

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TROMBOSİT HÜCRE MEMBRANINA ANNEXIN V  
BAĞLANMASININ PİEZOELEKTRİK ALGILAYICILAR İLE  
ÖLÇÜLMESİ**

**BUĞRA AYAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**2014**



**TROMBOSİT HÜCRE MEMBRANINA ANNEXIN V  
BAĞLANMASININ PİEZOELEKTRİK ALGILAYICILAR İLE  
ÖLÇÜLMESİ**

**ANNEXIN V BINDING DETECTION ON PLATELET CELL  
MEMBRANE WITH PIEZOELECTRIC BIOSENSOR**

**BUĞRA AYAN**

Başkent Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.  
2014

“Trombosit Hücre Membranına Annexin V Bağlanması Piezoelektrik Algılayıcılar ile Ölçülmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından, 18/06/2014 tarihinde, **BIYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :  
Prof.Dr. M. Ali ONUR

Üye (Danışman) :  
Doç.Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye :  
Doç.Dr. İ. Cengiz KOÇUM

**ONAY**

.../.../2014

Prof. Dr. Emin AKATA  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŐEKKÜR

Çalışmanın sonuca ulaőtırılmasında ve karşılaşılan güçlüklerin aőtılmasında yardımcı ve yol gösterici olan danışmanım sayın Doç.Dr. Mustafa KOCAKULAK'a,

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca beni destekleyen Ankara Güven Hastanesi Biyomedikal Müdürlüğü'nün değerli çalışanlarına,

Değerli arkadaşım Mert KESER'e,

En büyük destekçim ve her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZ

### **TROMBOSİT HÜCRE MEMBRANINA ANNEXIN V BAĞLANMASININ PIEZOELEKTRİK ALGILAYICILAR İLE ÖLÇÜLMESİ**

Buğra AYAN

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Trombositler hemostazın sağlanmasında görev alan kan hücreleridir. Trombositler endotel dışına çıktığında ya da yabancı bir yüzeyle etkileştiğinde pıhtılaşma kaskadı devreye girer. Trombositlerin agregasyona uğramadan önceki formları oldukça önemli olup, apoptosis öncesi hakkında bilgi vermesi teşhis ve tedavi süreçlerini dolayısı ile hastanın hayatını doğrudan etkilemektedir. Bu amaçla erken trombosit apoptosisi tespiti hayati öneme sahiptir.

Bu çalışmanın amacı, trombosit aktivasyonu ve erken trombosit apoptosisini hassas, hızlı ve ucuz olarak ölçebilen bir sistem geliştirmektir. Bu amaçla piezoelektrik kristallerin yüzey temizliği, hidrofilik yüzey eldesi işlemlerinin ardından sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonu yapılarak uzatma kolu oluşturulmuştur. Erken trombosit apoptosisi tanıyıcı molekülü olan Annexin V immobilizasyonu sonrası farklı trombosit sayısı içeren kan derişimlerinde deneyler yapılmıştır. Farklı derişimler Annexin V biyosensörleri ve farklı derişimlerdeki kan süspansiyonlarındaki frekans değişimi Annexin V konsantrasyonu ve trombosit sayısı ile orantılıdır. Bu sonuç AFM ve SEM görüntüleriyle de desteklenmiştir. Geliştirilen piezoelektrik biyosensörle mevcut sistemlere göre hızlı, hassas ve ucuz bir sistemdir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** biyosensör, annexin V, trombosit aktivasyonu ve apoptosisi

**Danışman:** Doç. Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü.

## **ABSTRACT**

### **ANNEXIN V BINDING DETECTION ON THE PLATELET CELL MEMBRANE WITH PIEZOELECTRIC BIOSENSOR**

Buğra AYAN

Başkent University Institute Of Science And Engineering

The Department of Biomedical Engineering

Platelets are blood cells that ensure hemostasis. When platelets get out of endothelium or get in interaction with another surface the coagulation cascade steps in. Form of platelets just before they expose to aggregation are so critical and they provide information on pre-apoptosis situation, which directly affects the diagnosis and treatment processes and thus the life of patient. Therefore, detection of early platelet apoptosis is of vital importance.

The aim of this study is to develop a system which is capable of measuring the early platelet apoptosis and platelet activation in an accurate, fast and economic manner. To that end, after surface cleaning of piezoelectric crystals and obtaining a hydrophilic surface an extension arm was developed by sistamine and glutaraldehyde immobilization. After immobilization of Annexin V which is responsible for detection of early platelet apoptosis several tests were conducted with blood concentrations with different platelet numbers. The said different concentrations are proportional to the Annexin V biosensors and the change in frequency at blood suspensions with different concentrations to the Annexin V concentration and the number of platelets; which results were also supported with AFM and SEM images. The piezoelectric biosensors newly developed provide a more accurate, economic and faster system in comparison with the existing systems.

**KEYWORDS:** biosensor, annexin V, platelet activation and apoptosis

**Advisor:** Assoc. Prof.Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent University, The Department of Biomedical Engineering.

# İÇİNDEKİLER LİSTESİ

Sayfa

ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ .....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	ix
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı .....	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	2
2.1 Trombositler .....	2
2.1.1 Trombositlerin yapısal anatomisi .....	2
2.1.2 Trombosit granülleri.....	4
2.1.3 Trombosit aktivasyonu ve apoptosisi.....	5
2.2 Trombosit Aktivasyonu ve Apoptosisi Ölçüm Yöntemleri.....	10
2.2.1 Akış sitometri.....	10
2.2.2 ELISA .....	11
2.2.2.1 <u>Kompetitif(Yarışmalı) ölçümler</u> .....	12
2.2.2.2 <u>Yarışmasız(Sandwich) ölçümler</u> .....	12
2.2.3 Yüzey plasmon rezonans (SPR).....	14
2.3 Biyosensörler.....	15
2.3.1 Biyosensör performans parametreleri.....	16
2.3.1.1 <u>Seçicilik</u> .....	16
2.3.1.2 <u>Hassasiyet</u> .....	16
2.3.1.3 <u>Doğrusallık</u> .....	17
2.3.1.4 <u>Geniş bant aralığı</u> .....	17
2.3.1.5 <u>Tayin Limiti(LOD)</u> .....	17
2.3.1.6 <u>Tepki Süresi</u> .....	17
2.3.1.7 <u>Tekrarlanabilirlik</u> .....	18
2.3.1.8 <u>Kararlılık</u> .....	18
2.3.1.9 <u>Ölçüm başına maliyet ve zaman</u> .....	18
2.3.2 Biyosensör çeşitleri.....	18



2.3.2.1	<u>Elektrokimyasal biyosensörler</u> .....	18
2.3.2.2	<u>Optoelektrik biyosensörler</u> .....	19
2.3.2.3	<u>Termal biyosensörler</u> .....	19
2.3.3	Piezoelektrik etki.....	19
2.3.3.1	<u>Kuvars kristal mikroterazi(QCM)biyosensörler ve özellikleri</u> .....	19
2.3.3.2	<u>Kuvars kristal mikroterazi(QCM)'in eşdeğer devresi</u> .....	21
2.3.3.3	<u>Saubey denklemi</u> .....	22
2.3.3.4	<u>Kuvars kristal mikroterazi(QCM)ile yapılan çalışmalar</u> .....	23
2.4	İmmobilizasyon Yöntemleri.....	23
2.4.1	Non-kovalent(Zayıf) yöntemler .....	24
2.4.1.1	<u>Adsorpsiyon</u> .....	24
2.4.1.2	<u>Mikroenkapsülasyon</u> .....	24
2.4.1.3	<u>Tutuklama</u> .....	24
2.4.1.4	<u>Çapraz bağlama</u> .....	25
2.4.2	Kovalent bağlama .....	25
2.5	Yüzey Karakterizasyonu.....	26
2.5.1	Atomik kuvvet mikroskobu(AFM) .....	26
2.5.2	Taramalı elektron mikroskobu(SEM) .....	26
<b>3.</b>	<b>DENEY AŞAMASI.</b> .....	<b>28</b>
3.1	Deneyde Kullanılan Cihazlar, Malzemeler, Kimyasallar .....	28
3.2.	Deneyin Yapılışı .....	29
3.2.1	Osilatör ve frekans sayıcı devreleri.....	30
3.2.1.1	<u>Colpitts osilatör devresi</u> .....	30
3.2.1.2	<u>Frekans sayıcı devresi</u> .....	30
3.2.2	Kuvars kristal biyosensör yüzeyinin oluşturulması .....	33
3.2.2.1	<u>Kuvars kristal yüzey temizliği</u> .....	33
3.2.2.2	<u>Kuvars kristal yüzey aktivasyonu</u> .....	34
3.2.2.3	<u>Sistamin immobilizasyonu</u> .....	34
3.2.2.4	<u>Glutaraldehit immobilizasyonu</u> .....	35
3.2.2.5	<u>Annexin V immobilizasyonu</u> .....	37
3.2.3	Kanla yapılan deneyler .....	38
3.2.4	Kuvars kristal yüzey karakterizasyonu .....	47
3.2.4.1	Taramalı elektron mikroskobu(SEM) görüntüleri .....	47
3.2.4.2	Atomik kuvvet mikroskobu(AFM) görüntüleri .....	64

<b>4. SONUÇ .....</b>	<b>68</b>
<b>KAYNAKLAR LİSTESİ .....</b>	<b>70</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Trombosit hücre kesiti.....	5
Şekil 2.2	Pıhtılaşma mekanizması .....	7
Şekil 2.3	Trombosit aktiflenme mekanizması .....	8
Şekil 2.4	Trombosit pıhtılaşma mekanizması .....	9
Şekil 2.5	Akış sitometri cihazı.....	11
Şekil 2.6	Yarışmalı(A) ve yarışmasız(B) ELISA ölçüm yöntemleri .....	13
Şekil 2.7	SPR blok diyagramı .....	14
Şekil 2.8	Biyosensör blok diyagramı.....	15
Şekil 2.9	Kuvars kristalin üç boyutlu yapısı.....	20
Şekil 2.10	AT kesim kuvars kristali.....	21
Şekil 2.11	Kuvars kristal mikroterazinin eşdeğer devresi .....	21
Şekil 2.12	Sistamin ve glutaraldehitin kuvars yüzeye immobilizasyonu.....	25
Şekil 2.13	Taramalı elektron mikroskobu şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.1	Colpitts osilatör devresi.....	30
Şekil 3.2	Hazırlanan frekans sayıcının blok diyagramı .....	31
Şekil 3.3	Arduino ile hazırlanan frekans sayıcının görünümü .....	31
Şekil 3.4	Arduino ile hazırlanan bilgisayar arayüzü .....	32
Şekil 3.5	PIC ile yapılmış frekans sayıcı devresi .....	32
Şekil 3.6	PIC ile yapılmış frekans sayıcının görünümü.....	33
Şekil 3.7	Sistamin molekül yapısı .....	34
Şekil 3.8	Sistamin derişiminin frekans değişimine etkisi(N=5).....	35
Şekil 3.9.	Glutaraldehit molekül yapısı .....	36
Şekil 3.10	Glutaraldehit derişiminin frekans değişimine etkisi(N=5).....	36
Şekil 3.11	Karıştırma hızının frekans değişimine etkisi(N=5) .....	37
Şekil 3.12	Farklı Annexin V konsantrasyonlarının immobilizasyona etkisi(N=5)..	38
Şekil 3.13	Tüm işlem basamaklarında kristallerin ortalama frekans değişimi.....	39
Şekil 3.14	Kan derişimi – trombosit sayısı grafiği(A), trombosit sayısı – PCT ilişkisi grafiği(B), trombosit sayısı – MPV ilişkisi grafiği(C) .....	41
Şekil 3.15	Trombosit sayısı – frekans değişimi grafiği(N=3).....	43
Şekil 3.16	Biyosensörün farklı trombosit sayılarındaki ortalama frekans değişimi (N=3) .....	44

Şekil 3.17 Farklı derişimlerdeki Annexin V biyosensörünün aynı trombosit sayısındaki kan derişimiyle etkileşimi(N=5) .....	46
Şekil 3.18 Kirli yüzeyin 150x SEM görüntüsü .....	47
Şekil 3.19 Temizlenmiş yüzeyin 200x SEM görüntüsü .....	48
Şekil 3.20 Temizlenmiş yüzeyin 200x SEM görüntüsü .....	49
Şekil 3.21 Yüksek derişimindeki aseton çözeltisinden dolayı aşınan yüzeyin 1000x SEM görüntüsü .....	50
Şekil 3.22 Ultra saf su ve ultrasonik banyo ile yıkanmamış kristalin 200x SEM görüntüsü.....	51
Şekil 3.23 Annexin V immobilizasyonu sonrası 40000x SEM görüntüsü .....	52
Şekil 3.24 Annexin V immobilizasyonu sonrası 20000x SEM görüntüsü .....	53
Şekil 3.25 Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 1600x SEM görüntüsü .....	54
Şekil 3.26 Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 1300x SEM görüntüsü .....	55
Şekil 3.27 Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 1200x görüntüsü .....	56
Şekil 3.28 Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 250x SEM görüntüsü .....	57
Şekil 3.29 203 K/mm <sup>3</sup> trombosit içeren kan derişimi uygulanmış kristalin SEM görüntüsü.....	58
Şekil 3.30 124 K/mm <sup>3</sup> trombosit içeren kan derişimi uygulanmış kristalin SEM görüntüsü.....	59
Şekil 3.31 Kristal A, Kristal B, Kristal C SEM görüntüleri ve histogramları .....	61
Şekil 3.32 Görüntü işleme yapıldıktan sonraki görüntüleri ve siyah renkli piksel yüzdesi .....	62
Şekil 3.33 Kılıfından çıkarılmış kuvars kristalin 10 µm x 10 µm boyutlu AFM görüntüsü.....	64
Şekil 3.34 10 µm x 10 µm boyutlu kirli yüzeyin üç boyutlu AFM görüntüsü .....	65
Şekil 3.35 10 µm x 10 µm boyutlu Annexin V immobilize edilmiş kristalin üç boyutlu AFM görüntüsü.....	66
Şekil 3.36 10 µm x 10 µm boyutlu Annexin V immobilize edilmiş kristalin iki boyutlu AFM görüntüsü.....	67

## ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Trombosit adezyon reseptörleri .....	6
Çizelge 2.2 Eşdeğer devre elemanlarının parametreleri ve ifadesi .....	22
Çizelge 3.1 On farklı kan derişimindeki trombosit sayısı, MPV ve PCT değerleri	40
Çizelge 3.2 Kan derişimiyle frekans değişimi çizelgesi.....	42
Çizelge 3.3 Farklı Annexin V derişiminde aynı sayıda trombosit içeren kan derişimi sonrası frekans değişimi .....	45
Çizelge 3.4 Program sonucuna göre yüzde apoptotik trombosit hücresi miktarı ile frekans değişiminin kıyaslanması.....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

vWF	von Willebrand Faktör
GP	Glikoprotein
QCM	Quartz Crystal Microbalance
$\mu\text{m}$	mikrometre
fl	femtolitre
ml	mililitre
$\text{mm}^3$	milimetreküp
$\mu\text{l}$	mikrolitre
cc	cubic centimeter
cm	santimetre
nm	nanometre
mM	milimolar
M	Molar
ppm	parts per million
ATP	Adenozin Trifosfat
ADP	Adenozin Difosfat
PS	Fosfadilseri
VAD	Ventricle Assist Device
PEDIVAS	Pediatric Ventricle Assist Device
LOD	Limit of Detection
PTFE	Polytetrafluoroethylene
AFM	Atomic Force Microscopy
$\Delta\text{f}$	Kuvars kristalde frekans değişimi
$\Delta\text{m}$	Yüzeyde oluşan film tabakasının kütlesi
mg/kg	miligram/kilogram
A	Elektrot yüzey alanı
Ag	Gümüş
COM5	Communication5
f	rezonans frekansı
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
MPV	Mean Platelet Volume
PCT	Platelet Crit
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AFM	Atomic Force Microscopy
SEM	Scanning Electron Microscopy
MATLAB	Matrix Laboratory

## 1.GİRİŞ

Trombositler hemostazın sağlanmasında görev alan kan hücreleridir. Kan endotel dışına çıktığında ya da yabancı bir yüzeyle temas ettiğinde trombosit yüzeyinde taşıdıkları glikoprotein (GP) reseptörleri ile endotel alt tabakasındaki kollajen, fibronektin, von Willebrand faktör (vWF), trombospondin ve fibrinojene bağlanırlar. Böylece hasar bölgesinde ya da yabancı yüzeyde trombosit adezyonu gerçekleşir. Trombosit reseptörlerinin ilgili ligandlarına bağlanması trombosit aktiflenmesine yol açarak Annexin V, Fibrinojen, p-Selektin gibi biyomoleküller sentezlenmektedir. Bu aktivasyon, trombosit agregasyonundan önce olduğu için tespiti oldukça önemlidir.

### 1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Günümüzde trombosit aktivasyonu ve erken trombosit apoptosisini çeşitli yöntemlerle ölçülmektedir. Ancak bu testlerin yapımı uzun sürdüğünden ve cihazı kullanmayı bilen teknik personele ihtiyaç duyulduğundan maliyeti artmaktadır. Gerçek zamanlı olarak bu ölçümün yapılması, kan endotel dışına çıktığında ve trombositlerin biyomalzemelerle etkileşimi hakkında bilgi vermesi teşhis ve tedavi süreçlerini dolayısı ile hastanın hayatını doğrudan etkilemektedir. Bütün bunları düşük maliyet ile gerçekleştirebilmesi ise sistemin tercih edilebilirliği ve yaygın kullanımı için avantaj sağlamaktadır.

Piezoelektrik kuvars kristal mikroterazi (QCM) sistemleri biyosensör çalışmalarında kullanılabilen ve bu çalışmada da tercih edilen kütle hassas çevirici türüdür. QCM çok hassas kütle sensörü olarak tanımlanabilir. QCM'nin temeli bir çift elektrot arasına sıkıştırılmış piezoelektrik AT-kesimli kuvars kristaldir. Elektrotlar bir osilatöre bağlandığında ve elektrotlar üzerine bir AC voltajı uygulandığında kuvars kristaller piezoelektrik etkisi sebebiyle rezonans frekansında salınım başlamaktadır.

Yapılan çalışmanın amacı kuvars kristal yüzeyine Annexin V immobilizasyonu yapılarak trombosit aktivasyonu ve erken trombosit aktivasyonunu hızlı, kuantatif, pratik ve ucuz bir şekilde ölçen sistem oluşturmaktır. QCM sistemleri, kütle değişimine göre frekans değişimi verdiği için Annexin V ile afinite gösteren erken

trombosit apoptosisi hücrelerinin sayısı arttıkça frekans düşecektir. Çalışmada bu ilkedden yararlanılarak apoptosise uğramamış trombositler tespit edilecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Trombositler**

Trombositler; çekirdeksiz, 2-3 um çapında,5-8 fl hacminde, disk biçiminde hemostazın sağlanmasında primer rol oynayan kan hücreleridir[1]. 1 mm<sup>3</sup> kanda 150-400 bin adet bulunan trombositlerin dolaşım sistemindeki toplam sayısı yaklaşık bir trilyondur[2]. Kırmızı kemik iliğindeki megakaryosit hücrelerinde oluşturulan bu kan hücrelerin yaşam süresi 8-10 gün olup, dalak ve lenf bezlerinde yok edilir[3]. Trombositlerin sayı ve yapısındaki fonksiyon bozukluklarından dolayı birçok hastalık meydana gelmektedir. Bu hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde trombosit fonksiyonu, kan pıhtılaşma mekanizması ve faktörleri önemli bir yer tutmaktadır[4].

#### **2.1.1 Trombositlerin Yapısal Anatomisi**

Çekirdeği ve DNA'sı olmamasına rağmen sitoplazmasında RNA molekülleri olan Trombositler, damar yaralanmalarında endotele yapışarak bir plak oluştururlar. Salgıladıkları trombokinaz enzimiyle kanın pıhtılaşmasını sağlayarak hemostazın sağlanmasında etkindir.

Trombositler, kırmızı kemik iliğinde megakaryositlerin sitoplazmasından oluşur. Gelişimleri kök hücrenin megakaryoblasta dönüşümü, promegakaryosit ve megakaryosit sırasıyla ilerler. Megakaryositlerin büyüklüğü 20-90 mikron olup, çoğalmaları endomitozla olur.

Trombositlerin yapısal anatomisi; periferik bölge, sol-gel bölgesi, organeller bölgesi ve membran bölgesi olmak üzere 4 ana başlıkta incelenir[5].



### ✓ **Periferik Bölge**

Periferik bölge plazma membranından oluşmaktadır. Bu bölgede ADP reseptörleri, pıhtılaşma faktörleri( I, V, VIII, XI, XII) , trombin, vWF, kollojen, fibrinojen, fibrin, fibronektin, epinefrin, PAF, tromboksan A2, serotonin bulunmaktadır. Dış yüzey, birim membran ve membran altı bölge olmak üzere üç kısımda incelenmektedir.

- Dış Yüzey: 10-20 nm kalınlığında glikokaliks ve glikoproteince zengin tabakadan oluşmaktadır. Hücre-hücre ve hücre-damar duvarı etkileşimi reseptörleri bu bölümde bulunur.
- Birim Membran: Diğer zarlar gibi fosfolipid bakımından zengin çift katmanlı lipid tabaka, hücre içi ve hücre dışı fizikokimyasal olayların ayrılması ve anyon ve katyon pompası vardır.
- Membranaltı bölge: Anatomik ve fonksiyonel olarak membran glikoproteinive sitoplazmik filamen sistemiyle doğrudan ilişkili yaygın mikrofilamen ağından oluşmuştur[6].

### ✓ **Sol-gel Bölgesi**

Trombosit sitoplazması ve kontraktıl protein olan aktin ağından oluşmuş hücrenin biçim ve özelliklerini sağlayan bölümdür. Trombositlerin aktivasyonu mikrotübülle, merkezdeki organeller çevresinde halka oluştururlar.

### ✓ **Organel Bölgesi**

Çeşitli depo granülleri, mitokondri, peroksizom ve lizozom gibi organellerden oluşur. Organeller merkezde yer alıp metabolik reaksiyonlar bu bölgede gerçekleşir.

### ✓ **Membran Sistemi**

Üzerinde girinti ve çıkıntılar bulunan açık kanal sistemlerden oluşur. Kanallar hücresel taşıyım olaylarında geniş yüzeyler oluşturur ve trombosit aktivasyonu esnasında yüzeyleri genişler. İkincil membran sistemi olarak çalışan dens

tüpler prostoglandin sentezinde görev alır ve kalsiyumların depolandığı bölgedir.

### **2.1.2 Trombosit Granülleri**

#### **❖ Alfa granüller**

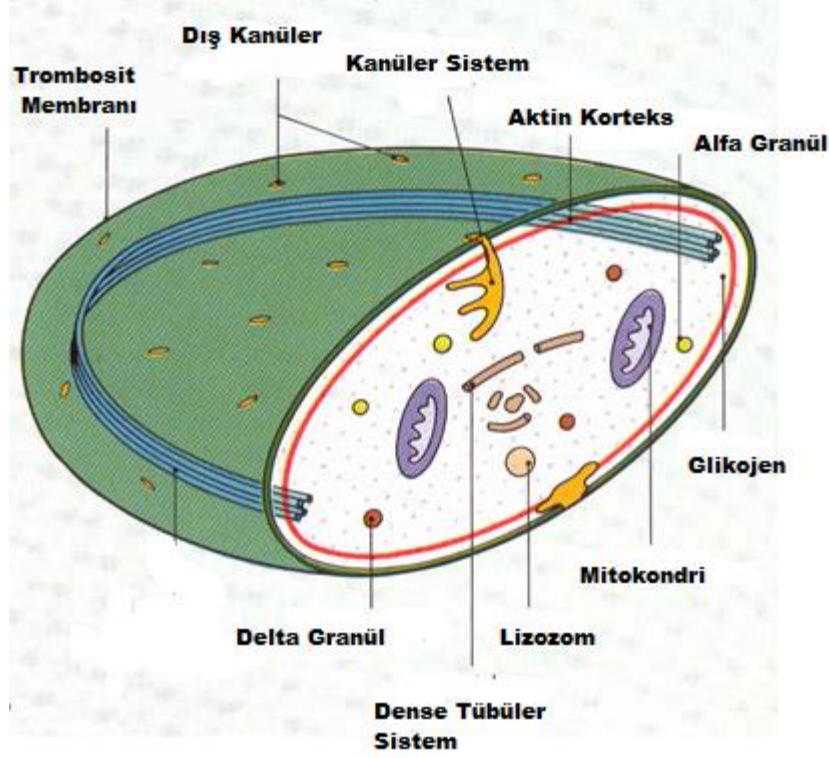
Trombositlerde bulunan temel granüller olup her bir trombositte ortalama 50–80 adet alfa granül içerir. Alfa granüller 300–500 nm çapında olup; çoğu hemostaz ve doku rejenerasyonunda kritik öneme sahip otuzdan fazla biyoaktif protein ve büyüme faktörü içerirler. Bu biyoaktif protein ve büyüme faktörlerinin proteinlerin bir kısmı megakaryosit olgunlaşması esnasında sentezlenirken bazıları da megakaryosit ya da trombosit aşamasında plazmadan endositoz yoluyla depolanır. Alfa granüllerinde pıhtılaşma faktörleri(fibrinojen, faktör V) vWF, Faktör IV, trombospondin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü bulunur.

#### **❖ Delta(Dense) granüller**

İçerisinde ATP, ADP, pirofosfat, serotonin içeren ve plazmadan 100 kat daha fazla miktarda serotonin bulunan granüller olup ortalama 250-300 nm çaptaki granüllerdir. Adezyon ve agregasyondan sonra trombositler parçalanır ve trombosit faktör I, V, VI, VIII, IX salgılanır. Plazma pıhtılaşma faktörleri V, I, X, VIII ve XIII konsantrasyonları yükselir[7].

#### **❖ Lizozomlar**

Çapları 175-250 nm arasında değişen bu granüller düşük pH'da hidrolitik enzimler içerirler. Bu enzimlerin görevi, plazminin tamir fazından sonra bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırmasıdır.



**Şekil 2.1** Trombosit hücre kesiti

### 2.1.3 Trombosit Aktivasyonu ve Apoptosisi

Trombosit hücreleri yabancı bir yüzeyle etkileştiklerinde ya da endotel dışına çıktıklarında pıhtılaşma kaskadı dahilinde morfolojisinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler trombosit aktivasyonu ile başlayarak apoptosise kadar devam eder. Bu nedenle kanın pıhtılaşmadan önceki durumunun bilinmesi birçok hastalığın teşhisinde ve tedavisinde kullanılmaktadır[8-10].

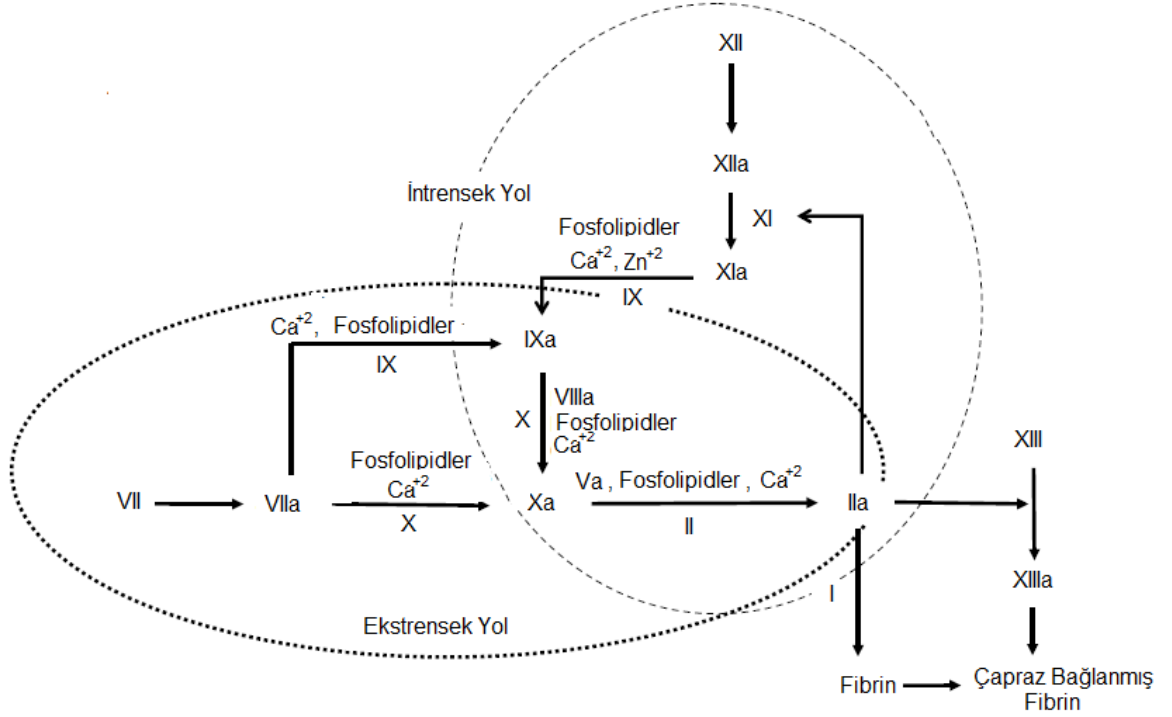
In vivo ortamda kan damarlarında meydana gelen bir hasar sonucunda trombositler, diğer kan hücreleri ve kollojen, laminin, fibronektin, vWF gibi ekstrasellüler matris moleküllerine adezyona uğrar[11]. Adhezyon sırasında von Willebrand faktörünün GPIb reseptörüne bağlanarak trombositlerden ADP, tromboksan  $A_2(T_xA_2)$  gibi otoaktivatör ve epinefrin, serotonin gibi vazoaaktif maddelerin salınımı sağlar ve ön trombosit aktivasyonu başlar. Hasarlanan endotel çevresinde, kollojen fibrilleri içeren subendotelyal matris, trombosit membranında bulunan GPIIb/IIIa ve GPIV reseptörleri ile afinite göstererek hücre

içinde kalsiyum artışına, trombosit granüllerinin salınımına neden olurken, trombositlerin disk şeklindeki yapısı değişir[12-14]. Trombositlerde çıkan uzantılarla trombositlerin birbirine temas ettikleri yüzey artar. Trombositler endotelden salgılanan ADP ve T<sub>x</sub>A<sub>2</sub> gibi otoaktivatörler aracılığıyla aktiflenerek agregasyon bölgesinde toplanırlar. Agregasyonun ilk aşaması tersinebilirken sekresyon ve granüllerin yapısında bulunan agonistlerle agregasyon tersinemez hale gelir[15],[16].

**Çizelge 2.1** Trombosit adezyon reseptörleri[17]

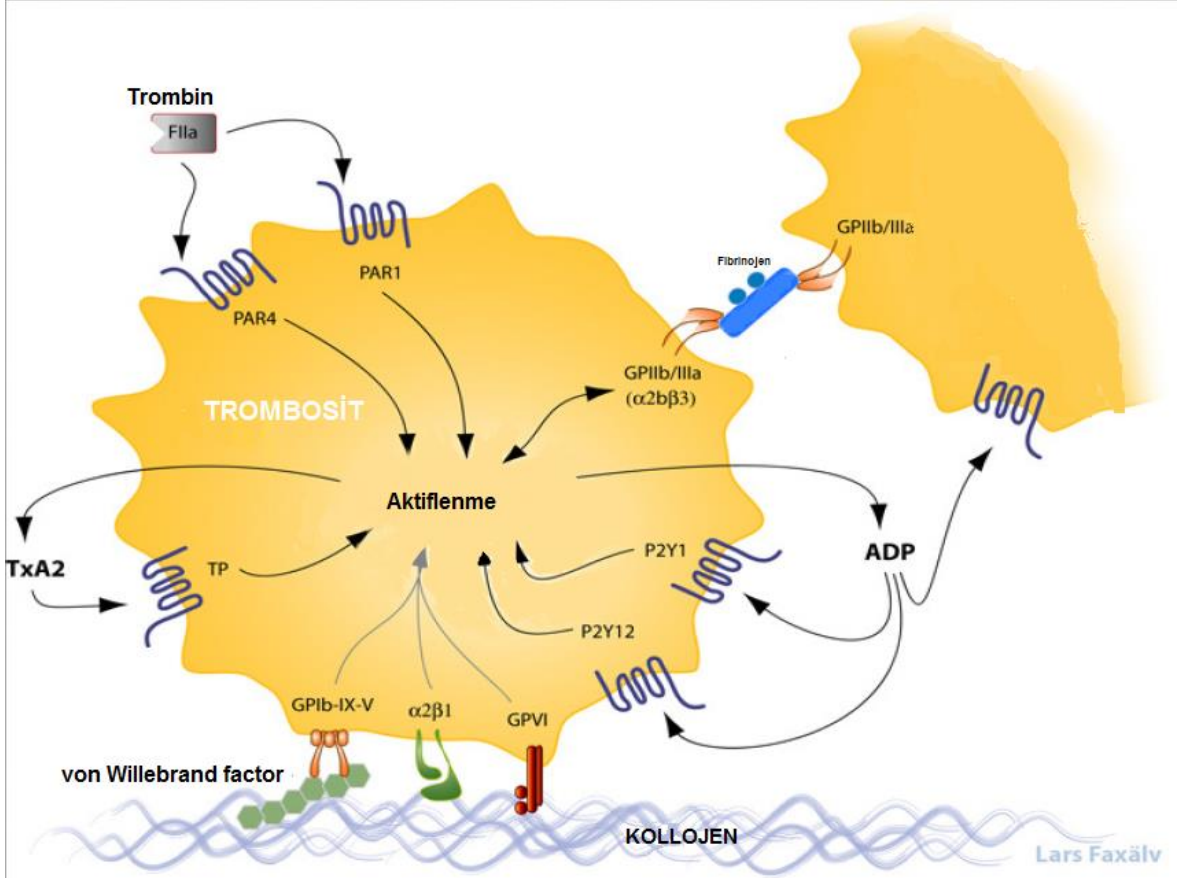
Ligand	Reseptör
Kollajen	GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, GPIV
Fibrinojen	GPIIb/IIIa
Fibronektin	GPIc/IIa, GPIIb/IIIa
Trombospondin	Vitronektin reseptörü, GPIV
Vitronektin	Vitronektin reseptörü, GPIIb/IIIa
von Willebrand faktörü	GPIb/IX, GPIIb/IIIa
Laminin	GPIc/IIa
Fosfadilseri(PS)	Annexin V

Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler zayıf ve güçlü olarak sınıflanırlar. Kollojen, trombin gibi güçlü agonistler granül sekresyonunu uyarabilirler. ADP epinefrin gibi zayıf agonistler ise kendi başlarına granül sekresyonunu uyaramazlar. Ancak agonistler agregasyonu uyarabilirler ve agregasyon sonucunda sekresyon olabilir. Trombosit membranları sialik asitçe zengin olduğundan dolayı negatif yükü bulunmaktadır. Yüzeydeki sialik ait miktarında azalma meydana gelince, negatif yükte de azalma meydana gelir ve agregasyon başlar[18-21].



**Şekil 2.2** Pıhtılaşma mekanizması

Birçok trombosit membran reseptörü integrin ailesinde bulunmaktadır. Integrinler heterodimerik yapıdadır. Alfa ve  $\beta$  olarak simgelenen iki heterojen alt üniteleri vardır. Trombositler tarafından görülen integrin yapısındaki reseptörlerden yalnızca GPIIb/IIIa'nın alfa alt ünitesi olan GPIIb (CD41) megakaryosit ve trombositlere özgüdür. Fibrinojen reseptörü olan GPIIb/IIIa trombosit agregasyonu için mutlaka gereklidir[22]. Fibrinojen reseptörü GPIIb/IIIa yokluğunda trombosit agregasyonu gerçekleşemez. GPIIb/IIIa granül membranında da eksprese edilir ve trombosit aktivasyonunu takiben, muhtemelen granül ekzositozu neticesinde hücre membran yüzeyinde ortaya çıkar[23]. GPIIb/IIIa trombosit sitoplazma membranında en yoğun olarak bulunan protein olup fibrinojen molekülüyle 90 derece açı yapacak şekilde çapraz bağlanır[24]. GP IIb/IIIa'ya bağlanabilen tek ligand fibrinojen molekülü olmayıp endotelde adezif protein de bu reseptöre bağlanabilmektedir. Bu nedenle GPIIb/IIIa'nın yalnızca trombosit agregasyonunda değil, adezyonda da rol oynadığı düşünülmektedir[25].

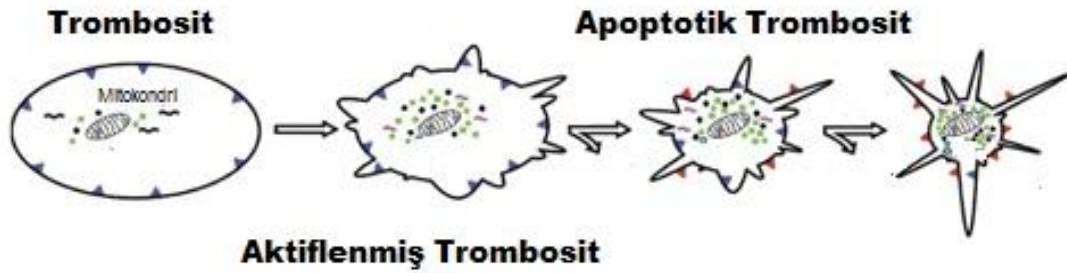


**Şekil 2.3** Trombosit aktiflenme mekanizması

Apoptosis, hem iç hem de dış faktörlerden etkilenen birçok hastalığın başlangıcında olabilmektedir[26-29]. Bu nedenle erken dönem apoptosis, trombosit hücre membranının simetrisinde bozulmalar meydana gelirken, membran yüzeyinde PS ekspresyon edilir[30]. Trombosit hücrelerinde PS'nin hücre zarı dış yüzeyine çıkması apoptosis belirteci olup, afinitesi en yüksek molekül Annexin V'dir[31-34]. Annexin V, annexin grubunun hücre proteinidir, tam olarak fonksiyonu bilinmemesine rağmen kan pıhtılaşmasının protrombinle beraber fosfatidilseri(PS) birikme alanları için rekabet ederek kan pıhtılaşmasında önemli rol oynayan biyomoleküldür[35-37].

Trombosit aktivasyonu ile süregelen pıhtılaşma kaskadında agregasyon öncesi trombositlerin durumu önem kazanmaktadır. Trombosit hücrelerindeki apoptosis ile ileri trombosit aktivasyonu arasındaki PS ekspresyonu yapay organ çalışmalarında, kardiyovasküler damar tıkanıklıklarında ve açık ameliyatlarda hızlı

olarak ölçülmesi önem kazanmıştır. Bu nedenle literatürde trombosit aktivasyonu ve apoptosisin ölçülmesi için birçok çalışma yapılmıştır[38-48]. Bu çalışmalarda trombosit tespiti için CD41, aktivasyonun belirlenmesinde CD61P, CD62P, CD63P, PAC1 kullanılırken, apoptosisin belirlenmesinde ise anti-caspase-3, JC-1 kullanılmıştır[49-52]. İleri trombosit aktivasyonu ve erken trombosit apoptosisi proteini olan hücre dış yüzeyindeki PS tespiti için Annexin V önemli bir belirteçtir. Bundan dolayı da Annexin V kullanılarak trombosit aktivasyonu ve apoptosisin ölçümünün hızlı, kuantatif, ucuz bir yöntemle yapılması önem kazanmıştır.



**Şekil 2.4** Trombosit pıhtılaşma mekanizması[53]

Fosfadilseri(PS), pek çok hücre tipinde plazma membranı içinde asimetrik olarak dağılmıştır. Platelet koagülasyonu sırasında artan oranda PS'e maruz kalma kan pıhtılaşmasında, endotel hücrelerinin procoagulant aşamasında ve vasküler düz kas hücrelerinde görülmüştür. Son dönemde, çeşitli hücre tipleri için ortamda PS bulunması apoptosisin erken tanısı için kullanılmaktadır[54-57].

Apoptoz sırasında apoptotik trombosit membranlarında değişimler olur. En belirgin değişim normalde trombosit membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda Annexin V gibi proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır[58].

Annexin V fosfolipide bağlanan bir protein olup, çift zarlı anyonik fosfolipidlere yüksek afinite ile bağlanmaktadır. In vitro ve in vivo hücre seviyesinde PS ölçümünün kullanışlı bir method olduğu kanıtlanmıştır. Çeşitli kültür edilmiş hücre tipleri ve kandan veya dokudan izole edilmiş primer hücreler ile ilgili pek çok çalışma yayınlanmıştır[59].

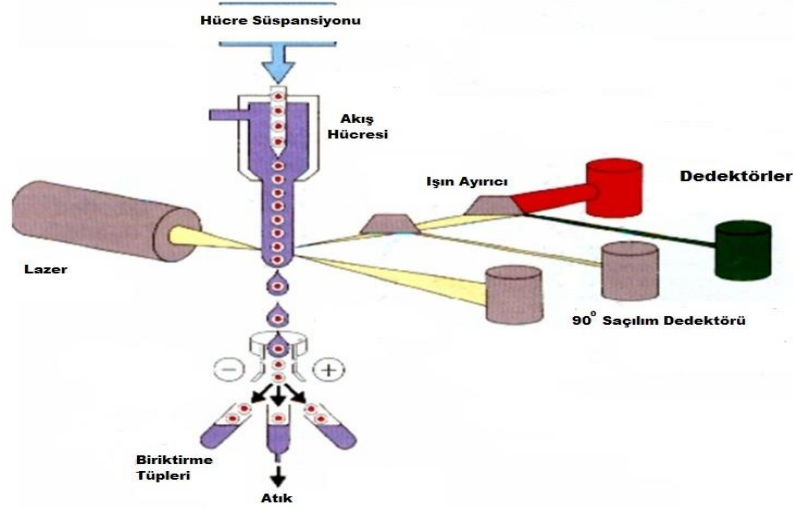
Özellikle kalp pompaları gibi biyomalzemelerle yapılan çalışmalar kan hücrelerinin yabancı yüzeye gösterdikleri uyum önemlidir. Trombositlerin yabancı yüzeye temas ederek aktiflenmesi ve devamında apoptosise uğraması bu tür sistemlerde birçok problem yaratmaktadır. Bu nedenle trombosit ve aktivasyonu ve apoptosisin hızlı bir şekilde ölçülmesi önem kazanmaktadır. VAD, PEDIVAS gibi kalp pompaların vücuda takıldıktan sonraki dönemlerde trombositlerin ve lökositlerin durumları üzerinden kan testleri yapılmakta ve pompaların vücuda uyumlulukları test edilmektedir. Annexin V kullanılarak hazırlanan dizilerin daha fazla değerlendirilmesi trombosit apoptosisi hakkında bilgiler vermekte ve VAD gibi kan uyumluluğu gerektiren sistemlerde gözlem şansı vermektedir. Trombositlerin agregasyona uğramadan önceki hallerinin tespiti duruma müdahaleyi kolaylaştırmakta ve mortaliteyi azaltmaktadır. Bu kan uyumluluk testleri normalde akış sitometri cihazları kullanılarak uzun ve karmaşık yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Kan uyumluluğu testlerinin hızlı, güvenilir ve ucuz şekilde yapılması ve anlık olarak izlenmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir[60],[61].

## **2.2 Trombosit Aktivasyonu ve Apoptosisi Ölçüm Yöntemleri**

### **2.2.1 Akış sitometri**

Akış sitometri; hücre tipleri, hücre reseptörlerini çeşitli dalga boylarındaki florasan işaretli antikolar ile boyanarak hazırlanan örneklerden veriler elde edilen tekniktir. Her spesifik antikor FITC, PE, PC5, APC gibi florasan boylarla işaretlenerek belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği florasan sinyalleri değerlendirilir. Böylelikle hücre ve antijen bilgisi hakkında bilgi elde edilir[62], [63].





**Şekil 2.5** Akış sitometri sistemi[64]

Akış sitometresinde farklı florokromlar ile işaretlenen hücelere akış hücresinden teker teker geçerken lazer ışını gönderilir. Hücelere bağlanan monoklonal antikolar lazer ışını absorbe ederek üzerlerindeki florokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın yayarlar. Florokrom işaretli hücelerden yayılan bu ışınlar dedektörler kullanılarak her bir hücre için belirlenir. Florokromlarla saçtığı ışıklardan başka hücreye çarpıp saçılan ve hücrenin büyüklüğü ile ilgili olan lazer ışınlarını hücreden 90° açıyla saçılan ve hücrenin yapısı ile ilgili olan ışınları da bilgisayar ortamı aktarılır. Bilgisayar ortamında grafiksel olarak birçok bilgi elde edilir[65-72].

Akış sitometri günümüzde kullanılan en yaygın yöntem olup birçok molekülle çalışılmaktadır. Ancak uzman kişi çalıştırılması, protokollerin uzun ve yorucu olması dezavantajları yaratmaktadır.

### 2.2.2 ELİSA

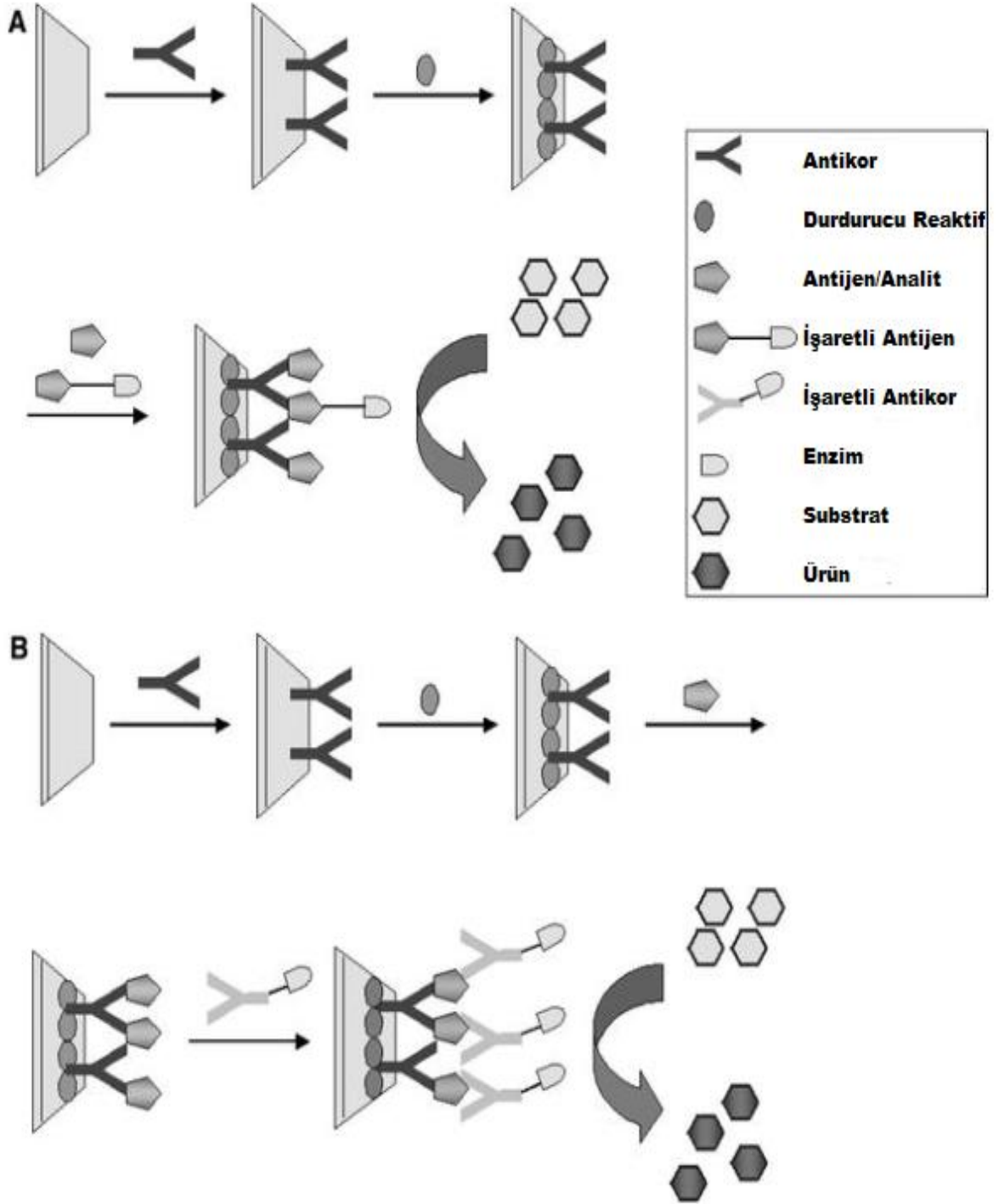
Spesifik antijen - antikor bağlanmasının antikora alkalen fosfataz ya da horseradish peroksidaz gibi enzim bağlanmasıyla enzimlerin substratının renkli ürünlere dönüştürülerek monitorize edilmesini sağlayan immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yöntemiyle örnekteki antijenin miktarını spesifik antikorla tespit edilebilir. Kompetitif(Yarışmalı) ve yarışmasız(sandwich yöntemi) ölçüm olmak üzere ikiye ayrılır[73],[74].

### **2.2.2.1 Kompetitif(Yarışmalı) ölçümler**

Ölçüm tüpünün içindeki katı bir yüzeye antijen ya da antikor immobilize edilmiştir. Ölçüm tüpün işaretli ligand içeren serum ve enzim işaretli ligand içeren reaktif eklenildikten sonra inkübasyon edilir. Immobilize antijen ya da antikora bağlanmak için işaretli ligand ile enzim işaretli ligand yarışır. Antijen/ antikor – işaretli ligand ve antijen/antikor - enzim işaretli ligand yapıları oluşur. Yıkama yapılarak antijen/antikor - işaretli ligand ve antijen/antikor- enzim işaretli ligand yapıları dışındaki ürünler ortamdaki uzaklaştırılır. Enzim substratı( $H_2O_2$ ) ve kromojen (O-fenilendiamin) ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu için örnekler durdurucu reaktif( $H_2SO_4$ ) eklendikten 2 saat içerisinde uygun dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ya da kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu işaretli ligand derişimi ile ters orantılı olup, standart grafikten referans alınarak derişim belirlenir[75], [76].

### **2.2.2.2 Yarışmasız(Sandwich) ölçümler**

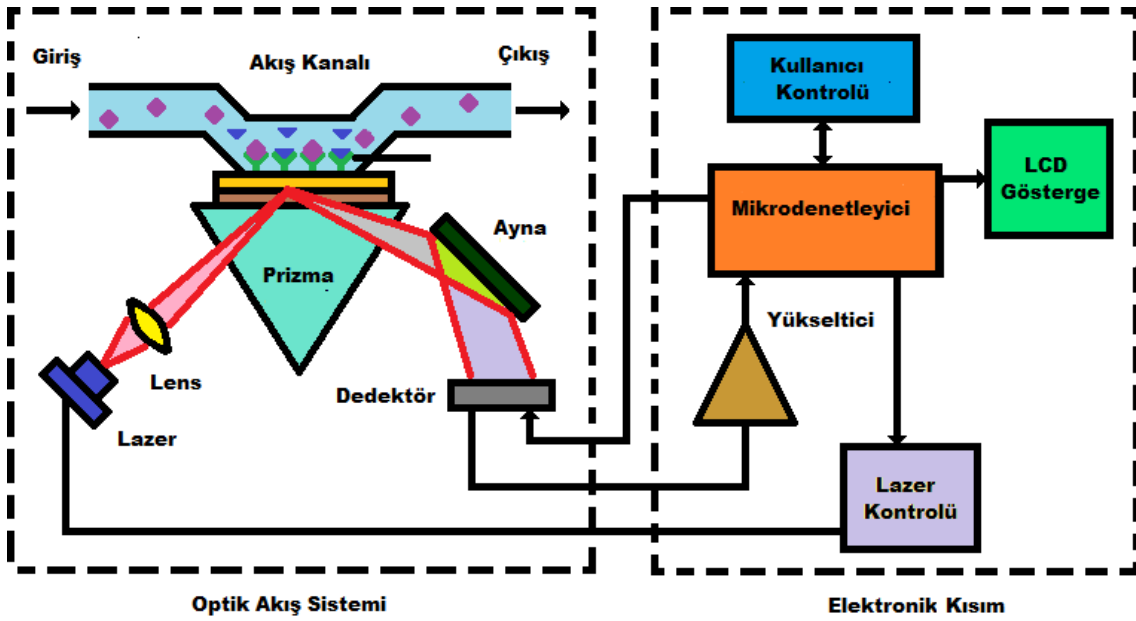
Polistren ölçüm tüplerinin içine antijenlerin tutunması için antikor immobilize edilmiştir. Ölçüm tüpüne örnekler gönderilir ve inkübasyon edilir. Örnekteki antijenlerin hepsi immobilize antikorlar tarafından bağlanır ve antikor-antijen yapıları oluşur. Yıkama yapılarak bu yapının haricindeki maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Enzim işaretli antikor ölçüm tüpüne gönderilerek ikinci bir inkübasyon yapılır. Böylece primer antikor-antijen enzim işaretli antikor yapısı oluşur. Yıkama yapılarak bu yapı dışında kalan maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Enzim substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu için örnekler durdurucu reaktif( $H_2SO_4$ ) eklendikten 2 saat içerisinde uygun dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ya da kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu işaretli ligand derişimi ile doğru orantılıdır. Referans grafik üzerinden derişim hesaplanır[77].



**Şekil 2.6** Yarışmalı(A) ve yarışmasız ELISA ölçüm yöntemleri

### 2.2.3 Yüzey plasmon rezonans (SPR)

Metal bir yüzeyin elektromanyetik dalgalarla uyarılması sonucu, yüzeydeki tüm atomların elektronlarının belli bir frekansta rezonansa girmesi ve maksimum enerji soğurması tekniğidir[78]. Işık, altın yüzeyli bir prizmaya gönderilirken ışığın bir bölümü emilirken, diğer bir bölümü ise yansımaktadır. Geliş açısı değiştirilirse yansıyan ışığın şiddetinde değişiklikler meydana gelir. Bu bilgi doğrultusunda yansıyan ışığın şiddeti maksimum kayıp gerçekleştirilirse bulunduğu açının rezonans açısıdır[79].



Şekil 2.7 SPR blok diyagramı

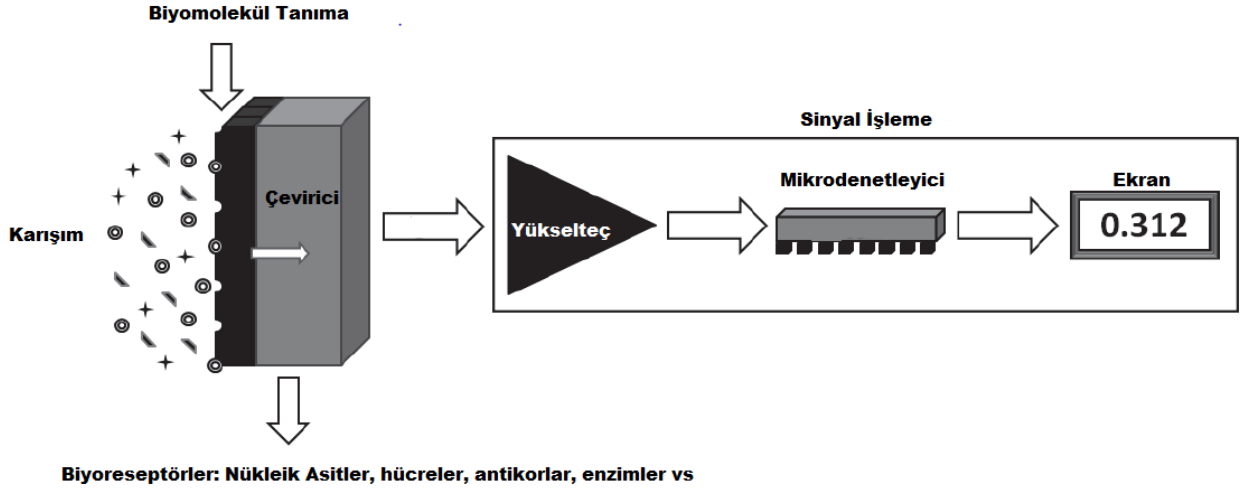
Yüzeyin bulunduğu ortamın özelliklerinin değişmesi ya da yüzeyde madde birikmesi rezonans açısı değiştirmektedir. Bu özellik kullanılarak yüzeyde spesifik ve afinitesi yüksek antikörlerle ölçüm alınabilir.

İkincil molekül gerektirmeden gerçek zamanlı ölçüm yapılabilen bir yöntem olan yüzey plasmon rezonans sisteminde değişik hedef moleküller ve farklı etkileşimler tespit edilebilir. Yaygın kullanıma uygun bir teknoloji olup yüzey birden fazla kullanılmakta, hassas, hızlı ve seçici uygulamalar yapılabilir[80].

## 2.3 BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, enzimler, antikolar, nükleik asitler, dokular, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri gibi biyolojik bir materyal ile biyolojik olarak elde edilmiş malzemeler veya biyomimetik malzeme ile birleştirilmiş veya beraber çalışan fizikokimyasal dönüştürücü veya mikrosistem analitik cihazlardır[81].

Biyosensörler, ilaç, çevre, gıda, güvenlik ve savunma sanayi gibi çok çeşitli analitik problemlere uygulanmıştır. Günümüzde, terörle mücadelede, yüksek hassasiyette ve hızda patlayıcı maddelerin algılanmasına yönelik biyosensör çalışmaları vardır. Genel olarak doğal su, kan, idrar vb. karmaşık analitiklerin içinde son derece seçici moleküler tanıma ulaşabilmek için analit içindeki birçok molekül ile rekabet edebilmek gerekir. Bu durumda biyolojik malzeme ile moleküler tanımda seçicilik anahtar-kilit modeli ile sağlanır[82],[83].



**Şekil 2.8** Biyosensör blok diyagramı

Hedef analitin, moleküler tanımından sonra optik, elektrokimyasal, piezoelektrik, termometrik veya manyetik bir dönüştürücü ile sinyalin oluşturulması gerekir. Elektrokimyasal dönüştürücüler, elektrotlarındaki bu biyokimyasal bilgileri kimyasal reaksiyonlar ile elektrik sinyaline dönüştürülür.

Bir biyosensörün duyarlılığı, dönüştürücü ve sinyalin yükseltme katına, algılama sınırına, sinyal-gürültü oranına bağlıdır. Moleküler tanımlamanın doğasına bağlı olarak, biyosensörler:

1. Antijen/antikor (immünolojik)
2. Enzim/ substrat (enzim)
3. Reseptör/hormon
4. S-DNA hibridizasyon (genomik)
5. Algılama katmanında etkileşim.

Biyosensörler genellikle, karmaşık bir örnek matris içinden belirli bir analit veya bir grup analitin konsantrasyonu ile orantılı bir dijital elektronik sinyal üretir[84].

### **2.3.1 Biyosensör performans parametreleri**

Biyosensörler, fiziksel olguları elektriksel sinyallere çeviren sistemler olup ideal biyosensörlerin çeşitli performans parametreleri vardır. Bu parametreler: “ seçicilik, hassasiyet, doğrusallık, geniş bant aralığı, tayin limiti(LOD), tepki süresi, tekrarlanabilirlik, kararlılık, ölçüm başına maliyet ve zamandır”.

#### **2.3.1.1 Seçicilik**

Biyosensör, hedef biyomoleküle duyarlı olmalı ve hedef molekül dışında kalan moleküllerden etkilenmemesi esastır. Biyosensörün çalıştırılacağı ortamda birden fazla farklı molekül olabileceğinden dolayı, biyosensörün hedef molekül dışında kalan moleküllerden etkilenmemesi için ölçüm sisteminin bu etkilerden korunması gerekmektedir[85][86].

#### **2.3.1.2 Hassasiyet**

Giriş fiziksel sinyal ile çıkıştaki elektriksel sinyal arasındaki ilişki biyosensörün performansını belirleyen en önemli parametrelerden biridir. Sensörün ölçüm yüzeyinin alanı, ölçüm ortamına doğru kimyasal molekülün kütle aktarım hızı gibi parametreler hassasiyetle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle elektriksel sinyaldeki küçük değişim ile fiziksel sinyaldeki küçük değişim oranı yani kalibrasyon eğrisinin eğimi hassasiyeti vermektedir.

### **2.3.1.3 Doğrusallık**

Ölçüm ortamında bulunan en yüksek derişim analit ile en düşük derişimi arasındaki ilişki belirli bir hedef molekül derişimine kadar doğrusallık göstermesi biyosensörün performans parametreleri arasında yer almaktadır.

### **2.3.1.4 Geniş bant aralığı**

Sensörün ölçebileceği en düşük derişim ile en yüksek derişim arasında kalan elektriksel olgudur. Biyosensör uygulamalarında derişim arttıkça elektriksel sinyalinde doğrusallık gösterdiği aralıktır.

### **2.3.1.5 Tayin limiti(LOD)**

Hedef molekülün miktarının belirlenmesinde en önemli biyosensör parametresidir. Biyosensörün tayin limitinin belirli bir derişim değerinin altında olması gerekir. Bu limit, sensörün yüzey alanına, ligandın affinitesine, ligand immobilizasyon miktarına göre değişmektedir.

$$\text{Tayin Limiti(LOD)} = k \times \text{std}_{\text{background}} \quad (2.1)$$

Tayin limiti hesaplanırken; k sabiti sinyal-gürültü oranını,  $\text{std}_{\text{background}}$  ise arka plan sinyalin standart sapmasıdır. k sabit sayısı ise genellikle 3 olarak alınır.

Biyolojik tanıma işlemlerinde hangi sinyalin ölçülüp yükseltileceğinin anlaşılması ve sinyaller arası farklılığın tespiti için tayin limitinin belirlenmesi önemlidir.

Bir analitin en küçük derişim tespitinde ise  $C_{\text{LOD}}$  kullanılmaktadır.

$$C_{\text{LOD}} = \text{std}_{\text{background}} / S \quad (2.2)$$

$C_{\text{LOD}}$  hesaplanırken;  $\text{std}_{\text{background}}$  arka plan sinyalin standart sapması, S ise hassasiyettir.

### **2.3.1.6 Tepki süresi**

Bir biyosensörün plato değerinin %95'ine ulaşmak için geçen süre o sensörün cevap süresidir. Bu nedenle sensörün dinamik cevabı analitin derişimindeki değişikliğe verilen tepki belirlemektedir. Kalibrasyon grafiğinden bakılarakta bir

biyosensörün tepki süresi tespit edilebilir. Eğer kalibrasyon eğrisi yayvansa tepki süresinin yavaş, tersi söz konusu ise tepki süresi hızlıdır.

### **2.3.1.7 Tekrarlanabilirlik**

Aynı şartlar altında arka arkaya yapılan ölçümlerin birbirine yakın olması ideal bir biyosensörün parametreleri arasındadır. Tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün başarı kriterleri arasında olup, ölçüm değerleri arasındaki yakınlık biyosensör uygulamalarında önemlidir[87].

### **2.3.1.8 Kararlılık**

Belirli bir süre zarfında biyosensörün hassasiyetindeki ya da baz çizgisindeki değişimleri alan bir parametredir. Kararlılık; sıcaklık, nem, pH gibi ortam koşullarından etkilendiğinden dolayı biyosensörün kararlı çalışması için aynı şartlar altında ölçüm alınması gereklidir[88].

### **2.3.1.9 Ölçüm başına maliyet ve zaman**

Bir biyosensörün maliyeti ve ölçüm zamanı günümüzde önem kazanmış parametrelerdir. Biyosensör sisteminin basit, ucuz ve kullanımı rahat biyosensörler olması nedeniyle ideal biyosensördür. Bu sebepten dolayı her ölçüm başına maliyet ve zaman dikkat edilmesi gereken parametrelerdir[89].

## **2.3.2 Biyosensör çeşitleri**

### **2.3.2.1 Elektrokimyasal biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler, kimyasal tepkimeler sonucunda ortamda iyon veya elektronların üretilmesi ya da tüketilmesi sonucu nükleik asit, glikoz gibi maddelerin derişiminin tayininde kullanılır. Tasarlanan elektrokimyasal biyosensör teknolojilerinin her birinin yapım aşamasının kolay olması, hassas sonuçlar vermesi, tekrarlanabilir ve ucuz maliyetli olması birçok avantaj sağlamaktadır. Elektrokimyasal biyosensörlerde ölçülen parametreye göre amperometrik, potansiyometrik ya da kondüktometrik olarak sınıflandırılır[90].



### **2.3.2.2 Optoelektrik biyosensörler**

Yüksek kondaktif metallerdeki serbest elektronların osilasyona uğraması sonucu yüksek nanoparçacıklı diziler ve filmler elde edilir. Optoelektrik biyosensörlerde optik prensibine göre çalışmaktadır. Aktif alandaki ligand-anilat bağlarının oluşturduğu kırınım alanlarına lazer ışını gönderilerek sinyaller elde edilir. Bu sinyaller işlenerek anlamlı veriler oluşturulur[91].

### **2.3.2.3 Termal biyosensörler**

Kimyasal ve biyolojik etkileşimler sonucu ekzotermik ve endotermik tepkimeler ortaya çıkması prensibine dayanır. Tepkimenin olduğu ortama konulan biyosensör ile molar entalpi baz alınarak molekül miktarının ölçülmesi yapılabilir. Bu metodla bakterilerin tayini saptanabilir[92].

### **2.3.3 Piezoelektrik etki**

Piezoelektrik etki 1880 yılında Curie kardeşler tarafından keşfedilmiştir. Bir malzemeye mekanik gerilim uygulandığında elektriksel potansiyel farkı oluşturduğu etki olup, kristal yapı malzemelerde görülmektedir. Daha sonradan yapılan çalışmalarda piezoelektrik kristalin iki yüzeyi arasında uygulanan gerilim farkının kristallerde boyut değiştirmeye ve gerinime yol açtığı gösterilmiştir. Bundan dolayı kristal yüzeyleri arasına uygulanan elektriksel gerilimin şiddeti değiştirilmesiyle piezoelektrik kristalin boyutu değiştirilebilmektedir [93],[94].

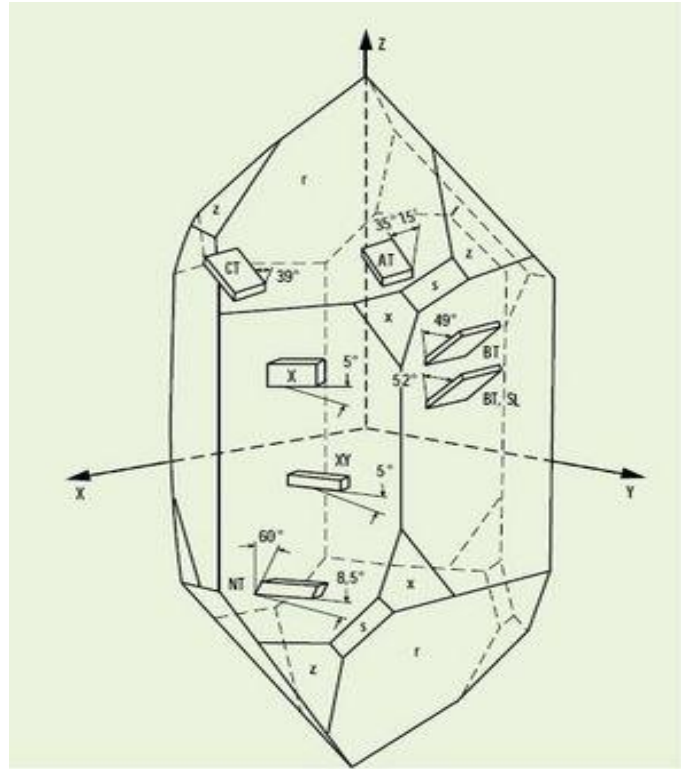
Kristallerde atomların belli bir zamanda eski konumlarından yeni konumlarına geçmelerine kadar geçen süre kristalin rezonans frekansını belirler. Piezoelektrik kristallerde vibrasyon sonucunda elektrik alan değişerek polarizasyonu da değişmektedir.

### **2.3.3.1 Kuvars kristal mikroterazi(QCM) biyosensörler ve özellikleri**

QCM çok hassas kütle sensörü olarak tanımlanabilir. QCM'nin temeli bir çift elektrot arasına sıkıştırılmış piezoelektrik AT-kesimli kuvars kristaldir. Elektrotlar bir osilatöre bağlandığında ve elektrotlar üzerine bir AC voltajı uygulandığında

kuvars kristaller piezoelektrik etkisi sebebiyle rezonans frekansında salınımaya başlar.

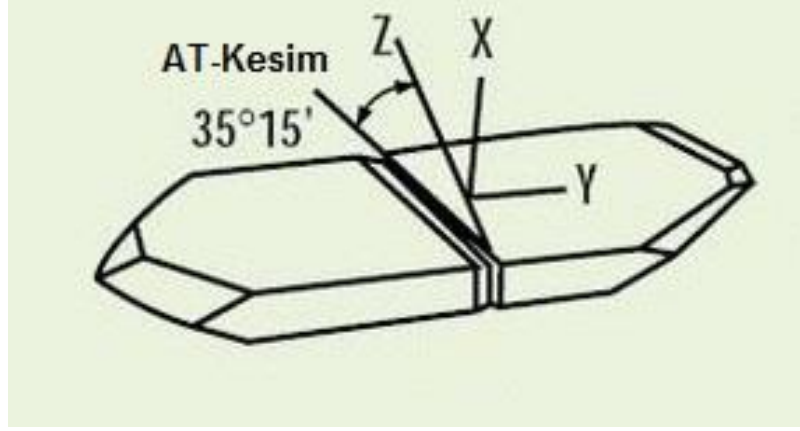
Piezoelektrik uygulamalarında kristal iki metal elektrot arasına konulmuştur. Elektrotların bu şekilde yerleştirilmesi salınan elektrik alanının kristal yüzeyine dik yönde olmasını sağlar. Oluşan elektrik alanı kristal yığın yapısında mekanik salınımaya yol açar. Mekanik salınım, elektrotlar bir birinin tam olarak karşısına geldiği durumda en yüksektir. Mekanik salınımın yol açtığı kayma ise elektrotlara paralel yöndedir. Elektrotlar kristal yüzeyine metal buharlarının depozite edilmesiyle hazırlanır. Kristalin çalışma frekans seviyesi depozite edilen metal miktarıyla ayarlanır. Piezoelektrik uygulamalarında kullanılan kristaller 10-16 mm boyutlarında, yaklaşık 0.15 mm kalınlığında, disk, kare veya dikdörtgen şeklindedir. Rezonans frekansları 5, 9 veya 10 MHz olan kuvars kristaller tercih edilirken metal elektrotlar ise altın, gümüş, alüminyum veya nikel olabilir.



**Şekil 2.9** Kuvars kristalin üç boyutlu yapısı

Kristallerin kesimi algılayıcı olarak kullanılmalarında önemlidir. Kristal yapının karakteristik düzlemi ile kesme tabakası arasındaki açı AT ve BT kesmelerde

$35^{\circ}15'$  ve  $-49^{\circ}00'$  dir. AT kesimin getirdiği en büyük avantaj kararlı olmaları ve sıcaklık katsayılarının  $1\text{ppm}/^{\circ}\text{C}$  olmasıdır[95].

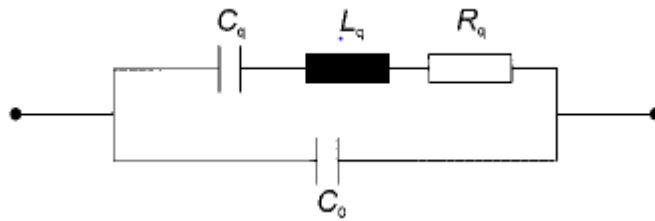


**Şekil 2.10** AT kesim kuvars kristal

### 2.3.3.2 Kuvars kristal mikroterazi(QCM)'in eşdeğer devresi

Kuvars kristalin elektriksel özelliğinin incelenebilmesi için elektriksel bir eşdeğer devreye dönüştürülmesi gerekmektedir.

Şekilde kuvars kristalin mekanik esnekliği  $C_q$ , ilk kütlesi  $L_q$ , sürtünmeler sonucunda ortamda yok olan mekanik enerji ise  $R_q$ 'dir.  $C_0$  ise hem kuvars yüzeydeki elektrotlar hem de mekanik yapının kapasitesini simgelemektedir.



**Şekil 2.11** Kuvars kristal mikroterazinin eşdeğer devresi[96]

Kuvars kristalin empedansı tamamen rezistif ise rezonans çok düşüktür. Bu durumda  $f_s$  ve  $f_p$  olmak üzere iki farklı frekans vardır.

**Çizelge 2.2** Eşdeğer devre elemanlarının parametreleri ve ifadesi[96]

Parametre	İfadesi
$C_0$	$\frac{\epsilon_{22}A}{d_q}$
$C_q$	$\frac{8Ae_{26}^2}{\pi^2 d_q \bar{c}_{66}}$
$L_q$	$\frac{d_q^3 \rho_q}{8Ae_{26}^2}$
$R_q$	$\frac{d_q \eta_q \pi^2}{8Ae_{26}^2}$
$f_s$	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left( 1 + \frac{C_0 R_q^2}{2L_q} \right)$
$f_p$	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left( 1 + \frac{C_q}{2C_0} - \frac{C_0 R_q^2}{2L_q} \right)$

### 2.3.3.3 Saubey denklemleri

Bir kuvars kristalde kalınlığı ( $\Delta x$ ) ile rezonans frekansı ( $f$ ) arasındaki ilişki aşağıda verilmiştir. Burada “N” frekans katsayısı olup, AT-kesme kuvars kristallerde değeri  $1.67 \times 10^5$  cm Hz dir.

$$\Delta x = N / f \quad (2.3)$$

Kalınlık aynı zamanda kütlesi ile de aşağıdaki gibi ilişkilidir.

$$\Delta x = m / A \cdot \Delta q \quad (2.4)$$

Burada, m: kristal kütlesi (g);

A: kristal üzerindeki elektrotun altında kalan alan ( $\text{cm}^2$ );

$\Delta q$ : kristal yoğunluğu (kuvars için:  $2.65 \text{ g/cm}^3$ ) dir.

Yukarıdaki iki denklem birleştirilir ve yeniden düzenlenirse aşağıdaki şekle gelir.

$$f = \Delta q \cdot N \cdot A / m \quad (2.5)$$

Eğer kristal elektrotlardan birinin yüzeyine  $\Delta m$  kadar kütle ilave edilirse bu bir frekans kaymasına ( $\Delta f$ ) neden olur ki bu da aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$\Delta f = -\left(\frac{f^2}{\Delta q \cdot N \cdot A}\right) \left(\frac{\Delta m}{1 + \Delta m/m}\right) \quad (2.6)$$

Bu ifade, kuvars kristaller için, ilgili sabitler yerine konulursa şu şekli alır:

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \Delta m / A \quad (2.7)$$

Burada görüldüğü gibi “Kristal üzerine ilave edilen kütle ( $\Delta m$ ), kristalin salınım frekansında kaymaya neden olur ( $\Delta f$ ) bu kayma ölçülebilirse kütle artışı yukarıdaki basit ifadeyle hesaplanabilir.” Bu denklik ilk kez Sauerbery tarafından türetilmiş olup onun adıyla anılmaktadır[84].

#### **2.3.3.4 Kuvars kristal mikroterazi(QCM) ile yapılan çalışmalar**

Kuvars kristal mikroterazi sistemlerinin ucuz, güvenilir ve yüksek hassasiyetli olmasından dolayı kullanım alanları oldukça geniştir. Kuvars kristal mikroterazi sistemleri termal, saçılma, magnetron, iyon ve lazer kalıntısı ince film kalınlığı izlemede, elektrot yüzeylerinde yüzeyler arası işlemlerin elektrokimyasında ve işlevsel hale getirilmiş yüzeylerde hassas ölçümlerde kullanılmaktadır[97-101]. Gaz sensörler, lipid membranlar, polimer kaplamalar ve immunosensörler gibi yüzey modifikasyonu ile ölçülmek istenen moleküle afinite gösteren molekül yüzeye, immobilize edilerek kristaldeki frekans değişimi ile yüzeydeki kütle değişimi hakkında doğrudan bilgiye ulaşılmaktadır. Bu nedenle bu tür sistemlerde yüzey modifikasyonunda kullanılan protokoller önem kazanmaktadır[102-106].

#### **2.4 İmmobilizasyon Yöntemleri**

Piezoelektrik kristallerinin biyosensor olarak kullanılmaları için yüzeylerinin modifiye edilmesi, başka bir ifadeyle ortamda bulunan anilat ile spesifik olarak etkileşecek ligandın kristal yüzeyine immobilize edilmesi gerekir.

## **2.4.1 Non-kovalent(zayıf) yöntemler**

Non-kovalent yöntemlerde antikorun yüzeye fiziksel olarak absorbe olması için yüzeyde temas ettirildikten sonra beklenmesi gerekir. Antikorlar yüzeye van der Waals, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanmaktadır. Bu yöntemlerde pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerle proteinler yüzeyden ayrılabilir. Bu durum biyosensörün yeniden kullanılabilirliğini etkilemektedir.

### **2.4.1.1 Adsorpsiyon**

Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon; van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlar, hidrofobik kuvvetleri içerir. Fiziksel adsorpsiyon ile bağlanmış biyolojik bileşenlerin ölçümleri piezoelektrik kuvars kristal mikrobalsans (QCM) ile yapılır[107].

Kimyasal adsorpsiyon, daha kuvvetli ve kovalent bağların dizilişinden oluşur. Yüzeye tutunan biyomalzeme pH, sıcaklık, iyonik kuvvet ve substrattaki değişimlere maruz kalarak biyolojik aktiviteyi azaltır.

### **2.4.1.2 Mikroenkapsülasyon**

Biyomalzeme inert zar tarafından hapsedilir. Genellikle kullanılan zarlar; selüloz asetat, polikarbonat, PTFE (polytetrafluoroethlene). Bu metod enzim ve çevirici arasında yakınlık içermez. Bu metolla yalnızca zara nüfuz edebilen küçük analitlerin tespit edilebilir.

### **2.4.1.3 Tutuklama**

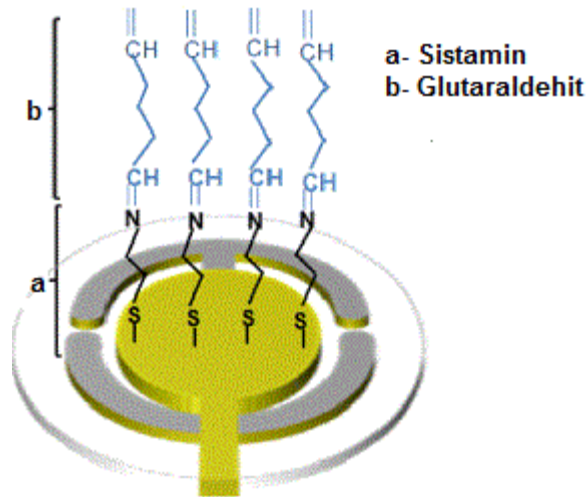
Enzimin polimerik jele veya membran arkasına immobilizasyonu göreceli olarak kolay bir işlemdir. Enzim fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamıştır. Enzimlerin, hücrelerin ve organellerin ihtiva edilmesi için bazı polimerler vardır. Bunlar, polivinil alkol, polivinil klorid, polikarbonat, poliakrilamid ve selüloz asetatdır. Jeldeki gözeneklerden biyoaktivitenin kaybedilmesi meydana gelebilecek sorunlardandır.

#### 2.4.1.4 Çapraz bağlama

Desteğe kovalent bağlanmış adsorblanmış proteinlerin veya enzimlerin istikrarını artırmak için çok fonksiyonlu ajanları kullanır. Glutaraldehit biyosensör uygulamasında çapraz bağlama ajanları arasında en sık rastlanandır. Reaksiyonun kontrol zorluğu, büyük miktarda biyolojik malzeme gerekliliği ve protein-enzim tabakasının rijid (esnemez) olması dezavantajlarındandır.

#### 2.4.2 Kovalent bağlama

Kovalent bağlama diğer yöntemlere oranla prosedürleri karışık ve uzun süreli olmasına rağmen daha uzun antikor yüzeyi yaşam süresi vardır. Biyomoleküller katı yüzeye tanımlı bağlar sayesinde immobilize olur. Bağlı proteinlerin düzenliliğini, yoğunluğunu ve dağılımını artırılır. Enzimler ve proteinlerin immobilizasyonunda kullanılır. Mevcut reaktif gruplara bağlı olan ligantı immobilize etmek için birçok kovalent bağlayıcı kimyasallar vardır. Amin ( $\text{NH}_2$ ), tiyol ( $\text{SH}_2$ ) ve aldehit ( $\text{COOH}$ ) bağlama kimyasalları iyi yerleştirilmiş prosedürlerdir. Avantajı; biyomolekül yüzeyde genellikle kuvvetli bir şekilde immobilize olur ve bu yüzden kullanım süresince yüzeyden istenmeden ayrılmaz. Bu da biyomoleküllerin dağılımını belirlemede kullanılan yüzey-kuvvet mikroskopi tekniklerini uygulamak için önemli bir gerekliliktir.



**Şekil 2.12** Sistamin ve glutaraldehitin kuvars yüzeye immobilizasyonu[110]

## **2.5 Yüzey Karakterizasyonu**

### **2.5.1 Atomik kuvvet mikroskobu(AFM)**

Atomik kuvvet mikroskobu herhangi bir katı yüzey, örnek sıvı ya da hava da atomik ve moleküler ölçekte görüntü alınmasını sağlayan sistemdir. AFM 10 pm çözünürlükte ve 8-10 µm dikey ölçüm aralığındadır. En önemli özelliği ise iletken olmayan örneklerde çalışabilmektedir. Bu nedenle ince ve kalın kaplamalarda, seramikler, polimerler, kompozitler, camlar, sentetik membranlar, biyolojik membranlar, metaller ve yarıiletkenler gibi malzemelerin yüzeyi görüntülenebildiği gibi yüzey etkileşim özellikleri, elektriksel yük, hidrofilik davranış gibi çeşitli özellikler de incelenebilmektedir[111]. Atomik kuvvet mikroskobunda silikon, silikon oksit, silikon nitrik gibi malzemelerden iğne uçları üretilmekte iğne ucu ile yüzey arasındaki atomlar arasında oluşan kuvvet yardımıyla görüntü elde edilmektedir[112].

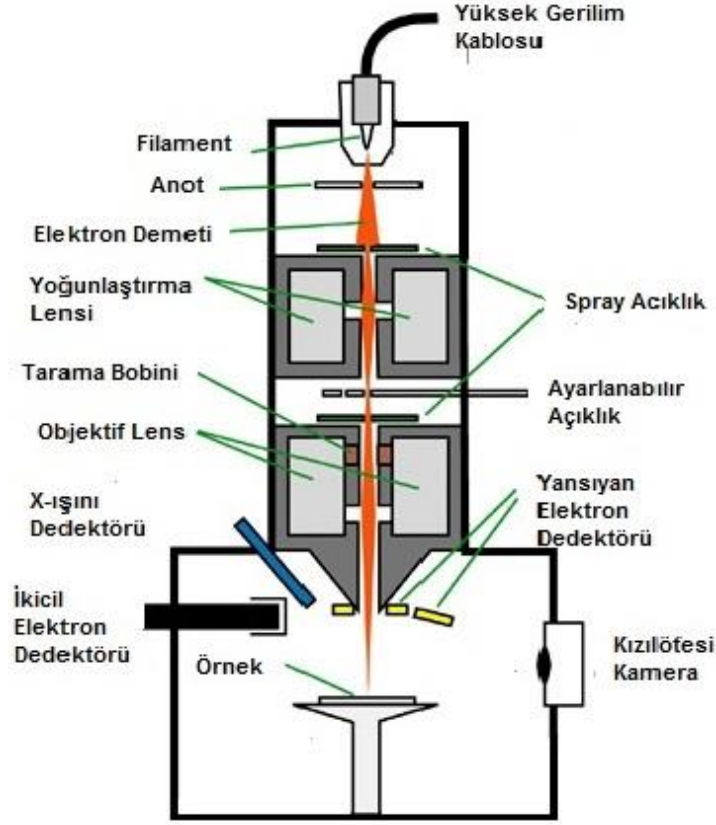
Transmisyon elektron mikroskopları ile karşılaştırıldığında 3B Atomik Kütle Mikroskobu görüntülerinde numune hazırlama evresi olmadan örnek hazırlanır ve 2B profillerden kesit numuneler alınabilir. Ayrıca kontrast, yüzey özelliklerinin birlikte sayısal yükseklik bilgisi de elde edilmektedir[113].

### **2.5.2 Taramalı elektron mikroskobu(SEM)**

Taramalı elektron mikroskobunda örneğin mikroyapısı alan derinliği ve yüksek ayırım gücü değerlerinde tarama gerçekleştirilerek bulunur. Görüntü bir elektron demeti tarafından yüzeyin taranması ile oluşturulmaktadır.

Taramalı elektron mikroskobunda 200 eV ile 100 keV enerjileri arasında gönderilen elektronlar yoğunlaştırıcı elektromanyetik mercekte toplanarak objektif mercekle yüzeye odaklandırılır. Elektromanyetik saptırıcı bobinler vasıtasıyla yüzeyde tarama işlemi yapılır[114].





**Şekil 2.13** Taramalı elektron mikroskobu şematik gösterimi

Elektron demeti ile örnek yüzeyindeki malzeme arasındaki etkileşim sonucu yüzeye gelen elektron demetiyle 1800 derece açı yapan bir elektron grubu ise geri saçılma elektronlarıdır. Tipik enerjileri 50 eV seviyelerinde olan bu elektronlar örnek yüzeyinin 10 nm'lik bir derinliğinden ortaya çıkarlar Bu enerjideki elektronlar ikincil elektron dedektörleriyle tespit edilerek indüklenen elektrik akımının şiddetine göre çıkış sinyali alınır[115].

Gelen elektron demetiyle örneğin yüzeyiyle yaptığı etkileşim sonucu karakteristik X ışınları çıkmaktadır. Örneğe çarpan elektron malzemedeki atomun iç yörüngesinden bir elektron koparmasıyla enerji dengelenmesi için bir üst yörüngedeki elektron bu seviyeye geçerek ortama X ışını yayar. Bu karakteristik x ışını dedektörlerle algılanarak sinyal, bilgisayar sistemine gönderilerek işlenir. Karakteristik X ışınıyla her malzemeye özel olup, malzemenin element bilgisini vermektedir[116].

### 3. DENEY AŞAMASI

Piezoelektrik kristallerin trombosit apoptosinin tespiti için kullanılabilmesi için yüzey modifikasyonu gereklidir. Bu kapsamda kontrollü deneyler yapılabilmesi için deney düzeneği kurulmuş bağımlı ve bağımsız değişkenler kullanılmıştır. Bu deney düzeneğinde piezoelektrik kristallerin rezonans frekansına getirmek için osilatör devresi ve frekans tespiti için frekans sayıcı devresi oluşturulmuştur.

Trombosit apoptosisi tespiti için kullanılacak olan Annexin V molekülünün piezoelektrik kristallerin yüzeyine immobilizasyon edilebilmesi için bir takım işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Çünkü direk olarak immobilize edilen moleküller yüzeye yapışmakta ve gerçek tutunma sağlanamamaktadır. Bu kapsamda yüzey temizliği, hidrofilik yüzey eldesi ve yüzey aktivasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yüzey temizliği ve hidrofilik yüzey eldesi için aseton, metanol ve sodyumhidroksit kullanılmıştır. Ardından kristal yüzeyini aktivasyonu için sırasıyla sistamin, glutaraldehit ve trombosit apoptosisi tanıyıcı molekül olan Annexin V immobilize edilmiştir. Her bir aşamada kristaller nitrojenle kurutulmuş ve frekansları ölçülmüştür. Bütün deneyler biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 Deneyde Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar

Deney düzeneği kurulurken: 5,10,12 MHz'lik Kuvars Kristalleri, QCM( SRS QCM Quartz Crystal Microbalance, İsveç), Biyogüvenlik Kabini(Nüve, Türkiye), manyetik karıştırıcı(IKA, Almanya), pH metre(Sartorius, Almanya), hassas terazi(Sartorius, Almanya), Ultrasonik banyo(Dandelin Sonaex, Almanya), Ultrasaf Su Cihazı(Milipore, Fransa), Dremel Lithium Ion(Dremel, Almanya),Hot Plate(VWR, Amerika),Vakum Pompası(Rocker, Çin) Etüv(Termal, Türkiye), frekans sayıcı(PCE, Çin), osiloskop(Fluke, Almanya), multimetre(Fluke, Almanya), Güç kaynağı(Gwinstek, Tayvan),Takometre(Fluke, Almanya) termohigrometre(TFA, Almanya), termometre(Amatek, Amerika), beherler(Çalışkan, Türkiye), Kumpas(Mitutoyo, Japonya),Otomatik Pipet(Eppendorf, Almanya), Balon Joje(Çalışkan,Türkiye), Pisetler(Çalışkan, Türkiye), Nitrojen(HABAŞ, Türkiye). AFM ve SEM görüntüleri Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi(UNAM)'nde çekilmiştir.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar; Aseton(Merck, Almanya), Metanol(Merck, Almanya),NaOH(Merck, Almanya), Sistamin(SIGMA Aldrich, ABD), Gluteraldehit(Fluka, ABD), HCl(Merck, Almanya), Fosfat Tamponu için(Ambresco, ABD), Borik asit(Aklar Kimya, Türkiye), sodyum tetraborat/HCl Tamponu, Annexin V Protein ab52111(Abcam, ABD) insan kan plazması( Türk Kızılayı Ankara Kan Merkezi) kullanılmıştır.

### **3.2 Deneyin Yapılışı**

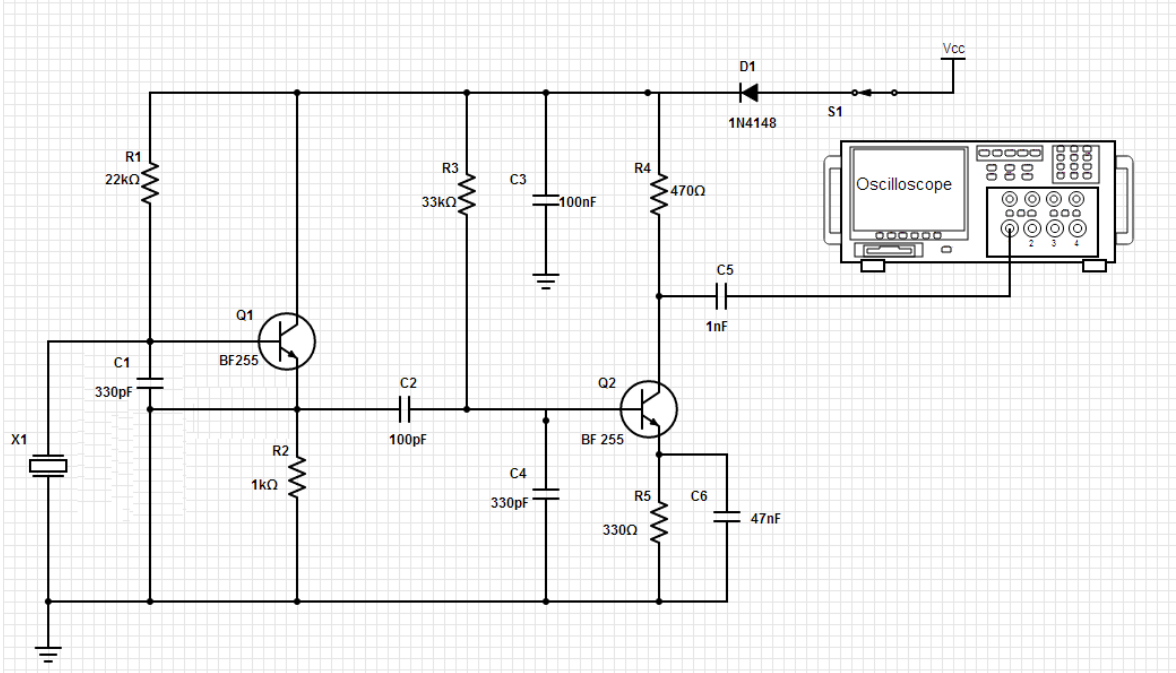
Kuvars kristallerdeki frekans değişimi ile kütle değişimi tespiti yapılabilmektedir. Bu tez kapsamında piezoelektrik algılayıcılar yüzeyine yapılacak immobilizasyon ile trombosit apoptosisin ölçümü yapılmıştır. Kuvars kristaldeki frekans değişimi Saurbey denklemleri kullanılarak kütle değişimi hesaplanabilmektedir. Gümüş elektrotlu kuvars kristallerin, üzerindeki metal kılıflar kesilerek, elektrotlar ve kuvars yüzeyi çıkarılmıştır. Kuvars kristallerin biyosensör olarak kullanılabilmesi için yüzeyde oluşan toz parçacıklarının temizlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple yüzey temizliği ve hidrofilik yüzey eldesi için aseton, metanol ve sodyum hidroksit ile etkileşime sokulmuştur. Sodyum hidroksit ile Ag kuvars yüzeylerinde aktif OH fonksiyonel grupları oluşturulmuştur. Yüzey temizliği ve hidrofilik yüzey eldesinden sonra Annexin V tutunmasını kolaylaştırmak ve ligand-anilat etkileşmesinde ortaya çıkabilecek sterik engellemeleri ortadan kaldırmak için space-arm(uzatma kolu) oluşturulmuştur. Bunun için sistamin ve gluteraldehit immobilizasyonu yapıp ardından trombosit apoptosisin tespitinde kullanılan Annexin V molekülü yüzeye etkileştirilerek biyosensör oluşturulmuştur. Saurbey denklemine göre frekans değişimi ile yüzeydeki kütle değişimi doğru orantılıdır. Kuvars kristallerin kılıflarından çıkarıldıktan sonraki her işlem biyogüvenlik kabiniinde yapılmış olup, her işlemden sonra kristaller nitrojenle kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür.

#### **3.2.1 Osilatör ve frekans sayıcı devreleri**

Piezoelektrik kristaller kullanılarak oluşturulan biyosensörün rezonans frekansına getirebilmesi ve frekansının okunabilmesi trombosit apoptosisinin ölçülebilmesi için önem arz etmektedir. Bu nedenle osilatör ve frekans sayıcı devreleri kullanılmıştır.

### 3.2.1.1 Colpitts osilatör devresi

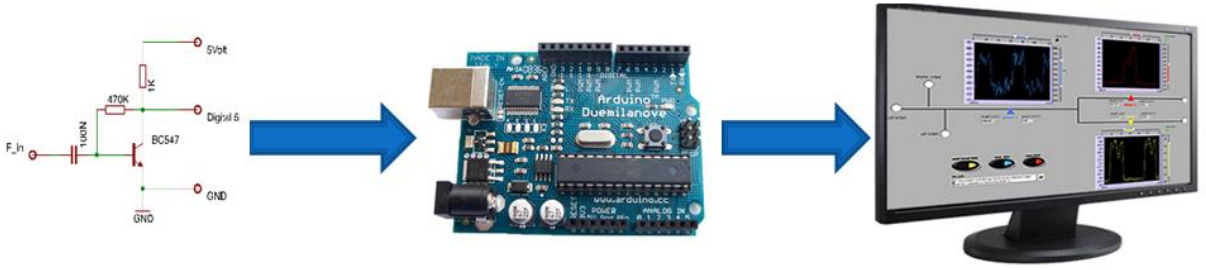
QCM çalışmalarında literatürde birçok osilatör kullanılmıştır[117]. Ancak kararlılığın yüksek olması nedeniyle Colpitts osilatör devresi kullanılmıştır. VHF transistörlerle yüksek frekanslarda yüksek kazanç sağlayan Şekil 3.1'deki collpitts osilatör ve tampon yükselteç devresi kristallerin frekans değişiminin gözlenmesi için kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Colpitts osilatör devresi[118]

### 3.2.1.2 Frekans sayıcı devresi

Frekans sayma işlemi için iki adet frekans sayıcı devresi tasarlanmıştır. İlk frekans sayıcı Arduino mikrodenetleyici kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan frekans sayıcı sisteminde ön yükselteçle sinyal yükselttilerek Arduino mikrodenetleyicisi ile frekans sayımı yapılmıştır. Elde edilen veriler USB port üzerinden bilgisayara gönderilmekte ve arayüzde anlık frekans gözükmemektedir.

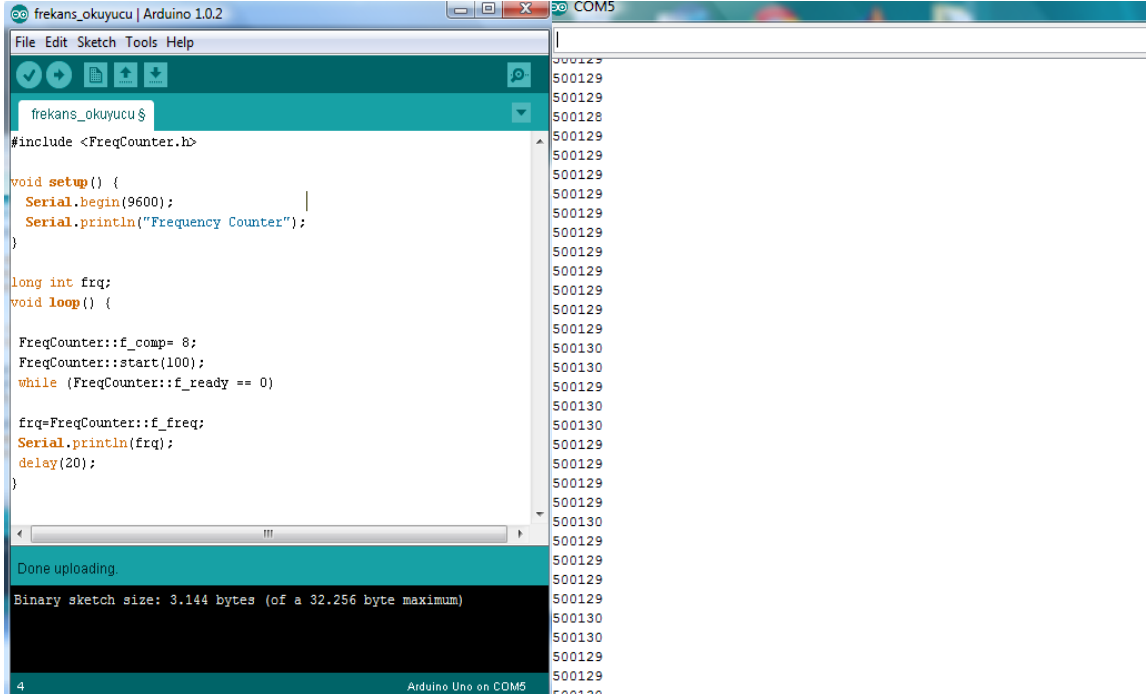


**Şekil 3.2** Hazırlanan frekans sayıcının blok diyagramı



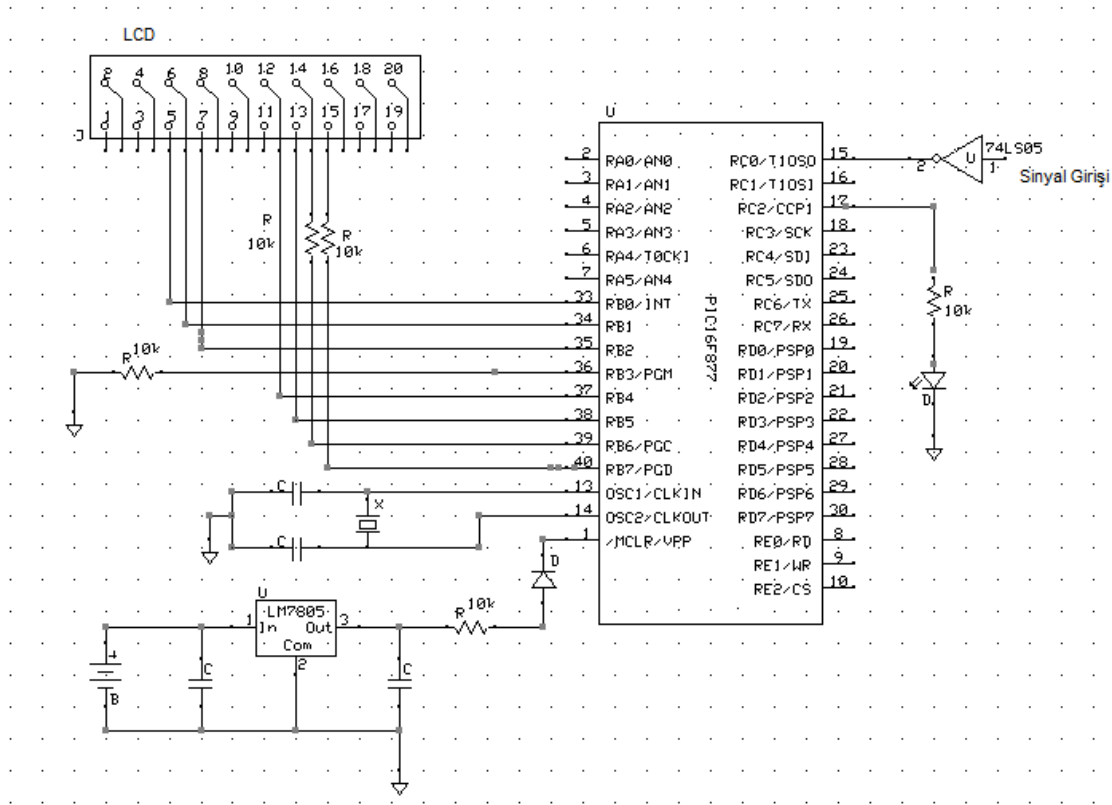
**Şekil 3.3** Arduino ile hazırlanan frekans sayıcının görünümü

Colpitts osilatör devresi ile osilasyona uğrayan kuvars kristalleri Arduino frekans sayıcı ile frekansları ölçülmekte ve COM5 portu kullanılarak frekanslar bilgisayarda görüntülenmektedir.



Şekil 3.4 Arduino ile hazırlanan bilgisayar arayüzü

İkinci kullanılan frekans sayıcı ise PIC mikrodenetleyici ile hazırlanmıştır. Mikrodenetleyicinin yakala ve kıyasla modülü kullanılarak kuvars kristalin frekansı LCD ekranda gösterilmiştir. (Şekil 3.6)



Şekil 3.5 PIC ile yapılmış frekans sayıcı devresi



**Şekil 3.6** PIC ile yapılmış frekans sayıcının görünümü

İki frekans sayıcı birçok deneyde kıyaslanmıştır. Arduino yapılan frekans sayıcı devrenin frekans ölçme konusunda yetersiz kaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bütün deneylerde Colpitts osilatör devresiyle birleştirilmiş PIC frekans sayıcı kullanılmıştır.

### **3.2.2 Kuvars kristal biyosensör yüzeyinin oluşturulması**

#### **3.2.2.1 Kuvars kristal yüzey temizliği**

Kristaller kılıflarından çıkarılırken kuvars yüzeyde metal tozları ve kirlenmeler meydana gelmektedir. Bu sebeple üretim esnasında ve kılıf çıkarma sırasında ortaya çıkan tozları yok edilmesi ve immobilizasyon yapılması gerekmektedir.

Klemens uçlarına sabitlenen kuvars kristaller, 10mL'lik beherle sırasıyla 0.5M aseton ve 0.5M metanol ile sabit sıcaklıkta 300 rpm'de 30 dakika yıkanmıştır.

Yüzey temizleme işleminde aseton ve metanol kullanımında süre önemli bir faktördür. 30 dakikanın üstünde yapılan deneylerde kristallerin yüzeylerinde çatlama ve elektrotlarında kopmalar meydana gelmiştir. Bu sebeple süre maksimum 30 dakika olarak belirlenmiştir.

Her bir aşamadan sonra kristaller 5 dakika ultra saf suyla ve ultrasonik banyoda 3 dakika yıkanıp nitrojenle kurutulmuştur. Temizleme işlemlerinde kristallerin frekans değerleri ölçülerek değişimler izlenmiştir.

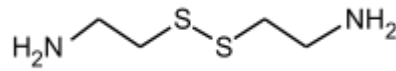
### **3.2.2.2 Kuvars kristal yüzey aktivasyonu**

Kuvars kristallerin yüzeyleri temizlendikten sonra 0.5M NaOH'le sabit sıcaklıkta, 300rpm'de 30 dakika etkileştirilerek yüzeyde OH fonksiyonel grupları oluşturulmuştur. Her bir aşamadan sonra kristaller 5 dakika ultra saf suyla ve ultrasonik banyoda 3 dakika yıkanıp nitrojenle kurutulmuştur ve frekans değerleri okunarak kaydedilmiştir.

Bütün aşamalarda ultra saf suyla ve ultrasonik banyoda yıkama yapılması yüzeyde oluşan tuzların uzaklaştırılması açısından önemlidir. Böylece fiziksel olarak tutunan moleküllerin kristal yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Aksi takdirde kristal yüzeyinde tuzlar birikmektedir. Kristaller yüzeyine diğer immobilizasyonlara yer kalmamakta ve kristal doyum noktasına gittiğinden doğru ölçüm alınmamaktadır.

### **3.2.2.3 Sistamin immobilizasyonu**

Yüzey temizlik aşamasın kuvars kristallerinde yüzeyinde oluşan OH gruplarıyla tiyol(SH) ve amin (NH<sub>2</sub>) içeren bifonksiyonel özelliğe sahip sistamin molekülü immobilizasyon edilmesiyle kristal yüzeyinde yeni fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Sistaminin, tiyol ucunun kristal yüzeyine tutunması sağlanmıştır.



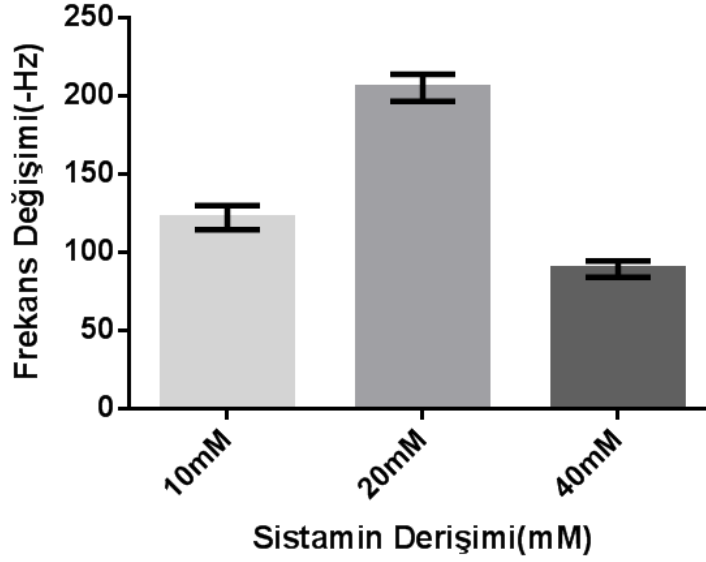
**Şekil 3.7** Sistamin molekül yapısı

Kristallerde sistamin molekülüyle maksimum fonksiyonel grup oluşturulması biyosensörün ölçüm aralığı artıracağı için farklı sistamin derişimlerinde ölçümler alınmıştır. Bu amaçla 10, 20, 40 mM'lık sistamin derişimleri(0.1M, pH:7); sabit sıcaklık,30 dakikada, 300 rpm'de ve karanlık ortamda reaksiyona sokulan kristaller 5 dakika ultra saf suyla ve 3 dakika ultrasonik banyoda yıkanmıştır. Böylelikle



fiziksel absorpsiyon olan pasif moleküllerden yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Kristaller nitrojenle kurutularak frekans değerleri ölçülmüştür.

### Sistamin Derişiminin Frekans Değişimine Etkisi

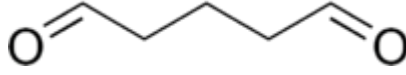


Şekil 3.8 Sistamin derişiminin frekans değişimine Etkisi(N=5)

Şekil 3.1 'de görüldüğü gibi aynı şartlar altında aynı anda deneye sokulan farklı konsantrasyondaki kuvars kristallerde en fazla frekans değişimi 20 mM'lık derişim uygulanmış kristalde meydana gelmiştir. Bu sebepten dolayı sistamin aşamalarında 20mM'lik derişim kullanılmıştır.

#### 3.2.2.4 Glutaraldehit immobilizasyonu

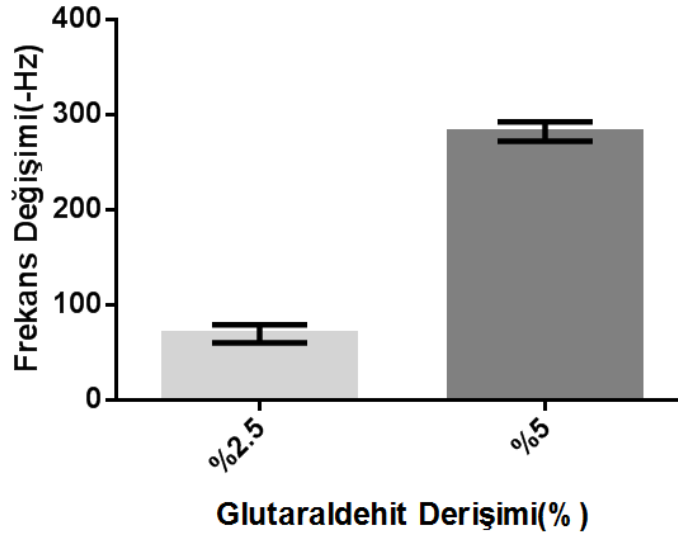
Trombosit apoptosisi tanıyıcı molekölü olan Annexin V immobilizasyonu için ligand moleküllerinin aktif uçlarının kristal yüzeyinden dışarı bakması gerekir. Böylelikle uzatma kolu yardımıyla kristal yüzeyine Annexin V bağlanabilmekte ve ligand-anilat etkileşiminde ortaya çıkabilecek sterik engellemeler ortadan kaldırılır[95]. Bu nedenle kristal yüzeyine sistamin immobilizasyon sonrası yüzeyde uzatma kolu bifonksiyonel özelliğe sahip glutaraldehit kullanılmıştır. Sistaminin serbest olan ucu ile glutaraldehidin aldehit uçlarının reaksiyona girerek kovalent bağlanması sağlanmıştır.



**Şekil 3.9** Glutaraldehit molekül yapısı

Sistamin immobilizasyonundan sonra %2.5 ve %5 derişimli iki farklı glutaraldehit derişimi hazırlanmıştır. Sabit sıcaklık, 45 dakikada, 300 rpm'de ve karanlık ortamda reaksiyona sokulan kristaller 5 dakika ultra saf suyla ve 3 dakika ultrasonik banyoda yıkanmıştır. Kristaller nitrojenle kurutulduktan sonra frekans değerleri ölçülmüştür.

### Glutaraldehit Derişiminin Frekans Değişimine Etkisi

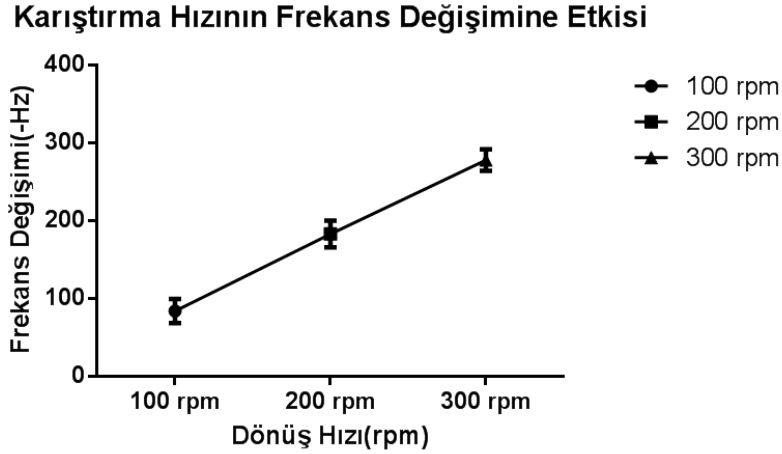


**Şekil 3.10** Glutaraldehit derişiminin frekans değişimine etkisi(N=5)

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi sistamin immobilizasyonu sonrasında %2.5'luk ve %5'lik glutaraldehit immobilizasyonunda %5 glutaldehit derişiminde frekans kayması daha fazladır. Bu nedenle deneylerde %5'lik glutaraldehit çözeltisi kullanılmıştır.

Glutaraldehit immobilizasyonunda derişim sabit ve diğer etkenler sabit tutularak manyetik karıştırıcının hızı etkisi araştırılmıştır.100 rpm, 200 rpm ve 300 rpm olmak üzere üç farklı hızda sistamin sonrası %5'lik glutaraldehit çözeltileriyle, sabit sıcaklıkta, 45 dakikada ve karanlık ortamda tepkimeye sokulmuştur. Ardından 5

1 dakika ultra saf suyla ve 3 dakika ultrasonik banyoda yıkandıktan sonra kurutulmuş ve ölçümler alınmıştır.



**Şekil 3.11** Karıştırma hızının frekans değişimine etkisi(N=5)

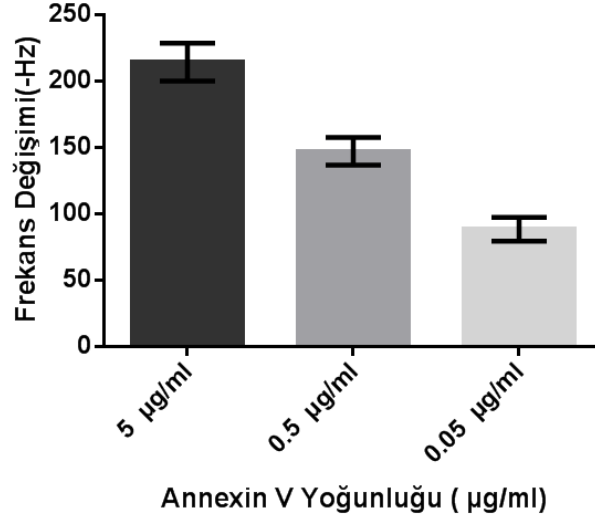
Yukarıdaki grafikte görüldüğü gibi en fazla frekans değişimi 300 rpm’de olurken en az frekans değişimi ise 100 rpm’de gerçekleşmiştir. Bunun sebebi daha hızlı dönen manyetik balıkların kuvars kristalin glutaraldehitle daha fazla temas etmesinden dolayıdır. Bu nedenle çevirme hızıyla immobilizasyon miktarı arasında doğrusal bir ilişki söz konusudur.

### **3.2.2.5 Annexin V immobilizasyonu**

Trombosit apoptosisin tanıyıcısı olan Annexin V, 50 µg 0.5mg/ml derişimindeki stoktan fosfat tamponu(pH 7.4) ile 1/100, 1/1000, 1/10000 derişimlerinde seyreltilerek 5µg/ml, 0.5 µg/ml ve 0.05 µg/ml’lik konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Biyogüvenlik kabininde kristallerin yüzeylerine 10µl mikropipetle damlatılmış ve 45 dakika immobilizasyonun gerçekleşmesi için beklenmiştir.

Kristaller, manyetik karıştırıcıda 37°C ve 300 rpm hızda fosfat tamponuyla(pH 7.4) 15 dakika etkileştirilmiştir. Yüzeyde immobilize olmayan antikorlar sterik engelleme olmaması amacıyla uzaklaştırılmıştır. Ardından kristaller ultrasonik banyoda 3 dakika ultra saf su ile yıkanmıştır. Kristaller etüv içerisinde 37°C kurutulduktan sonra frekansları ölçülmüştür.

### Farklı Annexin V Konsantrasyonlarının İmmobilizasyona Etkisi



**Şekil 3.12** Farklı Annexin V konsantrasyonlarının immobilizasyona etkisi(N=5)

Grafikte 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seyreltilmiş Annexin V konsantrasyonlarından en fazla frekans düşmesinin 5 µg/ml derişim uygulanan kristaller olduğu tespit edilmiştir. Frekans düşmesinin immobilize olan Annexin V kütlesiyle doğru orantılıdır.

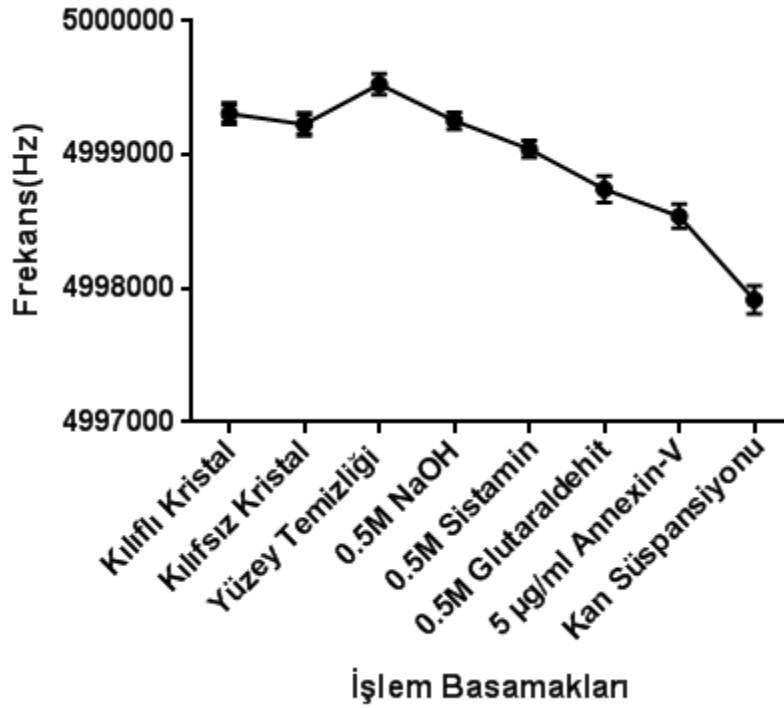
#### 3.2.3 Kanla yapılan deneyler

Kuvars kristallerin yüzey temizliği ve hidrofilik yüzey eldesi, kristallerin yüzey aktivasyonu ve Annexin V immobilizasyonu sonucunda oluşturulan biyosensör insandan alınan kan ile trombosit apoptosinin ölçülmesinde kullanılacaktır. Kan, sıcaklık, nem gibi çevresel şartlarından doğrudan etkilendiğinden dolayı işlemler kısa zaman aralığında gerçekleştirilmiştir.

Kanın hücrelerinde aktiflenmemesi ve parçalanmaması için kalın uçlu enjektör 5 birim heparinle yıkanmıştır. Sağlıklı bir insanın venöz damardan 30cc'lik kan alınmıştır. Alınan kan 1,5ml'lik EDTA tüplere konularak, 15 °C, 3000 rpm devirde santifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki buffy coat kısmından trombosit aktivasyonu baskılanmış hücreler toplanmıştır. Baskılanan trombosit aktivasyonu tekrar gerçekleşmesi için 5 birim protamin örneklere eklenmiştir.

Annexin V immobilize edilmiş kuvars kristal yüzeyleri ile hazırlanan aktiflenmiş trombositçe zengin süspansiyonla 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı da 300 rpm'de etkileşime sokulmuştur. Daha sonra fiziksel tutunmaların uzaklaşmasını sağlamak için 3 dakika ultrasonik banyo ile yıkanmıştır. Kurutulduktan sonra frekansları ölçülmüştür.

Kılıflarından çıkarılmış kristaller, yüzey temizliği, sodyum hidroksit, sistamin, glutaraldehit ve Annexin V ile etkileştirilmiş ve kan süspansiyona sokularak frekans değerleri ölçülmüştür.



**Şekil 3.13** Tüm işlem basamaklarında kristalleri ortalama frekans değişimi

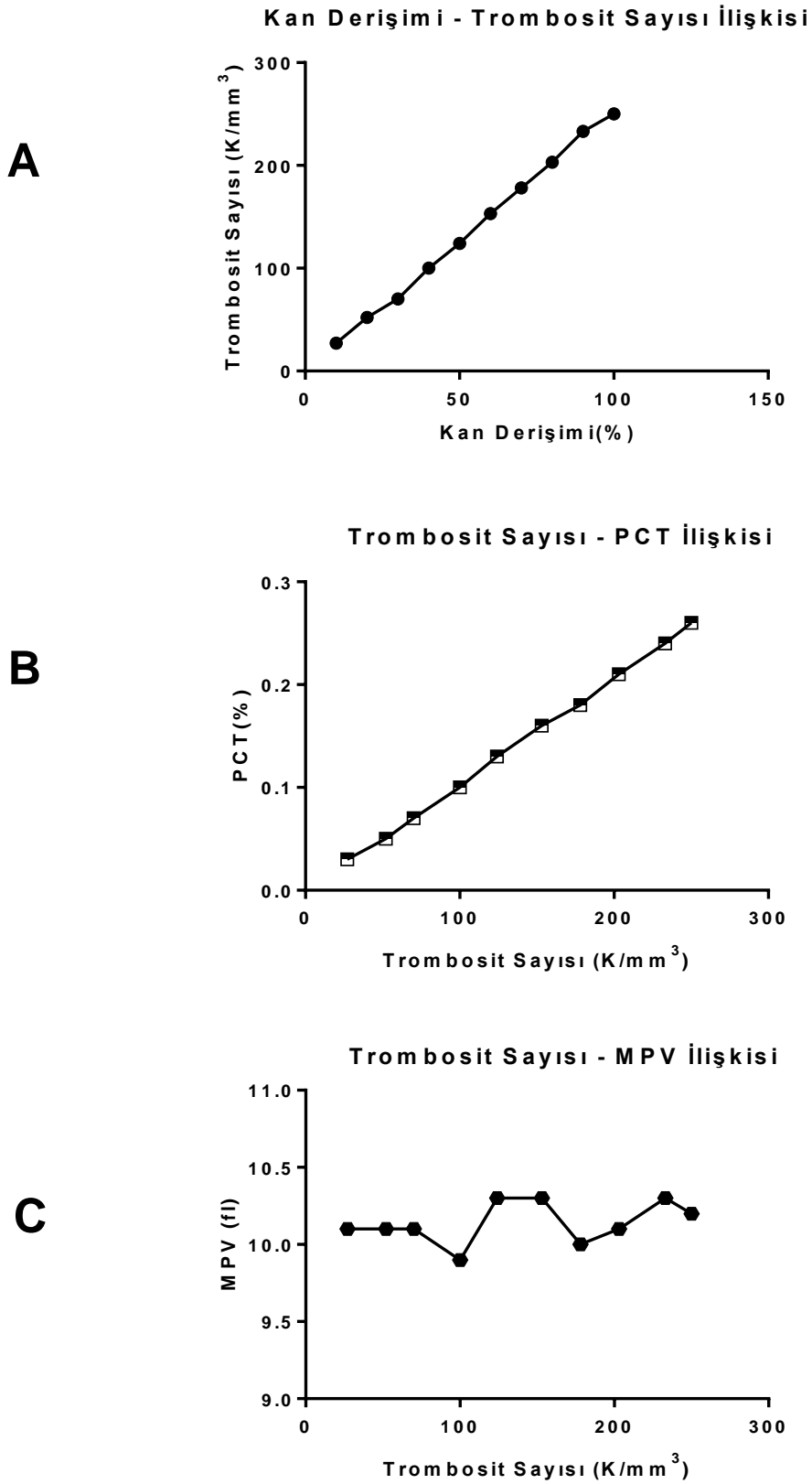
Tez kapsamında %100,%90,%80,%70,%60,%50,%40,%30,%20,%10'luk 10 adet kan derişimi fosfat tamponuyla(pH=7) seyreltilmiş ve baskılanan trombosit aktivasyonun tekrar gerçekleşmesi için 5 birim protamin örneklere ilave edilerek hazırlanmıştır. Her bir örnek iki parçaya ayrılarak bir parçası kuvars kristal deneylerinde kullanılmıştır. Ayrılan diğer parça ise Ankara Düzen

Laboratuvarından trombosit sayımı, MPV ve PCT değerlerine bakılmıştır. Trombosit sayımı sonuç tabloda belirtilmiştir.

**Çizelge 3.1** On farklı kan derişimindeki trombosit sayısı, MPV ve PCT değerleri

<b>Örnek No</b>	<b>Kan Derişimi(%)</b>	<b>Trombosit Sayısı(K/mm<sup>3</sup>) (130-400)</b>	<b>MPV(fl) (7.2- 11.1 )</b>	<b>PCT(%) (0.1-0.41)</b>
1	100	250	10.2	0.26
2	90	233	10.3	0.24
3	80	203	10.1	0.21
4	70	178	10	0.18
5	60	153	10.3	0.16
6	50	124	10.3	0.13
7	40	100	9.9	0.1
8	30	70	10.1	0.07
9	20	52	10.1	0.05
10	10	27	10.1	0.03

Tabloda görüldüğü gibi kan derişimi azaldıkça trombosit sayısı ve kanın yüzde kaçının trombositlerden oluştuğunu gösteren Trombosit Crit (PCT) değerinin azaldığı görülmektedir. Ancak derişimle beraber trombositlerin ortalama büyüklüğünü gösteren Mean Platelet Volume(MPV) değeri sabit kalmaktadır.



**şekil 3.14** Kan derişimi – trombosit sayısı grafiği(A), trombosit sayısı – PCT ilişkisi grafiği(B), trombosit sayısı – MPV ilişkisi grafiği(C)

Hazırlanan derişimler Annexin V immobilize edilmiş kristallerle sabit sıcaklıkta, 300 rpm hızda etkileşime sokulmuştur. Daha sonra fiziksel tutunmaların uzaklaştırılması için 3 dakika ultrasonik banyoda yıkanmıştır. Etüvde 37 °C kurutulan kristallerin frekansları ölçülmüştür.

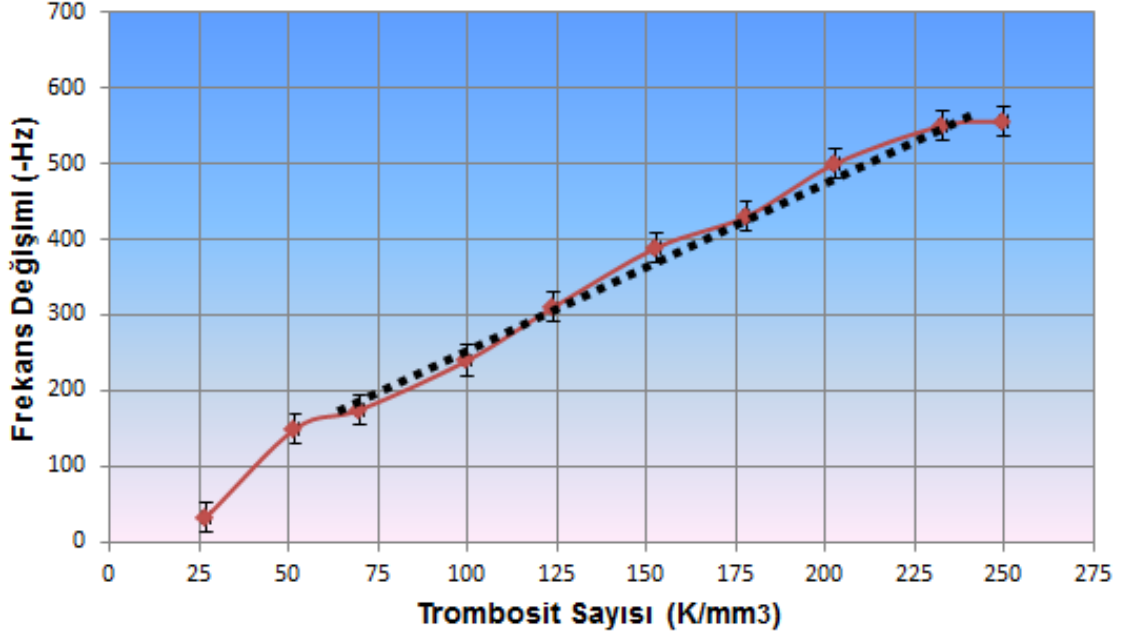
**Çizelge 3.2** Kan derişimiyle frekans değişimi çizelgesi

<b>Kan Derişimi</b>	<b>Trombosit Sayısı(K/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Frekans Değişimi(-Hz)</b>
%10	27	33,2
%20	52	150,1
%30	70	175,7
%40	100	240,5
%50	124	310,3
%60	153	389,8
%70	178	430,9
%80	203	500,3
%90	233	550,4
%100	250	555,1

Trombosit sayısı arttıkça kristallerin frekansında buna paralel olarak azaldığı gözlenmiştir. Yüzeyi Annexin V ile modifiye edilmiş kuvars kristallerin frekansında trombosit sayısına bağlı olarak bir azalma meydana gelmiştir. Bunun sebebi aktiflenmiş trombositlerin kuvars kristal yüzeyinde tutunmasıdır.



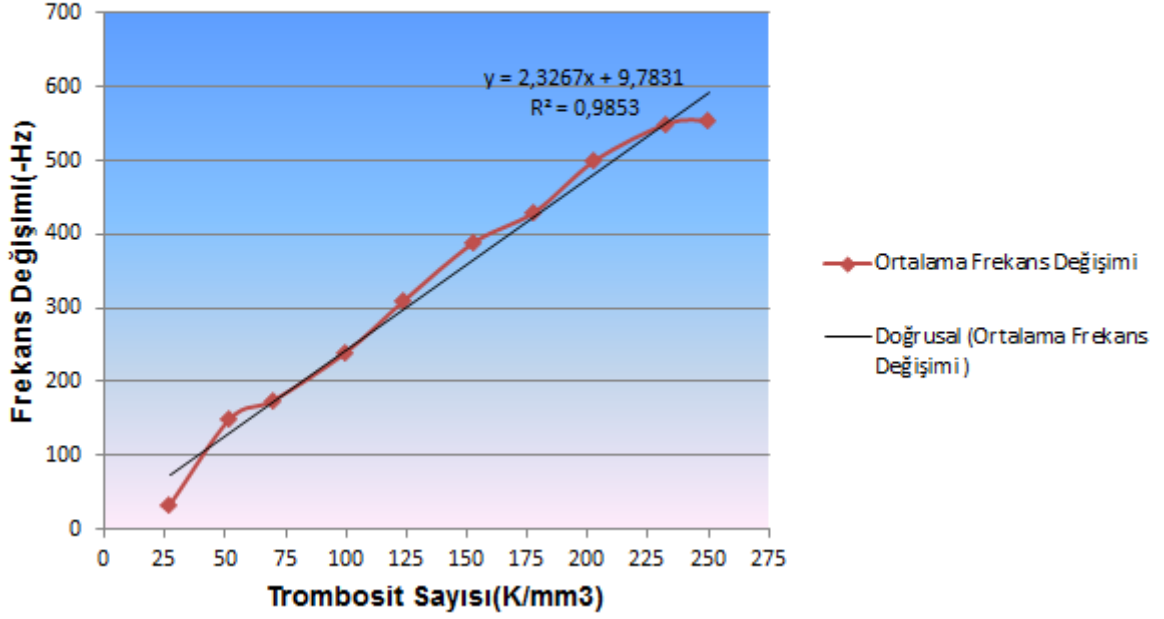
### Trombosit Sayısı- Frekans Değişimi Grafiği



**Şekil 3.15** Trombosit sayısı- frekans değişimi grafiği(N=3)

Yukarıdaki Şekil 3.15'te görüldüğü gibi hazırlanan biyosensörün bir cevap aralığı bulunmaktadır. Farklı trombosit sayılarında alınan ölçümler sonucunda biyosensörün en iyi çalıştığı aralık 75 ile 225 K/mm<sup>3</sup> trombosit sayısının olduğu alandır. Bu aralıkta kalibrasyon eğrisi doğrusala yakındır.

### Biyosensörün Farklı Trombosit Sayılarındaki Ortalama Frekans Değişimi



**Şekil 3.16** Biyosensörün farklı trombosit sayılarındaki ortalama frekans değişimi(N=3)

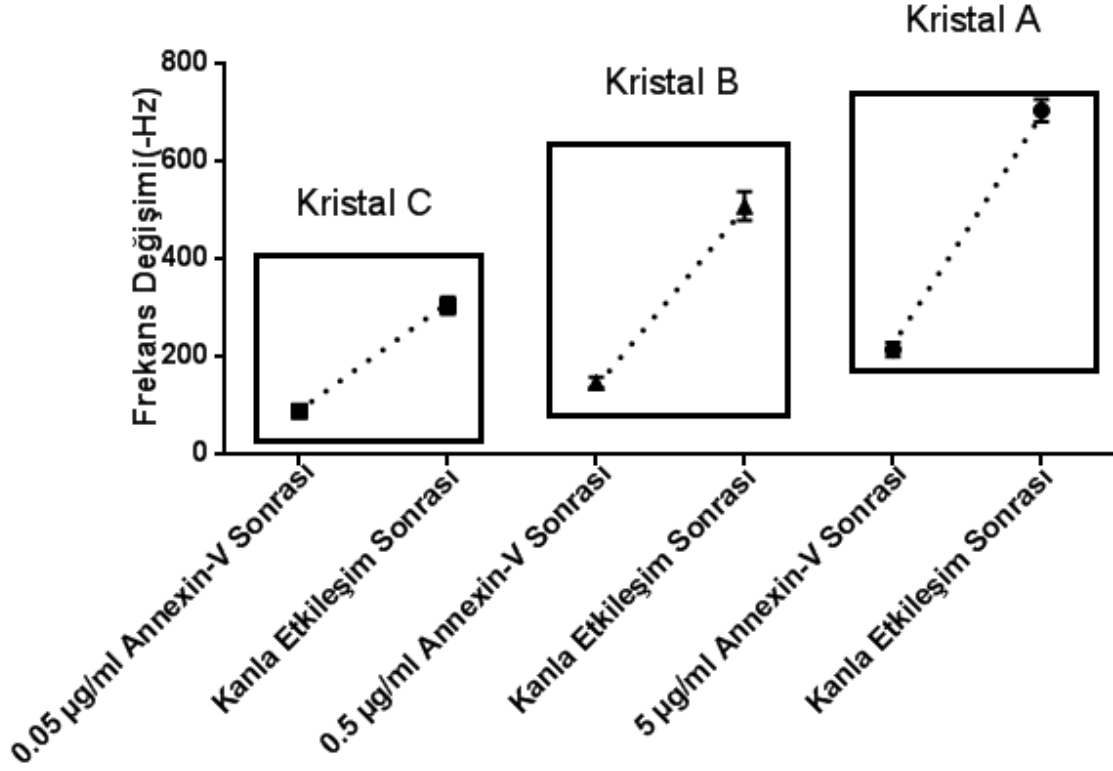
Her trombosit sayısında üç farklı kristalle yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak biyosensörün farklı trombosit sayılarındaki ortalama frekans değişimi grafiği oluşturulmuştur. Biyosensörün en iyi cevap verdiği trombosit sayısı aralığı olan 75-225 K/mm<sup>3</sup> aralığında  $y=2,3267x+9,7831$  doğru denklemi elde edilirken regresyon katsayısı da 0,9853 olarak bulunmuştur.

Trombosit aktivasyonu ve erken trombosit aktivasyonu belirteci olan Annexin V derişiminin biyosensör üzerindeki etkisi araştırılması için standart protokol gerçekleştirilerek aseton, metanol, sodyumhidroksit, sistamin ve glutaraldehit ile kristaller immobilizasyon edildikten sonra 5µg/ml, 0.5 µg/ml ve 0.05 µg/ml'lik konsantrasyonlar hazırlanan Annexin V immobilize edilmiştir. Kristal A 5µg/ml Annexin V konsantrasyonu, Kristal B 0.5µg/ml ve kristal C ise 0.05µg/ml Annexin V konsantrasyonu ile etkileştirilmiştir. Annexin V immobilizasyonundan sonra her kristal aynı miktarda trombosit içeren kan derişimi uygulanmıştır. Her bir kristal grubu için beşer adet kristalde sonuçlar alınarak ortalama frekans değişimi tablodaki gibidir.

**Çizelge 3.3** Farklı Annexin V Derişiminde Aynı Sayıda Trombosit İçeren Kan Derişimi Sonrası Frekans Değişimi(N=5)

<b>Kristal Adı</b>	<b>Uygulanan Annexin V Derişimi(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Uygulanan Annexin V Sonrası Frekans Değişimi (-Hz)</b>	<b>Uygulanan Kanın Trombosit Sayısı (<math>\text{K/mm}^3</math>)</b>	<b>Aynı Sayıda Trombosit İçeren Kan Derişimi Sonrası Frekans Değişimi(-Hz)</b>
<b>Kristal A</b>	5 $\mu\text{g/ml}$	214,4	203	489,6
<b>Kristal B</b>	0.5 $\mu\text{g/ml}$	147,2	203	361,4
<b>Kristal C</b>	0.05 $\mu\text{g/ml}$	88,4	203	216

Kristallere uygulanan farklı miktarlardaki Annexin V immobilizasyonu sonrası 203  $\text{K/mm}^3$  trombosit içeren kan derişimleri kristallere uygulanmıştır. Bu işlemde sonra ölçülen frekanslarda diğer kristallere göre yoğun Annexin V içeren kristallerdeki frekans değişimi daha fazlayken, diğer kristallere oranla daha az Annexin V içeren kristallerin kanla etkileşimi sonucu frekans sayısı daha azdır.



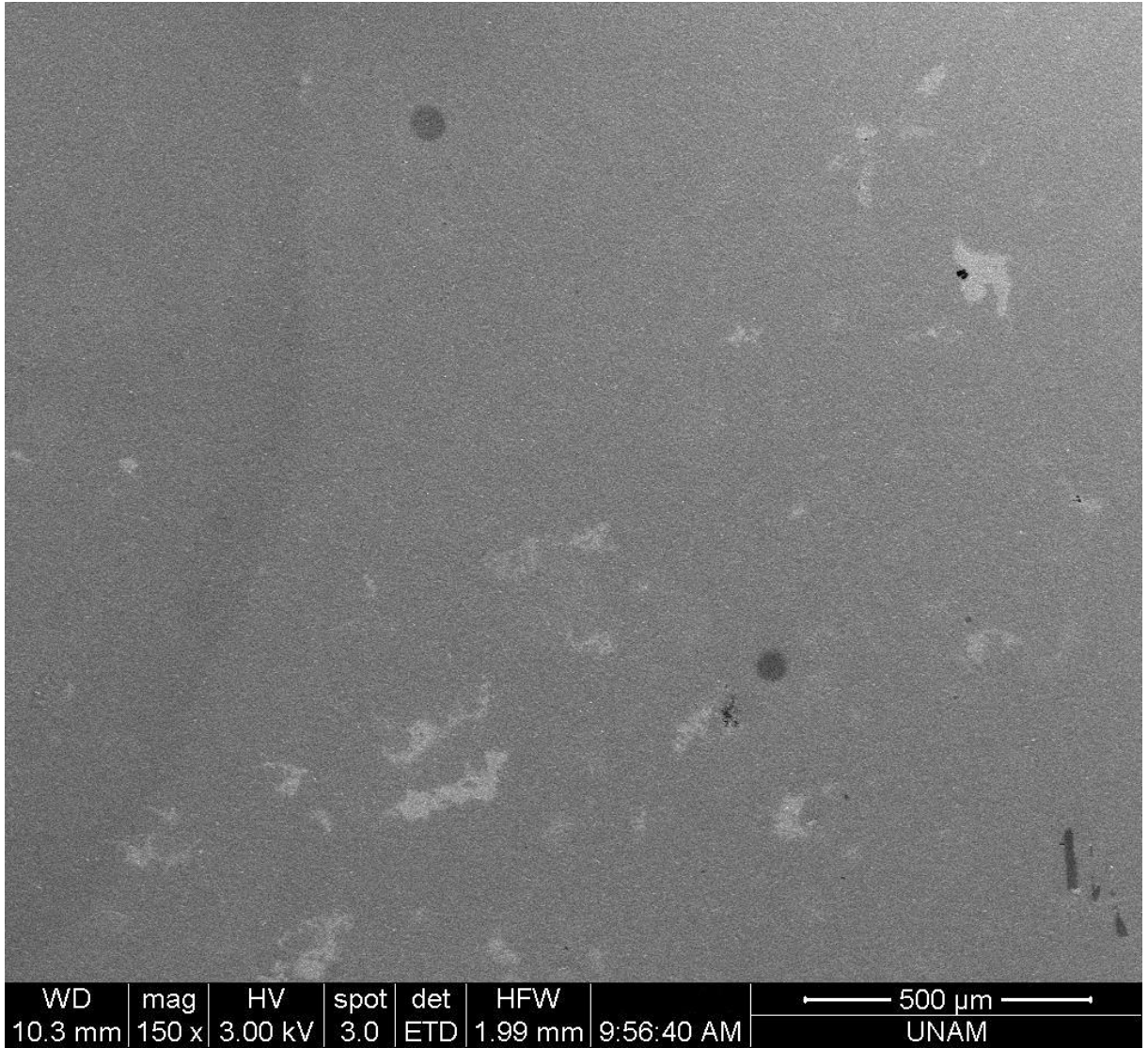
**Şekil 3.17** Farklı derişimlerdeki Annexin V biyosensörünün aynı trombosit sayısındaki kan derişimiyle etkileşimi(N=5)

Kanda etkileştirilen farklı derişimlerde hazırlanmış Annexin V immobilize kristallerinin kanla etkileşimi sonucu frekans değerlerinde düşme tespit edilmiştir. Ancak derişim oranlarıyla frekans derişimleri kıyaslanacak olursa yüksek derişimli Annexin V içeren biyosensörle düşük konsantrasyon içeren kuvars kristalleri arasında belirgin bir fark yoktur. Bunun sebebi Saurbey denkleminin kuvars kristal elektrot yüzeyine ince bir film halinde tutunan antijen geçerlidir ve içerisinde homojen olarak bulunan Annexin V proteinin tamamı elektrot yüzeyinde toplanmayacaktır. Bu nedenle elektrot yüzeyinde boş alanların kalması durumları ile analit içerisindeki aktiflenmiş trombositler sayısı azaldıkça değişecek olan pozitif ve negatif yükler arasında itme ve çekme kuvvetleri oluşmaktadır.

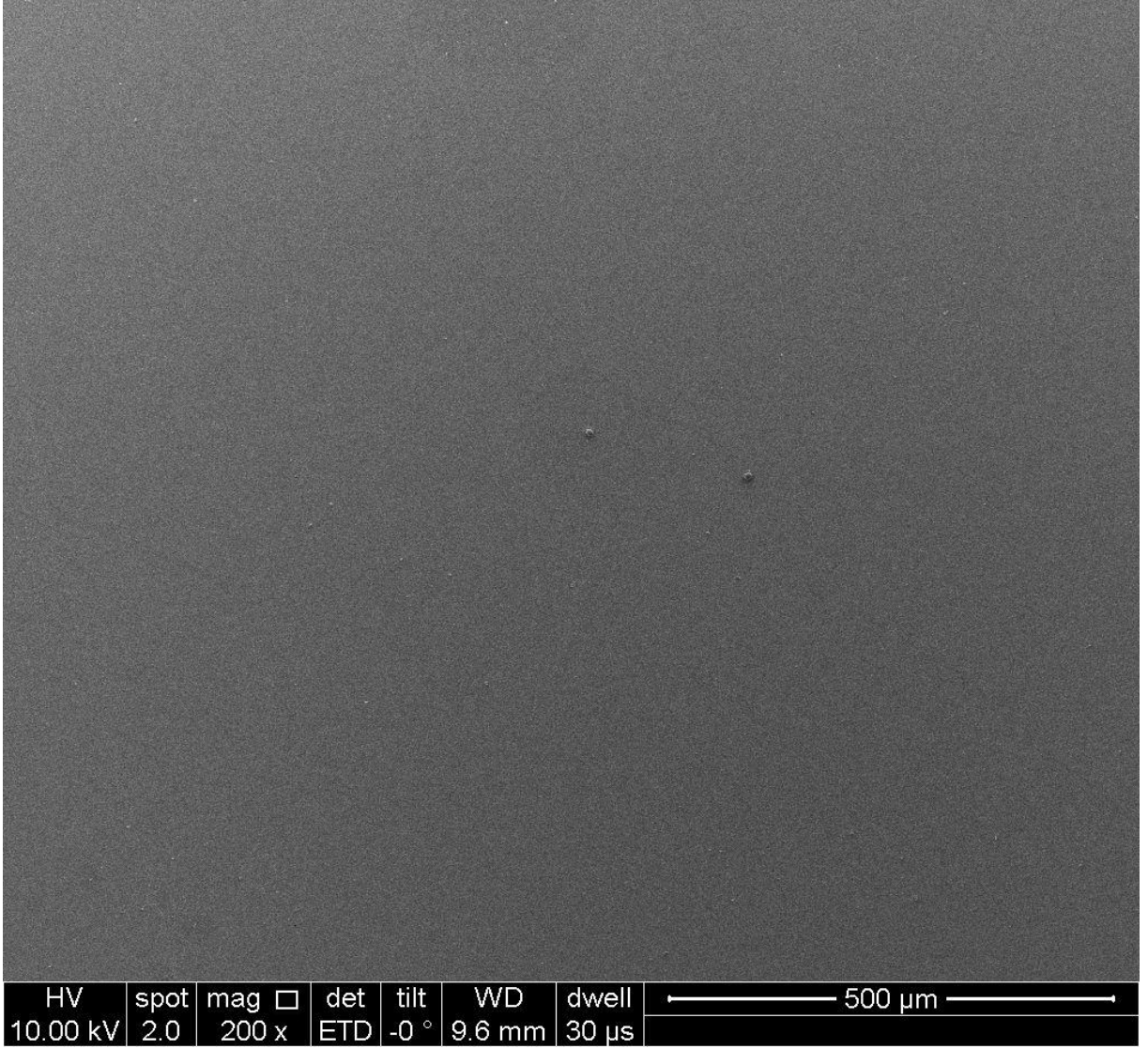
### 3.2.4 Kuvars kristal yüzey karakterizasyonu

#### 3.2.4.1 Taramalı elektron mikroskobu(SEM) görüntüleri

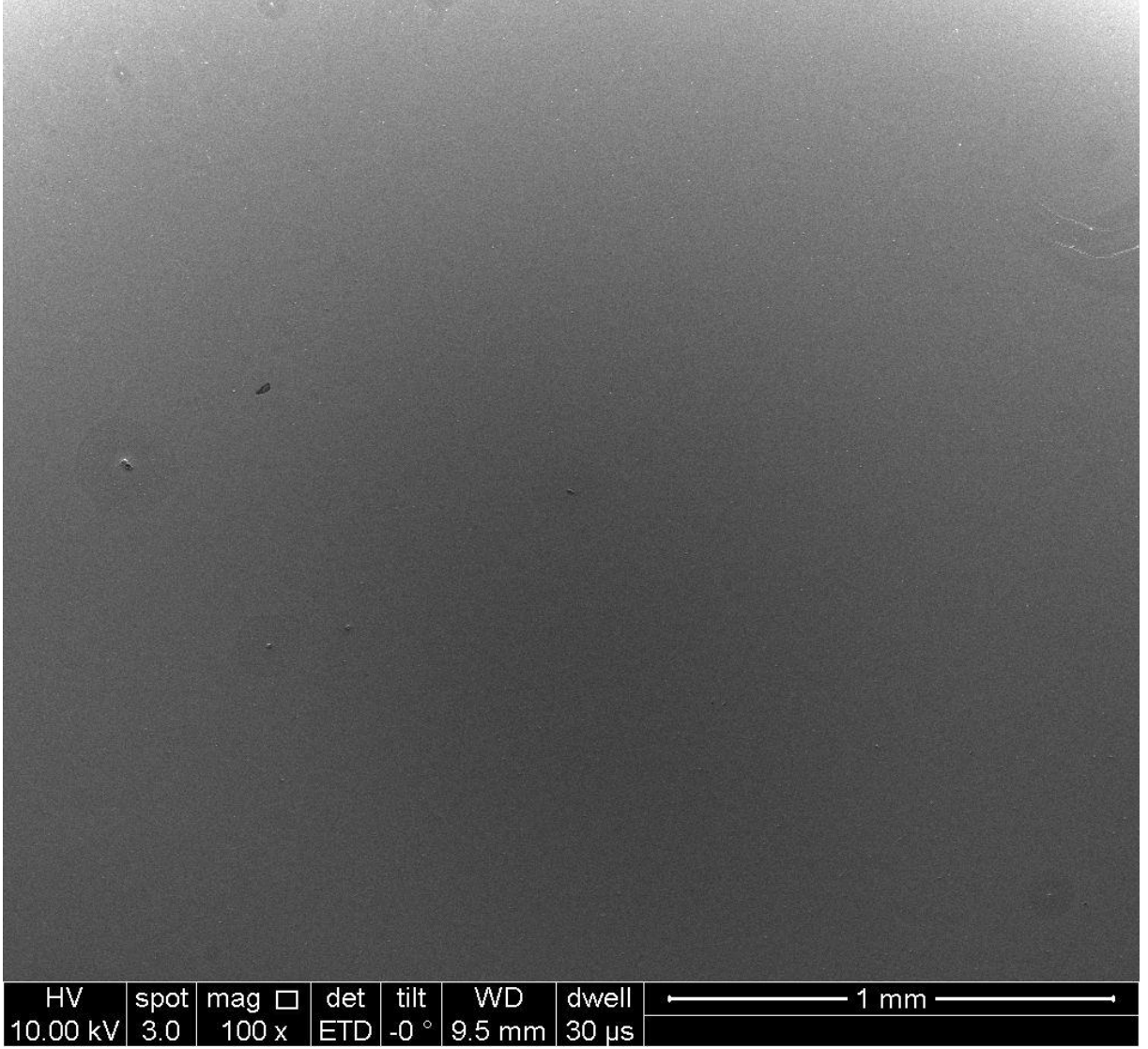
Kılıflı Kuvars kristallerinin kılıflarından çıkarılma işlemi esnasında metal tozları ve çevresel etmenlerin yüzeyde birikmesi sonucu kuvars kristal frekansında artma meydana gelmiştir. Annexin V immobilizasyonu yapılabilmesi ve yüzeyin temizlenmesi için kristaller aseton ve metanolle yıkanmıştır.



Şekil 3.18 Kirli yüzeyin 150x SEM görüntüsü



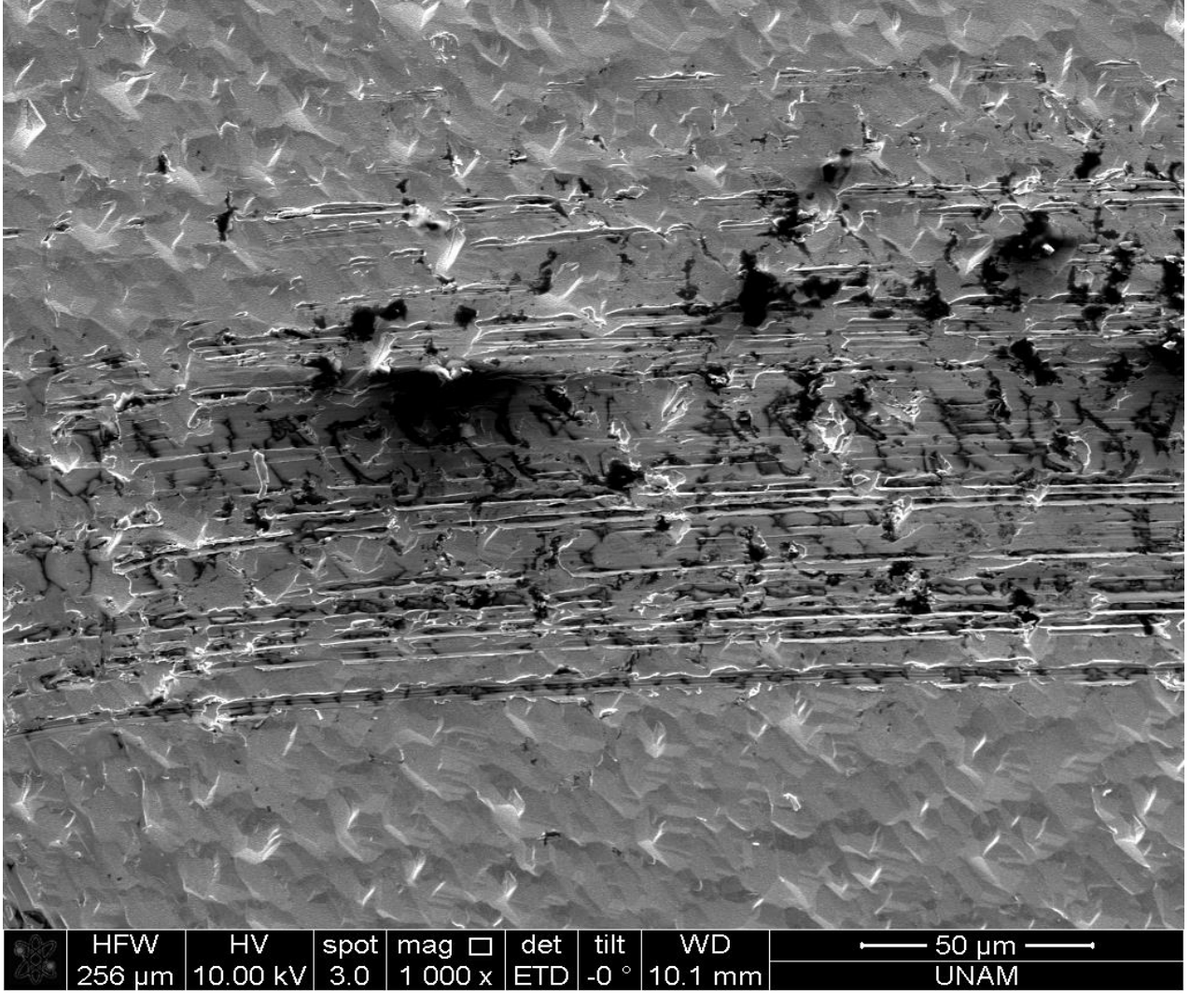
**Şekil 3.19** Temizlenmiş yüzeyin 200x SEM görüntüsü



**Şekil 3.20** Temizlenmiş yüzeyin 200x SEM görüntüsü

Yapılan Temizleme işlemlerinden sonra yüzeyde bulunan materyaller temizlendiğin kütle azalmıştır. Buna bağlı olarak frekansta yükselme meydana gelmiştir. Yüzeyin temizlenerek kimyasal immobilizasyona hazır hale geldiği SEM görüntülerinde de görülmektedir. Ancak kuvars kristalinin yüzey temizleme prosedüründe yüksek molaritede kullanılan aseton yüzeylere zarar verdiği görülmüştür(Şekil 3.21). Bu nedenle bu deneylerde 0.5M aseton çözeltisi kullanılarak kuvars kristallerin yüzeylerinin aşınması engellenmiştir.

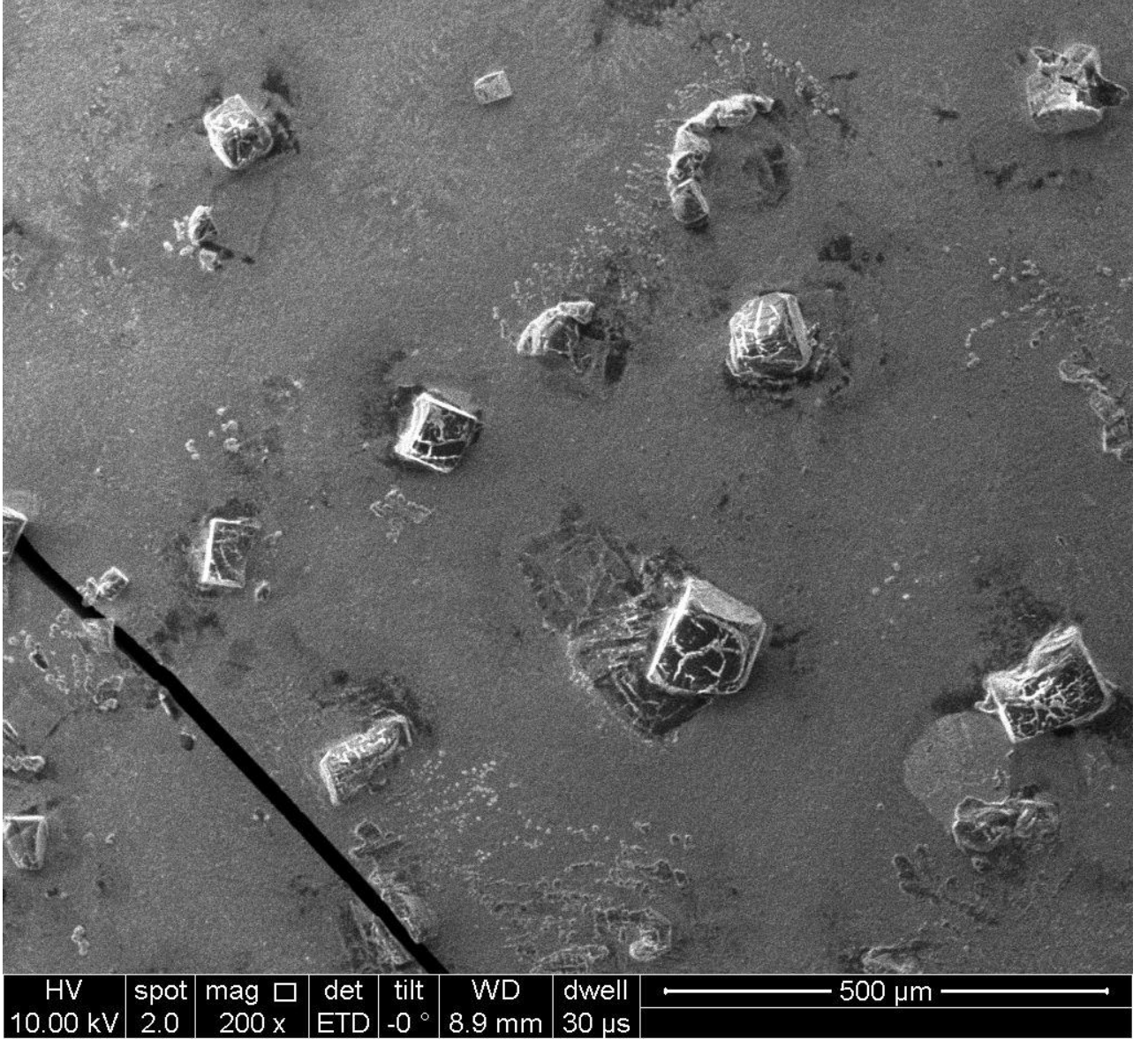




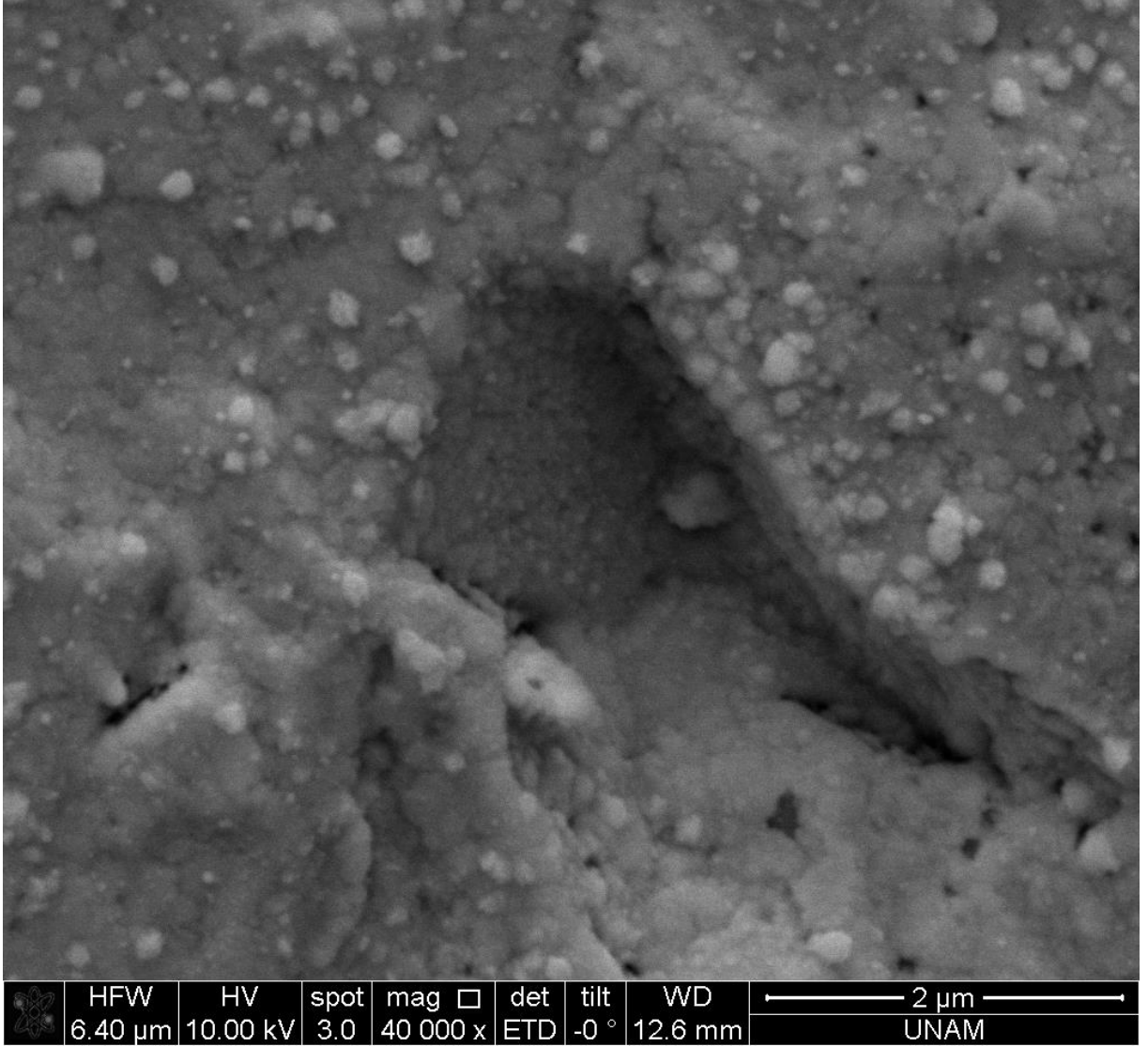
**Şekil 3.21** Yüksek derişimindeki aseton çözeltilisinden dolayı aşınan yüzeyin 1000x SEM görüntüsü

Hidrofilik yüzey elde etmek amacıyla 0.5M NaOH ile kuvars kristallerin etkileştirilmiştir. Ancak ultra saf su ve ultrasonik banyo ile kristallerde yıkama yapılmadığı takdirde sodyumhidroksit yüzeyde birikmektedir.



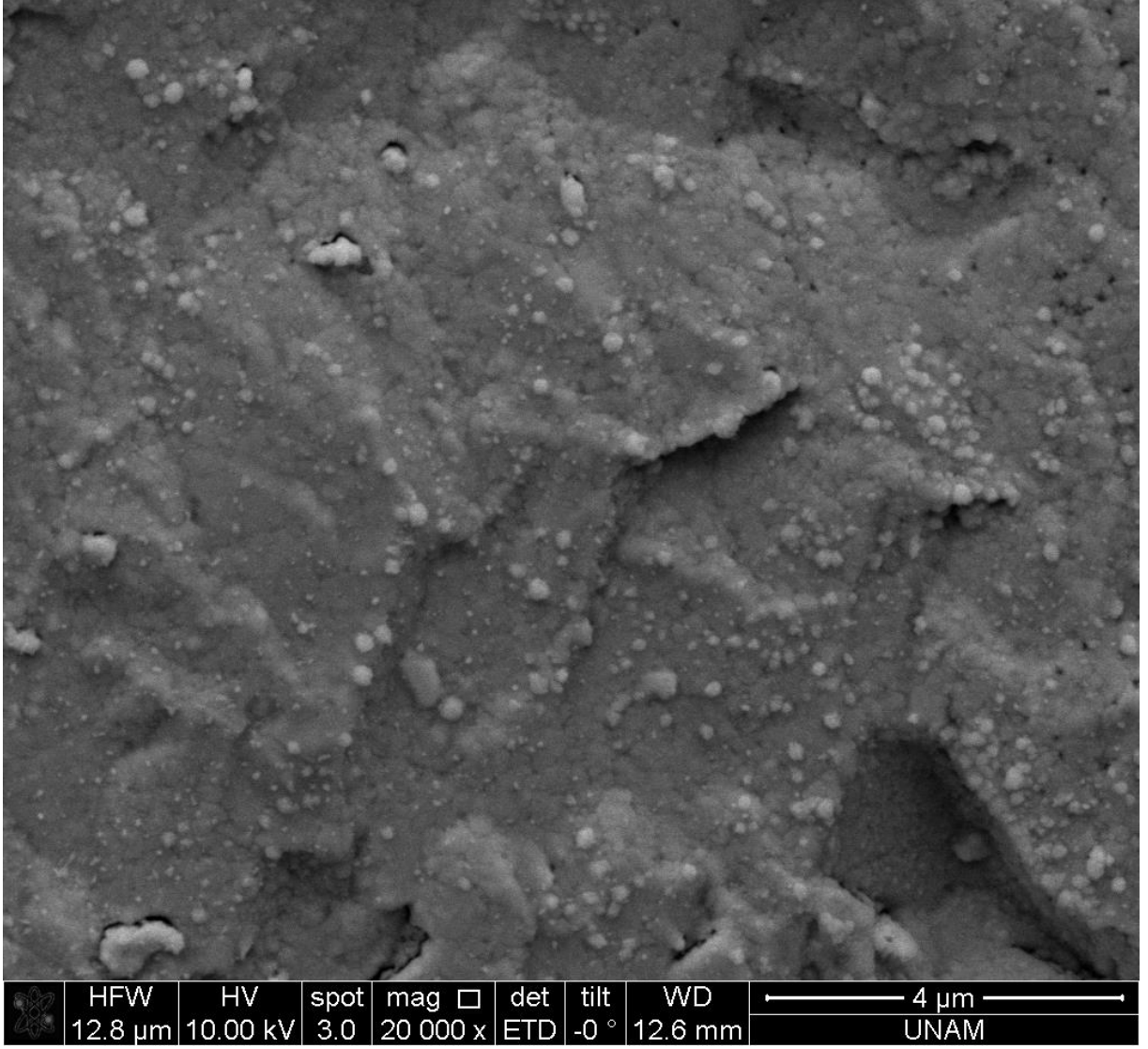


**Şekil 3.22** Ultra saf su ve ultrasonik banyo ile yıkanmamış kristalin 200x SEM görüntüsü

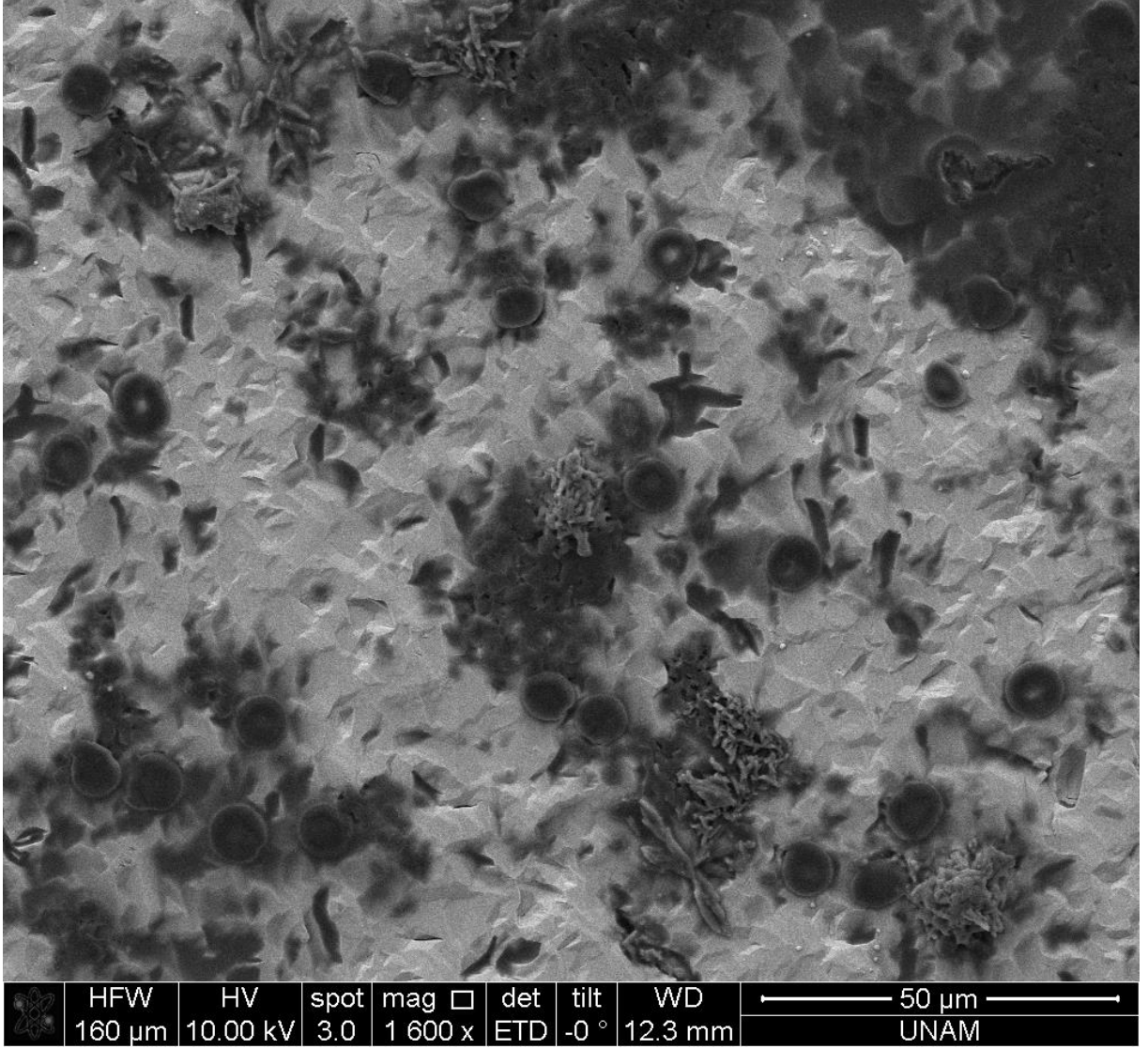


**Şekil 3.23** Annexin V immobilizasyonu sonrası 40000x SEM görüntüsü

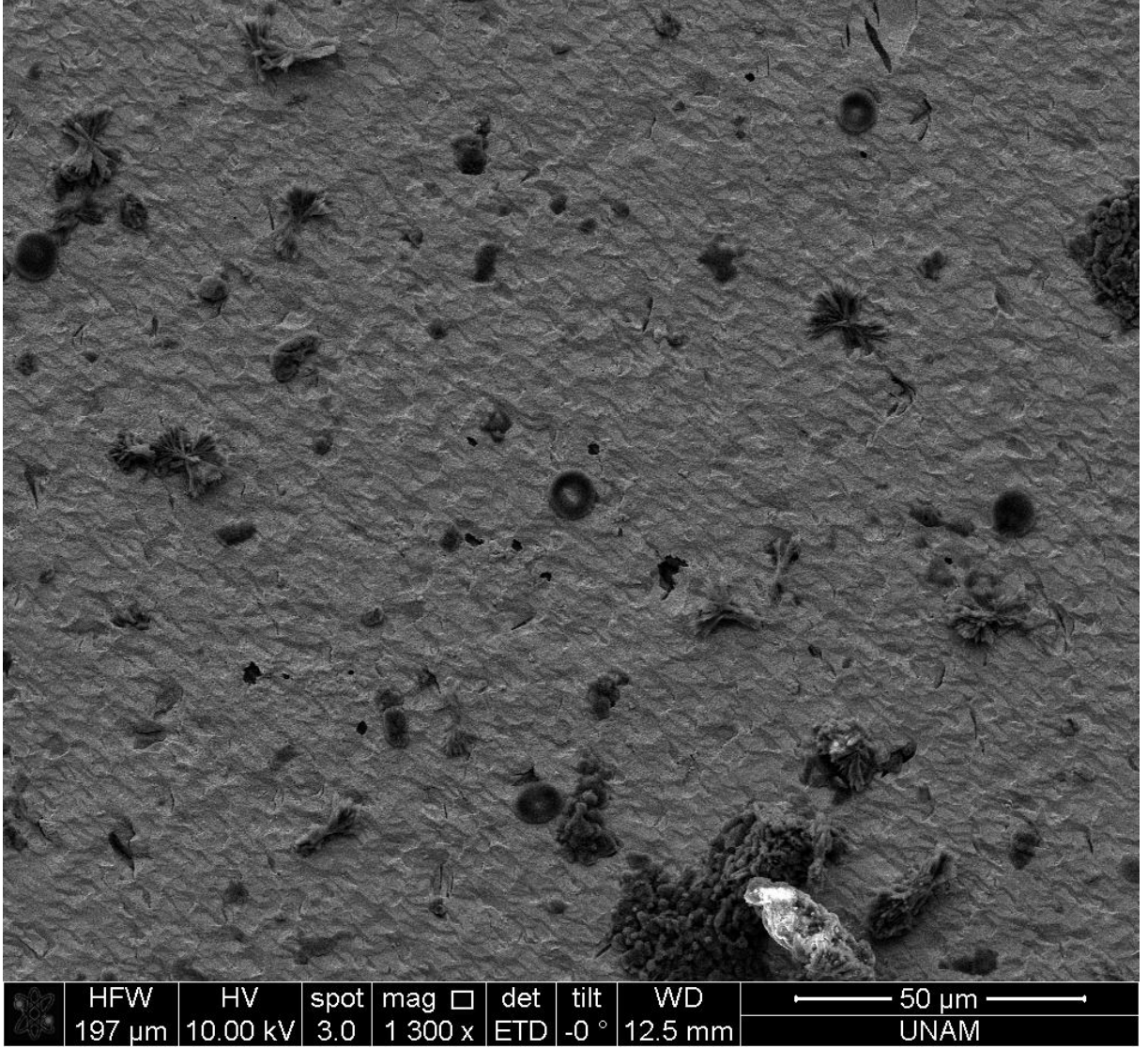
Temizleme işlemi sonrası NaOH ile yüzeyde OH grupları oluşturulan kuvars kristaline sırasıyla sistamin ve glutraldehit immobilizasyonu yapıldıktan sonra Annexin V immobilizasyonu yapılmıştır. İmmobilizasyon sonrası alınan SEM görüntülerine(Şekil 3.23 ve Şekil 3.24) bakıldığında trombosit hücre membranında bulunan Annexin V molekülünün oldukça küçük olduğu görülmektedir.



**Şekil 3.24** Annexin V immobilizasyonu sonrası 20000x SEM görüntüsü

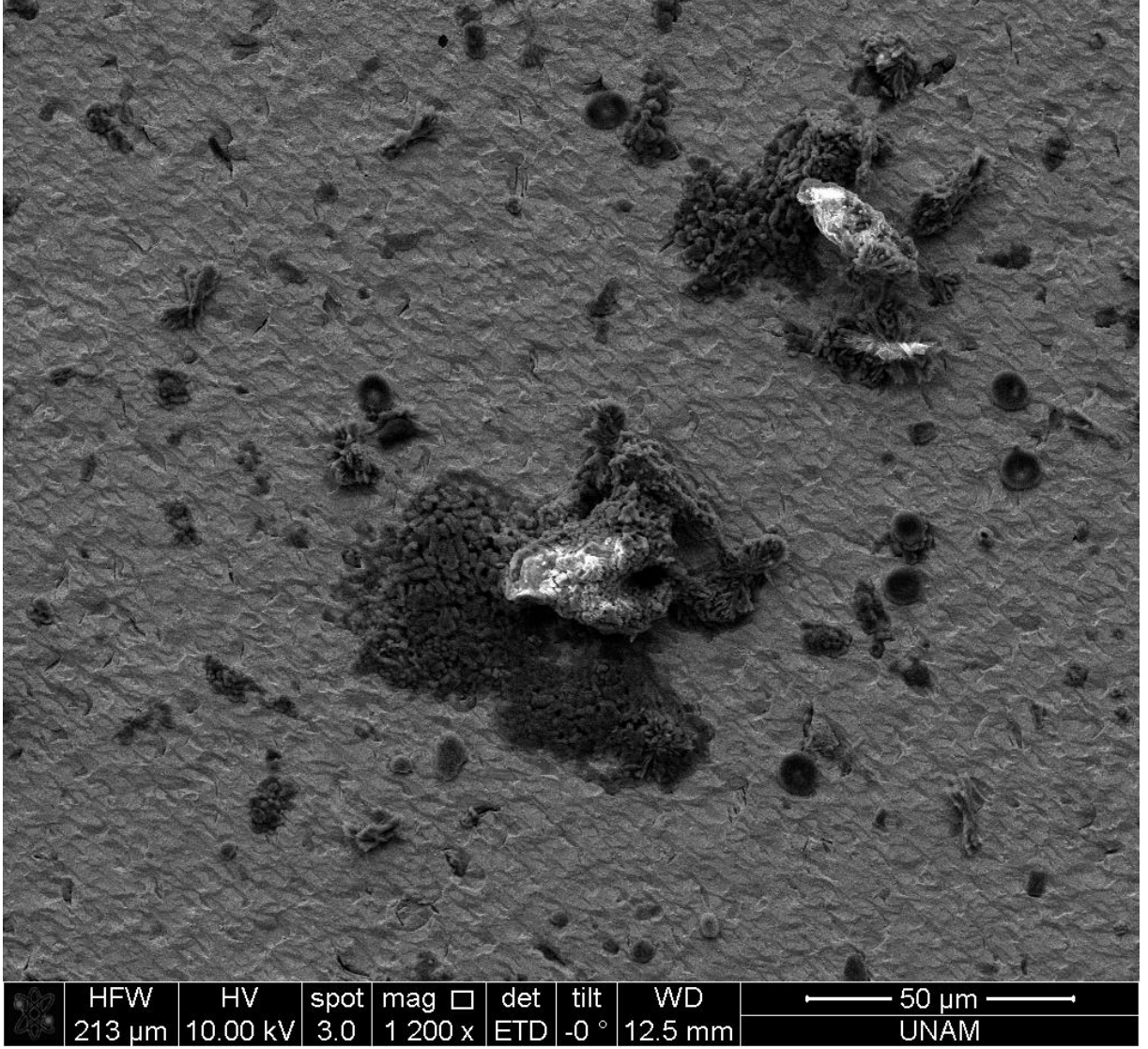


**Şekil 3.25** Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 1600x SEM görüntüsü

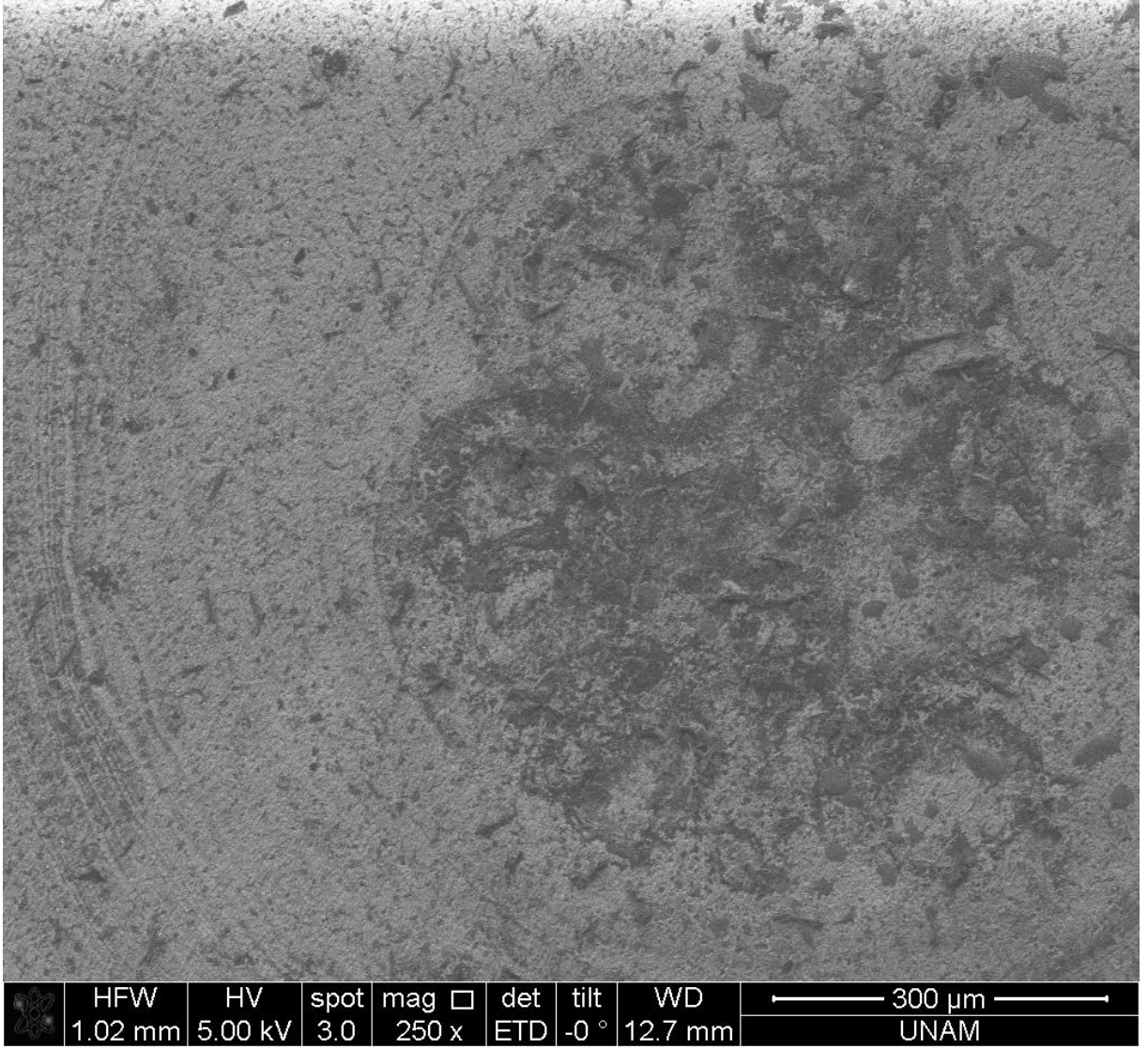


**Şekil 3.26** Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 1300x SEM görüntüsü

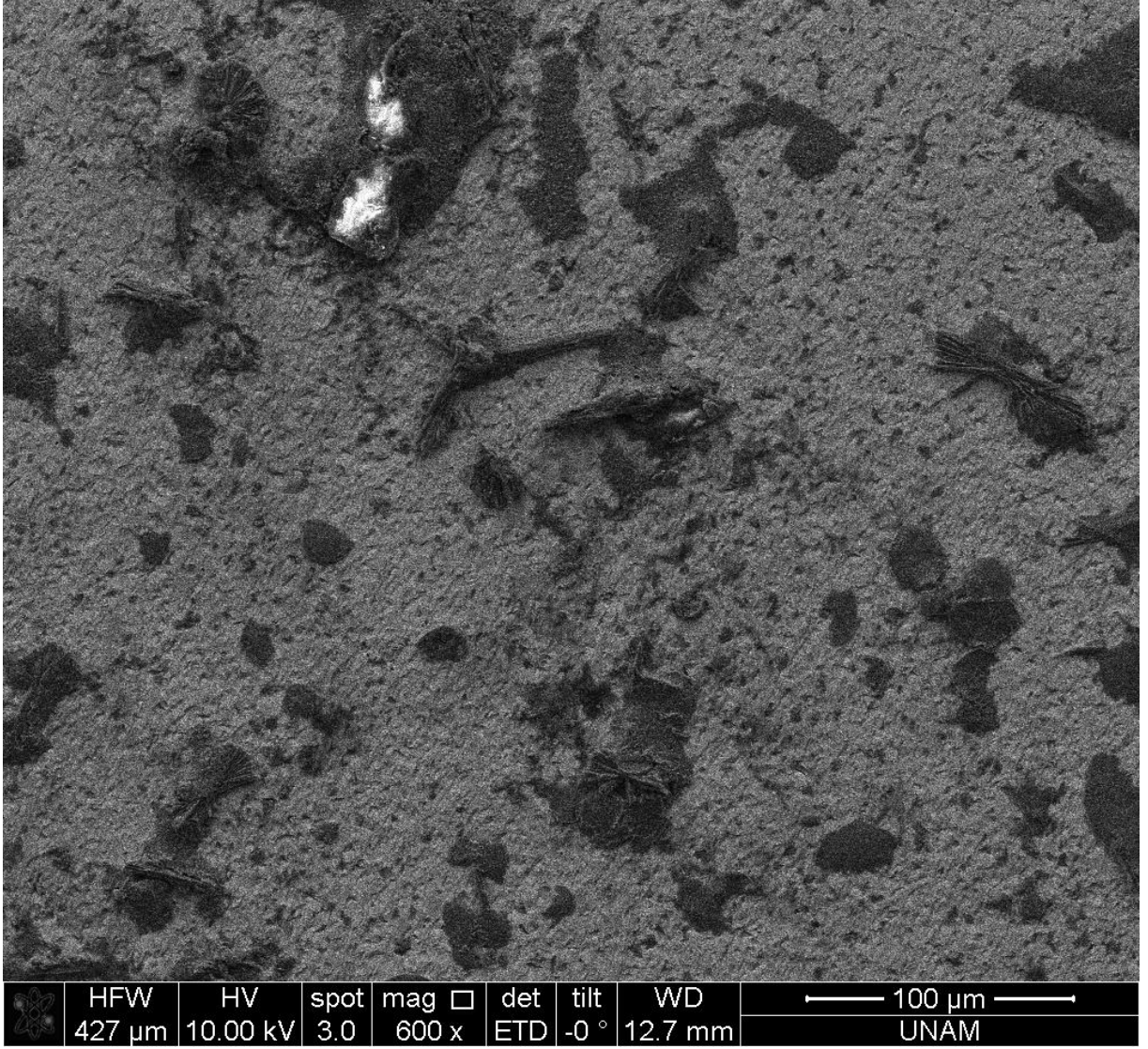




**Şekil 3.27** Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 1200x SEM görüntüsü

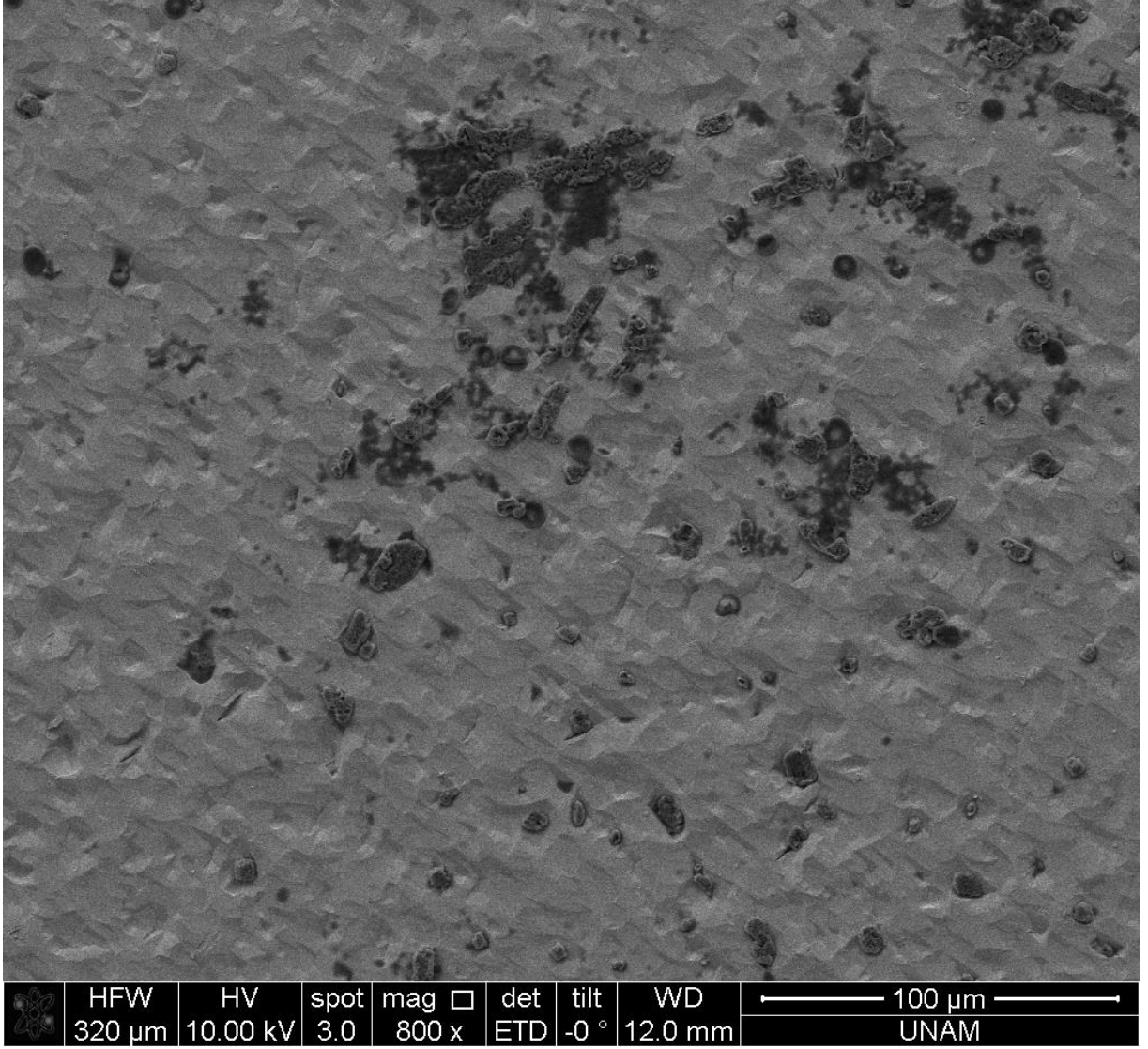


**Şekil 3.28** Biyosensör kanla etkileştirildikten sonraki 250x SEM görüntüsü



**Şekil 3.29**  $203 \text{ K/mm}^3$  trombosit içeren kan derişimi uygulanmış kristalin 600x SEM görüntüsü





**Şekil 3.30** 124 K/mm<sup>3</sup> trombosit içeren kan derişimi uygulanmış kristalin SEM görüntüsü

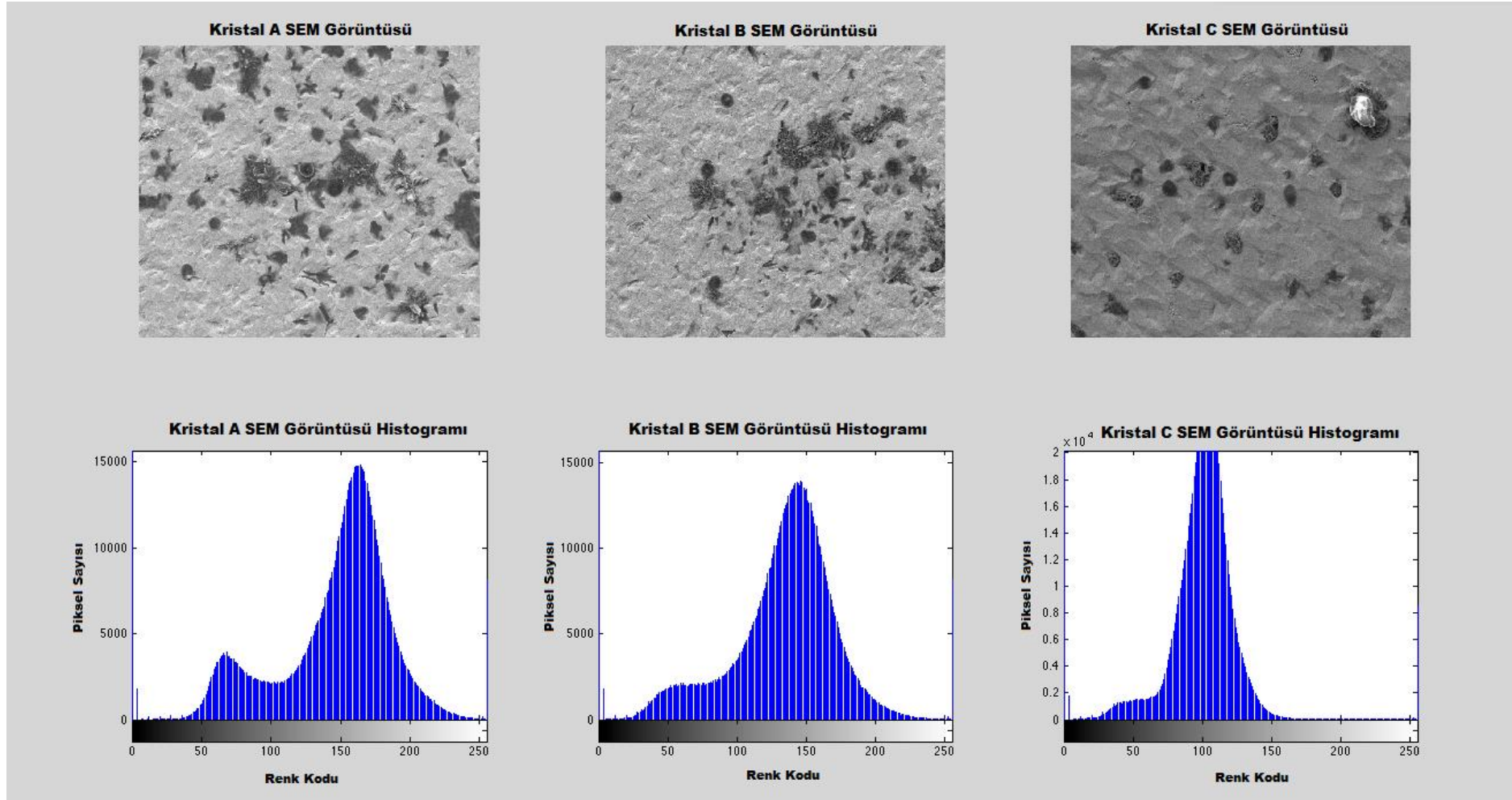
Şekil 3.29'da 203 K/mm<sup>3</sup> trombosit içeren kan derişimi uygulanmış kristalin SEM görüntüsü ve Şekil 3.30 124 K/mm<sup>3</sup> trombosit içeren kan derişimi uygulanmış kristalin SEM görüntüsünün yakınlaştırma oranları yakın olduğundan bir kıyaslama yapılacak olursa uygulanan Annexin V molekülü aynı olan iki kristalin iki farklı trombosit sayılı derişiminin SEM görüntüleri arasında fark vardır. Şekil 3.29'teki SEM görüntüsünde trombosit sayısı ile doğru orantılı bir aktiflenmiş trombosit birikmiştir. Trombosit sayısı arttıkça aktiflenmiş trombosit tespiti de artmaktadır.

Farklı Annexin V immobilizasyonu sonrası aynı miktarda trombosit sayısındaki kan derişimleri tepkimeye sokulmuş bunun sonucunda ise derişimi en fazla olan Annexin V biyosensörlerinde frekans kayması maksimum iken, derişimi en az olan Annexin V biyosensörlerinde frekans değişimi minimumdur. Annexin V konsantrasyonunda frekans düşmesi ve immobilizasyon maksimumdur. Ayrıca üç farklı konsantrasyon incelendiğinde frekans değişimi doğrusaldır. Aynı kristallerin aynı büyültme oranında SEM görüntülerine bakıldığında en fazla madde apoptotik trombosit hücrelerinin Kristal A'da gözlemlenirken, en az apoptotik hücre Kristal C'de birikmiştir. Üç farklı kristal için SEM görüntüleri aynı yakınlaştırılma oranında alınmıştır. Böylelikle MATLAB programında görüntü işleme yazılımı hazırlanarak, kuvars kristalleri üzerindeki apoptotik trombosit hücrelerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

SEM görüntülerinin görüntü işleme yapılarak görüntülerin sayısal hale getirilmesi son yıllarda önem kazanmıştır[119]. Hazırlanan MATLAB yazılımında SEM görüntüleri programa yüklenerek sayısal hale çevirilmiştir. SEM görüntüsülerinde trombositler siyah renge daha yakın olduğundan ve zeminin ise açık renkte olmasından dolayı tüm SEM görüntülerinin histogramları çıkartılmıştır. Histogramlara bakıldığında yoğun Annexin V derişimi uygulanmış kristalin kanla etkileşmesi sonucu daha fazla apoptotik trombosit hücrelerinin varlığı görülmüştür.

SEM görüntülerindeki madde birikimini sayısal hale getirmek ve frekans değişimleriyle kıyaslamak için bir eşik değeri belirlenmiştir. Bu eşik değerinin üstündeki değerler beyaza, eşik değerinin altında kalan değerler ise siyah renge çevrildikten sonra tüm görüntüler gray skalaya dönüştürülmüştür. Böylelikle veri kaybı en aza indirilmiştir.

Tüm piksel değerleri taranarak siyah ve beyaz piksel sayıları tespit edilmiştir. Siyah piksel sayısı tüm piksel sayısına bölünerek görüntüdeki siyah piksellerin tüm resme oranını hesaplanmış, bu oran ile frekans değerleri kıyaslanmıştır.



Şekil 3.31 Kristal A, Kristal B, Kristal C SEM görüntüleri ve histogramları

**Kristal A SEM Görüntüsü İşlenmiş Hali**



**Kristal B SEM Görüntüsü İşlenmiş Hali**



**Kristal C SEM Görüntüsü İşlenmiş Hali**



<b>Siyah Renkli Piksel Yüzdesi(%)</b>		
<b>Kristal A</b>	<b>Kristal B</b>	<b>Kristal C</b>
17,9437	11,8529	6,0477

**Şekil 3.32** Görüntü işleme yapıldıktan sonraki görüntüler ve siyah renkli piksel yüzdesi

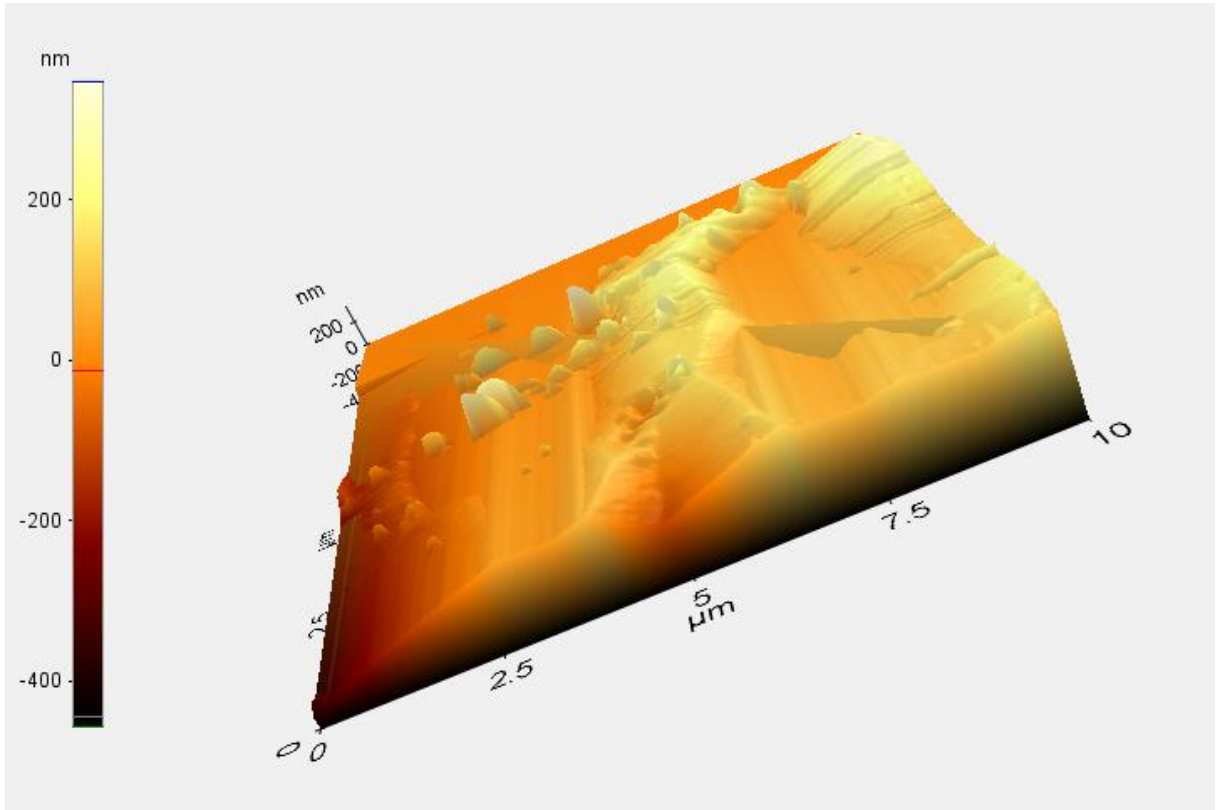
**Çizelge 3.4** Program sonucuna göre yüzde apoptotik trombosit hücresi miktarı ile frekans değişiminin kıyaslanması

<b>Kristal Adı</b>	<b>Uygulanan Annexin V Derişimi (µg/ml)</b>	<b>Uygulanan Annexin V Sonrası Frekans Değişimi (-Hz)</b>	<b>Uygulanan Kanın Trombosit Sayısı (K/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Aynı Sayıda Trombosit İçeren Kan Derişimi Sonrası Frekans Değişimi (-Hz)</b>	<b>Program Sonucuna Göre Siyah Renkli Pikel Yüzdesi (%)</b>
<b>Kristal A</b>	5µg/ml	214,4	203	489,6	17.9437
<b>Kristal B</b>	0.5µg/ml	147,2	203	361,4	11.8529
<b>Kristal C</b>	0.05µg/ml	88,4	203	216	6.0477

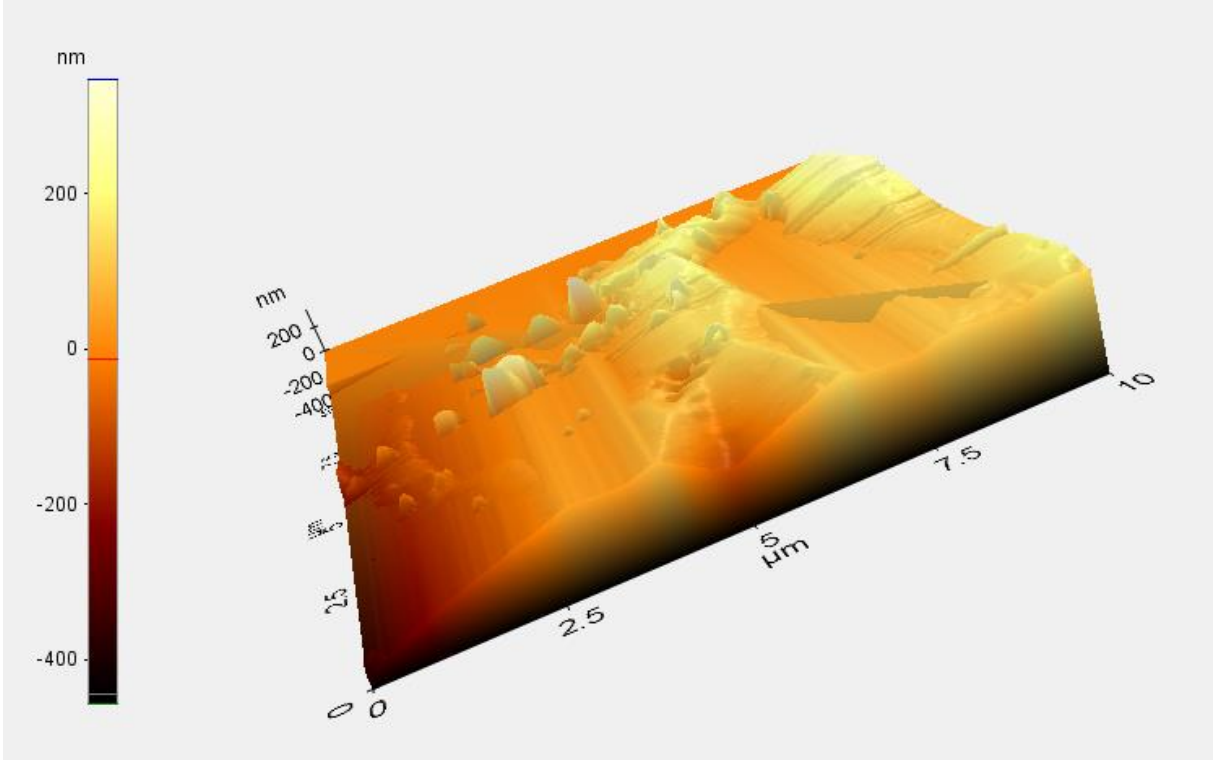
Protokol yerine getirilerek farklı derişimde Annexin V immobilize ettirilerek hazırlanan kuvars kristallerine aynı trombosit sayısına sahip kan derişimleriyle etkileştirilmesi sonucu en az fazla frekans kayması Kristal A'da olmuştur. MATLAB programında geliştirilen yazılım da Kristal A için %17.9437 çıkararak bu sonucu destekler niteliktedir.

### 3.2.4.2 Atomik kuvvet mikroskobu(AFM) görüntüleri

Atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri, kontak modda ve  $10\mu\text{m}^2$ 'lik yüzey alanında alınmıştır. Kılıflarından çıkarılan çıkarılan kuvars kristallerine hiçbir işlem yapılmadan AFM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.33 ve Şekil 3.34 de görüldüğü gibi yüzeyde çeşitli tozlar görünmekte ve SEM görüntülerini desteklemektedir.

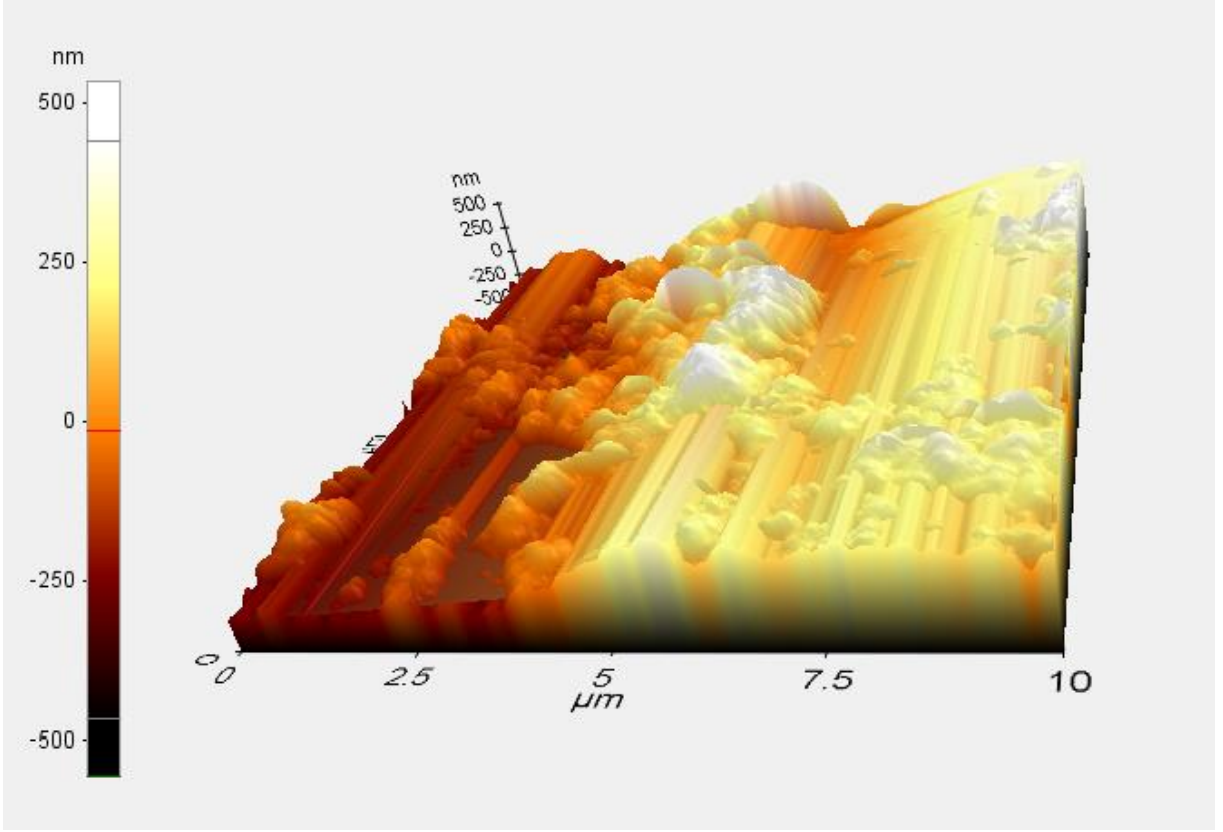


**Şekil 3.33** Kılıfından çıkarılmış kristalin  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$  üç boyutlu AFM görüntüsü



**Şekil 3.34** 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  boyutlu kirli gümüş yüzeyin üç boyutlu AFM görüntüsü

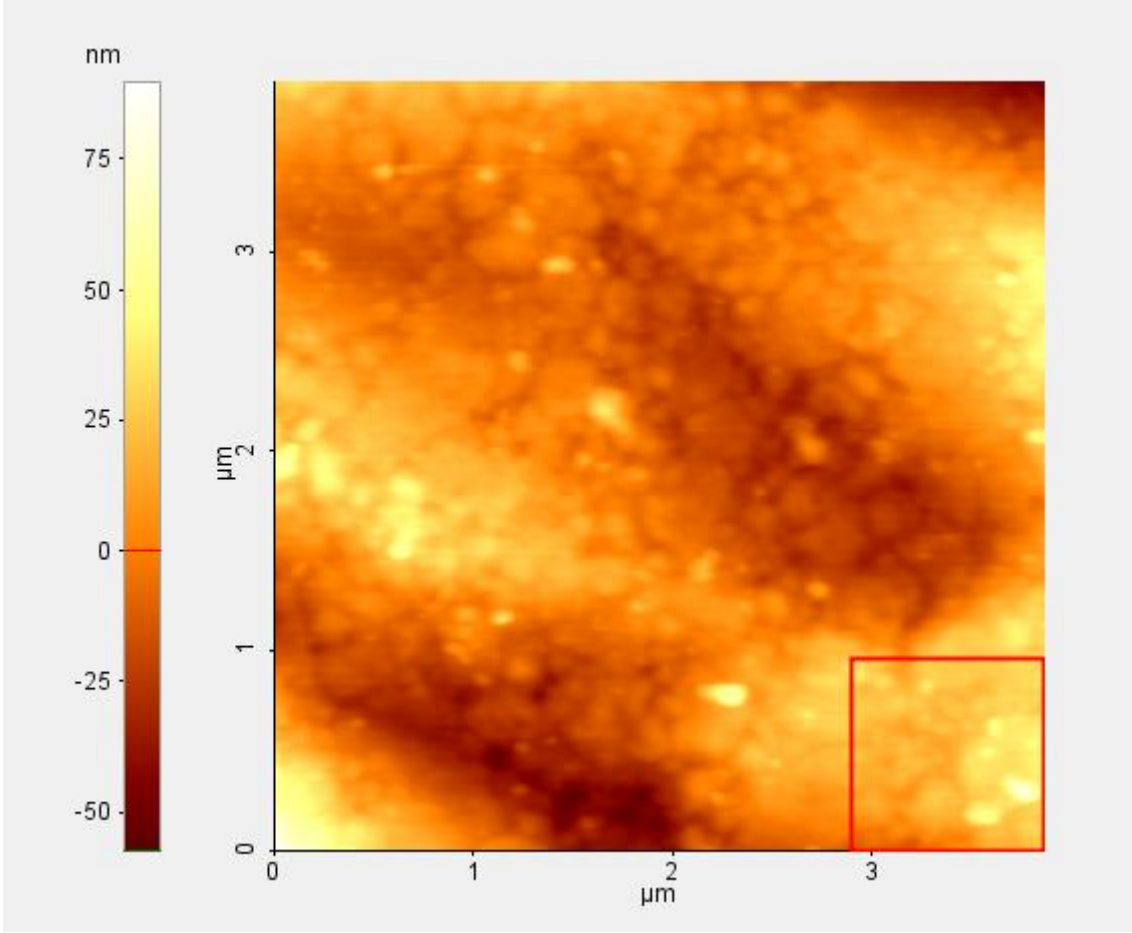
Kılıfından çıkarılan kuvars krsitaline sırasıyla 0.5M aseton, 0.5M metanol, 0.5M sodyumhidroksit, 20mM sistamin, %5'lik glutaraldehit immobilizasyonu ve Annexin V immobilizasyonu sonrası alınan AFM görüntülerinde kılıfından çıkarılan kristalde alınan AFM görüntüsüne göre yüzeyin Annexin V ile kaplandığı görülmektedir.



**Şekil 3.35** 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  boyutlu Annexin V immobilize edilmiş kristalin üç boyutlu AFM görüntüsü

Kuvars kristallere Annexin V immobilizasyonu sonrası alınan atomik kuvvet mikroskopunu görüntüleri iki boyutta incelendiğinde Annexin V molekülünün oldukça küçük olduğu tespit edilmiştir.





**Şekil 3.36** 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  boyutlu Annexin V immobilize edilmiş kristalin İki boyutlu AFM görüntüsü

#### 4.SONUÇ

Annexin V ligandı kullanılarak hazırlanan trombosit aktivasyonu ve erken trombosit apoptosisi piezoelektrik biyosensörü için osilatör ve frekans sayıcı devreleri hazırlanmıştır.

Annexin V proteini immobilizasyonu için öncelikle kuvars kristallerin yüzey temizliği 0.5M aseton ve 0.5M metanol kullanılarak yapılmıştır. Hidrofilik yüzey eldesi için 0.5M NaOH 30 dakika 300 rpm çevirme hızında kuvars kristallere uygulanmıştır. Yüzeyde oluşan OH gruplarıyla tiyol(SH) ve amin (NH<sub>2</sub>) grupları içeren sistamin molekülü uygulanmıştır. Sistaminin serbest ucuyla glutaraldehitimin aldehit uçları reaksiyona girerek uzatma kolu oluşturulması için %5'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlanarak kristallerle reaksiyona sokulmuştur. Bu prosedürde kimyasalların derişimleri ve çevirme hızları değiştirilerek optimum koşullar belirlenmiştir. Bu kapsamda sistamin immobilizasyonunda 20mM sistamin derişimi en başarılı olurken glutaraldehit immobilizasyonunda ise %5'lik glutaraldehit çözeltisinde daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ayrıca glutaraldehit immobilizasyonunda 300 rpm çevirme hızı diğer çevirme hızlarına oranla daha başarılıdır.

Kuvars kristal yüzeyinde uzatma kolu oluşturulduktan sonra trombosit aktivasyonu ve apoptosisi tanıyıcı molekülü olan Annexin V 5 µg/ ml, 0.5 µg/ ml, 0.05 µg/ ml'lik konsantrasyonlarla uygulanmıştır. En fazla frekans düşmesi 5 µg/ml derişim uygulanan kristallerde gözlenmiştir.

Hazırlanan biyosensörler 10 farklı trombosit sayısındaki kan çözeltilerinde test edilerek biyosensörün 75 ile 225 K/mm<sup>3</sup> arasında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Bu aralıkta kalibrasyon denklemi  $y=2,32676+9,7831$  iken regresyonu  $R^2=0,9853$ 'tür.

Kuvars kristalleri kılıftan çıkarıldıktan sonra, temizleme prosedürü uygulanmış ve kanla etkileştirildikten sonra SEM görüntüleri alınarak frekans değişimleri desteklenmiştir. Ayrıca kristaller kılıftan çıkarıldıktan sonra ve Annexin V proteini immobilizasyonu sonrası AFM görüntüleri alınmıştır. AFM ve SEM görüntüleri frekans değişimlerini destekler niteliktedir.

Farklı Annexin V derişimlerinde hazırlanan biyosensörler aynı trombosit sayısına sahip kan çözeltilerinde test edilmiş ve yoğun Annexin V derişimi uygulanmış kuvars kristallerinde daha fazla frekans değişimi olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan MATLAB yazılımıyla yüzeylerin histogramları çıkarıldıktan sonra yüzeydeki kontrast farkından yüzeye yapışan moleküllerin yüzdesi belirlenmiş ve frekans değişimiyle kıyaslanmıştır. Frekans değişimi ve yüzeye yapışan moleküllerin benzerliği biyosensörün başarılı olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] RUMBAUT, R. and THIAGARAJAN P., Platelet-Vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- [2] MICHELSON Alan D., Platelets, Elsevier, 2007 ISBN: 978-0-12-369367-9
- [3] Robert, F., Bioengineering in platelet biology. Thrombosis Research, 133, 2014.
- [4] FLAUMENHAFT, R., Bioengineering in platelet biology. Thrombosis Research, 133(4): p. 523-524, 2014.
- [5] BLOOM AL., THOMAS DP., Haemostasis and Thrombosis, 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 20, 1987.
- [6] MANN KG., et al. Surface dependent relations of the vitamin K-dependent enzyme complexes. Blood, 76:1-16, 1990.
- [7] GUNNING W., The platelet delta granule and its role in hemostasis. Microscopy and Microanalysis, 2003.
- [8] KIMMELSTIEL, C., et al., Bivalirudin is a dual inhibitor of thrombin and collagen-dependent platelet activation in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Circulation. Cardiovascular interventions, 4(2): p. 171-179, 2011.
- [9] STRAUB, A., et al., Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 31(7): p. 1607-1616, 2011.
- [10] TOPALOV, N., et al., Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. British journal of haematology, 157(1): p. 105-115, 2012.
- [11] KWAK, D., et al., Fibrinogen and von Willebrand's factor adsorption are both required for platelet adhesion from sheared suspensions to polyethylene preadsorbed with blood plasma. Journal of biomedical materials research. Part A, 74(1): p. 69-83, 2005.
- [12] JACKSON SP, et al., Signaling events underlying thrombus formation. J Thromb Haemost, 1335-42, 2003.
- [13] RUGGERI ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. J Thromb Haemost, 2003.
- [14] NIESWANDT B, et al., Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor, Blood, 102:449-61, 2003.

- [15] TOPALOV, N., et al., Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ . *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(10) p. 2475-2483, 2012.
- [16] BEAUDOUIN, J., et al., Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*, 20(4) p. 599-610, 2013.
- [17] WINTER, E., et al., Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 28(5): p. 769-777, 2014.
- [18] FEZOUA-BOUBEGTITEN, Z., et al., Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  versus  $\text{Ca}^{2+}$  on the behavior of annexin A5 in a membrane-bound state. *European Biophysics Journal(EBJ)*, 40(5): p. 641-649, 2011.
- [19] HU, S., et al., Longitudinal PET imaging of doxorubicin-induced cell death with  $^{18}\text{F}$ -Annexin V. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 14(6): p. 762-770, 2012.
- [20] CEVIK, O., et al., The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke, *Molecular Biology Reports*, 2013.
- [21] ARNDT, S., et al., Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosensors & Bioelectronics*, 19(6): p. 583-594. 2004.
- [22] STRAUB, A., et al., Platelet anaesthesia during extracorporeal circulation: differential effects of GP IIb/IIIa blockers on platelet activation marker P-selectin expression at hypothermia. *Thrombosis Research*, 122(3): p. 383-389. 2008.
- [23] MICHELSON, A., et al., Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*, 104(13): p. 1533-1537, 2001.
- [24] WEISEL JW., et al., Examination of the platelet membrane glycoprotein I Ib/IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem*, 267:16637– 16643, 1992.
- [25] THIAGARAJAN, et al., Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(29): p. 17420-17423, 1990.

- [26] BALASUBRAMANIAN, K., et al., Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation. *Biochemistry*, 40(30): p. 8672-8676, 2001.
- [27] SCHUTTERS, K., et al., Cell surface-expressed phosphatidylserine as herapeutic target to enhance phagocytosis of apoptotic cells, *Cell Death and Differentiation*, 20(1): p. 49-56, 2013.
- [28] SOBOL, A., et al., Effect of uremia and hemodialysis on platelet apoptosis. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 19(3): p. 320-323, 2013.
- [29] PASCAL, T., et al., Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's chloride channel function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772, 2007.
- [30] PAN, Y., et al., Sensitive and visible detection of apoptotic cells on Annexin-V modified substrate using aminophenylboronic acid modified gold nanoparticles (APBA-GNPs) labeling. *Biosensors & Bioelectronics*, 52: p. 62-68, 2014..
- [31] TONG, C., et al., An Annexin V-based biosensor for quantitatively detecting early apoptotic cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(6): p. 1777-1782, 2009.
- [32] ZHANG, G., et al., Early detection of apoptosis using a fluorescent onjugate of annexin V. *Biotechniques*, 1997.
- [33] NARULA, J., et al., Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nature medicine*, 7(12): p. 1347-1352, 2001.
- [34] BLANKENBERG, F., Imaging the molecular signatures of apoptosis and injury with radiolabeled annexin V. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(5): p. 469-476., 2009.
- [35] ALSCHER, D., et al., Apoptosis of mesothelial cells caused by unphysiological characteristics of peritoneal dialysis fluids. *Artificial Organs*, 27(11): p. 1035-1040, 2003.
- [36] ANDREOLI, M.C., et al., Impact of dialyzer membrane on apoptosis and function of polymorphonuclear cells and cytokine synthesis by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients. *Artificial Organs*, 31(12): p. 887-892, 2007.
- [37] MICHELLE, M.M., et al., A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2010.
- [38] Inglis, D., et al., Microfluidic device for label-free measurement of platelet activation. *Lab on a Chip*, 8(6): p. 925-931, 2008.

- [39] SNYDER, T., et al., Blood biocompatibility assessment of an intravenous gas exchange device. *Artificial Organs*, 30(9): p. 657-664, 2006.
- [40] KANEKO, N., et al., Purification of cardiac annexin V from the beagle dog heart and changes in its localization in the ischemic rat heart. *Heart and vessels*, 1994.
- [41] EWING, M., et al., Annexin A5 prevents post-interventional accelerated atherosclerosis development in a dose-dependent fashion in mice. *Atherosclerosis*, 221(2): p. 333-340, 2012.
- [42] YU, J., et al., Study of endothelial cell apoptosis using fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor cell line with hemodynamic microfluidic chip system. *Lab on a Chip*, 13(14): p. 2693-2700, 2013.
- [43] DEMCHENKO, A., Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis, *Cytotechnology*, 65(2): p. 157-172, 2013.
- [44] GYLYS, K., Rapid annexin-V labeling in synaptosomes. *Neurochemistry International*, 44, 2004.
- [45] NIU, G., et al., Apoptosis imaging: beyond annexin V. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(11): p. 1659-1662, 2010.
- [46] UNGETHUM, L., et al., Engineered annexin A5 variants have impaired cell entry for molecular imaging of apoptosis using pretargeting strategies. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(3): p. 1903-1910, 2011.
- [47] HUBER, R., et al., The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *The EMBO journal*, 9(12): p. 3867-3874, 1990.
- [48] WALENSKY, L., et al., Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689): p. 1466-1470, 2004.
- [49] LU, Q., et al., Comparison of two platelet activation markers using flow cytometry after in vitro shear stress exposure of whole human blood. *Artificial Organs*, 35(2): p. 137-144, 2011.
- [50] MUTLU, A., et al., Concurrent and separate inside-out transition of platelet apoptosis and activation markers to the platelet surface. *British Journal of Haematology*, 2013.
- [51] GYULKHANDANYAN, A., et al., Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 33(4): p. 397-411, 2012.

- [52] KATAYANAGI, K., et al., Generation of monoclonal antibodies to murine bile duct epithelial cells: identification of annexin V as a new marker of small intrahepatic bile ducts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(4): p. 1019-1025, 1999.
- [53] LEYTIN et al, Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320:303-310 2004.
- [54] JOHNSON, C., et al., Platelet activation in ovines undergoing sham surgery or implant of the second generation PediaFlow pediatric ventricular assist device. *Artificial Organs*, 35(6): p. 602-613, 2011.
- [55] SNYDER, T., et al., Platelet activation, aggregation, and life span in calves implanted with axial flow ventricular assist devices. *The Annals of Thoracic*, 2002.
- [56] LU, Q., et al., In vitro shear stress-induced platelet activation: sensitivity of human and bovine blood. *Artificial Organs*, 2013.
- [57] TAIT, et al., Measurement of phosphatidylserine exposure in leukocytes and platelets by whole-blood flow cytometry with annexin V. *Blood cells, molecules & diseases*, 25(5-6): p. 271-278, 1999.
- [58] ZHANG G., et al., Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525–531,1997.
- [59] SNYDER, T., et al., Platelet activation, aggregation, and life span in calves implanted with axial flow ventricular assist devices. *The Annals of thoracic*, 73(6): p.1933-1938, 2002.
- [60] WILLIAM, R.W., et al., Blood biocompatibility analysis in the setting of ventricular assist devices. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*,11, 2000.
- [61] RATNER, B., Blood compatibility--a perspective. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 11(11): p. 1107-1119, 2000.
- [62] BRUMATTI, et al., Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(3): p. 235-240, 2008.
- [63] GYLYS, K., Rapid annexin-V labeling in synaptosomes. *Neurochemistry International*, 44, 2004.
- [64] TABLL, A., et al., The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma, *Liver Biopsy*, 2011.



- [65] IVERSEN, L., et al., A heparin-based method for flow cytometric analysis of microparticles directly from platelet-poor plasma in calcium containing buffer. *Journal of immunological methods*, 388(1-2): p. 49-59, 2013.
- [66] WINTER, E., et al., Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 28(5): p. 769-777, 2014.
- [67] JOHNSON, C., et al., Flow cytometric assays for quantifying activated ovine platelets. *Artificial Organs*, 32(2): p. 136-145, 2008.
- [68] KOOPMAN, G., et al., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5): p. 1415-1420, 1994.
- [69] PENG, L., et al., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis, 32(4): p. 602, 2001.
- [70] VERMES, I., et al., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1): p. 39-51. 1995.
- [71] VAN, M., et al., Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998.
- [72] DORMANN, D., et al., Flow cytometric analysis of agonist-induced annexin V, factor Va and factor Xa binding to human platelets. *Platelets*, 9(3-4): p. 171-177, 1998. [73] HEMPEN C., et al., Labeling strategies for bioassays. *Anal Bioanal Chem* 384:572–583, 2006.
- [74] BALASUBRAMANIAN, K., et al., Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation, *Biochemistry*, 40(30): p. 8672-8676, 2001.
- [75] KANEKO, N., et al., Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. *International Journal of Clinical Chemistry*, 251(1): p. 65-80 1996.
- [76] TAKADA, N., et al., Development of an indirect competitive ELISA for the detection of ABO blood group antigens. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 16(3): p. 139-145, 2014.
- [77] XIE, X., et al., Development and evaluation of a sandwich ELISA method for the detection of human CD306. *Journal of Immunological Methods*, 396: p. 65-73, 2013.
- [78] S.G. NELSON, et al., High sensitivity surface plasmon resonance sensor based on phase detection, *Sensors and Actuators B*, 35–36, pp. 187–191, 1996.

- [79] HOMOLA J., Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Springer, 2006.
- [80] MALTAIS, J.-S., et al., Label-free monitoring of apoptosis by surface plasmon resonance detection of morphological changes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 17(8): p. 916-925, 2012.
- [81] KARUBE, I., et al., *Biosensors: Fundamentals and applications*, Oxford, p.770, 1987.
- [82] KIM, Y., et al., Engineering a polarity-sensitive biosensor for time-lapse imaging of apoptotic processes and degeneration. *Nature Methods*, 7(1): p. 67-73, 2010.
- [82] BUCK R. P., *Biosensor technology: fundamentals and applications*, Marcel Dekker Inc., 1990.
- [84] ERMEK, Erhan, *QCM Heparin Biyosensör Tasarımı ve Üretimi*, Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [85] LI N., et al., Spatially resolved characterization of catalyst – coated membranes by distance – controlled scanning mass spectrometry utilizing catalytic methanol oxidation as gas – solid probe reaction . *Analytical Chemistry* , 79 ( 15 ), 5674 – 5681, 2007.
- [86] LAU, C., Borgmann , S. , et al., Improved specificity of reagentless amperometric PQQ - sGDH glucose biosensors by using indirectly heated electrodes . *Biosensors & Bioelectronics* , 22 ( 12 ), 3014 – 3020, 2007.
- [87] SVOBODA , V. , et al., Standardized characterization of electrocatalytic electrodes . *Electroanalysis* , 20 ( 10 ), 1099 – 1109, 2008.
- [88] KANG , C. , et al., ( 2006 ) On the stability of the “ wired ” bilirubin oxidase oxygen cathode in serum, *Bioelectrochemistry* , 68 ( 1 ), 22 – 26, 2006.
- [89] BORGMANN S et all, *Amperometric Biosensor*, *Advances in Electrochemical Science and Engineering: Bioelectrochemistry*, Volume 13 1-83, 2012.
- [90] LUD S.Q., et al., Field Effect of Screened Charges: Electrical Detection of Peptides and Proteins by a Thin Film Resistor, *ChemPhysChem* 7(2), 379-384, 2006.
- [91] ZHANG, R., et al., Annexin A5-conjugated polymeric micelles for dual SPECT and optical detection of apoptosis. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 52(6): p. 958-964, 2011
- [92] RAMANATHAN k, et al *Principles and applications of thermal biosensors*, *Biosensor and Bioelektronics*, 47-423, 2001.

- [93] O'SULLIVAN,CK et al., Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications, *Biosensors & Bioelectronics* 14 663–670, 1999.
- [94] RASOOLY, A., et al., *Methods in molecular biology: Biosensors and Biodetection*, vol. 504, 2009.
- [95] TABRIZI, Amir Parviz Farsçı, Altın Nanopartikül Üretim Ve Kuartz Kristal Mikrobalans Sisteminde Kullanımı, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, S.11, 2005.
- [96] STEINEM C.,Piezoelectric mass sensing devices as a biosensor an alternative to optical biosensor, *Angew Chem International Edition* 39, 4004-4032, 2000.
- [97] CAI, Q., et al., Immobilization of biomolecules on cysteamine-modified polyaniline film for highly sensitive biosensing. *Talanta*, 120: p. 462-469, 2014.
- [98] DEWILDE, A., et al., Quartz crystal microbalance measurements of mitochondrial depolarization predicting chemically induced toxicity of vascular cells and macrophages. *Analytical Biochemistry*, 439(1): p. 50-61, 2013.
- [99] FERREIRA, G., et al., Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends in Biotechnology*, 27(12): p. 689-697, 2009.
- [100] GODA, T., et al., Simultaneous monitoring of protein adsorption kinetics using a quartz crystal microbalance and field-effect transistor integrated device. *Analytical Chemistry*,84(17): p. 7308-7314, 2012.
- [101] HUNTER, A., Application of the quartz crystal microbalance to nanomedicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(6): p. 669-675, 2009.
- [102] LIU, Y., et al., Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 299(2): p. 130-135, 2001.
- [103] LIU, Y., et al., Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents. *Biosensors & bioelectronics*, 19(1): p. 9-19, 2003.
- [104] PAN, Y., et al., Annexin-V modified QCM sensor for the label-free and sensitive detection of early stage apoptosis. *The Analyst*, 138(21): p. 6287-6290, 2013.
- [105] SALMAİN, M., et al., Piezoelectric immunosensor for direct and rapid detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) at the ng level. *Biosensors & Bioelectronics*, 29(1): p. 140-144, 2011.

- [106] SCHMİDT, V., et al., Formation of annexin-a5 protein/block copolymer micelle complexes: QCM-D and PAGE experiments. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 24(21): p. 12189-12195, 2008.
- [107] SHEN, L., et al., Two dimensional nanoarrays of individual protein molecules. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 8(20): p. 3169-3174, 2012.
- [108] CAI, Q., et al., Immobilization of biomolecules on cysteamine-modified polyaniline film for highly sensitive biosensing. *Talanta*, 120: p. 462-469, 2014.
- [109] AYAN, B., et al., QCM Yüzeyine Anti-P-Selektin İmmobilizasyonu EMO İlk Bildiriler Konferansı, Ankara, 2012
- [110] JOILSON RAMOS-JESUS, A piezoelectric immunosensor for Leishmania chagasi antibodies in canine serum, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011
- [111] BUTT, et al., Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surface Science Reports* 59: 1–152, 2005.
- [112] LANG, K.M.; et al., Conducting atomic force microscopy for nanoscale tunnel barrier characterization, *Review of Scientific Instruments* 75 (8): 2726–2731, 2004.
- [113] BRAGA, P.C., et al., atomic force microscopy: biomedical methods and applications, *Methods in Molecular Biology*, vol. 242, s.3-12, 2003.
- [114] KIERNAN, JA, Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do, *Microscopy Today* (1): 8–12, 2000.
- [115] MCMULLAN, D. "Scanning electron microscopy 1928–1965". *Scanning* 17 (3): 175, 2006
- [116] BARNES, P. R. F., et al., A technique for the examination of polar ice using the scanning electron microscope, *Journal of Microscopy* 205 (2): 118–124, 2002.
- [117] ZHANG, et al., Development of a new kind of dual modulated QCM biosensor. *Biosensors & Bioelectronic*, 12 (12), 1219–1225, 1997.
- [118] KOCUM, et al., Design of Temperature Controlled Quartz Crystal Microbalance System, *Instrumentation Science & Technology* 38(1), 39-51, 2010.

- [119] DE BRÍTO ALVES, et al., Digital image processing for biocompatibility studies of clinical implant materials. *Artificial organs*, 27(5): p. 444-446, 2003.