Yumurtalık Kanseri Tayinine Yönelik Grafen Oksit ve Katkılı Nanofiber İle Modifiye Edilmiş Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Tabanlı Biyosensör Geliştirilmesi

Development of a Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Biosensor Modified with Graphene Oxide and Doped Nanofibers for Ovarian Cancer Detection

Gizem Kaleli-Can
Department of Biomedical Engineering
İzmir Democracy University
İzmir, 35140, Türkiye
gizem.kalelican@idu.edu.tr

Fahriye Arslan
Department of Biomedical Engineering
İzmir Democracy University
İzmir, 35140, Türkiye
arslan989904@gmail.com

Özet—

Yumurtalık kanseri, kadınlar arasında en ölümcül jinekolojik malignite olup, geç tanı, yüksek nüks oranları ve tedavilere direnç nedeniyle zorluk teşkil etmektedir. Erken teşhis edilen vakalarda sağkalım oranlarının %90'ın üzerinde olması, bu konuda stratejileri kritik hale getirmektedir. Mevcut erken tanı yöntemleri sınırlı olduğundan, biyosensörler gibi yenilikçi teknolojilere yönelik çalışmalar artmaktadır. Yüksek hassasiyet, seçicilik, taşınabilirlik ve gerçek zamanlı analiz yetenekleriyle biyosensörler, tanı süreçlerinde önemli bir potansiyel sunmaktadır. Bu çalışmada, yumurtalık kanserinin erken teşhisinde HE4'ün tespiti için, kitosan ve grafen oksit katkılı nanofiberler kullanılarak, yüzey plazmon rezonans (SPR) tabanlı bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu sensör, düşük konsantrasyonlarda HE4 proteininin (1 nM ve 10 µM) SPR açısındaki artışlarla güçlü bağlanma ve moleküler etkileşim gösterdiğini kanıtlamıştır (1 nM için 104 m°(10^3), 10 nM için 164 m°(10^3)). Geliştirilen SPR-tabanlı biyosensör, yumurtalık kanserinin erken teşhisinde ultra hassas, yüksek seçicilikte ve tekrarlanabilir bir tanı aracı sunmayı hedeflemektedir.

Anahtar Kelimeler — Yüzey Plazmon Rezonans, He4, Biyosensör, Kitosan Nanofiber, Grafen oksit, Elektro-eğirme.

Abstract—

Ovarian cancer is the most lethal gynecological malignancy among women, posing significant challenges due to late diagnosis, high recurrence rates, and resistance to current treatments. The fact that survival rates exceed 90% in cases diagnosed at an early stage highlights the critical importance of early detection strategies. Since existing early diagnostic methods are limited, research on innovative technologies such as biosensors is increasing. With their high sensitivity, selectivity, portability, and real-time analysis capabilities, biosensors offer substantial potential in diagnostic processes. This study aims to develop a surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor for the detection of HE4, a key biomarker for early diagnosis of ovarian cancer, utilizing chitosan and graphene oxide-enhanced nanofibers. The sensor demonstrated strong binding and molecular interaction with HE4 protein at low concentrations (1 nM and 10 µM), as evidenced by significant increases in SPR angle shifts (104 m°(10^3) for 1 nM and 164 m°(10^3) for 10 nM). The developed SPR-based biosensor aims to provide an ultra-sensitive, highly selective, and reproducible tool for the early diagnosis of ovarian cancer.

Keywords — Surface Plasmon Resonance, SPR, HE4 (Human Epididymis Protein 4), Biosensor, Chitosan Nanofiber, Graphene Oxide, Electrospinning.

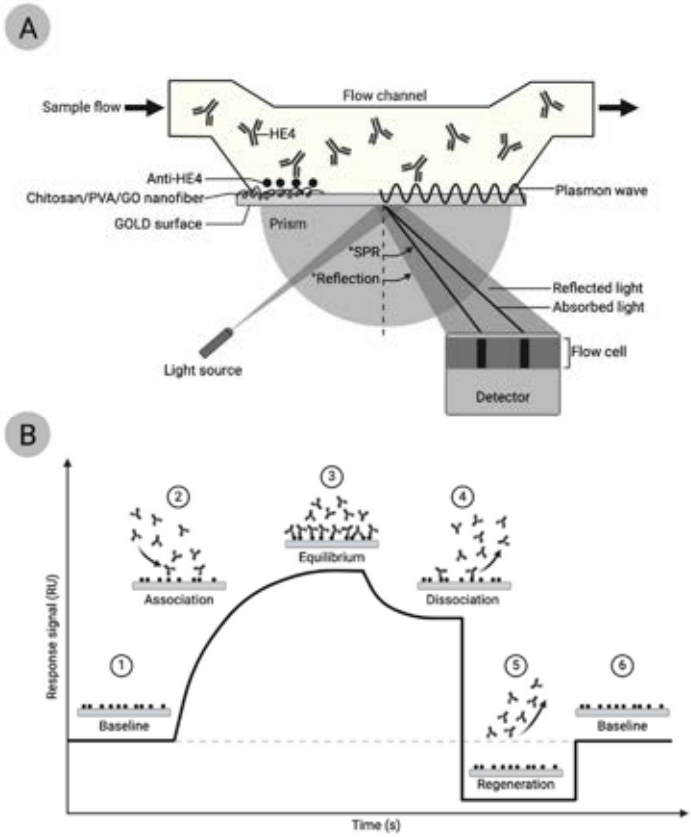
I. GİRİŞ

Yumurtalık kanseri, kadınlarda erken teşhis edildiğinde başarıyla tedavi edilebilen ancak ileri evrelerde yüksek mortalite oranlarına yol açan önemli bir sağlık problemidir [1-4]. Hastalığın belirtilerinin spesifik olmaması ve erken evrelerde sıklıkla asemptomatik seyretmesi, erken teşhisin büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Bu durum, yeni ve daha duyarlı tanı yöntemlerine olan ihtiyacı açıkça ortaya koymaktadır [5-8].

Yüzey plazmon rezonansı (SPR) teknolojisi, yüksek hassasiyeti, etiketsiz ölçüm yapabilme özelliği ve gerçek zamanlı analiz imkanı, biyosensör uygulamaları için ideal bir platform sunmaktadır [9-17]. Özellikle, kanser gibi kronik hastalıkların erken teşhisinde, SPR tabanlı biyosensörlerin

979-8-3315-2981-9/24/$31.00 ©2024 IEEE

kullanımı ile daha hassas ve hızlı sonuçlar elde edilebilmektedir [18-21].



Şekil 1: SPR (Yüzey Plazmon Rezonansı) yöntemi ile HE4 seviyelerinin ölçüm prensibi şu şekildedir. **(A)** ASENSIS'teki optik ünitenin reaksiyonların şematik tasviri gösterilmektedir. İlk reaksiyonda, örnek çözeltideki HE4, immobilize edilmiş anti-HE4 ile reaksiyona girer. Sensör çipindeki altın tabaka, SPR için gerekli fiziksel koşulları oluşturur. HE4, Kitosan/PVA/GO çözeltisi ile oluşturulan nanofiber matriksinin tampon çözeltisi ile temas halinde olacağı şekilde akış hücresine monte edilir. Çözelti akış hücresinden geçirilir ve HE4, Anti-HE4'e bağlanır. SPR cihazı, sensör çipi yüzeyine yakın sulu tabakadaki kütle artışını, kırılma indeksindeki değişiklikleri ölçerek tespit eder. Anti HE4'e bağlı HE4'ler, akış hücresinden geçirildikten sonra anti-HE4 ile reaksiyona girer. Anti-HE4/HE4 bağlanması, SPR açısını daha da artırır. **(B)** SPR (Yüzey Plazmon Rezonansı) analizinde bir bağlanma (association) ve ayrılma (dissociation) eğrisini göstermektedir. Grafikte, zaman (x ekseni) ve yanıt sinyali (RU) (y ekseni) boyunca SPR sensöründeki süreçler gösterilmektedir. (1) Bu aşamada sensör çipinde henüz bir bağlanma gerçekleşmemiştir. Yüzey sabit ve sinyal değişmeden kalır. (2) Analit sensör yüzeyine eklenir ve immobilize edilmiş liganda bağlandıkça yanıt sinyalinde artış gözlemlenir. (3) Bağlanma ve çözünme hızları dengeye ulaştığında sinyal bir plato noktasına gelir. Bu denge, bağlanan ve ayrılan moleküllerin oranının eşit olduğu noktadır. (4) Analit akışından arındırıldığında, moleküller sensör yüzeyinden ayrılmaya başlar ve sinyal düşmeye başlar. (5) Bu aşamada yüzey, bağlanan moleküllerden tamamen temizlenir ve sinyal başlangıç seviyesine geri döner. Bu, yüzeyin yeniden kullanıma hazır olduğu anlamına gelir. (6) Sensör yüzeyi başlangıç durumuna döner ve sinyal yine sabit hale gelir.

Yumurtalık kanserinin erken teşhisinde potansiyel bir biyobelirteç olan HE4 proteini, serum seviyelerinin yumurtalık kanserli hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu bildirilmektedir [22]. Bu nedenle, HE4'ün hassas ve spesifik bir şekilde tespiti, yumurtalık kanserinin erken teşhisinde kritik bir öneme sahiptir. Ancak, mevcut HE4 tespit yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin yetersiz olması, yeni ve daha gelişmiş tanı yöntemlerine olan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır [23-24].

Bu çalışmada, yumurtalık kanserinin erken teşhisinde kullanılan mevcut yöntemlerin sınırlılıklarını aşmak amacıyla, HE4 proteininin tespiti için yüksek hassasiyetli ve spesifik bir SPR tabanlı biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörde, kitosan ve grafen oksit gibi nanomalzemelerin sinerjistik etkisiyle sensörün yüzey alanı ve duyarlılığı artırılarak, HE4 proteininin daha hassas bir şekilde tespiti hedeflenmiştir (Şekil 1(A)). Kitosanın biyouyumlu olması ve grafen oksitin yüksek yüzey alanı ve elektriksel iletkenliği gibi özellikleri, bu malzemelerin biyosensör uygulamaları için uygun olmasını sağlamaktadır. Bu biyosensör sisteminin performansı, HE4 proteininin yüzeye bağlanma (assosiasyon) ve çözünme (dissosiasyon) kinetiklerini gerçek zamanlı olarak izleyerek değerlendirilmiştir (Şekil 1(B)). Bu süreç boyunca, HE4 proteini ile anti-HE4 arasındaki etkileşim, SPR sinyalinde bir artışa neden olarak, bağlanma ve çözünme dengelerini ortaya koymaktadır.

II. MALZEME VE YÖNTEM

SPR sistemi ASENSİS firması tarafından temin edilmiştir.



Şekil 2: ASENSİS firmasından temin edilen ASENSİS SPR cihazı ve optik hücresi.

A. Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Hazırlanması

Grafen oksit katkılı kitosan nanofiber üzerine anti-HE4 ile modifiye edilecek SPR çipleri dört aşamada hazırlandı:

1) Cam üzerine altın modifiyeli çiplerin temizlenmesi

2) Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen grafen oksit katkılı kitosan nanofiberler ile modifikasyonun yapılması

3)Fonksiyonelleştirilmiş nanofiberlere Anti-HE4 tutuklama; Aktivasyon ve deaktivasyon aşamaları

4) HE4 Bağlanma Ölçümleri

A.1.Cam üzerine altın modifiyeli çiplerin temizlenmesi

SPR çiplerinin altın kaplı yüzeyleri modifiye edilmeden önce, altın yüzey saf etil alkol (10 mL), aseton (10 mL) ve distile su (10 mL) aşamalarından geçirilerek temizlenmiştir. Son olarak, seyreltilmiş asit (10 mM hidroklorik asit) 2 dakika bekletilecek, ardından etanol ve distile su ile yıkanıp, azot gazı ile kurutulmuştur.

A.2.Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen grafen oksit katkılı kitosan nanofiberler ile modifikasyonun yapılması

Öncelikle kitosan (CS) çözeltisi, ağırlıkça %1 CS tozunun, ağırlık/ağırlık olarak %90 asetik asit ile damıtılmış su içinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. PVA tozu, PVA solüsyonu (ağırlıkça %10) elde etmek üzere karıştırılarak 70 °C'de damıtılmış su içerisinde çözündürüldü. CS/PVA/GO elektroeğirme öncü çözeltileri şu şekilde hazırlandı: GO dispersiyonu (ağırlıkça %1, sulu çözelti), CS çözeltisi (ağırlıkça %1) ve PVA çözeltisi (ağırlıkça %10) belirli bir hacimle karıştırıldı. Kitosan solüsyonu sulu PVA solüsyonu ile optimum olarak kabul edilen 3:7 ağırlık oranlarında karıştırıldı. GO içeriği CS'nin ağırlıkça %5'i olacak şekilde hazırlandı. Elektroeğirme için öncü çözeltisi yeterince karıştırılmıştır.

A.3.Fonksiyonelleştirilmiş nanofiberlere Anti-HE4 tutuklama; Aktivasyon ve deaktivasyon aşamaları

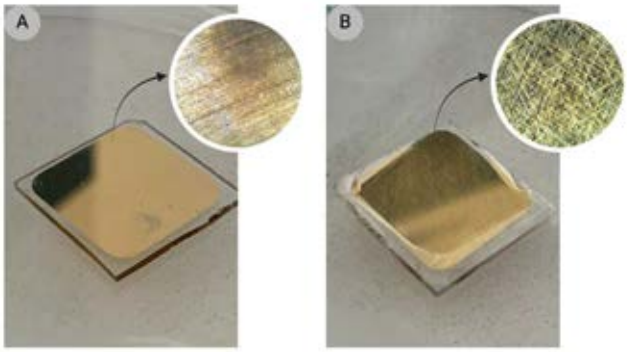
Grafen oksit katkılı kitosan nanofiber ile modifiye edilmiş SPR çipi, kontrollü şekilde PBS (pH:7.2) çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından farklı konsantrasyonlarda glutaraldehit çözeltileri (%1-%25 (v/v)) ve 10 µg/mL anti-HE4 şırınga pompası yardımı ile çip yüzeyinden geçirilmiştir. Sonrasında anti-HE4 tutuklanmış yüzeyde istenmeyen reaksiyonları önlemek için pH 8.5'e ayarlanmış 1.0 M etanolamin hidroklorür çözeltisi kullanılmıştır.

A.4.HE4 Bağlanma Ölçümleri

Anti-HE4 tutuklanmış yüzeyden 10 µg/mL HE4 içeren çözelti şırınga pompası yardımıyla akış ortamına verilmiştir. Bağlanma tepkisinin kaydedilmesi ile ölçülmüştür. Çalışma boyunca her bir akış sonrası antikor-antijen bağlarını çözmek ve yüzeyi tekrar kullanmak için, çip yüzeyi; PBS ve seyreltilmiş asit (10 mM hidroklorik asit) ile yıkanmıştır. Bu sayede aynı düzeyde birden fazla ölçüm yapılabildi.

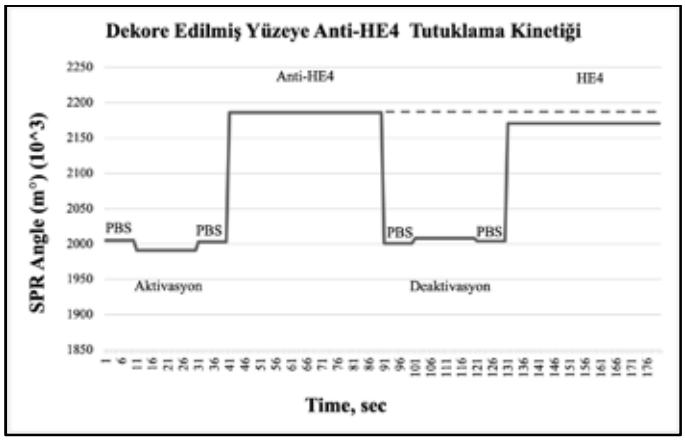
III. BULGULAR

Elektroeğirme yöntemi, yüksek manyetik alan altında polimerin nano boyutta fiber oluşturma üzerine oldukça basit ve düşük maliyetli bir teknolojidir. Manyetik alan, voltaj verilen iletken bir uçtan, toprağa bağlı konnektör yüzeye kadar oluşan manyetik alan çizgisi boyunca konnektörde birikerek oluşmaktadır. Nanofiber oluşumunda nem, mesafe, akış hızı ve voltaj parametrelerine bağlı olarak üç boyutlu bir yapı oluşmaktadır. Bekleme süresi ve akış hızına bağlı olarak kaplamanın kalınlığının değiştiği bilinmektedir. Bu sayede kaplanmak istenilen yüzeyin kalınlığı istenilen seviyelerde ayarlanabilir. Bu amaçla boncuksuz ve tekdüze nanofiber eldesi için optimum konsantrasyonlar belirlenmiştir (CS:PVA 3:7, GO %5). Optimizasyon sonucunda uygulama süresi 2 dakika olarak belirlenmiştir. CS/PVA çözeltisine grafen oksit çözeltileri eklenerek şekil 3B'deki gibi boncuksuz ve tekdüze nanofiber eldesine olanak sağlayan kompozisyon optimize edilmiştir. Daha sonra, mesafe (9 cm), akış hızı, (0.3 ml/h) ve voltaj (14 kV) parametreleri optimum koşullar olarak kaydedilmiştir.



Şekil 3: SPR cihazında kullanılan altın çipler. (A) Yüzey modifikasyonu yapılmamış altı çip. (B) CS/PVA/GO çözeltisinden elde edilen nanofiberlerle modifiye edilmiş altın çip.

Dekore edilmiş yüzey üzerinde gerçekleştirilen Anti-HE4 tutuklama kinetiği Şekil 4'te incelendiğinde, aktivasyon sürecinin başlangıcında SPR açısının yaklaşık 2000 m° (10^3) olduğu gözlemlenmiştir. Aktivasyon sonrasında, Anti-HE4'nin yüzeye bağlanmasıyla birlikte SPR açısı yaklaşık 2200 m° (10^3) seviyesine yükselmiştir. Deaktivasyon aşamasında ise SPR açısında bir miktar azalma gözlemlenmiş, ancak bu azalma minimal düzeyde kalmış ve SPR açısı yaklaşık 2000 m° (10^3) seviyesine geri dönmüştür. Son olarak, HE4 proteininin eklenmesiyle SPR açısında tekrar bir artış meydana gelmiş ve bu artış, Anti-HE4'nin bağlandığı seviyeye yakın bir noktaya ulaşmıştır. Bu durum, HE4 proteininin yüzeye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir.

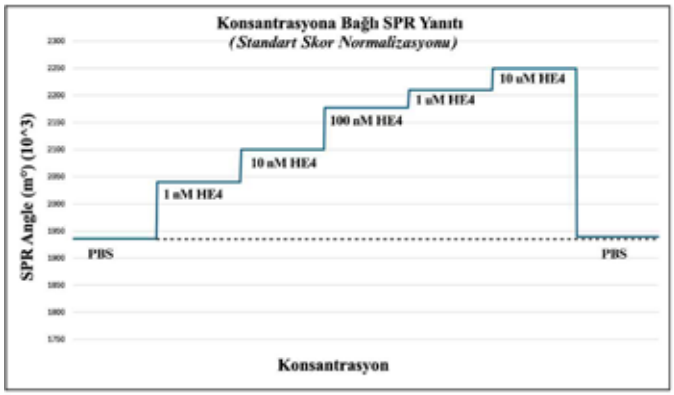


Şekil 4: Kitosan/PVA/GO nanofiber modifiyeli altın çip yüzeyine Anti-HE4 tutuklama sırasında oluşan SPR kinetik eğrisi.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, HE4 proteininin SPR açısındaki kademeli artış ile nasıl ilişkilendiğini açıkça ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler, HE4 konsantrasyonunun artışıyla SPR açısında kademeli bir yükseliş olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Bu bulgular (şekil 5), HE4 proteininin çip yüzeyine bağlanma etkinliğini ve bu bağlanmanın HE4 konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olduğunu doğrulamaktadır. Grafikte, en düşük konsantrasyon olan 1 nM seviyesinden 10 µM'ye kadar artan HE4 konsantrasyonları için SPR açısında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, anti-HE4'nin yüzeyde HE4 proteinini spesifik olarak tanıyıp bağladığını ve bu bağlanmanın SPR cihazı ile yüksek hassasiyette tespit edilebildiğini

göstermektedir. Literatürde çeşitli kanser biyobelirteçlerini tanımada yapılan çalışmalarda tespit sınırı 0.4 nM ile 50 nM aralığındadır [25-26]. Bizim çalışmamızda geliştirilen SPR tabanlı biyosensör, 1 nM seviyesinde başarılı bir tespit gerçekleştirmiş olup, literatürde belirtilen hassasiyet aralığı ile uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur.



Şekil 5: Bu grafikte, yüzeyi anti-HE4 ile modifiye edilmiş kitosan/PVA/GO nanofiberlerle modifiye edilmiş altın çip üzerinden çeşitli konsantrasyonlarda HE4 proteini geçirilmiş ve Surface Plasmon Resonance (SPR) cihazı kullanılarak elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.

Grafikte sunulan bu veriler, immünosensörün HE4 proteini için yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu ve HE4 konsantrasyonlarının kesin bir şekilde ölçülebileceğini kanıtlamaktadır. Bu sonuçlar, anti-HE4 ile modifiye edilmiş yüzeyin etkinliğini ve bu sensörün HE4 gibi biyobelirteçlerin tespitinde kullanım potansiyelini göstermektedir. Dolayısıyla, bu SPR tabanlı immünosensör, klinik uygulamalarda HE4 seviyelerinin izlenmesi ve erken tanı süreçlerinde kullanılabilir bir araç olarak değerlendirilebilir.

İlerleyen çalışmalarda, sensörün performansını daha düşük HE4 konsantrasyonları, özellikle picomolar (pM) seviyelerinde test ederek değerlendirmek amaçlanmaktadır. Bu testler, sensörün alt tespit limitini belirlemek ve klinik tanı uygulamalarında kullanılabilirliğini teyit etmek açısından önem arz etmektedir. Bu bağlamda, SPR sinyalindeki olası değişiklikler üzerinden sensörün düşük konsantrasyonlardaki HE4'ü tespit edebilme yeteneği daha da netleştirilecektir.

KAYNAKLAR

[1] Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., & Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. The Lancet, 384(9951), 1376-1388.
[2] Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z et al. New tumor markers: CA 125 and beyond. International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society 2005;15 Suppl 3:274-81.
[3] Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. Molecular & cellular proteomics : MCP 2004;3:355-66.
[4] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians 2011;61:69-90.
[5] Koyun, A., Ahlatcıoğlu, E., Koca Ġpek, Y., Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, Prof. Sadik Kara (Ed.), ISBN: 978-953-51-0609-8, InTech, 2012,
[6] Çolak, A. (2013). Over Kanserinin Erken Tanı ve Takibinde Ca 125 ve He4 ün Sensitivitesi ve Spesifitesinin Karşılaştırılması.
[7] Hajikhani, M., & Lin, M. (2022). A review on designing nanofibers with high porous and rough surface via electrospinning technology for rapid detection of food quality and safety attributes. Trends in Food Science & Technology.
[8] Netsuwan, P., Mimiya, H., Baba, A., Sriwichai, S., Shinbo, K., Kato, K., ... & Phanichphant, S. (2014). Long-range surface plasmon resonance immunosensor based on water-stable electrospun poly (acrylic acid) fibers. Sensors and Actuators B: Chemical, 204, 770-776.
[9] Zhang H, Sun Y, Gao S, Zhang J, Zhang H, Song D: A novel graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensor for immunoassay. Small 2013, 9: 2537. 10.1002/smll.201202958
[10] Wu T, Liu S, Luo Y, Lu W, Wang L, Sun X: Surface plasmon resonance-induced visible light photocatalytic reduction of graphene oxide: using Ag nanoparticles as a plasmonic photocatalyst. Nanoscale 2011, 3: 2142. 10.1039/c1nr10128e
[11] Ryu Y, Moon S, Oh T, Kim Y, Lee T, Kim DH, Kim D: Effect of coupled graphene oxide on the sensitivity of surface plasmon resonance detection. Appl Opt 2014, 53: 1419. 10.1364/AO.53.001419
[12] Choi SH, Kim YL, Byun KM: Graphene-on-silver substrates for sensitive surface plasmon resonance imaging biosensors. Opt Express 2011, 19: 458–466. 10.1364/OE.19.000458
[13] Wu L, Chu HS, Koh WS, Li EP: Highly sensitive graphene biosensors based on surface plasmon resonance. Opt Express 2010, 18: 14395–14400. 10.1364/OE.18.014395
[14] Zhang J, Sun Y, Xu B, Zhang H, Gao Y, Zhang H, Song D: A novel surface plasmon resonance biosensor based on graphene oxide decorated with gold nanorod–antibody conjugates for determination of transferrin. Biosens Bioelectron 2013, 45: 230–236.
[15] Chiu N-F, Huang T-Y: Sensitivity and kinetic analysis of graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensors. Sens Actuators B Chem 2014, 197: 35.
[16] Aliofkhazraei M: Advances in Graphene Science. Volume 8. InTech—Open Access Company; 2013. Graphene oxide based surface plasmon resonance biosensors, Croatia Graphene oxide based surface plasmon resonance biosensors, CroatiA
[17] Salihoglu O, Balci S, Kocabas C: Plasmon-polaritons on graphene-metal surface and their use in biosensors. Appl Phys Lett 2012, 100: 213110. 10.1063/1.4721453
[18] Das, S., Devireddy, R., & Gartia, M. R. (2023). Surface plasmon resonance (SPR) sensor for cancer biomarker detection. *Biosensors*, *13*(3), 396.
[19] Kumar, V. R., Kampan, N. C., Abd Aziz, N. H., Teik, C. K., Shafiee, M. N., & Menon, P. S. (2023). Recent advances in surface plasmon resonance (SPR) technology for detecting ovarian cancer biomarkers. *Cancers*, *15*(23), 5607.
[20] Wu, T., Shao, Y., Wang, Y., Cao, S., Cao, W., Zhang, F., ... & Wang, Y. (2017). Surface plasmon resonance biosensor based on gold-coated side-polished hexagonal structure photonic crystal fiber. *Optics express*, *25*(17), 20313-20322.
[21] De La Franier, B., & Thompson, M. (2019). Early stage detection and screening of ovarian cancer: A research opportunity and significant challenge for biosensor technology. Biosensors and Bioelectronics, 135, 71-81.
[22] Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. Cancer research 2003;63:3695- 700.
[23] Moore RG, Brown AK, Miller MC et al. Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus. Gynecologic oncology 2008;110:196-201.
[24] Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. British journal of cancer 2009;100:1315-9.
[25] Ribaut, C., Voisin, V., Malachovská, V., Dubois, V., Mégret, P., Wattiez, R., & Caucheteur, C. (2016). Small biomolecule immunosensing with plasmonic optical fiber grating sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *77*, 315-322.
[26] Swami, S., Kayenat, F., & Wajid, S. (2024). SPR biosensing: Cancer diagnosis and biomarkers quantification. *Microchemical Journal*, *197*, 109792.