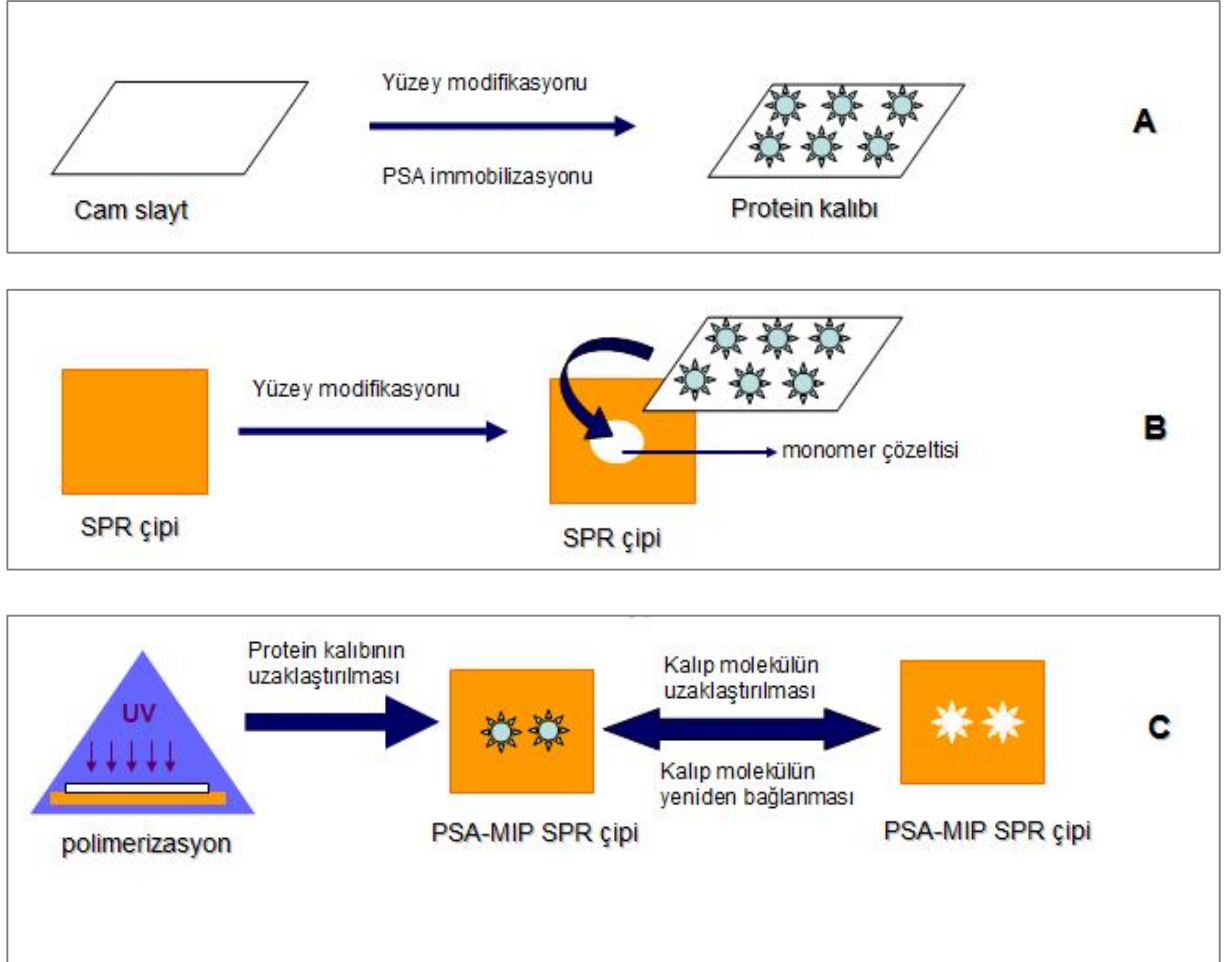


Şekil 2.2. SPR çiplerinin allil merkaptan ile modifiye edilmesi ve allil gruplarının yönlenmesi

2.2.3. SPR Çip Yüzeyinde PSA Baskılanmış Polimerik Filmin Oluşturulması

Protein kalıbı ile modifiye edilmiş SPR çiplerini bir araya getirmeden önce, monomer çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için fonksiyonel monomer olarak MAA (metakrilik asit) ve çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (etilen glikol dimetakrilat); 1:5 (V/V) oranında kullanılarak, monomer çözeltisi hazırlanmış ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözelti içerisine 2 mg başlatıcı olarak kullanılan AIBN (α - α' -azobisisobutironitril) eklenmiştir. Reaksiyon karışımından azot gazı geçirilerek çözünmüş oksijen ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu reaksiyon

karışımından 1.5 μL alınarak SPR χ ip y $\ddot{u}$ zeyine damlatılmıştır. Ardından protein kalıbının olduğu cam slayt, bu karışım $\ddot{u}$ zerine ters çevrilerek kapatılmış, UV ışığı altında (100 W, 365 nm, UVP B100-AP High Intensity UV-lamp) 20 dakika s $\ddot{u}$ resince polimerizasyon işlemeine tabi tutulmuştur. Polimerizasyon sonrasında, protein kalıbı SPR χ ip y $\ddot{u}$ zeyinden alınmıştır. Polimer kaplanmış altın χ ipler 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.4), distile su ve etanol ile yıkanmış, azot gazı ile kurutulmuştur.



Şekil 2.3. Mikrotemas baskılama yöntemi ile PSA baskılanmış (PSA-MIP) SPR χ iplerinin hazırlanması; A) Protein kalıbının hazırlanması, B) SPR χ ipinin y $\ddot{u}$ zey modifikasyonu ve monomer χ ozeltisi ile muamele edilmesi, C) Mikrotemas baskılama yöntemi ile PSA'nın SPR χ ip y $\ddot{u}$ zeyine baskılanması

2.3. SPR Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonu

2.3.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

SPR çiplerinin altın yüzeyinin karakterizasyonu için yarı temas modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çipleri, çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları, hava ortamında, yarı temas modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 V_{RMS} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RMS}'dir. Örnekler 2 µm/s tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 x 2 µm²'lik bir alanda görüntülenmiştir.

2.3.2. Elipsometre

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çiplerinin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. SPR çipi lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma+50 nm altın+50 nm polimer katmanı veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

2.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çiplerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi için, 1.2 nm düzeyinde yüksek çözünürlüklü QUANTA 400F Field Emission SEM (ABD) cihazı kullanılmıştır. SPR çipleri SEM analizi öncesinde etanol ve distile su ile her bir aşamada, 10 dakika olacak şekilde temizlenmiştir. Analiz öncesinde elektrotlar Au/Pd ile kaplanmıştır.

2.3.4. Dispersif Raman Analizi

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çiplerinin dispersif Raman analizi için Ramanscope II (Bruker Optics Inc., Billerica, ABD) cihazı kullanılmıştır. 633 nm lazer kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir.

2.3.5. FT-IR (ATR) Ölçümü

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çiplerinin FT-IR (ATR) ölçümü için IFS 66/S (Bruker Optics Inc., Billerica, ABD) cihazı kullanılmıştır. 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında tarama yapılmıştır. 2300-1800 cm^{-1} dalga sayısı aralığında görünür olan küçük pikler ATR kristaline ait olduğundan örnek için değerlendirilmemiştir. Sonuçlara atmosferik ayarlama (H_2O ve CO_2 için) ve taban çizgisi (baseline) düzeltilmesi yapılmıştır.

2.3.6. Temas Açısı Ölçümü

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çiplerinin temas açısı ölçümleri için KSV/Attention Theta (Boston, ABD) temas açısı ve yüzey gerilim ölçüm cihazı kullanılmıştır. Temas açısı ölçümlerinde yapışık damla (Sessile Drop) yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemle, analizi yapılmak istenen yüzeyler üzerine 1 damla su damlatılarak her birinin temas açısı ölçülmüştür. Temas açısı değerleri, damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı dikkate alınarak belirlenmiştir. Her bir yüzey için belirlenen temas açısı 50 ölçümün ortalama değeridir.

2.4. PSA Baskılanmış (PSA-MIP) SPR Çipler ile Kinetik Ölçümler

PSA baskılanmış SPR çipleri ile kinetik analizler SPRImager II (GWC Technologies, Madison, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Digital Optics V++ görüntüleme yazılımı ve bu yazılım ile birlikte çalışan Microsoft Excel programı, sensorgramların elde edilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 2.4. SPR imager II (GWC Technologies, Madison, ABD) cihazı

GWC SPRImager II cihazı, yüzey plazmon rezonans açısına yakın sabit bir açıda uyarılmış olan örnekten yansıyan ışığın ölçülmesi prensibine göre çalışır. Cihaz; ışık kaynağı, kutuplayıcı, örnek hücresi, dar bant filtresi, çip yüzeyindeki tüm optik alanı yakalayabilen CCD kameradan oluşan bir dedektör ve bir sıcaklık sensöründen oluşmaktadır. SPRImager II sisteminde ışığın dalga boyu (800 nm) ve geliş açısı (40°-70°) sabittir.

Cihazın çalışma prensibi şu şekildedir: Koşutlanmış polikromatik bir kaynaktan gelen ışık, yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir bölgedeki açıda bir polarizörden geçerek prizma/ince altın film/örnek üçlüsünün beraberce oluşturduğu örnek hücrelerine çarpar. Prizma/altın ara yüzeyi ile etkileşen ışık, yansıyan ışığın şiddetinde azalmaya neden olan yüzey plazmonlarını oluşturur. Yansıyan ışığın şiddeti, dedektör tarafından ölçülür.

PSA baskılanmış SPR çipinin polimerik film kaplı yüzeyi akış hücresi yönünde olacak şekilde örnek tutucuya yerleştirilmiş, üzerine kırılma indisi eşitleyici sıvı (kırılma indisi: 1.720 ± 0.0005 , Cargille Laboratories Series M Fluid) damlatılmış, en üste prizma yerleştirilmiştir. Ardından akış hücresi, giriş ve çıkış uçları örnek tutucuya eklenerek örnek hücresi hazırlanmıştır. Örnek hücresi, cihaza yerleştirilmiştir. Sıcaklık sensörü ile sıcaklık 25 °C'ye sabitlenmiştir.

İlk olarak sistemden 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) geçirilerek sistemin dengelenmesi sağlanmıştır (akış hızı: 150 μ L/dak). Sistemden tampon çözelti geçerken, yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans açısı belirlenmiştir. Geliş açısı bu açiya yakın bir açiya sabitlenerek sensorgram alınmaya başlanmıştır. Sistemden 10 dakika süresince 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) geçirilmeye devam edilmiştir. Bu dengeleme basamağından sonra örnek çözeltisi (sulu PSA çözeltisi, yarışmacı proteinleri içeren çözelti, PSA içeren serum örnekleri, prostat kanserli hasta serumu örnekleri) 50 dakika süresince sistemden geçirilerek sistemin denge durumuna gelmesi beklenmiştir. Ardından 10 dakika süresince sistemden desorpsiyon çözeltisi (25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5) geçirilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra sistem 10 dakika süresince fosfat tamponu (10 mM, pH: 7.4) ile temizlenmiş ve böylece sistemin rejenerasyonu sağlanmıştır. Ardından yukarıda anlatılan cihaz ile birlikte sunulan yazılımlar kullanılarak sensorgramlar elde edilmiştir.

Bu kapsamda incelenmiş olan parametreler şu şekildedir:

- a. Desorpsiyon çözeltisinin PSA tayini üzerine etkisi
- b. Sulu çözeltiden PSA tayini
- c. Yarışmacı proteinler ile yarışmalı kinetik analizler
- d. PSA baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi
- e. PSA eklenen sağlıklı insan serum örneklerinden PSA tayini
- f. Prostat kanserli hasta serumundan PSA tayini ve elde edilen sonuçların ELIZA ile karşılaştırılması
- g. Tekrarlanabilirlik çalışmaları

2.4.1. Desorpsiyon Çözeltisinin PSA Tayini Üzerine Etkisi

SPR çipi üzerine bağlanan PSA'yı etkili bir şekilde desorbe etmek için, iki farklı desorpsiyon ajanının (1 M NaCl, pH: 7.4 ve 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5) etkisi incelenmiştir. 1 ng/mL ile 20 ng/mL arasında değişen derişimde PSA çözeltileri sistemden geçirildiğinde, iki farklı desorpsiyon ajanı kullanıldığında, sensörün verdiği cevap (ΔR) incelenmiştir.

2.4.2. Sulu Çözeltiden PSA Tayini

0.1 ng/mL-50 ng/mL derişim aralığında, 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanan PSA çözeltileri sistemden geçirilmiştir. Her bir derişim değerine ait sensorgramlar alınarak ΔR değerleri belirlenmiştir. Bu ölçümlere göre kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur.

2.4.3. Yarışmacı Proteinler ile Yarışmalı Kinetik Analizler

PSA baskılanmış sensörün PSA'ya olan seçiciliğini göstermek amacıyla, yarışmacı proteinler olarak immunoglobulin G (IgG), insan serum albumini (HSA) ve lizozim (Lyz) kullanılmıştır. 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde 10 ng/mL derişiminde hazırlanan IgG, HSA, Lyz, IgG/PSA, HSA/PSA, Lyz/PSA ve IgG/HSA/Lyz/PSA tekli, ikili ve dörtlü çözeltileri SPR sistemine gönderilerek sensorgramlar alınmıştır. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları hesaplanmıştır.

2.4.4. PSA Baskılanmış Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

PSA baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için PSA baskılanmamış (non imprinted-NIP) SPR çipi hazırlanmıştır. Bu çipin hazırlanması için kullanılan yöntem, PSA-MIP SPR çipinin hazırlanması için kullanılan yöntemle aynıdır. Aradaki tek fark, protein baskısının oluşturulduğu cam yüzeyler hazırlanırken, modifikasyon aşamasından sonra cam slaytlara protein (PSA) immobilizasyonu yapılmamıştır. Onun dışında tüm prosedür yukarıda detaylı bir şekilde anlatıldığı gibidir. Bu şekilde kalıp molekül kullanılmadan baskılanmamış-NIP SPR çipi hazırlanmıştır.

Hazırlanan NIP çipi ile 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde hazırlanan 2 ng/mL-50 ng/mL derişim aralığında, PSA çözeltileri ile kinetik çalışmalar yapılmıştır.

Ayrıca yarışmacı proteinler olarak kullanılan IgG, HSA ve Lyz çözeltileri ile kinetik çalışmalar yapılmıştır. Bu çözeltiler de 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde 10 ng/mL derişiminde hazırlanmıştır.

2.4.5. PSA Eklenen Sağlıklı İnsan Serum Örneklerinden PSA Tayini

Sağlıklı insan serum örneğinden PSA tayini için, kan örneği test tüpüne alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra kan örnekleri 3 µm'lik filtrelerden geçirilerek kullanılabilecek kadar -20 °C'de derin dondurucuda bekletilmiştir. Serum örnekleri 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 1:4 oranında dilue edilmiştir. PSA'nın tayin edilemediği örnek kör örnek (blank) olarak seçilmiştir. Bu örneğe dışarıdan 100 pg/mL-10 ng/mL arasında değişen derişimde PSA eklenmiştir. Bu örnekler sistemden geçirilerek ΔR değışimleri incelenmiştir. Bu şekilde kan örneği için kalibrasyon grafiğı oluşturulmuş ve % geri kazanım oranı hesaplanmıştır.

2.4.6. Prostat Kanseri Hasta Serumundan PSA Tayini ve Elde Edilen Sonuçların ELİZA ile Karşılaştırılması

PSA-MIP sensörün kanserli hasta örneklerinden PSA tayini için kullanılabilirliğinin ve PSA tayini için günümüzde mevcut yöntemler ile uyumluluğunun araştırılması için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji A.B.D'den prostat kanseri teşhisi konmuş hastalardan kan örnekleri alınmıştır (Etik Kurulu Karar No: GO 13/135-28). PSA seviyesi 0.21 ng/mL ile 21.8 ng/mL arasında değişen 10 hastaya ait örnekler EDTA içeren vakumlu tüpler ile toplanmıştır. Kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örnekler, 3 µm'lik filtrelerden geçirilmiş ve -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. SPR sistemine uygulanmadan önce, fosfat tamponu (10 mM, pH: 7.4) ile ¼ oranında dilue edilmiştir. Sistemden geçirilerek sensogramlar alınmıştır.

Hazırlanan sensörün etkinliğini ve validasyonunu göstermek için, prostat kanserli hasta serumuna PSA-MIP sensörünün verdiği cevap, günümüzde PSA ölçümü için kullanılan mevcut ELİZA yönteminin bir varyasyonu olan Kemiluminesans İmmüno-analiz yöntemi ile karşılaştırılmıştır. ELİZA ölçümleri H.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji A.B.D'de yapılmıştır.

2.4.7. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

PSA-MIP sensörünün tekrar kullanılabilirliğini test etmek için, 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde 10 ng/mL derişiminde hazırlanan PSA çözeltisi art arda 50 enjeksiyon sonrasında, aynı örneğe sensörün verdiği cevap (ΔR) incelenmiştir.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. SPR Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonu

3.1.1. Atomik Kuvvet Mikroskop (AFM) Analizi

AFM üç boyutlu yüzey topografisi, nanoyapıların boyutları ve biçimleri, nanoboyutta yüzey pürüzlülüğü, faz görüntülemeyle yüzey kompozisyonu belirlenmesi, bölgesel nanomekanik, manyetik ve elektriksel özellikler hakkında bilgi edinilmesini sağlar.

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerinin yüzey morfolojisi yarı temas modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Modifiye edilmemiş SPR çipinin yüzey derinliği 11.45 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipinin yüzey derinliği 20.51 nm olarak bulunmuştur (Şekil 3.2). Bu sonuç, yüzeyi temizlenmiş olan altın çip üzerine allil merkaptan modifikasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Son olarak PSA-MIP SPR çipinin yüzey derinliği ise Şekil 3.3'den de görüldüğü gibi 163.63 nm olarak belirlenmiştir. Son aşamada yüzey derinliğindeki bu artış, allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey üzerinde polimerik film tabakasının başarılı bir şekilde oluşturulduğunu kanıtlamaktadır.

3.1.2. Elipsometre Analizi

Elipsometre, ışığın bir malzemeden geçmesi veya yansması sırasında kutuplanmasında oluşan değişikliği ölçer. Elipsometre ile elde edilen veriler, her malzemenin optik özelliklerine ve ölçülen filmin kalınlığına bağlıdır. Böylelikle elipsometre, film kalınlığı tayininde ve malzemelerin optik sabitlerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Bununla beraber elipsometre, malzemelerin bileşiminin, kristalleşme seviyesinin, pürüzlülüğünün ve katkılama oranının belirlenmesinde de kullanılabilir.

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerinin elipsometre analizi sonuçları Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de görülmektedir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Allil merkaptan ile modifiye

edilmiş SPR çipinin ortalama yüzey kalınlığı 95.4 nm olarak belirlenmiştir. PSA-MIP SPR çipinin ortalama yüzey kalınlığı ise 125.1 nm olarak bulunmuştur.

3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

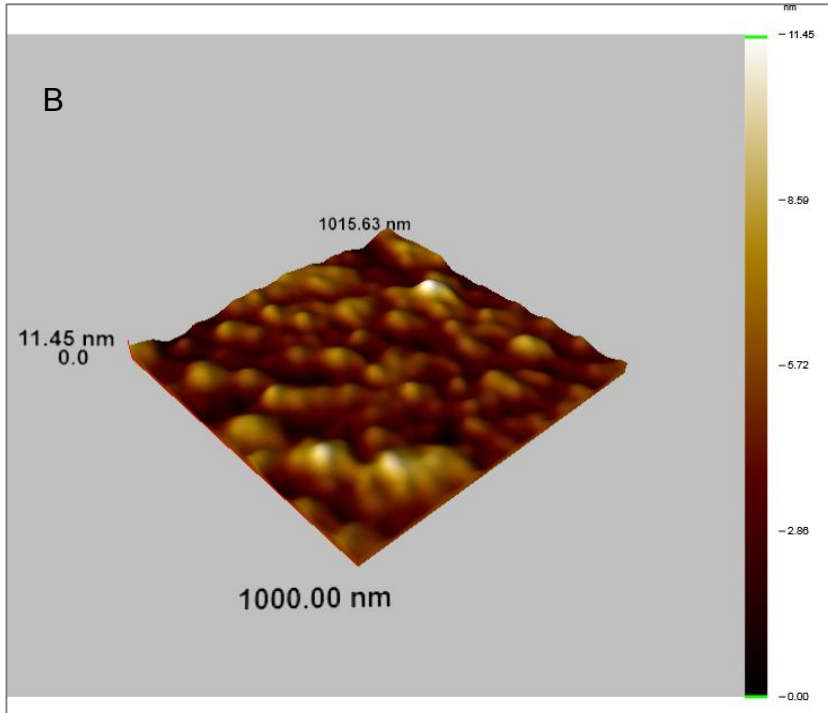
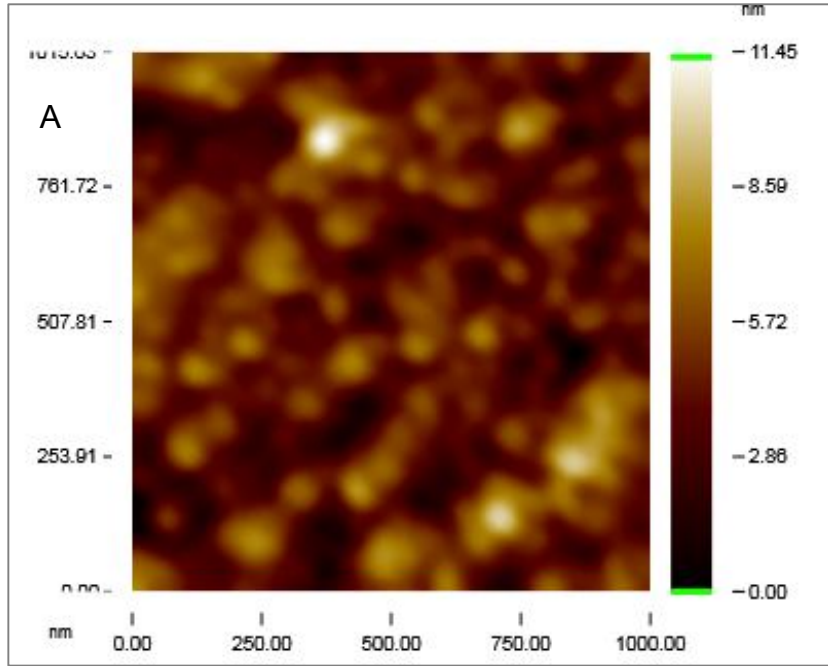
Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Analiz edilecek örnekler ilk olarak vakum altında ince bir altın tabaka ile kaplanmıştır ve ardından taramalı elektron mikroskop (QUANTA 400F Field Emission SEM, USA) görüntüleri alınmıştır. Her üç SPR çipine ait, farklı büyütmelerdeki görüntüler Şekil 3.6-3.8'de gösterilmektedir. SEM görüntülerindeki farklılık, modifiye edilmiş altın yüzeyin polimerik film ile kaplandığının kanıtıdır.

3.1.4. Dispersif Raman Analizi

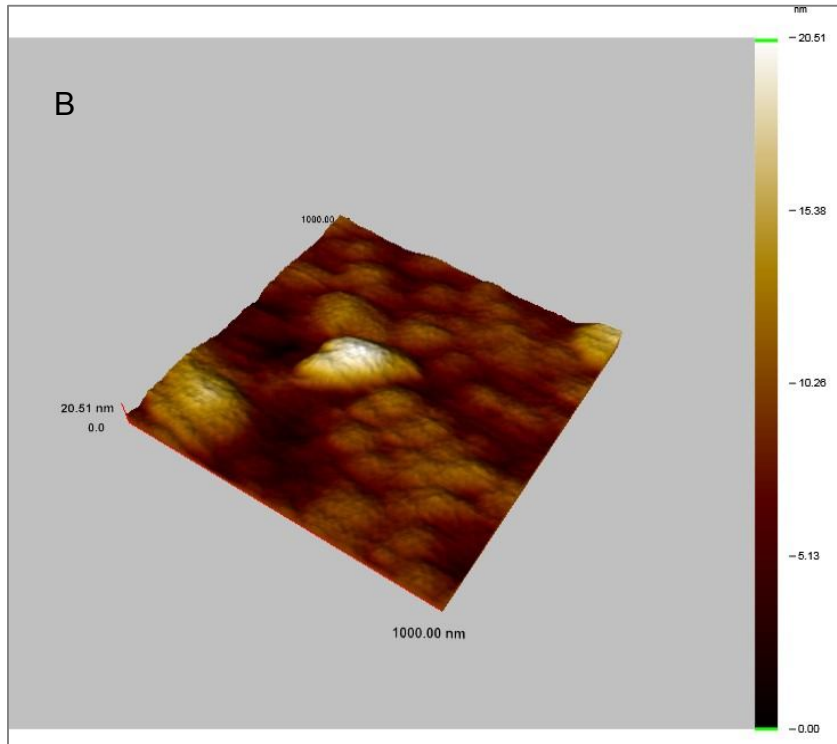
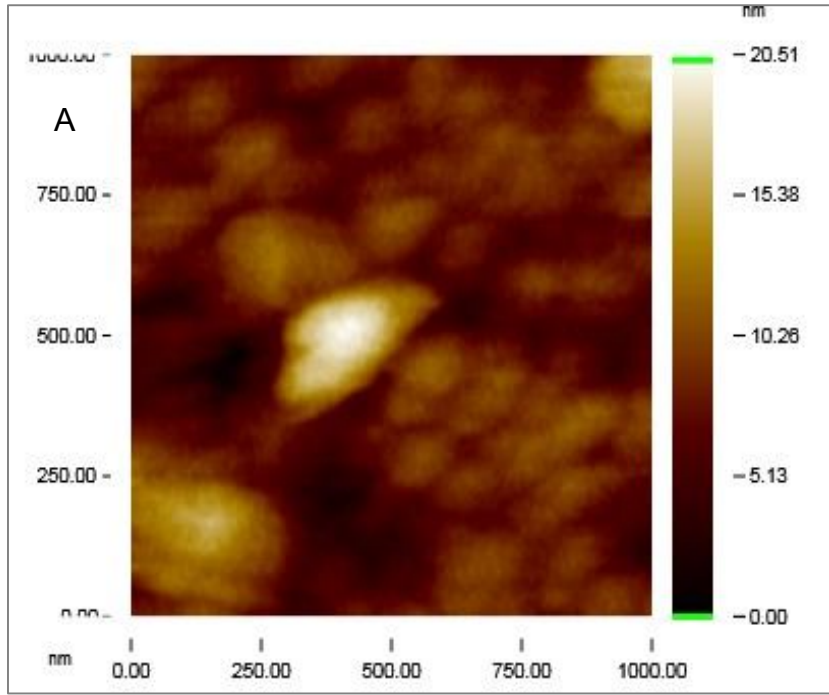
Raman spektroskopisi molekül ve kristal örgülerdeki bağlı atomların elektron bulutlarının, gelen ışıkla etkileşerek titreşmesi sonucunda meydana gelen Raman saçılma sürecine dayanmaktadır. Raman spektrumundan organik ve inorganik maddelerin bağları hakkında kalitatif ve kantitatif bilgilerin yanı sıra, madde veya malzeme yapısını meydana getiren ilgili fonksiyonel gruplar hakkında da bilgi edinilebilmektedir. Raman spektroskopisi, hiçbir numune hazırlamayı gerektirmeyen sadece küçük bir numunenin ölçüm için yeterli olduğu ve numuneye zarar vermeyen bir yöntemdir.

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış SPR çiplerinin dispersif Raman analizi için, 633 nm lazer kullanımı ile çalışan, Ramanscope II (Bruker Optics Inc., Billerica, ABD) cihazı kullanılmıştır.

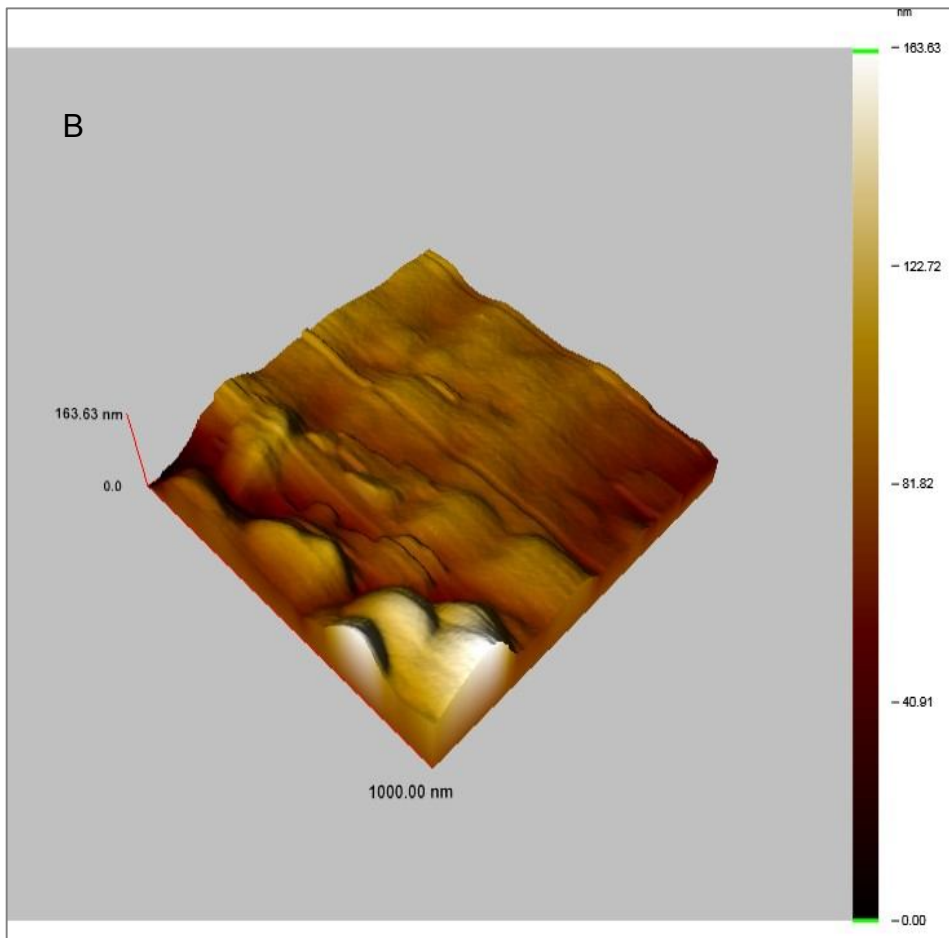
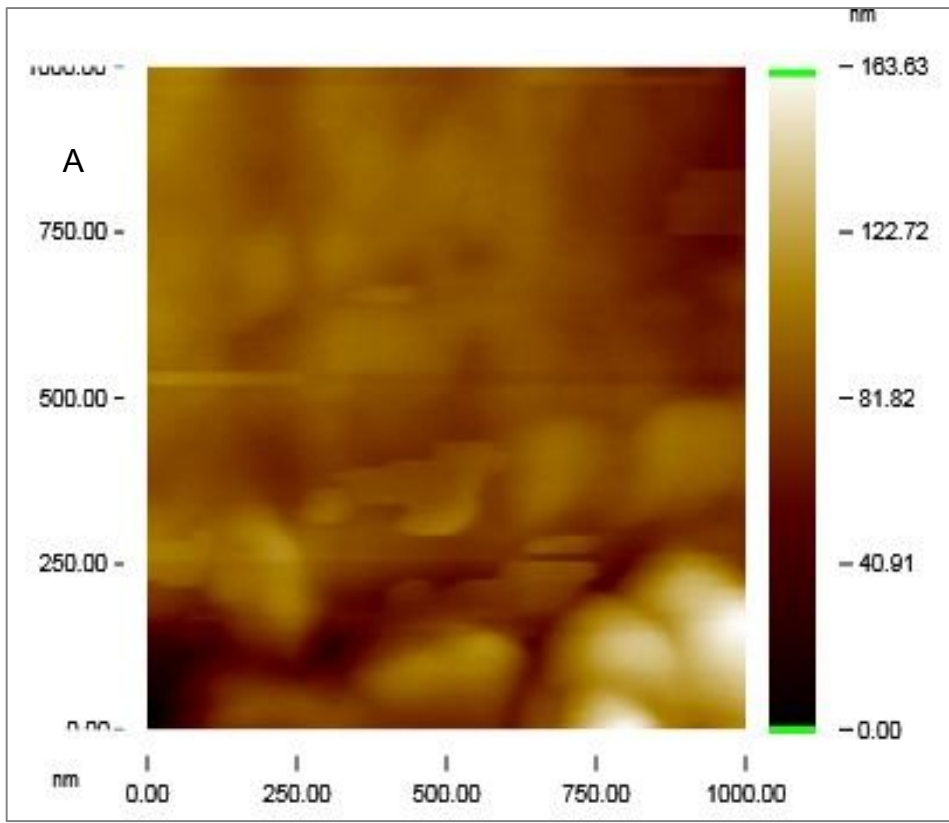
Modifiye edilmemiş (Şekil 3.9A), allil merkaptan ile modifiye edilmiş (Şekil 3.9B) ve PSA-MIP SPR çiplerine ait (Şekil 3.10A) Raman görüntüleri incelendiğinde, bantlardaki kaymalar yüzeyin allil merkaptan ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini ve modifiye edilmiş yüzeyde PSA-baskılanmış polimerik filmin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir.



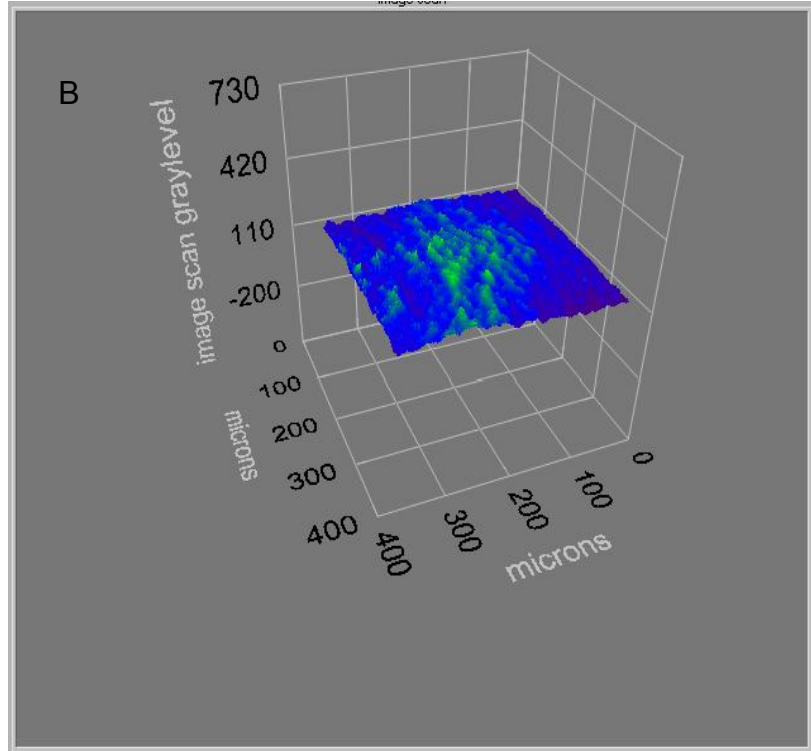
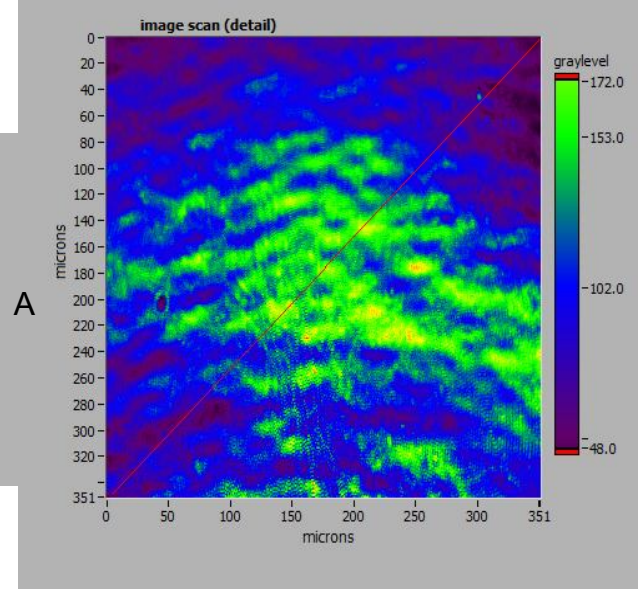
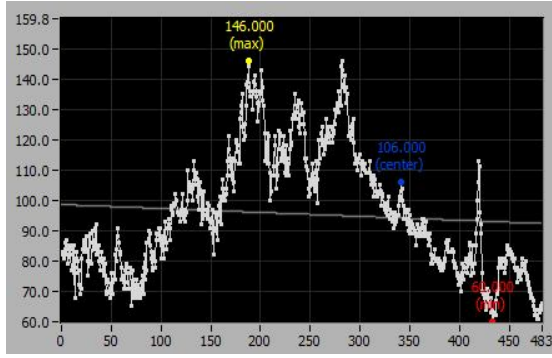
Şekil 3.1. Modifiye edilmemiş SPR çipinin yarı temas modda alınan AFM görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü



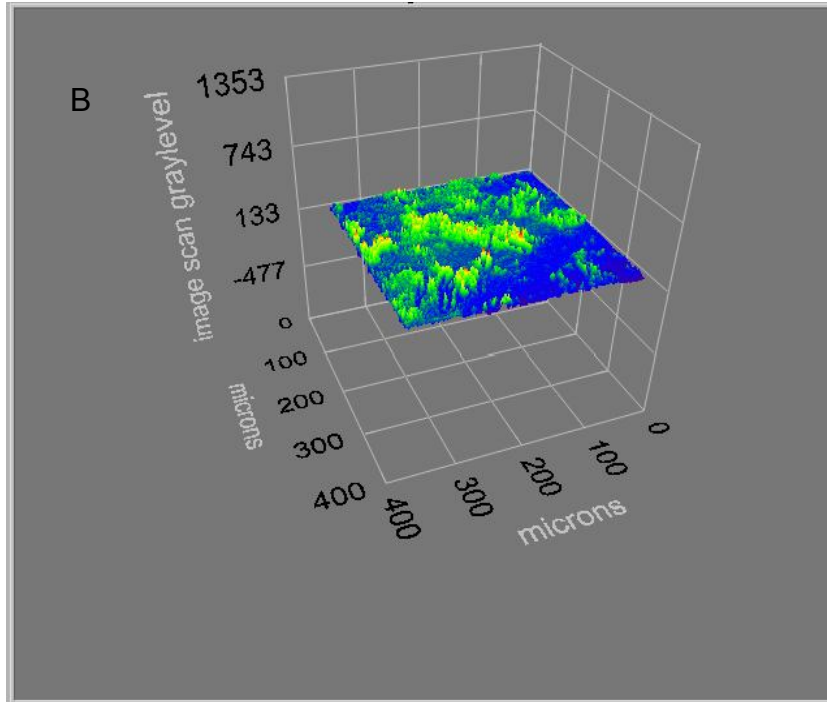
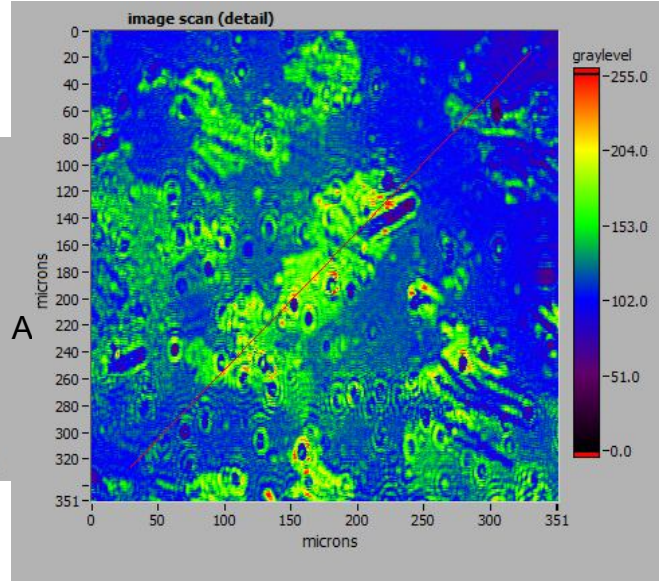
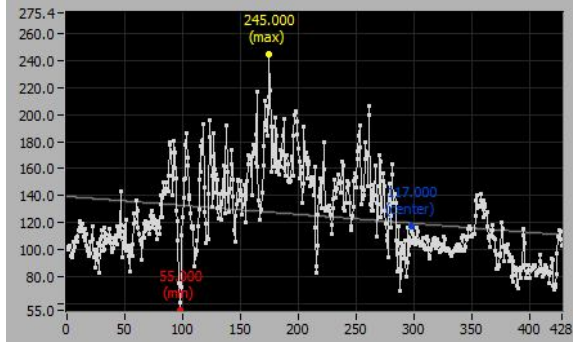
Şekil 3.2. Alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipinin yarı temas modda alınan AFM görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü



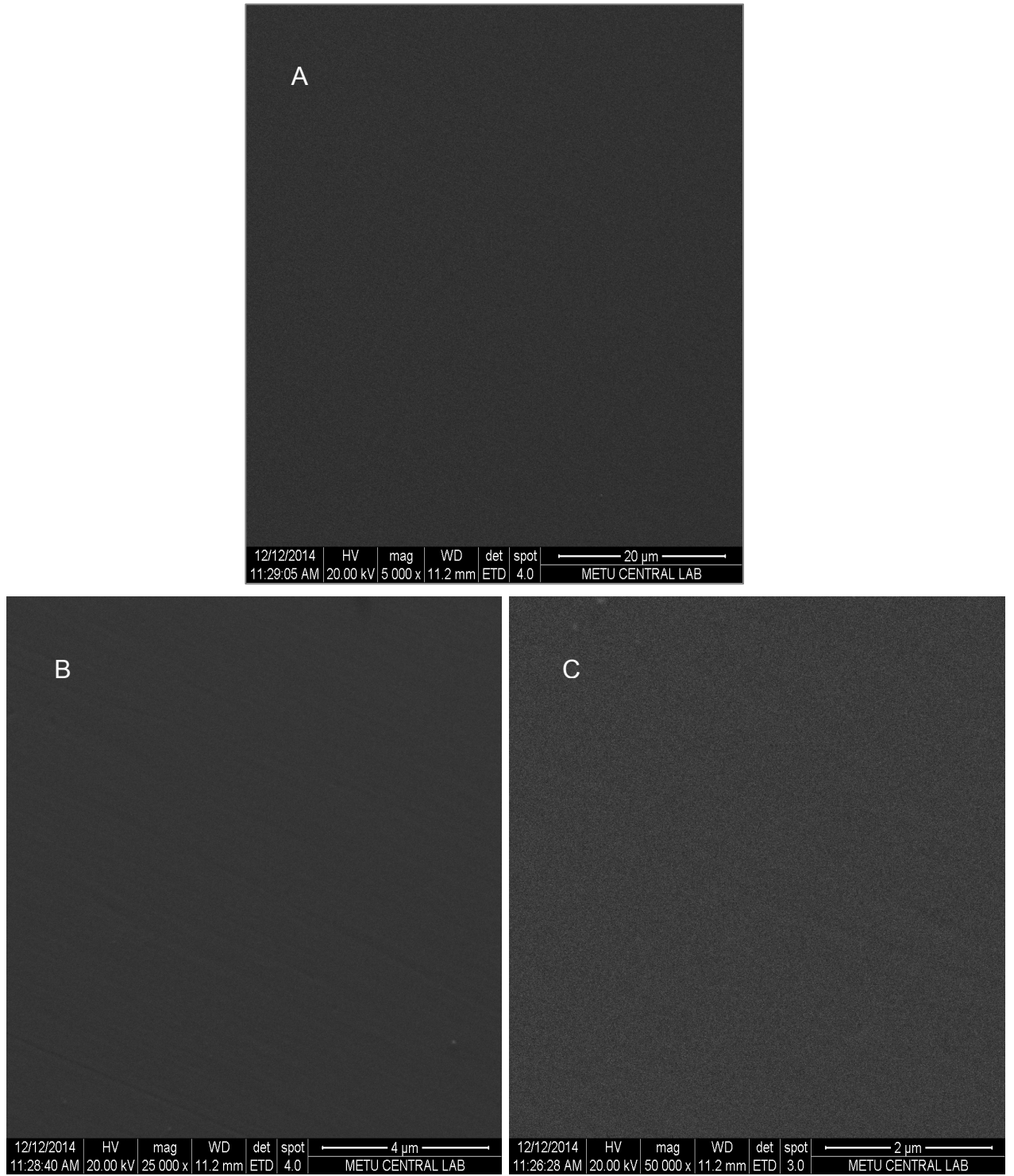
Şekil 3.3. PSA-MIP SPR çipinin yarı temas modda alınan AFM görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü



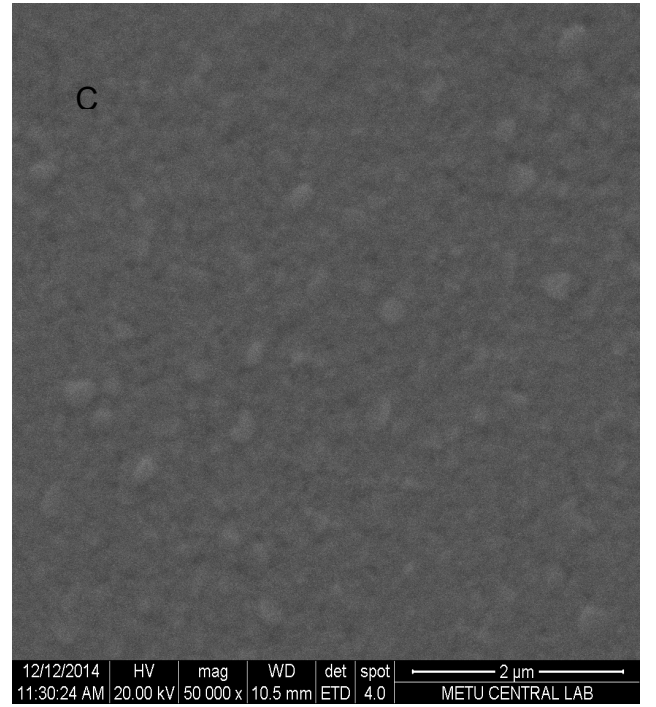
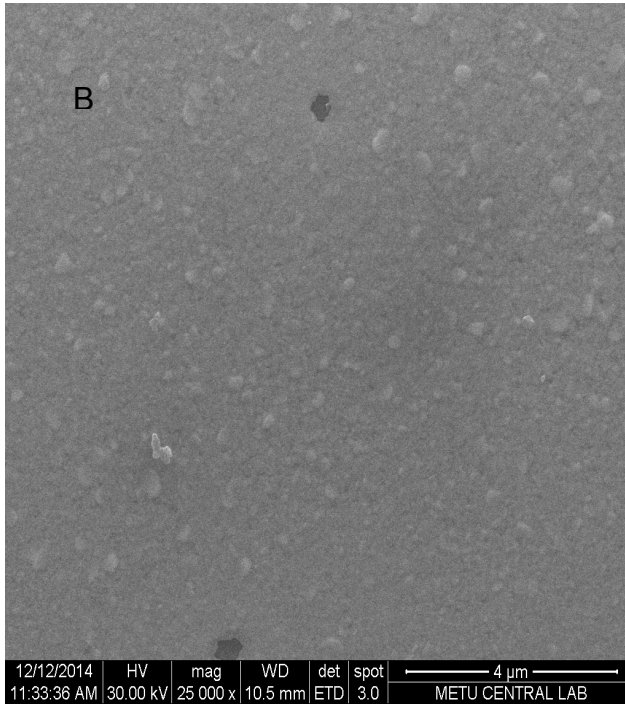
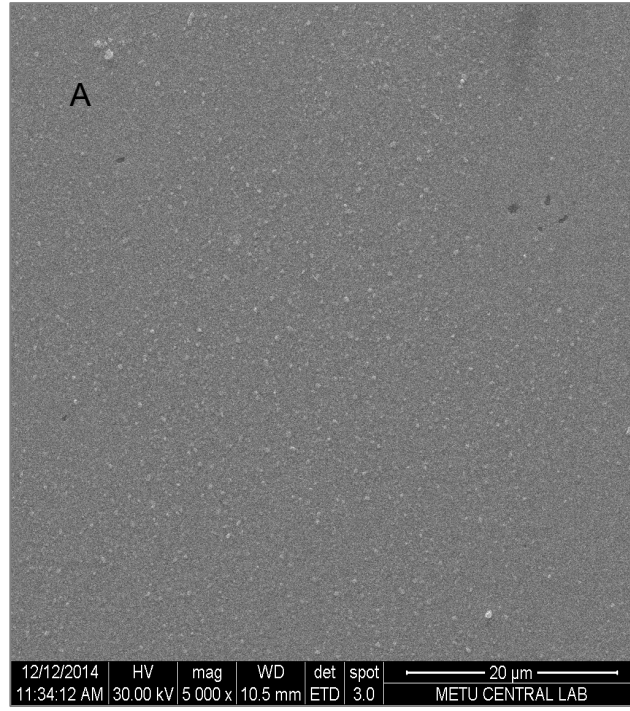
Şekil 3.4. Alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipinin elipsometre görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü



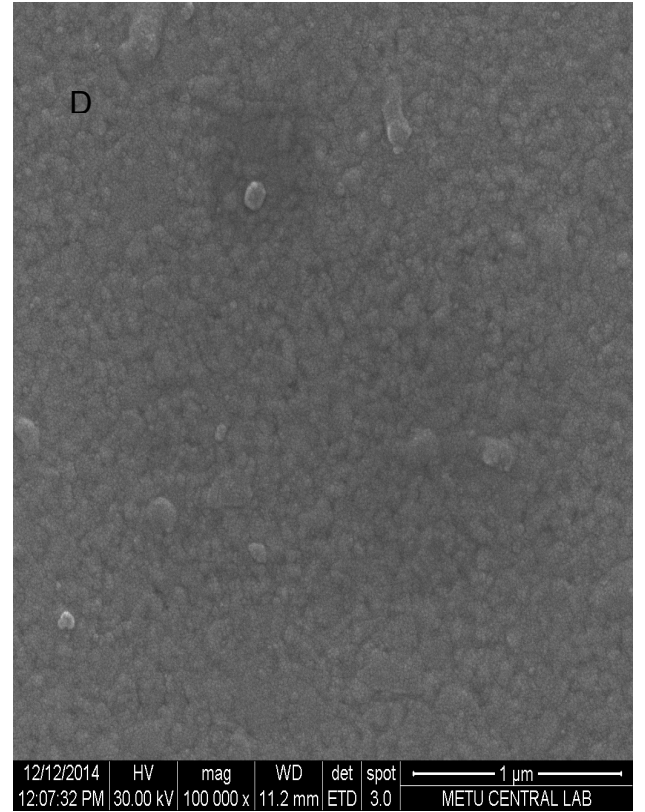
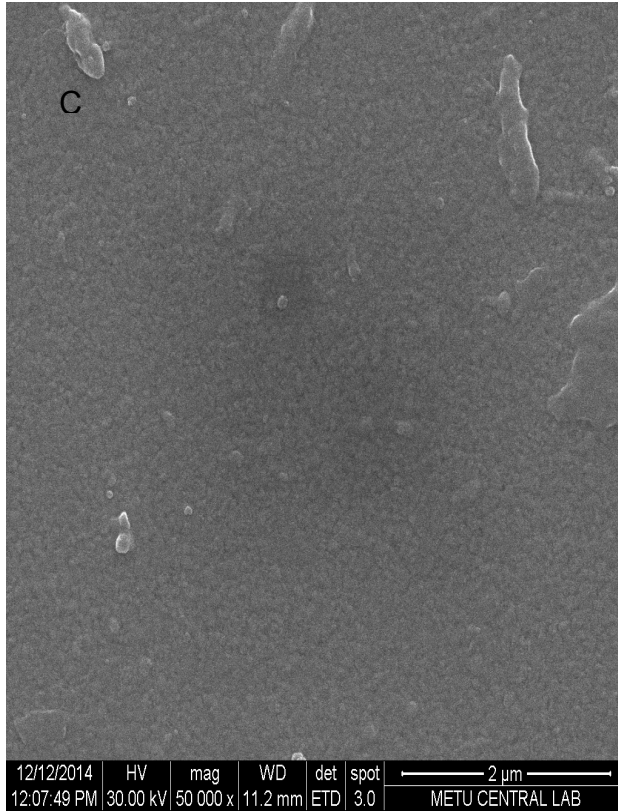
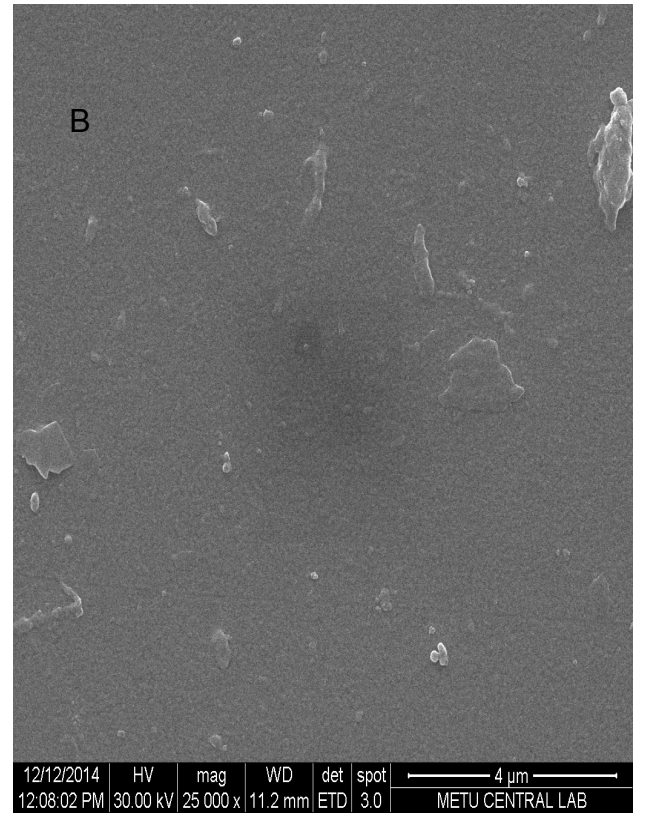
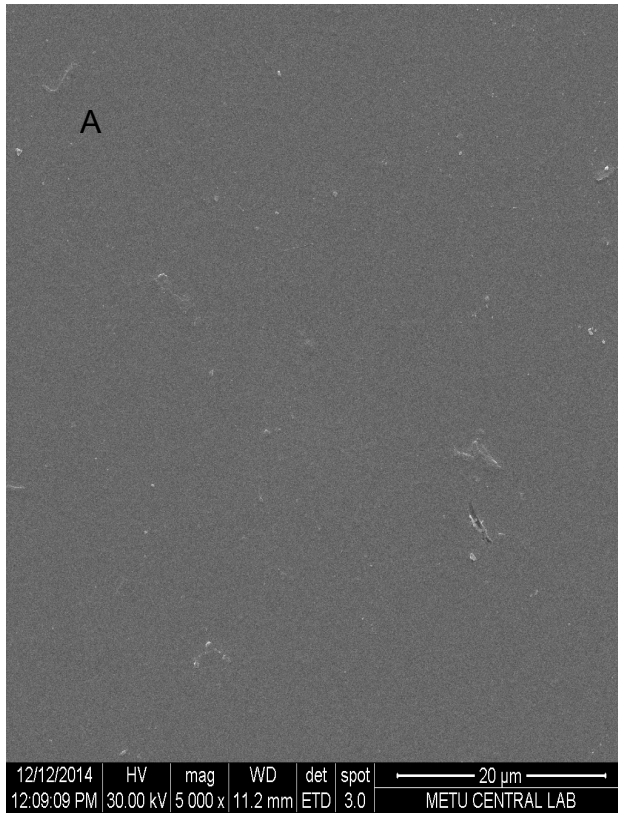
Şekil 3.5. PSA-MIP SPR chipinin elipsometre görüntüsü (A) Yüzey görüntüsü; (B) 3B görüntüsü



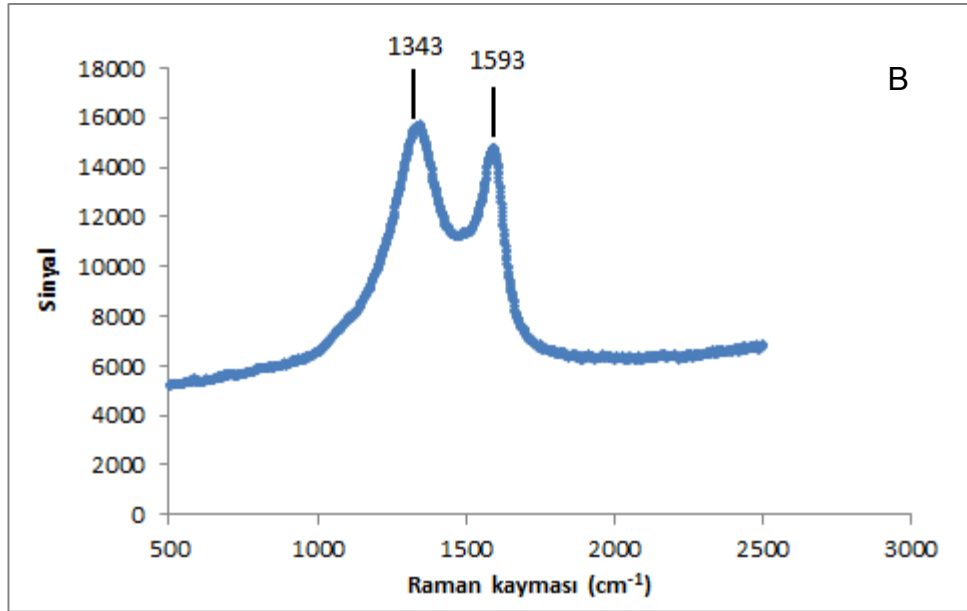
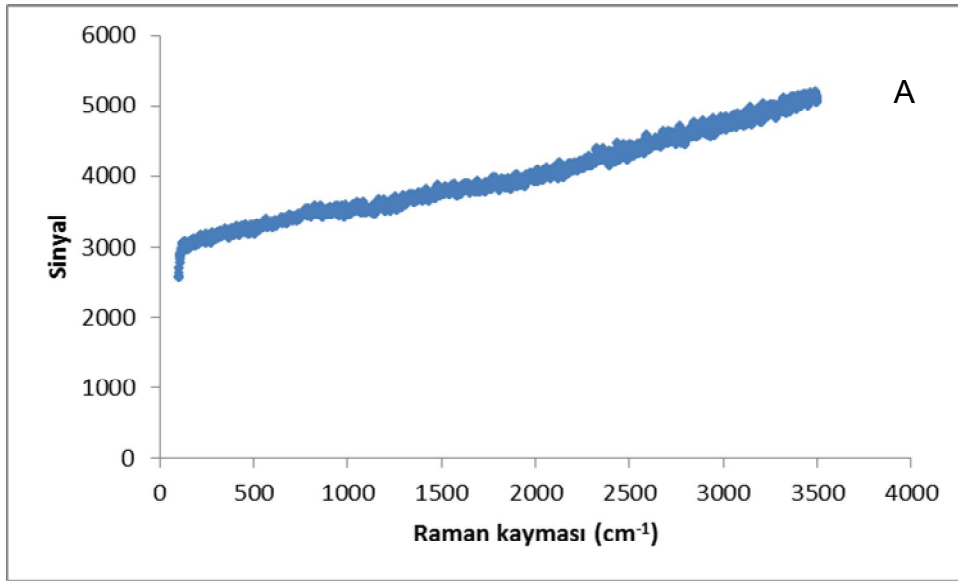
Şekil 3.6. Modifiye edilmemiş SPR çiplerine ait SEM görüntüsü; A) 5000X, B) 25000X, C) 50000X



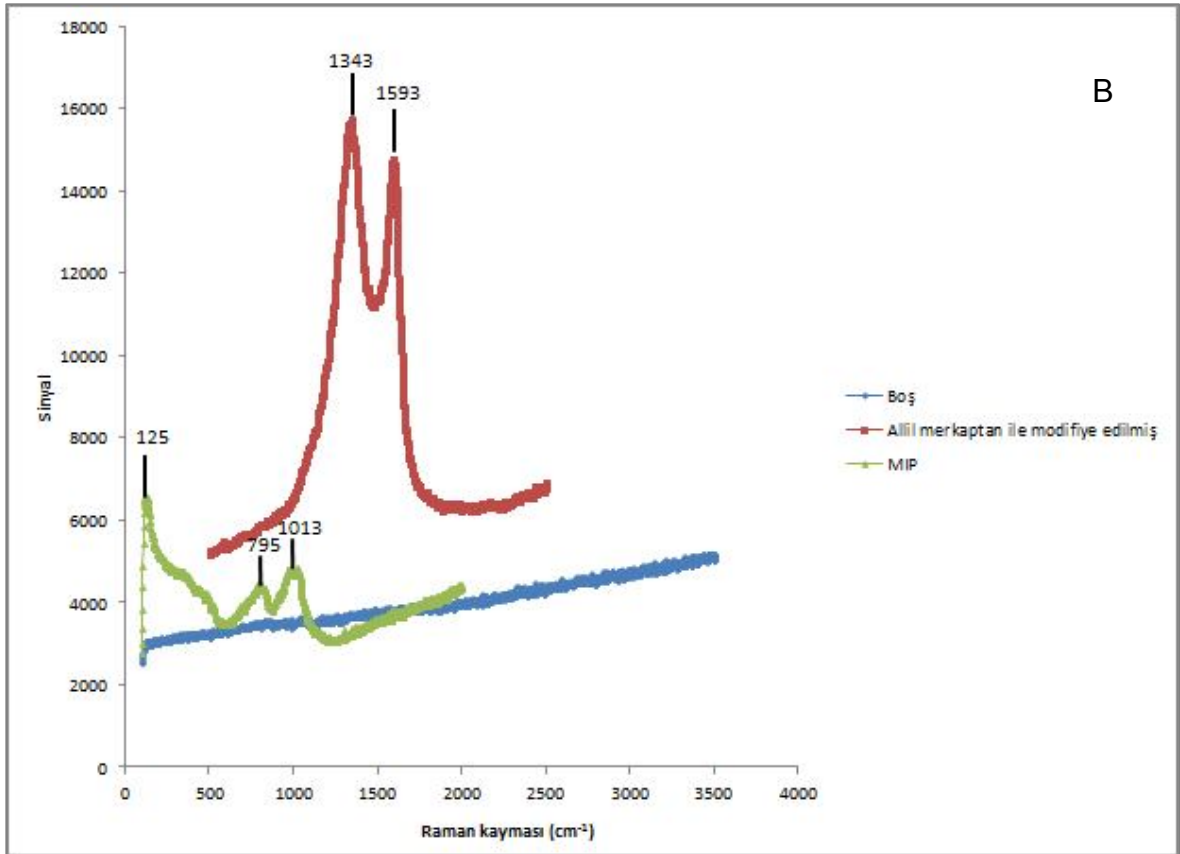
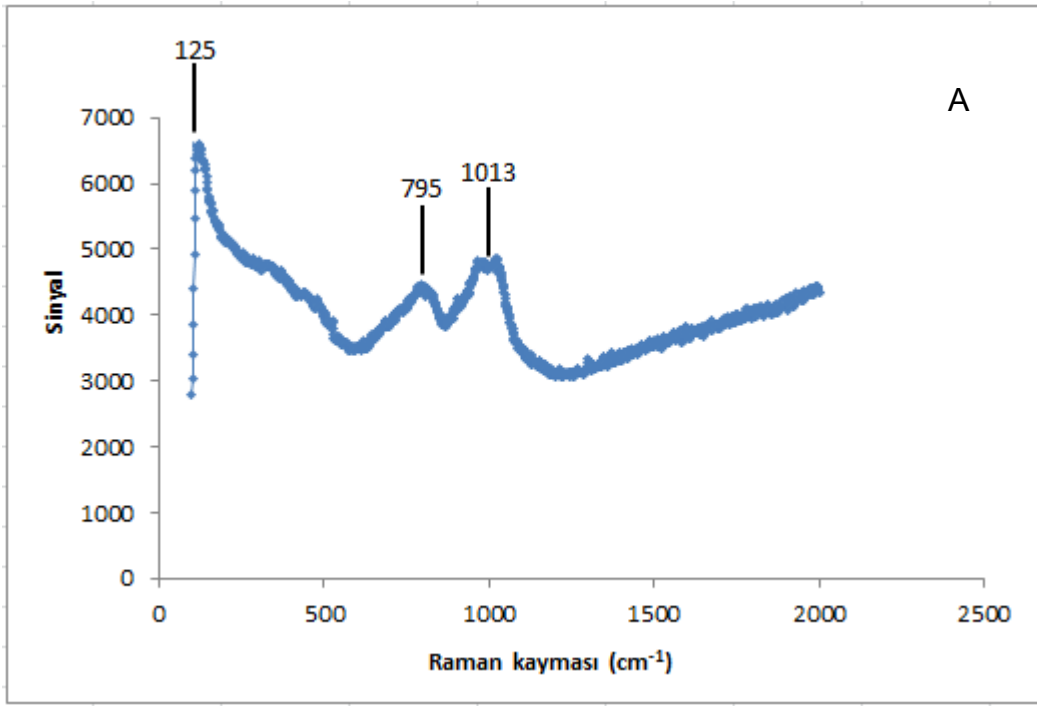
Şekil 3.7. Alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çiplerine ait SEM görüntüsü; A) 5000X, B) 25000X, C) 50000X



Şekil 3.8. PSA-MIP SPR çiplerine ait SEM görüntüsü; A) 5000X, B) 25000X, C) 50000X, D) 100000X



Şekil 3.9. SPR çiplerine ait Raman analiz sonuçları; A) Modifiye edilmemiş SPR çipi, B) Alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipi



Şekil 3.10. Raman analiz sonuçları; A) PSA-MIP SPR çipi, B) Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çipine ait çakışık Raman analiz sonucu

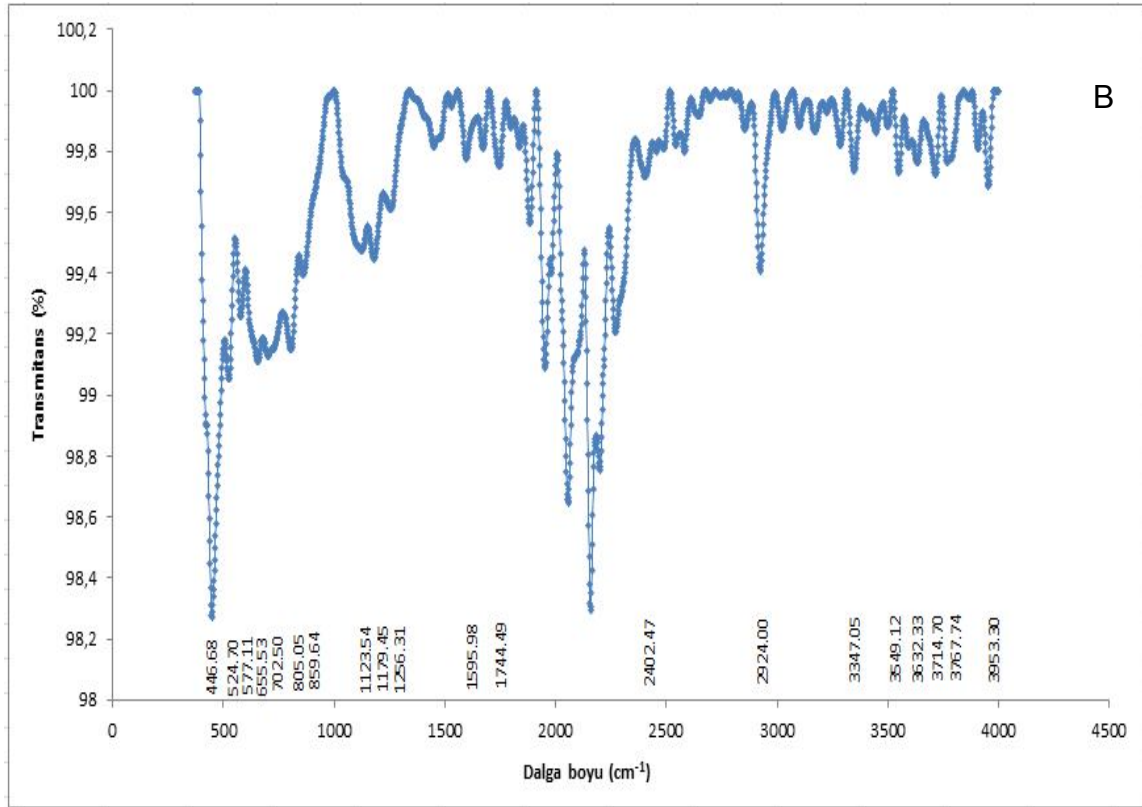
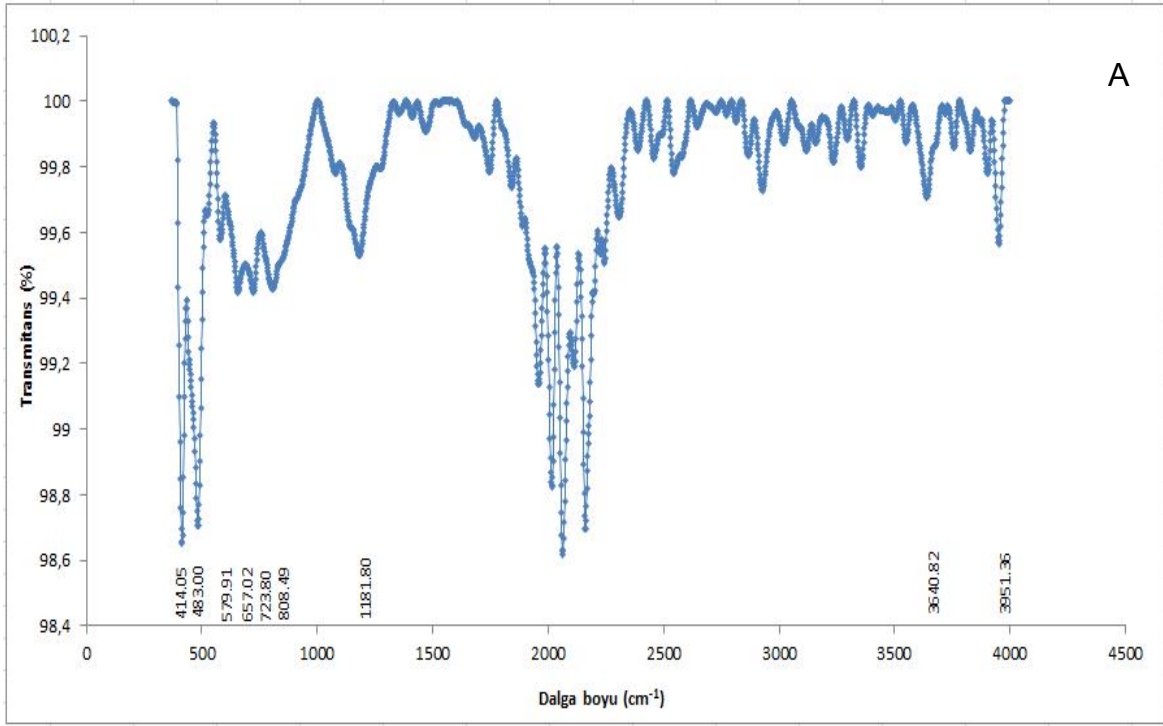
3.1.5. FTIR-ATR Analizi:

IR spektroskopisi, moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçer ve moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. FT-IR spektroskopisi ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak, katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir.

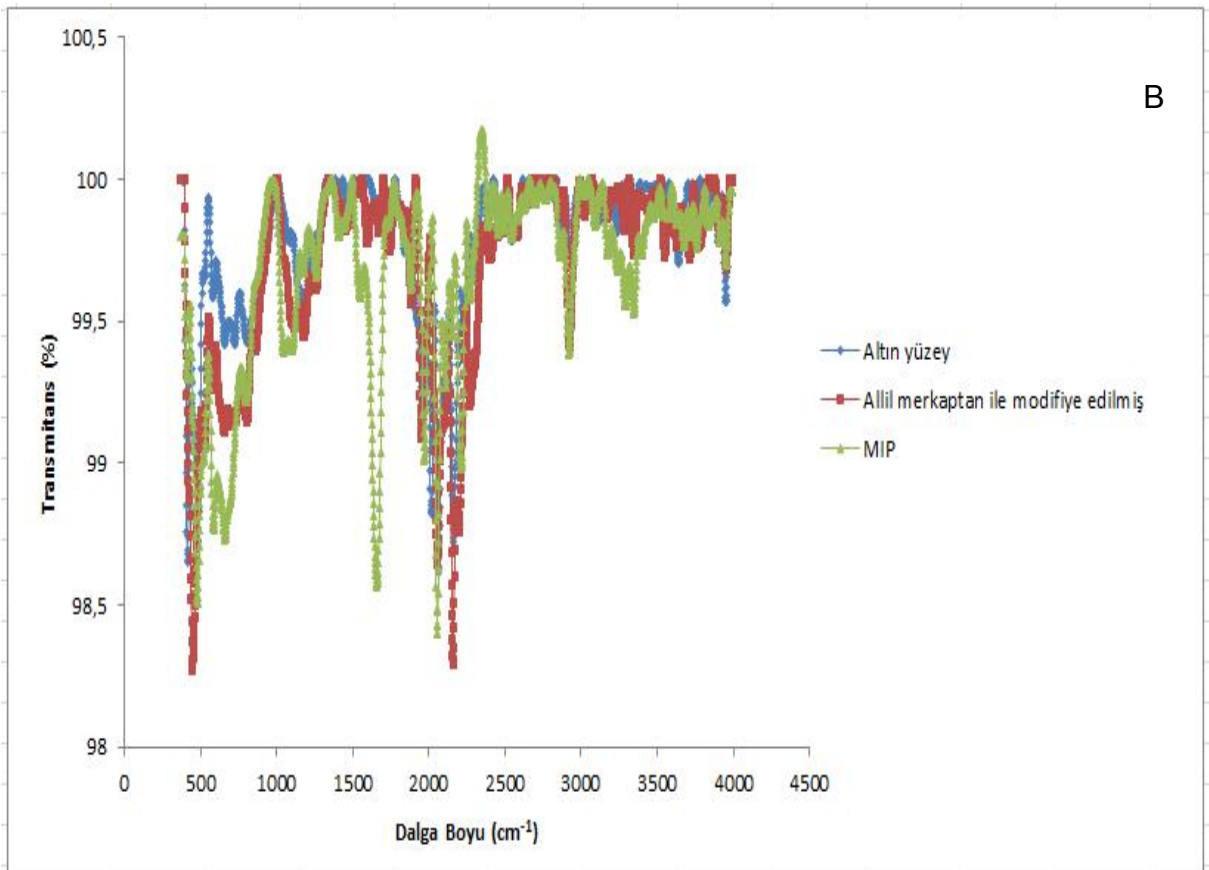
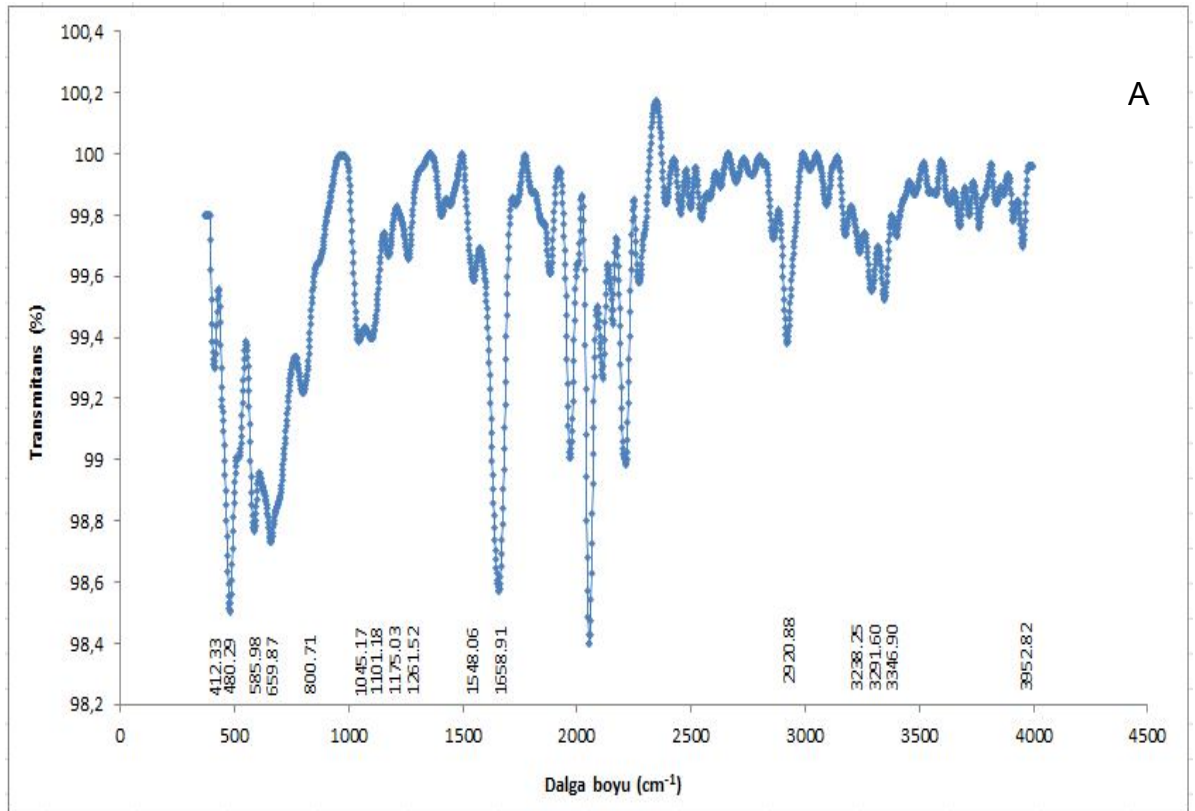
Tiyoller (R-SH) altın (Au) substratlar üzerinde oldukça başarılı şekilde SAM (Self Assembled Monolayer) oluştururlar. Uç grup altın yüzeyinde kuvvetli ve istemli bir şekilde adsorbe olur. Daha sonra moleküller zincir-zincir etkileşimleri ile tekrar kendi aralarında organize olarak yüzeyde yoğun ve düzenli bir tabaka oluştururlar. Altının göreceli inertliği, kolay temizlenmesi ve hazırlanmasına olanak sağlayan mikrokristalin yapısı nedeniyle Au üzerine tiyol bağlanması en çok çalışılan model sistemlerden biridir.

Modifiye edilmemiş altın çip, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipi ve PSA-MIP SPR çipine ait FT-IR görüntüleri Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de görülmektedir. Modifiye edilmemiş (Şekil 3.11A) ve allil merkaptan ile modifiye edilmiş (Şekil 3.11B) altın yüzey karşılaştırıldığında, C-H gerilme bölgesinde bakıldığında, 2924 cm^{-1} 'de C-H gerilme titreşimlerine ait bantlar görülmektedir. Altı karbon ve üzeri alkil zincirine sahip alkanotiyolatlar için bu değerler literatürde simetrik gerilmeler için $2848\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ ve asimetrik gerilmeler için $2918\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ aralığındadır. Allil merkaptan ile kaplı altın yüzey için bulunan C-H gerilme titreşim bantlarına ait frekans değerleri literatür ile uyumludur.

PSA-MIP SPR çipine ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 3.12A), 1548 cm^{-1} ve 1658 cm^{-1} amid bantları, 2920 cm^{-1} 'de alifatik C-H titreşimleri görülmektedir.



Şekil 3.11. A) Modifiye edilmemiş SPR çipine ait FT-IR analiz sonucu, B) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipine ait FT-IR analiz sonucu



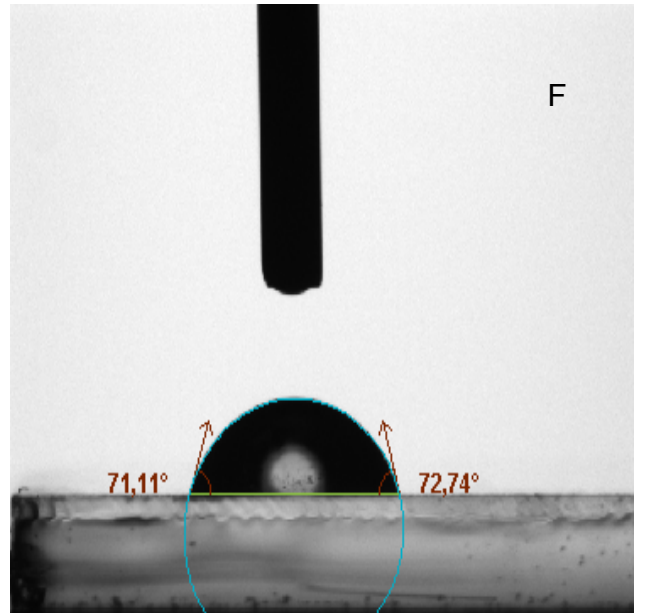
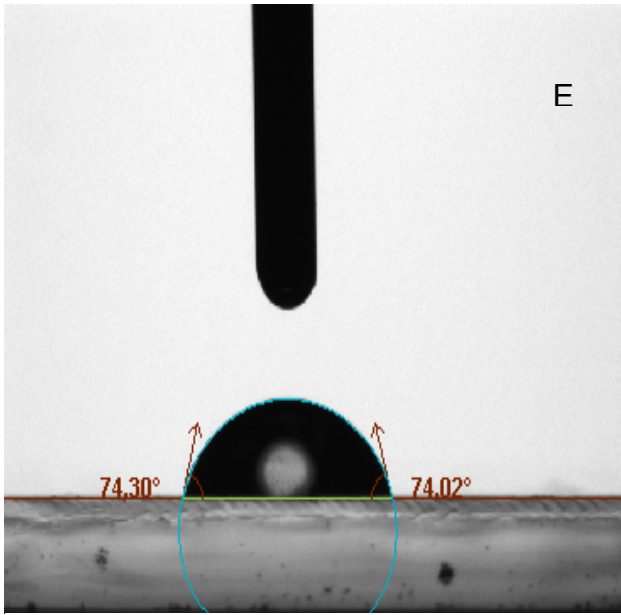
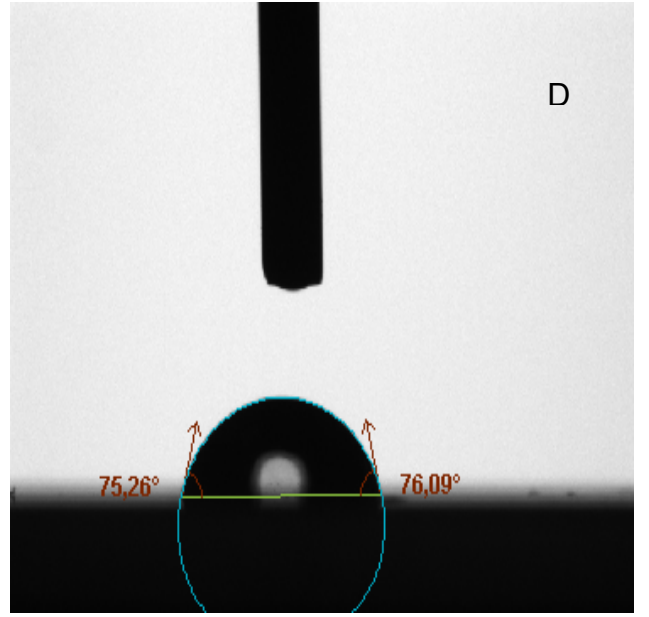
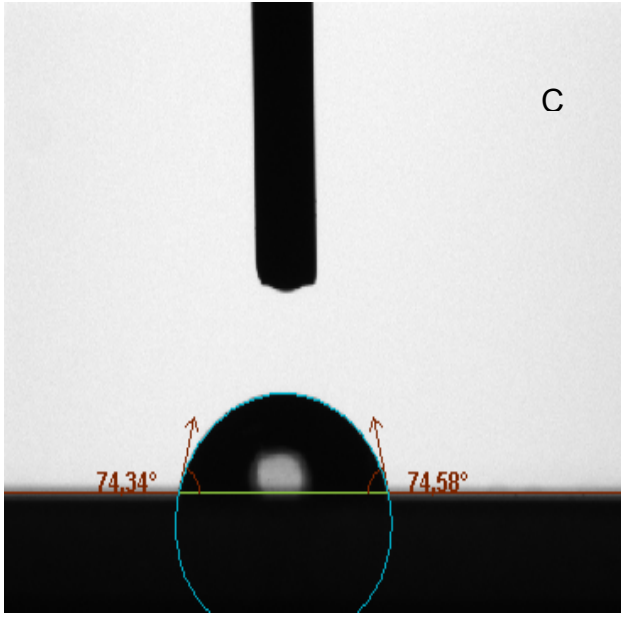
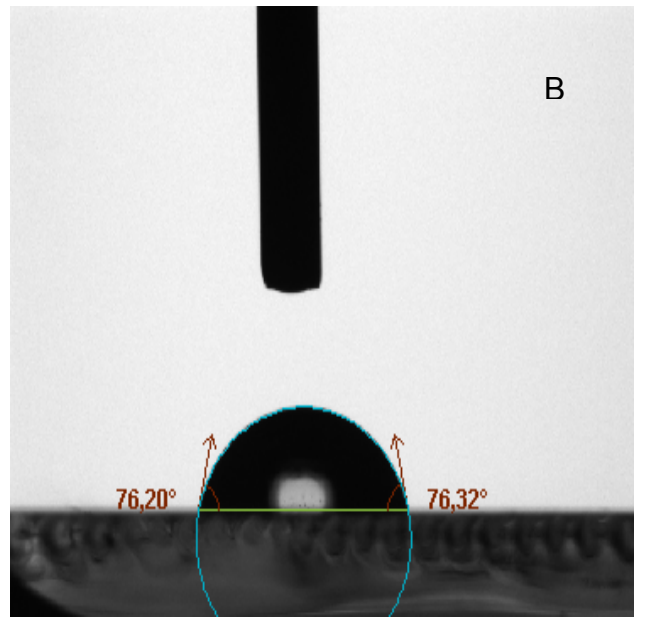
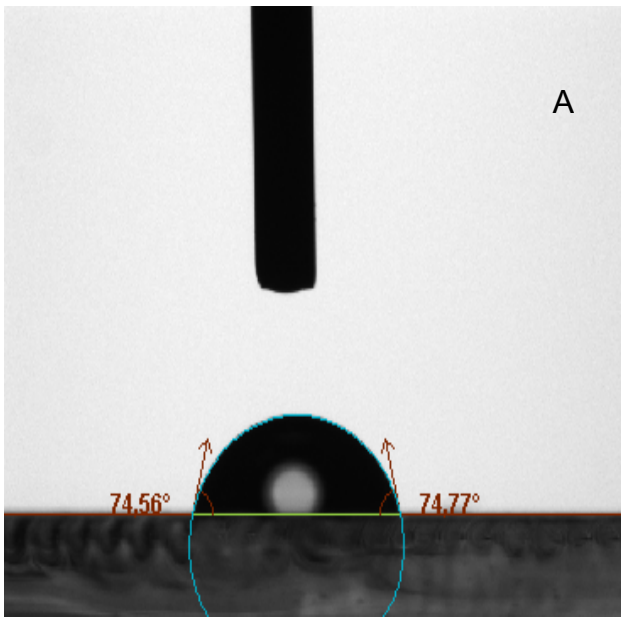
Şekil 3.12. A) PSA-MIP SPR çipine ait FT-IR analiz sonucu, B) Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerine ait çakışık FT-IR görüntüsü

3.1.6. Temas Açısı ve Yüzey Gerilimi Ölçümü

Temas açısı, damla görüntülerini kaydederek zamana bağlı damla şeklini otomatik olarak analiz eder. Damla şekli, sıvının yüzey geriliminin, sıvı ile sıvıyı çevreleyen ortam arasındaki yoğunluk farkının bir fonksiyonudur. Katı yüzeylerde, damla şekli ve temas açısı maddenin serbest yüzey enerjisine bağlıdır. Temas açısı, yüzey gerilimi, ara yüzey gerilimi ve serbest yüzey enerjisi ölçümleri; ıslanabilirlik, sıvı emilimi, sıvıyı yüzeyde tutma, sıvı yayılması, yüzey temizliği, yüzey heterojenliği, emülsiyon kararlılığı, vb. gibi malzeme özellikleri hakkında bilgi sağlar.

Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çipinin temas açısı değerleri KSV/Attention Theta (Boston, ABD) temas açısı ve yüzey gerilim ölçüm cihazı ile belirlenmiştir. Çizelge 3.1’de modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerine ait yüzey temas açıları özetlenmektedir.

Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü üzere (Çizelge 3.1), modifiye edilmemiş SPR çipinin yüzey temas açısı değeri ($75.56^\circ \pm 2.47$), allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyinde $74.55^\circ \pm 2.38$ ’e düşmüş ve PSA baskılandıktan sonra da $73.59^\circ \pm 2.42$ ’ye düşmüştür. Yüzeyin temas açısının düşmesi, yüzeyin hidrofilik özelliğinin ve ıslanabilirliğinin arttığının bir göstergesidir. Temas açısındaki düşme, ilk aşamada yüzeyin allil merkaptan ile kaplandığının bir göstergesidir. Son aşamada temas açısındaki düşme, yüzeyde metakrilik asit temelli hidrofilik bir monomerin kullanımıyla gerçekleştirilen PSA baskılama işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır. Şekil 3.13’de temas açısı ölçümleri alınan modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çiplerine ait temas açısı görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 3.13. A) Modifiye edilmemiş, B) Alil merkaptan ile modifiye edilmiş, C)PSA-MIP SPR çipine ait temas açısı görüntüleri

Çizelge 3.1. Modifiye edilmemiş, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve PSA-MIP SPR çipine ait temas açısı ölçümleri

SPR çipi	Temas Açısı Ortalaması (°)	Hacim (µL)
Altın yüzey	75.56 ± 2.47	2.68
Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipi	74.55 ± 2.38	2.57
PSA-MIP SPR çipi	73.59 ± 2.42	2.40

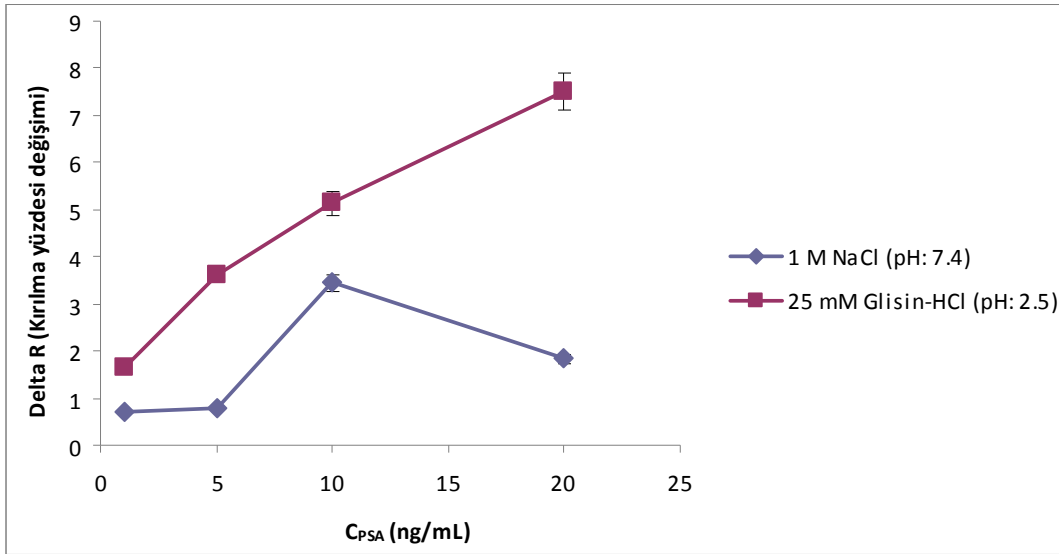
3.2. PSA Baskılanmış SPR Çipleri ile Kinetik Analizler

PSA baskılanmış SPR çipleri ile kinetik çalışmalar kapsamında şu parametreler incelenmiştir:

3.2.1. Desorpsiyon Çözeltisinin PSA Tayini Üzerine Etkisi

PSA-MIP çipine bağlanan PSA'yı etkili bir şekilde desorbe edebilecek desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl (pH: 7.4) ve 25 mM Glisin-HCl (pH: 2.5) incelenmiştir. 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanan 1 ng/mL ile 20 ng/mL derişim aralığında hazırlanan PSA çözeltileri sistemden geçirildiğinde, Şekil 3.14'de gösterildiği gibi, en fazla kırılma yüzdesi değişimi (ΔR) desorpsiyon ajanı olarak 25 mM Glisin-HCl (pH: 2.5) kullanıldığında ölçülmüştür. 1 M NaCl (pH: 7.4)'ün

desorpsiyon ajanı olarak kullanıldığı durumda, Şekil 3.14'den de görüldüğü gibi normalde artan PSA derişimi ile orantılı olarak artması gereken ΔR değeri, 10 ng/mL PSA derişiminden sonra azalmaktadır. Ayrıca incelenen tüm derişimlerde gözlenen ΔR değeri, 25 mM Glisin-HCl (pH: 2.5)'in desorpsiyon çözeltisi olarak kullanıldığı durumdaki kadar yüksek değildir. Bunun sebebi, 1 M NaCl (pH: 7.4)'ün yüzeye bağlanan PSA'yı etkili bir şekilde desorbe edememesidir. Dolayısıyla yüzeydeki boşluklara bağlanan PSA etkili bir şekilde desorbe olamadığı için, bir sonraki analizde yüzeye bağlanabilecek PSA derişimi, belirli bir değerden sonra artmak yerine azalmaktadır. Bu yüzden bundan sonraki tüm analizlerde desorpsiyon ajanı olarak 25 mM Glisin-HCl (pH: 2.5) kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 3.14. Desorpsiyon çözeltisinin PSA tayini üzerine etkisi (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)

3.2.2. Sulu Çözeltiden PSA Tayini

PSA derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanmış 0.1 ng/mL ile 50 ng/mL derişim aralığında PSA çözeltileri hazırlanmıştır. Şekil 3.15'de farklı derişimlerdeki PSA çözeltileri ile kırılma yüzdesindeki değışimi gösteren sensorgramlar görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, PSA derişimi arttıkça ΔR değeri, beklenildiği üzere,

artmıştır. Bunun sebebi, çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.

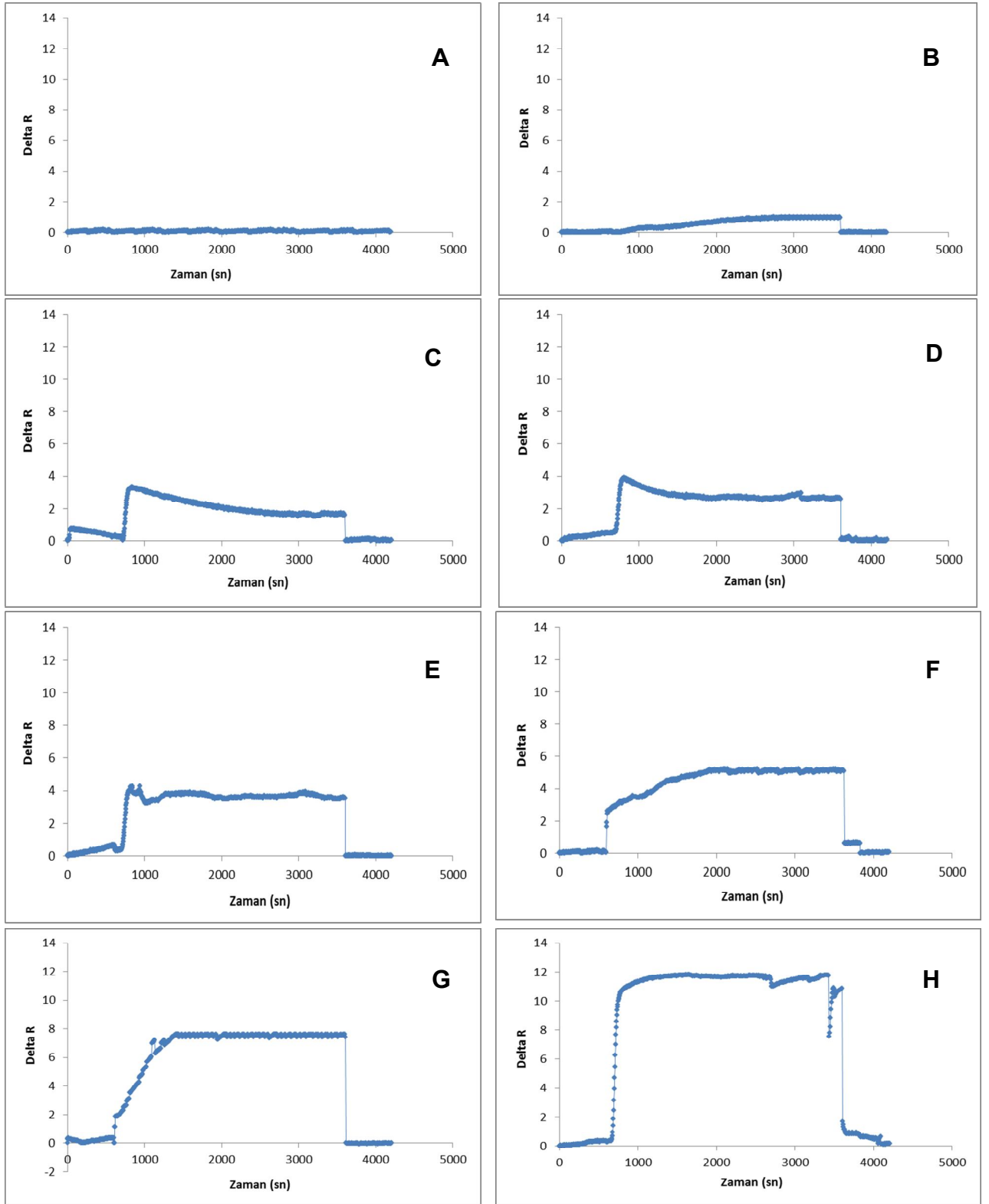
Her bir analiz öncesinde sistemden 10 dakika süresince denge tamponu (10 mM fosfat, pH: 7.4) geçirilmiştir. Daha sonra 50 dakika süresince, sistem dengeye ulaşana kadar, denge tamponu içinde hazırlanmış örnek çözeltileri sistemden geçirilmiştir. Son aşamada desorpsiyon çözeltisi (25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5) 10 dakika süresince sistemden geçirilerek yüzeye bağlanan PSA'nın desorpsiyonu gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.16A'da görüldüğü gibi sistemden sadece denge tamponu geçirildiğinde, ΔR değerinde bir değişim olmamıştır. En yüksek ΔR değeri, en yüksek PSA derişimi olan 50 ng/mL'de 11.56 olarak belirlenmiştir.

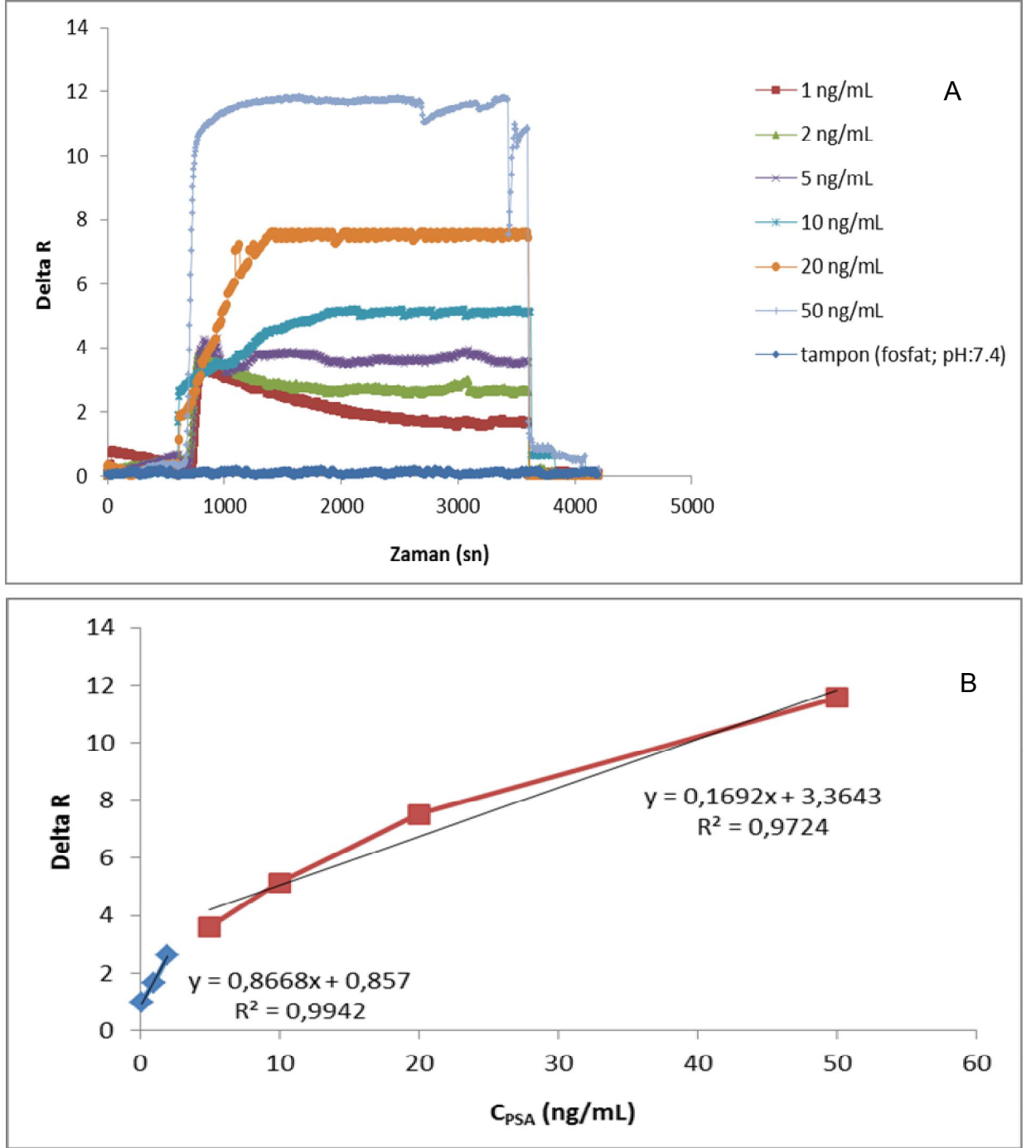
Şekil 3.16B'de görüldüğü gibi, SPR sensörü iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0.1 ng/mL ile 50 ng/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde, elde edilen doğruların denklemi; ($y = 0.8668x + 0.857$), ($y = 0.1692x + 3.3643$) ve doğrusallıkları (R^2) sırasıyla 0.9942 ve 0.9724 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, PSA moleküllerinin sensör yüzeyine iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlandığını göstermektedir. Başka bir deyişle hazırlanan PSA-MIP sensör, 0.1 ng/mL-2 ng/mL derişim aralığını yaklaşık % 99.5 ng/mL-50 ng/mL derişim aralığını % 97 doğrulukla ölçebilmektedir. Prostat kanseri tayini için eşik olarak kabul edilen değer 4.0 ng/mL olduğu ve 2.5 ng/mL PSA değerinin kanser şüphesi açısından riskli olduğu bilindiği için, sensörün düşük PSA derişiminde doğrusallığının yüksek olması oldukça önemlidir.

Hazırlanan PSA-MIP sensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (Limit of Detection-LOD) değeri belirlenmiştir. Kör (denge) çözelti için ΔR değeri, yaklaşık 10 ölçümün ortalaması alınarak 0.04863 ± 0.0128 olarak belirlenmiştir. Denge (kör) çözeltisi geçerken alınan sinyalin 3 katı olarak tanımlanan tayin limiti [276] 90.85 pg/mL olarak hesaplanmıştır.

Prostat kanserinin erken teşhisi için kullanılacak bir yöntemin mümkün olduğunca, PSA için belirlenen eşik değer olan 4.0 ng/mL'nin altında tayin yapılabilmesi gerekmektedir. Hazırlanan sensör belirlenen tayin limiti (LOD) değeri ile prostat kanseri teşhisini başarıyla gerçekleştirebilecek özelliğe sahiptir.



Şekil 3.15. PSA çözeltileri ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar; (A) denge tamponu, B) 0.1 ng/mL, C) 1.0 ng/mL, D) 2.0 ng/mL, E) 5.0 ng/mL, F) 10 ng/mL, G) 20 ng/mL, H) 50 ng/mL (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)



Şekil 3.16. A) PSA çözeltileri ile PSA-MIP SPR sensörü arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar, B) PSA-MIP SPR sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki (kalibrasyon grafiğı)

3.2.2.1. Kinetik Analizler

-Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlenin derişime dönüştürölme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücreinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (3.1)$$

Burada; $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değışim hızı; R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal; C , analit derişimi (ng/mL), k_a , bağlanma hız sabiti (mL/ng.s) ve k_d , ayrılma hız sabiti (1/s)'dir. Bağlanma sabiti K_A (mL/ng), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A = k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (3.2)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

-Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 3.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (3.3)$$

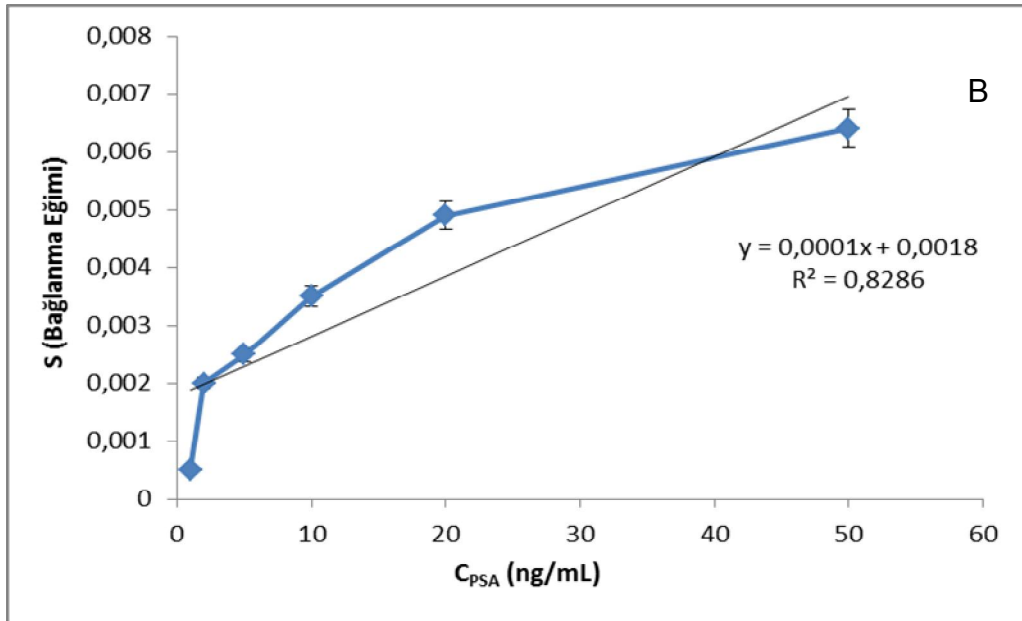
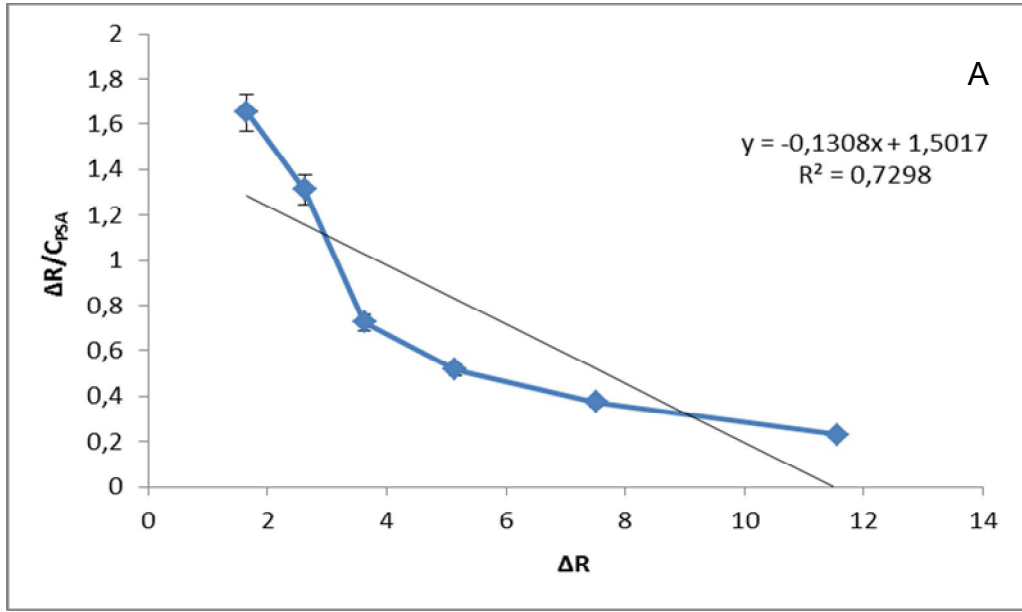
eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erıştirmek için çok yüksek analit derişimlerine gerek olduğu için R_{maks} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d \quad (3.4)$$

S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (3.5)$$

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir [277]. Şekil 3.17'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.17. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi; (A) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard), B) Bağlanma kinetik yaklaşımı

Çizelge 3.2. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	11.481	k_a , ng/mL.s	0.0001
K_A , ng/mL	0.1308	k_d , 1/s	0.0018
K_D , mL/ng	7.645	K_A , ng/mL	0.056
R^2	0.7298	K_D , mL/ng	17.86
		R^2	0.8286

3.2.2.2. Denge İzoterm Modelleri

PSA-MIP SPR sensörü ile PSA arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır. Bunlar: Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleridir.

$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \{\Delta R_{maks}[C]/K_D + [C]\} \quad (3.6)$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{maks}[C]^{1/n} \quad (3.7)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \{\Delta R_{maks}[C]^{1/n}/K_D + [C]^{1/n}\} \quad (3.8)$$

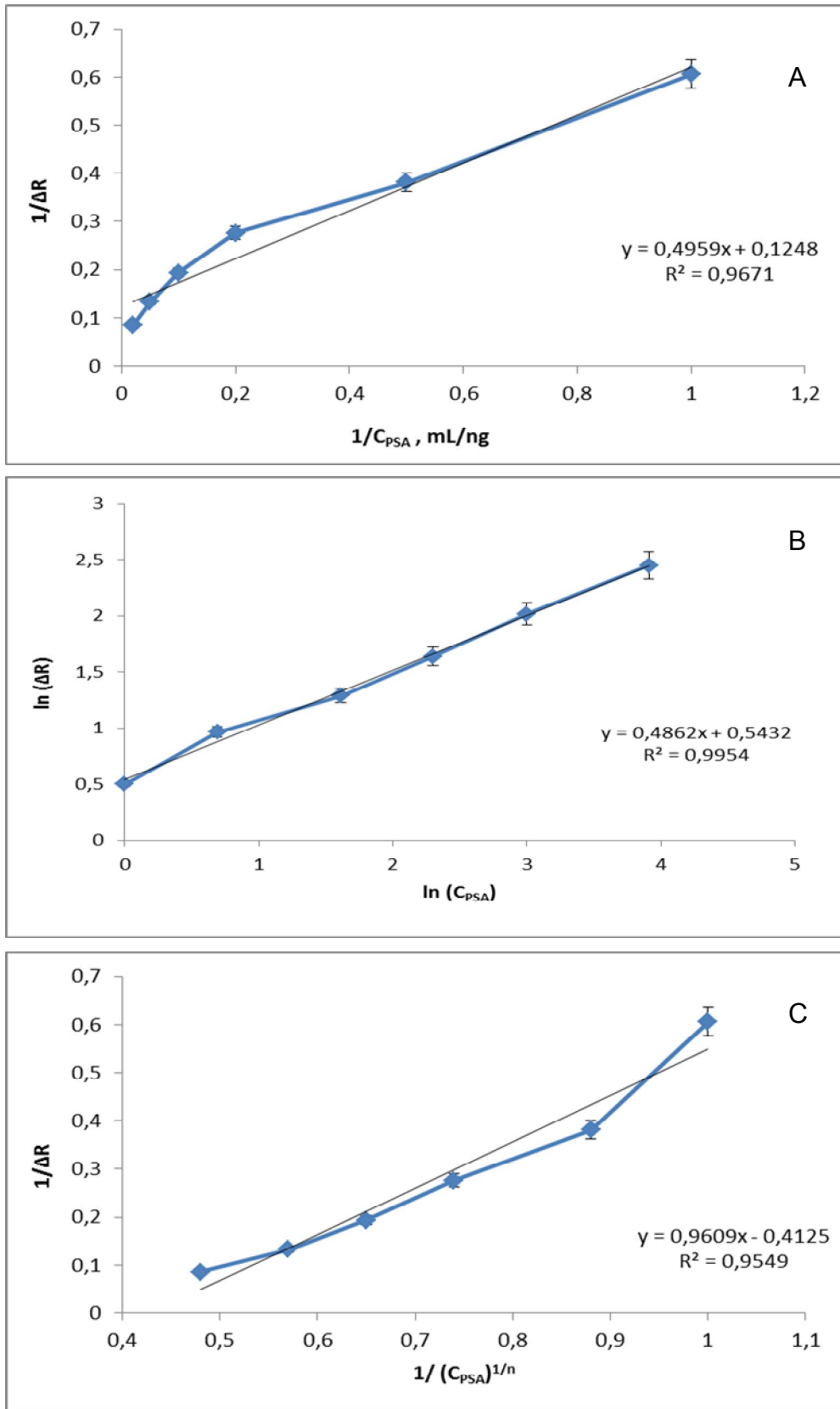
Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR_{denge} , denge halindeki SPR sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi (ng/mL); K_A (ng/mL), bağlanma denge sabiti; K_D (mL/ng), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

Langmuir izotermine adsorpsiyon, adsorplanan maddenin başlangıç derişimi ile birlikte lineer olarak artar. Maksimum doyma noktasında, yüzey tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeye adsorbe olmuş madde miktarı sabit kalmaktadır. Langmuir

izoterminde adsorpsiyon enerjisi üniformdur. Adsorpsiyon, adsorplanan madde miktarı ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorpsiyon alanları ile doğru orantılıdır. Özellikle tek tabakalı adsorpsiyonun meydana geldiği heterojen adsorpsiyon sistemlerinde bu izoterm denge durumunu net olarak açıklayamaz.

Freundlich'e göre, bir adsorban yüzeyi üzerinde bulunan adsorpsiyon alanları heterojendir yani farklı türdeki adsorpsiyon alanlarından teşkil edilmiştir. Freundlich izoterminde ana fikir olarak Langmuir izoterminden yola çıkılarak bazı varsayımlar ve gelişimler yapılarak bu eşitlik elde edilmiştir. Langmuir eşitliğinden farklı olarak, düşük konsantrasyonda Henry kanununu uygulamaz ve dengeden sonra tam sabit bir adsorplanan madde miktarı değeri elde edilemez.

Homojen bağlanma varsayımına dayanan Langmuir adsorpsiyon modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [278]. MIP'lerin bir miktar heterojen bağlanma bölgelerine sahip olduğu da rapor edilmiştir [279, 280]. Freundlich adsorpsiyon modeli özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir [279]. Langmuir-Freundlich modeli (LF), heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doygunluğa kadar MIP sistemleriyle uygunluk göstermektedir [280]. Şekil 3.18'de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmektedir.



Şekil 3.18. Adsorpsiyon modelleri; A) Langmuir, B) Freundlich, C) Langmuir-Freundlich

Çizelge 3.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{maks} , RIU	8.013	ΔR_{maks} , RIU	1.722	ΔR_{maks} , RIU	2.42
K_D , mL/ng	3.974	1/n	0.1893	1/n	0.1893
K_A , ng/mL	0.252	R^2	0.9954	K_D , mL/ng	2.33
R^2	0.9671			K_A , ng/mL	0.429
				R^2	0.9549

Şekil 3.18'e göre deneysel olarak elde edilen veriler Freundlich adsorpsiyon modeli ile en uyumludur ($R^2=0.9954$). Bu sonuç, hazırlanan PSA baskılanmış sensör yüzeyindeki PSA bağlanma bölgelerinin heterojen olduğunu göstermektedir.

Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3 'de verilmektedir.

3.2.3. Yarışmalı Kinetik Analizler

HSA, IgG ve Lyz moleküllerinin PSA'ya göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir.

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (3.9)$$

Eşitlikte K_d , dağılıma katsayısını (mL/ng); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (ng/mL); V , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir [277]. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda; seçicilik katsayısı,

(3.10)

$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}}$$

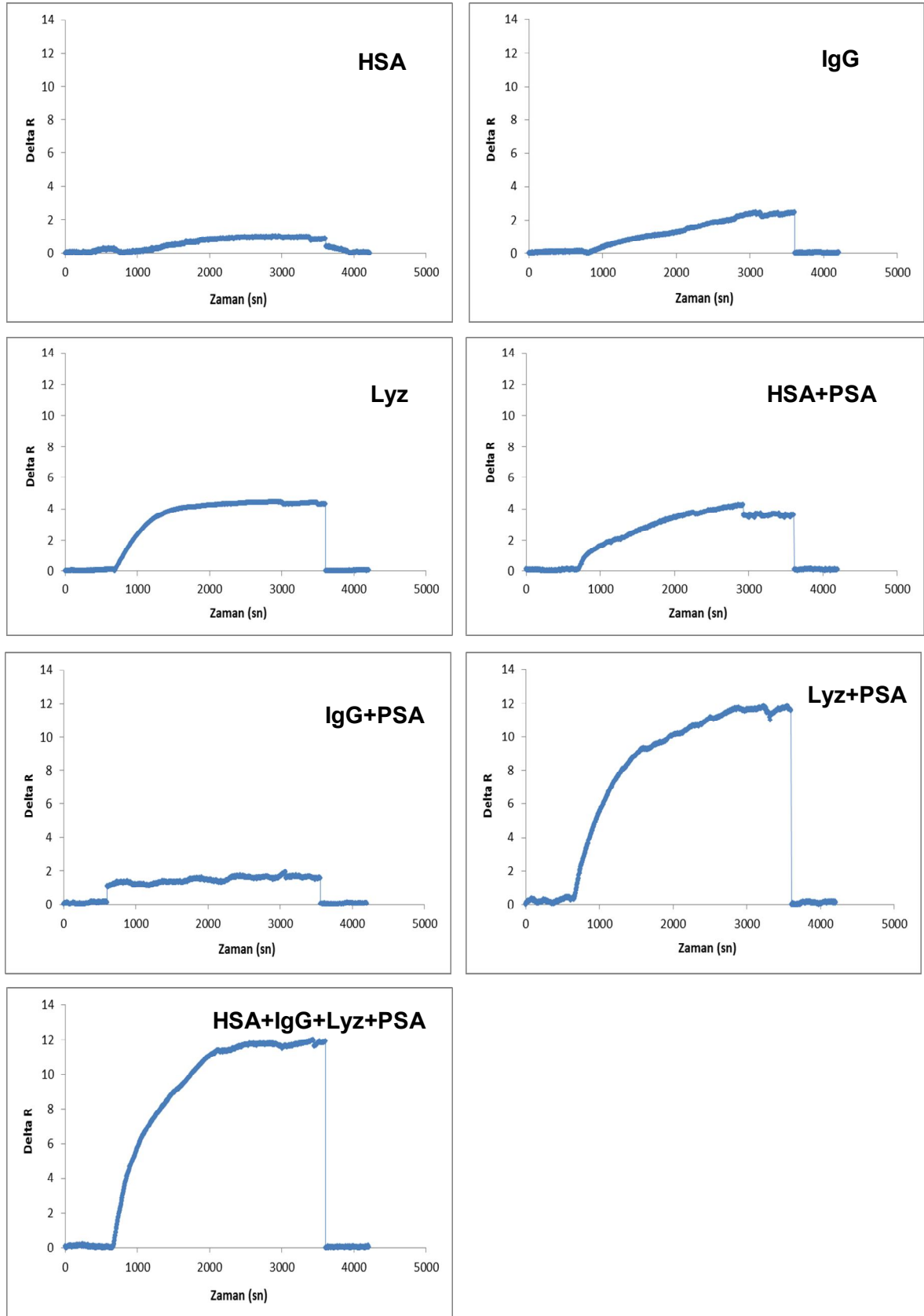
şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}}$$

(3.11)

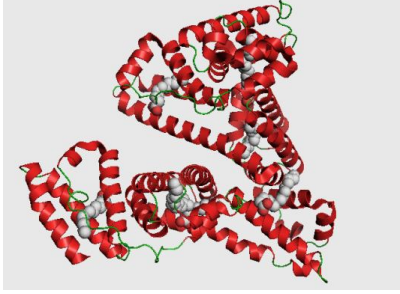
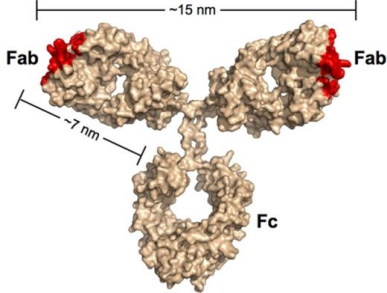
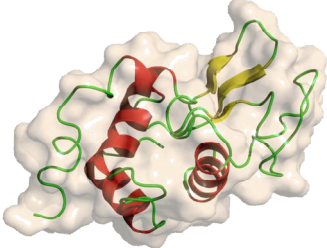
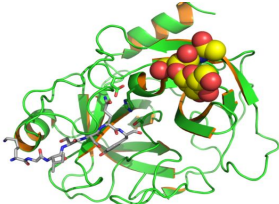
şeklinde ifade edilebilir.

Hazırlanan PSA baskılanmış sensörün PSA'ya karşı seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla, yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanmış 10 ng/mL derişimindeki HSA, IgG, Lyz ve PSA'nın tekli, ikili ve dördü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün bu proteinlere verdiği tepki Şekil 3.19'daki sensorgramlarda görülmektedir. Yarışmalı kinetik analizlerinde kullanılan proteinler ve özellikleri Çizelge 3.4'de özetlenmektedir.



Şekil 3.19. HSA, IgG, Lyz ve PSA proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (protein derişimi: 10 ng/mL; denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C)

Çizelge 3.4. Seçicilik çalışmalarında kullanılan yarışmacı proteinler ve özellikleri

Protein	Molekül ağırlığı (kDa)	İzoelektrik noktası (pI)	Şekil
HSA (İnsan serum albümini)	66.5 kDa	4.7	
IgG (İmmunoglobulin G)	150 kDa	6.6-7.2	
Lyz (Lizozim)	14.3 kDa	11.35	
PSA (Prostat Spesifik Antijen)	30-34 kDa	6.8-7.5	

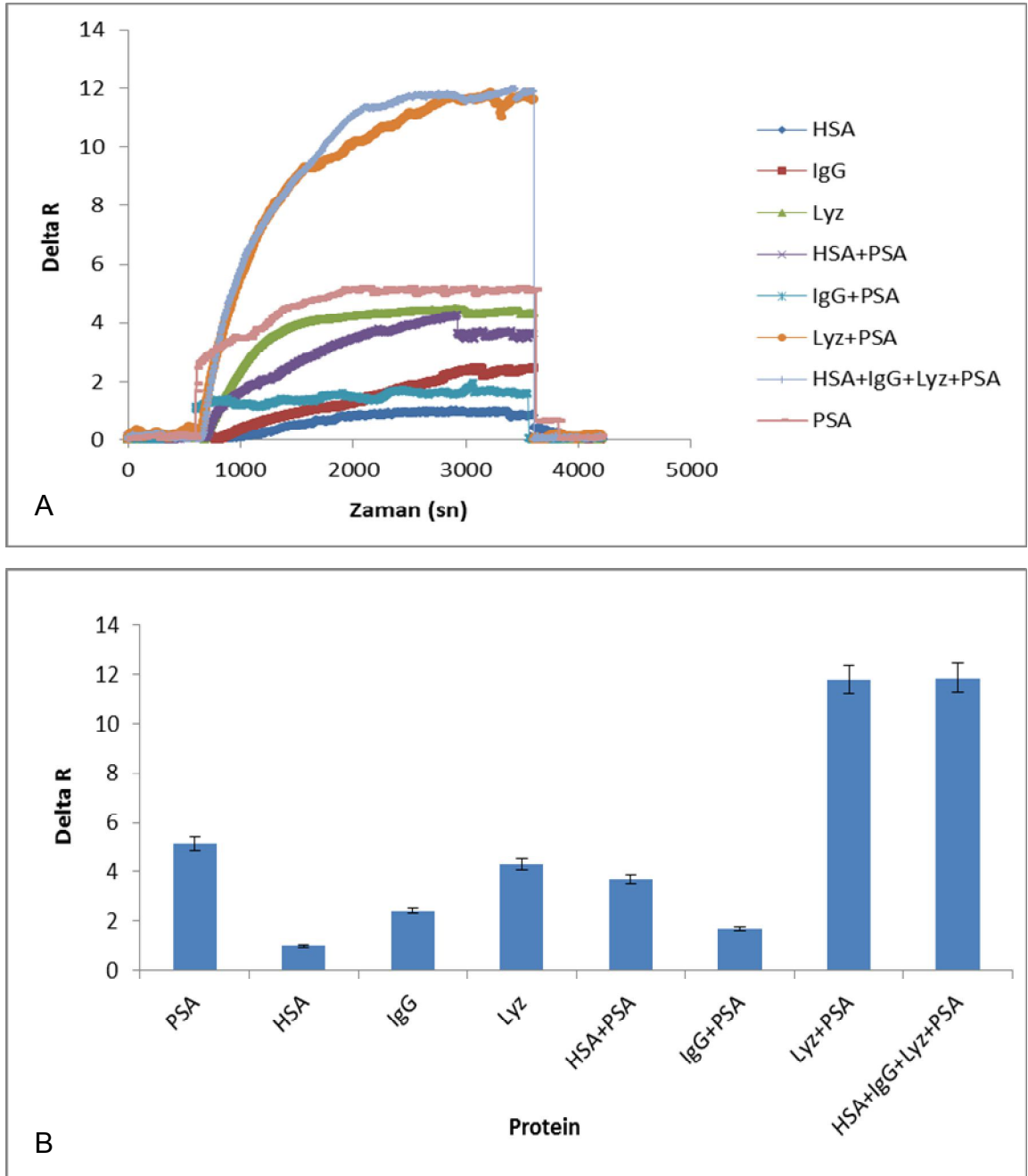
HSA ve IgG, kanda PSA'ya kıyasla milyon kat fazla derişimde bulunan, kanın en baskın proteinleri olmalarından dolayı, Lyz ise PSA'ya göre oldukça küçük olan molekül ağırlığı nedeniyle yarışmacı proteinler olarak seçilmiştir.

Şekil 3.19 incelendiğinde, PSA baskılanmış sensörün HSA için çok düşük bir sinyal ($\Delta R=0.96$) verdiği görülmektedir. HSA, molekül ağırlığı PSA'ya göre büyük (HSA= 66.5 kDa, PSA=30-34 kDa) ve izoelektrik noktası (pI) 4.7 değerinde olan bir proteindir. Proteinlerin sulu çözeltiden maksimum adsorpsiyonları elektrostatik açıdan pI'da pozitif ve negatif yük sayıları dengede olduğu için izoelektrik noktalarında gerçekleşir. Çalışılan pH olan 7.4'de HSA negatif yüklüdür. Bu da bu proteinin yüzeye bağlanmasını zorlaştırır.

Nitekim aynı sonuçlar IgG için değerlendirildiğinde sensörün verdiği cevap ($\Delta R=2.41$) HSA'ya göre daha yüksektir. Çünkü IgG molekülünün izoelektrik noktası (pI) 6.6 ile 7.2 arasındadır. Dolayısıyla molekülün izoelektrik noktası çalışılan pH değerine yakındır. Bu yüzden molekül ağırlığı bakımından PSA'ya göre çok büyük bir molekül olmasına karşın, pI değeri bakımından PSA'nın pI değerine oldukça yakındır.

Son olarak sensörün yarışmacı proteinler arasından en fazla Lyz'ye cevap verdiği ($\Delta R=4.31$) görülmüştür. Lyz molekülünün pI değeri 11.35'dir, dolayısıyla çalışılan pH değerinde pozitif yüklüdür. Ancak lizozim PSA'ya göre molekül ağırlığı bakımından oldukça küçük bir molekül olduğu için PSA için oluşturulan boşluklara girmesi normaldir.

İkili karışımlar incelendiğinde, HSA ve IgG'nin PSA ile birlikte olduğu karışımlarda, PSA'nın tek başına olduğu duruma göre ΔR değerinde düşme görülmüştür. Bu durum, moleküllerin PSA ile karışım halinde iken yarışmacı ajan olarak davrandığını ve ΔR değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. Ancak lizozim için durum farklıdır. Lizozimin PSA ile birlikte olduğu ikili karışımda ve tüm yarışmacı ajanlarla birlikte bulunduğu dörütlü karışımda sensörün sinerjik bir etki ile cevap verdiği görülmüştür. Lizozimin içinde olduğu karışımların SPR sinyallerinin tekli çözeltilerdeki sinyallerin toplamından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.20).

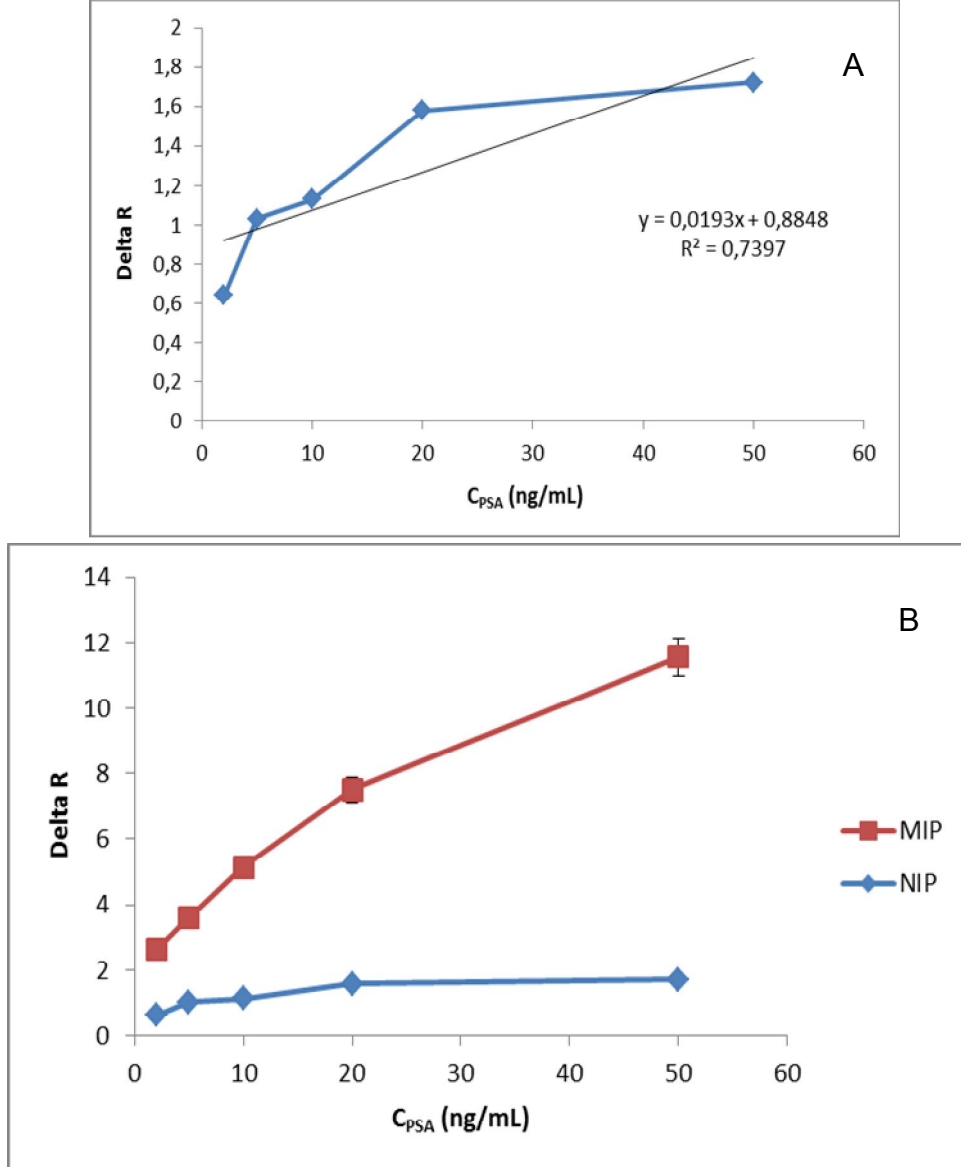


Şekil 3.20. A) Yarışmacı proteinler ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşime ait zamana karşı ΔR değişimini gösteren sensorgramların çakışık görüntüsü, B) PSA-MIP SPR sensör ile yarışmacı proteinler arasındaki ilişki (Protein derişimleri; HSA: 1.20×10^{-9} M, IgG: 2.71×10^{-9} M, Lyz: 0.26×10^{-9} M, PSA: 0.61×10^{-9} M)

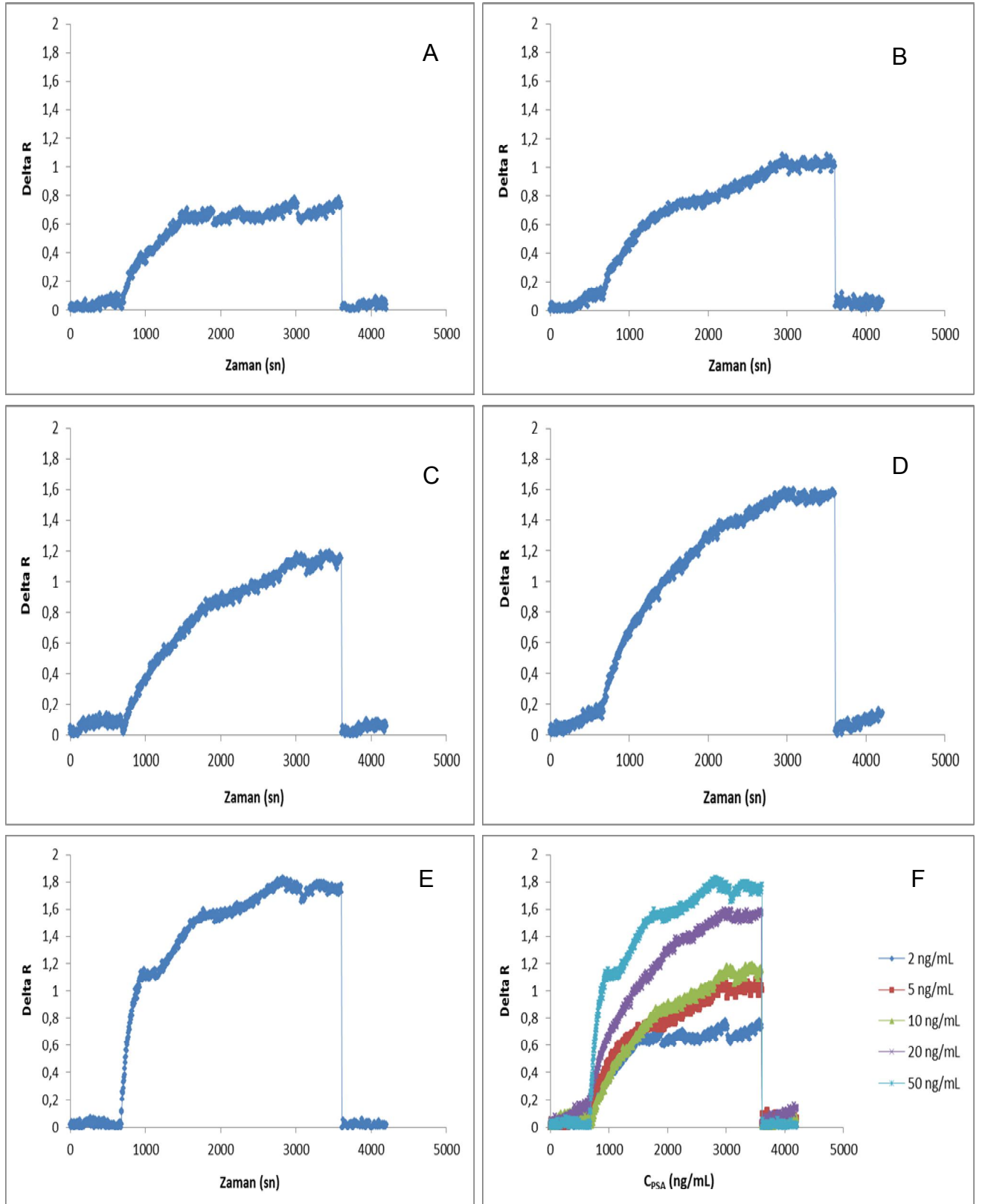
3.2.4. PSA Baskılanmış Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

PSA-MIP sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için PSA baskılanmamış NIP çipi de hazırlanmıştır. Öncelikle hazırlanan bu çip ile PSA tayini gerçekleştirilmiştir. 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanmış 2 ng/mL ile 50 ng/mL

arasında değişen derişimlerdeki PSA çözeltileri sistemden geçirilmiştir. PSA derişimi arttıkça ΔR değerlerinin de arttığı görülmektedir. Yaklaşık 20 ng/mL derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasına bağlı olarak, bu artış hızı azalmakta ve dengeye ulaşılmaktadır (Şekil 3.22).



Şekil 3.21. A) NIP sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki (kalibrasyon grafiği), B) PSA-MIP SPR sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki ile NIP sensöre ait PSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişkinin karşılaştırılması



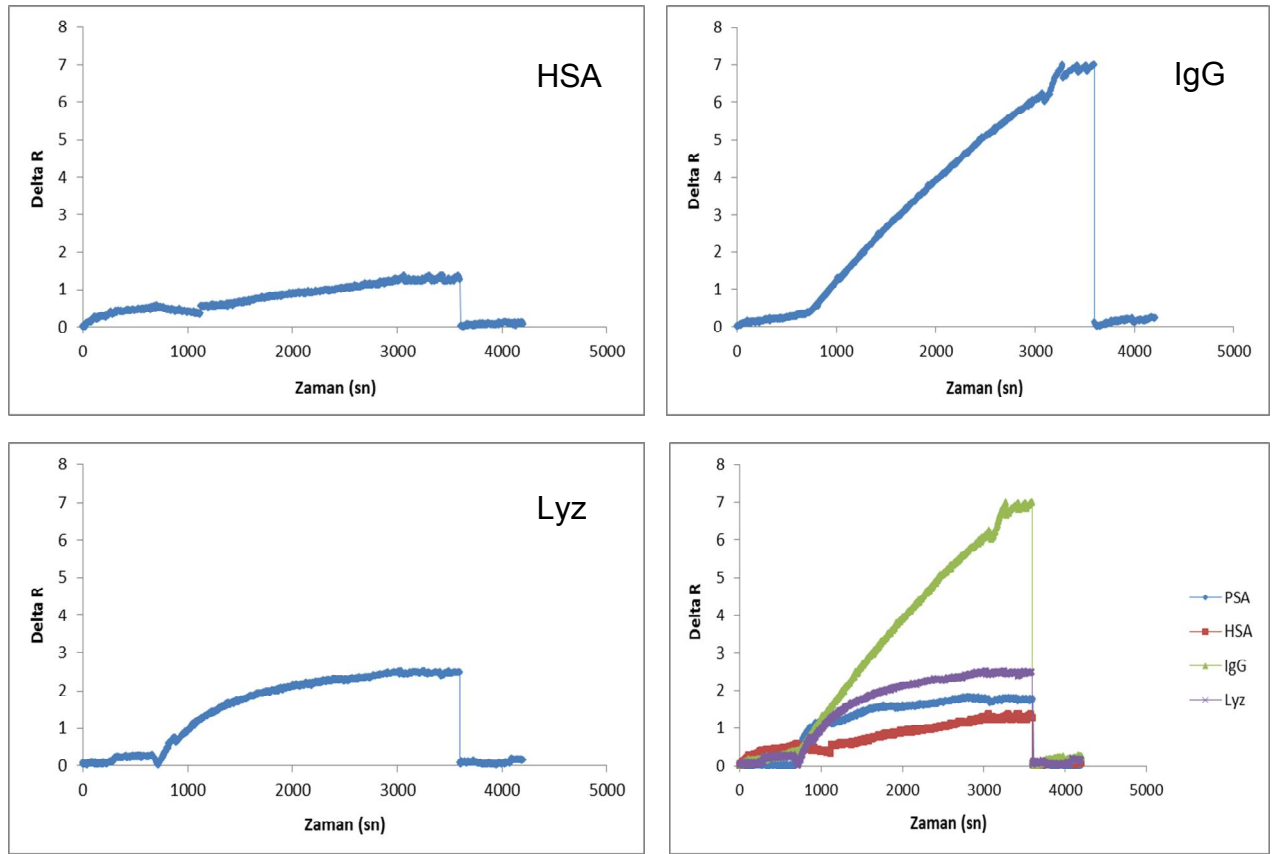
Şekil 3.22. PSA çözeltileri ile NIP sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar; A) 2.0 ng/mL, B) 5.0 ng/mL, C) 10 ng/mL, D) 20 ng/mL, E) 50 ng/mL, F) çakışık sensorgramlar (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)

Şekil 3.21’de görüldüğü gibi 2 ng/mL ile 50 ng/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 0.0193x + 0.8848$) ve doğrusallığı (R^2) 0.7397’dir. Hazırlanan sensör belirtilen derişim aralığında yaklaşık % 74 doğrulukta ölçüm yapmaktadır. Denge (kör) çözelti geçerken alınan sinyalin 3 katı olarak tanımlanan tayin limiti (LOD) NIP sensör için 3.75 ng olarak hesaplanmıştır [276]. Dolayısıyla elde edilen veriler PSA-MIP sensör ile kıyaslandığında ölçüm aralığı, doğrusallığı ve tayin limiti açısından NIP sensörün etkinliği oldukça düşüktür.

Hazırlanan NIP sensörün yarışmacı proteinler olan HSA, IgG ve Lyz’ye olan cevabı da incelenmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (10 mM, pH: 7.4) 10 ng/mL derişiminde hazırlanmıştır. NIP sensörün bu proteinlere verdiği cevap Şekil 3.23’de görülmektedir.

Çizelge 3.5’de görüldüğü gibi, NIP sensörün PSA ($\Delta R = 1.68$) ve HSA’ya ($\Delta R = 1.27$) verdiği cevap birbirine oldukça yakındır. Lyz ($\Delta R = 2.49$) için onlara göre biraz fazla ancak yine de bu değerlere yakın cevap vermiştir. NIP sensör en fazla cevabı IgG ($\Delta R = 6.76$) molekülüne karşı göstermiştir. PSA-MIP ve NIP sensörler kıyaslandığında, PSA sinyalinin ΔR değerinin 5.146’dan 1.68’e düştüğü görülmektedir. Eşitlik 3.10 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, PSA baskılanmış sensörün PSA’yı HSA’ya göre 5.36 kat, IgG’ye göre 2.14 kat, Lyz’ye göre 1.19 kat daha yüksek seçicilikte tanıdığını göstermektedir. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı (k') ise 4.05 (PSA/HSA), 8.59 (PSA/IgG) ve 1.77 (PSA/Lyz) olarak hesaplanmıştır. Bağıl seçicilik değeri 1’in ne kadar üzerinde ise baskılama işlemi o kadar etkindir.

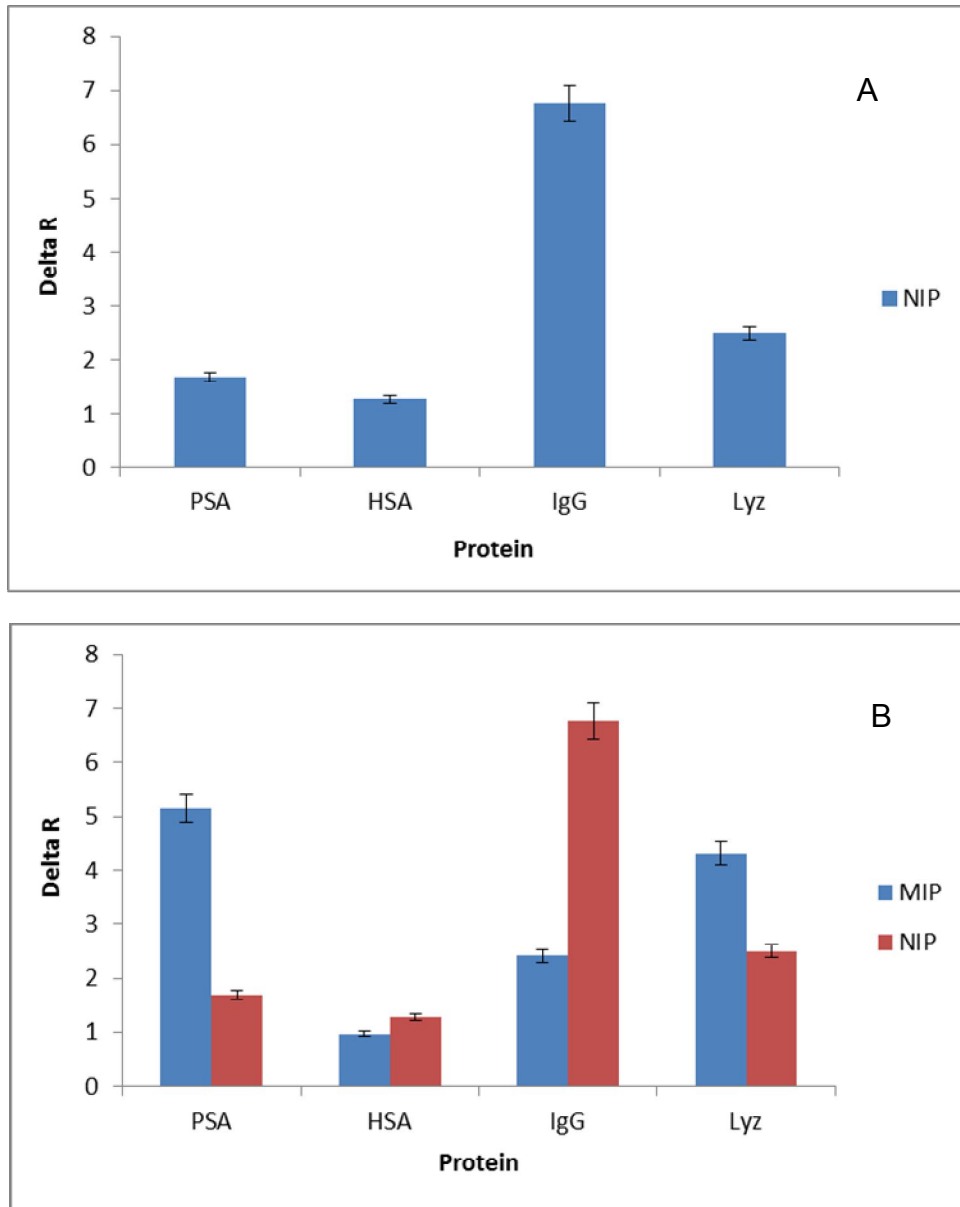
Şekil 3.24’de PSA-MIP sensörün yarışmacı proteinlere verdiği cevap ile NIP sensörün cevabı karşılaştırılmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde PSA-MIP sensörün NIP sensöre kıyasla PSA açısından oldukça seçici olduğu görülmektedir.



Şekil 3.23. HSA, IgG ve Lyz proteinleri ile NIP sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)

Çizelge 3.5. PSA'ya göre HSA, IgG ve Lyz için PSA-MIP ve NIP sensörlerin seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

	MIP				NIP		
Protein	Delta R	k		Protein	Delta R	k	k'
PSA	5.15	-		PSA	1.68	-	-
HSA	0.96	5.36		HSA	1.27	1.32	4.05
IgG	2.41	2.14		IgG	6.76	0.25	8.59
Lyz	4.31	1.19		Lyz	2.49	0.67	1.77

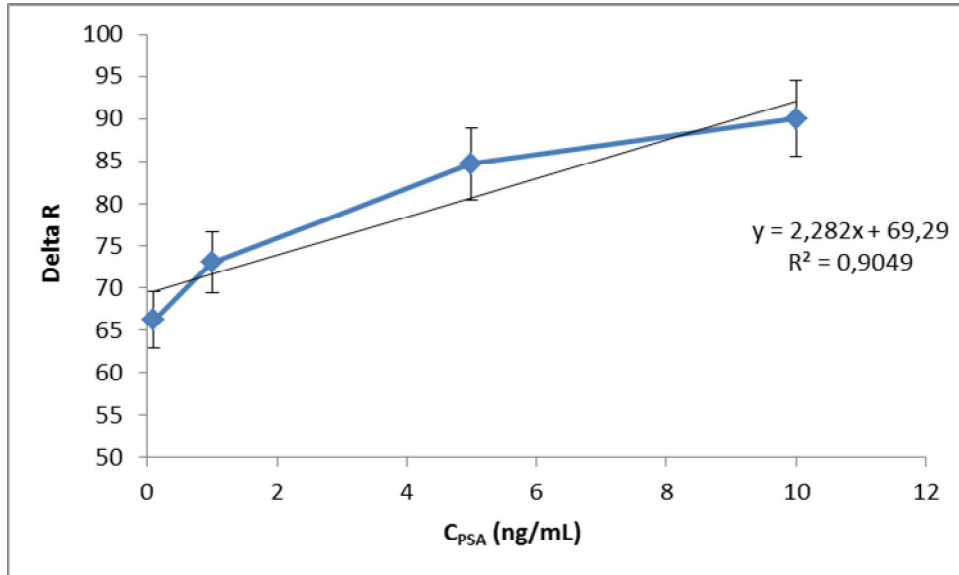


Şekil 3.24. A) NIP sensör ile yarışmacı proteinler arasındaki ilişki, B) PSA-MIP ve NIP sensörün yarışmacı proteinlere karşı gösterdiği ΔR cevabının karşılaştırılması

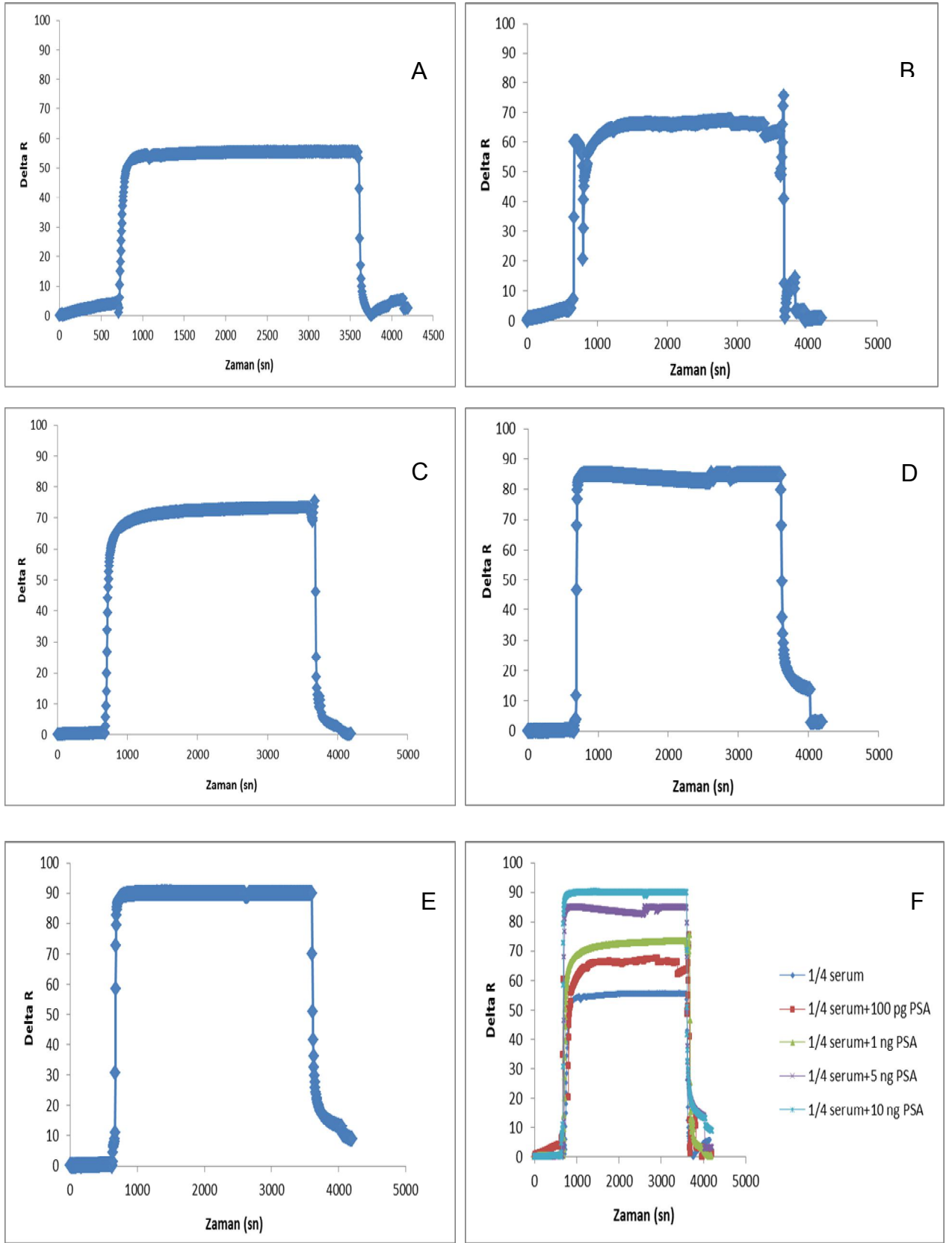
3.2.5. PSA Eklenen Sağlıklı İnsan Serum Örneklerinden PSA Tayini

Sağlıklı insan serum örneğinden PSA tayini için, 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile ¼ oranında seyreltilen serum örnekleri içerisine dışarıdan 100 pg/mL ile 10 ng/mL arasında değişen derişimde PSA eklenmiştir. Şekil 3.26'dan da görüldüğü gibi serum örneği içerisindeki PSA derişimi arttıkça ΔR değeri de artmaktadır. ¼ serum+100 pg/mL PSA ile ¼ serum+10 ng/mL PSA aralığındaki veriler değerlendirildiğinde, elde edilen doğrunun denklemi ($y=2.282x+69.29$) ve doğrusallığı (R^2) 0.9049'dur (Şekil 3.25). Hazırlanan sensör belirtilen derişim aralığında serum örneği içerisinde (1/4 seyreltilmiş) yaklaşık % 90 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir. Bu grafik denklemi bir sonraki analizde prostat kanserli hasta serumundan PSA analizi yapıldığında, sensörden geçirilen örneklerin, sensörün verdiği ΔR cevabına göre ne kadar PSA içerdiğinin bulunmasında kullanılmıştır.

Kan serumu oldukça kompleks bir ortamdır (su, proteinler, iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar, vb..). Bu karmaşık ortamdan PSA'nın doğrusal bir şekilde test edilebilmesi, geliştirilen sensörün klinikte hasta serumundan PSA tayini için kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu amaçla bir sonraki aşamada, prostat kanserli hastaların serum örneğinden PSA tayini gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.25. PSA-MIP sensöre ait serum örnekleri ile ΔR arasındaki ilişki (kalibrasyon grafiği)



Şekil 3.26. Serum örnekleri ile PSA-MIP SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar; A) 1/4 serum, B) 1/4 serum+0.1 ng/mL PSA, C) 1/4 serum+1.0 ng/mL PSA, D) 1/4 serum+5.0 ng/mL PSA, E) 1/4 serum+10 ng/mL PSA, F) toplu (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 µL/dak.; sıcaklık: 25 °C)

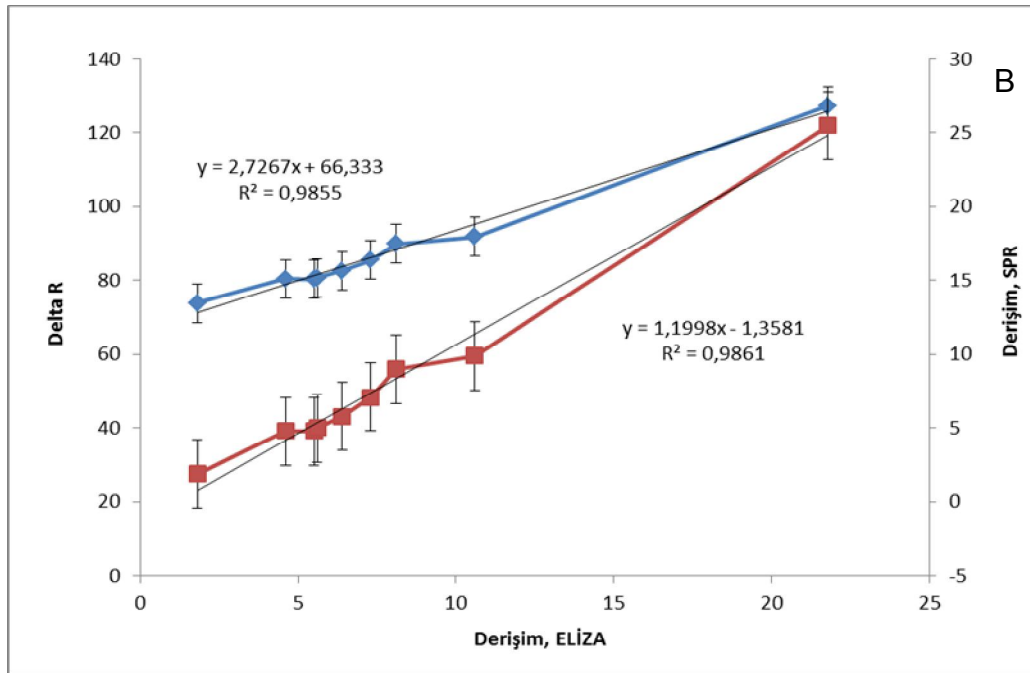
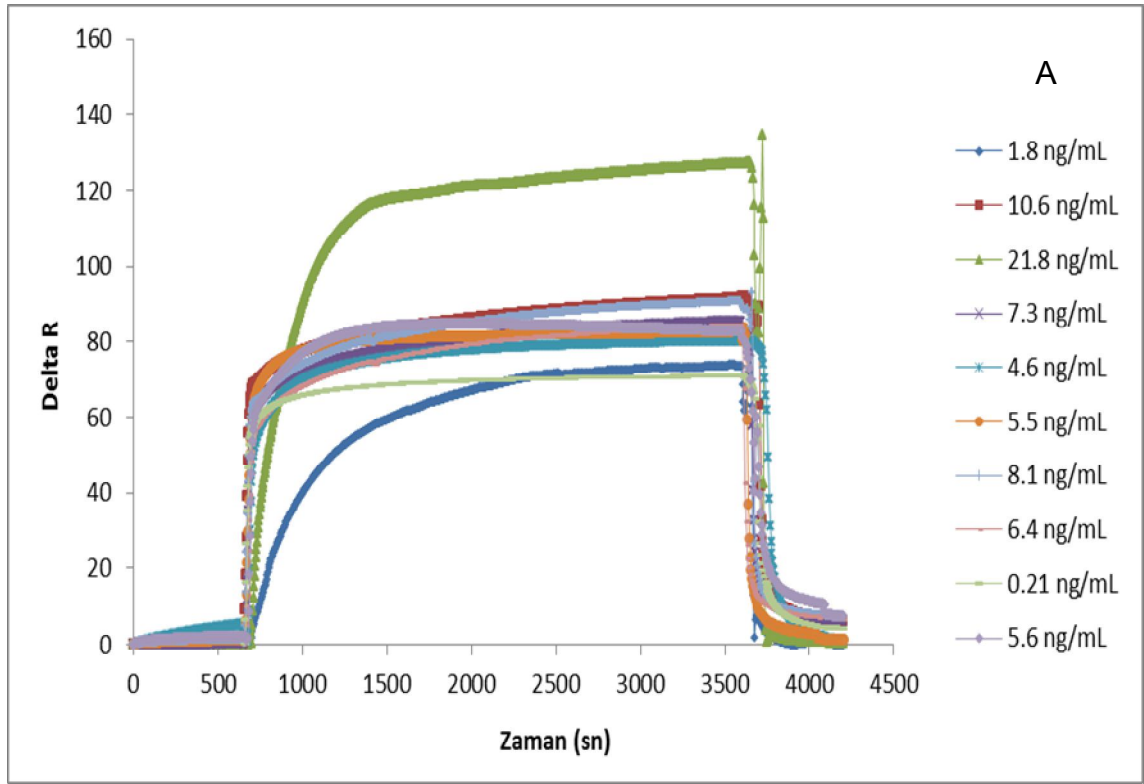
3.2.6. Prostat Kanseri Hastası Serumundan PSA Tayini ve Elde Edilen Sonuçların ELİZA ile Karşılaştırılması

PSA-MIP sensörün, prostat kanserli hasta örneklerinden PSA tayini için kullanılabilirliğinin araştırılması için, H.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji ABD'den prostat kanseri teşhisi konmuş, yaşları 50-83 arasında değişen hastalardan kan örnekleri alınmıştır (Etik Kurul Karar No: GO 13/135-28). 10 hastaya ait serum örnekleri 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde ¼ oranında seyreltilmiştir. Sistemden geçirilen kan örneklerine ait sensorgramlar topluca Şekil 3.27A'da gösterilmektedir. Sensorgramlardan elde edilen ΔR değerleri, $y=2.282x + 69.29$ denkleminde yerine konduğunda her bir hastaya ait PSA değeri hesaplanmıştır.

PSA baskılanmış SPR sensörün günümüzde PSA için kullanılan mevcut ELİZA yöntemi ile uyumluluğunun ve sensörün güvenilirliğinin test edilmesi amacıyla, ölçüm sonuçları CLI-ELİZA (Chemiluminescent Immunoassay-ELISA) ölçümleri ile karşılaştırılmıştır. Bunlara ait grafikler Şekil 3.27B'de görülmektedir. SPR ölçümleri ile ELİZA ölçümleri arasında yaklaşık % 98.6'lık doğrusallık olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.27B).

Ayrıca aynı kanserli hasta serumu örneklerinden % geri kazanım oranı da hesaplanmıştır. Buna göre serum örneklerinin içeriğindeki PSA değeri, SPR ile ölçüm sonrasında hesaplanan PSA değeri ile kıyaslanmıştır. Çizelge 3.6'da görüldüğü gibi, % 87.3 ile % 116.9 arasında değişen % geri kazanım oranı elde edilmiştir.

PSA tayini açısından, SPR yöntemi ile mevcut ELİZA yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı, Student T-testi kullanılarak incelenmiştir. p değeri 0.751 olarak hesaplanmıştır ($p>0.05$). Elde edilen sonuç bize iki yöntem arasında, PSA tayini açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir (Çizelge 3.7).



Şekil 3.27. A) Prostat kanserli hastalara ait serum örnekleri ile PSA-MIP sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar, B) ELİZA ve PSA-MIP sensöre ait derişim ile ΔR değerlerinin karşılaştırılması (denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)

Çizelge 3.6. Prostat kanserli hastalara ait serum örneklerinden % geri kazanım oranı

Serum No	İçerdiği PSA (ng/mL)	Hesaplanan PSA (ng/mL)	% Geri kazanım
1	1.8	1.9	105.6
2	10.6	9.9	93.4
3	21.8	25.5	116.9
4	7.3	7.1	97.3
5	4.6	4.8	104.3
6	5.5	4.8	87.3
7	8.1	9.0	111.1
8	6.4	5.8	90.6
9	0.21	0.22	104.8
10	5.6	5.0	89.3

Çizelge 3.7. PSA tayini açısından ELİZA ve SPR yönteminin istatistiksel olarak karşılaştırılması

PSA Tayin Yöntemi	*p Değeri
ELİZA (n=10)	*p=0.751
SPR (n=10)	

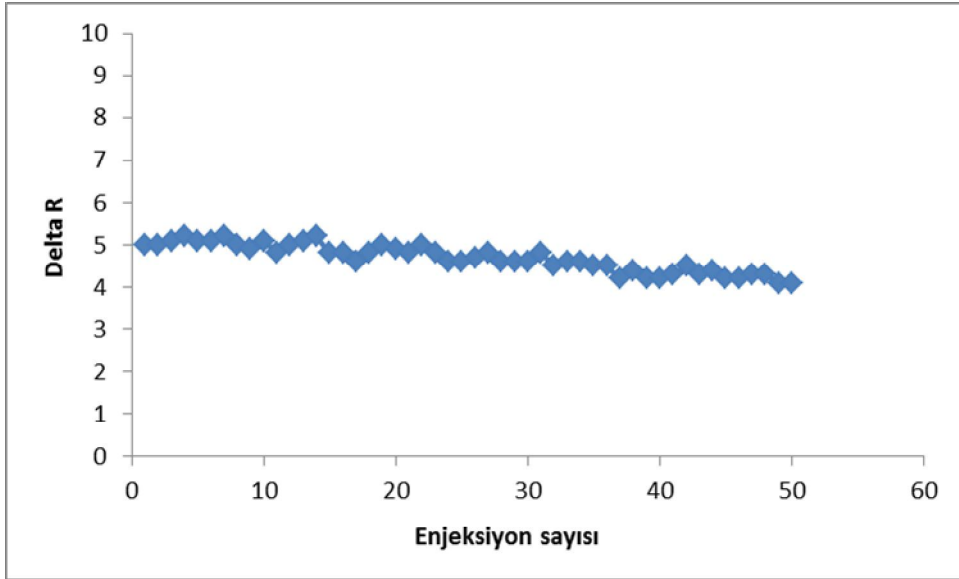
+: Student T-test

*: $p > 0.05$ (istatistiksel açıdan iki yöntem arasında, PSA tayini bakımından anlamlı bir fark yoktur)

3.2.7. PSA Baskılanmış Sensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

SPR temelli sensörlerin en önemli avantajlarından biri, tekrar kullanılabilir olmasıdır. Özellikle moleküler baskılanmış polimerler ile hazırlanan sensörlerde, polimerik yapının sağlamlığı, çevresel koşullara karşı dayanıklılığı ve uzun süren raf ömrüne sahip olmaları nedeniyle, tanıma elementi olarak biyolojik moleküllerin kullanıldığı sensörlere göre çok daha uzun süre tekrar kullanılabilme kapasitesine sahiptir.

PSA-MIP sensörün tekrar kullanılabilirliğini test etmek amacıyla, 10 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde hazırlanan 10 ng/mL derişimindeki PSA çözeltisi art arda 50 kez sistemden geçirilmiştir. Şekil 3.28'den de görüldüğü gibi, sensörün ΔR cevabında ciddi bir düşüş olmadan hazırlanan sensör PSA'yı tayin edebilmektedir. Ayrıca tez kapsamında yapılan tüm analizlerin 3 tekrarlı olmak üzere aynı PSA-MIP SPR çipi ile yapıldığı düşünüldüğünde hazırlanan sensörün yüksek bir tekrarlanabilirlik oranı ile PSA tayini için kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.



Şekil 3.28. PSA-MIP SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği (PSA derişimi: 10 ng/mL; denge tamponu: 10 mM fosfat, pH: 7.4; desorpsiyon ajanı: 25 mM Glisin-HCl, pH: 2.5; akış hızı: 150 μ L/dak.; sıcaklık: 25 $^{\circ}$ C)

- Yapılan tez çalışması kapsamında, prostat kanseri tayininde önemli bir biyo-belirteç olan PSA'nın klinik örneklerden eş zamanlı, ultra hassas ve seçici tayini için biyosensör geliştirilmesi ve geliştirilen biyosensörün günümüzde PSA tayini için rutin olarak kullanılan, ticari bir yöntem olan ELİZA yöntemi ile doğruluğunun ve güvenilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır.
- Yapılan tez çalışmasında, PSA, mikrotamas baskılama yöntemi ile önceden allil merkaptanla modifiye edilmiş SPR çipi yüzeyine baskılanmıştır. Literatürde, PSA'nın mikrotamas baskılama yöntemi ile SPR çip yüzeyine baskılanması yolu ile tayinine yönelik bir biyosensör çalışması bulunmamaktadır. Mikrotamas baskılama yönteminin geleneksel moleküler baskılama yöntemine göre, özellikle makromoleküller ile çalışırken sunduğu birtakım avantajlar vardır. Farklı kompozisyondaki MIP'lerin hızlı ve paralel sentezini mümkün kılar. Sadece birkaç mikrolitrelik monomer çözeltisi ile aynı anda düzinelerce örnek aynı anda polimerleştirilebilir. Bu yüzden özellikle kısıtlı sayıdaki ve pahalı kalıp moleküllerin kullanıldığı moleküler baskılama çalışmalarında mikrotamas baskılama yöntemi tercih edilmektedir [281]. Bu yöntem, proteinler gibi makromoleküller ile çalışılırken karşılaşılan çözünürlük ile ilgili problemlerin yaşanmasını da engeller, çünkü bu yöntemde kalıp molekül, polimerizasyon işlemi öncesinde monomer çözeltisi ile temas etmez. Aynı zamanda bu durum, uygulama sırasında kalıp molekülün aktivite kaybını da engeller. Sonuçta bu yöntem, özellikle biyosensör çalışmalarında yüksek seçicilikte, yüksek hassasiyette, düşük maliyette ve kararlı tanıma yüzeylerinin oluşturulmasını sağlar [248]. Bu yüzden tez çalışması kapsamında mikrotamas baskılama yöntemi tercih edilmiştir.
- Baskılama işleminde fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve başlatıcı olarak α - α' -azobisisobutironitril (AIBN) kullanılmıştır. MAA ve EGDMA, moleküler baskılama çalışmalarında en çok kullanılan fonksiyonel monomer-çapraz bağlayıcı çiftlerinden birisidir.
- Baskılama işleminden sonra, PSA'nın yüzeye başarılı bir şekilde baskılandığının gösterilmesi amacıyla modifiye edilmemiş, allil merkaptan

ile modifiye edilmiş ve PSA baskılanmış (PSA-MIP) SPR çiplerinin atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, taramalı elektron mikroskobu (SEM), dispersif Raman, FT-IR ve temas açısı ile detaylı karakterizasyonu yapılmıştır. Herbir karakterizasyon işlemi sonrasında elde edilen sonuçlar, allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu işleminin başarılı olduğunu, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çipleri üzerine PSA'nın başarılı bir şekilde baskılandığını kanıtlamaktadır.

- PSA-MIP SPR çipleri ile kinetik analizler kapsamında, ilk aşamada desorpsiyon ajanı belirlenmiştir. Çalışılan derişim aralığında, desorpsiyon işleminden sonra baz çizgisine hızlı bir dönüş olduğu, sensör yüzeyinin rejenerasyonunu hızlı ve etkili bir şekilde sağladığı ve en yüksek kırılma yüzdesi değişimi (ΔR) sağladığı için, 25 mM Glisin-HCl (pH: 2.5)'nin iyi bir desorpsiyon ajanı olduğuna karar verilmiştir. Tüm analizlerde desorpsiyon ajanı olarak 25 mM Glisin-HCl (pH: 2.5) kullanılmıştır.
- Sulu çözeltiden PSA tayini kapsamında, 0.1 ng/mL ile 50 ng/mL derişim aralığındaki PSA çözeltileri ile çalışılmış ve bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde, sensörün iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı gösterdiği, bu doğrusallıkların (R^2) da sırasıyla % 99.42 ve % 97.24 olduğu hesaplanmıştır. Hazırlanan PSA-MIP sensörü için tayin limiti (LOD) 90.85 pg/mL olarak bulunmuştur. PSA için FDA tarafından kabul edilen normalin alt sınırı 4.0 ng/mL'dir. Bu yüzden bu değerin mümkün olduğunca altında PSA tayini gerçekleştirebilen bir sistem, bu hastalığın hem erken teşhisinde, hem de tedavi sonrasında hastalığın nüks edip etmediğinin gösterilmesinde oldukça önemlidir. Bu kapsamda hazırlanan PSA-MIP sensör, belirlenen eşik değerin oldukça altındaki tayin limiti ile bu kriteri karşılamaktadır. Ayrıca hesaplanan tayin limiti, literatürde PSA tayini için geliştirilen biyosensörler ile elde edilen tayin limiti ile de kıyaslanabilir niteliktedir.
- Literatürde PSA tayini için son zamanlarda geliştirilen sensör çalışmalarının bir tanesinde, elektrokimyasal impedans spektroskopisi kullanılarak, aptamer temelli biyosensör ile klinik kan örneklerinden PSA tayini gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör ile 1 ng/mL'den daha düşük derişimde PSA tayini gerçekleştirilmiştir [282]. Jiang ve ark.'ları [283]

tarafından, f-PSA ve t-PSA'nın eş-zamanlı tayini için geliştirilen iki kanallı SPR biyosensör çalışmasında, t-PSA, anti-PSA antikoru ile t-PSA arasındaki direkt etkileşim yolu ile tayin edilirken; f-PSA yarışmacı inhibisyon immüno-analiz yöntemi ile tayin edilmiştir. LOD değerleri sırasıyla, t-PSA için 0.40 ng/mL, f-PSA için ise 0.03 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Homojen potensiyometrik immüno-analiz yöntemi ile pozitif yüklü poli-etilenimin-poli (stiren-ko-akrilik asit) (PEI-PSAA) nanoküreleri ve anti-PSA ile konjuge edilmiş negatif yüklü altın nanopartiküller arasındaki elektrostatik etkileşimin ölçülmesi ile PSA için LOD değeri 0.04 ng/mL olarak rapor edilmiştir [284]. Hou ve ark'ları [285] tarafından anti-PSA antikoru ve DNAzim fonksiyonelliği kazandırılmış altın-palladyum hibrit nano etiketleri kullanılarak, PSA'nın tayini için impedimetrik immünosensör geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada LOD değeri 0.73 pg/mL olarak rapor edilmiştir. İkincil antikor ve luminofor ile çok fonksiyonlu hale getirilmiş iletken nano küreler kullanılarak, biyolojik barkot temelli sandviç tipi elektrokemiluminesans immünosensörü geliştirilmiştir. LOD değeri 0.6 pg/mL olarak rapor edilmiştir [286].

- PSA-MIP SPR sensörü ile PSA arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla çalışılan üç farklı izoterm modeli arasından, hazırlanan sensörün Freundlich adsorpsiyon modeli ile uyumluluk gösterdiği saptanmıştır ($R^2=0.9954$). Bu yüzden hazırlanan sensör yüzeyindeki PSA bağlanma bölgelerinin heterojen olduğu söylenebilir. Freundlich adsorpsiyon modelinin özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk gösterdiği daha önceki çalışmalarda rapor edildiği için [280], bu sonuç literatür ile uyumludur. Kovalent olmayan MIP'ler heterojen yüzeylere benzer davranış sergilerler. Bu yüzden, bu tarz MIP'ler Freundlich izotermine benzer matematiksel yaklaşımlar ile modellenebilirler. Kovalent olmayan MIP'lerdeki bağlanma bölgelerinin heterojen özelliği, bu tarz sistemler için Freundlich izoterminin uygun olmasını sağlar [287]. Diğer yandan, kovalent baskılanmış MIP'lerdeki izoterm modelinin Freundlich izotermi ile zayıf korelasyon gösterdiği de rapor edilmiştir [219].
- Yarışmacı proteinler ile yarışmalı kinetik analizler kapsamında yapılan çalışmaların sonucunda PSA-MIP sensörün tekli çözeltiler arasında en

yüksek ΔR cevabı ile PSA'ya özgüllük gösterdiği bulunmuştur. İkili karışımlarda HSA ve IgG, PSA ile karışım halinde iken yarışmacı ajan olarak davranmışlar ve PSA'nın tek başına verdiği ΔR cevabına göre daha düşük bir ΔR değeri elde edilmesine sebep olmuşlardır. Tam tersine lizozim ise karışım halinde iken sinerjik bir etki ile sensör cevabında (ΔR) artışa neden olmuştur. Bu durum yarışmacı proteinlerin farklı özelliklere (molekül ağırlığı, izoelektrik nokta, vb.) sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Buradaki en önemli sonuç, PSA-MIP SPR sensörün her koşulda, tek başına veya karışım halinde, PSA'yı oldukça seçici bir şekilde tayin edebilmesidir.

- PSA tayini için geliştirilen bir sensör çalışmasında, sensörün PSA'ya karşı seçiciliğini test etmek amacıyla karsinoembriyonik antijen (CEA), alfa fetoprotein (AFP) ve immunoglobulin G (IgG) yarışmacı proteinler olarak kullanılmıştır. Sensörün PSA için direnci 5×10^3 Ohm iken, yarışmacı proteinler için 1×10^3 Ohm olarak kaydedilmiştir [285]. Başka bir çalışmada, PSA için seçicilik çalışmaları 1 ng/mL derişiminde hazırlanan sığır serum albümini (BSA), HRP, CK-MB ve AFP kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SPR sensör cevabında önemli bir değişim olmadığı rapor edilmiştir [288]. İnsan serum albümini (HSA) kandaki en önemli proteinlerden biri olduğu için, özgül olmayan bağlanma çalışmalarında kontrol proteini olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 100 μM HSA ile muamele sonrasında, sensör cevabında %12.5'lik bir artış olduğu saptanmıştır [282]. Mikrotemas baskılama yöntemi ile prokalsitonin (PCT) baskılanmış SPR sensör çalışmasında, HSA, miyoglobin ve sitokrom c (cyt c) yarışmacı proteinler olarak kullanılmıştır. ΔR değerleri PCT için yaklaşık 2.0, HSA için 0.6, miyoglobin için 1.0 ve cyt c için 0.2 olarak rapor edilmiştir [250]. Yapılan tez çalışması kapsamında, PSA için elde edilen seçicilik sonuçları, PSA tayini için geliştirilen farklı sensör çalışmalarından ve farklı hedef analitler için geliştirilen MIP sensör çalışmalarından elde edilen değerler ile kıyaslanabilir niteliktedir.
- PSA-MIP sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan baskılanmamış (NIP-non imprinted) sensör için tayin limiti 3.75 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Çalışılan derişim aralığında sensörün doğrusallığı ise yaklaşık % 74 olarak belirlenmiştir. Bu yüzden PSA-MIP sensör ile

kıyaslandığında NIP sensörün hassasiyeti oldukça düşük bulunmuştur. LOD değerleri bakımından kıyaslandığında, PSA-MIP sensörün hassasiyeti NIP sensöre kıyasla yaklaşık olarak 40 kat daha yüksek bulunmuştur.

- Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları, PSA-MIP sensörün NIP sensöre kıyasla PSA'yı oldukça seçici bir şekilde tayin edebildiğini göstermektedir. Bağıl seçicilik katsayısının 1'in üzerinde olması, baskılama işleminin etkinliğini gösterir.
- Çalışmanın önemli aşamalarından biri olarak sağlıklı insan serum örneklerine dışarıdan PSA eklenerek yapılan PSA analizleri sonucunda, PSA-MIP sensörün yaklaşık % 90 doğrusalılıkta serumdan PSA ölçümü yapabildiği gösterilmiştir. Bu sonuç bize kan serumu gibi oldukça kompleks bir ortamdan bile hazırlanan sensörün başarılı bir şekilde PSA tayini yapabildiğini göstermektedir. Klinik örneklerde bu kompleks serum ortamı içerisindeki PSA derişimi yaklaşık 4 ng/mL ile 10 ng/mL arasındadır. HSA gibi bazı proteinler, PSA'ya kıyasla, serum içerisinde yaklaşık 1 milyon kat daha fazla miktarda bulunurlar. Bu yüzden, serum örneği içerisinde PSA'nın tayin edilebilmesi, PSA-MIP sensörün klinikte kullanılabilirliğini test etmek ve sensörün, serum içerisindeki diğer proteinlere kıyasla PSA'ya olan seçiciliğini göstermek açısından önemlidir.
- Çalışmanın en önemli aşaması olarak, prostat kanserli hasta serumundan yapılan PSA analizi sonuçları, H.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji A.B.D'de PSA tayini için rutin olarak kullanılan ELİZA yönteminden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. 10 hastaya ait serum örnekleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, iki yöntem arasında % 98.6 gibi oldukça yüksek oranda doğrusalılık olduğu gösterilmiştir. İki yöntem arasında yüksek korelasyon oranı, geliştirilen sistemin, PSA tayini için memnun edici düzeyde hassasiyete ve güvenilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.
- Ayrıca aynı örnekler kullanılarak hesaplanan % geri kazanım oranının % 87.3 ile % 116.9 arasında olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç bize sensörün veriminin oldukça yüksek olduğunu kanıtlamaktadır. Düşük derişimde bulunan tümör belirteçlerinin insan serumundan tayini, hastalıkların erken teşhisi açısından oldukça önemlidir. Du ve ark'ları [286] yapmış oldukları

çalışmada, % 97.3 ile % 111.3 arasında geri kazanım oranı rapor etmişlerdir. Choi ve ark'ları [289] % 87.1 ile % 110.5 oranında geri kazanım oranı rapor ederken, Kokkinos ve ark'larının [290] geliştirdikleri sensörde geri kazanım oranının % 95 ile % 108 arasında olduğu rapor edilmiştir. Yapılan tez çalışması kapsamında hesaplanan geri kazanım oranı, klinik örneklerden PSA tayininin yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir.

- Student T-testi kullanılarak yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre, SPR yöntemi ile mevcut ELİZA yöntemi arasında, PSA tayini açısından anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir ($p=0.751$, $p>0.05$).
- Çalışmanın en önemli bulgularından biri, hazırlanan PSA-MIP sensörün yüksek tekrar kullanılabilirlik oranıdır. 50 enjeksiyon sonrasında gözlemlenen ΔR değeri bize, tüm analizlerin 3 tekrarlı olarak, aynı PSA-MIP SPR çipi ile yapıldığı da göz önünde bulundurulduğunda, hazırlanan PSA-MIP sensörün performansında ciddi bir düşüş olmaksızın, uzun süre PSA tayini için kullanılabileceğini kanıtlamaktadır. Ayrıca bu sonuç PSA-MIP sensörün kararlılığının yüksek olduğunun da bir işaretidir.
- Nitelikli biyosensörlerde bulunması gereken 8 parametre açısından PSA-MIP sensörü değerlendirildiğinde:
 - Tayini gerçekleştirecek olan PSA miktarı değişimine bire bir cevap vermesi ile yüksek duyarlılığa,
 - Hesaplanan seçicilik katsayıları ile kanıtlanan yüksek seçiciliğe,
 - PSA için literatürde belirtilen derişim aralığında ve hatta daha düşük derişimde ölçüm yapabilen ölçüm aralığına,
 - Tüm analizin 70 dakikada tamamlanması, ancak yaklaşık 20 dakikada PSA değişimine oldukça hızlı bir şekilde cevap vermesi ile kısa ölçüm süresine,
 - Tüm analiz sonuçlarından elde edilen yüksek tutarlılığa,
 - Tayin limiti olarak PSA için belirlenen eşik değerin yaklaşık 44 katı altında gerçekleştirdiği PSA tayini ile oldukça düşük tayin limitine,
 - Performansında gözle görülür, ciddi bir azalma olmadan verdiği uzun hizmet ömrüne,

➤ Yüksek kararlılığa ve verime

sahip olması ile nitelikli biyosensörlerde olması gereken tüm özellikleri taşıyan bir sensör olarak, günümüzde mevcut ELİZA yöntemine göre birçok avantajı ile üstün, alternatif bir yöntem olarak PSA tayininde kullanılabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Grönberg, H., Prostate Cancer Epidemiology, *The Lancet*, 361, 9360, 859-864, **2003**.
- [2] Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chemical Reviews*, 108, 2, 462-493, **2008**.
- [3] Haupt, K., Peer Reviewed: Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation, *Analytical Chemistry*, 75, 17, 376 A-383 A, **2003**.
- [4] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., and Asanuma, H., Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications, *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*, by Makoto Komiyama, Toshifumi Takeuchi, Takashi Mukawa, Hiroyuki Asanuma, pp. 148. ISBN 3-527-30569-6. Wiley-VCH, Mart 2003., 1, **2003**.
- [5] Mahony, J., Nolan, K., Smyth, M., and Mizaikoff, B., Molecularly Imprinted Polymers—Potential and Challenges in Analytical Chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 534, 1, 31-39, **2005**.
- [6] Piletsky, S. A., Turner, N. W., and Laitenberger, P., Molecularly Imprinted Polymers in Clinical Diagnostics—Future Potential and Existing Problems, *Medical Engineering & Physics*, 28, 10, 971-977, **2006**.
- [7] Wei, S., Jakusch, M., and Mizaikoff, B., Capturing Molecules with Templated Materials—Analysis and Rational Design of Molecularly Imprinted Polymers, *Analytica Chimica Acta*, 578, 1, 50-58, **2006**.
- [8] Yan, M., *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*: CRC press, **2004**.
- [9] Parkin, D., Whelan, S., Ferlay, J., Teppo, L., and Thomas, D., Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII, *IARC Scientific Publications*, 155, **2002**.
- [10] Sakr, W., Haas, G., Cassin, B., Pontes, J., and Crissman, J., The Frequency of Carcinoma and Intraepithelial Neoplasia of the Prostate in Young Male Patients, *The Journal of Urology*, 150, 2 Pt 1, 379-385, **1993**.
- [11] Hayes, R. B., Liff, J. M., Pottner, L. M., Greenberg, R. S., Schoenberg, J. B., Schwartz, A. G., Swanson, G. M., Silverman, D. T., Brown, L. M., and Hoover, R. N., Prostate Cancer Risk in Us Blacks and Whites with a Family History of Cancer, *International Journal of Cancer*, 60, 3, 361-364, **1995**.
- [12] Whittemore, A. S., Wu, A. H., Kolonel, L. N., John, E. M., Gallagher, R. P., Howe, G. R., West, D. W., Teh, C.-Z., and Stamey, T., Family History and Prostate Cancer Risk in Black, White, and Asian Men in the United States and Canada, *American Journal of Epidemiology*, 141, 8, 732-740, **1995**.
- [13] Monroe, K. R., Mimi, C. Y., Kolonel, L. N., Coetzee, G. A., Wilkens, L. R., Ross, R. K., and Henderson, B. E., Evidence of an X-Linked or Recessive Genetic Component to Prostate Cancer Risk, *Nature Medicine*, 1, 8, 827-829, **1995**.

- [14] Armstrong, B., and Doll, R., Environmental Factors and Cancer Incidence and Mortality in Different Countries, with Special Reference to Dietary Practices, *International Journal of Cancer*, 15, 4, 617-631, **1975**.
- [15] Howell, M., Factor Analysis of International Cancer Mortality Data and Per Capita Food Consumption, *British Journal of Cancer*, 29, 4, 328, **1974**.
- [16] Hayes, R. B., Ziegler, R. G., Gridley, G., Swanson, C., Greenberg, R. S., Swanson, G. M., Schoenberg, J. B., Silverman, D. T., Brown, L. M., and Pottern, L. M., Dietary Factors and Risks for Prostate Cancer among Blacks and Whites in the United States, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8, 1, 25-34, **1999**.
- [17] Lee, M. M., Wang, R.-T., Hsing, A. W., Gu, F.-L., Wang, T., and Spitz, M., Case-Control Study of Diet and Prostate Cancer in China, *Cancer Causes & Control*, 9, 6, 545-552, **1998**.
- [18] Whittemore, A. S., Kolonel, L. N., Wu, A. H., John, E. M., Gallagher, R. P., Howe, G. R., Burch, J. D., Hankin, J., Dreon, D. M., and West, D. W., Prostate Cancer in Relation to Diet, Physical Activity, and Body Size in Blacks, Whites, and Asians in the United States and Canada, *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 9, 652-661, **1995**.
- [19] De Stefani, E., Deneo-Pellegrini, H., Mendilaharsu, M., and Ronco, A., Essential Fatty Acids and Breast Cancer: A Case-Control Study in Uruguay, *International Journal of Cancer*, 76, 4, 491-494, **1998**.
- [20] Gann, P. H., Hennekens, C. H., Sacks, F. M., Grodstein, F., Giovannucci, E. L., and Stampfer, M. J., Prospective Study of Plasma Fatty Acids and Risk of Prostate Cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 86, 4, 281-286, **1994**.
- [21] Giovannucci, E., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Chute, C. C., and Willett, W. C., A Prospective Study of Dietary Fat and Risk of Prostate Cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 85, 19, 1571-1579, **1993**.
- [22] Godley, P. A., Campbell, M. K., Miller, C., Gallagher, P., Martinson, F. E., Mohler, J. L., and Sandler, R. S., Correlation between Biomarkers of Omega-3 Fatty Acid Consumption and Questionnaire Data in African American and Caucasian United States Males with and without Prostatic Carcinoma, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5, 2, 115-119, **1996**.
- [23] Harvei, S., Bjerve, K. S., Tretli, S., Jellum, E., Røsbjerg, T. E., and Vatten, L., Prediagnostic Level of Fatty Acids in Serum Phospholipids: Ω -3 and Ω -6 Fatty Acids and the Risk of Prostate Cancer, *International Journal of Cancer*, 71, 4, 545-551, **1997**.
- [24] Chan, J. M., Stampfer, M. J., Ma, J., Gann, P. H., Gaziano, J. M., and Giovannucci, E. L., Dairy Products, Calcium, and Prostate Cancer Risk in the Physicians' Health Study, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 4, 549-554, **2001**.
- [25] Kolonel, L. N., Hankin, J. H., Whittemore, A. S., Wu, A. H., Gallagher, R. P., Wilkens, L. R., John, E. M., Howe, G. R., Dreon, D. M., and West, D. W.,

Vegetables, Fruits, Legumes and Prostate Cancer: A Multiethnic Case-Control Study, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9, 8, 795-804, **2000**.

- [26] Severson, R. K., Nomura, A. M., Grove, J. S., and Stemmermann, G. N., A Prospective Study of Demographics, Diet, and Prostate Cancer among Men of Japanese Ancestry in Hawaii, *Cancer Research*, 49, 7, 1857-1860, **1989**.
- [27] Stattin, P., Adlercreutz, H., Tenkanen, L., Jellum, E., Lumme, S., Hallmans, G., Harvei, S., Teppo, L., Stumpf, K., and Luostarinen, T., Circulating Enterolactone and Prostate Cancer Risk: A Nordic Nested Case-Control Study, *International Journal of Cancer*, 99, 1, 124-129, **2002**.
- [28] Strom, S. S., Yamamura, Y., Duphorne, C. M., Spitz, M. R., Babaian, R. J., Pillow, P. C., and Hursting, S. D., Phytoestrogen Intake and Prostate Cancer: A Case-Control Study Using a New Database, **1999**.
- [29] Bylund, A., Zhang, J.-X., Bergh, A., Damber, J.-E., Widmark, A., Johansson, A., Adlercreutz, H., Aman, P., Shepherd, M. J., and Hallmans, G., Rye Bran and Soy Protein Delay Growth and Increase Apoptosis of Human Lncap Prostate Adenocarcinoma in Nude Mice, *Prostate*, 42, 4, 304-314, **2000**.
- [30] Landström, M., Zhang, J. X., Hallmans, G., Åman, P., Bergh, A., Damber, J. E., Mazur, W., Wähälä, K., and Adlercreutz, H., Inhibitory Effects of Soy and Rye Diets on the Development of Dunning R3327 Prostate Adenocarcinoma in Rats, *The Prostate*, 36, 3, 151-161, **1998**.
- [31] Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., and Willett, W. C., A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk, *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 5, 391-398, **2002**.
- [32] Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., Van Breemen, R., Ashton, D., and Bowen, P. E., Oxidative DNA Damage in Prostate Cancer Patients Consuming Tomato Sauce-Based Entrees as a Whole-Food Intervention, *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 24, 1872-1879, **2001**.
- [33] Redman, C., Xu, M. J., Peng, Y.-M., Scott, J. A., Payne, C., Clark, L. C., and Nelson, M. A., Involvement of Polyamines in Selenomethionine Induced Apoptosis and Mitotic Alterations in Human Tumor Cells, *Carcinogenesis*, 18, 6, 1195-1202, **1997**.
- [34] Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., and Gross, E. G., Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with Carcinoma of the Skin: A Randomized Controlled Trial, *Jama*, 276, 24, 1957-1963, **1996**.
- [35] WITHERINGTON, R., JANOSKO, J. H. E., BOROSSO, D. C. C., FALK10, S., and ROUNDER, J., Decreased Incidence of Prostate Cancer with Selenium Supplementation: Results of a Double-Blind Cancer Prevention Trial, *British Journal of Urology*, 81, 730-734, **1998**.
- [36] Heinonen, O. P., Koss, L., Albanes, D., Taylor, P. R., Hartman, A. M., Edwards, B. K., Virtamo, J., Huttunen, J. K., Haapakoski, J., and Malila, N.,

Prostate Cancer and Supplementation with A-Tocopherol and B-Carotene: Incidence and Mortality in a Controlled Trial, *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 6, 440-446, **1998**.

- [37] Huggins, C., and Hodges, C. V., Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate, *The Journal of Urology*, 168, 1, 9-12, **2002**.
- [38] Hsing, A. W., Chua, S., Gao, Y.-T., Gentzschein, E., Chang, L., Deng, J., and Stanczyk, F. Z., Prostate Cancer Risk and Serum Levels of Insulin and Leptin: A Population-Based Study, *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 10, 783-789, **2001**.
- [39] Stattin, P. r., Söderberg, S., Hallmans, G. r., Bylund, A., Kaaks, R., Stenman, U.-H. k., Bergh, A., and Olsson, T., Leptin Is Associated with Increased Prostate Cancer Risk: A Nested Case-Referent Study 1, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 3, 1341-1345, **2001**.
- [40] Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Gann, P. H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C. H., and Pollak, M., Plasma Insulin-Like Growth Factor-I and Prostate Cancer Risk: A Prospective Study, *Science*, 279, 5350, 563-566, **1998**.
- [41] Harman, S. M., Metter, E. J., Blackman, M. R., Landis, P. K., and Carter, H. B., Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor I (Igf-I), Igf-II, Igf-Binding Protein-3, and Prostate-Specific Antigen as Predictors of Clinical Prostate Cancer, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 11, 4258-4265, **2000**.
- [42] Stattin, P., Bylund, A., Rinaldi, S., Biessy, C., Déchaud, H., Stenman, U.-H., Egevad, L., Riboli, E., Hallmans, G., and Kaaks, R., Plasma Insulin-Like Growth Factor-I, Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins, and Prostate Cancer Risk: A Prospective Study, *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 23, 1910-1917, **2000**.
- [43] Hickey, K., Do, K.-A., and Green, A., Smoking and Prostate Cancer, *Epidemiologic Reviews*, 23, 1, 115-125, **2001**.
- [44] Dennis, L. K., and Hayes, R. B., Alcohol and Prostate Cancer, *Epidemiologic Reviews*, 23, 1, 110-114, **2001**.
- [45] Peterson, H. B., and Howards, S. S., Vasectomy and Prostate Cancer: The Evidence to Date, *Fertility and Sterility*, 70, 2, 201-203, **1998**.
- [46] Lee, I.-M., Sesso, H. D., Chen, J.-J., and Paffenbarger Jr, R. S., Does Physical Activity Play a Role in the Prevention of Prostate Cancer?, *Epidemiologic Reviews*, 23, 1, 132-137, **2001**.
- [47] Sardana, G., Dowell, B., and Diamandis, E. P., Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer, *Clinical Chemistry*, 54, 12, 1951-1960, **2008**.
- [48] Makarov, D. V., Loeb, S., Getzenberg, R. H., and Partin, A. W., Biomarkers for Prostate Cancer, *Annual Review of Medicine*, 60, 139-151, **2009**.

- [49] Gutman, A. B., and Gutman, E. B., An "Acid" Phosphatase Occurring in the Serum of Patients with Metastasizing Carcinoma of the Prostate Gland, *Journal of Clinical Investigation*, 17, 4, 473, **1938**.
- [50] Veeramani, S., Yuan, T.-C., Chen, S.-J., Lin, F.-F., Petersen, J. E., Shaheduzzaman, S., Srivastava, S., MacDonald, R. G., and Lin, M.-F., Cellular Prostatic Acid Phosphatase: A Protein Tyrosine Phosphatase Involved in Androgen-Independent Proliferation of Prostate Cancer, *Endocrine-Related Cancer*, 12, 4, 805-822, **2005**.
- [51] Whitesel, J., Donohue, R., Mani, J., Mohr, S., Scanavino, D., Augspurger, R., Biber, R., Fauver, H., Wettlaufer, J., and Pfister, R., Acid Phosphatase: Its Influence on the Management of Carcinoma of the Prostate, *The Journal of Urology*, 131, 1, 70-72, **1984**.
- [52] Lowe, F. C., and Trauzzi, S. J., Prostatic Acid Phosphatase in 1993. Its Limited Clinical Utility, *The Urologic Clinics of North America*, 20, 4, 589-595, **1993**.
- [53] Al Taira, M., Merrick, G., Wallner, K., and Dattoli, M., Reviving the Acid Phosphatase Test for Prostate Cancer, *Oncology*, 21, 8, 1, **2007**.
- [54] Han, M., Piantadosi, S., Zahurak, M. L., Sokoll, L. J., Chan, D. W., Epstein, J. I., Walsh, P. C., and Partin, A. W., Serum Acid Phosphatase Level and Biochemical Recurrence Following Radical Prostatectomy for Men with Clinically Localized Prostate Cancer, *Urology*, 57, 4, 707-711, **2001**.
- [55] Hara, M., Koyanagi, Y., Inoue, T., and Fukuyama, T., Some Physico-Chemical Characteristics of"-Seminoprotein", an Antigenic Component Specific for Human Seminal Plasma. Forensic Immunological Study of Body Fluids and Secretion. VII, *Nihon hōigaku zasshi= The Japanese Journal of Legal Medicine*, 25, 4, 322, **1971**.
- [56] Wang, M., Valenzuela, L., Murphy, G., and Chu, T., Purification of a Human Prostate Specific Antigen, *Investigative Urology*, 17, 2, 159-163, **1979**.
- [57] Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., and Redwine, E., Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate, *New England Journal of Medicine*, 317, 15, 909-916, **1987**.
- [58] Ercole, C., Lange, P. H., Mathisen, M., Chiou, R., Reddy, P., and Vessella, R., Prostatic Specific Antigen and Prostatic Acid Phosphatase in the Monitoring and Staging of Patients with Prostatic Cancer, *The Journal of Urology*, 138, 5, 1181-1184, **1987**.
- [59] Pound, C. R., Partin, A. W., Eisenberger, M. A., Chan, D. W., Pearson, J. D., and Walsh, P. C., Natural History of Progression after Psa Elevation Following Radical Prostatectomy, *Jama*, 281, 17, 1591-1597, **1999**.
- [60] Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., and Andriole, G. L., Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer, *New England Journal of Medicine*, 324, 17, 1156-1161, **1991**.
- [61] Cooner, W., Mosley, B., Rutherford Jr, C., Beard, J., Pond, H., Terry, W., Igel, T., and Kidd, D., Prostate Cancer Detection in a Clinical Urological

- Practice by Ultrasonography, Digital Rectal Examination and Prostate Specific Antigen, *The Journal of Urology*, 143, 6, 1146-1152; discussion 1152-1144, **1990**.
- [62] Oberaigner, W., Horninger, W., Klocker, H., Schönitzer, D., Stühlinger, W., and Bartsch, G., Reduction of Prostate Cancer Mortality in Tyrol, Austria, after Introduction of Prostate-Specific Antigen Testing, *American Journal of Epidemiology*, 164, 4, 376-384, **2006**.
 - [63] Antenor, J. A. V., Roehl, K. A., Eggener, S. E., Kundu, S. D., Han, M., and Catalona, W. J., Preoperative Psa and Progression-Free Survival after Radical Prostatectomy for Stage T1c Disease, *Urology*, 66, 1, 156-160, **2005**.
 - [64] Makarov, D. V., Humphreys, E. B., Mangold, L. A., Walsh, P. C., Partin, A. W., Epstein, J. I., and Freedland, S. J., Pathological Outcomes and Biochemical Progression in Men with T1c Prostate Cancer Undergoing Radical Prostatectomy with Prostate Specific Antigen 2.6 to 4.0 Vs 4.1 to 6.0 Ng/ml, *The Journal of Urology*, 176, 2, 554-558, **2006**.
 - [65] Nadler, R. B., Loeb, S., Roehl, K. A., Antenor, J. A. V., Eggener, S., and Catalona, W. J., Use of 2.6 Ng/ml Prostate Specific Antigen Prompt for Biopsy in Men Older Than 60 Years, *The Journal of Urology*, 174, 6, 2154-2157, **2005**.
 - [66] Nadler, R. B., Humphrey, P. A., Smith, D. S., Catalona, W. J., and Timothy, L., Effect of Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia on Elevated Serum Prostate Specific Antigen Levels, *The Journal of Urology*, 154, 2, 407-413, **1995**.
 - [67] Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., and Crawford, E. D., Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 Ng Per Milliliter, *New England Journal of Medicine*, 350, 22, 2239-2246, **2004**.
 - [68] Catalona, W. J., Southwick, P. C., Slawin, K. M., Partin, A. W., Brawer, M. K., Flanigan, R. C., Patel, A., Richie, J. P., Walsh, P. C., and Scardino, P. T., Comparison of Percent Free Psa, Psa Density, and Age-Specific Psa Cutoffs for Prostate Cancer Detection and Staging, *Urology*, 56, 2, 255-260, **2000**.
 - [69] Carter, H. B., Morrell, C. H., Pearson, J. D., Brant, L. J., Plato, C. C., Metter, E. J., Chan, D. W., Fozard, J. L., and Walsh, P. C., Estimation of Prostatic Growth Using Serial Prostate-Specific Antigen Measurements in Men with and without Prostate Disease, *Cancer Research*, 52, 12, 3323-3328, **1992**.
 - [70] Yu, X., Loeb, S., Roehl, K. A., Han, M., and Catalona, W. J., The Association between Total Prostate Specific Antigen Concentration and Prostate Specific Antigen Velocity, *The Journal of Urology*, 177, 4, 1298-1302, **2007**.
 - [71] D'Amico, A. V., Chen, M.-H., Roehl, K. A., and Catalona, W. J., Preoperative Psa Velocity and the Risk of Death from Prostate Cancer after

- Radical Prostatectomy, *New England Journal of Medicine*, 351, 2, 125-135, **2004**.
- [72] D'Amico, A. V., Renshaw, A. A., Sussman, B., and Chen, M.-H., Pretreatment Psa Velocity and Risk of Death from Prostate Cancer Following External Beam Radiation Therapy, *Jama*, 294, 4, 440-447, **2005**.
 - [73] Eggener, S. E., Roehl, K. A., Yossepowitch, O., and Catalona, W. J., Prediagnosis Prostate Specific Antigen Velocity Is Associated with Risk of Prostate Cancer Progression Following Brachytherapy and External Beam Radiation Therapy, *The Journal of Urology*, 176, 4, 1399-1403, **2006**.
 - [74] Carter, H. B., Ferrucci, L., Kettermann, A., Landis, P., Wright, E. J., Epstein, J. I., Trock, B. J., and Metter, E. J., Detection of Life-Threatening Prostate Cancer with Prostate-Specific Antigen Velocity During a Window of Curability, *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 21, 1521-1527, **2006**.
 - [75] Sengupta, S., Myers, R. P., Slezak, J. M., Bergstralh, E. J., Zincke, H., and Blute, M. L., Preoperative Prostate Specific Antigen Doubling Time and Velocity Are Strong and Independent Predictors of Outcomes Following Radical Prostatectomy, *The Journal of Urology*, 174, 6, 2191-2196, **2005**.
 - [76] Freedland, S. J., Dorey, F., and Aronson, W. J., Preoperative Psa Velocity and Doubling Time Do Not Predict Adverse Pathologic Features or Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy, *Urology*, 57, 3, 476-480, **2001**.
 - [77] CHRISTENSSON, A., LAURELL, C. B., and Lilja, H., Enzymatic Activity of Prostate-Specific Antigen and Its Reactions with Extracellular Serine Proteinase Inhibitors, *European Journal of Biochemistry*, 194, 3, 755-763, **1990**.
 - [78] Lilja, H., Christensson, A., Dahlén, U., Matikainen, M.-T., Nilsson, O., Pettersson, K., and Lövgren, T., Prostate-Specific Antigen in Serum Occurs Predominantly in Complex with Alpha 1-Antichymotrypsin, *Clinical Chemistry*, 37, 9, 1618-1625, **1991**.
 - [79] Björk, T., Piironen, T., Pettersson, K., Lövgren, T., Stenman, U.-H., Oesterling, J. E., Abrahamsson, P.-A., and Lilja, H., Comparison of Analysis of the Different Prostate-Specific Antigen Forms in Serum for Detection of Clinically Localized Prostate Cancer, *Urology*, 48, 6, 882-888, **1996**.
 - [80] Luderer, A. A., Chen, Y.-T., Soriano, T. F., Kramp, W. J., Carlson, G., Cuny, C., Sharp, T., Smith, W., Petteway, J., and Brawer, M. K., Measurement of the Proportion of Free to Total Prostate-Specific Antigen Improves Diagnostic Performance of Prostate-Specific Antigen in the Diagnostic Gray Zone of Total Prostate-Specific Antigen, *Urology*, 46, 2, 187-194, **1995**.
 - [81] Prestigiacomo, A. F., Lilja, H., Pettersson, K., Wolfert, R. L., and Stamey, T. A., A Comparison of the Free Fraction of Serum Prostate Specific Antigen in Men with Benign and Cancerous Prostates: The Best Case Scenario, *The Journal of Urology*, 156, 2, 350-354, **1996**.
 - [82] Catalona, W. J., Partin, A. W., Slawin, K. M., Brawer, M. K., Flanigan, R. C., Patel, A., Richie, J. P., Walsh, P. C., Scardino, P. T., and Lange, P. H., Use

- of the Percentage of Free Prostate-Specific Antigen to Enhance Differentiation of Prostate Cancer from Benign Prostatic Disease: A Prospective Multicenter Clinical Trial, *Jama*, 279, 19, 1542-1547, **1998**.
- [83] Djavan, B., Remzi, M., Schulman, C. C., Marberger, M., and Zlotta, A. R., Repeat Prostate Biopsy: Who, How and When?: A Review, *European Urology*, 42, 2, 93-103, **2002**.
 - [84] Khan, M. A., Sokoll, L. J., Chan, D. W., Mangold, L. A., Mohr, P., Mikolajczyk, S. D., Linton, H. J., Evans, C. L., Rittenhouse, H. G., and Partin, A. W., Clinical Utility of ProPsa and "Benign" Psa When Percent Free Psa Is Less Than 15%, *Urology*, 64, 6, 1160-1164, **2004**.
 - [85] Woodrum, D., French, C., and Shamel, L. B., Stability of Free Prostate-Specific Antigen in Serum Samples under a Variety of Sample Collection and Sample Storage Conditions, *Urology*, 48, 6, 33-39, **1996**.
 - [86] Piironen, T., Pettersson, K., Suonpää, M., Stenman, U.-H., Oesterling, J. E., Lövgren, T., and Lilja, H., In Vitro Stability of Free Prostate-Specific Antigen (Psa) and Prostate-Specific Antigen (Psa) Complexed to A 1-Antichymotrypsin in Blood Samples, *Urology*, 48, 6, 81-87, **1996**.
 - [87] Lilja, H., Haese, A., Björk, T., Friedrich, M. G., Piironen T., Pettersson, K., Huland, E., and Huland, H., Significance and Metabolism of Complexed and Noncomplexed Prostate Specific Antigen Forms, and Human Glandular Kallikrein 2 in Clinically Localized Prostate Cancer before and after Radical Prostatectomy, *The Journal of Urology*, 162, 6, 2029-2035, **1999**.
 - [88] Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Wang, T. J., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., Marks, L. S., Song, W., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M., "Bpsa," a Specific Molecular Form of Free Prostate-Specific Antigen, Is Found Predominantly in the Transition Zone of Patients with Nodular Benign Prostatic Hyperplasia, *Urology*, 55, 1, 41-45, **2000**.
 - [89] Sokoll, L. J., Chan, D. W., Mikolajczyk, S. D., Rittenhouse, H. G., Evans, C. L., Linton, H. J., Mangold, L. A., Mohr, P., Bartsch, G., and Klocker, H., Proenzyme Psa for the Early Detection of Prostate Cancer in the 2.5–4.0 Ng/MI Total Psa Range: Preliminary Analysis, *Urology*, 61, 2, 274-276, **2003**.
 - [90] Khan, M. A., Partin, A. W., Rittenhouse, H. G., Mikolajczyk, S. D., Sokoll, L. J., Chan, D. W., and Veltri, R. W., Evaluation of Proprostate Specific Antigen for Early Detection of Prostate Cancer in Men with a Total Prostate Specific Antigen Range of 4.0 to 10.0 Ng/MI, *The Journal of Urology*, 170, 3, 723-726, **2003**.
 - [91] Getzenberg, R. H., Pienta, K. J., Huang, E. Y., and Coffey, D. S., Identification of Nuclear Matrix Proteins in the Cancer and Normal Rat Prostate, *Cancer Research*, 51, 24, 6514-6520, **1991**.
 - [92] Dhir, R., Vietmeier, B., Arlotti, J., Acquafondata, M., Landsittel, D., Masterson, R., and Getzenberg, R. H., Early Identification of Individuals with Prostate Cancer in Negative Biopsies, *The journal of Urology*, 171, 4, 1419-1423, **2004**.

- [93] Leman, E. S., Cannon, G. W., Trock, B. J., Sokoll, L. J., Chan, D. W., Mangold, L., Partin, A. W., and Getzenberg, R. H., Retracted: Epca-2: A Highly Specific Serum Marker for Prostate Cancer, *Urology*, 69, 4, 714-720, **2007**.
- [94] Recker, F., Kwiatkowski, M. K., Piironen, T., Pettersson, K., Huber, A., Lümnen, G., and Tscholl, R., Human Glandular Kallikrein as a Tool to Improve Discrimination of Poorly Differentiated and Non-Organ-Confined Prostate Cancer Compared with Prostate-Specific Antigen, *Urology*, 55, 4, 481-485, **2000**.
- [95] Stephan, C., Jung, K., Nakamura, T., Yousef, G. M., Kristiansen, G., and Diamandis, E. P., Serum Human Glandular Kallikrein 2 (Hk2) for Distinguishing Stage and Grade of Prostate Cancer, *International Journal of Urology*, 13, 3, 238-243, **2006**.
- [96] Mincheff, M., Zoubak, S., and Makogonenko, Y., Immune Responses against Psma after Gene-Based Vaccination for Immunotherapy–A: Results from Immunizations in Animals, *Cancer Gene Therapy*, 13, 4, 436-444, **2006**.
- [97] Diamandis, E. P., Okui, A., Mitsui, S., Luo, L.-Y., Soosaipillai, A., Grass, L., Nakamura, T., Howarth, D. J., and Yamaguchi, N., Human Kallikrein 11 a New Biomarker of Prostate and Ovarian Carcinoma, *Cancer Research*, 62, 1, 295-300, **2002**.
- [98] Stephan, C., Meyer, H.-A., Cammann, H., Nakamura, T., Diamandis, E. P., and Jung, K., Improved Prostate Cancer Detection with a Human Kallikrein 11 and Percentage Free Psa-Based Artificial Neural Network, *Biological Chemistry*, 387, 6, 801-805, **2006**.
- [99] Rhodes, D. R., Barrette, T. R., Rubin, M. A., Ghosh, D., and Chinnaiyan, A. M., Meta-Analysis of Microarrays Interstudy Validation of Gene Expression Profiles Reveals Pathway Dysregulation in Prostate Cancer, *Cancer Research*, 62, 15, 4427-4433, **2002**.
- [100] Miyake, H., Hara, I., Yamanaka, K., Gohji, K., Arakawa, S., and Kamidono, S., Elevation of Serum Levels of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Receptor Is Associated with Disease Progression and Prognosis in Patients with Prostate Cancer, *The Prostate*, 39, 2, 123-129, **1999**.
- [101] Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X.-W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., and Kuefer, R., Recurrent Fusion of Tmprss2 and Ets Transcription Factor Genes in Prostate Cancer, *Science*, 310, 5748, 644-648, **2005**.
- [102] Laxman, B., Tomlins, S. A., Mehra, R., Morris, D. S., Wang, L., Helgeson, B. E., Shah, R. B., Rubin, M. A., Wei, J. T., and Chinnaiyan, A. M., Noninvasive Detection of Tmprss2: Erg Fusion Transcripts in the Urine of Men with Prostate Cancer, *Neoplasia*, 8, 10, 885-888, **2006**.
- [103] Shariat, S. F., Menesses-Diaz, A., Kim, I. Y., Muramoto, M., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M., Tissue Expression of Transforming Growth Factor-B 1 and Its Receptors: Correlation with Pathologic Features and Biochemical Progression in Patients Undergoing Radical Prostatectomy, *Urology*, 63, 6, 1191-1197, **2004**.

- [104] Ivanovic, V., Melman, A., Davis-Joseph, B., Valcic, M., and Geliebter, J., Elevated Plasma Levels of Tgf-B1 in Patients with Invasive Prostate Cancer, *Nature Medicine*, 1, 4, 282-284, **1995**.
- [105] Shariat, S. F., Walz, J., Roehrborn, C. G., Montorsi, F., Jeldres, C., Saad, F., and Karakiewicz, P. I., Early Postoperative Plasma Transforming Growth Factor-B1 Is a Strong Predictor of Biochemical Progression after Radical Prostatectomy, *The Journal of Urology*, 179, 4, 1593-1597, **2008**.
- [106] Umbas, R., Schalken, J. A., Aalders, T. W., Carter, B. S., Karthaus, H. F., Schaafsma, H. K., Debruyne, F. M., and Isaacs, W. B., Expression of the Cellular Adhesion Molecule E-Cadherin Is Reduced or Absent in High-Grade Prostate Cancer, *Cancer Research*, 52, 18, 5104-5109, **1992**.
- [107] Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., Debruyne, F. M., and Schalken, J. A., Decreased E-Cadherin Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Prostate Cancer, *Cancer Research*, 54, 14, 3929-3933, **1994**.
- [108] Wozny, W., Schroer, K., Schwall, G. P., Poznanović, S., Stegmann, W., Dietz, K., Rogatsch, H., Schaefer, G., Huebl, H., and Klocker, H., Differential Radioactive Quantification of Protein Abundance Ratios between Benign and Malignant Prostate Tissues: Cancer Association of Annexin A3, *Proteomics*, 7, 2, 313-322, **2007**.
- [109] Gu, Z., Thomas, G., Yamashiro, J., Shintaku, I., Dorey, F., Raitano, A., Witte, O., Said, J., Loda, M., and Reiter, R., Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) Expression Increases with High Gleason Score, Advanced Stage and Bone Metastasis in Prostate Cancer, *Oncogene*, 19, 10, 1288-1296, **2000**.
- [110] Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., and Loening, S. A., Hepsin Is Highly over Expressed in and a New Candidate for a Prognostic Indicator in Prostate Cancer, *The Journal of Urology*, 171, 1, 187-191, **2004**.
- [111] Shariat, S. F., Andrews, B., Kattan, M. W., Kim, J., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M., Plasma Levels of Interleukin-6 and Its Soluble Receptor Are Associated with Prostate Cancer Progression and Metastasis, *Urology*, 58, 6, 1008-1015, **2001**.
- [112] Shariat, S. F., Kattan, M. W., Traxel, E., Andrews, B., Zhu, K., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M., Association of Pre-and Postoperative Plasma Levels of Transforming Growth Factor B1 and Interleukin 6 and Its Soluble Receptor with Prostate Cancer Progression, *Clinical Cancer Research*, 10, 6, 1992-1999, **2004**.
- [113] Parekh, D. J., Ankerst, D. P., Troyer, D., Srivastava, S., and Thompson, I. M., Biomarkers for Prostate Cancer Detection, *The Journal of Urology*, 178, 6, 2252-2259, **2007**.
- [114] Antenor, J. A. V., Han, M., Roehl, K. A., Nadler, R. B., and Catalona, W. J., Relationship between Initial Prostate Specific Antigen Level and Subsequent Prostate Cancer Detection in a Longitudinal Screening Study, *The Journal of Urology*, 172, 1, 90-93, **2004**.

- [115] Thompson, I. M., Ankerst, D. P., Chi, C., Lucia, M. S., Goodman, P. J., Crowley, J. J., Parnes, H. L., and Coltman, C. A., Operating Characteristics of Prostate-Specific Antigen in Men with an Initial Psa Level of 3.0 Ng/ML or Lower, *Jama*, 294, 1, 66-70, **2005**.
- [116] Benson, M., Whang, I. S., Olsson, C., McMahon, D., and Cooner, W., The Use of Prostate Specific Antigen Density to Enhance the Predictive Value of Intermediate Levels of Serum Prostate Specific Antigen, *The Journal of Urology*, 147, 3 Pt 2, 817-821, **1992**.
- [117] Carter, H. B., Pearson, J. D., Metter, E. J., Brant, L. J., Chan, D. W., Andres, R., Fozard, J. L., and Walsh, P. C., Longitudinal Evaluation of Prostate-Specific Antigen Levels in Men with and without Prostate Disease, *Jama*, 267, 16, 2215-2220, **1992**.
- [118] Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., and Cooner, W. H., The Use of Age-Specific Reference Ranges for Serum Prostate Specific Antigen in Men 60 Years Old or Older, *The Journal of Urology*, 153, 4, 1160-1163, **1995**.
- [119] Schmid, H.-P., Tumour Markers in Patients on Deferred Treatment: Prostate Specific Antigen Doubling Times, *Cancer Surveys*, 23, 157-167, **1994**.
- [120] Catalona, W. J., Smith, D. S., Wolfert, R. L., Wang, T. J., Rittenhouse, H. G., Ratliff, T. L., and Nadler, R. B., Evaluation of Percentage of Free Serum Prostate-Specific Antigen to Improve Specificity of Prostate Cancer Screening, *Jama*, 274, 15, 1214-1220, **1995**.
- [121] Thompson, I. M., Ankerst, D. P., Chi, C., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Feng, Z., Parnes, H. L., and Coltman, C. A., Assessing Prostate Cancer Risk: Results from the Prostate Cancer Prevention Trial, *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 8, 529-534, **2006**.
- [122] Edgington, T. S., Glassock, R. J., Watson, J. I., and Dixon, F. J., Characterization and Isolation of Specific Renal Tubular Epithelial Antigens, *The Journal of Immunology*, 99, 6, 1199-1210, **1967**.
- [123] Milgrom, F., Tuggac, Z. M., and Witebsky, E., Organ-Specific Antigens of Liver, Testicle and Pituitary, *The Journal of Immunology*, 94, 1, 157-163, **1965**.
- [124] Sleeman, H. K., Studies on Soluble Antigenic Substances Isolated from Human Liver, *Experimental Biology and Medicine*, 113, 2, 451-455, **1963**.
- [125] Li, T., and Behrman, S., The Sperm-and Seminal Plasma-Specific Antigens of Human Semen, *Fertility and Sterility*, 21, 7, 565, **1970**.
- [126] SHULMAN, S., and BRONSON, P., Immunochemical Studies on Human Seminal Plasma, *Journal of Reproduction and Fertility*, 18, 3, 481-491, **1969**.
- [127] Rao, A. R., Motiwala, H. G., and Karim, O., The Discovery of Prostate-Specific Antigen, *BJU international*, 101, 1, 5-10, **2008**.
- [128] Stenman, U.-H., Leinonen, J., Zhang, W.-M., and Finne, P., "Prostate-Specific Antigen." pp. 83-93.

- [129] Henttu, P., and Vihko, P., Cdna Coding for the Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies to the Human Tissue Kallikrein Genes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160, 2, 903-910, **1989**.
- [130] Lundwall, Å., and Lilja, H., Molecular Cloning of Human Prostate Specific Antigen Cdna, *FEBS Letters*, 214, 2, 317-322, **1987**.
- [131] Schaller, J., Akiyama, K., Tsuda, R., Hara, M., Marti, T., and Rickli, E. E., Isolation, Characterization and Amino-Acid Sequence of Γ -Seminoprotein, a Glycoprotein from Human Seminal Plasma, *European Journal of Biochemistry*, 170, 1-2, 111-120, **1987**.
- [132] Wang, M., Papsidero, L., Kuriyama, M., Valenzuela, L., Murphy, G., and Chu, T., Prostate Antigen: A New Potential Marker for Prostatic Cancer, *The Prostate*, 2, 1, 89-96, **1981**.
- [133] Zhang, W.-M., Leinonen, J., Kalkkinen, N., Dowell, B., and Stenman, U.-H., Purification and Characterization of Different Molecular Forms of Prostate-Specific Antigen in Human Seminal Fluid, *Clinical Chemistry*, 41, 11, 1567-1573, **1995**.
- [134] GILABERT, J., A Quantitative Elisa for the Measurement of Complexes of Prostate-Specific Antigen with Protein C Inhibitor When Using a Purified Standard, *J Lab Clin Med*, **1993**.
- [135] Cohen, P., Graves, H., Peehl, D., Kamarei, M., Giudice, L., and Rosenfeld, R., Prostate-Specific Antigen (Psa) Is an Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Protease Found in Seminal Plasma, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75, 4, 1046-1053, **1992**.
- [136] Killian, C. S., Corral, D. A., Kawinski, E., and Constantine, R., Mitogenic Response of Osteoblast Cells to Prostate-Specific Antigen Suggests an Activation of Latent Tgf-B and a Proteolytic Modulation of Cell Adhesion Receptors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192, 2, 940-947, **1993**.
- [137] Yoshida, E., Ohmura, S., Sugiki, M., Maruyama, M., and Mihara, H., Prostate-Specific Antigen Activates Single-Chain Urokinase-Type Plasminogen Activator, *International Journal of Cancer*, 63, 6, 863-865, **1995**.
- [138] Abrahamsson, P. A., Lilja, H., Falkmer, S., and Wadström, L., Immunohistochemical Distribution of the Three Predominant Secretory Proteins in the Parenchyma of Hyperplastic and Neoplastic Prostate Glands, *The Prostate*, 12, 1, 39-46, **1988**.
- [139] Aihara, M., Lebovitz, R., Wheeler, T., Kinner, B., Ohori, M., and Scardino, P., Prostate Specific Antigen and Gleason Grade: An Immunohistochemical Study of Prostate Cancer, *The Journal of Urology*, 151, 6, 1558-1564, **1994**.
- [140] Kamoshida, S., and Tsutsumi, Y., Extraprostatic Localization of Prostatic Acid Phosphatase and Prostate-Specific Antigen: Distribution in Cloacogenic Glandular Epithelium and Sex-Dependent Expression in Human Anal Gland, *Human Pathology*, 21, 11, 1108-1111, **1990**.

- [141] Diamandis, E. P., and Yu, H., Nonprostatic Sources of Prostate-Specific Antigen, *Urologic Clinics of North America*, 24, 2, 275-282, **1997**.
- [142] Oesterling, J. E., Tekchandani, A. H., Martin, S. K., Bergstralh, E. J., Reichstein, E., Diamandis, E. P., Yemoto, C., and Stamey, T. A., The Periurethral Glands Do Not Significantly Influence the Serum Prostate Specific Antigen Concentration, *The Journal of Urology*, 155, 5, 1658-1660, **1996**.
- [143] Oesterling, J. E., Prostate Specific Antigen: A Critical Assessment of the Most Useful Tumor Marker for Adenocarcinoma of the Prostate, *The Journal of Urology*, 145, 5, 907-923, **1991**.
- [144] STENMAN, U. H., Prostate-Specific Antigen, Clinical Use and Staging: An Overview, *British Journal of Urology*, 79, S1, 53-60, **1997**.
- [145] Stenman, U.-H., Leinonen, J., Alfthan, H., Rannikko, S., Tuhkanen, K., and Alfthan, O., A Complex between Prostate-Specific Antigen and A1-Antichymotrypsin Is the Major Form of Prostate-Specific Antigen in Serum of Patients with Prostatic Cancer: Assay of the Complex Improves Clinical Sensitivity for Cancer, *Cancer Research*, 51, 1, 222-226, **1991**.
- [146] Imber, M., and Pizzo, S., Clearance and Binding of Two Electrophoretic "Fast" Forms of Human Alpha 2-Macroglobulin, *Journal of Biological Chemistry*, 256, 15, 8134-8139, **1981**.
- [147] Stenman, U.-H., Leinonen, J., Zhang, W.-M., Finne, P., and Wu, P., The Clinical Importance of Free Prostate-Specific Antigen (Psa), *Current Opinion in Urology*, 8, 5, 393-399, **1998**.
- [148] Björk, T., Ljungberg, B., Piironen, T., Abrahamsson, P.-A., Pettersson, K., Cockett, A. T., and Lilja, H., Rapid Exponential Elimination of Free Prostate-Specific Antigen Contrasts the Slow, Capacity-Limited Elimination of Psa Complexed to Alpha 1-Antichymotrypsin from Serum, *Urology*, 51, 1, 57-62, **1998**.
- [149] Richardson, T. D., Wojno, K. J., Liang, L. W., Giacherio, D. A., England, B. G., Henricks, W. H., Schork, A., and Oesterling, J. E., Half-Life Determination of Serum Free Prostate-Specific Antigen Following Radical Retropubic Prostatectomy, *Urology*, 48, 6, 40-44, **1996**.
- [150] Bjartell, A., Björk, T., Matikainen, M., and Abrahamsson, P., Disant" Agnese A. Lilja H (1993). Production of Alpha-1-Antichymotrypsin by Psa-Containing Cells of the Human Prostate Epithelium, *Urology*, 42, 502-510.
- [151] Catalona, W., Richie, J., Ahmann, F., Hudson, M., Scardino, P., Flanigan, R., Dekernion, J., Ratliff, T., Kavoussi, L., and Dalkin, B., Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical Trial of 6,630 Men, *The Journal of Urology*, 151, 5, 1283-1290, **1994**.
- [152] Gann, P. H., Hennekens, C. H., and Stampfer, M. J., A Prospective Evaluation of Plasma Prostate-Specific Antigen for Detection of Prostatic Cancer, *Jama*, 273, 4, 289-294, **1995**.

- [153] Schröder, F. H., van der Crujisen-Koeter, I., de Koning, H. J., Vis, A. N., Hoedemaeker, R. F., and Kranse, R., Prostate Cancer Detection at Low Prostate Specific Antigen, *The Journal of Urology*, 163, 3, 806-812, **2000**.
- [154] Stenman, U.-H., Leinonen, J., Hakama, M., Knekt, P., Aromaa, A., and Teppo, L., Serum Concentrations of Prostate Specific Antigen and Its Complex with A 1-Antichymotrypsin before Diagnosis of Prostate Cancer, *The Lancet*, 344, 8937, 1594-1598, **1994**.
- [155] Balk, S. P., Ko, Y.-J., and Bubley, G. J., Biology of Prostate-Specific Antigen, *Journal of Clinical Oncology*, 21, 2, 383-391, **2003**.
- [156] Morgan, T. O., Jacobsen, S. J., McCarthy, W. F., Jacobson, D. J., McLeod, D. G., and Moul, J. W., Age-Specific Reference Ranges for Serum Prostate-Specific Antigen in Black Men, *New England Journal of Medicine*, 335, 5, 304-310, **1996**.
- [157] Oesterling, J. E., Cooner, W. H., Jacobsen, S. J., Guess, H. A., and Lieber, M. M., Influence of Patient Age on the Serum Psa Concentration. An Important Clinical Observation, *The Urologic clinics of North America*, 20, 4, 671-680, **1993**.
- [158] Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Chute, C. G., Guess, H. A., Girman, C. J., Panser, L. A., and Lieber, M. M., Serum Prostate-Specific Antigen in a Community-Based Population of Healthy Men: Establishment of Age-Specific Reference Ranges, *Jama*, 270, 7, 860-864, **1993**.
- [159] Crawford, E. D., Leewansangtong, S., Goktas, S., Holthaus, K., and Baier, M., Efficiency of Prostate-Specific Antigen and Digital Rectal Examination in Screening, Using 4.0 Ng/MI and Age-Specific Reference Range as a Cutoff for Abnormal Values, *The Prostate*, 38, 4, 296-302, **1999**.
- [160] Hudson, M., Bahnson, R., and Catalona, W., Clinical Use of Prostate Specific Antigen in Patients with Prostate Cancer, *The Journal of Urology*, 142, 4, 1011-1017, **1989**.
- [161] Critz, F. A., Levinson, A. K., Williams, W. H., and Holladay, D. A., Prostate-Specific Antigen Nadir: The Optimum Level after Irradiation for Prostate Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 14, 11, 2893-2900, **1996**.
- [162] Kattan, M. W., Fearn, P. A., Leibel, S., and Potters, L., The Definition of Biochemical Failure in Patients Treated with Definitive Radiotherapy, *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 48, 5, 1469-1474, **2000**.
- [163] Killian, C. S., Yang, N., Emrich, L. J., Vargas, F. P., Kuriyama, M., Wang, M. C., Slack, N. H., Papsidero, L. D., Murphy, G. P., and Chu, T. M., Prognostic Importance of Prostate-Specific Antigen for Monitoring Patients with Stages B2 to D1 Prostate Cancer, *Cancer Research*, 45, 2, 886-891, **1985**.
- [164] Kuriyama, M., Wang, M. C., Lee, C.-I., Papsidero, L. D., Killian, C. S., Inaji, H., Slack, N. H., Nishiura, T., Murphy, G. P., and Chu, T. M., Use of Human Prostate-Specific Antigen in Monitoring Prostate Cancer, *Cancer Research*, 41, 10, 3874-3876, **1981**.

- [165] Crowther, J., The Elisa Guidebook, Vol. 149, *Methods in Molecular Biology*, Human Press Totowa, New Jersey, 49, **2001**.
- [166] Crowther, J., "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa)," *Molecular Biomethods Handbook*, 657-682: Springer, **2008**.
- [167] Healy, D. A., Hayes, C. J., Leonard, P., McKenna, L., and O'Kennedy, R., Biosensor Developments: Application to Prostate-Specific Antigen Detection, *Trends in Biotechnology*, 25, 3, 125-131, **2007**.
- [168] Kost, G. J., Guidelines for Point-of-Care Testing. Improving Patient Outcomes, *American Journal of Clinical Pathology*, 104, 4 Suppl 1, S111-127, **1995**.
- [169] Grieve, R., Beech, R., Vincent, J., and Mazurkiewicz, J., Near Patient Testing in Diabetes Clinics: Appraising the Costs and Outcomes, *Health Technology Assessment (Winchester, Ingiltere)*, 3, 15, 1-74, **1998**.
- [170] von Lucadou, I., Luft, G., Preidel, W., and Richter, G., The Electrocatalytic Glucose Sensor, *Hormone and Metabolic Research. Supplement Series*, 20, 41-43, **1987**.
- [171] Mulchandani, A., and Bassi, A. S., Principles and Applications of Biosensors for Bioprocess Monitoring and Control, *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 2, 105-124, **1995**.
- [172] Su, L., Jia, W., Hou, C., and Lei, Y., Microbial Biosensors: A Review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 5, 1788-1799, **2011**.
- [173] Turner, A. P., Biosensors, *Current Opinion in Biotechnology*, 5, 1, 49-53, **1994**.
- [174] Ziegler, C., and Göpel, W., Biosensor Development, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 5, 585-591, **1998**.
- [175] Nice, E., and Catimel, B., Instrumental Biosensors: New Perspectives for the Analysis of Biomolecular Interactions, *Bioassays*, 21, 4, 339-352, **1999**.
- [176] Clarke, D. J., Calder, M. R., Carr, R. J., Blake-Coleman, B. C., Moody, S. C., and Collinge, T. A., The Development and Application of Biosensing Devices for Bioreactor Monitoring and Control, *Biosensors*, 1, 3, 213-320, **1985**.
- [177] Gooding, J. J., Biosensor Technology for Detecting Biological Warfare Agents: Recent Progress and Future Trends, *Analytica Chimica Acta*, 559, 2, 137-151, **2006**.
- [178] Shah, J., and Wilkins, E., Electrochemical Biosensors for Detection of Biological Warfare Agents, *Electroanalysis*, 15, 3, 157-167, **2003**.
- [179] Pan, Y., Sonn, G. A., Sin, M. L., Mach, K. E., Shih, M.-C., Gau, V., Wong, P. K., and Liao, J. C., Electrochemical Immunosensor Detection of Urinary Lactoferrin in Clinical Samples for Urinary Tract Infection Diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2, 649-654, **2010**.
- [180] Turner, A. P., and Pickup, J. C., Diabetes Mellitus: Biosensors for Research and Management, *Biosensors*, 1, 1, 85-115, **1985**.

- [181] Huhtinen, P., Soukka, T., Lövgren, T., and Härmä, H., Immunoassay of Total Prostate-Specific Antigen Using Europium (Iii) Nanoparticle Labels and Streptavidin–Biotin Technology, *Journal of Immunological Methods*, 294, 1, 111-122, **2004**.
- [182] Soukka, T., Paukkunen, J., Härmä, H., Lönnberg, S., Lindroos, H., and Lövgren, T., Supersensitive Time-Resolved Immunofluorometric Assay of Free Prostate-Specific Antigen with Nanoparticle Label Technology, *Clinical Chemistry*, 47, 7, 1269-1278, **2001**.
- [183] Ye, Z., Tan, M., Wang, G., and Yuan, J., Preparation, Characterization, and Time-Resolved Fluorometric Application of Silica-Coated Terbium (Iii) Fluorescent Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 76, 3, 513-518, **2004**.
- [184] Ye, Z., Tan, M., Wang, G., and Yuan, J., Preparation, Characterization and Application of Fluorescent Terbium Complex-Doped Zirconia Nanoparticles, *Journal of Fluorescence*, 15, 4, 499-505, **2005**.
- [185] Grubisha, D. S., Lipert, R. J., Park, H.-Y., Driskell, J., and Porter, M. D., Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen: An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogold Labels, *Analytical Chemistry*, 75, 21, 5936-5943, **2003**.
- [186] Wang, J., Electrochemical Biosensors: Towards Point-of-Care Cancer Diagnostics, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 10, 1887-1892, **2006**.
- [187] Fernández-Sánchez, C., McNeil, C. J., Rawson, K., and Nilsson, O., Disposable Noncompetitive Immunosensor for Free and Total Prostate-Specific Antigen Based on Capacitance Measurement, *Analytical Chemistry*, 76, 19, 5649-5656, **2004**.
- [188] Meyerhoff, M. E., Duan, C., and Meusel, M., Novel Nonseparation Sandwich-Type Electrochemical Enzyme Immunoassay System for Detecting Marker Proteins in Undiluted Blood, *Clinical Chemistry*, 41, 9, 1378-1384, **1995**.
- [189] Sarkar, P., Pal, P. S., Ghosh, D., Setford, S. J., and Tothill, I. E., Amperometric Biosensors for Detection of the Prostate Cancer Marker (Psa), *International Journal of Pharmaceutics*, 238, 1, 1-9, **2002**.
- [190] Lee, J. H., Hwang, K. S., Park, J., Yoon, K. H., Yoon, D. S., and Kim, T. S., Immunoassay of Prostate-Specific Antigen (Psa) Using Resonant Frequency Shift of Piezoelectric Nanomechanical Microcantilever, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 10, 2157-2162, **2005**.
- [191] SeonáHwang, K., HoonáLee, J., SungáYoon, D., HoáPark, J., and SongáKim, T., In-Situ Quantitative Analysis of a Prostate-Specific Antigen (Psa) Using a Nanomechanical Pzt Cantilever, *Lab on a Chip*, 4, 6, 547-552, **2004**.
- [192] McKendry, R., Zhang, J., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H. P., Baller, M. K., Certa, U., Meyer, E., and Güntherodt, H.-J., Multiple Label-Free Biodetection and Quantitative DNA-Binding Assays on a Nanomechanical Cantilever Array, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 15, 9783-9788, **2002**.

- [193] Wood, R., Xlii. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 4, 21, 396-402, **1902**.
- [194] Wood, R., Xxvii. Diffraction Gratings with Controlled Groove Form and Abnormal Distribution of Intensity, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 23, 134, 310-317, **1912**.
- [195] Rayleigh, L., On the Dynamical Theory of Gratings, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 79, 532, 399-416, **1907**.
- [196] Fano, U., The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves), *JOSA*, 31, 3, 213-222, **1941**.
- [197] Otto, A., Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflection, *Zeitschrift für Physik*, 216, 4, 398-410, **1968**.
- [198] Kretschmann, E., and Raether, H., Radiative Decay of Non-Radiative Surface Plasmons Excited by Light, *Z. Naturforsch. a*, 23, 12, 2135-2136, **1968**.
- [199] Liedberg, B., Nylander, C., and Lunström, I., Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 299-304, **1983**.
- [200] Tudos, A. J., and Schasfoort, R. B., Introduction to Surface Plasmon Resonance, *Handbook of Surface Plasmon resonance*, 1-14, **2008**.
- [201] Geib, S., Sandoz, G., Mabrouk, K., Matavel, A., Marchot, P., Hoshi, T., Villaz, M., Ronjat, M., Miquelis, R., and Lévêque, C., Use of a Purified and Functional Recombinant Calcium-Channel B4 Subunit in Surface-Plasmon Resonance Studies, *Biochem. J*, 364, 285-292, **2002**.
- [202] Kretschmann, E., Die Bestimmung Optischer Konstanten Von Metallen Durch Anregung Von Oberflächenplasmaschwingungen, *Zeitschrift für Physik*, 241, 4, 313-324, **1971**.
- [203] Wassaf, D., Kuang, G., Kopacz, K., Wu, Q.-L., Nguyen, Q., Toews, M., Cosic, J., Jacques, J., Wiltshire, S., and Lambert, J., High-Throughput Affinity Ranking of Antibodies Using Surface Plasmon Resonance Microarrays, *Analytical Biochemistry*, 351, 2, 241-253, **2006**.
- [204] Pérez-Morales, M., Pedrosa, J. M., Muñoz, E., Martín-Romero, M. T., Möbius, D., and Camacho, L., Ellipsometric Study of a Phospholipid Monolayer at the Air–Water Interface in Presence of Large Organic Counter Ions, *Thin Solid Films*, 488, 1, 247-253, **2005**.
- [205] Čtyroký, J., Homola, J., and Skalský, M., Tuning of Spectral Operation Range of a Waveguide Surface Plasmon Resonance Sensor, *Electronics Letters*, 33, 14, 1246-1248, **1997**.
- [206] Salamon, Z., Macleod, H. A., and Tollin, G., Surface Plasmon Resonance Spectroscopy as a Tool for Investigating the Biochemical and Biophysical Properties of Membrane Protein Systems. Ii: Applications to Biological

- Systems, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1331, 2, 131-152, **1997**.
- [207] Schasfoort, R. B. M., Kooyman, R., Bergveld, P., and Greve, J., A New Approach to Immunofet Operation, *Biosensors and Bioelectronics*, 5, 2, 103-124, **1990**.
- [208] Kooyman, R., Kolkman, H., Van Gent, J., and Greve, J., Surface Plasmon Resonance Immunosensors: Sensitivity Considerations, *Analytica Chimica Acta*, 213, 35-45, **1988**.
- [209] Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., and Rönnerberg, I., Real-Time Biospecific Interaction Analysis Using Surface Plasmon Resonance and a Sensor Chip Technology, *Biotechniques*, 11, 5, 620-627, **1991**.
- [210] Chtcheglova, L. A., Vogel, M., Gruber, H. J., Dietler, G., and Haeberli, A., Kinetics of the Interaction of Desaabb-Fibrin Monomer with Immobilized Fibrinogen, *Biopolymers*, 83, 1, 69-82, **2006**.
- [211] Karlsson, R., and Stahlberg, R., Surface Plasmon Resonance Detection and Multispot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low-Molecular-Weight Analytes and for Determination of Low Affinities, *Analytical Biochemistry*, 228, 2, 274-280, **1995**.
- [212] Wink, T., de Beer, J., Hennink, W. E., Bult, A., and van Bennekom, W. P., Interaction between Plasmid DNA and Cationic Polymers Studied by Surface Plasmon Resonance Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 71, 4, 801-805, **1999**.
- [213] Nedelkov, D., Rasooly, A., and Nelson, R. W., Multitoxin Biosensor-Mass Spectrometry Analysis: A New Approach for Rapid, Real-Time, Sensitive Analysis of Staphylococcal Toxins in Food, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 1, 1-13, **2000**.
- [214] Haupt, K., and Mosbach, K., Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors, *Chemical Reviews*, 100, 7, 2495-2504, **2000**.
- [215] Hudson, P. J., Recombinant Antibody Fragments, *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 4, 395-402, **1998**.
- [216] Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R., Making Antibodies by Phage Display Technology, *Annual review of immunology*, 12, 1, 433-455, **1994**.
- [217] Lehn, J.-M., Toward Self-Organization and Complex Matter, *Science*, 295, 5564, 2400-2403, **2002**.
- [218] Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R., and Mosbach, K., Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting, **1993**.
- [219] Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., and Vulfson, E. N., A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 27, 7105-7111, **1995**.

- [220] Wulff, G., Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates—a Way Towards Artificial Antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 17, 1812-1832, **1995**.
- [221] Mosbach, K., and Ramström, O., The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Nature Biotechnology*, 14, 2, 163-170, **1996**.
- [222] Klein, J. U., Whitcombe, M. J., Mulholland, F., and Vulfson, E. N., Template-Mediated Synthesis of a Polymeric Receptor Specific to Amino Acid Sequences, *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 13-14, 2057-2060, **1999**.
- [223] Yilmaz, E., Haupt, K., and Mosbach, K., The Use of Immobilized Templates—a New Approach in Molecular Imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, 39, 12, 2115-2118, **2000**.
- [224] Hosoya, K., Yoshizako, K., Shirasu, Y., Kimata, K., Araki, T., Tanaka, N., and Haginaka, J., Molecularly Imprinted Uniform-Size Polymer-Based Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography Structural Contribution of Cross-Linked Polymer Network on Specific Molecular Recognition, *Journal of Chromatography A*, 728, 1, 139-147, **1996**.
- [225] Mayes, A. G., and Mosbach, K., Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase, *Analytical Chemistry*, 68, 21, 3769-3774, **1996**.
- [226] Vorderbruggen, M. A., Wu, K., and Breneman, C. M., Use of Cationic Aerosol Photopolymerization to Form Silicone Microbeads in the Presence of Molecular Templates, *Chemistry of Materials*, 8, 5, 1106-1111, **1996**.
- [227] Ansell, R. J., and Mosbach, K., Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Beads for Drug Radioligand Binding Assay, *Analyst*, 123, 7, 1611-1616, **1998**.
- [228] Ye, L., Cormack, P. A., and Mosbach, K., Molecularly Imprinted Monodisperse Microspheres for Competitive Radioassay, *Analytical Communications*, 36, 2, 35-38, **1999**.
- [229] Matsui, J., Kato, T., Takeuchi, T., Suzuki, M., Yokoyama, K., Tamiya, E., and Karube, I., Molecular Recognition in Continuous Polymer Rods Prepared by a Molecular Imprinting Technique, *Analytical Chemistry*, 65, 17, 2223-2224, **1993**.
- [230] Sellergren, B., Imprinted Dispersion Polymers: A New Class of Easily Accessible Affinity Stationary Phases, *Journal of Chromatography A*, 673, 1, 133-141, **1994**.
- [231] Schweitz, L., Andersson, L. I., and Nilsson, S., Capillary Electrochromatography with Predetermined Selectivity Obtained through Molecular Imprinting, *Analytical Chemistry*, 69, 6, 1179-1183, **1997**.
- [232] Hjerten, S., Liao, J.-L., Nakazato, K., Wang, Y., Zamaratskaia, G., and Zhang, H.-X., Gels Mimicking Antibodies in Their Selective Recognition of Proteins, *Chromatographia*, 44, 5-6, 227-234, **1997**.

- [233] Kempe, M., Glad, M., and Mosbach, K., An Approach Towards Surface Imprinting Using the Enzyme Ribonuclease A, *Journal of Molecular Recognition*, 8, 1-2, 35-39, **1995**.
- [234] Aherne, A., Alexander, C., Payne, M., Perez, N., and Vulfson, E., Bacteria-Mediated Lithography of Polymer Surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 118, 36, 8771-8772, **1996**.
- [235] Lanza, F., and Sellergren, B., Method for Synthesis and Screening of Large Groups of Molecularly Imprinted Polymers, *Analytical Chemistry*, 71, 11, 2092-2096, **1999**.
- [236] Takeuchi, T., Fukuma, D., and Matsui, J., Combinatorial Molecular Imprinting: An Approach to Synthetic Polymer Receptors, *Analytical Chemistry*, 71, 2, 285-290, **1999**.
- [237] Fischer, L., Mueller, R., Ekberg, B., and Mosbach, K., Direct Enantioseparation Of. Beta.-Adrenergic Blockers Using a Chiral Stationary Phase Prepared by Molecular Imprinting, *Journal of the American Chemical Society*, 113, 24, 9358-9360, **1991**.
- [238] Sellergren, B., and Shea, K. J., Influence of Polymer Morphology on the Ability of Imprinted Network Polymers to Resolve Enantiomers, *Journal of Chromatography A*, 635, 1, 31-49, **1993**.
- [239] Wulff, G., and Haarer, J., Enzyme-Analogue Built Polymers, 29. The Preparation of Defined Chiral Cavities for the Racemic Resolution of Free Sugars, *Die Makromolekulare Chemie*, 192, 6, 1329-1338, **1991**.
- [240] Kriz, D., Kriz, C. B., Andersson, L. I., and Mosbach, K., Thin-Layer Chromatography Based on the Molecular Imprinting Technique, *Analytical Chemistry*, 66, 17, 2636-2639, **1994**.
- [241] Sellergren, B., Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer, *Analytical Chemistry*, 66, 9, 1578-1582, **1994**.
- [242] Ramström, O., Ye, L., and Mosbach, K., Screening of a Combinatorial Steroid Library Using Molecularly Imprinted Polymers, *Analytical Communications*, 35, 1, 9-11, **1998**.
- [243] Mustafa, G., and Lieberzeit, P. A., "Mip Sensors on the Way to Real-World Applications," *Designing Receptors for the Next Generation of Biosensors*, 167-187: Springer, **2013**.
- [244] Inerowicz, H., Howell, S., Regnier, F., and Reifemberger, R., Multiprotein Immunoassay Arrays Fabricated by Microcontact Printing, *Langmuir*, 18, 13, 5263-5268, **2002**.
- [245] James, C., Davis, R., Kam, L., Craighead, H., Isaacson, M., Turner, J., and Shain, W., Patterned Protein Layers on Solid Substrates by Thin Stamp Microcontact Printing, *Langmuir*, 14, 4, 741-744, **1998**.
- [246] Ratner, B. D., and Shi, H., Recognition Templates for Biomaterials with Engineered Bioreactivity, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 4, 4, 395-402, **1999**.

- [247] Hirayama, K., Sakai, Y., and Kameoka, K., Synthesis of Polymer Particles with Specific Lysozyme Recognition Sites by a Molecular Imprinting Technique, *Journal of Applied Polymer Science*, 81, 14, 3378-3387, **2001**.
- [248] Lin, H.-Y., Hsu, C.-Y., Thomas, J. L., Wang, S.-E., Chen, H.-C., and Chou, T.-C., The Microcontact Imprinting of Proteins: The Effect of Cross-Linking Monomers for Lysozyme, Ribonuclease a and Myoglobin, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 4, 534-543, **2006**.
- [249] Chen, L., Xu, S., and Li, J., Recent Advances in Molecular Imprinting Technology: Current Status, Challenges and Highlighted Applications, *Chemical Society Reviews*, 40, 5, 2922-2942, **2011**.
- [250] Sener, G., Ozgur, E., Rad, A. Y., Uzun, L., Say, R., and Denizli, A., Rapid Real-Time Detection of Procalcitonin Using a Microcontact Imprinted Surface Plasmon Resonance Biosensor, *Analyst*, 138, 21, 6422-6428, **2013**.
- [251] Dickert, F. L., Forth, P., Bulst, W.-E., Fischerauer, G., and Knauer, U., Saw Devices-Sensitivity Enhancement in Going from 80 Mhz to 1 Ghz, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 46, 2, 120-125, **1998**.
- [252] Di Natale, C., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R., D'Arcangelo, G., Roscioni, C., Finazzi-Agrò, A., and D'Amico, A., Lung Cancer Identification by the Analysis of Breath by Means of an Array of Non-Selective Gas Sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 10, 1209-1218, **2003**.
- [253] Knez, M., Sumser, M., Bittner, A. M., Wege, C., Jeske, H., Martin, T. P., and Kern, K., Spatially Selective Nucleation of Metal Clusters on the Tobacco Mosaic Virus, *Advanced Functional Materials*, 14, 2, 116-124, **2004**.
- [254] Dickert, F., Greibl, W., Rohrer, A., and Voigt, G., Sol-Gel-Coated Quartz Crystal Microbalances for Monitoring Automotive Oil Degradation, *Advanced Materials*, 13, 17, 1327-1330, **2001**.
- [255] Dickert, F. L., Forth, P., Lieberzeit, P. A., and Voigt, G., Quality Control of Automotive Engine Oils with Mass-Sensitive Chemical Sensors-Qcms and Molecularly Imprinted Polymers, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366, 8, 802-806, **2000**.
- [256] Lieberzeit, P. A., Glanznig, G., Leidl, A., Voigt, N., and Dickert, F. L., Nanostructured Polymers for Detecting Chemical Changes During Engine Oil Degradation, *Sensors Journal, IEEE*, 6, 3, 529-535, **2006**.
- [257] Hayden, O., and Dickert, F. L., Selective Microorganism Detection with Cell Surface Imprinted Polymers, *Advanced Materials*, 13, 19, 1480-1483, **2001**.
- [258] Dickert, F. L., and Thierer, S., Molecularly Imprinted Polymers for Optochemical Sensors, *Advanced Materials*, 8, 12, 987-990, **1996**.
- [259] Iqbal, N., Mustafa, G., Rehman, A., Biedermann, A., Najafi, B., Lieberzeit, P. A., and Dickert, F. L., Qcm-Arrays for Sensing Terpenes in Fresh and Dried Herbs Via Bio-Mimetic Mip Layers, *Sensors*, 10, 7, 6361-6376, **2010**.

- [260] Ji, H.-S., McNiven, S., Ikebukuro, K., and Karube, I., Selective Piezoelectric Odor Sensors Using Molecularly Imprinted Polymers, *Analytica Chimica Acta*, 390, 1, 93-100, **1999**.
- [261] Krupadam, R. J., An Efficient Fluorescent Polymer Sensing Material for Detection of Traces of Benzo [a] Pyrene in Environmental Samples, *Environmental Chemistry Letters*, 9, 3, 389-395, **2011**.
- [262] Lieberzeit, P. A., Rehman, A., Yaqub, S., and Dickert, F. L., Nanostructured Particles and Layers for Sensing Contaminants in Air and Water, *Nano*, 3, 04, 205-208, **2008**.
- [263] Stetter, J. R., Jurs, P. C., and Rose, S. L., Detection of Hazardous Gases and Vapors: Pattern Recognition Analysis of Data from an Electrochemical Sensor Array, *Analytical Chemistry*, 58, 4, 860-866, **1986**.
- [264] Kröger, S., Turner, A. P., Mosbach, K., and Haupt, K., Imprinted Polymer-Based Sensor System for Herbicides Using Differential-Pulse Voltammetry on Screen-Printed Electrodes, *Analytical Chemistry*, 71, 17, 3698-3702, **1999**.
- [265] Schirhagl, R., Latif, U., and Dickert, F. L., Atrazine Detection Based on Antibody Replicas, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 38, 14594-14598, **2011**.
- [266] Xie, C. g., Gao, S., Zhou, H. k., and Li, H. f., Chemiluminescence Sensor for Sulfonylurea Herbicide Using Molecular Imprinted Microspheres as Recognition Element, *Luminescence*, 26, 4, 271-279, **2011**.
- [267] Iglesias, R. A., Tsow, F., Wang, R., Forzani, E. S., and Tao, N., Hybrid Separation and Detection Device for Analysis of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes in Complex Samples, *Analytical Chemistry*, 81, 21, 8930-8935, **2009**.
- [268] Percival, C., Stanley, S., Galle, M., Braithwaite, A., Newton, M., McHale, G., and Hayes, W., Molecular-Imprinted, Polymer-Coated Quartz Crystal Microbalances for the Detection of Terpenes, *Analytical Chemistry*, 73, 17, 4225-4228, **2001**.
- [269] Sergeeva, T., Piletsky, S., Brovko, A., Slinchenko, E., Sergeeva, L., and El'Skaya, A., Selective Recognition of Atrazine by Molecularly Imprinted Polymer Membranes. Development of Conductometric Sensor for Herbicides Detection, *Analytica Chimica Acta*, 392, 2, 105-111, **1999**.
- [270] Pardieu, E., Cheap, H., Vedrine, C., Lazerges, M., Lattach, Y., Garnier, F., Remita, S., and Pernelle, C., Molecularly Imprinted Conducting Polymer Based Electrochemical Sensor for Detection of Atrazine, *Analytica Chimica Acta*, 649, 2, 236-245, **2009**.
- [271] Ansell, R. J., Molecularly Imprinted Polymers in Pseudoimmunoassay, *Journal of Chromatography B*, 804, 1, 151-165, **2004**.
- [272] Ye, L., and Haupt, K., Molecularly Imprinted Polymers as Antibody and Receptor Mimics for Assays, Sensors and Drug Discovery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 8, 1887-1897, **2004**.

- [273] Dickert, F., and Hayden, O., Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases. Selective Detection of Yeasts with Imprinted Polymers, *Analytical Chemistry*, 74, 6, 1302-1306, **2002**.
- [274] Seifner, A., Lieberzeit, P., Jungbauer, C., and Dickert, F. L., Synthetic Receptors for Selectively Detecting Erythrocyte Abo Subgroups, *Analytica Chimica Acta*, 651, 2, 215-219, **2009**.
- [275] Dickert, F. L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K.-J., Blaas, D., and Waigmann, E., Bioimprinted Qcm Sensors for Virus Detection—Screening of Plant Sap, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 8, 1929-1934, **2004**.
- [276] Durst, R., Chemically Modified Electrodes: Recommended Terminology and Definitions (Iupac Recommendations 1997), *Pure and Applied Chemistry*, 69, 6, 1317-1324, **1997**.
- [277] Lin, L.-P., Huang, L.-S., Lin, C.-W., Lee, C.-K., Chen, J.-L., Hsu, S.-M., and Lin, S., Determination of Binding Constant of DNA-Binding Drug to Target DNA by Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology, *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5, 1, 61-72, **2005**.
- [278] Li, X., and Husson, S. M., Adsorption of Dansylated Amino Acids on Molecularly Imprinted Surfaces: A Surface Plasmon Resonance Study, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3, 336-348, **2006**.
- [279] Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Chen, Y., Shah, R. N., and Shimizu, K. D., Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm, *Analytical Chemistry*, 73, 19, 4584-4591, **2001**.
- [280] Wei, X., Samadi, A., and Husson, S. M., Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for Chromatographic Separations, *Separation Science and Technology*, 40, 1-3, 109-129, **2005**.
- [281] Chou, P.-C., Rick, J., and Chou, T.-C., C-Reactive Protein Thin-Film Molecularly Imprinted Polymers Formed Using a Micro-Contact Approach, *Analytica Chimica Acta*, 542, 1, 20-25, **2005**.
- [282] Jolly, P., Formisano, N., Tkáč, J., Kasák, P., Frost, C. G., and Estrela, P., Label-Free Impedimetric Aptasensor with Antifouling Surface Chemistry: A Prostate Specific Antigen Case Study, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 306-312, **2015**.
- [283] Jiang, Z., Qin, Y., Peng, Z., Chen, S., Chen, S., Deng, C., and Xiang, J., The Simultaneous Detection of Free and Total Prostate Antigen in Serum Samples with High Sensitivity and Specificity by Using the Dual-Channel Surface Plasmon Resonance, *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 268-273, **2014**.
- [284] Zhang, B., Liu, B., Chen, G., and Tang, D., Competitive-Type Displacement Reaction for Direct Potentiometric Detection of Low-Abundance Protein, *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 465-471, **2014**.
- [285] Hou, L., Gao, Z., Xu, M., Cao, X., Wu, X., Chen, G., and Tang, D., Dnazyme-Functionalized Gold-Palladium Hybrid Nanostructures for Triple Signal Amplification of Impedimetric Immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 365-371, **2014**.

- [286] Du, S., Guo, Z., Chen, B., Sha, Y., Jiang, X., Li, X., Gan, N., and Wang, S., Electrochemiluminescence Immunosensor for Tumor Markers Based on Biological Barcode Mode with Conductive Nanospheres, *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 135-141, **2014**.
- [287] Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Bode, M., Berch, J. K., Shah, R. N., and Shimizu, K. D., Application of the Freundlich Adsorption Isotherm in the Characterization of Molecularly Imprinted Polymers, *Analytica Chimica Acta*, 435, 1, 35-42, **2001**.
- [288] Liang, J., Yao, C., Li, X., Wu, Z., Huang, C., Fu, Q., Lan, C., Cao, D., and Tang, Y., Silver Nanoprism Etching-Based Plasmonic Elisa for the High Sensitive Detection of Prostate-Specific Antigen, *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 128-134, **2015**.
- [289] Choi, H. K., and Lee, J. H., Role of Magnetic Fe₃O₄ Graphene Oxide in Chemiluminescent Aptasensors Capable of Sensing Tumor Markers in Human Serum, *Analytical Methods*, 5, 24, 6964-6968, **2013**.
- [290] Kokkinos, C., Economou, A., Petrou, P. S., and Kakabakos, S. E., Microfabricated Tin–Film Electrodes for Protein and DNA Sensing Based on Stripping Voltammetric Detection of Cd (II) Released from Quantum Dots Labels, *Analytical Chemistry*, 85, 22, 10686-10691, **2013**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı ve Soyadı: Gizem ERTÜRK

Doğum Yeri: Erzurum

Medeni Hali: Bekar

E-posta: gizemertrk@hacettepe.edu.tr

Adresi: Gazililer Sitesi, Alacaaatlı Mah., No: 32, Çayyolu/ANKARA

Eğitim

Lise: Ankara Atatürk Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

85 (ÜDS), 80 (KPDS)

İş Deneyimi

Temmuz 2011- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Eylül 2013-Mart 2014: Ziyaretçi Araştırmacı, Lund Üniversitesi, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Deneyim Alanları

Moleküler Baskılama

Biyosensörler

Protein Saflaştırma ve Tayin Yöntemleri

Kriyojeller

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Prostat Kanseri Tayini İçin Moleküler Baskılama Temelli Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörlerinin Hazırlanması (Proje No: 013D04601008, Proje Bütçesi: 18494.84 TL)

Tezden Üretilmiş Yayınlar

- G. Ertürk, M. Hedström, M.A. Tümer, A. Denizli, B. Mattiasson, Real-time prostate-specific antigen detection with prostate-specific antigen imprinted capacitive biosensors (Analytica Chimica Acta, 2015, in press, [dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.055](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.055))
- G. Ertürk, H. Özen, M.A. Tümer, B. Mattiasson, A. Denizli, Microcontact Imprinting Based Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor for Real-time and Ultrasensitive Detection of Prostate Specific Antigen (PSA) From Clinical Samples (submitted to Sensors and Actuators B, August 2015)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- G. Ertürk, M. Hedström, M.A. Tümer, A. Denizli, B. Mattiasson, "Prostat Kanseri Tayini İçin Moleküler Baskılama Temelli Elektrokimyasal Sensörler", 8. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi, 4-6 Eylül 2014, Konya. (poster sunumu)
- G. Ertürk, D. Berillo, M. Hedström, B. Mattiasson, "Molecularly Imprinted Polymeric Capacitive Biosensors for Bovine Serum Albumin (BSA) Detection", EPF 2015, 21-26 Haziran 2015, Dresden, Almanya. (poster sunumu)
- G. Ertürk, H. Özen, M.A. Tümer, B. Mattiasson, A. Denizli, "Detection of Prostate Specific Antigen (PSA) with Surface Plasmon Resonance (SPR)", International Köyceğiz Meetings 2015, 6-12 Eylül 2015, Köyceğiz, Muğla. (sözlü sunum)