

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİRUBİN BİYOSENSÖR TASARIMI VE ÜRETİMİ
DESIGN AND CONSTRUCTION OF A BILIRUBIN
BIOSENSOR**

SİNAN SAĞLAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2010

BİLİRUBİN BİYOSENSÖR TASARIMI VE ÜRETİMİ
DESIGN AND CONSTRUCTION OF A BILIRUBIN
BIOSENSOR

SİNAN SAĞLAM

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

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından **BIYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman) :.....

Doç. Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye :.....

Yrd. Doç. Dr. Metin YILDIZ

Üye :.....

Yrd. Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof. Dr. Emin AKATA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőmesinde katkılarından dolayı, aőađıda adı geçen kiői ve kuruluőlara içtenlikle teőekkür ederim.

Sayın Doç. Dr. Mustafa KOCAKULAK'a (tez danıőmanı), çalışmanın sonuca ulaőtırılmasında ve karőtılaőtılan güçlüklerin aőtılmasında her zaman yardımcı ve yol gösterici olduğu için...

Bilirubin ile ilgili sorularımı sabırla cevaplayan ve fikirler veren Dr. Sema Bozalioğlu'na

Deneyler sırasında benden yardımını esirgemeyen ve destek olan değerli arkadaőtım Erhan Ernek'e

Deneyler esnasında benden bilgisini ve deneyimini eksik etmeyen dostum Arif Mutlu Őanlı'ya

teőekkür ederim.

ÖZ

BİLİRUBİN BİYOSENSÖR TASARIMI VE ÜRETİMİ

Sinan SAĞLAM

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilirubin bir safra pigmentidir ve memelilerde yaşlanmış kırmızı kan hücrelerindeki hemoglobin katabolizması sonucu oluşur. İnsan vücudundaki fonksiyonu zincir kıran bir antioksidan olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca bu madde beyin dokusunda biriken toksik bir maddedir. Bilirubin seviyesi yüksek olan hiperbilirubinemi hastalarının tedavisinde plazmadan bilirubin uzaklaştırılması teknikleri kullanılmaktadır. Bilirubin seviyesinin ölçülmesi hastalığın teşhisinde ve tedavisinde önem taşımaktadır. Bu ölçümlerin yapılmasında standart olarak deri test cihazları, kimyasal olmayan fotometrik cihazlar ve laboratuvar analizatör kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı kuartz kristalleri kullanarak yeni bir bilirubin biyosensörünün tasarımı ve üretimidir. Biyosensör üretimi için ilk aşamada kuartz kristal üzerine çapraz bağlama ve kovalent bağlama immobilizasyon yöntemleri kullanılarak albümin immobilizasyonu yapılmıştır. Van der Waals etkileşimi ile kristal üzerindeki albümin üzerine bilirubin bağlanmıştır. Kuartz kristal üzerine bağlanan bilirubin miktarı frekans değişimlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Böylece yapılan çalışmalarda başarılı bir şekilde bilirubin biyosensörü tasarlanmıştır. Geliştirilen tasarımla, düşük maliyetle bilirubin seviyesini ölçebilen cihazlar tasarlanabilecektir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Bilirubin, Biyosensör, Kuartz kristal, QCM

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

ABSTRACT

DESING AND CONSTRUCTION OF A BILIRUBIN BIOSENSOR

Sinan SAĞLAM

Başkent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

Bilirubin is a bile pigment and it is generated by hemoglobin katabolism in old erythrocytes for mammals. The fuction of bilirubin in human body believed as an antioksidan. Billirubin is also accumulated in brain tissues and it is toxic. In order to treat hyperbilirubinemia patients, who has high bilirubin levels, extracorporeal bilirubin removal columns applied . Measurement of bilirubin level is important for diagnosis and theraphy. Measurement of bilirubin levels are made by skin test devices, nonchemical photometric devices and laboratory analyzers . The aim of this study is to design and implement of a new bilirubin biosensor using quartz crystal microbalances. For biosensor production, in the first phase; we use cross-linking and covalent binding immobilization methods on the quartz crystal using to make immobilized albumin. By Van der Walls reaction, over surface of the albumin on the crystal is connected with bilirubin. The amount of bilirubin anchored on quartz crystal is calculated by using frequency changes. In this study new bilirubin biosensor is designed and constructed. As a result a low cost and sensitive bilirubin measurement device is implemented.

KEYWORDS: Bilirubin, Biosensor, Quartz crystals.

Supervisor: Asc. Professor Mustafa KOCAKULAK, Başkent University, Department of Biomedical Engineering.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

| | |
|--|-----------|
| ÖZ | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER LİSTESİ | iii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | v |
| ÇİZELGELER LİSTESİ..... | vii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1 Kan | 2 |
| 2.2 Kan Bileşenleri | 4 |
| 2.3 Albümin..... | 7 |
| 2.4 Bilirubin | 9 |
| 2.4.1 Bilirubin'in Kimyası | 9 |
| 2.4.2 Bilirubin Fonksiyonları..... | 10 |
| 2.4.3 Bilirubin Toksik Etkisi ve Kan Testleri..... | 12 |
| 2.4.4 Bilirubin Ölçüm Cihazları..... | 14 |
| 2.5 İmmobilizasyon Yöntemleri | 16 |
| 2.5.1 Adsorbsiyon | 16 |
| 2.5.2 Mikrokapsülasyon | 17 |
| 2.5.3 Tutuklama | 17 |
| 2.5.4 Çapraz Bağlama | 18 |
| 2.5.5 Kovalent Bağlama | 19 |
| 2.6 Kuartz Kristaller | 19 |
| 2.6.1 Piezoelektrik Etki ve Kuartz Kristallerde Kullanımı | 19 |
| 2.6.2 Ağırlık Ölçümüne Dayalı ve Dayalı Olmayan QCM | 21 |
| 2.6.3 Rezonans Kristalleri..... | 22 |
| 2.6.4 Kesme Dalgasının Sıvı ve Gazlarda Sönümlenmesi..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6.5 Çalışma Modları..... | 22 |
| 2.6.6 Elektrokimyasal QCM..... | 23 |
| 3. DENEY AŞAMALARI | 24 |
| 3.1 Deneyde Kullanılan Materyaller | 24 |
| 3.2 Deneysel Yöntem..... | 24 |
| 3.2.1 Kristallerin Temizlenmesi..... | 26 |
| 3.2.2 Sistamin İmmobilizasyonu | 27 |
| 3.2.3 Gluteraldehit İmmobilizasyonu..... | 28 |
| 3.2.4 Albümin İmmobilizasyonu..... | 29 |
| 3.2.5 Bilirubin ve Albümin Etkileşimi..... | 29 |
| 3.2.6 Bilirubin Ölçüm Aşamaları..... | 30 |
| 4. DENEYSEL SONUÇLAR..... | 31 |
| 4.1 Atomik Kuvvet Mikroskobu Görüntüleri..... | 41 |
| 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER..... | 46 |
| KAYNAKLAR LİSTESİ..... | 48 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1 İnsan serum albumininin şematik gösterimi | 7 |
| Şekil 2.2 Bilirubin Kimyasal Yapısı | 10 |
| Şekil 2.3 Bilirubin Dönüşümü | 11 |
| Şekil 2.4 Adsorpsiyon Şematik Gösterimi..... | 16 |
| Şekil 2.5 Mikrokapsilasyon Şematik Gösterimi..... | 17 |
| Şekil 2.6 Tutuklama Şematik Gösterimi..... | 18 |
| Şekil 2.7 Çapraz Bağlama Şematik Gösterimi..... | 18 |
| Şekil 3.1 Metal Kılıfların Kesilmesi | 25 |
| Şekil 3.2 Metal Kılıfın Çıkarılmış Hali | 25 |
| Şekil 3.3 Kristallerin Temizlenmesinin Şematik Gösterimi | 26 |
| Şekil 3.4 Kristallerin Ultrasonik Banyoda Temizlenmesi..... | 27 |
| Şekil 3.5 Karanlık Ortamda Kristallere Sistamin İmmobilizasyonu | 28 |
| Şekil 3.6 Sistamin İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi | 28 |
| Şekil 3.7 Gluteraldehit İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi | 29 |
| Şekil 4.1 1mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları | 32 |
| Şekil 4.2 2mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları | 33 |
| Şekil 4.3 5mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları | 34 |
| Şekil 4.4 10mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları | 35 |
| Şekil 4.5 Farklı Bilirubin Konsantrasyonları İçin Ölçülen Frekans Değişimleri | 36 |
| Şekil 4.6 Farklı Bilirubin Seviyeleri İçin Sauerbrey Denkleminden Elde Edilen Kütle Birikim Miktarı Grafiği | 37 |
| Şekil 4.7 5mg/ml İçin Bilirubin Tekrar Kullanılabilirlik Grafiği | 38 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.8 Plazmada Farklı Bilirubin Konsantrasyonları İçin Ölçülen Frekans Değişimleri..... | 39 |
| Şekil 4.9 Plazmada İçerisinde Farklı Bilirubin Seviyeleri İçin Sauerbrey Denkleminden Elde Edilen Kütle Birikim Miktarı Grafiği | 40 |
| Şekil 4.10 Albumin İmmobilizasyonu Sonrası AFM Görüntüsü..... | 42 |
| Şekil 4.11 Bilirubin İmmobilizasyonu Sonrası AFM Görüntüsü..... | 43 |
| Şekil 4.12 Plazmadan Bilirubin Ölçümü Sonrası AFM görüntüsü | 44 |

ÇİZELGELER LİSTESİ

| | | |
|-------------|--|----|
| Çizelge 2.1 | Normal Kabul Edilen Plazma Bilirubin Seviyeleri | 13 |
| Çizelge 4.1 | Metal Başlıklı ve Metal Başlıksız Olarak Yapılan Ölçümlerde Elde Edilen Değerler ve Aralarındaki Fark | 31 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|-----------------|---|
| A | Kristalin elektrotlar arasındaki hareketli alanı, |
| dL | Desilitre |
| eV | Elektron volt |
| f_0 | Kristalin rezonans frekansı, |
| gr | Gram |
| Hz | Hertz |
| KeV | Kilo elektron volt |
| Kg | Kilogram |
| Km | Kilometre |
| L | Litre |
| μmol | Mikromol |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimol |
| QCM | Kuartz kristal mikro terazi |
| V_q | Kuartzdaki kayma dalga hızıdır. |
| Δf (Hz) | Kuartz kristal frekans değişimi |
| $(\Delta m(g))$ | Kuartz kristal üzerinde kütlede olan değişiklik |
| ρ_q | Kuartzın yoğunluğu, |
| μ_q | Kayma genliği(katsayısı), |

1. GİRİŞ

Bilirubin; sarı renkte, hem katabolizmasının sonucu oluşan bir üründür. Günümüzde kandaki bilirubin miktarının belirlenmesi deri test cihazları, kimyasal olmayan fotometrik cihazlar ve laboratuvar analizatör ile yapılmaktadır. Bu cihazlar kandaki bilirubin miktarını dolaylı bir şekilde ölçer ve hatalı sonuçlar verebilir. Yapılan araştırma neticesinde kuartz kristallerin yüzeyine kimyasal immobilize albumin ve bilirubin ile kuartz kristalde neden olduğu frekans değişiminden yararlanarak bilirubin ölçümü yapılması hedeflenmiştir.

1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Yapılan çalışmanın amacı kuartz kristal yüzeyine albumin immobilize edip, bilirubin miktarının kuartz kristal mikroterazi (Quartz Crystal Microbalance- QCM) ile ölçülmesidir. QCM cihazı; kütle değişimine göre frekans değişimini göstermektedir. Eğer kristal yüzeyinde kütle azalması varsa frekans artacaktır. Kristal yüzeyinde kütle artışı varsa frekans azalacaktır. Bu bilgiden yararlanarak bu tez çalışmasında albumin immobilizasyonu yapılan QCM üzerinden bilirubin miktarı ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

Bu kısımda kan ve kan bileşenleri hakkında genel bilgiler verilmiştir. Daha sonra kanda bulunan albümin ile bilirubin genel özelliklerine değinilmiştir. Bu bilgilerden sonra immobilizasyon yöntemleri anlatılmış ve kuartz kristallerin özelliklerinden bahsedilmiştir.

2.1 Kan

Kan, atardamar, toplardamar ve kılcal damarlardan oluşan damar ağının içinde dolaşan; akıcı plazma ve hücrelerden (alyuvar, akyuvar ve kan pulcukları) meydana gelmiş kırmızı renkli hayati bir sıvıdır. Kan ile ilgili tıbbi terimler genellikle hemo ve hemoto sözcükleri ile başlar. Bu sözcükler eski Yunanca'da kan sözcüğünü karşılayan haimadan türetilmiştir. Kolloid bir madde olup homojen görünse bile, heterojen bir karışımdır.

Kanın ana işlevi besin maddelerinin (oksijen, glikoz) ve yapısal elemanların sağlanması ve atık maddelerin (karbondioksit, laktik asit vs.) atılmasının sağlanmasıdır [1].

Her bedende 3.1 ile 5.2 litre arası kan bulunur. Bu miktar ortalama vücut ağırlığının %7-%8'ini oluşturur. Kanın yarısı, sıvı olan bölümden yani plazmadan meydana gelir. Diğer yarısı ise kanın içinde çeşitli görevler üstlenmiş olan hücreler veya moleküllerdir.

Kandaki hücreler, vücuttaki kan miktarının yarısını oluşturmalarına rağmen, yan yana dizildikleri takdirde 96.500 km'lik bir çizgi oluşturabilecek kadar fazladırlar. Bu dünyanın çevresini iki kez dolaşmaya yeterli bir uzunluktur.[29]

Eğer kanın pıhtılaşmasına izin verilirse, tüpün üstünde kalan sıvıya serum denir. Serumda fibrinojen ve pıhtılaşma ile ilgili diğer proteinler, pıhtılaşmada kullanıldığı için yoktur. Diğer bir deyişle plazma, fibrinojen ve serumdan oluşur.

Kanın en önemli görevi kalpten dokulara metabolik olaylar için gerekli oksijeni taşımaktır.

Bazı ufak ve basit yapıları canlılarda kanın yapısı deniz suyuna çok benzerdir. Bu canlıların vücut parçalarının gerek duyduğu oksijen bu sıvıda çözünmüş olarak taşınır. Daha karmaşık yapıları canlılarda dokuların oksijen ihtiyacı çok fazla olup, çözünmüş halde taşınan oksijen yeterli olamaz. Bunlarda “solunum pigmentleri” denilen renkli maddeler oksijeni bağlayarak dokulara taşırlar. Bu pigmentlerin (boya maddelerinin) kanda yaygın halde bulunmaları kanı kıvamlı ve akışkanlığı az bir hale getireceğinden insan ve diğer memelilerde pigment taşıyıcı özel hücreler vardır.

İnsanlarda kan, birçok canlı hücrenin bulunduğu karmaşık bir ortamdır. Her vücut kilosunda 70 mililitre kan bulunduğu kabul edilir. Bu hesaba göre 70 kg'lık normal bir erişkinde yaklaşık 5000 ml (5 litre) kan bulunur.[29]

Kan, kalbin pompa vazifesi yaptığı bir kapalı sistemde dolaşır. Bu sistem kalp ile dokular arasında ve kalp ile akciğer arasında olmak üzere iki bölümdür. Bunlardan birincisine “büyük dolaşım sistemi”, ikincisine de “küçük dolaşım sistemi” denilir. Toplardamarlardan gelen kan kalbin sağ kulakçığına dökülür. Buradan sağ karıncığa geçen kan, kalbin kasılmasıyla akciğere yollanır. Akciğerde temizlenen kan, kalbin sol kulakçığına gelir, buradan da karıncığa geçtikten sonra vücuda pompalanır. Kan kılcal damarlardan geçerken oksijenini bırakır ve karbondioksit alır.

Dokuların oksijen ihtiyacını karşılamak ve artıkları almaktan başka kanın birçok önemli görevi daha vardır. Besin maddelerini taşır. Vitaminler, enzimler ve hormonların gitmeleri gereken yerlere ulaşmalarını sağlar.

Kan aynı zamanda, yabancı cisimlere karşı vücudun savunmasında önemli bir role sahiptir. Bir iltihabi olaya karşı savaşırken, bir takım kan hücreleri direkt mikrobu tahribe çalışır, diğer bazıları antikor yaparak mikrobu tesirsizleştirir.

Kanın bir diğerk önemli vazifesi de, iç dengeyi sağlamaktır. “Hemeostazis” adı verilen bu dengedeki en ufak değışiklik vücut için tehlikeli durumlar ortaya çıkarır.

Vücut sıcaklığını ayarlama da önemli rol oynayan kan, metabolizması hızlı organlardan aldığı ısıyı, yüzeydeki damarlardan geçerken verir. Ayrıca kan içerdığı maddelerle vücudun sıvı-elektrolit dengesini de sağlar.

2.2 Kan Bileşenleri

Bir sıvı topluluğu gibi görüldüğü halde, kan aynı zamanda bir vücut dokusudur. Bu vücut dokusunun ara maddesini diğerk dokulardan farklı olarak bir sıvı meydana getirir. Plazma kanın % 55'ini teşkil eder. Kalan kısmı ise alyuvarlar, akyuvarlar ve pıhtılaşmada rol oynayan trombositlerden meydana gelmiştir.

Kan hücreleri kolaylıkla plazmadan ayrılabilir. Santrafüj denilen cihazlarla yüksek süratle döndürme sağlanarak, kan hücreleri dibe çöktürölüp, plazmadan ayrılır. Kanın vizkozitesi sudan 5-8 defa daha fazladır.

Her gün kanın belli kısmı yenilenir. Yaklaşık % 1 kadar kırmızı kan hücresi ölürken, yerlerine aynı miktar genç hücre kemik iliğinden kana verilir. Plazma miktarı da en ufak bir değışiklikte hemen dengelenir. Bir kan kaybı durumunda vücut denge mekanizmaları ile hemen hacmi sabit tutmaya çalışır. Önce dokulardan kana sıvı geçişı olur. Daha sonra hızla genç alyuvarlar kana verilmeye başlanır. Büyük miktarlarda kanın kaybedildiği durumlarda şok ortaya çıkar. Kaybolan kan yerine konmazsa şok durumu atlatılamaz.

Plazma: Kan plazması, % 91 su, % 8 organik maddeler ve % 1 inorganik maddelerden müteşekkildir. Organik bileşenlerin tamamına yakını, proteindir ve plazma için proteinlerin suda çözünmesiyle meydana gelir. Plazmanın üç temel proteini albumin, globulin ve fibrinojendir. 100 mililitre plazmada 4,5 gr albumin, 2,5 gr globulin ve 0,3 gr fibrinojen bulunur.

Albumin: Proteinlerin en küçük molekülü olanlarından biridir. Kanın osmotik basıncının dörtte üçünü albumin sağlar. Osmotik basınç sayesinde kan-plazma oranı korunur. Albumin karaciğerde yapılır. Karaciğer bozukluğu olanlarda hipoalbuminemi denilen plazma albumin seviyesi düşüklüğü ortaya çıkar.

Globulin: Plazma globulinleri birçok değişik türdedir. Elektroforez metoduyla globulinler alfa, beta ve gamma parçalarına ayrılabilir. Alfa ve beta globulinler çeşitli proteinleri bağlayarak, çeşitli yerlere taşırlar. Gama globulinlerden ise hastalıklarda bağışıklık sağlayan savunma maddeleri yapılır.

Fibrinojen: Kan pıhtılaşma mekanizmasının en son basamağını yapan proteindir. Fibrinojen molekülleri fibrin liflerine dönerek katılışrlar ve pıhtılaşma gerçekleşir.

Proteinlerden başka plazmada alınan gıdaların metabolizma ürünleri olan ürik asit, kreatinin, amino asitler gibi bir takım organik moleküller de bulunur. Diğer organik maddeler ise glikoz, yağlar ve kolesteroldür.

Plazmanın başlıca inorganik bileşenleri elektrolitlerdir. Bunlar sodyum (Na⁺), klor (Cl⁻), kalsiyum (Ca⁺⁺), fosfat (PO₄)⁻³, sulfat (SO₄)⁻² ve magnezyum (Mg⁺⁺)dur.

Alyuvarlar: Kırmızı kan hücreleri kanın hücre kısmının tamamına yakınına meydana getirirler. Kanın her milimetre kübünde yaklaşık beş milyon alyuvar bulunur. Mikroskopta bakıldığında alyuvarlar, ortası çökük tavla pulu şeklinde görülür. Ortalama çapları 7,5 mikron olup, merkezdeki kalınlıkları bir mikrondur.

Hemoglobin: Her kırmızı kan hücresinde oksijen bağlama yeteneğindeki bir proteinli boya (pigment) olan hemoglobin bulunur. Oksijenle dolu olan hemoglobine “oksihemoglobin” denir. Bu, kana parlak kırmızı rengini verir. Dokulara oksijen getirdikten sonra bir miktar karbondioksiti alarak akciğerlere getirir. Buna da “karbaminohemoglobin” denir.

Akyuvarlar: Alyuvarlardan ayrı olarak tam hücre özelliği gösterirler. Bir çekirdekleri ve diğer hücre organelleri vardır. 10-20 mikron çaplarıyla da alyuvarlardan daha büyüktür. Hareketleri amipsi şekildedir. Bir milimetreküp kanda yaklaşık 7000 kadar akyuvar bulunur. Beyaz hücreler ailesinin en önemli fertleri “granüositler” (parçalı nüveliler), “lenfositler” ve “monositler”dir. Akyuvarların % 60-70'ini granüositler, % 30-45'ini lenfositler % 10'dan az kısmını da monositler teşkil eder.

Granülositler de aralarında “nötrofil”, “bazofil” ve “eozinofil” olmak üzere üç çeşide ayrılırlar. Bunların büyük çoğunluğunu nötrofiller teşkil eder.

Beyaz kan hücreleri iki yolla vücudun enfeksiyonlara karşı savunmasını üstlenirler. Granülositler ve monositler mikroorganizmayı yutarak (fagositozla) yok ederken lenfositler antikor meydana gelmesine sebep olarak mikroorganizmaya karşı çalışırlar. Akyuvarların en büyükleri olan monositler de bakteri ve ölü hücre kırıntılarını yerler. Ömürleri çok kısadır. İnsanlarda 4 gündür. Mikrobik hastalıklarda sayıları artar.

Kan pulcukları: Çapları sadece 1-2 mikron olan kanın en küçük hücreleri olan trombositler, pıhtılaşmada önemli rol oynarlar. Kırmızı kemik iliğindeki dev hücrelerin (megakaryosit) parçalanmasıyla meydana gelen oval veya yuvarlak, renksiz ve çekirdeksiz parçacıklardır. Trombosit olarak da bilinirler. Her milimetreküp kanda yaklaşık 150-400 bin trombosit bulunur. Kanda 9 gün sağ kalırlar. Yağ, protein ve karbonhidratlardan başka bir takım enzimleri de vardır. Damar yaralanmalarında, damarın iç yüzüne yapışarak tıkarlar.

Salgıladıkları trombokinaz enzimiyle pıhtılaşmada rol oynarlar. Pıhtı meydana geldiğinde katılarak yaranın ağzını büzerler ve kanamayı durdururlar. Trombositlerin pıhtılaşmadaki çok önemli görevlerinin dışında serotonin, adrenalin, noradrenalin ve histamin maddelerini taşıma vazifeleri de vardır.

Kan yapıcı organlar: Kan yapan organlar olarak, kemik iliği, lenf nodülleri (bezeleri) ve dalak sayılabilir. Ana karnında karaciğer, dalak ve kemik iliği tarafından yapılan akyuvar yapımını doğumdan bir süre sonra tamamiyle kemik iliği üstlenir. Dalak ve lenf bezleri “Lenfatik doku”nun en önemli kısımları olup lenfosit ve monositleri imal ederler.

Lenfatik doku: Bademcikler, timus, barsak mukozasında da bulunmasına rağmen, lenfatik dokunun iki büyük merkezi lenf bezleri ve dalaktır. Bu doku, lenfositleri meydana getiren lenfoblastlar ve monositleri yapan histiositlerden husule gelmiştir. Lenfositlerinden meydana gelen “plazma hücreleri” antikor yapımında görev alırlar.

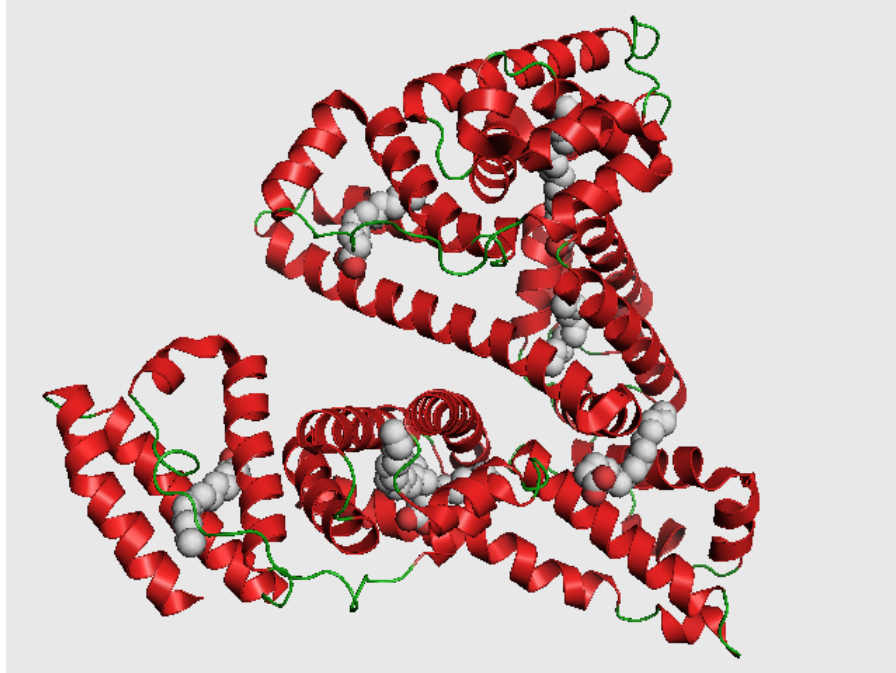
Pıhtılaşma: Damar yaralanmalarında dışarı çıkan kanın, birtakım kimyasal reaksiyonlar sonucu sıvı halden pelte koyuluğuna veya katı hale geçmesine kanın pıhtılaşması denir. Pıhtılaşma sayesinde kan kaybı önlenir.

Pıhtılaşma mekanizması, çok kompleks olmakla beraber olayın son kademesini ve esasını kanda çözünen plazma proteini fibrinojen'in çözünmeyen iplikli yapıdaki Fibrin'e dönüşmesi teşkil eder.

2.3 Albümin

Kısaca albümin diye de bilinen serum albümini, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Albümin şekil 2.1'de gösterilmektedir. Kanda bulunan proteinlerin %60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda gözyaşı, ter, mide suları ve safrada da bulunur. Vücuttaki toplam albüminin %30-40'ı kandadır.

Yağ asitleri ve çeşitli başka maddeleri kanda taşımasının yanı sıra en önemli işlevi, kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktır.



Şekil 2.1 İnsan serum albumininin şematik gösterimi, 6 palmitik asit molekülüne bağlanmış haliyle [2]

Büyük proteinler kılcal damarlardan geçemedikleri için kandaki sıvıların sızma eğilimini dengelerler. Bu yüzden albümin, kılcal damarlardan dokulara su ve suda çözünür maddelerin geçmesine neden olan kolloid osmotik basınç veya onkotik basıncı düzenleyen başlıca proteindir. Osmotik basıncın %70'i albümin tarafından karşılanır, bu yüzden albümin damarların içiyle dışındaki dokular arasındaki sıvının dengelenmesinde gereklidir. Kan protein seviyelerinin düşmesi halinde, örneğin idrara protein geçme (proteinüri) veya kötü beslenmeden dolayı, dokular arasında su birikmesi, yani ödem oluşur.

Albüminin en ilginç özelliği taşıyabildiği maddelerin çeşitliliğidir. Albümin, suda çözünürlükleri düşük olan yağ asitlerinin kandaki başlıca taşıyıcısıdır. Bunun yanı sıra, oksijen serbest radikallerine bağlanarak bunları kontrol altına alır, ayrıca bilirubin (hem molekülünün yıkımı sırasında ortaya çıkar) gibi suda çözünmeyen bazı toksin metabolizma ürünlerine bağlanarak onları zararsız kılar.

Albümin, bir kısmı yüksek konsantrasyonda zehirli olabilecek olan çeşitli metal iyonlarına da bağlanabilir. Pek çok fizyolojik süreçte yer alan nitrik oksit (NO) kandaki başlıca taşıyıcısı da albümindir. Bu maddelere bağlanması sayesinde albümin hem bu maddelerin kandaki konsantrasyonlarını düşük ve zararsız düzeylerde tutar, hem de onların ihtiyaç duydukları yerlere ulaşmalarını sağlar.

Albüminde uzun yağ asidi moleküllerinin (oleik, linoleik, linolenik, arasidonik, palmitik ve miristik asit gibi) bağlanabildiği, ikisi sıkı, dördü gevşek olmak üzere altı bağlanma yeri vardır. Bu yağ asitleri albümin tarafından hücrelere taşınıp oralarda kullanılırlar.

Yağ asitlerinin bağlandıkları yerlerden farklı olarak ayrıca küçük organik iyonların bağlanabildiği de iki yer vardır. Bunlardan biri küçük aromatik karboksilik asitleri tercih eder, öbürü negatif yük içeren çok halkalı bileşikleri tercih eder. Bu yerlerde tiroid hormonu ve diğer steroid hormonlar ve bilirubin taşınabilir. Tedavi amaçla vücuda alınan çoğu ilaç da bir ölçüde buralarda albümine bağlanırlar. Piridoksal (vitamin B6) da albümin tarafından taşınır.

Albümin, bu belirtilen bileşikler dışında çeşitli ağır metal iyonlarına da bağlanarak onların kandaki konsantrasyonunu kontrol eder. Albümin proteininde iki metal iyonu bağlanma yeri vardır ve bunlara çinko, bakır, kadmiyum, cıva, altın, gümüş ve nikel

dâhil olmak üzere çeşitli iyonlar bağlanabilir. Kalsiyum ve magnezyum da albümine bağlandığından albümin bu iki iyonun kandaki konsantrasyonlarına etki edebilir. Albüminin bir diğer özelliği de kan pH'ını kısmen tamponlayabilmesidir.

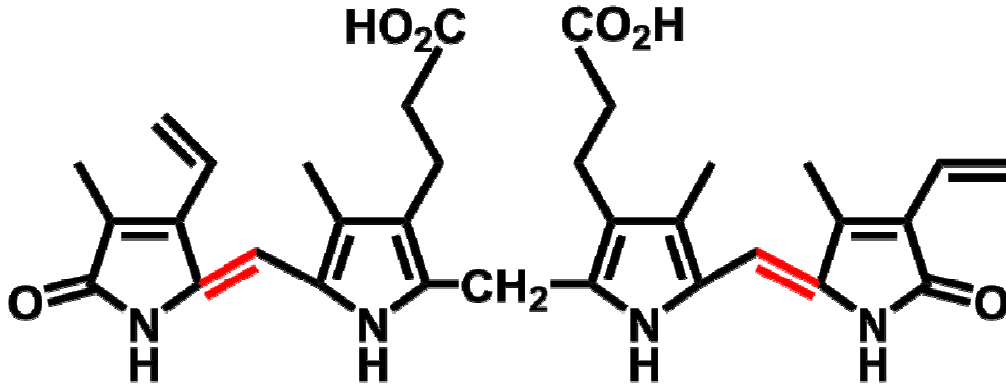
2.4 Bilirubin

Bu kısımda bilirubinin kimyasal özellikleri, fonksiyonları, etkileri, nasıl ölçüldüğü anlatılmıştır.

2.4.1 Bilirubin'in Kimyası

Bilirubin sarı renkte normal hem katabolizması (parçalanması) sonucu oluşan bir üründür. Hem kırmızı kan hücrelerini oluşturan hemoglobinde bulunur. Hemoglobin parçalandığında Hem'e sonrada bilirubine parçalanır. Parçalanan bu bilirubinde karaciğere taşınır. Karaciğer her gün ortalama olarak 300 mg (500 µmol) bilirubin taşınır [1]. Sağlıklı karaciğer 300 mg bilirubini kolaylıkla işleme kapasitesine sahiptir.

Bilirubin dört adet (tetrapyrrole) açık zincirinden oluşur. Şekil 2.2'de de görüldüğü gibi. Ancak bilirubin Hem'de bu dört halka porfirin halkasına bağlıdır. Bilirubin molekülüne benzer moleküller bitkilerde de ışığı algılamak için kullanılmaktadır. Bilirubinde diğerleri gibi ışığa duyarlıdır ve bu nedenle de ışıkla bilirubin izomerize olur. Bu sayede ışık terapisiyle sarılık olan yeni doğmuş bebeklerin tedavisinde kullanılır. Işık tedavisi bilirubini izomerize edip çözünürlüğünü artırır.



Şekil 2.2 Bilirubin Kimyasal Yapısı [1].

2.4.2 Bilirubin Fonksiyonları

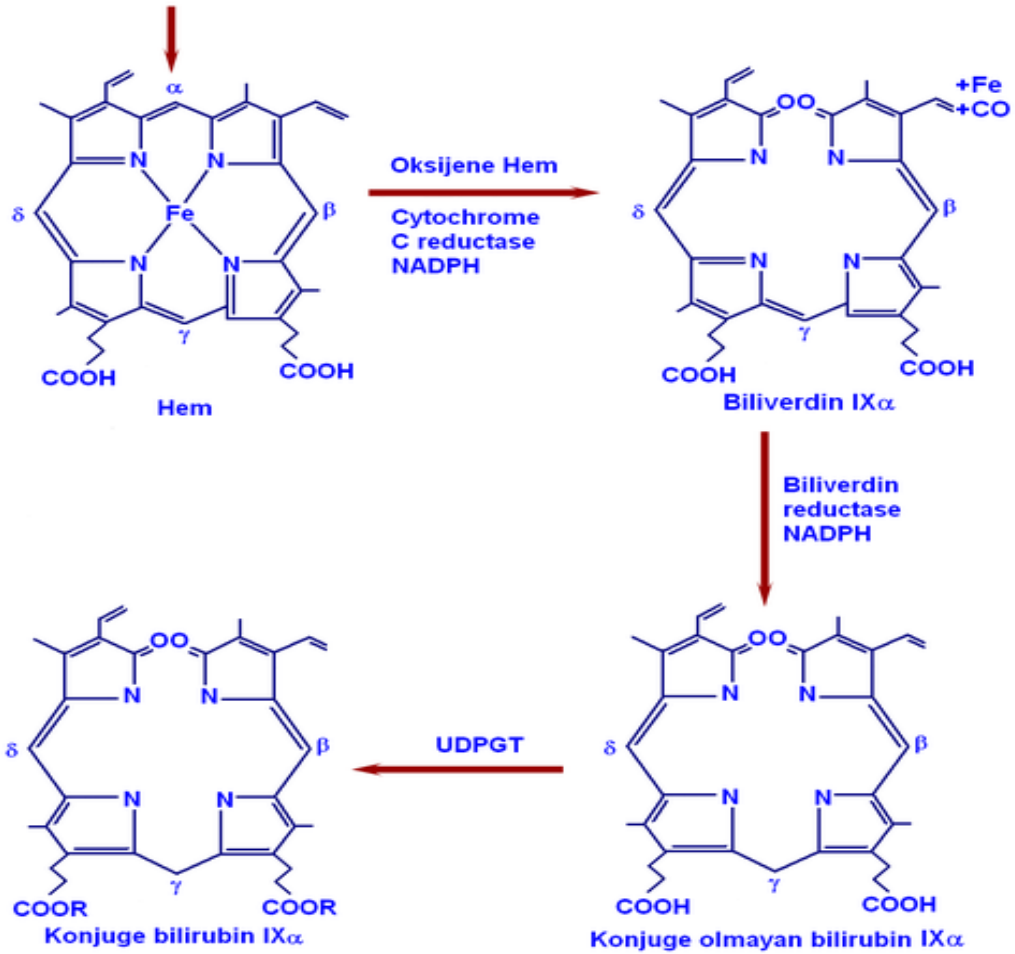
Bilirubin biliriverdinin indirgenmesi işlemi sonucu oluşur. Eğer bilirubin oksitlenirse tekrar biliriverdine dönüşür.

Kemik iliğinde üretilen eritrositler yaşlandığında ya da hasar aldığına dalak tarafından parçalanır. Bu durum ortaya hemoglobinin çıkmasına neden olur. Hemoglobinde parçalandığında Hem ortaya çıkarır. Bu hemler ankonjuge bilirubine dalaktaki makrofaj tarafından çevrilir. Çevrilen bu ankonjuge bilirubin suda çözünmez ancak albümine bağlanarak karaciğere gönderilir.

Karaciğerde bilirubin konjuge olarak glukuronik asite çevrilerek suda çözünmesi sağlanır ardından safraya gönderilir ve buradan ince bağırsağa geçer. Bir kısım konjuge bilirubin kalın bağırsakta kalır ve kolondaki bakteriler tarafından metabolize edilerek önce urobilinojene sonra sterkobilinojene en sonunda da sterkobiline oksitlenir. Dışkıya kahverengi rengini veren sterkobilindir. Ayrıca ara basamakta oluşan urobilinojen bağırsaktan emilir ve idrar yoluyla oksitlenmiş formda urobilin olarak atılır.

Normal olarak çok az miktarda bilirubin idrar yoluyla atılır. Bu durumda idrara açık sarı rengini verir. Eğer karaciğer fonksiyonları azalır ya da safra drenajı tıkanır, bir miktar konjuge bilirubin karaciğer hücresinden dışarı sızıp gider ve idrara karışır. Bu durum idrarda koyu kehribar bir renk verir.

İdrardaki konjuge bilirubin klinik olarak analiz edilebilir. Ancak bu hemolitik anemi (kırmızı kan hücrelerinin artması) kandaki ankonjuge bilirubini artırır fakat ankonjuge bilirubin suda çözünmez. Bu nedenle karaciğer veya safra sistemlerinde herhangi bir anormallik yoksa idrardaki bilirubin miktarı değişmez. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi normal işlemlerden geçerek oluşan üronobilinojen bu durumda artar. Bu sayede idrardaki bilirubin ve urobilinojen miktarları ölçülerek farklı bölgelerdeki hastalıklar ayırt edilebilir.



Şekil 2.3 Bilirubin Dönüşümü [1]

2.4.3 Bilirubin Toksik Etkisi ve Kan Testleri

Yeni doğan bebeklerde ankonjuge hyperbilirubinamia beynin belli bölgelerinde bilirubin birikimine neden olur. Bu durum kernikterus olarak da adlandırılır ve bunun sonucunda beynin ganglionlarında bilirubinin etkisiyle zekâ geriliği, nöbetler, anormal refleksler ve göz hareketliliğine neden olur. Bu hastalığın yeni doğanlarda oluşmasının nedeni kan beyin bariyerinin tam olarak gelişmemesi ve bilirubinin rahatlıkla beyin interstitiumuna geçmesidir. Yetişkin kişilerde bu durum gerçekleşmez.

Spesifik kronik hastalıklar dışında da yeni doğan bebeklerde hyperbilirubinaemia riski daha yüksektir. Bunun nedeni yenidoğan bebeklerle bağırsakta bulunan bakterilerin henüz oluşmamasından dolayı konjuge bilirubinin parçalanamamasıdır. Parçalanmayan konjuge bilirubin β -glukoronidase enzimiyle ankonjuge hale gelir ve yüksek miktarı tekrar emilir.

Bilirubin ışıkla parçalara ayrılmaktadır. Bu nedenle kan toplama tüpleri ışığa maruz bırakılmamalıdır. Bilirubin kanda iki formda bulunur:

1) Konjuge (direkt bilirubin) ve

2) Ankonjuge (indirekt bilirubin).

Konjuge bilirubin glikoronik aside bağlanabilir. Ayrıca boyar maddeler (diaz) kana eklendiğinde hızlı bir şekilde tepkimeye girer ve azobilirubini oluşturur. Buna karşılık ankonjuge bilirubin çözülebilir değildir ve yavaş reaksiyona girer yine azobilirubini oluşturur.

Etanol her iki bilirubinde reaksiyonunu hızlandırır. Toplam bilirubin, konjuge ve ankonjuge bilirubinlerin toplamıdır. Toplam ve direkt bilirubin seviyeleri kandan ölçülebilir buradan da indirekt bilirubin hesaplanabilir. Ayrıca indirekt bilirubin suda çözünmez yağda çözünür [3 - 5].

İlk olarak bilirubin Van den Bergh reaksiyonu ile niteliksel olarak ölçülmüştür. Toplam bilirubin 2,5 dichlorophenyldiazonium metoduyla, direkt bilirubin ise Jendrassik and Graf metoduyla ölçülebilir [6].

Bilirubin ölçümünün farklı metotları vardır. Bilirubinün kandaki seviyesinin hangi aralıkta normal kabul edileceği halen tartışma konusudur. Bu konuda farklı çalışmalar vardır [7 - 11]. Bu çalışmalarda normal kabul edilen değerler tablo 2.1 verilmiştir.

Çizelge 2.1 Normal Kabul Edilen Bilirubin Seviyeleri [7,8,9]

| | µmol/L | mg/dL |
|------------------|---------------|--------------|
| total bilirubin | 5.1 - 17.0 | 0.1 - 1.9 |
| direkt bilirubin | 1.0 - 5.1 | 0 - 0.4 |

Bilirubin vücudun ürettiği ancak dışarı atılan bir maddedir ve seviyesi yetişkin ve bebeklerde farklılık göstermektedir. Buna rağmen hastalıkların teşhisinde kandaki bilirubin seviyesi önem taşımaktadır.

Bilirubinün az miktarda yükselmesi hemoliz ya da Gilbert sendromundan kaynaklanmaktadır. Bilirubinün orta seviyede yükselmesi ise çeşitli ilaçlardan, hepatit, kemoterapi, safra yollarının daralmasından kaynaklanmaktadır. Bilirubinün yüksek seviyede yükselmesi ise yeni doğan karaciğer fonksiyon bozukluğu, safra yollarının tıkanması, ciddi böbrek yetmezliği veya sarılık, hepatit, Cigler-Najjar sendromu, Dubin-Johnson sendromu, safra kanallarında bir veya daha fazla taş bulunması hali (Cholelithiasis) hastalığından kaynaklanmaktadır.

Siroz hastalığında normal, yüksek veya çok yüksek seviyede bilirubin kanda bulunabilir. Bilirubin siroz hastalığının özelliğine bağlıdır.

Bilirubin artışının nedenini anlamak için diğer karaciğer fonksiyonlarının testlerinin yapılması faydalı olabilir. Özellikle alanintransaminiz, aspartat transaminiz , gamma glutamil transpeptaz, alkanin fosfotaz enzimleri ile hemoliz enfeksiyonel sarılık testleri yapılmalıdır. Ayrıca idrardaki bilirubinde ölçülebilmektedir.

Bilirubin seviyesindeki farklılık göz beyazında ve deriden anlaşılabilir. Bilirubinden dolayı oluşan sarılık bilirubin konjuge mi ankonjugemi olduğuna bağlı olarak sınıflandırılır. Konjuge sarılık ve ankonjuge sarılık olarak adlandırılır.

2.4.4 Bilirubin Ölçüm Cihazları

Bilirubin ölçüm cihazları üç ana katagoriye ayrılabilir.1) El tipi ölçüm alan invazif olmayan okumaları deri veya deri içinden ölçen cihazlar. 2) Kan gaz analizörü : Bu cihazlar kimyasal tepkime olmadan ışık yoluyla ölçüm alırlar. 3) Laboratuar analiz cihazları: Kan veya serumdaki toplam bilirubini kimyasal reaksiyonlardan sonra fotometrik yolla ölçen cihazlardır.

Bu üç ana kategorideki cihazlar farklı metotlarla ölçüm alabilirler. Ayrıca rutin laboratuar ölçüm metotlarında ulaşılan serumdaki toplam bilirubin seviyesi farklılıklar göstermektedir [3]. Bu nedenle farklı cihazların özellikleri belirtilmiştir. Bu cihazların ölçüm maliyetleri ortalama 10 ölçüm için 5.00 \$ civarındadır [33].

2.4.4.1 Deri Test Cihazları

Bilirubin ölçümü bu cihazlarda sternumun alt kısmından yapılmaktadır. Burada kullanılan metod, bilirubin konsantrasyonunun derinin optik yoğunluğunun farklı dalga boylarında ölçülerek tahmin edilmesidir. Bunlara örnek olarak Biliblitz JM-102,103 ve Bilicheck analizör örnek verilebilir. Bu cihazların dezavantajı her seferinde kalibre edilmesi gereksinimidir. Ayrıca bazı cihazlar içinde deneylerin tekrar edilmesi gerekmektedir. Biliblitz JM-102 için bilirubin ölçüm hassasiyeti 34 $\mu\text{mol/L}$ 'de %87.5,

Biliblitz JM-103 için 34 $\mu\text{mol/L}$ 'de %84.3 ve Bilicheck analizörü için 34 $\mu\text{mol/L}$ 'de %86.9 olarak bulunmuştur [3].

2.4.4.2 Kimyasal Olmayan Fotometrik Cihazlar

Bu cihazlara örnek olarak Twin Beam, ABL 735 ve Roche OMNI S verilebilir. Bu cihazlardan ABL 735 ve Roche OMNI S kandan toplam bilirubin seviyesini, Twin Beam cihazı ise plazmadan bilirubin seviyesini ölçmektedir.

Twin Beam analizör cihazı bilirubin seviyelerini ölçerken 455 ve 575 nanometrelik iki farklı dalga boyunda ölçüm almaktadır ve örnekler santrifüje tabi tutulmaktadır. ABL 735 cihazında ise spektrometrik olarak 478 ile 672 nanometre arasında 128 farklı okuma olarak bilirubin seviyesini ölçmektedir.

Roche OMNI S cihazı ise 460 ile 660 nanometre aralığında 512 okuma olarak bilirubin seviyesini bulmaktadır. ABL 735 ve Roche OMNI S cihazlarında kan örnekleri ölçümden önce ultrasonik olarak hemoliz edilmektedir. Twin Beam için bilirubin ölçüm hassasiyeti 34 $\mu\text{mol/L}$ 'de %100, ABL 735 için 34 $\mu\text{mol/L}$ 'de %90.3 ve Roche OMNI S için 34 $\mu\text{mol/L}$ 'de %89.9 olarak bulunmuştur [3].

2.4.4.3 Laboratuvar Analizörleri

Bu cihazlara örnek olarak Hitachi 912, Dimension RXL ve Vitros 250 örnek verilebilir. Bu cihazlar klinik amaçlı olarak kullanılan kimyasal analizleri yaparlar. Hitachi 912 ve Dimension RXL diazo metodu kullanırken Vitros 250 cihazı ise doğrudan spektrometrik metodu kullanır. Hitachi 912 için bilirubin ölçüm hassasiyeti 341.3 $\mu\text{mol/L}$ 'de %99.4, Dimension RXL için 349.3 $\mu\text{mol/L}$ 'de %99.4 ve Vitros 250 için 337.2 $\mu\text{mol/L}$ 'de %99.3 olarak bulunmuştur [3].

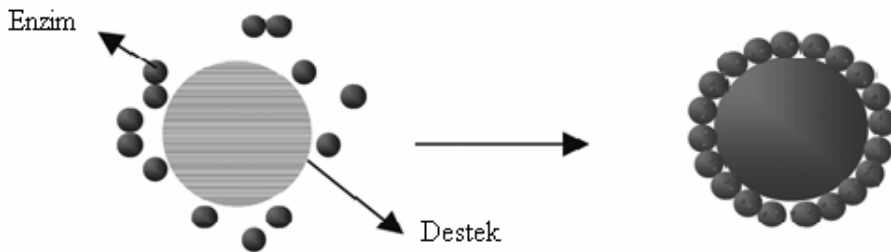
2.5 İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensör biyolojik veya fizyokimyasal bileşenler bir arada tutabildiğinde daha iyi çalışırlar. Bu bir arada tutma, analitin biyolojik bileşene ulaşabildiğinde ve etkileşimin korunabildiği durumlarda sağlanır. Genel olarak biyolojik bileşenler çeviriciye düzgün bir şekilde immobilizasyon yöntemiyle tutunması sağlanır.

İmmobilizasyon yöntemi biyolojik bileşenin yapısına bağlıdır. Ayrıca kullanılacak çeviricinin özellikleri ve analitin fiziksel özelliklerinde önemli faktörler arasındadır. İmmobilizasyon metotları beş ana dala ayrılabilir. Bunlar adsorbsiyon, mikrokapsilasyon, tutuklama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama olarak ayrılır.

2.5.1 Adsorbsiyon

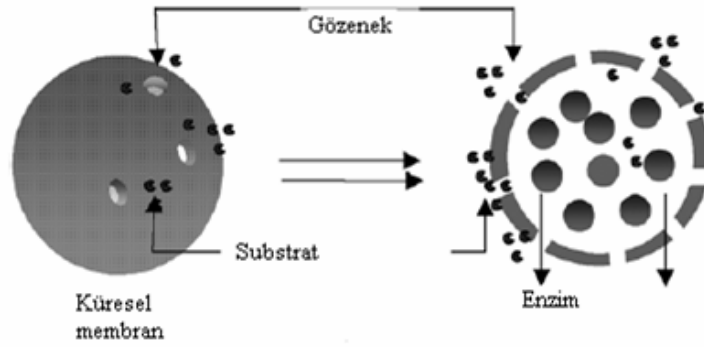
Adsorbsiyon fiziksel ve kimyasal adsorbsiyon olarak ikiye ayrılır. Fiziksel adsorbsiyon genellikle zayıf bir bağdır ve Vander Walls bağları ya da hidrojen bağları ile kurulur. Kimyasal adsorbsiyon ise daha güçlüdür ve kovalent bağlarla yapılır. Ancak adsorbe edilen biyomateryal ph, sıcaklık, iyonik güçlükler gibi dış etmenlere maruz kalarak biyolojik etkinlikleri azalır. Bu nedenle kısa süreli deneylerde tercih edilmelidir. Bu yöntemin avantajları temizleme basamağının olmaması, enzimlerin kesintiye uğramasının az olması ve ayıraç (reagent) kullanılmamasıdır [12]. Bu durum şematik olarak Şekil 2.4'te gösterilmiştir [31].



Şekil 2.4 Adsorpsiyon Şematik Gösterimi.

2.5.2 Mikrokapsülasyon

Biyobileşenler mikrokapsülasyon yönteminde tepkimeye girmeyen bir membran tarafından tutulur. Genellikle kullanılan membranlar selüloz asetat (proteinlerin filtrelenmesinde ve karışan türlerin taşınmasının yavaşlatılmasında) polikarbonat ve politetrafloraetilen'dir. Bu yöntemde enzimlerle çeviricinin çok yakında bulunmasına gerek yoktur. Enzimin güvenilebilirliği, safsızlığı ve bozunması gömülü bir cihaz tarafından sağlanır. Mikrokapsülasyon yöntemi, geçirgenliği olan gaz molekülleri içinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Bu yöntemin dezavantajı ise membrandan geçebilen küçük analitlerin algılanmasında kullanılmasıdır [12]. Bu durum şematik olarak Şekil 2.5'te gösterilmiştir [31].

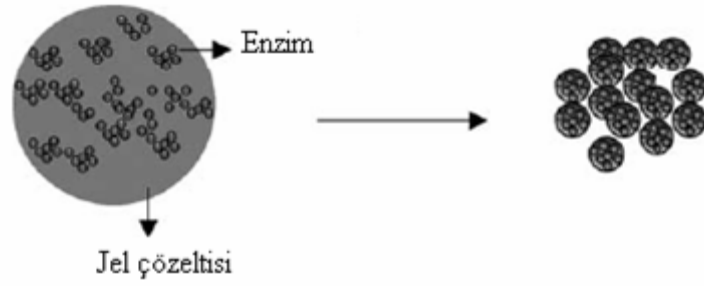


Şekil 2.5 Mikrokapsülasyon Şematik Gösterimi.

2.5.3 Tutuklama

Tutuklama yöntemi biyobileşenin monomer çözelti içinde süspanse edilmesidir. Bu durumda jel formda polimerize edilerek biyobileşen tutuklanır. Ancak bu yöntemin bazı problemleri vardır. Bu problemler substrat difüzyonunu engelleyen büyük bariyerlerin oluşmasını ve jeldeki porlardan dolayı biyoaktivitenin kaybıdır. Bu sorunlar çapraz bağlamayla giderilebilir.

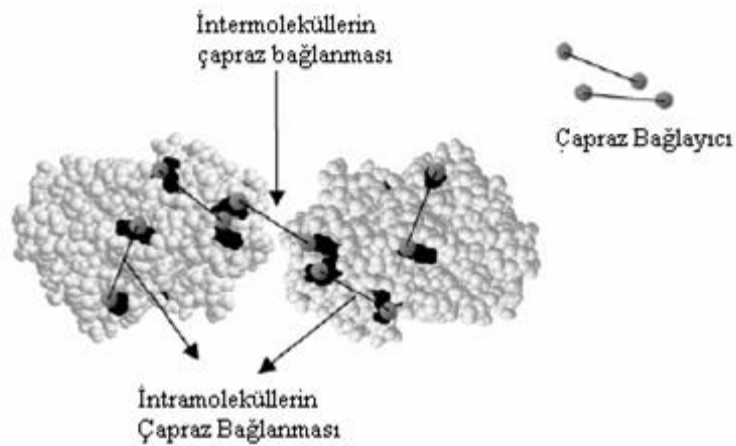
Tutuklama yönteminde genellikle kullanılan jeller polyakrilamide, nişasta, naylon, silika türevleridir[12]. Bu durum şematik olarak Şekil 2.6'da gösterilmiştir [31].



Şekil 2.6 Tutuklama Şematik Gösterimi.

2.5.4 Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama iki fonksiyonlu ajanları kullanarak enzimlerin sabit moleküllere bağlanmasıdır. En çok kullanılan materyaller gluteraldehit, 1.5 dinitron-2.4 diflorobenzen ve hekzametil disokrilat'dır. Bu yöntemde faydalı bir metod olarak adsorbe edilen enzimlerin stabilize edilmesidir. Bu yöntemde de tutuklama gibi difizyon limiti ve biyomalzemenin zarar görmesi gibi sorunlar vardır. Ayrıca mekanik gücünde zayıftır [13]. Bu durum şematik olarak Şekil 2.7'da gösterilmiştir [31].



Şekil 2.7 Çapraz Bağlama Şematik Gösterimi

2.5.5 Kovalent Bağlama

Kovalent bağlama biyomateryalin fonksiyonel grubunun destek matrisine bağlanmasıdır. Bu metotta nükleofilik gruplar (NH_2 , CO_2 , OH , $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$, SH ve imidazol) bağlama için kullanılır. Genel olarak kovalent bağ kullanan ajanlarla gerçekleştirilen immobilizasyon teknikleri proteinler için geçerlidir. Bu durumda immobilizasyon kalıcı olmakta destekten proteinin uzaklaştırılması bir problem teşkil etmektedir. Bu yöntemin dezavantajı ise kovalent bağın bir veya birden çok fonksiyonel bağlantının kaybına sebep olmasıdır [32]. Bu kovalent bağların biyosensörlerdeki bağlantı süreleri 4 ile 14 ay gibi çok uzun bir süredir.

2.6 Kuartz Kristaller

Bu kısımda kuartz kristallerin piezoelektrik etkide kullanılması, çalışma modları, elektrokimyasal kullanımı, kesme dalgasının sönümlenmesi, rezonans durumu, ağırlık ölçümünde kullanımından bahsedilmiştir.

2.6.1 Piezoelektrik Etki ve Kuartz Kristallerde Kullanımı

Piezoelektrik ile ilgili sıvılarda ilk gözlemler Jaques ve Pierre Curie tarafından 1980 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada bazı kristallerin yüzeylerine mekanik olarak bir kuvvet uygulandığında kristal yüzeylerinin arasında elektriksel potansiyel farkın olduğu gözlemlenmiştir [13].

Daha sonraki çalışmalarda kristalin iki yüzeyi arasında uygulanan elektriksel gerilimin kristalde boyut değiştirdiği gözlemlenmiştir. Bu durumda kristal içinde gerilim değiştirilerek bir titreşim yaratılabilir. Bu titreşimin frekansı o kristalin rezonans frekansı olarak tanımlanır. Bu özelliği gösteren çeşitli quartz, turmalin, amonyum, dihidrojen fosfat, etilen, tartarat, daimin ve baryum titanat gibi kristaller bulunmaktadır.

Pratikte en yaygın olarak kullanılan piezoelektrik ise kuartz'dır. Kuartz doğal veya sentetik yollarla elde edilebilir. Suda çözünmez ve sıcaklığa dayanıklıdır. Bu kristal piezoelektrik uygulamalarda kullanılırken malzeme iki metal elektrot arasına yerleştirilir. Bu sayede mekanik salınım elektriksel gerilime çevrilir. Bu durumda kuartz kristallerle almaç tasarlanıp çeşitli ölçümler yapılabilir. Bu almaçlardan biride kuartz kristal mikrobals (QCM) olarak adlandırılır.

QCM birim alandaki kütleyi kuartz kristalin frekans değişiminin ölçülmesiyle bulur. Kristalin rezonans frekansı yüzeyindeki eklenen veya azalan kütleyle ilgili olarak değişir. Bu sayede QCM gaz ölçümlerinde ve sıvı ölçümlerinde kullanılabilir. Sıvı ölçümlerinde protein moleküllerinin varlığı yüzeydeki algılama bölgelerine çekildiğinde rahatlıkla algılanır.

Ayrıca daha büyük virüs ya da polimer içinde kullanılabilir. Bu yöntem biyomoleküllerin birbiriyle etkileşimini gözlemlemek için kullanılmıştır.

QCM uygulamalarında, yüksek doğrulukta frekans değişimi ölçülmektedir. Yapılan doğru ölçümle $1\text{ng}/\text{cm}^2$ 'ye kadar kütle yoğunluğu ölçümleri gerçekleştirilebilir. Ayrıca frekans gibi yayılma parametresi ölçülebilir ve örneğin viskoelastik özellikleri bulunabilir.

Kuartz bu uygulamalarda akustik rezonansın elektriksel rezonansa çevrilmesini sağlar. Burada kuartz kristale değişken bir akım uygulanarak osilasyonlar yaratılır ve sabit bir kesme dalgası oluşturulur. Bu osilasyonun kalite faktörü (merkez frekansın bant genişliğine oranı) 10^6 kadar yüksektir.

Kalite faktörünün yüksek olması osilasyonun sabit olmasını ve yüksek doğrulukta bulunmasını sağlar. Genellikle 4-6MHz arasında çalışan QCM'ler için 1Hz çözünürlükte ölçümler yapılabilir. Bu ölçümlerde frekans algılayıcı cihaz, osilasyon kaynağı, ölçüm ve kayıt cihazları, tutma ünitesinden oluşur.

Kuartz kristalin osilasyon frekansı kristalin kalınlığına bağlıdır. Bu nedenle kalınlıktaki herhangi bir değişim osilasyon frekansını da değiştirir. Eğer ölçülecek kütle kristalin yüzeyine bağlanırsa kalınlık artacak ve osilasyon frekansı da düşecektir. Bu bağıntı Sauerbrey tarafından bulunmuştur [14]. Bu bağıntı Denklem (2.1) de verilmiştir.

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = \frac{-2f_0^2}{A\rho_q v_q} \Delta m \quad (2.1)$$

Burada;

f_0 kristalin rezonans frekansı,

A kristalin elektrotlar arasındaki hareketli alanı,

ρ_q kuartzın yoğunluğu,

μ_q kayma genliği(katsayısı),

v_q kuartzdaki kayma dalga hızıdır.

Sauerbrey eşitliği sayesinde QCM sensörü üzerinde kütlede ($\Delta m(g)$) oluşan değişiklikler Δf (Hz) frekans değişimleri şeklinde hesaplanabilmektedir.

2.6.2 Ağırlık Ölçümüne Dayalı ve Dayalı Olmayan QCM

Quartz kristaller kullanılarak mikro ağırlık ölçümü ile ilgili bir çok uygulama yapılmıştır[15]. Buna dayalı birçok ticari cihaz geliştirilmiştir. Bu cihazlarda Sauerbrey'in geliştirdiği yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde, ince filmlerde rezonans frekansı ile toplam katman kalınlığı ters orantılıdır. Ancak tabaka katmanı kalınlaştığında viskoelastik etkilerde devreye girmektedir.

1980'lerin sonunda QCM'ler sıvılar içinde kullanılmaya başlanmıştır [16]. Burada viskoelastik etmenler rezonans durumunu etkilemektedir. Bu sayede viskozite ve viskoelastik özelliklerde ölçülebilmektedir. Bu ölçümlerde kütleyle bağlı olmayan ölçümler kullanılmıştır.

2.6.3 Rezonans Kristalleri

QCM ilk geliştirildiğinde doğal kristaller kullanılmaktaydı. Ancak günümüzde bu kristaller laboratuvar ortamında yaratılmaktadır. Bu kristaller farklı kalınlıklarda yapılarak 1-30MHz arasında üretimi yapılabilmektedir [17].

Elektromekanik kuplaj, QCM'de ince bir piezoelektrik plaka, buharlaştırılmış metal ile iki yüzeye kaplanır. Bu sayede piezoelektrik etki AC voltajı uygulanmasıyla kesme deformasyonu oluşur. Ayrıca bu durumun terside geçerlidir.

2.6.4 Kesme Dalgasının Sıvı ve Gazlarda Sönümlenmesi

QCM gibi birçok akustik dalga temelli algılayıcılar kesme dalgalarını kullanır. Kesme dalgaları sıvı ve gaz ortamında hızlı bir şekilde sönümlenir. Basınç dalgası ise hacimsel olarak yayılır ve kristalin hücre duvarlarından yansır. Bu yansımalar kesme dalgasından kaynaklanmaz. 5Mhz'lik bir kesme dalgası yaklaşık olarak suda 250nm'ye kadar yol alır. Buda QCM alıcısının sadece yüzeye bağlı olmasını sağlar. Ayrıca sıvı ve gazların kesme akustik empedansları küçüktür ve salınımları zayıf bir şekilde sönümlendirir.

2.6.5 Çalışma Modları

En ekonomik QCM uygulamaları osilatör devreleriyle gerçekleştirilmektedir [18]. Ayrıca empedans analizi ve sönümlenme analizi kullanılabilir. Empedans analizinde elektriksel iletkenlik empedans ölçer yada network analizörü ile ölçülür. Bu ölçümler iletkenlik eğrisi ile rezonans eğrisi ilişkilendirilerek ölçümler yapılır.

Sönümlenme analizinde ise elektrotlar arası voltaj, uyarma voltajının kapatılmasından sonra ölçülür. Ölçülen voltaj sönümlenen bir sinüzoidal dalgadır. Bu sönümlenen sinüzoidal dalgadan periyot ve sönümlenme katsayısı bulunarak rezonans parametreleri elde edilebilir.

2.6.6 Elektrokimyasal QCM

QCM yüzey analitik cihazlarla birleştirilerek kullanılabilir. Bunlar elektrokimyasal QCM olarak adlandırılır [19]. Bu tip QCM'lerin kullanılmasıyla elektrokimyasal reaksiyona giren ve yüzeye bağlanan miktar ölçülebilir. Bu sayede QCM'ler farklı biyosensör uygulamalarında da kullanılabilir.

3. DENEY AŞAMALARI

Bu kısımda deneyin gerçekleştirilme aşamaları ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Bunlar deneyde kullanılan malzemelerin hazırlanması, ara aşamalar ve ölçüm aşamalarından oluşmaktadır.

3.1 Deneyde Kullanılan Materyaller

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve Sigma Aldrich, Aklar Kimya ve Kartal Kimya firmalarından sağlanmıştır.

Deneylerde kullandığımız kimyasallar; Saf aseton (CH_3COCH_3 , Aklar Kimya, Türkiye), metanol (CH_3OH , Aklar Kimya, Türkiye), NaOH (Sodyum hidroksit, Sigma Aldrich, ABD), sistamin (Sigma Aldrich M9768-5G, ABD), glutaraldehit (Sigma Aldrich G5882, ABD), sığır albumini (Sigma Aldrich A7906-10G, ABD), Bilirubin (Sigma Aldrich 14370-1G, ABD), saf su (Kartal Kimya,Türkiye) ilgili yerlerden temin edilmiştir.

Deneyi yapmamızda yardımcı olan araç ve gereçler; kuartz kristal (Tic,10Mhz), ultrasonik yıkayıcı (Bandelin Sonorex, Almanya), hassas terazi (Sartorius, Almanya), etüv (Termal, İstanbul), phmetre (Sartorius, Almanya), kristallerin üzerindeki metali kesmek için kullandığımız bataryalı kesici (Dremel, Almanya), Başkent Üniversitesi Yüksek Lisans Öğrencisi Erhan Ermeğen tarafından tasarlanan osilatör ve frekans sayacı (Escort EFC3201), manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya) dır. Bunların haricinde deneyimizi gerçekleştirirken pipet, balon joje, beher, balık ve su ısıtıcısı kullanılmıştır.

3.2 Deneysel Yöntem

Yapılan çalışmada daha önce anlatılan immobilizasyon yöntemlerinden çapraz bağlama yöntemi ve kovalent immobilizasyon tercih edilmiştir. Böylece kuartz kristalin yüzeyine albümin çapraz bağlanmayla tutturulmuştur. Sunulan araştırma

kapsamında kuartz kristallerin yüzeyine albümin etkileşimi yapıp, ortaya çıkan frekans değişiminden yararlanarak bilirubin ölçümü yapılması hedeflenmektedir.

Deneyimize başlamadan önce kuartz kristallerin elektrot kısımlarının ortaya çıkması için metal kılıflarının kesilerek çıkarılması gerekmektedir (Şekil 3.1,Şekil 3.2).



Şekil 3.1 Metal Kılıfların Kesilmesi



Şekil 3.2 Metal Kılıfın Çıkarılmış Hali

3.2.1 Kristallerin Temizlenmesi

Kristallerin üstünde bulunan metal kılıflar kesilirken, kristallerin üzerinde bir miktar metal tozu ve kir yapışmaktadır. Kristallerden bu parçacıklar uzaklaştırmak için elektrot yüzeyinin temizlenmesi gerekmektedir. Kuartz kristalleri temizlemek için kullanılan birçok yöntem vardır. Davis ve Leary temizleme yöntemi bunlara örnek gösterilebilir. [30]

Kristallerin temizliğini yapmak için öncelikle metal kılıfı kesilmiş kristaller, aseton ve metanol içerisinde 30'ar dakika bekletilmiştir. Aseton ve metanol içerisinde bekletilen kristaller ardından saf su kullanılarak yıkanmıştır. Bu işlemin sonunda hem kristallerin fiziksel olarak tutunan metal tozlarından arındırılmış hem de kristal üzerinde OH gruplarının oluşması sağlanmıştır.

Kristallerin yüzeyinin su seven (hidrofilik) olması amacıyla 30 dakika 0.5M NaOH 'a maruz bırakılmıştır. Bu işlemin ardından kristaller ultrasonik yıkayıcıda 3 dakika yıkanarak temizlenmiştir (Şekil 3.4). Bu temizleme işleminden sonra kristal üzerine fiziksel olarak tutunan moleküller uzaklaştırılmıştır. Bu basamaktan sonra kristaller etüv'de 20 dakika süreyle 30⁰C'de kurutulmuştur. Kristallerin temizlenmesi için kristalin gümüş elektrotlarına hangi çözeltiler uygulandığı şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Kristallerin Temizlenmesinin Şematik Gösterimi [26]



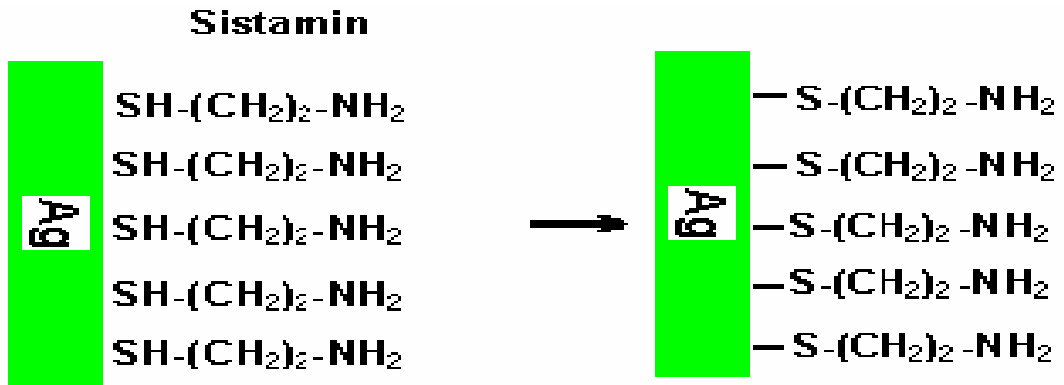
Şekil 3.4 Kristallerin Ultrasonik Banyoda Temizlenmesi

3.2.2 Sistamin İmmobilizasyonu

Kuartz kristallerin temizliği yapıldıktan sonra kristallerin üzerine sistamin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Sistamin molekülü amin (NH₂) ve tiyol (SH) adı verilen iki fonksiyonel grup içermektedir. Sistamin, kuartz kristalin gümüş kısmına tiyol ucundan tutunmuş ve amin ucu ise başka bir bağ yapmak üzere kalmıştır. Bu işlemden sonra 20mM sistamin, 0.1M ve ph=7'de fosfat tamponunda çözmüştür. Kuartz kristaller 30 dakika boyunca karanlık ortamda bu çözelti ile reaksiyona sokulmuştur. Bu işlemin sonucunda kristaller ultrasonik yıkayıcıda 3 dakika yıkanmış ve etüv'de 20 dakika 30⁰C'de kurutulmuştur.



Şekil 3.5 Karanlık Ortamda Kristallere Sistamin İmmobilizasyonu

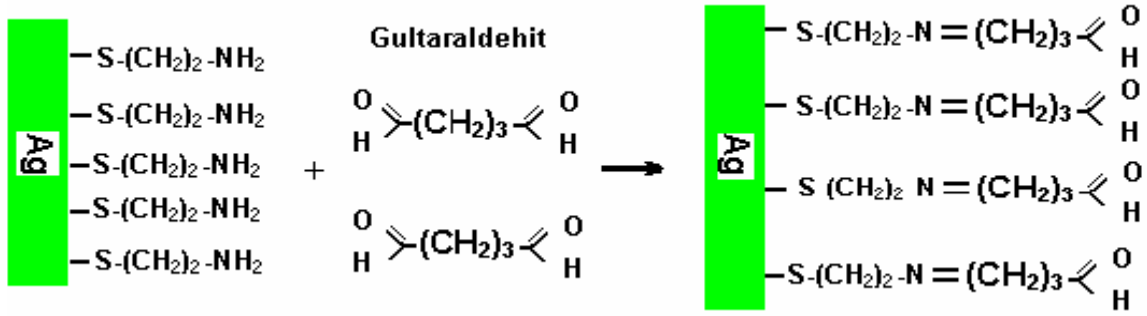


Şekil 3.6 Sistamin İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi [26]

3.2.3 Gluteraldehit İmmobilizasyonu

Sistamin immobilizasyonu yapılmış olan kuartz kristallerin üzerine bifonksiyonel özellikte olan gluteraldehit uzatma kolu (spacer arm) olarak takılmıştır (Şekil 3.7). Bunu gerçekleştirmek için sistamin immobilize edilmiş kuartz kristal üzerine 0.66M

gluteraldehit sodyumtetraborat/HCL tamponuna (ph=8.2) karanlık ortam içerisinde reaksiyona sokulmuştur. Bu işlemin sonucunda sistaminin serbest amin ucuna gluteraldehit'in aldehit uçları kovalent olarak bağlanmıştır. Kuartz kristaller ultrasonik yıkayıcıda 3 dakika yıkanmış ve etüv'de 20 dakika süreyle 30⁰C'de kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.7 Gluteraldehit İmmobilizasyonunun Şematik Gösterimi [26]

3.2.4 Albümin İmmobilizasyonu

Sistamin immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuartz kristaller üzerine uzatma kolu takıldıktan sonra (ph=7,4) fosfat tamponu içerisinde 2mg/ml albümin çözülmüştür. Kuartz kristaller karanlık ortamda 1 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. Bu işlemin ardından kuartz kristaller ultrasonik yıkayıcıda 3 dakika yıkanmış ve etüv'de 20 dakika boyunca 30⁰C'de kurutulmuştur. Bu basamakların sonunda kuartz kristallerin frekansları ölçülmüştür.

3.2.5 Bilirubin ve Albümin Etkileşimi

Kuartz kristal üzerinde albümin ile bilirubin arasındaki etkileşim önemlidir. Bu çalışmada amacımız kuartz kristaller üzerine albümin tutturulması ve ardından bilirubin miktarının ölçümünün gerçekleştirilmesidir.

Albümin ile bilirubin arasındaki etkileşim Chen ve arkadaşları tarafından incelenmiş ve deneysel sonuçlardan bilirubin ile albümin arasında güçlü bir etkileşim olduğu bulunmuştur[20]. Etkileşimin mekanizması statik Van der Waals kuvvetlerine ve hidrojen bağlarına bağlıdır. Albüminin ligant bağlarını yaptığı yerler hidrofobik

boşluklardaki 11A ve 11A alt bölgeleridir [20,21]. Daha önceki çalışmalarda Bilirubin 11A alt bölgesine bağlanmıştır [22]. Bu bağlantı Bilirubin ile albümin arasında kovalent olmayan kuvvetler (hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimi ve hidrofobik etkileşim) sayesinde kararlı hale gelir [23,24].

3.2.6 Bilirubin Ölçüm Aşamaları

Deneylerde fosfat tamponunda $\text{pH}=7,4$ 'te çözülmüş 2.0mg/ml albümin 30 dakika oda sıcaklığında kuartz kristallerle etkileştirilmiştir. Bu sürenin sonunda albümin immobilize kristaller 3 dakika ultrasonik yıkayıcıda yıkanmıştır.

Albümin immobilize edilmiş kuartz kristalleri, miktarları 1 mg/ml, 2mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml olacak şekilde fosfat tamponu içerisinde ($\text{pH}=7.4$) karanlık ortamda 1 saat boyunca reaksiyona sokuyoruz. Bu işlemin ardından kuartz kristaller 3 dakika ultrasonik yıkayıcıda yıkanmış ardından etüv'de 20 dakika 30°C 'de kurutulup frekansları ölçülmüştür.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

Deneyde Tic marka 10Mhz'lik kuartz kristal kullanılmıştır. Kuartz kristallerin metal başlıkları çıkarılmadan ve çıkarıldıktan sonra frekansları ölçülmüştür. Bu işlemlerin ardından 3. ölçüm aseton, metanol ve 0.5 M NaoH sonrası yani kristallerin temizliği sonrası alınmıştır. Bir sonraki ölçüm aşamamız sistamin ve glutraldehit immobilizasyonu sonrası alınmıştır. Bu işlemin ardından albümin immobilizasyonu sonrası ölçüm alınmıştır. Son aşamamız bilirubin ölçümünde kuartz kristallerin frekans değişimine bakılmıştır.

Kuartz kristalin çalışma prensibine göre; eğer kristalin yüzeyine bir kütle tutunmuş ise frekans da düşme olması gerektiği, kütle tutunmamış ise frekansın değişmemesi gerektiğini biliyoruz. Bu prensipten yola çıkarak sonuçlar yorumlanmıştır.

Çizelge 4.1 Metal Başlıklı ve Metal Başlıksız Olarak Yapılan Ölçümlerde Elde Edilen Değerler ve Aralarındaki Fark

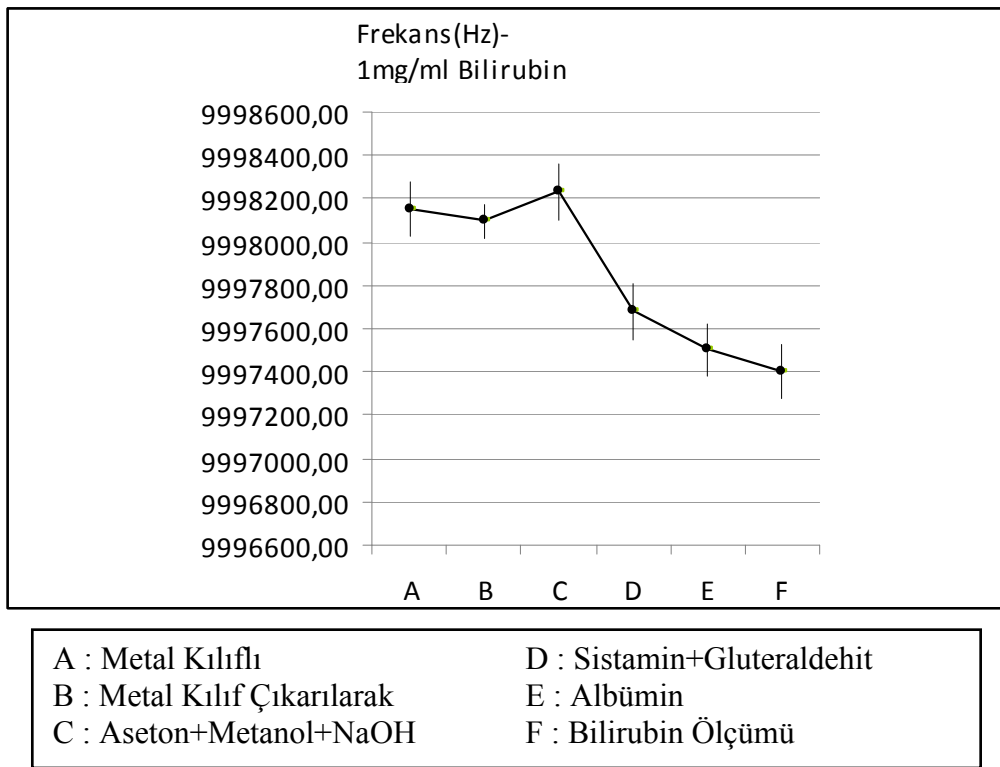
| Bilirubin Derişimi | Metal kılıf ile Deneyde Ölçülen Değerler (Hz) | Metal kılıf çıkarılarak Deneyde Ölçülen Değerler (Hz) | Değerler Arasındaki Fark (Hz) ($f_2 - f_1$) |
|--------------------|---|---|---|
| 1 mg/ml | 9998154,25 | 9998096,67 | -57,583 |
| 2 mg/ml | 9998211,29 | 9998154,57 | -56,714 |
| 5 mg/ml | 9998116,42 | 9998150,33 | 33,917 |
| 10 mg/ml | 9998127,58 | 9998128,75 | 1,167 |

Alınan ölçümlerde metal kılıfın kristal üzerinde olmasının olmamasına nazaran frekansa etkisinin çok az olduğu gözlemlenmiştir. Kristalin metal başlığının kesilmesinin frekansı arttıracığı ya da azaltacağı hakkında bir yorum yapılamamaktadır.

Deneyler sırasında kullandığımız beher ve balıkların kaynar deiyonize suyla her adımda yıkanmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Ultrasonik banyo içerisine yerleştirilen kristallerde 3 dakikayı geçen sürelerde yıkamanın kristal yüzeyinde delinmeler oluşturduğu ortaya çıkmıştır.

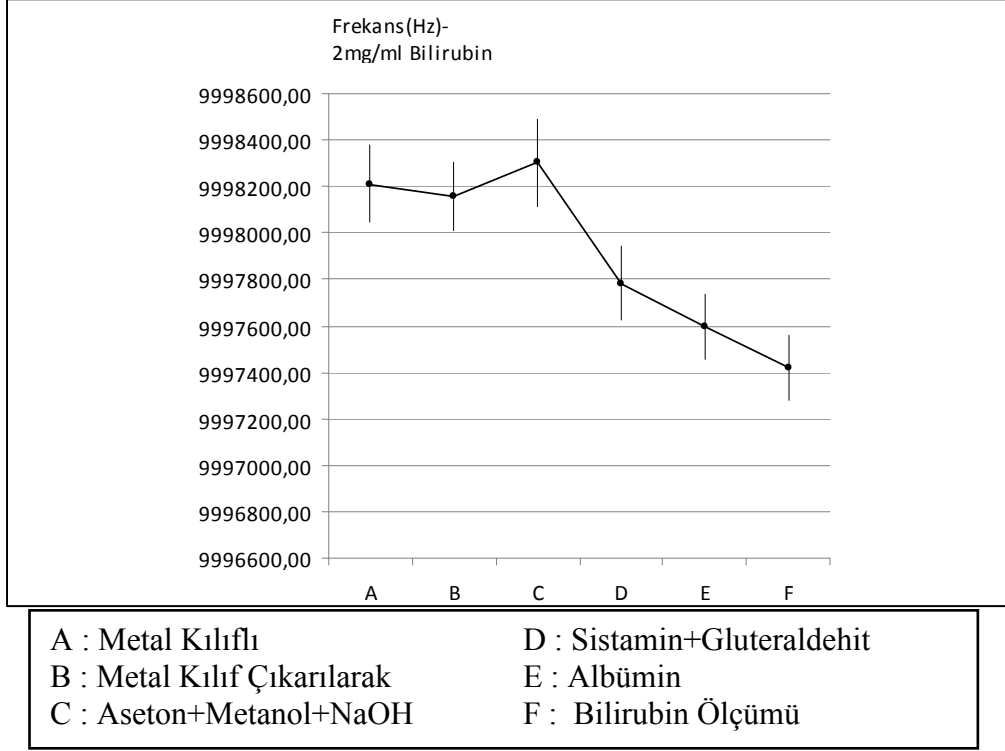
Bilirubin için farklı derişim miktarlarında her adım için frekans değişimleri izlenmiştir. Bilirubin derişimi kandaki bilirubin seviyesine paralel bir şekilde 1mg/ml ile 10mg/ml arasında değiştirilerek biyosensör üzerindeki etkisi bulunmuştur. Bulunan bu sonuçlar şekil 4.1 - 4.4 arasında deneysel yöntemde tarif edilen her bir adım için 12 sensörde ölçülmüş ortalama değeri ve standart sapması hesaplanmış ve grafikler üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.1 1mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları

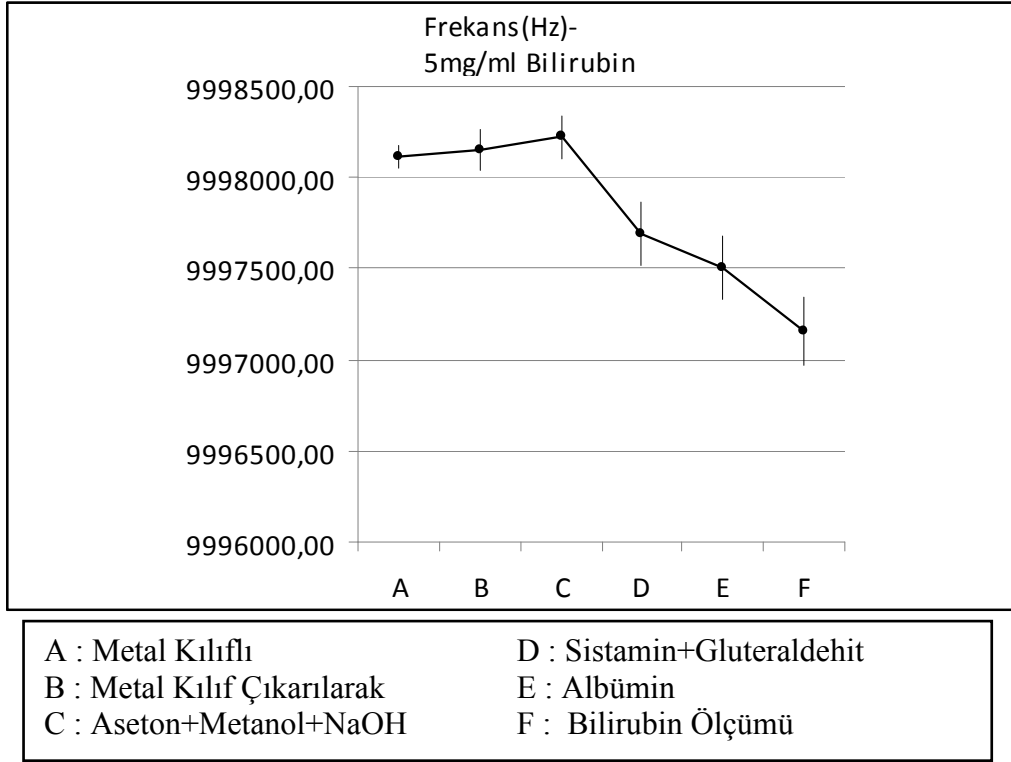
Şekil 4.1'de 1 mg/ml için alınan sonuçlardaki her bir adım için bulunan verilerin ortalamaları alınarak elde edilen değerler ve standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafikten de görüleceği üzere kuartz kristalin üzerinde metal kılıf varken yapılan ölçüme göre metal kılıf yokken yapılan ölçümdeki değerler azalmış olup, temizlik işleminin yapıldıktan sonra (aseton metanol NaOH) frekans değerlerinin ortalaması yükselmiştir. Sistamin ve gluteraldehit ikilisini kristal üzerine bağlanarak frekans ortalamasını düşürmüş, albümininde bağlanmasıyla ölçülen frekans

değerlerinin ortalaması daha da düşmüştür. Albümin ligant olarak kullanılarak immobilize edilmiş kristal yüzeyine bilirubin bağlanmış ve frekansın ortalamasını düşürmüştür.



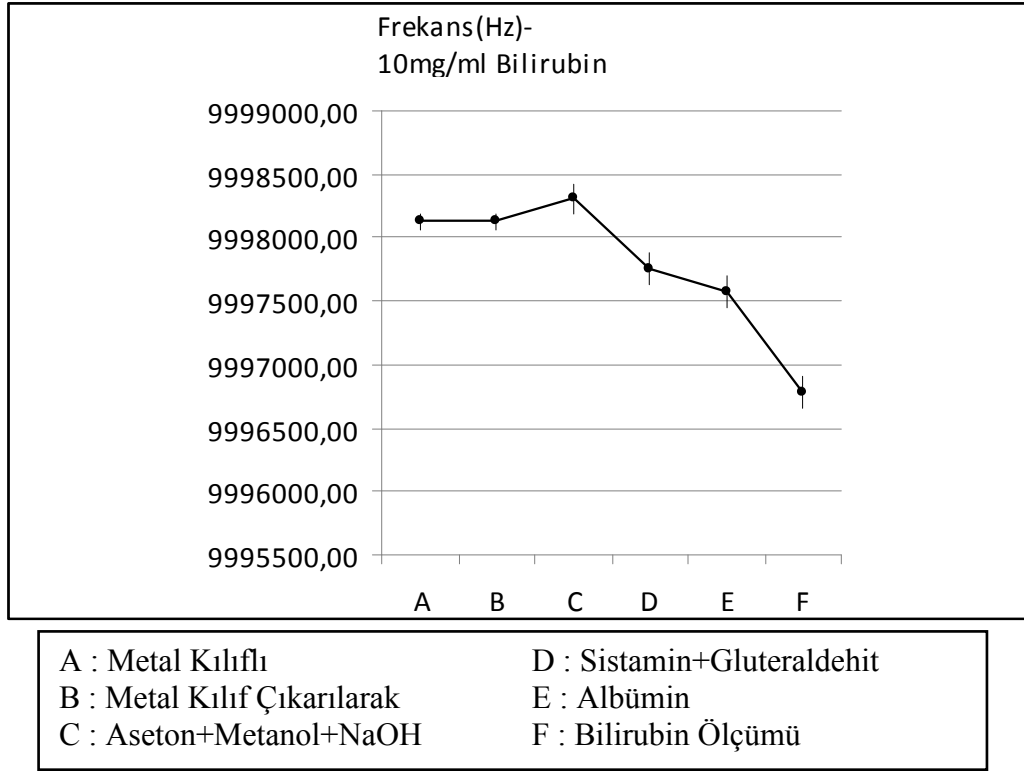
Şekil 4.2 2mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları

Şekil 4.2'de 2 mg/ml için alınan sonuçlardaki her bir adım için bulunan verilerin ortalamaları alınarak elde edilen değerler ve standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafikten de görüleceği üzere kuartz kristalin üzerinde metal kılıf varken yapılan ölçüme göre metal kılıf yokken yapılan ölçümdeki değerler azalmış olup, temizlik işlemi yapıldıktan sonra (aseton metanol NaOH) frekans değerlerinin ortalaması yükselmiştir. Sistamin ve gluteraldehit ikilisini kristal üzerine bağlanarak frekans ortalamasını düşürmüştür, albümininde bağlanmasıyla ölçülen frekans değerlerinin ortalaması daha da düşmüştür. Albümin ligant olarak kullanılarak immobilize edilmiş kristal yüzeyine bilirubin bağlanmış ve frekansın ortalamasını düşürmüştür.



Şekil 4.3 5mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları

Şekil 4.3'de 5 mg/ml için alınan sonuçlardaki her bir adım için bulunan verilerin ortalamaları alınarak elde edilen değerler ve standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafikten de görüleceği üzere kuartz kristalin üzerinde metal kılıf varken yapılan ölçüme göre metal kılıf yokken yapılan ölçümdeki değerler artmış olup, temizlik işlemi yapıldıktan sonra (aseton metanol NaOH) frekans değerlerinin ortalaması yükselmiştir. Sistamin ve gluteraldehit ikilisini kristal üzerine bağlanarak frekans ortalamasını düşürmüş, albümininde bağlanmasıyla ölçülen frekans değerlerinin ortalaması daha da düşmüştür. Albümin ligant olarak kullanılarak immobilize edilmiş kristal yüzeyine bilirubin bağlanmış ve frekansın ortalamasını düşürmüştür.



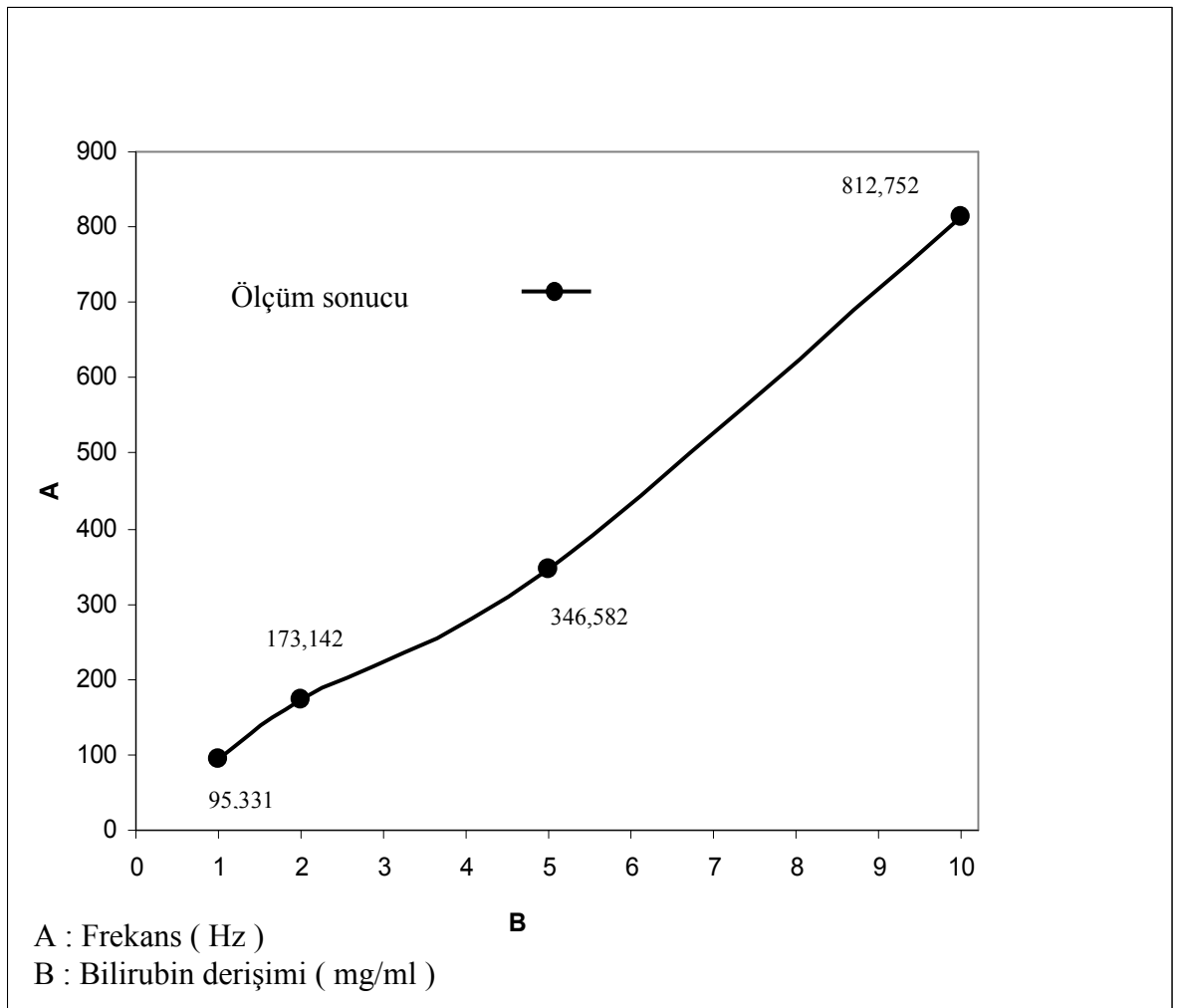
Şekil 4.4 10mg/ml Bilirubin İçin Sensörlerdeki Frekans Değişiminin Farklı Basamaklar İçin Ortalama Değerleri Ve Standart Sapmaları

Şekil 4.4'de 10 mg/ml için alınan sonuçlardaki her bir adım için bulunan verilerin ortalamaları alınarak elde edilen değerler ve standart sapmaları grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafikten de görüleceği üzere kuartz kristalin üzerinde metal kılıf varken yapılan ölçüme göre metal kılıf yokken yapılan ölçümdeki değerler artmış olup, temizlik işlemi yapıldıktan sonra (aseton metanol NaOH) frekans değerlerinin ortalaması yükselmiştir. Sistamin ve gluteraldehit ikilisini kristal üzerine bağlanarak frekans ortalamasını düşürmüştür, albümininde bağlanmasıyla ölçülen frekans değerlerinin ortalaması daha da düşmüştür. Albümin ligant olarak kullanılarak immobilize edilmiş kristal yüzeyine bilirubin bağlanmış ve frekansın ortalamasını düşürmüştür.

Genel olarak yapılan bütün ölçümlerde ve Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4' de elde edilen değerlerde: Kristalin metal kılıf veya metal kılıfsız olmasının frekans değişimi üzerinde sabit bir etkisi yoktur. Metal kılıf kesildikten sonra yapılan ölçümlerde frekans, 1 mg/ml ve 2 mg/ml bilirubin derişiminde azalırken, 5 mg/ml ve 10 mg/ml bilirubin derişiminde artmıştır. Temizlik yapıldığında ise kuartz kristal üzerindeki metal tozlarından arındırıldığından, kristal üzerindeki kütle azalmış ve

buna bağlı olarak frekans yükselmiştir. Sistamin ve glutraldehit kristal üzerine bağlandığından kristal üzerinde kütle artışı olduğundan frekans azalmıştır.

Sistamin ve glutraldehit immobilizasyonu yapılmış kristale albumin bağlanması sağlanarak kristal üzerindeki kütle artmış ve buna bağlı olarak frekans değerleri ortalaması azalmıştır. Albümin üzerine bilirubin statik Van der Waals ve hidrojen bağları sayesinde tutunmuş ve kristal üzerindeki kütleyi arttırmış bu sebeple de frekans değerleri ortalaması azalmıştır.



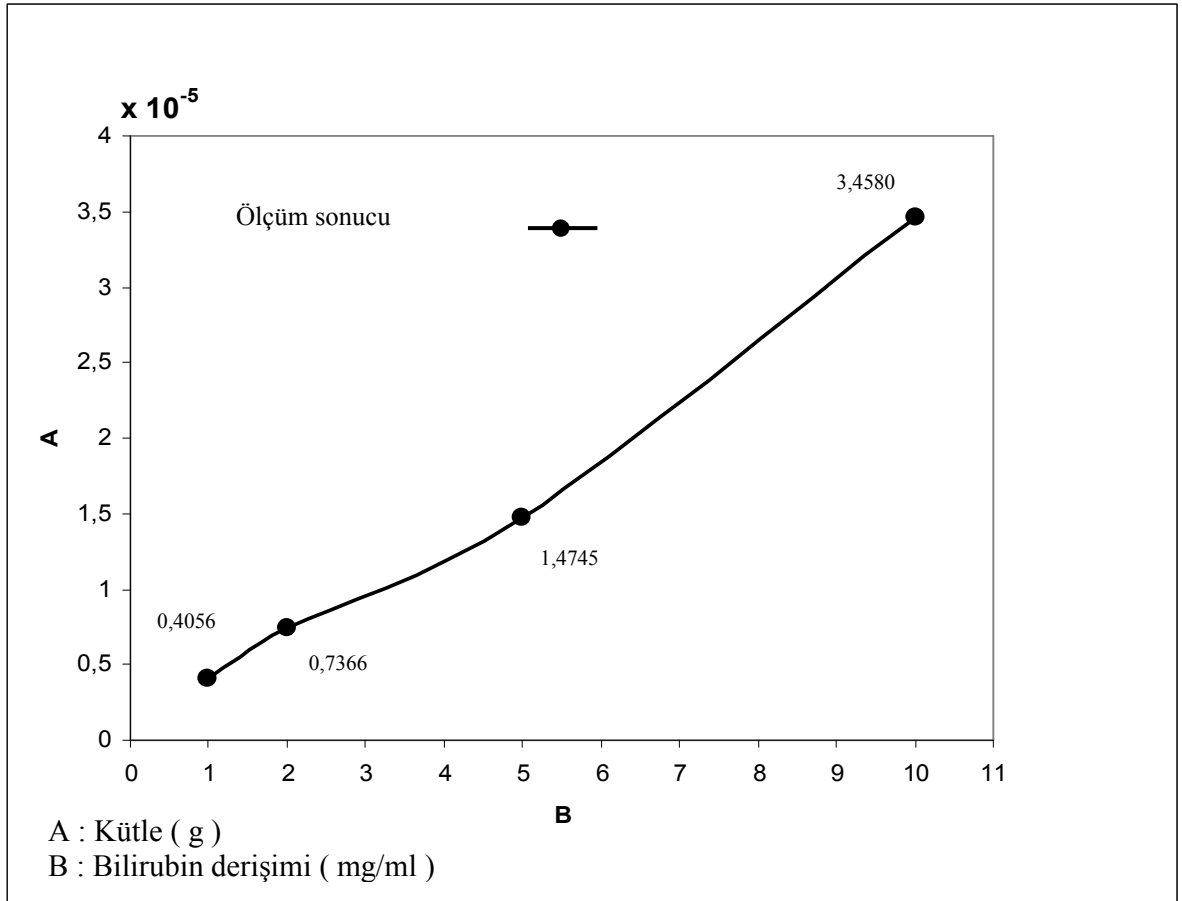
Şekil 4.5 Farklı Bilirubin Konsantrasyonları İçin Ölçülen Frekans Değişimleri

Şekil 4.5'te farklı bilirubin konsantrasyonlarında, deneyler sonucunda bulunan frekans değerleri ortalaması gösterilmiştir.

Deneyisel olarak ölçülen verilerden Sauerbrey'in geliştirdiği AT-kesimli kuartz kristallerinin titreşimi ile kristal üzerinde oluşan film tabakası halindeki malzeme arasındaki ilinti kullanılarak kristalin üzerine yapışan malzemenin miktarı tahmin edilmiştir [14, 27]. Kullanılan denklem (4.1)'de gösterilmektedir.

$$\Delta f = -2.3 \cdot 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A} \quad (4.1)$$

Bu durumda farklı bilirubin derişimleri için tahmin edilen kütle miktarı Şeki 4.6' da verilmiştir.

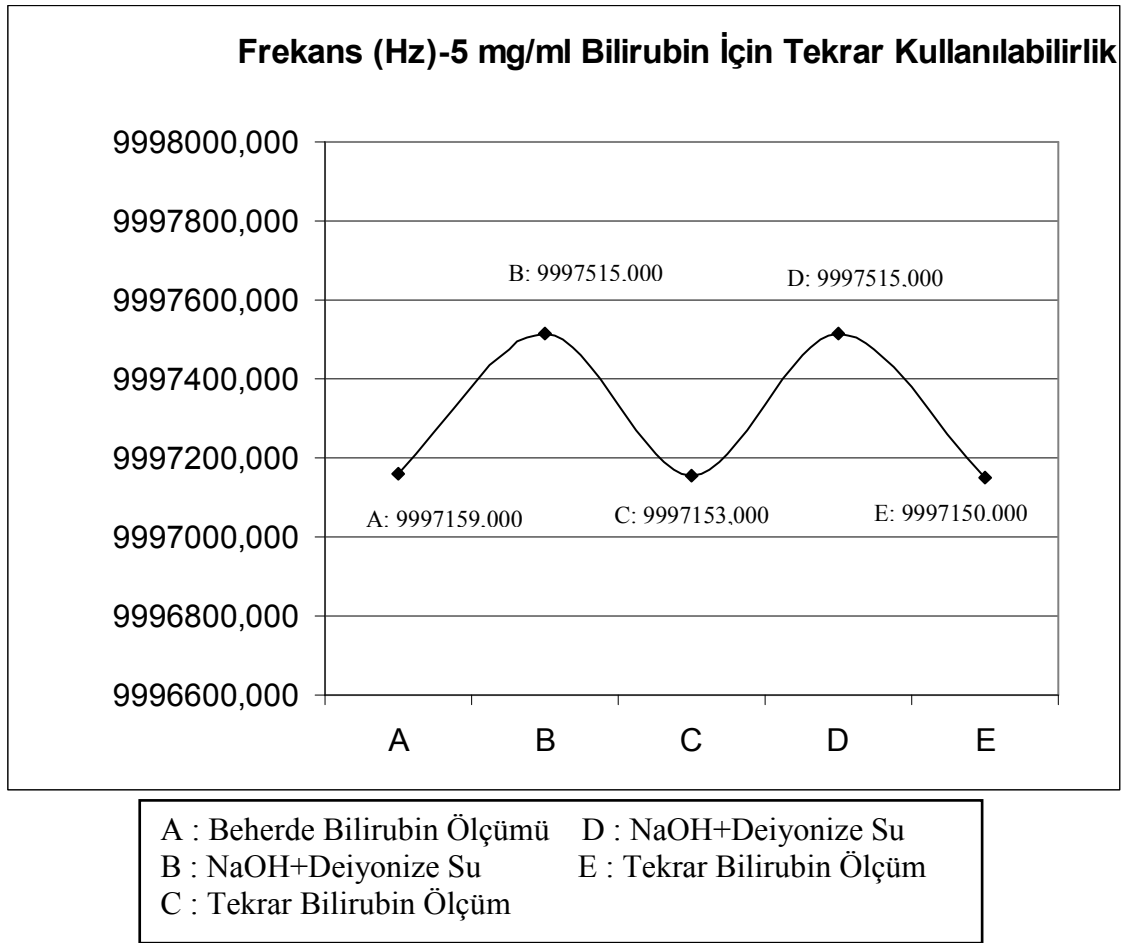


Şekil 4.6 Farklı Bilirubin Seviyeleri İçin Sauerbrey Denkleminden Elde Edilen Kütle Birikim Miktarı Grafiği

Şekil 4.6'daki grafikte de görüleceği üzere örnekteki bilirubin miktarı arttıkça kuartz kristal yüzeyine tutunan bilirubin miktarı da artmaktadır. Bilirubin derişimi arttıkça frekansta düşme ve Sauerbrey denklemine göre kütlede artış olduğu tespit edilmiştir. Teorik olarak kristal yüzeyinde olması gereken kütle değişim miktarı ile ölçümler sonucu elde edilen kütle değişim miktarı Şekil 4.6'da gösterilmiş ve birbirine yakın sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada sabit sıcaklık, karanlık ortam gibi deneysel şartlar en iyi düzeyde sağlanmaya çalışılmıştır.

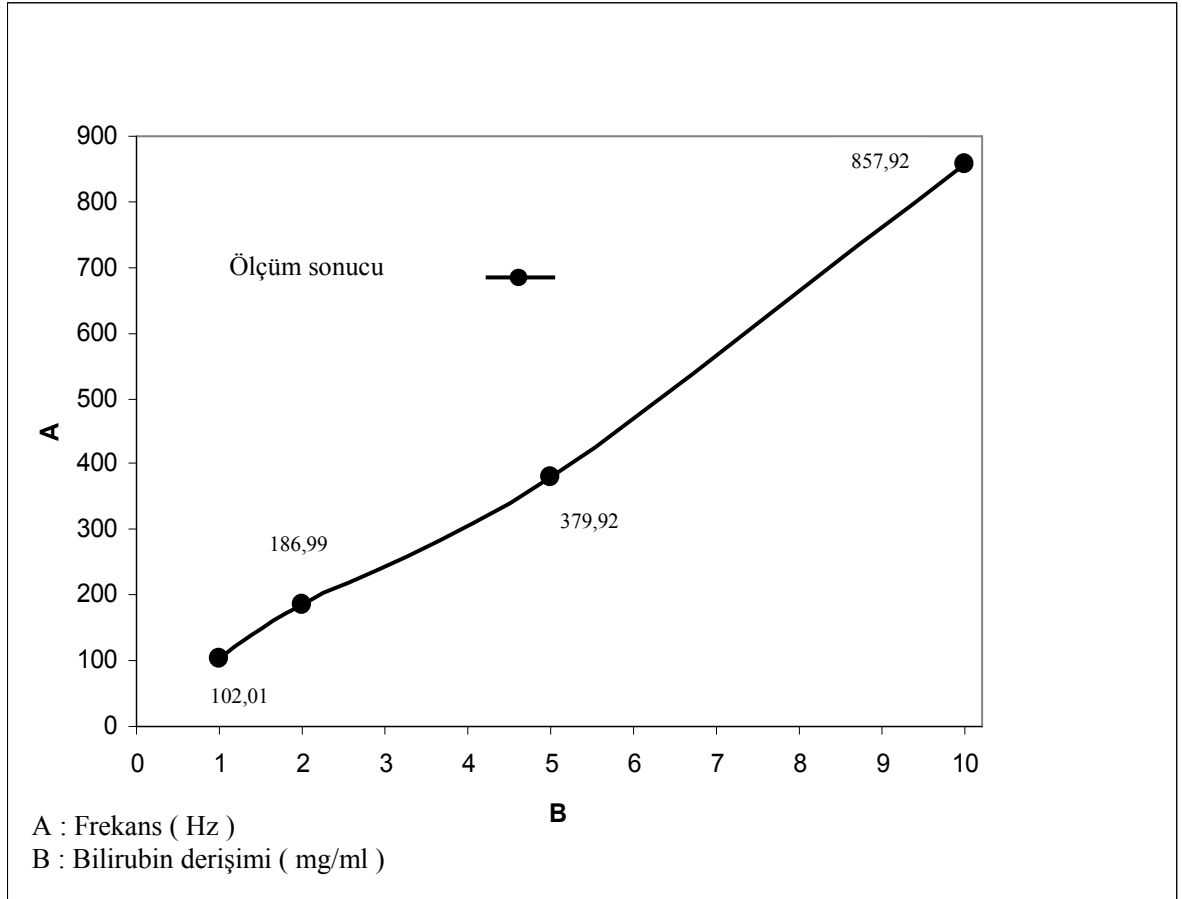
Yapılan deneylerde kullanılan QCM sanayide kullanılan sıradan ticari bir ürün olduğundan biyolojik veya kimyasal amaçlı olarak üretilmemiştir.



Şekil 4.7 5mg/ml İçin Bilirubinün Tekrar Kullanılabilirlik Grafiği

Şekil 4.7’de biyosensörün 0,5M NaOH ile etkileşime sokulup saf su ile yıkanıp tekrar ölçüm alındıktan sonra meydana gelen frekans değişimi incelenmiştir.

Tasarlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliği denemek amacıyla 3 kez art arda frekanstaki değişime bakılmış ve Şekil 4.7’de A, C ve E’ de birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. A, C ve E ‘deki ölçülen frekans değerlerinin giderek düşüş göstermesinin sebebi kristal yüzeyinden bir miktar bilirubinle beraber albümininde uzaklaşmasıdır. NaOH ve deiyozize suya maruz bırakılan kristallerin yüzeyinden bilirubin başarı ile uzaklaştırılmıştır.

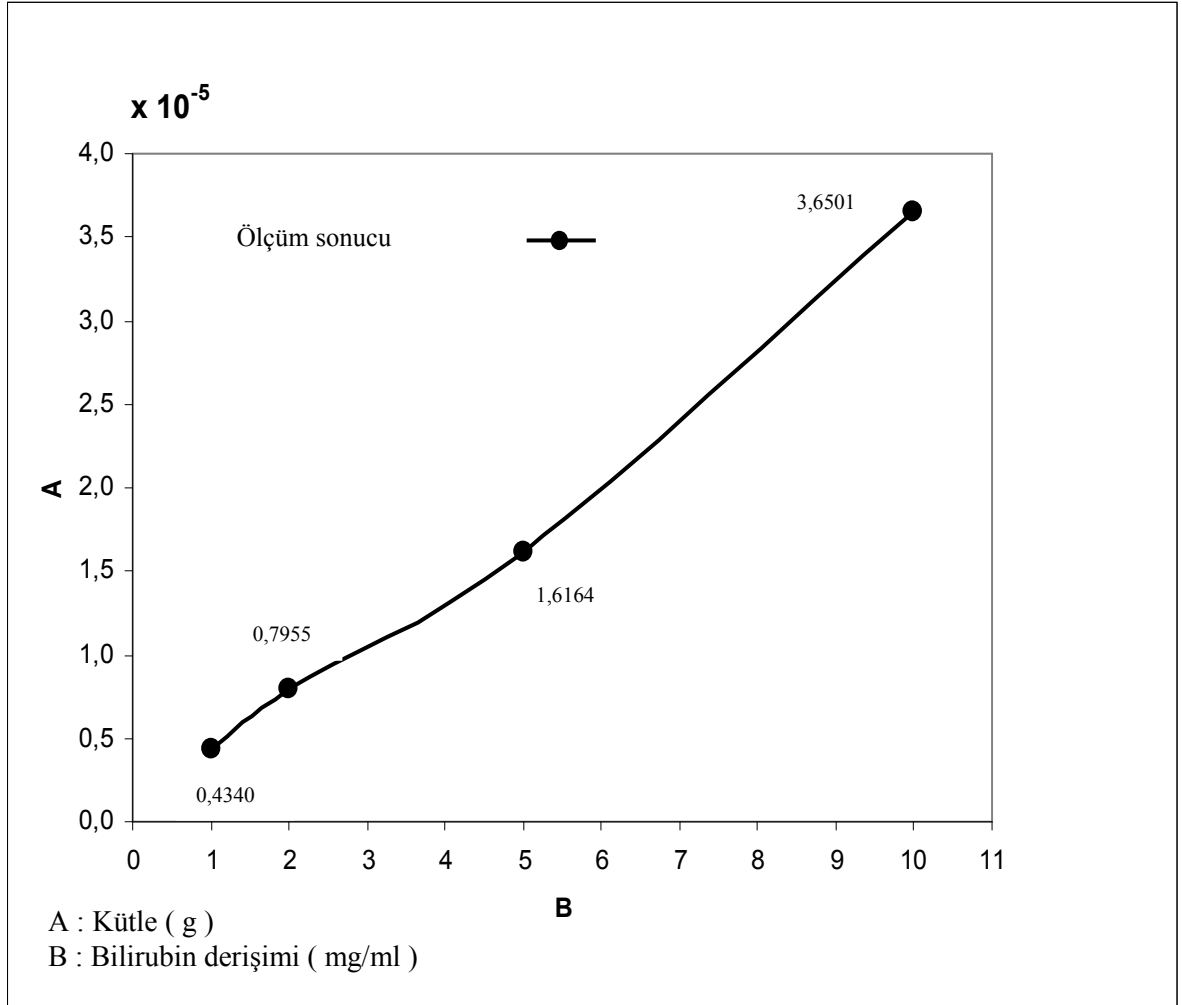


Şekil 4.8 Plazmada Farklı Bilirubin Konsantrasyonları İçin Ölçülen Frekans Değişimleri

Plazma içerisinde bilirubin konsantrasyonları için bulunan frekans değişimlerinin ortalaması Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Plazma içerisinde yapılan ölçümlerde kütle değişim miktarı, plazma içerisinde de bilirubin bulunması sebebiyle artmıştır. Kütle

değişim miktarının artması ölçülen frekans değişim değerlerinin de yükselmesine neden olmuştur.

Şekil 4.8'deki grafikte de görüleceği üzere örnekteki bilirubin miktarı arttıkça kuartz kristal yüzeyine tutunan bilirubin miktarı da artmaktadır. Bilirubin derişimi arttıkça frekans değişim miktarı da artmış ve Sauerbrey denkleminde göre kütlede artış olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9 Plazmada Farklı Bilirubin Seviyeleri İçin Sauerbrey Denkleminden Elde Edilen Kütle Birikim Miktarı Grafiği

Şekil 4.9'daki grafikte de görüleceği üzere plazma içerisindeki örnekte bilirubin miktarı arttıkça kuartz kristal yüzeyine tutunan bilirubin miktarı da artmaktadır. Bilirubin derişimi arttıkça frekansta düşme ve Sauerbrey denkleminde göre kütlede

artış olduğu tespit edilmiştir. Ölçümler sonucu elde edilen kütle değişim miktarı Şekil 4.9'da gösterilmiş ve doğrusala yakın sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada sabit sıcaklık, karanlık ortam gibi deneysel şartlar en iyi düzeyde sağlanmaya çalışılmıştır.

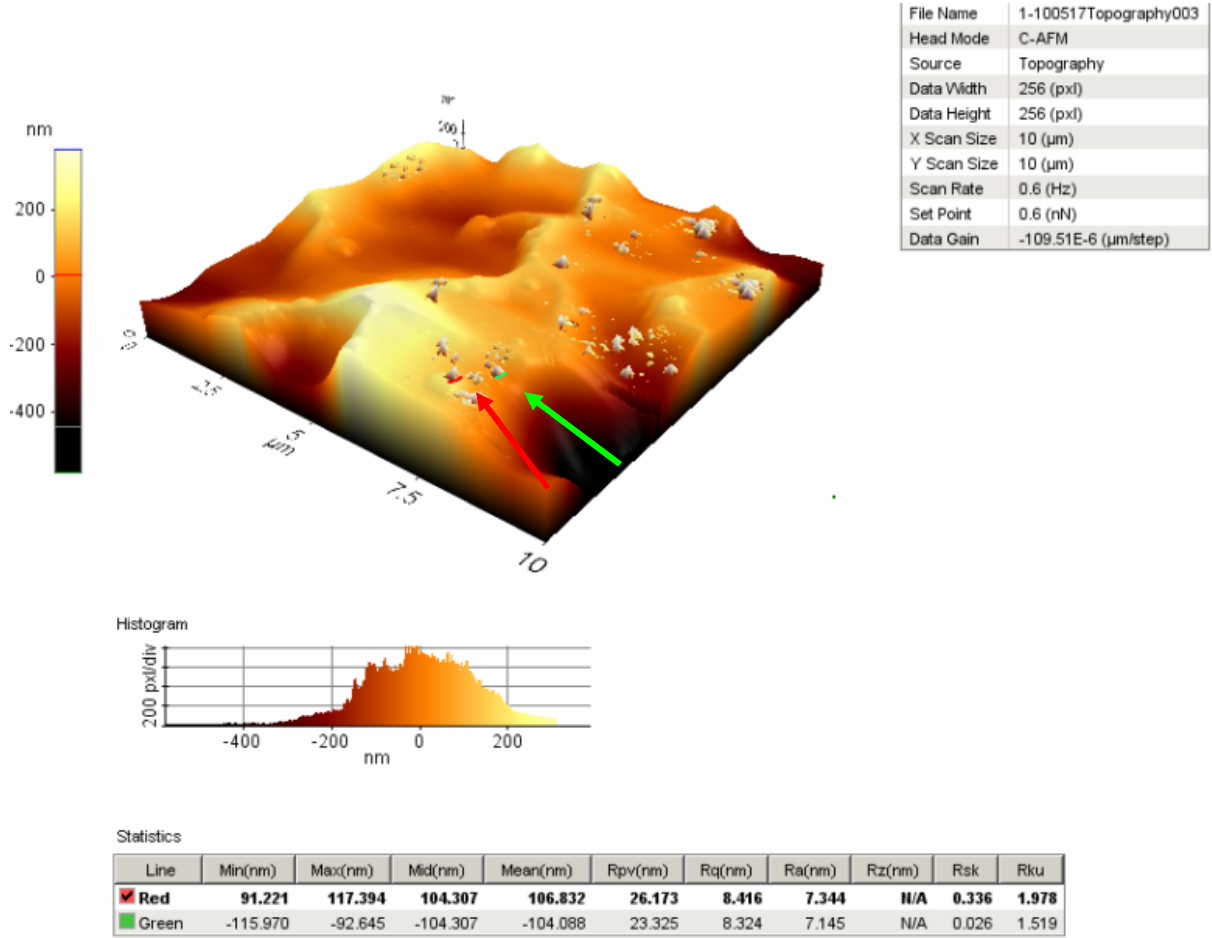
4.1 Atomik Kuvvet Mikroskobu

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak atomik boyutta görüntüler elde edilerek yüzey çalışmaları yapılmaktadır. Radyasyon malzeme etkileşimleri açısından büyük öneme sahip olan polimerlerin ve ileri teknoloji ürünü süper iletkenlerin yapımı ve karakterizasyon çalışmalarında bu mikroskop sayesinde yapılmaktadır. Atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri Bilkent Üniversitesi Uluslararası Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde alınmıştır.

Şekil 4.10'de Kuartz kristal üzerine albümin immobilize edilmiş yüzey görülmektedir. Albümin kuartz kristal üzerine şekilde de görüldüğü gibi çeşitli noktalardan immobilize olmuştur.

Şekil 4.11'te Bilirubin immobilizasyonu sonrası afm görüntüsü görülmektedir. Albümin ve bilirubin şekilde de görüldüğü gibi hidrojen bağları ve Van Der Walls bağları ile birbirine bağlanmıştır.

Şekil 4.12'de Albümin ve bilirubin plazma içerisinde birbirine hidrojen bağları ve Van Der Walls bağları ile birbirine bağlanmış, plazma içerisinde bağlanmanın daha fazla olduğu kanıtlanmıştır.



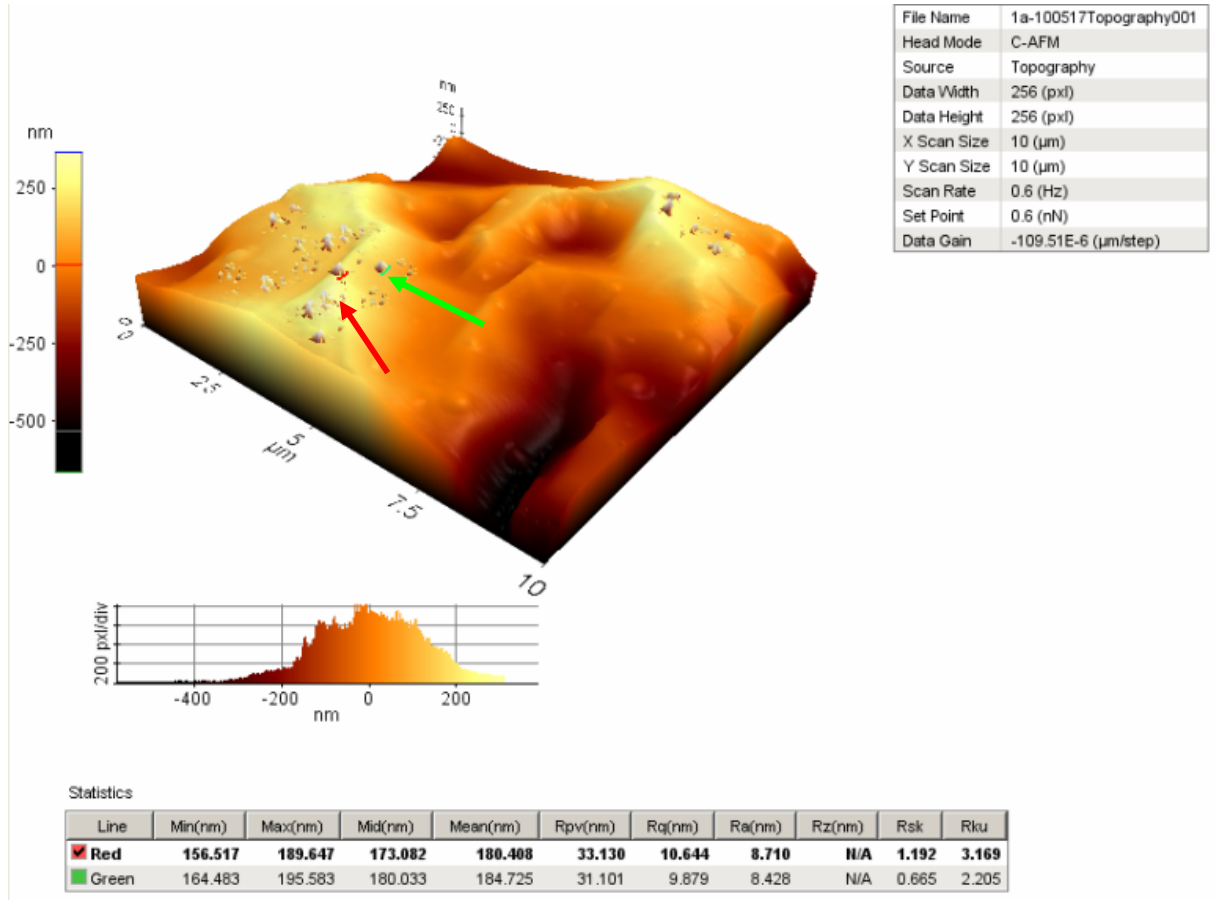
Şekil 4.10 Albumin İmmobilizasyonu Sonrası AFM Görüntüsü

Yukarıdaki şekilde albümin immobilizasyonu sonrası alınan AFM görüntüsünde moleküllerin çapları ölçülmüştür. Albümin molekülünün çapı yaklaşık olarak 7 nm civarındadır[35]. Yukarıdaki ölçümde de görüldüğü üzere oklarla gösterilen moleküllerin ölçülen değerleri tablonun Ra başlığı altında gösterilmiştir. Ölçülen değer literatürde olması gereken değere yakın olarak bulunmuş ve QCM üzerine albumin immobilizasyonu yapıldığı kanıtlanmıştır.

Şekil 4.10' te albümin immobilize edilmiş yüzeyde bulunan albümin molekülleri, genel olarak Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de görülen moleküllere göre daha büyük olarak görülmektedir. Bunun sebebi ortamda bilirubin olmaması ve bilirubin molekülünün albümine nazaran daha küçük boyutta olmasıdır.

Şekil 4.11'te bilirubin immobilizasyonu sonrası alınan görüntüde, küçük moleküllerin Şekil 4.10'a göre artış gösterdiği görülmektedir. Bunun sebebi bilirubin moleküllerinin albümine göre daha küçük boyutta olmasıdır.

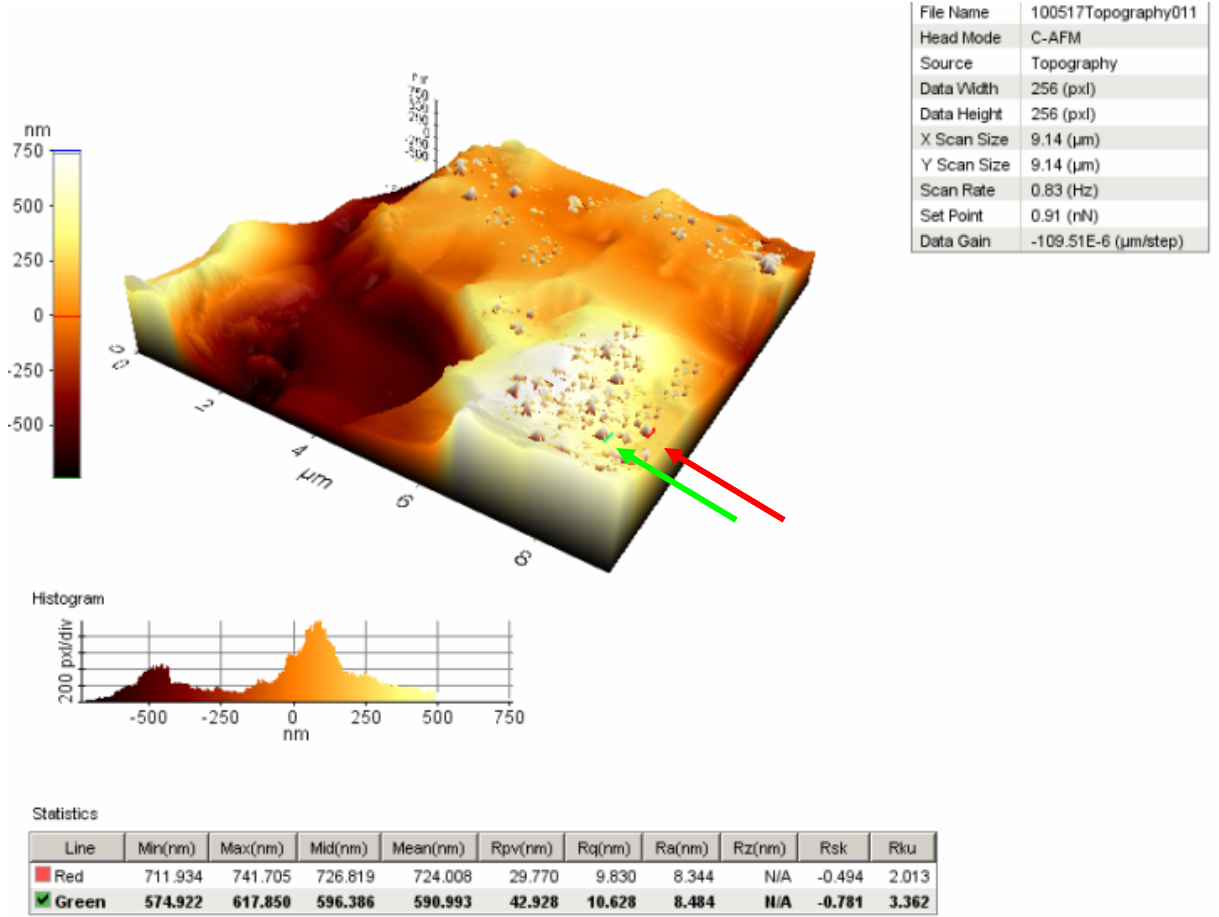
Şekil 4.12'te bilirubin immobilizasyonu plazma içerisinde yapıldığından ve plazma içerisinde de bir miktar bilirubin olduğundan küçük moleküllerin sayısında ve dağılışında artış gözlenmektedir.



Şekil 4.11 Bilirubin Ölçümü Sonrası AFM Görüntüsü

Yukarıdaki şekilde bilirubin ölçümü sonrası alınan AFM görüntüsünde moleküllerin çapları ölçülmüştür. Bilirubin molekülünün çapı yaklaşık olarak 1 nm civarındadır[34]. Yukarıdaki ölçümde de görüldüğü üzere oklarla gösterilen moleküllerin ölçülen değerleri tablonun Ra başlığı altında gösterilmiştir. Ölçülen değerlerin 8 nm civarında olmasının sebebi, albümin ile bilirubin molekülünün kimyasal olarak bağlanmasıdır.

Albümin molekülünün çapı yaklaşık olarak 7 nm civarında olduğu ve bilirubin molekülü çapının 1 nm civarında olduğu bilindiğinden bulunan sonucun 8 nm civarında olması beklenen bir durumdur.



Şekil 4.12 Plazmadan Bilirubin Ölçümü Sonrası AFM görüntüsü

Yukarıdaki şekilde plazmada bilirubin ölçümü sonrası AFM görüntüsünde moleküllerin çapları ölçülmüştür. Albümin molekülünün çapı yaklaşık olarak 7 nm civarındadır[34].

Yukarıdaki ölçümde de görüldüğü üzere oklarla gösterilen moleküllerin ölçülen değerleri tablonun Ra başlığı altında gösterilmiştir. Ölçülen değerler 8 nm civarında olmasının sebebi, albümin ile bilirubin molekülünün kimyasal olarak bağlanmasıdır.

Albümin molekülünün çapı yaklaşık olarak 7 nm civarında olduğu ve bilirubin molekülü çapının 1 nm civarında olduğu bilindiğinden bulunan sonucun 8 nm civarında olması beklenen bir durumdur.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Biyosensör üretimi için ilk aşamada kuartz kristal üzerine çapraz bağlama ve kovalent bağlama immobilizasyon yöntemleri kullanılarak albümin immobilizasyonu yapılmıştır. Van der Waals etkileşimi ile kristal üzerindeki albümin üzerine bilirubin tutunmuştur. Kuartz kristal üzerine bağlanan bilirubin miktarı rezonans frekansı değişimlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Böylece yapılan çalışmalarda başarılı bir şekilde bilirubin biyosensörü geliştirilmiştir.

Sistamin ve gluteraldehit immobilizasyonu yapılmış kristale albümin bağlanması sağlanarak kristal üzerindeki kütle artmış ve buna bağlı olarak frekans değerleri ortalaması azalmıştır. Albümin üzerine bilirubin statik Van der Waals ve hidrojen bağları vasıtasıyla tutunmuş ve kristal üzerindeki kütleyi arttırmış, bu nedenle de frekans değerleri ortalaması azalmıştır.

Ölçümlerde ve 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml bilirubin derişimin de elde edilen grafiklerin değerlerinde: Kristalin metal kılıf veya metal kılıfsız olmasının frekans değişimi üzerinde sabit bir etkisi yoktur. Temizlik sonrasında ise kuartz kristal üzerindeki metal tozlarından arındırıldığında, kristal üzerindeki kütle azalmış ve buna bağlı olarak frekans yükselmiştir. Sistamin ve gluteraldehit kristal üzerine bağlandığında kristal üzerinde kütle artışı olması nedeniyle frekans azalmıştır.

Yapılan çalışmanın amacı kuartz kristal yüzeyine albumin immobilize edip, bilirubin miktarının kuartz kristal mikroterazi (Quartz Crystal Microbalance- QCM) ile ölçülmesidir. Bu gerekçe ile albümine spesifik olarak bilirubin tutunması nedeniyle oluşan frekans değişimini kullanarak Sauerbrey denkleminde yararlanarak 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml bilirubin derişimi için kütle miktarı hesaplanmıştır.

Yapılan ölçümlerde 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml,10mg/ml bilirubin içeren insan plazması örneklerinde kristal yüzeyinde albümine tutunan bilirubin miktarı sırasıyla 0.434mg, 0.7955mg, 0.6164mg ve 3,6501mg olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ile doğrusala yakın bir grafik elde edilmektedir. Shihui ve arkadaşları [36] çalışmalarında bilirubin ve albümin arasında benzer bir afinite ilişkisi bulmuşlardır.

Geliştirilen biyosensör sisteminde gümüş elektrotlu elektronik yedek parça amaçlı üretilen kuartz kristaller kullanılmıştır. Altın elektrotlu kristaller ile karşılaştırıldığında kullanılan gümüş elektrotlu kristaller oldukça ucuzdur ve ticari ürüne dönüşebilme potansiyeli oldukça yüksektir.

DeneySEL sonuçlar geliştirilen bilirubin biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini göstermektedir. Bazik NaOH çözeltisi kullanarak bilirubin, albümin ligand molekülünden ayrılmıştır. Bu rejenerasyon işlemi sonrasında albümin ligandı zarar görmemiş ve yüzeyde kalmıştır. İşlem başarı ile 3 kez tekrarlanmıştır.

Atomik kuvvet mikroskobu kullanarak immobilizasyon işleminin aşamaları ve başarısı izlenmiştir. AFM sistemi kontrol deneyi amaçlı kullanılmıştır. AFM sonuçları ile frekans değişimi sonuçları örtüşmektedir. Bu yöntem ile deney hatası olasılığı en aza indirilmiştir.

Biyosensör sistemi fosfat tamponunda ve plazmada başarı ile denenmiştir. İnsan plazmasında elde edilen ölçüm sonuçları ile fosfat tamponundan elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir. Plazmada yapılan ölçümlerde bir miktar spesifik olmayan tutunmalar gözlemlense de ihmal edilebilir düzeydedir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] Kocakulak M, Plazmadan bilirubin uzaklaştırılması için spesifik sorbent üretimi, Hacettepe Üniversitesi Bilim Uzmanlığı Tezi, 1997.
- [2] Brown,G R, Oligo-peptide functionalized polymeric sorbents for bilirubin, Artificial Organs,s.16:568,1994.
- [3] Grohmann K, Roser M, Rolinski B, Kadow I, Müller C, Goerlach-Graw A, Nauck M, ve Küster H, Bilirubin Measurement for Neonates: Comparison of 9 Frequently Used Methods, Pediatrics, s.117: 1174 – 1183, 2006.
- [4] Liu Y, Li P, Lu J, Xiong W, Oger J, Tetzlaff W, Cynader M, Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Immunol. s.181 (3): 1887–97, 2008.
- [5] Rolinski B, Küster H, Ugele B, Gruber R, Horn K, Total bilirubin measurement by photometry on a blood gas analyzer: potential for use in neonatal testing at the point of care Clin. Chem. S.47 (10): 1845–7,1997.
- [6] Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH, Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. s.99 (25): 16093–8, 2002.
- [7] Golonka, D, Digestive Disorders Health Center: Bilirubin. WebMD. sayfa. 3, 2010.
- [8] A.D.A.M., Inc, CHEM-20, MedlinePlus Encyclopedia, 2010.
- [9] <http://www.sh.lsuhscc.edu/fammed/OutpatientManual/content.html>. Laboratory tests, Retrieved , s.08-14, 2007.
- [10] Debby G, Digestive Disorders Health Center: Bilirubin, WebMD. sayfa. 3, 2010.
- [11] A.D.A.M., Inc, Bilirubin-urine,MedlinePlus Encyclopedia, 2010.

- [12] Eiggins BR, Biosensors: an Introduction, John Wiley and Sons Inc., Newyork,s.1-117, 1996.
- [13] Koçak O, Kuartz Kristal Mikrobalans (QCM) Biosensör Tasarımı, 2006.
- [14] Saurebrey G,Verwendung von Schwing quarzen zur Wägung dünner Schich und Mikrowägung,Z.Phys.,s.155-206. , 1959.
- [15] Arnav A, Piezoelectric Transducers and Applications, Heidelberg:Springer, 2004.
- [16] Bruckanstein S ve.Shay M, Experimental aspects of use of the quartz crystal microbalancein solution, Electro chemical Acta 30:1295, 1985.
- [17] Basic Technology of Quartz Crystal Resonaters, Fortiming Corporation, 2008.
- [18] Arnav A,.Sogorb T ve Jimenez Y, Circuit For Continuous motional series resonant frequency and motioanl resistance monitoring of quartz crystal resonators by parallel capacitance compension, Rev. Sci. Instr., s.73-2724, 2002.
- [19] Buttry DA ve Ward MD, Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electro chemical quartz crystal microblance, Chem. Rev. s. 92-1335, 1992.
- [20] Chen J, Song G, He Y ve Yan Q, Spectroscopic analysis of the intereaction between bilirubin and bovine serum albumin, Microchim. Acta, s.79–85, 2007.
- [21] Carter DC, Ho JX, Structure of serum albumin, Adv. Protein Chem. s.45: 153, 1994.
- [22] Tayyab S, Sharma N ve Khan MM, Use of domain specific ligands to study urea-induced unfolding of bovine serum albumin, Biochem Biophys Res Commun, s. 277- 83, 2000.

- [23] Lemiesz LT, Karaczyn A, Keppler BK, Kozlowski H, Studies on the interactions between human serum albumin and trans-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate(III), J. Inorg. Biochem, s.78- 341, 2000.
- [24] Jacobsen J, Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength, Int. J. Pept. Protein Res.,s. 9- 235, 1977.
- [25] Berde CB, Hudson BS, Simoni RD, Sklar LA, Human serum albumin: Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin, J. Biol. Chem., s.254- 391,1979.
- [26] Srivatsa V, Rao I, Kimberly W, Anderson ve Leonidas GB, Oriented Immobilization of proteins, Chem. Acta, s.128-143, 1996.
- [27] Si S, Si L, Ren F, Zhu D, ve Fung Y, Study of Adsorption Behavior of Bilirubin on Human-Albumin Monolayer Using a Quartz Crystal Microbalance, Journal of Colloid and Interface Science 253, s.47:52, 2002.
- [28] <http://www.taek.gov.tr/tr/sss/130-malzeme-teknolojisi/486-taramali-elektron-mikroskobu-sem-nasil-calisir-.html>
- [29] Maton, A., Jean H., Charles W. McL., Susan J., Maryanna Q. W., David L., Jill D. W., Human Biology and Health. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall, s.1-13, 1993.
- [30] Bunde L.R., Jarvi J.E., Rosentreter, Piezoelectric quartz crystal biosensors Department of Pharmaceutical Sciences, Idaho State University, Pocatello, s.122-1236, 1998.
- [31] Alagöz D., Beta Galaktozidaz Ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu Ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi Ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması , s.3-8, 2007.
- [32] Fadile YENER, Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Kocaeli Üniversitesi, s.20-27, 2007.
- [33] <http://www.anesmed.com.tr> – Anesmed Medikal.

- [34] Zhengpeng Yang, Shihui Si, Yingsing Fung, Bilirubin adsorption on nanocrystalline titania films, *Thin Solid Films*, s.3344–3351, 2006.
- [35] Oliver Smithies, *Why the kidney glomerulus does not clog: A gel Permeation diffusion hypothesis of renal function*, Chapel Hill, NC, s. 7525, 2003.
- [36] Shihui Si, Li Si, Fenglian Ren, Derong Zhu ve Yingsing Fung, Study of Adsorption Behavior of Bilirubin on Human-Albumin Monolayer Using a Quartz Crystal Microbalance , *Journal of Colloid and Interface Science*, s. 47–52 , 2002.