

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA-1-ANTİTRİPSİN ANALİZİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

OSMAN MEHMET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2018

OSMAN MEHMET'in hazırladığı "ALFA-1-ANTİTRİPSİN ANALİZİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

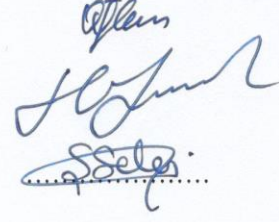
Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Özlem SAÇAN

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

Doç.Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

İmza



Tez Savunma Tarihi:

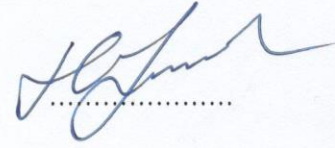
12/10/2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

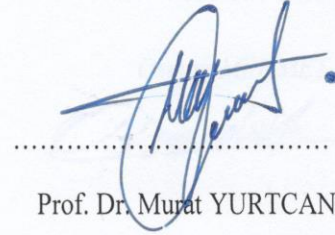
İmza

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

Tez Danışmanı



Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Murat YURTCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİMDALİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

12 / 10 / 2018

Osman MEHMET



Yüksek Lisans Tezi

Alfa-1-Antitripsin Analizine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Alfa-1 Antitripsin (A1AT) karaciğerde sentezlenen bir glikoproteindir. Serin proteaz inhibitörleri sınıfına dahildir. Akut faz proteini olan A1AT, birçok enzimin aktivitesinin inhibe edilmesine yardımcı olmakla birlikte, esas görevi akciğeri nötrofil elastazın saldırısından korumaktır. Bu nedenle kandaki A1AT miktarı önemlidir. Alfa-1-antitripsin eksikliği (AATD) olarak bilinen otozomal kalıtsal bir hastalıkta, kan serumunda A1AT miktarı azalır ve akciğerde amfizem, karaciğer apoptozu, karaciğer kanseri ve pankülit gibi hastalıkların gelişme riski artar. Ek olarak son yıllarda A1AT miktarının artması Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Günümüzde kanda A1AT miktarının tayini için elektroforez ve nefelometrik yöntemler kullanılmaktadır.

Bu tez kapsamında, A1AT analizi için impedimetrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör; altın elektrot yüzeyinde 4-merkaptobenzoik asit ile SAM oluşturulduktan sonra, karboksil gruplarının EDC/NHS ile aktivasyonu ve A1AT spesifik antikorunun (anti-A1AT) immobilizasyonu şeklinde inşa edilmiştir. Her bir immobilizasyon aşaması elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve siklik voltametri kullanılarak karakterize edilmiştir. Tekrar üretilebilirliği yüksek olan bu biyosensörle 100-600 ng/μL tayin aralığında A1AT miktarı tayini için hassas sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca yapay serumlu A1AT çözeltileri kullanılarak bu biyosensörün kan serumunda da kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğu anlaşılmıştır.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 76

Anahtar Kelimeler : Alfa-1-antitripsin, elektrokimyasal biyosensör, immunosensör, α-1-antitripsin eksikliği, Alzheimer, Amfizem.

Master Thesis

Development of Biosensor for Alpha-1-Antitrypsin Analysis

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry of Department

ABSTRACT

Alpha-1 Antitrypsin (A1AT) is a glycoprotein synthesized in the liver. Also it included in the class of serine protease inhibitors. A1AT, the acute phase protein, helps to inhibit the activity of many enzymes, but its main task is to protect the lung from the attack of neutrophil elastase. For this reason, the amount of A1AT in the blood serum is very important. In an autosomal hereditary disease known as alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD), the A1AT amount in the blood serum decreases, and increases the risk of developing emphysema, liver apoptosis, liver cancer and panniculitis.

In this thesis, an impedimetric biosensor for A1AT analysis was developed. After the formation of SAM with 4-mercaptophenylacetic acid on the surface of the gold electrode, it was constructed by activation of the carboxyl groups with EDC / NHS and immobilization of the A1AT specific antibody (anti-A1AT). Each immobilization stage was characterized using electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. With this highly reproducible biosensor, sensitive results were obtained for A1AT assay in the range of 100-600 ng / μ L. In addition, artificial serum solutions of A1AT have also been used and it has been found that this biosensor can be used in blood serum samples.

Year : 2018

Number of Pages : 76

Keywords : Alpha-1-antitrypsin, electrochemical biosensor, immunosensor, α -1-antitrypsin deficiency, Alzheimer, Emphysema.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında danışmanım olarak bana yol gösteren, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a ve deney aşamasını kavramam konusunda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana olan güvenleriyle hep yanımda olan aileme, arkadaşlarıma ve tez aşamam boyunca bilgi ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan Yüksek Kimyager Dr. Nükte TOPRAKSEVER'e ve Öğr. Gör. Sevilay İNAL KABALA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TÜBAP 2017/145 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Osman MEHMET

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alfa-1 Antitripsin (A1AT) Proteini.....	3
2.1.1. A1AT'nin Yapısı	4
2.1.2. A1AT' nin Gen Lokusu ve Sentezi.....	6
2.2. A1AT Fonksiyonu ve Fizyolojik Önemi.....	7
2.3. A1AT Eksikliği ve Neden Olduğu Durumlar.....	10
2.3.1. A1AT Eksikliğinin Klinik Özellikleri	11
2.4. Alfa-1 Antitripsin Eksikliğinin (AATD) Tedavisi	13
2.5. A1AT Eksikliği (AATD) Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	15
2.6. Alfa-1 Antitripsin Eksikliğinin Tanısında Kullanılabilecek Yeni Yaklaşımlar ...	17
2.7. Biyosensörlerin Temeli	18
2.7.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	20
2.7.1.1. Biyokomponent seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması.....	21
2.7.1.2. Transducer seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	23
2.7.2. Biyokomponentlerin İmmobilizasyonu	23
2.7.2.1. Tutuklama	24
2.7.2.2. Çapraz bağlama.....	24
2.7.2.3. Adsorpsiyon	24
2.7.2.4. Biyolojik etkileşim.....	25

2.7.2.5. Kovalent bağlama.....	25
Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (SAM)	27
2.7.3. Biyosensör uygulamalarında elektrokimya	29
2.7.3.1. Elektrokimyasal Temelli Biyosensörler	30
2.7.3.1.1. Amperometrik biyosensörler.....	30
2.7.3.1.2. Potansiyometrik biyosensörler.....	30
2.7.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi	31
2.7.5. Voltametrik Yöntemler	33
2.7.5.1. Siklik (Döngüsel) Voltametri (CV).....	33
2.8. Literatürde A1AT Analizi İçin Geliştirilmiş Biyosensörler	34
2.9. A1AT Analizine Yönelik Biyosensörün Hazırlanması	37
BÖLÜM 3.....	42
MATERYAL VE METOD	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	42
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	43
3.1.3. Deney Esnasında Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması	43
3.2. Metodlar	44
3.2.1. Elektrot Temizliği	44
3.2.2. Geliştirilen Biyosensörün Çalışma Prensipleri	45
3.2.3. Hesaplama Prosedürü	46
3.2.3.1. Yük Transfer Direncinin Hesaplanması.....	47
3.2.4. Alfa-1 Antitripsin Analizine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı.....	48
3.2.5. A1AT Analizine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu	49
3.2.5.1. 4-MPA Konsantrasyonunun Optimizasyonu	49
3.2.5.2. EDC/NHS Karışımının Optimizasyonu	49
3.2.5.3. Anti-A1AT Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	50
3.2.6. A1AT Analizine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu	50
3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı	50
3.2.6.2. Tekrar Üretilebilirlik	51

3.2.6.3. Yapay Serum Uygulamaları	51
BÖLÜM 4.....	52
SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	52
4.1. A1AT Biyosensörüyle Elde Edilmiş Bulgular	52
4.1.1. A1AT Biyosensörünün Oluşturulması Aşamalarına İlişkin Bulgular	52
4.1.2. A1AT Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular	55
4.1.2.1. 4-MPA Konsantrasyonun Biyosensör Cevabına Etkisi	55
4.1.2.2. EDC/NHS Konsantrasyonunun Biyosensör Cevabına Etkisi	57
4.1.2.3. Anti-A1AT Konsantrasyonun Biyosensör Cevabına Etkisi.....	58
4.1.3. A1AT Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	60
4.1.3.1. A1AT Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı	60
4.1.3.2. A1AT Biyosensörünün Tekrar Üretilirliği	62
4.1.3.3. A1AT Biyosensörünün Yapay Serum Uygulamaları.....	63
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A1AT	Alfa-1 Antitripsin
AFP	Akut Faz Proteinleri
NAFP	Negatif Akut Faz Proteinleri
PAFP	Pozitif Akut Faz Proteinleri
RER	Kaba (Granüllü) Endoplazmik Retikulum
ER	Endoplazmik Retikulum
SLPI	Sekretuar Lökosit Proteaz İnhibitörü
cANCA	Antinötrofil Stoplazmik Antikor
KOAH	Kronik Obsraktif Akciğer Hastalığı
AATD	Alfa-1 Antitripsin Eksikliği
NE	Nötrofil Elastaz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
GOD	Glukoz Oksidaz Enzimi
GLT	Glutaraldehit
3-MPA	3-Merkaptopropiyonik Asit
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimit
NHS	N-Hidroksisüksinimit
PAMAM	Poliamidoamin Dendirimeri
SAM	Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka
ITO	İndiyum Kalay Oksit
CUTMS	11-Siyanoundesiltrimetoksisilan
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
AC	Alternatif Akım
Anti-A1AT	Anti Alfa-1 Antitripsin Antikoru
CV	Siklik Voltametri
CNT	Karbon Nanotüp
EQCM	Elektrokimyasal Kuvars Kristal Mikrobals
MSA	Merkaptosüksinikasit
4-MBA	4-Merkaptobenzoik Asit
4-MPA	4-Merkaptofenilasetik Asit
NP	Nanopartikül
TAA	Tiyol Aromatik Aldehit
IgG	İmmünoglobülin G
KCl	Potasyum Klorür
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
M	Molar

μM	Mikromolar
Pt	Platin
Cu	Bakır
Ag	Gümüş
Au	Altın
Mn	Mangan
ZnS	Çinko Sülfid
pg	Pikogram
μL	Mikrolitre
mM	Milimolar
Ng	Nanogram
fM	Femtomolar
mg/dL	Miligram/Desilitre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Alfa-1 antitripsin sekonder yapısının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2.	Alfa-1 antitripsinin yapısının 3 boyutlu gösterimi.....	5
Şekil 2.3.	A1AT'nin sentezlendiği yer ve SERPINA1 geni üzerindeki lokalizasyonu.....	6
Şekil 2.4.	A1AT'in biyosentezinde yer alan süreçler.....	7
Şekil 2.5.	A1AT'nin nötrofil elastaz inhibisyon mekanizması.....	9
Şekil 2.6.	A1AT geninden doğan başlıca varyantlar ve risk değerlendirmesi.....	12
Şekil 2.7.	Loop-sheet polimerizasyonunun moleküler temeli.....	13
Şekil 2.8.	Biyosensörün temel bileşenleri.....	20
Şekil 2.9.	Biyosensörlerin biyokomponentlerinin etki prensibine göre sınıflandırılması.....	22
Şekil 2.10.	Kafes tipi tutuklama ve mikrokapsül tipi tutuklama.....	24
Şekil 2.11.	Çapraz bağlama yöntemi.....	24
Şekil 2.12.	Adsorpsiyon ile assosiyel olmuş bir biyoreseptör.....	25
Şekil 2.13.	VEGF-1 reseptörünün altın elektrot yüzeyine kovalent bağlanma metodu ile immobilizasyon stratejisi.....	26
Şekil 2.14.	Self Assambled Monolayer (SAM)'in şematik gösterimi.....	28
Şekil 2.15.	Kovalent bağlanma metodu ile ITO tabanlı biyosensörün immobilizasyonu.....	29
Şekil 2.16.	Bu tez kapsamında geliştirilen A1AT biyosensörü için elde edilmiş Nyquist eğrileri.....	32
Şekil 2.17.	CV ile alınmış bir voltamogram görüntüsü.....	34
Şekil 2.18.	Zhu ve Jin Lee'nin A1AT analizi için geliştirdiği sandviç tipli aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörün şematik gösterimi.....	36
Şekil 2.19.	4-MPA'nın elektriksel yük karşısındaki rezonansı.....	38
Şekil 2.20a.	A1AT analizine yönelik bu tez kapsamında geliştirilen biyosensör için SAM'in oluşturulması.....	40
Şekil 2.20b.	A1AT biyosensörü için SAM oluşumundan sonraki aşamaların şematik gösterimi.....	40
Şekil 2.21.	A1AT proteininin Anti-A1AT antikoruna bağlanması.....	41

Şekil 3.1.	Gamry Analyst yazılımından yararlanarak oluşturulan eş-değer devre modeli.....	46
Şekil 3.2.	CPE With Diffüsiyon ve hesaplama için kullanılabilir diğer devre modelleri.....	47
Şekil 3.3.	Gamry Analyst® yazılımının hesaplama ekranı.....	48
Şekil 4.1.	A1AT biyosensöründe uygulanan immobilizasyon aşamalarının impedans spektrumları.....	53
Şekil 4.2.	A1AT biyosensöründe uygulanan immobilizasyon aşamalarının siklik voltamogramları.....	53
Şekil 4.3.	Biyosensör cevabına 4-MPA konsantrasyonunun etkisi.....	56
Şekil 4.4.	Biyosensör cevabına EDC/NHS karışımı konsantrasyonunun etkisi.....	57
Şekil 4.5.	Biyosensör cevabına Anti-A1AT konsantrasyonunun etkisi.....	59
Şekil 4.6.	100-600 ng/µL A1AT tayin aralığında elde edilmiş nyquist eğrileri.....	61
Şekil 4.7.	100-600 ng/µL A1AT tayin aralığında elde edilmiş siklik voltamogramlar.....	61
Şekil 4.8.	A1AT biyosensörüne ait 100-600 ng/µL tayin aralığındaki kalibrasyon grafiği.....	62
Şekil 4.9.	A1AT biyosensörünün yapay serum uygulamaları sonucu elde edilmiş nyquist eğrileri.....	64
Şekil 4.10.	A1AT biyosensörünün yapay serum uygulamaları sonucunda elde edilmiş siklik voltamogramları.....	64
Şekil 4.11.	A1AT biyosensörünün yapay serum uygulamaları sonucu çizilen kalibrasyon grafiği.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Biyosensörleri meydana getiren kısımların çeşitliliği.....	19
Çizelge 2.2.	Biyokomponent seçimine göre biyosensörler ve analiz alanları.....	21
Çizelge 2.3.	Transduser seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması.....	23
Çizelge 4.1.	A1AT biyosensörünün yapımı için uygulanan tüm immobilizasyon adımları ve her aşamada hesaplanmış Rct değerleri.....	54
Çizelge 4.2.	4-MPA konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	56
Çizelge 4.3.	EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	58
Çizelge 4.4.	Anti-A1AT konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	59
Çizelge 4.5.	A1AT biyosensörü için belirlenmiş olan optimum değerler.....	60
Çizelge 4.6.	Optimize edilmiş parametrelerle üretilen A1AT biyosensörlerinin doğrusal denklemleri ve doğrusallık katsayıları.....	63

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Akut faz yanıtı; normal koşullar altında omurgalılarda etkili olan çok sayıda homeostatik mekanizmayı, doku zedelenmesini veya enfeksiyonu takiben gerçekleşen değişikliklerin bütünü olarak tanımlanabilir. Akut faz cevabını oluşturan bu değişiklikler, insanlarda yaygın olarak bakteriyel enfeksiyon, cerrahi ya da diğer sebeplerden dolayı oluşan travma, kemik kırığı, yanık hasarı, doku tahribatı ve immünolojik olarak bir dizi enflamatuvar uyarandan sonra görülmektedir. Deney hayvanlarına terebentin veya başka bir lokal enflamatuvar maddenin enjeksiyonu ile aseptik enflamasyon veya alternatif olarak bakteriyel lipopolisakkarit enjeksiyonu ile enflamasyon oluşturulan deney modellerinde; enflamatuvar uyarımdan sonraki ilk birkaç saat içinde metabolik, hormonal ve fizyolojik fonksiyon dizisinde meydana gelen değişimler “Akut Faz Yanıtı” olarak değerlendirilir.

Akut faz yanıtı sırasında sentezlenen ve fizyolojik değişimlerin başlamasına neden olan plazma proteinleri de “Akut Faz Proteinleri (AFP)” olarak adlandırılır. AFP’lerin büyük bir kısmı karaciğerde sentezlenirken, çok azı endotel hücreleri ve diğer hücrelerde sentezlenebilir. Genellikle hepatositlerde granüler endoplazmik retikulum üzerindeki ribozomlarda pre-protein olarak, akut faz yanıtını oluşturmak üzere sinyal peptidi içerir halde sentezlenirler. Plazma proteinlerinin neredeyse tamamı glikoprotein olup, bu proteinler N- veya O- bağlı oligosakkaritleri veya her ikisini de içerebilirler ve polimorfizm gösterebilirler. Başlıca polimorfik akut faz proteinleri; α -1 antitripsin (A1AT), haptoglobulin, transferrin, seruloplazmin ve immunoglobulinlerdir.

Yapı ve fonksiyonları bakımından çok çeşitli özelliklere sahip olan akut faz proteinlerinin seviyeleri, akut faz yanıtına göre azalır veya artar. Oluşan yanıtı karşı, serum düzeylerinde azalma görülen proteinlere ‘Negatif Akut Faz Proteinleri (NAFP)’ denir. Tam tersi şekilde, yanıtın olduğu durumda serumda düzeyleri artan proteinlere ise ‘Pozitif Akut Faz Proteinleri (PAFP)’ denir.

Konsantrasyonu azalan proteinler (NAFP); Albümin, Transferin, Transtiretin, α 2-HS glikoprotein, Alfa fetoprotein, Tiroksin bağlayıcı globülin, İnsülin benzeri büyüme faktörü I, Faktör XII’dur. Konsantrasyonu artan proteinler ise (PAFP); α -1 antitripsin (α -1 Proteaz inhibitörü), mannoz bağlayıcı lektin, fibrinojen, α -1 antikomotripsin, haptoglobin, salgılanan fosfolipaz A₂, ferritin, α 1-asit glikoprotein’dir.

PAFP için bakıldığında, akut faz yanıtının büyüklüğü meydana gelen enflamasyon veya doku hasarının şiddetiyle paralel ilerler. Bu nedenle yanıt esnasında miktarı artan plazma proteinleri önemlidir ve kantitatif analizleri yapılabilir. Bu analizler çoğu zaman kesin bir tanı için yetersiz olsa da tanı ve tedavi konusunda kılavuz olarak kullanılmaktadır. Fakat bazı hastalıkların tanısında akut faz proteinlerinin analizi hayati önem arz etmektedir. Meydana gelen hastalık doğrudan AFP’nin serumdaki seviyesi ile ilişkili ise ilgili proteinin kantitatif analizi, hastalığın tanısının konması ve tedavisi sırasında durum takibinin yapılabilmesi konularında kritik noktadır.

A1AT karaciğerde sentezlenen tek zincirli bir glikoproteindir. Esas görevi akciğeri yıkıcı etkiye sahip enzimlerden korumaktır. Bu nedenle kandaki seviyesi önemlidir. A1AT miktarının azalması durumu, ölümle sonuçlanabilecek akciğer amfizemi, karaciğer apoptozu, karaciğer kanseri, pannikülit gibi çok çeşitli hastalıklara neden olur. Bu eksiklik, A1AT proteinini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. A1AT eksikliğinin (AATD) günümüz teknolojisinde kalıcı bir tedavisi olmadığından bu hastalığın teşhisi hayati önem arz eder. Çünkü teşhis konan kişiler eksiklik seviyesine göre bir yaşam sürmelidir. Böylece kişi çok daha uzun süre hayatta kalabilir ve kaliteli bir yaşam sürebilir.

Bu çalışma kapsamında A1AT proteinin kantitatif analizinde kullanılmak üzere spesifik, maliyeti düşük ve kolay uygulanabilir bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Alfa-1 Antitripsin (A1AT) Proteini

Alfa-1 Antitripsin (A1AT), normal olarak serumda 150 ile 350 mg/dL miktarında bulunan bir akut faz proteinidir. 52 kDa ağırlığında, 394 amino asitli ve tek zincirli bir glikoproteindir. Serpinler (serin proteaz inhibitörleri) olarak bilinen proteaz inhibitör proteinleri sınıfının bir üyesidir. Yapısal olarak dokuz alfa-heliks ve üç beta-pilili tabakadan oluşan globüler (küresel) bir moleküldür. Karaciğerde hepatosit adı verilen hücrelerde ve mononükleer fagositlerde eksprese edilirler (Brantly, Nukiwa & Crystal, 1966).

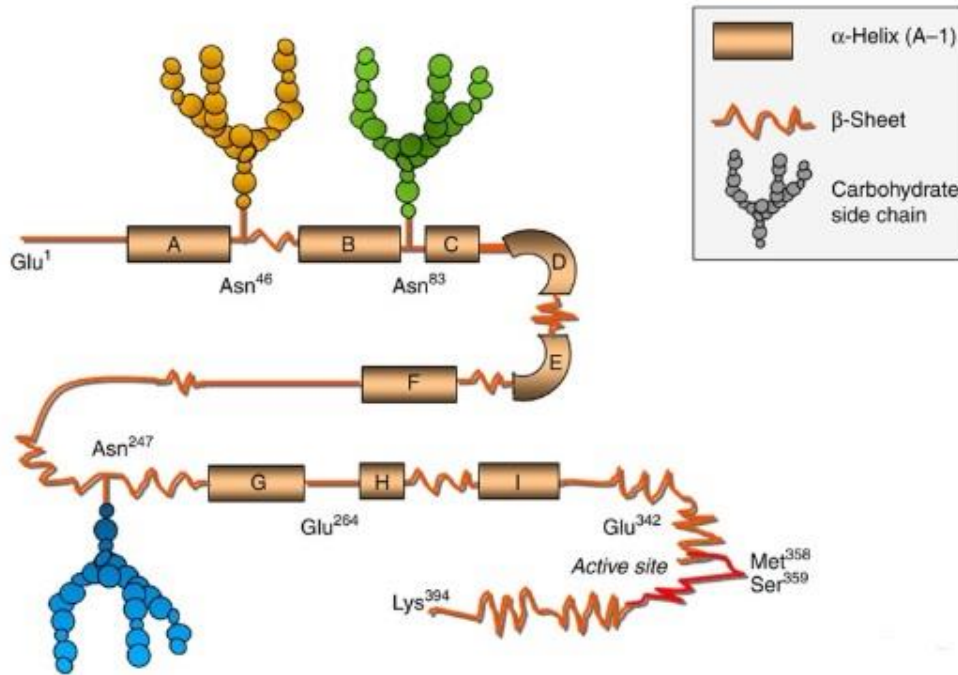
A1AT, serum proteazların miktarları söz konusu olduğunda plazma içerisinde en bol bulunan protein olup serin proteazların dolaşım ve dokudaki başlıca inhibitörüdür (Subramaniyam vd., 2006). Kandaki yarı ömrü dört ile beş gün arasındadır. Bireyin kg vücut ağırlığı için günde yaklaşık 34 mg A1AT üretilmektedir (Jones, Vergalla, Steer, Bradley-Moore & Vierling, 1978). Ömrü tamamlanmış olan A1AT'nin kaderi bilinmemektedir. Ancak diğer plazma proteinleri ile aynı şekilde katabolize olduğu varsayılmaktadır (Waldmann & Strober, 1969).

Tarihsel olarak incelendiğinde, insan plazması tarafından proteazların inhibe edici kapasitesi, 19. yüzyılın sonlarında Fermi ve Pernosi tarafından keşfedilmiştir (de Serres & Blanco, 2014). Ancak o zamanki laboratuvar tekniklerinin yetersiz olması nedeniyle

1955 yılına kadar inhibisyondan sorumlu ajanı belirlemek mümkün olmamıştır. Herman Schultze (Almanya), kanın antiproteaz aktivitesinden sorumlu proteinini izole ettiğinde, globülinlerin $\alpha 1$ bandındaki konumu ve pankreas tripsinini inhibe etme yeteneğinden dolayı bu proteine **α -1-Antitripsin** adını vermiştir (Blanco, 2017).

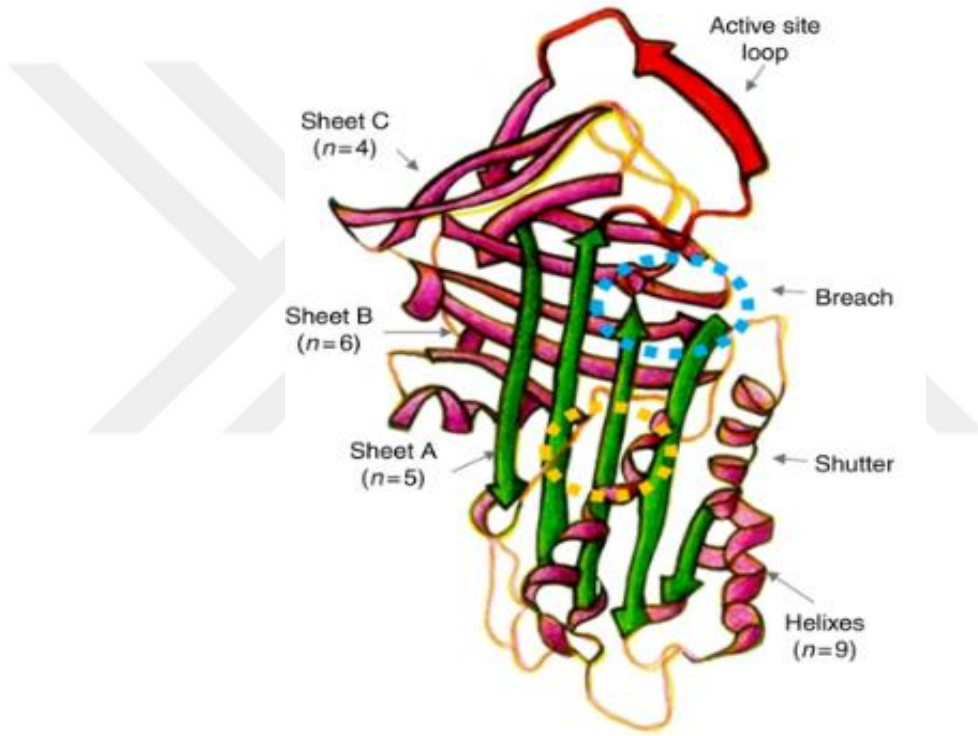
2.1.1. A1AT'nin Yapısı

Olgun A1AT proteini, 394 amino asitlik tek bir zincirden oluşan bir glikoproteindir. Üç karbonhidrat yan zincirine sahiptir. A1AT'nin başlıca formları 4.4 ile 4.6 aralığında izoelektrik noktaya sahiptir. Üç karbonhidrat zinciri N bağlı şekilde Asn46, Asn83 ve Asn247 üzerinden polipeptide bağlanmıştır (Şekil 2.1). Yan zincirler, Asn-NAcGlc-NAcGlc-Man-(Man)₂'nin ortak çekirdek dizisi olarak düzenlenmiş N-asetilglukozamin (NAcGlc), mannoz (Man), galaktoz (Gal) ve sialik asitten (Sia) oluşur (Brantly vd., 1966).



Şekil 2.1. Alfa-1 antitripsin sekonder yapısının şematik gösterimi (Blanco, 2017)

Şekil 2.1’de sekonder yapısı verilmiş olan Alfa-1 antitripsin’in şematik gösteriminde amino asitler ve karbonhidratlar, 9 α -sarmalı (A-I büyük harfleriyle gösterilmiştir) ve A (n:5), B (n:6) ve C (n:4) olarak adlandırılan 15 β tabaka olarak düzenlenmiştir. Sarmallar ve tabakalar, aktif alanın substratlarla reaksiyona girmesi için açık pozisyonda bulunur ve molekülün gövdesinde 20 amino asit kalıntılı mobil loopu tutan kompakt bir çerçeve oluşturur. Bu hareketli kısım proteinin enzimle etkileşimini sağlamaktadır.



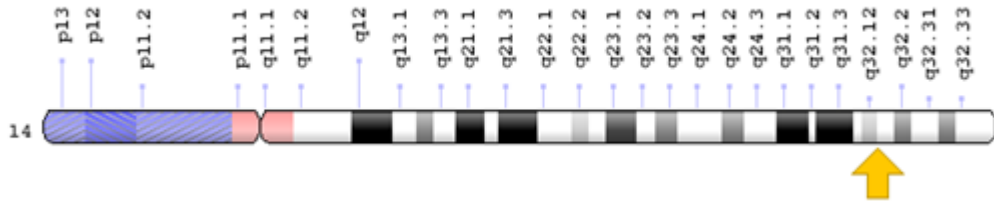
Şekil 2.2. Alfa-1 antitripsinin yapısının 3 boyutlu gösterimi (Blanco, 2017)

A1AT molekülünün içinde Glu342-Lys290 ve Glu264-Lys387 olmak üzere iki adet tuz köprüsü bulunmaktadır. Bu köprüler ortak A1AT eksikliği durumlarının patogenezi ile ilgili önemli etkileşimleri barındırırlar. A1AT, aktif bölgesinde bulunan proteazları, molekülden çıkan oldukça gerilmiş bir dış ilmiğin parçası olan Met358-Ser359 kalıntılarında ortalar. Bunun sonucunda, Met358-Ser359 bağı aktif bölgede gerilim altında tutulur. Yarılırsa, bu iki kalıntı geniş bir şekilde ayrılır. Bu ilmiğin C-

terminali 35 amino asitli (Ser359-Lys394) üç yapraklı β -tabaka C ve B iplikçiklerinin bir parçasıdır. Aktif bölge ilmeğinin (Leu327-Met35) N-terminal bölgesini, beta-tabaka A'nın iki şeridi oluşturur. Bu A1AT'in ilgili proteaz ile özgünlüğünü veren aktif bölge döngüsünün konformasyonudur (Loebermann, Tokuoka, Deisenhofer & Huber, 1984).

2.1.2. A1AT'nin Gen Lokusu ve Sentezi

Gen lokusu, belirli bir genin kromozom üzerindeki yerini ifade eden bir terimdir. Alfa-1 antitripsin proteinini kodlayan gen, SERPINA1 (eski adıyla PI) genidir ve 12.2kb uzunluğundadır. Kromozom 14'ün uzun kolunda yer alır (14q31-32.1 bölgesi) (Şekil2.3). Gen, oldukça pleomorfiktir ve bugüne kadar 100'den fazla allelik varyantı tanımlanmıştır (Köhnlein & Welte, 2008).

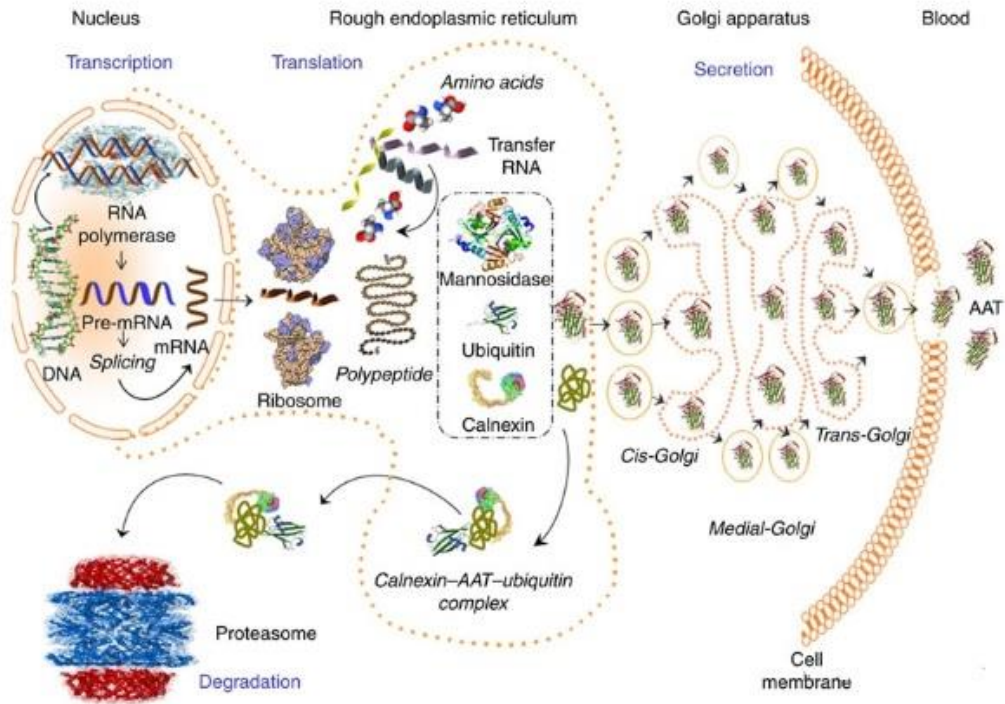


Şekil 2.3. A1AT'nin sentezlendiği yer ve SERPINA 1 geni üzerindeki lokalizasyonu (Genetics Home Reference, 2018)

A1AT'i sentezleyen gen 12301 baz çifti içermektedir. Beş ekson ve dört introndan meydana gelir. A1AT geni, serpin ailesinin proksimalinde, diğer antiproteaz genlerin (alfa-1antikimotripsin, kortikosteroid-binding globulin ve protein C inhibitörü genleri) uç noktasında yerleşmiştir (Ugenskiene, Sanak, Sakalauskas & Szczeklik, 2005).

A1AT'nin biyosentezi, hepatositlerin çekirdeğinde mRNA öncüsünün, A1AT geninden kopyalanması (transkripsiyon) ile başlar. Ekleme ve translokasyondan sonra, A1AT mRNA'sı kaba endoplazmik retikulum (RER) üzerinde translasyona tabi tutulur. Bu işlemden sonra yeni sentezlenen polipeptit zinciri RER'nin sisternasına salgılanır. Sinyal peptidi yarılır ve protein katları olarak karbonhidrat (CHO) yan zincirleri eklenir. İlk 'yüksek mannoz' karbonhidrat yan zincirleri proksimal kırpma işlemine tabi tutulur

ve protein daha sonra golgi aygıtına transloke edilir. Golgi içinde, karbonhidrat yan zincirlerinin terminal modifikasyonu ile olgunlaştırılıp kana salgılanan kompleks yapı, 52 kDa ağırlığında A1AT proteinidir (Brantly vd., 1966). Yanlış katlanmış A1AT molekülleri, daha cis-golgiye gelmeden mannosidaz-1 tarafından tespit edilir ve atılır. Tespit edilen yanlış katlanmalar ubiquitin ve kalneksin ile işaretlenerek proteoliz için proteazoma gönderilir (Blanco, 2017)



Şekil 2.4. A1AT'in biyosentezinde yer alan süreçler (Blanco, 2017)

2.2. A1AT Fonksiyonu ve Fizyolojik Önemi

Serpin süper ailesi, geri dönüşümsüz intihar substrat mekanizması aracılığıyla çeşitli proteolitik süreçleri düzenlemekten sorumlu olan birbirinden farklı 16 sınıfa ayrılır (Zagariya vd., 2005). Serpinlerin ortak özelliği, yaklaşık 400 amino asit kalıntısı içeren tek zincirli glikoprotein olmalarıdır. Pek çoğunun aktif merkezindeki amino asit dizisi birbirine benzer. Molekülün ortasındaki Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro amino asitleri,

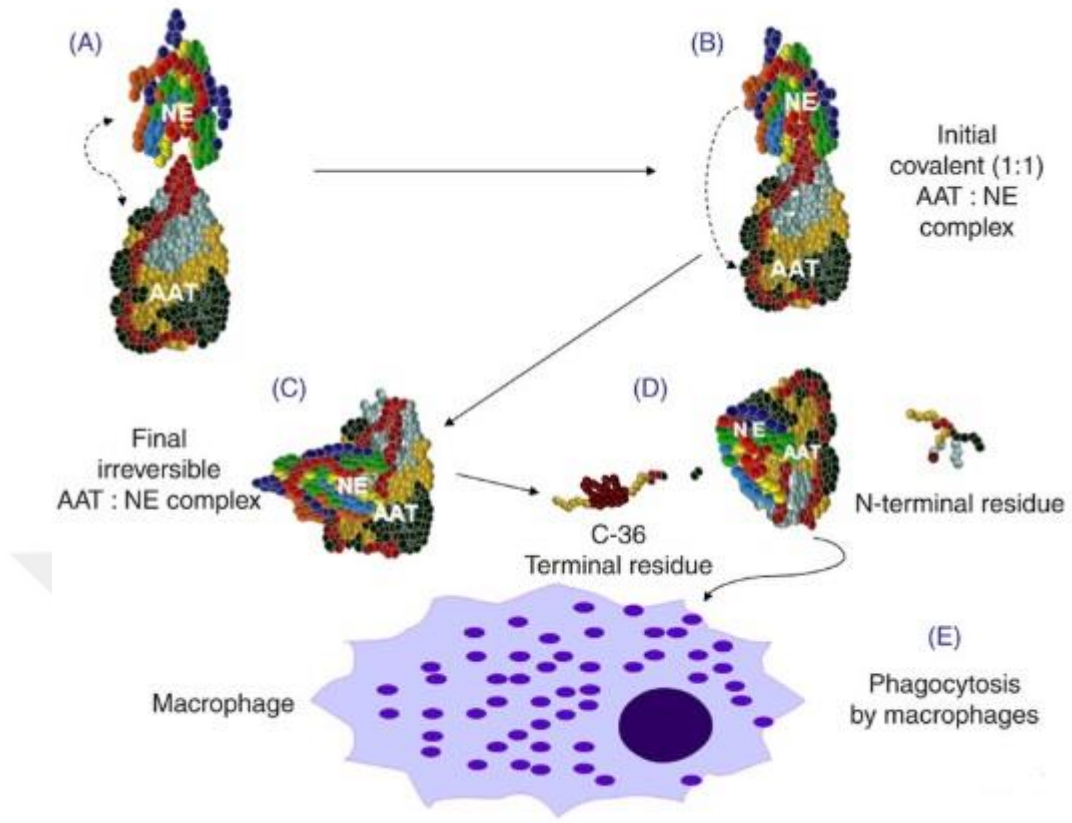
apoptoz sırasında hedef proteazları tanıyarak bunları inhibe edebilir (Grabarek, Du, Johnson, Lee & J., 2002).

Sağlıklı insanlarda akciğer, proteazları hızla (1:1 oranında) inaktive eden çeşitli antiproteazlarca korunur. A1AT, akciğerde görev yapan antiproteazlardandır. En yüksek konsantrasyona ve nötrofil elastaz için en yüksek afiniteye sahiptir (10^7 M/s). Alfa-1 antitripsin, serin proteaz inhibitörleri ailesine aittir. Nötrofil elastazın substratı ile benzer bir afiniteye sahiptir. Bunun dışında alfa-1 antitripsinden daha düşük konsantrasyonlarda bulunan diğer önemli akciğer proteaz inhibitörleri, sekretuar lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) ve elafindir (Williams, Brown, Roghanian & Sallenave, 2006).

Alfa-1 antitripsininin en önemli fizyolojik fonksiyonu, pulmoner dokuda salınan proteolitik enzimlerin inaktivasyonunu sağlamaktır. Akciğerin geniş yüzeyi sürekli olarak hava kaynaklı patojenlere maruz kalmakta ve bu da sıklıkla hücrel immün tepkilere neden olmaktadır. Neticede fagositoz süreci sırasında, proteazlar ve oksidanlar birlikte akciğer dokusuna salınır. En önemli proteaz, akciğer matriks bileşenlerini yok etme potansiyeli yüksek olan Nötrofil Elastazdır (NE). Yıkıcı potansiyele sahip diğer yaygın proteazlar, katepsin G, plazmin aktivatörü ve proteinaz-3'tür (Köhnlein & Welte, 2008).

Nötrofil elastaz, akciğere hava alışverişi sırasındaki esnekliğini sağlayan elastin proteinlerini parçalamakla yükümlü bir enzimdir. Proteolitik yıkımdan sorumlu olan bu enzim oldukça aktif olup, elastin dışında hücre dışı matriksin çok çeşitli bileşenlerini de parçalayan güçlü bir proteazdır (Köhnlein & Welte, 2008).

A1AT, nötrofil elastazı inhibe etmesinin yanı sıra diğer insan serin proteazlarını da (tripsin, kimotripsin, katepsin G, plazmin, trombin, faktör X ve plazminojen dahil olmak üzere; peptid bağına saldıran, bölgeye katılan ve bir serin artığı olan proteolitik enzimleri) inhibe eder. Ama diğer serin proteazlardaki aktivitesi, nötrofil elastazı inhibe etme gücü kadar yüksek değildir (Brantly vd., 1966).



Şekil 2.5. A1AT'nin nötrofil elastaz inhibisyon mekanizması.

(A) A1AT'nin aktif bölgesi nötrofil elastazı çeker ve iki molekül arasında kararlı kovalent bir kompleks oluşur. (B) Her iki molekül de kalıcı olarak imha edilir, etkisiz hale gelir ve birbirine kaynaştırılır. (C) Peptit zincirinin amino ve karboksil terminal kalıntıları kopar (D) Kalan kompleks fagositoz ile makrofajlar (E) tarafından temizlenir (Blanco, 2017).

Bu nedenle A1AT'nin kan serumundaki miktarı çok önemlidir. Çünkü akciğer sürekli bir nötrofil elastaz yükünün altındadır. Bu enzimin regülasyonundan sorumlu olan proteinin azalması durumunda akciğer, nötrofil elastazlarca yıkılır ve alveolar duvarlar bozulur. Böylece akciğerin yapısı bozularak işlev göremez hale gelir.

A1AT, sadece akciğerin korunması nedeniyle önem arz etmez. Karaciğerde sentezlendiği için, kana salgılanmadığı durumlarda yani eksiklik durumlarının olduğu zamanlarda hepatosit hücrelerinde birikeceğinden karaciğer tahribatına da neden olur (Crystal, 1990). Ayrıca A1AT, proteinin eksik olduğu durumda panikülit adı verilen bir deri hastalığı meydana gelebilir. Bunlara ek olarak A1AT'nin eksik olduğu durumlar,

cANCA pozitif vaskülit, çölyak hastalığı, broşiektazi, astım, pankreas tutulumu ve aneverizmalara da neden olabilmektedir (Ioachimescu & Stoller, 2005).

Son olarak A1AT, Alzheimer hastalığı ve karaciğer kanserinin çok erken aşamalarında önemli bir biyolojik belirteç olarak önerilmiştir (Kim & Lee, 2015; Song, Poljak, Smythe & Sachdev, 2009).

2.3. A1AT Eksikliği ve Neden Olduğu Durumlar

A1AT eksikliğin tarihi 1952’de Malmö Üniversitesi Hastanesi Klinik Kimya Laboratuvarı şefi Carl-Bertil Laurell’in (1919–2001) laboratuvarında plazma proteinlerinin elektroforezini başlattığı ve beş hasta numunesinin protein elektroforezinde α 1 bandının yokluğunu fark etmesiyle başlamıştır. Başlangıçta bakteriyel kontaminasyonun neden olduğu bir durum olabileceğini düşünmesine rağmen bu rastlantının, bantların geri kalan kısmını etkilemeden α 1 bandıyla sınırlı olmasından şüphelenmiştir. Böylece, bu hastaların klinik bilgilerini araştırmak için Sten Erickson’a bir talepte bulunmuştur. Erickson, üçünün akciğer amfizeminden muzdarip olduğunu ve ağır bir solunum yolu hastalığı öyküsü olduğunu, bunlardan birinin de Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı’ndan (KOAH) etkilenen bir aile öyküsüne sahip olduğunu buldu. Geriye kalan iki hastada ise, A1AT eksikliği ile ilişkili hastalıklar yoktu. Ertesi yıl (1964) Erickson, ciddi elektroforetik α 1 eksikliği ve akciğer amfizemi olan iki erkek kardeşi saptadı. Bu bulgudan hareketle, birkaç İsveç hastanesinden gelen klinik hikayeleri de gözden geçirerek, 33 vakayı toplamayı başardı. (bulguların çoğu KOAH ile ilişkilendirilmiştir). Daha sonra Erickson, doktorasını 1965 yılında “Alfa-1 Antitripsin Eksikliği Çalışmaları” başlıklı konuda yaptı ve danışmanı Laurell ile birlikte, A1AT eksikliğin erken dönemlerde amfizemin gelişmesini destekleyen kalıtsal bir bozukluk olduğu sonucuna vardı (Blanco, 2017).

Alfa-1 antitripsin eksikliği (AATD); normal serum seviyesinin % 35’i altına indiği durumlarda, 30 ila 40 yaş arası kişilerde yaygın olarak amfizeme neden olan ve daha az ölçüde yeni doğan döneminde karaciğer hastalığı (sarılık) yaratan otozomal bir kalıtsal hastalıktır. Klinik olarak, erişkinlerde amfizem ve karaciğer hastalıkları, yeni doğanlarda ise daha az sıklıkla karaciğer hastalığı ile ilişkilidir. A1AT, protein veya gen seviyesinde belirlenen 100’den fazla varyantı ile oldukça pleomorfik bir proteindir. Bu

varyantlara göre serum A1AT seviyesi, düzeylerine ve fonksiyonlarına göre; normal, eksik, işlevsiz ve yok olmak üzere dört durum şeklinde sınıflandırılabilir (Brantly vd., 1966).

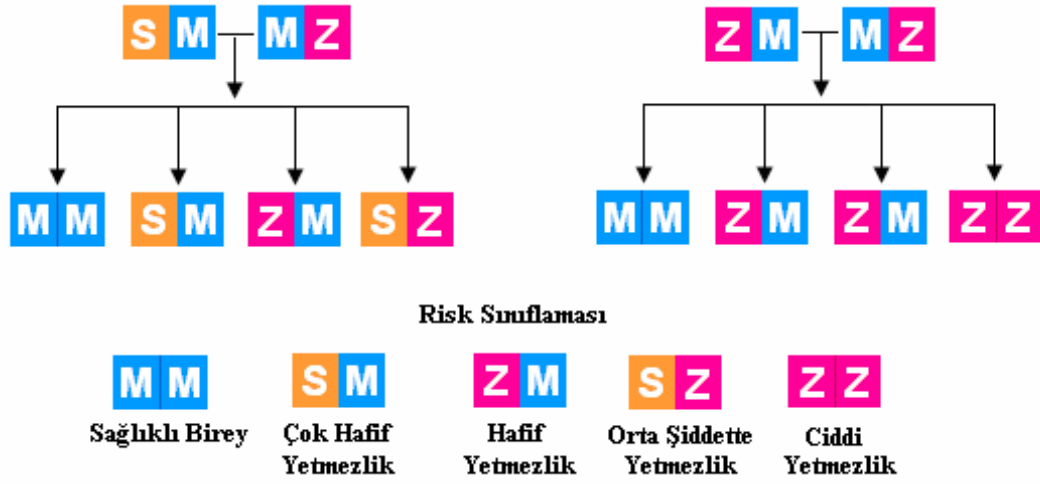
2.3.1. A1AT Eksikliğinin Klinik Özellikleri

Klasik alfa-1 antitripsin (A1AT) eksikliği formu, 1800 canlı doğumdan 1'ini etkileyen otozomal ko-dominant bir bozukluktur. Bir nokta mutasyonu, mutant A1AT molekülünün anormal bir katlanma yoluna ve kümelenmeye eğilimli olmasını sağlar. Protein, karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda (ER) fizyolojik fonksiyonun nötrofil elastaz aktivitesinin inhibisyonu olduğu kan ve vücut sıvılarında tutulur (Perlmutter, Brodsky, Balistreri & Trapnell, 2007).

A1AT'nin akciğerleri proteolitik ataklara karşı korumasındaki rolü merkezidir. Plazmada eksikliği durumunda erken başlangıçlı panlobüler amfizem, astım, bronşektazi ve Wegener granülomatozu ile ilişkilendirilir. 70'in üzerinde doğal olarak ortaya çıkan varyant, izoelektrik odaklama jelleri üzerindeki göçleriyle tanımlanmış ve karakterize edilmiştir.

En yaygın iki eksiklik varyantı, S ve Z allelidir. Bu alleller, alfa-1 antitripsin genindeki nokta mutasyonlardan kaynaklanır ve protein, izoelektrik odaklama üzerinde normal olan M allelinden daha yavaş göç eder. S allelinde Glu²⁶⁴ yerine Valin amino asidi gelir. Z varyantında ise Glu³⁴² yerine Lizin amino asidi gelmektedir (Lomas, 2000). M aleli, yabancı alel olarak değerlendirilir ve M1, M2, M3 ve M4 alt tipleri mevcuttur (Ugenskiene vd., 2005).

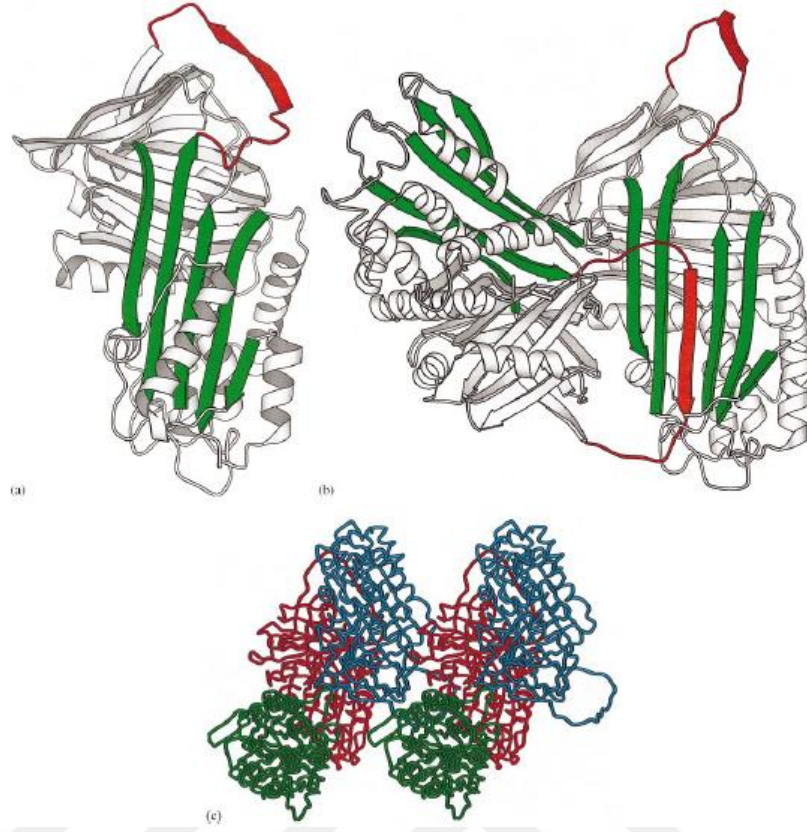
Kökeni Avrupa'ya dayanan insanların % 90'ında normal serum A1AT düzeyi ile beraber normal M alleli vardır. Bu kişiler Pi MM olarak isimlendirilen genotipe sahiptir. A1AT eksikliği bulunan olguların % 95'inden fazlası homozigot Z alleli taşır. Amfizem riski en çok bu ZZ homozigotlarındadır. Pi ZZ genotipindeki insanların A1AT düzeyi normal seviyenin % 16'sı kadardır. A1AT seviyesi, Pi SS genotipindeki bireylerde normal serum seviyesinin % 52'si, Pi SZ heterozigotlarında normal seviyenin % 35'i olduğu bilinmektedir. Pi SS homozigotu barındıran kişide amfizem riski yokken, Pi SZ heterozigotunda orta derece risk söz konusudur (Söylemez, 2006).



Şekil 2.6. A1AT geninden doğan başlıca varyantlar ve risk değerlendirmesi

Z mutasyonu, karaciğerin kaba endoplazmik retikulumunda inklüzyon olarak A1AT birikimi ile sonuçlanır. Bu inklüzyonlar, homozigotu juvenil hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (karaciğer kanseri) yatkın hale getirmektedir (Eriksson, Carlson & Velez, 1986). Hepatositlerde biriken A1AT dolaşıma salınamadığından akciğere gönderilemez. Böylece akciğer, nötrofil elastazın (NE) proteolitik saldırılarına karşı savunmasız hale gelir.

Birikim, A1AT proteinin (özellikle Z alleleline sahip A1AT) aktif merkezinin bir diğer A1AT molekülüne, bu molekülünde başka bir A1AT molekülüne bağlanması ile gerçekleşir. Bu reaksiyon dizinine ‘ β -Loop Sheet Polimerizasyonu’ adı verilmektedir (Şekil 2.7). Bu süreçte yer alan proteinlerin, gen düzeyinde nokta mutasyonuna uğramış varyantlar olduğu unutulmamalıdır (Lomas, 2000).



Şekil 2.7. Loop-sheet polimerizasyonunun moleküler temeli. (a) A1AT'nin (kırmızı) reaktif halkası, ikinci bir molekülün (yeşil) β -tabakası A'ya kolayca sokulabilen bir β -iplikçik olarak tutulur. Bağlanma, β -tabakası A'yı bozan mutasyonlarla kolaylaştırılır. Böylece bir başka antitripsin molekülünün peptid döngüsüne katılması daha açık hale gelir. (b) Bir molekülün reaktif merkez döngüsünü gösteren A1AT dimeri. Bir saniyede β -tabakası A'ya sokulur. (c) Bu işlem polimerlerin zincirlerini oluşturmak için uzanabilir. Modelde her bir antitripsin molekülü farklı bir renkte gösterilmiştir (Lomas, 2000).

2.4. Alfa-1 Antitripsin Eksikliğinin (AATD) Tedavisi

AlAT eksikliği ile ilişkilendirilen amfizemin serum protein eksikliğinden kaynaklandığı ve buna bağlı olarak alt solunum yolunun nötrofil elastaz ve anti nötrofil elastaz düzeyi arasındaki bir dengesizlikten kaynaklandığı düşünüldüğünde bu hastalığı tedavi etmek için iki genel yaklaşım vardır:

(1) Nötrofillerin alt solunum yollarında birikmesini önlemek (böylece nötrofil elastazın yükünü azaltır).

(2) A1AT'nin serum seviyelerini arttırmak (böylelikle nötrofil elastaz yüküne karşı akciğerde yeterli koruma sağlanır).

Tedavi olarak, A1AT augmentasyon (arttırım) tedavisi uygulanır. Çünkü yaralanan bir alveolus tamir edilse de, tahrip olmuş bir alveol kalıcı bir kayıptır. Fonksiyonel ünitelerin değiştirilebildiği karaciğer gibi organların aksine, yetişkin insan akciğeri kendini yenileyemez. Bu nedenle, nötrofil elastaz/anti nötrofil elastaz dengesizliği açısından A1AT eksikliğine bağlı olan amfizem patogenezinin anlaşılması için augmentasyon tedavisi; anti nötrofil elastaz düzeyini (A1AT miktarını) fonksiyon gösterecek kadar yeterli bir seviyeye çıkararak alt solunum yollarını nötrofil elastazın daha ileri saldırılarından korumak amacını taşır.

A1AT eksikliğinden kaynaklı olan akciğer tahribatının patogenezi hakkında her şey bilindiğinden, bu kişilerde alt solunum yollarına ait anti nötrofil elastaz düzeyi yeniden oluşturulabilir. Karakterize olan akciğer tahribatının abartılı oranı önlenecek böylece hastalık stabilize edilebilecektir. Diğer bir deyişle, giderek artan alveol kaybı azalıp duracaktır. 50 mg/dL'den düşük olan A1AT düzeyleri, amfizem gelişimi için yüksek risk oluşturur. 50 ile 80 mg/dL'lik serum düzeyi hafif risk grubudur. A1AT serum düzeyi 80 mg/dL'den fazla olduğu durumlarda ise (gerçek bir laboratuvar standardı kullanılarak 10.9 μ M'dan fazla) bir hastalık riski yoktur. Bu gözlemlerden hareketle, eğer augmentasyon tedavisi uzun süre zarfında 80 mg/dL'den fazla serum A1AT seviyesi sağlayabiliyorsa, alt solunum yolunda yeterli miktarda A1AT bulunur ve alveollere karşı koruyucu kalkan vazifesi görür.

Bu bulgulardan hareketle yapılan tedaviler olumlu sonuç vermiştir. Bu tedavi şeklinin güvenli, uygulanabilir ve biyokimyasal olarak etkili olduğunu açıkça göstermiştir. Tedavi, hastalar tarafından iyi tolere edilmiş ve iyi karşılanmıştır. Ayrıca kapsamlı güvenlik değerlendirmesi, parenteral arttırma tedavisinin güvenliğine ilişkin endişelerin önemsiz olduğunu göstermektedir. A1AT ile ilişkili akciğer tahribatının patogenezinin anlaşılması, hem serum hem de akciğer epitelyal astar sıvısı A1AT seviyelerini ve anti-nötrofil elastaz kapasitelerini arttırmak için augmentasyon

tedavisinin yeteneği büyük önem taşımaktadır. Sağlıklı bireylerde kararlı durum olarak nitelendirilen A1AT serum seviyesi, eksikliğe sahip kişilerin serum seviyelerinden yaklaşık 3 kat fazladır. Arttırım tedavisi uygulanan eksikliğe sahip kişilerde ise bu düzey 80 mg/dL eşik koruyucu serum seviyesini aşmıştır.

Sigara kullanımından kaçınma ve enfeksiyonların agresif tedavisi gibi nonspesifik tavsiyeler ve önlemlerin yanı sıra, augmentasyon tedavisi olmaksızın bu hastalık için herhangi bir tedavi mevcut değildir (Hubbard & Crystal, 1988).

Son yıllarda eksikliğin gen düzeyinde tedavisinin yapılması hakkında çalışmalar başlamıştır. 2010 yılında Li ve ark., A1AT eksikliğine neden olan bozuk genin tedavisi için A1AT proteinini sentezleyen sağlıklı geni, taşıyıcı bir vektör yardımıyla kemik iliği kök hücrelerine (BM) aktarmışlardır. Sonrasında ex-vivo transdüksiyonlu bu BM hücrelerinin karaciğere transplantasyonunu gerçekleştirerek başarılı bulgular elde etmişlerdir (Li vd., 2010). Yine aynı şekilde 2011 yılında Li ve ark., A1AT üreten cDNA'ı içeren rekombinant Adeno ilişkili virüs (AAV) vektörlerini kullanarak yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerini transdüse etmişlerdir. Bu kök hücreler daha sonra bir farenin karaciğerine aktarılmış ve sonuç olarak farelerin insan A1AT proteinini sentezleyebildikleri saptanmıştır (Li vd., 2011). Bu çalışmalar belli bir başarı oranına sahip olsa da ticarileşme konusunda zayıftır. Çünkü gen tedavileri günümüz şartlarında halen pahalı ve uygulaması zordur.

Tedavi edilmeyen A1AT eksikliği, etkilenen kişilerin çoğunluğu için ilerleyici ve ölümcül bir hastalıktır. A1AT eksikliği sonucu gelişen amfizemin patogeneğinde nötrofil elastaz ve anti-nötrofil elastaz arasındaki dengesizliğin rolüne ilişkin kanıtlar göz önüne alındığında, A1AT eksikliği olan kişilerin ve amfizemin klinik kanıtlarının parenteral A1AT güçlendirme tedavisi alması önemlidir (Hubbard & Crystal, 1988).

2.5. A1AT Eksikliği (AATD) Tanısında Kullanılan Yöntemler

A1AT eksikliği olan bireyler çok çeşitli belirtilere sahip olabilirler. Belirtiler yaşamın erken döneminde ortaya çıkabilir veya 50-60 yaşına gelene kadar başlamayabilir.

AATD'nin belirtileri, A1AT proteinin sentezlendiği ve hedeflendiği organlardaki bozukluklarla eş değer seyrederek. Eksikliğe sahip kişilerin akciğerlerine bağlı olarak; nefes darlığı, balgam, balgam üretimi ile aşırı öksürük, hışırtılı solunum görülebilir. Ayrıca egzersiz kapasitesinde ve kalıcı düşük enerji hallerinde azalmaya neden olabilir ve çabuk yorulma görülür. Semptomlar kronik olarak veya solunum yollarının akut enfeksiyonları ile ortaya çıkabilir. Bazen A1AT eksikliği olan bir kişi, nefes alırken artan göğüs ağrısına sahip olabilir. Bu, yaşamı tehdit eden çökmüş bir akciğere bağlı olabilir (amfizem hastalığı).

Eksikliğe sahip kişilerin karaciğerleriyle alakalı olarak; yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı, ayak veya karın şişmesi, cildin veya göz akının sarımsı renk alması (sarılık), kan kusma veya dışkıda kan görülmesi muhtemel semptomlardır. Ciltte ise; cildin altında sıcak, kırmızı, ağrılı topaklar görülebilir (Alpha-1 Foundation, 2018). Sayılan tüm bu semptomlar AATD'nin neden olduğu ilgili organlardaki hastalıklarla ilişkilidir. Serumdaki A1AT seviyesine göre bunların şiddetleri farklılık gösterir. A1AT'i kodlayan genin alleline göre bu semptomların çoğu görülebilir ya da görülmeyebilir (Brantly vd., 1966).

Tanı koymak, temel belirtilerden hareketle serum seviyesindeki A1AT düzeyine bakılarak yapılır. Normal serum seviyesinin % 35'i ve altı seviyesine inen A1AT miktarı eksiklikle ilişkilendirilir şeklinde belirtilse de (Brantly vd., 1966), serum A1AT seviyesinin 80 mg/dL'nin altına düşmesi bu kalıtsal hastalığın teşhisinde temel parametre olarak kabul edilir (Crystal, 1990).

Sağlık kuruluşlarında A1AT'nin serum seviyesinin tayini için protein elektroforezi ya da İmmunofiksasyon Elektroforezi uygulanmaktadır (AACC, 2018). Elektroforez tekniği uzun zamandır tıp alanında tanı koymak için uygulanan popüler bir yöntemdir. AATD durumunda akut faz proteinlerinin ya da total proteinin miktarındaki değişimler tanı koyma konusunda elektroforez kullanımını mantıklı kılar. Elektroforez, elektriksel bir alan içerisinde proteinlerin izoelektrik noktalarındaki farklılıklara göre anoda ya da katoda doğru göç etmelerine dayanan ve bu esasa göre ayırım yapan bir metottur. Bunun haricinde serum proteinlerinin analizinde spektroskopik metotlar da kullanılmaktadır. Klinik olarak kullanılan en yaygın metot nefelometri yöntemi ile A1AT miktarı tayinidir. Nefelometri yönteminde, bir süspansiyon içerisinde belirli bir

dalga boyuna sahip ışık geçirilir. Işık çözelti içerisinde absorplanır ve geri yansıtılır. Absorpsiyon durumu her bileşen için spesifik olduğundan analiz edilecek protein kolaylıkla tayin edilir.

Bu metotlar tanı koymada yeterli olsa da analiz yönteminin zorluğu, uzun hazırlık basamakları, uzman kişiler tarafından yapılması gerekliliği, cihaz ve testlerin yüksek maliyetli oluşu gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle her sağlık kurumunda A1AT eksikliği için bir test uygulanamaz. Eksiklik, KOAH ile sıkça karıştırılır (Blanco, 2017) ve buna göre bir tedavi yöntemi uygulanır. Böylelikle bir türlü iyileşemeyen kişi, hastalık belirsizliğinden doğan psikolojik sıkıntıları da beraberinde yaşar (Worthington, Parrott & Smith, 2018). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1997 yılında mevcut verilere dayandırılarak yapılmış bir beyana göre KOAH hastalığından muzdarip kişilerin ve astım tanısı almış genç ya da erişkin yaştaki bireylerin mutlaka hayatlarında an az bir kez A1AT eksikliğine karşı kantitatif test yaptırmalarının gerekli olduğu önerilmiştir (Boulyjenkov, 1997). Bundan dolayı AATD tanısında doğrudan A1AT miktarına spesifik olabilecek bir tanı yöntemi geliştirilmelidir.

2.6. Alfa-1 Antitripsin Eksikliğinin Tanısında Kullanılabilecek Yeni Yaklaşımlar

A1AT'nin günden güne artan önemi ve eksiklik durumunun (AATD) önüne geçilmez ise ölümcül sonuçlara neden olması, bu proteinin analizi için yeni metotlar geliştirilmesini zorunlu kılar. Son yıllarda yüzey plazmon rezonansı yöntemi (SPR) kullanılarak Aptamer-Antikor etkileşimli sandviç tipi testler (kitler) oluşturup serum örneklerinde A1AT analizi yapmayı hedefleyen çalışmalar mevcuttur ve yöntem A1AT tayini için oldukça hassas ve etkili olarak belirtilmiştir (Kim & Lee, 2015). Bir başka çalışmada ise, elektrokimyasal esaslı alkalin fosfataz etiketli antikor-gümüş nanoparçacıkları ve karbon nanotüpleri ile sandviç tipi bir biyosensör geliştirilmiş ve A1AT analizi için uygulanmıştır. Bu yöntemde de yüksek hassasiyet ve tekrarlanabilirlik elde edilmiştir (Zhu & Lee, 2017).

Biyosensörler, A1AT'nin serum örneklerinde analizi için oldukça uygun bir tayin metodu olarak umut vadetmektedir. Bu yöntemle analiz süresi minimuma indirilerek, tedavi safhasında da A1AT miktarının kontrolü yapılabilecektir. Bu

çalışmanın çıkış noktası da bu nedenle A1AT tayini için yeni bir biyosensör geliştirmektir.

2.7. Biyosensörlerin Temeli

Biyosensörler, biyokomponent (algılayıcı biyolojik kısım) ile fiziksel komponentlerden (etkileşim sonucu açığa çıkan değişimi ölçebilen transduser kısım) oluşan mikro yapıli sistemlerdir. Biyokomponent kısmına biyolojik tabaka da denmektedir. Analiz edilecek materyal biyosensörün biyokomponent kısmıyla muamele olur ve burada gerçekleşen biyokimyasal ilişki transduser (dedektör) kısmında anlamlı bir sinyale dönüştürölür (Telefoncu, 1999) Sinyal, bir sinyal arttırıcı ara yüzünde çoğaltılarak ölçülebilir seviyeye getirilir (Baş & Deniz, 2015).

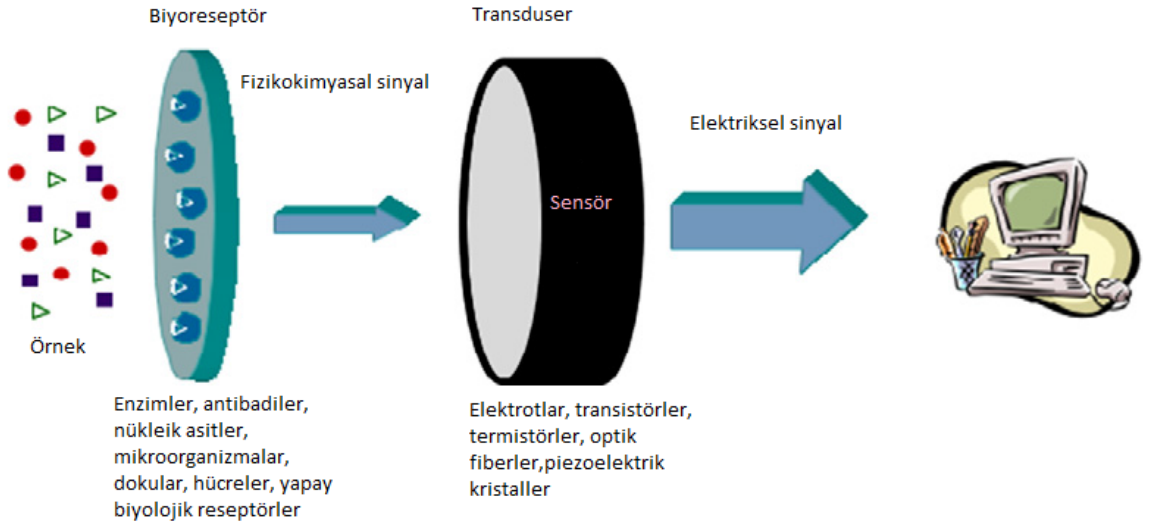
Biyosensörler, son yıllarda analitik kimya, biyo-analitik kimya, tıp, endüstri, gıda kimyası, kısacası analiz yapılması gerekli olan tüm alanlarda kullanılma potansiyeli olan bir yöntem olarak görölmektedir. Çünkü, biyokomponent kısım analit madde ile spesifik bir etkileşime girer. Bu etkileşimi ölçebilecek bir sinyale dönüştüren dedektör seçimiyle, analiz çok daha hızlı, hassas ve doğru bir şekilde gerçekleştirilebilir.

Dedektör sistemi, alınacak cevabın şekline göre değişiklik gösterir. Örneğin; Atomik absorpsiyon spektroskopisinde fotometrik bir dedektör kullanılması uygunken, elektrokimyasal temelli bir biyosensörde impedimetrik (volt), amperometrik (akım) veya konduktometrik (iletkenlik) bir dedektör kullanılması uygun olacaktır. Buna göre biyokomponent kısmın seçimi de analizi yapılacak materyale göre çeşitlendirilebilir. Günümüzde biyokomponent ve transduser çeşitliliğinden yola çıkarak pek çok biyosensör sistemi geliştirilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Biyosensörleri meydana getiren kısımların çeşitliliği (Tüylek, 2017)

ANALİT (ÖRNEK)	BİYOKOMPONENT	TRANDUSER
Hormonlar	Enzimler	Elektrokimyasal Esaslı
Enzim	Antikorlar	Yarı iletken Esaslı
Koenzimler	Hücre	Optik Esaslı
Substrat	Doku Kesitleri	Fotometri Esaslı
Aktivatör	Reseptörler	Flüorometri Esaslı
İnhibitör	Mikroorganizmalar	Flüorometri Esaslı
Antikor-Antijen	Nükleik Asitler	Piezoelektrik Esaslı
Nükleik asit	Lipitler	Kuartz Kristal Mikrobalans
Mikroorganizmalar	Hücre Organelleri	Mikrokantil everlar
Glukoz	Glukoz Oksidaz (GOD)	Amperometrik
L-Aminoasitler	Horseradish Peroksidaz	Potansiyometrik
Herbisit	Antikorlar	Piezoelektrik quartz kristal
Metaller	---	Elektrokimyasal Esaslı

İlk olarak, 1950’li yılların ortasında kandaki glukozun, glukozidaz immobilize edilmiş bir elektrot yardımıyla ölçümü gerçekleştirilmiştir (Clark & Lyons, 1962). Burada glukozidaz (GOD) enzimli elektrot biyokomponent kısmı oluşturmaktadır. Glukoz ve çözünmüş halde bulunan oksijen elektrot tarafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenir. Glukonik asit oluşumu ile devam eden süreçte oksijen harcanmaktadır. Ortamdaki glukozun bitimine kadar oksijen harcanır ve glukoz bittiği anda oksijen tüketimi durur (Bulut, 2011). Oksijen miktarının başlangıçtaki seviyesi ile glukozun bittiği andaki oksijen seviyesi arasındaki fark hesaplanarak ne kadar glukozu karşılık geldiği bulunur. Burada oksijen seviyesini belirleyen ise dedektördür (fiziksel kısım). Biyosensörler, genel olarak bakıldığında üç kısımdan oluşurlar. Bunlar biyoreseptör (biyokomponent), transduser (dedektörler) ve sinyal güçlendiricidir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Biyosensörün temel bileşenleri (Bahadır & Pagano Meriç, 2014)

Klasik elektrokimya metotlarıyla sadece anyon ve katyonların analizi yapılabilirken, bu sistemlere biyomateryallerin eklenmesi ile pek çok maddenin tayini mümkün hale gelmektedir. Böylece hazırlanan analiz sistemleri ‘Biyosensörler’ adını alır. Aslında biyosensörler, doğadaki canlıların evrim süreci içerisinde geliştirdikleri algılama kabiliyetlerinin laboratuvar ortamında simüle edilmesinden ibarettir. Köpek balıklarının tonlarca suyun arasından bir damla kanı algılayabilmesi, erkek keleklerin dişilerin yaydığı birkaç molekül feromonu algılayabilmesi ya da alglerin zehirli maddelere karşı aşırı duyarlılığı gibi örnekler biyosensörlerin kurgulanmasında fikir ve ilham veren doğal olaylardır (Bulut, 2011).

2.7.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, biyokomponentin türüne ve kullanılan transduser sistemine göre sınıflandırılırlar. Sınıflandırma ayrıca analitin tanınması esnasındaki mekanizmaya göre de yapılmaktadır.

2.7.1.1. Biyokomponent seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

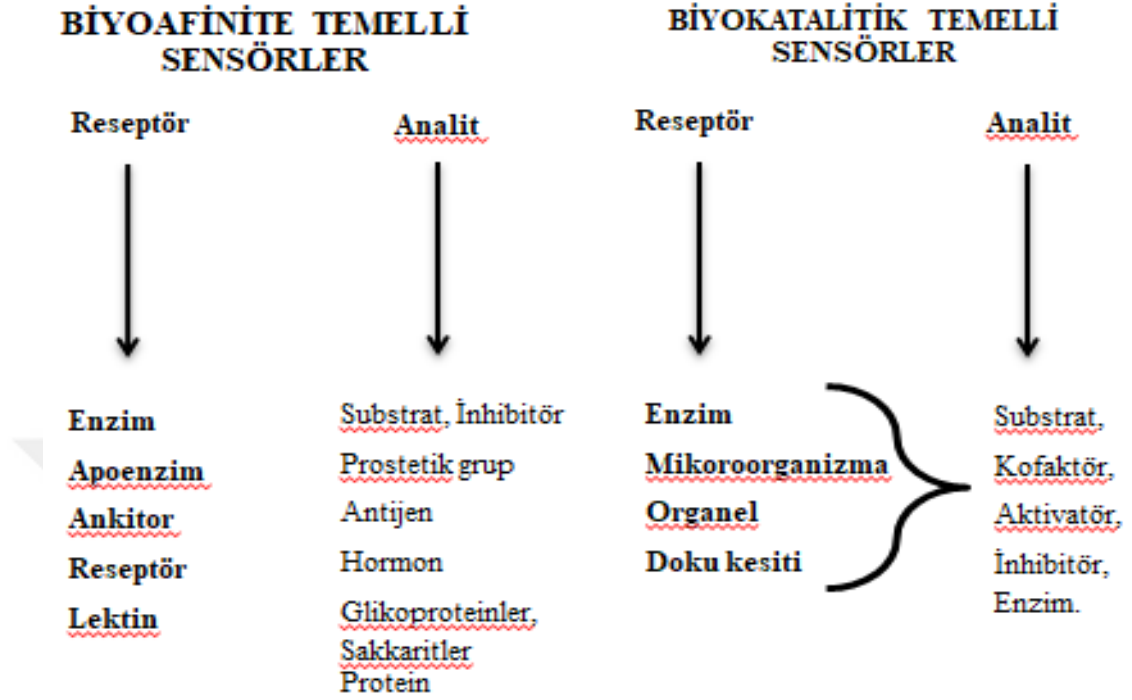
Çizelge 2.2’de gösterildiği gibi bu tarz bir sınıflandırmada dikkat edilmesi gereken nokta, biyokomponent olarak seçilen biyomolekülün analizi yapılacak substrat madde ile nasıl bir etkileşime gireceğinin belirlenmesidir.

Çizelge 2.2. Biyokomponent seçimine göre biyosensörler ve analiz alanları (Telefoncu, 1999).

Enzim sensörleri	Küçük moleküllü organik veya anorganik moleküllerin analizi, (örneğin: metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler vb.)
Mikrobiyal sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı analizlere ek olarak BOD, mutajenite, toksisite alanlarında.
DNA sensörleri	Gen düzeyinde hastalık yapıcıların tayininin yanı sıra virüsler, patojen mikroorganizma analizinde.
İmmüno sensörler	DNA sensörlerinin analiz alanlarına ek olarak ksenobiyotiklerin analizinde.

Biyosensörler ek olarak çalışma prensiplerine göre kendi aralarında; biyoafinite temelli ve biyokatalitik temelli olarak iki grupta incelenir (Şekil 2.9).

BİYOSENSÖRLER



Şekil 2.9. Biyosensörlerin biyokomponentlerinin etki prensibine göre sınıflandırılması (Telefoncu, 1999)

Biyoafinite temelli sensörler, boyaların, lektinlerin, hormonların ve reseptörlerin veya antikorların, enzimlerin, hücre içi matrikse dayalı glikoproteinlerin analizleri için kullanılırlar. Ayrıca antijen ve hormon tanımlanması yapmak için de kullanılabilirler. Elektrodun uç kısmında oluşan kompleks nedeniyle tabaka kalınlığında bir değişim meydana gelir. Bu değişim ise ışık absorpsiyonu ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerde değişime sebep olur. Bu değişimler çeşitli transduserlerle ölçülürler (Optik esaslı, potansiyometrik ya konduktometrik esaslı transduserler vs.).

Biyokatalitik temelli sensörlerde ise analitin kimyasal dönüşümü söz konusudur. Biyoaktif tabakada bulunan enzim, mikroorganizma, organel vs. tarafından analit kimyasal olarak değiştirilir. Bu nedenle katalitik sensörler aynı zamanda metabolizma sensörleri olarak isimlendirilir (Telefoncu, 1999).

2.7.1.2. Transduser seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Bir biyosensör tasarımında, biyokomponent seçimi ne kadar önemliyse fiziksel kısmın seçimi de o kadar önemlidir. Çünkü biyoaktif tabakada meydana gelecek etkileşimden doğan fizikokimyasal değişimlerin iyi belirlenmesi cevabın etkisini doğrudan etkiler. Fizikokimyasal değişimin türüne göre ise biyosensörler Çizelge 2.3'deki gibi sınıflandırılabilir (Novotny, 2009).

Çizelge 2.3. Transduser seçimine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

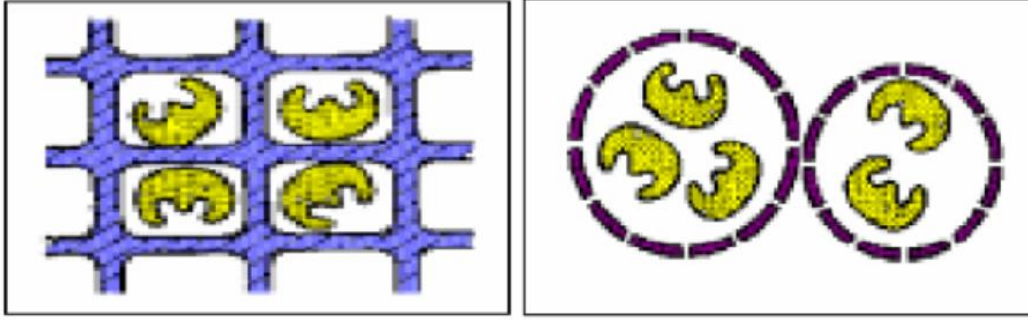
Elektrokimyasal Temelli Biyosensörler	İmpidimetrik, Amperometrik, Potansiyometrik.
Optik Temelli Biyosensörler	Fotometrik, Biyolüminesans, Fluorometrik
Piezoelektrik Temelli Biyosensörler	Mikrokantileverlar, Kuartz kristal mikrobals
Kalorimetrik Temelli Biyosensörler	Termistörler

2.7.2. Biyokomponentlerin immobilizasyonu

İmmobilizasyon, biyosensörün tekrarlanabilirliği ve stabilitesinin sağlanması açısından önemli bir faktördür. Seçilen biyoreseptör (biyokomponent) ve transduser analiz yöntemine göre çeşitlilik gösterir. Analiz yönteminin esası biyolojik kısımda meydana gelen etkileşimin ve bu etkileşimden doğan fizikokimyasal tepkinin bir bütünüdür. Son yıllarda immobilizasyon tekniğinin çok çeşitli versiyonları tanımlansa da başlıca 5 yöntem kullanılarak biyoreseptör molekül istenilen yüzeye immobilize edilir. Bu yöntemler; tutuklama, çapraz bağlama, adsorpsiyon, biyolojik etkileşim ve kovalent bağlama olarak sıralanabilir.

2.7.2.1. Tutuklama

Biyoreseptör molekülün, bir membran veya tabaka matriksi içerisinde hapsedilmesi temeline dayanır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kafes tipi tutuklama ve mikrokapsül tipi tutuklama (Burak, 2012)

2.7.2.2. Çapraz bağlama

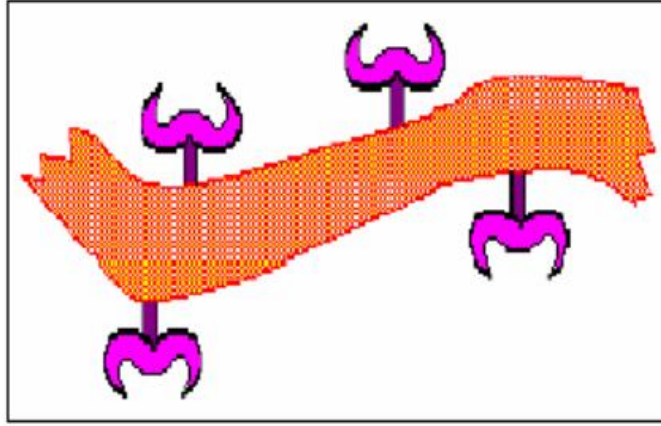
Kimyasal bağlama ile tutuklama metodunun birleştirilmesiyle oluşan bir metottur. Tutuklamayla immobilize edilmiş bir biyoreseptör molekül, glutaraldehit (GLT) gibi foksiyonel bir reaktif molekül ile tabakaya kovalent bağlanır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Çapraz bağlama yöntemi (Burak, 2012)

2.7.2.3. Adsorpsiyon

Biyoreseptör molekülün, hidrofobik, hidrofilik veya iyonik etkileşimler vasıtasıyla tabakaya ya da bir filme tutturulmasından ibarettir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Adsorpsiyon ile assosiye olmuş bir biyoreseptör (Burak, 2012)

2.7.2.4. Biyolojik etkileşim

Biyoreseptörün, immobilize olacağı tabakayla spesifik olmak koşuluyla kimyasal bağlanma ile birleşimi temeline dayanır (Telefoncu, 1999).

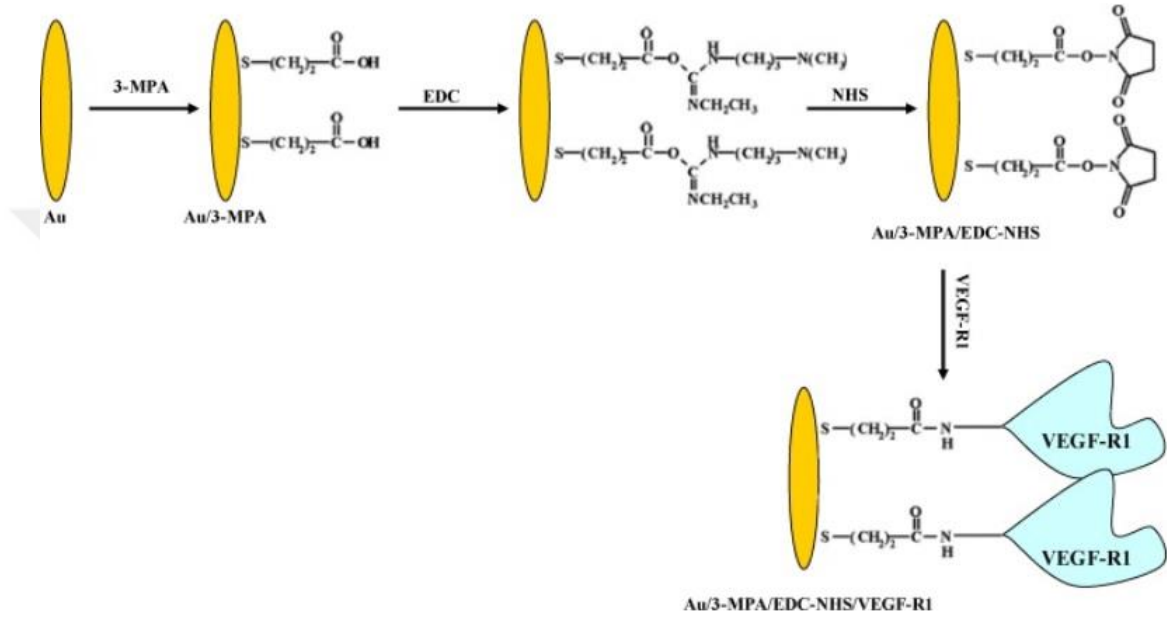
2.7.2.5. Kovalent bağlama

Biyoreseptör molekülün, transduser yüzeyine çeşitli kimyasal reaksiyonlar kullanılarak kovalent bağlanması temeline dayanır (Telefoncu, 1999).

İmmobilizasyon, oda sıcaklığında ve nötral pH'larda yapılmalıdır. Kovalent bağlama metoduyla immobilizasyon için kullanılabilecek önemli reaktif grupları; açiller, karboksilat polimerleri, imidoesterler, karbodiimidazol ve tiyollerdir. Bu grupların verdiği reaksiyonlar ise immobilizasyonun sağlanmasında seçilebilecek önemli reaksiyonlardır (Telefoncu, 1999)

Bu çalışmada geliştirilen A1AT biyosensörünün inşa edilmesinde kovalent bağlama yöntemi kullanılmıştır. Literatürde kovalent bağlama metodu ile geliştirilmiş çok sayıda biyosensör çalışması da mevcuttur. Bu çalışmalara örnek olarak, 2011 yılında Sezgintürk, Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) tayini amacıyla bu proteini tanıyan spesifik reseptörünü VEGF-R1 molekülünü Au bir elektrot yüzeyine kovalent olarak immobilizasyonuna dayalı impedimetrik temelli bir biyosensör

geliştirmiştir (Sezgintürk, 2011). İlk olarak, Au yüzeyini tiyol grubu ihtiva eden 3-merkaptopropiyonik asit ile muamele etmiş ve muamele sonucu 3-MPA'nın tiyollerindeki kükürt, altına kovalent olarak kendiliğinden SAM stratejisiyle bağlanmıştır. Daha sonra ise EDC/NHS çözeltileriyle 3-MPA'nın karboksilli asitlerini aminleyerek aktive etmiştir. Son olarak ise Şekil 2.13'de görüldüğü üzere VEGF-1 reseptörü bu kimyasal köprüye kovalent olarak immobilize edilmiştir.



Şekil 2.13. VEGF-1 reseptörünün altın elektrot yüzeyine kovalent bağlanma metodu ile immobilizasyon stratejisi (Sezgintürk, 2011)

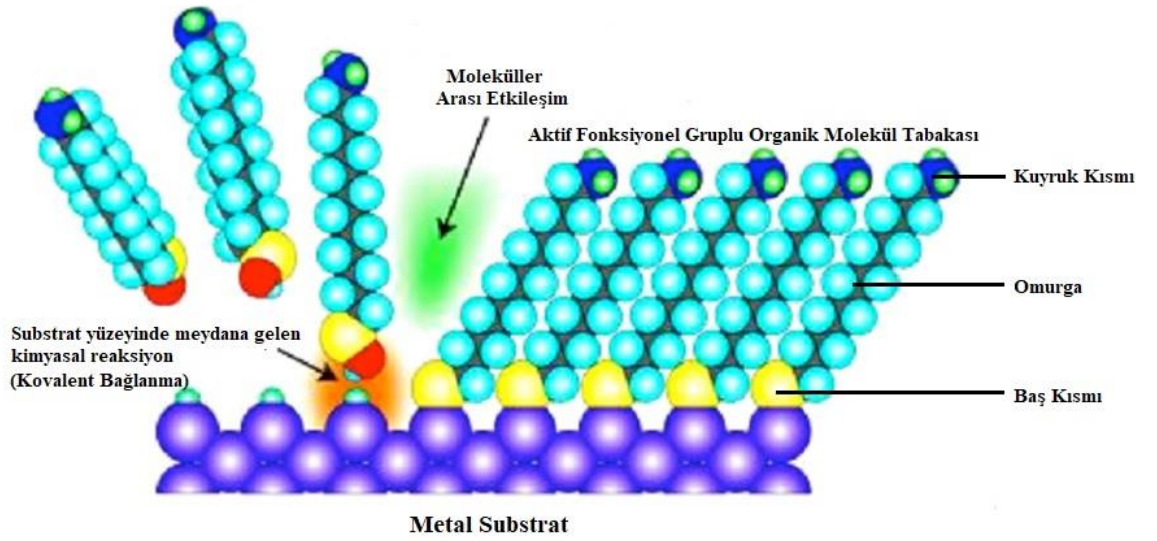
Bir başka çalışmada Sezginürk ve Uygun, VEGF-R1 molekülünü Au yüzeyini sisteaminle modifiye ettikten sonra ölçümün hassasiyetini arttırmak için poliamino grupları içeren PAMAM dendirimerlerini kullanarak impedimetrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Sisteamin Au elektrot yüzeyine kendiliğinden bağlanmış ve amin grupları glutaraldehit ile fonksiyonellik kazandırılmıştır. Daha sonra PAMAM dendirimerinin sisteamine kovalent bağlanması sağlanmış ve tekrar glutaraldehit kullanılarak aktive edilmiştir. Glutaraldehit aldehit grubuna VEGF-R1 molekülü amino gruplarından kovalent bağlanarak bir biyosensör tasarlanmıştır (Sezgintürk & Uygun, 2012)

Kovalent bağlama metodu, kullanılabilecek fonsiyonel grupların çeşitliliği nedeniyle moleküllerin immobilizasyonu hususunda önemli ve popüler bir yere sahiptir ve bilim insanına geniş bir yelpaze sunar. Bu çalışma kapsamında A1AT biyosensörü geliştirilirken kovalent bağlama yöntemi kullanılmış ve 4-merkaptofenilasetik asit SAM stratejisi ile altın elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir.

Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (SAM)

SAM terimi, yüzeyde birkaç nanometre kalınlığında özel bir yapı olarak meydana gelen alkil tiyol moleküllerinin kendiliğinden oluşumunu ifade eder (Love, Estroff, Kriebel, Nuzzo & Whitesides, 2005). Kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM)'lı sistemler son derece ilgi çekicidir. Çünkü elektrot yüzeyine inkübe edilen kimyasallar, fonsiyonel grupları sayesinde kendiliğinden bağlanma gösterir (Kokkokoğlu, 2013). Tiyol grubu içeren kimyasalların kullanımı ile elektrot yüzeyinde SAM oluşturmak yaygın bir tekniktir. Ayrıca tiyol grubu içeren oligonükleotidler ile DNA immobilizasyonu için SAM oluşturan çalışmalar mevcuttur (Gooding, 2002). Tiyollerin haricinde SAM oluşturmak için disüfitler veya sülfür gibi kükürt bazlı bileşiklerin kullanımı (Boozer, Chen & Jiang, 2006) oldukça yaygındır. Bu moleküller, daha düşük serbestlik derecelerine (hareketsiz) sahip çok karmaşık yapıları oluşturacak şekilde substratla bağlantılı hale gelebilirler. Bazı SAM'lar, temiz metal üzerinde sulu fazdan kendiliğinden adsorpsiyon (kendiliğinden organize) ile kolayca oluşturulabilir (Xu & Li, 1995). SAM adsorpsiyonunun kinetiği iki aşamalı bir süreçten geçer. İlk adımda, SAM'lerin hızlı bir şekilde büyümesi (yüzey örtüsünün veya kalınlığının nihai değerinin % 80-90'ı) ilk 2-3 dakika içinde gerçekleşir. Bunu, film kalınlığının yaklaşık 10-20 saatlik bir zaman aralığında bir denge değerine yaklaştığı daha yavaş bir adım izler.

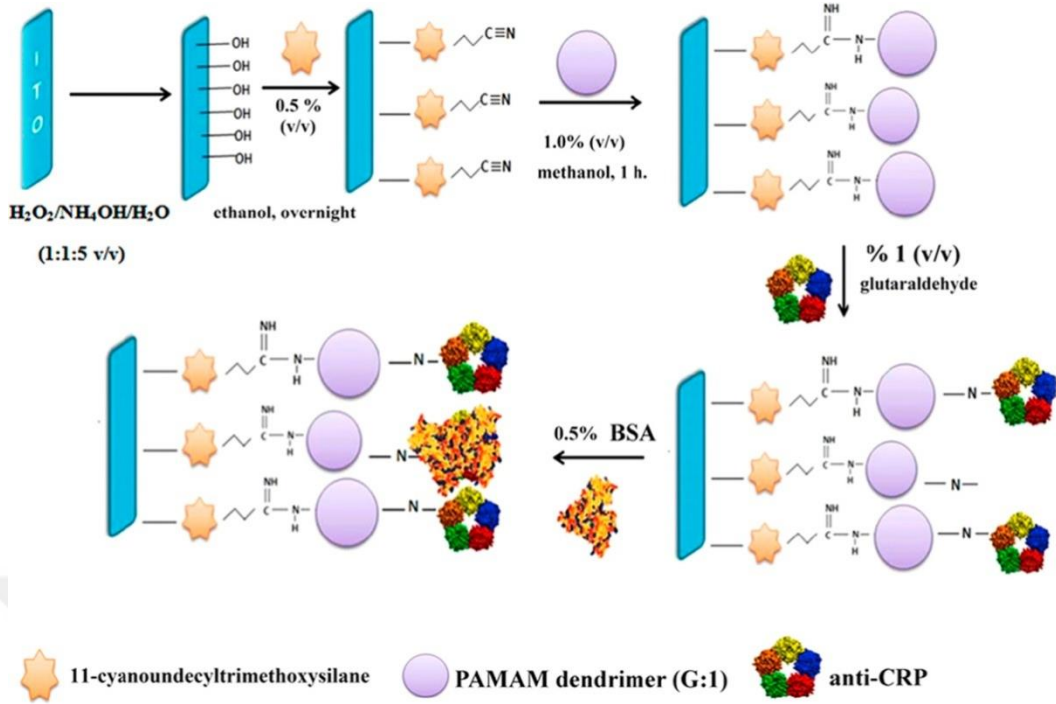
Oluşturulacak SAM'in özelliğini kullanılan kimyasalın zincir uzunluğu, uç grubunun işlevselliği, çözücünün doğası, daldırma süresi ve alt tabakanın (elektrot) yüzey morfolojisi gibi faktörler etkileyebilir (Pan, Durning & Turro, 1996).



Şekil 2.14. Self Assambled Monolayer (SAM)'in şematik gösterimi (Vuillaume, 2010).

SAM oluşturulacak yüzeyin çeşitlendirilmesiyle kullanılan kimyasalın yapısı değişebilir. Şekil 2.14'te belirtilen metal substrat; Pt, Cu, Ag, Au gibi metallerden oluşuyor ise baş kısmında tiyoller veya sülfidler kullanılabilir. Yüzey metal oksitlerden oluşuyor (SiO_2 gibi) ise baş kısmında alkil siloksanlar (silan grupları) bulunduran bir kimyasal kullanılması gerekir (Vuillaume, 2010).

SAM'lar sadece metal yüzeye tiyol gruplarının kendiliğinden bağlanması şeklinde oluşmaz. Son yıllarda alternatif metal substratlar ile kimyasallar geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Örneğin 2018 yılında Sonuç Karaboğa ve Sezgintürk, İndiyum Kalay Oksit (ITO) tek kullanımlık tabakaları ile anti-CRP (C-Reaktif Protein) antikoru kovalent etkileşimler vasıtasıyla hareketsizleştirmişlerdir (Şekil 2.15). Burada ITO yüzeyini 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (CUTMS) ve PAMAM dendrimerleri kullanılarak modifiye edip CRP analizi yapabilen bir biyosensör sistemi geliştirmişlerdir (Sonuç Karaboğa & Sezgintürk, 2018).



Şekil 2.15. Kovalent bağlanma metodu ile ITO tabanlı biyosensörün immobilizasyonu

2.7.3. Biyosensör Uygulamalarında Elektrokimya

Elektrokimya, elektrik enerjisi ile kimyasal enerji arasındaki etkileşimi, bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri ve kimyasal tepkilerde gerçekleşen elektron geçişlerini inceleyen bir bilim dalıdır. Elektrokimyasal bir sistemin oluşturulabilmesi için elektron verici bir anot, elektron alıcı bir katot ve bu iki uç arasında elektronun transferine olanak sağlayacak bir elektrolit çözeltisi olmalıdır. Elektrokimyasal reaksiyonun olduğu ortam elektrokimyasal hücre olarak isimlendirilir. Analizi gerçekleştirilecek maddenin elektrokimyasal özellikleri baz alınarak gerçekleştirilen kantitatif analizler ‘elektro analitik kimya’ olarak isimlendirilir.

Elektro analitik yöntemler düşük tayin sınırlarında bile yüksek hassasiyete sahip oluşları ve kısa sürede cevap verebilmeleri sebebiyle avantaj sağlarlar (Kayran, 2011). Bu nedenle elektrokimyasal sistemler ile biyokomponent sistemleri bir araya getirilerek biyosensör uygulamalarında kullanılmaktadır.

2.7.3.1. Elektrokimyasal Temelli Biyosensörler

Elektrokimyasal temelli biyosensörler, elektrokimyasal tekniklerin analitik gücünü biyolojik tanıma süreçlerinin özgüllüğü ile birleştirir. Genel olarak biyokimyasal reaksiyonlar sonucu bir analitin konsantrasyonu ile ilgili elektrik sinyali üretilir. Bu amaçla, biyospesifik bir reaktif uygun bir elektrotta immobilize edilir. Bu da biyolojik tanıma olayını kantitatif amaçlı amperometrik veya potansiyometrik bir cevaba dönüştürür. Elektrotun bir biyomolekül ile kombinasyonu, birçok zorlu probleme uygulanabilen yeni ve güçlü analitik araçlar sunmaktadır (Wang, 2006). Ayrıca elektrokimyasal biyosensörler, biyosensörlerin diğer sınıflarına göre daha hızlı tepki, daha fazla basitlik, yüksek hassasiyet ve daha düşük maliyet sunması nedeniyle en çok tercih edilen biyosensör sınıflarından olmuştur.

2.7.3.1.1. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, bir ürünün veya reaktanın genellikle sabit uygulanan bir potansiyelde yükseltgenmesi veya indirgenmesi sırasında oluşan akımın değişimini ölçer. Amperometrik biyosensörleri etkileyen en önemli faktör, katalitik moleküller arasındaki elektron transferidir (Gu, Liu, Zhang & Hasebe, 2009).

2.7.3.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörler, bir çözelti içine daldırılmış iki elektrot arasındaki potansiyel farkını ölçer. Elektrotlardan biri referans elektrodudur ve ortamından bağımsız sabit bir potansiyele sahiptir. Prob elektrodunun potansiyeli, oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarının meydana geldiği katı ve sıvı fazlar arasındaki ara yüzde potansiyeldir. Denge, oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarının oranları eşit olduğunda elde edilir. Denge potansiyeli aşağıda verilmiş olan Nernst denklemiyle ifade edilir.

$$E = E_0 - \left(\frac{RT}{zF} \right) \ln \left(\frac{[red]}{[ox]} \right)$$

Denkleimde [oks] ve [red], sırasıyla, sistemin oksitlenmiş ve indirgenmiş formlarının konsantrasyonlarını temsil eder. Potansiyometrik biyosensör oluşturmak için prob elektrotunda hidrofobik membran ile bir biyolojik bileşen eklenmelidir (Yılmaz & Karakuş, 2011).

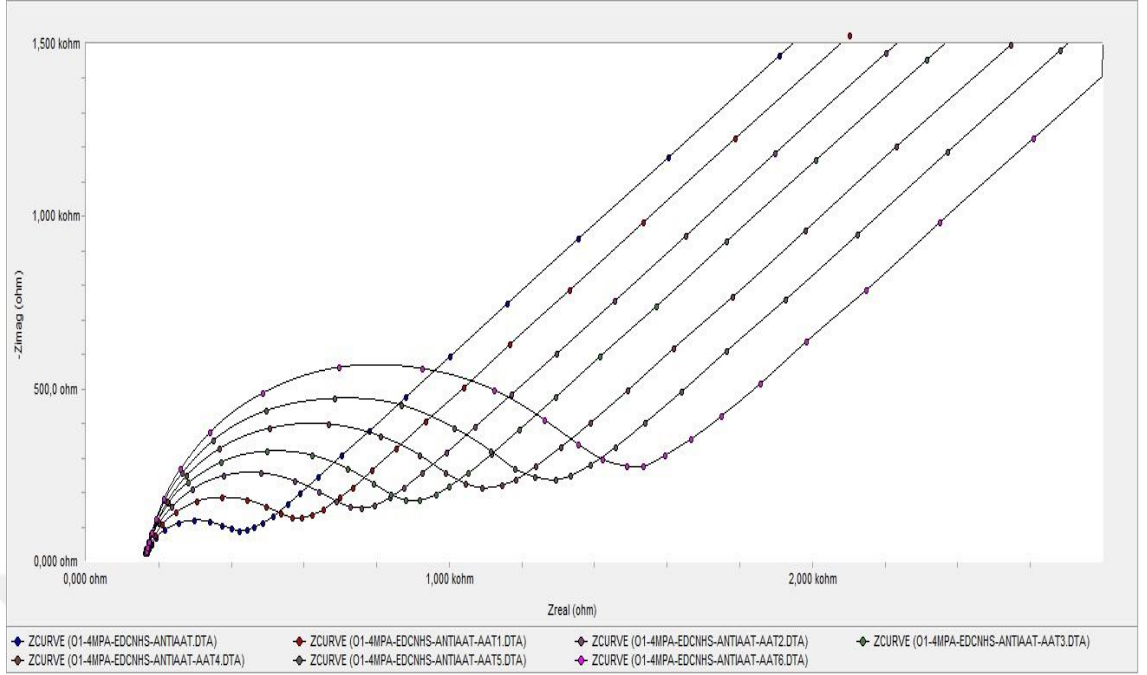
Biyolojik bileşenlerin immobilizasyonundan sonra çeşitli parametrelerde ölçümler uygulanarak bağlanmanın ve ölçümün karakterizasyonu yapılmalıdır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin başında impedimetri ve voltametri gelmektedir.

2.7.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), çok çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliğin hassas bir göstergesidir. Günümüzde elektrokimyasal temelli impedimetrik biyosensörlerin gelişimine yönelik artan bir eğilim vardır. Biyosensörlerin üretimini karakterize etmek ve enzimlerin katalize edilmiş reaksiyonlarını veya spesifik bağlayıcı proteinlerin, lektinlerin, reseptörlerin, nükleik asitlerin, bütün hücrelerin, antikorların ve antikorla ilişkili maddelerin biyomoleküler tanıma olaylarını izlemek için impedimetrik teknikler uygulanmaktadır (Guan, Miao & Zhang, 2004). EIS ile yüzeyler, membranlar ya da tabakalar üzerinde meydana gelen değişim, difüzyon prosesleri ve karakterizasyon konularında bilgi sağlanır (Telefoncu & Kılınç, 2013).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), genliğe sahip bir sinüzoidal uyarım sinyali ile dengede olan bir sistemin pertürbasyonuna dayanarak malzemelerin hem kararlılığının hem de kapasitif özelliklerinin analizini gerçekleştirir.

Sistemin impedansı, verilen potansiyele karşı çok çeşitli alternatif akım (AC) frekansı taranmasıyla oluşur. Alınan veri ise impedans spektrumu olarak adlandırılır. Eşdeğer devre modelleri, impedans spektrumlarının yorumlanması için faydalıdır (Guan vd., 2004). İmpedans spektrumu cevabı Bode grafiği ve Nyquist eğrisi olmak üzere iki şekilde verilmektedir (Sezgintürk, 2013). Biyosensörlerin karakterizasyonunda Nyquist eğrisi önem arz etmektedir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Bu tez kapsamında geliştirilen A1AT biyosensörü için elde edilmiş Nyquist eğrileri.

Şekil 2.16’da verilen Nyquist eğrileri, immobilize edilmiş Anti-A1AT antikor ve üzerine eklenen A1AT proteini çözeltileri ile etkileşiminin impedans ölçümlerinin görüntüsüdür. A1AT proteinin ilavesi altı kez yapılmıştır. Lacivert renkli eğri Anti-A1AT’e ait olup en küçük impedans değerine sahiptir. Antikor molekülün üzerine spesifik proteini olan A1AT proteininin eklenmesiyle Nyquist eğrisinin büyüklüğü de artmıştır. İlave edilen A1AT konsantrasyonları aynı olup sistemin ölçüm doğruluğu eğrilerde lineer artış olarak görülmektedir.

Biyosensör uygulamalarında impedimetrik yöntemle birçok farklı biyomolekül çeşitli frekanslarda AC kullanılıp analiz edilmiştir. Özellikle, enzimler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve mikroorganizmalar, impedimetrik biyosensörler geliştirmek için elektrotların yüzeyi üzerine sabitlenmiştir (Guan vd., 2004). Buradan hareketle de çok çeşitli impedimetrik biyosensörler oluşturulmuş ve literatüre girmiştir. Başlıca impedimetrik biyosensörler ise; enzim temelli, immüno-bağlayıcı temelli, nükleik asit temelli ve hücre-mikroorganizma temelli impedimetrik sensörler olarak dört sınıfta toplanabilir (Guan vd., 2004).

2.7.5. Voltametrik Yöntemler

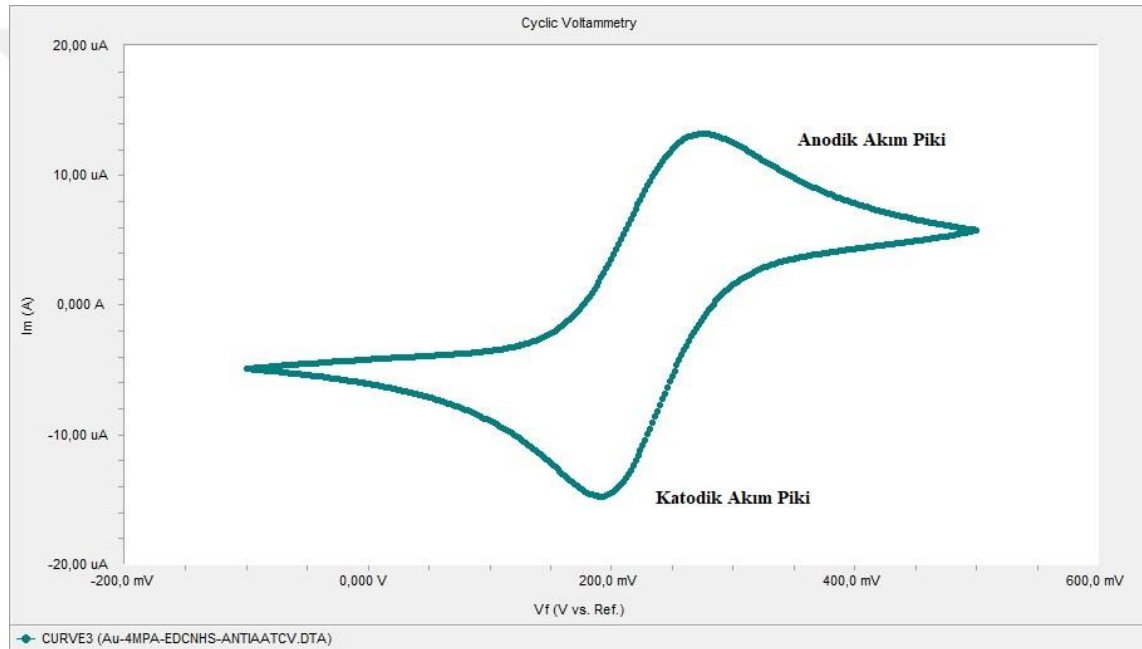
Voltametrik yöntemler, sisteme uygulanan sabit bir potansiyele karşı çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında oluşan akımın ölçümüne dayanan etkin analiz yöntemleridir. Potansiyel ve akım arasındaki bağlantı analit derişimi ile ilişkilendirilir (Yavuz, 2012). Elde edilen akım-potansiyel eğrisine voltamogram adı verilmektedir. Voltametri deneyleri üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirirler. Sisteme verilen potansiyele karşı akım cinsinden bir cevap alınmaktadır (Kayran, 2011). Potansiyeli değişen elektrot, çalışma elektrodu adını alır. Çalışma elektrodu, incelenen elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrottur ve işlevi elektrokimyasal ölçüm bölgesini oluşturmaktır. Çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesinden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmesinden dolayı oluşan akıma anodik akım denir. Bu elektrotlar amaca bağlı olarak soy (inert) veya soy olmayan metallerden seçilebilir. Platin ve altın elektrotları voltametride tercih edilen çalışma elektrotlarıdır. Voltametrik yöntemle analiz; Siklik (döngüsel) Voltametri (CV), Kare Dalga Voltametri (SWV) ve Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) olmak üzere üç farklı sistemle yapılabilir (Kayran, 2011).

Bu tez kapsamında geliştirilen biyosensörün tasarımında, biyolojik molekülün altın elektrot yüzeyine immobilizasyonu aşamalarında optimizasyon ve karakterizasyon aşamalarının her adımında CV analizi yapılmıştır.

2.7.5.1. Siklik (Döngüsel) Voltametri (CV)

Siklik voltametri yönteminde potansiyel tarama döngüseldir. Potansiyel E_1 değerinden E_2 değerine belirli bir hızla taranır. Daha sonra E_2 'den E_1 'e doğru aynı hızla taramanın tersi yönünde ilerler. Böylelikle yüzey üzerinde meydana gelen elektrokimyasal değişim sonucu oluşan ürünün elektrokimyasal davranışları incelenebilir (Telefoncu & Kılınç, 2013). Bu işlem, akım zamanının bir fonksiyonu olarak kaydedilir ve tarama defalarca tekrarlanabilir. Bir devir 100 saniyeden fazla veya 1 saniyeden az sürede de tamamlanabilir (Topkaya, 2013). Ayrıca potansiyelin sonlanma anındaki haliyle başlangıçtaki hali aynı olmayabilir.

CV’de pik potansiyeli ve akımı sayesinde yüzeyde meydana gelen reaksiyonun difüzyon kontrollü olup olmadığı ya da tersinir olup olmadığı anlaşılmaktadır. Tersinirlik azaldığı zaman tersinmez olayı gösteren pik yüksekliğinde azalma görülür ve pik potansiyellerinin arasındaki fark artış gösterir. Şayet tamamıyla tersinmez bir olay varsa tersinmez olayı gösteren pik kaybolur. Pik akımı bu nedenle analiz için önemli bir parametredir (Telefoncu & Kılınç, 2013). Ayrıca CV’nin cevap süresinin çok kısa olması ve analit tayin sınırının düşük olması önemli avantajlarındandır (Topkaya, 2013).



Şekil 2.17. CV ile alınmış bir voltamogram görüntüsü

2.8. Literatürde A1AT Analizi İçin Geliştirilmiş Biyosensörler

A1AT’in tespiti için yüzey plazmon rezonansı (SPR) ve floresan algılama temelli birkaç yöntem geliştirilmiş olsa da (Kim & Lee, 2015; Li vd., 2011) elektrokimyasal temelli bir biyosensör tasarımı ilk kez 2017 yılında Zhu ve Lee tarafından yapılmıştır.

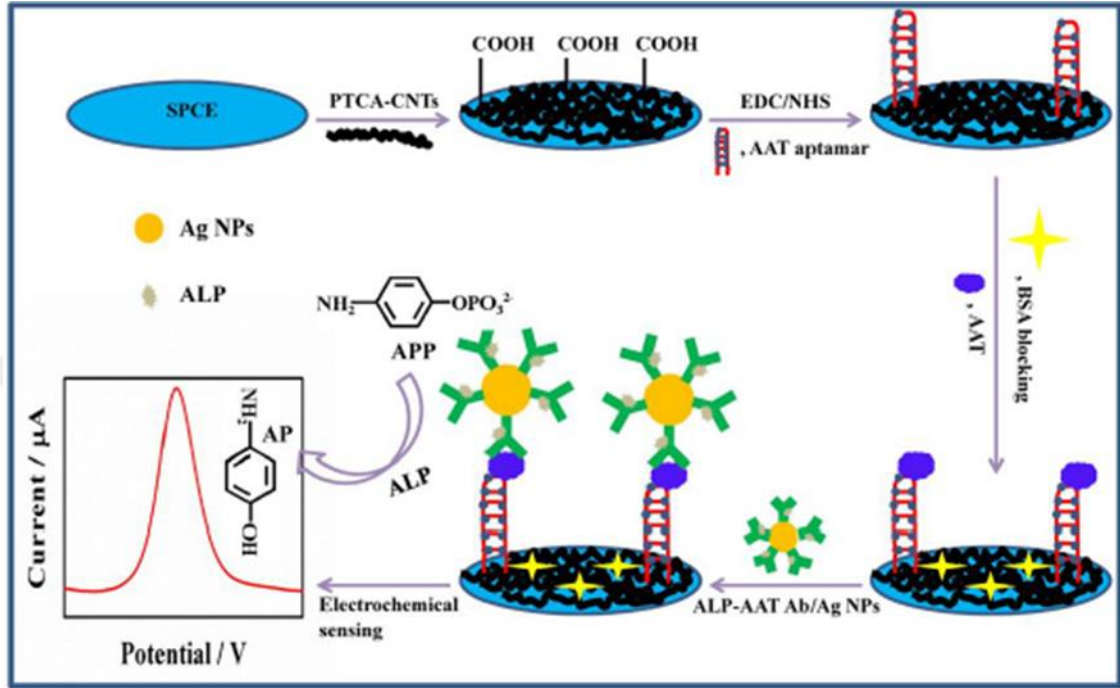
Floresan algılama temelli geliştirilen A1AT analiz yöntemi daha çok bu proteinin kalitatif tayini için planlanmıştır. Yöntem; A1AT eksikliğinin tedavisi için yapılan Bölüm 2.4'te belirtilen gen tedavisi ile ilgili çalışmaların, karaciğerde A1AT sentezini arttırıp arttırmadığını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir (Li vd., 2011).

2015 yılında Kim ve Lee ise, altın bir SPR çipini 11-merkaptoundekanoik asit ile muamele ederek SAM oluşturmuş ve EDC/NHS karışımı ile SAM'i aktive etmişlerdir. Sonrasında ise A1AT'e özgü 5' amin grubu modifiyeli bir DNA Aptamerini (5'-H2N-GGG GCA CGT ACG GGC ATC AC ACA GGC GTG CCCC-3 ') bu kol üzerine immobilize etmişlerdir. Bu tasarımın üzerine A1AT eklemesi yapılarak proteinin aptamerine bağlanması sağlanmıştır. Son olarak, Anti-A1AT antikorunun eklenmesiyle sandviç tipi antikor-aptamer temelli bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrıca bu yöntemin etkinliğini desteklemek için A1AT'nin serum ve tamponda ELİSA temelli kolorimetrik tespitlerini de yapmışlardır (Kim & Lee, 2015).

Zhu ve Lee'nin A1AT miktar tayini yapmak üzere geliştirdiği biyosensörde ise; biyokomponent olarak AAT aptameri, fiziksel bileşen olarak elektrokimyasal temelli ölçüm yapabilen potansiyostat cihazı kullanılmıştır. Çalışmada, modifiye karbon nanotüpler ile alkalen fosfataz etiketli antikor-gümüş nanoparçacıklarının etkileşimine dayalı elektrokimyasal esaslı sandviç tipi bir biyosensör olarak dizayn edilmiştir (Şekil 2.18). Karbon nanotüpler Perilen-3,4,9,10-tetrakarboksilikasit (PTCA) ile muamele edilerek modifiye karbon nanotüpler (PTCA-CNT) elde edilmiştir. PTCA-CNT çözeltisi seri baskılı karbon elektrot (SPCE) üzerine damlatılmış, maddenin yüzeye absorpsiyonundan sonra ise A1AT'e spesifik DNA aptameri (5'-H2N GGG GCA CGT ACG GGC ATC AC ACA GGC GTG CCC C-3') eklenmiştir. Diğer taraftan, gümüş nanopartiküller (Ag-Np) merkaptofenilasetik asit (MPA) ile fonksiyon kazandırılarak MPA-Ag-Np'ler elde edilmiş, karboksil grupları EDC ve NHS ile aktive edilmiştir. Aktive edilmiş MPA-Ag-Np'ler alkalen fosfatazla muamele edilerek A1AT antikor çözeltisi ile karıştırılmış ve Alkalen fosfataza A1AT antikoru bağlanmış gümüş nanopartiküller (ALP-AAT Ab-Ag NP) elde edilmiştir.

Elde edilen ALP-AAT Ab-Ag NP'leri SPCE üzerine immobilize edilmiş A1AT aptamer ile etkileştirilerek sandviç temelli bir kimyasal etkileşim gerçekleştirilmiştir (**ALP-AAT Ab-Ag NPs/AAT protein/AAT aptamer-CNTs/SPCE** kompleksi).

A1AT miktar tayinleri; farklı konsantrasyonlarda A1AT çözeltileri eklenmesi ve 1 saat inkübasyonu şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.18. Zhu ve Jin Lee'nin A1AT analizi için geliştirdiği sandviç tipli aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörün şematik gösterimi

Sonuç olarak Zhu ve Jin Lee tarafından geliştirilen A1AT biyosensörünün yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik ve kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu avantajlarına rağmen biyosensörün dizaynındaki komplekslik beraberinde çok fazla kimyasal madde kullanımını getirmekte olup hazırlanan biyosensörün maliyetini arttırmaktadır. Kimyasal madde çeşitliliğinin fazlalığı biyosensörün optimizasyon aşamasında da güçlük oluşturabilir.

Bu tez kapsamında bahsi geçen bu üç yöntemle karşılaştırıldığında; daha az kimyasal madde kullanılarak, A1AT antikor (anti-A1AT) ile analit çözeltisindeki A1AT proteininin birbirini immün tanınması ile A1AT'nin kantitatif tayinini yapabilecek; dizaynı basit, ucuz ve elektrokimyasal esaslı spesifik bir immünosensör dizaynı hedeflenmiştir.

2.9. A1AT Analizine Yönelik Biyosensörün Hazırlanması

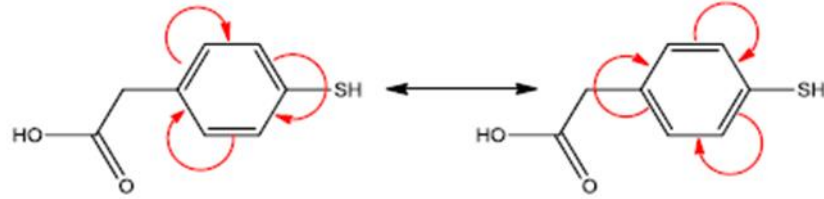
Tez kapsamında A1AT biyosensörünü tasarlarken A1AT antikor molekülü anti-A1AT'in altın elektrot üzerine kovalent olarak bağlanması, tiyol esaslı SAM'ler oluşturarak planlandığı için SAM oluşturmak üzere kullanılacak kimyasal molekül odak noktası olmuştur. Daha önce de belirtildiği gibi metaller veya yarı iletken yüzeylerde SAM oluşturabilmek ve biyokomponentin immobilizasyonu sağlamak amacıyla tiyollerin kullanımı oldukça yaygındır (Vuillaume, 2010). Ayrıca literatürde SAM oluşturmak üzere alkan tiyollerin kullanımı daha yaygındır (Hewas, 2013).

Ahmad ve Moore, 2012 yılında suda benzo[a]piren saptanması için elektrokimyasal temelli bir immünosensör geliştirmişler, 11-merkaptoundekanoik asit kullanarak SAM oluşturmuşlardır (Ahmad & Moore, 2012). Benzer şekilde Kim ve Lee, 2015 yılında 11-merkaptoundekanoik asit kullanarak altın elektrot yüzeyini aktiflemişler ve aptamer-antikor etkileşimli sandviç testi ile yüzey plazmon rezonansı kullanılarak A1AT analizine yönelik bir metod geliştirmişlerdir (Kim & Lee, 2015).

2013 yılında Agab Mohamed Hewas Leicester Üniversitesi'nde yaptığı doktora tezi kapsamında suda metal iyonlarının analizine yönelik SAM ile modifiye edilmiş EQCM (Elektrokimyasal kuvars kristal mikrobals) elektrotları geliştirmiştir. Bu tez kapsamında aromatik tiyollerin etkinliklerini de SAM kapasiteleri yönünden araştırmıştır. Çalışmasında merkaptosüksinik asit (MSA), 4-merkaptobenzoik asit (4-MBA) ve 4-merkaptofenilasetik asit (4-MPA) ile ilgili karakterizasyon çalışmaları yapmıştır (Hewas, 2013).

4-MBA ve 4-MPA'nın EIS ölçümleri, her iki molekülün de frekansta önemli bir artışa neden olduklarını göstermiştir. Alifatik tiyollere kıyasla aromatik yapılı kimyasal moleküller çıplak altın yüzeyine daha fazla kütle eklediğinden (Aromatik yapıdan kaynaklanan hacim ve ağırlıkla ilişkili durum) elektrot yüzeyinin daha yüksek (kalın) bir kaplamaya sahip olması ve elektrolit ortamına yüzeyin bloke olması gerekir. Fakat bu iki aromatik tiyolün CV ölçümü sonucu yüzeyin redoks ortamından engellenmediği görülmüştür. Alifatik bir tiyol olan MSA'a karşı aromatik tiyollerin CV'lerinde az bir farklılık saptanmıştır. Bu cevabın bir miktar düşüş göstermesinin nedeni aromatiklikten gelen çift bağıdır. Molekül içinde elektronlar çift bağlar üzerinden çözelti yığını aşır

altın elektrot yüzeyine geçebilirler. 4-MBA'nın 4-MPA'dan daha etkili olduğu konusunda bir yaklaşım vardır. Çünkü 4-MBA'da elektriksel yük, halkadan ve karboksilik gruba ulaşmak için dışarıdan dağıtılırken, 4-MPA'da rezonans hareketi benzen halkasının içinde kısıtlanmıştır yani elektriksel yük halka içinde kalıp elektrot yüzeyine geçememiştir (Şekil 2.18) (Hewas, 2013).



Şekil 2.19. 4-MPA'nın elektriksel yük karşısındaki rezonansı (Hewas, 2013).

Sonuç olarak Hewas, bu bilgilerin ışığında aromatik tiyollerin de SAM oluşumunda kullanılabileceklerini ortaya koymuştur (Hewas, 2013).

Son yıllarda aromatik tiyoller kullanılarak yapılmış çalışmalar incelendiğinde; Ponce ve ark., 2011 yılında O_2 'nin indirgenmesine yönelik bir metot geliştirmişlerdir. Au elektroda demir ftalosiyanın adsorbe ederek elektrotlar işlevselleştirildikten sonra 4-aminotiofenol (4-ATP) ve 1-(4-merkaptofenil)-2,6-difenil-4-(4-piridil)-piridinyum tetrafloroborat (MDPP) kullanılarak bu elektrotlarda SAM oluşturulmuştur. Au/4-ATP/FePc ve Au/MDPP/FePc elektrotları ile yapılan elektrokatalitik çalışmalar neticesinde O_2 'nin indirgenmesi sağlanmıştır (Ponce vd., 2011).

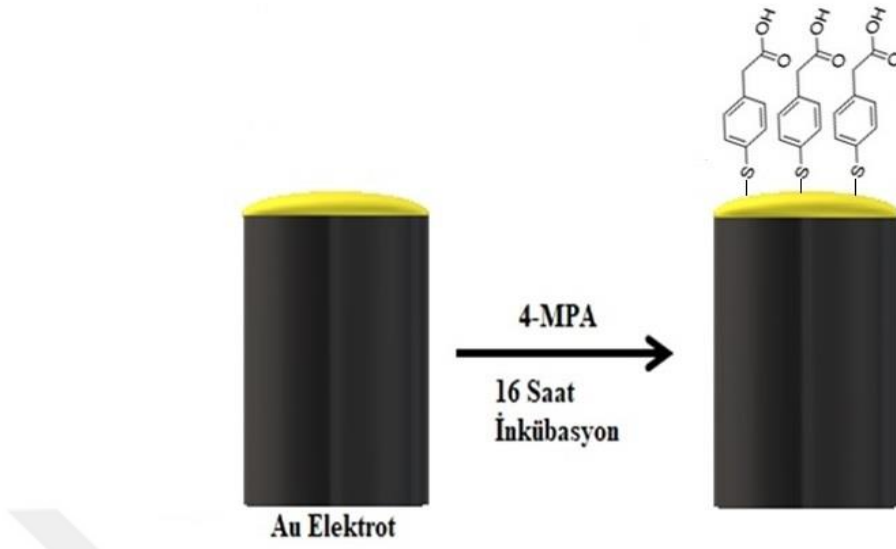
2013 yılında, Gandhi ve ark., 4-merkaptofenilasetik asit ile fonksiyonel hale getirdikleri Mn^{2+} katkılı ZnS nanopartikülleri (4-MPA-ZnS- Mn^{2+} NP'ler) standart bakır çözeltilerinde bakır iyonlarının saptanması için floresan prob olarak kullandıklarını bildirmişlerdir (Gandhi, Rohit, Kumar & Kailasa, 2013).

Medikal anlamda aromatik tiyollerin kullanımı ile ilgili çalışmalara değinilecek olursa, 2015 yılında Zhang ve ark., $Fe_3O_4^+Au$ nanopartiküller kullanılarak sentezledikleri tiyol aromatik aldehit (TAA) ve PAMAM ile birlikte bu NP'leri

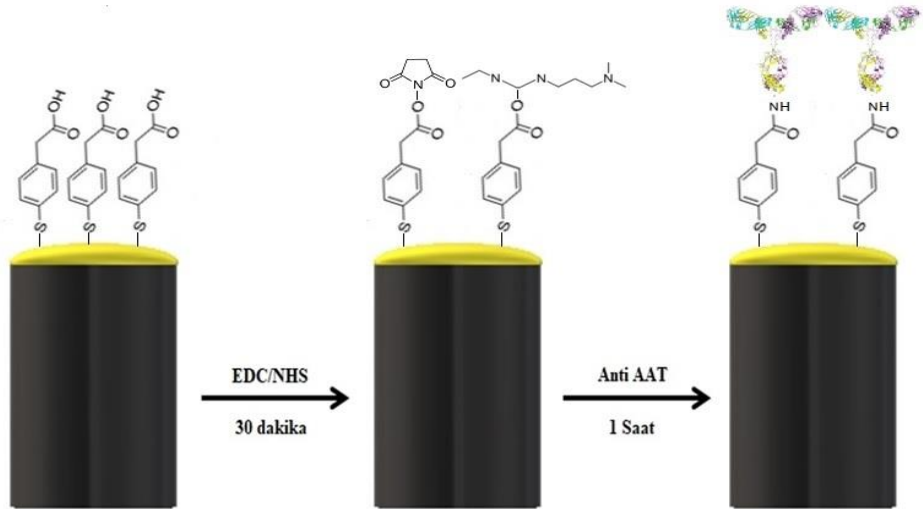
işlevselleştirerek elektrokimyasal temelli bir immünosensör geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri immünosensör 3 pg.ml^{-1} saptama sınırı ile $0,005\text{-}50 \text{ ng.ml}^{-1}$ aralığında IgG'nin tespiti için arzu edilen performansı sergilemiştir (Zhang, Shen, Shen & Zhang, 2015). 2017 yılında Miranda ve ark., p-merkaptobenzoik asit aracılığıyla altın yüzeye SAM oluşturarak tiyoaromatik DNA mono tabakaları yardımıyla çevresel patojenik bakterilerin tespiti için elektrokimyasal bir algılama sistemi geliştirmişlerdir (Miranda-Castro vd., 2017).

Biyosensörlerin geliştirilmesinde SAM'i oluşturacak kimyasalın seçimi kadar seçilen kimyasal molekülün aktivasyonu da önem taşır. Aktivasyon süreci yorucu ve zaman alıcı olabilir. Bu nedenle, immobilize edilen antikorların prosedürünü basitleştirmek için yeni SAM'lar bulmak gereklidir. Aromatik tiyoller bu konuda da umut vadelerler. 4-MPA ve TAA gibi tiyoller SAM oluşturduktan sonra çapraz bağlayıcılara gerek duymazlar (Zhang vd., 2015). Çapraz bağlayıcı ekstra bir kimyasal moleküle gerek duyulmaması, geliştirilen biyosensörün optimizasyonu, kolay uygulanabilirliği ve maliyeti konularında büyük avantaj sağlar. Hewas kendi çalışmasında 4-MBA'nın 4-MPA'dan daha etkin olduğunu savunmuş olsa da (Hewas, 2013) Gallagher ve arkadaşlarının RNA proteinlerinin segmental etiketlenmesi ile alakalı çalışması merak uyandırıcıdır. Gallagher, proteinlerin ligasyonu için 4-MPA kullanmış ve 4-MPA'nın tiyol değişim katalizörü olarak bu çalışmada anahtar eleman olduğunu belirtmiştir (Gallagher, Burlina, Offer & Ramos, 2017).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu tez kapsamında, elektrot yüzeyine uygulanacak SAM sistemi olarak hem tiyol grubu içeren hem de fenilasetik asit gibi fonksiyonel bir grup taşıyan 4-merkaptofenilasetik asit (4-MPA) seçilmiştir ve SAM oluşturulmuştur. Daha sonra bu SAM tabakası 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDC)/N-Hidroksisüksinimit (NHS) karşımı eklenerek 4-MPA'nın dışarı bakan $-\text{COOH}$ grupları aminlenip aktifleştirilmiştir. Son olarak ise Anti-A1AT antikoruna aktifleşmiş bu kol üzerine eklenerek Şekil 2.20a ve Şekil 2.20b'de gösterildiği gibi A1AT biyosensörün dizaynı yapılmıştır.

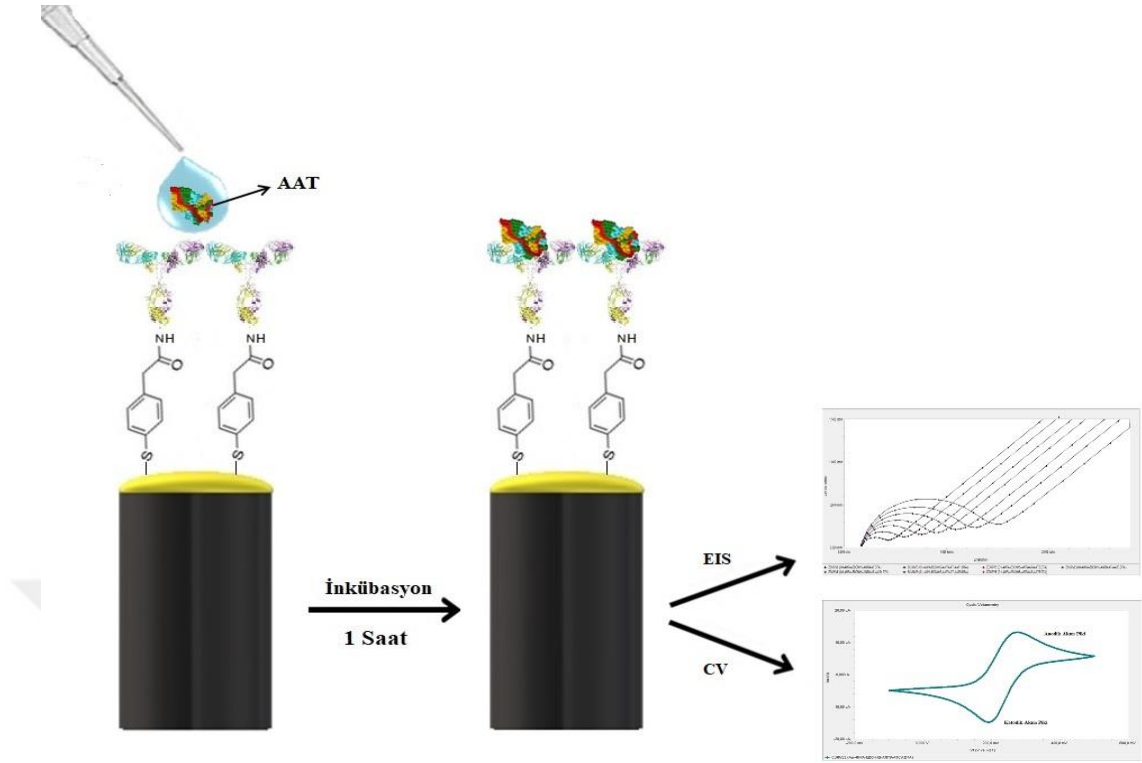


Şekil 2.20a. A1AT analizine yönelik bu tez kapsamında geliştirilen biyosensör için SAM'in oluşturulması



Şekil 2.20b. A1AT biyosensörü için SAM oluşumundan sonra ki aşamaların şematik gösterimi

İmmobilizasyon aşamaları gerçekleştirilip biyosensör sisteminin tasarımı yapıldıktan sonra elektrot yüzeyine, fosfat tamponuyla porsiyonlanmış A1AT protein çözeltisi eklenerek biyosensör cevapları EIS ve CV ölçümleri olarak alınmıştır (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. A1AT proteininin Anti-A1AT antikoruna bağlanması

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez kapsamında A1AT analizine yönelik impedimetrik temelli elektrokimyasal bir biyosensör yöntemi geliştirilmiştir. Üçlü elektrot sistemi için gerekli olan elektrotlar BASi, Warwickshire, UK firmasından sağlanmıştır. Çalışma elektrodu olarak 2.01mm² yüzey alanına sahip Au elektrot seçilmiştir. Karşıt elektrot olarak 10 cm uzunluğunda Pt tel kullanılmıştır. Referans elektrot olarak KCl ile doygunlaştırılmış 3M Ag/AgCl elektrodu kullanılmıştır.

Geliştirilen biyosensör metodunun ölçüm sistemi olarak; elektrokimyasal temelli impedans ölçümü yapabilen FRA modüllü potanstiyostat/galvanostat cihazı (Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 Gamry Instruments Warminster, USA) kullanılmıştır. Cihaz; siklik voltametri (CV) ile elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yazılımı içeren Echem Analyst programı yüklü bir bilgisayara bağlıdır.

Deneylerde kullanılan çözeltileri hazırlamak için ise hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland), çeşitli hacimlere sahip mikro pipetler (20 µL, 200 µL, 1000 µL Eppendorff), sıcaklık kontrollü ultrasonikatör (Wise Clean

Daihan, Kore), manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer MSH 300) ve pH metre (6173 pH, made in China for USA) kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Oluşturulan biyosensörün biyolojik bileşeni olan A1AT antikor proteini ve analit A1AT proteini Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Antikorum Au elektrot yüzeyine immobilizasyonundan önce elektrot yüzeyinde SAM tabakası oluşturmak için 4-merkaptofenil asetik asit (4-MPA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDC), N-hidroksisüksinimit (NHS) kullanılmıştır. Bunlara ek olarak, elektrotların bulunduğu ölçüm sistemindeki çözelti ortamı için potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat ve KCl kullanılmıştır. Tüm bu kimyasallar Sigma-Aldrich Co. LLC (USA) firmasından temin edilmiştir. Elektrot temizliği işlemlerinde ise etanol (Absolute %99.9 Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)) ve Alüminyum oksit kullanılmıştır.

A1AT ve Anti-A1AT proteinleri çalışmada kullanılacak konsantrasyonlara seyreltilerek porsiyonlara ayrılmıştır. Seyreltme işlemlerinde fosfat tamponu ve yapay serum çözeltisi kullanılmış olup yapay serum Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)'den temin edilmiştir. Fosfat tamponu için ise Merck KGaA (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiş olan sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) ve dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) kullanılmıştır. A1AT ve Anti-A1AT porsiyonları deneyde kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

İmmobilizasyon basamaklarında kullanılan tüm çözeltiler taze hazırlanmış ve günlük olarak kullanılmıştır.

3.1.3 Deney Esnasında Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM pH:7.0 Fosfat tamponu: İlk olarak 3.549 g Na_2HPO_4 tartılarak saf su ile 500 ml'ye tamamlanır. Sonra 3.4015 g KH_2PO_4 tartılarak saf su ile 500 ml'ye tamamlanır. Bu iki çözelti pH:7.0 (± 0.01) olacak şekilde karıştırılarak tampon hazırlanır.

Ölçümlerde Kullanılan Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanışı;

5.0 mM K₃[Fe(CN)₆]: 0.8231 g K₃[Fe(CN)₆] tartılarak 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile 500 ml'ye tamamlanır.

5.0 mM K₄[Fe(CN)₆]: 1.0560 g K₄[Fe(CN)₆] tartılarak 50 mM pH:7.0 fosfat tamponuyla 500 ml'ye tamamlanır.

0.1 M KCl: 3.72 g KCl tartılarak önceden hazırlanmış 500 mL 5.0 mM K_{3,4}[Fe(CN)₆] çözeltisinde çözülür.

EDC/NHS Çözeltisinin Hazırlanışı;

0.2 M EDC: 5.94 mg EDC tartılır ve 100 µl 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu içerisinde pipetleme yapılarak çözündürülür.

0.05 M NHS: 2.88 mg NHS tartılır ve 500 µl 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu içerisinde pipetleme yapılarak çözündürülür. EDC/NHS çözelti karışımı bu iki çözeltinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanır.

5 mM 4-MPA: 4.205 mg 4-MPA tartılır ve 5 ml %99'luk etanol içinde çözülerek hazırlanır.

3.2. Metodlar

3.2.1. Elektrot Temizliği

Elektrot temizliği altın elektrot yüzeyine dış ortamdan gelen safsızlıkları gidermek üzere yapılan gerekli ve önemli bir adımdır. Temizlik mekanik ve kimyasal olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilir. Elektrodun mekanik temizliği için; bir miktar Alüminyum oksit kadife bir keçe üzerine alınır. Üzerine bir iki damla ultra saf su eklenerek macun kıvamına getirilir. Elektrodun altın yüzeyi macun kıvamına getirilmiş alüminyum oksit üzerinde hafif hareketlerle gezdirilerek mekanik temizlik tamamlanır.

Elektrot yüzeyinde kalan alüminyum oksit partikülleri saf su ile yıkanarak giderildikten sonra içinde saf su bulunan bir behere konulur ve ultrasonikatörde 10 dk

muamele edilerek giderilemeyen adsorplanmış safsızlıkların temizlenmesi sağlanır. Ardından elektrodun altın yüzeyi etanol ile yıkanır ve içinde etanol bulunan bir behere alınır. Beher ultrasonikatörde 10 dk muamele edilerek elektrodun organik safsızlıklardan da arınması sağlanır. Tüm bu işlemlerden geçirilmiş elektrodun EIS ölçümleri alınarak ne kadar temizlendiği kontrol edilir. Elektrot temizlenmiş ise argon gazı ile kurutularak SAM oluşturmak üzere hazır duruma getirilir.

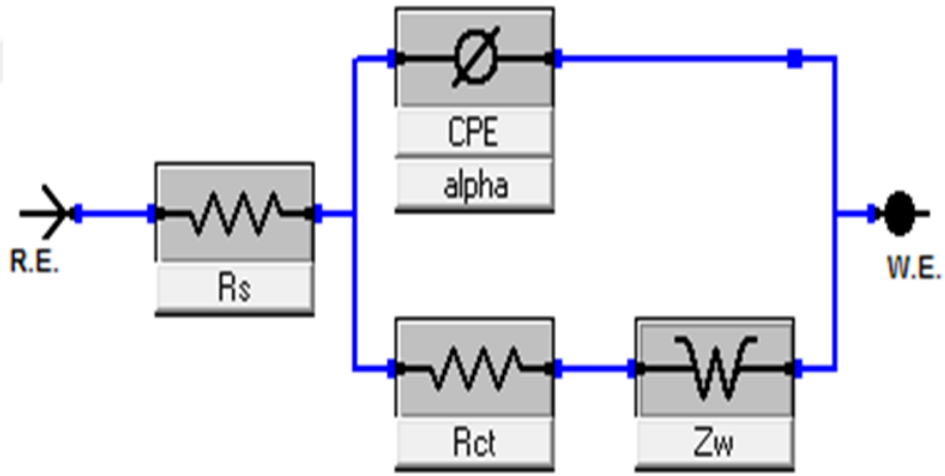
3.2.2. Geliştirilen Biyosensörün Çalışma Prensipleri

Bu tez kapsamında A1AT biyosensörü tasarlariken uygulanan bütün immobilizasyon adımlarının (4-MPA ile SAM oluşturma + EDC/NHS ile 4-MPA'nın karboksilli asit grubunun aktive edilmesi + anti-A1AT proteininin bu karboksilli asit karbonil karbonuna kovalent olarak bağlanması) sonrasında elektrot yüzeyindeki değişimler siklik voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri yapılarak takip edildi. Her iki ölçümde de analizler redoks probu olarak görev yapan 5.0 mM $K_3/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1 karışımı) çözeltisiyle hazırlanan 0.1 M'lık KCl çözeltisi içerisinde yürütüldü. CV için ölçüm potansiyeli 0.5 ile -0.1 V arasında, adım büyüklüğü 1 mV, tarama hızı 50 mV/s olarak belirlendi. EIS ölçümleri için ise alternatif akım 5 mV olacak şekilde ayarlandı. İmpedans spektrumları ise her ölçüm için 50.000-0.05 Hz aralığında alındı.

Tavşandan izole Anti-A1AT antikorunun çalışma elektrodu yüzeyine immobilizasyonu sağlandıktan sonra A1AT protein çözeltisi (100 ng/μl) mikropipet yardımıyla elektrot yüzeyine tatbik edildi ve A1AT proteininin spesifik antikoruna bağlanması için bu işlemten sonra izole bir ortamda bir saat bekletildi. Bir saatin sonunda ise altın elektrot yüzeyinde bağlanmadan kalan fazla A1AT proteinlerini uzaklaştırmak için elektrot saf su ile yıkandı. Yıkamadan sonra elektrot, ölçüm için $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücreye konarak EIS ve CV ölçümleri yapıldı. Ölçümü tamamlanan elektrot hücreden alınarak tekrar saf su ile yıkandı ve argon gazıyla kurutuldu. Bu işlemler elektrot yüzeyine her A1AT çözeltisi eklendiğinde ve bunu takiben EIS ve CV ölçümü yapıldığında uygulandı.

3.2.3. Hesaplama Prosedürü

A1AT biyosensörü hazırlanırken immobilizasyon prosedürünün her aşamasının kontrolü ve sonrasında A1AT miktar tayini için elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi kullanıldı. İmpedans; verilen alternatif akıma karşı, çalışma elektrodunda oluşan direnç olarak tanımlanır. Tez kapsamında Gamry Potentiostat/Galvanostat cihazı ve Gamry Analyst® yazılımı aracılığıyla bu değer ölçüldü. Direnç Nyquist eğrisi şeklinde ölçüm sisteminden elde edildi. Bu Nyquist eğrilerinin anlamlı bir ifadeye çevrilmesi için ise eş değer devre modeli kullanıldı. Eş değer devre modeli sayesinde eğriler, cihaz tarafından anlamlı sayısal verilere çevrildi. Elde edilen sayısal verilerin “yük transfer direnci (R_{ct})” olarak ifade edildi. R_{ct} yaklaşık olarak Nyquist eğrisinin çap değerine karşılık gelen elektrot yüzey alanıdır. Elektrot yüzeyindeki madde miktarı ne kadar artarsa R_{ct} değerinin de buna bağlı olarak arttığı yani madde miktarı ile R_{ct} arasında doğru orantı olduğu bildirilmektedir (Uygun & Sezgintürk, 2011).

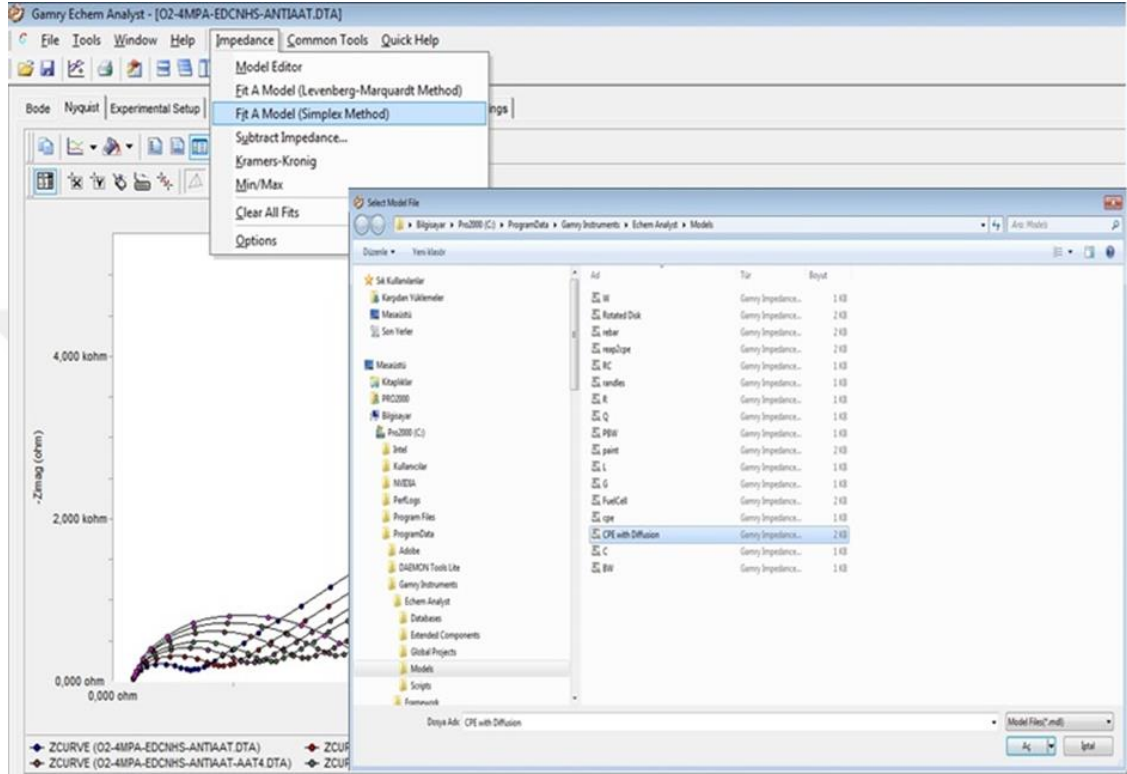


Şekil 3.1. Gamry Analyst yazılımından yararlanarak oluşturulan eş-değer devre modeli

Bu devre örneği Şekil 3.1’de görülmekte olup; bu devrede, çözelti direnci R_s kısaltması ile Warburg impedansı Z_w ile sabit faz elemanı kapasitansı CPE-alpha ile yük transfer direnci ise R_{ct} ile ifade edilmiştir.

3.2.3.1. Yük Transfer Direncinin Hesaplanması

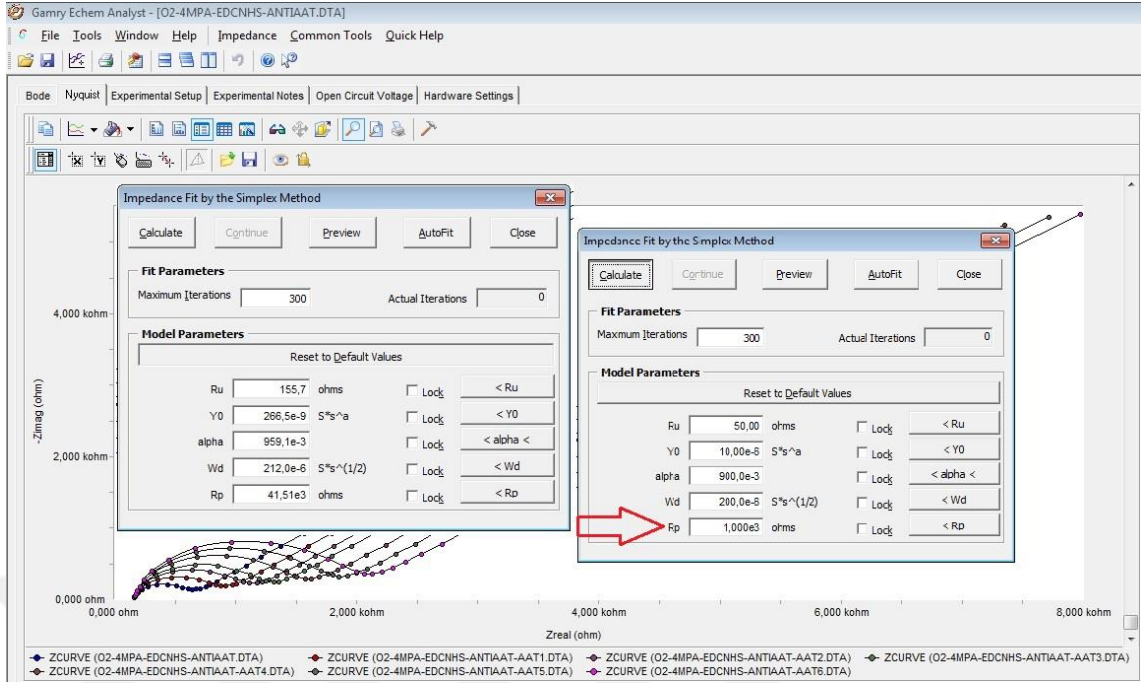
Rct değeri hesaplanacak olan Nyquist diyagramı Gamry Analyst® yazılımında açılır ve üst menüdeki Impedance sekmesinden ‘Fit A Model (Simplex Method)’ seçilir. Açılan pencereden ‘CPE with Diffusion’ sekmesine tıklanır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. CPE With Diffusion ve hesaplama için kullanılabilir diğer devre modelleri

“CPE with diffusion” sekmesine tıklandıktan sonra açılan pencere Rct değerinin hesaplanacağı penceredir. Hesaplamaya geçmeden önce ilk olarak “Reset to Default Values” ibaresine tıklanarak hesaplama ekranı sıfırlanır. Rp yazan kısım sıfırlandığı zaman, önceden seçilmiş olan Nyquist eğrisinin Rct’si hesaplanabilir. Bunun için yine aynı pencerede sol üst köşede bulunan “Calculate” ibaresine tıklanarak eğrinin Rct değerine denk gelen Rp değeri hesaplanır (Şekil 3.3).

Bu işlem sonucunda alınan Rp değerleri, her bir EIS ölçümü sonunda elde edilen Nyquist eğrileri için ayrı ayrı hesaplanıp kaydedildi. Elektrot yüzeyine bağlanmış analit madde miktarı ile Rp-Rct arasında doğru orantı olduğu bilindiğinden (Uygun & Sezgintürk, 2011) elde edilen bu Rp değerleri tüm kantitatif amaçlı yapılan tayinlerde kullanıldı.



Şekil 3.3. Gamry Analyst® yazılımının hesaplama ekranı

3.2.4. Alfa-1 Antitripsin Analizine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı

Au elektrot yüzeyinde biyosensör tasarımını gerçekleştirebilmek için elektrot öncelikle Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi temizlendi. Temizlenmiş Au elektrodun yüzeyinde SAM oluşturabilmek amacıyla % 99.9’luk etanol içerisinde hazırlanmış olan 5 mM 4-MPA çözeltisine elektrot daldırıldı ve 16 saat bekletilerek inkübe edildi. 16 saatin sonunda elektrot, çözelti ortamından alınarak etanol ve saf suyla yıkandı. EIS ölçümleri yapılarak SAM’in oluştuğu belirlendikten sonra 4-MPA moleküllerinin karboksilli asit uçlarını aktiflemek üzere 0.2M/0.05M EDC/NHS (1:1) çözelti karışımından 10µL alınıp elektrot üzerine tatbik edildi ve 30 dk bekletildi. Biyosensörün biyoreseptör kısmını oluşturan anti-A1AT antikoru, stok çözeltisinden 5µL’lik porsiyonlar halinde alınıp elektrot yüzeyine eklenerek karanlık ve izole bir ortamda 1 saat bekletildi. Sürenin sonunda EIS ve CV ölçümleri yapılarak biyosenör yapımı tamamlandı. A1AT analizi yapmak üzere; elektrot yüzeyine A1AT protein çözeltisinden 5 µL damlatılarak 1 saat bekletilip sonrasında EIS ve CV ölçümleri yapıldı.

3.2.5. A1AT Analizine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

Biyosensör cevabının yükseltilmesi ve hassasiyetinin arttırılabilmesi için biyosensör tasarımında kullanılan tüm kimyasal maddelerin optimum miktarlarının belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle öncelikle A1AT biyosensörünün hazırlığında kullanılan tüm kimyasalların değişen konsantrasyonlarında biyosensörler hazırlandı ve A1AT analizi için biyosensör cevapları ölçüldü.

3.2.5.1. 4-MPA Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Altın elektrot yüzeyinde mutlak dayanıklı, etkin bir SAM oluşturabilmek için çeşitli konsantrasyonlarda 4-MPA çözeltileri %99.9'luk etanolde hazırlandı. Bunun için **1 mM, 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM**'lık 4-MPA çözeltileri hazırlandı. SAM oluşturmak üzere, hazırlanmış bu çözeltiler içine elektrot daldırılarak oda koşullarında 16 saat inkübe edildi. Sonrasında biyosensör tasarımında kullanılan diğer kimyasal bileşenlerin konsantrasyonları sabit tutularak biyosensör inşası tamamlandı ve analit molekül A1AT'nin farklı konsantrasyonları için EIS ve CV ölçümleri yapılarak biyosensör cevapları belirlendi.

SAM'i oluşturan çözeltinin optimizasyonu yapılırken etkin bir sonuç elde edebilmek için denemelerde sabit tutulan konsantrasyonlar; EDC/NHS (0.2 M/0.05 M), Anti-A1AT (100 ng/ μ L) ve A1AT (100 ng/ μ L)'dir.

3.2.5.2. EDC/NHS Karışımının Optimizasyonu

İmmobilizasyon basamağının ikinci aşaması, altın yüzeye bağlanmış 4-MPA'nin aktivasyonudur. SAM'in dışa dönük yüzeylerinde 4-MPA'dan gelen -COOH gruplarını aktifleştirmek için EDC/NHS karışımı kullanılmıştır. Aktivasyonun sağlanması için gerekli EDC/NHS miktarını belirlemek adına EDC ve NHS çözeltileri arasındaki stokiyometri korunarak **(1M/0.25 M), (2 M/0.5 M), (0.2 M/0.05 M), (0.02 M/0.005 M)** konsantrasyonlarında EDC/NHS çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerle biyosensörler geliştirilmiştir.

EDC/NHS karışımının optimizasyonu yapılırken etkin bir sonuç elde edebilmek için denemelerde diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler; 4-MPA (5mM), Anti-A1AT (100 ng/μL) ve A1AT (100 ng/μL)'dir.

3.2.5.3. Anti-A1AT Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Anti-A1AT antikoru, analiz edilmesi ön görülen A1AT proteinini kimyasal olarak tanıyıp spesifik olarak bağlayacak olan biyoreseptör moleküldür. Anti-A1AT molekülü bu tez kapsamında geliştirilen biyosensörün biyokomponent kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle hem geliştirilen biyosensör koluna bağlanabilmesi hem de A1AT proteinini en iyi şekilde algılayabilmesi için konsantrasyonunun optimize edilmesi gereklidir.

Anti-A1AT konsantrasyonunun optimizasyon çalışmasında; **100 ng/μL, 200 ng/μL, 500 ng/μL ve 1000 ng/μL** konsantrasyonlarına sahip Anti-A1AT çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerle biyosensörler dizayn edilmiştir. Optimum anti-A1AT miktarını tayin edebilmek için denemelerde diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu parametreler; 4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/0.05 M) ve A1AT (100 ng/μL)'dir.

3.2.6. A1AT Analizine Yönelik Geliştirilen Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu

Karakterizasyon, geliştirilen biyosensörün ideal bir biyosensör olup olmadığı konusunda bilgi verir. Oluşturulan sensörün tekrarlanabilirlik, seçicilik, tayin sınırı, stabilite ve duyarlılık gibi çok çeşitli parametrelerde değerlendirilmesi gereklidir.

3.2.6.1. Doğrusal Tayin Aralığı

Bölüm 3.2.5'te belirtilen optimizasyon çalışmaları sonucunda edinilen optimum değerler 4-MPA konsantrasyonu 5 mM, EDC/NHS konsantrasyonu 0.2 M/0.05 M, Anti-A1AT konsantrasyonu 200 ng/μL olup, bu koşullarda hazırlanmış biyosensörler ile A1AT proteini için (100-600 ng/μL) doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

3.2.6.2. Tekrar Üretilirlik

Optimize edilmiş koşullar kullanılarak (5 mM 4-MPA, 0.2M/0.05M EDC/NHS, 200 ng/μL Anti-A1AT) çok sayıda biyosensör yapılmış ve A1AT'nin doğrusal tayin aralığında biyosensör cevapları ölçülmüştür. Çok sayıda ve farklı günlerde hazırlanan bu biyosensörlerin cevapları karşılaştırılarak A1AT biyosensörünün tekrar üretilebilirlik başarısı denenmiştir.

3.2.6.3. Yapay Serum Uygulamaları

A1AT biyosensörünün kullanım amacı kan serumu, idrar vb. vücut sıvılarında bu molekülün analizini yapmaktır. Bu nedenle Anti-A1AT ve A1AT moleküllerinin etkileşimine dayalı biyosensör cevapları üzerine serum içerisindeki protein, tuz ve diğer biyolojik bileşenlerin etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere yapay serumda A1AT çözeltileri hazırlandı. Serumdan gelen başka moleküllerin reseptör-analit etkileşimine girişim yapması, alınacak cevabı da etkilemesi istenmez.

Serum bileşenlerinin geliştirilmiş olan A1AT biyosensörü üzerindeki etkisini belirlemek için; yapay serum kullanılarak seyreltilmiş A1AT çözeltileri immobilize edilmiş kol üzerine tatbik edilerek biyosensör cevapları alındı.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

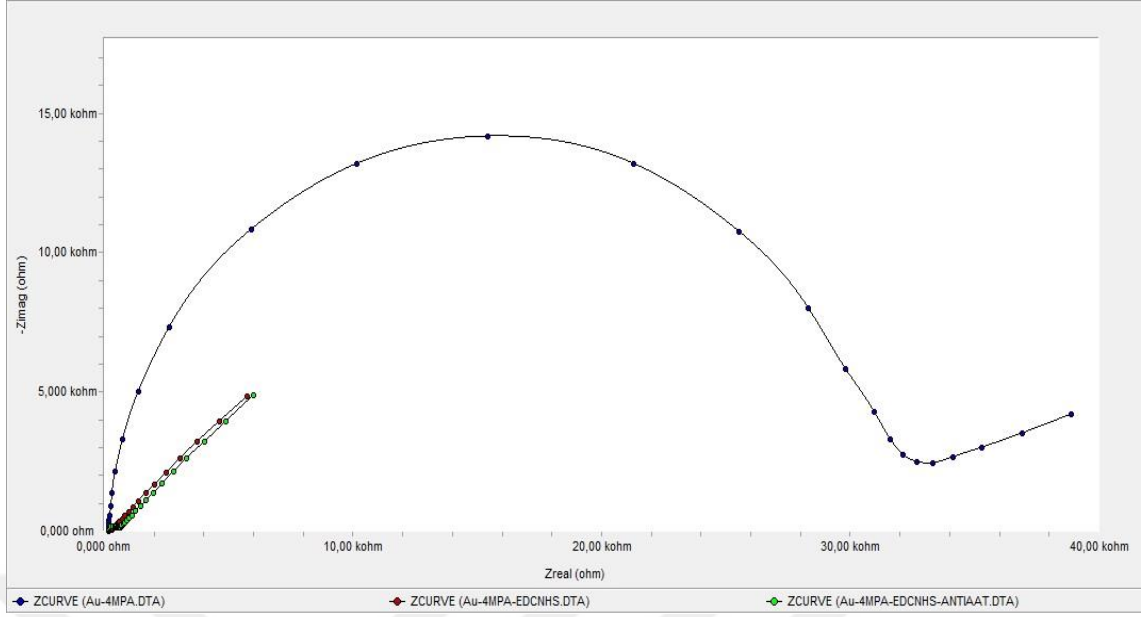
4.1. A1AT Biyosensörüyle Elde Edilmiş Bulgular

4.1.1. A1AT Biyosensörünün Oluşturulması Aşamalarına İlişkin Bulgular

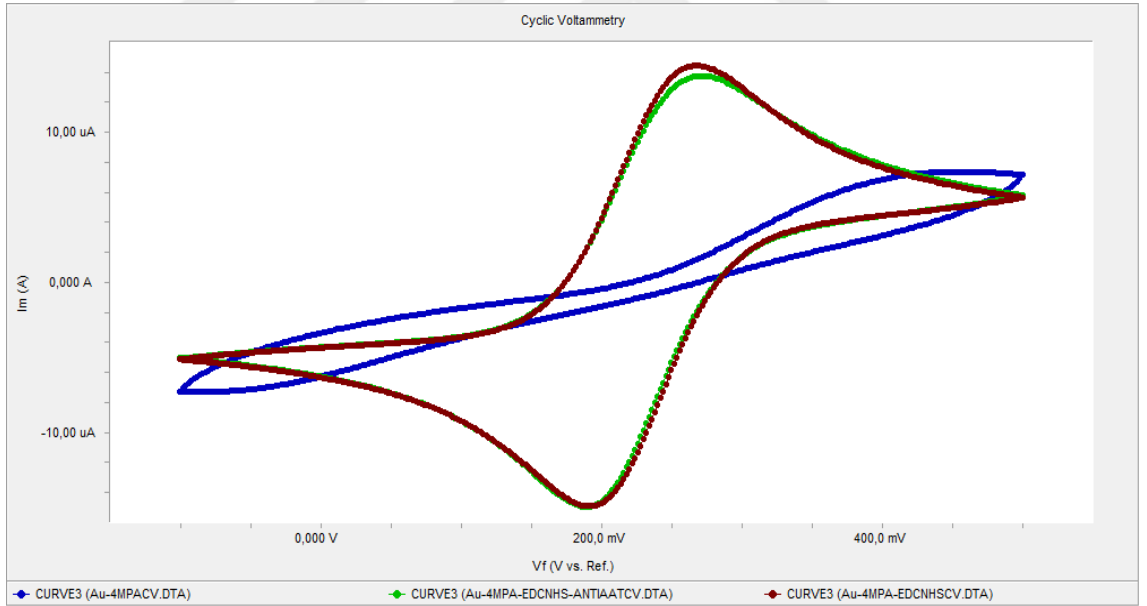
A1AT biyosensörünün her bir immobilizasyon basamağından sonra altın elektrot yüzeyinde meydana gelen değişimler CV ve EIS ölçümleri ile belirlendi, elde edilen CV ve EIS'ler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir.

1. Temizlenmiş ve hiçbir bağlanmanın olmadığı elektrot: Au-Bare elektrot
2. 4-MPA ile SAM oluşturulan fonksiyonellik kazanmış altın yüzeyi: Au-4MPA
3. EDC/NHS ile aktive edilmiş altın elektrot yüzeyi: Au-4MPA-EDCNHS
4. Antikor bağlanmasından sonra elektrot yüzeyi: Au-4MPA-EDCNHS-ANTIAAT

Şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.1. A1AT biyosensörünün yapımı için uygulanan immobilizasyon aşamalarının impedans spektrumları



Şekil 4.2. A1AT biyosensörünün yapımı için uygulanan immobilizasyon aşamalarının siklik voltamogramları

İmmobilizasyon aşamalarının her bir adımında elde edilen Nyquist eğrilerinin Rct değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. A1AT biyosensörünün yapımı için uygulanan tüm immobilizasyon adımları ve her aşamada hesaplanmış Rct değerleri

Elektrot yüzeyi	Rct (ohms Ω)
Au-Bare	162.9
Au-4MPA	31000
Au-4MPA-EDCNHS	126.4
Au-4MPA-EDCNHS-ANTIAAT	399.5

İmmobilizasyon işlemi sırasında alınan impedans spektrumları ve bu spektrumların hesaplanan Rct değerleri göz önüne alındığında, elektrodun Bare ölçümünden sonra 4-MPA ile SAM oluşturma adımının biyosensör cevabını arttırdığı açıkça görülmektedir. Bunun sebebi altın yüzey üzerinde 4-MPA'nin tiyol grupları aracılığıyla altın elektroda bağlanmasıdır. 4-MPA yapısında bulunan aromatik halka nedeniyle hacimli bir moleküldür. Bu nedenle bağlanma sırasında altın yüzey üzerinde birikerek redoks ortamında bulunan elektronların yüzey üzerine geçişini engelleyen bir bariyer görevi görür. Yani özetle elektrot yüzeyinin akıma karşı direnci artar. 4-MPA'nın yapısından kaynaklanan rezonans nedeniyle çok düşük bir miktar elektron yüzeye ulaşabilse de, EIS ölçümlerinden görüldüğü üzere SAM tabakası direnci tatmin edici düzeyde arttırmıştır. 4-MPA'nın direnci büyük miktarda arttırması CV ölçümlerinde karakteristik piklerin belirsiz olmasına ya da anodik ve katodik akım piklerinin kaybolmasına neden olmuştur.

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere; 4-MPA'da bulunan karboksil gruplarını aktive etmek için kullanılan EDC/NHS karışımı elektrot yüzeyinin Rct değerini düşürmüştür. Bunun nedeni, karboksil grubunun aktivasyonu sırasında oluşan ara ürünün pozitif yüklü olmasıdır. Bu pozitif yüklü ara ürün redoks probunu elektrot yüzeyine doğru çeker. Bunun sonucunda ise yüzeye gelen redoks probu dönüşüme uğrar. Elektrot yüzeyine daha fazla yükün ulaşması iletkenliği arttırarak direnci düşürür, dolayısıyla Rct değeri de düşer. Ayrıca daha fazla elektrolitin dönüşüme uğraması ölçülen akımın artmasına sebep olacağından döngüsel voltamogramlarda redoks probuna ait karakteristik indirgenme ve yükseltgenme pikleri gözlenmeye başlar.

Anti-A1AT proteinin eklenmesi ile de Rct değerinde bir artış olduğu görülmektedir. Artış anti-A1AT molekülünün iletken olmamasından kaynaklanır. Protein yapılı anti-A1AT molekülü immobilizasyonda kullanılan diğer kimyasal maddelere göre daha yüksek molekül ağırlığına sahip olduğundan, ölçüm sisteminde bulunan ferrisiyanatlar elektrot yüzeyine difüze olamaz. Bu durum elektrot yüzeyindeki direnci arttırarak Rct değerini arttırır. Sonuç olarak; EIS spektrumları için Rct değerinde bir artış, döngüsel voltamogramlarda ise pik yüksekliği değerinde belirli bir azalma gözlenmiştir.

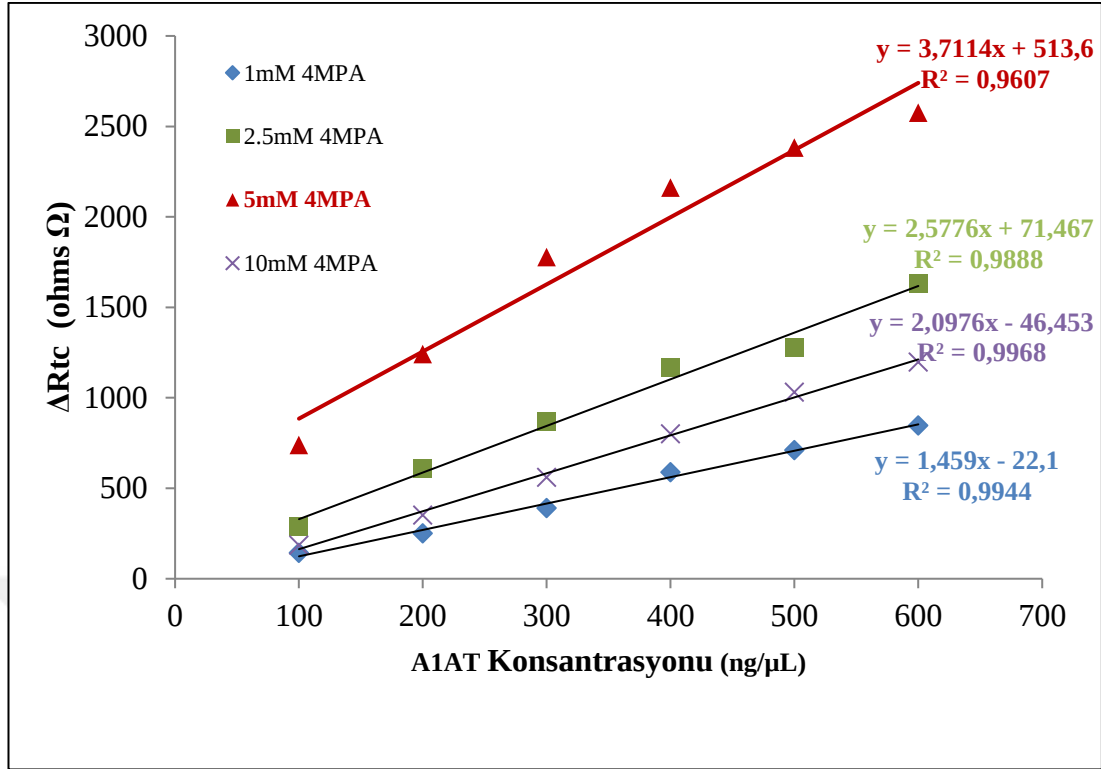
Anti-A1AT immobilizasyonu ile A1AT biyosensörünün yapımı tamamlanmıştır. Sonrasında analizlere geçilmiştir. Bu amaçla biyosensör yüzeyine A1AT proteinini çözeltisi ilave edilerek biyosensör ölçümleri yapılmıştır. Altın elektrot yüzeyine eklenen A1AT protein çözeltileri de tıpkı Anti-A1AT molekülü gibi elektronların yüzeye ulaşmalarını engelleyerek direnci arttırmış ve Rct değerinde belli bir artışa neden olmuştur.

SAM tabakasının taşıma kapasitesi göz önünde bulundurularak elektrot yüzeyine A1AT protein çözeltisi eklendiğinde alınan EIS ölçümleri ve Rct değerlerinin arttığı görülmüştür. Ayrıca her A1AT çözeltisi ilavesi sonrasında alınan siklik voltamogramlarda ise pik yüksekliğinin azaldığı gözlenmiştir.

4.1.2. A1AT Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.2.1. 4-MPA Konsantrasyonun Biyosensör Cevabına Etkisi

4-Merkaptofenilasetik asit ile hazırlanmış 1 mM, 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM'lık konsantrasyonlara sahip çözeltiler altın elektrotlar yüzeyine immobilize edilerek SAM oluşturulmuştur. Bu SAM'ler üzerinden geliştirilen A1AT biyosensörlerinin Nyquist eğrilerinden (EIS) hesaplanan Rct değerleri ile A1AT konsantrasyonu arasında oluşturulmuş kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Her bir biyosensör için çizilen standart grafiklerinin doğru denklemleri ile doğrusallık katsayıları (R^2) ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Biyosensör cevabına 4-MPA konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.2. 4-MPA konsantrasyonunun optimizasyonundan elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

4-MPA Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R ²)	Doğru Denklemi
1.0 mM	0.9944	$y=1.4590x - 22.1$
2.5 mM	0.9888	$y=2.5776x + 71.647$
5.0 mM	0.9607	$y=3.7114x + 513.6$
10 mM	0.9968	$y=2.0976x - 46.453$

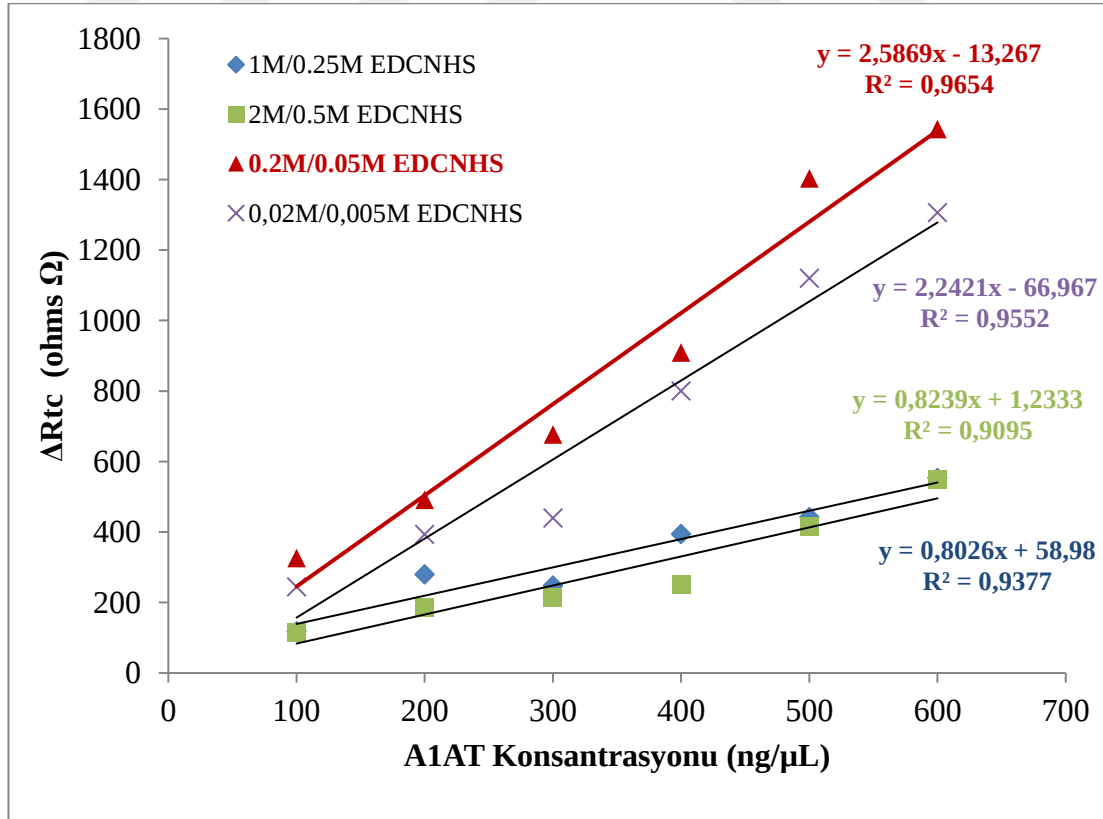
5 mM'lık 4-MPA ile oluşturulan SAM üzerinden dizayn edilen biyosensörün cevabı diğer konsantrasyonlarda hazırlanan biyosensörlere göre daha yüksek olduğu için optimum 4-MPA konsantrasyonu **5 mM** olarak seçilmiştir (Şekil. 4.3). 5 mM'dan daha düşük konsantrasyonlarda grafiklerin doğrusallık katsayıları daha yüksek olmasına rağmen yüksek biyosensör cevabı nedeniyle bundan sonraki çalışmalarda SAM 5 mM 4-MPA kullanılarak hazırlanmıştır. Çünkü SAM'in oluşumunu takiben yapılan biyosensörün bağlanmalara karşı dayanıklı olması gereklidir. Düşük konsantrasyonlarda

hazırlanan SAM'lerde 4-MPA molekülünün dizilimi seyrek ve aralıklı olabileceği için düzenlenen SAM'ler daha az dayanıklı olabilir.

Alifatik tiyollerin kullanıldığı çalışmalarda SAM konsantrasyonunun artması cevabı da arttırır. Mantıken 4-MPA içinde konsantrasyon arttıkça cevabında artacağı yönünde bir yaklaşım düşünülse de, 4-MPA'nın aşırı altın yüzeyinin maruz kaldığı kimyasal miktarını arttırarak SAM oluşumunu olumsuz yönde etkiler. 4-MPA'nın aromatik yapılı ve hacimli olması nedeniyle bu fazlalık daha düzensiz ve dayanıksız SAM'ler üretebilir, bu da cevabı düşürecektir.

4.1.2.2. EDC/NHS Konsantrasyonunun Biyosensör Cevabına Etkisi

EDC/NHS karışımının 0.02 M/0.005 M, 0.2 M/0.05M, 2.0 M/0.5 M ve 1 M/2.5 M olacak şekilde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle SAM tabakasını oluşturan 4-MPA'ların karboksilli asit uçları aktiveleştirilmiştir. Bu yolla hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ile A1AT konsantrasyonu arasında oluşturulmuş kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Çizilen doğruların ise doğrusallık katsayıları (R^2) ile doğru denklemleri de Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Biyosensör cevabına EDC/NHS karışımı konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.3. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu çalışmasından elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

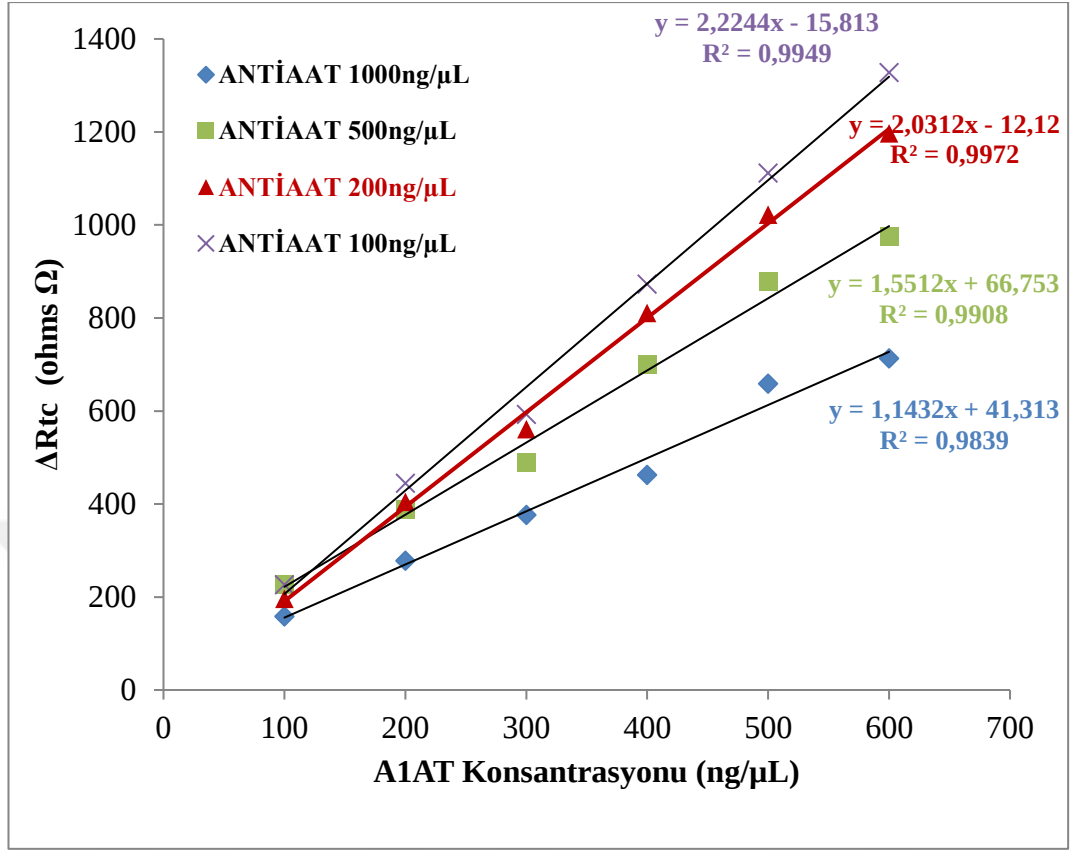
EDC/NHS Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
1 M/2.5 M	0.9377	$y = 0.8026x + 58.98$
2.0 M/0.5 M	0.9095	$y = 0.8239x + 1.2333$
0.2 M/0.05 M	0.9654	$y = 2.5869x - 13.267$
0.02 M/0.005 M	0.9552	$y = 2.2421x - 66.967$

Yüksek konsantrasyonlarda EDC/NHS karışımı kullanılmasıyla elektrot yüzeyine daha fazla Anti-A1AT molekülü bağlanması beklenir. Ancak oluşturulan SAM'in dayanıklılığı da göz önüne alınmalıdır. SAM tabakasının taşıma kapasitesini aşacak miktarda Anti-A1AT molekülü bağlanması, oluşturulan kimyasal köprünün dağılmasına neden olabilir. 2 M/0.5 M ve 1 M/0.25 M EDC/NHS içeren biyosensörlerle yapılan ölçümler sonucu alınan cevapların düşük ve lineerlikten uzak olması bu nedenle olabilir. Ayrıca bu yüksek konsantrasyonlu karışımların hazırlanması ve elektrot yüzeyine tatbiki de oldukça zordur. Her iki çözeltide de 30 dk bekleme sonunda elektrot yüzeyinde yapışmalar görülmüştür. EDC/NHS'nin fazlasını uzaklaştırmak için daha şiddetli ve uzun süre saf su ile yıkamak gerekmektedir. Bu yıkamalar SAM tabakasına zarar verebileceğinden bu iki yüksek konsantrasyon seçilmemiştir.

Cevapların yüksekliğine bakıldığında 0.02M/0.005M EDC/NHS konsantrasyonu yeterli bulunmamıştır. Ayrıca SAM'in taşıma kabiliyetine zarar vermeden maksimum yüklenebilecek Anti-A1AT antikorun bağlanması istendiğinden optimum EDC/NHS konsantrasyonu **0.2 M/0.05 M** olarak belirlenmiştir.

4.1.2.3. Anti-A1AT Konsantrasyonun Biyosensör Cevabına Etkisi

Daha önce belirlenen optimum 4-MPA ve EDC/NHS konsantrasyonlarında 100ng/ μ L, 200 ng/ μ L, 500 ng/ μ L ve 1000 ng/ μ L'lik konsantrasyonlara sahip Anti-A1AT porsiyonları kullanılarak biyosensörler yapıldı. Hazırlanan bu biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ile A1AT konsantrasyonu arasında oluşturulan kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Çizilen doğruların ise doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Biyosensör cevabına Anti-A1AT konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.4. Anti-A1AT konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

Anti-A1AT Konsantrasyonu	Doğrusallık Katsayısı (R ²)	Doğru Denklemi
1000ng/μL	0.9839	$y = 1.1432x + 41.313$
500ng/μL	0.9908	$y = 1.5512x + 66.753$
200ng/μL	0.9972	$y = 2.0312x - 12.12$
100 ng/μL	0.9949	$y = 2.2244x - 15.813$

Şekil 4.5 ve Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere çalışılan tüm konsantrasyonlarda doğruların doğrusallık katsayıları iyi olmasına rağmen, konsantrasyon arttırıldığında alınan cevabın düştüğü görülmektedir. Bunun nedeni; Anti-A1AT konsantrasyonu yüksek olduğunda altın elektrot yüzeyine immobilize edilmiş kola daha fazla A1AT

proteini bağlanması ve bunun sonucunda SAM'in taşıma kapasitesi aşarak oluşturulan kimyasal köprüde bozulmalar meydana geldiği düşünülmektedir.

100 ng ve 200 ng'lık Anti-A1AT konsantrasyonlarına bakıldığında ikisi de seçmek için uygundur. 100 ng/ μ L'lik Anti-A1AT ile oluşturulmuş biyosensörün cevabı incelendiğinde diğer biyosensörlerin cevaplarına nazaran yüksek olduğu görülmektedir. Ancak **200 ng/ μ L**'lik Anti-A1AT çözeltisi ile alınmış biyosensör ölçümlerinde daha fazla A1AT proteini bağlayacağı düşünüldüğünden optimum Anti-A1AT konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

Optimizasyon basamaklarının yapılması sonucunda; A1AT analizine yönelik geliştirilen biyosensör için elde edilmiş optimum parametreler Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. A1AT biyosensörünün inşası için belirlenmiş olan optimum değerler

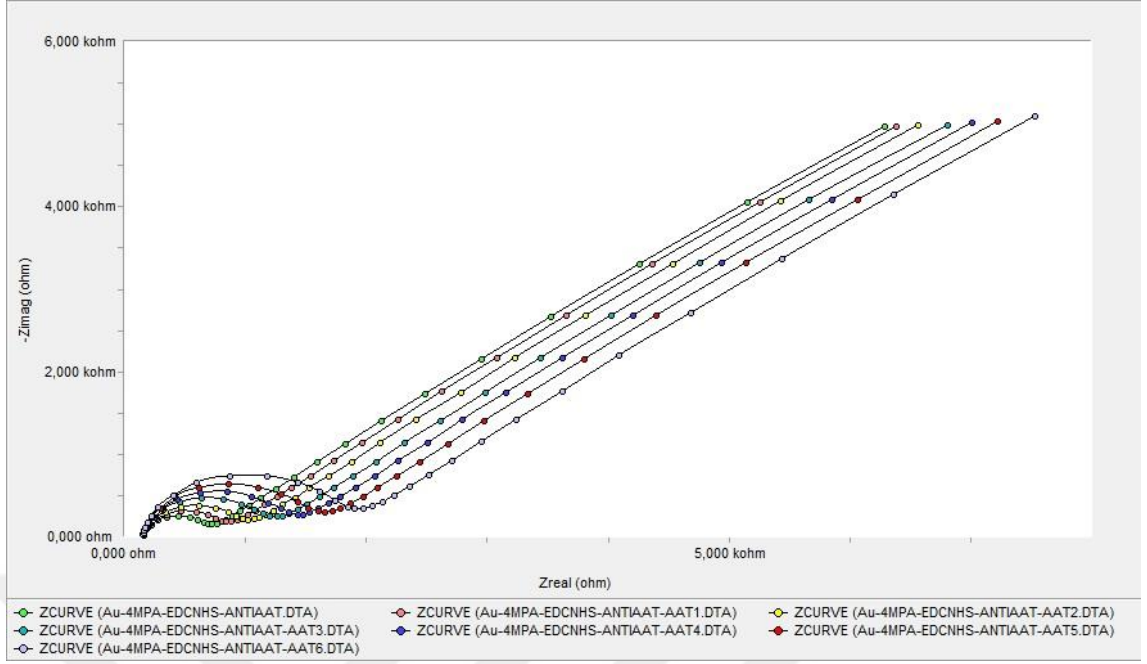
İmmobilizasyon Basamakları	Optimum Değerler
4-MPA Konsantrasyonu	5 mM
EDC/NHS Konsantrasyonu	0.2 M/0.05 M
Anti-A1AT Konsantrasyonu	200 ng/ μ L

4.1.3. A1AT Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

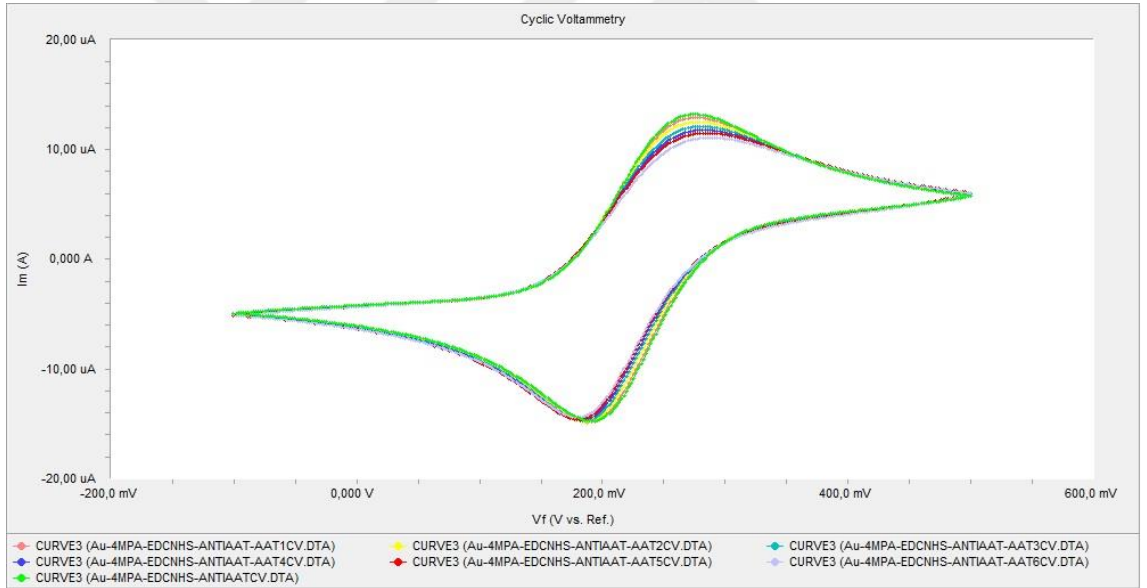
4.1.3.1. A1AT Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığı

İmmobilizasyon basamaklarının optimizasyonu sonucu elde edilen optimum parametreler 4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/0.05 M), Anti-A1AT (200 ng/ μ L) kullanılarak üretilen A1AT biyosensörünün 100-600 ng/ μ L konsantrasyon aralığında A1AT proteini için cevapları ölçülmüştür. Tekrar üretilebilirlik kapsamında hazırlanan biyosensörlerle yapılan impedans ölçümleri sonucunda elde edilen Nyquist eğrilerinden R_{ct} değerleri hesaplanmıştır.

Bu ölçümlerden elde edilmiş olan Nyquist eğrileri Şekil 4.6'da, alınan siklik voltamogramları Şekil 4.7'de görülmektedir.

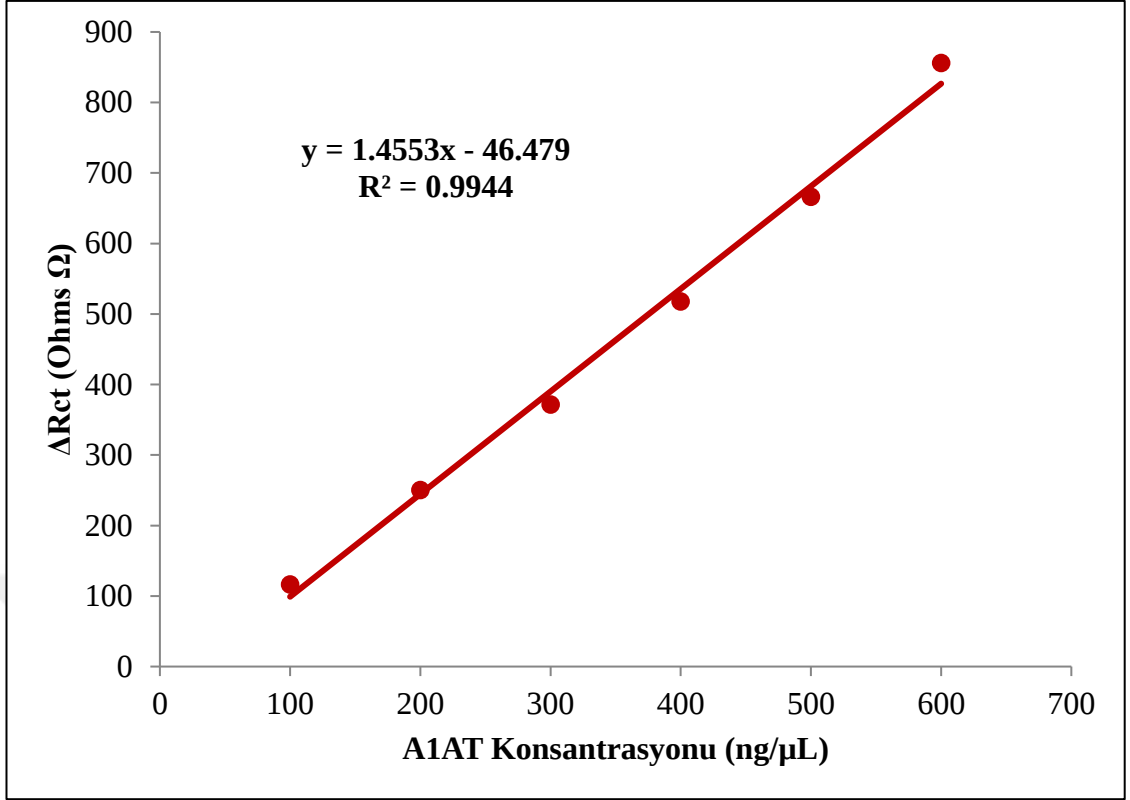


Şekil 4.6. 100-600 ng/ μ L A1AT tayin aralığında elde edilmiş Nyquist eğrileri



Şekil 4.7. 100-600 ng/ μ L A1AT tayin aralığında elde edilmiş siklik voltamogramlar

Geliştirilmiş olan tüm biyosensörler için Rct değerleri hesaplandı ve bunların aritmetik ortalamasıyla oluşturulan lineer kalibrasyon grafiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. A1AT biyosensörüne ait 100-600 ng/μL tayin aralığındaki kalibrasyon grafiği

4.1.3.2. A1AT Biyosensörünün Tekrar Üretilabilirliği

Optimum konsantrasyonlarda çok sayıda A1AT biyosensörü hazırlanmış, doğrusal tayin aralığında A1AT proteinleri ile biyosensör cevapları ölçülmüş ve doğrusallık katsayıları ve Rct değerleri hesaplanmıştır. İdeal bir biyosensörde tekrar üretilebilirliğin mutlak bir biçimde iyi olması gereklidir. Bu amaçla, çok sayıda biyosensör hazırlanmış ve ölçüm sonuçlarından kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Bu biyosensörlerden 9 tanesi için oluşturulan kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayısı ve doğru denklemleri Çizelge 4.6’da verilmiştir.

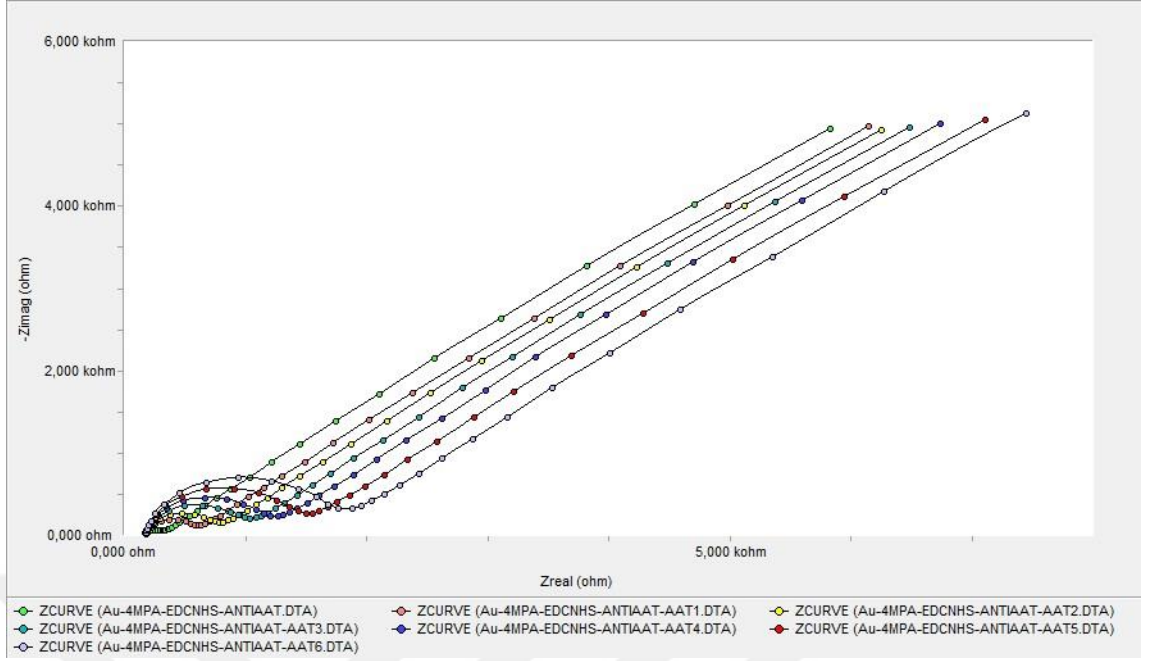
Çizelge 4.6’da görüldüğü üzere A1AT analizine yönelik yapılan 9 farklı biyosensörün doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri benzerlik göstermektedir. Böylece optimize edilmiş koşullar altında yapılan A1AT biyosensörünün tekrar üretilebilirliği ve doğruluğu belirtilmiştir.

Çizelge 4.6. Optimize edilmiş parametrelerle üretilen A1AT biyosensörlerinin doğrusal denklemleri ve doğrusallık katsayıları

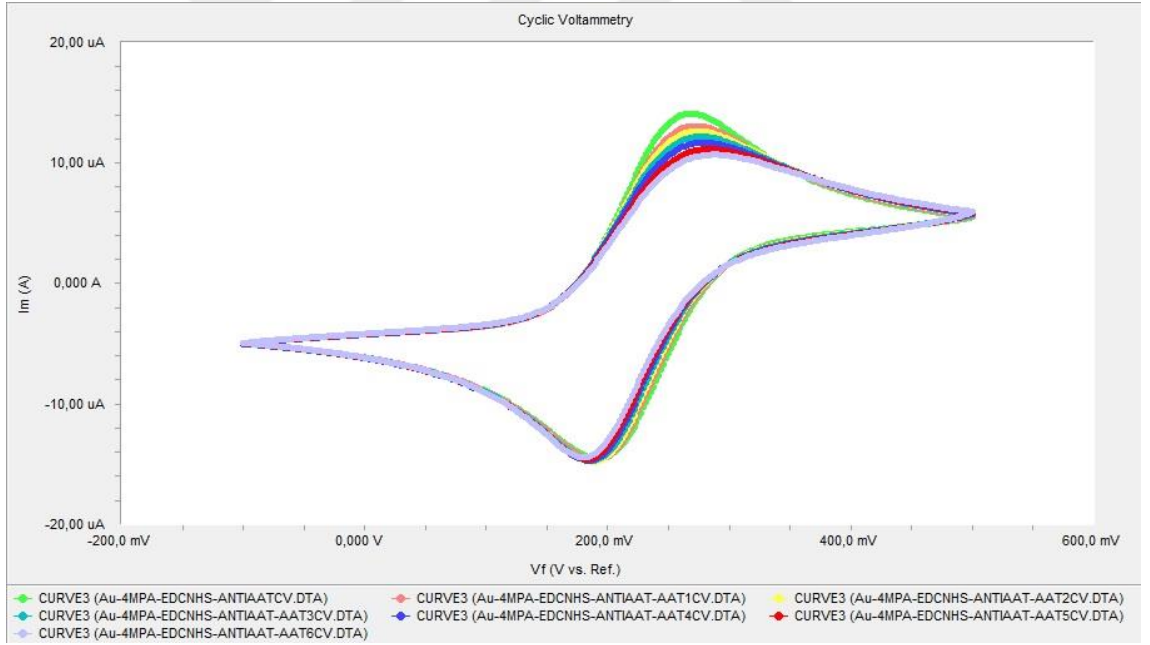
Biyosensör Numarası	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemleri	Doğrusal Tayin Aralığı
1	0.9914	$y = 1.3940x - 40.973$	100-600 ng/ μ L
2	0.9957	$y = 1.6619x - 38.58$	100-600 ng/ μ L
3	0.9868	$y = 1.4835x - 87.32$	100-600 ng/ μ L
4	0.9789	$y = 1.3958x - 114.63$	100-600 ng/ μ L
5	0.9953	$y = 1.2886x + 179.8$	100-600 ng/ μ L
6	0.9987	$y = 1.8750x - 67.44$	100-600 ng/ μ L
7	0.9955	$y = 1.1161x - 45.28$	100-600 ng/ μ L
8	0.9931	$y = 1.4295x - 105.77$	100-600 ng/ μ L
9	0.9971	$y = 1.4014x + 24.7$	100-600 ng/ μ L

4.1.3.3. A1AT Biyosensörünün Yapay Serum Uygulamaları

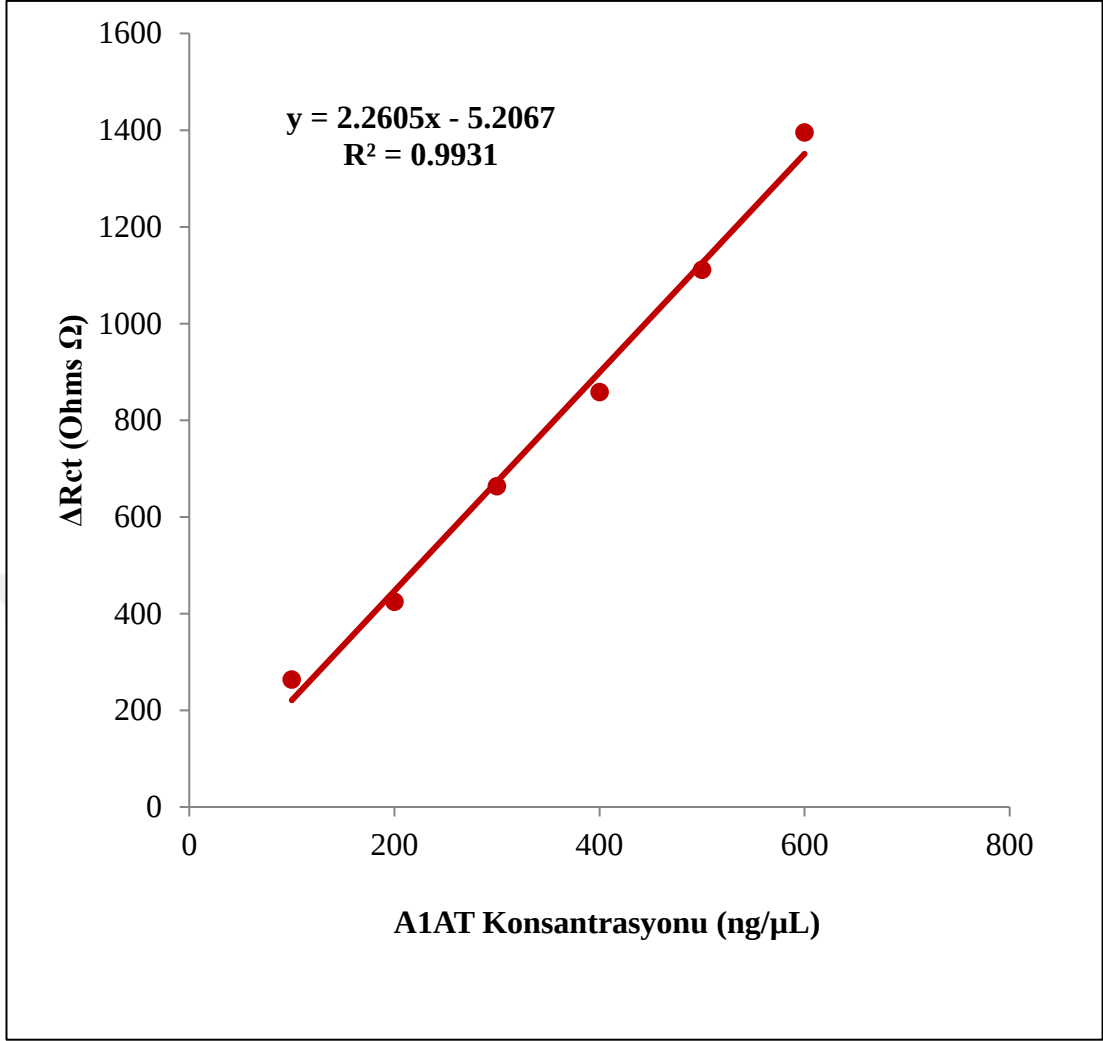
Yapay serum bileşiminde bulunan biyomoleküllerin A1AT biyosensörünün cevapları üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmak üzere; optimize edilmiş koşullarda (4-MPA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/0.05M), Anti-A1AT (200 ng/ μ L)) hazırlanmış biyosensörler ile lineer tayin aralığı olan 100-600 ng/ μ L konsantrasyon aralığında yapay serumla porsiyonlanmış A1AT protein çözeltileri ile biyosensör cevapları ölçüldü, R_{ct} olarak hesaplanan biyosensör cevapları A1AT konsantrasyonları arasında lineer grafik oluşturuldu. Bu bağlamda A1AT biyosensörünün yapay serum içerisinde yapılan ölçümlerinden elde edilmiş Nyquist eğrileri Şekil 4.9’da, alınan siklik voltamogramları Şekil 4.10’da ve Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri ile çizilmiş lineer kalibrasyon grafiği Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. A1AT biyosensörünün yapay serum uygulamaları sonucu elde edilmiş Nyquist eğrileri



Şekil 4.10. A1AT biyosensörünün yapay serum uygulamaları sonucunda elde edilmiş siklik voltamogramları



Şekil 4.11. A1AT biyosensörünün yapay serum uygulamaları sonucu çizilen kalibrasyon grafiği

Şekil 4.8 ve Şekil 4.11’de verilen kalibrasyon grafikleri incelenecek olursa; yapay serum, A1AT biyosensörünün doğrusallık katsayısını az bir miktar düşürmüş ancak eğimi artmıştır (Şekli 4.11). Eğim ile alınan cevap arasında doğru orantı olduğundan yapay serum bu biyosensörün cevabını arttırmıştır. Bunun asıl nedeni yapay serum içerisinde bulunan biyomoleküllerin elektrot yüzeyine tutturulmuş kol üzerinde molekül miktarını arttırarak direnci arttırmasıdır. Düşük bir düzeyde girişim olsa da sonuç olarak bu söz konusu girişim biyosensör ölçümünde ciddi bir değişime neden olmadığından A1AT biyosensörünün serum içerisinde çalışabileceği kanısına varılmıştır.

Özetle; bu çalışma kapsamında A1AT eksikliği durumunun tanısının konması ve buna ek olarak tanı konmuş kişilere uygulanan tedavinin takibi konularında kullanılabilecek A1AT miktar tayini yapabilecek bir A1AT biyosensörü geliştirilmiştir. Bölüm 2’de de belirtildiği üzere A1AT eksikliği bu proteini kodlayan gende meydana gelen nokta mutasyonları sonucu olduğundan günümüz teknolojiyle kalıcı bir tedavisi yoktur. Tedavisi için dışarıdan saflaştırılmış A1AT proteininin damara enjeksiyonu yapılarak kanda miktarının artırılması hedeflenmektedir. Bu nedenle hem tanı hem de tedavi takibi konularında etkin, maliyeti düşük, hassas ve uzman gerektirmeden herkesin kolayca kullanabileceği yeni bir yöntem geliştirmek faydalı olacaktır.

Bölüm 2.8’de belirtildiği gibi Zhu ve Lee 2016 yılında A1AT analizi için geliştirdikleri sandviç tipi biyosensörleri, ilk elektrokimyasal esaslı çalışma özelliği taşımaktadır. Zhu ve ark., aldıkları CV ve DPV cevaplarıyla A1AT tespit limitini pM’a kadar indirmişler ve yüksek bir doğrulukla beraber yüksek bir hassasiyet yakalamışlardır (Zhu & Lee, 2017). Yine aynı mantık ile A1AT analizi yapmak üzere Kim ve arkadaşları 2015 yılında, yüzey plazmon rezonansı (SPR) kullanarak Aptamer-Antikor etkileşimli sandviç tipi bir test kiti (ELISA) geliştirmiş ve A1AT tespit limitini fM’a kadar düşürmüşlerdir (Kim & Lee, 2015). Ancak bu yöntemler incelendiğinde oldukça zorlu ve karmaşık immobilizasyon basamakları uygulanmış, bu amaçla çok çeşitli kimyasal maddeler kullanılmıştır. Bu durum A1AT analiz maliyetini yükseltecektir. Ayrıca her bir basamağın optimizasyonu da sorun teşkil edebilir. fM gibi düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapabilmesi bu sensörün avantajı gibi görülmesine rağmen, A1AT molekülünün kandaki miktarı yüksek olduğundan pratikte sensörlerin ölçüm aralığına inebilmesi için analiz öncesi kan serumunun seyreltilmesi gibi bir ön işlem gerekliliği de ortaya çıkabilir.

Bu tez kapsamında A1AT analizine yönelik impedimetrik temelli bir biyosensör sistemi ilk defa geliştirilmiştir. Biyosensör tasarımı minimum seviyede kimyasal kullanımı ve basitlik odak noktası olmuştur. Bu immünosensör, 100-600 ppm’lik (100-600 ng/μL) doğrusal tayin aralığına sahip olup kan serumunda A1AT miktarını saptayabilecek niteliktedir. Bu nedenle tayin aralığının son yıllarda geliştirilen sandviç tipi biyosensör ve SPR çipinden yüksek olması dezavantaj olarak algılanmamalıdır.

A1AT biyosensörü, yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde; uygun tekrar üretilebilirlik, yüksek doğrusallık sunduğundan A1AT analizi için etkin bir analiz metodudur.

Bu bağlamda A1AT analizine yönelik geliştirilen bu biyosensörün minyatürize edildiği takdirde A1AT eksikliği (AATD) sonucu görülen Akciğer Amfizemi, Karaciğer Apoptozu ve Karaciğer Kanseri, Panikülit, ANCA (Antinötrofil Stoplazmik Antikor) pozitif vaskülit gibi hastalıkların (Güleç Ceylan, Şentürk & Hasanoğlu, 2016) teşhisinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu söylenebilir.



KAYNAKLAR

- AACC. (2018). The American Association for Clinical Chemistry. *Lab Tests Online*. <https://labtestsonline.org.tr/> adresinden alınmıştır
- Ahmad, A. & Moore, E. (2012). Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptoundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water. *Analyst*, 137(24), 5839–5844. <https://doi.org/10.1039/c2an35236b>
- Alpha-1 Foundation. (2018). *Alpha-1 Foundation*. <https://www.alpha1.org/> adresinden alınmıştır
- Bahadır, E. B. & Pagano Meriç, S. (2014). Pestisit analizlerinde elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı. *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3(2), 18–28.
- Baş, D. & Deniz, E. (2015). Gıda güvenliği ve kalite kontrolünde biyosensörler, 40 (4) *The Journal of Food*, 225–232. <https://doi.org/10.15237/gida.GD14057>
- Blanco, I. (2017). *Blanco's Overview of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency History, Biology, Pathophysiology, Related Diseases, Diagnosis and Treatment*, 17-66. London, United Kingdom: Academic Press.
- Boozer, C., Chen, S. & Jiang, S. (2006). Controlling DNA orientation on mixed ssDNA/OEG SAMs. *Langmuir*, 4694–4698. <https://doi.org/10.1021/la052908e>
- Boulyjenkov, V. (1997). α 1-antitrypsin deficiency: Memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization*, 75(5), 397–415.

- Brantly, M., Nukiwa, T. & Crystal, R. G. (1966). Molecular basis of alpha-1 -antitrypsin deficiency. *The American Journal of Medicine*, 13–31.
- Bulut, Y. (2011). Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış. *6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11)*.
- Burak, D. (2012). *Anti-miyelin temelli protein tayini için impedimetrik immünosensör geliştirilmesi*. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Ankara).
- Clark, L. C. & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 102(1), 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- Crystal, R. G. (1990). α_1 -Antitrypsin deficiency, emphysema. *The Journal of Clinical Investigation*, Inc., 1343-1352.
- De Serres, F. & Blanco, I. (2014). Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *Journal of Internal Medicine*, 311–335. <https://doi.org/10.1111/joim.12239>
- Eriksson, S., Carlson, J. & Velez, R. (1984). Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha-1 antitrypsin deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 736-739.
- Gallagher, C., Burlina, F., Offer, J. & Ramos, A. (2017). A method for the unbiased and efficient segmental labelling of RNA-binding proteins for structure and biophysics. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13950-8>
- Gandhi, N. P., Rohit, J. V., Kumar, M. A. & Kailasa, S. K. (2013). 4-Mercaptophenylacetic acid functionalized Mn^{2+} -doped ZnS nanoparticles fluorescence quenching caused by the addition of Cu^{2+} . *Research on Chemical Intermediates*, 39(8), 3631–3639. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-0867-4>
- Genetics Home Reference. (2018). <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINA1#location> adresinden alınmıştır
- Gooding, J. J. (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis*, 14 (17), 1149–1156. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200209\)14:17<1149::AID-ELAN1149>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200209)14:17<1149::AID-ELAN1149>3.0.CO;2-8)

- Grabarek, J., Du, L., Johnson, G. L., Lee, B. W. & J., D. (2002). Sequential activation of caspases and serine proteases (serpases) during apoptosis. *Cell Cycle*, 1(2), 115–122. <https://doi.org/10.4161/cc.1.2.113>
- Gu, T., Liu, Y., Zhang, J. & Hasebe, Y. (2009). Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of DNA-Cu(II) in DNA/chitosan polyion complex membrane. *Journal of Environmental Sciences*, 56–59. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60037-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60037-1)
- Guan, J.-G., Miao, Y.-Q. & Zhang, Q.-J. (2004). Impedimetric biosensors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(4), 219–226. <https://doi.org/10.1263/jbb.97.219>
- Güleç Ceylan, G., Şentürk, A. & Hasanoğlu, C. (2016). The importance of molecular diagnosis in alpha-1 antitrypsin deficiency: Case Report. *Van Tıp Dergisi*, 92–94.
- Hewas, A. M. (2013). *Analysis of metal ions in water using sam-modified EQCM electrodes*. University of Leicester.
- Hubbard, R. C. & Crystal, R. G. (1988). Alpha-1-antitrypsin augmentation therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency. *The American Journal of Medicine*, 52–62. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(88\)80071-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(88)80071-8)
- Ioachimescu, O. C. & Stoller, J. K. (2005). A Review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Order*, 185(216), 2:263–275. <https://doi.org/10.1081/COPD-200057602>
- Jones, E. A., Vergalla, J., Steer, C. J., Bradley-Moore, P. R. & Vierling, J. M. (1978). Metabolism of intact and desialylated alpha 1-antitrypsin. *Clinical science and molecular medicine*, 55(2), 139–148.
- Kayran, Y. U. (2011). *Optik ve elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin genetik hastalık ve mikroorganizma tayinine yönelik tasarımı ve uygulamaları*. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (İzmir).
- Kim, S. & Lee, H. J. (2015). Direct detection of α -1 antitrypsin in serum samples using surface plasmon resonance with a new aptamer-antibody sandwich assay. *Analytical Chemistry*, 7235–7240. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01192>

- Köhnlein, T. & Welte, T. (2008). Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *American Journal of Medicine*, 121(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.07.025>
- Kokkokoğlu, F. (2013). *Development of an electrochemical DNA biosensor for detection of genetic mutations*. Fatih University, Master of Science in Genetics and Bioengineering Department (İstanbul).
- Li, H., Lu, Y., Witek, R. P., Chang, L.-J., Campbell-Thompson, M., Jorgensen, M. & Song, S. (2010). Ex vivo transduction and transplantation of bone marrow cells for liver gene delivery of alpha1-antitrypsin. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 1553–1558. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.116>
- Li, H., Zhang, B., Lu, Y., Jorgensen, M., Petersen, B. & Song, S. (2011). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-based liver gene delivery. *Journal of Hepatology*, 54(5), 930–938. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.051>
- Loebermann, H., Tokuoka, R., Deisenhofee, J. & Huber, R. (1984). Human alpha1-proteinase inhibitor crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *Journal of Molecular Biology*, 177, 531-556.
- Lomas, D. (2000). Loop-sheet polymerization: the mechanism of alpha1-antitrypsin deficiency. *Respiratory Medicine*, supplement C S3-S6. doi:10.1053/rmed.2000.0850.
- Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 1103-1169. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>
- Miranda-Castro, R., Sánchez-Salcedo, R., Suárez-Álvarez, B., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J. & Jesús Lobo-Castañón, M. (2017). Thioaromatic DNA monolayers for target-amplification-free electrochemical sensing of environmental pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.017>

- Novotny, P. (2009). An overview of selected Lux-Marked biosensors and its application as a tool to ecotoxicological analysis. *Nova Science Publishers, Inc.*, 1–24.
- Pan, W., Durning, C. J. & Turro, N. J. (1996). Kinetics of alkanethiol adsorption on gold. *Langmuir*, 4469–4473. <https://doi.org/10.1021/la9408634>
- Perlmutter, D. H., Brodsky, J. L., Balistreri, W. F. & Trapnell, B. C. (2007). Molecular pathogenesis of alpha-1 antitrypsin deficiency associated liver disease: A meeting review. *Hepatology*, 45(5), 1313–1323. <https://doi.org/10.1002/hep.21628>
- Ponce, I., Silva, J. F., Oñate, R., Rezende, M. C., Páez, M. A., Pavez, J. & Zagal, J. H. (2011). Enhanced catalytic activity of Fe phthalocyanines linked to Au (III) via conjugated self-assembled monolayers of aromatic thiols for O₂ reduction. *Electrochemistry Communications*, 1182–1185. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2011.08.050>
- Sezgintürk, M. K. (2011). A new impedimetric biosensor utilizing VEGF receptor-1 (Flt-1): Early diagnosis of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 4032–4039. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.03.025>
- Sezgintürk, M. K. (2013). *Bazı meme kanseri biyomarkerlerinin ekonomik ve duyarlı analizine yönelik elektrokimyasal ölçüm sistemlerinin geliştirilmesi*. Namık Kemal Üniversitesi. Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11776/2131>
- Sezgintürk, M. K. & Uygun, Z. O. (2012). An impedimetric vascular endothelial growth factor biosensor-based PAMAM/cysteamine-modified gold electrode for monitoring of tumor growth. *Analytical Biochemistry*, 423(2), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.12.049>
- Song, F., Poljak, A., Smythe, G. A. & Sachdev, P. (2009). Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 61(2), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.05.003>

- Sonuç Karaboğa, M. N. & Sezgintürk, M. K. (2018). Determination of C-reactive protein by PAMAM decorated ITO based disposable biosensing system: A new immunosensor design from an old molecule. *Talanta*, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.051>
- Söylemez, Z. (2006). *Kronik obstrüktif akciğer hastalarında Alfa-1 antitripsin genine ilişkin genotipleme çalışması*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Afyon).
- Subramaniam, D., Glader, P., Von Wachenfeldt, K., Burneckiene, J., Stevens, T. & Janciauskiene, S. (2006). C-36 peptide, a degradation product of α 1-antitrypsin, modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(4), 563–575. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.021>
- Telefoncu, A. (1999). *Biyosensörler*. (A. Telefoncu, Ed.). İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi.
- Telefoncu, A. & Kılınç, A. (2013). *Biyosensör Tasarımı ve Uygulamalarında Son Gelişmeler*. (358) İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
- Topkaya, S. N. (2013). *Nükleik aside dayalı elektrokimyasal biyosensörler ile hibridizasyon algılanmasına ait yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması*. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (İzmir).
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi BEU Journal of Science*, 6(62), 71–80. Retrieved from <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/391093>.
- Ugenskiene, R., Sanak, M., Sakalauskas, R. & Szczeklik, A. (2005). Genetic polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina*, 41(1), 17–22.
- Uygun, Z. O. & Sezgintürk, M. K. (2011). A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth. *Analytica Chimica Acta*, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.044>

- Vuillaume, D. (2010). Molecular electronics based on self-assembled monolayers. *Oxford Handbook of Nanoscience and Nanotechnology*, 3, 312–342.
- Waldmann, T. A. & Strober, W. (1969). Metabolism of Immunglobulins. *Program Allergy*, 1-11058. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.05.100151.000443>
- Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry, Third Edition*. U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471790303>
- Williams, S. E., Brown, T. I., Roghanian, A. & Sallenave, J.-M. (2006). SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clinical Science*, 110(1), 21–35. <https://doi.org/10.1042/CS20050115>
- Worthington, A. K., Parrott, R. L. & Smith, R. A. (2018). Spirituality, illness unpredictability, and math anxiety effects on negative affect and affect-management coping for individuals diagnosed with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Health Communication*, 33(4), 363–371. <https://doi.org/10.1080/10410236.2016.1266576>
- Xu, J. & Li, H. L. (1995). The chemistry of self-assembled long-chain alkanethiol monolayers on gold. *Journal of Colloid And Interface Science*, 176(1), 138–149. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.0017>
- Yavuz, Y. (2012). *Nanoyapı Modifiye Mikroorganizma / Maya Temelli Elektrokimyasal Biyosensörlerin Geliştirilmesi*. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi (Muğla).
- Yilmaz, D. & Karakuş, E. (2011). Construction of a potentiometric glutamate biosensor for determination of glutamate in some real samples. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39(6), 385–391. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.611473>
- Zagariya, A. M., Bhat, R., Zhabotynsky, E., Chari, G., Navale, S., Xu, Q. & Vidyasagar, D. (2005). Characterization of serine/cysteine protease inhibitor α 1-antitripsin from meconium-instilled rabbit lungs. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(1), 137–144. <https://doi.org/10.1002/jcb.20492>

- Zhang, C., Shen, G., Shen, Y. & Zhang, X. (2015). The development of an electrochemical immunosensor using a thiol aromatic aldehyde and PAMAM-functionalized Fe₃O₄@Au nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 485, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.06.016>
- Zhu, G. & Lee, H. J. (2017). Electrochemical sandwich-type biosensors for α -1 antitrypsin with carbon nanotubes and alkaline phosphatase labeled antibody-silver nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 959–963. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.080>



ÖZGEÇMİŞ

15.04.1993 yılında İstanbul’da doğdum. İlköğrenimimi Behiye Selim Pars İlk Öğretim Okulunda tamamladım. Liseyi Bahçelievler Lisesi’nde okuyup 2011 yılında mezun oldum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimime başlayıp 2015 yılında mezun oldum. 2016 yılında ise Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nın Biyokimya programından yüksek lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.

Osman MEHMET