



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**KUARTZ KRİSTAL YÜZEYİNE PROTAMİN
İMMOBİLİZASYONU**

SEMİHA İREM AKAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2009

KUARTZ KRİSTAL YÜZEYİNE PROTAMİN İMMOBİLİZASYONU

IMMOBILIZATION OF PROTAMINE TO THE SURFACE OF QUARTZ CRYSTAL

SEMİHA İREM AKAY

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

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan (Danışman) :.....
(Doç. Dr. Mustafa Kocakulak)

Üye :.....
(Yrd. Doç. Dr. Bülent Yılmaz)

Üye :.....
(Yrd. Doç. Dr. Aylin Gürpınar)

ONAY

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

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

Prof. Dr. Emin AKATA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

TEŐEKKÖR

Tez aşamasında bana verdiği yönlendirici bilgilerinden dolayı ve deneyimlerini benden esirgemeyen Danışmanım Mustafa Kocakulak'a,

TÜBİTAK 105M270 Proje Destekçilerine,

Biomedtek Prof. Dr. Erhan Pişkin'e ve AFM görüntülerini alan ve verdiği yardımcı bilgilerden dolayı Hacettepe Üniversitesi Yüksek Lisans öğrencisi Nihan Güvener'e,

Deneyler esnasında benimle birlikte yeni bilgiler edinen ve bana destek olan Erhan Ernek'e,

İş yerinde bana desteklerini veren çalışma arkadaşlarıma,

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

ÖZ

KUARTZ KRİSTAL YÜZEYİNE PROTAMİN İMMOBİLİZASYONU

İrem AKAY

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Yapılan çalışmanın amacı kuartz kristal yüzeyine protamin immobilizasyonu yapıp, heparin miktarının kuartz kristal mikrobals (QCM) ile ölçülmesidir. QCM cihazı; kütle değişimine göre frekans değişimi vermektedir. Çalışma sırasında bu ilkeden yararlanarak immobilizasyon sırasında moleküllerin ne miktarda tutunduğu ölçülmüştür.

Kristaller; farklı derişimlerde hazırlanmış olan sistamin ve glutaraldehit çözeltilerinde etkileştirilmesiyle optimum derişim bulunmaya çalışılmıştır. Daha sonra sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonunun gerçekleştiği kristallerde, fosfat tamponunda hazırlanmış olan protaminle immobilizasyon yapılmıştır. Protamin immobilizasyonundan sonra biyosensör oluşturulması aşamasında tedavi edici doz aralığında fosfat tamponu ile hazırlanmış olan heparin ölçümü yapılmaya çalışılmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Protamin, heparin, biyosensör, QCM, Kalp Akciğer Makinesi, Kardiyopulmoneri bypass, aktifleşmiş pıhtılaşma zamanı (ACT)

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

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF PROTAMINE TO THE SURFACE OF QUARTZ CRYSTAL

İrem AKAY

Baskent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

The purpose of this study is to measure of the quantity of heparine by quartz crystal microbalance(QCM) method, through protamine immobilization on quartz crystal surface. QCM device gives frequency change response according to change of mass. It was measured how much molecules of mass was held during the immobilization by using this principle.

It was worked to find out the optimum concentration in cysteamine and glutaraldehyde solutions by making interaction. Then immobilization was performed by protamine that had already been prepared in phosphate buffer in crystals in which cysteamine and glutaraldehyde immobilization had already been occurred. It was worked to make heparine measurements which were prepared by phosphate buffer in dosage range for treatment after protamine immobilization and at the stage of the composing of biosensor.

KEYWORDS: Protamine, heparin, biosensor, QCM, Heart Lung Machine, Cardiopulmonary bypass, activated clotting time

Advisor: Asist. Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK, Baskent University, Department of Biomedical Engineering

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kan ve Kan Elemanları.....	2
2.1.1 Kan.....	2
2.1.2 Plazma.....	3
2.1.3 Kan Hücreleri.....	3
2.2 Kanamanın Durması Ve Kan Pıhtılaşma Mekanizması.....	4
2.3 Heparin.....	8
2.4 Protamin.....	9
2.5 Kardiyopulmoner Bypass'ta Heparin ve Protamin	10
2.6 Pıhtılaşma Zamanı Ölçüm Metodları.....	13
2.6.1 Lee-White metodu	13
2.6.2 Lam metodu.....	13
2.6.3 Otomatik Metodlar.....	14
2.7 Kalp Akciğer Makinesi.....	15
2.7.1 Kalp Akciğer Makinesinin Temel Bileşenleri.....	16
2.7.1.1 Venöz Kanüller.....	18
2.7.1.2 Venöz Rezervuar.....	18
2.7.1.3 Oksijenatörler.....	18
2.7.1.3.a Bubble Oksijenatörler.....	19
2.7.1.3.b Membran Oksijenatörler.....	20
2.7.1.4 Pompa.....	22
2.7.1.4.a Roller Pompalar.....	22

2.7.1.4.b Santrifüj Pompalar.....	22
2.7.1.4.c Peristaltik Pompalar.....	23
2.7.1.5 Isı Değişirici.....	23
2.7.1.6 Filtreler.....	24
2.7.1.7 Emici sistemler.....	24
2.7.1.8 Vent Sistemleri.....	24
2.7.1.9 Arter Kanülü.....	24
2.8 Biyosensör.....	25
2.9 Piezoelektrik Etki ve Piezoelektrik Kristaller.....	25
2.10 Kuartz Kristal Mikrobals (QCM)	27
2.10.1 QCM Kullanım Alanları.....	28
2.11 İmmobilizasyon Yöntemleri.....	29
2.12 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	30
3. DENEY AŞAMASI.....	32
3.1 Deneyde Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar	32
3.2 Deneyin Yapılışı.....	32
3.2.1 Temizleme ve Hidrofilik Yüzey Eldesi.....	33
3.2.2 Sistamin İmmobilizasyonu.....	36
3.2.3 Glutaraldehit İmmobilizasyonu.....	38
3.2.4 Protamin İmmobilizasyonu.....	40
3.2.5 Heparin Ölçüm Deneyleri.....	41
3.2.6 Deneysel Sonuçlar.....	41
3.2.7 AFM Görüntüleri.....	44
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR LİSTESİ.....	49
EKLER.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Protrombin aktivatörünün oluşması.....	6
Şekil 2.2 Pıhtılaşma mekanizması.....	6
Şekil 2.3 Heparinin kan dolaşımına girmesi.....	8
Şekil 2.4 ACT'nin Heparin verildikten sonraki değişim.....	9
Şekil 2.5 22 pediyatrik (çocuk) hastanın bypass ameliyatı esnasında 6 zaman noktasında Hemochron ve HemoTec (Hepcon) ACT değerleri.....	15
Şekil 2.6 Kalp Akciğer Makinesi ve Bileşenleri.....	17
Şekil 2.7 Sorin Group COBE Cardiovascular Apex marka oksijenatör.....	19
Şekil 2.8 Bubble oksijenatörün kalp akciğer makinesinde yeri.....	20
Şekil 2.9 Membran oksijenatörde gaz alışverişi.....	21
Şekil 2.10 Membran oksijenörün kalp akciğer makinesinde yeri.....	21
Şekil 2.11 Santrifüj Pompa.....	22
Şekil 2.12 Biyosensörün şematik gösterimi	25
Şekil 2.13 Kuartz kristal bileşenleri.....	27
Şekil 3.1 Kristallerin Dremel 10.8V Lithium Ion el aletiyle metal başlıklarının kesilip çıkarılması.....	33
Şekil 3.2 Kristalin manyetik karıştırıcıda çözelti ile etkileştirilmesi.....	34
Şekil 3.3 Temizleme işleminin frekans değişimi ile karşılaştırılması.....	35
Şekil 3.4 Kristallerin ultrasonik banyoda deiyonize su ile yıkanması.....	35
Şekil 3.5 Karanlık ortamın sağlanması.....	37
Şekil 3.6 Farklı sistamin derişiminin yarattığı frekans değişimi.....	38
Şekil 3.7 Sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonu için kristallere karanlık ortam sağlanması.....	39
Şekil 3.8 Farklı glutaraldehit derişiminin yarattığı frekans değişimi.....	40
Şekil 3.9 Protamin sonrası yıkama işleminin heparin ölçümüne etkisi.....	42
Şekil 3.10 Farklı derişimdeki heparinin protamin ile etkileşmesi.....	43
Şekil 3.11 Farklı derişimdeki heparinin kristalde kütle değişimi.....	44
Şekil 3.12 Uygulama öncesi kuartz kristal yüzeyi.....	45
Şekil 3.13 Sistamin immobilizasyonu sonrası kuartz kristal yüzeyi.....	45
Şekil 3.14 Protamin immobilizasyonu sonrası kuartz kristal yüzeyi.....	46
Şekil 3.15 Heparin immobilizasyonu sonrası kuartz kristal yüzeyi.....	46

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1	Kanda bulunan pıhtılaşma faktörleri	7
-------------	---	---

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ΔF	Salınan kristalde frekans değişimi
Δm	Yüzeyde oluşan film tabakası kütlesi
μ	mikro
A	Elektrod yüzey alanı
Ag	Gümüş
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
cm	santimetre
CO ₂	Karbondiyoksit
Da	dalton
f	rezonans frekansı
gr	gram
Hz	Hertz
i.v- IV	intravenöz
IU	Uluslararası Birim
IU/ml	Uluslararası Birim/milimetre
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg/kg	miligram/kilogram
MHz	Megahertz
O ₂	Oksijen
PTFE	politetrafluoretilen
S.C	subkütan
sn	saniye
ACT	Aktifleşmiş Pıhtılaşma Zamanı (Activated Clotting Time)
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AFM	Atomic Force Microscopy
CPB	Cardiopulmonary Bypass
KAM	Kalp Akciğer Makinası
KPB	Kardiyopulmoneri Bypass
QCM	Quartz Crystal Microbalance

1. GİRİŞ

Heparin; açık kalp ameliyatı, diyaliz, hemaperfüzyon gibi ekstrakorporeal uygulamalarda pıhtılaşmanın önlenmesi için kullanılan sülfatlı polisakkarit molekülüdür. Günümüzde kandaki heparin miktarının izlenmesi pıhtılaşma zamanının ölçülmesi ile olmaktadır. Bu yöntem dolaylı bir ölçümdür ve hatalı sonuçlar verebilir. Sunulan araştırma kapsamında kuartz kristallerin yüzeyine kimyasal immobilize protamin ile etkileşimin neden olduğu frekans değişimiyle heparin ölçümü yapılması hedeflenmiştir.

1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Yapılan çalışmanın amacı kuartz kristal yüzeyine protamin immobilizasyonu yapıp, heparin miktarının kuartz kristal mikrobalsans (Quartz Crystal Microbalance- QCM) ile ölçülmesidir. QCM cihazı; kütle değişimine göre frekans değişimi vermektedir. Eğer kristal yüzeyinde kütle artışı varsa frekans düşecektir. Kristal yüzeyinde kütle azalması varsa frekans artacaktır. Çalışmada bu ilkeden yararlanarak heparin miktarı tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kan ve Kan Elemanları

2.1.1 Kan

Kan, yaşam için primer bir rol oynayan, yüksek yapılı hayvan ve insanda atardamar, toplardamar ve kılcal damarlarda dolaşan ve akıcı bir bağ dokusudur. Dokuyu oluşturan kan hücreleri, kan plazması denen bir sıvı içinde bulunur. Plazmanın bol sıvı oluşu, kan hücrelerinin serbestçe hareket etmesini sağlar.

Kanın ana işlevi besin maddelerinin ve yapısal elemanların sağlanması ve atık maddelerin (karbondioksit, laktik asit vs.) atılmasının sağlanmasıdır. Her bedende 3.1 ile 5.2 litre arası kan bulunur. Bu miktar ortalama vücut ağırlığının %7-8'ini oluşturur. Kanın yarısı, sıvı olan bölümden yani plazmadan gelir. Diğer yarısı ise kanın içinde çeşitli görevler üstlenmiş olan hücreler veya moleküllerdir.

Kan damardan alındıktan sonra bir süre bekletilirse pıhtılaşır ve kan serumu adı verilen sarımtırak bir sıvı ayrılır. Serumda fibrinojen ve pıhtılaşma ile ilgili diğer proteinler, pıhtılaşmada kullanıldığı için yoktur. Plazma, fibrinojen ve serumdan oluşur. Plazma kanın % 55'ini teşkil eder. Kalan kısmı ise kan hücrelerini yani; alyuvarlar, akyuvarlar ve pıhtılaşmada rol oynayan trombositlerden (kan pulcukları, platelet) meydana gelmiştir. [1]

2.1.2 Plazma

Plazma: Kan plazması, %91 su, %8 organik maddeler ve %1 inorganik maddelerden müteşekkildir. Organik bileşenlerin tamamına yakını, proteindir ve plazma için proteinlerin suda çözünmesiyle meydana gelir denir. Plazmanın üç temel proteini albumin, globulin ve fibrinojendir. 100 mililitre plazmada 4.5 gr albumin, 2.5 gr globulin ve 0.3 gr fibrinojen bulunur.

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

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

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

2.1.3 Kan Hücreleri

Alyuvarlar (Eritrosit): Kırmızı kan hücreleri kanın hücre kısmının tamamına yakınına meydana getirirler. Kanın her milimetre kübünde yaklaşık 4-5 milyon alyuvar bulunur. Mikroskopta bakıldığında alyuvarlar, ortası çökük tavla pulu şeklinde görülür. Ortalama çapları 7,5 mikron olup, merkezdeki kalınlıkları bir mikrondur. Her kırmızı kan hücresinde oksijen bağlama yeteneğindeki bir proteinli boya (pigment) olan hemoglobin bulunur. Oksijenle dolu olan hemoglobine oksihemoglobin denir. Bu, kana parlak kırmızı rengini verir. Dokulara oksijen getirdikten sonra bir miktar karbondioksiti alarak akciğerlere getirir. Buna da karbaminohemoglobin denir. [1]

Akyuvarlar (Lökosit): Alyuvarlardan ayrı olarak tam hücre özelliği gösterirler. Bir çekirdekleri ve diğer hücre organelleri vardır. 10-20 mikron çaplarıyla da alyuvarlardan daha büyüktür. Bir milimetreküp kanda yaklaşık 7000 kadar akyuvar bulunur. Akyuvarlar; granülositler, lenfositler ve monositler olarak ayrılır. Akyuvarların % 40-75'ini granülositler, % 20-45'ini lenfositler, % 2-10'unu ise monositler teşkil eder. Granülositler de aralarında nötrofil, bazofil ve eozinofil olmak üzere üç çeşide ayrılırlar. Bunların büyük çoğunluğunu nötrofiller oluşturur. [1] [2]

Trombositler (Kan pulcukları): Çapları sadece 1-2 mikron olan kanın en küçük hücreleri olan trombositler, pıhtılaşmada önemli rol oynarlar. Kırmızı kemik iliğindeki dev hücrelerin (megakaryosit) parçalanmasıyla meydana gelen oval veya yuvarlak, renksiz ve çekirdeksiz parçacıklardır. Her milimetreküp kanda yaklaşık 150-400 bin trombosit bulunur. Damar yaralanmalarında, damarın iç yüzüne yapışarak tıkarlar. Salgıladıkları trombokinaz enzimiyle pıhtılaşmada rol oynarlar. Pıhtı meydana geldiğinde kasılarak yaranın ağzını buserler ve kanamayı durdururlar. Trombositlerin pıhtılaşmadaki çok önemli görevlerinin dışında serotonin, adrenalin, noradrenalin ve histamin maddelerini taşıma görevleri de vardır. [1] [2]

2.2 Kanamanın Durması ve Kan Pıhtılaşma Mekanizması

Bir damar yaralandığı zaman bazı mekanizmalar sırasıyla işlerlik kazanarak kanama durdurulur. Kanamanın durması hemostaz, kanın pıhtılaşması koagulyasyondur. Hemostaz mekanizmaları;

Vazokonstriksiyon veya vazospazm: Damar büzülmesi, damar yaralanmalarından sonra kanamayı durdurmak ve azaltmak için devreye giren ilk mekanizmadır. Serotonin salgılanması ile hasarlı damar büzülür.

Trombosit tıkaçının oluşması: Trombositler yaralanmış damar yapısı ile karşılaşınca yapıları değişime uğrar, yüzeylerinde ışınal çıkıntılar oluşur, ADP salgılanır ve tromboxan A2 oluşur. Diğer trombositlerin aktivasyonu gerçekleşir ve trombositler birbirine yapışır. Bunun sonucunda yaralı damar bölgesinde bir araya

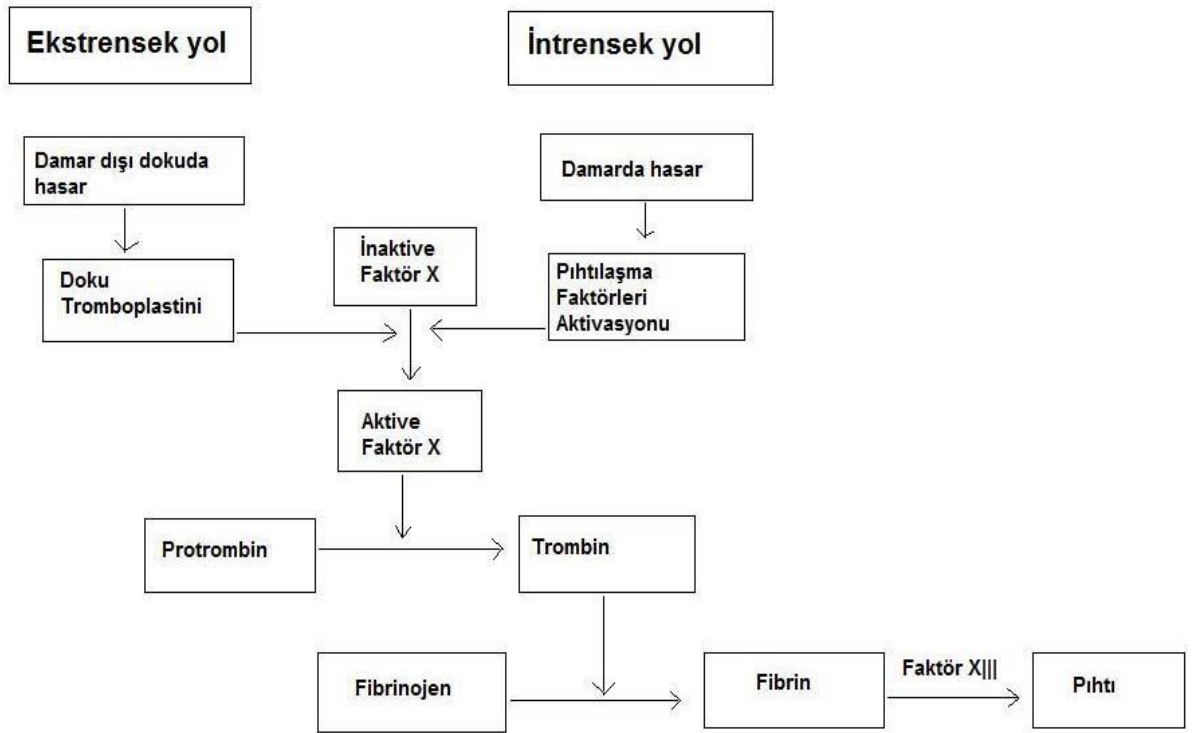
toplanarak bir tıkaç oluştururlar ve damar duvarındaki deliği kan akımını engellemeden tıkarlar. [2]

Kanamamanın durması için önemli olan üçüncü mekanizma pıhtı oluşması yani koagulasyondur.

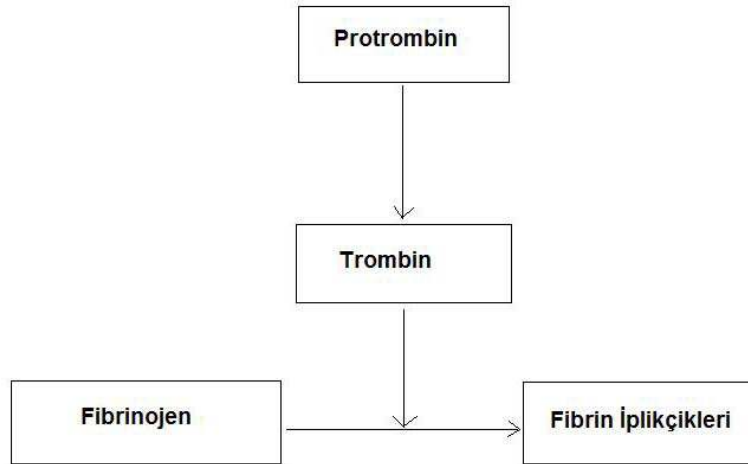
a. Protrombin aktivatörünün oluşması. Protrombin aktivatörü ekstrensek ve intrinsek yollarla oluşur. Ekstrensek yol; Damar duvarı ve çevresindeki dokuların travmaya uğramasıyla başlar. İntrinsek yol; kanın içindeki yapıların uyarılmasıyla başlar (Şekil 2.1) . Bu yolların her ikisinde de kan pıhtılaşma faktörleri adı verilen ve birden onüç kadar roma rakamları ile gösterilen protein yapısındaki maddeler görev alır. (Çizelge 2.1) [3]

b. Oluşan protrombin aktivatörünün Ca^{+2} iyonlarının beraberliğinde protrombinden (plazmada bulunan bir protein molekülü) trombin oluşturması

c. Trombinin fibrinojene etki ederek fibrin ipliklerini oluşturması. Fibrin iplikleri kan hücrelerini ve plazmayı içine alarak bir kitle oluşturur, buna pıhtı adı verilmektedir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.1 Protrombin aktivatörünün oluşması [4]



Şekil 2.2 Pıhtılaşma mekanizması [3]

Çizelge 2.1 Kanda bulunan pıhtılaşma faktörleri [3]

Pıhtılaşma Faktörleri	İsimleri
Faktör I	Fibrinojen
Faktör II	Protrombin
Faktör III	Doku faktörü(Doku tromboplastini)
Faktör IV	Kalsiyum
Faktör V	Proakselerin (labil faktör)
Faktör VII	Serum protrombin konversiyon akseleratörü
Faktör VIII	Antihemofilik faktör A
Faktör IX	Plazma tromboplastin komponenti (Christmas faktör.Antihemofilik faktör B)
Faktör X	Stuart-Prower faktör
Faktör XI	Plazma tromboplastin (Antihemofilik faktör C)
Faktör XII	Hageman faktör
Faktör XIII	Fibrin stabilize edici faktör
Prekallikrein	Fletcher faktör
HMWK	Yüksek molekül ağırlıklıkininogen (fitzgerald faktör)

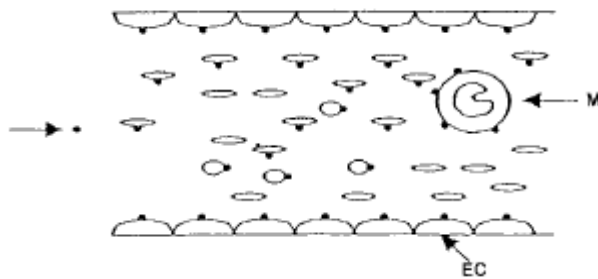
2.3 Heparin

Formülü $C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$ olan heparinin, molekül ağırlığı 3000 Da'dan 30000 Da kadar ortalama molekül ağırlığı 15000 Da'dır (yaklaşık 45 monosakkarit zinciri). [3] [5]

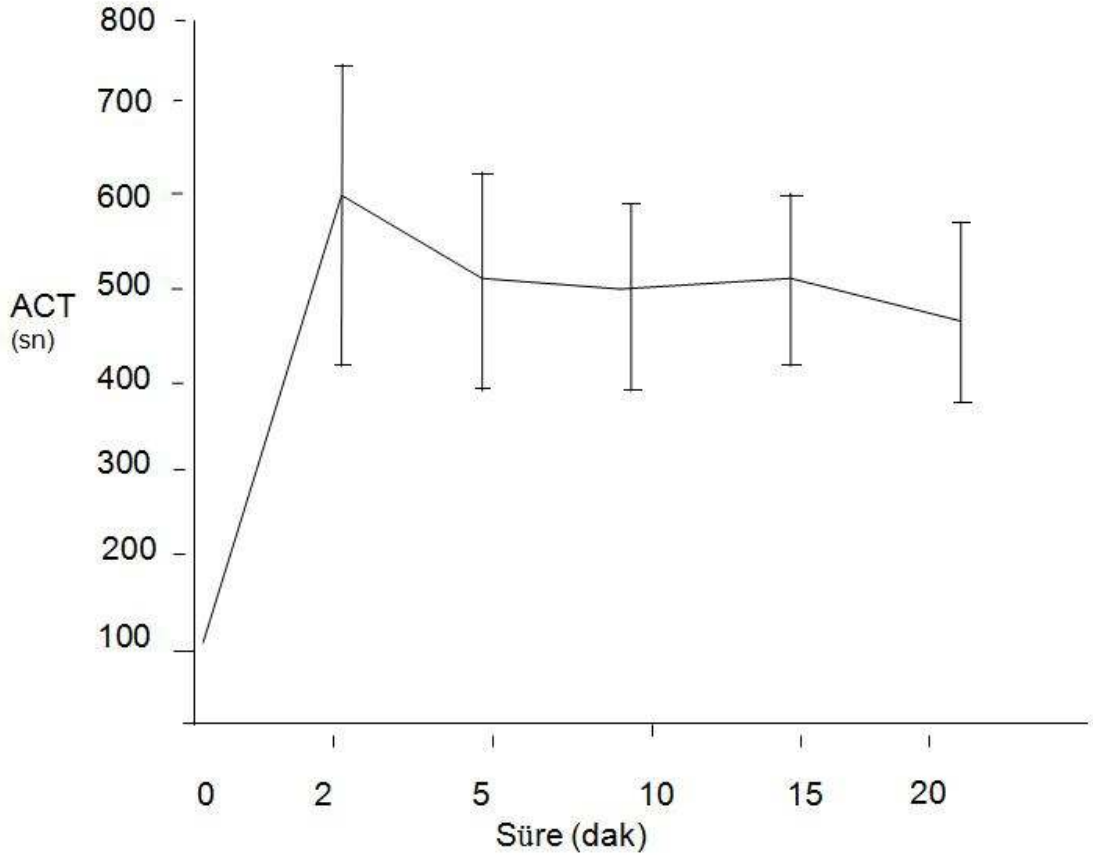
Spesifik olarak pıhtılaşma faktörleri IX ve XI'i bağlayarak ve antitrombin III ile etkileşip bunun trombini inaktive etme yeteneğini artırarak kanın pıhtılaşmasını önler. 200 ve 400 U/kg doz heparinin yarılanma süresi sırasıyla 1.6 ve 2.5 saattir. [6]

1 ml kan için 75 IU heparin gerekir. 100 IU heparin, 1 mg heparine eşdeğerdir. Piyasada ml.sinde 100, 1000, 10000 IU heparin içeren preparatlar vardır [3] [4]. Heparin, intravenöz (IV, damar içi) ve subkütan (SC, deri altı) yolla verilir. SC yolla verilme seçilirse, verilecek olan ilk doz biyoyararlanımının düşüklüğünün üstesinden gelmek için yeterli miktarda olmalıdır.

Kan dolaşımına girdikten sonra heparin, bir miktar plazma proteinlerine bağlanır, bu antikoagülan aktivitesini düşük konsantrasyonlarda düşürür,



Şekil 2.3 Heparinin kan dolaşımına girmesi. Heparin (.) dolaşıma girer, heparin bağlanan proteinlere (○), endotel hücrelerine (EC), makrofajlara (M), ve AT-III'e (antitrombin III- o) bağlanır. Sadece yüksek afiniteli pentasakkaritli heparin AT-III'e bağlanır. [7]



Şekil 2.4 ACT'nin Heparin verildikten sonraki değişim. ACT (aktifleşmiş pıhtılaşma zamanı), sağ atriya kilogram başına 300 U heparin enjekte edildikten sonra beş farklı aralıkta, radial arter kan örneğinden ölçülür. Çoğu hastada ACT'nin hızlı artışı iki dakika içinde meydana gelir. [3]

2.4 Protamin

Protamin; alabalık sperminden elde edilmiş bir polikasyonik proteindir. Heparin nötralizasyonunda kullanılır. Protaminin iki aktif tarafı vardır, biri heparini nötralize eder, diğeri heparinden bağımsız olarak hafif bir antikoagülan etki uygular. [3]

Moleküler ağırlığı 4000 kDa'dır. Heparin ve protamin arasındaki etkileşim, elektrostatik etkileşimdir. Negatif yüklü heparin, pozitif yüklü protamine bağlanır [8]. KPB'da 100 U heparin için 1mg protamin verilmelidir. Ek doz: ACT >150 sn ise 0.5-1 mg/kg olmalıdır. [3] [9]

2.5 Kardiyopulmoner Bypass'ta Heparin ve Protamin

Günümüzde kalp hastalıklarının büyük bir kısmının cerrahi tedavisi, kardiyopulmoner bypass (KPB) tekniği uygulanarak gerçekleştirilmektedir. Bu ameliyatlarda hastaların, kalp ve solunum fonksiyonlarının geçici olarak yerine getiren, Kalp akciğer makinası (KAM) sayesinde yapılabilmektedir. KAM uygulanan hastaların hepsinde, klinik olarak bulgu vermese de, hücresel ve moleküler düzeyde morbiditeye neden olmaktadır. [10]

Antikoagülasyon, açık kalp cerrahisi açısından son derece önemlidir. Heparinin keşfi ve klinik uygulamaya girmesi kardiyopulmoner bypass teknolojisini uygulanabilir hale getirerek modern kalp cerrahisinin başlamasını sağlamıştır. Böylece yabancı yüzeyle temas eder kanda pıhtı oluşması önlenmiştir. Heparin, etkileri kontrol edilmesi gereken antikoagülan bir ajandır ve cerrahi işlem bittiğinde bu antikoagülan etkinin nötralize edilmesi gerekmektedir.

Heparin dozunun ve antikoagülan etkinliğinin ayarlanması kişiden kişiye büyük farklılıklar gösterebildiğinden genelde problem olmuştur. Zira heparinin birçok pıhtılaşma faktörleri, plazma proteinleri, plateletler ile etkileşmesi, kardiyopulmoner bypassın ve ısı değişikliklerinin de bu sistemler üzerine etkilerinden olayı henüz tam olarak açıklanamayan noktalar bulunmaktadır.

Heparin etkilerini nötralize etmede kullanılan, protamin uygulamasının beraberinde getirdiği birçok riski vardır ve açık kalp cerrahisinin en tehlikeli devresi olarak protamin uygulaması görülmektedir. Ayrıca yüksek protamin dozunun da antikoagülan etkisi vardır. Bu nedenle son yıllarda uygulanan protamin dozlarını azaltmaya yönelik çalışmalar süratle devam etmektedir. [11]

Heparinin nötralizasyonunda, 1 mg heparin için 1-1.5 mg protaminin verilmesi önerilmektedir. Svenarud ve ark, 1 mg heparin için 0.75 mg protamin verilmesinin avantajlı olmadığı postoperatif dönemde kanama eğiliminin ve kan kullanımının arttığını belirtmektedir. Heparinin 1 mg'ı için tek doz 1.3 mg protaminin bolus

verilmesinin yeterli nötralizasyon sağladığı ve bu uygulamanın emniyetli olduğu ifade edilmektedir. Miyashita ve ark, düşük (1.6 mg/kg) ve yüksek dozlarda (3.56 mg/kg) protamin nötralizasyonu yapılan olguları karşılaştırmışlar ve yüksek dozda protamin verilenlerde protamin öncesi değerlere göre platelet sayılarında %69 azalma, plazma platelet faktör 4 seviyelerinde ise yaklaşık 2 katlık artış olduğu gözlemiştir. Turan Ege ve ark, KPB sonrası heparin etkilerini nötralize etmek için yeterli miktar olarak kabul edilen 1.3 mg protamin vermişlerdir. Svenarud ve ark, protaminin bolus verilmesinin güvenli olduğunu belirtmelerine rağmen Turan Ege ve ark kendi çalışmalarında toplam protamin miktarını 15 dakikada infüzyon olarak vermişlerdir. [12] [13] [14]

Hastanın anestezi hazırlığı tamamlandığında, başlangıç ACT değeri ölçülür. Heparin, hasta kanüle edilmeden en az 10 dakika önce 4 mg/kg dozunda IV olarak yapılır. 5 dakika sonra ACT kontrol edilir. Yeterli antikoagülasyondan emin olmak için ACT'nin 480 sn ve üzerinde tutulması gerekir. ACT' nin yükselmediği durumlarda antitrombin III eksikliği veya heparin rezistansı akla gelmelidir. Bu durumda, Antitrombin III konsantresi kullanılabilir. Heparin dozunun 2 veya 3 kez tekrar edilmesi gerekebilir. Kardiyopulmoner bypass başlatıldıktan 10 dakika sonra ve sonrasında saatlik olarak ACT tekrar edilir. Yeterli ACT düzeyi sağlanacak şekilde ilave heparin yapılabilir. Kısa süreli KPB sürelerinde ACT, hasta ısıtılırken tekrar kontrol edilir. KPB' dan çıktıktan sonra, hastanın hemodinamisinin stabil, yapılan tamirin yeterli ve KPB desteğinde onarılmayı gerektiren bir kanamanın bulunmadığından emin olunduktan sonra, hastaya IV yolla yavaş olarak protamin verilir. Protamin dozu, 1 mg heparin için, 1 mg protamin olacak şekildedir. Çocuklarda protamin dozu, heparin dozunun 1.5 katı kadar olabilir. Sonrasında tekrar ACT bakılarak heparin nötralizasyonunun yeterli olup olmadığı değerlendirilir. [15]

Heparin kaplı sistemler sayesinde düşük doz sistemik heparinizasyon kullanarak, KPB'in eritrositler üzerindeki olumsuz etkilerini azaltılabileceği, ameliyat sonrası mortalite ve morbidite (hastalığa yakalananların sayısı) oranını düşüreceği yönünde yeni bilgiler elde edilmektedir. [10]

Tüm heparin kaplı materyalde kanın etkileştiği tüm yüzeyler immobilize heparin ile kaplanmıştır. Heparin kaplı sistem ile düşük doz heparin kullanımı pulmoner fonksiyonel parametreler üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkiler meydana getirmiştir. Heparin kaplı sistemlerde daha az heparin kullanımı sonucunda daha az heparin protamin kompleksinin oluşmasının teorik olarak domuz modeli çalışmalarla pulmoner disfonksiyonu azalttığı saptanmıştır. [16]

Heparin veya protamin dozaj kontrol tekniği aşağıdaki gibidir:

- a. ACT kontrolü yapılır (Heparinsiz vs.). Diğer sorunlar hariç tutularak ACT normali (90-120 saniye) olmalıdır. A noktası olarak işaretlenir.
- b. ACT kontrolünü yaklaşık 15 mg/kg seviyesinde ikiye katlayacağı tahmin edilen heparin dozajı uygulanır. ACT'yi kontrol edilir. B noktası olarak işaretlenir.
- c. ACT'yi istenen seviyede tutacak ilave heparin miktarı (mesela, KPB için 450-500'de) uygulanır. Bu, grafikte A-B hattının açısından, mesela toplam 4 mg/kg için, tahmin edilir. Böylece 2.5 mg/kg'a daha ihtiyaç vardır. Bir başka ACT, C noktası olarak işaretlenir.
- d. Şimdi elde doz-cevap eğrisinde 3 nokta vardır. Bu eğri ile, bu hasta bu sıcaklıkta kabaca izlenir.
- e. Daha yüksek ACT'yi sağlamak için hedef, A-B-C hattından çıkarılır. Bu hedefi gerçekleştirmek için istenen heparin miktarı mg/kg cinsinden heparin skalasından okunur.
- f. Daha az ACT gerçekleştirmek için ya süre heparin azaltmasını sağlayacak ya da protamin kullanılacaktır. Eğer C noktasında ACT'nin 200 saniyeye düşürülmesi arzu edilirse bu nokta yaklaşık 1.5 mg/kg protamin etkisinde olacak veya $5.2 - 1.5 = 3.7$ mg/kg protamin verilecektir.

g. Böylece iki nokta arasında hareketi sağlayan heparin veya protamin dozaj farkı ile hastanın doza reaksiyonu aşağı veya yukarı çekilebilir. [17] [Bakınız EK-1 Heparin veya protamin dozaj kontrol tekniği]

2.6 Pıhtılaşma Zamanı Ölçüm Metodları

Aktive edilmiş (aktifleşmiş) pıhtılaşma zamanını (ACT) belirlemede manuel ve otomatik metodlar kullanılır. Manuel metodlar arasında; Lee-White ve Lam methodu vardır. Otomatik metodlarda da ACT ölçümü için özel olarak geliştirilmiş cihazlar kullanılır. Bunlarda Hemochron ve HemoTec ACT cihazlarıdır.

2.6.1 Lee-White metodu

Üç adet test tübü 1, 2, 3 olarak numaralandırılır. Bu tüplere hastadan alınan kan eşit hacimde dağıtılır. Manuel olarak tüpler sırayla eğilir. Her birinde pıhtılaşma gözlenene kadar eğme işlemi devam eder. Bu yöntem ucuzdur fakat işlemin uzun sürme ihtimali vardır. Bazı hastalarda bu süre 30 dakikayı aşmaktadır. [3] [4]

Lee-White metoduna benzer bir metoddaki daha önce damar delici ile 1mL veya daha çok kanı çekerek çıkarmayı ve müteakiben turnikeyi çıkarıp kanın 37 °C sıcaklığa ısıtılmış tübe tahliye edilmesine müsaade edilir. Zaman ölçer kan tüpte görüldüğünde çalıştırılır. Sonra karıştırmak için bir kaç kez ters çevrilir ve 37 °C'de su banyosuna veya ısı tuğlası içine yerleştirilir. 1 dakika ve 5 saniye aralıklardan sonra tüp banyodan çıkarılır ve eğilir ve ilk açık pıhtı görüldüğünde zaman ölçer durdurulur. Bir başka yöntemde ise, damar içi kateterden 2 ml kan çekilir, 30 saniye boyunca saniyede bir kez ters çevrilir ve 40 watt'lık lamba ile (sıcaklık belirlenmemiş) ısıtılmış ısı bloğu içine yerleştirilir. Burada kan tübe ilk girdiğinde çalışan ve pıhtı olduğunda duran saat kullanılır. [3]

2.6.2 Lam metodu

-Parmak ucu alkol veya alkol-eter karışımıyla temizlenir.

-Temizlenen yerde lanset ile 4 mm derinliğinde bir delme yapılır ve hemen kronometre çalıştırılır.

- Delme yerinden akan kandan 1-2 damla bir lam üzerine alınır.
- Bundan sonra kan içinde fibrin oluşup oluşmadığı, kan belli aralıklarla lanset ile yoklanarak araştırılır.
- Lansetin ucuna fibrin lifleri takıldığı an kronometre durdurulur ve okunur.
- Kronometrede okunan zaman değeri pıhtılaşma zamanı olarak belirlenir. Bu, normalde 3-7 dakika kadardır. [4]

2.6.3 Otomatik Metodlar

ACT'nin normal aralığı ve heparine yanıtı kullanılan teçhizata ve seçilen ajanlara bağlıdır. ACT'nin en yaygın tipleri manuel ACT, Hemochron ACT ve HemoTec ACT'dir.

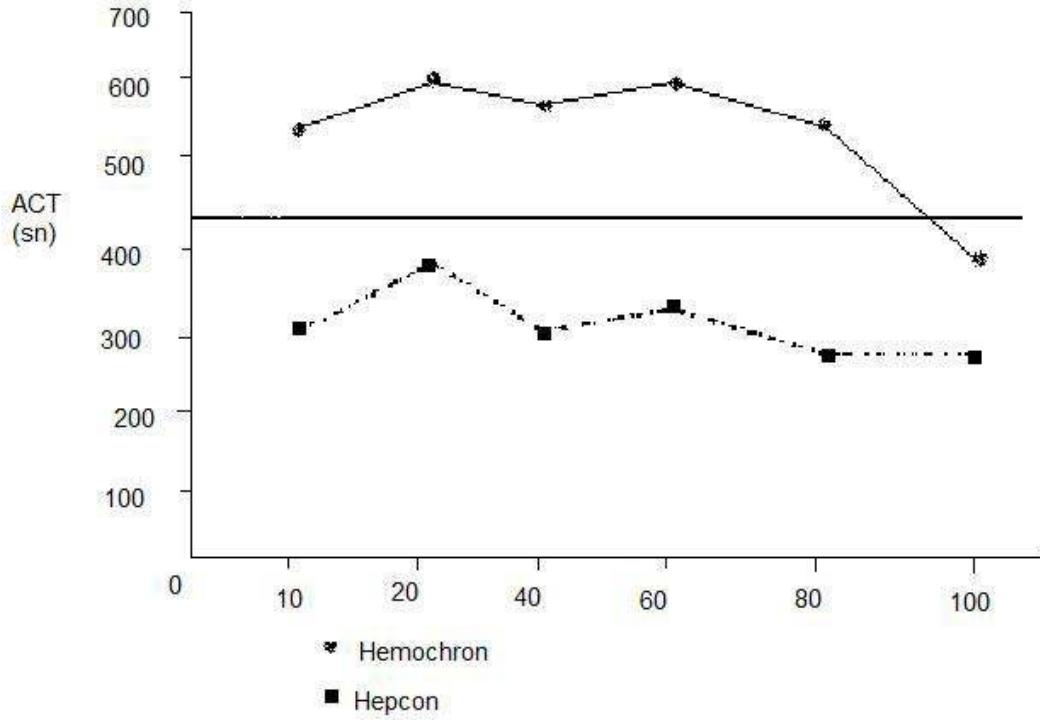
Manuel ACT tekniklerinin yerini otomatik ACT teknikleri aldı. Çünkü, otomatik teknikler daha az eğitim gerektirir ve operatörü, özellikle heparinle pıhtılaşma süresi uzun sürdüğünde daha az meşgul eder.

Uluslararası Technidyne Hemochon ACT, 2 ml kan kullanır. Zaman ölçer kan örneği bir magnet ve plastik tampon içeren test tüpü içine yerleştirildiğinde çalışmaya başlar. Kuvvetlice elle karıştırıldıktan sonra test tüpü bir ısı bloğu içine eğik olarak yerleştirilir ve sürekli döndürülür. Katı pıhtı oluşumu magnete bağlanır ve dönme devam ederken test tüpünden en bağlı parçasının kopmasına sebep olur. Bu manyetik alanın kesilmesine neden olur ve zaman ölçer otomatik olarak durur. Hemochron ACT sapma katsayısı $[(\text{standard sapma}/\text{ortalama}) \times 100]$ kontrollü ortamda %4'dür. CPB için kullanılan kan heparin varlığı durumunda % 8'e ulaşır. [3]

HemoTec ACT, iki plastik kartuşun her biri içine enjekte edilmiş 0.4 ml kanın tamamını kullanır, bilahare ısı bloğu içine yerleştirilir. Her bir kartuş, test başladığında mekanik kaldırma aparatıyla birleştirilmiş bir piston içerir. Pistonun ilk hareketinde ve pistonun sürekli yükselmesi ve düşmesinde kanın tamamı kaolin aktivatör ile karışır. Pıhtı oluşumu, pistonun aktif yükselişinden sonra kendiliğinden düşüşünü geciktirene kadar her numune yumuşakça karıştırır. Pistonun

düşüşünün foto-optik olarak tespit edilen bitişi ACT oluşturmak üzere zaman saatini durdurur. [3]

Çocuklardaki ACT tepkisinde çeşitlilik; yetişkinlerinkine göre büyüktür ve Şekil 2.5'te görüldüğü gibi test mekanizmasına ve kullanılan aktivatöre büyük oranda bağlıdır.



Şekil 2.5 22 pediyatrik (çocuk) hastanın bypass ameliyatı esnasında 6 zaman noktasında Hemochron ve HemoTec (Hepcon) ACT değerleri. 5 noktada Hemochron ACT değerleri HemoTec ACT değerlerinden yüksektir. HemoTec ACT tüm zaman noktalarında 400 saniye eşik değerinin altındadır. [3]

2.7 Kalp Akciğer Makinesi

Kalp akciğer makinesinin birincil fonksiyonu kalbe gelen tüm venöz kanın kalp akciğer makinesi devresinde toplanarak sistemik arteriyel dolaşıma geri

verilmesidir. Bundan dolayı, gaz değişimi için akciğerin, dolaşıma gerekli enerjiyi sağlamak için de kalbin fonksiyonunu yerine getirebilmelidir.

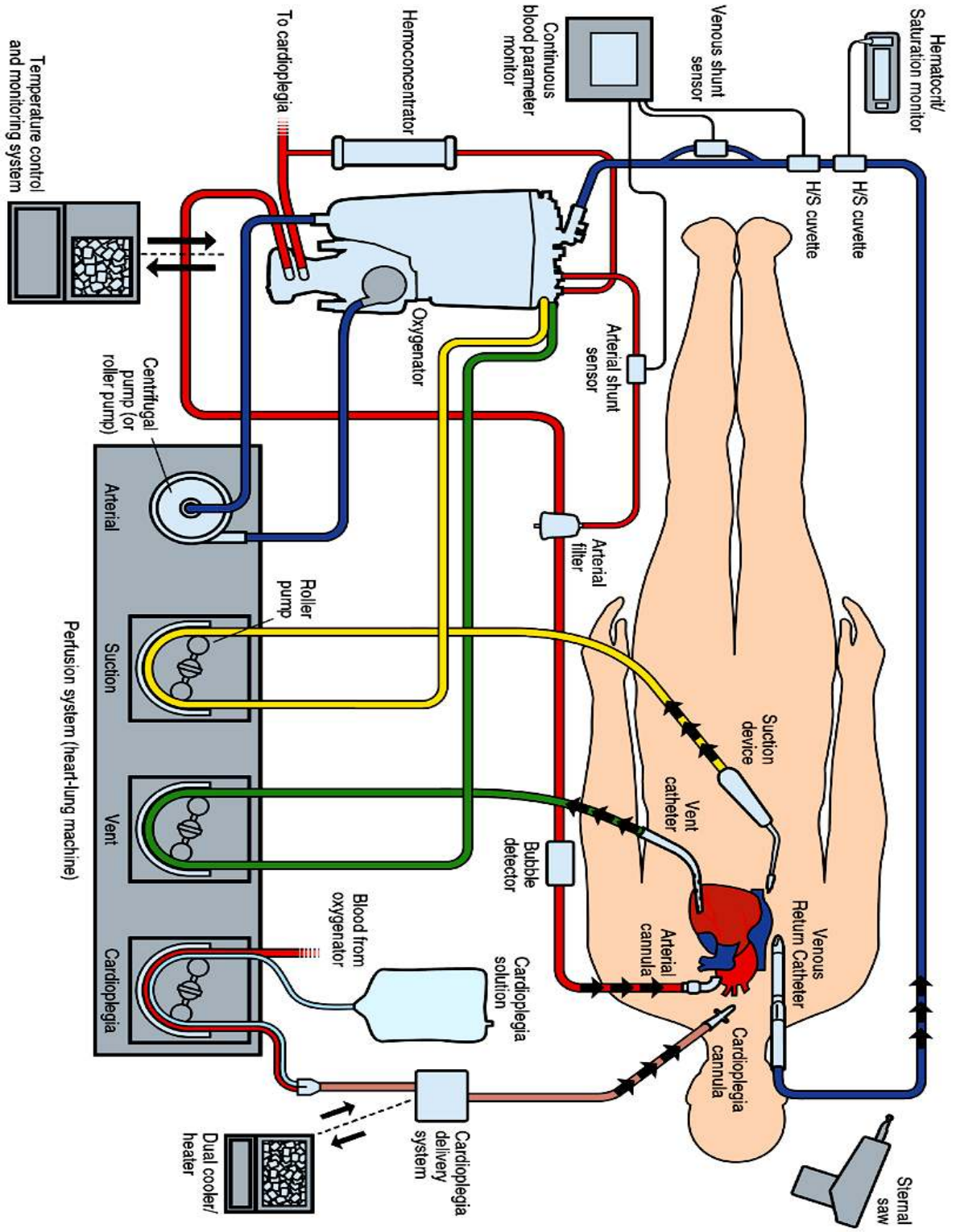
Kan, yerçekimi etkisiyle kalp akciğer makinesine drene olur. Burada yapay bir akciğer boyunca hareket eder (bubble veya membran oksijenatör) ve genellikle bir roller ya da sentrifüj pompa vasıtasıyla asandan aortaya yerleştirilmiş bir kanül yoluyla arteriyel sisteme pompalanarak geri döner.

Pompa; bubble oksijenatör kullanıldığında oksijenatörden sonra, membran oksijenatör kullanıldığında ise önce yer alır.

Kardiyopulmoner bypassta hasta kanının aktif olarak ısıtılması ve soğutulması yoluyla sistemik hipotermi elde etmek için ısı değiştiriciler gereklidir. Isı değiştirici bobinler oksijenatörden önce yerleştirilmiştir.

2.7.1 Kalp Akciğer Makinesinin Temel Bileşenleri

- Bir veya birden fazla venöz kanül, (kalpten veya büyük venlerden kanı toplayan),
- Emici sistem, (cerrahi sahadaki kanın aspire edilmesini ve kanın yeniden sisteme kazandırılmasını sağlayan)
- Venöz rezervuar, (venöz kanüllerden ve diğer emici sistemlerden gelen kanın toplandığı)
- Oksijenatör, (kanın oksijenlenmesini sağlayan)
- Isı değiştirici, (kanın soğutulup ısıtılmasını sağlayan)
- Pompa, (kalbin pompa görevini üstlenecek)
- Arteriyel hat filtresi ve (sisteme karışma olasılığı olan partiküllerin temizlendiği)
- Arteriyel kanüldür. (oksijenlenmiş ve filtre edilmiş kanı hastanın arteriyel sistemine ileten) [18] [19]



Şekil 2.6 Kalp Akciğer Makinesi ve Bileşenleri [20]

2.7.1.1 Venöz Kanüller

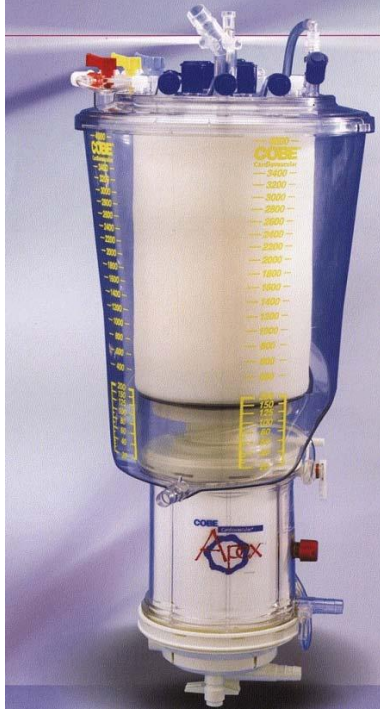
Venöz kanüller kanı hastadan ekstrakorporeal dolaşıma seviye farkı veya pompa oksijenatör sistemi ile direne ederler. Aort kapak ameliyatları, sol ventrikül çıkış yolu ameliyatları, çıkan aorta ameliyatları ve koroner baypas cerrahisi (CABG) prosedürlerinde tek kanül kullanılır. Sağ atriyum veya sağ ventrikül içinde çalışılacaksa iki kanül kullanılır. Perfüzyon esnasında santral venöz basınç (CVP) 15 mmHg'nın altında olmalı, ince duvarlı venler kollaps oluşturup akımı sınırlayabileceğinden negatif basınç oluşturulmamalıdır. [18]

2.7.1.2 Venöz Rezervuar

Bir çok ekstrakorporeal perfüzyon sisteminde, sistemik venöz kanın venöz rezervuara iletimi yer çekimi ile olur. Bu nedenle venöz rezervuar sistemik büyük venlerin bulunduğu düzlemden 25-30 inç daha aşağıda olmalıdır. Kan sisteme tekrar kazanılır ve kan kaybı önlenmiş olur. Genellikle hava embolisini önlemek için rezervuarda volümün belli bir seviye altına indiğinde veya arteriyel hat içinde hava saptandığında alarm veren sistemler vardır. [19]

2.7.1.3 Oksijenatörler

Oksijenatörler aynı akciğer gibi O₂ ve CO₂ değiş tokuşu yapılan ortamlardır. İlk yapılan oksijenatörlerde kanın oksijenlendirilmesi kanın ince bir tabaka halinde geniş bir yüzeye yayılması ve üstüne oksijen üflenmesiyle gerçekleşmekteydi. Bunların disk, silindir ve tel kafes şeklinde tipleri mevcuttu. Bubble ve membran oksijenatör olmak üzere iki tip oksijenatör vardır. [19]

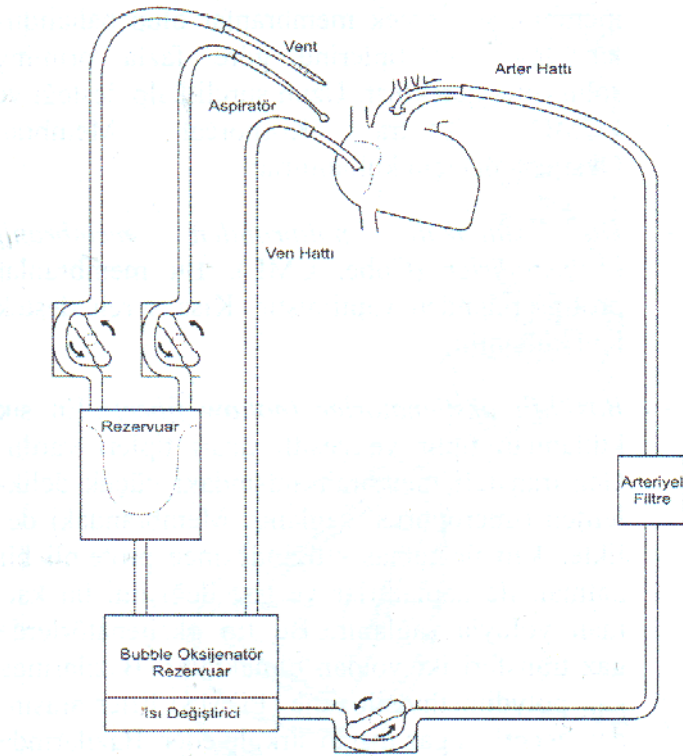


Şekil 2.7 Sorin Group COBE Cardiovascular Apex marka oksijenatör [21]

2.7.1.3.a Bubble Oksijenatörler

O₂ direkt olarak sistemik venöz kanla difüzyon sahasında karşılaşır. Difüzyon sahasında kanın içinde binlerce küçük oksijen bubble'ı oluşur.

Gaz değişimi her bir bubble etrafında oluşan ince film tabakasında olur. CO₂ bubble içine difüze olur, O₂ ise kana geçer. Karbondioksit plazmaya oksijenden 20 kez daha hızlı difüze olur. [3] Oluşturulan hava kabarcığının büyüklüğü 35 µm civarındadır. Kabarcık sayısının artması oksijenlenmeyi artırır. Gaz değişimi meydana gelen kabarcıklar, ana yapısı dimetilpolisiloxan olan kabarcık tutucudan arteriyel rezervuara gider. Kurulumları ve kullanılmaları kolay ve diğer oksijenatörlere göre ucuzdurlar. Kalp akciğer makinesi düzeneğinde pompadan önce yer alırlar. [19]

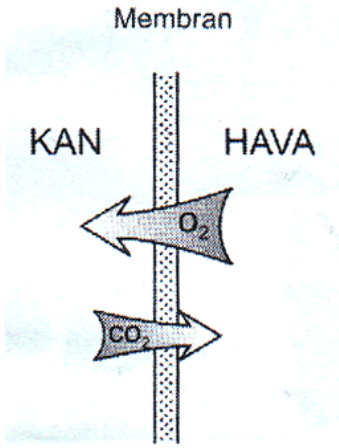


Şekil 2.8 Bubble oksijenatörün kalp akciğer makinesinde yeri [19]

2.7.1.3.b Membran Oksijenatörler

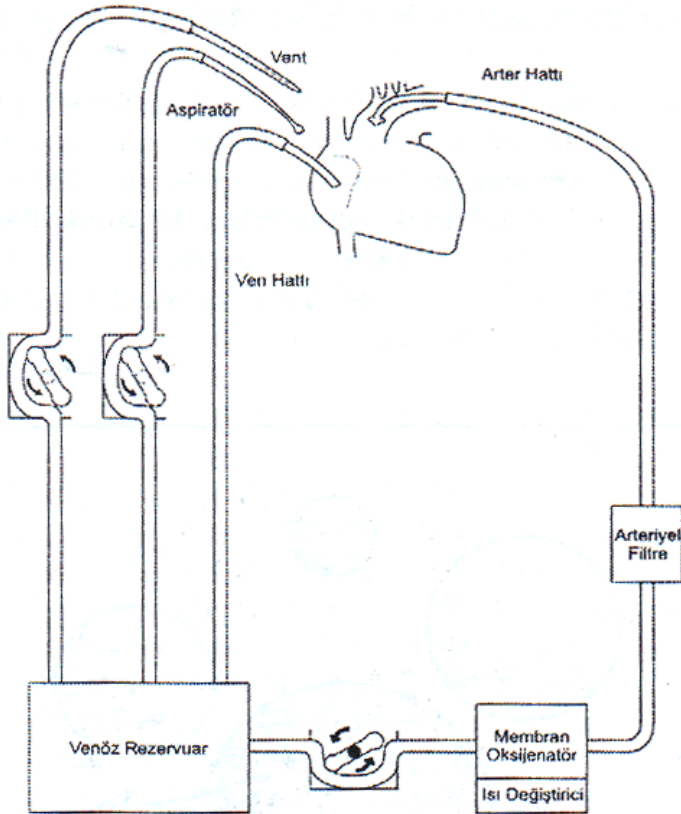
Kan ve gaz ince bir membranla ayrılmıştır. Gaz değişimi bu 2-5 m²'lik yapay tabakada olur. Gaz değişimi O₂ ve CO₂'in kandaki eriyebilirliğine, membranın geçirgenliğine ve her iki tarafındaki kısmi gaz basıncı farklılıklarına bağlıdır. Membranla temas eden kan tabakası mümkün olduğunca ince ve membranlar arası kısmi basınç farkı yüksek olmalıdır. İnsan alveollerine en çok benzeyen tiptir. [19]

Yeni nesil oksijenatörler artırılmış CO₂ geçirgenliği sayesinde O₂ ve CO₂ transferi dengesini, gaz değişim verimliliğini geliştiren ve prime volüm (ilk hacmi) azaltan silikon tabanlı zarlardır. Silikon veya mikroporlu polipropilen membran vasıtasıyla kan ile gazın bölümleri ayrılır. [22]



Şekil 2.9 Membran oksijenatörde gaz alışverişi [19]

Membran oksijenatörler, kanın membrandan geçirilmesi belirli bir direnç yarattığından ve basınç gerektiğinden kalp akciğer makinesinde pompadan sonra yer alırlar. [19]



Şekil 2.10 Membran oksijenörün kalp akciğer makinesinde yeri [19]

2.7.1.4 Pompa

Venöz sistemden gelen kanı arteriyel sisteme ileten kalbin görevini geçici olarak üstlenen yapılardır. Santrifüj ve roller olmak üzere iki tip pompa ve yeni nesil peristaltik pompalar vardır.

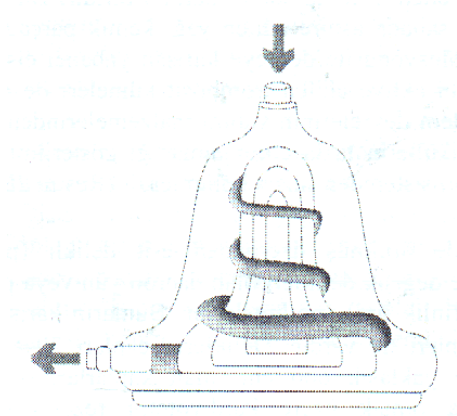
2.7.1.4.a Roller Pompalar

DeBakey tarafından geliştirilmiştir. Elektrik motoru ile dönen bir merkez ve buna bağlı genellikle iki veya daha fazla dönen bir kol vardır. Bu kollar kan taşıyan hattı döndükleri yöne doğru sıkıştırarak bir yöne doğru akım oluşturur. Roller pompaların oluşturacağı kan hacmi tüpün çapına ve dönme hızına bağlıdır. [19]

Roller 180 mmHg basınca kadar kanı hattan atabilir. Böylece devamlı akım sağlanır. Çıkış hattında direnç olmadıkça ileri doğru olan akım etkilenmez. Roller pompa hastaya destek vermek için düzenli akış sağlamak, kardiyopleji idaresi ile delikler için emme, saha emmesi (kardiyotomi) ve artırılmış toplardamar drenajı için kullanılır. Roller pompa güvenli, ucuz ve kullanımı kolaydır. [4] [18]

2.7.1.4.b Santrifüj Pompalar

Santrifüj pompalar koni şeklindedir, bir çark ve manyetik bir tabakadan oluşur. Bu çark kanı yüksek hızla çevirir ve yarattığı merkezkaç etkisiyle içerisinden geçen kan, konik yapının ucuna doğru ilerler. Bu yapıdaki pompalarda kan elemanları hasarı az düzeydedir ve daha az antikoagülasyon gerektirir. [18] [19]



Şekil 2.11 Santrifüj Pompa [19]

Santrifüj pompaların roller pompalara iki temel üstünlüğü vardır:

- a.Santrifüj pompalarda geçici obstrüksiyon olsa bile yüksek geri basınç oluşmaz.
- b.Santrifüj pompalarda tüp kompresyonu olsa bile geniş gaz embolileri oluşmaz.

[18]

2.7.1.4.c Peristaltik Pompalar

Ana yapısını oluşturan odacık 3 bölümden oluşur. Başlangıç, tıkayıcı ve dolucu segmentlerdir. Dolucu segmentler venöz rezervuarın yarattığı hidrostatik basınç ile dolar. İleri akım rezervuardaki kan seviyesine bağlıdır. Rezervuar belli bir seviyenin altına inerse tıkayıcı segment kollapsa uğrar ve akımı keserek hava embolisine engel olur. [19]

2.7.1.5 Isı Değiştirici

Kardiyopulmoner bypass esnasında vücut ısısının kontrolü için ısı değiştirici gereklidir. Kanın soğutulması ve tekrar ısıtılması için oksijeneratörlerde kullanılan ısı değiştiriciler kanın bölgesel olarak aşırı ısınmasını önleyerek, istenen ısı değişimini sağlayabilen, biyolojik olarak inert yüzey oluşturacak şekilde yapılır. Genellikle ısı değiştiricilerin içine ve dışına doğru enerjinin transferi, perfüzyon aparatının bir parçası olan bir ısıtma ve soğutma birimi boyunca dolaşan steril olmayan su ile sağlanır. Soğutma istendiğinde su bir buz banyosundan geçirilir. Isıtma istendiğinde ise elektrik dirençli ısıtıcılarla ısıtılır. Isı transfer sıvısı olarak su basit bir ısıtıcıdır ve güvenilirdir. Aynı zamanda ısı değiştirici yüzeylerde bölgesel ısı noktalar oluşturmaz. [3]

Isı değiştiricinin içinde 1 °C ile 42 °C arasında su dolaşır. Kan 42 °C'nin üzerinde ısıtılırsa kan proteinleri hasar görür. Soğuma ile her 10 °C'de metabolizma %50 yavaşlar.[18] [19] [23]

Yetişkinde soğuma esnasında ısı dakikada 0.7-1.5 °C azalır. Isınma esnasında ise dakikada 0.2-0.5 °C artar. Arter ile ven arasındaki ısı farkı erişkinlerde 12 °C;

pediatrik hastalarda 8 °C'yi aşarsa proteinler denatüre olur, proteinlerin sıvı absorblaması ile hemoliz artar. [19]

2.7.1.6 Filtreler

Hava ve partikül embolileri en önemli komplikasyondan biridir. Cerrahi sahadan aspire edilen yağ, kemik parçacıkları veya prime solüsyon ile devreye karışan yabancı cisimler olabilir. Eşit delikli veya değişik delikleri olan dacron yün veya poliüretandan yapılmışlardır. Deliklerin çapları 20-40 µm'dir ve yaklaşık 600-800 cm² alan kaplarlar. Arteriyel hatta olmak üzere kardiyotomi rezervuarında, oksijenatör ve kardiyopleji hattına konulur. Arteriyel hatta bulunan filtrelerde havayı rezervuara gönderen ayrı bir hat bulunur. Bypass öncesi kullanılan, devrelerden kaynaklanabilen parçacıklar için 5 µm'lik çaplı olanları da vardır. Fakat bu filtrelerde prime olarak kan kullanılamaz ve albümin ilavesi yapılamaz. Gaz tipi filtrelerde ise çap 0.2 µ kadardır. Tüm filtreler ilk doluşlarında yaklaşık 200 cc kadar prime gerektirir. [19]

2.7.1.7 Emici sistemler

Kanamaların toplanmasında ve sisteme dahil edilmesinde kullanılırlar. Hemolize, partikül embolisine, yağ ve gaz mikroembolilerine yol açabilir. Ayrıca trombosit hasarına ve kaybına yol açan en önemli faktördür. Roller pompa aspiratörlerinde, pompa ile rezervuar arasında devamlı olarak kan bulunması hücresel travmanın fazla olmasına neden olmaktadır. [19]

2.7.1.8 Vent Sistemleri

Kalp içine yerleştirilen ve kalbin basıncını azaltmaya yarayan sistemlerdir. Ventler ventrikül ve aortada biriken havanın çıkarılmasında da fonksiyon görürler. [19]

2.7.1.9 Arter Kanülü

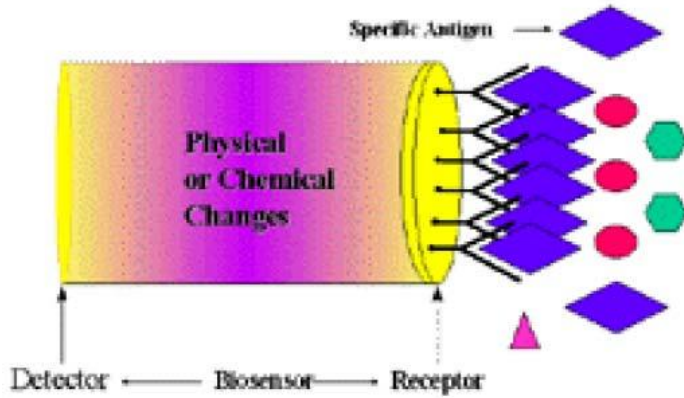
Kardiyopulmoner bypass sırasında organ perfüzyonu için gerekli oksijenlenmiş kan aort kanülü ile verilir. Kanüle giriş ve çıkış noktalarındaki basınç farkı fazla ise

oluşan jet akım nedeniyle hemoliz ve arterde iç hasar oluşabilir. Kabul edilebilir basınç gradyenti en çok 100 mmHg'dır. [19]

2.8 Biyosensör

Sensörler fiziksel olguları elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Çalışma şekillerine göre ve dönüştürücü (transducer) adı verilen yapılarına göre çeşitlere ayrılmaktadır. Termal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler ve biyosensörler bunlardan bazılarıdır. Biyosensörler, biyolojik olarak aktif malzemelerin yüksek seçiciliğinde ve hassasiyetinde avantaj sağlayan kimyasal sensörlerdir. [24]

Bir biyosensör; reseptör ve dedektör olmak üzere iki bileşene sahiptir (Şekil 2.12). Reseptör; sensörün seçiciliğinden sorumludur. Enzimler, antibadiler, ve yağ tabakaları örneklerini içerir. Dedektör; çevirici görevi görür, analiti tanıyarak fiziksel veya kimyasal değişimi elektrik sinyaline çevirir. Örnek olarak pH elektrot, oksijen elektrodu, veya bir piezoelektrik kristal. [24]



Şekil 2.12 Biyosensörün şematik gösterimi [24]

2.9 Piezoelektrik Etki ve Piezoelektrik Kristaller

Piezoelektrik etki ilk kez 1880 yılında Jaques ve Pierre Curie tarafından keşfedilmiştir. Belli malzemelerin mekanik gerilim uygulandığında elektriksel

potansiyel farkı oluşturduğu etkidir. Bazı kristalimsi malzemeler kendilerine özgü kristal yapılarından dolayı piezoelektrik davranış gösterirler. [25]

Curie kardeşler sonraki yıllarda yaptıkları çalışmalarda, piezoelektrik kristalinin iki yüzeyi arasına uygulanan elektriksel gerilim farkının kristallerde boyut değiştirmeye, gerinime yol açtığını göstermişlerdir. Başka bir ifadeyle, “ters piezoelektrik etki” olarak bilinen bu etkiyi kullanarak, kristal yüzeyleri arasına uygulanan elektriksel gerilimin şiddetini değiştirerek piezoelektrik kristalin boyutlarını bununla orantılı olarak değiştirmek mümkün olmaktadır.

Kristallerde vibrasyon söz konusudur. Vibrasyon kristal içindeki atomların belli bir zaman içinde orijinal konumlarından deforme olmuş konuma geçmeleri, buradan yine orijinal konuma dönmeleri ve bunu izleyen devrede tersi yönde deforme konuma geçmeleri ve yine orijinal konuma dönmeleri şeklinde devam eden sürekli aynı şekilde tekrarlanan bir davranışı ifade etmektedir. Bu döngülerin birim zamanda tekrarlanma sayısı kristalin rezonans (temel) frekansı olarak tanımlanır. Piezoelektrik kristallerde pozitif ve negatif yüklü iyonlar vardır. Vibrasyon sonucu yük dağılımı değişir, başka bir ifadeyle polarizasyon oluşur. Dolayısıyla bu salınım frekansına karşı salınan elektrik alan oluşumu söz konusudur. Elektrik alan salınım frekansı rezonans frekansı ile aynıdır. [26]

Salınımdaki piezoelektrik kristalin rezonans frekansı ile kristal yüzeyine yapışan kütle arasındaki ilişkiyi tarif eden temel eşitlikler Sauerbrey, Stockridge ve Lostis tarafından türetildi. Herbiri farklı bir yol takip etti, fakat nihai eşitlikleri birbirine benzerdir. Sauerbrey eşitliği en yaygın kabul görendir.

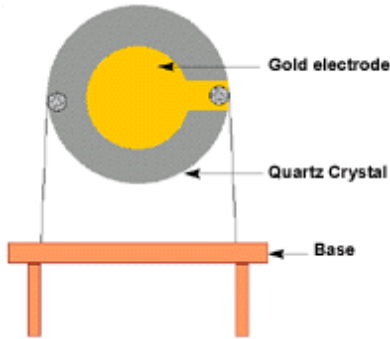
1959 yılında Sauerbrey, kalınlık kesme modunda (thickness shear mode) AT-kesimli kuartz kristallerin titreşimi için bir amprik eşitlik geliştirdi. Bu, kuartz kristal üzerinde oluşan ince metal film tabakası halindeki malzeme depoziti (birikimi) ile buna karşılık gelen kristalin rezonans frekansındaki değişimin ilişkisini tanımlar.

$$\Delta F = -2.3 \times 10^6 F^2 \frac{\Delta M}{A} \quad (2.1)$$

Burada;

ΔF = salınan kristalde frekans değışimi, Hz,
F= piezoelektrik kristalin rezonans frekansı, MHz
 ΔM = yüzeyde oluşan film tabakası kütlesi, g,
A = elektrod yüzey alanı, cm^2 . [24]

Piezoelektrik uygulamalarında kristal iki metal elektrod arasına sandviç edilmiştir. Elektrodların bu şekilde yerleştirilmesi salınan elektrik alanının kristal yüzeyine dik yönde olmasını sağlar. Oluşan elektrik alanı kristal yığın yapısında mekanik salınıma yol açar. Piezoelektrik uygulamalarında kullanılan kristaller 10-16 mm boyutlarında, yaklaşık 0.15 mm kalınlığında disk, kare veya dikdörtgen şeklindedir. Rezonans frekansları 5, 9 veya 10 MHz olan kuartz kristaller tercih edilir. Metal elektrodlar altın, gümüş, alüminyum veya nikel olabilir. Elektrod çapları 3-8 mm kalınlıkları ise 0.3-1.0 nm aralığındadır. Altın elektrodlar inert olmaları nedeniyle birçok uygulamada tercih edilmektedir. Gümüş elektrodların sulu ortamlarda uzun süreli kararlılığı düşüktür. [26]



Şekil 2.13 Kuartz kristal bileşenleri [24]

2.10 Kuartz Kristal Mikrobalans (QCM)

QCM çok hassas kütle sensörü olarak tanımlanabilir. QCM'nin temeli bir çift elektrod arasına sıkıştırılmış piezoelektrik AT-kesimli kuartz kristaldir. Elektrodlar bir osilatöre bağlandığında ve elektrodlar üzerine bir AC voltajı uygulandığında kuartz kristaller piezoelektrik etkisi sebebiyle rezonans frekansında salınıma başlar.

2.10.1 QCM Kullanım Alanları

QCM'in farklı alanlarda bir çok kullanımı söz konusudur. Bunlardan bazıları aşağıdakilerdir.

- Termal, e-beam, saçılma, magnetron, iyon ve lazer kalıntısı ince film kalınlığı izleme
- Elektrod yüzeylerinde yüzeylerarası işlemlerin elektrokimyası
- Biyoteknoloji
 - DNA ve RNA'nın tamamlayıcı dizilerle etkileşimi
 - İmmobilize edilmiş reseptörler tarafından protein ligandları özellikli tanımda
 - Bakteri, virüs, memeli hücresi tespitinde
 - Yüzeylerin biyoyumluluğunda
- İşlevsel hale getirilmiş yüzeylerde
 - Gaz sensörler
 - Lipit membranlar
 - Polimer kaplamalar
 - Reaktif yüzeyler
 - İmmunosensörlerde
- İnce film oluşumu
 - Kendiliğinden birleşen monotabakalar
 - Polielektrod yüzeye emme
 - Spin kaplama
 - Tek tabaka oluşumu
 - Yüzeye emilmiş tektabakalar
- İlaç araştırmasında
 - Polimer kaplamaların eritilmesinde
 - İlacın dağıtımında
 - İlaçların moleküler etkileşimde
- Sıvı kaplama ve parlatma [27]

2.11 İmmobilizasyon Yöntemleri

Piezoelektrik kristallerinin biyosensor olarak kullanılmaları için yüzeylerinin modifiye edilmesi, baska bir ifadeyle ortamda bulunan ölçülecek madde (anilat) ile spesifik olarak etkilesecek biyoaktif ajanın (ligand) kristal yüzeyine immobilize edilmesi gerekir. [26]

Biyolojik bileşenin dönüştürücüye (transducer) immobilizasyonla uygun bir şekilde tutturulması gerekmektedir. Genel olarak immobilizasyon için 5 metod vardır. Bunlar;

- I. Adsorpsiyon,
 - i. Fiziksel Adsorpsiyon
 - ii. Kimyasal Adsorpsiyon
- II. Mikroenkapsülasyon
- III. Tutuklama
- IV. Çapraz bağlama
- V. Kovalent bağlama'dır.

Adsorpsiyon: Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

Fiziksel adsorpsiyon; van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlar, hidrofobik kuvvetleri içerir. Fiziksel adsorpsiyon ile bağlanmış biyolojik bileşenlerin ölçümleri piezoelektrik kuartz kristal mikrobals (QCM) ile yapılır [28]. Kimyasal adsorpsiyon; daha kuvvetli ve kovalent bağların dizilişinden oluşur. Yüzeye tutunan biyomalzeme pH, sıcaklık, iyonik kuvvet ve substrattaki değişimlere maruz kalır ki bunlar biyolojik aktiviteyi azaltır. [29]

Mikroenkapsülasyon: Biyomalzeme inert zar tarafından hapsedilir. Genellikle kullanılan zarlar; selüloz asetat, polikarbonat, PTFE (polytetrafluoroethylene). Bu metod enzim ve çevirici arasında yakınlık içermez. Bu metod; yalnızca zara nüfuz edebilen küçük analitlerin tespitinde kullanılır. [29]

Tutuklama: Enzimin polimerik jele veya membran arkasına immobilizasyonu göreceli olarak kolay bir işlemdir. Enzim fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamıştır. Enzimlerin, hücrelerin ve organellerin ihtiva edilmesi için bazı polimerler vardır; polivinil alkol, polivinil klorid, polikarbonat, poliakrilamid ve selüloz asetatıdır. Jeldeki gözeneklerden biyoaktivitenin kaybedilmesi meydana gelebilecek sorunlardandır. [28] [29]

Çapraz bağlama: Desteğe kovalent bağlanmış adsorblanmış proteinlerin veya enzimlerin istikrarını artırmak için çok fonksiyonlu ajanları kullanır. Glutaraldehit biyosensör uygulamasında çapraz bağlama ajanları arasında en sık rastlanandır. Reaksiyonun kontrol zorluğu, büyük miktarda biyolojik malzeme gerekliliği ve protein-enzim tabakasının rijid (esnemez) olması dezavantajlarındandır. [28]

Kovalent bağlama: Biyomoleküller katı yüzeye tanımlı bağlar sayesinde immobilize olur. Biyomoleküle en az zarar veren metoddur. Bağlı proteinlerin düzenliliğini (uniformity), yoğunluğunu ve dağılımını geliştirmeye yarar. Enzimler ve proteinlerin immobilizasyonunda kullanılır. Mevcut reaktif gruplara bağlı olan ligantı immobilize etmek için birçok kovalent bağlayıcı kimyasallar vardır. Amin (NH_2), tiyol (SH_2) ve aldehit (COOH) bağlama kimyasalları iyi yerleştirilmiş prosedürlerdir. Avantajı; biyomolekül yüzeyde genellikle kuvvetli bir şekilde immobilize olur ve bu yüzden kullanım süresince yüzeyden istenmeden ayrılmaz. Bu da biyomoleküllerin dağılımını belirlemekte kullanılan AFM gibi yüzey-kuvvet mikroskopi tekniklerini uygulamak için önemli bir gerekliliktir. [28]

2.12 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscopy-AFM), yüzey topografisini angstrom seviyesinden 100 mikrona kadar görüntüleyebilen bir metoddur. Hassas bir iğnenin yüzeyi taramasıyla, yüzeyin yüksek çözünürlüklü 3D görüntüsünü verir.

İnce ve kalın kaplamalar, seramikler, kompozitler, camlar, sentetik ve biyolojik membranlar, metaller, polimerler ve yarıiletkenler gibi materyallerin yüzeyi görüntülenebildiği gibi yüzey etkileşim özellikleri, elektriksel yük, manyetiklik, adhesif ve hidrofilik davranış gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi alınabilir.

Hassas yay atomik itme-çekme kuvvetleriyle eğilir. Eğilme, lazerden gelen ışının açısını değiştirir. Yansıyan ışığın açısı fotodedektörle saptanır. Fotodedektörden gelen sinyal bilgisayarda toplanır. [31]

3. DENEY AŞAMASI

3.1 Deneyde Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar

Deneyleri gerçekleştirirken kullanılan cihazlar; QCM (SRS QCM Quartz Crystal Microbalance, İsveç), manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya), pH metre ve terazi (Sartorius, Almanya), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex, Almanya), kristal üzerindeki metal başlıklar kesmek için Dremel Lithium Ion (Dremel, Almanya), etüvdür (Termal, İstanbul). 12 MHz'lik kristallerin frekanslarını ölçmek için Başkent Üniversitesi'nde Yüksek lisans öğrencisi Erhan Ermek'in kendi tezi için hazırlamış olduğu osilatör ve frekans sayacı devresi ile ayrıca Escort EFC-3201 (Hong Kong) frekans sayacı kullanılmıştır. AFM görüntüleri Hacettepe Üniversitesi'nde Yüksek lisans öğrencisi Nihan Güvener tarafından alınmıştır.

Deneyde kullanılmak üzere; 4 ve 12 MHz'lik (TIC) kristaller, manyetik karıştırıcı için manyetik balık, pipetler, termometre ve beher kullanılmıştır.

Deneyi yaparken kullanılan kimyasallar; NaOH (Merck, Almanya), saf aseton (Merck, Almanya), metanol (Merck, Almanya), HCl (Merck, Almanya), sistamin (SIGMA Aldrich, ABD), glutaraldehit (Fluka, ABD), fosfat tamponu için NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 tuzları (SIGMA Aldrich, ABD), fosfat tamponu tuzu (PBS) (Amresco, Kanada), borik asit tuzu (Aklar Kimya, Ankara), sodyum tetraborat/HCl tamponu, protamin (SIGMA Aldrich, ABD), heparin (Liquemine Heparin 25000 I.U/5 ml i.v. 5ml'lik 1 flakon, Roche, Almanya) kullanılmıştır. Saf su Aklar Kimya- Ankara'dan, deiyonize su ise Kartal Kimya- Ankara'dan temin edilmiştir.

3.2 Deneyin Yapılışı

Sunulan araştırma kapsamında kuartz kristallerin yüzeyine kimyasal immobilize protamin ile etkileşimin neden olduğu frekans değişimi ile heparin ölçümü yapılması hedeflenmektedir.

Öncelikle deneyler sırasında kullanılacak gümüş (Ag) elektrotlu kuartz kristallerin, (4 MHz-12 MHz) üzerindeki metal başlıklar kesilerek kristalin elektrotları ve kuartz yüzey ortaya çıkarılmıştır. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Kristallerin Dremel 10.8V Lithium Ion el aletiyle metal başlıklarının kesilip çıkarılması

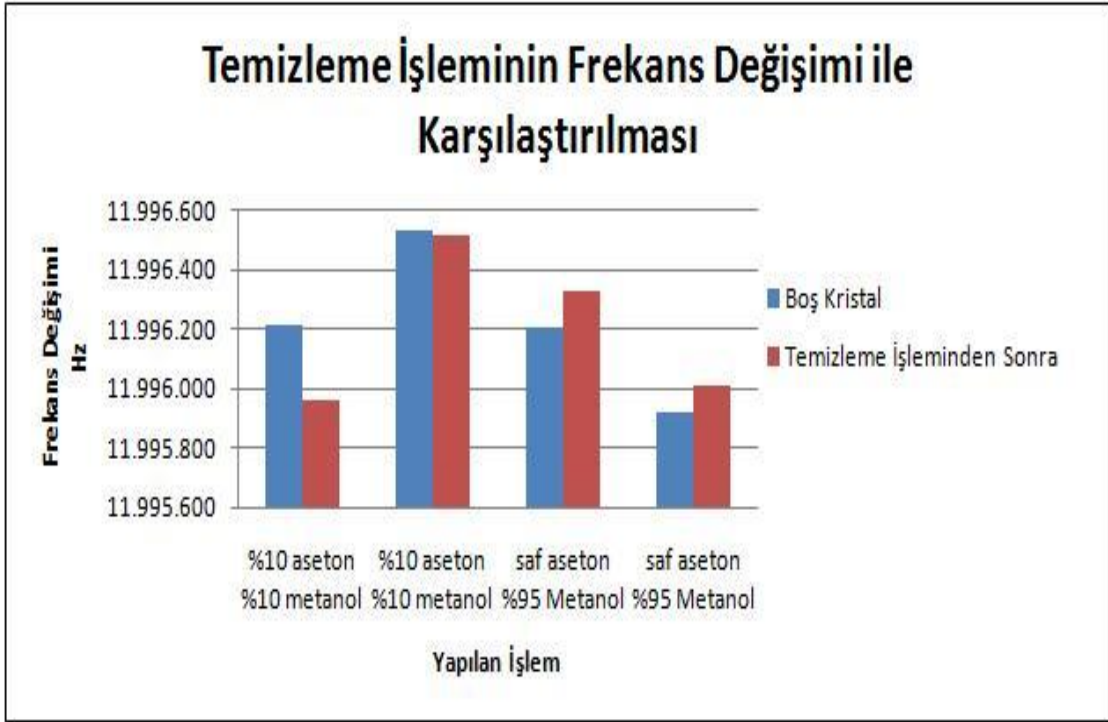
3.2.1 Temizleme ve Hidrofilik Yüzey Eldesi

Deneylere ilk başlandığı dönemde kristaller 0.5 M NaOH ile farklı derişimlerde hazırlanmış aseton ve metanol ile 30 dakika etkileştirilmişlerdir (Şekil 3.2). Kristallerin metal başlıklarını çıkartırken metal tozlarının kristalin yüzeyine fiziksel olarak tutunmasından dolayı öncelikle kristallerin temizleme işlemlerinin yapılması gerektiğine karar verilmiştir. Bu nedenden dolayı kristaller aseton ve metanol ile etkileştirildikten sonra deiyonize su ile yıkanmıştır. Bu sayede kristallerin yüzeyleri temizlenmiş ve NaOH ile Ag elektrotlar üzerinde aktif OH fonksiyonel gruplarının oluşturulması sağlanmıştır.



Şekil 3.2 Kristalin manyetik karıştırıcıda çözelti ile etkileştirilmesi

%10 aseton ve metanol kullanılarak yapılan temizleme işlemlerinin yeterli olmadığı saptanmış ve saf aseton ve %95 metanolla yıkama işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.3). Kristaller temizleme işleminden yani saf aseton ve metanolden sonra ultrasonik banyoda deiyonize suyla 3 dakika yıkanmıştır (Şekil 3.4). Hidrofilik yüzey elde etmek için 30 dakika 0.5 M NaOH'de tutulan kristaller ultrasonik banyoda deiyonize suyla 3 dakika yıkanmıştır. Böylece fiziksel olarak tutunan moleküllerin kristal yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Fiziksel olarak adsorbe olan moleküllerin kristal yüzeyinden elimine edilmesi sonrası kristaller etüvde 37 °C'de yaklaşık 30 dakika kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrası kuartz kristallerin frekans değişimler ölçülmüştür.



Şekil 3.3 Temizleme işleminin frekans değişimi ile karşılaştırılması



Şekil 3.4 Kristallerin ultrasonik banyoda deiyonize su ile yıkanması

3.2.2 Sistamin İmmobilizasyonu

Kullanılan Ag elektrotlu kristallere, OH grubu aktivasyonundan sonra tiyol ve amin içeren bir bileşik yardımıyla yüzeyde yeni fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Kuartz kristallerin yüzey aktivasyonu aşamasından sonra kristallerin yüzeylerine sistamin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sistamin molekülü bir tiyol (SH) ve amin (NH₂) olmak üzere iki fonksiyonel gruba sahiptir. Molekülün bu özelliğinden yararlanılarak tiyol ucundan kristal yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Bu amaçla 5, 20 ve 50 mM derişimleri için farklı miktarlarda sistamin, fosfat tamponunda (0.1 M pH: 7) çözülmüştür. Kristaller hazırlanan çözeltiler içinde belirli bir süre karanlık ortamda bekletilerek reaksiyona sokulmuştur (Şekil 3.5). Süre sonunda kristaller deiyonize suyla 30 dakika boyunca yıkanmış ve yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür. Temizleme işleminden sonra 5, 20, 50 mM derişimlerinde hazırlanmış sistamin ile immobilizasyon yapılmıştır. 5 mM ile yapılan sistamin immobilizasyon işlemi başarısız olmuştur. Ancak 20 mM ve 50 mM derişimleri ile yapılan immobilizasyon başarılı olmuştur. Bu iki derişim ile yapılan deney sonucunda elde edilen frekans değişimi birbiriyle karşılaştırıldığında 20 mM derişimle yapılan işlemin daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5 Karanlık ortamın sağlanması



Şekil 3.6 Farklı sistamin derişiminin yarattığı frekans değişimi

İleri deneylerde 20 mM sistamin ile karanlık ortamda 30 dakika tutulan kristaller ultrasonik banyoda deiyonize suyla 3 dakika yıkanmıştır [32]. Böylece fiziksel olarak tutunan moleküllerin kristal yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Fiziksel olarak adsorbe olan moleküllerin kristal yüzeyinden elimine edilmesi sonrası kristaller etüvde 37 °C’de yaklaşık 30 dakika kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrası kuartz kristallerin frekans değişimleri ölçülmüştür.

3.2.3 Glutaraldehit İmmobilizasyonu

Sistamin immobilize edilmiş kuartz kristallerin üzerine uzatma kolu (spacer arm) takılması amacıyla bifonksiyonel özelliğe sahip glutaraldehit kullanılmıştır. Sistaminin serbest olan amin ucu ile glutaraldehidin aldehit uçlarının reaksiyona girmesi ile kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır.

Ligand immobilizasyonu sırasında, ligand moleküllerinin aktif uçlarının kristal yüzeyinden dışarı bakması, böylece anilat molekülleri ile spesifik olarak, yeteri kadar hızlı etkileşmesini sağlayacak şekilde gerçekleştirilmesidir. Uzatma kolu

kullanılarak immobilizasyonun gerçekleştirilmesi, ligand-anilat etkileşmesinde ortaya çıkabilecek sterik engellemeleri ortadan kaldıracak için önerilen bir yaklaşımdır. [26]

Sistamin immobilize edilmiş kristaller glutaraldehit etkileşimi için sodyum tetraborat/HCl tamponuna (pH: 8.2) karanlık ortamda reaksiyona sokulmuştur (Şekil 3.7). Yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülüp kaydedilmiştir. Bunun için sistamin immobilize kuartz kristaller değişen glutaraldehit derişimlerinde (%1 ve 5) sodyum tetraborat/HCl tamponuna (pH: 8.2) karanlık ortamda belirli bir süre 30 dakika bekletilerek reaksiyona sokulmuştur. Süre sonunda kristaller deiyonize suyla 30 dakika boyunca yıkanmış ve yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür. Sistamin immobilizasyonundan sonra %1 ve %5 glutaraldehit yapıldığında elde edilen frekans değişimi karşılaştırıldığında %5 ile yapılan immobilizasyon daha başarılı olmuştur. %5 glutaraldehit kristalde %1'e göre daha fazla frekans düşüşüne neden olmuştur. (Şekil 3.8)



Şekil 3.7 Sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonu için kristallere karanlık ortam sağlanması



Şekil 3.8 Farklı glutaraldehit derişiminin yarattığı frekans değişimi

İleri deneylerde %5 glutaraldehit ile karanlık ortamda 30 dakika tutulan kristaller ultrasonik banyoda deiyonize suyla 3 dakika yıkanmıştır. Böylece fiziksel olarak tutunan moleküllerin kristal yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Fiziksel olarak adsorbe olan moleküllerin kristal yüzeyinden elimine edilmesi sonrası kristaller etüvde 37 °C’de yaklaşık 30 dakika kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrası kuartz kristallerin frekans değişimleri ölçülmüştür.

3.2.4 Protamin İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda, en eski immobilizasyon yöntemi olan kovalent bağlama uygulanmıştır. pH:7 fosfat tamponunda hazırlanmış 1.0 mg/ml protamin immobilizasyon süresi 30 dakika olarak oda sıcaklığında uygulanmıştır. Protamin immobilizasyonundan sonra kristaller 3 dakika deiyonize su ile ultrasonik banyoda yıkanmış ve ölçümler alınmıştır.

3.2.5 Heparin Ölçüm Deneyleri

Protamin immobilizasyonundan sonra kristaller fosfat tamponu ile hazırlanmış olan 0.2, 0.5, 0.7, 1, 2, 2.5, 3, 4 U\ml heparin ile 30 dakika etkileştirilmiş kurutma işleminden sonra ölçümler alınmıştır.

3.2.6 Deneysel Sonuçlar

Saf aseton ve %95 metanol ile temizleme yapılmasının daha iyi sonuç verdiği karar verilmiştir. 0.5 M NaOH ile hidrofilik yüzeyin oluşturulmasıyla ve 20 mM sistamin ile %5 glutaraldehit yapılmasıyla ve yıkama işlemlerinin 3 dakika ultrasonik banyoda deiyonize su ile yapılan deneylerde, her aşamada alınan frekans ölçümleri sonucunda frekansların düştüğü tespit edilmiştir. Bundan sonra ilk frekans ölçümü kristallerin metal başlıkları çıkartıldıktan sonra ve 2. ölçüm protamin immobilizasyonundan sonra, 3. ölçüm ise heparin ölçümünden sonra alınmıştır.

Yapılan işlemlerin arkasından QCM ile frekans değerleri okunmuştur. Eğer frekansta düşme var ise bu; yüzeye kütlenin tutunduğunu, frekansta artış var ise yüzeydeki kütleye kopmalar olduğu anlamına gelmektedir.

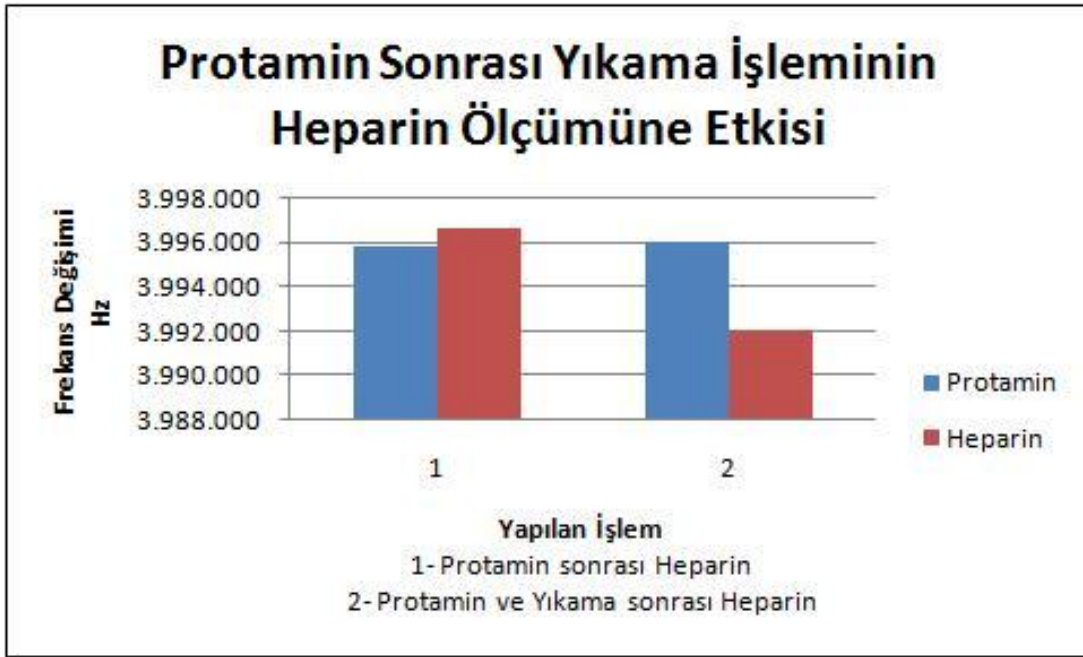
Kristallerin kalitesinden ileri gelen problemi gidermek için, 4 MHz'lik kristallerden sonra TIC marka 12 MHz'lik kristaller kullanılmıştır. Bu kristallerin kullanılmasına rağmen metal başlıklar çıkartıldıktan sonra elektrotların tam birbirine denk olmadığı gözlenmiş bazılarında lekeler tespit edilmiştir.

Deneyler esnasında kullanılan beherlerin kaynar suyla ve saf suyla da ayrıca yıkanması önemli olduğu saptanmıştır.

Temizleme işleminin saf aseton ve %95 metanol ile yeterli şekilde sağlandığı gözlenmiştir.

Ultrasonik banyoda deiyonize su ile yapılan yıkama işleminin süresi arttırıldığında kristallerin yüzeyinde aşınma ve delikler tespit edildiğinden optimum değer olarak 3 dakika uygulanmıştır.

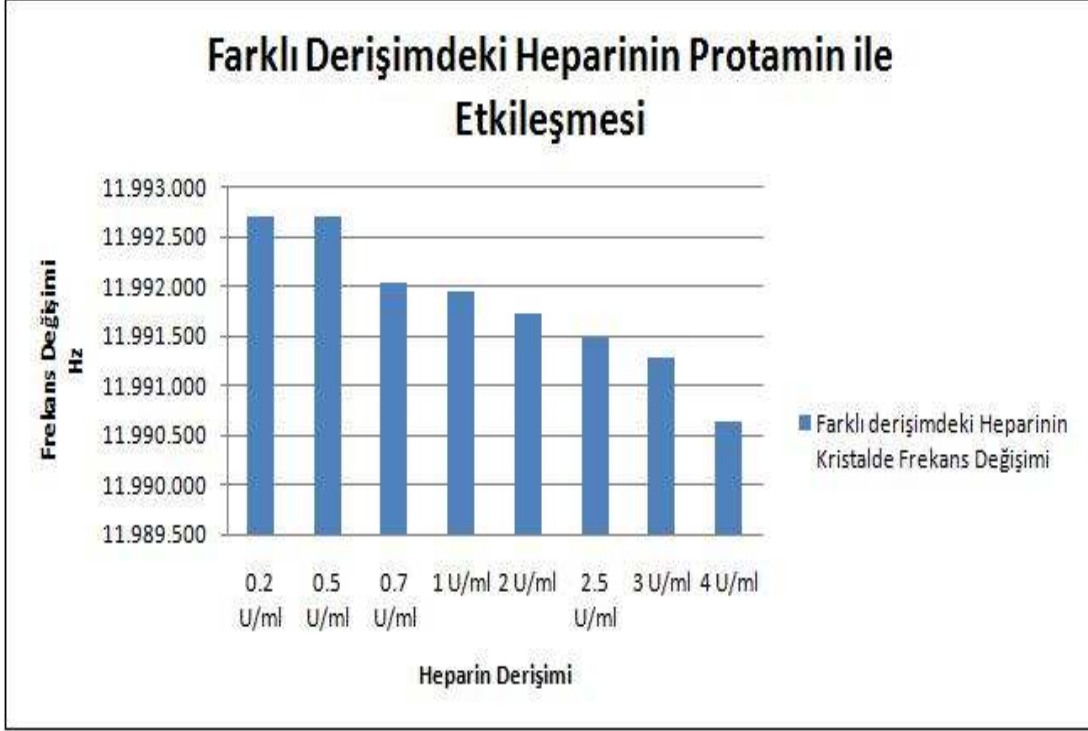
Tutunmanın sağlandığı kristallerde protamin immobilizasyonu işlemi yapılmıştır. pH 7’de hazırlanmış olan fosfat tamponu ile 1 mg/ml derişimindeki protamin ile 30 dakika süreyle reaksiyona maruz bırakılmıştır. Bazı kristallerde, protamin işleminden sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmemiş, bazılarında ise uygulanan yıkama işlemiyle frekans değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 3.9). Yıkama ve 37 °C’de kurutma işlemi gerçekleştirilmiş olan kristallerle heparin ölçümü yapıldığında heparinin yüzeye tutunduğu saptanmıştır. Ancak yıkama işleminin yapılmadığı kristallerle yapılan heparin ölçümünde protamin kopmaları olmuştur (Şekil 3.9).



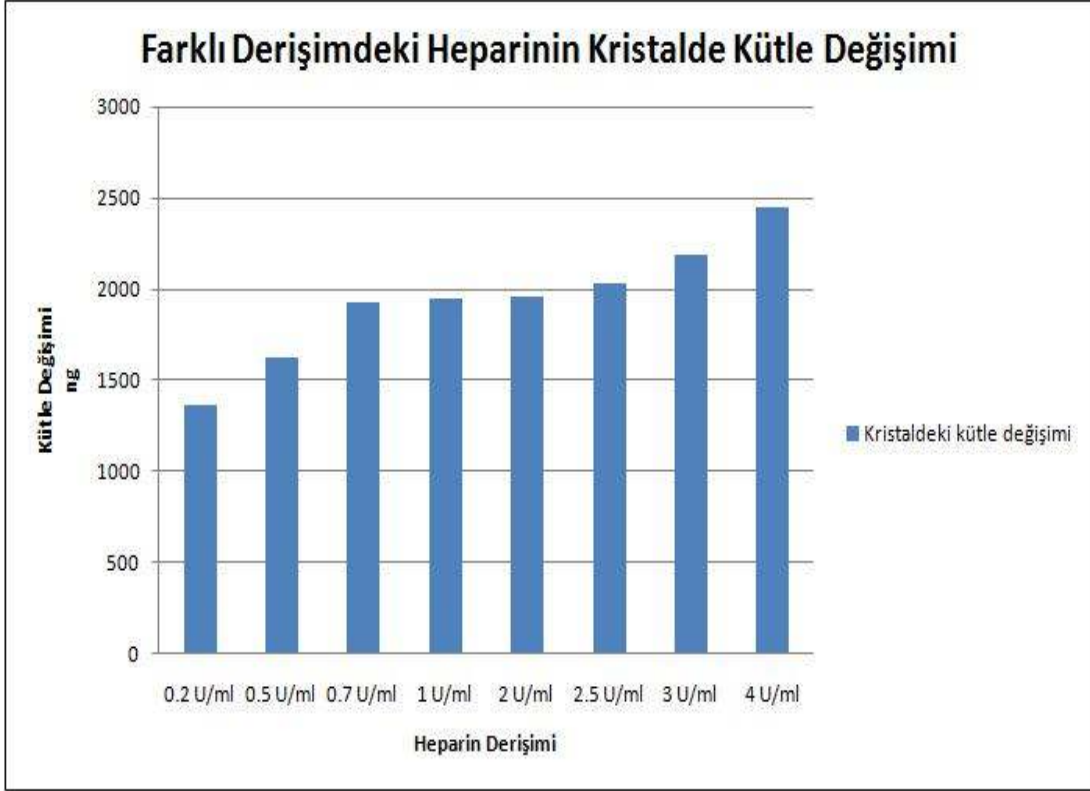
Şekil 3.9 Protamin sonrası yıkama işleminin heparin ölçümüne etkisi

Protamin immobilize olmuş kristallerle yapılan heparin ölçümlerinde 0.2, 0.5, 0.7, 1, 2, 2.5, 3, 4 U\ml değerler denenmiştir. Heparin derişimi artıkça frekansta azalma (Şekil 3.10), dolayısıyla protamine tutunmada da artış gözlenmiştir. Bu değişim, Sauerbrey denklemine göre hesaplandığında Şekil 3.11’de görüldüğü gibi kütle

değişimi gözlenmiştir. Ancak bir aşamadan sonra protaminin (tespit edebileceği) tutabileceği heparin değerinde, heparin derişimi arttıkça azalma olacaktır. Protaminin heparine doygunluğu artmaya başlayınca frekansta artış olmaya başlayacak ve kristalin yüzeyine tutunan kütlede azalma başlayacaktır.



Şekil 3.10 Farklı derişimdeki heparinin protamin ile etkileşmesi



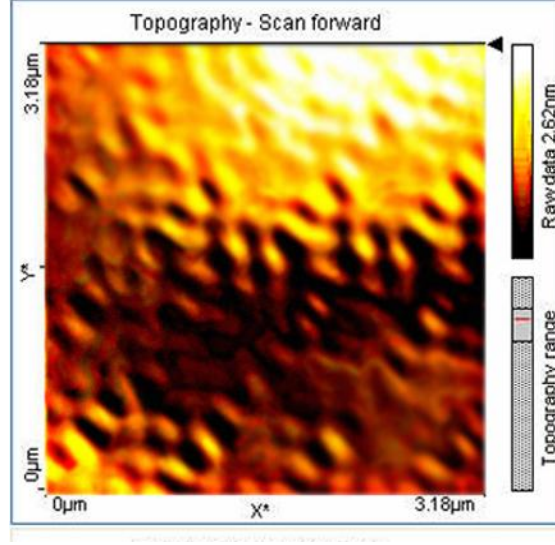
Şekil 3.11 Farklı derişimdeki heparinin kristalde kütle değişimi

3.2.7 AFM Görüntüleri

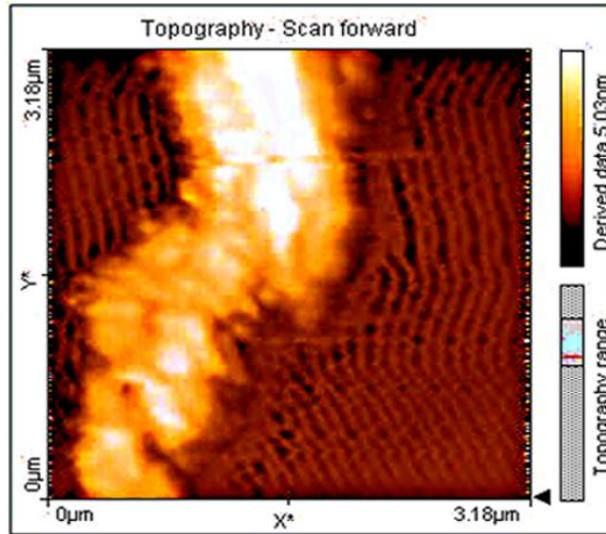
AFM analizleri NanoSurf Atomik Kuvvet Mikroskobu tarafından 10 mikrometrelik tarama kafasıyla yapılmıştır. Görüntüleme tekniği olarak Temassız Mod uygulanmıştır.

Tüm AFM görüntülerinde değişen yükseklik farklarına bağlı derecelendirme şekillere ekli halde bulunmaktadır. Adım adım ilerleyen deney aşamalarında değişken olarak gözlemlenen kalınlık farkı ve yüzey topografyası ile immobilizasyon görüntülenmiştir. Şekil 3.12`de boş kuartz kristal yüzeyinin AFM görüntüsü görölmektedir. Fabrikasyon gümüş yüzeyinin oluşturulması aşamasında oluşan yüzey pürüzlülüğünden dolayı yaklaşık 2 nm miktarında bir yükseklik farkı gözlenmiştir. Sistamin immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisindeki değişim yığılmalar şeklinde olup, ortalama yükseklik değişimi 5 nm civarındadır (Şekil 3.13). Protamin immobilizasyon ile yüzey morfolojisi daha muntazam gözlemlenmekte olup, adacık görüntüsü yerini düzenli bir topografyaya bırakmıştır.

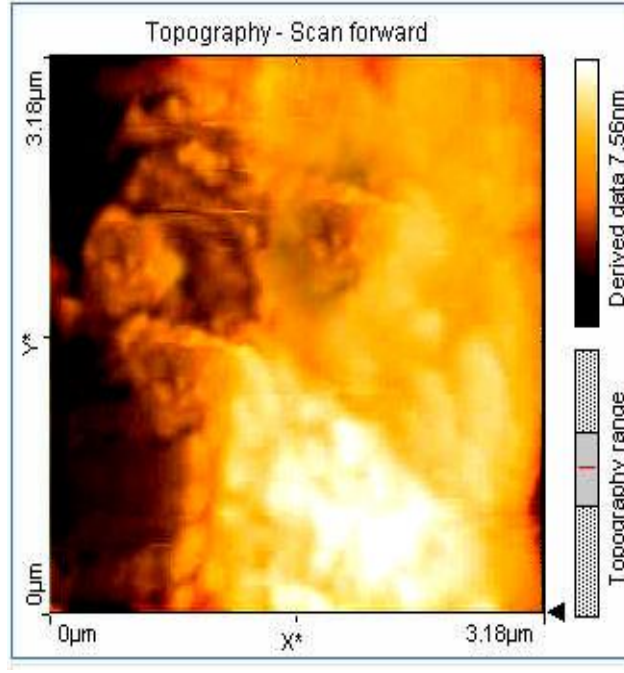
Kalınlık farkı protamin immobilizasyonu sonucunda bu katmanda 7 nm kadar bulunmuştur (Şekil 3.14). Heparin immobilizasyonu sonucu yüzeydeki yığılma adacıkları yer yer gözlenmekte olup, doluluk miktarındaki artış AFM görüntülerinde de gözlenmektedir. Heparin immobilizasyonu sonucunda tabakadaki kalınlık farkı yaklaşık 9 nm olup Şekil 3.15`te görülmektedir. [31]



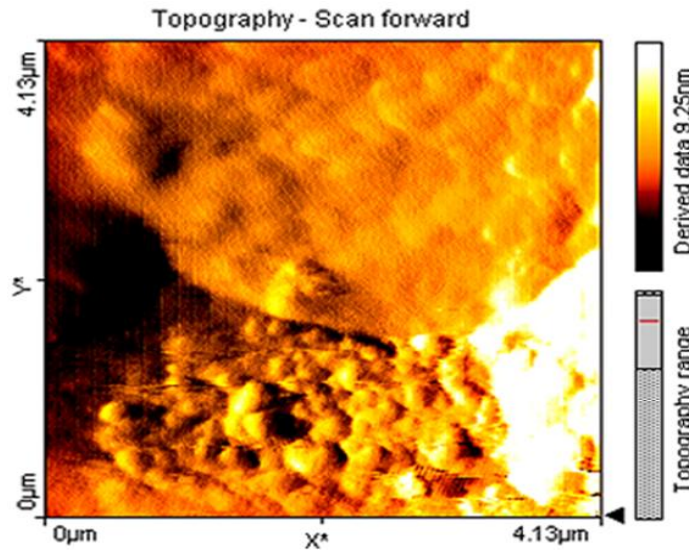
Şekil 3.12 Uygulama öncesi kuartz kristal yüzeyi



Şekil 3.13 Sistamin immobilizasyonu sonrası kuartz kristal yüzeyi



Şekil 3.14 Protamin immobilizasyonu sonrası kuartz kristal yüzeyi



Şekil 3.15 Heparin immobilizasyonu sonrası kuartz kristal yüzeyi

SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanın pıhtılaşmasını önlemek amacı ile heparin kullanılmaktadır. Heparinin antidotu olarak da protamin kullanılabilir. Protamin heparinin antikoagülan görevini inhibe eder ve pıhtılaşmayı tekrar sağlar.

Yapılan çalışmada; kuartz kristal yüzeyine protamin immobilize ederek, frekans değişimiyle heparin tayini yapılabilmektedir. İmmobilizasyon işlemleri için en uygun parametreler çeşitli literatür araştırması yapılarak elde edilmiştir. İmmobilizasyon yapıp yapılamadığı ise yüzeydeki kütle değişimine bağlı olarak frekans değişimi ile cevap veren QCM ile belirlenmiştir.

Yıkama işlemi ultrasonik banyoda deiyonize suyla yapıldığında gümüş kristal yüzeyindeki fiziksel olarak tutunmayı daha iyi arıttığı saptanmıştır. Fakat ultrasonik banyoda yıkama süresi arttırıldığında kristallerin yüzeylerinde aşınma ve deliklerin oluştuğu gözlenmiştir, bu nedenden dolayı yıkama işlemi 3 dakika ile sınırlandırılmıştır.

Uzun soluklu deneysel çalışmalar sonunda Heparinin derişimi arttığında frekansta düşme ve Sauerbrey denklemine göre kütlede artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak bir aşamadan sonra heparin derişimi arttıkça protaminin tespit edebileceği heparin değerinde, azalma olacaktır. Protaminin heparine doygunluğu artmaya başlayınca frekansta artış olmaya başlayacak ve kristalin yüzeyine tutunan kütlede azalma başlayacaktır.

Yapılan deneylerde kullanılan kristaller elektronik sanayiinde kullanılan ticari ürünlerdir. Bunlar biyolojik ve kimyasal amaçlı üretilmediklerinden dolayı gelecekteki çalışmalarda daha iyi sonuçlar alınması açısından altın (Au) kaplı kristallerin kullanılması önerilmektedir.

Ayrıca,

- a. Ölçümleri plazmadan yapmak,
- b. Geliştirilen sensörün tekrar kullanılabilirliğini denemek,

- c. Heparinle etkileştirdikten sonra suyla ya da zayıf asit ve çözeltileriyle yıkayarak heparini protaminden ayırıp tekrar heparinle etkileştirmek,
- d. Hazırlanan biyosensörleri akış hücresine yerleştirip ölçümler yapmak daha sonraki adımlar olarak sıralanmaktadır.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] DENİZ, Eşref, Tıbbi Biyoloji, 3.Baskı, s.217-229, 1985
- [2] Direskeneli, Güher S., Kardiyopulmoner ve Kan Fizyolojisi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel ve Klinik Bilimleri Ders Kitapları, s.200-203, 2001
- [3] Gravlee, G.P., Davis, R.F., Kurusz, M., Utley, J.R., Cardiopulmonary Bypass Principles and Practice, Lippincott Williams&Wilkins, 2nd Ed, 2000
- [4] M. Altınışik, 2009, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Aydın, mustafa_altinisik@yahoo.com, maltinisik@adu.edu.tr
- [5] HIRSH, J., RASCHKE, R., Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin, CHEST; 126: s. 188–203, 2004
- [6] SELLERS, Edward, Clinical Pharmacology of Anticoagulant Therapy, Anticoagulation: Principles and practice, s.5, 1977
- [7] HIRSH, J., ANAND, S.S., HALPERİN, J. L., FUSTER, V., Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin : A Statement for Healthcare Professionals, Circulation, 103; s. 2994-3018, 2001
- [8] BESSELINK, G.A.J., BERGVELD, P., ISFET Affinity Sensor Methods in Biotechnology, Affinity Biosensors Techniques and Protocols, Vol 7
- [9] CHANG, L.C., Low Molecular Weight Protamine as Nontoxic Heparin/Low Molecular Weight Heparin Antidote (III): Preliminary In Vivo Evaluation of Efficacy and Toxicity Using a Canine Model, AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists) Pharmsci; 3 (2) article 19, 2001

- [10] USLU, A., YİĞİT, R., The relationship between the dose of heparin and free plasma hemoglobin in open heart surgery, *Cerrahpaşa J Med*, 32 (1): 37-42, 2001
- [11] ÇORAPÇIOĞLU, Tümer, Açık Kalp Cerrahisinde Antikoagülasyonun Sağlanması Heparin-Protamin Titrasyonunun Önemi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Cilt 50, Sayı 2, s.117-120, 1997
- [12] SVENARUD, P., OVRUM, E., Clinical effects of different protamine doses after cardiopulmonary bypass. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*; 10:119-123, 2002
- [13] MIYASHITA, T., NAKAJIMA, T., HAYASHI, Y., KURO, M., Hemostatic effects of low-dose protamine following cardiopulmonary bypass. *Am J Hematol*; 64(2):112-115, Jun 2000
- [14] EGE, Turan, Açık Kalp Cerrahisinde Farklı İki Heparin Nötralizasyon Yönteminin Postoperatif Drenaja Etkisi, *Gülhane Tıp Dergisi* 44 (4) : 399 – 404, 2002
- [15] Sarıoğlu T., Kardiyopulmoner Bypass Protokolü, Acıbadem Bakırköy Hastanesi Kalp Ve Damar Cerrahisi Bölümü, 2005
- [16] SARIOSMANOĞLU N., Heparin Kaplı Sistemin Pulmoner Hasar Üzerine Etkilerini Gösteren Klinik Çalışma, *GKDC Dergisi*; 7: 1-6, 1999
- [17] FİSCHBACH, David P. , Coagulation The Essentials, William & Wilkins, s.235-236, 1981
- [18] ATEŞ, M., ŞENSÖZ, Y., Mükemmel Kalp-Akciğer Makinesine Doğru, *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*,3: s.253-258, 2002

- [19] SARIBÜLBÜL, Osman, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilimdalı Manisa; Açık Kalp Makinası Ekstrakorporeal Dolaşım
- [20] <http://www.terumo-cvs.com>
- [21] <http://www.soringroup-usa.com/index.php?id=30&c=oxygenators&product=apex>
- [22] Wegner, Julie A., Oxygenator Anatomy and Function, Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, Volume 11, Issue 3, s. 275-281, May 1997
- [23] AKAR, Ahmet R., UÇANOK, Kemalettin Ekstakorporeal Dolaşım (Extracorporeal Circulation), AÜTF Kalp ve Damar Cerrahisi, 2002
- [24] Ashok Kumar, Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application, JOM-e, 52 (10), 2000
- [25] Ahmad Safari, Victor F. Janas, Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook, CRC Press LLC, s.142, 1999
- [26] TABRİZİ, Amir Parviz Farşçi, Altın Nanopartikül Üretim Ve Kuartz Kristal Mikrobals Sisteminde Kullanımı, Yük. Lis. Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, S.11, 2005
- [27] What is a Quartz Crystal Microbalance (QCM) QCM Z500 Technical Note, KSV Instruments, 2004
- [28] Collingsy, A. F., Biosensors: recent advances, Rep. Prog. Phys. 60, s.1397–1445, 1997
- [29] MEHRVAR, M., Bis,C., et al., Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances, Analytical Sciences, July 2000, Vol.16, s. 677-691, 2000

[30] <http://home.hccnet.nl/ja.marquart/>

[31] N.Güvener, 2009, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Ankara, nihanguvener@hotmail.com

[32] SHEN, G., LIU, M., CAI, X., A novel piezoelectric quartz crystal immnuosensor based on hyperbranched polymer films for the detection of Fetoprotein, *Analytica Chimica Acta* 630 (2008) 75–81)

EKLER

EK-1 Heparin veya protamin dozaj kontrol tekniği [17]

