

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKUT MİYOKARD HASARININ TROPONİN
BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLMESİ

ORHAN ERDEM HABERAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2012

AKUT MİYOKARD HASARININ TROPONİN BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLMESİ

A TROPONIN BIOSENSOR APPLICATION FOR DETERMINING ACUTE MYOCARD DAMAGE

ORHAN ERDEM HABERAL

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

2012

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince beni eğiten, geliştiren ve yol gösteren değerli Hocam Doç. Dr. Mustafa Kocakulak'a

Bölümümüz araştırma imkanlarının gelişmesini sağlayarak tez çalışmamın gerçekleşmesine katkı sağlayan Mühendislik Fakültesi Dekanı Prof Dr. Berna Dengiz'e

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresinde daima yol gösterici olan değerli Hocam Prof Dr. Hüseyin Akçay'a

Tez çalışmamın şekillenmesi için klinik uygulamalardaki çok değerli bilgi birikimini paylaşan Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesinden Doç. Dr. Tulga Ulus'a

Bütün sorularımı sabırla cevaplayan Hocam Yrd. Doç. Dr. Cengiz Koçum'a

Tüm yardımları için arkadaşım ve Hocam Öğretim Görevlisi Mehmet Yüksekaya'ya

Laboratuvarına araştırmacı olarak davet ederek pratik bilgi birikimimi geliştirmemi sağlayan değerli Hocam University North Carolina (A.B.D.), Chapel Hill'den Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kesimer'e

Tez projemi destekleyerek bana maddi olanak sağlayan, Başkent Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'na.

Bu çalışmada emeği geçen tüm Başkent Üniversitesi Ailesi Bireylerine

Ve;

Hayatın en zor dönemeçlerinde destekleri ile beni yolda tutan, emeklerini esirgemeyen, Ülkeme hizmet etmek için yetişmemi sağlayan tüm değerli Aile Büyüklerime

En içten Teşekkürlerimi sunarım.

ÖZ

AKUT MİYOKARD HASARININ TROPONİN BİYOSENSÖR İLE ÖLÇÜLMESİ

Orhan Erdem HABERAL

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Koroner kalp hastalıkları Türkiye’de yetişkinlerde ölüm oranının en yüksek olduğu hastalıklardan biridir. Özellikle kardiyopulmoner bypass ameliyatı sonrası hastalarda miyokard enfarktüs riski oldukça yüksektir. Amerikan Kardiyoloji Derneği ve Avrupa Kardiyoloji Birliği kardiyak troponinleri miyokard enfarktüs tanısı için biyokimyasal belirteç olarak önermektedir. Bu nedenle, ameliyat sonrası hastanın hayati değerleri ile birlikte kandaki troponin seviyesinin ardışık olarak ölçülmesi gereklidir. Ancak sürekli ölçüm yapabilen hassas bir sistem henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı kandaki troponin protein seviyesini hassas, hızlı ve ucuz olarak ölçebilen bir sistem geliştirmektir. Bu amaçla, QCM kristalleri yüzey temizliği işleminden sonra anti-cTnT immobilize edilmiştir. Troponin konsantrasyonu, QCM sensörünün frekans değişimi ile gözlemlenmiştir. Aynı sensör farklı troponin konsantrasyonları ile test edilmiş ve frekans değerinin, troponin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Bu sonuç TEM görüntüleri ile desteklenmiştir. Geliştirilen sensör sistemi troponin seviyesinin gözlemlenmesi için önerilen hızlı, etkili ve ucuz bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Miyokard Enfarktüs, QCM, Troponin, TEM

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

ABSTRACT

A BIOSENSOR APPLICATION FOR DETERMINING ACUTE MYOCARD DAMAGE

Orhan Erdem HABERAL

Başkent University Institute Of Science And Engineering

The Department Of Biomedical Engineering

Coronary heart disease is the leading cause of morbidity and mortality among adults in Turkey. It is crucial to diagnose myocardial infarction especially after the coronary bypass surgery. American Heart Association and European Society of Cardiology emphasize that troponins can be used as biochemical markers to diagnose myocardial infarction. The goal of this research is to develop a highly sensitive and rapid biosensor system that can measure troponin T levels in a rapid, sensitive and easy way. In this study, highly sensitive QCM crystals were chemically modified to measure changes in adsorbed mass on the surface and were used to detect the amount of the troponin concentrations. The amount of the troponin proteins was quantified by measuring the change in frequency of the QCM. QCM crystals with immobilized anti-cTnT were tested using different concentrations of troponin molecules. Frequency values of the sensor system were changed proportional to the amount of troponin concentration in the sample, indicating that troponin molecules attach to the surface of the QCM. These results were supported by SEM images. This method presents a rapid and inexpensive biosensor system that monitors troponin levels.

Keywords: Myocard Infarction, QCM, Troponin, SEM

Advisor: Associate Prof Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent University, Department Of Biomedical Engineering.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
ÇİZELGELER LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp Kası Ve Yapısı	3
2.2. Miyokard Hasarının Biyokimyasal Belirleyiciler	7
2.2.1. Kardiyak Troponinler	10
2.2.2. Miyogloblin	12
2.2.3. Kreatin Kinaz(Ck)	13
2.3. Kardiyak Troponin Düzeylerini Yükselten Hastalıklar	16
2.3.1. Akut Koroner Tıkanma	16
2.3.2. Miyokard Enfarktüsü	16
2.3.3. Perikardit	17
2.3.4. Kalp Yetmezliği	18
2.3.5. Septik Şok	18
2.4. Troponin Ölçüm Yöntemleri	18
2.4.1. Elisa	18
2.4.2. CMİA	20
2.4.3. Yüzey Plazmon Rezonans	23
2.4.4. İmmunokromatografik	24
2.4.5. Elektrokimyasal	25

2.4.6.	Kuvars Kristal Mikroterazi Biyosensörler	26
2.5.	İmmobilizasyon Yöntemleri	28
2.5.1.	Non-Kavolent (Zayıf Bağlar) Yöntemler	29
2.5.2.	Kovalent Bağlanma	29
2.5.3.	Literatürden Örnekler	30
2.6.	Yüzey Karakterizasyonu	32
2.6.1.	Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM)	32
2.6.2.	Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM)	33
3.	DENEY AŞAMASI.....	36
3.1.	Deneyde Kullanılan Kimyasallar	36
3.2.	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	36
3.3.	Deneyin Yapılışı.....	37
3.3.1.	Osilatör Ve Frekans Sayıcı Devreleri	38
3.3.2.	Kuvars Kristal Biyosensör Yüzeyinin Oluşturulması ...	42
3.3.3.	Biyosensörün Test Edilmesi Ve Tampon Çözeltide Troponin T Ölçümü	49
3.3.4.	Akış Hücresi Deneyleri.....	50
3.3.5.	TEM Görüntüleri.....	54
3.3.6.	AKM Görüntüleri	72
4.	SONUÇ.....	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Kasılmada Troponinin Rolü.....	4
Şekil 2.2 Kas Kasılması ve Gevşemesinde Aktin-Miyozin İlişkisi	5
Şekil 2.3 Akut Miyokard Enfarktüsünün Karar Aşamaları	8
Şekil 2.4 İnsan Troponin Kompleksi Şerit Gösterimi.....	10
Şekil 2.5 İskemi Sonrası Biyokimyasal Belirteçlerin Plazmaya Karışması	12
Şekil 2.6 CMIA gösterimleri	20
Şekil 2.7 Hedef ile Mikropartiküllerin Etkileşimi	21
Şekil 2.8 Reaksiyon kuvvetinin yıkanması.....	21
Şekil 2.9 Akrinidyum işaretli konjugatın mikropartikül ile bağlanması.....	22
Şekil 2.10 Yüzey Plazmon Rezonans Çalışma Prensibi.....	24
Şekil 2.11 İmmunokromatografik Ölçüm Gösterimi	25
Şekil 2.12 Yüzeyler ve Bağlanma Türleri.....	29
Şekil 2.13 Sistamin ve Glutaraldehitin Kuvars Yüzeye Bağlanması	30
Şekil 2.14 Taramalı Elektron Mikroskopunun Şematik Gösterimi[47].....	34
Şekil 3.1 Deneylerde Kullanılan Kuvars Kristaller.....	37
Şekil 3.2 Colpitts Osilatör Devresi	38
Şekil 3.3 Kenar Yakalama Birimi Blok Şema Gösterimi.....	39
Şekil 3.4 Frekans Sayıcının Devre Şeması	39
Şekil 3.5 Colpitts Osilatöre Bağlı QCM Çıkışı.....	40
Şekil 3.6 Frekans sayıcı ve Osilatör Kutulanmış Hali	41
Şekil 3.8 Biyolojik Güvenlik Kabini İçersisinde Sistamin İmmobilizasyonu	44
Şekil 3.9 QCM Akış Hücresi Ölçüm Sistemi	53
Şekil 3.10 SRS QCM Sistemi	53
Şekil 3.11 Sodyum Tetraborat (pH 8.2) Tamponunda Glutaraldehit Çözeltisi İle Etkileştirilen Kristal Yüzeyi 200x Büyütme Ultrasonik Banyo Öncesi.....	54

Şekil 3.12 Sodyum Tetraborat (pH 8.2) Tamponunda Glutaraldehit Çözeltisi İle Etkileştirilen Kristal Yüzeyi 100x Büyütme Ultrasonik Banyo Öncesi	55
Şekil 3.13 Sodyum Tetraborat (pH 8.2) Tamponunda Glutaraldehit Çözeltisi İle Etkileştirilen Kristal Yüzeyi 120x Büyütme Ultrasonik Banyo Öncesi	56
Şekil 3.14 Aşınmış Kristal TEM Görüntüsü (1000x Büyütme)	57
Şekil 3.15 Aşınmış Kristal Yüzeyi (250x Büyütme).....	58
Şekil 3.16 Aşınmış Kristal Yüzeyi (280x Büyütme).....	59
Şekil 3.17 0.7ng/ml cTnT Konsantrasyonu ile Etkileştirilen Kristal Yüzeyi (200x Büyütme).....	60
Şekil 3.18 Yüzeye İmmobilize Molekül (2600x Büyütme)	61
Şekil 3.19 Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzeye İmmobilize Molekül (6000x Büyütme).....	62
Şekil 3.20 Altın Elektrotlu Temiz Kristal Yüzeyi (200x Büyütme).....	63
Şekil 3.21 Gümüş Elektrotlu Temiz Kristal Yüzeyi (200x Büyütme)	64
Şekil 3.22 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzeyi (200x Büyütme).....	65
Şekil 3.23 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzeyi (1600x Büyütme).....	66
Şekil 3.24 cTnT ile Etkileştirilmiş Altın Elektrotlu Kristal Yüzey (400x Büyütme) ..	67
Şekil 3.25 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzey.....	68
Şekil 3.26 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzey (5000x Büyütme).....	69
Şekil 3.27 Akış Hücresinde cTnT ile Etkileştirilen Altın Elektrotlu Kristal Yüzey (200x Büyütme).....	70
Şekil 3.28 Akış Hücresinde cTnT ile Etkileştirilen Altın Elektrotlu Kristal Yüzeyi (1600x Büyütme).....	71
Şekil 3.29 AKM ile Görüntülenmiş Temiz Kristal Yüzeyi.....	72
Şekil 3.30 AKM ile Görüntülenmiş Aşınmış Kristal Yüzeyi	72
Şekil 3.31 AKM ile Görüntülenmiş Yüzeyi Modifiye Edilmiş Kristal Yüzeyi.....	73

ÇİZELGELER LİSTESİ

Grafik 2.1 Kardiyak Belirteçlerin Serum Yükselme Süreleri.....	15
Grafik 3.1 Farklı Konsantrasyonlarda Sistamin İmmobilizasyonu Sonucu Frekans Değişimleri	44
Grafik 3.2 Sistamin İmmobilizasyonuna Sıcaklığın Etkisi	45
Grafik 3.3 Glutaraldehit İmmobilizasyonu Sonucu Frekans Değişimleri.....	47
Grafik 3.4 Antikor İmmobilizasyonu Sonrası Frekans Değişimleri	48
Grafik 3.5 cTnT Konsantrasyonlarına Biyosensörün Frekans Değişimleri	50
Grafik 3.6 Akış Hücresinde cTnT ölçümleri	52

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMİ	Akut Miyokard Enfarktüsü
ATP	Adenozin 3'-trifosfat
Ca	Kalsiyum
CK	Kreatin Kinaz
CMİA	Kemiluminesans mikropartikül immünoassay
cTnT	Kardiyak Troponin T
DNA	Deoksiribonükleik asit
EKG	Elektrokardiyografi
ELİSA	antikora bağlanmış bir enzimin aktivite testi
QCM	Kuvars Kristal Mikrobalans
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı

1. GİRİŞ

Türkiye’de her 7 kişiden 1’i kalp krizi riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Türkiye’deki toplam koroner kalp hastası sayısı 2.8 milyon ve her yıl 207 bin kişi koroner kalp hastalığı nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Türkiye’deki ölümlerin % 43’ü koroner kalp hastalığına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Türk Kardiyoloji Derneği’nin verilerine göre, Türkiye’de yılda 15 bin kişiye stent takılırken, 25 bin hastaya da by-pass uygulanmaktadır.

ABD ve Avrupa’ da ise her yıl 15 milyon hasta göğüs ağrısı ve diğer miyokard enfarktüsü belirtileri ile acil servislere başvurmaktadır. (Bassand et al., [2]) Miyokard enfarktüsün hızlı teşhisi hastanın doğru belirlenmiş tedaviyi en hızlı şekilde alabilmesi için hayati önem taşımaktadır. (Thygesen et al., [33]). Günümüzde elektrokardiyogram ve kardiyak belirteçlerden altın standart olan troponin ölçümleri doğru tedaviye yönlendiren başlıca yol göstericilerdir. Elektrokardiyogramdaki birtakım anomaliler çoğu zaman akut koroner sendromların teşhisinde tek başına yeterli olamamaktadır. Kardiyopulmoner bypass ve kalbin mekanik manipülasyonu sonrası gelişen miyokard hasarının değerlendirmekte kardiyak belirteçlerden troponin çok ayırıcı ve hassastır.(Pope et al., [26]; Wang et al., [35]). Akut miyokard enfarktüsünün teşhisi 6 ile 12 saatlik seri kan testlerinin takibini gerektirmektedir ve miyokard enfarktüsünün tam olarak teşhis edilemediği her an hasta için yüksek risk arz etmektedir. Göğüs ağrısı şikayeti ile acil servislere başvuran birçok sayıda hastanın şüpheli rahatsızlık durumlarını ve yüksek riskli hastalar için her an büyük önem taşıırken yanıltıcı şikayetleri olan acil servisi kalabalıklaştıran hastaların en kısa zamanda doğru teşhisi almaları da acil servislerin işlevselliği açısından büyük önem arz etmektedir.(Reichlin et al., [27]) Diğer yandan bu testler için her yıl milyonlarca lira harcanmaktadır. Troponinler için farklı testler olsa da sürekli ölçüm yapan bir sistem bulunmamaktadır. Kardiyak troponin T’nin kandaki seviyesi 0.4ng/ml sınırını aştığı takdirde kalp kasında hasar meydana geldiği tanısı konabilmektedir.

1.1. Çalışmanın Amacı

Amerikan Kardiyoloji Derneği ve Avrupa Kardiyoloji Birliği kardiyak troponinleri miyokard enfarktüs tanısı için biyokimyasal belirteç olarak önermektedir. Kardiyopulmoner bypass ve kalbin mekanik manipülasyonu sonrası gelişen miyokard hasarının değerlendirmekte kardiyak belirteçler çok ayırıcı ve hassastır. Tez önerisinin hedefi troponin kardiyak belirteçleri için hassas ölçüm yapan bir biyosensör üretilmesidir. Biyosensör temelini iki farklı alandan güncel ve başarılarını yakın zamanda kanıtlamış farklı uygulamalar ile gelecek vaat eden teknolojilerden almaktadır. Bu teknolojilerden ilki biyokimya alanında antikor immobilizasyonu diğeri ise biyosensör alanında QCM tekniğidir.

Kardiyak belirteçlerden altın standart kabul edilen troponin proteininin hasta başında takip edilmesi ile özellikle koroner arter bypass operasyonu sonrası hasta için hayati öneme sahip akut tıkanmaların erken teşhisi için kullanılabilecektir. Bu çalışma süresince ilk etapta kardiyak belirteçlerden troponin T (cTnT) için basit, hızlı ve düşük maliyetli bir biyosensör geliştirilmeye çalışılmıştır, daha sonrasında ise bu biyosensörün sürekli ölçüm yapabilirliği denenmiştir.

QCM, kuvars kristallerinin çok hassas kütle sensörleri olarak kullanılması prensibine dayanır. Kristal üzerindeki kütle değişimi frekans değişimi olarak algılanır ve gerekli parametre çevrimleri ile frekanstaki değişim kütle değişimine oranlanır. QCM'in en büyük avantajları sıvı içerisinde çalışması, üretim özelliklerinin iyi bilinmesi, sensör yüzeyinde moleküler bağlanma olaylarının doğrudan (ek işaretçi olmadan-etiketsiz) ölçüm sinyali üretmesi, basit ve hassas ölçüm yapabilme yeteneğini çok düşük maliyetlerle gerçekleştirebilmesidir. QCM uygulamalarının hızla artmasını tüm bu özellikleri yanı sıra kolaylık uygulanabilir yüzey modifikasyonları ile farklı biyosensörlerin üretilmesidir.

Tez 3 aşamadan oluşmaktadır. 1. aşamada biyosensör oluşturulmuş. 2. aşamada elektronik sistem tasarlanmış 3. aşamada akış hücresinde troponin ölçümleri yapılmış ve bilgisayarda veriler işlenmiştir. Kuvars kristallerin yüzeyleri temizlenmiş, yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş ve yüzeye troponine spesifik antikor immobilize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Kası Ve Yapısı

Kalp iki ayrı pompadan oluşur. Sağ kalp pulmoner sisteme sol kalp çevre organlara kan pompalama işlemlerini gerçekleştirir. Sağ ve sol kalp, atriyum ve ventrikül olarak adlandırılan odacıklardan oluşur. Atriyum kanın ventriküllere taşınmasına yardımcı olan zayıf pompalama kuvvetini sağlayan odacıktır. Ventriküller ise kanı çevresel organlara ve pulmoner sisteme gönderen kuvveti sağlayan odacıktır. Kalp özelleşmiş yapısı sayesinde ritmik kasılma hareketleri ile bu pompalama işlevlerini gerçekleştirir. (Hall and Guyton, [38])

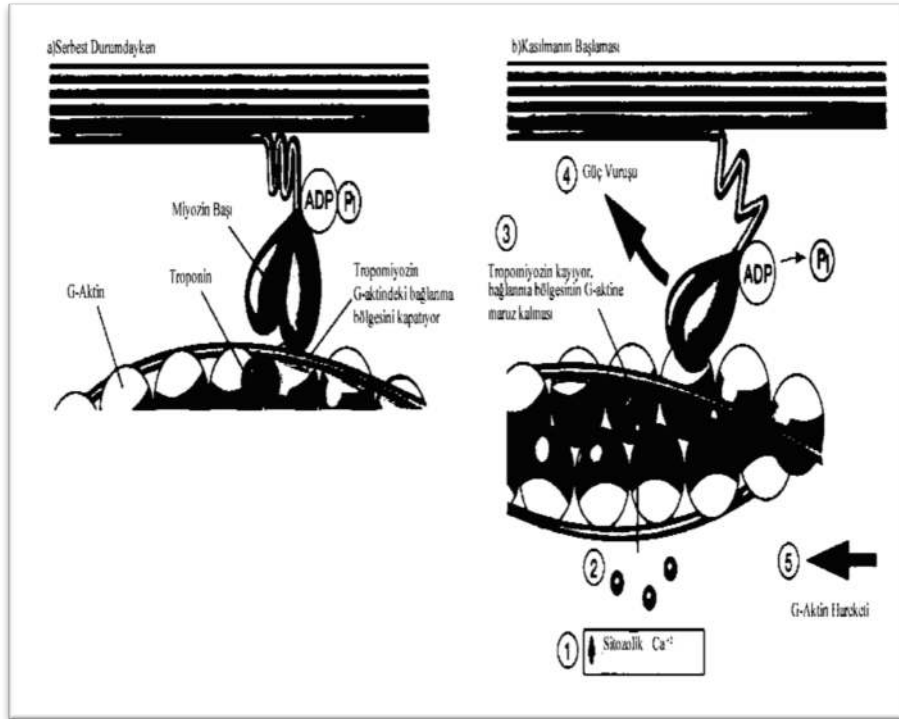
Kalp üç tip kastan meydana gelir. Bunlar; atriyum kası, ventrikül kası ve özelleşmiş ve iletili kas lifleridir. Kasılma sürelerinin daha uzun olması dışında iskelet kaslarının kasılmasına benzeyen atriyum ve ventrikül kasları, çok az miktarda kasılabilir, fibril içeren özelleşmiş uyarı ve iletili lifleridir. Bu lifler belli belirsiz kasılmaları dışında aksiyon potansiyelleri ve ritmik elektriksel uyarılar ile veya aksiyon potansiyellerini kalbin tamamına ileterek ritmik özelliği düzenleyen uyarı sistemi sağlarlar.

Bölünen, bir araya gelen ve tekrar ayrılan kalp kası liflerinin dantel işine benzer şekilde düzenlendiği görülmektedir. Kalp kası tipik bir iskelet kası gibi çizgilidir. Kalp kasının tipik miyofibrilleri iskelet kasındakilerin hemen hemen aynı olan aktin ve miyozin filamentleri içerirler. Bu filamentler yan yana dizilmişlerdir ve kasılma esnasında birbirleri üzerine kayarlar. Diğer özellikler bakımından kalp kası iskelet kasından oldukça farklıdır.

Protein yapısında olan ince ve kalın filamentler kontraktil proteinler olarak adlandırılırlar. Kalın filament miyozinin iki uzun kuyruğa ve uçlarında globuler başlıklara sahiptir, bu uçlarda adenosin trifosfat (ATP) ve aktin bağlayan özel bağlanma bölgeleri mevcuttur. Hafif zincir halkaları başlıklarla gevşek bağlantı içindedir ve bu zincir halkalarının fosforilasyonu sonucu kas kasılması meydana gelir. İnce filamentler aktin ile beraber birkaç protein daha içerir. Aktin polimerize altyapılardan oluşan iki heliks iplikçik ile miyozin ucundaki başlıklarla çapraz köprüler oluşturur. Tropomiyozin, düzenleyici olarak görev yapan ve fibröz yapıda

aktin içinde boşlukta duran protein yapısıdır. Kasın gevşeme durumunda aktin ve miyozinin birbiriyle etkileşimini engeller. Troponin; başka bir düzenleyici protein 3 alt yapıdan oluşur. Troponin C aktivasyon sırasında kalsiyum iyonlarını bağlar ve aktin uçlarındaki çapraz köprü kurulan bağlanma bölgelerindeki diğer düzenleyici proteinlerin konformasyonel değişimlerini başlatır. Troponin T, kompleks troponin yapılarını tropomiyozin üzerine sabitler. Troponin I aktin-miyozin etkileşiminin dinlenme durumunda inhibe eder. (Hall and Guyton , [38])

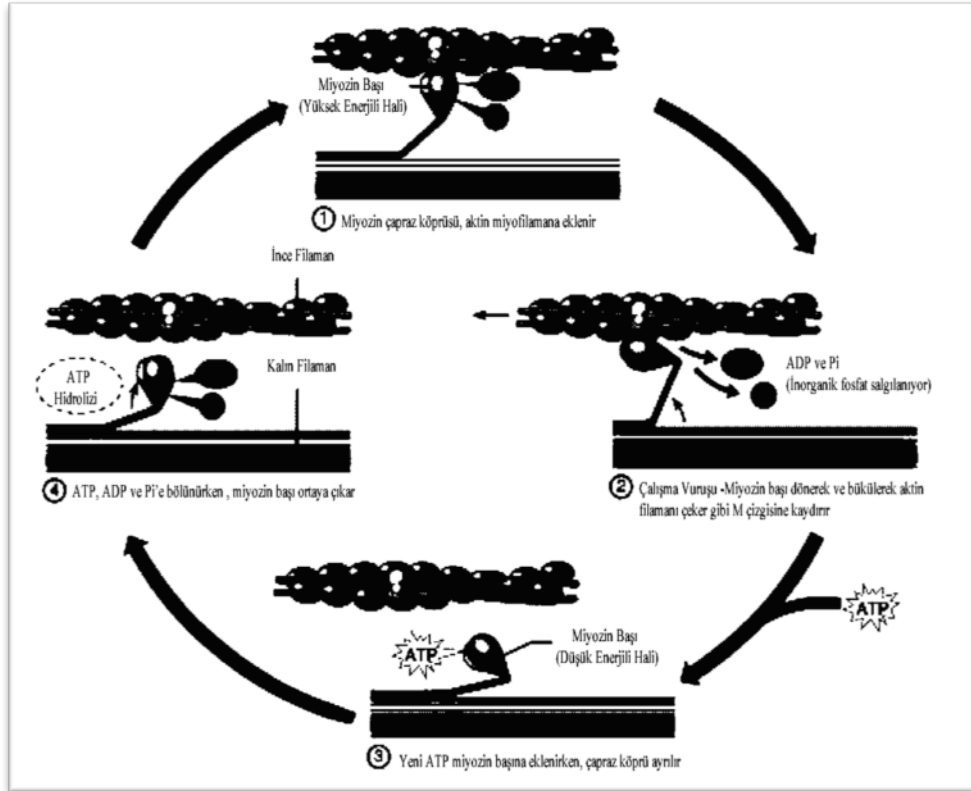
Troponin I ve T kardiyak kası nekrozu için çok spesifikdir. Serum seviyeleri göğüs ağrısını takiben 4-8 saat sonra artmaya başlar 12-16 saat sonra tavan seviyelere ulaşır, 5-9 gün sonunda normal seviyelerine döner.



Şekil 2.1 Kasılmada Troponinin Rolü

Troponin kompleksi 3 düzenleyici proteinden oluşmaktadır. Troponin C,I,T kas iskelet ve kalp kası kasılmasında anahtar rol oynarlar, ama düz kaslarda fonksiyonları yoktur.

Kas aksiyon potansiyelleri uyarma-kasılma eşliği olarak adlandırılan işlem ile mekanik kasılma gerçekleştirir. Bu eşliğin en önemli kısmı hücre içi kalsiyum derişiminin ani artışıdır. Kalsiyum, troponindeki bağlanma bölgelerine bağlanır ve şeklinin değişmesine sebep olur. Bunun sonucu olarak tropomiyozini aktin-miyozin üzerindeki bağlanma bölgesinden öterler, çapraz köprülerin kurulmasına izin verir ve aktin-miyozinin birbiri üzerinde kayarak kas kasılmasını gerçekleştirir. Kalsiyumun troponinden ayrılması ile tropomiyozin çapraz köprüleri bloklar ve önceki konumuna yerleşir, kas dinlenme konumuna geçmiş olur.



Şekil 2.2 Kas Kasılması ve Gevşemesinde Aktin-Miyozin İlişkisi

Kasın kasılması;

- 1.Kası uyaran motor sinir sonlarından transmitter molekül bırakılır.
- 2.Sarkolemma depolarize olur.
- 3.Sarkolemma boyunca ilerleyen aksiyon potansiyelleri transvers tubuller ile kas fiberinin içine götürülür.
- 4.Sonrasında sarkoplazmik retikulumdan miyoplazma içerisine Ca^{++} salınır.
5. Ca^{++} troponine bağlanınca miyozin başının aktine bağlanacağı yer boşalır.
- 6.Miyozin başları aktine bağlanır. Bu sırada ATP den ADP ve P oluşur ve açığa çıkan enerji kasın kasılmasında kullanılır.

Kasılma anında sarkomer boyu kısalır, Z bantları birbirlerine yaklaşırlar

Kasın gevşemesi;

- 1.Uyarı bitince Ca^{++} troponini terkeder. Serbest kalan Ca^{++} sarkoplazmik retikulumda bulunan Ca^{++} bağlayan kalsekestrin adı verilen protein tarafından tekrar bağlanır.
2. Miyozin başına yeni bir ATP bağlandığında kas gevşer
3. Tropomiyozin aktinde miyozinin bağlanacağı bölgeleri tekrar kapatır.

2.2. Miyokard Hasarının Biyokimyasal Belirleyiciler

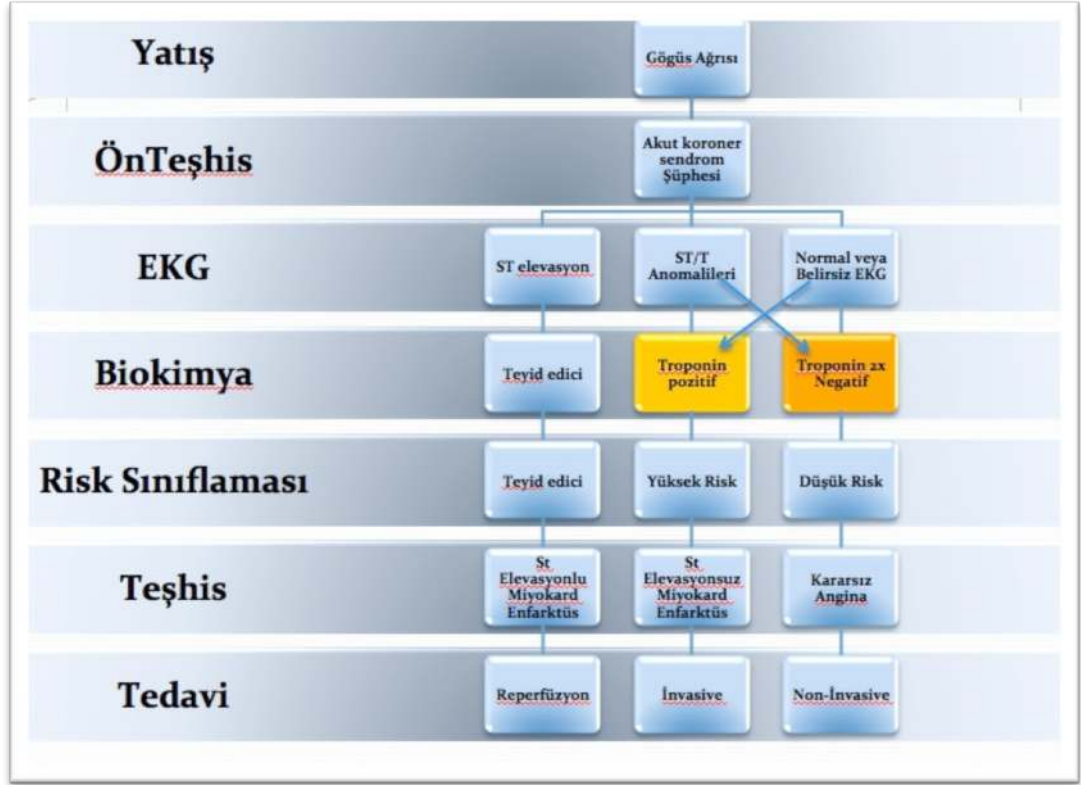
Akut miyokard iskemisi olan hastaların tanı, izlem ve değerlendirilmesinde kardiyak troponinlerin önemli bir yeri vardır. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO); akut miyokard enfarktüs (AMI) tanısı için klasik üç kriter bildirmiştir;

1. Göğüsde iskemik tipte ağrı
2. Ardışık alınan EKG'lerde ilerleyici değişiklikler
3. Serum kardiyak belirteçlerde yükselme ve düşme

Bu üç kriterden ikisinin bulunması AMI tanısını belirler; ancak bu durum AMI hastalarının sadece 1/2'sinde görülür. AMI hastalarının 1/3'ünde klasik tip göğüs ağrısı yoktur ve sonradan çekilen EKG'lerde patolojik Q dalgaları tesadüfen belirlenerek hastalık tanısı konur. Böyle şüpheli durumlarda kardiyak belirteçlerin seri ölçümleri çok büyük önem taşır .(Alaybeyoğlu , [39])

Biyokimyasal belirteçlerin tespiti için yapılan testler yüksek maliyetli, karmaşık donanım ve kalifiye eleman gerektiren birkaç aşamadan oluşan zaman alıcı testlerdir. Bu testler ilerleyen bölümlerde tartışılacaktır.

Göğüs ağrısı şikayeti ile servise başvuran hastalarda ön teşhisi doğrulamak için ilk yapılan inceleme elektrokardiyogramdır. Ekg'de görülen S dalgasındaki yükselme akut koroner şüphesini güçlendirici yöndedir ve biyokimyasal testler sadece teyit etme işlevini görür. Diğer yandan ST ve T dalgasındaki anormallikler veya EKG'nin normal sonuçlar vermesi durumunda biyokimyasal testler risk sınıflamasında kritik rol oynar. Günümüzde troponin biyokimyasal belirteç testleri için altın standarttır ancak bazı durumlarda diğer kardiyak belirteçler için de test yapma gereği vardır. (Nusier and Ababneh , [24])



Şekil 2.3 Akut Miyokard Enfarktüsünün Karar Aşamaları

Kardiyak miyositlerde nekroz gelişimi nedeniyle sarkolemma bütünlüğü bozulduğundan hücre içi makromoleküller, kardiyak interstisyum ve mikrodolaşıma karışmaktadır. Bu belirleyicilerin dolaşımda görülme hız ve zamanları, hücre içi yerleşmeler, molekül ağırlıkları, bölgesel mikrodolaşım veya kandan uzaklaştırma hızları gibi çeşitli faktörlerden etkilenir.(Özden , [44])

Sitozolik proteinler hücre içinde serbest halde bulunurlar. Bu nedenle miyositlerdeki hasarı takiben dolaşımda daha erken belirir ve daha erken pik değerine ulaşırlar. Buna karşın kontraktıl bölümde bağlı olarak bulunan proteinler hücre içinde proteoliz ile serbestleşerek dolaşıma geçerler. Bundan dolayı sitozolik proteinlere göre kana geçme hızları daha yavaştır ve tepe değerine daha geç ulaşırlar. Kardiyak belirleyicileri, hücre içi yerleşimlerine göre üç ana grupta incelemek mümkündür.(Habif , [16])

1- SİTOZOLİK

- CK
- CK-MB
- LDH
- Kalsiyum bağlayan protein S 100a
- Miyoglobin
- H-FABP
- Glikojen fosforilaz BB

2- SİTOZOLİK VE YAPISAL:

- cTnT (kardiyak troponin T)
- cTnI (kardiyak troponin I)

3-YAPISAL:

- Miyozin hafif zinciri(MLC)
- Miyozin ağır zinciri(MHC)

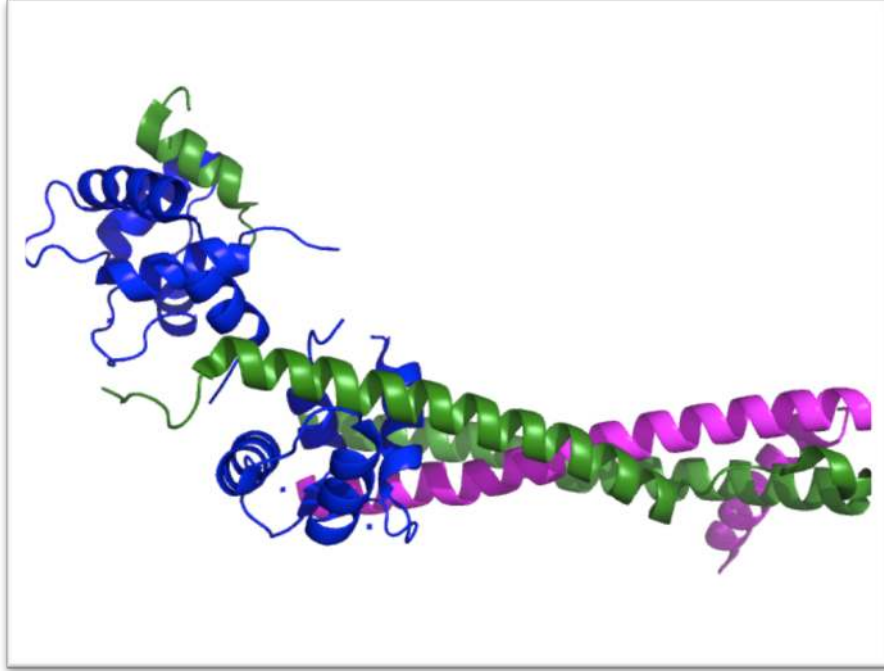
Kardiyak belirteçlerin ideal olmaları için kalp kasına özgü olmaları, normal koşullarda dolaşımda bulunmamaları, uzun süre saklanabilmeleri, klinik araştırmalarının tamamlanmış olmaları, ölçümü kolay, hızlı ve ucuz olarak gerçekleştirilebilmelidir.

Miyokard hasarı önceki yıllarda sitoplazmik enzim seviyeleri ile belirlenmekteydi. Enzim seviyelerinin belirlenmesi için de bu enzimlerin katabolik aktivite ölçümleri kullanılmaktaydı. Son yıllarda ise enzim aktivite testleri yerine kütle ölçümleri yapılmaktadır. (Özhasenekler , [45])

İmmünoassay tekniklerin gelişmesi ile daha hassas ölçümler yapabilmektedir. AKS durumunda yapılan başlıca belirteç testleri CK-MB, miyoglobin ve troponinlerdir.

2.2.1. Kardiyak Troponinler

Kardiyak troponinler kas kasılmasında anahtar rol oynayan ve kas yapısındaki ince filamentleri düzenleyen üç alt bileşene sahip proteinlerdir. Bunlar ; TnC(18kDa), TnI(24kDa) ve TnT(37kDa)'dır. Troponinler çizgili iskelet kaslarında da yer alırlar. TnC'nin iskelet ve kalp kaslarındaki izoformları aynıdır. TnI ve TnT yavaş,hızlı seyiren iskelet kası ve kalp kası olmak üzere 3 farklı kas dokusunda 3 farklı gen tarafından sentezlenmektedir. Kardiyak nekroz gerçekleşmesinden sonra kas yapısı bozulması nedeniyle troponinler dolaşıma geçerler. Sağlıklı bireylerde dolaşımda yer almadıkları için en ufak artışları bile miyokard hasarının ve akut koroner sendromlarda ölüm riskinin belirlenmesinde anahtar rol oynarlar. (Christenson et al., [8]). Yapılan çalışmalarda TnT değerinin göğüs ağrısının başlangıcından itibaren 3 saat sonra 0.3ng/ml seviyelerine ulaştığı tespit edilmiştir. Miyokard enfarktüsün erken tanısı ve yanlış pozitif değerlerden kaçınmak için ardışık test yapma gereği vardır.

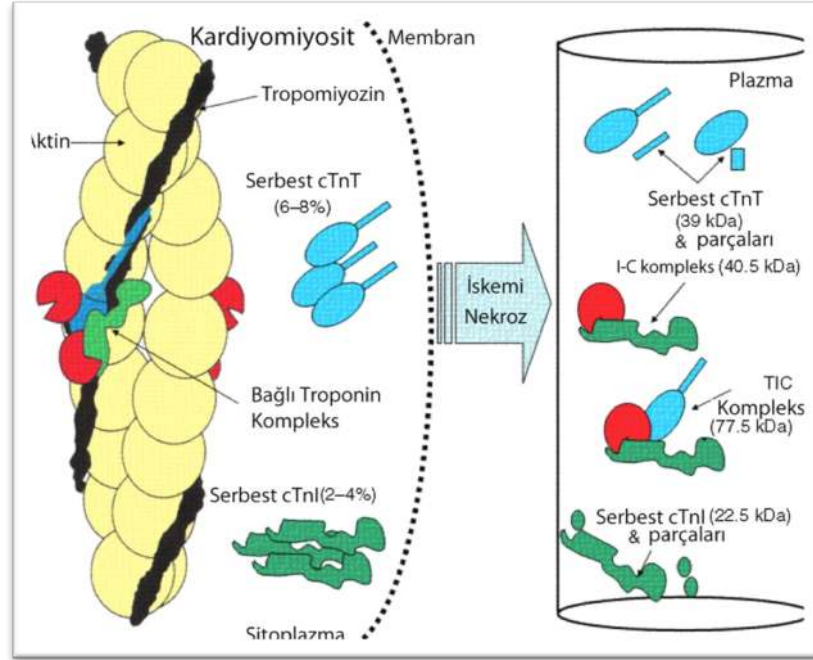


Şekil 2.4 İnsan Troponin Kompleksi Şerit Gösterimi

Şekil 2.4'te insan troponin kompleksinin kalsiyum doymuş formunun (52kDa) gösterimi yer almaktadır. Mavi zincir Troponin C, yeşil zincir Troponin I, pembe zincir Troponin T'dir.

EKG'deki belirsizlikler sonucu serum kreatin kinaz-MB (CK-MB) düzeyleri normal sınırlarda iken yüksek serum cTn düzeylerinin saptanması ve diğer kardiyak belirteçlerin aksine serum cTn'ı sağlıklı bireylerde tespit edilememesi cTn'nın minimal miyokard hasarı için oldukça duyarlı olduğunu gösterir. Ayrıca akut koroner sendromda ölüm riskinin serum cTnı düzeyleri ile yorumlanabileceği ve prognostik değeri olduğu gösterilmiştir. Serum cTnı, göğüs ağrısının akut koroner sendroma bağlı olacağını göstermekle birlikte pulmoner emboli, kardiyak yetmezlik, miyokardit, kardiyomiyopati, renal yetmezlik , kardiyak cerrahi , akut felç, septik şok, perkutanöz transluminal koroner anjiyoplasti ve ilaca bağlı kardiyotoksisitede de yükselebilir. Tüm bu olgularda serum CTnı artışı, yine de subklinik miyokard hasarını düşündürür.

Troponinler, kana üçlü kompleks (Troponin I-T-C), ikili kompleks (Troponin I-C) veya serbest alt gruplar şeklinde salınırlar. İmmun ölçümlerdeki Troponin I eşik değerlerindeki değişkenlikler, serbest ve kompleks cTnı saptanması için kullanılan antikorların farklı özgüllüklerine bağlı olabilir. Troponin I ölçümü bu farklı yöntemlerin bulunması değişik eşik değerlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca Troponin I test sonuçlarının yorumu, miyokardiyal iskeminin başlangıç zamanına göre değişiklik gösterir .



Şekil 2.5 İskemi Sonrası Biyokimyasal Belirteçlerin Plazmaya Karışması

2.2.2. Miyogloblin

Miyogloblin, kaslarda bulunan düşük molekül ağırlıklı bir proteindir. Hasarlı miyokard hücrelerinden dolaşıma salınır.

AMİ'nün başlamasından 1 - 2 saat sonra kanda tespit edilebilir. Miyogloblinin serumda bulunma süresi 12-18 saat arasındadır. İdrar ile uzaklaştırılması oldukça yüksektir. Kalbe özgü olmayıp, iskelet kasında da yüksek miktarda bulunduğundan, AMİ tanısında sınırlı özgüllüğü vardır. Göğüs ağrısının ilk 4-8 saati içerisinde miyogloblin yüksekliği diğer belirteçlerle birlikte kullanılmadıkça AMİ lehine yorumlanmamalıdır. Ancak göreceli küçük bir makromolekül olması ve AMİ sırasında hızla yükselmesi dolayısıyla AMİ'nün erken tanısında önemini korumaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda, miyokard nekrozunun daha özgü belirteçleri ile miyogloblinin birlikte bakılmasının AMİ'nün erken dönemde belirlenmesi için yararlı olduğu gösterilmiştir. (Sağlam , [46]) (Ohman et al. , [25])

2.2.3. Kreatin Kinaz(Ck)

Her biri 43000 dalton ağırlığında iki M monomerinden (CK-MM) oluşan kreatin kinaz enzimi kas dokusunda, iki B monomerinin oluşturduğu enzim (CK-BB) beyin, böbrek ve gastrointestinal sistemde, bir M ve bir B monomerlerinin oluşturduğu CK-MB enzimi ise kalp dokusunda daha çok bulunur. MM, MB ve BB izoenzimleri sitoplazmada bulunurlar. CK- MM aktivitesinin % 5 kadarı hem iskelet kası, hem de kalp kasında bulunan sarkomerin M çizgisi ile ilgilidir, ayrıca kalp kasındaki Z çizgisi ile de yüksek oranda ilişkilidir.(Gök, [43])

Miyokarddaki CK' nin %15 'i CK-MB formundadır, bu da AMİ tanısındaki duyarlılık ve özgüllüğe sebep olur. Kalp dokusuna ek olarak yetişkin iskelet kası, ince bağırsak, dil, diyafram, uterus ve prostatta da küçük oranlarda CK-MB izoenzimi bulunur.CK-MB'nin bir kısıtlılığı kısmi miyokard hasarını gösterebilecek kadar duyarlı olmamasıdır.

CK-MB'nin 2 izoformu olduğu gösterilmiştir: CK-MB1, serum tipi ve CK-MB2 doku tipidir. CK-MB2>1 ünite veya CK-MB2/CK-MB1 oranı>1.5 ise AMİ lehine kabul edilmektedir. CK-MB2 ölçümü AMİ için duyarlılığı biraz artırmakta ise de özgüllüğü fazla değiştirmemektedir.(Gök , [43])

İskelet kası hasarını kardiyak hasardan net olarak ayırmasının yanında kısmi hasarı da daha duyarlı olarak saptayan troponin ölçümlerinin kullanıma girmesi ile AMİ tanısında CK-MB ve izoformlarının önemi giderek azalmasına karşın özellikle miyokard hasarının derecesini yansıtmakta ve reperfüzyonu saptama konusunda üzerinde en çok çalışılan ve en çok veri bulunan belirteç olma özelliğini halen korumaktadır. CK-MB, miyokard hasarını takiben 3-12 saat içinde yükselmeye başlar; 24.saatte zirve değerine ulaşır; 48-72 saat içinde de normale döner.(Vatner et al., [34])

Kontüzyon, aşırı egzersiz, konvülsiyonlar, intramüsküler enjeksiyonlar, pulmoner emboli, elektrik çarpması, kardiyoversiyon, miyokarditler, perikarditler, kalp cerrahisi sonrasında CK-MB yükselebilir. Ayrıca böbrek yetmezliğinde ve hipotiroidide de klirens azalacağı için CK-MB düzeyleri yüksek bulunabilir.(Gök, [43])

CK ve CK-MB'nin seri ölçümleri ile infarktüs büyüklüğü ve yaygınlığının tahmin edilebileceği gösterilmiştir.(Roberts et al., [28]).

Intrakoroner girişimlerden sonra oluşan CK-MB yükselmelerinin önemi ve oranı konusunda çelişkili yayınlar vardır. Komplikasyonsuz girişimlerden sonra CK-MB yükselmesinin çok nadir olduğunu iddia eden çalışmalar olmasına karşın, bu oranı çok yüksek bulan çalışmalar da vardır. Bugün için CK-MB'de girişim sonrası bazal değerlere göre 3 kat artış olması yeni bir Mİ olarak değerlendirilmektedir.(Gök, [43])

Trombolitik tedavi sonrası veya spontan olarak damarda rekanalizasyon sağlanabilirse kan akımının sağlanmasıyla birlikte miyokarddan salgılanan enzim miktarının hızlanması nedeniyle CK-MB zirvesi daha erken dönemde oluşur (genellikle 16 saatten önce). Bu hastalarda genellikle 24.saatten önce CK-MB değeri normale döner.(Vatner et al., [34])

CK-MB KİTLE ölçümü: Plasma CK-MB seviyesinin klasik ölçümü, agaroz jel elektroforezinde CK izoenziminin gücüne dayanır. CK-MB izoformunun direkt ölçümü ve hesaplanması monoklonal antikorları kullanan yeni gelişmiş fluorometrik immunoassay yöntemi ile yapılmaktadır. Klasik jel agaroz elektroforezinden daha hızlı olan bu yöntemle acil serviste veya koroner yoğun bakımda yatak başı ölçümü daha kolay yapılabilir.

Gelişen Mİ seyrinde CK-MB ve CK-MB kitle ölçümlerinin duyarlılığı ve özgüllüğünün incelendiği çalışmalarda CK-MB kitle ölçümü, klasik CK-MB ölçümünden daha duyarlı sonuçlar vermiştir. Veriler, CK-MB kitle ölçümünün, AMİ'nün erken tanısı için iyi bir marker olabileceğini göstermiştir. Göğüs ağrısı semptomunun başlangıcından sonraki ilk 6 saatte CK-MB kütlesi için sık plazma örneklerinin alınması, daha erken AMİ tanısına olanak sağlayabilir.(Gök, [43])

Kardiyak Belirteç	Yükselme Zamanı	Tepe Değere Ulaşma Zamanı	Normale Dönüş Zamanı
Ck-Mb	4-6 Saat 3-12 Saat	12-24 Saat 24 Saat	3-4 Gün
Ldh	2-5 Gün	-	10 Gün
Miyoglobin	2-4 Saat 4-8 Saat	8-10 Saat	24 Saat
Troponin I	4-6 Saat	12 Saat	3-10 Gün
Troponin T	4-8 Saat	12-48 Saat	7-10 Gün
H-Fabp	20 Dk	2 Saat	-
Glikojen Fosforilaz Bb	4 Saat		
Ck-Mb Mass	6 Saat		

Grafik 2.1 Kardiyak Belirteçlerin Serum Yükselme Süreleri

2.3. Kardiyak Troponin Düzeylerini Yükselten Hastalıklar

2.3.1. Akut Koroner Tıkanma

Bir koroner arterin akut tıkanması çok sık olarak daha önce ciddi atherosklerotik koroner kalp hastalığı bulunan kişilerde ortaya çıkar, hemen hiç bir zaman koroner dolaşımın normal olduğu bir bireyde görülmez. Akut tıkanma, aşağıda iki tanesi açıklanan birkaç etkinin herhangi birinden kaynaklanabilir.

2.3.1.1. Atherosklerotik plak

Trombüs adı verilen ve sonuçta arteri tıkayan lokal bir pıhtı oluşumuna yol açabilir. Trombüs, genellikle aterosklerotik plağın endotel boyunca kırıldığı yerde oluşarak akan kanla doğrudan temasa geçer. Plağın yüzeyi düzgün olmadığı için bu yüzeye trombositler yapışmaya başlar, fibrin oluşur ve eritrositler damarı tıkayınca kadar genişleyen bir pıhtı içinde toplanırlar. Ya da nadiren pıhtı atherosklerotik plağa tutunduğu yerden kopup koroner arter ağacının daha perifer dallarından birine, arteri bu noktada tıkamak üzere, kan akımıyla sürüklenir. Bu şekilde arter boyunca sürüklenip daha uçtaki bir damarı tıkayan trombüse koroner emboli adı verilir. (Hall and Guyton, [38])

2.3.1.2. Lokal Kas Spazmı

Çoğu klinisyen, bir koroner arterde lokal kas spazmının da gelişebileceğine inanmaktadır. Spazm, aterosklerotik plağın kenarları tarafından arter duvarındaki düz kasların doğrudan iritasyonundan veya koroner damar duvarının aşırı kasılmasına yol açabilen lokal sinirsel bir refleksten de kaynaklanabilir. Spazm daha sonra damarın sekonder trombozuna da yol açabilir. (Hall and Guyton, [38])

2.3.2. Miyokard Enfarktüsü

Akut koroner tıkanmadan hemen sonra tıkanmanın ötesindeki kan damarlarında kan akımı, çevre damarlarda küçük miktardaki kollateral akım dışında, durur. Hiç kan almayan ya da aldığı kan akımı kalp kasının işlevlerini sürdürmesine yetmeyecek ölçüde olan kas alanının infarktli olduğu söylenir, olayın tümüne miyokard enfarktüsü adı verilir.

Enfarktüsün başlangıcından hemen sonra küçük miktarlarda kollateral kan infarkt alanına sızmaya başlar ve bu, bölgesel kan damarlarının giderek genişlemesiyle birlikte bölgenin durağan kanla dolmasına yol açar. Aynı anda kas lifleri kandaki son oksijen kırıntılarını kullanır. Bu da hemoglobinin tamamen deoksijene olmasına yol açar. Enfarktüs alanı mavi-kırmızı görünümündedir ve bu bölgedeki damarlar, kan akımı olmamasına rağmen genişlemiş olarak görülür. Daha sonraki dönemlerde damar duvarları daha fazla geçirgen olmaya başlar ve sıvı sızdırır. Lokal kas dokusu ödemli olmaya, kalp kası hücreleri azalmış hücresel metabolizma nedeniyle şişmeye başlar. Kan akımı olmazsa birkaç saat içerisinde kalp kası hücreleri ölür.(Hall and Guyton, [38])

Kalp kası sadece yaşayabilmek için 100 gr kas dokusu başına dakikada 1,3 ml oksijene gereksinim duyar. Normal dinlenme koşullarında 100 gr sol ventrikül kasına dakikada 8 ml oksijen ulaşır. Bu yüzden normal dinlenme durumundaki koroner kan akımının %15-30'u bile hücrelerin yaşamasına yetecektir. Bununla birlikte büyük bir infarktın hiç kollateral kan akımı olmayan merkezi bölümündeki kas dokusu ölür.

2.3.3. Perikardit

Perikard, kalbe içinde rahatça hareket edeceği bir ortam oluşturur. Miyokardın dayanıklılığını artırır. Kalbin aşırı dilatasyonunu önler, negatif basınç sayesinde ventrikül sistolü sırasında atriumlara kan doluşu kolaylaştır. Akciğer, mediasten, özafagus, diafragma, plevra gibi komşu organ enfeksiyonlarına karşı fizyolojik bir bariyer oluşturur.(Çelebi, [10])

Perikardiyumun inflamasyonuna perikardit denir. Normalde perikardiyal sıvı miktarı 10-30 ml olup, perikard yapraklarının kalınlıkları 1'er mm civarındadır. Perikard içi basınç -1 ila -2 mmHg olup, bu değer intraplevral basınca eşittir. Bu basınç inspiyumda -5 mmHg olur. Perikardite neden olan durum veya etkene bağlı olarak inflamasyonun özellikleri ve klinik seyri değişiklikler gösterir. Bu nedenle klinik veya laboratuvar (patolojik) özelliklerine göre perikarditler; akut veya kronik, efüzyonlu ve ya efüzyonsuz, fibrinöz veya serofibrinöz veya pürülan, konstriktif veya konstriktif olmayan perikarditler olarak tanımlanırlar. Perikarditlerin

seyri sırasında özellikle subepikardiyal miyokardiyumda da inflamasyon olabilmektedir. Bu durum klinik ve laboratuvar olarak önem kazanırsa miyoperikardit olarak adlandırılır.

2.3.4. Kalp Yetmezliği

Tedavi edilmesi gereken en önemli hastalıklardan biri olan kalp yetmezliği basitçe kalbin vücudun gereksinimini karşılamaya yetecek miktarda kanı pompalamadaki yetersizliği demektir. Bu durum kalbin kanı pompalama yeteneğini azaltan herhangi bir durumda oluşabilir. Nedeni genellikle azalmış koroner kan akımı sonucu miyokardın kasılma yeteneğinin azalmasıdır. Ancak pompalama yetersizliği kalp kapaklarının harabiyeti, kalp çevresinde dış basınç, B vitamini eksikliği, primer kalp kası hastalığı veya kalbin pompalama etkinliğini azaltan herhangi bir diğer anormallik sonucu da oluşabilir.(Hall and Guyton, [38])

2.3.5. Septik Şok

Eskiden kan zehirlenmesi olarak bilinen durum şimdi klinisyenler tarafından septik şok olarak adlandırılmaktadır. Bu, enfeksiyonun kan yoluyla bir dokudan diğerine taşınarak aşırı harabiyete neden olduğu, çok sayıda vücut alanına geniş bir şekilde yayılan bakteriyel bir enfeksiyonu tanımlar. Septik şokun birçok değişik tipi vardır; çünkü olaya neden olan birçok bakteriyel enfeksiyon tipi olduğu gibi vücudun bir kesimindeki enfeksiyon diğer bölgelerdeki enfeksiyona göre farklı etkiler oluşturmaktadır.(Hall and Guyton, [38])

2.4. Troponin Ölçüm Yöntemleri

2.4.1. Elisa

İmmün bir ölçüm yöntemi olan ELISA antijen-antikor kompleksi oluşumunu ölçmek için, radyoizotopik işaret yerine bir enzim işareti kullanır. Bu enzim işareti (horseradish peroksidaz), bir liganda konjugedir. Ligand, bir antijen, ilgili antijene spesifik bir antikor, primer antikora karşı bir antikor olabilir.

2.4.1.1. Kompetitif (yarışmalı) ölçümler

Bir antijen veya antikor, katı bir destek üzerine (ölçüm tüpü) adsorbe edilmiştir. Ölçüm tüpüne işaretli ligand içeren test örneği ve enzim (horseradish peroksidaz) işaretli ligand eklenir. Belirlenen referans tüpüne sadece enzim işaretli ligand eklenir. Kısa bir inkübasyon süresince immobilize antijen veya antikora bağlanmak için test örneğindeki işaretli ligand ile enzim işaretli ligand yarışır ve bağlanırlar. İnkübasyondan sonra, çözeltideki serbest (bağlanmamış) enzim işaretli ligand yıkama suretiyle çıkarılır. Substrat (H_2O_2) ve kromojen (o-fenilendiamin) eklenir. İkinci inkübasyon süresince kromojen, bağlı fraksiyondaki enzim (horseradish peroksidaz) tarafından renkli ürüne çevrilir. Standartların, kontrollerin ve örneklerin absorbansı, durdurucu reaktif (1N H_2SO_4) eklendikten sonra 2 saat içinde uygun dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak belirlenir. En çok renklenme, referans tüpünde gözlenir. Test örneğindeki işaretli ligandın (antijen veya antikor) konsantrasyonu, standart eğri yardımıyla bulunur. Oluşan ürün miktarı, test edilen örnekteki işaretli ligand konsantrasyonu ile ters orantılıyken; tüplerde referans tüpüne göre renk azalması standart, kontrol ve örneklerdeki işaretli ligand miktarı ile doğru orantılıdır.

Kompetitif ELISA yöntemi, antikor belirlemek için sıklıkla kullanılır ki bu durumda ölçüm tüpünün iç duvarı antijen kaplıdır.

2.4.1.2. Nonkompetitif ölçümler (sandviç yöntemi):

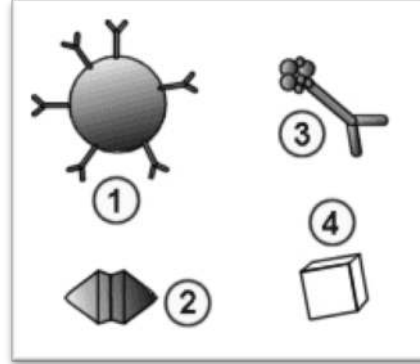
Polisteren ölçüm tüplerinin iç duvarına veya boncuklara, antijen için spesifik antikorlar fazla miktarda adsorbe edilir. Ölçüm tüpüne eklenen örnekteki tüm antijenlerin immobilize antikora bağlanması için inkübasyon yapılır. Yıkama yapıldıktan sonra, ölçüm tüpüne enzim (alkalen fosfataz) işaretli ikinci antikor eklenir. İkinci inkübasyon süresince primer antikor-antijen-enzim (alkalen fosfataz) işaretli ikinci antikor kompleksi oluşur. Eğer ikinci antikor monoklonal ise, antikor substrat ile eşzamanlı eklenebilir ve yalnız bir kez yıkama yapılır; değilse ikinci yıkamadan sonra ölçüm tüpüne substrat (p-nitrofenilfosfat) eklenir. Standartların, kontrollerin ve örneklerin absorbansı, durdurucu reaktif (1N H_2SO_4) eklendikten

sonra 2 saat içinde uygun dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak belirlenir. Konsantrasyonlar, standart eğri yardımıyla bulunur.

2.4.2. CMİA

Antijen , antikor ve analitlerin örnekler içerisinde belirlenmesini sağlayan bu yöntem kimyasal mikropartikül luminans immunoassay olarak adlandırılır. Bu yöntem için gerekli kimyasallar şunlardır:

- Aranan analit için manyetik olarak işaretlenmiş antijen, antikor veya virütik tanıyıcı kaplı mikropartiküller
- Akrinidyum işaretli konjugat
- Ön başlatıcı solüsyonlar

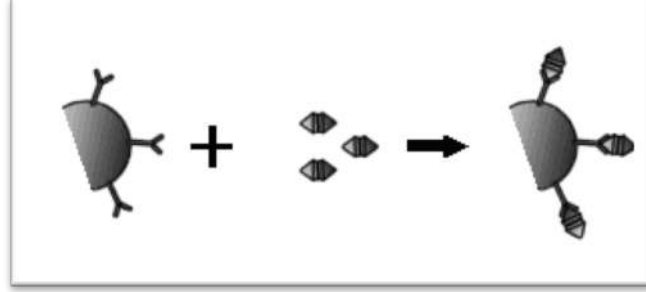


Şekil 2.6 CMİA gösterimleri

- 1)Tanıyıcı ajan ile kaplı Anti-Analit Mikropartikül 2) Hedef Molekül 3) Akrinidyum işaretli konjugat 4) Ölçülmek istenilmeyen örnek

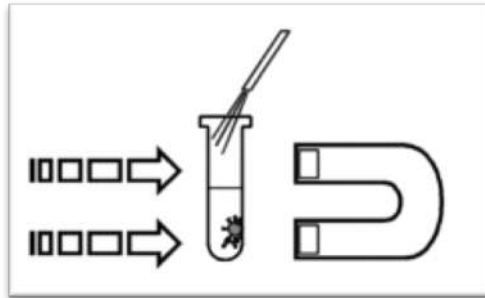
CMİA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) sisteminde sıralama hedef moleküle göre değişmektedir ve her bir assay için protokoller farklılık göstermektedir. En basit haliyle protokolün temel mantığı şu şekilde özetlenebilir:

- Otomatik pipet mikropartikülleri (manyetik işaretli tanıyıcı ile kaplanmış) örneğin bulunduğu reaksiyon küvetine bırakır. Vortex ile karışmaları sağlanır.



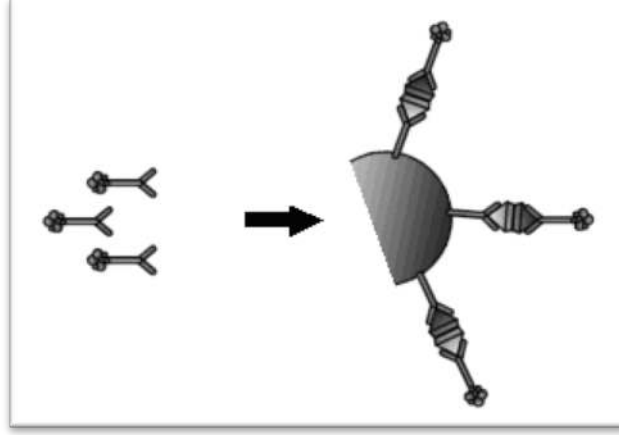
Şekil 2.7 Hedef ile Mikropartiküllerin Etkileşimi

- Reaksiyonun gerçekleştiği çözelti içerisinde hedef molekül mikropartiküller ile bağlanarak immün kompleks oluşturur.
- Mıknatıs yardımı ile manyetik işaretli mikropartiküllerin (hedef ile bağlanmış) reaksiyon küvetinin duvarına çekilmesi sağlanır. Yıkama solüsyonu ile bağlanmayan moleküllerin ve atıkların reaksiyon küvetinden atılması sağlanır.



Şekil 2.8 Reaksiyon küvetinin yıkanması

- Otomatik pipet, kimyasal luminans akrinidyum işaretli konjugatı reaksiyon küvetine boşaltır. Konjugat immun komplekse bağlanır ve reaksiyon karışımı tamamlanmış olur.



Şekil 2.9 Akrinidyum işaretli konjugatın mikropartikül ile bağlanması

- Bağlanmayan moleküller yıkama küvetinden atılır.
- Ön-Reaksiyonu başlatıcı solüsyon (hidrojen peroksit) havuza aktarılır ve sistem ilk optik okumasını alır. Bu solüsyonun temel görevi ortamı asidik hale getirmek, erken enerji boşalımını (ışık yayılımı) engellemektir. Bunun yanında mikropartiküllerin topaklanmasını engeller ve akrinidyum boyanın mikropartikül kompleksinden ayrılmasını sağlar ve boya bir sonraki adım için hazır hale gelir.
- Reaksiyon başlatıcı solüsyon (Sodyum Hidroksit) eklenir. Akrinidyum, peroksit ve alkali bir solüsyona maruz kalarak oksidatif bir reaksiyona girer.
- Bu reaksiyon kimyasal luminans reaksiyonun gerçekleşmesini sağlar. N- Methilakridon oluşur ve normal formuna dönerken enerji (ışık) yayılmasını sağlar.
- CMIA optik sistem kimyasal ışık yayılımını belli bir zaman süresince okuyarak analit için kuantitatif ölçüm gerçekleştirir veya kantitatif ölçüm için eşik değer tespiti yapar.

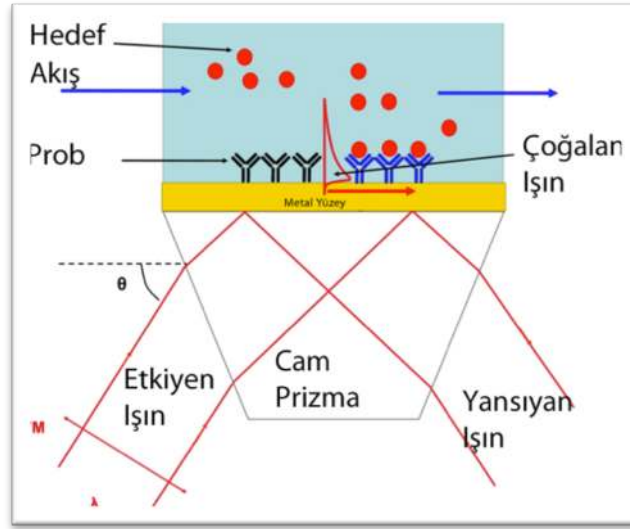
2.4.3. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) bölgesel kırılma indisindeki değişimleri algılayarak metal yüzeylerindeki moleküler bağlanmaları ölçen optik biyosensör tekniğidir. SPR; çözelti-faz ve immobilize biyomoleküller arasındaki etkileşim olan çalışmalarda kullanılan yüzey duyarlı bir tekniktir. SPR, floresan ve ELİSA gibi tekniklere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Ölçümlerin kırılma indislerinin değişmesi, analitlerin saçılma bandı, etiketi gibi özelleşmiş karakteristiklerine gerek duyulmaması ,direk algılanması, geniş moleküler ağırlık ve bağlanma etkinliği aralığında analitleri algılaması SPR'nin avantajlarındanıdır. Aynı zamanda SPR geniş kullanım alanına sahiptir. Örneğin; protein–peptid etkileşiminin gözlenmesi, protein-DNA etkileşiminin gözlenmesi, DNA hibridizasyonu gibi çalışmalarda kullanılmaktadır.(Dutra and Kubota, [11])

Genellikle gümüş ve altın metal ara yüzeylerinin uyarılmasıyla elektromanyetik dalgalar oluşur. Metal yüzeyine gelen aç kritik açıdan daha büyük olduğunda yansıyan ışıktaki azalma gözlenir. Bu azalmanın sebebi gönderilen ışıktan plazmon yüzeye olan enerjinin rezonans transferinin yansıyan ışıktaki keskin bir azalmaya sebep olmasıdır. Yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kaybın gerçekleştiği açıya rezonans açısı ya da SPR açısı adı verilir. Bu geliş açısında ışık, yüzey plazmonlarını (elektron paketçikleri) harekete geçirecek, yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşecektir. Yüzey plazmon rezonansı iki optik ortamın ara yüzeyine ince iletken bir film yerleştirildiğinde meydana gelir. Spesifik bir geliş açısında metal yüzeyindeki elektron frekanslarının eşleşmeleri nedeniyle gelen ışık ile rezonans durumuna gelecektir. Bu rezonans durumunda enerji absorblanacağı için yansıyan ışığın yoğunluğunda bir azalma meydana gelmektedir. Yansıyan ışıktaki gerçekleşen bu durum yüzeyde kaplamanın gerçekleştiğinin göstergesidir.(Bergstrom and Mandenius, [3]; Green et al., [15])

SPR sensörü çapraz bağlanmış dextran içeren altın kaplı cam diskten oluşmaktadır. Yüzey karakterizasyon etkisinden dolayı dextran matriksi bağlanma kapasitesini arttırmaktadır. Antikor ile streptavidin konjuge çiftlerdir ve streptavidin dextranın birincil amin grubuna bağlanabilir yapıdadır. Bu yapılar sayesinde bağlanma gerçekleştiğinde yansıyan açıda oluşan değişim gözlemlenir. Değişen

açı ile bağlanan malzeme miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. SPR açısındaki miliderece değişiklik sensör yüzeyindeki makromoleküllerin bağlanma kalitesinin cevabı olarak kullanılmaktadır. 120 miliderece değişim yüzeydeki proteinlerin yaklaşık 1 ng/mm² değişimini yada yığın kırılma indisinin yaklaşık 10⁻³ değişimini ifade etmektedir. Bu değerler ile SPR tekniği ile metal yüzeylerine bağlanan moleküllerin gözlemlenmesi gerçekleştirilmektedir.(Bergstrom and Mandenius, [3])

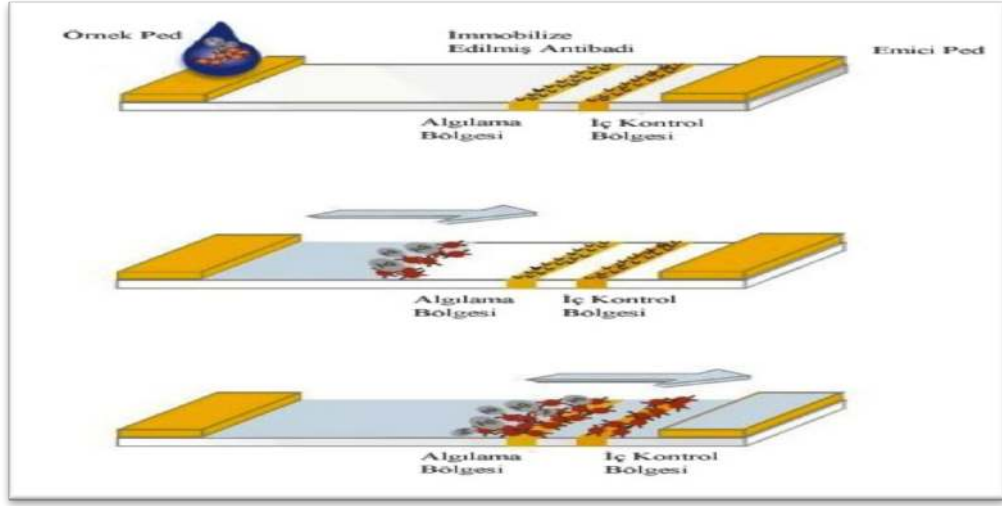


Şekil 2.10 Yüzey Plazmon Rezonans Çalışma Prensibi

2.4.4. İmmunokromatografik

Son yıllarda kardiyak belirteçlerden troponin için kullanılan kalitatif; ancak çok hızlı sonuç veren yeni testler geliştirilmiştir. Bu testlerin temel mantığı kromatografik yöntemle dayanmaktadır. Test kartuşu kromatografik bir membran üzerinde iki farklı bölgeye immobilize edilmiş antikorlar ile bir filtre üzerine uygulanmış renkli partiküller içeren çözülebilir taşınabilir ajan içeren malzemeden oluşur. Test, örnek havuzuna yaklaşık 100µl serum damlatılması ile gerçekleştirilebilmektedir. Damlatılan serum örneği renkli işaretçiler içeren filtre boyunca akar, örnek ve işaretçiler daha sonra birlikte membrana geçerler ve burada diğer belirteç bölgeleri ile temas ederler. Örnek içerisindeki troponinler antikorları tarafından immobilize edilirler ve membran üzerindeki o bölgede renk değişimi sonucu bir çizgi oluşur. Geri kalan partiküller ise ikinci antikor bölgesinde immobilize olurlar ve kontrol

çizgisini oluştururlar. Bazı durumlarda ek donanım ile çizgilerin yoğunluğu izlenerek troponin yoğunluğu belirlenebilir. (Cloney et al., [9])



Şekil 2.11 İmmunokromatografik Ölçüm Gösterimi

2.4.5. Elektrokimyasal

Biyosensör geliştirme konusunda genelde en büyük ilgiyi çeken elektrokimyasal cihazlardır. Bu cihazlar hasta izlenmesi için basit, maliyeti düşük, kesin ve hassas sonuçlar üretmektedir. Elektrokimyasal biyosensörlerin molekül izleme çalışmalarına uygulanması biyolojik tanıyıcı molekül ile elektrot dönüştürücü çifti ile ilgilidir. Çeviricinin amacı biyolojik olarak tanınabilecek bir olayı, kullanılabilir bir elektrik sinyaline çevirmektir. Amperometrik ve potansiyometrik çeviriciler elektrokimyasal biyosensörlerde en çok kullanılan bağlantılardır. Potansiyometrik cihazlarda analitik bilgi, biyolojik olarak tanıma işleminin biyopotansiyele iyon seçicili elektrotlar sayesinde çevrilmesiyle gerçekleşir. Amperometrik biyosensörlerde; sabit bir voltaj uygulanır ve elektroaktif içeriğin indirgenme ve yükseltgenme işlemlerinin sonucunda oluşan akım değişimi gözlenir. Amperometrik biyosensörler yüksek duyarlılığı ve geniş doğrusal ölçüm aralığı ile daha uygundur. Yeni geliştirilen biyosensörlerde, sayısız teknolojik inovasyonun bir araya getirilmesi amperometrik sensörlerin geniş klinik uygulamalarda kullanılmasının önünü açmıştır. Yüksek duyarlılığı, seçiciliği, kullanım kolaylığı ve küçük olması bu elektriksel biyoanaliz sistemlerinin karışık optik protokollerle

yarışabilmesini sağlamaktadır. Minyatürleşme biyoğip cihazındaki küçük bir parmak izi içine sayısız mikroskobik elektrot dönüştürücü yerleştirilebilmesine olanak vermektedir ve sonucunda yüksek yoğunlukta diziler elde edilebilmektedir.(Ko et al., [19])

Yapılan bir ęalıřmada; hassas, güvenilir ve taşınabilir elektrokimyasal immünosensör; birbirinden ayrı ölçüm havuzcukları, mikroelektrot ęip ve elektrokimyasal olarak cTnl konsantrasyonu ölçen PDMS kanal kullanılarak geliştirilmiştir. Silanizasyon işlemi PDMS kanallarının iç yüzeyinde geręekleřtirilmiř olup, yüzey altın elektrotlar dışında karboksil gruplarına maruz bırakılmıştır. Protein G , IgG antikorunun Fc kısmına spesifik olarak bağlanabilen bir proteindir. Protein G, silan film üzerine anti-cTnl'dan sonra immobilize edilmiştir ve bu immobilizasyon anti-cTnl'nın oryantasyonunun düzenini arttırmıştır. Aynı zamanda parazit olmadan antikorun antijene bağlanması sırasında oluşabilecek üçüncül yapıların Fab kollarındaki serbest hareketlerini arttırdığı belirtilmiştir. (Boyle and Reis, [5])

Elektrokimyasal mikroğip tabanlı biyosensör insan kardiyak troponin I (cTnl) görüntülenmesi için geliştirilmiştir. Kardiyak Troponin I, miyokard enfarktüsünde oluşan miyokardiyal hasarın erken dönemde görüntülenmesini sağlamaktadır. Mikroğipin düşük görüntüleme limiti olup, 148 pg/ml'dir. Bu değer, analit enjekte edildikten 8 dakika sonra son elektrokimyasal sinyalden önceki görünen değerdir. Elektrokimyasal sinyal; protein G tarafından antikordaki düzenli oryantasyona, sterik engelleri azaltan en iyi paketleme yoğunluğuna ve yüzeyi karakterize edilmiş, kirlenmemiş altın elektrota dayandırılmaktadır. Bu sonuçlar biyosensörün hassasiyetini arttırmıştır. Üstelik bu sistem geleneksel yöntemlerden çok daha ekonomik , hızlı ve basit olup bakım noktası analizine izin vermektedir. (Ko et al.)

2.4.6. Kuvars Kristal Mikroterazi Biyosensörler

2.4.6.1. Piezoelektrik Etki

Latince bastırmak anlamına gelen “piezin” sözcüğünden türetilmiş olan piezoelektrik etki, kristallerin yüzeylerine mekanik kuvvet uygulandığında kristal yüzeylerine uygulanan kuvvet ile doğru orantılı bir elektriksel potansiyel fark

oluşması ve tam tersi olarak bir elektriksel potansiyel uygulandığında kristallerin boyut değişiminin sonucu olarak bir salınım oluşturmalarıdır; bu durum ters piezo elektrik etki olarak adlandırılmaktadır. (Tabrizi, [47])

Kristali oluşturan atomlarda vibrasyon, atomların yer değiştirmeleri ve ilk konumlarına gelmelerine kadar geçen süre ve bu döngünün birim zamanda sürekli olarak tekrarlaması sonucu kristalin rezonans frekansı oluşur . Rezonans frekansı ile vibrasyonun sonucu meydana gelen polarizasyon aynıdır.

2.4.6.2. Kuvars Kristal Mikroterazinin Özellikleri

Piezoelektrik kristallerde elektrotlar kuvars yüzeyi iki yanından sıkıştırır. Bu sıkıştırma ile elektrotlara uygulanan değişken elektrik akımı ile kuvars yüzeye dik elektrik alan oluşur ve sonucunda kristal salınımı gerçekleşir. Piezoelektrik kristaller 5-15mm boylarında, 0.15mm kalınlığında genelde yuvarlak şekildedir. Rezonans frekansları 4 ile 12 MHz arasındadır. Metal elektrotlar altın, gümüş, alüminyum, krom ve alaşımlarından olabilir. İnert olması nedeniyle altın elektrotlar daha sık tercih edilmektedir.

Kristallerin kesimi algılayıcı olarak kullanılmalarında önemlidir. Kristal yapının karakteristik düzlemi ile kesme tabakası arasındaki açı AT ve BT kesmelerde 35°15' ve -49°00' dir. AT kesimin getirdiği en büyük avantaj kararlı olmaları ve sıcaklık katsayılarının 1ppm/°C olmasıdır. (Tabrizi , [47])

2.4.6.3. Sauerbrey Denklemi

Bir kuvars kristalde kalınlığı (Δx) ile rezonans frekansı (f) arasındaki ilişki aşağıda verilmiştir. Burada “N” frekans katsayısı olup, AT-kesme kuvars kristallerde değeri 1.67x10⁵ cm Hz'dir.

$$\Delta x = N / f$$

Kalınlık aynı zamanda kütlesi ile de aşağıdaki gibi ilişkilidir:

$$\Delta x = m / A \cdot \Delta q$$

Burada;

m: kristal kütlesi (g),

A: kristal üzerindeki elektrodun altında kalan alan (cm²),

Δq : kristal yoğunluğu (kuvars için: 2.65 g/cm³) dur.

Yukarıdaki iki denklem birleştirilir ve yeniden düzenlenirse aşağıdaki ifade elde edilir:

$$f = \Delta q \cdot N \cdot A / m$$

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

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

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

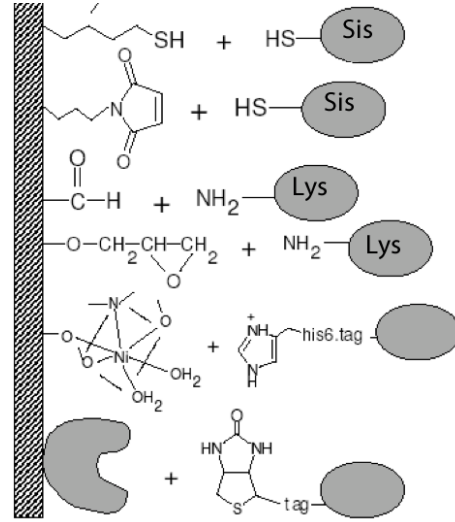
$$\Delta f = - 2.26 \times 10^{-6} f^2 \Delta m / A$$

Burada görüldüğü gibi “Kristal üzerine ilave edilen kütle (Δm), kristalin salınım frekansında kaymaya neden olur (Δf), ki bu kayma ölçülebilirse kütle artışı yukarıdaki basit ifadeyle hesaplanabilir.” Bu denklik ilk kez Sauerbery tarafından türetilmiş olup onun adıyla anılmaktadır.(Ermek, [41])

2.5. İmmobilizasyon Yöntemleri

Kuvars kristallerin yüzeyine antikor immobilizasyonu yapılabilmesi için ilk önce yüzeylerinin temizlenmesi gereklidir. Yüzey temizliği sonrasında yüzeyin aktive edilmesi ve son olarak fonksiyonel grupların immobilize edilmesi ile biyosensör yüzeyi hazırlanmış olur. Kuvars kristallerde yaygın olarak altın, gümüş ve platin elektrotlar kullanılmaktadır. Altın elektrotlu kristaller doğrudan, gümüş elektrotlu kristaller yumuşak asitler ve bazlar teorisine dayanarak, yumuşak asitler olarak tiyoller ile kovalent bağ yapmaktadır.

- Tiol Yüzey
- Maleimid Yüzey
- Aldehit Yüzey
- Epoksi Yüzey
- Nikel Şelat Yüzey
- Streptavidin Y.
- Biotin Yüzey



Şekil 2.12 Yüzeyler ve Bağlanma Türleri

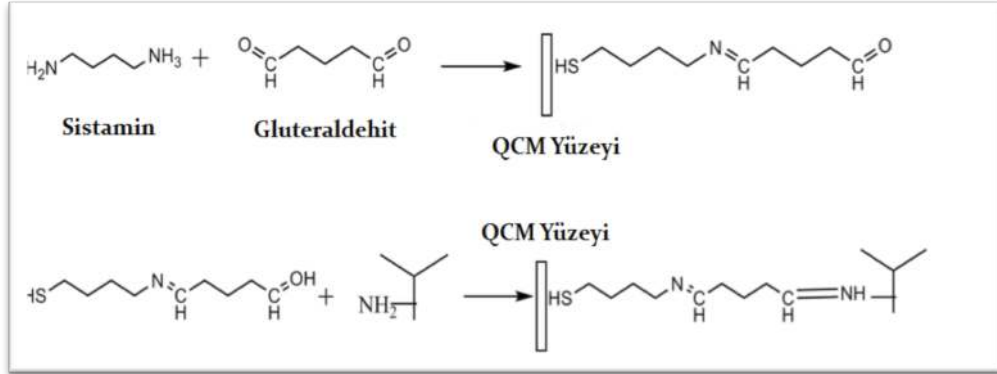
2.5.1. Non-Kovalent (Zayıf Bağlar) Yöntemler

En kolay antikor immobilizasyon yöntemi fiziksel adsorbsiyondur. Antikor yüzeye hidrojen bağları, van der Waals ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanabilir. Bağlanmanın gerçekleşmesi için antikorun yüzeye teması ve bir süre beklenmesi yeterlidir. Bu etkileşimler pH ve sıcaklık gibi faktörlere fazlasıyla bağlıdır ve antikorun yüzeyden ayrılması için herhangi birinin değişmesi yeterlidir. Antikorun yüzeyden kolayca ayrılması biyosensörün tekrar kullanılabilirliği açısından olumsuz bir durumdur.

2.5.2. Kovalent Bağlanma

Kovalent bağlanma karmaşık immobilizasyon prosedürleri ve gerçekleşme süresinin daha uzun olmasına rağmen fiziksel adsorbsiyona göre birçok avantaja sahiptir. Bunların başında daha istikrarlı oluşu ve güçlü iyonik çözeltilerde dahi antikor için güçlü bağ yapısını koruması gelmektedir. Kararlı yapısı ile biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini sağlar. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ticari uygulamalarda oldukça önemlidir. Ticari uygulamalarda kıymetli antikorların biyosensörün kullanımı sonrası kaybedilmemesi ve yapılarını korumaları beklenir. Antikorların immobilizasyonunun etkinliklerinin azalmaması için fonksiyonel gruplar aracılığıyla yapılması tercih edilir. Tiyol ve sülfidlerin, organik polimer tabakalarının ve ince inorganik polimer tabakaların altın yüzeylere kolayca bağlanmaları ile

yüzey fonksiyonelliği gerçekleşir. Kovalent bağlanma da –SH , -NH ve –OH grupların protein bağlanması ile gerçekleşir.(Lee and Chang, [21])



Şekil 2.13 Sistamin ve Glutaraldehitin Kuvars Yüzeye Bağlanması

2.5.3. Literatürden Örnekler

Antibody İmmobilizasyonu; Piezoelektrik immünosensör *Escherichia coli*'nin hızlı tanınması için geliştirilmiştir. Geliştirilen immünosensör bakteriyi 30-50 dk içinde 103-108 CFU/ml aralığında görüntüleyebilmektedir.

Temizlenmiş kristal ilk olarak 16-mercaptohexadeconic(MHDA) ethanol solüsyonu içine daldırılır. MHDA modifiye edilmiş kristallere EDC(carbodiimide)-NHS uygulanır ve terminal karboksilik grupları aktif NHS esterlerine çevrilir. Suyu yıkanıp kurutulduktan sonra , anti-E.coli antikorları altın yüzey üzerine eklenir ve en az 15 saat 4 C de bekletilir. Antikorlarda oluşabilecek taşma PBS ile yıkanarak temizlenir.(Su and Li, [31])

Ferritin; bir depo proteini olup genel olarak vertebralardan, intervertebralardan, bitkilerden, fungiden, ve bakterilerden dağıtılmaktadır. Ferritinin asıl görevi hücreler arasındaki demir iyonunun dağıtımı ve detoksifiye edilmesidir.Kanda demir iyonunun yükselmesi ile birlikte, kandaki ferritin orantsız bir şekilde artmaktadır. Kandaki ferritin oranının yükselmesi durumu tümör ve iltihabın spesifik olmayan belirteçidir.

Ferritin immünosensörü ; anti-ferritin antikorlarını quartz kristalinin altın diskinin üzerine immobilize edilerek elde edilmiştir. Bu şekilde üretilen ferritin immünosensörünün bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar :

- Yüksek spesifite
- Yüksek duyarlılık
- Az hacimde örnekle çalışabilmesi
- Tekrar kullanılabilmesi

Kristal sistamin ve glutaraldehit solüsyonları ile etkileştirilmiş daha sonra antikor içeren solüsyonu içine daldırılmıştır. Kristal yüzeyi glycine-PBS solüsyonu ile bloke edilmiştir. (Chou et al., [7])

Oakadaik asit görüntülenmesi; bunun için üretilen QCM bazlı immünosensör standart solüsyonlar ile üretilmiştir. Pek çok bağlama teknolojisi , protein A , protein G ve glutaraldehitli polietilenimin (PEI) ve bağ yapmamış amino grupları glutaraldehit ile aktiflenmiştir . OA-BSA eşleniği daha sonra aktif türevlere bağlanarak çapraz bağlı kompleksleri oluşturmuştur. Çapraz bağlı kompleksler kristalin altın yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanmıştır ve sonuç olarak iyi durumda uzun dönemli depolama özellikleri edilmiştir. (Tang et al., [32])

Oakadaik asidin görüntülenmesi çevrede bulunan algal toxin ile alakalıdır.

Kristal yüzeyi temizlendikten sonra kristal yüzeyi PEI (polyethylenimine) ile kaplanmıştır. Kristal yüzeyinde bağ yapmamış amino grupları glutaraldehit ile aktiflenerek elde edilmiştir. Oakadaik asit – Bovine Serum Albumin (OA-BSA) çifti daha sonra aktif türevlere bağlanarak , çapraz bağlı Antioakadaik asit antikorunun (Anti-OA Ab) miktarını dedekte edebilecek kompleks yapılar oluşturmuştur.

2.6. Yüzey Karakterizasyonu

2.6.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM)

1980'lerde geliştirilen Atomik Kuvvet Mikroskobu-Taramalı Kuvvet Mikroskobu olarak da adlandırılmaktadır-kolay kullanım özellikleri ve üzerinde çalıştığı yüzeylere zarar vermemesi nedeniyle kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir.

Sert yüzeylerin özellikleri hakkında net bir şekilde önemli bilgileri içeren atomik kuvvet mikroskobu hava ya da örnek sıvı içerisinde incelenmeye olanak tanır. Görüntü alanı 125 µm kadar olabilen atomik kuvvet mikroskobu aynı zamanda dikey ölçüm aralığının 8-10 µm olabilmesi nedeniyle de kaba yüzeylerde incelenebilir, düşük çözünürlüklü bilgilerle mukayese edilebilir. Büyük numuneleri kesmeden inceleme avantajı sağlar. Optik mikroskoplara göre avantajları olan atomik kuvvet mikroskobu aynı zamanda elektron mikroskoplarına göre de üstün topografik kontrast ve sayısal yükseklik bilgisi gibi bazı önemli avantajlar sunar.

Atomik kuvvet mikroskobu, 3B görüntülerinin pahalı numune hazırlanmaksızın örnek alınarak hazırlanması ve 2B profilden kesit numuneler alınması ile transmisyon elektron mikroskoplarından daha avantajlıdır.(Braga , [6])

Yüzeyin elektriksel olarak iletken olması zorunluluğu bulunmadığından taramalı elektron mikroskobunda olduğu gibi örneğin dehidratasyonuna gerek yoktur. Bu nedenle sıvı içerisinde örnekten görüntü alınabilir. Elde edilen bu görüntülerde olduğu gibi ekstrasellüler polimerik maddeler içinde de atomik kuvvet mikroskobu çözünürlüğü taramalı elektron mikroskobundan daha yüksektir.(Braga, [6])

Atomik kuvvet mikroskobunda, sivri uç yardımıyla, iğnenin yüzey ile etkileşimiyle üç boyutlu yüksek çözünürlükte görüntü elde edilmektedir. Farklı amaçlarla kullanılan farklı uçların bulunduğu atomik kuvvet mikroskobunda kullanılan teknikler incelendiğinde; ucun yüzey ile temasının sağlandığı temas yöntemi (çekici mod), ucun yüzey ile temasının sağlanmadığı temas yöntemi (İtici mod) ve iğnenin yüzeye vurarak temasın sağlandığı (tıklatma mod) görülmektedir. Atomik kuvvet mikroskobunda yüksek çözünürlükte atomik seviyede görüntülere; faz , elektrik iletkenlik ve manyetik farklılık bilgilerinin elde edilmesi ile ulaşılmaktadır.

Atomik kuvvet mikroskopunda kullanılan iğne uçları genellikle silikon, silikon oksit, silikon nitrit gibi malzemelerden üretilmekte ve fotolitografik teknikler kullanılarak elde edilmektedir. Atomik kuvvet mikroskopunda iğne ucu ile yüzey üzerindeki atomlar arasında oluşan kuvvet yardımıyla görüntü elde edilmektedir.

Atomik kuvvet mikroskopunda kullanılan diğer bir uygulama yöntemi incelendiğinde ise ucu taşıyan kolun üstü metal kaplama ile kaplanarak kola tıpkı bir ayna özelliği kazandırıldığı görülmektedir. Bir lazer kaynağından lazer demeti kola aktarılır ve kola kuvvetin uygulanması ile kolda oluşan eğilme ölçülür. Bu ayna özelliğindeki koldan yansıyan demetler iki fotodiyottan oluşan bir sistem ile incelendiğinde, kolun konumu artan akım şiddetine bağlı olarak hesaplanır. Artan akım değişimi kolun sapma değeri hakkında bilgi vermiş olacaktır.(Ermek , [41])

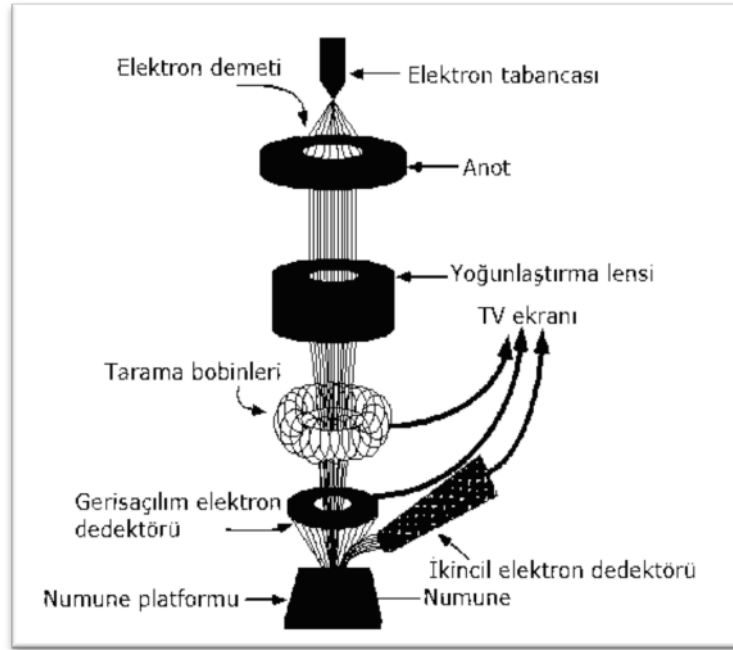
Bu uygulamaya ek olarak geliştirilen başka bir yöntem ise hassas frekanslara duyarlı ucun yüzeye çarpıp geri çekilmesi arasındaki sürenin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu sürenin ölçümü ile birlikte malzemenin kimyasal özelliklerinden kaynaklanan yüzeyin sertlik ve yumuşaklık bilgilerinin kolaylıkla eldesi sağlanmıştır. Yüzeyin sert olması durumunda ucun geri dönüş süresi kısa olmakta, yüzeyin yumuşaklığının artması ile ucun yüzeye batması nedeniyle geri dönüş süresi artmaktadır.(Ermek , [41])

2.6.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM)

Taramalı elektron mikroskobunun temel prensibi, Tungsten katot veya alan emisyonlu tabancasından (FEG) ortaya çıkan elektronların, incelenecek örnek yüzeyine gönderilmesi sonucu oluşan etkileşmelerden yararlanılmasına dayanmaktadır.

TEM'de yüzeye gönderilen bu elektronların enerjisi 200-300 eV ila 100 keV olabilir. Elektron demeti, yoğunlaştırıcı elektromanyetik merceklerle (condenser lense) toplanır, objektif merceklerle odaklanır. Elektromanyetik saptırıcı bobinlerle örnek yüzeyinde tarama işlemi (scanning) gerçekleştirilir. Görüntü oluşumu temel olarak; elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşmelerin sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi prensibine dayanır. (Yıldız, [48])

Bunlardan ilki, gelen elektron demetindeki elektronların, örnek yüzeyindeki atomlardaki elektronlara enerjilerini transfer ettiğine (elastik olmayan çarpışma) ortaya çıkan ikincil elektronlardır (secondary electrons). Tipik enerjileri en fazla 50 eV civarında olan bu elektronlar numune yüzeyinin yaklaşık 10 nm'lik bir derinliğinden ortaya çıkarlar. İkincil elektronlar foto çoğaltıcı tüp yardımıyla toplanıp, örneğin tarama sinyali konumuyla ilişkilendirilerek yüzey görüntüsü elde edilir. (Yıldız , [48])



Şekil 2.14 Taramalı Elektron Mikroskobunun Şematik Gösterimi[47]

Gelen elektron demetinin incelenen numune yüzeyi ile yapmış olduğu ikinci etkileşme, enerjileri keV mertebesinde olan karakteristik X-ışınlarının çıktığı durumdur. Örneğe çarpan elektron, örnekteki atomun iç yörüngesinden bir elektron kopmasına neden olur. Bu durumda enerjinin dengelenmesi gerekir; bir üst yörüngedeki elektron bu seviyeye geçer, bu geçiş sırasında ortama bir X ışını yayar. Yayıdığı bu ışına karakteristik X ışını adı verilir. Dedektörle algılanan sinyal yükselticiye, buradan analizöre ve daha sonra da SEM sisteminin bilgisayarına gönderilir. Ortaya çıkan karakteristik X ışını -enerjisi her atoma özel- , malzemenin element bakımından içeriğinin nitel ve nicel olarak saptanmasını sağlar.

İncelemenin yapıldığı ortam vakumlu olmalıdır. Elektronların içinden geçtiği boşlukta ve numunenin etrafında kalan gaz molekülleri elektronların saçılmalarına; hızlı hareket eden elektronlar da bu gaz moleküllerini iyonlaştırarak numune görüntüsünün bozulmasına neden olurlar. (Ayaz , [40])

İletken malzemelerin incelendiği SEM’de ağır atomlardan oluşmuş altın vb. malzeme yüzeyleri çok iyi görüntülenebilirken hafif atomlardan oluşmuş malzemelerin yüzey görüntüleri pek hassas sonuç vermez.

3. DENEY AŞAMASI

3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Deneyin gerçekleştirilme aşamalarında kullanılan kimyasallar ; Pbs tablet(amresco), glutaraldehit (Merck, Almanya) , sistamin (SIGMA Aldrich, ABD) , NaOH (Merck, Almanya) , Troponin T antikor (Abcam,İngiltere) , Troponin T protein (Abcam , İngiltere), saf aseton (Merck, Almanya), metanol (Merck , Almanya) , sodyum tetraborat/HCl tampon (Merck, Almanya)

3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deney aşamalarında kullanılan cihazlar; biyolojik güvenlik kabini (Nüve, Türkiye) , ultrasaf su cihazı (Millipore ,Fransa) , manyetik karıştırıcı (IKA , Almanya) , ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex, Almanya) (Kudos, Çin) , pH metre ve terazi (Sartoriusi Almanya), Akış Hücresi (ALS, Japonya), Mikropompa (Bartels, Almanya), vortex (DragonLab, Çin), etüv (Termal, İstanbul), otomatik pipetler (eppendorf , Almanya), daldırma tip termometre.

Deneyde kullanılmak üzere; 25.4mm 5Mhz altın kristal (SRS, ABD) , 8.4mm 12MHZ gümüş (TİC, Çin) ve 13.9mm 5MHz'lik (RENLUX, Çin) özel yapım altın ve gümüş kristaller temin edilmiştir. TİC marka kristallerin üzerindeki metal başlıkları kesmek için Dremel Lithium Ion (Dremel, Almanya), kristallerin frekanslarını ölçmek için osilatör ve frekans sayıcı devre tasarlanmıştır. Ayrıca Escort EFC-3201 (Hong Kong) frekans sayacı kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan diğer malzemeler ise 10ml, 250ml, 500ml beherler; 500ml,1000ml pisetler ve şişeler, manyetik balık, otomatik pipet uçları , akış hücresi bağlantıları için tygoon bağlantı hatlarıdır.



Şekil 3.1 Deneylerde Kullanılan Kuvars Kristaller

Soldan sağa ; 8.4mm 12MHZ gümüş (TİC, Çin), 13.9mm 5MHz'lik gümüş ve altın kristaller (RENLUX, Çin), 25.4mm 5Mhz altın kristal (SRS, ABD), 14mm 5MHz Altın Kristal (qsense,ABD)

3.3. Deneyin Yapılışı

Kuvars kristallerin bir biyosensöre dönüştürülerek kullanılabilmesi için birtakım işlemlerden geçirilmeleri ve yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu işlemler; yüzey temizliği, yüzey aktivasyonu ve yüzeyde fonksiyonel gruplar oluşturulması olarak sıralanabilir. Fonksiyonel grupların oluşturulmasını takiben tanıyıcı ligand yüzeye immobilize edilir. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesine ait yöntem şu şekildedir:

Daldırma ve kurutma yönteminde, oluşan frekans değişikliklerinin okunması, kristal kuru olduğu durumda gerçekleştirilir. Molekülün bağlanması ya da immobilizasyonun tamamlanması için gerekli süre geçtikten sonra kristal yıkanır ve kurutulur. Frekans ölçümü kristaller kuruduktan gerçekleştirilir. Modifikasyondan önceki ve sonraki kütlenin farkı yüzeye immobilize olan molekül kütlesi ile doğru orantılıdır. Daldırma ve kurutma yönteminde kristal elektrotlarının her ikisi de kullanıldığından artan kütle miktarı fazla olacak; bu nedenle hassasiyet artacaktır.

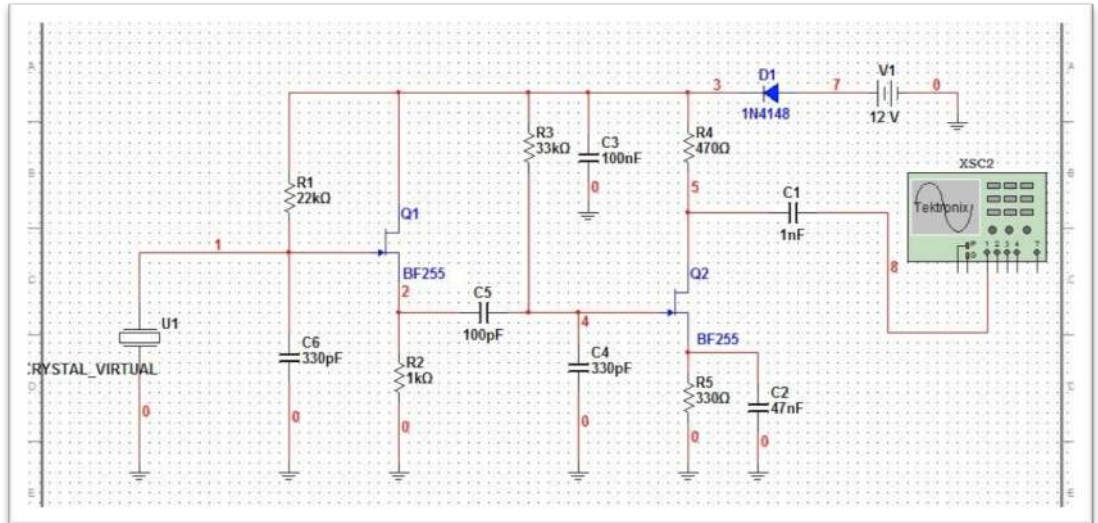
Ayrıca viskozite vb nedenlerle çözeltinin etkileri ortadan kalkacaktır. Kristalin bir süre için örnek içine batırılması ile sonrasında hızlı bir yıkama ve durulama ile hızlı sonuçlar elde edilebilir. Bu metodun hassas olmasını sağlayan sebepler aynı zamanda kristalin negatif yönünün bir parçasıdır, kristal çevresel etkileşimler özellikle nem faktöründen etkilenir.

3.3.1. Osilatör Ve Frekans Sayıcı Devreleri

3.3.1.1. Colpitts Osilatör

Kuvars kristal mikroterazide kütle değişimi ile oluşan frekans değişiminin görülebilmesi amacıyla tasarlanan ilk sistemde akış hücresi içerisine yerleştirilen kristalin tek yüzeyi sıvı ile temas halinde bulunmaktadır. Akış hücresinde kristalin bulunduğu havuzun hacmi 25 μ l'dir. Kristalin rezonans frekansında salınmaya devam edebilmesi için osilatör devresinin kristale bu frekansı sağlaması ve bu koşullar altında kararlı bir şekilde çalışmaya devam etmesi gerekmektedir.

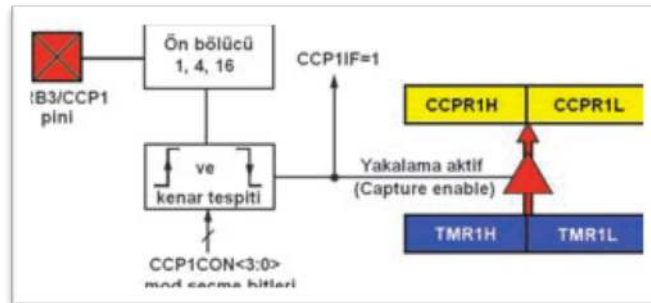
Frekans değişiminin görülebilmesi için tasarlanan ikinci sistem ise daldırma ve kurutma yöntemine dayanmaktadır. Her iki sistemde de havada alınan ölçümlerde colpitts osilatör devresi kullanılmıştır. SRS QCM sistemi ve kendi osilatörü tasarlanan sisteme referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Colpitts Osilatör Devresi

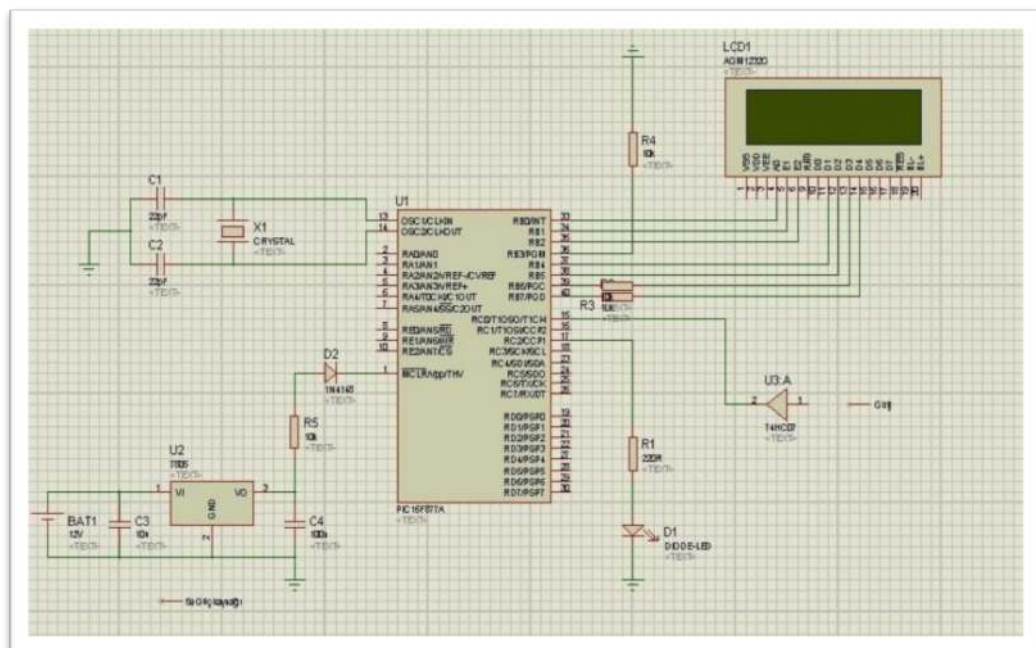
3.3.1.2. Frekans Sayıcı Devresi

Frekans ölçüm işlemi için PIC mikro denetleyicinin CCP (Capture/Compare/PWM) birimi kullanılmaktadır. Bu birim içerisinde bulunan yakalama birimi ile gerçekleştirilmiştir.



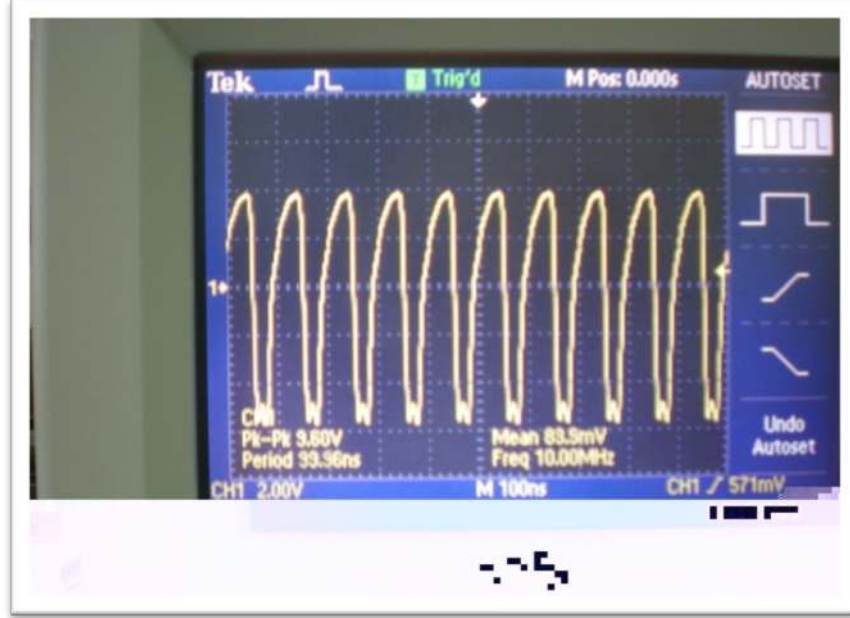
Şekil 3.3 Kenar Yakalama Birimi Blok Şema Gösterimi

PIC mikrodenetleyicinin RB3/CCP1 adlı giriş bacağında kesme olduğunda 16 bitlik TMR1 zamanlayıcısının içeriğinin 16 bitlik CCPR1H:CCPR1L saklayıcı çiftine aktarılmaktadır.



Şekil 3.4 Frekans Sayıcının Devre Şeması

Osilatör devresi ile frekans bilgisi elde edilen kuvars kristal frekansının sayısal olarak görülebilmesi amacıyla frekans sayıcı devresi ve LCD sürücü devresi PIC16F877A mikrodenetleyici ile gerçekleştirilmiştir. Osilatör çıkışındaki frekans bilgisi 1 Hz çözünürlükle okunmaktadır.



Şekil 3.5 Colpitts Osilatöre Bağlı QCM Çıkışı

Colpitts osilatör devresinin çıkış değerlerine osiloskopta bakıldığında çıkışın sinüsoidal bir çıkış olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden frekansı ölçülecek sinyali PIC mikrodenetleyiciye uygulamadan önce kare dalgaya dönüştürmek gerekmektedir.

Devre board üzerinde test edildikten sonra Proteus ISIS ve ARES devreleri çizilerek baskı devre yapılmıştır. Baskı devre işleminden sonra kutulama işlemi yapılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.6 Frekans sayıcı ve Osilatör Kutulanmış Hali



Şekil 21 Frekans Sayıcı ve Osilatör Baskı Devresi

3.3.2. Kuvars Kristal Biyosensör Yüzeyinin Oluşturulması

3.3.2.1. Kuvars Kristal Yüzey Temizliği

Aseton ile etkileşimi

Kristallerin yüzey temizliği 10ml'lik beherler içerisinde iyi bir organik çözücü olan % 95'lik aseton çözeltisine tutucularından daldırılarak 30 dakika süre ile manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve 300 rpm dönüş hızında gerçekleştirilmiştir.

Aseton ile etkileşim sonrasında kristaller 10ml beherler içerisinde ultrasaf su ile 10 dakika manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve sabit hızda etkileştirilmiştir.

Asetonun kristal yüzeyinden tamamen uzaklaştırılması için kristaller ultrasonik banyoda 4 dakika süre ile ultrasaf su kullanılarak yıkanmıştır.

Kristal yüzey temizliği amacı ile yapılan işlemlerin sonucunu ve etkileşimi izlemek için kristallerin frekansları etüvde 30 dakika süre ile 37°C kurutulduktan sonra ölçülmüştür.

Yapılan bu çalışmalar kapsamında süre kritik bir değişkendir. Sürenin uzaması durumunda gümüş elektrotlar aşınmakta, bu aşınma sonucu kuvars diskten ayrılmaktadır. Bunun sonucunda kristal kullanılmaz hale gelir, herhangi bir frekans değeri görülemez. Dolayısıyla, yanıltıcı sonuçlardan kaçınmak için kristallerin temizlenme süresinin optimize edilmesi gerekmektedir.

Metanol ile Etkileşim

Yüzey temizliğinin ikinci aşaması metanol ile 30 dakika süre ile manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve 300 rpm dönüş hızında gerçekleştirilmiştir.

Kristaller 10ml beherler içerisinde ultrasaf su ile 10 dakika süre ile manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve sabit hızda etkileştirilmiştir.

Metanolün kristal yüzeyinden tamamen uzaklaştırılması için kristaller ultrasonik banyoda 4 dakika süre ile ultrasaf su ile yıkanmıştır.

Temizlik sonucunu ve etkileşimi izlemek için kristallerin frekansları etüvde 30 dakika süre ile 37°C'de kurutulduktan sonra ölçülmüştür.

3.3.2.2. Kuvars Kristal Yüzey Aktivasyonu

Yüzey modifikasyon çalışmalarının ilk aşamasında kristal yüzeyinde fonksiyonel OH gruplarının oluşturulması amacıyla kristaller ultrasaf su ile seyreltilen 0.5M NaOH çözeltisi ile, 30 dakika süreyle, manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve 300 rpm hızında etkileştirilmişlerdir.

Kristaller 10ml beherler içerisinde ultrasaf su 10 dakika manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve 300 rpm sabit hızda etkileştirilmişlerdir.

Kristal yüzeyinden NaOH'ın temizlenebilmesi için kristaller ultrasonik banyoda 4 dakika süre ile ultrasaf su ile yıkanmıştır.

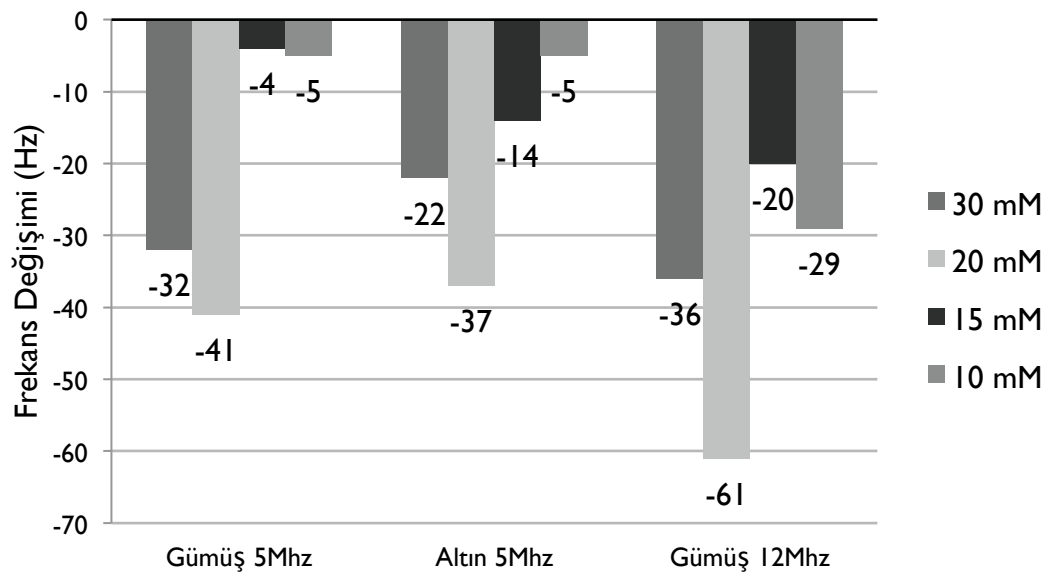
Yüzeyde oluşturulan OH gruplarının kristal yüzeyinde oluşturduğu kütle birikiminin neden olduğu frekans değişiminin net olarak izlenebilmesi için kristaller etüv içerisinde 37°C kurutulmuş ve frekansları ölçülmüştür.

3.3.2.3. Sistamin İmmobilizasyonu

Kristal yüzeyinde oluşturulan fonksiyonel OH gruplarına tiyol ve amin içeren bifonksiyonel özelliğe sahip sistamin molekülü immobilizasyonu ile yüzeyde yeni fonksiyonel gruplar oluşturulur. Optimum sistamin derişiminin belirlenmesi ile daldır ve kurut metodu ile deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde 5 Mhz'lik altın ve gümüş kristaller kullanılmıştır. Bu immobilizasyon sonucu altın ve gümüş yüzeyler arasında belirgin farklılıklar görülmemiştir. Kullanılan kristallerin yüzeylerin pürüzsüz ve parlatılmış oluşu bağlanmanın üzerinde negatif bir etki olarak görülmüştür. Yüzeyi pürüzlü olan 12MHz'lik kristaller ile denemeler sonucunda bu kristallerde sistaminin yüzeye bağlanmasında artış görülmüş ve bu durum yüzeyin pürüzlü ve daha geniş bir bağlanma alanı yaratmış olması olarak yorumlanmıştır. Tüm bu sonuçların bir arada yorumlanması sonucu optimum sistamin derişimi literatür ile paralellik göstererek 20mM olarak belirlenmiştir.

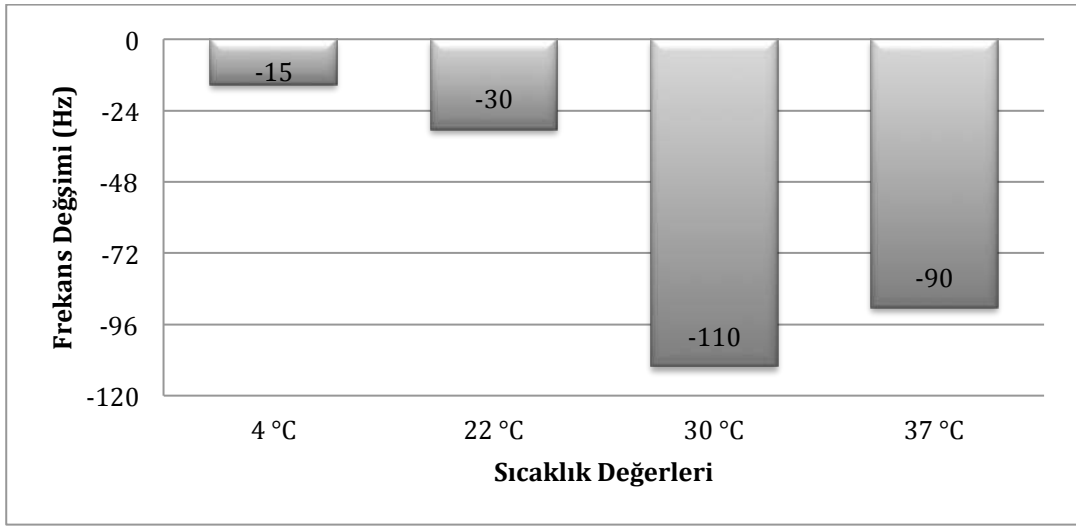


Şekil 3.8 Biyolojik Güvenlik Kabini İçerisinde Sistamin İmmobilizasyonu



Grafik 3.1 Farklı Konsantrasyonlarda Sistamin İmmobilizasyonu Sonucu Frekans Değişimleri

20mM sistamin derişiminde daha fazla sistaminin immobilize edilebilirliğini denemek amacıyla sıcaklık etkisi üzerinde denemeler yapılmıştır. Bunun için immobilizasyonun en az olduğu 5Mhzlik cilalı altın kristaller ile denemeler yapılmıştır. Seçilen sıcaklık aralığı 4°C ile vücut sıcaklığı olan 37°C arasında (4, 22, 30, 37 °C) olarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Sistaminin parlak altın yüzeye optimum immobilize olduğu sıcaklık bu aralıkta 30°C olarak saptanmıştır. Altın yüzeyin inert yapısı ve yüzeyin parlatılmış olmasının sonucu olarak tüm kristallere ait sistamin immobilizasyonu frekans değışimi ortalamalarının altında bir immobilizasyon olarak gözlenmiştir.



Grafik 3.2 Sistamin İmmobilizasyonuna Sıcaklığın Etkisi

Bu işlemlerin tümünü gerçekleştirmek için kristaller fosfat tamponunda (pH 7.4) farklı derişimlerde hazırlanan sistamin çözeltileri için karanlık ortamda 30 dakika manyetik karıştırıcıda belirlenen farklı sıcaklıklarda ve 300 rpm dönüş hızında etkileştirilmişlerdir.

Kristaller fiziksel olarak tutunan sistaminin uzaklaştırılması amacıyla 10ml beherler içerisinde 0.1M pH 7.4 fosfat tamponunda 10 dakika manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık (22 °C) ve 300 rpm dönüş hızında yıkanmışlardır.

Kristal yüzeyine immobilize olmayan sistaminin uzaklaştırılması için kristaller ultrasonik banyoda 4dk ultrasaf su ile yıkanmıştır.

Yüzeye immobilize edilen sistaminin izlenebilmesi için kristaller etüv içerisinde 37°C de kurutulmuş ve frekansları ölçülmüştür.

3.3.2.4. İmmobilizasyonu

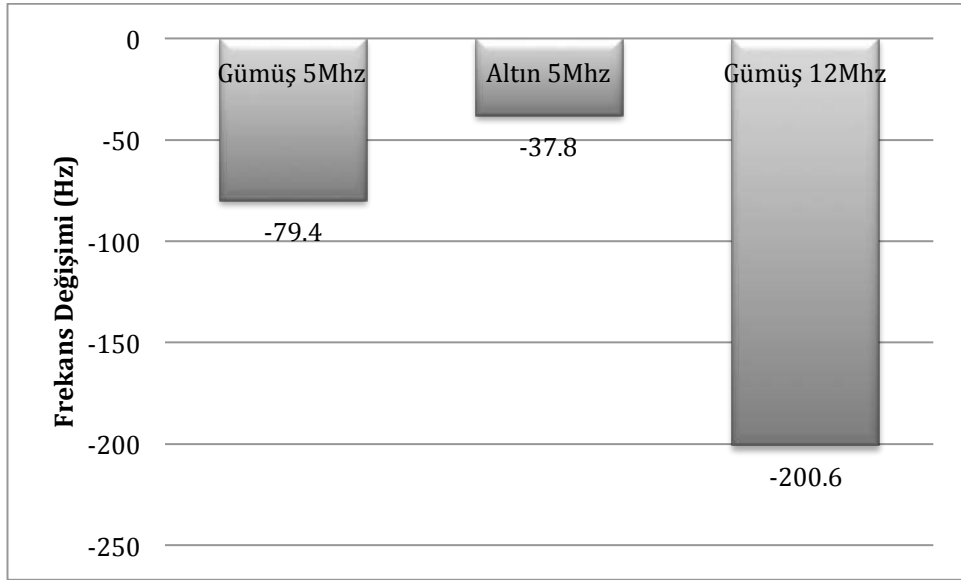
Sistamin immobilize edilmiş kuvars kristallerin üzerine uzatma kolu (spacer arm) takılması amacıyla bifonksiyonel özelliğe sahip glutaraldehit kullanılmıştır. Sistaminin serbest olan amin ucu ile glutaraldehidin aldehit uçlarının reaksiyona girerek kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Uzatma kolu ligand moleküllerinin aktif uçlarının kristalin yüzeyinden dışarı bakmasını böylece anilat molekülleri ile sterik engellemeler olmaksızın spesifik ve hızlı etkileşmesini sağlar.

Yüzey aktivasyonunun ikinci aşamasında kristaller %5 glutaraldehit çözeltisinde karanlık ortamda 30 dakika manyetik karıştırıcıda 30°C sıcaklık ve 300 rpm dönüş hızında etkileştirilmişlerdir. Sıcaklığın sistamin immobilizasyonundaki pozitif etkisinden glutaraldehit immobilizasyonunda da faydalanılması amacıyla manyetik karıştırıcı sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır.

Kristaller 10ml beherler içerisinde 10mM pH 7.4 fosfat tamponunda 10 dakika manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve 300 rpm sabit hızda etkileştirilmişlerdir.

Kristal yüzeyinde sistamin ile bağlanmayan glutaraldehitin uzaklaştırılması için kristaller ultrasonik banyoda 4 dakika süre ile ultrasaf su ile yıkanmıştır.

Aşamanın başarısını tespit etmek için kristaller etüv içerisinde 37°C de kurutulmuş ve frekansları ölçülmüştür.



Grafik 3.3 Glutaraldehit İmmobilizasyonu Sonucu Frekans Değişimleri

İmmobilizasyon sonucu elde edilen sonuçlarda kristallerdeki frekans değişimleri incelendiğinde 12Mhz'lik kristallerde belirgin frekans değişimi farkı olduğu, immobilizasyon işleminde yüzeye daha çok kütle birikimi olmasından daha çok kristalin rezonans frekansının yüksek olmasının frekans değişimindeki çözünürlüğe etkisi olarak yorumlanmıştır. Altın ve gümüş kristaller arasındaki frekans değişimi ise altın yüzeyine sistamin immobilizasyonun daha az olması sonucu glutaraldehit immobilizasyonunda da daha az olması olarak yorumlanmıştır.

3.3.2.5. Antibadi İmmobilizasyonu

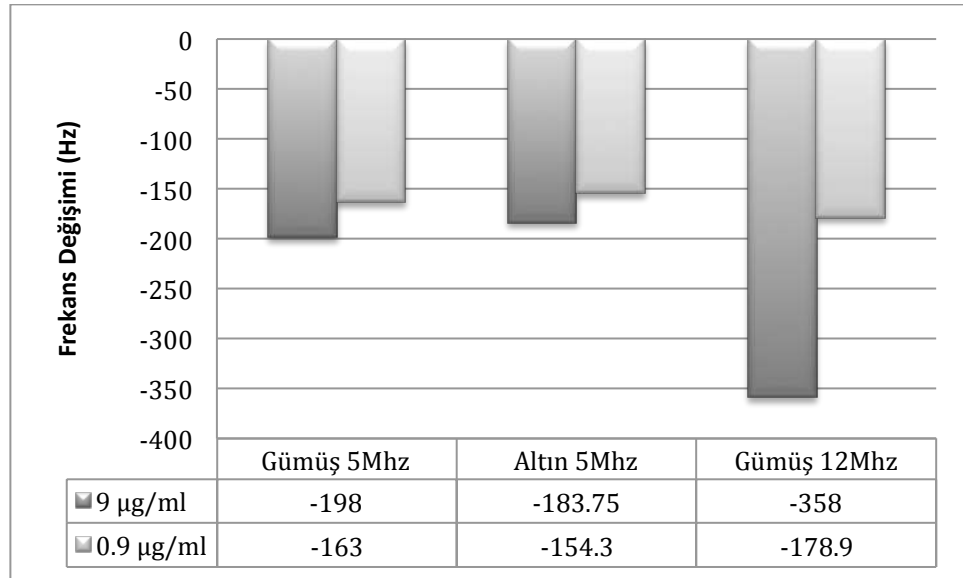
Kardiak troponin T antikor 200 μ g 0.9mg/ml derişimindeki stoktan fosfat tamponu (pH 7.4) 1/100 ve 1/1000 derişimlerinde seyreltilerek 9 μ g/ml ve 0.9 μ g/ml olarak hazırlanmış ve optimum antikor konsantrasyonu için deney yapılmıştır. Kristallerin her bir yüzeyine 10 μ l mikropipet ile damlatılmış biyolojik güvenlik kabini içerisinde her bir yüzey için 30dk immobilizasyonun gerçekleşmesi için beklenmiştir.

Kristaller 10ml beherler içerisinde 10mM pH 7.4 fosfat tamponunda 10 dakika manyetik karıştırıcıda 37°C ve 300rpm hızda etkileştirilmiştir.

Yüzeye immobilize olmayan antikorların sterik engellemere sebep olmaması için uzaklaştırılması gereklidir, bunun için kristaller ultrasonik banyoda 4dk ultrasaf su ile yıkanmıştır.

Aşamanın başarısını tespit etmek için kristaller etüv içerisinde 37°C de kurutulmuş ve frekansları ölçülmüştür.

Antikor konsantrasyonları arasındaki ilk frekans değişimleri incelendiğinde 9µg/ml'lik konsantrasyonda daha çok antikor immobilize olmuştur; ancak bir sonraki aşamada biyosensör ile cTnT ölçümleri sonuçları incelendiğinde 0.9µg/ml antikor konsantrasyonunun sonuçlarının daha iyi olduğu, biyosensörün lineere daha yakın çalıştığı gözlenmiştir. Yüzeyde sıkışık olarak yerleşen antikorlar birbirleri ile etkileşebilir ve aktif bölgelerini kapatabilir, kuvars yüzeyde daha çok antikor immobilizasyonu sonucu daha çok kütle birikimi olur; ancak tanıyıcı yüzey başarılı olarak oluşturulmamış olur.



Grafik 3.4 Antikor İmmobilizasyonu Sonrası Frekans Değişimleri

3.3.3. Biyosensörün Test Edilmesi Ve Tampon Çözeltide Troponin T Ölçümü

Kardiyak troponin T proteini 50µg 0.755mg/ml derişimindeki stoktan 0.37, 0.7, 1.85, 3.7, 7.4 ng/ml'lik konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kristallerin herbir yüzeyine 10ul mikropipet ile damlatılmış ve 30 dakika immobilizasyonun gerçekleşmesi için beklenmiştir.

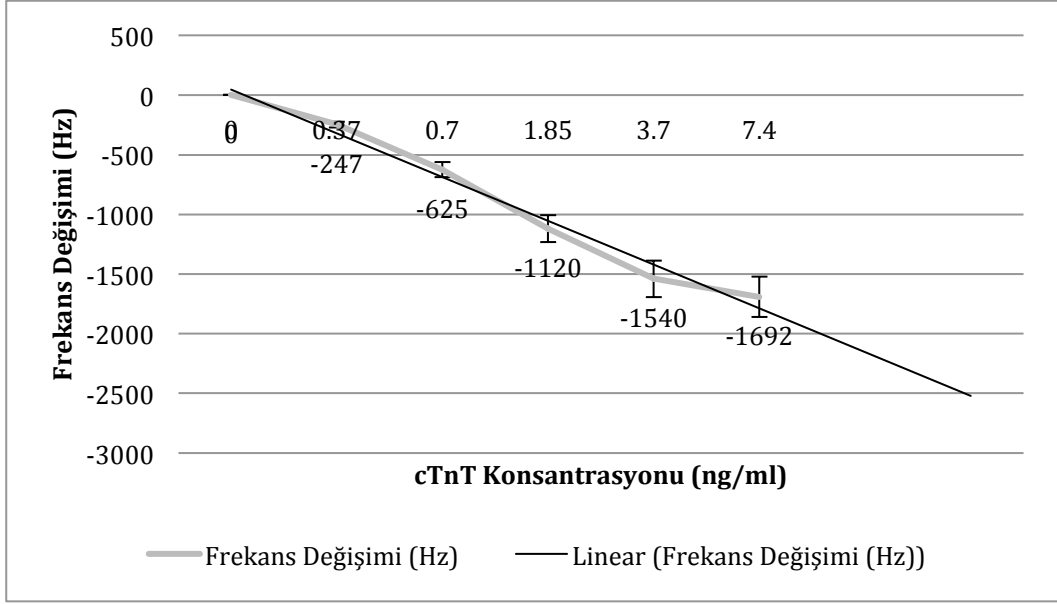
Kristaller 10ml beherler içerisinde 10mM pH 7.4 fosfat tamponunda 10 dakika manyetik karıştırıcıda sabit sıcaklık ve sabit hızda etkileştirilir.

Antikor ile kovalent olarak bağlanmayan troponin t proteini uzaklaştırılması için kristaller ultrasonik banyoda 4 dakika ultrasaf su ile yıkanmıştır.

Ligand antikor ile anahtar kilit formunda bağlanan troponin t proteininin izlenebilmesi için kristaller etüv içerisinde 37°C de kurutulmuş ve frekansları ölçülmüştür.

Denenen iki farklı konsantrasyon sonucu antikor immobilizasyonunda daha iyi sonuç vermiş olan yüksek konsantrasyon troponin testinde başarı sağlayamamıştır. Bu durum sıkışık olarak yerleşen antikorların birbirlerini engellemesi ve birbirleri ile etkileşmesi sonucu aktif bölgelerinin kapanması ile yorumlanmıştır.

Düşük konsantrasyon (0.9µg/ml) optimum antikor konsantrasyonu olarak belirlenmiş ve kristaller farklı konsantrasyonda cTnT içeren çözeltilerle ve tampon çözelti ile test edilmiştir.



Grafik 3.5 cTnT Konsantrasyonlarına Biyosensörün Frekans Değişimleri

Farklı cTnT konsantrasyonları ile yapılan sonuçlarda biyosensörün 3.7ng/ml seviyelerine kadar doğrusal çalıştığı görülmüş, üzerindeki konsantrasyonlarda ise kristallerin doyuma gittiği belirlenmiştir. Bu durumun sebebi kristal yüzeylerine immobilize olan protein yapılarının kristalin osilasyonuna kütle artışı sonucu değil osilasyonu engelleyici bir tutunma ile bağlanmaları yüzeyde rigid bir yapı oluşturmaları sonucu olarak açıklanabilir.

3.3.4. Akış Hücresi Deneyleri

Akış hücreleri kuvars kristalin bir yüzeyinin sıvıyla ve diğer yüzeyinin havayla etkileşmesine olanak verirler. Analizler statik veya dinamik çözeltide yapılabilir.

Biyosensörün dinamik ortamda denenmesi amacıyla akış hücresi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada iki farklı akış hücresi denenmiştir: Birincisi 14mm'lik 5 MHz'lik altın ve gümüş kristallerle kullanılmak üzere akış ALS marka (Japonya) ticari bir akış hücresi temin edilmiştir. İkinci akış hücresi 8.4mm'lik 12MHz'lik kristallerle kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Referans sistem olarak SRS marka QCM sistemi kullanılmıştır. Sisteme devamlı çözelti pompalayan mikropompa (Bartels) Almanya'dan temin edilmiştir. Mikropompa iki adet piezo tetikleyiciden oluşmakta ve mikrolitre seviyede sıvı pompalayabilmektedir.

Akış hücresi deneylerinde akış hızı tüm solüsyonlar için 200µl/dk olarak belirlenmiştir. Kristaller akış hücresine yerleştirilmeden önce daldır ve kurut yöntemi ile aseton ve metanol çözeltileri ile temizlenmiş ve kurutulmuşlardır. Akış hücresine yerleştirildikten sonra 10 dakika süresince ultrasaf su ile yıkanmışlardır. Yıkama işlemi sonrasında 20mM sistamin çözeltisi ile 40 dakika süresince etkileştirilmişlerdir. İşlem süresince buharlaşma olmasını engellemek için beherlerin ağzı kapatılmıştır. Akış hücresi hacmi 25µl ve kullanılan hatlardaki ölü hacim yaklaşık olarak 0.5ml'dir. Bu işlem yapılırken 10 dakika boyunca akış sürdürülmüş sonrasında 10 dakika süresince pompa kapalı beklenmiş ve işlem tekrarlanmıştır. Bunun amacı yüzeye sürekli taze sistamin çözeltisi pompalanması ve sıcaklık değişiminin yanıltıcı sonuçlarından kaçınmaktır.

Sistamin immobilizasyonu sonrasında kristal aynı akış hızı ile sürekli olarak 10 dakika süresince 0.1M fosfat tamponu ile immobilize olmayan sistaminin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır.

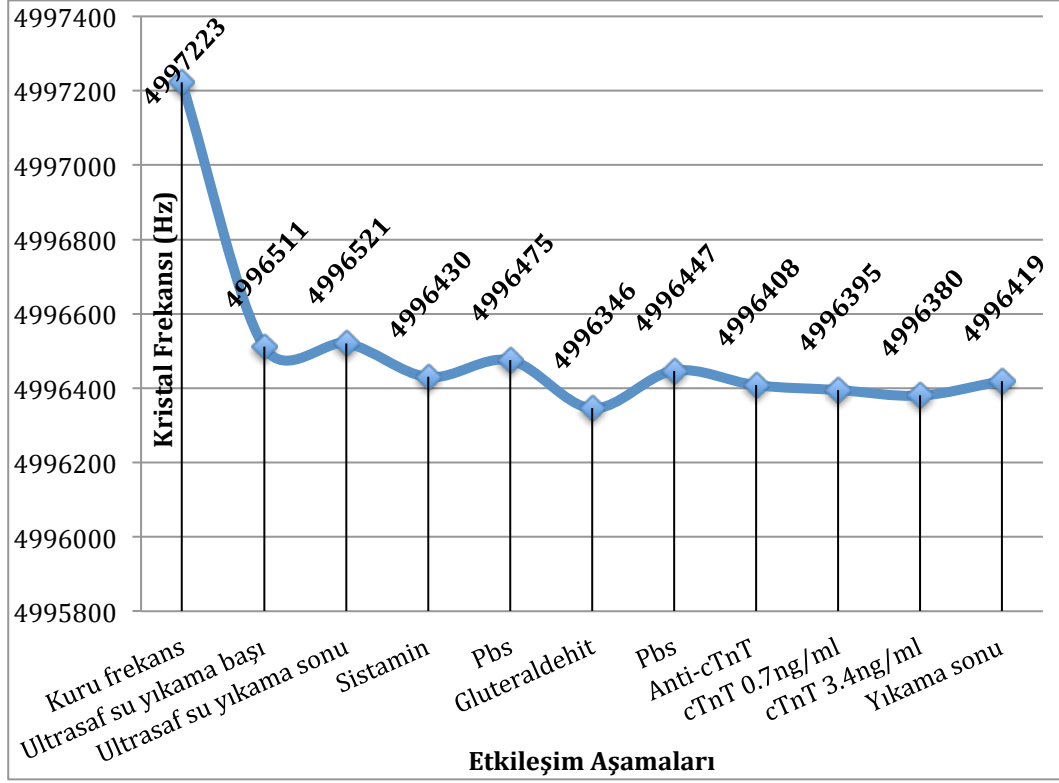
Glutaraldehit immobilizasyonun sistamin immobilizasyonu ile aynı prosedürde gerçekleştirilmiştir. 40 dakika süresince etkileşim gerçekleştirilmiş 10'ar dakika aralıkla sisteme akış sağlanmıştır. Kullanılan %5lik sodyum tetraborat tamponunda (pH 8.4) glutaraldehit çözeltisi sistemden uzaklaştırılması amacıyla kristal akış hücresinde aynı akış hızı ile sürekli olarak 10 dakika süresince 0.1M fosfat tamponu ile yıkanmıştır.

Aktive edilen yüzeye antikor immobilize edilebilmesi için 0.9µg/ml konsantrasyonunda 10ml hazırlanan anti cTnT çözeltisi 10 dakika boyunca 200µl/dk akış hızı ile etkileştirilmiş sonrasında 10 dakika süresince pompa kapatılmış ve beklenmiş ve bu işleme toplam 90 dakika süresince devam edilmiştir.

Antikor immobilizasyonu sonrasında kristal 200µl/dk akış hızı ile sürekli olarak 10 dakika süresince 0.1M fosfat tamponu ile immobilize olmayan anti cTnT'nin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır.

Akış hücresindeki biyosensör 1ml'lik 0.7ng/ml ve 3.4ng/ml'lik fosfat tamponunda cTnT çözeltileri ile test edilmiştir.

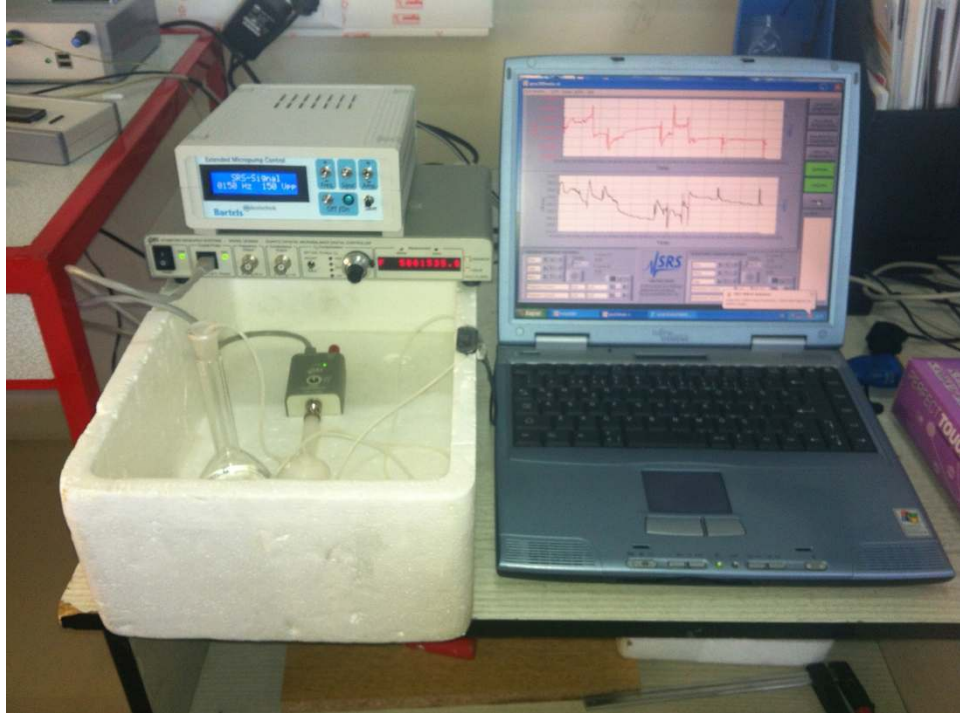
Troponin testi sonrası kristal akış hücresinden çıkarılmadan yüzeyi temizlenmesi için 30 dakika süresince fosfat tamponu ve 30 dakika %95 aseton ile yıkanmıştır.



Grafik 3.6 Akış Hücresinde cTnT ölçümleri

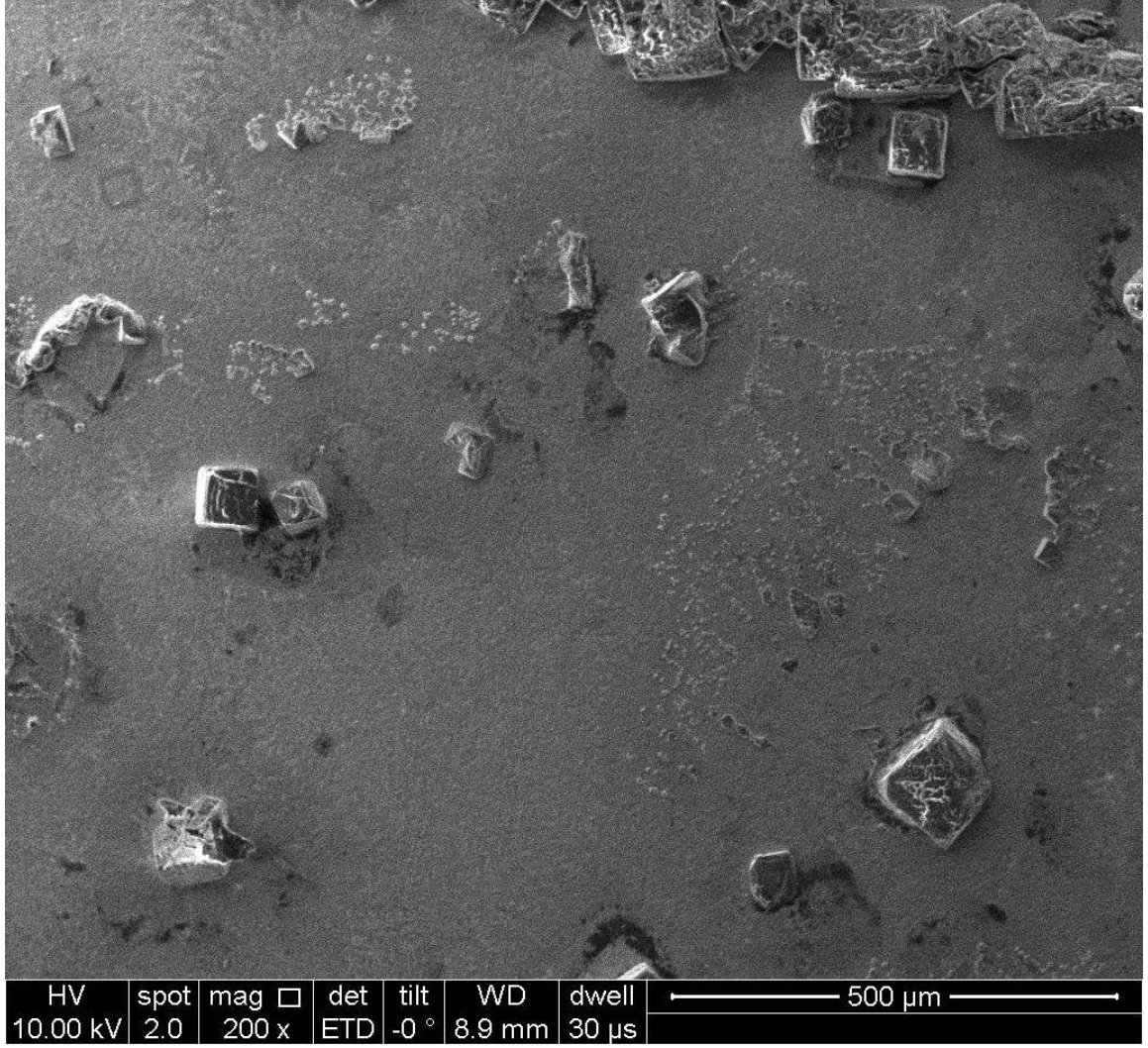


Şekil 3.9 QCM Akış Hücresi Ölçüm Sistemi

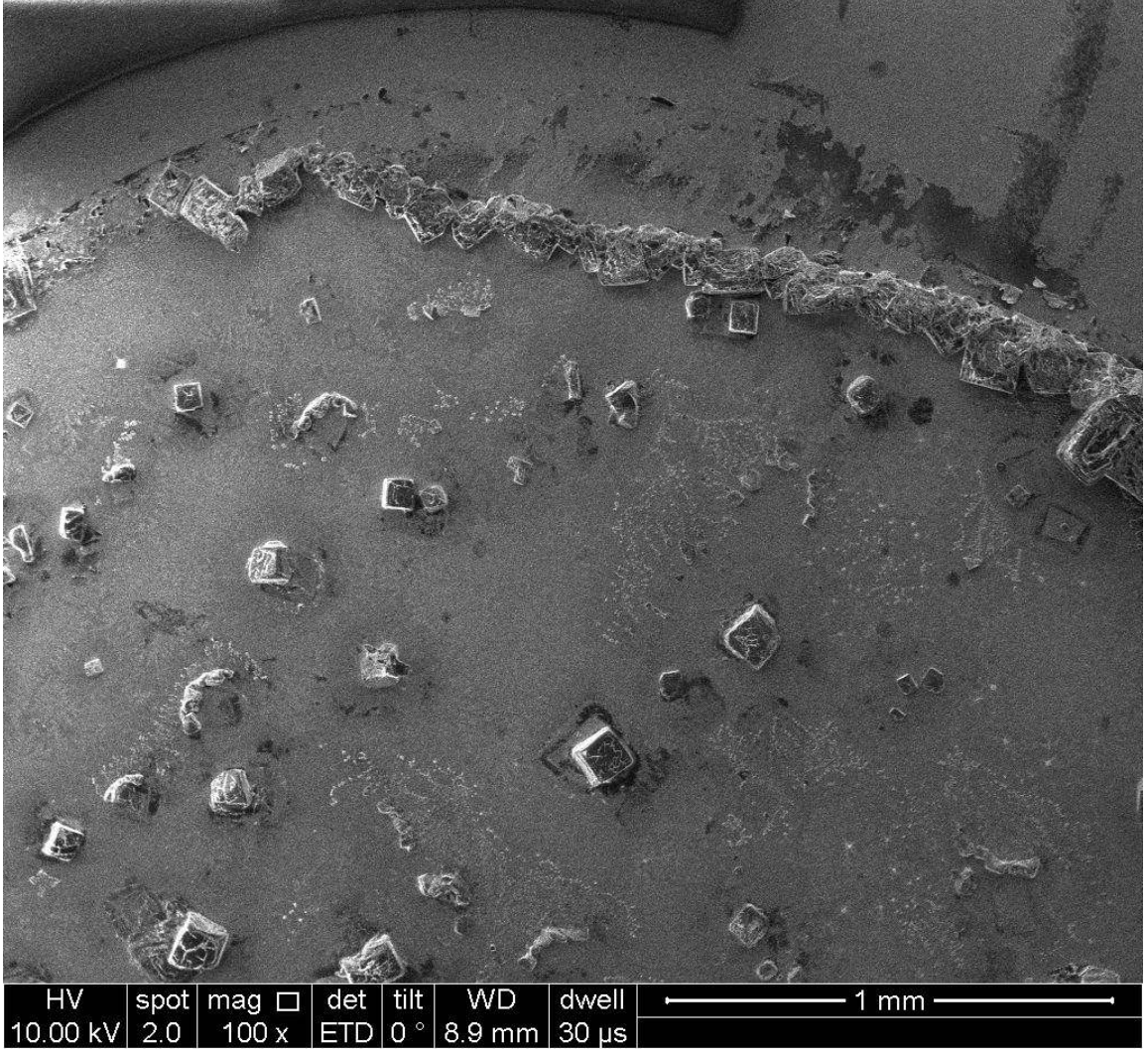


Şekil 3.10 SRS QCM Sistemi

3.3.5. TEM Görüntüleri

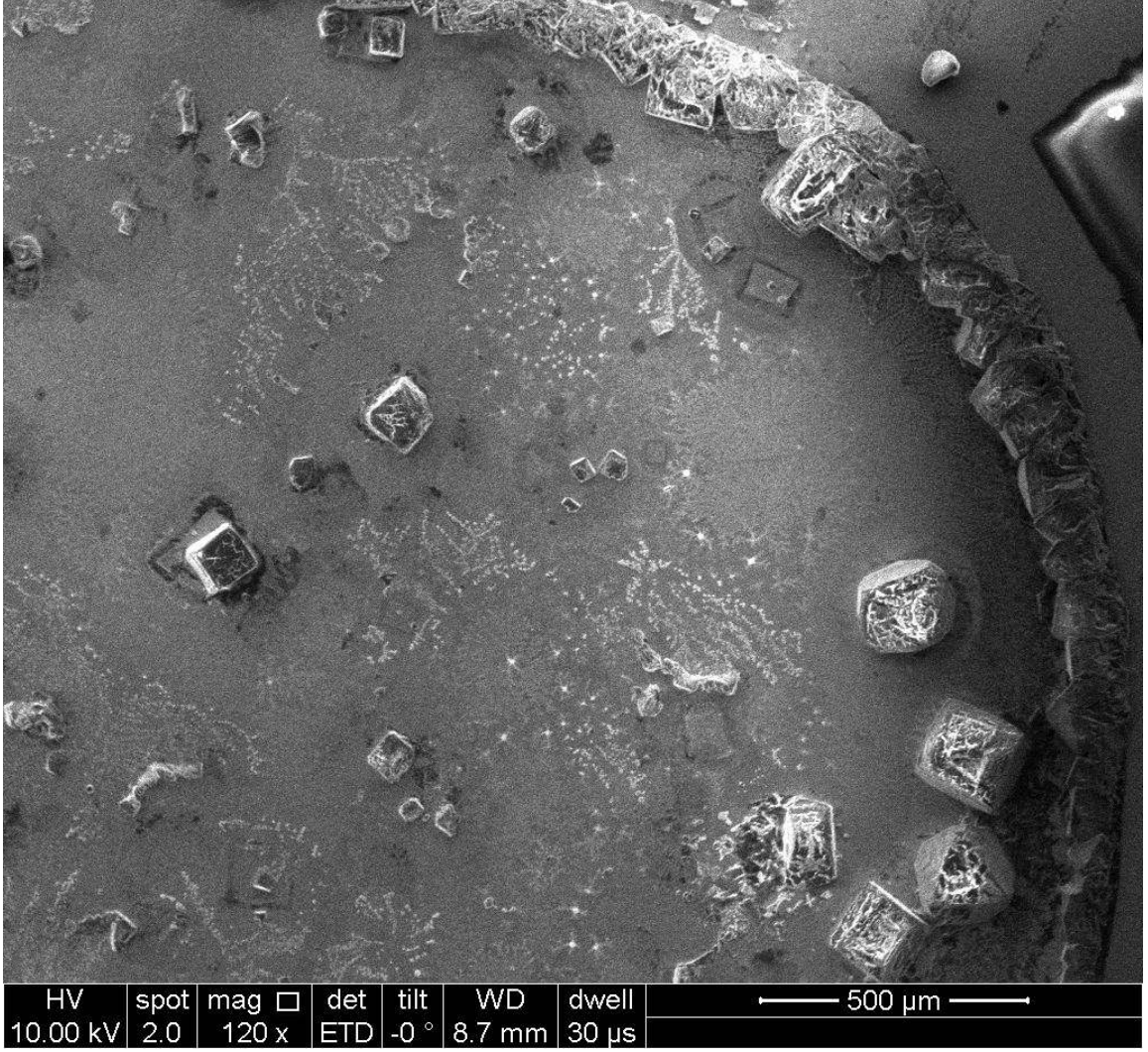


Şekil 3.11 Sodyum Tetraborat (pH 8.2) Tamponunda Glutaraldehit Çözeltisi İle Etkileştirilen Kristal Yüzeyi 200x Büyütme Ultrasonik Banyo Öncesi



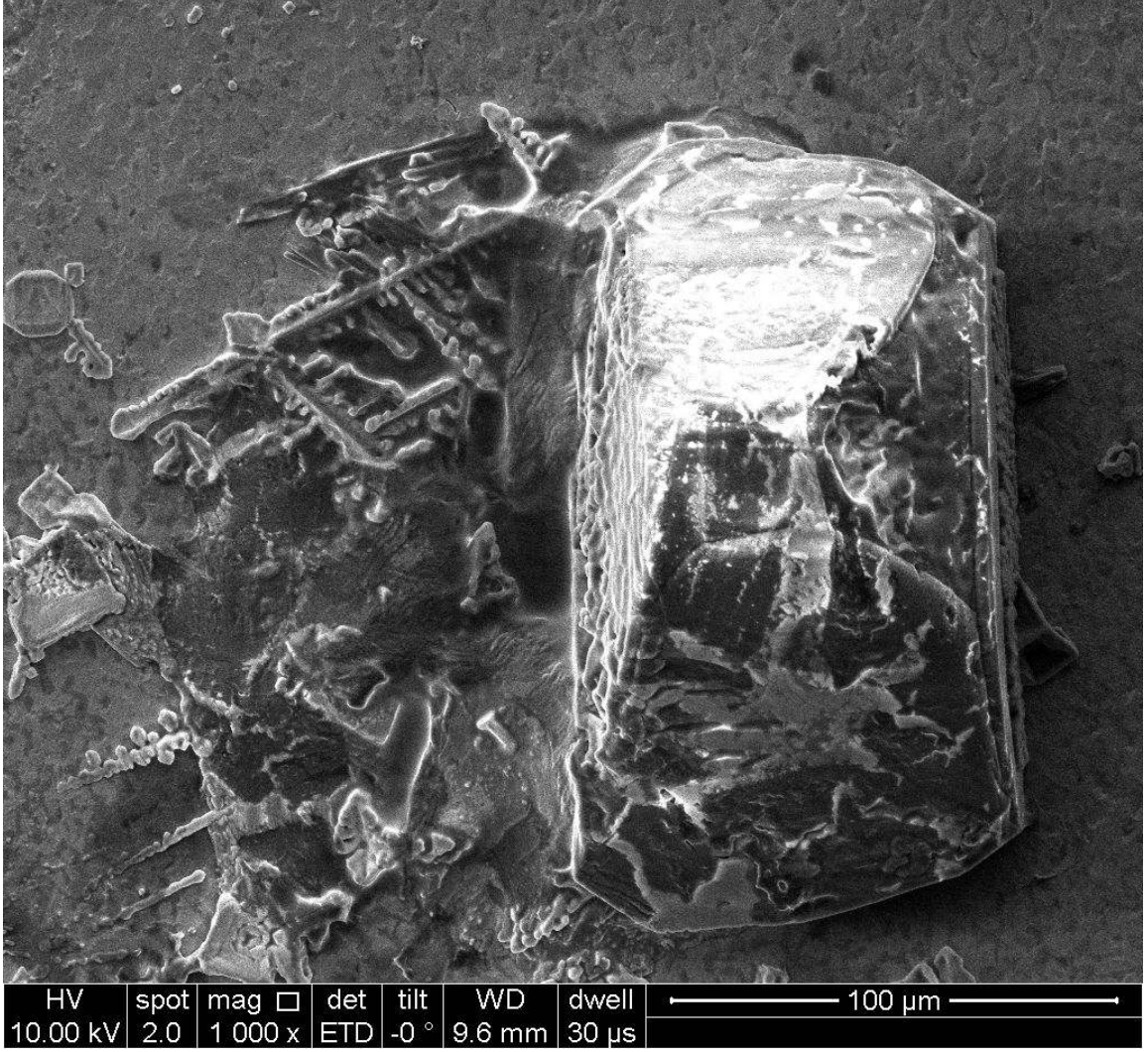
Şekil 3.12 Sodyum Tetraborat (pH 8.2) Tamponunda Glutaraldehit Çözeltisi İle Etkileştirilen Kristal Yüzeyi 100x Büyütme Ultrasonik Banyo Öncesi

Kristalin elektrot çeperinde aşınmalar ve sodyum birikimi görülmektedir.



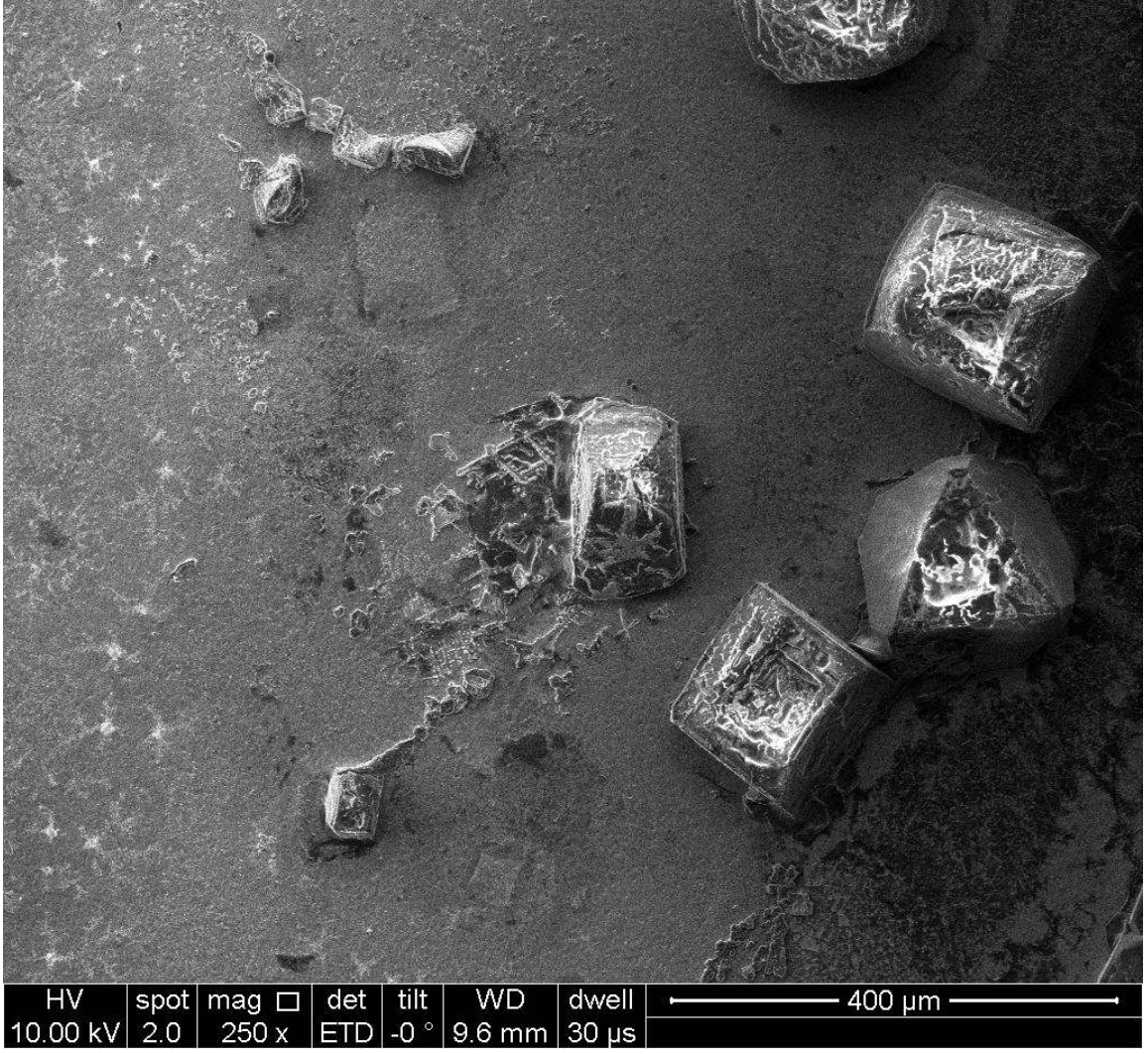
Şekil 3.13 Sodyum Tetraborat (pH 8.2) Tamponunda Glutaraldehit Çözeltisi İle Etkileştirilen Kristal Yüzeyi 120x Büyütme Ultrasonik Banyo Öncesi

Ultrasonik banyoda ultrasaf su ile yıkanmayan kristal yüzeyinde düzensiz yerleşen yapılar görülmektedir.

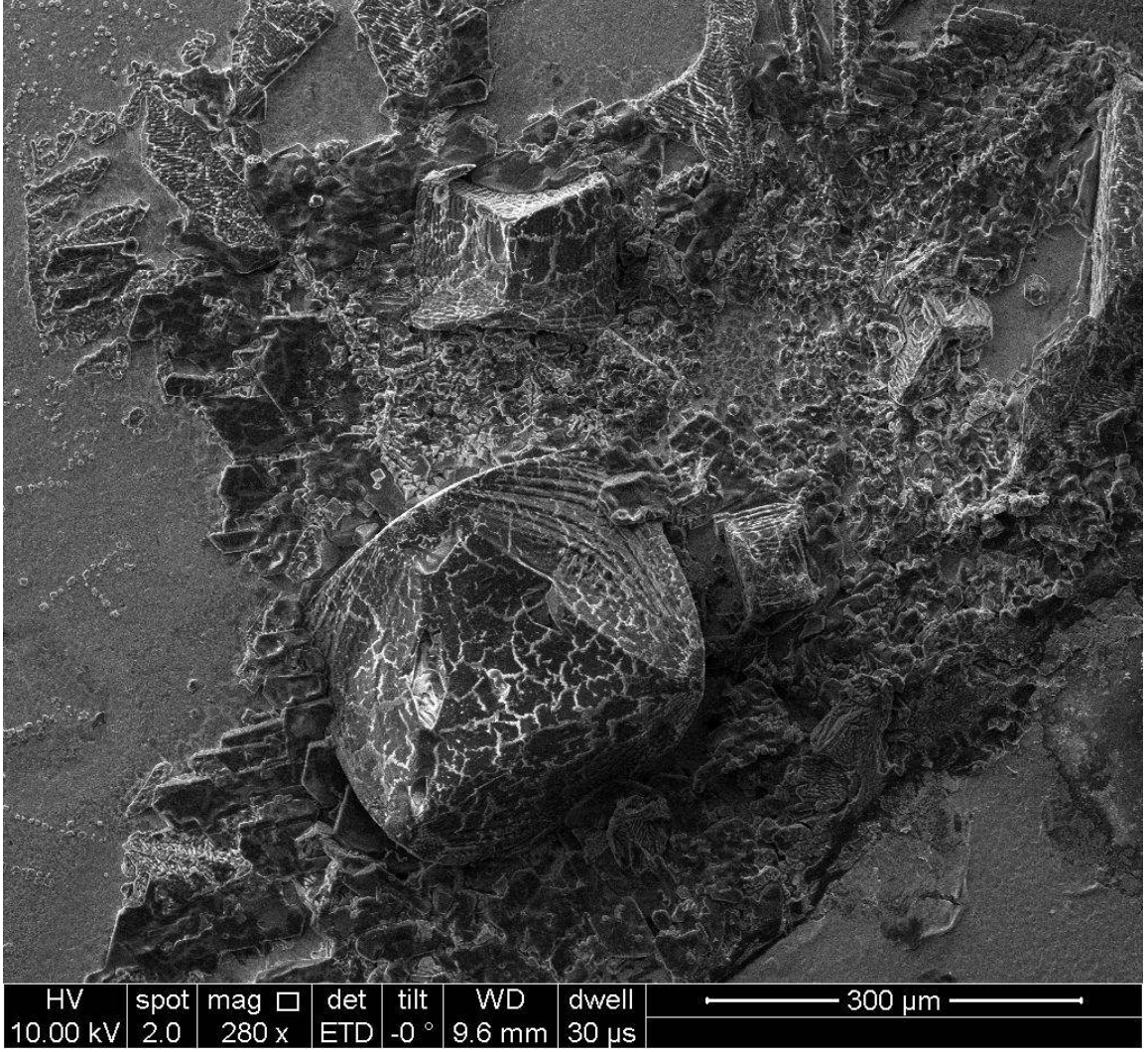


Şekil 3.14 Aşınmış Kristal TEM Görüntüsü (1000x Büyütme)

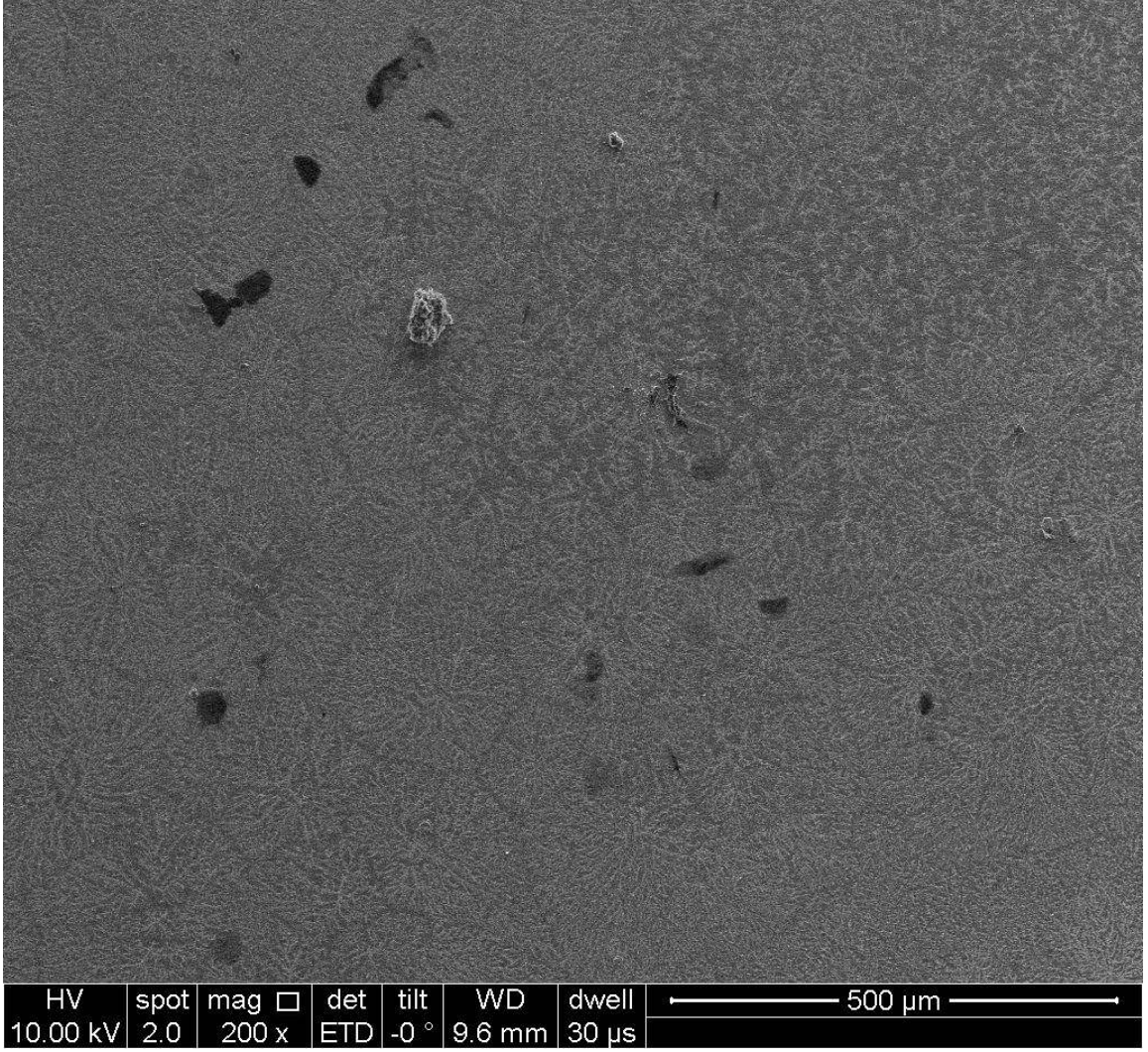
Kristal Yapının Yüzeyine Tutunduğu Ve Yapısına Zarar Verdiği Görülmektedir.



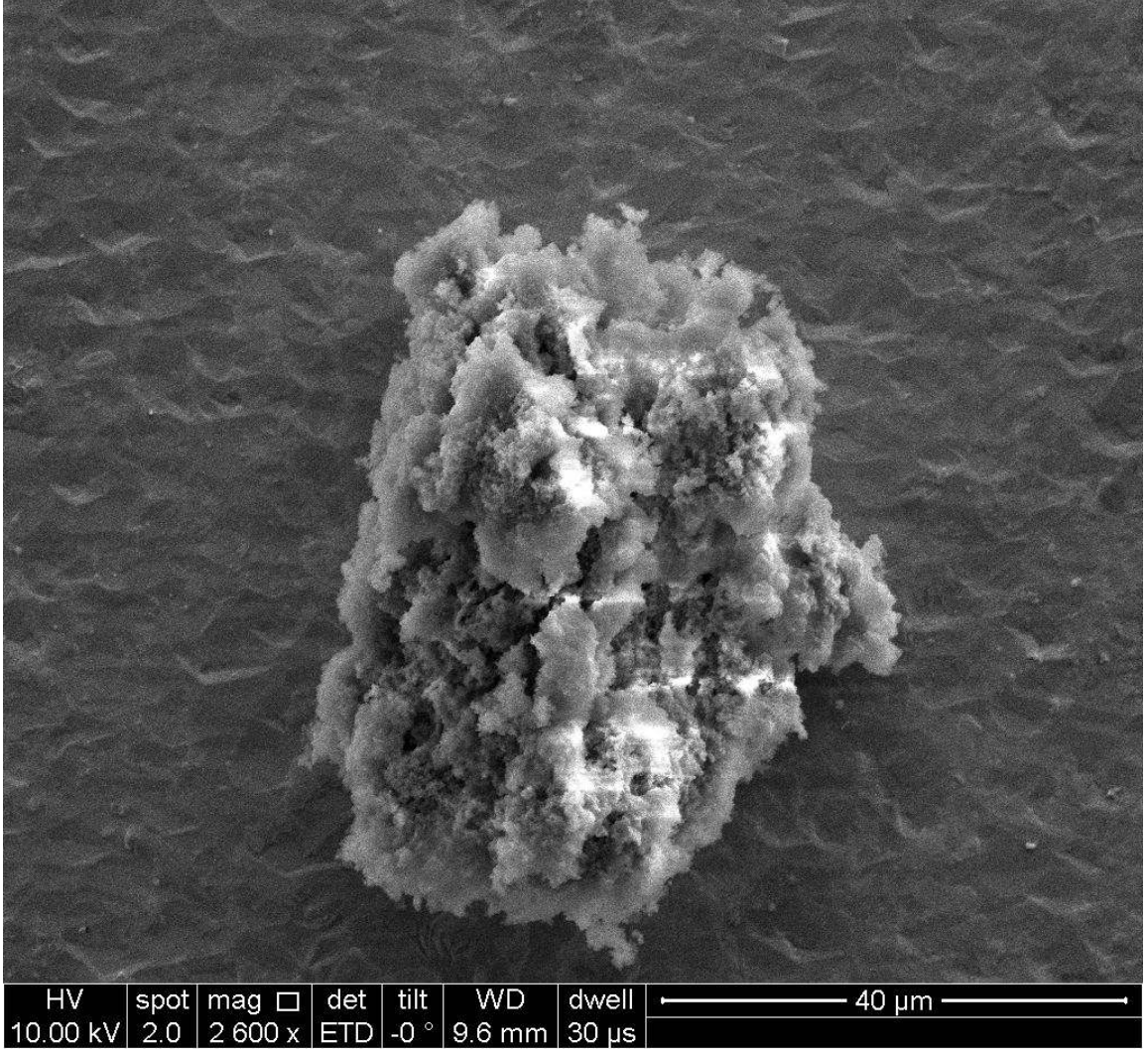
Şekil 3.15 Aşınmış Kristal Yüzeyi (250x Büyütme)



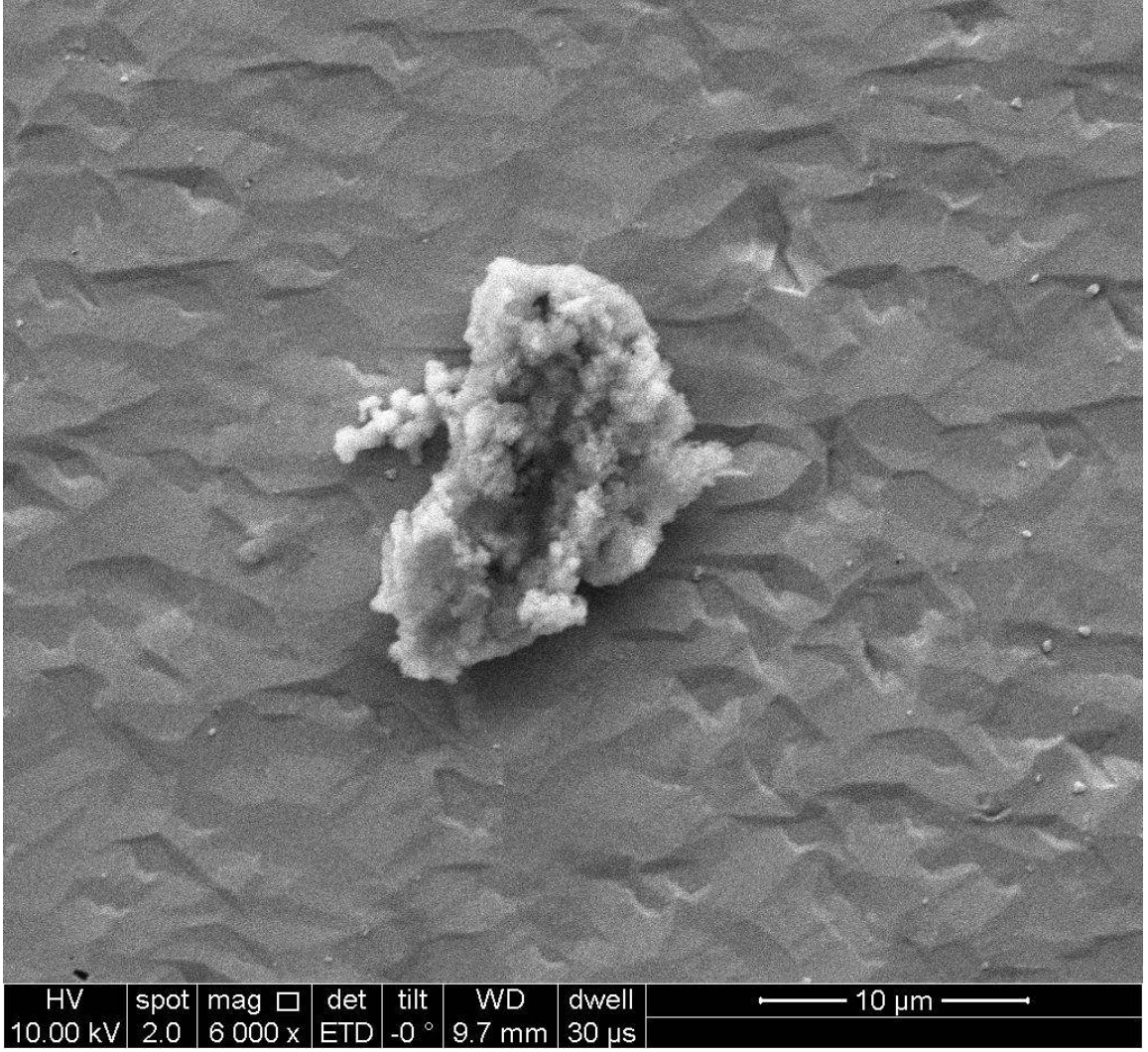
Şekil 3.16 Aşınmış Kristal Yüzeyi (280x Büyütme)



Şekil 3.17 0.7ng/ml cTnT Konsantrasyonu ile Etkileştirilen Kristal Yüzeyi
(200x Büyütme)

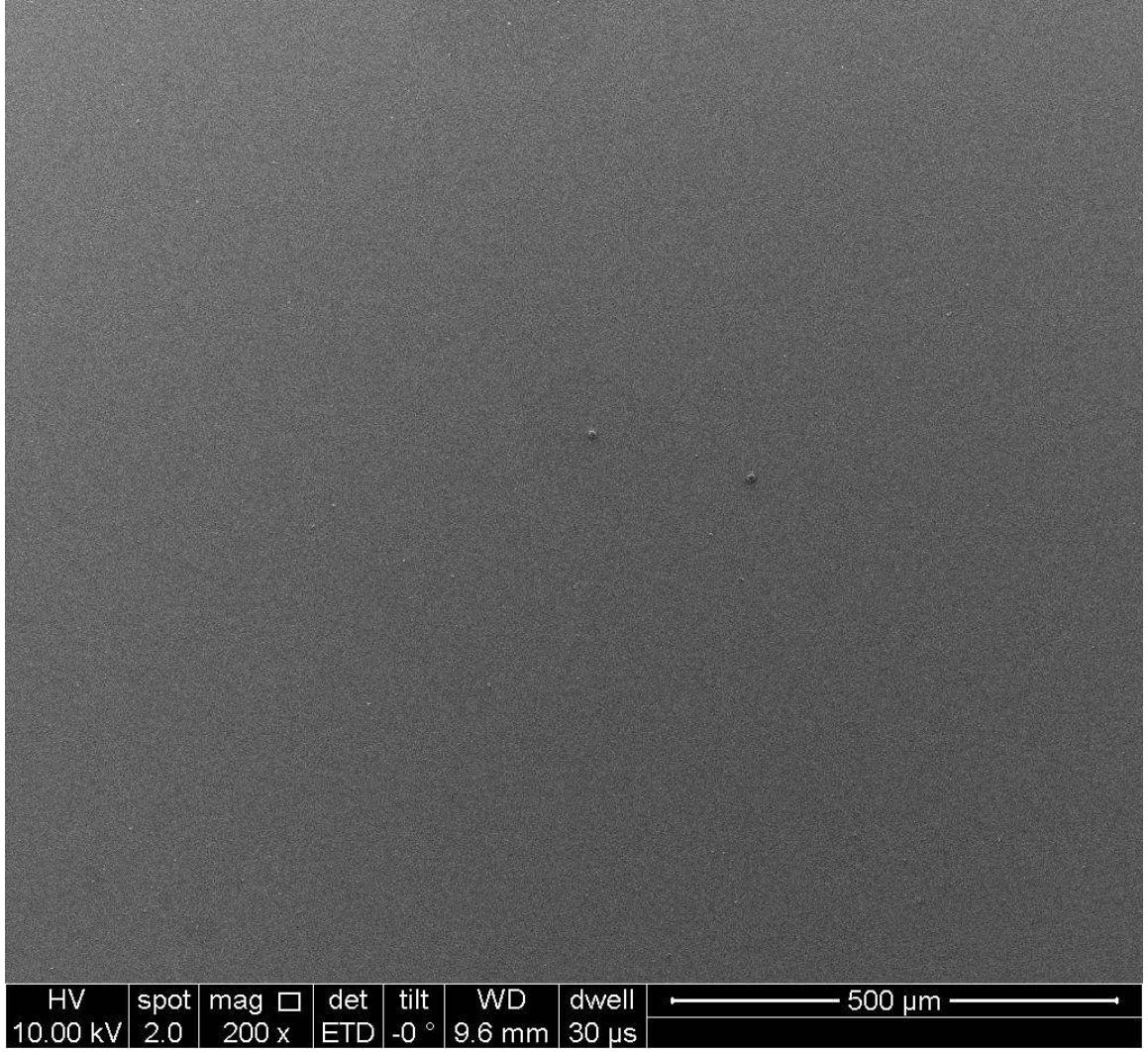


Şekil 3.18 Yüzeye İmmobilize Molekül (2600x Büyütme)

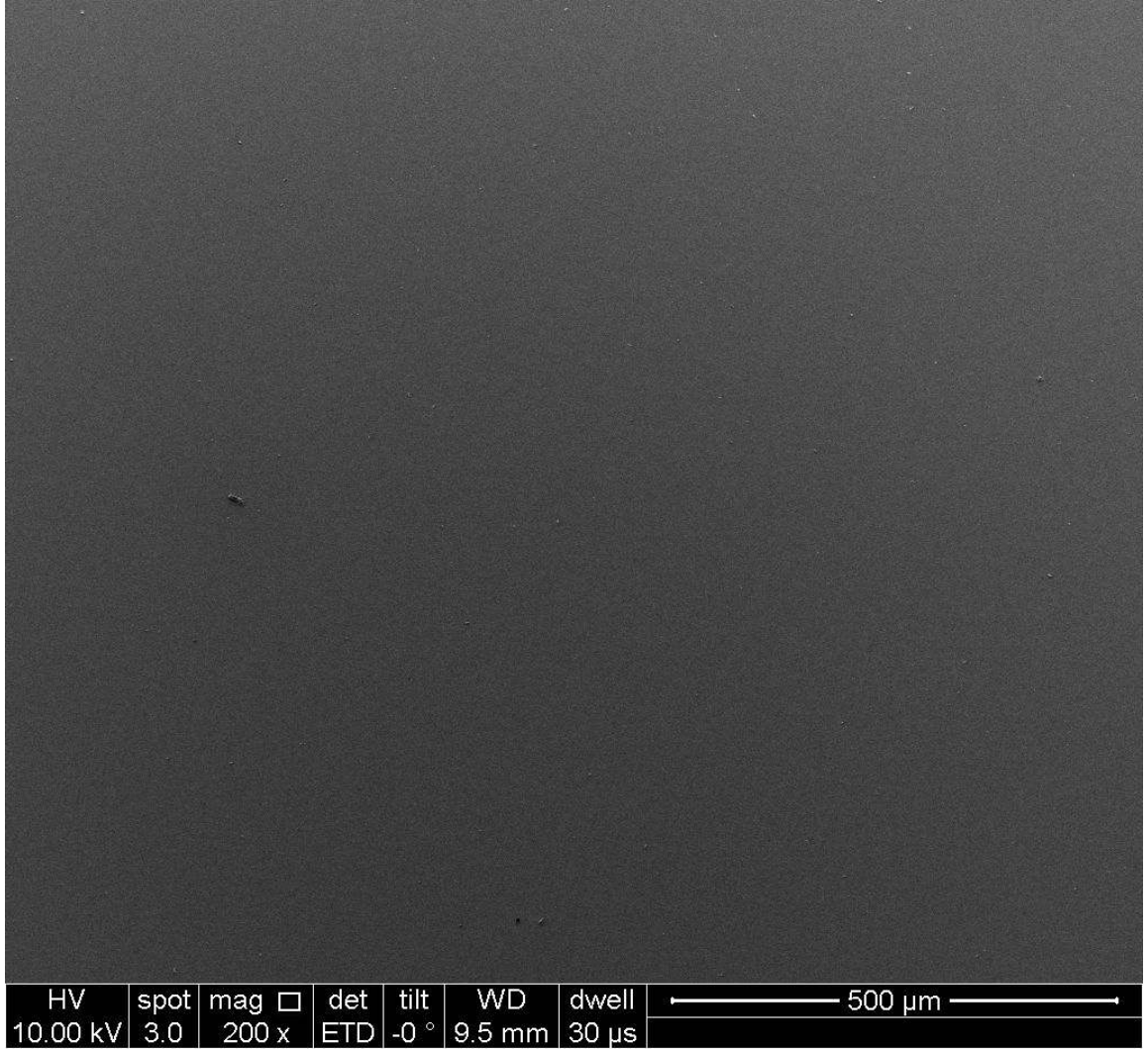


Şekil 3.19 Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzeye İmmobilize Molekül (6000x Büyütme)

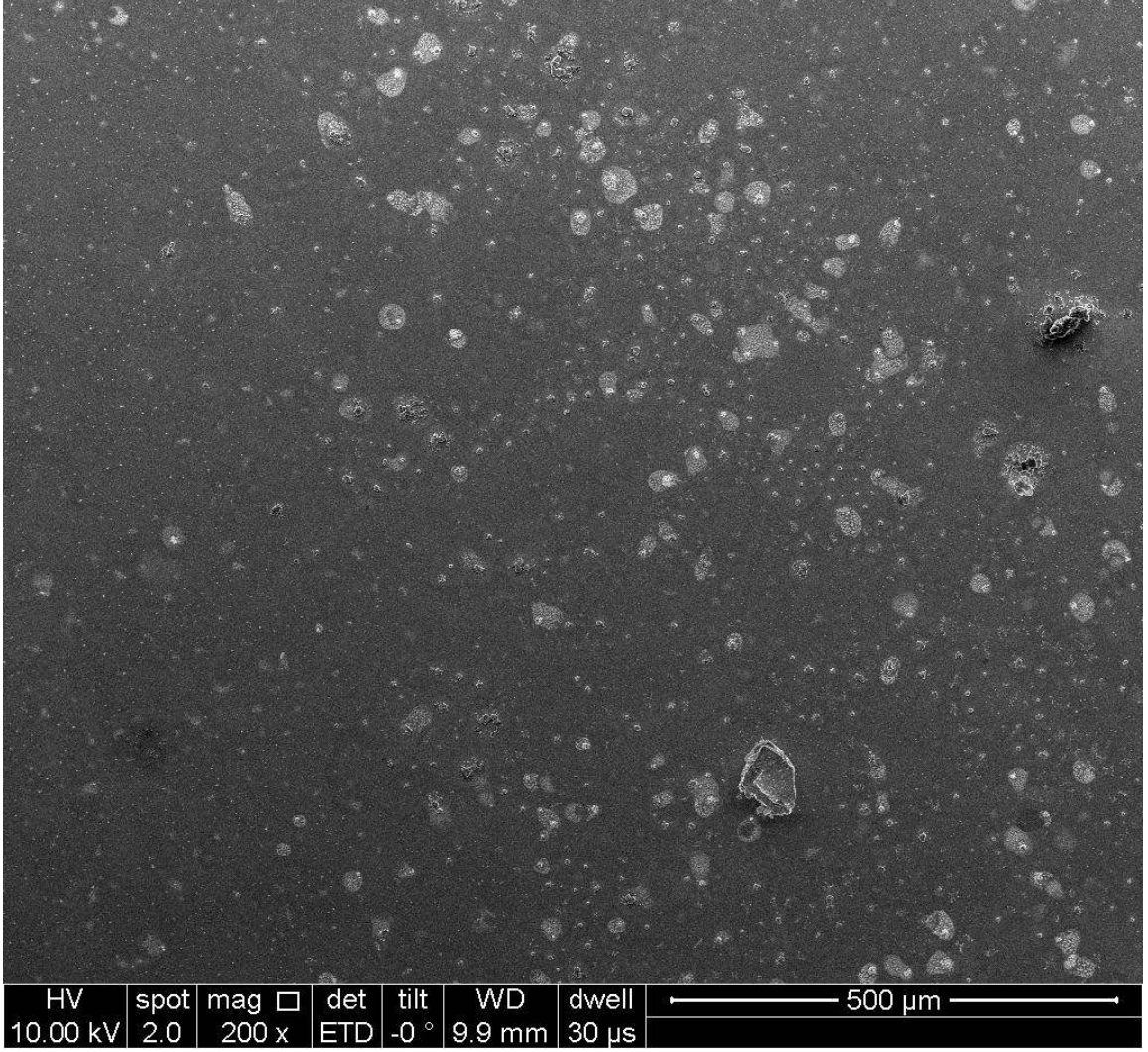
12Mhz 8.4mm gümüş elektrotlu kristallerin yüzey pürüzleri TEM resminde belirgin olarak görülmektedir, yüzeyin pürüzlü yapısı doğru yıkama yöntemleri uygulandığında avantaj sağlarken, yıkama uygulaması başarısız olursa yüzeyin aşınmasına ve istenmeyen yapılarında tutunmasına sebep olabilmektedir.



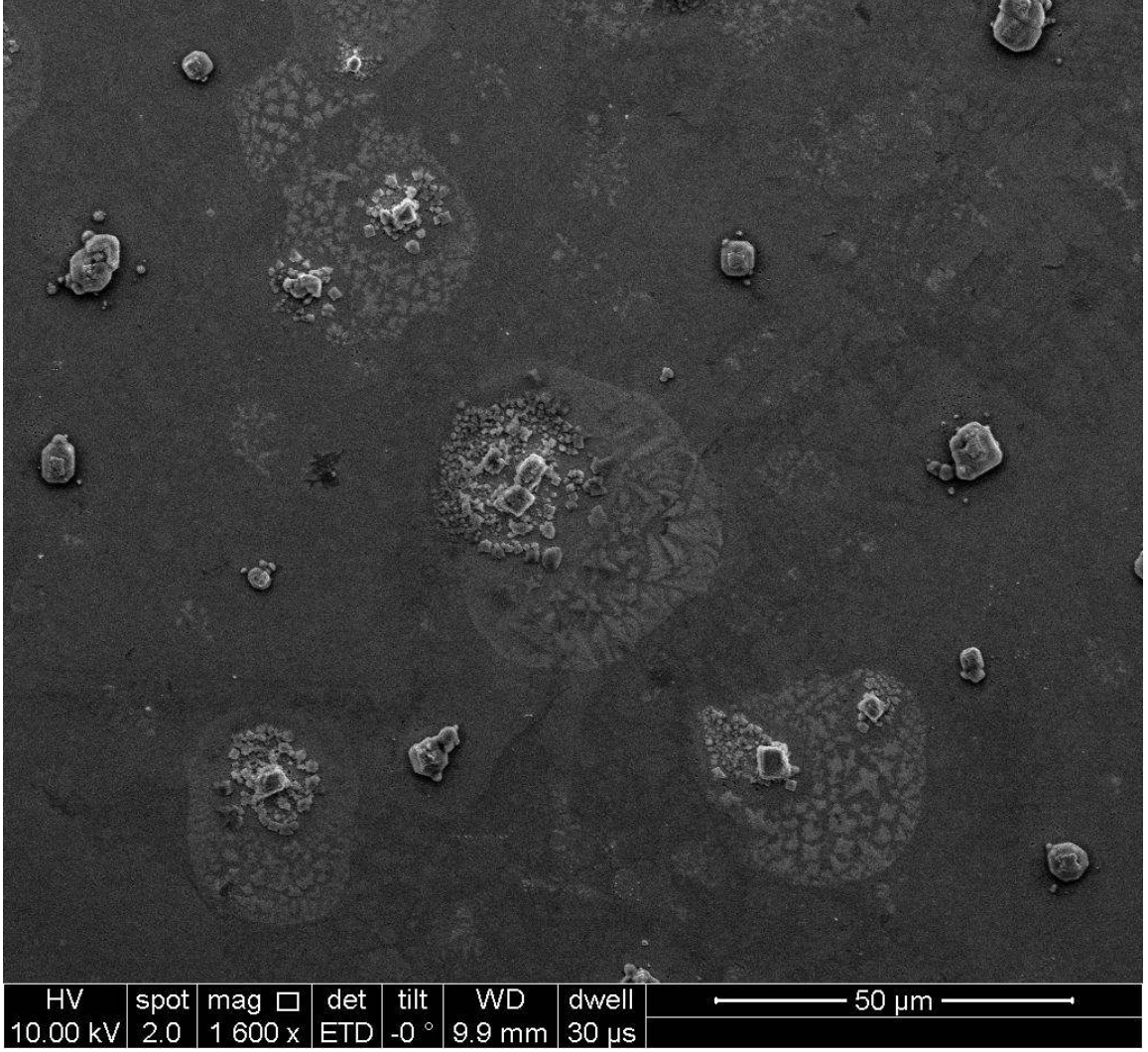
Şekil 3.20 Altın Elektrotlu Temiz Kristal Yüzeyi (200x Büyütme)



Şekil 3.21 Gümüş Elektrotlu Temiz Kristal Yüzeyi (200x Büyütme)

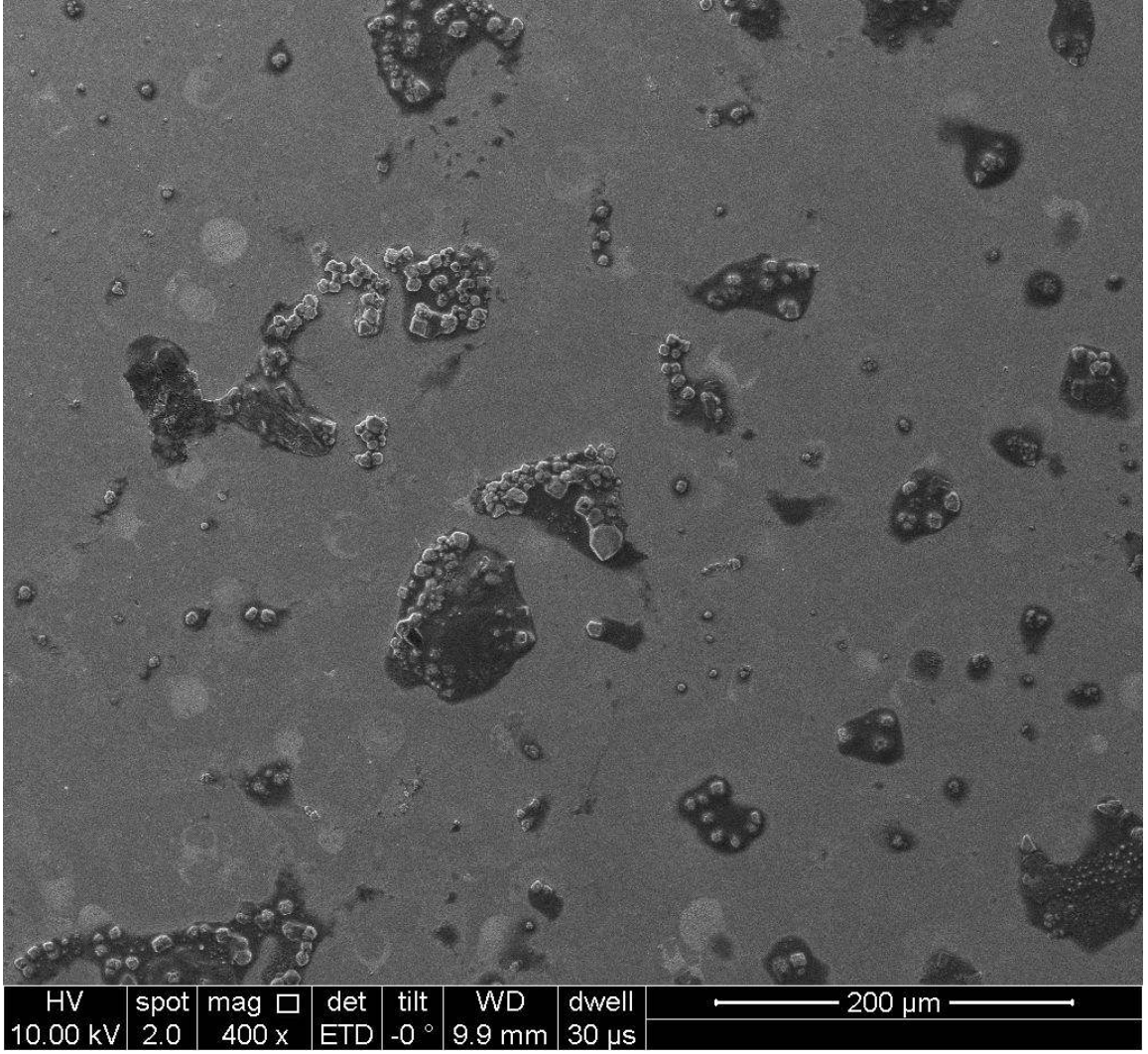


Şekil 3.22 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzeyi (200x Büyütme)

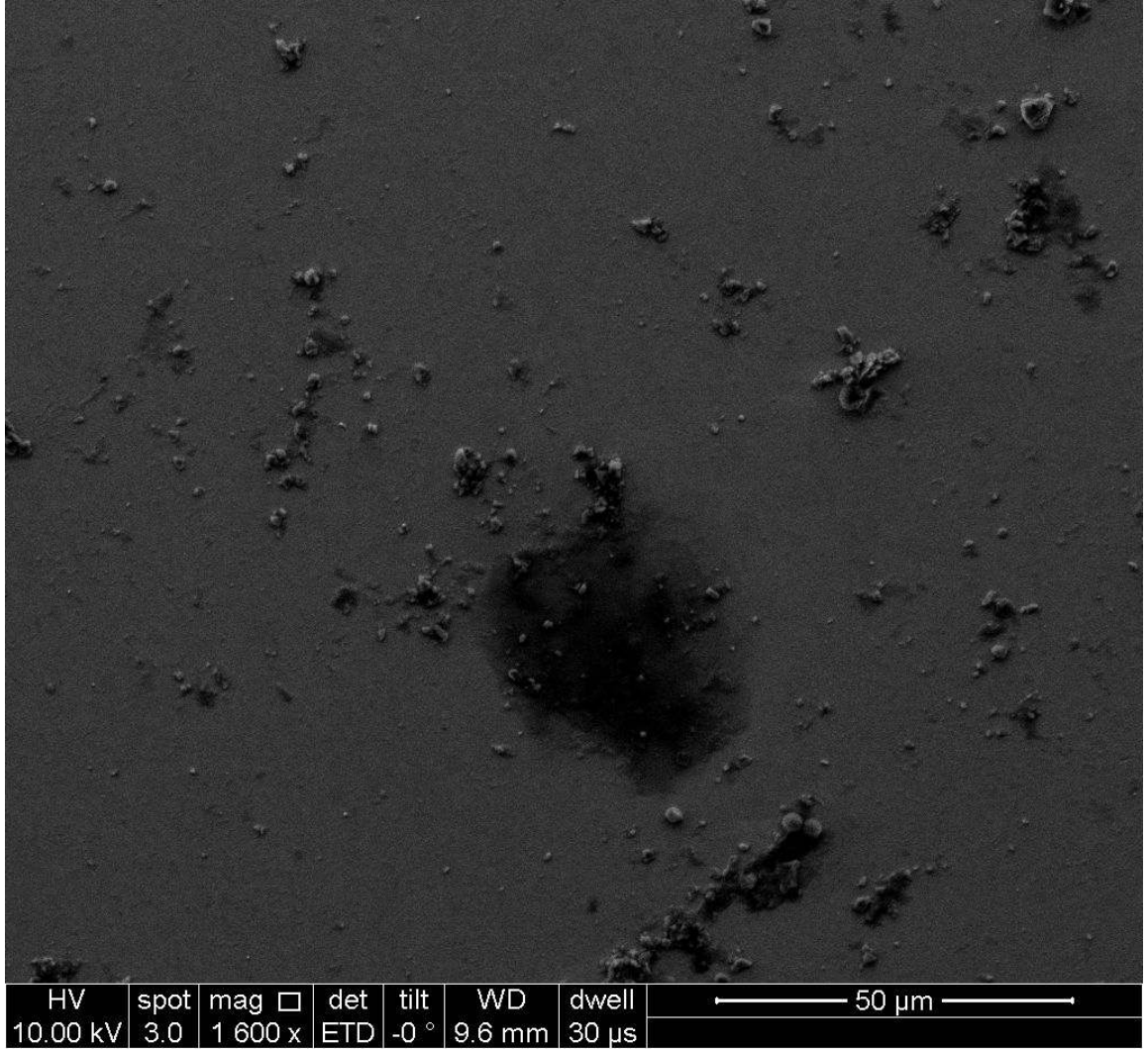


Şekil 3.23 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzeyi (1600x Büyütme)

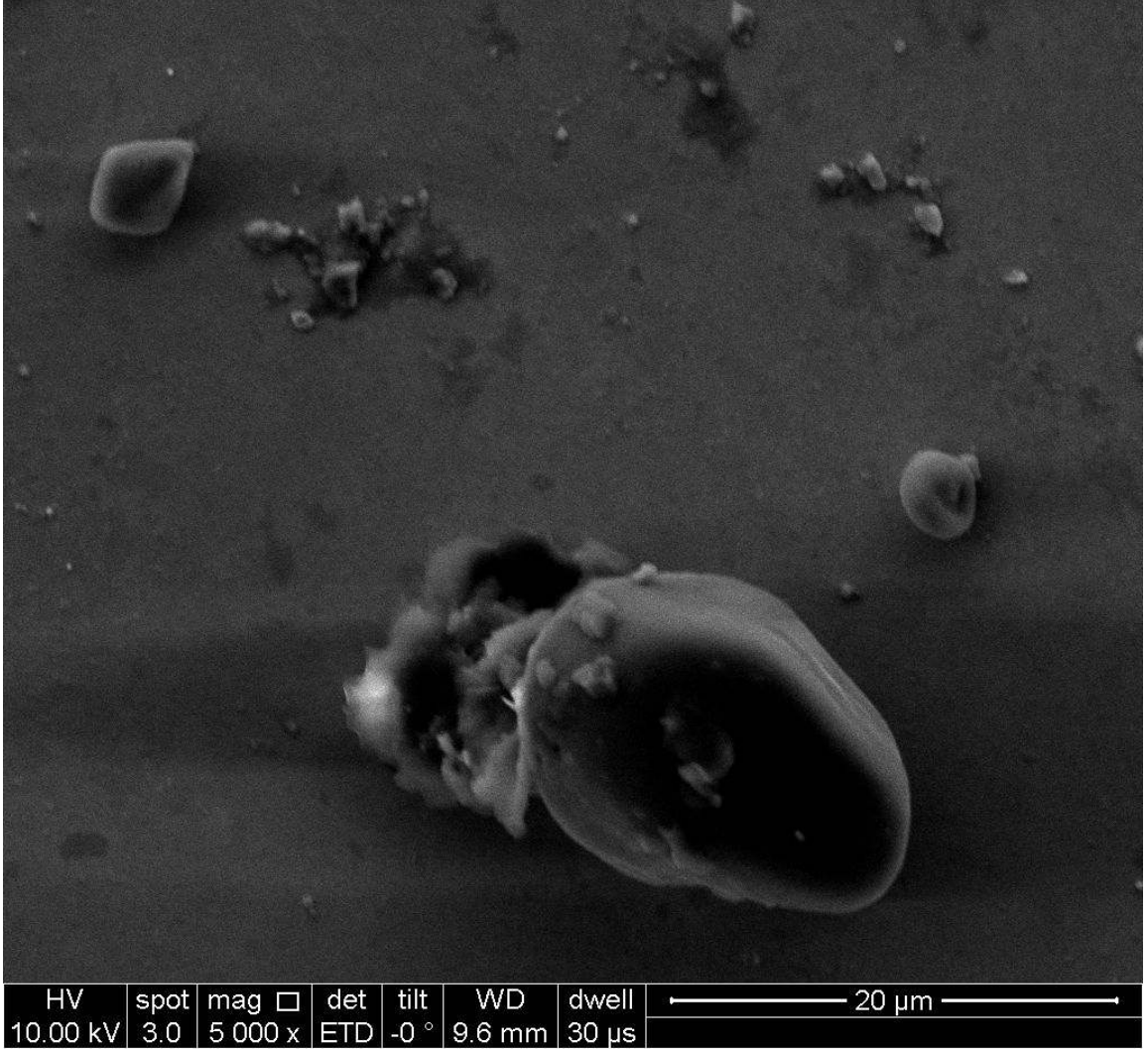
Yüzeye İmmobilize Olan Moleküller Görülmektedir.



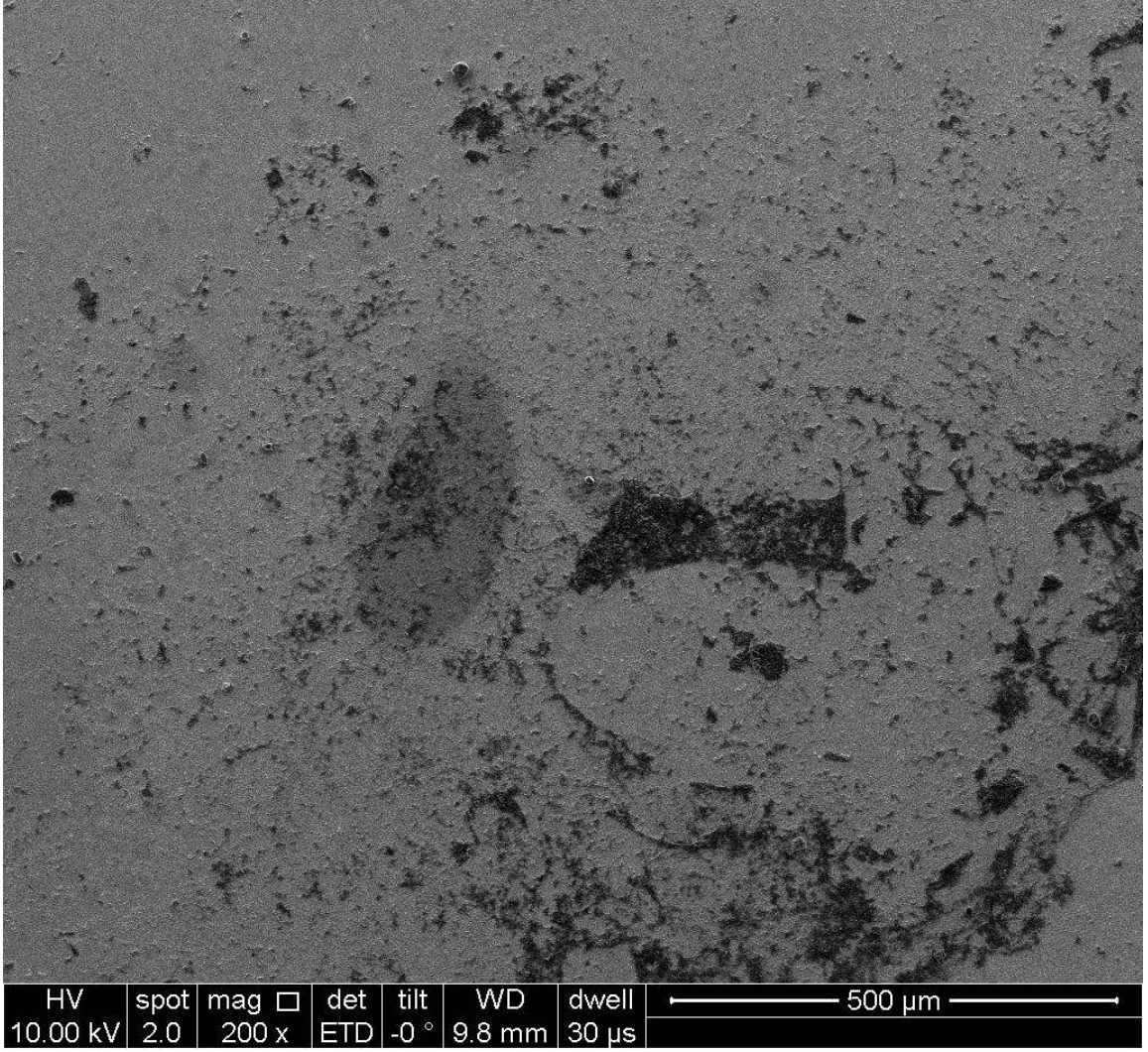
Şekil 3.24 cTnT ile Etkileştirilmiş Altın Elektrotlu Kristal Yüzey (400x Büyütme)



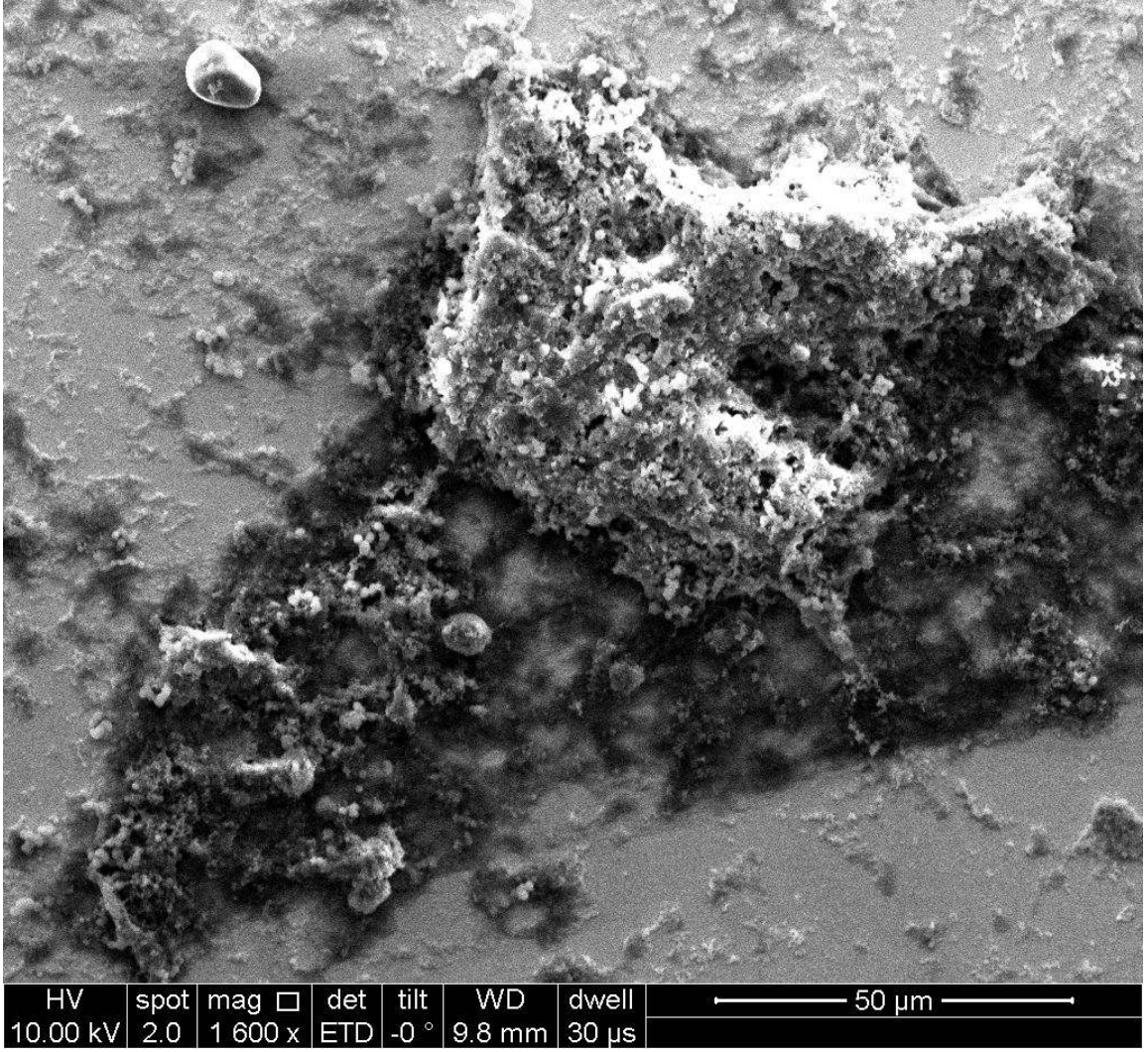
Şekil 3.25 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzey



Şekil 3.26 cTnT ile Etkileştirilmiş Gümüş Elektrotlu Kristal Yüzey (5000x Büyütme)

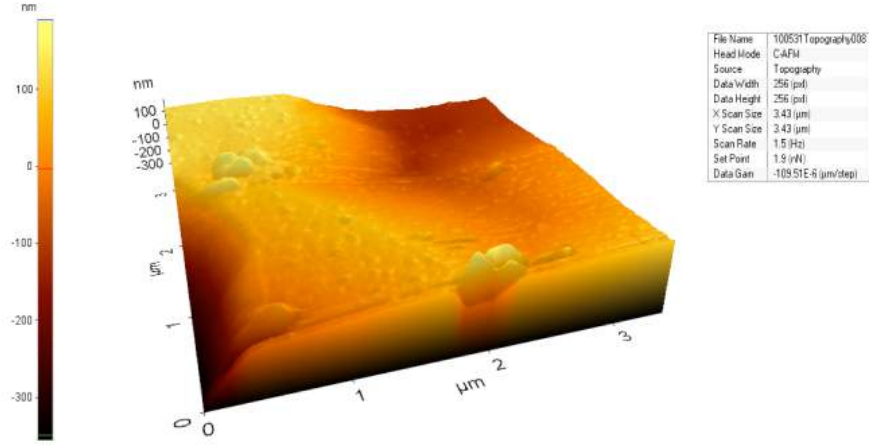


Şekil 3.27 Akış Hücresinde cTnT ile Etkileştirilen Altın Elektrotlu Kristal Yüzey (200x Büyütme)

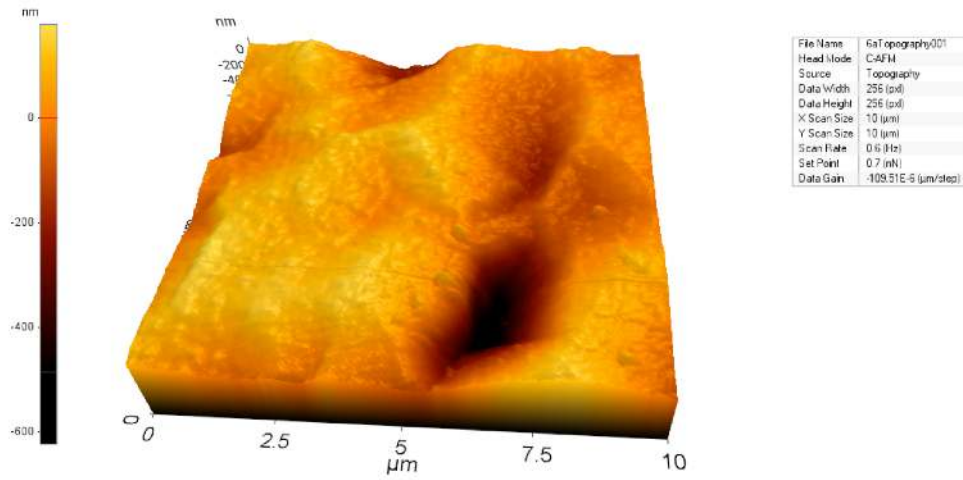


Şekil 3.28 Akış Hücresinde cTnT ile Etkileştirilen Altın Elektrotlu Kristal Yüzeyi (1600x Büyütme)

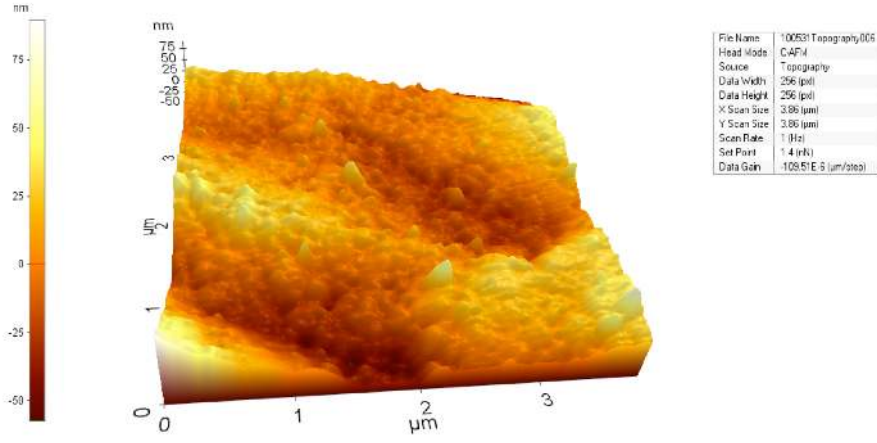
3.3.6. AKM Görüntüleri



Şekil 3.29 AKM ile Görüntülenmiş Temiz Kristal Yüzeyi



Şekil 3.30 AKM ile Görüntülenmiş Aşınmış Kristal Yüzeyi



Şekil 3.31 AKM ile Görüntülenmiş Yüzeyi Modifiye Edilmiş Kristal Yüzeyi

4. SONUÇ

cTnT antikor immobilizasyonu için kristal yüzeylerinde yıkama ve yüzey modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için aseton, metanol ve NaOH kullanılmıştır.

Yıkama ve modifikasyon işlemleri içerisinde fiziksel tutunan moleküllerin yüzeyden ayrılması için manyetik karıştırıcı yanında ultrasonik banyo 53khz frekansta 23°C sıcaklıkta 3dkda en iyi sonuç alınmıştır. Bunun dışında yapılan denemelerde kristallerde aşınmalar veya yetersiz yüzey temizliği ile sonuçlanmıştır.

Kristallerin işlemleri başlamadan önce ve her aşama arasında frekansları ölçülmüştür.

Yapılan deneylerde yüzey temizlik aşamaları için sıcaklık 22°C iken sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonları için 35°C olarak uygulanması bağlanmayı artırmıştır.

Yüzey temizliği ve immobilizasyon aşamalarında manyetik karıştırıcı ile 300rpm dönüş hızı bağlanmalar için uygun karıştırma hızı olarak belirlenmiştir.

Yüzey modifikasyonunda sistamin immobilizasyonu için süre ve derişimlerde en iyi sonuç 30dk ve 20mM derişimi olarak gerçekleşmiştir.

Glutaraldehit immobilizasyonu için 30dk ve %5lik konsantrasyon antikor immobilizasyonu için gerekli koşulları sağlamıştır.

Antikor immobilizasyonunda konsantrasyon 0.9µg/ml olarak belirlenmiştir. Bunun üzerindeki konsantrasyonlarda ise beklenen frekans düşüşü gerçekleşmemiş beklenen cTnT immobilizasyonu olmamıştır.

cTnT proteini patolojik kabul edilen miktarların altında ve üzerinde farklı konsantrasyonlar ile denemeler yapılmış. Sensörün doğrusal çalıştığı izlenmiştir.

Kuvars kristal mikrobals biyosensörlerde kullanılan daldırma ve kurutma yönteminin uygulanışı açısından son derece titiz çalışma gerektiren bir yöntemdir bu sebeple tekrar edilebilirlik sorunu vardır.

Akış hücresi ile elde edilen biyosensörler daldırma ve kurutma yöntemine göre tekrar edilebilirlik açısından avantajlıdır. Bunun yanında çözeltiler ile çalışırken sıcaklık, viskozite, pompa basıncı gibi faktörlerden etkilenirler. Bu faktörlerin etkilerinin azaltılması için hacimler mikrolitre seviyelerine indirilmeli, mikrosıvı aygıtlar tasarlanmalıdır.

KAYNAKLAR LİSTESİ

Bilimsel periyodikler:

- [1] BABACAN, S., Pivarnik, P., Letcher, S., Rand, A.G., 2000. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors & Bioelectronics* 15(11-12), 615-621.
- [2] BASSAND, J.P., Hamm, C.W., Ardissino, D., Boersma, E., Budaj, A., Fernandez-Aviles, F., Fox, K.A.A., Hasdai, D., Ohman, E.M., Wallentin, L., Wijns, W., 2007. The task force for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes of the European society of cardiology. *European Heart Journal* 28(13), 1598-1660.
- [3] BERGSTROM, G., Mandenius, C.F., 2011. Orientation and capturing of antibody affinity ligands: Applications to surface plasmon resonance biochips. *Sensors and Actuators B-Chemical* 158(1), 265-270.
- [4] BINNING, G., Quate, C.F. and GERBER, C., Atomic force microscope, *Physics Review Letters*, vol.56, s.930, 1986
- [5] BOYLE, M.D.P., Reis, K.J., 1987. BACTERIAL FC-RECEPTORS. *Bio-Technology* 5(7), 697-703.
- [6] BRAGA, P.C. And Ricci, D. Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications, *Methods in Molecular Biology*, vol. 242, s.3-12, 2003.
- [7] CHOU, S.F., Hsu, W.L., Hwang, J.M., Chen, C.Y., 2002. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on a quartz crystal microbalance. *Analytica Chimica Acta* 453(2), 181-189.
- [8] CHRISTENSON, R.H., Apple, F.S., Morgan, D.L., Alonsozana, G.L., Mascotti, K., Olson, M., McCormack, R.T., Wians, F.H., Keffer, J.H., Duh, S.H., 1998. Cardiac troponin I measurement with the ACCESS (R) immunoassay system: analytical and clinical performance characteristics. *Clinical Chemistry* 44(1), 52-60.

- [9] CLONEY, L.P., Spiller, L.J., Fong, W.K., Harris, J.E., Harris, P.C., 2003. RAMP (R): High accuracy from immunochromatographic assays by the use of internal control ratios. *Clinical Chemistry* 49(10), 1775-1777.
- [10] ÇELEBİ, Özlem Özcan; Diker Erdem, Aydoğdu Sinan , kardiyak troponinlerin klinik önemi, *Türk kardiyol Dern Arş.*, 2008;36(4):269-277
- [11] DUTRA, R.F., Kubota, L.T., 2007. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip. *Clinica Chimica Acta* 376(1-2), 114-120.
- [12] ELMALI E, Karaeren Z, Özdöl Ç, Akan ÖA. Akut Koroner Sendrom şüpheli Hastalarda Kardiyak Troponin T Troponin I'nın karşılaştırılması, *Türk Biyokimya Dergisi* 2005; 30(3); 212-5.
- [13] FİLATOV, V.L., Katrukha, A.G., Bulargina, T.V., Gusev, N.B., 1999. Troponin: Structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry-Moscow* 64(9), 969-985.
- [14] FONSECA, R.A.S., Ramos-Jesus, J., Kubota, L.T., Dutra, R.F., 2011. A Nanostructured Piezoelectric Immunosensor for Detection of Human Cardiac Troponin T. *Sensors* 11(11), 10785-10797.
- [15] GREEN, R.J., Frazier, R.A., Shakesheff, K.M., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B., 2000. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* 21(18), 1823-1835.
- [16] HABİF, Sara, Kardiyak Troponinler, *T Klin J Med Sci* 2003, 23
- [17] KATRUKHA, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M.E., 1997. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex. *Clinical Chemistry* 43(8), 1379-1385.
- [18] KATUS, H.A., Remppis, A., Neumann, F.J., Scheffold, T., Diederich, K.W., Vinar, G., Noe, A., Matern, G., Kuebler, W., 1991. Diagnostic Efficiency Of

- Troponin-T Measurements In Acute Myocardial-Infarction. *Circulation* 83(3), 902-912.
- [19] KO, S., Kim, B., Jo, S.S., Oh, S.Y., Park, J.K., 2007. Electrochemical detection of cardiac troponin I using a microchip with the surface-functionalized poly(dimethylsiloxane) channel. *Biosensors & Bioelectronics* 23(1), 51-59.
- [20] KOCUM, C., Erdamar, A., Ayhan, H., 2010. DESIGN OF TEMPERATURE CONTROLLED QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE SYSTEM. *Instrumentation Science & Technology* 38(1), 39-51.
- [21] LEE, Y.G., Chang, K.S., 2005. Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid. *Talanta* 65(5), 1335-1342.
- [22] MATTOS, A.B., Freitas, T.A., Silva, V.L., Dutra, R.F., 2012. A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection. *Sensors and Actuators B-Chemical* 161(1), 439-446.
- [23] MAZUREK, J.A., 2010. Sensitive Cardiac Troponin T Assay. *New England Journal of Medicine* 362(13), 1242-1243.
- [24] NUSIER, M.K., Ababneh, B.M., 2006. Diagnostic efficiency of creatine kinase (CK), CKMB, troponin T and troponin I in patients with suspected acute myocardial infarction. *Journal of Health Science* 52(2), 180-185.
- [25] OHMAN, E.M., Casey, C., Bengtson, J.R., Pryor, D., Tormey, W., Horgan, J.H., 1990. Early Detection Of Acute Myocardial-Infarction - Additional Diagnostic information From Serum Concentrations Of Myoglobin In Patients Without St Elevation. *British Heart Journal* 63(6), 335-338.
- [26] POPE, J.H., Aufderheide, T.P., Ruthazer, R., Woolard, R.H., Feldman, J.A., Beshansky, J.R., Griffith, J.L., Selker, H.P., 2000. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *New England Journal of Medicine* 342(16), 1163-1170.

- [27] REICHLEIN, T., Hochholzer, W., Bassetti, S., Steuer, S., Stelzig, C., Hartwiger, S., Biedert, S., Schaub, N., Buerge, C., Potocki, M., Noveanu, M., Breidthardt, T., Twerenbold, R., Winkler, K., Bingisser, R., Mueller, C., 2009. Early Diagnosis of Myocardial Infarction with Sensitive Cardiac Troponin Assays. *New England Journal of Medicine* 361(9), 858-867.
- [28] ROBERTS, R., Ambos, H.D., Sobel, B.E., 1983. Estimation Of Infarct Size With Mb Rather Than Total Ck. *International Journal of Cardiology* 2(5-6), 479-489.
- [29] RONAN, C. A., "Bilim Tarihi, Dünya Kültürlerinde Bilimin Tarihi ve Gelişimi", TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, 2005.
- [30] SPIES, C., Haude, V., Fitzner, R., Schroder, K., Overbeck, M., Runkel, N., Schaffartzik, W., 1998. Serum cardiac troponin T as a prognostic marker in early sepsis. *Chest* 113(4), 1055-1063.
- [31] SU, X.L., Li, Y.B., 2004. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157 : H7. *Biosensors & Bioelectronics* 19(6), 563-574.
- [32] TANG, A.X.J., Pravda, M., Guilbault, G.G., Piletsky, S., Turner, A.P.F., 2002. Immunosensor for okadaic acid using quartz crystal microbalance. *Analytica Chimica Acta* 471(1), 33-40.
- [33] THYGESEN, K., Alpert, J.S., White, H.D., Force, E.A.A.W.T., 2007. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116(22), 2634-2653.
- [34] VATNER, S.F., Baig, H., Manders, W.T., Maroko, P.R., 1978. Effects Of Coronary-Artery Reperfusion On Myocardial Infarct Size Calculated From Creatine-Kinase. *Journal of Clinical Investigation* 61(4), 1048-1056.
- [35] WANG, K., Asinger, R.W., Marriott, H.J.L., 2003. ST-segment elevation in conditions other than acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 349(22), 2128-2135.

- [36]WONG-EK, K., Chailapakul, O., Nuntawong, N., Jaruwongrungrunsee, K., Tuantranont, A., 2010. Cardiac troponin T detection using polymers coated quartz crystal microbalance as a cost-effective immunosensor. Biomedizinische Technik 55(5), 279-284.
- [37]WONG-EK, K., Chailapakul, O., Prommas, J., Jaruwongrungrunsee, K., Nuntawong, N., Tuantranont, A., 2009. Qcm Based On Flow System For Cardiovascular Disease. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, pp. 80-83. Springer, Munich, GERMANY.

Kitaplar:

- [38]HALL, J.E., Guyton, A.C., 2011. Guyton and Hall textbook of medical physiology, 12th ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia, Pa.

Tezler:

- [39]ALAYBEYOĞLU, Ülke Şule, Acil Servise Başvuran Ve Akut Koroner Sendrom Düşünülen Hastalarda Troponin T (Tnt) Ve High Sensitive Troponin T (HsTnT) Değerlerinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı, 2011
- [40]AYAZ, Bünyamin, Nanoteknoloji ve Uygulamaları, Yıldız Teknik Üniversitesi Makine Mühendisliği Makine Malzemesi ve İmalat Teknolojisi Anabilim Dalı, 2011
- [41]ERMEK, Erhan, QCM Heparin Biyosensör Tasarımı ve Üretimi, Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, 2010
- [42]GÖK, H. Akut Koroner Sendromların Tanısında Yeni Biyokimyasal Markerlar. Uzmanlık tezi, Türk Kardiyoloji Seminerleri Kasım 2001; 20-32.
- [43]GÖK, Bülent, St Yükselmez akut koroner sendromların erken tanısında kalp tipi serbest yağ aside bağlayıcı proteinin tanısal değeri, uzmanlık tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, 2006

- [44] ÖZDEN, Reyhan Başak, Akut koroner sendromda NT-PROBNP'nin Yeri, Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, 2005
- [45] ÖZHASANEKLER, Ayhan, Acil Servise Göğüs Ağrısı İle Başvuran Hastalarda Akut Koroner Sendromun Erken Tanısında Kalp Tipi Serbst Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinin (H-FABP) Rolü, Troponin Ve Ck-Mb İle Karşılaştırılması, uzmanlık tezi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı, 2008
- [46] SAĞLAM, İsmail, akut koroner sendromda PRO-BNP Düzeyinin; ekokardiyografiyle predikte edilen infarkt alanı ile ilişkisi, uzmanlık tezi, Şişli etfal eğitim ve araştırma hastanesi biyokimya ve klinik biyokimya bölümü,2006
- [47] TABRIZI, Amir Parviz Farşçi, Altın Nanopartikül Üretimi Ve Kuvars Kristal Mikrobalans Sisteminde Kullanımı, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı,2005
- [48] YILDIZ, S., "Günümüz Mikroskopları," *Bilim ve Teknik Dergisi*, Mart, 2003.