

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTI-CD62P BİYOSENSÖR İLE PLATELET
AKTİVASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ**

MÜNİRE SARAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
2014**

**ANTI-CD62P BİYOSENSÖR İLE PLATELET
AKTİVASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ**

**MEASUREMENT OF PLATELET ACTIVATION
WITH ANTI-CD62P BIOSENSOR**

MÜNİRE SARAL

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

2014

“Anti–CD62P Biyosensör ile Platelet Aktivasyonunun Ölçülmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından, 24 / 04 / 2014 tarihinde, **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye (Danışman) :
Doç. Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye :
Doç. Dr. Cengiz KOÇUM

ONAY
/ 05 / 2014

Prof. Dr. Emin AKATA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőmesinde katkılarından dolayı tez danıőmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa Kocakulak'a çalışmanın sonuca ulaőtırılmasında ve karőtılaőtılan güçlüklerin aőtılmasında her zaman yardımcı ve yol gösterici olduğu için saygılarımla teőekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim ve kiőtisel geliőtimin için sevgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, tez yazım sürecinde bilgi birikim ve deneyimlerini paylaőtarak yardıma ihtiyaım olan her anda yanımda olan kuzenim Kzım'a , tüm yüksek öğrenim hayatım boyunca benimle birlikte olan ve manevi olarak bu süreçte her zaman desteklerini yanımda hissettiğim Aslı, Merve ve Gökçe'ye içtenlikle teőekkür ederim.

ÖZ

ANTI-CD62P BİYOSENSÖR İLE PLATELET AKTİVASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ **MÜNİRE SARAL**

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu çalışmanın amacı platelet aktivasyonunun kuvars kristal mikroterazi sistemlerle (QCM) daha hızlı, uygulaması kolay, hassas ve etkin bir şekilde ölçülmesidir. Gerçek zamanlı algılama özelliği ile anlık veri alınması mümkün hale gelmektedir. QCM'in klinik teşhiste son yıllarda kullanımı artarak devam etmektedir ve bu çalışma ile platelet aktivasyonunun ölçümüne alternatif bir yöntem geliştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında gümüş elektrotlu piezoelektrik kristal yüzeylerin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kristal yüzeyinin temizlenmesi işleminin ardından yüzeye sistamin immobilizasyonu yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra sistamin üzerine bifonksiyonel gluteraldehit bağlanması gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında gluteraldehit bağlanmış yüzeylere platelet aktivasyonunu tanıyan ligand bağlanması sağlanmıştır. Hazırlanan kan örnekleri kullanılarak platelet aktivasyonunun varlığı anti-CD62P immobilize edilmiş kuvars kristaller ile belirlenmiştir. Bu şekilde, tasarlanan kristalin biyosensör olarak kullanılması ile platelet aktivasyonunu tanıyan yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: biyosensör, kuvars kristal, anti-CD62P, platelet aktivasyonu.

Danışman: Doç.Dr. Mustafa Kocakulak, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilimi Dalı.

ABSTRACT

MEASUREMENT OF PLATELET ACTIVATION WITH ANTI-CD62P BIOSENSOR MÜNİRE SARAL

Başkent University Institute Of Science And Engineering
The Department Of Biomedical Engineering

The aim of this study is measurement of platelet activation faster, more accurately, more effectively and easily applicable by using quartz crystal microbalance systems (QCM). The real-time detection makes the instantaneous data acquisition possible. The usage of QCM increases in clinical diagnosis recent years and in this study an alternative method to the measurement of platelet activation is developed.

In the first phase of the study, the modification of the silver electrode piezoelectric crystal surface is performed. Clearance of the crystal surface and cysteamine immobilization to this surface is carried out respectively. After these processes, binding of bifunctional glutaraldehyde to cysteamine is done.

In the second phase of the study, binding of platelet activation sensitive ligands to glutaraldehyde bonded surfaces are performed. The presence of platelet activation is determined by using blood samples with anti-CD62P immobilized quartz crystals. By using this designed crystal as a biosensor a new method to recognize the activation of platelets is developed.

KEYWORDS: biosensor, quartz crystal, anti-CD62P, platelet activation.

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	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1 Platelet.....	1
2.1.1 Plateletin tanımı ve anatomisi.....	1
2.1.2 Platelet granülleri.....	3
2.1.3 Platelet yapımı.....	5
2.1.4 Plateletin dolaşımdaki yeri.....	5
2.1.5 Platelet aktivasyonu.....	5
2.1.6 Platelet fonksiyon testleri.....	9
2.2 Kuvars Kristal Mikroterazi Sistemler	13
2.2.1 Sensörler	13
2.2.2 Kristalin yapısı	14
2.2.3 Piezoelektrik etki	18
2.2.4 QCM'in çalışma prensibi.....	20
2.2.5 Sauerbrey eşitliği	21
2.2.6 Kuvars kristal mikroterazi sistemlerin kullanım alanları	22
2.3 İmmobilizasyon Yöntemleri.....	25
2.3.1 Tutuklama.....	26
2.3.2 Çapraz bağlama	26
2.3.3 Taşıyıcı bağlama	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Materyal	30
3.1.1 Deneyde kullanılan cihaz ve malzemeler	30
3.1.2 Deneyde kullanılan kimyasallar	30
3.2 Deneyin Yapılışı	32
3.2.1 Kuvars kristal yüzeyin temizlenmesi ve hidrofilik yüzey eldesi	33
3.2.2 Sistamin immobilizasyonu	35
3.2.3 Glutaraldehit immobilizasyonu.....	36
3.2.4 Antibadi immobilizasyonu	37
3.2.5 Kan ile yapılan deneyler	38
4. ÖLÇÜMLER	41
4.1 Frekans Ölçümleri	41
4.2 SEM Görüntüleri.....	45
4.3 AFM Görüntüleri.....	51
5. SONUÇ	54
KAYNAKLAR LİSTESİ	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Plateletin analitik yapısı	3
Şekil 2.2	Platelet aktivasyonunun basamakları	6
Şekil 2.3	Vasküler yaralanmada platelet tıkaç oluşumu	7
Şekil 2.4	Platelet tıkaç formu	8
Şekil 2.5	Beş kanallı agrometre cihazı	10
Şekil 2.6	PFA 100 cihazı	11
Şekil 2.7	Akış Sitometri Cihazı	12
Şekil 2.8	Sensör yapısı.....	14
Şekil 2.9	Alfa kuvars kristal.....	15
Şekil 2.10	Kuvars kristalin üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil 2.11	Kuvars kristalin kesilmeden önceki yapısı	16
Şekil 2.12	Metal kılıflı ve kılıfsız kuvars kristal elektrot şekli	17
Şekil 2.13	Kristaldeki boyut değiştirme	19
Şekil 2.14	Elektriksel yüklenme sonrası kristaldeki boyut değiştirme	20
Şekil 2.15	Kuvars kristal mikroterazi sistemin modeli	21
Şekil 3.1	Deney basamaklarının şematik gösterimi	33
Şekil 3.2	Sistaminin molekülünün kimyasal formülü	35
Şekil 3.3	Manyetik karıştırıcıda karanlık ortamda sistamin immobilizasyonu... ..	36
Şekil 3.4	QCM'in sistamin ve glutraldehit ile reaksiyonunu sonrasında oluşan kimyasal bağlar.....	37
Şekil 3.5	Santrifüj sonrasında kandan elde edilen beyaz bulutumsu tabaka ...	39
Şekil 3.6	Kandan santrifüj sonrasında elde edilen tabakalar	39
Şekil 3.7	Farklı derişimlerdeki kan süspansiyonu	41
Şekil 4.1	Yüzey modifikasyonu sonrası ölçülmüş frekans değerleri grafiği.....	42
Şekil 4.2	%100 kan derişimi ve farklı antibadi derişimleri ile frekans değişim grafiği	43
Şekil 4.3	Aynı derişimdeki antibadi (%100) ve 10 farklı kan süspansiyonları uygulanmış kristallerin frekans değerleri grafiği	45
Şekil 4.4	500x büyütmede SEM kirli yüzey görüntüsü	46
Şekil 4.5	250x büyütmede SEM kirli yüzey görüntüsü	46
Şekil 4.6	100x büyütmede SEM temiz yüzey görüntüsü.....	47
Şekil 4.7	1000x büyütmede SEM temiz yüzey görüntüsü.....	47
Şekil 4.8	100x büyütmede antibadi immobilizasyonu sonrası SEM görüntüsü	48
Şekil 4.9	400x büyütmede antibadi immobilizasyonu sonrası SEM görüntüsü	48
Şekil 4.10	500x büyütmede platelet çözeltisi uygulanmış kontrol kristalinin SEM görüntüsü	49
Şekil 4.11	250x büyütmede birinci derişim uygulanmış yüzeyin SEM görüntüsü	49
Şekil 4.12	250x büyütmede ikinci derişim uygulanmış yüzeyin SEM görüntüsü	50
Şekil 4.13	250x büyütmede üçüncü derişim uygulanmış yüzeyin SEM görüntüsü	50
Şekil 4.14	1600x büyütmede aktiflenmiş plateletin SEM görüntüsü	51
Şekil 4.15	10 µm x 10 µm boyutlu kirli gümüş yüzeyin AFM Görüntüsü	52
Şekil 4.16	10 µm x 10 µm boyutlu temiz gümüş yüzeyin AFM görüntüsü.....	52
Şekil 4.17	10 µm x 10 µm boyutlu antibadi immobilize edilmiş kristalin AFM görüntüsü	53

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Platelet granüllerinin içeriği.....	4
Çizelge 4.1 Yüzey modifikasyonu sonrası frekans değişimi çizelgesi	42
Çizelge 4.2 %100 kan derişimi ve farklı antibadi derişimleri ile frekans değişim çizelgesi	43
Çizelge 4.3 Kan derişimlerinde ölçülen platelet sayısı ve ortalama frekans değişimi çizelgesi	44

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

QCM	Kuvars Kristal Mikroterazi
OCS	Açık Kanüler Sistem
PZ	Piezoelektrik
CLEA	Çapraz Bağlanma Enzim Agregatları
CLEC	Çapraz Bağlanma Enzim Kristalleri

1. GİRİŞ

Plateletler kan pıhtılarının oluşumunda görev alan hücre parçalarıdır [1]. Günümüzde çeşitli yöntemlerle platelet aktivasyonu belirlenebilmektedir. Fakat günümüzde kullanılan bu yöntemler karmaşık sistemler içermektedir. Modern teknolojilerin kullanıldığı mevcut cihazlarda bile minimum test süresi 30 dakika kadarken, tasarlanan biyosensör ile anlık ölçüm gerçekleştirilebilmektedir. Sunulan tez kapsamında kuvars kristallerin yüzeyine kimyasal immobilizasyon yapılarak frekans değişimiyle platelet aktivasyonunun varlığı tespit edilmiş ve kullanılan geleneksel sistemlere alternatif bir yöntem geliştirilmiştir. Tasarlanan sistemin maliyetinin ucuz olması, kısa sürede işlemlerin tekrarlanabilir özellikte oluşu en büyük ve önemli avantajlarını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Platelet

Plateletler $7 \pm 4,8 \mu\text{m}^3$ (femtolitre, fL) hacminde çekirdeksiz kan hücreleri olup normal hemostazda önemli rolleri vardır. Bunun için periferik kanda uygun sayıda olmaları ($140000/\mu\text{L}$ - $400000/\mu\text{L}$) ve fonksiyonlarının normal olması gerekmektedir [2]. Platelet sayı ve işlevlerindeki değişiklikler ciddi klinik sonuçlara neden olabilmektedir. Örneğin; bu hücrelerin sayı ve işlevlerinde azalma olduğunda kanamalar ortaya çıkarken, bazı trombositozlu hastalarda şiddetli tromboembolik ataklar görülebilmektedir. Yaşadığımız çağda en önemli ölüm nedeni olan koroner arter hastalıklarının patogeneğinde aşırı trombosit aktivasyon, adezyon ve agregasyonunun önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir [3].

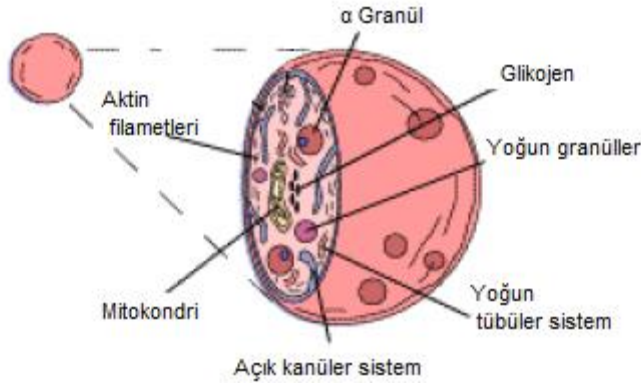
2.1.1 Plateletin tanımı ve anatomisi

Plateletler çok sayıda granül ihtiva eden renksiz hücre parçalarıdır. Çapları ortalama $<1.5-2.5 \mu\text{m}$ 'dir ve eritrosit büyüklüğünün yaklaşık dörtte biri büyüklüğe sahiptirler. Periferik kandaki en küçük hücreler olduğu için kan pulcukları adı ile de anılan çok fonksiyonlu hücrelerdir [4]. Plateletler kemik iliğinde megakaryositler

tarafından üretilirler. Pasif durumdayken diskoid şekle sahiptirler, aktifledikten sonra ise dalak tarafından temizlenmektedir [5]. Plateletlerin çekirdeği olmadığı halde, hücre içerisinde bulunan aminoasitleri mRNA kullanarak sentezleyebilirler. Protein sentezinin mitokondrial nükleik asitler sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir [4].

Elektron mikroskobu tarafından da açığa çıkarılmış olduğu gibi plateletlerin morfolojik sınıflaması üç başlık altında incelenmektedir:

- Periferik Bölüm: Bu bölüm plazma membranı ve açık kanallar sisteminden (OCS, open canalicular system) oluşmaktadır. Adezyon ve agresyonun gerçekleşmesinin sorumludur.
Yapısında glikoproteinler, glikolipitler, mukopolisakkaritler, adsorbe edilmiş plazma proteinleri ve integrinler bulunmaktadır.
- Sol-gel Bölümü: Mikrotübül sistemi destekleyen , büzülme ve bir araya gelme gibi fiziksel aktiviteleri içeren kısımdır. Açık kanüller sistem şeklinde tanımlanan bağlantı sistemini içermektedir.
- Organeller Bölümü: Bu bölüm platelet fonksiyonlarının çalışabilmesi için aktif moleküllere sahip farklı tipteki sitoplazmik organelleri içeren bölümdür. Bunların içeriğinde: yoğun granüller (yüksek konsantrasyonlarda adenin nükleotidleri), alfa granülleri (büyüme faktörleri ve sitokin benzeri proteinleri ihtiva eden granüller), lizozomal granüller (örneğin sindirim enzimleri; proteazlar, bakterisidal aktiviteyi sağlayan katyonik proteinler), mitokondri ve glikojen granülleri bulunmaktadır [4].



Şekil 2.1 Plateletin analitik yapısı [4]

2.1.2 Platelet granülleri

Eksositozun en önemli aşamaları üç tip salgı granülü tarafından gerçekleştirilmektedir. Bunlar alfa granülleri, lizozom ve dense granülleridir [6].

Platelet lizozomları: Lizozomlar, megakaryositler olgunluğa erişmeden önce, hatta alfa granüller de tam anlamıyla oluşumunu tamamlamadan önce şekillenirler. Tipik bir platelet lizozomu 175–250 nm çapa sahiptir. Alfa ve yoğun granüllere göre daha heterojen bir yapıları vardır. Ubikuitöz lizozomal membran proteinlerine sahiptirler; LAMP-1, LAMP-2, ve CD63 (LAMP-3) [7].

Dense granülleri: ADP, ATP, kalsiyum iyonları, pirofosfat ve serotonin (plazmadaki serotoninini alarak depolarlar) içeren, 250-300 nm çapındaki granüllerdir. Sağlıklı insan plateleti, platelet başına luminal pH 6.1'de 3-8 arasında dense granülü içermektedir. Elektron mikroskobu ile bakıldığında granüllerin yüksek osmofilik değere sahip olduğu görülebilmektedir. Dense granülleri serotonin, nonmetabolik ATP ve ADP, kalsiyum ve pirofosfat içermektedir [8].

Alfa granülleri: Fibrinojen, faktör V, vitronektin, trombospondin ve von Willebrand faktörü içeren granüllerdir. Bu hücreler platelet fonksiyonlarının normal bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan salgı granülleri ile doludurlar. Plateletlerin sahip olduğu üç salgı granülü arasında -alfa granülleri, dense granülleri ve lizozomlar- en bol bulunanı alfa granülleridir. Yaklaşık olarak her platelette 50-80 adet alfa granülü

bulunmaktadır. Boyutları 200-500 nm arasında değişkenlik göstermektedir. Platelet hacminin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadırlar. Dense granüllerine göre on kat daha fazla hacme sahiptirler. Toplam alfa membran granül yüzeyi her platelet için 14 lm^2 'dir ve bu da dense granüllerine göre 8 kat daha fazladır [6].

Lizozom, alfa ve dense granüllerinin morfolojik ve fonksiyonel olarak organellerden tamamen farklı olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Ayrıca organizmalarının ortaya çıkışı da tamamen organellerden farklıdır. Ayrıca platelet granülleri için, özellikle de alfa granülleri için, trans golgi açısından biyosentetik yolla üretildiğine dair oldukça fazla veri bulunmaktadır [7].

Çizelge 2.1 Platelet granüllerinin içeriği [8]

Alfa Granüller	Yoğun Granüller	Lizozomal Granüller
Albümin	Serotonin	Katepsin D
Fibrinojen	ATP	Katepsin E
Fibronektin	ADP	Karboksipeptidaz A
Vitronektin	Kalsiyum	Karboksipeptidaz B
Osteonektin	Pirofosfat	β - N -asetil- D- heksozaminidaz
von Willebrand faktör		β -D-glukuronidaz
von Willebrand antijen II		β -D-galaktosidaz
Trombospondin		α -D-mannosidaz
Platelet faktör 4		α -L-arabinofuranosidaz
IgG, IgA, IgM		α -D-galaktosidaz
C1 inhibitör		α -L-fukosidaz
Plazminojen		β -D-fukosidaz
Plazminojen aktivatör inhibitör-1		β -D-glukosidaz
Plateletten ayrılmış kollejenaz inhibitörü		α -D-glukosidaz
Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen		Asit fosfataz
Protein S		Arilsülfataz
α 2-antitripsin		
α 2-makroglobulin		
α 2-antiplazmin		
Multimerin		
Basit platelet proteini		
β -tromboglobulin		
Histidine zengin glikoprotein		
Doku bağlayıcı- aktive edici protein III		
Nötrofil aktive edici protein II		
Plateletten ayrılmış büyüme faktörü		
Dönüştürücü büyüme faktörü β -		
Endotel hücreli büyüme faktörü		
Pıhtılaştırıcı faktör V		
Pıhtılaştırıcı faktör VIII		

2.1.3 Platelet yapımı

Plateletler, kemik iliğinin en büyük hücresi olan megakaryositler tarafından üretilir [9]. Megakaryositlerin yaşam döngüsü 8-9 gündür. Üretilen plateletlerin yaşam döngüsündeki yarı ömürleri toplam platelet sayısı, hematokrit ve toplam kan hacmi üzerinden hesaplanabilmektedir.

Ortalama sağlıklı bir insan günlük 1×10^{11} platelet üretebilir. Erişkin megakaryositler $1-3 \times 10^3$ adet platelet üretimini gerçekleştirebilmektedirler [10].

2.1.4 Plateletin dolaşımdaki yeri

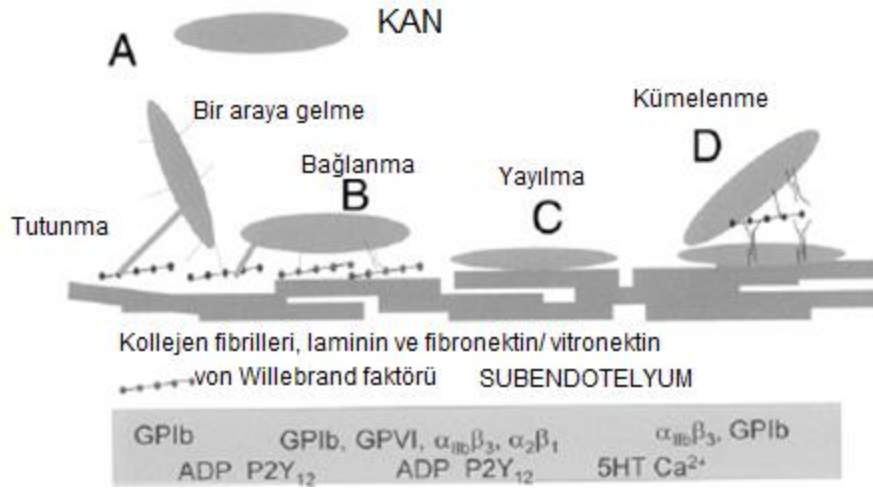
Pıhtı oluşumuna katılıp tüketilmediği sürece plateletlerin dolaşımdaki ömrü 9-10 gündür [11]. Daha sonra dalakta ayrıştırılır. Hipersplenizm (dalağın fonksiyonunda azalma veya yok olma) yüksek platelet sayılarına, hipersplenizm (dalağın aktivitesinde anormal artış) düşük platelet sayılarına neden olabilir [12].

2.1.5 Platelet aktivasyonu

1964 yılında Davie ve Ratnoff ilk kez kan koagülasyonunu tanımlayan kaskad teorii ortaya atmış ve koagülasyon prosesini üç faza ayırmıştır; başlama fazı, çoğalma fazı ve ilerleme fazı. Bu teoriden sonra kan koagülasyonu tamamen bağımsız bir biyokimyasal sistem olarak değerlendirilmeye başlanmıştır [13].

Platelet aktivasyonunun üç aşamada gerçekleştiği kabul edilir:

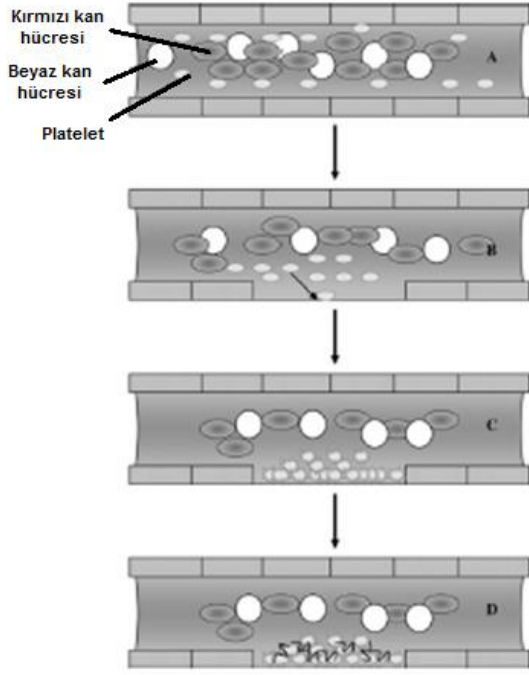
- a) Başlama Fazı: Bu fazda genellikle agonistlerin ortaya çıkmasına yol açarak platelet aktivasyonuna neden olan bir olay vardır. Agonistlerin plateletlere bağlanması bu hücrenin aktivasyonunu başlatır [13].
- b) Çoğalma Fazı: Hücre içindeki ikincil mesajcılar uyarıyı iletirler [13].
- c) İlerleme Fazı: Platelet iskelet yapısının değişmesi (Plateletin şekil değiştirmesi), plateletlerin fibrinojen aracılığı ile yapışıp küme oluşturmaları ve granül sekresyonudur [13].



Şekil 2.2 Platelet aktivasyonunun basamakları [14]

Platelet aktivasyonunu başlatan agonistler zayıf ve güçlü olarak sınıflandırılırlar. Güçlü agonistler (kollajen, trombin vb.) agregasyonun engellendiği şartlarda dahi (örneğin; Glanzman trombasteni) granül sekresyonunu uyarabilirler. Zayıf agonistler (ADP, epinefrin vb.) ise yalnız başlarına granül sekresyonunu uyaramazlar; ancak agregasyonu uyarabilirler. Agregasyon neticesinde sekresyon gerçekleşebilir.

Plateletlerin ana vazifeleri kanamanın durdurulması ve pıhtı teşekkülüdür. Platelet adezyonu ve kümelenmesi vasküler yaralanma, zedelenme gibi durumlarda hasarlı bölgeye plateletlerin gitmesi ile gerçekleşir [15]. Son derece küçük olan bu kan hücreleri pek çok maddeleri ihtiva ederler. Vazokonstrüktör adı verilen maddeyi salgırlar ve zedelenen damarın büzülmesinde vazife alırlar. Yine serotonin maddesi de kanda plateletlere taşınır. Pıhtılaşma mekanizmasının işlemeye başladığı durumlarda seruma verilirler. Yine plateletler histamin, epinefrin, norepinefrin bağlayabilirler [15]. Plateletlerin içeriğindeki ADP, GPIIb-IX-V complex, vWF-A1 gibi onlarca haberci hücre gelişmiş bir sinyalizasyon ağı sayesinde haberleşir.



Şekil 2.3 Vasküler yaralanmada platelet tıkaçı oluşumu [16]

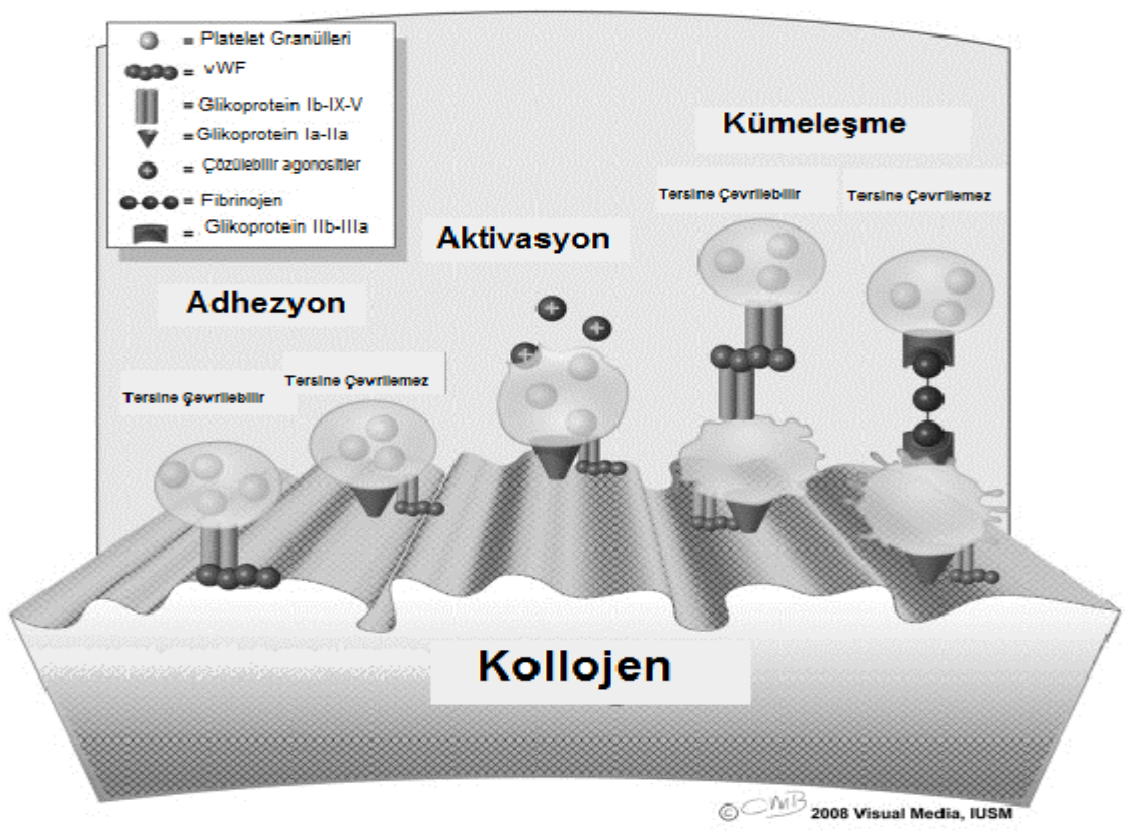
Plateletler, damar duvar hasarında homeostaz için kritik öneme sahip hücrelerdir. Platelet reseptörleri belirli bir sıraya göre aktif olmaktadır. Bu sıra kollajen ile temas eden ilk uyarıcıdan GPIb/von Willebrand hücresine ulaşınca kadarki aşamaları kapsamaktadırlar. GPIb/von Willebrand faktörü ile temas beraberinde hücrelerin ihtiva ettikleri granüllerin, integrinlerin ortaya çıkarılarak aktif olmasını sağlamaktadır [17].

Plateletler kollajen ile temas ettiklerinde aktive olurlar. Damarın içindeki endotel bir şekilde hasar gördüğünde altındaki kollajen (bağ dokusu) açığa çıkar ve aktive olan plateletler kollajene bağlanır. Hasarlı bölge üzerine plateletler kümelenir ve trombotik tıkaç oluştururlar. Bunun (oluşan tıkaçın) sonucu olarak da ihtiva ettikleri granüllerin içeriğini ortama boşaltırlar. Ortama boşaltılan bazı maddeler yüzünden plateletler birbirlerine bağlanırlar, yeni gelen plateletler hasarlı yüzeye bağlanmış plateletlere bağlanır.

Ayrıca granüllerin içeriği ortama boşaldığında ortaya çıkan serotonin salınımı damar duvarındaki düz kasların kasılmasına neden olarak hasarlanmış bölümden kan akımını engeller. Bunun nedeni serotoninin vazokonstrüktör olmasıdır.

Ayrıca agregasyon sırasında plateletlerde yüksek oranda bulunan miyozin ve aktin filamentleri kasılarak oluşan tıkaçı güçlendirirler. Plateletler plazmada bulunan fibrinojene ilave olarak fibrinojen salgılar. Bunun sonucu olarak pıhtılaşma sırasında daha çok fibrinojen fibrine dönüşürek, daha çok (platelet ve diğer) kan hücrelerinin tutunacağı fibröz ağ oluşturur [17].

Von Willebrand faktörü homeostazın sağlanmasında en önemli katkırı sağlamaktadır [17]. Hasarlı damar duvarına yapışarak plateletlerin buraya tutunmasını kolaylaştırır. Bu nedenle koagülasyon için önemlidir ve von Willebrand faktörü eksikliği veya bozukluğunda koagülasyon bozuklukları görülebilmektedir.



Şekil 2.4 Platelet tıkaç formu [18]

Son yıllarda platelet aktivasyonunu daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecek sinyal akışını açıklayıcı çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Böylece kompleks sinyal analizini plateletler ve etrafındaki hücreler için gerçekleştirebilmiştir. Bu gelişmeler platelet aktivasyonu üzerinde daha kolay çalışmalar yapılmasını sağlamıştır. Sinyal yollarının iyi anlaşılmasıyla geliştirilebilecek inhibitörler üzerinde çalışmalar

yapılabilecektir. Sinyal yolları, integrin bağlantıları, hücre bağlanmaları gibi bir çok noktanın çözümlenmesi beraberinde hemeostaz direncinin arttırılabilmesini sağlayacaktır. Bu da dolaylı olarak bağışıklık hastalıkları, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıklar için alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacaktır [19].

2.1.6 Platelet fonksiyon testleri

Normal şartlar altında, plateletler ve koagülasyon faktörleri inaktif durumdayken, kan damar içinde serbest olarak akar. Ancak vasküler hasar olduğunda, genel olarak primer ve sekonder olarak ayrılabilen hemostatik sistem aktive olur. Platelet sayısı normal iken kanama zamanının uzun olması platelet fonksiyonlarında bir problemi gösterir. Platelet zengin plazmada veya tam kanda çalışılabilir. Kullanılan agonistler genellikle kollajen, ADP, epinefrin, araziidonik asit ve ristosetindir [11].

Platelet fonksiyonlarını değerlendirilmesinde birçok yöntem ve test vardır. Ancak bu testler hem pahalı hem de zahmetli testler olup, en basit ve ucuzundan başlanarak en komplike olana doğru tercih edilmelidirler.

Pıhtılaşma testleri yapılırken test sonuçlarını olumlu ya da olumsuz yönde etkileyen birçok faktör vardır. Antikoagülan tip ve miktarı, bileşenlerin pH'si, ısı, tüplerin cam ya da plastik olması, agrogometrideki dönme hızı, platelet sayısı ve yoğunluğu, fibrinojen düzeyi, hemoliz varlığı ve eritrosit kontaminasyonu, venöz kan alım yöntemleri bunlardan birkaçıdır. Sağlıklı bir tanı için kan alma, tüp özellikleri, alınan kanın transferinin istenilen şartları sağladığından emin olunmalı en ufak bir şüphede test mutlaka tekrarlanmalıdır.

Başlıca klasik cihazlar;

- ❖ Kanama Zamanı Testi: Kanama zamanı testi, ilk defa in vivo olarak platelet fonksiyonunu ölçebilen yöntemdir. 1910 yılında Duke tarafından geliştirilmiş ve 1990'ların başına kadar en yararlı test olarak kabul edilmiştir. Genellikle ön kol anterior yüzeyde deride açılan bir kesiden kanama duruncaya kadar geçen zaman kanama zamanı olarak hesaplanarak test gerçekleştirilir.

Normal süre genellikle 2-10 dakika arasında değerlendirilmektedir. Fakat düşük platelet sayısına sahip hastalarda bu süre 30 dakikadan fazla olabilmektedir. Bu test yöntemi zaman tüketimi, tekrarlanabilirliği, invaziv girişim gerektirmesi gibi çeşitli sebeplerden ötürü zayıf kalmıştır [11]. Platelet fonksiyonlarını etkileyen ilaç kullanımında da kanama zamanı uzayabilir. Yine cilt ve damar yapısındaki bozukluklar da test sonucunu olumsuz olarak etkileyebilir. Test yapılış tekniği, platelet sayısı, yakın zamanda kullanılan ilaçlar gibi birçok faktörden etkilenir. Bunun yanı sıra sonlanım noktası kesin değildir. İnvaziv bir test olması kullanılabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini kısıtlayan unsurlardır.

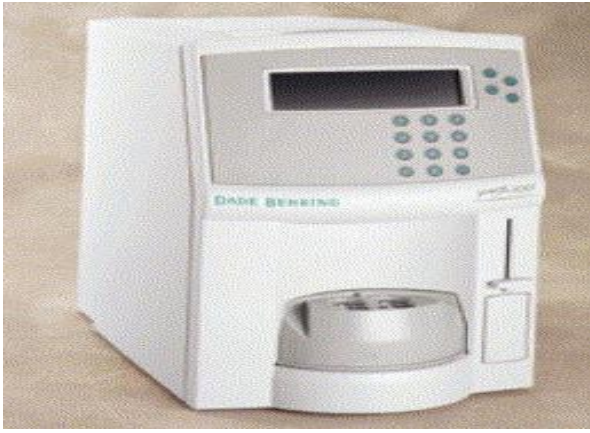
- ❖ Agregometreler: Plateletten zengin sitratlı plazma ya da sitratlı tam kan örneklerine platelet agregasyonunu uyaran bir reaktif eklendiğinde agregasyon sürecini ölçen cihazlardır. Bu cihazlar platelet agregasyonu yanı sıra, platelet ATP sekresyonu ve ristosetin koafaktör aktivitesi (von Willebrand faktörü aktivitesi) ölçmeye de yararlar. 1960 yıllarında geliştirilen cihazın kullanımı hala çok yaygındır ve platelet fonksiyon analizi için 'altın standart' olarak nitelendirilen ölçüm yöntemine sahiptir. Fakat bu yöntem ölçüm süresinin yaklaşık 2 saat oluşu gibi bir çok dezavantaja da sahiptir [11].



Şekil 2.5 Beş kanallı agrometre cihazı [20]

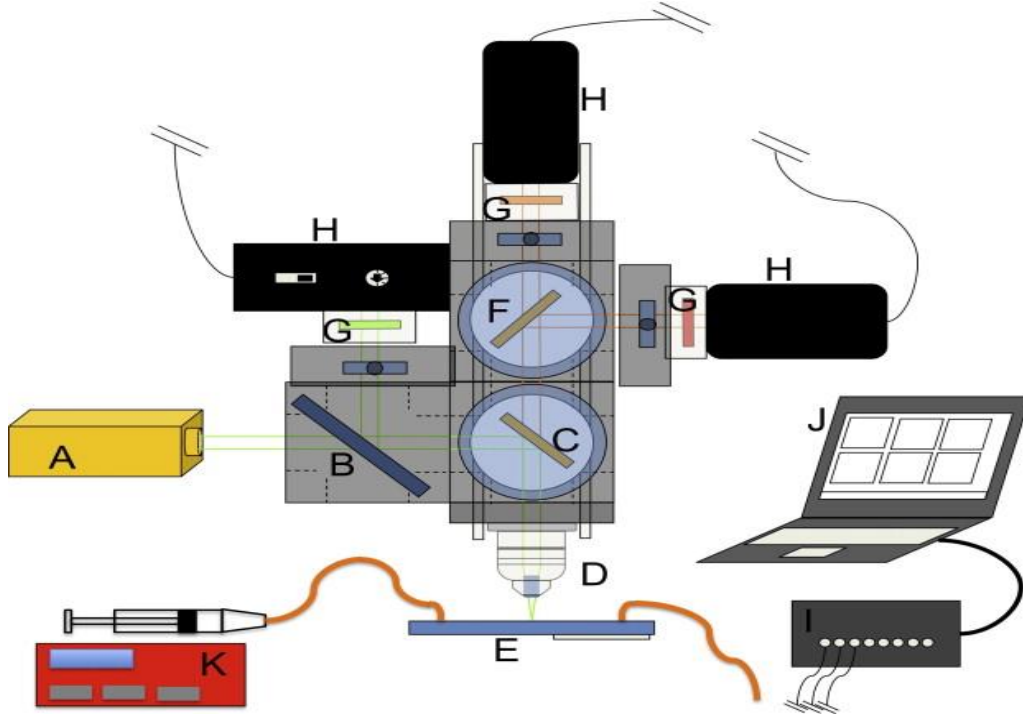
Başlıca yeni cihazlar/testler;

- ❖ PFA-100 ile in vitro kanama zamanı: Kanama zamanının in vitro şartlarda taklit edilmesi mantığıyla geliştirilen bir cihazdır. Kollajen/ADP ya da kollajen/epinefrin emdirilmiş kartuşların içinden geçen sitratlı kandaki plateletlerin ne kadar sürede kartuştan kan akımını bloke edecek şekilde pıhtı oluşturdıkları ölçülür [21]. PFA-100 platelet fonksiyonunu etkileyen platelet sayısı, hematokrit, uyuşturucu kullanımı, von Willebrand hastalığı, platelet resöpter bozuklukları gibi çeşitli anormalliklerin taranmasında yüksek duyarlılığı olan bir testtir [11].



Şekil 2.6 PFA 100 cihazı [22]

- ❖ Akış Sitometri: Platelet fonksiyon analizi için şüphesiz en önemli gelişmelerden biri akış sitometri cihazının kullanıma başlanması olmuştur. Fakat bu cihaz hem pahalı gereçleri hem de özel eğitimlerin alınmasını gerektirmektedir. Çok küçük miktarlarda kan örnekleri ile çalışılabilen bir tekniktir. Farklı kliniklerde farklı platelet aktivasyon markerları ile çalışmalar yapılmış ve hassasiyetinin son derece yüksek olduğu gösterilmiştir. Klasik platelet agonistleri kullanılarak in vitro olarak platelet aktivasyon cevabının ölçülebilmesine rağmen, akış sitometri yeni bir yöntem olarak kullanıcılar tarafından tercih edilir hale gelmiş bir yöntemdir [11].



Şekil 2.7 Akış Sitometri Cihazı [23]

❖ Tromboelastografi: Bu cihazlar pıhtı oluşumu sırasındaki viskoelastik değişiklikleri ölçerler. Pıhtılaşma sürecinin hangi fazında bozukluk olduğunu (pıhtılaşma, platelet, fibrinoliz, vb.) değerlendirmeye olanak sağlamaktadır. Tromboelastografi platelet haritalama sistemidir ve nicel olarak platelet fonksiyon analizi yapmaktadır. Bu yöntemin analitik varyasyonlar gözönüne alındığında güvenilirliğinin düşük olduğu gösterilmiştir.

Fakat en önemli farklılığı ve avantajı bu yöntem ile platelet fonksiyon analizine ilave olarak, plateletin kanama gücüne katkısı da ölçülebilmektedir. Platelet fonksiyonu ve pıhtılaşma birbirinden farklı kavramlar gibi görünse de tamamen birbirinden bağımsız değildir. Bu yüzden bu iki faktörün de ölçümünü gerçekleştirebildiği için tromboelastografi avantajlı olarak da değerlendirilebilir. Bu yöntemin bir avantajı da tam kan ile çalışmanın mümkün olmasıdır [24].

2.2 Kuvars Kristal Mikroterazi Sistemler

2.2.1 Sensörler

Endüstri, çevre mühendisliği ve ilaç alanındaki gelişmeler, her geçen gün yeni yöntemler ve yüksek hassasiyet gerektiren yöntemlere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Bu yeni yöntemlerden birisi de yüksek seçiciliğe sahip sensörlerin kullanılmasıdır. Genel anlamda sensörler; kimya, biyoloji, fizik, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanıp, moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin birleştirilmesi ile geliştirilen analitik cihazlar olarak tanımlanabilir [25].

Biyosensörler; bilgiyi algılayabilen, saklayabilen ve iletebilen biyolojik alıcıya ve fizikokimyasal çeviriciye sahip cihazlardır. Biyolojik alıcılar; enzimler, dokular, mikroorganizmalar, antikolar, hücre reseptörleri gibi biyolojik tabanlı malzemelerden oluşmaktadır. Başka bir deyişle, biyomalzemeler biyolojik malzemeleri tanıyabilme özelliğine sahip analitik cihazlardır. Bu tanıma işlemi sonrasında ise yapısında bulunan çevirici mekanizma ile algılamış olduğu malzemeyi biyokimyasal sinyale ya da elektrik sinyaline çevirme yeteneğine sahiptir.

Transdüksiyon mekanizması sonucunda optik, elektrokimyasal, piezoelektrik, termometrik, manyetik sinyaller analit analizinde kullanılmak üzere sinyallere çevirilebilirler. Bu çeşitlilik sebebi ile çok çeşitli biyosensörler tasarlanabilir.

Teknolojik olarak biyosensörler biyolojik komponentler için kullanılabilir malzemeler olarak tasarlanabilir.

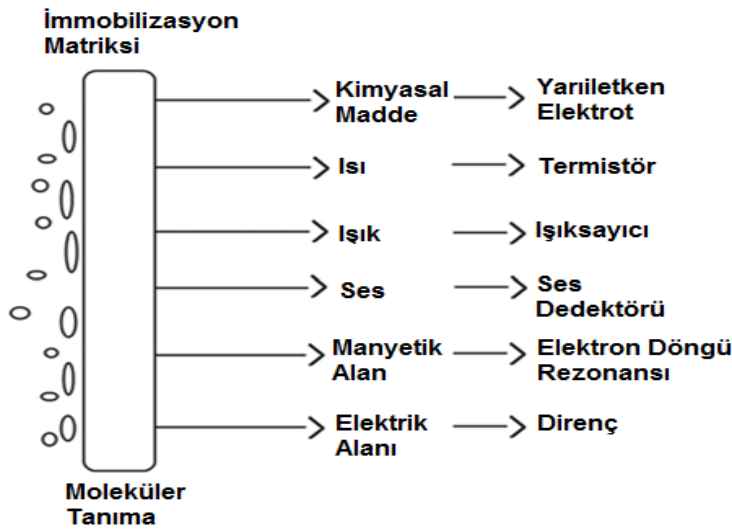
Biyosensörler çok çeşitli şekillerde, boyutlarda tasarlanabilir [26]. Biyosensörler ile anlık cevap alınabildiği için taşınabilir özellikte yiyeceklerdeki zararlı toksinleri tanıyabilen, kimyasal ya da biyolojik ajanları(enzimler, yağ tabakaları vs.) tanıyabilen bir çok farklı alanda farklı amaçlar için kullanılabilirler. Ayrıca biyofizik, ilaç sanayi gibi bir çok alanda da araştırma amaçları için de kullanılabilirler. Biyosensörlerin en önemli avantajı, biyofizik teknikleri,

floresan işaretleme, kimyasal yöntemler gibi bir çok yardımcı tekniğe ihtiyaç duymadan ölçüm yapılabilen bir sistem olmasıdır [27].

Biyosensörler son derece küçük boyutlarda ve hassas ölçüm yapabilir özellikte üretilebilirler. Ayrıca üretim esnasında steril edilebilir oluşları, tekrar edilebilir özellikte malzemelerden oluşmaları gibi üretimi kolaylaştırıcı özellikleri sayesinde üretim maliyetlerinin de aşağıya çekilmesini sağlayabilmektedirler [26].

Biyosensörlerin en önemli avantajı gerçek zamanlı analiz yapılmasına imkan vermeleridir [23].

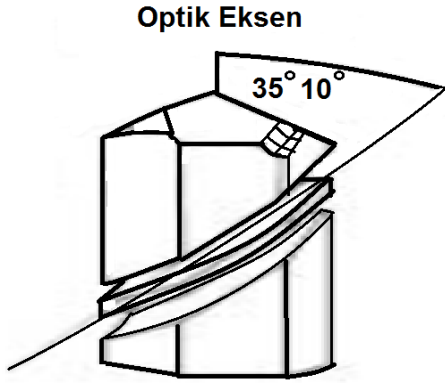
Piezoelektrik biyosensörler virüs, bakteri ve diğer hücrelerin, proteinlerin, nükleik asitler ve ilaçların, hormonlar gibi moleküllerin belirlenmesi için kullanılabilir [28].



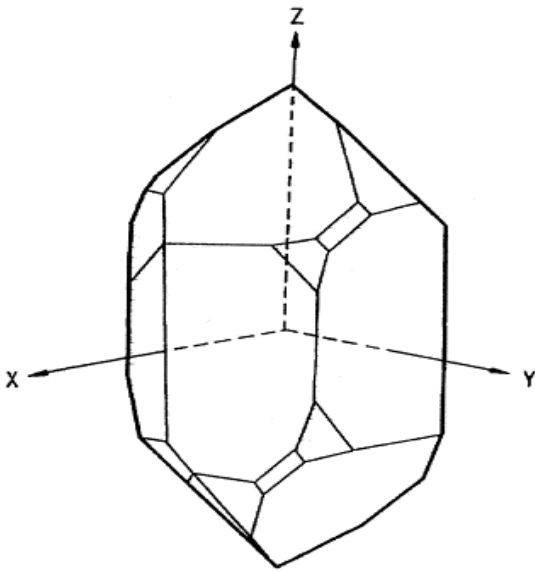
Şekil 2.8 Sensör yapısı [26]

2.2.2 Kristalin yapısı

Kristaller silika polimorflarının bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. İşlenmiş bu silika polimorflar, partiküllerin geçici piezoelektrik elektriksel boşalımların gerçekleştirilmesini sağlar. Kristal yüzeyi ile atmosferik gazların şiddetli reaksiyonu ile yüzey boşalımları oluşur. Piezoelektrik özellik kristallerin üzerine uygulanan elektriksel yüklerin kristal üzerinde gerçekleştirdiği yük boşalımları ile oluşmaktadır. Bu etki çeşitli alanlarda ticari ürünlerde de kullanılmaktadır [29].



Şekil 2.9 Alfa kuvars kristal [30]



Şekil 2.10 Kuvars kristalin üç boyutlu yapısı [31]

Kuvars kristaller kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütlesine bağlı olan doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Kristalin kırılma şeklinin rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır. Yüksek kaliteli mekaniksel ve piezoelektrik özelliğinden dolayı QCM uygulamalarında alfa-kuvars kristalleri tercih edilmektedirler. Kristal oryantasyonu ile birlikte kesilme açısı da salınımın şeklini belirlemektedir [32].

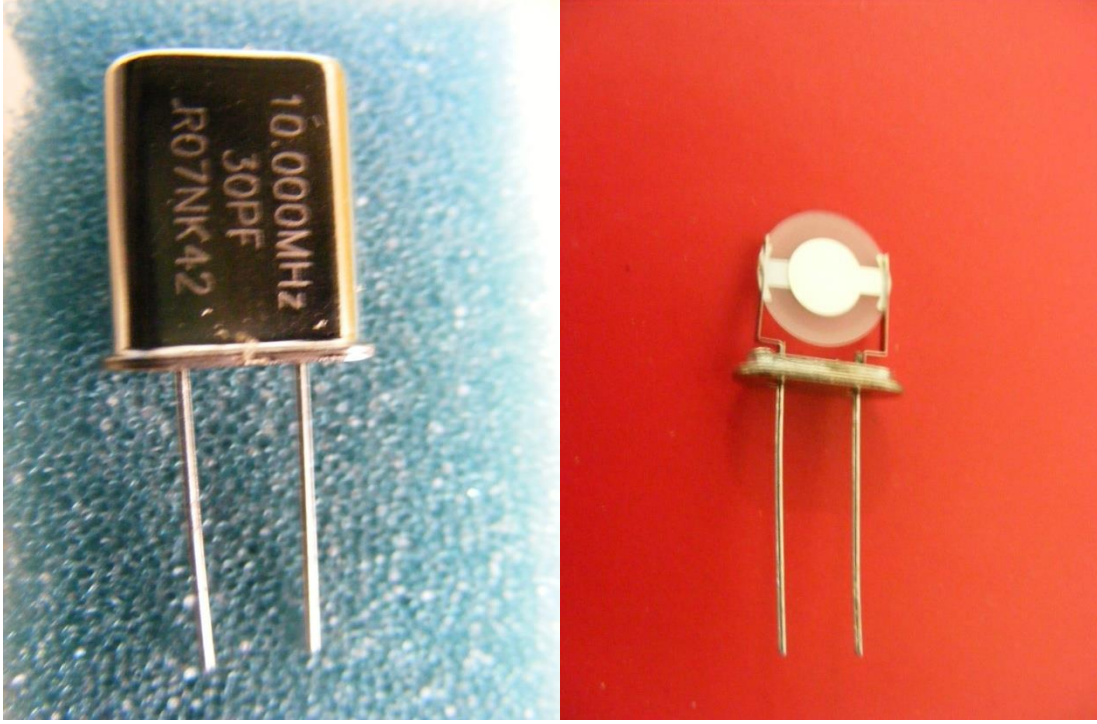


Şekil 2.11 Kuvars kristalin kesilmeden önceki yapısı [33]

Piezoelektrik uygulamalarında kristal iki metal elektrot arasına sandviç edilmiştir. Elektrotların bu şekilde yerleştirilmesi salınan elektrik alanının kristal yüzeyine dik yönde olmasını sağlamaktadır. Oluşan elektrik alanı kristal yığın yapısında mekanik salınıma yol açar. Mekanik salınım, elektrotlar birbirinin tam olarak karşısına geldiği durumda en yüksektir. Mekanik salınımın yol açtığı kayma ise elektrotlara paralel yöndedir [32].

Temel frekans ince plakanın kalınlığına, kimyasal yapısına, yoğunluğuna ve şekline bağlıdır. Kristalin kesme modülüsü, kalınlığı, yoğunluğu gibi bazı faktörler salınım frekansını etkilemektedir [34].

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.



Şekil 2.12 Metal kılıflı ve kılıfsız kuvars kristal elektrot şekli

Ticari sistemler kütle ölçüm duyarlılığı minimum 1 ng cm^2 olan ve 100 mg 'a kadar ölçüm alınabilmesini sağlayan güvenilir düzenekler olarak tasarlanmışlardır. Kristalin hazırlanmasında en büyük zorluk, istenilen özelliklerde kesmeye çalışırken kütle dedektörünün mikroterazi faktörünü gözardı etmesidir. QCM'lerin düşük sıcaklardan oda sıcaklığına kadar çok geniş bir sıcaklık aralığında etkileşime girmemesi, çok küçük frekans değişimlerini algılayabilme özelliğinde oluşu gibi sebepler ile AT kesim kuvars kristaller tercih edilmektedir. AT kesim kristaller diğerlerine göre çok daha karardır ve sıcaklık katsayıları $1 \text{ ppm/ } ^\circ\text{C}$ 'den düşük bir değerdir. Kristal yapının karakteristik düzlemi ile kesme tabakasının arasındaki açı AT ve BT kesmelerde sırasıyla z ekseninden $35^\circ 15'$ ve $-49^\circ 00'$ 'dir. AT kesim kristaller çok geniş sıcaklık çalışma aralığında çalışma imkanına sahiptirler [35]. Kristal düz ya da dalgalı, temiz ya da bulanık bir yüzeye sahip olabilir. Sıvı fazlar için optik olarak parlatılmış kristaller tercih edilir.

Kristal çapları stabilite için önemli rol oynamaktadırlar. Genellikle 0.5 inç 'lik çaplar tercih edilirken, 1 inç ve daha yukarısı için de kristaller bulunabilmektedir. Kristalin kalınlığı rezonans frekansı için etkilidir. Rezonans frekansı ise kütle ağırlığının duyarlılığını ölçmek için kullanılmaktadır. İnce kristaller yüksek rezonans frekansına sahiptir ve daha duyarlıdır. Fakat kırılğan bir yapıya sahiptirler [34].

Genellikle rezonans frekansları 5, 10 veya 12 MHz olan kuvars kristaller tercih edilir. Metal elektrotlar altın, gümüş, alüminyum veya nikel olabilir. Elektrot çapları genellikle 3-8 mm kalınlıkları ise 0,3-1,0 nm aralığındadır. Altın elektrotlar inert olmaları nedeniyle birçok uygulamada tercih edilmektedir. Gümüş elektrotların sulu ortamlarda uzun süreli kararlılığı düşüktür. Paladyum ile kaplı olanlarda bu sorun ortadan kalkmıştır. Anodik olarak okside edilmiş (Ag/AgCl'e karşı 1.4 V'da) paladyum elektrotlarda, modifiye edilmemiş olanlara göre yüzey hidroksil gruplarında önemli bir artış söz konusudur [34].

Kristal ve elektrotları osilatör devreleri için feedback olarak kullanılabilir. Frekans sayıcı bir devre yardımı ile frekans değerleri ölçülüp, hassas ölçümler yapmak için kullanılabilirler [34].

2.2.3 Piezoelektrik etki

Teorik olarak piezoelektrikliliğin kullanım öncüsü 1885 yılında yaptığı çalışmalar ile Raleigh olduğu kabul edilmektedir. Fakat bu konuda ilk araştırmalar Jacques ve Pierre Curie tarafından 1880 yılında gerçekleştirilmiştir [34].

Piezoelektrik kuvars kristaller doğal ya da sentetik malzemelerden levhalar halinde kesilirler. QCM ince kuvars bir disk ve üzerindeki elektrotlardan oluşmaktadır. Kuvars kristalin içerisinde sahip olduğu dahili mekanik stres sayesinde harici elektriksel potansiyel elde edilebilir. Kuvars kristaller doğru bir şekilde, uygun kalınlıkta ve kütlede kesildiğinde sahip oldukları akustik dalgalar kullanılabilir [34].

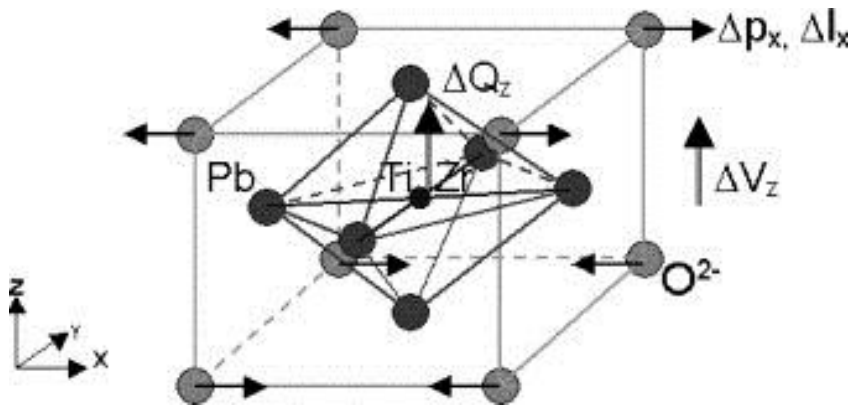
Piezoelektrik etki merkeze göre simetrik etkiden bağımsız olarak oluşmaktadır. Kristal yüzeyine bir basınç uygulandığında, kristal üzerinde oluşan deformasyon ile artı ve eksi kutuplar yer değiştirirler. Bir çok çeşit kristal piezoelektrik etki gösterebilirken, elektiriksel, kimyasal ve mekanik özellikleri analitik kullanımlar için QCM'i tercih edilir kılmıştır.

Piezoelektrik kuvars tabakalar tek bir kristalden elde edilirler. Kristal fabrikasyonunda genellikle alfa kesim kristaller tercih edilir. Piezoelektrik kuvars

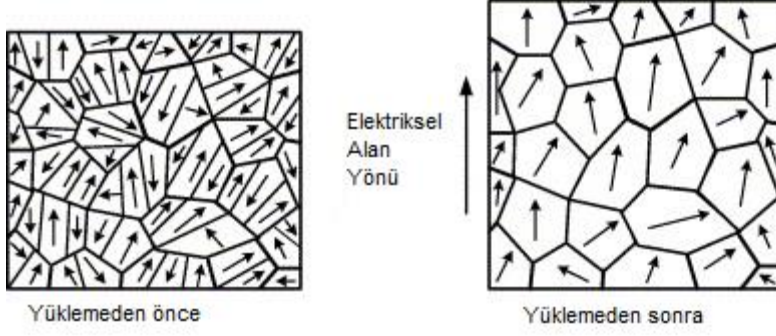
kristaller genellikle altın ya da gümüş iki elektrot arasına evaporizasyon yöntemi ile sandviç edilir. Elektrotlar arasındaki potansiyel farklılık sebebiyle alternatif elektrik alan oluşturulabilir. Uygulanacak olan bir voltaj ile elde edilen elektrik akımında kristal üzerinde oluşan deformasyon neticesinde salınımda farklılık meydana gelir. Bu mekanik salınım ile ise frekansta farklılık meydana gelir. Salınım yönü kafes gibi örülmüş kuvars ile aynı doğrultudadır [35].

Piezoelektrik etki ilk defa 1880'de Jaques ve Pierre Curie tarafından Rochelle tuzunda keşfedilmiştir. Temel olarak piezoelektrik etki, mekanik basınç altında bırakılan bazı yalıtkan kristallerin bir yüzünde pozitif, karşı yüzünde ise negatif elektrik yüklerinin ortaya çıkması şeklinde tanımlanır. Piezoelektrik bir kristalin yüzeyine fiziksel bir kuvvet uygulandığında yüzeyler arasında bir elektriksel potansiyel farkı oluştuğu gözlemlenmektedir. Oluşan elektriksel potansiyelin şiddetinin, uygulanan fiziksel kuvvet ile doğru orantılı olduğu bu etkiye "Piezoelektrik Etki" adı verilmektedir. Bu durumun tersi de mümkündür, yani bir kristalin iki yüzüne bir potansiyel farkı uygulanması sonucunda kristalde mekanik biçim değişikliği görülmektedir. Dolayısıyla, piezoelektrik kristalin yüzeyi üzerine yerleştirilen herhangi bir yabancı maddenin kütlesi ile rezonans frekansının değişmesi, piezoelektrik düzeneğinin çok yüksek bir hassasiyetle kütle ölçümünde kullanılabilmesi mümkün olmaktadır.

Kristal yüzeyinin seçici bir biyolojik malzeme ile kaplanması durumunda piezoelektrik kristal düzeneği biyosensör olarak kullanılabilir.



Şekil 2.13 Kristaldeki boyut değiştirme [36]



Şekil 2.14 Elektriksel yüklenme sonrası kristaldeki boyut değişimi [37]

Şekil 2.11’da piezoelektrik etkiye sahip kuvars kristalinin x-ekseni doğrultusunda uygulanan itme veya çekme kuvvetleri ile deformasyonu ve y-ekseni doğrultusunda oluşan yük değişimi gösterilmiştir. Kuvars kristallerin bu özelliğinden pek çok doğru ve duyarlı analitik cihaz yapılmasında yararlanılmaktadır.

2.2.4 QCM’in çalışma prensibi

QCM’de elektrotlar bir osilatöre bağlanır ve sisteme verilen bir AC akımı kristalin titreşim yapmasına izin verir. Bu sistem geniş sıcaklık aralıklarında dayanıklı olduğu için stabil çalışmalara olanak sağlar.

Piezoelektrik kuvars kristallerden sinyal üretmenin iki yöntemi bulunmaktadır. En çok kullanılan ilk yöntem kristalin bir osilatör devre elemanının parçası gibi kullanıldığı seçenektir. Bu yöntemde kristal titreşimleri kristal özelliklerinin kontrolündedir. İkinci yöntemde ise kristal harici bir enstrüman gibi değişken voltajın uygulandığı kristal üzerinde çeşitli frekansların oluşturulduğu yöntemdir.

Burada titreşim frekansını kristal belirleyemez, kristalin faz ve genliğinin elektriksel uyarıma cevabı ölçülür ve monitörize edilir. Genellikle tercih edilen yöntem, kararlılığı ve kolaylığı sebebi ile ilk seçenektekindir [35].

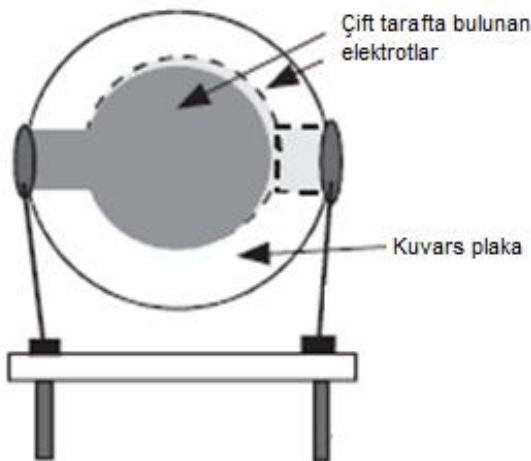
QCM, partiküllerin ölçümünün uygulanması için üzerinde iki tane kristal barındırır. Bunlardan bir tanesi havaya (yukarı) doğru bulunur, diğeri ise partiküllerin bulunduğu ortamdan uzak bir yerde bulunur. Havaya doğru yer alan kristal ince bir yapışkan tabaka ile kaplıdır ve bu tabaka partiküllerin kristal üzerine yapışmasını sağlar. Bu iki kristal karakteristik rezonans frekanslarına göre karşılaştırılır. Kuvars

kristal mikroterazi, bu iki kristalin aralarındaki frekans değişimini ortaya çıkarmaktadır. Üzerinde partikül biriken kristalin zamanla rezonans frekansı düşecek, buna bağlı olarak ise iki kristal arasındaki frekans farkı artacaktır. QCM kristalleri sıvı ve gaz fazda, vakumlu ve viskoelastik ortamlarda ölçüm yapabilme imkânı verirler. QCM, yüksek duyarlılıkla kütle ölçümlerini yapabilen akustik dalga mikrosensörlerinin bir çeşididir. Uygun koşullar altında, tipik bir QCM 0,1-1 ng/cm²'lik bir kütle değişimini ölçebilir. QCM yüksek frekanstaki AC elektrik alanının etkisi altında salınmaktadır [35].

2.2.5 Sauerbrey eşitliği

Piezoelektrik kristallerin kimyasal sensörlerde kullanılması ilk kez 1959 yılında Sauerbrey tarafından ortaya çıkartılmıştır. Sauerbrey kuvars kristal bir rezonatörün frekans boşluğunun eklenen kütle ile direkt orantılı olduğunu göstermiştir. Sauerbrey'in çalışması genel olarak bilimde büyük bir buluş ve çok küçük kütlelerin ölçülmesinde yeni bir nicel araç olarak kabul edilmiştir. Kuvars plaka kütleindeki bir artış, rezonans frekansında bir düşüşe neden olmaktadır [38].

Sauerbrey tarafından 1959'da piezoelektrik kristallerin AT-kesim kuvars plakalarının karakteristik bir rezonans özelliklere sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır [38].



Şekil 2.15 Kuvars kristal mikroterazi sistemin modeli [28]

Bir kuvars kristalde kalınlık (Δx) 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.

$$\Delta x = N / f \quad (2.1)$$

Kalınlık aynı zamanda kütlesi ile de aşağıdaki gibi ilişkilidir;

$$\Delta x = m / A \cdot \Delta \rho \quad (2.2)$$

Burada,

m: kristal kütlesi (g);

A: kristal üzerindeki elektrotun altında kalan alan (cm^2);

$\Delta \rho$: kristal yoğunluğu (kuvars için: $2,65 \text{ g/cm}^3$) dur.

Yukarıdaki iki denklem birleştirilir ve yeniden düzenlenirse aşağıdaki şekle gelir;

$$f = \Delta \rho \cdot N \cdot A / m \quad (2.3)$$

Eğer kristal elektrotlardan birinin yüzeyine Δm kadar kütle ilave edilirse bu bir frekans kaymasına (Δf) neden olur, ki bu da aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$\Delta f = -(f^2 / \Delta \rho \cdot N \cdot A) (\Delta m / 1 + \Delta m / m) \quad (2.4)$$

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

$$\Delta f = - 2,26 \times 10^{-6} f^2 \Delta m / A \quad (2.5)$$

Burada görüldüğü gibi; Kristal üzerine ilave edilen kütle (Δm), kristalin salınım frekansında kaymaya neden olur (Δf), bu kayma ölçülebilirse kütle artışı yukarıdaki basit ifadeyle hesaplanabilir [39; 40].

2.2.6 Kuvars kristal mikroterazi sistemlerin kullanım alanları

QCM sistemler yüksek hassasiyete sahip olması, kullanım kolaylığı, spesifikliğı, ucuz olması, doğrudan cevap vermesi gibi avantajlara sahip olduğundan hastalık

Bir kuvars kristalde kalınlık (Δx) 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.

$$\Delta x = N / f \quad (2.1)$$

Kalınlık aynı zamanda kütlesi ile de aşağıdaki gibi ilişkilidir;

$$\Delta x = m / A \cdot \Delta q \quad (2.2)$$

Burada,

m: kristal kütlesi (g);

A: kristal üzerindeki elektrotun altında kalan alan (cm^2);

Δq : kristal yoğunluğu (kuvars için: $2,65 \text{ g/cm}^3$) dur.

Yukarıdaki iki denklem birleştirilir ve yeniden düzenlenirse aşağıdaki şekle gelir;

$$f = \Delta q \cdot N \cdot A / m \quad (2.3)$$

Eğer kristal elektrotlardan birinin yüzeyine Δm kadar kütle ilave edilirse bu bir frekans kaymasına (Δf) neden olur, ki bu da aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$\Delta f = -(f^2 / \Delta q \cdot N \cdot A) (\Delta m / 1 + \Delta m / m) \quad (2.4)$$

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

$$\Delta f = - 2,26 \times 10^{-6} f^2 \Delta m / A \quad (2.5)$$

Burada görüldüğü gibi; Kristal üzerine ilave edilen kütle (Δm), kristalin salınım frekansında kaymaya neden olur (Δf), bu kayma ölçülebilirse kütle artışı yukarıdaki basit ifadeyle hesaplanabilir [39; 40].

2.2.6 Kuvars kristal mikroterazi sistemlerin kullanım alanları

QCM sistemler yüksek hassasiyete sahip olması, kullanım kolaylığı, spesifikliğı, ucuz olması, doğrudan cevap vermesi gibi avantajlara sahip olduğundan hastalık

teşhisi, antijen/antikor etkileşimi, ilaç analizleri, gaz sensörü olarak ve spesifik molekül tayinlerinde kullanımı son zamanlarda oldukça artmıştır. Kristalin yüzeyinin analizlenecek analite göre spesifik olarak tasarımı hassasiyeti arttıran bir etkidir. Uygulamalar, biyomolekülleri (proteinler, DNA, antijen/antikor), lipidleri, nanopartikülleri, polimerleri, polimer filmleri ve hücreler/bakterileri içermektedir. QCM tekniği çok ince yüzey sınır tabakalarının kütlesini belirler ve viskoelastik özellikleri hakkında bilgi verir. QCM tekniği yüzeyde bulunan makromoleküllerle çalışmak için uygun bir tekniktir ve var olan teknikleri tamamlayıcı özelliğe sahiptir. Yüksek duyarlılığı ve eş zamanlı algılama özelliği ile QCM birçok uygulamada kullanılabilirlik açısından cazip duruma gelmiştir [41].

QCM Uygulama Alanları;

Aşağıda QCM'in uygulama alanlarının bazıları gösterilmiştir.

- Biyoteknolojideki uygulamalar [34]
 - ✓ DNA ve RNA'nın tamamlayıcı iplikleri arasındaki etkileşimler
 - ✓ Protein ligandlarının immobilize reseptörler tarafından özgül tanınması ve immunolojik reaksiyonlar
 - ✓ Virüs kapsitlerinin, bakterilerin, memeli hücrelerinin ortaya çıkartılması
 - ✓ Hücrelerin, lipozomların ve proteinlerin adezyonu
 - ✓ Yüzeylerin biyouyumluluğu
 - ✓ Biyofilmlerin oluşturulması
- Fonksiyonel yüzeyler [34]
 - ✓ Seçici yüzeylerin yaratılması
 - ✓ Lipid membranlar
 - ✓ Polimer kılıflar
 - ✓ Reaktif yüzeyler
 - ✓ Gaz sensörleri
 - ✓ İmmunosensörler
- İnce film oluşumu [34]
 - ✓ Langmuir ve Langmuir-Blodgett filmleri
 - ✓ Polielektrolit adsorpsiyonu
 - ✓ Döner kaplama
 - ✓ İki tabaka oluşumu

- Yüzey aktif madde araştırmaları
- ✓ Yüzeylerdeki yüzey aktif madde etkileşimleri
- ✓ Yüzey aktif maddelerin etkinlikleri
- Diğer uygulama alanları [41]
- ✓ Redoks ve iletken polimer araştırmaları
- ✓ Korozyon alışmaları
- ✓ Yüzey oksidasyonu
- ✓ DNA ve RNA hibridizasyon alışmaları
- ✓ Protein-Protein etkileşimleri
- ✓ MEMs nanomateryalleri
- ✓ İlaç Analizleri
- ✓ Akıllı biyomateryaller

QCM uygulamalarına örnekler:

- ✓ Gaz Faz Algılama; Piezoelektrik kristallerle ilk analitik uygulama King (1964) tarafından rapor edilmiştir. King piezoelektrik detektör tasarlamış ve bunu ticari hale getirmiştir. Cihaz 0.1 ppm değerinde nem ölçebilmekte ve ksilen gibi hidrokarbonları 1 ppm'e kadar ölçebilme yeteneğine sahiptir. King'in tasarımından sonraki yıllarda yoğunluklu olarak organik vapore sahip gaz dedektörleri geliştirilmeye çalışılmıştır. İlk faz immünosensörü Guilbault ve Ngeh-Ngwainbi (1988) tarafından geliştirilmiştir. PZ kristal yüzeyine parathion antibadi'leri kaplanmıştır [34].
- ✓ DNA Biyosensörler; DNA'nın immobilize edilerek kullanıldığı ilk biyosensör örneği 1988 yılında geliştirilmiştir. DNA anti kuvars kristallere immobilize edilmiştir ve hibridizasyondan sonra kütle değişimi ölçülmüştür. Bu alışma sonrasında DNA'nın bir biyosensör vasıtası ile algılanması yaklaşımı yaygınlaşmıştır. Bu çalışmanın sonrasındaki 11 yıl boyunca QCM kullanılan DNA, RNA araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Ito ve arkadaşları 1996 yılında QCM'i spesifik katı faz DNA hibridizasyon reaksiyonlarının fizibilite çalışmalarında kullanmışlardır. Benzeri alışmalar günümüze kadar süregelmiştir. Süregelen alışmalar neticesinde DNA biyosensörleri aracılığı

ile DNA molekülleri üzerinde QCM ile çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir [34].

- ✓ İlaç Analizi; QCM 'in 1990 sonrası ilaç ve farmasötik alanda kullanımı literatürlere heyecan verici olarak geçmiştir. Çalışmalar bu yeni alanda QCM üzerine spesifik ajanları kaplayarak farmasötik ajanları belirleyebilmek şeklinde gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde 0.015 mg'dan daha düşük kütlelerin ölçümlerinin gerçekleştirildiği gözlemlenmiştir. Genellikle sulfa etken maddesi (sulfanilamid, sulfasetamid, sulfadiazin ve sulfametokszol), kortizol, atropin, fenitoin, klorfeninamin, vitamin içeren çalışmalar yoğunluktadır [34].
- ✓ İmmünosensörler; QCM uygulamaları için en çok ilgi bu alan üzerinde yoğunlaşmıştır. Kristal üzerinde kaplanan antibadiler ile çok çeşitli biyoseçici sensörler elde edilebilmektedir. Bu antibadi kfpalı kristaller QCM tabanlı immünosensörler olarak adlandırılmaktadır. İlk piezoelektrik immünosensör 1972 yılında Shons ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Kristal nyebare C ve BSA ile kaplanmış ve BSA antibadilerini tayin etmekte kullanılmıştır. Bu sensörlerle ilgili en önemli dezavantajlar; kristal yüzeyine antibadi immobilizasyonunun yeniden üretilebilir bir sistem olmayışı ile ilgili zayıflığı ve sıvı fazda akışla ilgili karşılaşılan sıkıntılardır. İkinci soruna ait sorunlar 'sıvı içine batırma ve kurutma' yöntemi ile uygulama yapılmadan önce örneğin kuru halinin rezonans frekansını ölçme ve işlem sonrasında yine kurularak frekansını ölçme şeklinde aşılabileceği üzerine çalışmalar yapılmıştır [34].

2.3 İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemlerini fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki başlık altında toplayabiliriz. Kimyasal yöntemle immobilizasyon sağlam kovalent bağları içerirken, fiziksel immobilizasyonda daha zayıf bağlarla tutunma söz konusudur.

Günümüzde henüz pek çok biyokatalizör için en uygun immobilizasyon yönteminin tasarımında izlenecek sistematik bir yöntem bulunmamaktadır. Optimizasyon şu an için deneme-yanılma yöntemiyle yürütülmektedir. İmmobilizasyon tekniğinin seçimi amaçlanan sonuç esas alınarak ve biyokatalizörün, reaksiyonun ve

reaktörün tipi göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. İmmobilizasyon yapılırken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta; enzimin katalitik aktivitesinde kayba neden olmayan, doğal yapısını ya da bağlanma bölgelerindeki reaktif grupları değiştirmeyen en uygun yöntemin seçilmesidir. Diğer bir deyişle bağlanması istenen maddeyi mümkün olan en az hasarla bağlamaktır.

2.3.1 Tutuklama

Tutuklama yönteminde immobilize edilmiş partikül ve hücreler yüzeye tutuklanarak, taşıyıcı bir matrikste ya da fiberler içinde tutulmaktadır. Geriye dönüş bu yöntemde mümkün değildir [42]. Tutuklama yönteminin avantajı sadece tekil enzimlerin değil, değişik tipte enzimlerin, organellerin ve hücrelerin hemen hemen aynı prosedürle immobilize edilebilmeleridir. Bu yöntem membran ya da jele doğru kütle transferini sınırladığı için pratik kullanımdan uzaktır [43]. Ayrıca yüksek maliyetler, difüzyon sınırlaması, immobilizasyon esnasında deaktivasyon, yüksek molekül ağırlığındaki substratların enzime zorlukla tutunabilmesi ve taşıyıcıların yeniden elde edilememesi gibi problemler dezavantajları olarak sıralanabilir. Matriks olarak alginat, korregen, kollajen, poliakrilamid, jelatin, silikon kauçuk, poliüretan, polivinil alkol kullanılabilmektedir [42].

2.3.2 Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yöntemi tersinmez, destek yapısı gerektirmeyen bir immobilizasyon yöntemidir. Destek yapı gerektirmeyişi biyokatalizörlerin aktivasyon süresini, spesifik aktivitesini arttırırken aynı zamanda maliyetleri de düşürür. Çapraz bağlanmada iki ana yöntem vardır. Birincisi Çapraz Bağlanma Enzim Agregatları (CLEA), ikincisi ise Çapraz Bağlanma Enzim Kristalleri (CLEC) şeklinde adlandırılmaktadır.

İki yöntemde 1960'lı yıllardan sonra gluteraldehit kullanımı ile geliştirilmiştir. Gluteraldehit protein yüzeydeki NH_2 grupları ile reaksiyona girmektedir. O yıllarda bu yöntemlerin ciddi anlamda dezavantajları bulunmasına rağmen örneğin mekanik dayanım, tekrar üretim zorluğu, düşük aktivasyon enerjisi vb., bu sıkıntılar iyileştirilmiş ve geliştirilmiştir. İlk iyileştirme de gluteraldehitin kristalize enzimlerle

kullanılışı olmuştur. Geliştirilen CLEC yöntemi ile ispat edilmiştir ki sıcaklık ve organik çözücülere karşı denatürasyon direnci ve proteinlerin parçalanma direnci artmıştır.

Ayrıca operasyon esnasındaki stabilite ve kolay geri dönüşün sağlanabilmesi ciddi avantajları beraberinde getirmiştir.

Tek ana dezavantajı yüksek saflıkta enzimlere ve bu enzimlerin kristalize edilmesine ihtiyaç duymasındır. Protein ya da ligandlar, glutaraldehit ile aktive edilmiş taşıyıcıya üçlü bağ oluşturacak şekilde immobilize edilmektedirler [43].

2.3.3 Taşıyıcı bağlama

Taşıyıcı bağlama uygulanan en eski immobilizasyon yöntemidir. Enzim proteinleri kimyasal aktif gruplar içeren aminoasit parçalar, iyonik gruplar ve/veya hidrofobik gruplar ile hidrofobik alanlar içermektedir. Bu gruplar kovalent bağ, iyonik bağ ya da fiziksel adsorpsiyon yöntemleriyle enzimlerin immobilizasyonunu sağlarlar. Taşıyıcıya bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası aktivitesi taşıyıcının doğasına bağlıdır.

Taşıyıcının seçimi enzimin yapısına bağlı olduğu kadar aşağıdaki kriterlere de bağlıdır:

- Partikül boyutu ve taşıyıcının yüzey alanı,
- Hidrofilik ve hidrofobik grupların molar oranı,
- Kimyasal yapı.

Genel olarak hidrofilik grupların oranındaki ve bağlanan enzimin konsantrasyonundaki artış immobilize olan enzimin aktivitesinin daha yüksek olmasını sağlar. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılar; selüloz, dekstran, agaroz, ve poliakrilamid jel gibi polisakkarit türevleridir. Bağlanma türüne göre taşıyıcı bağlama yöntemi alt sınıflara ayrılabilir [14; 42].

Taşıyıcı bağlama yöntemleri aşağıda gösterildiği gibi sınıflandırılmıştır:

- ❖ İyonik Bağlama; Bu yöntemde enzim ve destek malzeme arasındaki bağlar tuz yapısındadır. Bu bağlanmada doğası gereğince sıcaklık değişimleri, polarite ve iyonik güçlerle reaksiyon geriye dönebilir. Kromatografide kullanılan protein - ligand etkileşimine benzer özelliklerdedir.
Bu yöntem uygulanmasının kolay olması, desteklerin yenilenebilir olması ve enzimlerin modifiye olmaması nedenleri ile tercih edilen bir yöntemdir. Enzimin taşıyıcıya bağlanması, kullanılan tampon, pH, iyonik kuvvetler ve sıcaklık gibi değişkenlerden etkilenmektedir [14].
- ❖ Fiziksel Adsorpsiyon; En basit immobilizasyon yöntemi nonspesifik olan fiziksel adsorpsiyondur.
Enzimler matrikse van der Waals kuvvetleri ile hidrojen bağları ile veya hidrofobik etkileşimle bağlanırlar. Kolay bir şekilde tersine dönebilir bağlantılardır. Örneğin sıcaklık ya da çevresel koşullarda meydana getirilen bir değişiklik bağlantının gerçekleşmemesine sebep olabilir [37]. Fiziksel adsorpsiyon gerçekleştirmek için çeşitli inorganik destekler kullanılır. Sentetik reçineler ya da kitosan gibi doğal malzemeler de yüksek adsorpsiyon kapasiteleri nedeniyle kullanılabilirler. Adsorpsiyonun ardından glutaraldehitte çapraz bağlama immobilize enzimin aktivitesini stabilize eder.
Uygun koşullarda destekler yeniden elde edilebilir. Yüksek aktivasyonun gerekmeysi, ucuz malzemelerle bağlantıların kurulabilmesi yöntemi çekici hale getirmektedir [14].
- ❖ Kovalent Bağlama; Immobilizasyon için en alışlagelmiş yöntemdir. Enzimler ve malzemeler arasında doğrudan kovalent bağlanmalar gerçekleşir. Kovalent bağlar güçlü ve kararlıdır. Immobilize edilecek enzimin, aktif bölgesinde ya da substratla bağlanma bölgesinde bulunmayan fonksiyonel gruplarla gerçekleştirilebilirler.
Genellikle bağlanma enzimin nükleofilik gruplarının, destek malzemesinin fonksiyonel grubuyla reaksiyonu sonucu meydana gelir. Enzim üzerindeki aminohidroksil ve tiyol grupları bağlanmada rol alabilirler. Sistein, lisin, tirozin ve histidin artıkları en aktif yapılar olarak değerlendirilebilir. Bu tür

moleküller arası bağlar enzimin kullanım süresinin genişlemesini sağlayabilirler.

Kovalent bağla immobilize edilen enzimler şu avantajlara sahiptir:

- I. Oluşan sıkı bağ sonucu, kullanım aşamasında sızıntı ya da parçalanmayla karşılaşmaz,
- II. İmmobilize edilmiş enzim substratla çok kolay bağlantı kurabilir, çünkü enzim desteğin yüzeyinde tutturulmuştur,
- III. Enzim molekülleriyle destek madde arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle çoğunlukla ısı kararlılığında bir yükseliş görülebilir.

Diğer yandan kovalent bağın dezavantajları da vardır. Bunlar ise;

- I. Enzim moleküllerinin aktif yapısı kısmi modifikasyonlarla bozulabilir,
- II. Enzim molekülleriyle destek arasındaki kuvvetli etkileşimler, enzim moleküllerinin serbest hareketini engelleyebilir ve bu da enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açar,
- III. İmmobilizasyonun optimum koşullarını bulmak zordur,
- IV. Destekler genellikle yenilenebilir değildir. Bu nedenle bu yöntem daha çok kararlılığın kovalent bağlanma yöntemiyle arttığından emin olunan enzimler için uygundur.

Tüm bu dezavantajlarına rağmen, kovalent bağlanma analitik amaçlı immobilizasyonlarda kullanılır [14].

Yukarıda bahsedilen tüm immobilizasyon yöntemlerini bir arada değerlendirmek gerekirse; adsorpsiyon kolay, ucuz ve efektif ancak çoğunlukla kararlı değildir ve geriye dönüşüm gözlenir. Tutuklama yönteminde ise difüzyon problemleri gözlenir. Enzimin kovalent bağlanma ile bir taşıyıcıya bağlanması endüstriyel açıdan en cazip yöntem olarak öne çıkmaktadır. Çünkü kovalent bağlanma özellikle çapraz bağlanma ile birlikte uygulandığında efektif ve kararlıdır. Çapraz bağlama ajanı olarak da en iyi sonuçlar glutaraldehit ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir [43].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez için gerçekleştirilen deneyler Başkent Üniversitesi Kardiyovasküler Enstrümantasyon Laboratuvarında çeşitli cihaz ve sarf malzemeler kullanılarak yapılmıştır. SEM ve AFM görüntüleri UNAM'daki laboratuvarlar kullanılarak alınmıştır.

3.1.1 Deneyde kullanılan cihaz ve malzemeler

Ölçümler ve deney sırasında kullanılan başlıca cihaz ve malzemeler şunlardır;

- 10 Mhz'lik, 12 Mhz'lik, 5 Mhz'lik farklı marka kuvars kristaller,
- IKA marka manyetik karıştırıcı,
- Sartorius marka terazi,
- Bandelin marka ultrasonik banyo,
- Kristal üzerindeki metal kılıfları kesmek için Dremel marka Lithium Ion kesici,
- Nüve marka laminar hava kabini,
- Manyetik karıştırıcı için manyetik balık,
- Beher, balon, çeşitli türlerde tüpler,
- Merck marka Millipore model ultrasonik saf su cihazı,
- Frekansmetre ve osilatör devresi.

3.1.2 Deneyde kullanılan kimyasallar

Ölçümler ve deney sırasında kullanılan başlıca kimyasallar şunlardır;

- NaOH (Merck, Almanya),
- Saf aseton (Merck, Almanya),
- Metanol (Merck, Almanya),
- Sistamin (Sigma Aldrich, ABD),

- Glutaraldehit (Fluka, ABD),
- Fosfat tamponu için NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 tuzları (Sigma Aldrich, ABD),
- Fosfat tamponu tuzu (Amresco, Kanada),
- Ultra saf su,
- Sodyum tetraborat/HCl tamponu kullanılmıştır.

➤ 0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH:7,4) :

Fosfat Tamponu aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır;

A: 3,628 g KH_2PO_4 (potasyum hidrojen fosfat) + 400 mL ultra saf su

B: 9,488 g Na_2HPO_4 (disodyum hidrojen fosfat) + 800 mL ultra saf su

A ve B çözeltileri 30 dakika manyetik karıştırıcı karıştırılmıştır. Sonrasında A'dan 20 mL, B'den 80 mL alınmış ve 100 mL'lik 0,05 M fosfat tamponu hazırlanmıştır [44].

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında ultra saf su kullanılmıştır. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra cam şişelerde, buzdolabında yaklaşık 5°C sıcaklıkta saklanmaktadır.

➤ %2,5 derişim değerinde Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanışı:

%2,5 derişim değerinde gluteraldehit çözeltisi aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır;

A: 3,628 g KH_2PO_4 (potasyum hidrojen fosfat) + 400 mL ultra saf su

B: 9,488 g Na_2HPO_4 (disodyum hidrojen fosfat) + 800 mL ultra saf su

A çözeltisinde 92 mL ve B çözeltisinde 8 mL alınarak, %25 oranında seyreltilmiş saf gluteraldehit ile karıştırılmıştır. Son karışım 45 dakika manyetik karıştırıcıda tepkimeye sokulmuş ve %2,5 derişim değerinde gluteraldehit çözeltisi hazırlanmıştır.

Ayrıca aynı formülüzasyon uygulanarak %5 derişim değerinde de çözelti hazırlanmıştır. Her iki derişim içinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

➤ 0,5 M metanol çözeltisinin hazırlanışı:

Metanol 0,5 M olarak hazırlanmıştır. 16,02 g metanol 1 L ultra saf su ile 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

➤ 0,5 M aseton çözeltisinin hazırlanışı:

Aseton 0,5 M olarak hazırlanmıştır. 29,035 g aseton 1 L ultra saf su ile 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

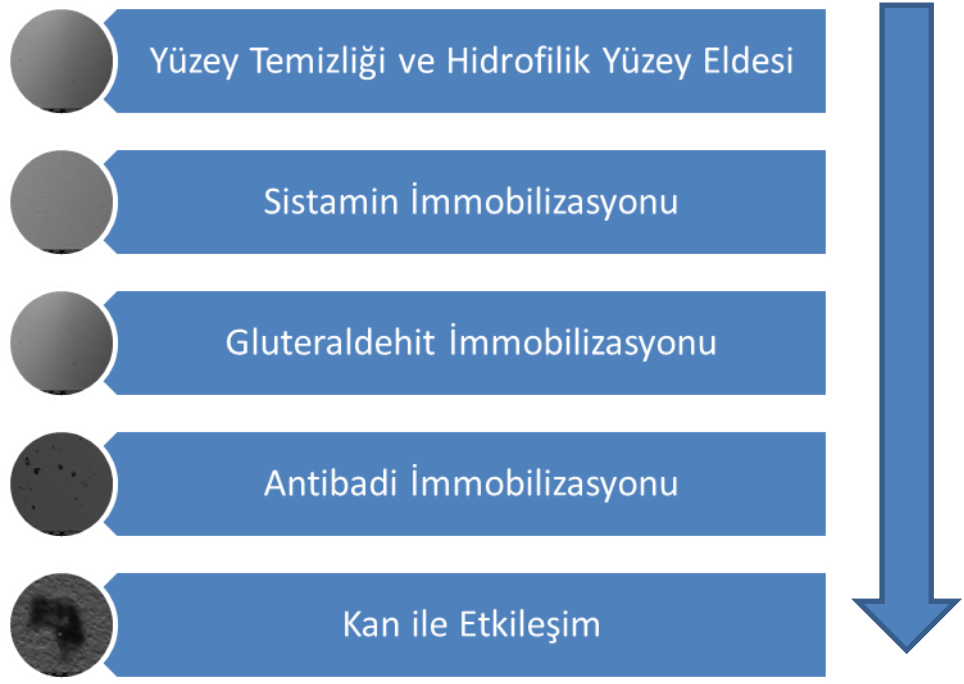
➤ 0,5 M NaOH özeltisinin hazırlanışı:

NaOH 0,5 M olarak hazırlanmıştır. 20 g NaOH 1 L ultra saf su ile 20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.2 Deneyin Yapılışı

Bu tezde kristalin yüzeyine yapılan ligand immobilazasyonu ile platelet aktivasyonun varlığı tespit edilmek istenmektedir. Kuvars kristalin üzerine madde eklendikçe frekansı düşmekte ve aktivasyonun gerçekleştiği bu yolla tespit edilmektedir.

Deneyde yapılacak işlemler sırası ile yüzey temizliği ve hidrofilik yüzey eldesi, sistamin, glutraldehit ve antibadi immobilizasyonu ve kan çözeltisi ile etkileşim şeklinindedir. Frekans ölçümleri, SEM, AFM sonuçları ile deney basamakları takip edilerek deneyin ilerleyişi kontrol altında tutulmuştur.



Şekil 3.1 Deney basamaklarının şematik gösterimi

3.2.1 Kuvars kristal yüzeyin temizlenmesi ve hidrofilik yüzey eldesi

Kuvars kristaller üzerinde herhangi bir işlem yapabilmek veya bir immobilizasyon işlemine tabii tutabilmek için öncelikle bu kristallerin ve kristallerin elektrotlarının üzerinde temizleme, aktivasyon ve fonksiyonel grupların immobilizasyonu gerçekleştirilmelidir.

Yüzey üzerindeki oksitleri uzaklaştırıp, yeniden kullanılabilir bir yüzey elde edilmesi için gümüş elektrotların yüzeylerinin tamamen temizlenmesi ve yüzeyin tamamen kurutulmuş olması gerekmektedir [45].

Deney başlangıcında yapılan ilk işlem kristallerin frekanslarının metal kılıflarıyla beraber ölçülmesidir. Bu ölçüm kristalin kullanılabilir yüzeyi ortaya çıkarıldığında ölçülen frekans değeri ile karşılaştırma yapabilmek içindir. Ölçüm sonrasında kristal üzerindeki metal kılıf kesilerek çıkartılmış ve yeniden kristalin frekansı ölçülmüştür.

Kristaller medikal kullanım amacı ile üretilmedikleri için temiz bir yüzeyleri yoktur. Üretim esnasında etraftan gelmiş ve yapışmış olarak bulunan tozlar, kılıf kesilirken

kristalin üzerine gelen metal parçacıkları gibi birçok dış etken sebebiyle kristalin yüzeyinin temizlenmesi deneyin sağlıklı devam edebilmesi için gereklidir. Kristal üzerindeki bizim istemediğimiz her yabancı madde frekansında farklılık yaratmaya sebep olacağı için yüzeyin temizlenmesi çok önemlidir.

Kristallerin yüzey temizleme işlemi sırasında izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- I. 0,5 M Aseton çözeltisi (30 dakika)
- II. 0,5 M Metanol çözeltisi (30 dakika)
- III. 0,5 M NaOH çözeltisi (30 dakika)

Aseton çok iyi bir çözücü olduğu için ilk basamakta tercih edilmiştir [46]. İkinci aşama olarak ise asetondan daha zayıf bir etkiye sahip olan metanol kullanılmıştır. Aseton ile uzun muamele kristal yüzeyine zarar vereceği için metanol kullanılmış ve temizleme işlemi tamamlanmıştır. Kristaller hidrofilik yüzey elde etmek için 30 dakika 0,5 M NaOH'de tutulmuştur [45].

Aseton, metanol, NaOH çözeltileri ile 30'ar dakika manyetik karıştırıcı kullanılarak reaksiyona sokulan kristaller, her aşama sonrasında 3'er dakika ultra saf su ile yıkanmıştır. Böylece fiziksel olarak tutunan moleküllerin kristal yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır [47]. Fiziksel olarak adsorbe olan moleküllerin kristal yüzeyinden elimine edilmesi sonrasında, kristaller laminar hava kabini içinde yaklaşık 30 dakika bekletilerek kurutulmuştur. Kristallerin tam kuruması sağlandıktan sonra frekans sayıcı devre ile frekans değerleri ölçülmüştür.

Ultra saf su kullanılması ürünün kalitesi açısından gereklidir. Ham suyla yıkanan ürünlerin yüzeylerinde yıkama sonrası bir miktar su kalır. Bu suların zamanla buharlaşması sonucunda ham suyun içerisinde bulunan tuzlar ürünün yüzeyine yapışırlar. Ürün üzerinde oluşan bu tuz lekeleri kristal üzerinde olumsuz bir etki yapar. Kristal yüzeyinde kalan tuz lekeleri frekans değerinde de yanlış okumalara sebep olabilmektedir.

Kuvars kristallerin frekans değişimleri işlemler sırasında her aşamada ölçülerek yapılan yüzey temizleme yöntemi takip edilmiştir. Temizlik aşamasında her adımda frekans değerinin artması beklenmektedir. Çünkü kristal yüzeyinde var olan istenmeyen maddelerin ve fiziksel tutunmaların yapılan işlemler sonrası uzaklaşması gerekmektedir. Eğer bu uzaklaşma sağlanamıyorsa kristal yüzeyinde yeterince temizlik sağlanamamış demektir.

Yapılan bu işlemler neticesinde hem kristallerin yüzeyleri temizlenmiş hem de NaOH ile kristallerde bulunan Ag elektrotlar üzerinde aktif OH fonksiyonel gruplarının oluşumu sağlanmıştır.

3.2.2 Sistamin immobilizasyonu

Kuvars kristallerin yüzey temizleme aşamasından sonra kristal yüzeylerine bifonksiyonel bir molekül olan sistamin (C_2H_7NS) immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sistamin molekülü bir tiyol (SH) ve bir de amin (NH_2) olmak üzere iki fonksiyonel uca sahiptir. Yumuşak bir baz olan sistamin molekülünün bu özelliğinden yararlanılarak tiyol ucundan zayıf bir asit olan Ag kristal yüzeyine tutturulmuş ve diğer amin ucu fonksiyonel olarak başka bağ için hazır tutulmuştur [48].



Şekil 3.2 Sistaminin molekülünün kimyasal formülü [48]

Bu amaçla 20 derişimde sistamin, 0,05 M fosfat tamponunda (pH: 7,0) çözülmüştür. Bu reaksiyon 45 dakika manyetik karıştırıcıda, hazırlanan karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir [49].

Kristaller ile ise yine 45 dakika manyetik karıştırıcıda ve karanlık ortamda karıştırılmıştır [44]. Süre sonunda kristaller ultra saf suyla 3 dakika yıkanmış ve yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür. Ultra saf su ile

yıkama işleminde yüzeye fiziksel adsorbsiyon ile tutunan sistamin molekülleri de uzaklaştırılmıştır [50].



Şekil 3.3 Manyetik karıştırıcıda karanlık ortamda sistamin immobilizasyonu

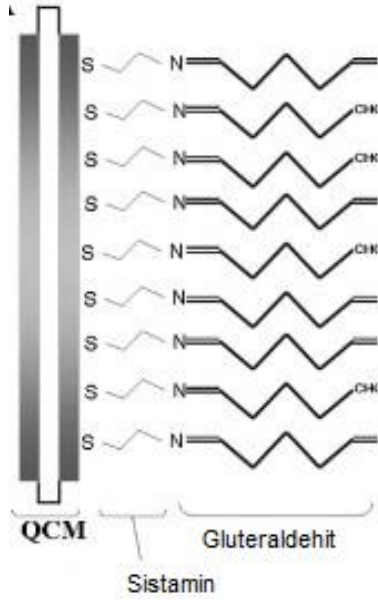
3.2.3 Glutaraldehit immobilizasyonu

Sistamin immobilize edilmiş kuvars kristallerin üzerine uzatma kolu (spacer arm) takılması amacıyla bifonksiyonel özelliğe sahip glutaraldehit kullanılmıştır. Burada amaç sistaminin serbest olan amin ucu ile glutaraldehidin aldehit uçlarının reaksiyona girmesi ile çapraz bağlanmanın sağlanmasıdır [51].

Sistamin immobilize edilmiş kristaller %5 ve %2,5 derişimdeki glutaraldehit ile karanlık ortamda 45 dakika, ısı da kullanılarak manyetik karıştırıcıda reaksiyona sokulmuştur [52]. Sonrasında 3 dakika ultra saf su ile yıkanmıştır. İşlem bittikten sonra kurutulup frekans değeri ölçülmüştür [49].

Deneyde %2,5 ve %5 derişimde iki farklı çözelti hazırlanmıştır. Fakat gluteraldehit ile reaksiyon sonrası ölçülen frekans değerlerinde, %2,5'lik derişimle yapılan deneylerde beklenen tutunmaların gerçekleşmediği sonucuna frekans ölçümleri sonrasında varılmıştır. Aynı derişimlerdeki çözeltilerle, aynı frekansa sahip kristallerle ve aynı işlem sırasına göre gluteraldehit basamağına kadar olan adımlar tekrar gerçekleştirilmiştir. Fakat %2,5'lik derişim yerine %5'lik derişim ile hazırlanan gluteraldehit çözeltilisinde daha iyi sonuç elde edilmiştir ve bu yüzden deneyin sonraki aşamaları için %5 derişime sahip gluteraldehit çözeltisi tercih

edilmiştir. %5 derişime sahip gluteraldehit çözeltisi sonrasında ölçülen frekans değerleri %2,5 derişime sahip gluteraldehit derişimi ile yapılan deneylere göre daha düşüktür. Bu da bize daha iyi tutunmaların gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.4 QCM'in sistamin ve gluteraldehit ile reaksiyonunu sonrasında oluşan kimyasal bağlar [53]

3.2.4 Antibadi immobilizasyonu

Plateletlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri sebebi ile hazırlanması ve saklanması esnasında etkilendiği çeşitli faktörler bulunmaktadır. Toplanma şekilleri, kan alma yöntemleri, donörün bağımsız etkileri gibi bir çok neden plateletin sahip olduğu özellikleri de spesifikleştirmektedir. Plateletlerin sahip olduğu bu metabolik ve morfolojik çeşitlilikler onların saklanmasını ve deneysel ortamda kullanılabilmesini kısıtlamaktadır. Bu konu üzerinde azımsanmayacak derecede çok bilimsel efor sarfedilmesine rağmen henüz tam anlamıyla zarar görmeden nasıl muhafaza edileceğine dair tam bir reçete bulunmamaktadır. Fakat çelişkili bir şekilde ise plateletlerin çekirdeği olmadığı için saklama esnasında hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu işlem yüksek duyarlılığa sahip plateletler için hassas bir çalışma yapılması gerektiği sonucunu çıkarmamızı sağlamaktadır. Plateletler diskoid ve küresel şekiller arasında yüzey görünüm şeklini değiştirebilmektedir [54].

Saklama işleminin bu kadar önemli ve zor olması sebebi ile özel membranlar geliştirilmiştir. Geliştirilen bu membranların en iyi örneklerinden biri P-selektin molekülü adıyla da bilenen CD62P'dir. P selektin molekülü dinlenme halindeki plateletlerin α -granüllerinde bulunmaktadır. Uyarılma sonrasında bu molekülün yer değiştirmesi platelet aktivasyonu sırasında çok erken aşamada ortaya çıkmaktadır [54].

Sahip olduğu bu özellikler sebebi ile kristal yüzeyine immobilize edilmek için kullanılan antibadi anti-CD62P'dir. Anti-CD62P insan kanı ile reaktiftir. Akış sitometri yönteminde rutin testlerde kullanılmakta ve oldukça iyi sonuçların elde edildiği gözlemlenmektedir.

Kristal yüzeyine immobilize edilen anti-CD62P üç farklı derişim halinde hazırlanmış ve uygulanmıştır. İlk derişim en yoğun olan konsantrasyondur ve 1/10 derişiminde antibadi kullanılmıştır. İkinci ve üçüncü derişim pH=7,0 0,05 M fosfat tamponu ile 1/100 ve 1/1000 olarak seyreltilmiştir.

Bu farklı derişimlerden kristalin her iki yüzeyine 30'ar μ L damlatılmıştır. 30 dakika immobilizasyon işlemi için bekletilmiş ve sonrasında ultra saf su ile ultrasonik banyoda 3 dakika fiziksel adsorbsiyonları gidermek için yıkama yapılmıştır [50].

İmmobilizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için kristallerin tamamen kuruması sağlandıktan sonra frekans ölçümü yapılmıştır.

3.2.5 Kan ile yapılan deneyler

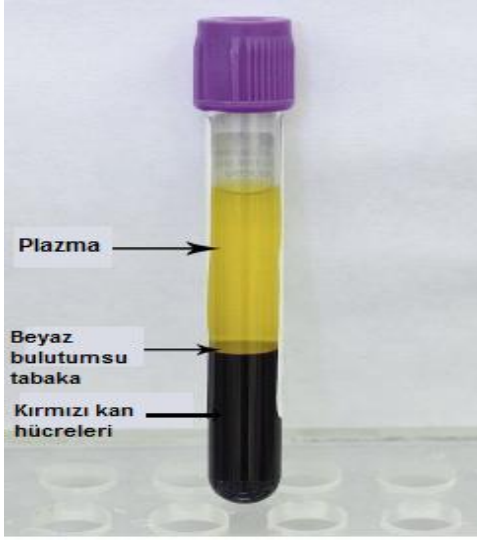
Deneyin son aşaması olan platelet aktivasyonunun varlığının belirlenmesi kan ile yapılmıştır. İnsandan alınan kan ile platelet aktivasyonunun varlığının belirleneceği için bazı parametreleri dikkat edilmesi önemlidir. Örneğin plateletlerin yapısının bozulmaması için kısa sürede işlemlerin gerçekleştirilmesi, çevre sıcaklık koşullarının çok yüksek olmaması, nemden uzak çalışma alanının sağlanması gibi gibi bir çok çevresel faktöre dikkat edilmesi gerekmektedir [55].

Enjektöre kan alınmadan önce enjektör, platelet aktivasyonunun gerçekleşmesinin önlenmesi için 5 birim heparin ile yıkanmıştır [51]. Enjektör hazırlandıktan sonra sağlıklı venöz damardan 10 cm³'lük perfüzyon enjektöre alınan kan plateletçe zengin tabakanın elde edilmesi için santrifüj edilmiştir [56].

Platelet aktivasyonu baskılanmış olan 10 cm³ kan 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine koyulmuştur. 3000 rpm'de 15 °C sıcaklıkta derecede 25 dakika kan santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerde beyaz bulutumsu tabakalar oluşmuştur. Aktivasyonu baskılanmış plateletler bu beyaz bulutumsu tabakada bulunmaktadır [57].



Şekil 3.5 Santrifüj sonrasında kandan elde edilen beyaz bulutumsu tabaka

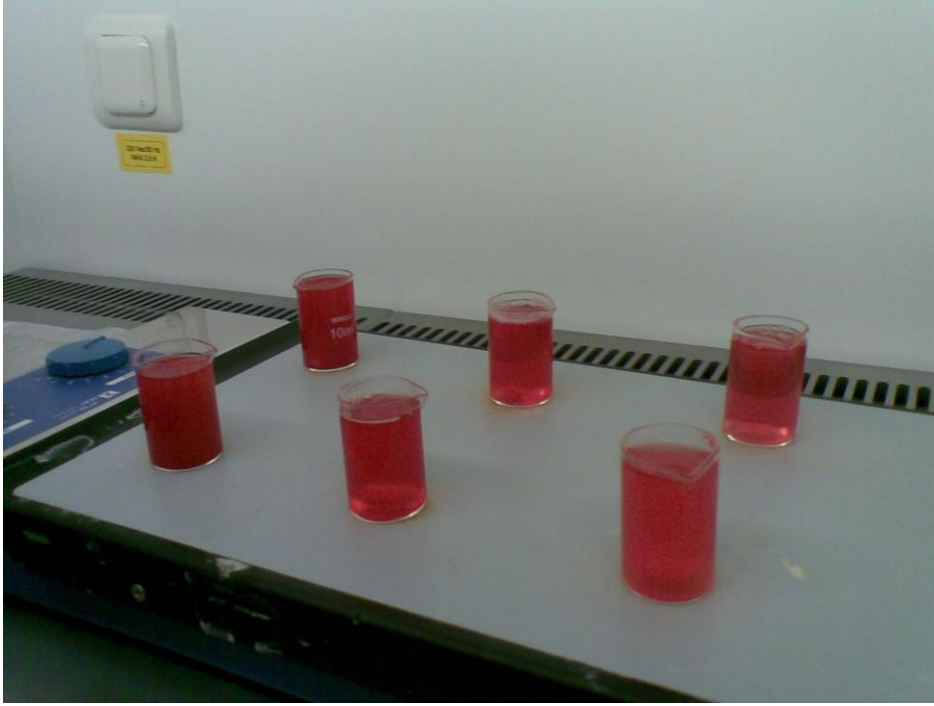


Şekil 3.6 Kandan santrifüj sonrasında elde edilen tabakalar [58]

Deneyde %100, %90, %80, %70, %60 %50, %40, %30, %20, %10,'luk derişimlerde on farklı kan süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardaki derişimler 0,05 M fosfat tamponu ile seyreltilmiştir ve 10 derişim için de platelet sayısı ölçümü Düzen Labaratuvarında yaptırılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre seyreltme oranı ile platelet sayısı paralel olarak azalmıştır.

En yoğun derişim için, plateletler bu tabakadan pipet uçları ile alınmış ve üzerine pH=7,0 0,05 M fosfat tamponu eklenerek 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu aşamada baskılanan platelet aktivasyonun tekrar gerçekleşmesi için 5 birim protamin plateletin bulunduğu süspansiyona ilave edilmiştir. %90, %80, %70, %60 %50, %40, %30, %20 ve %10'luk derişimler ise mevcut süspansiyonu seyrelterek elde edilmiştir [59; 60].

Son aşama olarak farklı derişimlerde antibadi immobilize edilmiş kristal yüzeyleri ile farklı derişimlerde hazırlanmış aktiflenmiş plateletlere sahip süspansiyonlar uygulanmıştır. Kristaller, 30 dakika manyetik karıştırıcı ile süspansiyonda reaksiyona sokulmuştur. Sonrasında fiziksel tutunmaların uzaklaşmasını sağlamak için 3 dakika ultrasonik banyo ile yıkanmıştır [49]. Kurutulduktan sonra frekansları ölçülmüş ve frekanslardaki düşüşlerin derişimle orantılı olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.7. Farklı derişimlerdeki kan süspansiyonu

4. ÖLÇÜMLER

4.1 Frekans Ölçümleri

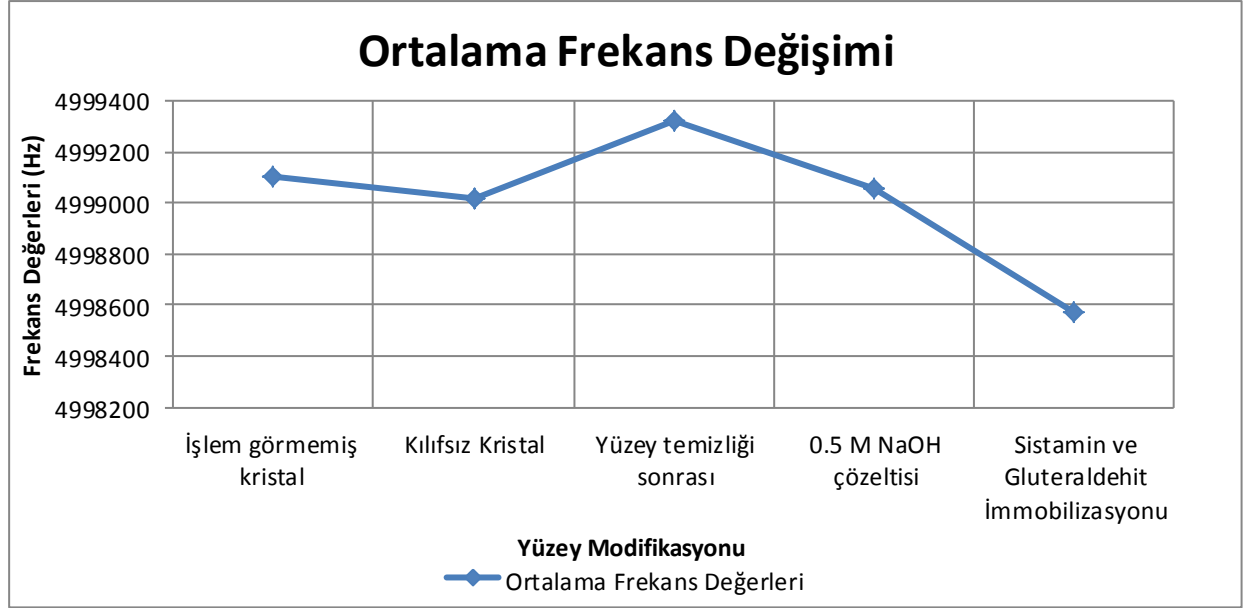
Çalışılan 100 adet kristalde oluşması beklenen frekans farklılığı deneyin basamakları arasındaki her aşamada ölçülmüştür. Teorik olarak kristal üzerindeki kütleleri temizledikçe frekansın artması gerekmektedir. Tam tersi olarak ise üzerine kütle ilave edildiğinde (sistamin, gluteraldehit vb.) frekansın düşmesi gerekmektedir. Ölçülen frekans değerleri Şekil 4.1’de frekans değişimi ise Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Kristal üzerindeki metal kılıflar çıkarıldığında, metal kılıflı haline kıyasla frekansta düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüşün sebebi kristal üzerinde biriken metal tozlar ve ortamdan gelen diğer toz partiküllerdir.

Temizleme sonrasında ise kristalin üzerinde bulunan partiküller kristal yüzeyinden uzaklaştırıldığı için frekansta artış olmuştur. Frekans değeri temizlemenin her aşamasında artmıştır. Çünkü her aşamada yüzey biraz daha temizlenmiştir. NaOH çözeltisi ile tepkimeye girdikten sonra ise frekansın düştüğü gözlemlenmiştir.

Bunun sebebi ise elde edilen hidrofilik yüzeydir. Yüzeyde oluşması beklenen serbest OH grupları frekans değişiminin gerçekleşmesine sebep olmuştur.

Sistamin ve gluteraldehit immobilizasyon işlemi de beklenen frekansta düşüşün olmasıdır. Sistamin ve gluteraldehit ile yüzeyde bağlanmalar gerçekleşmiştir ve frekans düşüşüne sebep olan bir kütle oluşması sağlanmıştır.



Şekil 4.1 Yüzey modifikasyonu sonrası ölçülmüş frekans değerleri grafiği

Çizelge 4.1 Yüzey modifikasyonu sonrası frekans değişimi çizelgesi

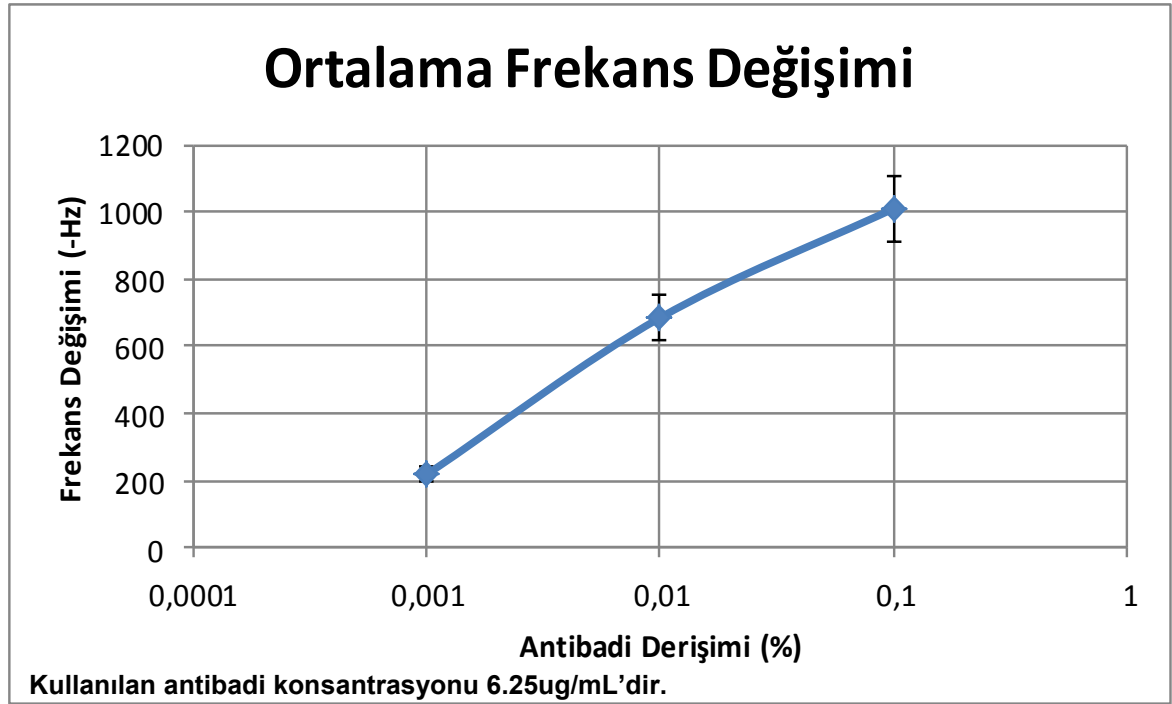
	Kılıf Çıkarma	Yüzey Temizliği	0.5 M NaOH Çözelti Uygulaması	Sistamin ve Gluteraldehit Immobilizasyonu
Ortalama Frekans Değişimi (Hz)	-88	308	-270	-479

Aynı kan süspansiyonu ile üç farklı derişimdeki antibadi kullanılarak hazırlanmış 5 MHz'lik kristaller 30 dakika manyetik karıştırıcıda tepkimeye sokulmuş ve sonrasında ultrasonik banyoda 3 dakika yıkama işlemi yapılmıştır. 6,25 ug/mL konsantrasyonuna sahip BD marka antibadi kullanılarak seyreltme oranları 1/10, 1/100, 1/1000 olan 3 farklı derişimde çözelti hazırlanmıştır. En yoğun antibadi derişiminde ortalama 1009 Hz'lik frekans düşüşü olduğu görülmüştür. Frekans

düşüşlerin 2. derişimdeki delta değerlerinin ortlaması 684 Hz ve 3. derişimdeki delta ortalaması 217 Hz'dir. Doğrusal ortalama frekans değerleri ile karşılaştırıldığına frekans düşüşünün üç derişimde de doğru orantılı olduğu görülmüştür. Kristal yüzeyine tutunmalar üç derişimde de ideal seviyededir. Sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 %100 kan derişimi ve farklı antibadi derişimleri ile frekans değişim çizelgesi

Antibadi Derişimi	Platelet Sayısı (K/mm ³)	Ortalama Frekans Değişimi (Hz)	Ortalama Frekans
0,1	250	-1009	4997283
0,01	250	-684	4997832
0,001	250	-217	4951530



Şekil 4.2 %100 kan derişimi ve farklı antibadi derişimleri ile frekans değişim grafiği

Kan süspansiyonu on farklı derişim halinde hazırlanmıştır. Farklı derişim değerleri ile yapılan çalışmalarda ideal tutunmaların gerçekleştiği yoğunluk tespit edilmeye çalışılmıştır ve doğrusal çalışma aralığı tespit edilmiştir. Antibadi derişimleri ile kristaller üzerinde yapılan çalışmalarda ideal derişim seviyesi tespit edildiği için

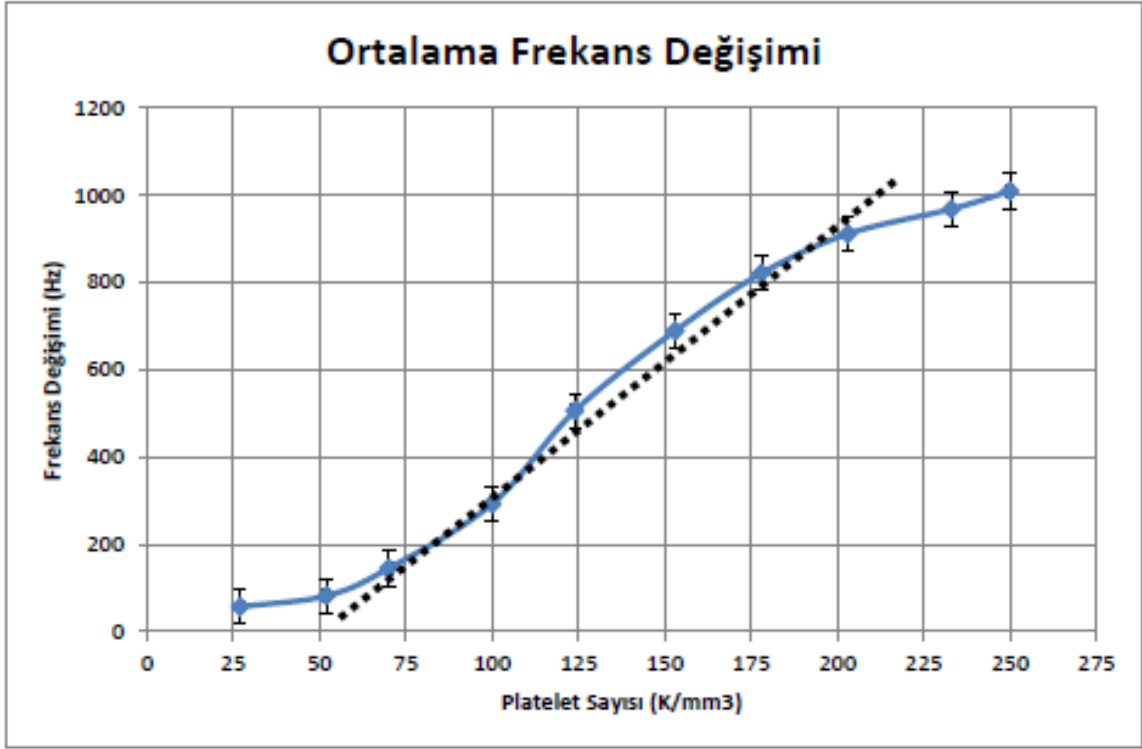
%100 derişimdeki antibadi konsantrasyonu ile farklı oranlarda seyreltilmiş kan süspansiyonlarının tepkimeye girmesi sağlanmıştır.

Elde edilen değerler doğrusal grafik ile karşılaştırıldığında ve sonuçlar analiz edildiğinde %30-%80 kan derişimlerinin doygunluğa ulaşılan ideal derişim olduğu, %30'luk kan derişimden daha seyreltik derişimler için ise beklenen seviyede düşüşün gerçekleşmediği dolayısı ile ideal bağlanma derişiminden uzaklaşıldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Kan derişimlerinde ölçülen platelet sayısı ve ortalama frekans değişimi çizelgesi

Kan Derişimi	Platelet Sayısı (K/mm ³)	Ortalama Frekans Değişimi (Hz)
100%	250	1009
90%	233	968
80%	203	911
70%	178	821
60%	153	689
50%	124	506
40%	100	293
30%	70	145
20%	52	82
10%	27	57

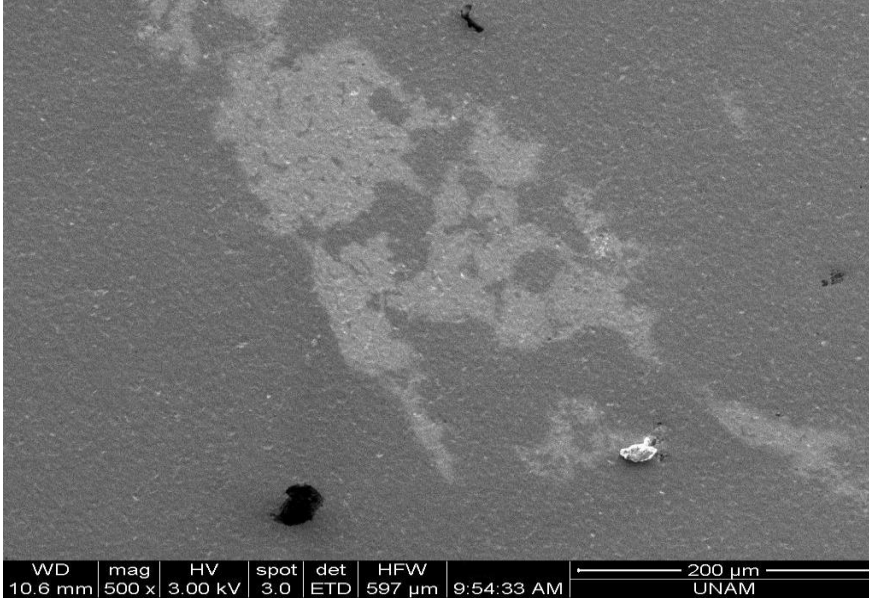
*Referans Aralığı: 130-400 K/mm³



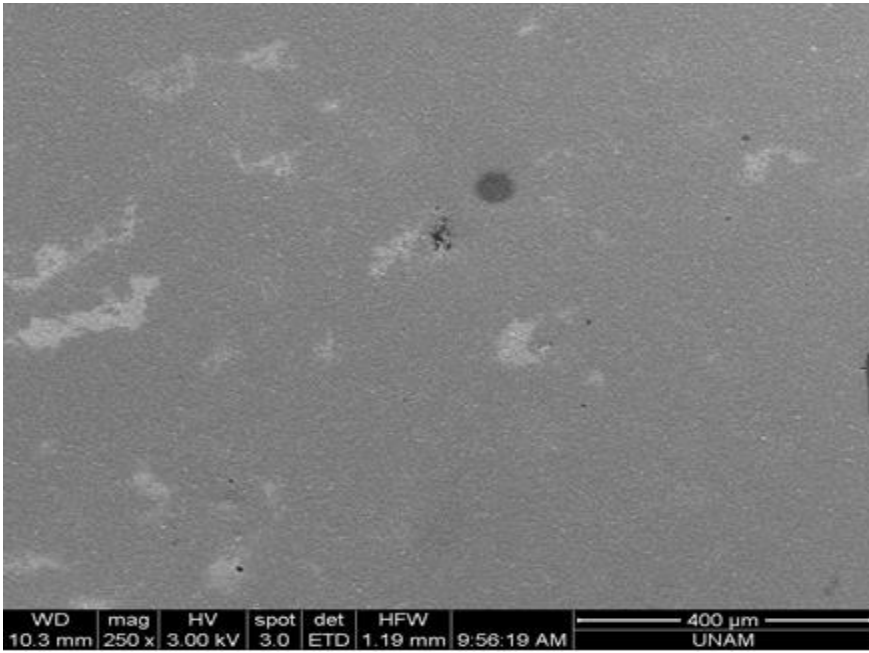
Şekil 4.3 Aynı derişimdeki antibadi (%100) ve 10 farklı kan süspansiyonları uygulanmış kristallerin frekans değerleri grafiği

4.2 SEM Görüntüleri

Metal kılıf çıkarıldıktan sonra ortamdaki partiküller, metal parçaları kristal yüzeyine yapışacağı için görüntülerde kirli bir yüzey beklenmektedir. Ayrıca daha çok elektronik amaçla üretilen kristallerde bulutumsu lekelerde net bir şekilde görülmektedir. İşlemlerin sağlıklı devam edebilmesi için bu kirli yüzeyden kurtulmak gerekmektedir. SEM görüntüleri ile tanımlanamayan metal parçalar ya da partiküller ile bulutumsu lekeler kümeler halinde görülebilmişlerdir.

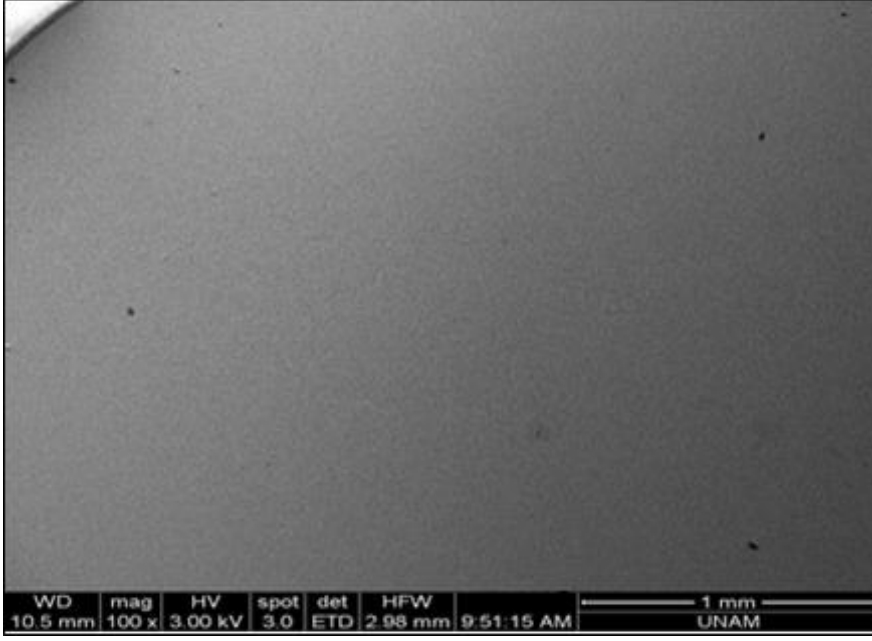


Şekil 4.4 500x büyütmede SEM kirli yüzey görüntüsü

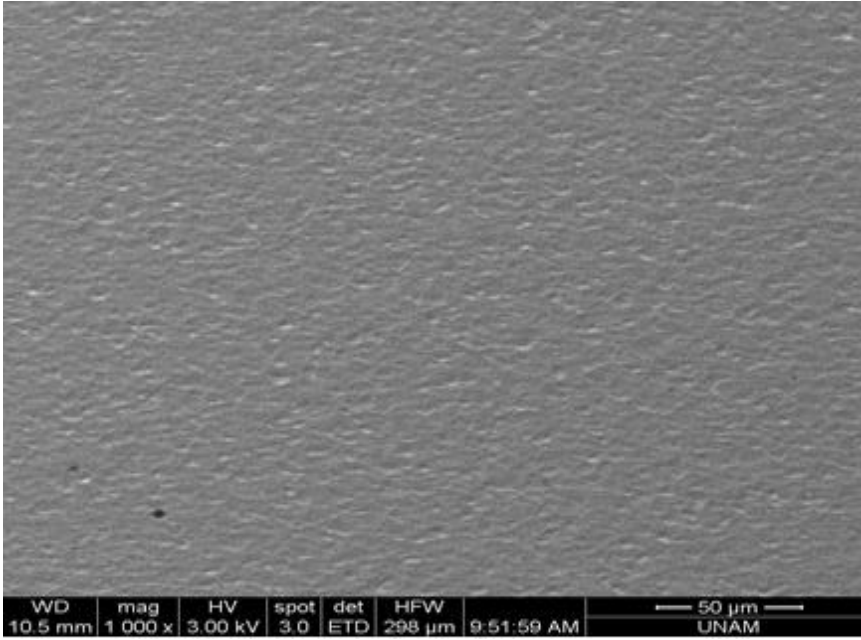


Şekil 4.5 250x büyütmede SEM kirli yüzey görüntüsü

Temizleme ve hidrofilik yüzey elde işlemi sonrasında alınan görüntülerde hemen hemen pürüzsüz bir yüzeyin varlığı görülebilmektedir. Bulutumsu lekeler yıkama işlemi sonrasında yüzeyden uzaklaştırılmışlardır.

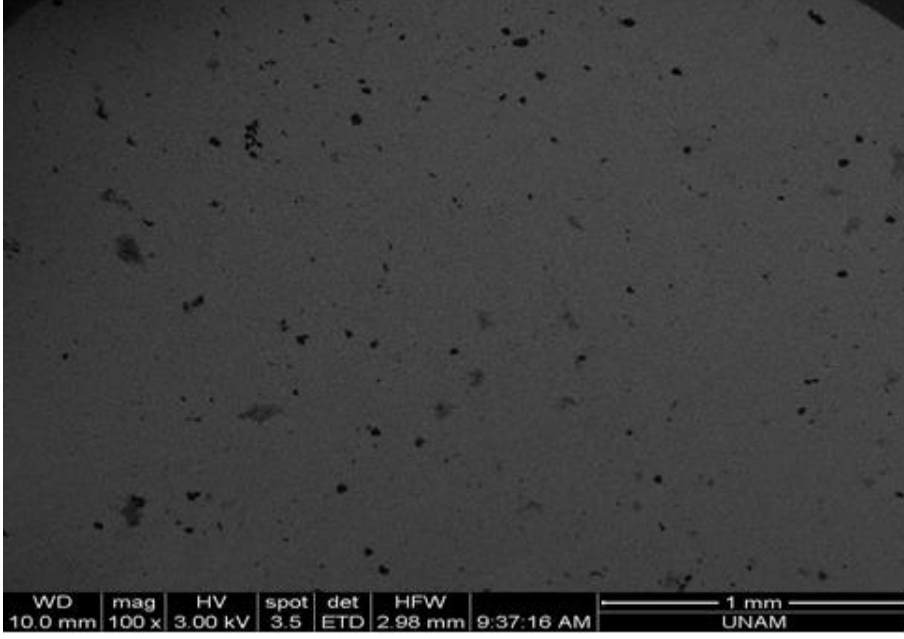


Şekil 4.6 100x büyütmede SEM temiz yüzey görüntüsü

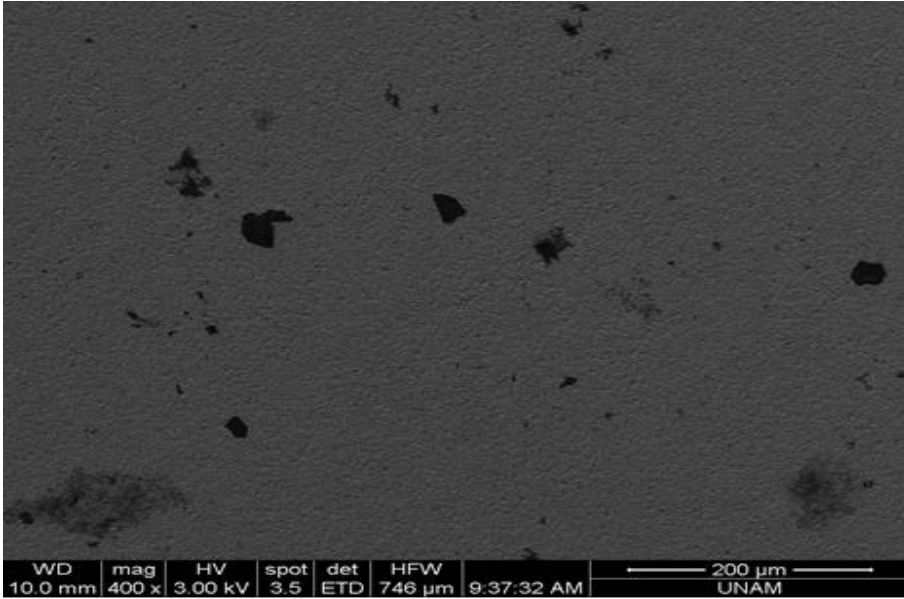


Şekil 4.7 1000x büyütmede SEM temiz yüzey görüntüsü

Temizleme işleminden sonra hemen hemen pürüzsüz olan yüzeye antibadi immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzeyin tamamında immobilizasyonun gerçekleştiğini alanın SEM görüntüleri ile kanıtlamaktadır.

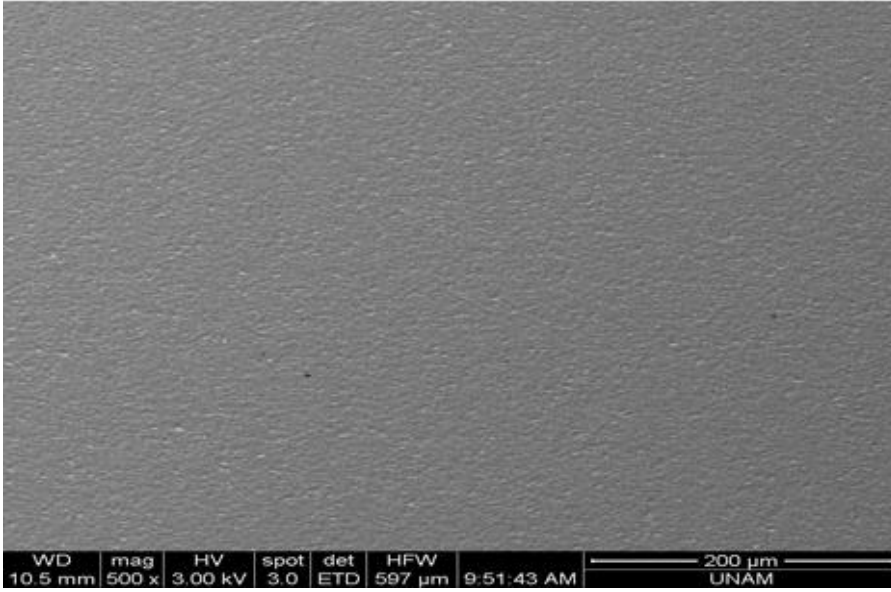


Şekil 4.8 100x büyütmede antibadi immobilizasyonu sonrası SEM görüntüsü



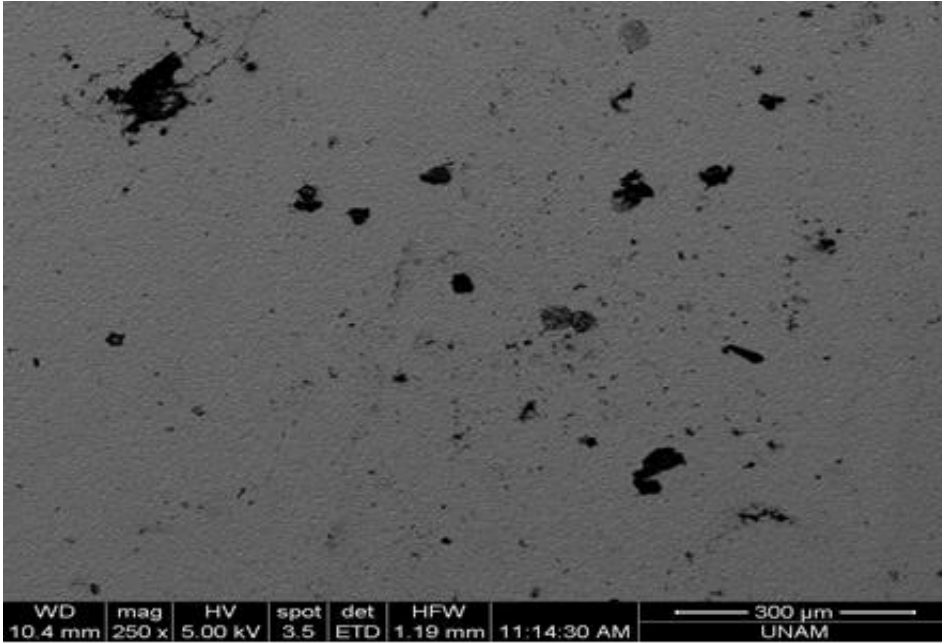
Şekil 4.9 400x büyütmede antibadi immobilizasyonu sonrası SEM görüntüsü

Kontrol kristali olarak temizlenmiş bir kristal yüzeyi üzerine uygulanmış platelet çözeltisi SEM'de görüntülenmiştir. Burada immobilizasyonun olmadığı hala temiz hemen hemen pürüzsüz bir yüzeyin olduğu görülmektedir. Yüzeyde kimyasal olarak bulunan yalnızca OH gruplarıdır. Yüzeye sistamin ve gluteraldehit uygulanmamıştır ve bu yüzden de anti-CD62P tutunamamıştır.

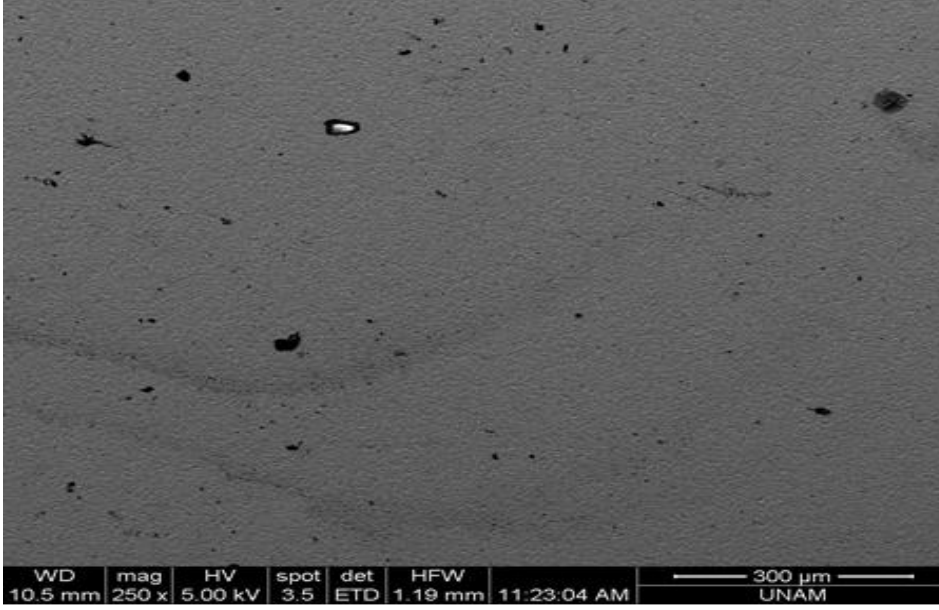


Şekil 4.10 500x büyütmede platelet çözeltisi uygulanmış kontrol kristalinin SEM görüntüsü

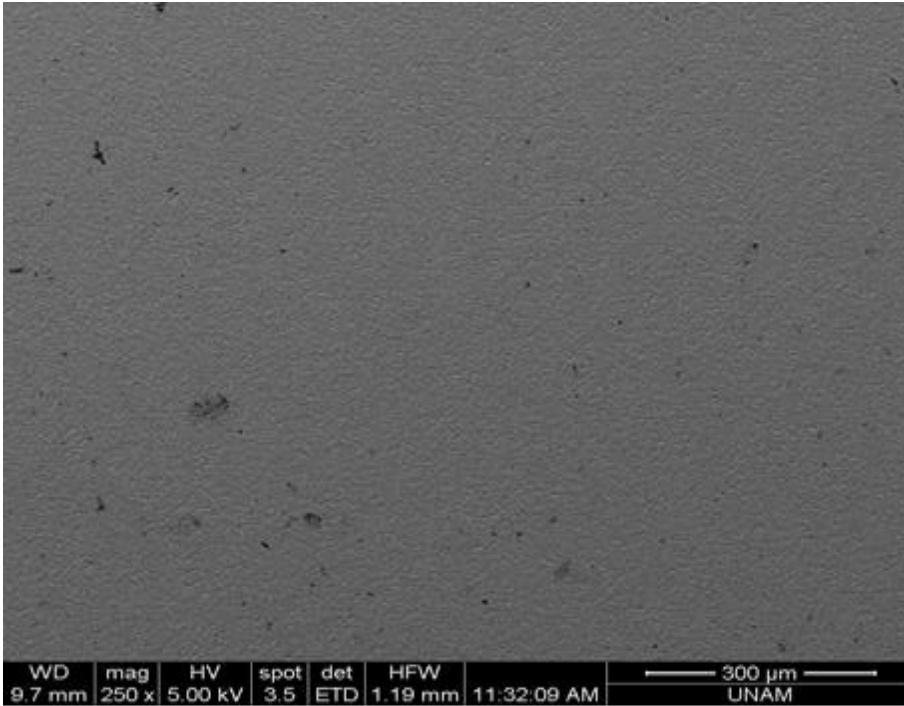
Üç derişim halinde hazırlanmış anti-CD62P solüsyonunun %100'lük derişimdeki kan çözeltisi ile tepkime sonrası alınmış SEM görüntülerinde de orantısal yoğunluğun olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle aynı büyütmede görüntüler alınarak doğru bir karşılaştırma yapılması sağlanmıştır.



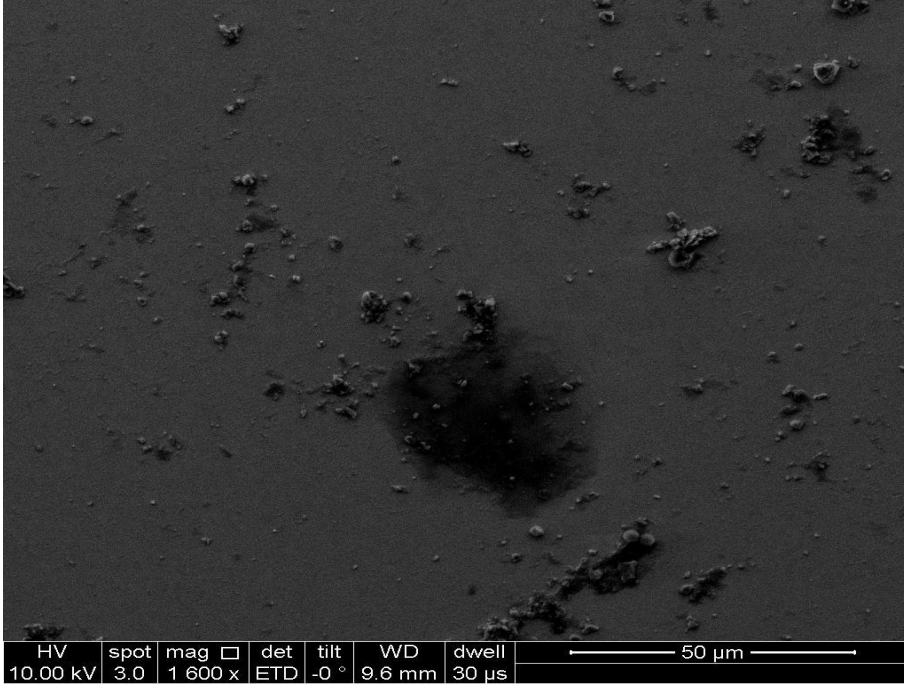
Şekil 4.11 250x büyütmede birinci derişim uygulanmış yüzeyin SEM görüntüsü



Şekil 4.12 250x büyütmede ikinci derişim uygulanmış yüzeyin SEM görüntüsü



Şekil 4.13 250x büyütmede üçüncü derişim uygulanmış yüzeyin SEM görüntüsü



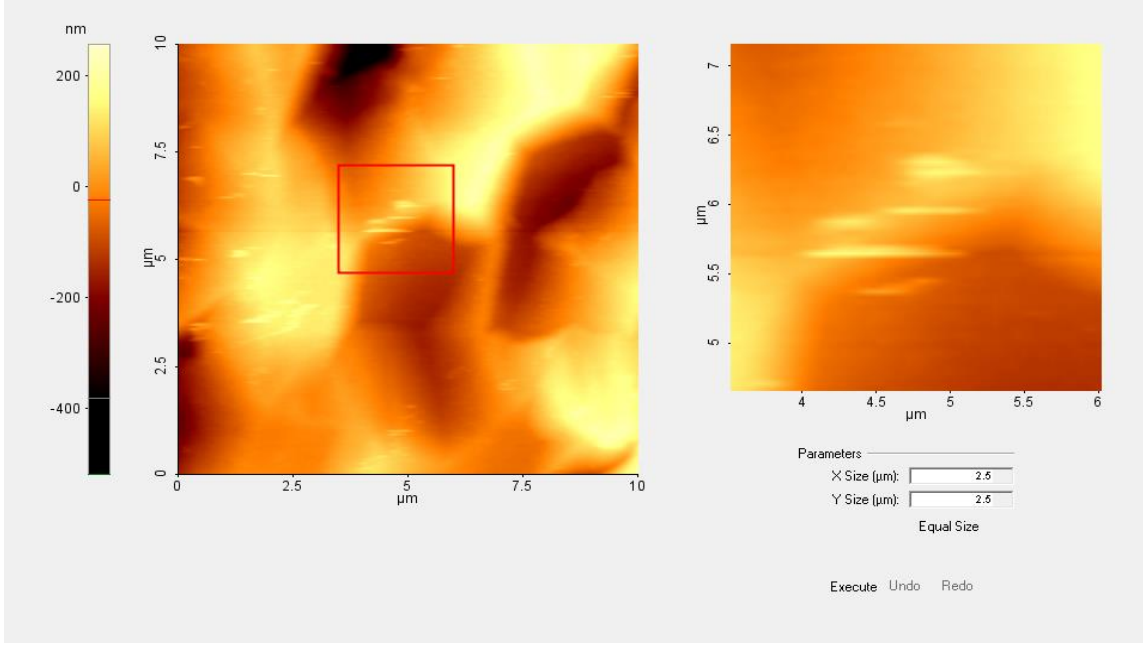
Şekil 4.14 1600x büyütmede aktiflenmiş plateletin SEM görüntüsü

Şekil 4.15 1600x büyütmede aktiflenmiş plateletin SEM görüntüsü

4.3 AFM Görüntüleri

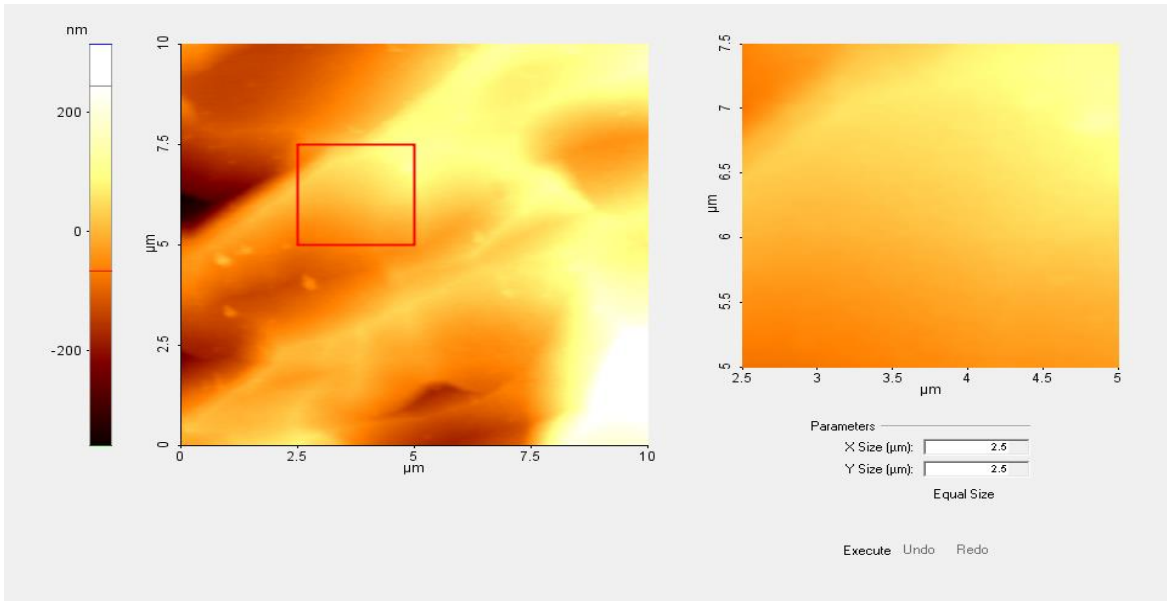
Kuvars kristaller için temiz yüzey, kirli yüzey ve antibadili AFM'de görüntüleme yapılmıştır.

Kılıfsız kirli kristal yüzeyinde çeşitli partiküllerin varlığı SEM ve frekans ölçümlerinde görüldüğü gibi AFM görüntülerinde de görülmektedir.



Şekil 4.15 10 µm x 10 µm boyutlu kirli gümüş yüzeyin AFM Görüntüsü

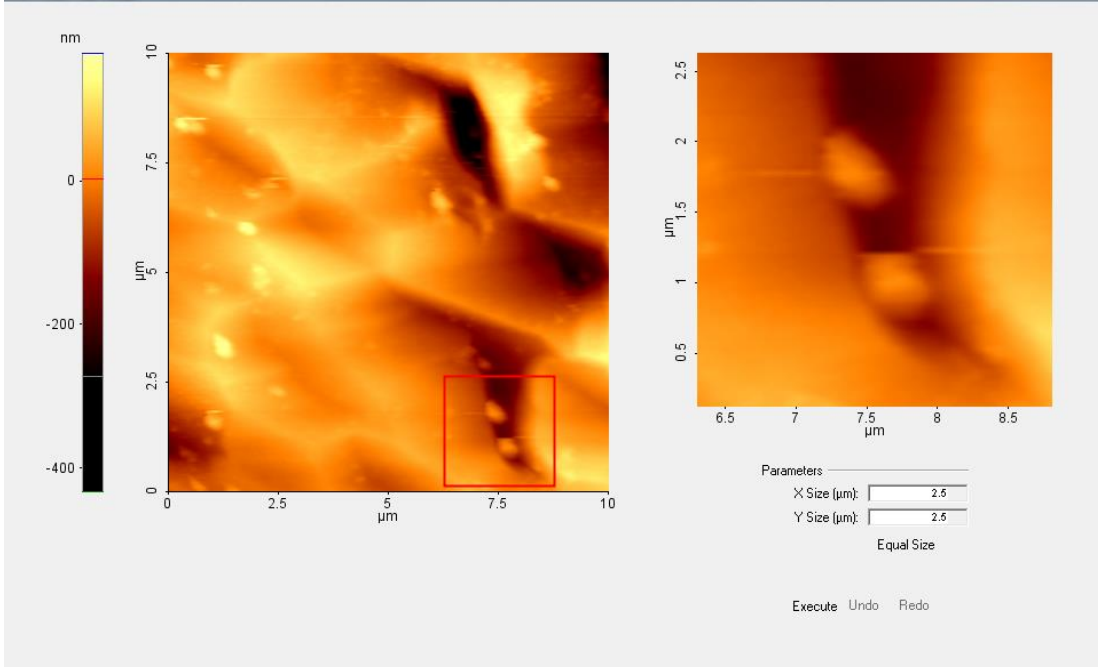
Temizleme ve hidrofilik yüzey elde işlemi sonrası kristalden alınan AFM görüntüsünde yüzey hemen hemen pürüzsüzdür. Yüzeyde fonksiyonel OH grupları oluşmuştur.



Şekil 4.16 10 µm x 10 µm boyutlu temiz gümüş yüzeyin AFM görüntüsü

Bir önceki aşamada hemen hemen pürüzsüz olan yüzey antibadi immobilizasyonu sonrasında pürüzlü bir yüzey haline gelmiştir. AntiCD62P antibadisinin de içerisinde yer aldığı trombosit mikropartiküllerinin ortalama büyüklükleri

0.1-1 μm 'dir [61] AFM'de de ölçülen antibadi büyüklüğünde referans olarak belirtilen aralıklardadır. Bu da bize yüzeyde tutunan antibadinin varlığını göstermektedir.



Şekil 4.17 10 μm x 10 μm boyutlu antibadi immobilize edilmiş kristalin AFM görüntüsü

5. SONUÇ

Sunulan çalışma kapsamında hedeflenen QCM'in biyosensör olarak kullanılarak platelet aktivasyonunu tanıyan yeni bir yöntem geliştirilmesidir. Geliştirilmesi düşünülen yöntem ile daha uygun maliyetlerle laboratuvar ölçüm cihazları ile karşılaştırıldığında aynı sonucun alınması sağlanmak istenmiştir. Yapılan çalışma kapsamında tasarlanan biyosensör ile daha hızlı, daha az maliyetli ve hasta konforunun yüksek olduğu bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Hasta konforunun ve ölçüm standartlarının iyileştirilebilmesinin yanısıra yapay kalp başta olmak üzere yapay organ uygulamaları, kan uyumluluğu testleri, koagülasyon ölçümü gerektiren üretim çalışmaları, implant ve diyaliz membranı gibi doğrudan doku ile etkileşimi olan biyomedikal altyapısı altındaki tüm uygulama alanlarında kullanılabilecek platelet miktarına bağlı olarak doğrusal çalışan bir sistem tasarlanmıştır. Tasarlanan biyosensör ile biyomedikal cihaz üretim çalışmalarında ürünlerin biyouyumluluk testlerini de gerçekleştirmek mümkün olabilecektir. Üretilen yeni ürünlerin kan ile uyumluluğunu belirlemek son derece önemlidir ve platelet aktivasyonunun ölçülmesi standart bir kontrol olarak gerçekleştirilmelidir.

Piezoelektrik sensörlerin gerçek zamanlı olarak algılama özelliğinden yararlanılmıştır. Gerçek zamanlı algılama özelliği ile anlık veri alınması mümkün hale gelmiştir [62].

QCM mikroterazi özelliği ve işlem yapılabilir özellikte bir yüzeye sahip olduğu için antibadiler ile spesifik molekülleri tanıyabilen biyosensörler tasarlanabilmektedir. Sunulan çalışmada platelet aktivasyonunu belirlemek için kristal yüzeyi anti-CD62P ile kaplanmıştır ve yüzeyin platelet aktivasyonunu tanınması sağlanmıştır. Anti-CD62P aktiflenmiş olan plateletleri tutarak yüzeye yapışmasını sağlanmaktadır. Yapılan işlemler doğrultusunda frekans değişimleri oluşmuş ve kuvars kristalin mikroterazi özelliğinden yararlanılmıştır.

Kuvars kristal hem biyosensör için iyi bir yüzey sağlamış hem de mikroterazi özelliği ile kütleler hakkında bilgi vermiştir. Yapılan çalışmanın her basamağında

frekans ölçümü gerçekleştirilerek kontrollü olarak ilerleme sağlanmıştır. Ayrıca yüzey görüntüleri de SEM ve AFM ile alınmış ve frekans değerleri ile karşılaştırma yapılabilmektedir.

Yapılan tezde kullanılan kontrol grupları, farklı derişimlerde yapılan karşılaştırmalar, frekans ölçümleri, AFM ve SEM görüntüleri platelet aktivasyonunun varlığını tanıyan bir yüzey elde edilerek biyosensör tasarımının gerçekleştirildiğini göstermektedir. Piezoelektrik kristalin sahip olduğu mikroterazi özelliği ile oluşturulan tanıyıcı yüzeyde kütle ölçümü gerçekleştirilebilmiştir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] CATHERINE P.M. HAYWARD, Diagnostic approach to platelet function disorders, C.P.M. Hayward / Transfusion and Apheresis Science 38 (2008) 65–76.
- [2] S. G. CHU, R. C. BECKER, P. B. BERGER, D. L. BHATT, J. W. EIKELBOOM, B. KONKLE, E. R. MOHLER, M. P. REILLY, and J. S. BERGER, Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8: 148–156.
- [3] ZAVERIO M. RUGGERI, Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis, Blood Cells, Molecules, and Diseases 36 (2006) 145–147.
- [4] Dott. ROSARIA ARNONE, Intracellular and surface redox systems in human platelets, Dottoro di Ricerca in Biochimica e biologia molecolare XXI ciclo 2009-2010.
- [5] CHRISTIAN HUMPEL, Influence of mental stress on platelet bioactivity, World J Psychiatr 2012 December 22; 2(6): 134-147.
- [6] PRICE BLAIR, ROBERT FLAUMENHAFT, Platelet a-granules: Basic biology and clinical correlates, Blood Reviews 23 (2009) 177–189.
- [7] SARAH M. KINGV AND GUY L., Development of platelet secretory granules, Cell & Development Biology, Vol. 13, 2002: pp. 293–302.
- [8] ARCHIBALD MCNICOL AND SARA J. ISRAELS, Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis, Thrombosis Research 95 (1999) 1–18.
- [9] EMMA C. JOSEFSSON, CHLOE JAMES, KATYA HENLEY, MARLYSE A. DEBRINCAT, KELLY L. ROGERS, MARK R. DOWNLING, MICHAEL J. WHITE, ELIZABETH A. KRUSE, RACHAEL M. LANE, SARAH ELLIS, PAQUITA NURDEN, KYLIE D. MASON, LORRAINE A. O'REILLY, ANDREW W. ROBERTS, DONALD METCALF, DAVID C.S. HUANG AND BENJAMIN T. KILE, Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets, The Journal of Experimental Medicine September 12, 2011.
- [10] VARDA R. DEUTSCH AND AARON TOMER, Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside, British Journal of Haematology, 2013, 161, 778–793.
- [11] PAUL HARRISON, Platelet function analysis, Blood Reviews (2005) 19, 111–123.
- [12] RICHARD H. ASTER, Pooling of Platelets in the Spleen: Role in the Pathogenesis of "Hypersplenic" Thrombocytopenia, Journal of Clinical Investigation Vol. 45, No. 5, 1966.
- [13] Y.H. QIBA, C.Q. XU, Y.J. ZENG, X.H. Xu, H. Zhao, H. Xu, The kinetic model and simulation of blood coagulation—the kinetic influence of activated protein C, Medical Engineering & Physics 26 (2004) 341–347.
- [14] NISHA S, ARUN KARTHICK S AND GOBI N, A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, Che Sci Rev Lett 2012, 1(3), 148-155.

- [15] BRYAN LINCOLN, ANTONIO J. RICCO, NIGEL J. KENT, LOURDES BASABE-DESMONTS, LUKE P. LEE, BRIAN D. MACCRAITH, DERMOT KENNY, GERARDENE MEADE, Integrated system investigating shear-mediated platelet interactions with von Willebrand factor using microliters of whole blood, *Analytical Biochemistry* 405 (2010) 174–183.
- [16] NAHREEN TYNNGARD, Preparation, storage and quality control of platelet concentrates, *Transfusion and Apheresis Science* 41 (2009) 97–104.
- [17] KENNETH J. CLEMETSON, Platelets and Primary Haemostasis, *Thrombosis Research* 129 (2012) 220–224.
- [18] MARK DÇ KLIGMAN, M.D., NICHOLAS J. ZYROMSKI, M.D., DANIEL G. McCULLOUGH, M.D., WILLIAM T. GUNNING, PH.D., Platelet-dense granule deficiency causes postoperative hemorrhage in patients receiving enoxaparin: a novel observation with dramatic clinical implications, *The American Journal of Surgery* (2009) 197, 365–370
- [19] ZHENYU LI, M. KEEGAN DELANEY, KELLY A. O'BRIEN AND WIAOPING DU, Signaling During Platelet Adhesion and Activation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2341-2349.
- [20] RAJBABU PAKALA, RON WAKSMAN, Currently available methods for platelet function analysis:advantages and disadvantages, *Cardiovascular Revascularization Medicine* 12 (2011) 312–322.
- [21] ERIC J. HEILMANN, SOURAV K. KUNDU, REYNALDO SIO, CARMEN GARCIA, RAMON GOMEZ AND DOUGLAS J. CHRISTIE, Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100'm system, *Thrombosis Research*, Vol.87, No. 1.pp.159-164,1997.
- [22] PAUL HARRISON, Platelet function analysis, *Blood Reviews* (2005) 19, 111–123.
- [23] MAURA GASPARETTO, TRACY GENTRY, SAID SEBTI, ERICA O'BRYAN, RAMADEVI NIMMANAPALLI, MICHELLE A. BLASKOVICH, KAPIL BHALLAC, DAVID RIZZIERI, PERRY HAALAND, JACK DUNNE, CLAY SMITH, Identification of compounds that enhance the anti-lymphoma activity of rituximab using flow cytometric high-content screening, *Journal of Immunological Methods* 292 (2004) 59– 71
- [24] RAJBABU PAKALA, RON WAKSMAN, Currently available methods for platelet function analysis:advantages and disadvantages, *Cardiovascular Revascularization Medicine* 12 (2011) 312–322.
- [25] YANG LIU, XIAO YU, RUI ZHAO, DI-HUA SHANGGUAN, ZUYI BO, GUOQUAN, Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in Solution, *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 1419-1427.
- [26] NUGGEHALLI M. RAVINDRA, CAMELIA PRODAN, SHANMUGAMURTHY FNU, IVAN PADRONL, AND SUSHIL K. SIKHA, Advances in the Manufacturing, Types, and Applications of Biosensors, *JOM-December* 2007
- [27] HIKMAT N. DAGHESTANI AND BILLY W.DAY, Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors, *Sensors* 2010, 10, 9630-9646.

- [28] PETR SKLADAL, Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions, *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 14, No. 4, 491-502, 2003.
- [29] B.J. WILLIAMSON, S. PASTIROFF, G. CRESSEY, Piezoelectric properties of quartz and cristobalite airborne particulates as a cause of adverse health effects, *Atmospheric Environment* 35 (2001) 3539–3542
- [30] ANDREAS JANSHOFF, HANS-JOACHIM GALLA, CLAUDIA STEINEM, Piezoelectric Mass-Sensing devices as biosensors- An alternative to optical biosensör?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 4004-4032.
- [31] C.K. O’SULLIVAN, G.G. GUILBAULT, Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications, *Biosensors & Bioelectronics* 14 (1999) 663–670.
- [32] TZONG-JIH CHENG, HSIEN-CHANG CHANG, TSUN-MEI LIN, A piezoelectric quartz crystal sensor for the determination of coagulation time in plasma and whole blood, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 13. No. 2, pp. 147-156, 1998.
- [33] BORINA G. KOTZEVA, MARCEL GUILLONG, ELITSA STEFANOVA, NIKOLAY B. PIPEROV, LA-ICP-MS analysis of single fluid inclusions in a quartz crystal, *Journal of Geochemical Exploration* 108 (2011) 163–175.
- [34] C.K. O’SULLIVAN, G.G. GUILBAULT, Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications, *Biosensors & Bioelectronics* 14 (1999) 663–670.
- [35] RENEE L. BUNDE, ERIC J. JARVI, JEFFREY J. ROSENTERER, Piezoelectric quartz crystal biosensors, *Talanta* 46 (1998) 1223–1236.
- [36] C.H. NGUYEN, S.J. PIETRZKO, Piezoelectric–mechanical–acoustic couplings from a PZT-actuated vibrating beam and its sound radiation, *Mechanical Systems and Signal Processing* 18 (2004) 929–945.
- [37] ARUNACHALAKASI AROCKIARAJAN, BUELENT DELIBAS, ANDREAS MENZEL, WOLFGANG SEEMANN, Studies on rate-dependent switching effects of piezoelectric materials using a finite element model, *Computational Materials Science* 37 (2006) 306-317.
- [38] IN SEON PARK, NANSOO KIM, Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal, *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998) 1091–1097.
- [39] JAN RICKERT, TILO WEISS, WOLFGANG KRAAS, GÜNTHER JUNG, WOLFGANG GÖPEL, A new affinity biosensor: Selfassembled thiols as selective monolayer coatings of quartz crystal microbalances, *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 11, No. 6/7, pp. 591-598, 1996.
- [40] YUNG- CHUAN LIU, CHIH-MING WANG, AND KUANG-PIN HSIUNG, Comparison of Different Protein Immobilization Methods on Quartz Crystal Microbalance Surface in Flow Injection Immunoassay, *Analytical Biochemistry* 299, 130–135 (2001)
- [41] MATTHEW A. COOPER AND VICTORIA T. SINGLETON, A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions, *Journal of Molecular Recognition J. Mol. Recognit.* 2007; 20: 154–184.
- [42] BEATRIZ M. BRENA AND FRANCISCO BATISTA-VIERA, Immobilization of Enzymes, *Enzyme Immobilization Literature Survey*.

- [43] EIŽBIETA GÖRECKA, MAGDALENA JASRZEBSKA, Immobilization techniques and biopolymer carriers, *Biotechnol Food Sci* 2011, 75 (1), 65-86.
- [44] DULBECCOR, VOGT M., Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *J Exp Med.* 1954 Feb;99(2):167-82.
- [45] Y.Y. WONG, S.P. NG, M.H. NG, S.H. SI, S.Z. YAO, Y.S. FUNG, Immunosensor for the differentiation and detection of Salmonella species based on a quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 676-684.
- [46] QIANG CHEN, JIADONG HUANG, HUIJUN YIN, KEJI CHEN, TETSUO OSA, The applications of affinity biosensors: IAsys biosensor and quartz crystal microbalance to the study on interaction between Paeoniae radix 801 and endothelin-1, *Sensors and Actuators B* 115 (2006) 116–122.
- [47] XIAODONG AHO, LIJIA LIU, MIN HU, LEILEI WANG, JIMING HU, Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27 (2002) 341–345.
- [48] WEI HUANGF, XINYU ZHANG, TONGZHONG JU, RICHARD D. CUMMINGS AND LAI XI WANG, Expeditious chemoenzymatic synthesis of CD52 glycopeptide antigens, *The Royal Society of Chemistry Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 5224–5233.
- [49] FABIANA ARDUINI, SIMONE GUIDONE, AZIZ AMINE, GIUSEPPE PALLESCI, DANILA MOSCONE, Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection, *Sensors and Actuators B* 179 (2013) 201– 208.
- [50] KENNETH A. MARX, TIEAN AHO, ANNE MONTRONE, DONNA MCINTOSH, SUSAN J. BRAUNHUT, A comparative study of the cytoskeleton bindin drugs nocodazole and taxol with a mammalian cell quartz crystal microbalance biosensor: Different dynamic responses and energy dissipation effects, *Analytical Biochemistry* 361(2007) 77-92
- [51] YUNHUI YANG, MINGHUI YANG, HUA WANG, JIANHUI JIANG, GUOLI SHEN, RUQIN YU, An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides, *Sensors and Actuators B* 102 (2004) 162–168.
- [52] MARIA GARDENNY RIBERIO PIMENTA-MARTINS, ROSELAYNE FERRO FURTADO, LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE, RICARDO SOUZA DIAS, MARIA DE FÁTIMA BORGES, CARLUCIO ROBERTO ALVES, Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese, *Journal of Microbiological Methods* 91 (2012) 138–143.
- [53] YUKO NAKANE, IZUMI KUBO, Layer-by-layer of liposomes and membrane protein as a recognition element of biosensor, *Thin Solid Films* 518 (2009) 678–681.
- [54] RENATA PROCHÁZKOVA, CTIRAD ANDRÝS, LENKA HUBÁČKOVÁ, JAN KREJSEK, Markers of platelet activation and apoptosis in platelet concentrates collected by apheresis, *Transfusion and Apheresis Science* 37 (2007) 115-123.
- [55] TÜMER ÇORAPÇIOĞLU, Açık Kalp Cerrahisinde Antikoagülasyonun Sağlanmasında Heparin-Ptotamin Tütrasyonunun Önemi, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* Cilt 50, Sayı 2, 1997.

- [56] JEAN-FRANÇOIS THÉORÉT, DANIEL YACOUB, AHMED HACHEM, MARC-ANTOÏNE GILLIS, YAHYE MERHI, P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation, *Thrombosis Research* 128 (2011) 243–250.
- [57] AZİZE SENER, DERYA OZSAVCI, RABIA OBA, GULDUREN YANIKKAYA DEMIREL, FIKRIYE URAS, TURAY YARDIMCI, Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet–leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia?, *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 1081–1087.
- [58] K LEW, Blood Sample Collection and Handling, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Volume 3.
- [59] Protamin Choay Sulphate 1 Flakon,
<http://www.ilacprospektusu.com/ilac/151/protamin-choay-sulphate-1-flakon>
- [60] PIOTR RADZIOW, BARBARA BOCZKOWSKA- RADZIOW, JOACHIM F. SCHENK, MAREK Z. WOJTUKIEWICZ, JANUSZ KLOCZKO, JAN GIEDROJĆ, AND HANS K. BREDDIN, Platelet Activation and its Role in Thrombin Generation in Platelet-induced Thrombin Generation Time, *Thrombosis Research* 100 (2000) 419±426.
- [61] MUTLU KASAR, Orak Hücre Hastalığında Eritrosit, monosit, trombosit, endotel, mikropartiküllerinin araştırılması ve klinik önemi, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu, Proje No: KA09/57
- [62] GUILHERME N.M. FERREIRA, ANA- CARINA DA-SILVA AND BRIGITTE TOMÈ, Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance, *Trends in Biotechnology* Vol.27 No.12.