


Meme kanseri hücresi tanımlayan biyosensör

Breast cancer detecting biosensor

Ayşe Kevser Özden 

Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada meme kanseri hücrelerini membran reseptörleri aracılığıyla tanımlayabilen yüksek hassasiyet ve özgüllükle çalışan hızlı bir tanı aracı oluşturmak hedeflendi. Kuvars kristal mikrodenge (QCM) sistemi hücrelerin reseptörlerine özgü ligantlarla işlevselleştirilerek etkin bir biyosensör geliştirmek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Biyosensörler afinite prensibiyle çalışan biyoreseptör ve dönüştürücü bölümden oluşan hassas tanı araçlarıdır. Kuvars kristal mikrodenge sistemi kuvars kristal rezonatörünün frekansındaki minimal kütle artışlarına bağlı değişimi saptar. QCM çipi öncelikle hazırladığımız polimerik nanopartiküllerle kaplandı. Nanopartikül tabakasının üzerine transferrin, noç 4 ve her2/neu monoklonal antikoru gibi ligantlar bağlanarak yüzey işlevselleştirildi. Modifiye edilen QCM çip yüzeyinin kimyasal ve fiziksel özellikleri incelendi. Üçlü negatif olarak bilinen meme kanseri hücre hattı MDA-MB 231 ve SKBR3 ile kontrol fibroblast hücreleri L929, kültürde çoğaltılarak deneylere hazırlandı. Hücreler PBS içinde çip yüzeyinden geçirildi ve QCM sisteminde hücre tutunmasına bağlı olarak oluşan frekans değişimleri saptandı. Geliştirilen biyosensör sisteminin bağlanma kinetiği, hassasiyeti ve tekrar kullanılabilirliği belirlendi.

Bulgular: QCM çipi kaplamak için hazırlanan nanopartiküllerin çapı 73,22 nm ve polidispersitesi 0,229 olarak bulundu ve yüzeyi homojen bir şekilde kapladıkları gözlemlendi. Transferrin, noç 4 ve her2/neu monoklonal antikoru ile işlevselleştirilen QCM'in saptama limiti 4-10 hücre/ml olarak saptandı. Bağlanmanın Langmuir tipinde olduğu hesaplandı.

Sonuç: Geliştirilen QCM temelli biyosensör meme kanseri hücrelerini reseptörleri aracılığıyla hızlı, hassas ve seçici biçimde tanımladı. Biyosensör tekrarlı kullanımda etkinliğini korudu. Bu hızlı tanı aracının klinik uygulamalarda yer alabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, biyosensör, QCM, reseptör.

ABSTRACT

Aim: This study aims to develop a rapid system to detect breast cancer cells, which is highly sensitive and selective. An efficient biosensor is aimed to be formed by functionalizing quartz crystal microbalance (QCM) system with ligands those are specific for breast cancer cell membrane receptors.

Materials and Methods: Biosensors are sensitive diagnostic devices based on affinity principle are composed of a bioreceptor and a transducer. Quartz crystal microbalance (QCM) system detects the changes in the frequency of crystal resonator created by minimal changes in the mass. QCM chip was first covered with polymeric nanoparticles that we prepared. Its surface is functionalized by attaching ligands like transferrin, notch 4 and her2/neu monoclonal antibodies on the nanoparticle layer.

Sorumlu yazar: Ayşe Kevser Özden
Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
E-posta: kevser.ozden@lokmanhekim.edu.tr
Başvuru tarihi: 15.12.2023 Kabul tarihi: 21.03.2024

The chemical and physical features of modified QCM chip surface is analyzed. The human breast cancer cells MCF 7, MDA-MB 231, SKBR3 and control fibroblast cells L929 are prepared for experiments by growing in culture. Cells suspended in PBS are passed over the QCM surface and frequency changes resulting from cell binding are recorded. The binding kinetics, affinity and reusability of the biosensor is determined.

Results: *The nanoparticles for coating the QCM chip had a diameter of 73, 22 nm and the polydispersity was 0, 229. It is observed that they covered the surface homogeneously. The detection limit of transferrin, notch 4 and her2/neu functionalized QCM was 4-10 cells/ml. Binding kinetics best fitted to Langmuir type binding.*

Conclusion: *The QCM based biosensor detected breast cancer cells through their membrane receptor rapidly with high affinity and selectivity. The biosensor retained its efficiency in repeated usage. It is concluded that this rapid detection system may find a place in clinical applications.*

Keywords: *Breast cancer, biosensor, QCM, receptor.*

Bu çalışma 20-22 Ekim 2023 tarihinde İzmirde düzenlenen 27. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumunda özet bildiri olarak sunulmuştur

GİRİŞ

Kanser günümüzdeki başlıca sağlık problemlerinden birisidir. Meme kanseri heterojen moleküler özellikleri olan ve kadınlarda en sık gözlenen kanser türüdür. Meme kanseri için kullanılan tanı yöntemleri pahalı, zaman alıcı ve bazan invaziv yapıdadır (1). Meme kanseri hücrelerinin moleküler özelliklerini saptayarak tanıya destek olacak hassas ve hızlı sistemlere gereksinim vardır (2). Biyosensörler meme kanserinin moleküler belirteçlerini etkin biçimde saptayabilecek aygıtlardır. Temel olarak biyoreseptör ve fizikokimyasal bir dönüştürücü olmak üzere iki bölümden oluşurlar. Dönüştürücü elektrokimyasal, optik, kalorimetrik veya kütle değişimlerine dayalı olabilir (3, 4). Kuvars kristal mikrodenge (QCM) sensörler piazoelektrik yapıda olup iki elektrot arasına yerleştirilmiş ince bir kuvars kristal içerirler. Özel çiplerinin yüzeyine nanogram düzeyinde bir kütle eklenmesiyle oluşan kuvars kristalin rezonansındaki değişimi saptayabilen çok hassas aygıtlardır. Bu sistemde etiketleme gerekmemekte ve opak bir çözelti içinde bile olsa hedef molekülü tanımlayabilmektedir (5, 6). QCM sistemi DNA, aptamer, enzim, antikor veya mikroorganizma gibi biyotanıma elemanı içeren çok çeşitli formlarda hazırlanabilmektedir (7). QCM gibi piazoelektrik sensörlerin antijen-antikor veya ligant- reseptör etkileşimlerine olan duyarlılığı kanser hücrelerine karşı yüksek afinite oluşturmaktadır. Meme kanseri hücrelerinin normal eşdeğer hücrelerine göre farklı ya da fazlaca eksprese ettikleri reseptörleri vardır. Örneğin, demir gereksinimi artmış olan meme kanseri hücreleri membranlarında çokça

transferrin reseptörü bulundurlar (8). Farklılaşma sonucunda meme hücrelerinde azalan noç 4 reseptörü de farklılaşma düzeyi gerilemiş olan meme kanseri hücrelerinde tanımlanan bir reseptördür (9). HER2/neu ise epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) mutant formudur ve meme kanserlerinin yaklaşık dörtte birinde saptanmaktadır (10).

Bu çalışmada MDA-MB-231 ve SKBR3 insan meme kanseri hücrelerini her biri hücreleri tanımlamada aracı olmuş bu üç reseptörü birlikte hedefleyen etkin bir biyosensör hazırlanması ve etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. MDA-MB 231 yüksek metataz niteliği olan ancak her2/neu eksprese etmeyen, SKBR3 ise bu reseptörü taşıyan meme kanseri hücreleridir. QCM çipinin yüzeyini hidrofilikleştirmek, protein bağlama özelliği sağlamak ve yüzey alanını genişletmek amacıyla p(HEMA) gibi polimerik nanopartiküllerle kaplanması planlanmıştır. QCM çipi nanopartikül kaplandıktan sonra transferrin, noç4 ve her2/neu antikolarıyla işlevselleştirilerek etkin bir meme kanseri tanı aracı geliştirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Nanopartiküllerin Hazırlanması

Poli(HEMA) nanopartiküller iki çözelti karıştırılarak hazırlandı. Bunun için 93,7 mg polivinil alkol (mw:100, 000) 50 ml suda çözülerek hazırlanan sürekli faza 14,4 mg Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve 11,7 mg NaHCO₃ eklendi. Diğer çözelti de 50 miligram (mg) Polivinil Alkol (PVA), 100 mililitre (mL) iyonize edilmiş suda çözülüp içine 50 mg SDS, 0,45 mL Hidroksietil Metakrilat ile 1,05 mL Etilen

Glikol Dimetakrilat eklendi. İki çözelti karıştırılarak 50,000 rpm de 30 dakika santrifüj edilerek miniemülsiyon hazırlandı. Miniemülsiyona polimerizasyonu başlatmak için 0,44 mg/mL potasyum persülfat eklendi. Polimerizasyon reaktöründe (Radleys Carousel 6, Essex, UK), 600 rpm de 40°Cde 24 saat çalkalanarak bekletildi. Alkol ve distile su ile yıkamalardan sonra 15 dakika sonikasyonla partiküller elde edildi). Nanopartiküller sırasıyla %70'lik alkol, deiyonize su ve piranha çözeltisi ile yıkayıp 200 mmHg vakumlu fırında kurutulmuş altın QCM çipinin üzerine damlatılıp UV ışığında 37°C de 30 dakika bekletilerek bağlandı. QCM çipi Maxtek (New York, ABD) firmasından temin edildi.

Hücreler

Araştırmada kullanılan tüm hücreler Sigma Chem. Co., St. Louis, ABD'den temin edildi. HER2/neu reseptör negatif yüksek metastatik özellikteki MDA-MB 231 hücre hattı ve fare deri fibroblast hücreleri L929, %10 fetal sıgır serumu, %1 L- Glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM içinde %5 karbon dioksit içeren 37 °C deki etüvde üretildi. HER2/neu reseptör pozitif meme kanseri hücreleri SKBR3 (ATCC-HTB-30) ise aynı şartlarda McCoy's 5a besi yeri kullanılarak çoğaltıldı. Hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile toplanıp PBS içerisine alındı. Hücreler QCM çipi üzerinden PBS içinde geçirildi.

QCM çipinin işlevselleştirilmesi

Çipe ligantların bağlanması ile gerçekleştirildi. Bunun için, transferrin çözeltisi 10 mg/100 ml, noç 4 ve her2/neu antikoları ise 0, 01 µg/100 ml olarak hazırlandı. Karbodiimid (5mg/200 mL) ile karıştırıldı ve +4°C'de 24 saat 37°C de inkübe edildi. Daha sonra 0, 1 M NaCl uygulanan çip son olarak PBS (pH 7,4) ile yıkayıp kullanıma hazırlandı.

Çipin özelliklerinin belirlenmesi

Öncelikle nanopartiküllerin boyut ve hidrofilitate analizleri yapıldı. Bunun için Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, London, UK)'da 1mL nanopartikül oda sıcaklığında 90°C ışık saçılımında incelendi. Ayrıca, atomik güç (AFM) mikroskobu (Orta Doğu Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı, Ankara) ile nanopartiküller görüntüledi. İşlevselleştirilmiş çip yüzeyinin kalınlığı ellipsometride (Nanofilm EP3-Nulling) 532 nm dalga boyunda ve 62° yansıma açısında ölçüldü. Yüzey hidrofobisini belirlemek için temas açısı ölçümleri KRUSS DSA100 (Hamburg, Germany) cihazında yapıldı. Çip yüzeyinin kimyasal analizinde FTIR (Bruker IFS 66/S, FRA

106/S, Hyperion 1000, Ramanscope II FTIR) kullanıldı.

Hücrelerin QCM'de incelenmesi

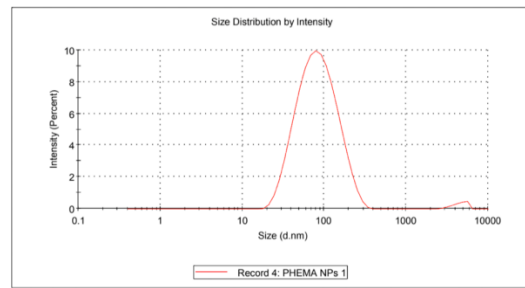
Research Quartz Crystal Microbalance Monitor MAXTEK RQCM Inficon QCM aygıtında öncelikle çip 0,1 M NaCl ile 0,5 mL /min hızda Watson Marlow SCI Q 400 Peristaltic Pump peristaltik pompa ile yıkanarak bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı. Sonra, PBS (pH:7,4) ile yıkanan çip, hücre bağlama çalışmalarında kullanıldı. PBS içinde süspansiyon olmuş farklı sayıda hücre, çip yüzeyinden 0, 5 ml/min hızla geçirildi ve rezonans frekansındaki değişimler kaydedildi. Sonuçlar RQCM (Maxtek) software kullanarak hesaplandı. İşlevselleştirilmiş QCM kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik açısından incelendi.

BULGULAR

Nanopartiküller ve çip yüzeyinin kaplanması:

Zeta (Z ζ) boyut analizi ile hesaplanan Z potansiyeli süspansiyon içerisindeki bir parçacık ile tanımlanan fiziksel bir özelliktir. Bu kavram özellikle emülsiyonların optimizasyonu için kullanılabilir. Ölçüm için yeterli yoğunluğa sahip nanopartikül çözeltisi nanoboyut analizörüne ölçüm yapıldı. Nanopartikül boyutları ile ilgili ölçüm sonuçları Şekil-1'de gösterilmektedir. Zeta boyut analiziyle partiküllerin 73,22 nm ortalama çapta oldukları ve polidispersitenin 0,229 olduğu saptandı (Şekil-1).

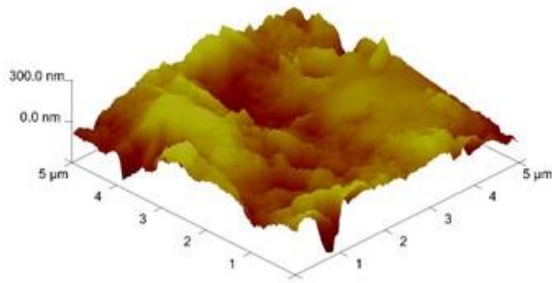
Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.n...)
Z-Average (d.nm): 73.22	Peak 1: 92.70	98.4
PDI: 0.234	Peak 2: 4544	1.6
Intercept: 0.888	Peak 3: 0.000	0.0
Result quality: Good		



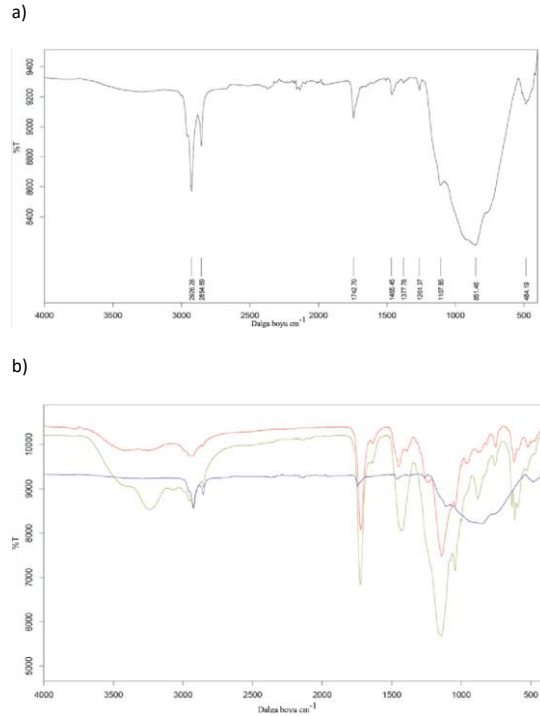
Şekil-1. Nanopartiküllerin boyutları.

Nanopartikül ile kaplanmış QCM çipindeki yüzey tabakasının kalınlığı ellipsometrede incelendi. Kalınlık ölçümü 532 nanometre(nm) dalga boyunda ve 62°lik geliş açısında gerçekleştirildi. Ölçümler; yüzey kaplanmamış ve polimerle kaplanmış QCM yüzeyi için yapıldı. Sonuçlar Zeta-sizer ölçümleri ile karşılaştırılarak her iki sonucun uyumlu olduğu belirlendi.

Nanopartiküllerin ölçümlerinden hesaplanan boyut 73,22 nm olduğu için 20 nm'lik boş çip üzerinde ise 87 nm'lik nanopartikül katmanı olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak, nanopartiküllerin çip yüzeyinde homojen bir tabaka oluşturdukları saptandı. QCM çipinin kalınlık ölçümleri Tablo-1'de verilmiş ve yüzeyin atomik güç fotoğrafı ise Şekil-2'de sunulmaktadır. Nanopartiküllerin etkisiyle yüzeyde oluşan hidrofilitate temas açısı ölçümleriyle desteklendi (Tablo-1). Çip yüzeyinin kimyasal yapısı FTIR ile incelendi. Şekil-2'de görülen spectrum poliHEMA nanopartiküllerin 1722 cm^{-1} (C=O), 3417 cm^{-1} (-OH), 2925 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), ve 1139 cm^{-1} (C=C) de gözlenen tipik zirvelerini içermektedir (Şekil-3) (11).



Şekil-2. Nanopartikül kaplı QCM çip yüzeyinin atomik güç (AFM) mikroskop görüntüsü



Şekil-3. QCM çip yüzeyinin nanopartikül kaplama öncesi (a) ve sonrası (b) FTIR spektrumları.

İşlevselleştirilmiş QCM çipinde hücre absorpsiyonu:

Transferrin ve noç4 ile her2/neu antikorları bağlanmış ve QCM çipinin ilk aşamada 0, 1 M pH 7,4 PBS yüzeyinden peristaltik pompa yardımıyla geçirilerek dengelenmiştir. Hücreler 1 ml PBS içinde belirli sayıda süspansiyon edilerek çip yüzeyine uygulanmak üzere hazırlandı.

Tablo-1. Nanopartikül kaplı QCM çip yüzeyinin kalınlık değerleri ve temas açısı değerleri

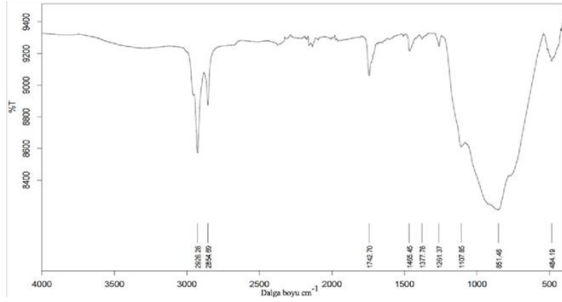
	Elipsometre (nm)	Temas Açısı (Boş QCM çip yüzeyi)
Boş QCM çip yüzeyi ölçümleri	20	Su damlası 85± 1.72
Nanopartikülle fonksiyonelleştirilmiş QCM çip yüzeyi ölçümleri	87	Nanopartikül çözeltisi 66.82± 5.71

Tablo-2. HER2, Notch4 ve transferin bağlı QCM çip için izoterm değerleri. QCM çipten geçirilen hücre sayısı süzpansiyondaki hücre/ml PBS olarak belirtilmiştir.

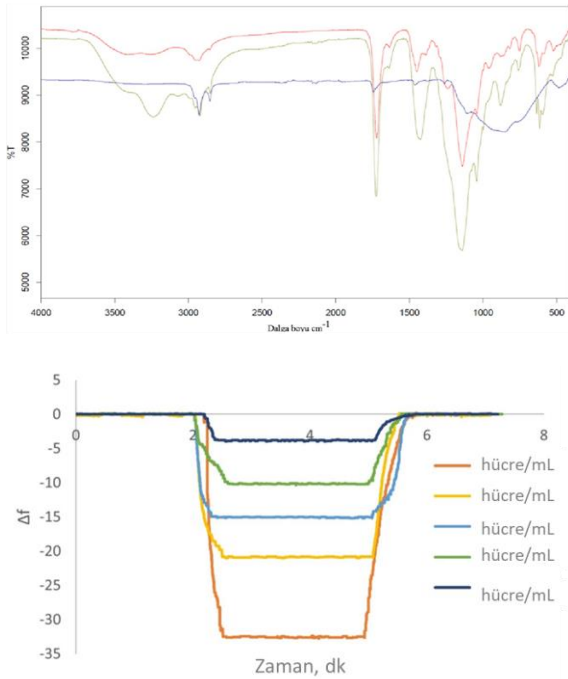
Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
Δ_{max}	0.63	Δ_{max} 4.806
K_A , hücre/ml	0.0076	$1/n$ 0.22
K_D , ml/hücre	130.15	R^2 0.97
R^2	0.99	K_A , hücre/ml 0.012
		K_D , ml/hücre 80.37
		R^2 0.98

Frekans dengelendikten sonra, QCM sisteminde SKBR3, MDA-MB 231 ve fibroblast hücrelerinin her biri sırayla 10-500 hücre/ml içeren süspansiyonlar halinde uygulandı. QCM çipe bağlanan SKBR3 hücrelerinin artan sayısına bağlı olarak rezonans frekansında oluşan değişimler belirlendi (Şekil-4).

a)



b)

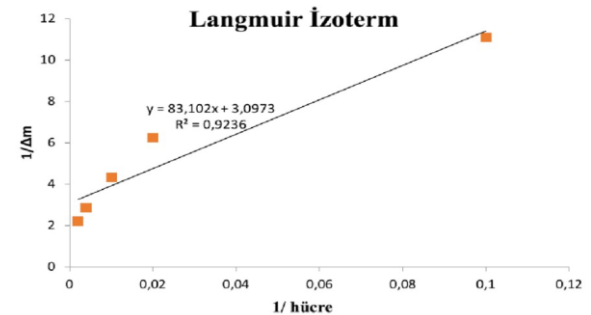


Şekil-4. Çipe bağlanan hücre sayısına bağlı frekans değişimleri

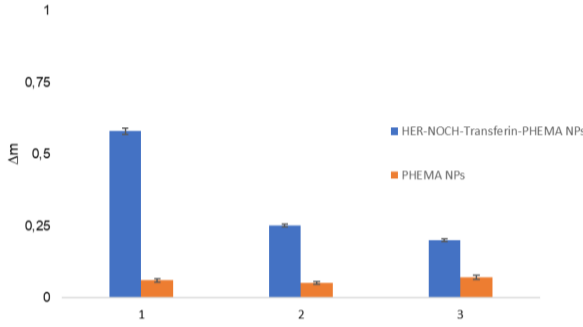
Hücreler sisteme verilirken çip yüzeyinde maksimum bağlanmanın olduğu, yani sistemin tepkisinin doğrusal forma yaklaştığı plato değerine 8 dakika geçtikten sonra ulaşıldı. Hücrelerin uzaklaştırılması için sisteme 1M Sodyum Klorür (NaCl) verildi ve tüm bağlama, çıkarma ve rejenerasyon aşamalarını içeren döngü 15 dakikada tamamlandı. Hücre

sayısındaki artışa göre uygulamalardan elde edilen veriler minimum saptama değerinin (LOD) hesaplanmasında kullanıldı.

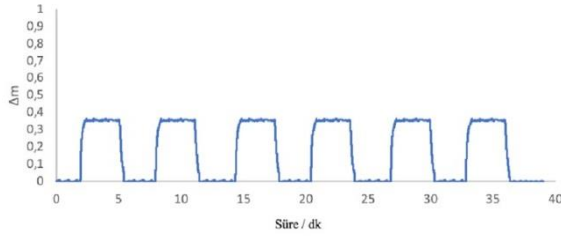
LOD değeri olarak belirtilen sensörün tespit etme limiti açıklanan çalışma koşullarında saptanan ama miktarının ölçülmesi mümkün olmayan en düşük analit derişimidir (12). LOD'nin yanı sıra sensörün tespit miktar sınırını belirten LOQ değeri ise açıklanan çalışma koşulları altında kabul edilebilir hassasiyet ve bu hassasiyetle belirlenen analitin en düşük derişimidir (13). Noç 4 ve her2/neu ile transferrin bağlı sistemin etkinliği Şekil-4'te gösterildiği gibi 4 hücre/ml LOQ değeri ise 10 hücre/ml olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyona dayalı olan bu tip analizlerde denge reaksiyonundaki gibi belirli miktarda adsorplayıcı ile bir madde etkileştiğinde, adsorbe edilen madde konsantrasyonu adsorban yüzeyde dengeye gelene kadar azalmaktadır. Adsorpsiyon Adsorpsiyon dengelendikten sonra çözeltideki adsorplanan madde miktarı sabitleşir. Adsorpsiyonda sıcaklık etken olduğu için sabit sıcaklıkta derişim başlıca etken olmaktadır. Sabit sıcaklıkta denge halinde olan çözeltiden kalan çözününen derişimine karşı birim adsorplayıcının miktarı grafik oluşturularak izoterm elde edildi (Tablo-2). Freundlich, Langmuir ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri olan bu kavramlar hücrelerin bağlanma şekillerini incelemekte kullanıldı. Şekil-5'te verilen doğruya göre her2/neu, noç4 ve transferrin ile bağlı olan QCM çip yüzeyi için regresyon katsayısının (R^2) en uyumlu olduğu model olarak Langmuir izoterm modeli olarak belirlendi. Bu model, adsorbanın, çözününeni bağlayabilen ve farklı eşdeğer kısımlardan oluşan ideale yakın bir katı yüzey olduğunu göstermektedir.



Şekil-5. QCM biyosensörde hücre bağlanma Langmuir izotermi



Şekil-6. Sadece nanopartikül kaplı ve işlevselleştirilmiş çiplerde hücre absorpsiyonu: 1:SKBR3, 2: MDA-MB 231, 3: Fibroblast hücreleri.



Şekil-7. QCM biyosensörün tekrarlı kullanımı.

Karşılaştırmalı analiz için gerçekleştirilen her2/neu, noç4 ve transferrin molekülünün bağlı olduğu QCM sensörde frekans değişimi (Δm) SKBR3 hücreleri için 0,58 bulundu ve yalnızca Polihidroksietilmetakrilat nanopartiküllerinin kaplı çip yüzeyi için ise bu değer 0,061 olarak bulundu. MDA-MB-231 hücreleri için ise bu değerler sırasıyla 0,251 ve 0,051, fibroblast hücreleri için de 0,201 ve 0,071'dir (Şekil-6). Seçicilik QCM sensör için önemli bir parametredir. Seçicilik özelliğini belirlemek için, QCM sensöre L929 hattı olan fare fibroblast hücreleri ve MDA-MB 231 insan meme kanseri hücreleri 10-500 hücre/ml yoğunlukta yarışmalı olarak uygulandı. Transferrinin hücre metabolizmasında rolü olmasından dolayı kanser ve kanser olmayan hücrelerin membranlarında transferrin reseptörü yer aldığı için, MDA-MB 231 hücreleri de sistemde tanınmıştır. QCM çipi; MDA-MB 231 hücrelerinde SKBR3 hücrelerine göre 1, 93 kat daha az seçicilik bulmuştur ancak yine de QCM çip tarafından MDA-MB 231 meme kanseri hücreleri tanınmıştır. Bunun nedeni, Notch4'ün MDA-MB 231 hücrelerinde aşırı eksprese edilmesi ve çip üzerinde bulunan Notch4 antikoru tarafından tanınıp yakalanmasıdır.

Tekrar kullanılabilirlik

Dengeleme bağlayıcı rejenerasyon döngüleri 10-500 tekrar edildi. HER2/neu2, Noç 4 ve transferrin bağlı QCM çipinin bağlama veriminde 5 döngü boyunca azalma saptanmadı. Sistemin tekrar kullanılabilirliği 500 hücre/ml olarak bulundu (Şekil-7).

TARTIŞMA

Kanser günümüzde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte ve kanser mortalitesinde geç tanının etkisi bilinmekte ve erken tanının önemi vurgulanmaktadır. Bu nedenle, kullanışlı, hızlı, duyarlı ve invaziv olmayan tanı araçları geliştirilmesi ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Kanser biyobelirteçleri ile ilgili bilgiler bu alanda yarar sağlamaktadır. Tanı aracı olarak biyosensörlerin geliştirilmesi kanser hücrelerinin membranındaki belirteçleri hedefleyecek şekilde planlanabilmektedir. Sensörün tanımlayıcı biyoreseptör bölümünü oluşturan moleküllerin membran reseptörlerine olan afinitesi biyosensörün işleyişinde önemli rol oynamaktadır (14). Kanser hücrelerini tanıyabilecek çok çeşitli moleküller bu amaçla kullanılmaktadır. Bu moleküller arasında en etkin ve yaygın olarak seçilen ise yüksek afiniteli bağlanma kapasitesine sahip olan antikorlardır (15). Ayrıca, transferrin gibi hücre membranında reseptörü bulunan ligantlar da biyosensör tasarımına uygun moleküllerdir. Kanser hücreleri artan metabolizmalarına gereken demiri membranlarındaki transferrin reseptörlerini çoğaltarak sağlarlar. Kanser hücrelerinde Transferrin reseptörünün ekspresyonu artmış olduğu için poliferasyon, migrasyon, invazyon, apoptoz ve metastaz gibi özellikler demir ile ilişkili yollardan etkilenmektedir (16, 17). Transferrin reseptörlerinin normal hücrelere göre kanser hücrelerinde tümör evresine paralel olarak artış gösterdiği ve bu artışın kötü prognozla ilişkili olduğu ve kanser için bir biyobelirteç olabileceği belirtilmektedir (18, 19). Noç4 meme dokusunun normal gelişim sürecinde proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli işlevlerde rol alması yanında meme hücrelerinde kanserleşme sürecinde etkin rol aldığı belirlenmiş bir reseptördür (20, 21). Meme kanseri hücrelerinde bulunan bu belirtecin radyasyona direnç ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (22). Meme kanseri hücrelerinin tiplendirilmesinde kullanılan her2/neu ise tirozin kinaz ailesinden olup epidermal büyüme faktörü reseptörünün mutant formudur.

Meme kanseri hücreleri dışında bazı kanser hücrelerinde de metastatik potansiyel ve anjiogenezele ilişkilendirilmiştir (23). Dolayısıyla, her2/neu reseptör ekspresyonu kötü prognozla da ilişkili bulunmaktadır (24).

Son yirmi yılda QCM sistemine dayalı biyosensör tasarım çalışmaları büyük ivme kazanmış ve sıvı ya da gaz ortamlardaki analitler yanında hücrelerin de tanınabileceği biyosensörler geliştirilmiştir. Bu sistemin etiketlemeye gerek duymadan çalışması, düşük maliyeti, hızı gibi sahip olduğu özellikler tanı için de kolaylıklar sağlamaktadır. Etiketlemeye gerek duyulmayan QCM gibi sistemler maliyeti ve gereken zamanı azalttıkları için oluşan tepkime veya bağlanmanın eş zamanlı ve dolaysız yürütülmesine olanak sağladıkları için etkin tanı araçları oluşturmaktadırlar (25, 26).

Bu çalışmada literatürde yer alan daha önce geliştirdiğimiz QCM-noç, QCM-transferrin ve her2/neu-QCM sistemlerinin (11, 27, 28) çoklu ligant şeklinde uygulanması ve böylece meme kanseri hücrelerini daha etkin tanımlanması amaçlandı. Bu özelliğiyle geliştirilen QCM sistemi 3 farklı reseptör-ligant etkileşiminin kullanıldığı ilk sistemdir. QCM çip yüzeyinin PHEMA ile modifikasyonunun ardından HER2, Notch4 ve transferrin bağlı çip yüzeylerinden eş zamanlı olarak hücreler geçirildi. Eş zamanlı hücre analizlerinde QCM çipin tespit limiti (LOD) değeri 4 hücre/ml olarak bulundu. LOD değeri 12 hücre olarak bulunan önceki noç 4 antikor temelli biyosensöre göre üçlü ligant bağlı QCM sensörün daha hassas olduğu belirlendi (9).

Literatürde QCM biyosensör ile ilgili kanser hücresi tanımlama çalışmaları bulunmaktadır.

Örneğin, Poturnayová, A. ve arkadaşları her2/neu reseptörüne özgül bir aptasensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada hücre saptama limiti 550 hücre/ml olarak bulunmuştur. Çalışmada, akustik sensör yüzeyine biyotinlenmiş DNA aptamerleri bağlanmış olup yeterli hassasiyete ulaşamamıştır (29). Poturnayová, A. ve arkadaşlarının akustik sensörde çip yüzeyinin kalın olması ve hücre katman kalınlığının kayma dalgası penetrasyon derinliğine kıyasla yüksek olması gibi sorunların düşük hassasiyete ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada da, Zhu, Y. ve arkadaşları SKBR3 hücrelerini de HER2 reseptörü aracılığıyla saptamışlardır. Bunun için, her2/neu antikorunu altın nanopartiküllere bağlamışlar ve cam yüzeyde karbon elektrot yüzeyinde sandviç yapısı oluşturmuşlardır. Bu sistemde LOD değeri 26 hücre/ml olarak bulunmuştur (5). Bu çalışmada geliştirilen çoklu tanıma elemanı içeren QCM biyosensör önceki çalışmalara göre yüksek afinite sağlamış olup tekrar kullanılabilir olması verimini arttırmaktadır.

SONUÇ

Literatürde yer alan çalışmalarda birçok meme kanserine ilişkin biyobelirteçler aracılığıyla sensörler veya yöntemler geliştirilse de QCM sisteminde üçlü ligant temelli biyosensör çalışması daha önce yapılmamıştır. Geliştirilen bu sistem QCM'nin hassasiyetini membran reseptörlerine özgü çoklu ligant yaklaşımıyla birleştirmiş ve iyi bir tanı aracı alternatifi oluşturmuştur.

Çıkar çatışması: Çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries CA. Cancer J. Clin. 2018;68(6):394-424 .
2. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. Endocr Relat Cancer. 2010;17(4):R245-62.
3. Saylan Y, Akgönüllü S, Yavuz H, Ünal S, Denizli A. Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications. Sensors (Basel). 2019;19(6):1279.
4. Zhang Y, Yang D, Weng L, Wang L. Early lung cancer diagnosis by biosensors. Int J Mol Sci . 2013;14(8):15479-509.
5. Zhu Y, Chandra P, Shim YB. Ultrasensitive and selective electrochemical diagnosis of breast cancer based on a hydrazine-Au nanoparticle-aptamer bioconjugate. Anal Chem. 2013;85(2):1058-64 .
6. Bakhshpour M, Özgür E, Bereli N, Denizli A. Microcontact imprinted quartz crystal microbalance nanosensor for protein C recognition. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017;151:264-270.

7. Liu LS, Wu C, Zhang S. Ultrasensitive Detection of DNA and Ramos Cell Using In Situ Selective Crystallization Based Quartz Crystal Microbalance. *Anal Chem.* 2017;89(7):4309-4313.
8. Heydari S, Haghayegh G. Application of Nanoparticles in Quartz Crystal Microbalance Biosensors . *Journal of Sensor Technology* . 2014;(4)81-100 .
9. Bakhshpour M, Piskin AK, Yavuz H, Denizli A. Quartz crystal microbalance biosensor for label-free MDA MB 231 cancer cell detection via notch-4 receptor. *Talanta.* 2019;204:840-845 .
10. Zakrzewski F, de Back W, Weigert M, Wenke T, Zeugner S, Mantey R, Sperling C, Friedrich K, Roeder I, Aust D, Baretton G, Hönscheid P. Automated detection of the HER2 gene amplification status in Fluorescence in situ hybridization images for the diagnostics of cancer tissues . *Sci Rep* . 2019 ;9(1):8231.
11. Asep B, Dani N, Rosi O, Risti R. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. 2019; (4):97-118. doi:10.17509/ijost.v4i1.15806
12. Armbruster David A, Terry Pry. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews* vol. 2008: (29): 49-52.
13. Shrivastava A, & Gupta VB . Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists.* 2011; (2) 21-25.
14. Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens Bioelectron.* 2006;21(10):1887-92.
15. Tohill IE, *Biosensors for cancer markers diagnosis.* *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 2009;20(1):55-62 .
16. Daniels TR, Bernabeu E , Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY , Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer . *Biochim Biophys Acta* . 2012;1820(3):291-317.
17. Gu Z, Wang H, Xia J, Yang Y, Jin Z, Xu H, Shi J, De Domenico I, Tricot G, Zhan F. Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation . *Cancer Res.* 2015;75(11):2211-21 .
18. Ohkuma M, Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Kim HM, Shimomura M, Hirose H, Yanaga K , Mori M. Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells . *Ann Surg Oncol.* 2012;19(4):1357-64.
19. Singh M, Mugler K, Hailoo DW, Burke S, Nemesure B, Torkko K, Shroyer KR . Differential expression of transferrin receptor (TfR) in a spectrum of normal to malignant breast tissues: implications for in situ and invasive carcinoma . *Appl Immunohistochem Mol Morphol* . 2011;19(5):417-23 .
20. Kontomanolis EN, Kalagasidou S, Pouliliou S, Anthoulaki X, Georgiou N, Papamanolis V, Fasoulakis ZN. The Notch Pathway in Breast Cancer Progression. *Scientific World Journal.* 2018 ;2018:2415489 .
21. Hellström M, Phng LK, Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr* . 2007;1(3):133-6 .
22. Harrison H, Farnie G, Howell SJ, Rock RE, Stylianou S, Brennan KR, Bundred NJ, Clarke RB. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res.* 2010;70(2):709-18 .
23. Zeng P, Sun S, Li R, Xiao ZX, Chen H . HER2 Upregulates ATF4 to Promote Cell Migration via Activation of ZEB1 and Downregulation of E-Cadherin. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2223.
24. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* . 2009;101(10):736-50 .
25. Syahir A, Usui K, Tomizaki KY, Kajikawa K, Mihara H. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays . *Microarrays (Basel).* 2015;4(2):228-44 .
26. Huang XH, Pan W, Hu JG, Bai QS. The Exploration and Confirmation of the Maximum Mass Sensitivity of Quartz Crystal Microbalance. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2018;65(10):1888-1892.
27. Atay S, Pişkin K, Yılmaz F, Çakır C, Yavuz H, Denizli A . Quartz crystal microbalance based biosensors for detecting highly metastatic breast cancer cells via their transferrin receptors. *Anal Methods.* 2016;8(1):153-161
28. Yılmaz M, Bakhshpour M, Göktürk I, Pişkin AK, Denizli A. Quartz Crystal Microbalance (QCM) Based Biosensor Functionalized by HER2/neu Antibody for Breast Cancer Cell Detection. *Chemosensors.* 2021; 9(4):80.
29. Poturnayová A, Dzubinová L, Buríková M, Bízik J, Hianik T. Detection of Breast Cancer Cells Using Acoustics Aptasensor Specific to HER2 Receptors . *Biosensors (Basel).* 2019;9(2):72.