

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

QCM HEPARİN BİYOSENSÖR TASARIMI ve ÜRETİMİ

ERHAN ERMEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2010

QCM HEPARİN BİYOSENSÖR TASARIMI ve ÜRETİMİ

QCM HEPARIN BIOSENSOR DESIGN and PRODUCTION

ERHAN ERMEK

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

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan

:

Prof. Dr. Hüseyin AKÇAY

ye

:

Prof. Dr. Osman EROĐUL

ye (Danışman)

:

Doç. Dr. Mustafa KOCAKULAK

ONAY

Bu tez 13/09/2010 tarihinde, yukarıdaki jüri yeleri tarafından kabul edilmiştir.

..../09/2010

Prof.Dr. Emin AKATA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

TEŐEKKÖR

Çalışmanın sonuca ulaőtırılmasında ve karşılaşılan güçlüklerin aőtılmasında her zaman yardımcı ve yol gösterici olduğu için Sayın Doç. Dr. Mustafa Kocakulak'a (tez danışmanı),

TÜBİTAK 105M270 Proje Destekçilerine,

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

ÖZ

QCM HEPARİN BİYOSENSÖR TASARIMI ve ÜRETİMİ

Erhan ERMEK

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Kandaki heparin miktarının izlenmesine olanak sağlayan direk ölçüm yöntemi bulunmamaktadır. Heparin; ekstrakorporal uygulamalarda pıhtılaşmanın önlenmesi için kullanılan sülfatlı polisakkarit moleküldür. Sunulan tez çalışması kapsamında kuvars kristallerin yüzeyine kimyasal immobilize afinite ligand ile etkileşimin neden olduğu frekans değişimi ile bir akış hücresinde insan plazmadan heparin ölçümü yapılması hedeflenmektedir. Uygulanacak kimyasal immobilizasyon yöntemi ile ligand molekülünün kristal yüzeyinde uzun süre kalması ve tekrarlanarak kullanılması hedeflenmektedir. Sunulan tez çalışması kapsamında; 1) Elektromekanik ve Elektronik Tasarım 2) Sensör oluşturulması 3) Plazmadan heparin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kuvars kristal frekansının ölçülebilmesi için elektronik devre (osilatör devresi ve frekans sayıcı devresi 12 MHz. LCD göstergeli) tasarlanmış ve üretilmiştir. Akış hücresi teflon malzemeden tasarlanmış ve üretilmiştir. Kapalı akış devresi oluşturularak fosfat tamponundan ve plazmadan heparin ölçümü sıcaklık kontrollü ortamda gerçekleştirilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: polietilenimin (PEI), heparin, biyosensör, kuvars kristal mikroterazi (QCM), kalp akciğer makinesi, kardiyopulmoner baypas, osilatör, frekans sayıcı, akış hücresi, plazma

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

ABSTRACT

QCM HEPARIN BIOSENSOR DESIGN and PRODUCTION

Erhan ERMEK

Baskent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

Direct measurement method does not exist that allows observation of amount of heparin in the blood. Heparin, is a sulfated polysaccharide molecule used for prevention of clots in extracorporeal applications. Under the presented thesis chemicals with immobilized affinity ligand-induced change in the frequency of interaction with in a flow cell to the surface of quartz crystal is targeted from the human plasma heparin measurements. Chemical immobilization methods to be applied with the ligand molecules on the surface of the crystals used for long duration and is aimed to be repeated. Offered as part of the thesis: 1) Electromechanical and Electronic Design 2) the sensor creation 3) heparin measurements from plasma. To measure the frequency of quartz crystals (12 MHz oscillator circuit and frequency counter circuit with LCD indicator) electronic circuit were designed and manufactured. Teflon flow cell were designed and produced. Determination of heparin were held by creating a closed circuit flow of phosphate buffer and plasma under temperature-controlled environment.

KEYWORDS: polyethyleneimine (PEI), heparin, biosensor, quartz crystal microbalance (QCM), heart-lung machine, cardiopulmonary bypass, oscillator, frequency counter, flow cell, plasma

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

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kalp Akciğer Makinası.....	2
2.1.1 Kalp-Akciğer makinası bileşenleri.....	2
2.1.1.1 <u>Venöz kanüller</u>	2
2.1.1.2 <u>Venöz rezervuar</u>	4
2.1.1.3. <u>Oksijenatör</u>	4
2.1.1.4 <u>Isı Değiştirici</u>	4
2.1.1.5 <u>Pompalar</u>	5
2.1.1.6 <u>Filtreler</u>	5
2.1.1.7 <u>Kanüller</u>	5
2.1.1.8 <u>Kardiotomi aspiratör sistemi</u>	6
2.1.2 Kalp-Akciğer makinesinin kurulması.....	6
2.1.2.1 <u>Önhacim</u>	6
2.1.3 Antikoagülasyon	6
2.1.3.1 <u>Heparin</u>	7
2.1.3.2 <u>Protamin</u>	8
2.1.3.3 <u>Akış miktarı ve basınçlar</u>	8
2.1.3.4 <u>Isı</u>	9
2.1.3.5 <u>Açık kalp ameliyatlarında heparin-protamin miktarının önemi</u>	9
2.2 Biyosensörler.....	12
2.2.1 Heparin biyosensörler.....	13

2.2.2	Piezoelektrik etki.....	14
2.2.2.1	<u>Kuvars kristal mikroterazi biyosensörler ve özellikleri</u>	16
2.2.2.2	<u>Sauerbrey Denklemi</u>	17
2.2.2.3	<u>Frekans ölçümü için izlenen yöntem</u>	18
2.2.2.3.i	<u>Piezoelektrik kristal osilatör devreleri</u>	18
2.2.3	İmmobilizasyon yöntemleri.....	19
2.2.3.1	<u>Non-Kovalent yöntemler</u>	20
2.2.3.2	<u>Kovalent bağlama</u>	21
2.2.3.2.i	<u>Sistamin ve glutaraldehitin kovalent bağlanması</u>	22
2.2.3.2.ii	<u>Polietilenimin immobilizasyonu</u>	23
2.2.3.3	<u>Heparin-PEI etkileşimi</u>	23
2.2.4	Sıvı fazda ölçüm.....	24
2.2.4.1	<u>Kanazawa denklemi</u>	26
2.2.5	Piezoelektrik temelli sistemlerin avantaj ve dezavantajları...26	
2.2.6	Yüzey karakterizasyonu.....	27
2.2.6.1	<u>Atomik kuvvet mikroskobu (AKM)</u>	27
3.	DENEY AŞAMASI	29
3.1	Deneyde Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar.....	28
3.2	Deneyin Yapılışı.....	30
3.2.1	Osilatör ve frekans sayıcı devreleri.....	30
3.2.1.1	<u>Colpitts osilatör</u>	31
3.2.1.2	<u>Frekans sayıcı devresi</u>	33
3.2.2	Kuvars kristal biyosensör yüzeyinin oluşturulması.....	34
3.2.2.1	<u>Kuvars kristal yüzey temizliği</u>	34
3.2.2.2	<u>Kuvars kristal yüzey aktivasyonu</u>	36
3.2.2.2.i	<u>Sistamin immobilizasyonu</u>	36
3.2.2.2.ii	<u>Glutaraldehit immobilizasyonu</u>	37
3.2.2.2.iii	<u>PEI immobilizasyonu</u>	38
3.2.2.2.iv	<u>İşlem basamakları sonrasında ölçülen frekans değişimleri</u>	39
3.2.3	Heparin ölçümü.....	40

3.2.3.1	<u>Fosfat tamponunda heparin ölçümü</u>	40
3.2.3.1.i	<u>Sauerbrey denklemi ile frekans-kütle ilişkisi</u>	41
3.2.3.1.ii	<u>Heparin ölçümü sonrasında sensör tekrar kullanılabilirliği</u>	42
3.2.3.2	<u>Plazmadan Heparin Ölçümü</u>	43
3.2.3.3	<u>Akış hücresinde ölçümler</u>	45
3.2.3.3.i	<u>Akış Hücresinde Heparin Ölçümü</u>	46
3.2.3.3.ii	<u>Akış Hücresinde Plazmadan Heparin Ölçümü</u>	47
3.2.4	<u>Kuvars kristal biyosensör yüzey karakterizasyonu</u>	48
3.2.4.1	<u>AKM görüntüleri</u>	48
3.2.4.1.i	<u>Boş kuvars kristal elektrot yüzeyi</u>	48
3.2.4.1.ii	<u>Yüzey aktivasyonu sonrasında yüzey görüntüsü</u>	49
3.2.4.1.iii	<u>Heparin ölçümü sonrasında yüzey görüntüsü</u>	49
SONUÇ ve ÖNERİLER		51
KAYNAKLAR LİSTESİ		53
EKLER LİSTESİ		58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Vücut dışı (ekstrakorporal) dolaşım.....	3
Şekil 2.2 Santrifüj pompa.....	5
Şekil 2.3 Tek bir ünitelik parçalanmamış heparin molekülü.....	8
Şekil 2.4 Biyosensör genel gösterim.....	12
Şekil 2.5 Piezoelektrik etkiyi açıklayan molekül modeli.....	14
Şekil 2.6 Piezoelektrik etki.....	15
Şekil 2.7 Piezoelektrik kuvars kristal ve şematik gösterim.....	16
Şekil 2.8 Osilatör devreleri.....	19
Şekil 2.9 Sistamin ve glutaraldehitin kovalent bağlanması.....	22
Şekil 2.10 Heparin temel yapısı.....	23
Şekil 2.11 Heparin molekülünün PEI ile kavolent bağlanması.....	24
Şekil 2.12 Akış hücresi.....	25
Şekil 3.1 Kuvars kristal mikroterazi sensör frekans okuyucu blok diyagramı.....	31
Şekil 3.2. Colpitts osilatör devresi.....	31
Şekil 3.3 Frekans sayıcı devresi validasyonu.....	34
Şekil 3.4 Kuvars Kristal metal kılıflarının çıkarılması.....	35
Şekil 3.5 Kuvars kristal ve elektrot yüzeyleri.....	35
Şekil 3.6 Kuvars kristallerin manyetik karıştırıcıda çözelti ile etkileştirilmesi.....	36
Şekil 3.7 Kuvars kristallerin ultrasonik banyoda deiyonize su ile yıkanması.....	37
Şekil 3.8 Sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonları için karanlık ortam eldesi..	38
Şekil 3.9 Polietilenimin immobilizasyonu için gereken koşulların sağlanması.....	39
Şekil 3.10 Farklı heparin konsantrasyonlarında sensör frekans cevap grafiği.....	40
Şekil 3.11 %50 plazma içinden kuvars kristallerin heparin ile etkileştirilmesi.....	44
Şekil 3.12 Plazma içerisinden, farklı heparin konsantrasyonlarında alınan ölçüm sonuçları.....	44
Şekil 3.13 Akış hücresi blok diyagramı.....	45
Şekil 3.14 Akış hücresi ile oluşturulan deney düzeneği.....	45
Şekil 3.15 Akış hücresinde fosfat tamponundan heparin ölçümü.....	47
Şekil 3.16 Akış hücresinde plazmadan heparin ölçümü.....	47
Şekil 3.17 Boş kuvars kristal elektrot yüzeyi AKM görüntüsü.....	48
Şekil 3.18 PEI immobilizasyonu sonrasında yüzey görüntüsü.....	49
Şekil 3.19 Plazmadan heparin ölçümü sonrası AKM görüntüsü.....	49

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1 Kuvar kristal mikroterazilerin sıcaklık ile frekans değişimi.....	17
Çizelge 3.1 Yüzey temizliği ve yüzey aktivasyon basamaklarının oluşturduğu frekans değişimleri.....	39
Çizelge 3.2 Sauerbrey denklemi ile frekans-kütle dönüşüm.....	41
Çizelge 3.3 Kalibrasyon eğrisi için elde edilen tablo.....	42
Çizelge 3.4 Sensör Tekrar kullanılabilirliği.....	43
Çizelge 3.5 Akış hücresinde frekans değişimleri.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ΔF	Kuvars kristalde frekans değişimi
Δm	Yüzeyde oluşan film tabakasının kütlesi
μ	mikro
A	Elektrod yüzey alanı
Ag	Gümüş
cm	santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Da	dalton
f	rezonans frekansı
gr	gram
Hz	Hertz
i.v- IV	intravenöz
IU	Uluslar Arası Birim
IU/ml	Uluslar Arası Birim/mililitre
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg/kg	miligram/kilogram
MHz	Megahertz
O ₂	Oksijen
PEI	Polietilenimin
sn	saniye
ACT	Aktifleşmiş Pıhtılaşma Zamanı
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AFM	Atomic Force Microscopy
CPB	Cardiopulmonary Bypass
KAM	Kalp Akciğer Makinası
KPB	Kardiyopulmoner Bypass
QCM	Quartz Crystal Microbalance
SEM	Scanning Electron Microscopy
TEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Htc	Hemodilüsyon

1. GİRİŞ

Açık kalp ameliyatı, diyaliz, hemaperfüzyon gibi ekstrakorporeal uygulamalarda pıhtılaşmanın önlenmesi için sülfatlı polisakkarit molekülü olan heparin kullanılmaktadır. Günümüzde kandaki heparin miktarının izlenmesi dolaylı bir ölçüm olan pıhtılaşma zamanının ölçülmesi ile olmaktadır. Sunulan tez kapsamında akış hücresi içinde kuvars kristallerin yüzeyine kimyasal immobilize polietilenimin (PEI) ile etkileşimin neden olduğu frekans değişimiyle plazma içerisinde heparin ölçümü yapılması hedeflenmiştir.

1.1 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Yapılan çalışmanın amacı elektronik bir malzeme olan ve kolayca temin edilebilen kuvars kristalin elektrot yüzeylerine heparine karşı ilgisi ve seçiciliği bulunan polietilenimin polimeri immobilizasyonu yapılarak, heparin miktarının, akış sırasında ölçülmesidir. Heparin miktarının, akış sırasında ölçülebilmesi için heparin sensörü, akış hücresinin yanında kuvars kristal mikroterazinin (QCM) sıvı içinde çalışmaya devam etmesini sağlayacak osilatör devresi ve pic mikrodenetleyici ile yapılan frekans sayıcı devresi bu çalışma kapsamında yapılmıştır. QCM cihazı; kütle değişimine göre frekans değişimi vermektedir. Ters orantılı olan bu değişim, kristal yüzeyinde kütle miktarı artışında frekans düşümüne, kütlede azalma olduğunda frekans artışına sebep olmaktadır. Çalışmada bu ilkedan yararlanarak kristal gümüş elektrot yüzeyinin modifikasyonu ile heparin miktarı tespit edilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kalp Akciğer Makinası

Kardiyopulmoner baypasın (K.P.B.) temel görevi, kalbe gelen tüm venöz kanın K.P.B. devresinde toplanarak sistemik arteriyel ile dolaşıma geri verilmesidir. Bundan dolayı, gaz değişimi için akciğerin, kan dolaşımına gerekli enerjiyi sağlamak için de kalbin fonksiyonunu yerine getirebilmelidir.

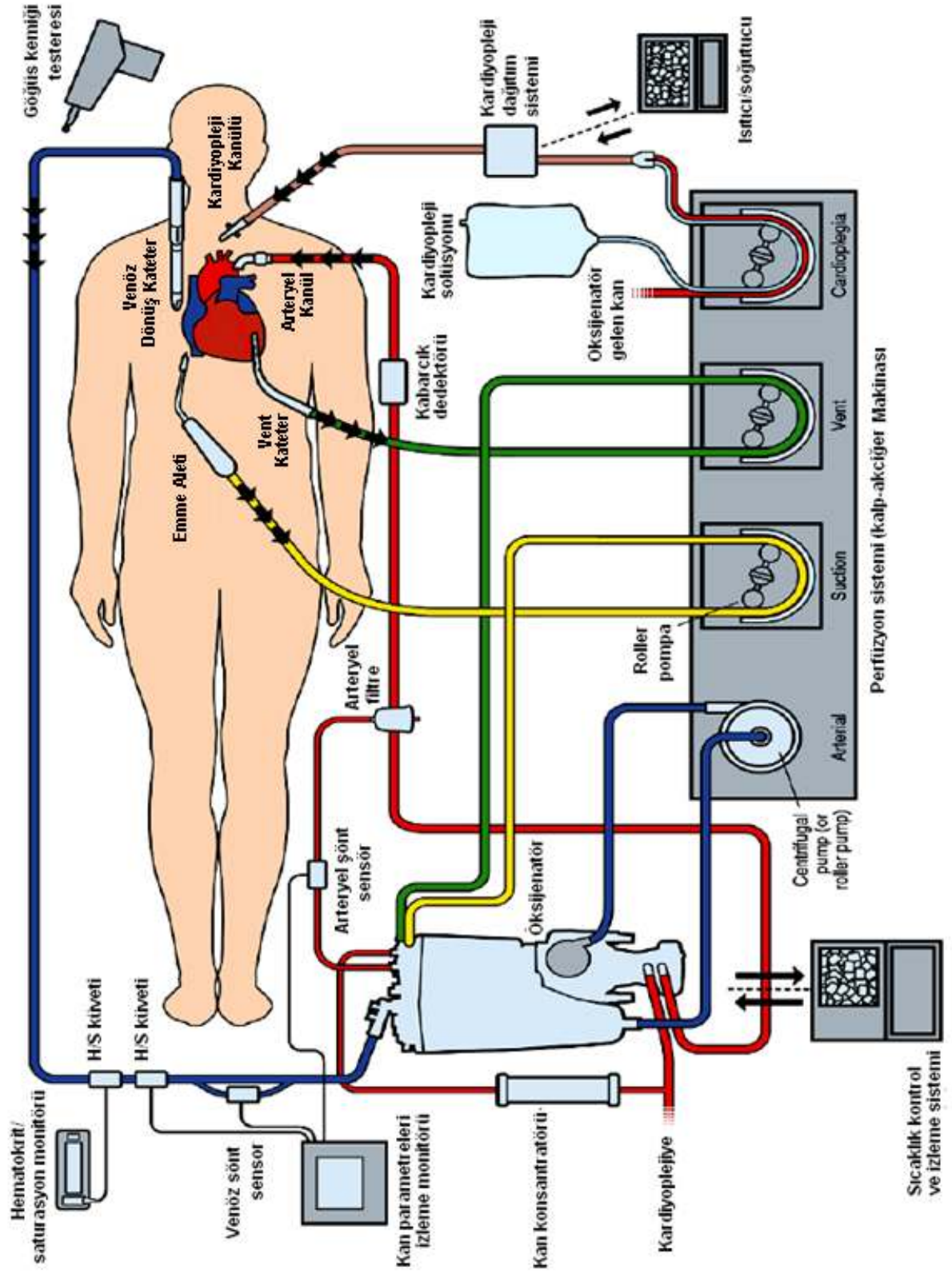
Temelde kalp-akciğer makinesi veya K.P.B. kalp ve akciğerin fonksiyonu olan kanın pompalanması ve ventilasyon görevini geçici olarak yapan aygıtlardır [1,2].

2.1.1 Kalp-Akciğer makinesi bileşenleri

Kalp-akciğer makinesinin temel bileşenleri: Bir veya birden fazla venöz kanül, venöz rezervuar, oksijenatör, ısı değiştirici, pompa, arteriyel hat filtresi ve arteriyel kanüldür. Makine ve makinede kullanılan malzemeler sentetik, polikarbonat, polivinilklorid, teflon, polietilen, paslanmaz çelik, silikon ve poliüretan gibi toksik etkisi olmayan malzemelerden yapılır.

2.1.1.1 Venöz kanüller

Venöz kanüller kanı, hastadan vücut dışı dolaşıma seviye farkı veya pompa-oksijenatör sistemi ile taşırlar. Aort kapak ameliyatları, sol ventrikül çıkış yolu ameliyatları, çıkan aorta ameliyatları ve koroner baypas cerrahisi ameliyatlarında tek kanül kullanılır. Sağ atriyum veya sağ ventrikül içinde çalışılacağı durumda iki kanül kullanılır. Venöz kanüller juguler ven, iliak ven, femoral ven ve vena kavalara direk olarak da konulabilir. Kanülün ucu büyük venlerin yarıçapının yarısından büyükse kanül etrafında venin zayıflamasından dolayı akış sınırlanır, bu durumda sağ atriya ulaşan uzun kateter tercih edilmelidir. Direk olarak veya kılavuz ile sağ atriya ulaşılabilir. Uzun süreli dolaşım desteği veya solunum desteğine ihtiyaç olduğu durumda da periferik kanülasyon tekniği kullanılır. Perfüzyon sırasında, santral venöz basınç 15 mmHg'nin altında olmalı, ince duvarlı venler yıgılma oluşturup akımı sınırlayabileceğinden negatif basınç oluşturulmamalıdır.



Şekil 2.1 Vücut dışı (ekstrakorporal) dolaşım [3].

2.1.1.2. Venöz rezervuar

Kan venöz hattın oksijenatör sistemine geçerken polimerik bir malzeme olan venöz rezervuarda toplanır. Venöz rezervuar torba ve sert venöz rezervuar olmak üzere iki temel tipte bulunur [4].

2.1.1.3 Oksijenatör

Oksijenatör, akciğer gibi oksijen ve karbondioksit değişimi yapan cihazlardır. Bubble ve membran oksijenatör olmak üzere iki tip oksijenatör vardır. Bubble oksijenatörlerde oksijen direkt olarak sistemik venöz kanla difüzyon sahasında karşılaşır. Difüzyon sahasında kanın içinde binlerce küçük oksijen kabarcıkları oluşur. Gaz değişimi hava kabarcıkları etrafında oluşan ince film tabakasında meydana gelir. Karbondioksit kabarcık içine diffüze olur oksijen ise kana geçer. Karbondioksit, oksijene göre plazmaya 20 kez daha hızlı difüze olur [5].

Membran oksijenatörlerde ise gaz, kan ile direk temas etmez. Silikon veya poliprolen fiberler vasıtasıyla kanda gaz değişimi yapılır.

Membran oksijenatörlerde kana verilen dakikadaki oksijen miktarı yaklaşık 400 ml. iken; akciğerde bu değer 2 litredir. Kandan CO₂ alma hızı bubble ve membran oksijenatörde yaklaşık 350 ml. iken; bu değer akciğer için 1,6 litredir.

Günümüzde yaygın olarak membran oksijenatörler kullanılmakta ve bubble oksijenatörler artık kullanılmamaktadır. 100 m² olan akciğerin kan-gaz değişim alanına ne kadar yaklaşılabiliyorsa membran oksijenatörlerdeki kan-gaz değişiminde basınç azalacak, kan travması ve diğer komplikasyonlar minimuma indirilebilecektir [6].

2.1.1.4 Isı değiştirici

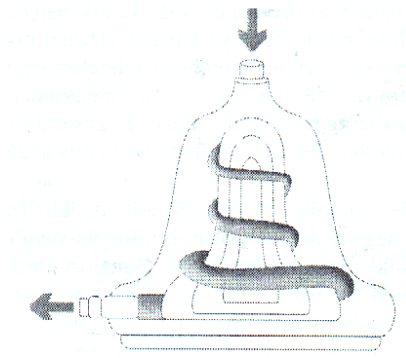
Kardiyopulmoner baypas sırasında vücut ısısının kontrolü ısı değiştirici ile yapılmaktadır. Isı değiştiricinin içinde 1°C ile 42°C arasında su dolaşmaktadır. Kan 42°C nin üzerine ısıtılırsa kan proteinleri hasar görür. Kanın hastadan ayrıldığı ve girdiği yerdeki ısı farkından dolayı soğuma genelde ısınmadan hızlı olur. Yetişkinde soğuma sırasında ısı dakikada 0,7-1,5°C azalır. Isınma sırasında ise dakikada 0,2-0,5°C arasında artar [7].

2.1.1.5 Pompalar

Kardiyopulmoner baypasta roller ve santrifüj pompa olmak üzere iki tip pompa kullanılır. Roller pompalar 180 mmHg basınca kadar kanı hattan atabilir. Böylece devamlı kan akışı sağlanır. Roller pompalar güvenli, ucuz ve kullanımları kolaydır. Çıkış hattında direnç oluşmadığı sürece kan akışı etkilenmez [5,7].

Santrifüj pompalar hızlı dönen koni şeklinde bir çark içerir, bu çark kanı yüksek hızla çevirir ve kan pompanın çıkışına ulaşır (Şekil 2.2). Santrifüj pompalarla roller pompalar karşılaştırılırsa:

- 1.Santrifüj pompalarda geçici tıkanıklık olsa bile yüksek geri basınç oluşmaz.
 - 2.Santrifüj pompalarda tüp basıncı olsa bile geniş gaz embolileri oluşmaz.
- Kardiyoplejik solüsyon vermek için roller tip pompalar kullanılır.



Şekil 2.2 Santrifüj Pompa

2.1.1.6 Filtreler

Kan filtreleri, partikülleri ve gaz embolilerini engeller. Arteriyel hat filtreleri bubble oksijenatör sisteminde kullanılmalıdır. Arteriyel filtreler naylon veya polyesterden yapılan, 25-40µm. gözenek büyüklüğü, 600-800 cm² yüzey alanı olan filtrelerdir. 200 ml ön hacim gerektiren filtrelerin akış miktarı 7 lt/dk, filtre içindeki basınç farkı 30 mmHg'dan azdır.

2.1.1.7 Kanüller

Kanüller, perfüzyon sistemi ile hasta arasında bağlantıyı sağlarlar. Perfüzyon devresinde kullanılan kanüller, arteriyel, venöz, antegrad kardioleji ve retrograde kardiolejiyi kapsar. [3]

2.1.1.8 Kardiyotomi aspiratör sistemi

İki sukker, konneksiyon tüpü, roller pompa, filtre ve rezervuar ünitesi kullanılır, operasyon sahasındaki kanın tekrar dolaşıma katılması sağlanır. Hava-kan teması ve aspirasyon sistemindeki turbulansdan dolayı hemoliz oluşur. Aspirasyon esnasında debrisler oluşacağından filtre kullanmak zorunludur [8].

2.1.2 Kalp-Akciğer makinesinin kurulması

Baypas başlamadan 30-45 dk. önce kalp-akciğer makinesi kurulur. Sistem kristaloid solüsyonla doldurulur. Birkaç dakika sirküle edilir ve sistemdeki havalar çıkarılır. Solüsyon dolaşımı sırasında, sistem kaçakları, monitörler ve oluşabilecek problemler kontrol edilir.

2.1.2.1 Önhacim

Yetişkinlerde, vücutdışı dolaşım sırasında yaklaşık olarak iki litre önhacim gereklidir. Hematokrit (Htc) %20-25 arasında tutulur. Bazı cerrahlar tarafından daha düşük ısıda, daha düşük hematokrit tercih edilir.

Yenidoğan ve küçük çocuklarda oransal olarak önhacim miktarı fazla olduğundan sıklıkla önhacime kan ilave edilir. Yenidoğanda minimum önhacim miktarı yaklaşık 800 ml. dir. Perfuzat pH'ı 7,4 olana kadar bikarbonat ilave edilir.

Kardiyopulmoner baypas sırasında düşük hemodilüsyonun avantajları:

1. Operasyon için daha az kana ihtiyaç duyulması sonucu serum hepatit ve viral patojenlerin bulaşma riski oransal olarak azalır.
2. Dolaşımda daha az kan olduğundan kan hücresi ve kan proteinlerinin travması azalır.
3. Hemodilüsyon idrar volümünü ve Na, K ve kreatinin klirensini artırır, oligüri ve akut tubuler nekroz insidansı hemodilüsyonda daha azdır.
4. Kanın viskozitesi azalınca kısmen daralan damardan arteriollere ve kapillere geçiş kolaylaşır.

2.1.3 Antikoagülasyon

Kardiyopulmoner baypas kuvvetli bir trombotik stimulustur. Heparin, koagülasyon döngüsünün sonlarına yakın etki gösterir ve herhangi bir basamakta artan

enzimatik reaksiyon serisini bastırmakta yetersizdir. Bu inhibisyon yetersizliği kardiyopulmoner baypas sırasında kuvvetli, serin-proteaz üretimine neden olur [9].

Heparin AT-III'ü aktive eder, AT-III de trombini inhibe eder ve pıhtılaşma önlenir. Heparin, subkütan veya intravenöz (IV) olarak verilir. İntravenöz injeksiyondan sonra yarılanma ömrü 60-90 dk'dır.

Heparin, protaminle birleşince kompleman aktivasyonu için önemli bir uyarandır. Protamin reaksiyonu olarak değerlendirilen kan basıncının düşmesi ve sağ kalp basınçlarının yükselmesinin temel sebebi budur [10].

Aktifleşmiş pıhtılaşma zamanı (ACT) en yaygın kullanılan takip testidir. İlk doz heparinden (300U/kg) sonra genelde ACT bakılır. Kardiyopulmoner baypasa ACT değeri 400 sn üzerine çıkmadan başlanılmaz. Her 30 dakikada bir ACT değeri kontrol edilir, gerekirse heparin ilave edilir.

2.1.3.1 Heparin

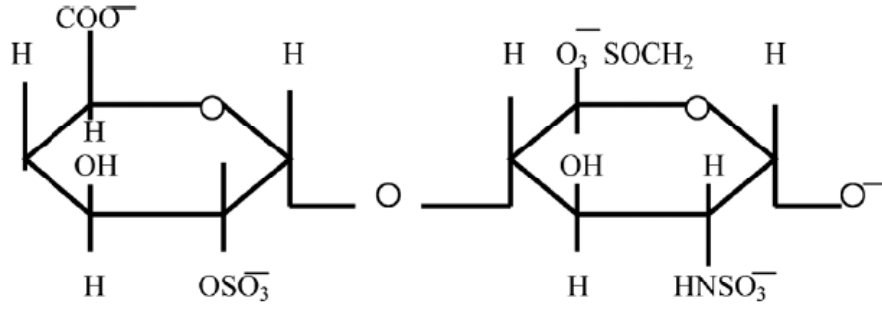
Heparin, böbrek diyalizi gibi cihazlarda kanın vücut dışı dolaşımı sırasında, diyaliz membranı gibi yabancı yüzeylere temas sonucu kanın pıhtılaşmasını önlemek için kullanılır. Kanın cihaz içerisinde dolaşımı sırasında pıhtılaşmayı engelleyecek dengede olması önemlidir ve aşırı heparinizasyon ile uzun süreli kanama riskleri hastada ortaya çıkabilir[11].

Heparin glikozaminoglikanların heterojen grubundan oluşan bir antikoagulandır.

Heparin içerisindeki ana şekerler[12]:

- . a-L-iduronik asit 2-sülfat,
- . 2-deoksi-2-sulfamino-a-D-glukoz 6-sülfat,
- . b-D-glukuronik asit,
- . 2-asetamido-2-deoksi-a-D-glukoz,
- . a-L-iduronik asit.

Heparin içerdiği kovalent bağlı sülfat ve karboksil asit grupları nedeniyle kuvvetli bir şekilde asidiktir.



Şekil 2.3 Tek bir ünitelik parçalanmamış heparinin kimyasal yapısı [13].

Heparin moleküler boyut ve farmakokinetik özellikleri açısından heterojendir ve sadece bir heparin molekülünün üçte biri antikoagülan özelliklere sahiptir. Heparinin, molekül ağırlığı 3000 ve 30000 arasında değişmektedir[14]. derin ven trombüs tedavisinde standart tedavi olarak heparin kullanılmaktadır. [15]. Heparin aynı zamanda diyaliz sistemlerinde ve kan oksijenatörleri gibi ekstrakorporeal tedavilerde kullanılır[16].

2.1.3.2 Protamin

Kardiyopulmoner baypas sonlandırılıktan sonra her 100 U heparin için 1 mg protamin verilir ve heparin nötralize edilir. Heparin-protamin kompleksi kompleman aktivasyonuna neden olur, hastaların yaklaşık %30-40'ında geçici hipotansiyon olur ve kardiyak output düşer. Kompleman aktivasyonu, bazofil ve mast hücre uyarımı kapiller permeabiliteyi artırarak vazodilatasyona, sonuç olarak da kardiyak fonksiyon bozukluklarına sebep olur [11].

2.1.3.3 Akış miktarı ve basınçlar

Kardiyopulmoner baypas sırasında, 37°C de anestezi almış yetişkinlerde metabolik asidozdan kaçınmak ve yeterli metabolik ihtiyaçları karşılamak için dakikada m² için 2,2 litrelik akış miktarı yeterli olur.

Mikrosirkülasyon perfüzyonu için güvenli sınır 37°C de akış miktarı 2.5 l/m²/dk olarak kullanılır.

Ortalama arteriyel basınç normotermik kardiyopulmoner baypasta genelde 50-70 mmHg arasında tutulur. Ortalama basıncın 45 mmHg' nın altına inmesiyle nörolojik

problemler arasında doğru orantı bulunmuştur. Orta derecede hipotermide ortalama kan basıncı 35 mmHg'nın üzerinde olması yeterlidir. Kardiyopulmoner baypas sırasında ortalama kan basıncının artırılması akış miktarının artırılmasıyla da sağlanabilir ve dakikada m² başına 2,2 litrenin üzerine çıkılabilir.

2.1.3.4 Isı

Düşük vücut ısısında, metabolik aktivite ve O₂ tüketimi azalır. Vücut ısısında 10°C'lik azalma O₂ tüketimini %50 azaltmaktadır. Kardiyopulmoner baypas sırasında orta derecede hipotermi avantajları vardır. Oksijen tüketimi azalır, laktat üretimi ve metabolik asidoz olmadan akış miktarı azaltılabilir. 28°C'nin altında akış miktarı dakikada m² başına 1,6 litre olarak 2 saatten fazla güvenle kullanılır [10].

2.1.3.5 Açık kalp ameliyatlarında heparin-protamin miktarının önemi

Antikoagülasyon, açık kalp cerrahisi açısından son derece önemlidir. Heparinin keşfi ve klinik uygulamaya girmesi kardiyopulmoner baypas teknolojisini uygulanabilir hale getirerek modern kalp cerrahisinin başlamasını sağlamıştır [17]. Böylece yabancı yüzeyle temas eden kanda pıhtı oluşması önlenebilmiştir. 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 baypasın ve ısı değişikliklerinin de bu sistemler üzerine etkilerinden dolayı henüz tam olarak açıklanamayan noktalar bulunmaktadır. Heparinin vücuttan eliminasyonu da düzenli bir olay değildir.

Uzun yıllar heparinin vücuttaki antikoagülan etkilerini belirlemede aktif pıhtılaşma zamanı (ACT) ve tam kan pıhtılaşma zamanı kullanılmıştır. Ancak bunlar her zaman güvenli sonuç vermemişlerdir. Son yıllarda ise kan heparin düzeylerinin ölçümü, bu düzeyin pompa süresince idame ettirilmesi ve heparin nötralizasyonunda heparin/protamin titrasyonu klinik uygulamaya girmeye başlamıştır.

Heparin etkilerini nötralize etmede kullanılan, protamin uygulamasının beraberinde getirdiği birçok riski vardır ve açık kalp cerrahisinin en tehlikeli devresi olarak protamin uygulaması görülmektedir [18,19]. Ayrıca yüksek protamin dozunun da antikoagülan etkisi vardır [20].

Kardiyopulmoner baypas, kanın damar dışında yabancı yüzeylerle temas etmesinden dolayı kuvvetli bir trombotik etki yaratır, bu nedenle yeterli antikoagülasyon sağlanmadan uygulanması mümkün değildir.

Heparinin antikoagülan etkinliğini değerlendirmede halen en sık olarak ACT kullanılmaktadır. Heparin sensitivitesi kişiler arasında değişiklikler gösterebilir [20]. Bu nedenle heparinin antikoagülan etkinliğini değerlendirmede ACT'den yararlanılır. ACT değeri birçok çevresel faktörden etkilenebilmektedir, bu nedenle her zaman doğru sonuçlar vermeyebilir. Geçmiş yıllarda pompaya başlamak için ACT değerinin 500 sn. üzerine çıkarılması önerilmesine rağmen bugün 400 sn. üzeri yeterli görülmektedir. Böylece hem uygulanan heparin ve protamin dozları azalmış, hem de bunların neden olabildiği yan etkilerde azalma sağlanmıştır. ACT değerini 400 sn. altına düştüğü durumlarda heparin ilave edilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda heparinle sağlanan antikoagülasyonun değerlendirilmesinde ACT ile birlikte plazma heparin düzeylerinin ölçümünün daha güvenli olduğu bildirilmektedir. Bu yöntemle hastanın boyu, kilosu ve istenen ACT değeri cihaza girilerek bu değeri sağlamak için gerekli plazma heparin düzeyi ve ne kadar heparin yapılması gerektiği belirlenmektedir. Böylece gereğinden fazla heparin yapılması önlenmektedir.

Pompa sonrası kan alınarak kandaki heparin düzeyi belirlenerek bunu nötralize etmek için gerekli protamin dozu hesaplanarak uygulanmaktadır. Vertress ve arkadaşları, Hill ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında bu yöntemle uygulanan heparin dozlarında belirgin farklılık olmadığı halde bunu nötralize etmek için kullanılan protamin dozlarında belirgin azalma sağlandığını bildirmişlerdir [20-23].

Protamin uygulaması sonucu heparin-protamin kompleksleri oluşmakta ve bu kompleksler, kompleman sistemini aktive edebilmektedirler. Böylece

vazodilatasyon, hipotansiyon, kardiyak disfonksiyon, kapiller permeabilite artışı ve histamin salınımı olmaktadır [24, 25]. Nadir de olsa bazı vakalarda protamin, plateletlerden tromboksan A2 salınımına neden olarak şiddetli pulmoner vazokonstriksiyona neden olur. Bu durumda reheparinizasyon uygulanarak tekrar KPB desteği gerekebilir [26].

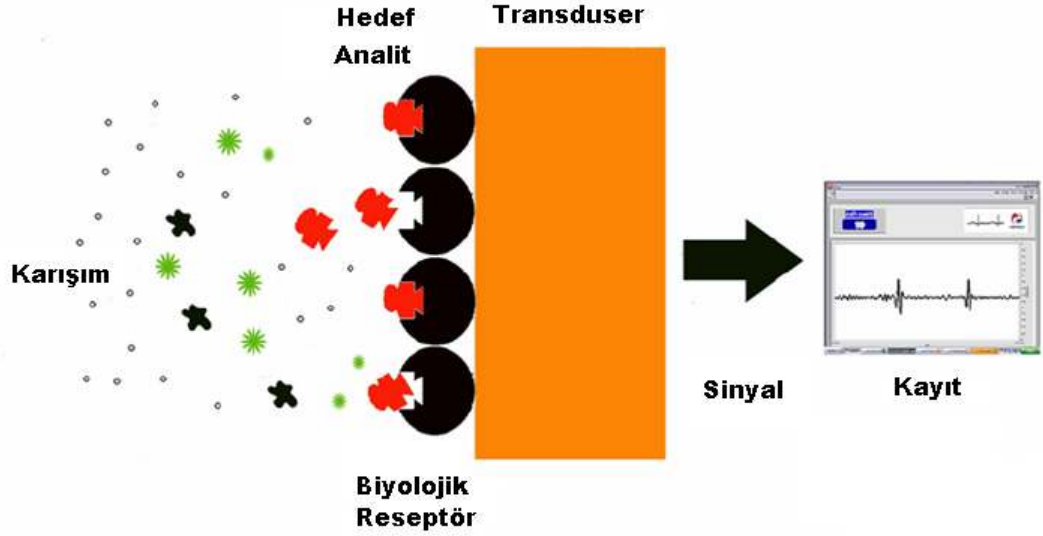
Heparin, dolaşımda protamine göre daha yavaş elimine olması nedeniyle protamin uygulamasından sonra "heparin rebound" denilen antikoagülasyon durumu gelişebilir. Bu etki genelde ilave doz protaminle önlenir. Yüksek dozlarda protamin uygulamasının kendisi de antitrombotik etki yaratabileceğinden postoperatif gelişen kanamalarda akla gelmelidir [20]. Protaminin fazla uygulanması ameliyat sonrası dönemde daha fazla kan ve kan ürünleri kullanımı gerektirebilmektedir.

Sonuç olarak KPB sırasında heparinin antikoagülan etkinliğini değerlendirmede heparin doz cevap eğrisinin belirlenerek buna göre heparin yapılmasıyla hem yetersiz antikoagülasyon gelişmesi, hem de aşırı dozda heparin yapılması önlenebilmektedir. Pompa sonrasında Heparin/Protamin titrasyonu ile gerekli protamin dozlarının hesaplanarak yavaş infüzyon şeklinde verilmesi protamin uygulamasının yol açabildiği birçok istenmeyen etkiyi ortadan kaldırılabilecektir.

Tez kapsamında tasarlanan ve deneylerde kullanılan akış hücresi ve kuvars kristal mikterazi heparin biyosensör ile akış anında heparin ölçümü yapılması mümkün olacaktır yani hastadan alınan hasta kanının tekrar bir cihaza yerleştirilmesine ya da manuel işlemlere gerek kalmadan heparin ölçümü yapılabilecektir. Bu yöntem ile dolaylı bir yol olan ACT ölçümünden daha hızlı ve direk heparin ölçümüne yönelik sonuç elde edilmektedir.

2.2 BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, enzimler, antibadiler, nükleik asitler, dokular, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri gibi biyolojik bir materyal ile biyolojik olarak elde edilmiş malzemeler veya biyomimetik malzeme ile birleştirilmiş veya beraber çalışan fizikokimyasal dönüştürücü veya mikrosistem analitik cihazlardır [27].



Şekil 2.4 Biyosensör genel gösterimi [28].

Biyosensörler, ilaç, çevre, gıda, güvenlik ve savunma sanayi gibi çok çeşitli analitik problemlere uygulanmıştır. Günümüzde, terörle mücadelede, yüksek hassasiyette ve hızda patlayıcı maddelerin algılanmasına yönelik yapılan çalışmalar vardır.

Genel olarak doğal su, kan, idrar vb. karmaşık analitiklerin içinde son derece seçici moleküler tanımaya ulaşabilmek için analit içindeki birçok molekül ile rekabet edebilmek gerekir. Bu durumda biyolojik malzeme ile moleküler tanımda seçicilik anahtar-kilit modeli ile sağlanır.

Hedef analitin, moleküler tanımından sonra optik, elektrokimyasal, piezoelektrik (akustik), termometrik veya manyetik bir dönüştürücü ile sinyalin oluşturulması gerekir. Elektrokimyasal dönüştürücüler, elektrotlarındaki bu biyokimyasal bilgileri kimyasal reaksiyonlar ile elektrik sinyaline dönüştürülür (Şekil 2.4) [29].

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

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

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

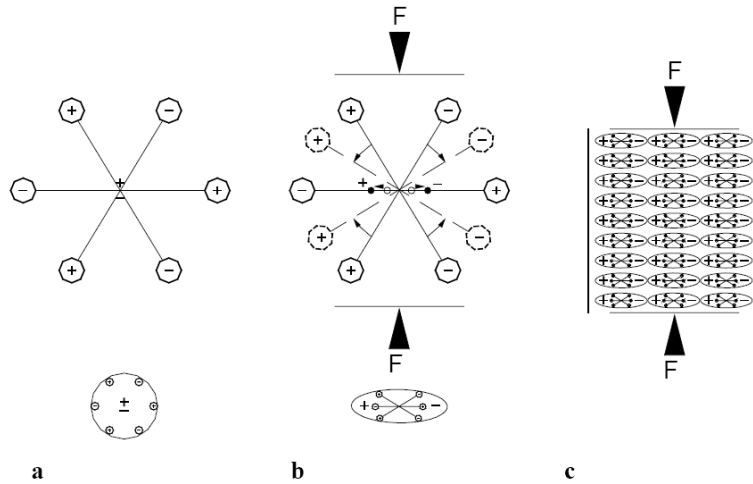
2.2.1 Heparin biyosensörler

İyon duyarlı alan etkili transistorler (ISFET) iyon-basamak yöntemiyle protamin affinite ligandı heparin konsantrasyon probu olarak endirek kullanılmıştır. Bu sensorun kullanım aralığı 0,1 ile 2.0 U/ml. ve ölçüm doğruluğu 0.08 U/ml. idi. Fakat immobilize protamin Ta₂O₅-ISFET yüzeyini tamamen kaplamıyordu ve kan plazması Ta₂O₅ yüzeyi için affinite gösteriyordu, yüzeye tanımlanamayan tutunmalar engellenemedi ve en düşük limit heparin tanımlaması 0.25 U/ml. olarak kalmıştır [30]. Yüzey Plasmon Resonans (SPR) temelli protamin veya polietilenimin ile kaplanmış heparin biyosensörleri yakın geçmişte gerçekleştirilmiştir [31]. Gerçekleştirilen sistemin ölçüm aralığı 0.1-2 U/ml aralığında, %11 hata ile ve 0.05 U/ml. doğruluk ile ölçüm yapmaktadır. Lewinsk, bakır oksit ile modifiye amperometrik sensör ile heparin miktar tayini yapmıştır. Tepki süresi oldukça hızlıdır ve ölçüm aralığı gereksinimi karşılamaktadır fakat fizyolojik Ph da ölçüm yapamamaktadır. Yakın geçmişte yapılan bir çalışmada iyon kanal temelli elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Ölçüm aralığı 0.0025-0.375 U/ml arasındadır [32] Direk heparin miktar tayini modifiye membranlarda iyon seçici elektrodlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir fakat bu yöntemde ölçüm aralığı 1.0-9.8 U/ml aralığındadır [33-34]. Klinik kullanımdaki uygulamalarda tedavi edici doz 0.2-0.7 U/ml olması nedeniyle kullanılması mümkün değildir. Bilimsel katkıları dışında günümüze kadar yapılan çalışmalar klinik kullanıma yeterince katkı sağlamamıştır dolayısıyla tam kandan sürekli ve gerçek zamanlı heparin ölçebilen sensörlerin geliştirilmesine yönelik gereksinim oldukça fazladır.

2.2.2 Piezoelektrik etki

Piezoelektrik kelimesi Yunanca' da, "basınç ile elde edilen elektrik" anlamına gelmektedir[35]. Bu isim 1881 yılında Hankel tarafından Pierre ve Jacques Curie kardeşlerin buluşundan bir sene önce önerilmiştir [36]. Cruie kardeşler kristalin farklı yönler büküldüğü zaman, önceki simetri durumuna göre kristal yüzeyinin çeşitli bölümlerinde pozitif ve negatif yükler oluştuğunu gördüler.

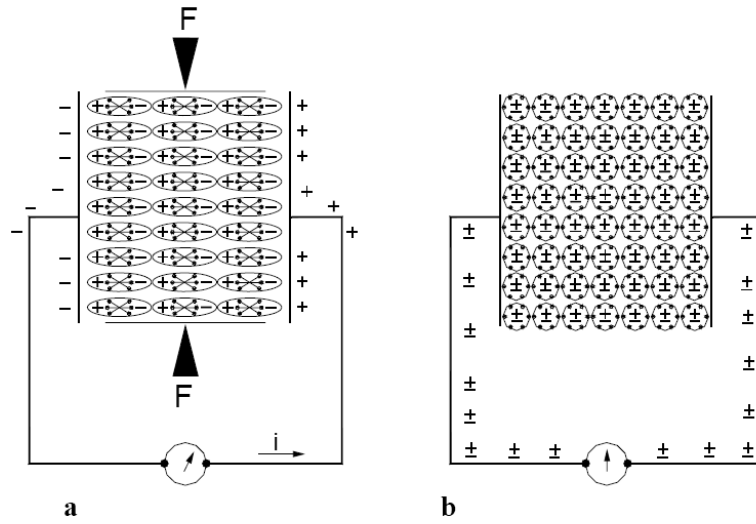
Şekil 2.5a' da malzeme üzerine uygulanan kuvvetin sonucu olarak bir elektriksel yük oluşumunun açıklandığı basit bir kristal molekül modeli görülmektedir. Kristale kuvvet uygulanmadan önce, her bir molekülün negatif ve pozitif yüklerinin merkezleri dengededir. Bu nedenle, negatif ve pozitif yüklerin dış kuvvetleri karşılıklı olarak iptal edilir. Sonuç olarak, bir elektriksel nötr molekül görünür. Malzemeye kuvvet uygulandığında, iç yapısı deforme olur ve moleküllerin pozitif ve negatif ağırlık merkezleri ayrılarak küçük dipoller (Şekil 2.5b) oluşur. Malzeme içinde karşılıklı bakan kutuplar iptal edililerek malzemenin yüzeyinde (Şekil 2.5c) bağlantılı bir yük dağılımı görünür. Yani, malzeme polarize olmuştur. Bu polarizasyon bir elektrik alanı oluşturur. Mekanik enerji, malzemenin deformasyonuna bağlı olarak elektrik enerjisine dönüştürülür.



Şekil 2.5 (a) Piezoelektrik etkiyi açıklayan basit bir molekül modeli, **(b)** dış kuvvet uygulanan molekül, **(c)** polarizasyon etkisi.

Piezoelektrik malzeme Şekil 2.6'de görülmektedir. Yüzey üzerinde iki metal plaka elektrot olarak, ters işaretli yüklerin bağlanması için kullanılır. Bu elektrotlara

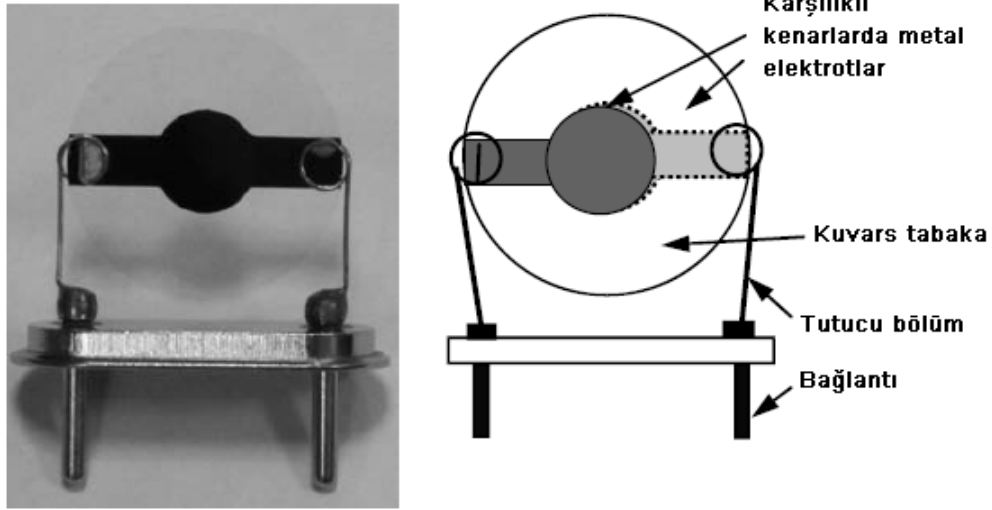
dışarıdan bir tel aracılığıyla kısa devre yapıldığı ve bir galvanometre bağlandığı kabul edilirse, piezoelektrik malzemeye kuvvet uygulandığında, elektrotlar ile temas eden kristal yüzeylerinde bağlantılı bir yük yoğunluğu oluştuğu görülür. Bu polarizasyon, iletkende elektrik akımına sebep olan bir elektrik alanı oluşturur. Bunların işaretine bağlı olarak serbest yükler kristalin kutuplaşması ile üretilen yükler, ters işarete doğru hareket ederler. Serbest yüklerin bu akışı, (Şekil 2.6a) polarizasyon etkisi serbest yükler tarafından nötralize olana kadar devam eder. Kristal üzerindeki baskı durduğu zaman, polarizasyon kaybolur ve serbest yüklerin akışı ilk başlangıç durumuna dönene kadar ters yönde devam eder.(Şekil 2.6b). Bu süreç galvanometre ile takip edilebilir. Eğer kısa devre yerine bir direnç bağlanır ve değişen basınç uygulanırsa, akım direnç üzerinden geçtiğinde mekanik enerji elektrik enerjisine dönüştürülmüş olacaktır.



Şekil 2.6 (a) Dışarıdan bir etki uygulandığında kısa devre aracılığıyla nötralize akımı, **(b)** bir basınç uygulanmadığı durumda akım geçişi görülmecektir.

Curie kardeşlerin bu buluşundan sonra Lippmann tarafından tersine sürecin varlığı bir yıl sonra (1881) doğrulanmıştır [37]. Yani, piezoelektrik etki elektrik yüklerin üretimine ve bunun sonucu olarak strese ve yasalara belirli malzemelerde bağlı kalarak bir elektrik alanının benzer şartlarda uygulanmasıyla bu malzeme üzerinde şekil değişikliğine sebep olacaktır. Bu anlamda, piezoelektrik malzeme elektrotları arasına gerilim uygulandığında mekanik bir deformasyon oluşacaktır.

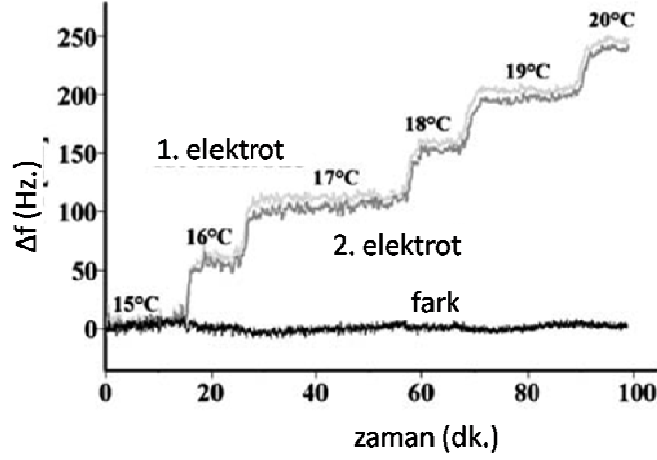
2.2.2.1 Kuvars kristal mikroterazi biyosensörler ve özellikleri



Şekil 2.7 Piezoelektrik kuvars kristal ve şematik gösterimi [38].

Kütle hassas özellikleri kuvars kristal mikroterazileri, kimyasal algılamada güçlü hale getirmektedir. Kesme açısı (AT-kesim) frekansın, sıcaklığa bağımlılığını optimize etmek için önemlidir. Gaz fazında bu koşul sağlanmaktadır. Ancak sıvı fazda biraz daha farklı bir görüntü vardır: Sauerbrey denklemi sadece elektrot yüzeyinde ideal sonsuz ince, sert bir film tabakası için geçerlidir. Gaz fazında, gerçek sistemde ideal olandan sapmalar, genellikle ihmal edilebilir. Ancak sıvılarda, viskozite nedeniyle daha farklı işlem yapmak gerekmektedir. Bunun bir nedeni Şekil 5' te, her iki yüzünde elektrot bulunan 10 MHz QCM suya batırılır ve elektrot sinyalleri 15-20°C sıcaklık değişimi için gösterilmiştir. Grafikte, her 1°C sıcaklık değişimi için ortalama 40 Hz. frekans kaymasına neden olmaktadır. Bu değer gaz fazı ölçümlerinde beklenenin çok daha üzerindedir. Bu durumun temel etkisi sıvı viskozitesinin yüksek sıcaklık bağımlılığından kaynaklanmaktadır: kuvars kısmen çevresindeki sıvı tabaka ile etkileşimdedir ve salınım sırasında sıvıyı beraberinde sürükler. Bu nedenle rezonans, malzeme içine yayılır ve hareket eden kuvars yüzeyi elastik olarak yavaşlar bu durum viskoz ortamın içerisinde hareket eden herhangi bir nesne için önceden beklendiği gibidir.

Çizelge 2.1 İki elektrotlu sistemde tek yüzeyleri sıvı ile etkileştirilen kuvars kristal mikroterazilerin 15-20° C arasında frekans değişimleri.



Bu durumda frekans kayması ve elektronik sönümde değişim ile sonuçlanır: yüksek viskozite, daha büyük negatif frekans değişimi ve kuvars üzerinde sönümlenme olur. Son olarak, bu durum sıvı fazda QCM için sıcaklık bağımlılığının çok belirgin nedenidir [39].

2.2.2.2 Sauerbrey Denklemi

Sauerbrey eşitliği 1959 yılında G. Sauerbrey tarafından piezoelektrik kristalların üzerine bağlanan kütlenin değişimini osilasyon frekansı ile korele etmek amacıyla oluşturulmuştur. [40]

Sauerbrey denklemi:

$$\Delta f = f_c - f_o = -\frac{2f_o^2 \Delta M}{A(\rho_q \mu_q)^{1/2}} \quad (2.1)$$

f_c = Kuvars kristal ve yüzeyde oluşan film tabakası ile birlikte osilasyon frekansı,

f_o = Kuvars kristal rezonans frekansı,

ΔM =Eklenen kütle,

ρ_q =2,648 g/cm⁻³ kuvars kristal yoğunluğu,

μ_q = 2.947x10E11 g/cm.s² AT kesim kuvars kristal için shear modulus katsayısı

$\Delta f = f_c - f_o$ =frekans değişimi

A =Kuars kristal yüzey alanı

Sauerbrey denklemi; K bir sabit sayı olacak şekilde yazılırsa,

$$\Delta m = -K \cdot \Delta f,$$

$$\Delta f = f_c - f_0, \text{ için}$$

$$\Delta m = Kx(f_0 - f_c) \text{ olacaktır,}$$

Kütle artışı (Δm) durumunda, eşitliğin her iki tarafının bozulmaması için (f_0 , sabit), f_c frekans değerinin azalması gerekmektedir. Dolayısıyla kütle artışına göre frekansta azalma görülecektir.

Sauerbrey denkleminin kuvars kritical sensörlerde uygulanabilmesi için üç şartın sağlanması gerekmektedir.

- 1- Ölçümü yapılacak kütle katı olmalıdır,
- 2- Kuvars kristal yüzeyinde homojen olarak dağılmış olmalıdır,
- 3- Frekans değişimi, $\Delta f / f < 0.02$ olmalıdır.

2.2.2.3 Frekans ölçümü için izlenen yöntem

Kuvar kristallerin frekans ölçümünde ucuz ve kolay temin edilebilir olmalarından dolayı kristal osilatör devreleri kullanılmaktadır.

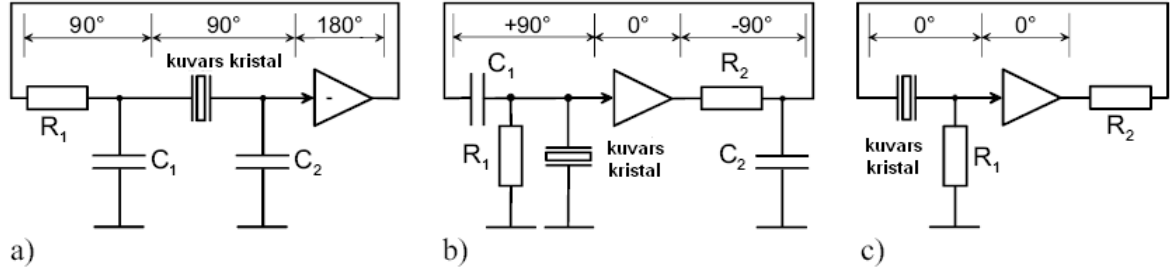
2.2.2.3.i Piezoelektrik kristal osilatör devreleri

QCM sensör arayüz uygulamaları için osilatör devrelerinin kullanımı en yaygın yöntemdir. Kuvars kristal bir rezonans elemanı olduğundan, oldukça basit devrelerle kararlı osilasyon elde edilebilir. Osilatör devreleri, dijital sistemlerde frekansı kolayca işlenebilen analog çıkış sinyali verirler. İki osilasyon koşulu, yaklaşık doğrusal davranış kabulü ve ön-salınım süreci göz önünde bulundurulmadan formüle edilebilir:

Genlik durumu: $|kA| \geq 1$

Faz durumu: $\varphi = 0, 2\pi, \dots, n2\pi$

A açık kazanç ve k ise geri besleme faktörüdür. Elektronik devre osilasyonun sönümünü engellemek için tekrar uyarı sağlamalıdır. Stabil osilasyon elde edebilmek için osilatör devresi keskin faz eğimi oluştuğunda kuvars kristali uyarmalıdır.



Şekil 2.8 (a) Eviren yükselteçli osilatör devresi, **(b)** colpitts osilatör, **(c)** evirmeyen yükselteç devresi.

Şekil 2.8'de iki basit osilatör prensibi görülmektedir. Şekil 2.8(a)'da Pierce osilatör eviren yükselteç olarak kullanılmaktadır bu durumda 180° faz geri beslemesi, geribesleme devresi (R_1 , C_1 and quartz crystal, C_2) tarafından faz durumunu tamamlamak amacıyla 360°'ye kaydırılmalıdır. Şekil 2.8(b), Colpitts osilatör gibi bir çalışma prensibi ile yüksek kaliteli endüktans gibi davranan kuvars kristal üç nokta arasında bir kapasitif bağlantı oluşturur. Osilatör prensibinde, endüktif davranan kuvars genellikle paralel rezonans osilatörü adını alır. Şekil 2.8(c), osilatör devresinde evirmeyen yükselteç gibi davranan osilatör faz koşulunu yerine getiren seri rezonans osilatörü gibi davranır [41].

Kuvars kristal mikroterazide kütle değişimi ile oluşan frekans değişiminin görülebilmesi amacıyla birçok osilatör devresi denenmiş fakat akış hücresi içerisinde tek elektrot sıvı ile temas halindeyken sadece colpitts osilatör ile başarılı sonuç alınmıştır. Bu durumda 12 MHz. lik colpitts osilatör devresi kurularak daldırma ve kurutma yönteminde, havada alınan ölçümlerde ve akış hücresi deneylerinde kullanılmıştır.

2.2.3 İmmobilizasyon yöntemleri

Kuvar kristaller üzerinde her hangi bir işlem yapabilmek veya bir ligand immobilizasyon işlemine tabi tutabilmek için öncelikle kuvars kristallerin elektrotları

üzerinde temizleme, aktivasyon ve fonksiyonel grupların immobilizasyonu gerçekleştirilmelidir. İmmobilizasyon yöntemleri bu bölümde non-kovalent (zayıf bağlar) yöntemler ve kovalent yöntemler olarak incelenmiştir.

2.2.3.1 Non-Kovalent (zayıf bağlar) yöntemler

Antikor immobilizasyonunda en kolay yöntem fiziksel adsorpsiyondur. Bu, antikorun yüzeye basitçe eklenmesi ve adsorpsiyonu için beklenilmesi ile gerçekleşir. Antikorlar yüzeye, van der Waals, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler yoluyla bağlanırlar. Kükürt uçları ile tiyol-altın etkileşimleri antikorlar üzerinde önemli bir rolü bulunmaktadır. Bu yöntemin protein tanım/biçim ile ilgisi yoktur fakat bazı özellikleri rastgele yönelim nedeniyle kaybolmaktadır. Yüzeyden protein kaybının hızı büyük ölçüde pH ve sıcaklık değişimlerine bağlıdır. Bu sebeple antikor yüzeyinin tekrar oluşturulması mümkün olmadığından, yüzeyin yeniden kullanılması ve kaotropi oluşturulması mümkün değildir.

Makromoleküllerin moleküler ağırlıkları genellikle yaklaşık 10.000 ve 1 milyon arasındadır. Küçük bir molekül olan su, hücre toplam kütlesinin %70'ini oluşturur; neredeyse geriye kalan hücre kütlesi makromoleküllerden oluşmaktadır.

Bir makromolekül, tekrar eden uç uca bağlanmış düşük molekül ağırlıklı zincir gibi polimer alt birimlerden oluşur. Genellikle alt birimden sadece bir aile, bir zincir oluşturmak için kullanılır: amino asitler diğer amino asitlere protein oluşturmak üzere bağlanır, nükleotidler diğer nükleotidlere, nükleik asit oluşturmak için ve şekerler diğer şekerlere polisakkarit oluşturmak için bağlanır. Altbirimlerin dizilişi makromolekülün fonksiyonu için önemli olduğundan, doğru alt ünitenin polimer zincirinin herhangi bir pozisyonunda biyosentezi için gereklidir [42].

Proteinler, polisakkaritler, DNA ve RNA makromoleküllerdir. Lipidler makromoleküllerin bazı özelliklerini taşımalarına rağmen; örneğin birçoğu küçük moleküllere doğrusal polimer olarak sentezlenirler (asetil CoA asetil grup), daha büyük yapılara dönüşebilirler (membranlar) fakat genellikle makromolekül olarak sınıflandırılmazlar. Memeli ve bakteri hücrelerinin büyük bölümü su ve proteinden oluşur.

2.2.3.2 Kovalent Bağlama

Kovalent bağlamanın, adsorpsiyona göre birçok avantajı vardır ancak immobilizasyon prosedürleri daha karmaşık ve daha uzun sürmektedir. Daha istikrarlı ve daha uzun antikor yüzeyi yaşam süresi sık gözlenmektedir. Yüksek iyonik güçlü çözeltilerde bile antikor yüzey kaybı minimal veya hiç görülmemektedir. Bu genellikle başlangıç antikor/antijen kompleksinin hızlı ve kolay birleşmesini, ve antikor yüzeyinin tekrarlanabilir rejenerasyonunu sağlar, genelde hiçbir antikor kaybolmaz. Ticari ürün elde edilmek isteniyorsa, immobilizasyon yöntemlerinin seri üretime dökülmesi yeterlidir, böylece düşük maliyetli ve istikrarlı bir biyomolekül yüzey formu elde edilebilir. Bir çok kovalent bağlama yöntemleri bu gereksinimleri karşılamaktadır ancak bazen karmaşık prosedürlere ihtiyaç duyulabilir. Ancak tüm bunlara rağmen, üretilen her bir sensör antikor kaplı yüzeyinin istikrarı ticari potansiyeli belirleyecektir. Birkaç aylık raf ömrüne sahip olması biyosensörün minimum gereksinimidir ve istikrarlı bir sensörün uzun bir raf ömrüne sahip olması daha güvenilir sürümünden daha büyük ticari ilgi çekecektir. Genel olarak, immobilizasyon işlemi, antikorların etkinliğine bir etkisi olmaması amacıyla fonksiyonel grupların aracılığıyla yapılmak istenir. Yüzey fonksiyonelliği tiyol veya sülfidlerin, organik polimer tabakalarının veya ince inorganik polimer tabakaların kendini altın yüzeylere kolayca monte etmesi ile gerçekleşir. Kovalent bağlanma genellikle protein üzerindeki nükleofilik grupların (- SH, - NH ve -OH) karbonil tipte reaksiyonlar oluşması ve fonksiyonel yüzeye bağlanması ile gerçekleşir.

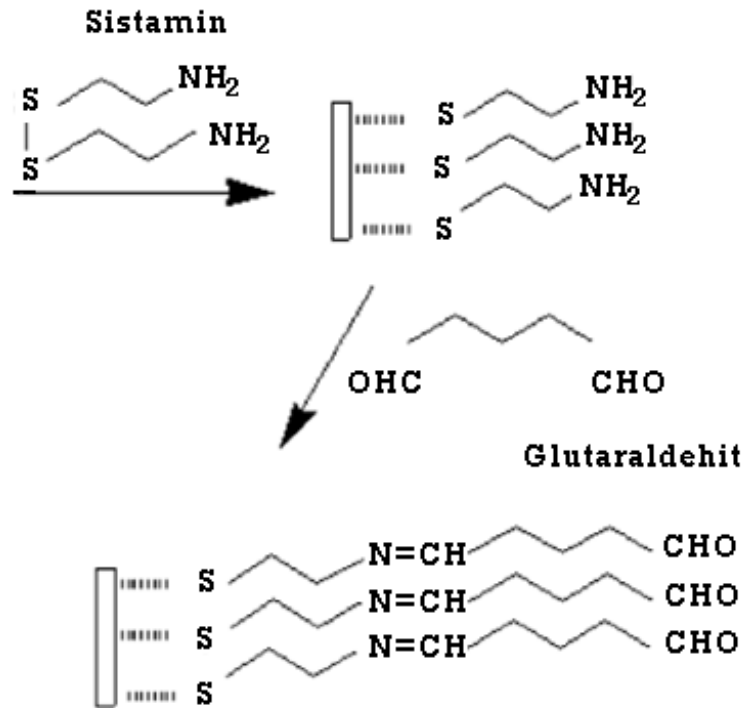
Organik polimer katmanlara kovalent immobilizasyon yaygın olarak uygulanmaktadır. En yaygın kullanılan polimer polietilenimindir (PEI), fakat polisitren, poliakrilamid ve çeşitli metakrilatlar dahil edilmiştir. Polimerlerin asıl avantajı çok yönlü olmalarından kaynaklanmaktadır. Hazırlanmaları kolay, çok büyük bir potansiyel uygulama alanları mevcut ve herhangi bir kullanım için uyarlanabilirler. Ko-polimerler, genellikle metakrilatlar, ihtiyaçları karşılamak için kolayca modifiye edilebilir ve aktiflenebilirler. Üretilen yüzeyin tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek olan filmin kalınlığını ve homojenizasyonunu kontrol altında tutmak zordur. Polimer ve yüzey arasındaki zayıf tutma kuvveti de bir sorun olabilir. Plazma polimerizasyon ve elektropolimerizasyon gibi yöntemler bu sorunların

üstesinden gelmek ve tabaka parametreleri üzerinde daha fazla kontrol sağlamak için geliştirilmiştir [43].

Kuartz kristallerin en yaygın elektrot türleri altın, gümüş, alüminyum ve platin olanlardır. Altın elektrotlu olan kristaller doğrudan, gümüş elektrotlu kristaller yumuşak asitler olarak (Au^+ , Ag^+) ditiyo (tiyoller) ile (yumuşak bazlar olarak: $\text{SH}-$) yumuşak asitler ve bazlar teorisine dayanarak (HSAB; HARD-SOFT ACID BASE) kovalent bağ yapmaktadırlar (Surface-Grafted Polyglutamate Films With Reaction-Induced Polar Order Wieringa, R.H.); (Paul E. Laibinis, 1991). Bu iki grup bileşikleriyle fonksiyonel gruplar oluşturulmaktadır.

2.2.3.2.i Sistamin ve glutaraldehit ($\text{COH}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$)'in kovalent bağlanması

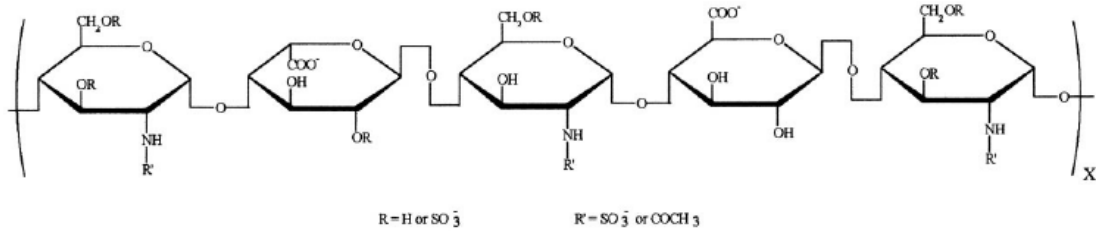
Glutaraldehit, günümüzde kullanılan en popüler bis-aldehit homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıdır[44].



Şekil 2.9 Sistamin ve glutaraldehitin kovalent bağlanması. [45]

2.2.3.2.ii Polietilenimin İmmobilizasyonu

Son zamanlarda, yüksek enzim aktivitesi ve reaktör verimliliği sağlayan, basit bir adsorpsiyon yöntemi olan, fibröz matrisler üzerinde *aspergillus oryzae* laktazı büyük miktarlarda immobilize etmek için polietilenimin (PEI) kullanılmıştır [46]. PEI, negatif yükleri elektrostatik etkileşim ile çekme özelliğinden dolayı nükleotit, protein ve hücre immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan polimerdir. PEI nispeten ucuz, kolay ulaşılabilir, kanserojen olmaması ve çevre için bir tehdit oluşturmamasından dolayı tercih edilir.



Şekil 2.10 Heparinin temel yapısı.

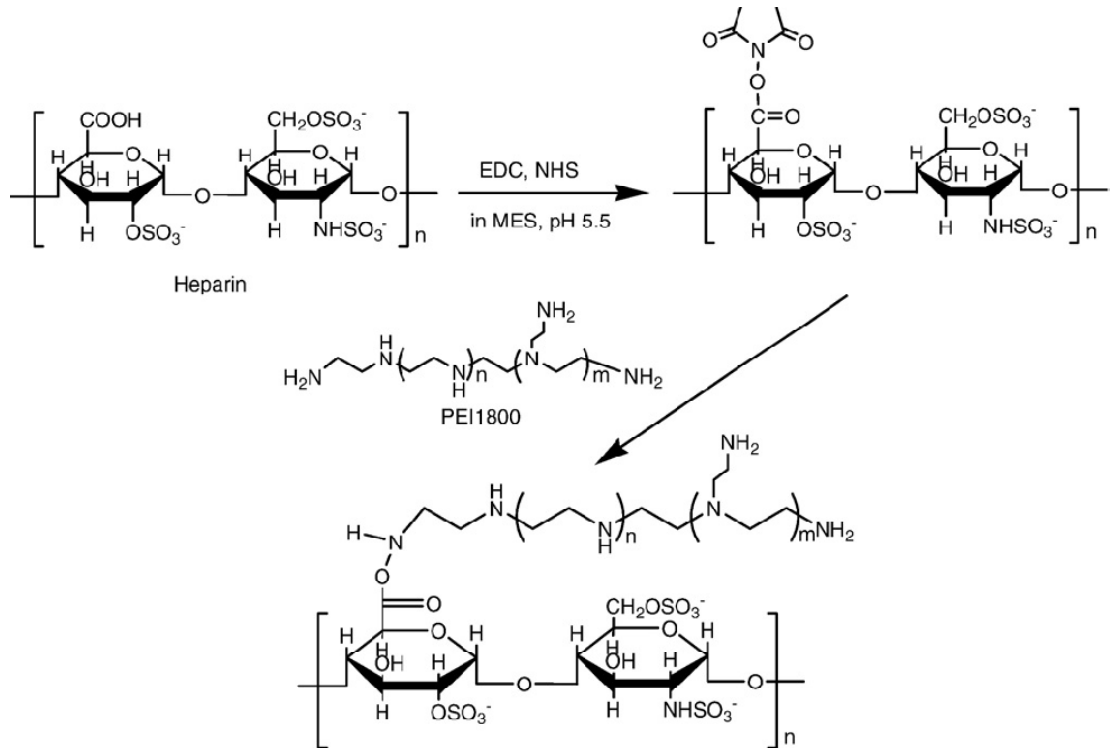
Heparin değişken sayıda sülfat, karboksil ve asetil artıkları içeren glukozamin-N-sülfat ve üronik asit grubundan heteropolisakkaritlerin sodyum tuzudur (Şekil 2.11). Heparinin bağlı bulunduğu farmakolojik grup anti-koagülanlar olarak adlandırılmaktadır. Heparin aktivitesi, uluslararası standart olan uluslararası birim (IU) miktarı ile ifade edilir. Heparin miktarının belirlenmesi biyolojik yöntemlerle yapılmaktadır [47].

2.2.3.3 Heparin-PEI etkileşimi

Polietilenimin (PEI), yüksek performans kromatografisinde bir anyon değişim polimeri olarak kullanılır [48-50]. Polimerizasyondan sonra PEI ikincil amin gruplarından dolayı temel polimerdir. Bir yüzey üzerine yerleştirildiğinde, her bir PEI zincirinin bir kısmı su fazında çözülür (su ile temasında) ve serbestçe polimer yüzeyine çıkar. PEI zincirlerinin iyonik etkileşim bölgeleri bu nedenle, gelen protein veya analitin veya bunların iyonik bölgelerinin durumuna göre değişebilir. Katı (polimer) / su (sıvı) arayüzünde (olarak net bir sınır olmayan bu tür dinamik yüzey düzenlemeleri) tipik olarak çok düşük bir serbest enerjiye sahip bir yüksek

hidrofiliklik ve yüksek aktif bağlama kapasitesi sunar. PEI için bağlama kapasitesi 35-50 mg protein / ml jel arasında olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.12) [50].

Uzun PEI zincirinin esnekliği ve yükü yapısal heterojenliğine rağmen heparin moleküllerini bağlamak için yeterli olmaktadır. PEI ve heparin arasındaki etkileşimin elektrostatik doğası gereği heparin adsorpsiyonunun, heparin etkinliğinden bağımsız olmasını sağlamalıdır [51].



Şekil 2.12 Heparin molekülünün PEI1800 molekülü ile kovalent bağlanması [52].

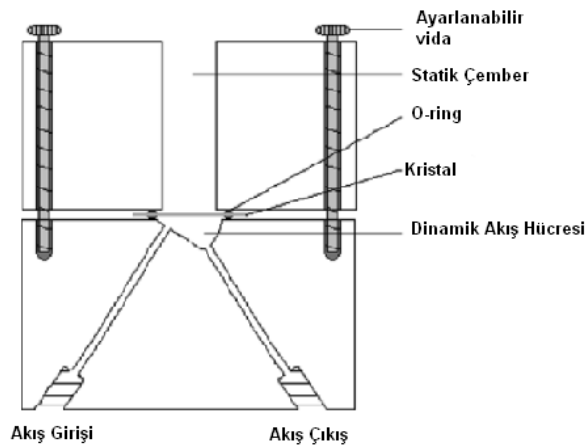
2.2.4 Sıvı fazda ölçüm

Piezoelektrik immunosensor analizi temel olarak sıvı fazda gerçekleştirilir. Ölçümler iki farklı şekilde, daldırma ve kurutma şeklinde ya da doğrudan çözelti içerisinde yapılabilir. Daldırma ve kurutma işleminde, frekans okuma işlemi, kristal kuru olduğu durumda gerçekleştirilir.

Molekülün bağlanması ya da immobilizasyonu tamamlanması için yeterli süre geçtikten sonra kristal yıkanır ve kurutulur. Frekans tekrar havada kuruduktan

sonra kaydedilir. Modifikasyondan önceki ve sonraki kütle farkı yüzeye immobilize olan molekül kütlesi ile doğru orantılıdır. Daldırma ve kurutma yöntemi kristal elektrotlarının her ikisinde kullanıldığından artan kütle miktarı fazla olacak ve dolayısıyla 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.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik genellikle daldırma ve kurutma tipinde sensörlerin gelişmesini engelleyen temel sebeplerdir. Bir referans kristal kullanımı ile ortam şartların üstesinden gelinebilir. Doğrudan sıvı içerisinde alınan ölçümler çevresel şartlardan daha az etkilenirler ve bu yöntem ile tekrarlanabilir sonuçlar ve tekrar üretilebilirlik elde edilebilir. Ancak bu durum, sıvı içerisinde sönümlleme etkisi nedeniyle sensör duyarlılığını azaltabilir. Ayrıca sıvı içerisinde kristal davranışı direk yüzeyine bağlanan kütle miktarına bağlı olmayabilir. Sıvı içerisindeki kristalin frekans cevabı, viskozite, sıvı sıcaklığı ve immobilize tabakanın kalınlığı ve sertliği gibi birçok faktöre bağlıdır. Analizler genellikle özel olarak tasarlanmış akış hücreleri (Şekil 2.13) içerisinde gerçekleştirilir.



Şekil 2.12 Çözelti analizinde kullanılan temel bir akış hücresi. Hücrede kristalin bir yüzü dinamik çözelti ile etkileşimdedir.

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

[53]. Akış hücresi içinde, kuvar kristal mikroterazi ile kütle ölçümü Kanazawa eşitliği ile yapılmaktadır.

2.2.4.1 Kanazawa denklemi

$$\Delta f = -f_o^{3/2} \left(\frac{\rho_L \eta_L}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{1/2} \quad (2.2)$$

$$\Delta f = f_c - f_o \quad (2.3)$$

Δf =frekans değişimi

f_c = Kuvars kristal ve yüzeyde oluşan film tabakası ile birlikte osilasyon frekansı,

f_o =Kuvars kristal rezonans frekansı,

ρ_q =2,648 g/cm⁻³ kuvars kristal yoğunluğu,

μ_q = 2.947x10¹¹ g/cm.s² AT kesim kuvars kristal için shear modulus katsayısı

η_L = sıvı viskozitesi

ρ_L =sıvı yoğunluğu [54]

Plazma viskozitesi, Numanoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre 56 hastanın ortalaması olan 1,43±0,12 mPa.s'dır [55].

Akış hücresinde yapılan deneylerde alınan frekans değişimi sonuçlarından Kanazawa eşitliğine göre kütle miktarı hesabı yapılamamıştır. QCM ile akış hücresinde yapılan yayınlar incelendiğinde, bu yayınların akış hücresinde alınan frekans değişiminden sonra Kanazawa eşitliğini kullanmadıkları ve frekans kütle dönüşümü yapmadıkları görülmüştür.

2.2.5 Piezoelektrik temelli sistemlerin avantaj ve dezavantajları

Diğer transduser teknolojileri ile karşılaştırıldığında piezoelektrik sensörlerin birçok avantajı bulunmaktadır:

– Kuvars kristal mikrodengeleyici sensörlerin üretim özellikleri iyi bilinmektedir.

- Sensör yüzeyinde, moleküler bağlanma olayları doğrudan (ek işaretçi olmadan-etiketsiz) ölçüm sinyali üretir.
- Çok sayıda bağımsız sensör, bir sensör dizisi oluşturmak için düzenlenebilir.
- Elektrot bölgesi ince bir tabakadan oluşur. Böylece iyi bilinen "tiyol yüzey kimyası" uygulanabilir. [56]

Bu avantajlara rağmen piezoelektrik biyosensörlerin birtakım dezavantajları bulunmaktadır:

- Sadece makroboyuttaki moleküllerden direk ölçüm sinyali elde edilebilmektedir.
- Sıcaklık veya viskozite değişimleri çıkış sinyalinde hatalara sebep olmaktadır [57].

2.2.6 Yüzey karakterizasyonu

2.2.6.1 Atomik kuvvet mikroskobu (AKM)

AKM görüntüleri yüzey özellikleri hakkında net bir şekilde önemli bilgileri sunar. AKM ile herhangi bir sert yüzey, hava ya da örnek bir sıvı içinde incelenebilir. Görüntü alanı atomik ve moleküler ölçekte 125 µm kadar olabilir ve elde edilen veri, diğer düşük çözünürlüklü bilgiler ile mukayese edilebilir. AKM de kaba yüzeylerde incelenebilir çünkü dikey ölçüm aralığı 8-10 µm ye kadar olabilir. Büyük numuneler kesilmeden doğrudan mikroskopta incelenebilir. Optik mikroskoplara göre üstün çözünürlük özelliğine ek olarak, AKM elektron mikroskoplarına göre bu önemli avantajlara sahiptir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karşılaştırıldığında, AKM üstün topografik kontrast, yüzey özelliklerinin yanı sıra, sayısal yükseklik bilgisi sağlamaktadır.

Örneğin, yüzeyin, elektriksel olarak iletken olmasının önemi bulunmamaktadır. Dolayısıyla, SEM de olduğu gibi örneğin dehidratasyonuna gerek yoktur, sıvı içerisinde örnekten sulu halde görüntü alınabilmektedir. Sulu örnek içerisinde elde edilen görüntülerde ve ekstraselüler polimerik maddeler içinde AKM çözünürlüğü geleneksel SEM den daha iyi olmaktadır.

Transmisyon elektron mikroskopları ile karşılaştırıldığında 3B AKM görüntülerinde pahalı numune hazırlama evresi olmadan örnek hazırlanır ve 2B profillerden kesit numuneler alınabilir [58].

Prensip olarak: Yüzey ve küçük bir uçta ($r \sim 50$ nm) doğrudan kuvvet ölçümü yapılabilir. Kantilever değişim bilgisi (kuvvet-ölçüm yayı < 1 N/m) yansıyan lazerden elde edilebilir. Normal (konsol çökme) ve (konsol torsiyon) yanıl kuvvetleri dört segment fotodiyot kullanarak tespit edilebilir. Pl geri besleme döngüsünde dikay uç pozisyonunu kontrol için normal kuvvet sinyali kullanılmak istendiğinde, sabit kuvvette ucu yanıl olarak tarama yapmak mümkündür. Bilgisayar yardımıyla sabit uç-yüzey etkileşimi ile topoloji bilgisi elde edilebilir, iki boyutlu gösterimi yapılabilir. SFA da olduğu gibi, uç-yüzey etkileşimleri, Van-der-Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler, belirli etkileşimler ve kılcal kuvvetleri içerebilir. AFM tekniğın birçok farklı türevleri 1990'ların başından beri geliştirilmiştir. Biyolojik yüzeyler için en uygun mod kantileverın dikey pozisyonda yüksek rezonans frekansında modüle edildiği AC modudur. Rezonans frekansı ve faz (uç-yüzey etkileşim) nedeniyle kaymalar, yüzeyden ek bilgi almak için kullanılır. Faz ve rezonans frekansı kaymasıyla (uç-yüzey etkileşimiyle) yüzeye ait bilgiler elde edilir.. Yanıl ve dikey çözünürlüğü yaklaşık 0,1 nm.dir. Topografi ve uç-yanıl kuvvetler bilgisi öncelikli temin edilebilmektedir. Ayrıca malzemenin mekaniksel ve sürtünme özellikleri de temin edilebilir [59].

3. DENEY AŞAMASI

Tez kapsamında sunulan deney aşamasındaki çalışmalar, dört bölümde değerlendirilmiş ve aşağıda özetlenmiştir.

Osilatör ve frekans sayıcı sisteminin kurulması: Sistemde kullanılan piezoelektrik sensör için osilatör ve frekans ölçüm devresinin kurulumu ve çalıştırılması gerçekleştirilmiştir. Ölçüm devresi osilatör ve frekans sayıcı devrelerinden oluşmaktadır.

Antijene duyarlı piezoelektrik kristalli sensör hazırlanması: Tezin bu bölümünde antijen ölçümü için bir piezoelektrik kristal yüzeyine antijene özgü antikor bağlanması ile bir biyosensör hazırlanmıştır. Bu amaçla kuvars kristal yüzeyinde üç aşamalı immobilizasyon yapılmıştır.

Sistemin immobilizasyonu

Glutaraldehit immobilizasyonu

Polietilenimin immobilizasyonu

Ligand–Analit etkileşimi: Hazırlanan polietilenimin bağlı piezoelektrik kristalin değişik konsantrasyonlarda heparin ile etkileştirilmesi sonucunda ligand-analit birleşmesine bağlı olarak analit testi beher ve akış hücresinde gerçekleştirilmiştir.

Yüzey analizi: Çalışmanın son bölümünde kütle değişimlerinin frekans ölçümü ile izlenmesine paralel olarak sensör hazırlama aşamasında kristal yüzeyinde yapılan modifikasyonların tanımlanması için AKM görüntüleri alınmıştır.

3.1 Deneyde Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar; QCM cihazı (SRS QCM Quartz Crystal Microbalance, İsveç), manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya), pH metre ve hassas terazi (Sartorius, Almanya), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex, Almanya), kuvars kristallerdeki metal kılıfları kesmekte kullanılan Dremel Lithium Ion (Dremel, Almanya) el aleti ve etüvdür (Termal, İstanbul). 12 MHz'lik kristallerin frekanslarını ölçmek için Escort EFC-3201 (Hong Kong) frekans sayıcı, osilatör ve frekans

sayıcı devreleri kullanılmıştır. AKM (atomik kuvvet mikroskobu) ve TEM (taramalı elektron mikroskobu) görüntüleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Merkezi'nde (UNAM) alınmıştır.

Deneyde; 12 MHz'lik (TIC) kuvar kristaller, manyetik karıştırıcı, manyetik balık, 10, 1000 µlt. pipetler, termometre, balon joje ve beherler kullanılmıştır.

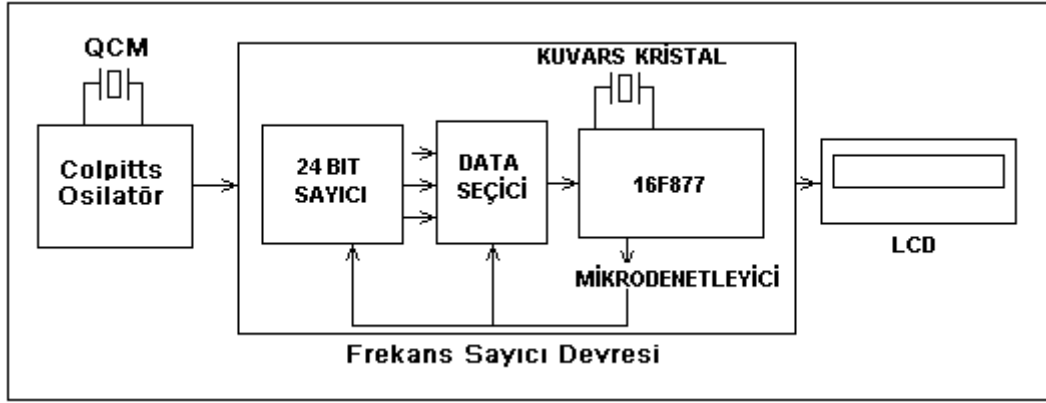
Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasallar; NaOH (Merck, Almanya), saf aseton (Merck, Almanya), metanol (Merck, Almanya), HCl (Merck, Almanya), sistamin (SIGMA Aldrich, ABD), glutaraldehit (Fluka, ABD), fosfat tamponu için NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 tuzları (SIGMA Aldrich, ABD), fosfat tamponu tuzu (PBS) (Amresco, Kanada), borik asit tuzu (Aklar Kimya, Ankara), sodyum tetraborat/HCl tamponu, polietilenimin (SIGMA Aldrich, ABD), etanolamin (Merck, Almanya), heparin (Nevparin Heparin Sodyum 25000 I.U/5 ml i.v.), insan plazma (Türk Kızılayı Ankara Kan Merkezi, Ankara), saf su Aklar Kimya' dan temin edilmiştir.

3.2 Deneyin Yapılışı

Sunulan araştırma kapsamında kuartz kristallerin yüzeyine kimyasal immobilize polietilenimin ile kütle tutunmasının neden olduğu frekans değişimi ile heparin ölçümü yapılması hedeflenmektedir. Öncelikle deneyler sırasında kullanılacak Ag elektrotlu kuartz kristallerin, (12 MHz) üzerindeki metal kılıflar kesilerek kristal elektrotları ve kuartz yüzey ortaya çıkarılmıştır. (Şekil 3.1). Kuvars kristallerin sensör olarak kullanılabilmesi için metal kılıfları çıkarılırken yüzeyde toplanan kir ve metal tozlarının temizlenmesi gerekmektedir. Yüzey temizliği işleminden sonra elektrot yüzeyinin sistamin ve glutaraldehit ile aktivasyonu, polietilenimin immobilizasyonu aşamalarının tamamlanması gerekmektedir. Bu aşamalardan sonra beherde ve akış hücresinde heparin ölçümü yapılmıştır.

3.2.1 Osilatör ve frekans sayıcı devreleri

Sensör geliştirme aşamalarında ve sıvı akış hücresinde bilgi alabilmek amacıyla osilatör devresi ve frekans sayıcı devreleri yapılmıştır.

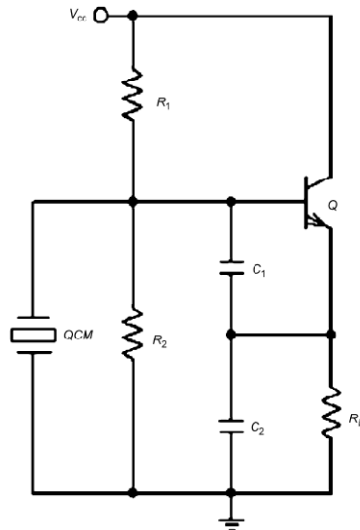


Şekil 3.1 Kuvars kristal mikroterazi osilatör ve sensör frekans okuyucu blok diyagramı

Devrede sıvı sistemi içerisinde gerekli ölçümü alabilmek amacıyla 12 MHz lik colpitts osilatör devresi kurulmuş ve çalıştırılmıştır.

3.2.1.1 Colpitts Osilatör

Colpitts osilatör devresi akış hücresi içerisinde tek elektrotu sıvı ile etkileştirildiğinde osilatör sinyalinin sıvı içerisinde sönümlenmesini engelleyerek ölçüm sonuçlarımızı almamızı sağlamaktadır. Bu nedenle tez kapsamında kullanımı tercih edilmiş ve devresi kurularak kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Temel Colpitts osilatör devresi

Şekil 3.2’de, Colpitts osilatör temel devresi gösterilmektedir. Fiziksel olarak devre çok basit olmasına rağmen analitik olarak karmaşıktır. Osilatörün üç farklı çalışma evresi vardır.

Yükseltici emiter takipçisi olarak çalışmaktadır ve kazancı 1 dir. Transistör her bir osilasyon döngüsünün sadece yaklaşık %15-20 lik kısmında akımı iletmektedir. Transistör, beyzi sinüsün en pozitif tepesini yapmadan hemen önce iletken duruma geçer ve maksimum tepe geriliminden hemen sonra iletken durumu sonlandırır. pozitif alternansta, transistör saturasyondadır ve doğru polarmalı beyz-kollektör birleşmesinde kristali klampler. Osilasyon döngüsünün %5-10 u kadar pozitif alternans saturasyonu sürer. Transistör, geriye kalan (%80-85) bölümde kapanır ve yalıtkan duruma geçer. Devrenin bu üç durumu her bir periyotta gerçekleşir: kısa bir süre için (%10) transistör iletimdedir ve emiter takipçi olarak çalışır, Transistörün saturasyonda ve kristali besleme gerilimine kısa devre yaptığı (%5-10) kısa zaman dilimi; üçüncü olarak (%80-85) transistörün açık devre olduğu süreç.

Transistörün açık ve normal olarak iletken olduğu kısa zamanda devre kristale seri durumda olan C_2 ile osilasyondadır. C_2 , kristalin iç kapasitansı ile (motional kapasite) seri durumdadır. bu durum döngünün net kapasitesini düşürerek osilasyon frekansını artırır. Bu yüksek osilasyon frekansında kristal endüktiftir ve C_2 ile birlikte emiterden beyze bir faz aktarır. R_1 ve emiter çıkış direnci olan R_{out} ve C_1 in paralel toplamı ile eşit fakat ters RC faz gecikmesi ile toplamda yükseltme döngüsünde emiterden beyze sıfır faz kayması gerçekleşir. C_2 ve kristal indüktansı arasındaki parçalı seri rezonans devresinden emiterden beyze bir gerilim kazancı elde edilir.

Transistörün kapandığı uzun dönemde C_1 üzerindeki gerilim, R_1 C_1 sabiti ile belirlenen oran ile sönümlenir. Kristalin Q duyarlılığı R_1 C_1 zaman sabitine bağlıdır.

C_1 , C_2 , R_1 ve R_{bias} için kristal üzerindeki gerilimi maksimum yapacak değerler kullanılmalıdır. En büyük faktör kristal bacakları arasındaki dış paralel dirençtir, bu faktör devrenin en düşük osilasyon frekansını belirleyen. güçlü bir faktördür. Bu paralel direnç R_{bias} ve transistör giriş dirençlerinin toplamıdır. Transistör giriş

direnci transistörün kazancı ve emiter yük direnci R_1 ile belirlenir. Emiter takipçisi için yüksek kazançlı transistör kullanımı kristal üzerindeki paralel direncin artmasına yardımcı olur.

Kristalin osilasyon yapmayacağı bir minimum kristal paralel direnci mevcuttur. Bu minimum şönt direnç değeri, kristalin iç seri direnci ile değişir, frekans ile ters olarak değişir.

Kristalin osilasyon yapmadığı minimum kristal şönt direnci vardır. Bu en düşük şönt direnç değeri, kristal iç seri direnç değeri R_g ile doğrudan ve frekans ile ters olarak değişir.

Colpitts devrelerinde bazı devre elemanlarının değerleri frekans ile değişirken bazılarının ki değişmez. Bir transistör devresinde C_2 değeri osilasyon frekansından bağımsız olarak 40-70pF arasında bir değere sabitlenmelidir. Osilasyon frekansı C_2 değerine oldukça hassastır fakat C değerine değildir. R_1 C_1 zaman sabiti osilasyon frekansı ile ters orantılıdır.

$$R_1 C_1 = 0.5 / f \quad (3.1)$$

R_1 (ohm), C_1 (μ F), ve f (MHz.), C_1 ve C_2 arasında özel bir bağlantı yoktur.

Kristal şönt direnci frekans düşmesi ile artacağından R_1 direnç değerini arttırmak kristalin şönt direncini arttırmaya yardımcı olur, çünkü emiter takip devresinin giriş direncinin artırılması ile R_{bias} direncinin değeri artırılmış olur. R_1 direnç değerinin değiştirilip C_1 değerinin sabit tutulması ile pratikte iyi sonuçlar alınabilir [60].

3.2.1.2 Frekans sayıcı devresi

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

Frekans sayıcı açık devre şeması, baskı devre şeması, devre elemanları değerleri ve PIC mikrokontroller kodu ek bölümünde (Ek-1) verilmiştir.



Şekil 3.3 Frekans sayıcı devresi ile sinyal jeneratörü validasyonu.

Yapılan frekans sayıcı devresinin doğru sonuç verdiği 11MHz, 12MHz., ve 13MHz. frekanslarında, sinüs dalga sinyal üretici ile kontrol edilmiştir. 12 MHz. frekansında, frekans sayıcı devresinde okunan sonuç 32 Hz. kadar daha fazladır. Bunun sebebi mikrokontrolör osilatör frekansını ayarlayan kuvars kristalden kaynaklanmaktadır. Bu değer kabul edilebilir limitler içerisinde.

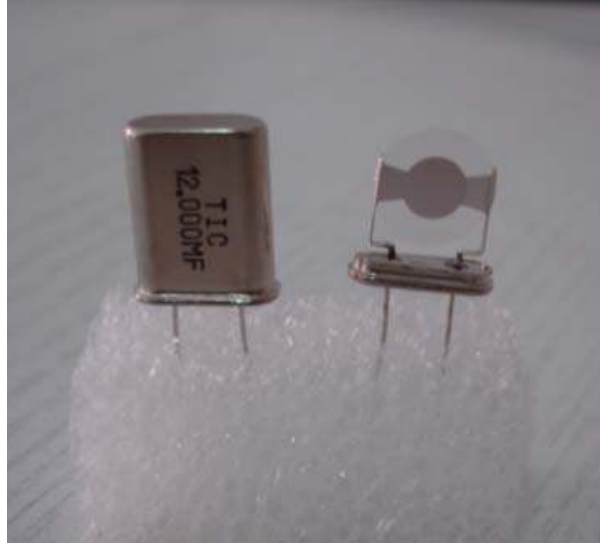
3.2.2 Kuvars kristal biyosensör yüzeyinin oluşturulması

3.2.2.1 Kuvars Kristal Yüzey Temizliği

Metal kılıfları çıkarılan kuvars kristaller (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5), yüzeyde bulunan kir ve metal tozları temizliğinin yapılması amacıyla manyetik karıştırıcıda, 5 ml. lik beherler içerisinde sırasıyla aseton, metanol ve NaOH ile otuzar dakika etkileştirilmişlerdir (Şekil 3.6). Bu basamaklardan sonra kuvars kristaller ultrasonik banyoda 5 dakika yıkanıp, etüv içerisinde, ortam sıcaklığında 15 dakika kurutulduktan sonra frekans ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümlerden sonra frekans sayıcısındaki okunan değer kristalin yüzey temizliğinden önceki değerinden daha yüksek olduğu görülmüş ve yüzey temizleme işleminin başarılı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.4 Kuvars kristal metal kılıflarının kesici el aletiyle çıkarılması



Şekil 3.5 Kuvars kristal metal kılıfları çıkarıldıktan sonra kristal ve elektrot yüzeyleri görülmektedir.



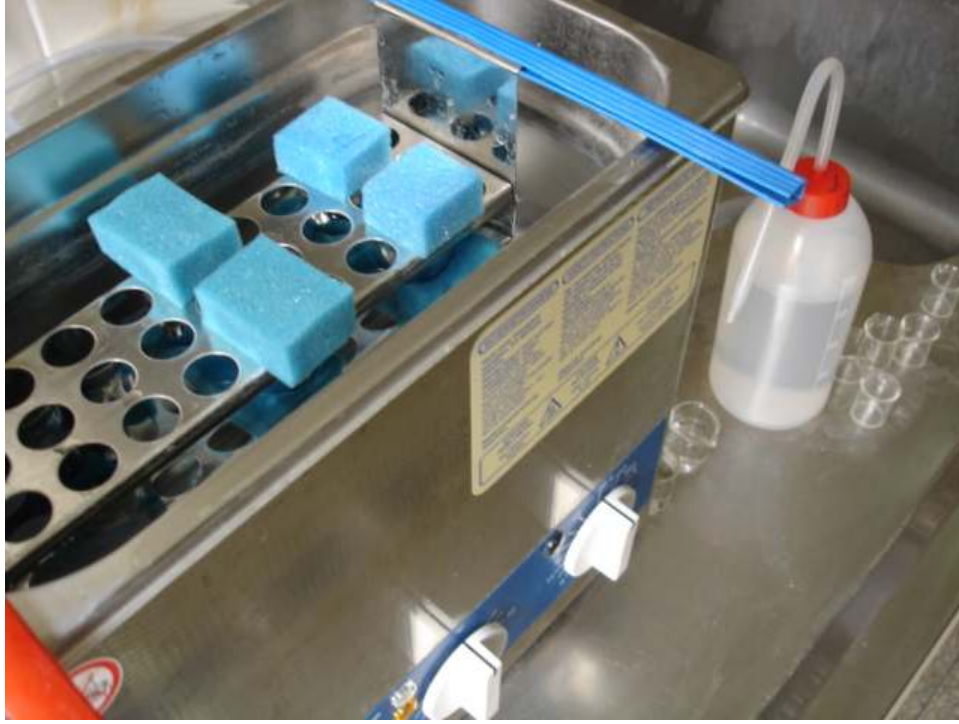
Şekil 3.6 Kuvars kristallerin manyetik karıştırıcıda çözelti ile etkileştirilmesi

3.2.2.2 Kuvars kristal yüzey aktivasyonu

Kuvars kristal sensör ile heparin ölçümünün yapılabilmesi için öncesinde heparine karşı seçiciliği ve afinitesi olan PEI polimerinin immobilize edilmesi gerekmektedir. PEI polimeri tutuklanması için gümüş elektrot yüzeylerinin sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonları ile polietilenimin tutuklanmasına hazır hale getirilmesi gerekmektedir.

3.2.2.2.i Sistamin immobilizasyonu

Kullanılan gümüş elektrotlu kristallere, yüzey temizliklerinin yapılmasından sonra (Şekil 3.7) tiyol (SH) ve amin (NH₂) içeren bifonksiyonel özelliğe sahip sistamin molekülü immobilizasyonu ile yüzeyde yeni fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Molekülün bu özelliğinden yararlanılarak tiyol ucundan kristal yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Bu amaçla 20mM derişiminde sistamin, fosfat tamponunda (0.1 M pH: 7) çözölmüştür. Kristaller hazırlanan çözelti içinde 30 dakika karanlık ortamda bekletilerek reaksiyona sokulmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.7 Kuvars kristallerin ultrasonik banyoda deiyonize su ile yıkanması

3.2.2.2.ii Glutaraldehit immobilizasyonu

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 amaçlanmış, bu yaklaşım ligand-anilat etkileşmesinde ortaya çıkabilecek sterik engellemeleri ortadan kaldıracağı için önerilen bir yaklaşımdır. [61].

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 girerek kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır.

Sistamin immobilize edilmiş kristaller glutaraldehit etkileşimi için sodyum tetraborat/HCl tamponu ile (pH: 8.2) karanlık ortamda reaksiyona sokulmuştur (Şekil 3.8). Yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Bunun için sistamin immobilize kuartz kristaller %5 glutaraldehit derişiminde sodyum tetraborat/HCl tamponuna karanlık ortamda 30 dakika

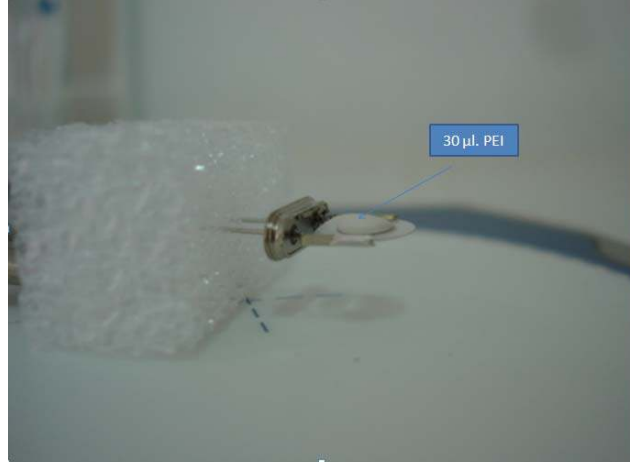
bekletilerek reaksiyona sokulmuştur. Süre sonunda kristaller deiyonize suyla ultrasonik yıkayıcıda 5 dakika boyunca yıkanmış ve yıkama işleminden sonra kurutularak frekans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.8 Sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonları için karanlık ortam eldesi

3.2.2.2.iii PEI immobilizasyonu

Glutaraldehit immobilizasyonundan sonra heparine ilgisi (afinitesi) ve seçiciliği olan polietilenimin polimerinin immobilizasyonu için kuvars kristaller yatay konumlandırılarak gümüş elektrotların yüzeylerine %2,5 polietilenimin her bir yüzey için 30 µlt. damlatılarak 30 dakika beklenmiştir (Şekil 3.9). Süre sonunda elektrotlar ultrasonik yıkayıcıda saf su ile temizlenerek kurutulmuş aynı basamaklar diğer yüzey için uygulandıktan sonra frekans değişimleri kaydedilmiştir.



Şekil 3.9 Polietilenimin immobilizasyonu için gereken koşulların sağlanması.

3.2.2.2.iv İşlem basamakları sonrasında ölçülen frekans değişimleri

QCM ile heparin ölçümü öncesinde yapılan temizlik, sistamin ve glutaraldehit ile yüzey aktivasyonu ve polietilenimin immobilizasyonu ile kuvars kristal, heparin ölçümü yapacak seçiciliğe sahip olmaktadır. Aşağıdaki grafikte temizlik, yüzey aktivasyonu ve PEI immobilizasyonu işlemlerinin sonrasında frekans değişimleri görülmektedir altmış adet kuvars kristal için düzenlenen bu grafik ile heparin ölçümü öncesinde yapılan işlemlerde kuvars kristal yüzeyinde frekans değişimi ile orantılı kütle değişiminin olduğu dolayısıyla yapılan immobilizasyon işlemlerinin başarılı olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.1 Yüzey temizliği ve yüzey aktivasyon basamaklarının oluşturduğu frekans değişimleri. A: Metal kılıf ile alınan frekans ölçümü, B Metal kılıf çıkarıldıktan sonra Alınan frekan, C: Yüzey temizliği, D: Sistamin ve glutaraldehit immobilizasyonları, E: Polietilenimin immobilizasyonu.

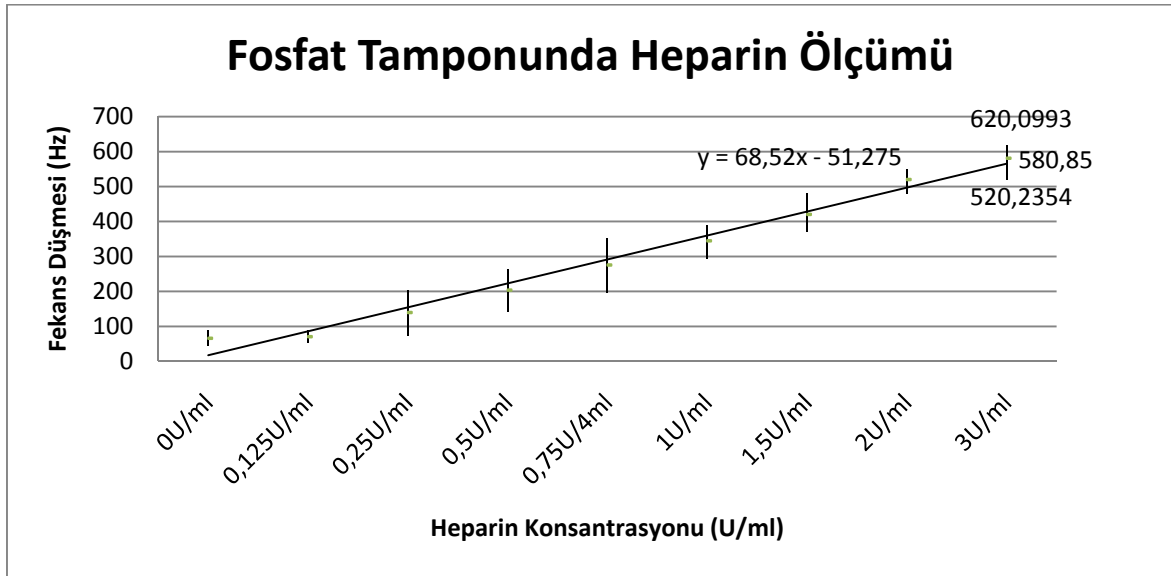


3.2.3 Heparin ölçümü

0, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 U/ml heparin değerleri fosfat tamponu (pH 7.0) içinde kuvars kristal ile 5ml lik beher içinde 30 dakika etkileştirilmiş, İşlem sonunda deiyonize su ile ultrasonik yıkayıcıda 5 dakika yıkandıktan sonra kurutularak alınan frekans değerleri grafikte gösterilmiştir.

3.2.3.1 Fosfat tamponunda heparin ölçümü

Aşağıdaki grafikte fosfat tamponu içerisinde 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 3 U/ml heparin değerleri için frekans grafiği görülmektedir. Bu grafikte heparin konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak frekans değişiminin olduğu gözlemlenmiştir. Oluşturulan bu grafik plazma içerisinde ve akış hücresinde yapılacak heparin ölçümleri için önem arz etmektedir. Sadece fosfat tamponu içerisinde yapılan ölçüm ile 0,125 U/ml heparin için yapılan ölçüm değerleri birbirlerine çok yakın çıkmıştır. Bunun sebebi 0,125 U/ml heparin değeri çok küçük bir değer olmasından kaynaklanmaktadır. Görülmek istenen heparin aralık 0,2 U/ml ile 3 U/ml değerleri arasındadır, 0,125 U/ml değer bilgi verilmesi amacıyla grafiğe eklenmiştir. Fosfat tamponu içerisinde heparin biyosensör, grafikte görüldüğü üzere beklenildiği gibi cevap doğrusuna sahiptir. Doğru grafiği $y = 68,52x - 51,275$ olarak grafik üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 3.10 Farklı heparin konsantrasyonlarında sensör frekans cevap grafiği.

Grafiklerde heparin ölçümü sonrasında alınan frekans değişimlerine bakılarak oluşturulan biyosensörün, heparin biyosensör olarak kullanılabileceği görülmektedir.

3.2.3.1.i Sauerbrey denklemi ile frekans-kütle ilişkisi

Bu aşamada, 5mm çapında, gümüş elektrotta sahip kuvars kristal heparin sensör yüzeyine ne kadar heparin tutunduğu, Sauerbrey denklemi ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2 Hesaplama sonuçları ve Sauerbrey denklemi kullanılarak hesaplanan kütle dönüşümleri.

Heparin U/ml.	Hesaplama(gr.)	Sauerbrey Eşitliği (gr.)
0	0µgr.	0ngr.
0,125	1,25µgr.	0,072µgr
0,25	2,5µgr.	0,168µgr.
0,5	5µgr.	0,264µgr.
0,75	7,5µgr.	0,337µgr.
1	10µgr.	0,421µgr.
1,5	15µgr.	0,529µgr.
2	20µgr.	0,614µgr.
3	30µgr.	0,722µgr.

Tabloda, heparin ölçümleri yapılan kuvars kristallerin Sauerbrey denklemi ve hesaplama yoluyla olması gereken kütle miktarları tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çizelgede fosfat tamponu içerisine eklenen heparin miktarı ile Sauerbrey denklemi kullanılarak bulunan heparin miktarları arasında yaklaşık 30 kat fark olduğu görülmektedir. Bu durum, Sauerbrey denkleminin kuvars kristal elektrot yüzeyine ince bir film halinde tutunan antijen için geçerlidir ve içerisinde homojen olarak bulunan heparinin tamamı elektrot yüzeyinde toplanmayacaktır ve elektrot yüzeyinde boş alanların kalması durumları ile ve analit içerisinde heparin miktarı azaldıkça değişecek olan pozitif ve negatif yükler arasındaki itme ve çekme kuvvetleri ile açıklanabilir.

Çizelge 3.3 Heparin konsantrasyonuna bağlı frekans değişimi ve Sauerbrey denklemi kullanılarak hesaplanan kütle dönüşümleri.

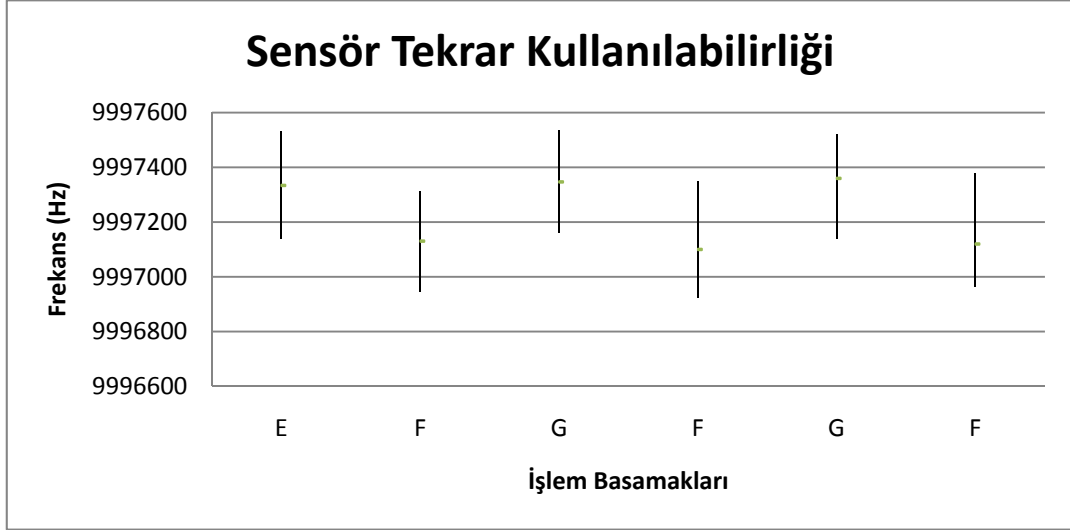
Heparin Derişimi (U/ml.)	Ölçülen Frekans Farkı Δf (Hz.)	Sauerbrey eşitliği (gr.)
0	66 Hz.	0,65 μ gr.
0,125	70,4 Hz.	0,072 μ gr
0,25	139,83 Hz.	0,168 μ gr.
0,5	203,83 Hz.	0,264 μ gr.
0,75	275,5 Hz.	0,337 μ gr.
1	344,38 Hz.	0,421 μ gr.
1,5	420,34 Hz.	0,529 μ gr.
2	520, 32 Hz.	0,614 μ gr.
3	580,85 Hz.	0,722 μ gr.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için fosfat tamponu içerisinde heparin bağlanması ile elde edilen frekans düşüşü-kütle değişim grafiği verilmiştir (Çizelge 3.3).

3.2.3.1.ii Heparin Ölçümü Sonrasında Sensörün Tekrar Kullanılabilirliği

Deneylerde, 0,5 U/ml konsantrasyonunda heparin ile etkileştirilen sensörler tekrar kullanılabilirliğin görülmesi amacıyla, Liu ve arkadaşları [62] yaptığı yöntemle iyonik bağlı heparin molekülünün uzaklaştırılması için 0,1M NaOH çözeltisi kullanılmış ve frekans ölçümünden sonra sensörün heparin öncesi durumuna geldiği tespit edilmiştir bu işlem grafikte görülmektedir.

Çizelge 3.4 Yüzey temizliği ve yüzey aktivasyon basamaklarının oluşturduğu frekans değişimleri. E: Polietilenimin immobilizasyonu, F: Heparin ölçümü, G:NaOH ile yıkama işlemi.



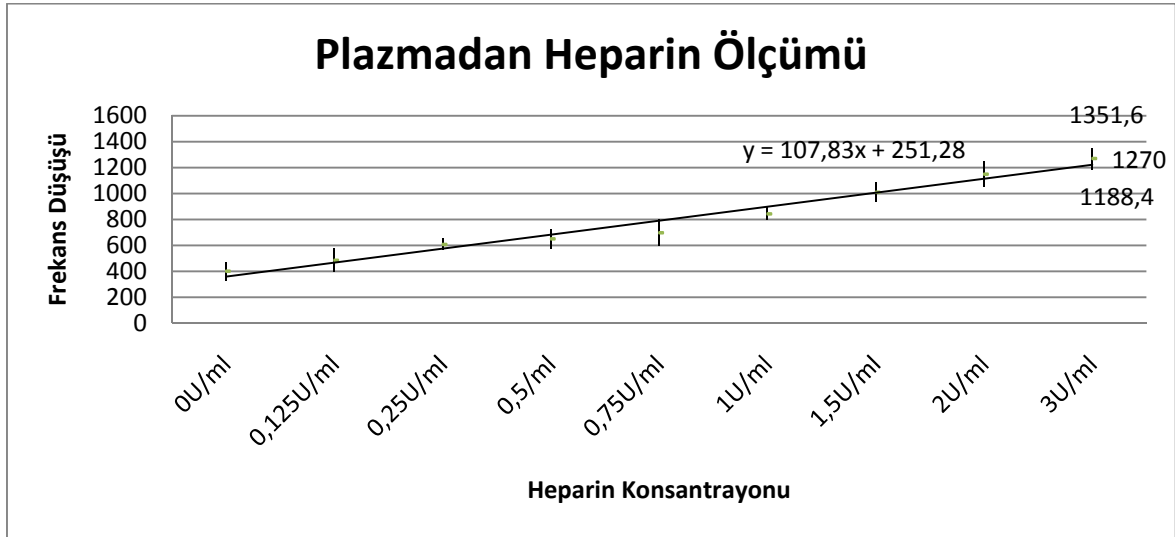
Aynı konsantrasyonlarda, tekrar edilen heparin ölçümlerinde, heparin konsantrasyonuna bağlı frekans değişiminin aynı kaldığı tekrarlanan ölçümlerde görülmektedir.

3.2.3.2 Plazmadan Heparin Ölçümü

Plazmadan heparin ölçümleri için serum fizyolojik, insan serumu ve heparin kullanılmıştır (Şekil 3.10). Daldırma ve kurutma ile alınan ölçümler 4ml. çözeltiler içinde hazırlanmıştır. Bu çözelti %50 plazma, %50 serum ve heparinden oluşmaktadır. Plazmadan alınan ölçümler için ligand olarak kullanılan polietilenimin için 0,125-3U/ml değer aralıklarında ölçümler alınmış ve grafik üzerinde gösterilmiştir.



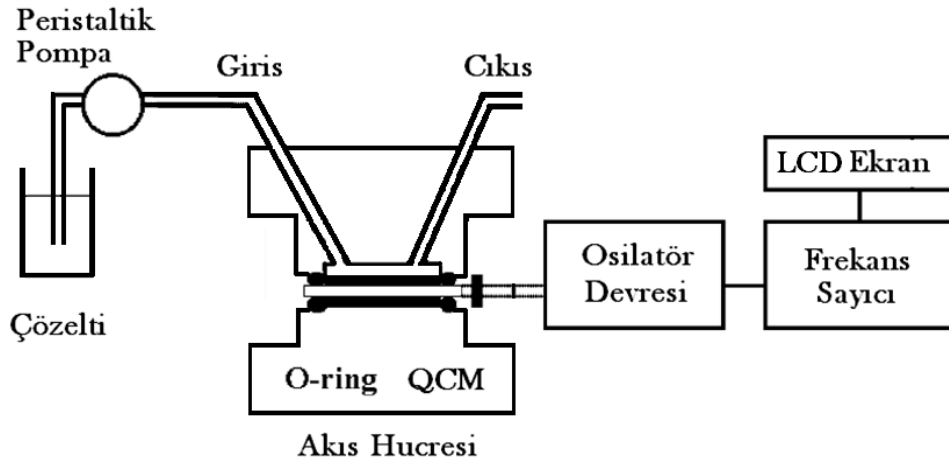
Şekil 3.11 %50 plazma içinden kuvars kristallerin heparin ile etkileştirilmeleri



Şekil 3.12 Plazma içerisinde yapılan, değişik heparin konsantrasyonlarında alınan ölçüm sonuçları.

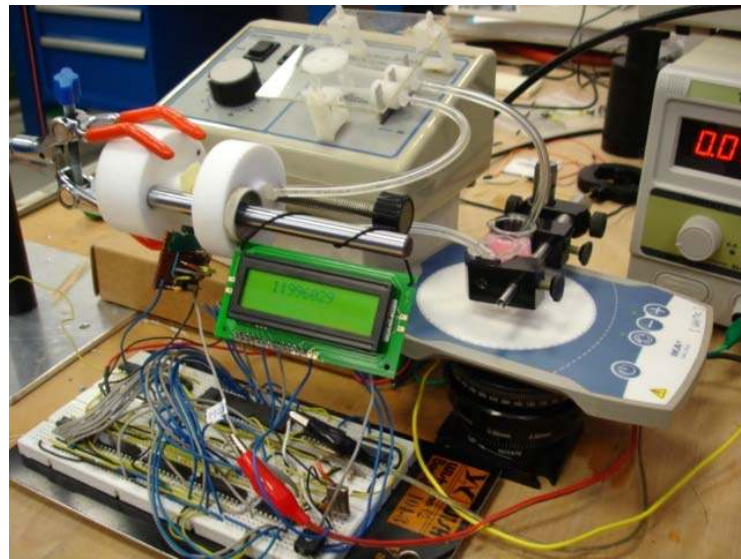
Polietilenimin ligand olarak kullanılması ile plazma içerisinde alınan ölçümlerde, fosfat tamponu içinden heparin ölçümüne göre farklılıklar bulunmaktadır. Öncelikle fosfat tamponu içindeki gibi bir standart sapma elde edilememiştir. Bunun sebebi olarak plazma proteinlerinin gümüş elektrot yüzeyinde unspezifik olarak bağlanmalarından kaynaklanmaktadır. Bu durum AKM ile görüntülenmiş ve kuvars kristal biyosensör karakterizasyon bölümünde (3.2.4.) belirtilmiştir. Doğru denklemi $y = 107,83x + 251,28$ olarak grafikte görülmektedir.

3.2.3.3 Akış hücresinde ölçümler



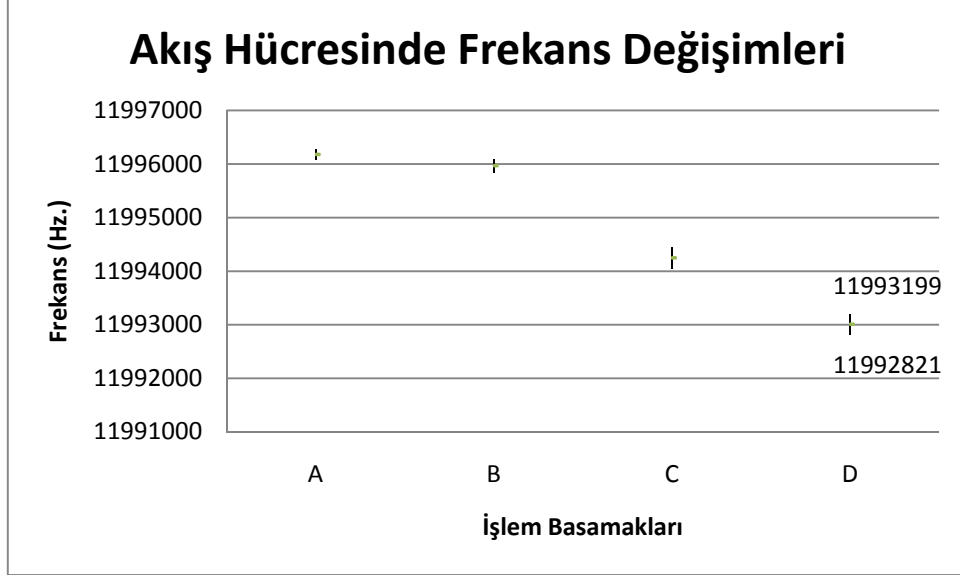
Şekil 3.13 Kurulan akış sistemi blok diyagramı

Kurulan akış hücresi sisteminde, akış hücresi, peristaltik pompa, manyetik karıştırıcı, osilatör devresi ve frekans sayıcı devresi kullanılmıştır. Akış hücresi kan uyumlu olan teflon malzemeden kuvar kristal bacakları dışarıda kalacak şekilde, kristal ölçülerine uygun olarak imal edilmiştir (Şekil 3.11). Ölçüm düzeneği kurulduktan sonra beher içerisine koyulan fosfat tamponu sistemde peristaltik pompa kullanılarak, kuvars kristal frekans değişimi 2-4 Hz. arasında olana kadar beklenir, bu arada frekans değişiminin sabitlenmesi amacıyla akış hücresi vidaları sıkılarak frekans stabilitesi sağlanır.



Şekil 3.14 Akış hücresi ile oluşturulan deney düzeneği görülmektedir

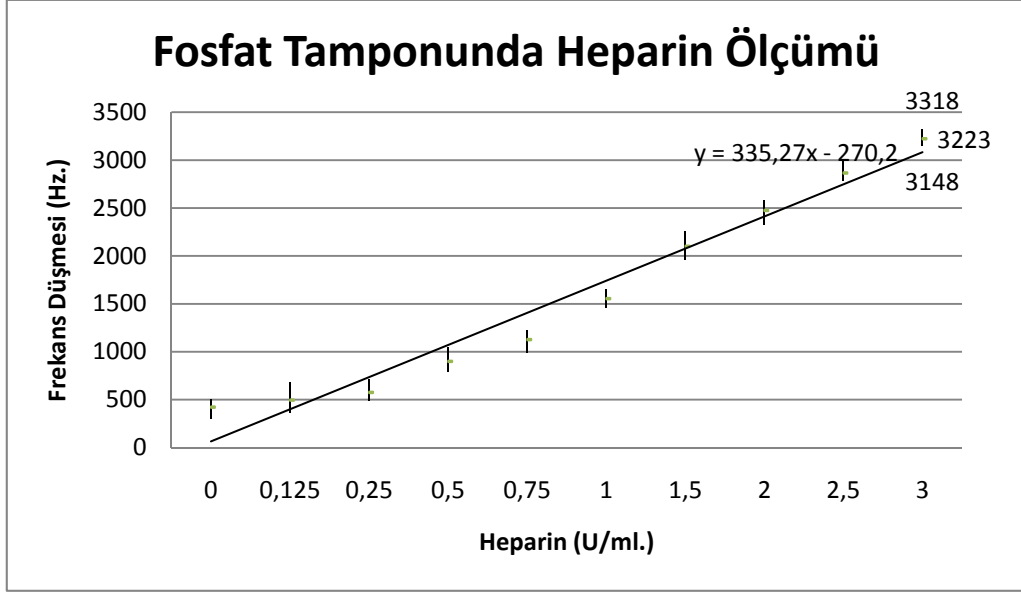
Çizelge 3.5 Akış hücresinde yapılan işlem basamaklarına göre frekans değişimi. A: Kuvars kristal yüzeyi fonksiyonel yapıldıktan sonra havada alınan ölçüm, B: Kuvars Kristal Akış hücresine yerleştirildikten sonra, C: Sistemde fosfat tamponu ile ölçüm alınması, D:Fosfat tamponuna heparin eklenmesi ile alınan sonuç.



3.2.3.3.i Akış hücresinde heparin ölçümü

Akış hücresinde fosfat tamponu içerisinde heparin deneyleri gerçekleştirilmesi sırasında belirtilen prosedüre uyulmuş ve işlem basamakları dikkatli bir şekilde yerine getirilmiştir.

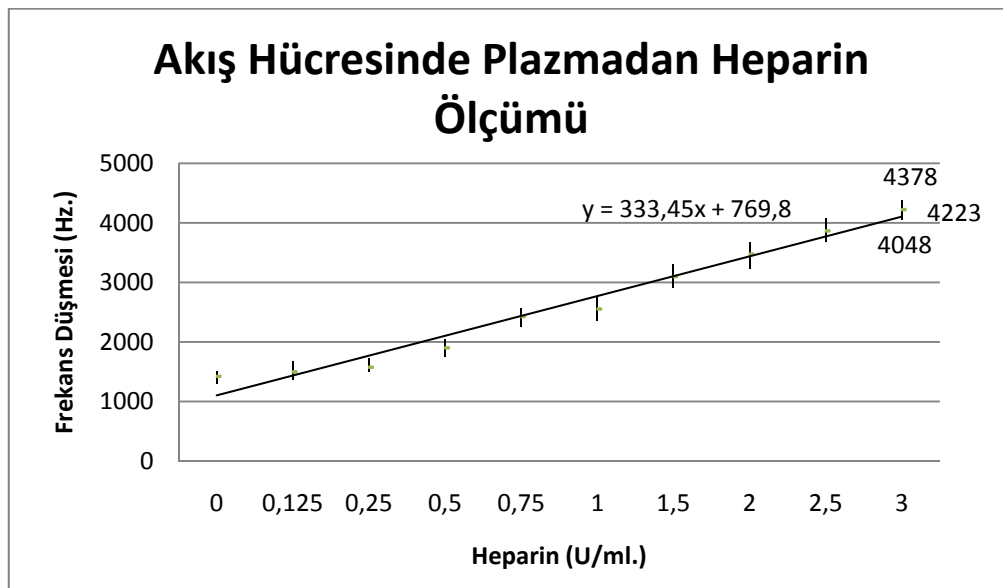
1. Kuvars kristal heparin ölçümü için akış hücresine yerleştirilmeden önce bütün immobilizasyon işlemleri tamamlanmış ve havada kuvars kristal frekansı ölçülmüştür.
2. Kuvars kristal akış hücresine yerleştirildikten sonra yaklaşık olarak 200 Hz. lik bir fark okunmasına dikkat edilmiştir. Bu durum sisteme fosfat tamponu verildiğinde okumanın sabitlenmesini kolaylaştırmaktadır.
3. Sisteme fosfat tamponu verilir ve frekans sayıcıda, akıştan kaynaklanan frekans değişimi sabit olana kadar akış hücresinin kuvars kristale uyguladığı baskı, vida gevşetilip sıkılarak ayarlanır.
4. Sisteme heparin verilerek heparinden kaynaklanan frekans değişimi not edilir. Bu süre yaklaşık olarak 4 dakikada üst limitine ulaşmaktadır.
5. Kuvars kristal hücreden çıkarılarak kuruması beklenir, kuruduktan sonra tekrar ölçüm yapılırsa, 1 adım ile olan frekans farkının konsantrasyona göre değiştiği görülür ve bu fark önceki ölçümlerle kıyaslanarak kontrol edilir.



Şekil 3.15 Akış hücreinde fosfat tamponundan heparin ölçümü. Sensör cevabı $y = 335,27x - 270,2$ doğrusu ile belirtilmiştir.

3.2.3.3.ii Akış hücreinde plazmadan heparin ölçümü

Akış hücreinde plazmadan alınan sonuçlar grafiğe döküldüğünde fosfat tamponu içerisinde alınan değerlere göre, standart sapmanın plazma vizkositesi nedeniyle arttığı gözlemlenmiştir. Doğru grafiği $y = 333,45x + 769,8$ olarak grafik üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 3.16 Akış hücreinde plazmadan heparin ölçümü.

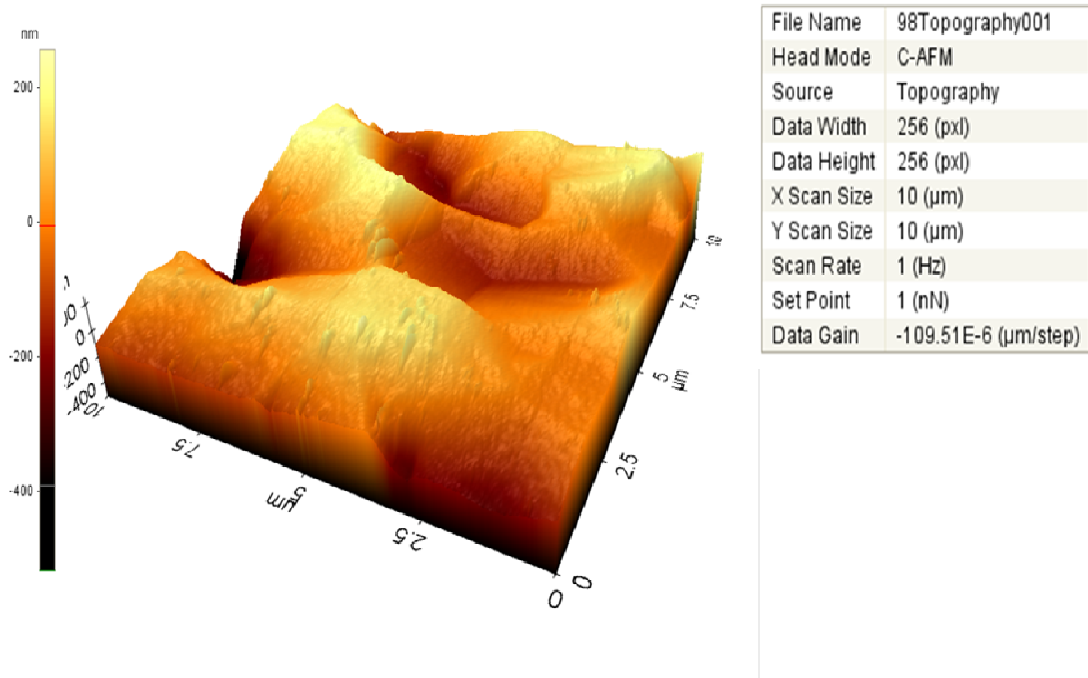
3.2.4 Kuvars kristal biyosensör yüzey karakterizasyonu

Kuvars kristal heparin biyosensör atomik kuvvet mikroskobu (AKM) görüntüleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Merkezi'nde (UNAM) alınmıştır.

3.2.4.1 AKM görüntüleri

Atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri, kontak modda ve $10 \mu\text{m}^2$ lik yüzey alanında alınmıştır. AKM görüntüleri, boş kuvars kristalde, sistamin, glutaraldehit ve PEI immobilizasyonları yapıldıktan sonra ve plazma içerisinde 0,25U/ml. heparin konsantrasyonunda ölçüm alındıktan sonra temin edilmiştir.

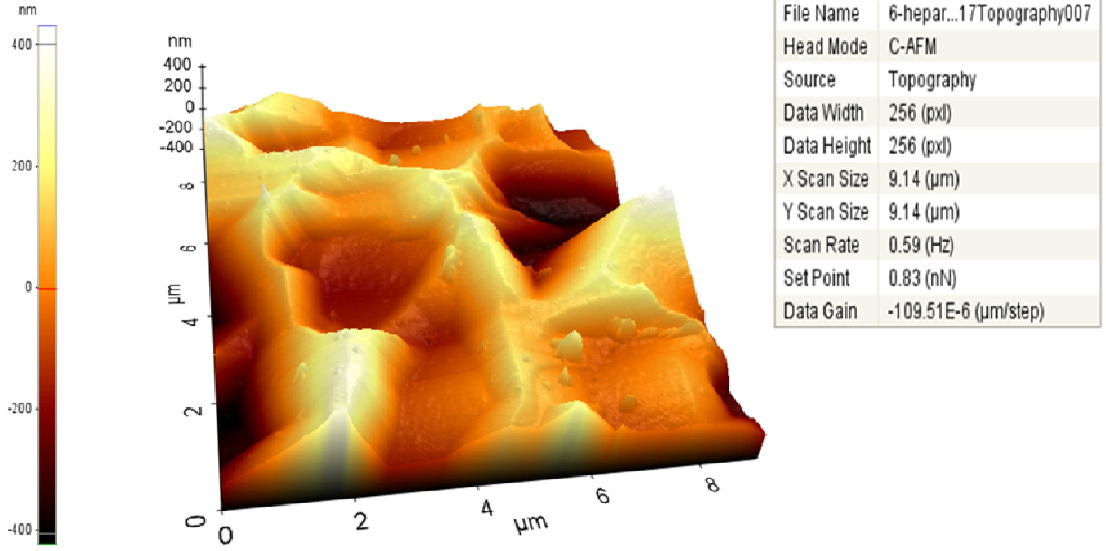
3.2.4.1.i Boş kuvars kristal elektrot yüzeyi



Şekil 3.17 Boş kuvars kristal elektrot yüzeyi AKM görüntüsü

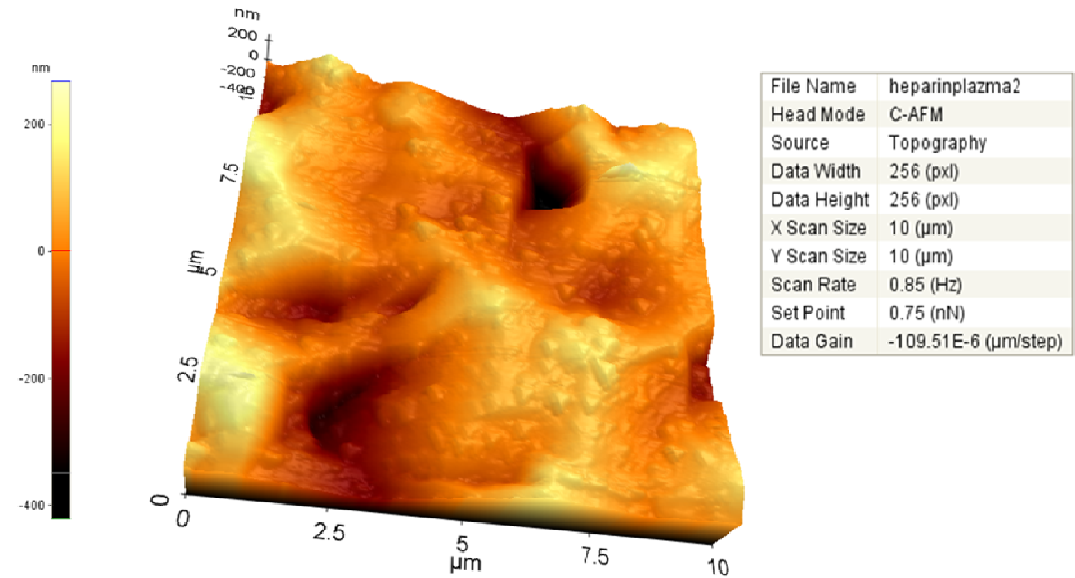
Kuvars kristallerin metal kılıfları çıkarıldıktan sonra alınan AKM görüntüsü Şekil 3.5. de gösterilmektedir. Yüzey üzerinde bir çok partikül olduğu görülmektedir.

3.2.4.1.ii Yüzey aktivasyonu sonrasında yüzey görüntüsü



Şekil 3.18 PEI immobilizasyonu sonrası kuvars kristal yüzeyi

3.2.4.1.iii Heparin ölçümü sonrası AKM görüntüsü



Şekil 3.19 Plazma içinden heparin ölçümü sonrası kuvars kristal yüzeyi AKM görüntüsü.

Polietilenimin görüntüsü ile karşılaştırıldığında, plazma içinden heparin ölçümü sonrasında plazma kaynaklı yüzey pürüzlülüğünün arttığı ve buna bağlı olarak non spesifik plazma proteinlerinin heparin ile birlikte gümüş yüzeye bağlandığı görülmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Heparin biyosensör tasarımı ve üretimine yönelik sunulan tez kapsamında, sensör tanıyıcı tabakasının oluşturulması, sıvı fazda ölçümlerin alınabilmesi için osilatör devresi, akış hücresi tasarımı, üretimi, yüzeyde tutuklanan moleküllerin kütlelerinin bulunması 24 bitlik PIC mikrodenetleyici ile frekans sayıcı devresi ve ihtiyaç duyulan kimyasal ve biyolojik malzemeler temin edilerek hazırlanmıştır.

Sensör yüzeyi oluşturulduktan sonra beher içerisinde fosfat tamponu ile alınan ölçümlerde 0,125-3U/ml heparin değerleri arasında beklenen grafik elde edilmiş ve buradan Sauerbrey denklemine göre kütle dönüşümü yapılmıştır. Heparin ölçümünde polietilenimin polimeri ile farklı heparin konsantrasyonları için ölçümler alınmıştır. Bu ölçümlere dayanarak %50 insan plazma içerisinde heparin ölçümleri yapılmış ve AKM görüntülerinden de anlaşılabileceği üzere plazmaların yüzeyde daha çok alanda toplandığı görülmüştür. Bu durum sadece plazma ve serum içeren çözeltide (0U/ml heparin için) frekans düşüşünün yaklaşık 600 Hz. olmasını sağlamış fakat bu durum eklenen heparin değerlerinde doğrusala yakın sonuçlar elde edilmiştir

Oluşturulan kuvars kristal biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliğine bakılmış ve yüzeylerin 0.1 molar NaOH ile temizlendikten sonra frekansın tekrar heparin ölçümü öncesine geri döndüğü tekrar eden heparin ölçümlerinde görülmüştür.

Beher içinde heparin ölçümü ile alınan sonuçlarda Saurbrey denklemi ile kütlede farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu fark beherde sıvı içinde homojen olarak bulunan ve sürekli manyetik karıştırıcıda homojen dağılım gösteren heparinin %3,3'lük oranının sensör yüzeyine tutunmasından ileri gelmektedir.

Akış hücresi içinde fosfat tamponu ile alınan ölçümlerde kuvars kristal sensörün akış hücresine yerleşimi sırasında zorlanılmış, sensör yüzeyinde deformasyonlar oluşmuştur fakat bu durum alışkanlığı ile ortadan kaldırılmıştır. Akış hücresinde ölçüm sırasında viskozite kaynaklı frekans kaymaları gözlemlenmiş ve bu durum standart sapmaların yüksek çıkmasına sebep olmuştur.

Alınan deney sonuçlarından polietilenimin immobilize kuvars kristallerin, gelecekte heparin biyosensör kullanımına yönelik kullanılabileceği görülmektedir.

PIC mikrokontrolör yazılımında yapılabilecek bir değişiklik ile frekans sayıcı devresinde kuvars kristal biyosensör yüzeyindeki kütle değişimi Sauerbrey denklemi yardımıyla kütle olarak LCD ekranında görölmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] EDMUNDS L.H. Jr., Cardiopulmonary bypass for open heart surgery. Glenn's Thoracic and Cardiovascular Surgery, s.1631-1653, 1996.
- [2] EDMUNDS, L.H. Jr., Cardiac surgery in adult, McGraw Hill, s.255, 1997.
- [3] KOCAKULAK, M., Açık kalp cerrahisinde pulslu perfüzyonun erken dönem etkileri, s.5, 2001.
- [4] TAYLOR, K., Cardipulmonary Bypass, Chapman&Hall Medical, 1986
- [5] KIRKLIN, J.W., Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump oxygenator system (Gibbon type): report of eight cases, Proc. Staff Meet Mayo Clin. vol,30, s.201, 1955.
- [6] COLMAN, R.W., Platelet function during open heart surgery: Comparison of the membrane and bubble oxygenators, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., vol.83, s.805-812, 1982.
- [7] DAVIES, L.K., Hypothermia: physiology and clinical use. Cardiopulmonary Bypass, s.140, 1993.
- [8] EDMUNDS, L.H. Jr., Relationship between platelet count and cardiectomy suction return, Ann. Thorac. Surg., vol.25, s.306-310, 1978.
- [9] ROSENBERG, R.D., Heparin-antithrombin system: A natural anticoagulant mechanism, Lippincott, s. 837,1994.
- [10] GRAVLEE, G.P., Anticoagulation for cardiopulmonary bypass. Williams & Wilkins, s.340, 1993.
- [11] SWARTZ, R.D. Anticoagulation in Patients on Hemodialysis Clinical Dialysis 2nd edition, C.T. Press,1990.
- [12] SINN, E., Prescription Drug Information for Consumers & Professionals, Heparin Lock Flush, 2004.
- [13] QUADER, A.M., Low Molecular Weight Heparins, J. Am. Coll. Surg. vol.187, s.641-658, 1998.
- [14] HIRSH, J., Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin, Circulation vol.103, s.2994-3018, 2001
- [15] JOBES, D.R. and AITKEN, G.L., Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., vol.110, s.36-45, 1995.

- [16] CAMERON, D.E., Cerebral blood flow during cardiopulmonary bypass: influence of temperature and pH management strategy, *Ann. Thorac. Surg.*, vol.59, s.880-886, 1995.
- [17] McLEAN, J., The discovery of heparin. *Circulation*, vol.19, s.75-78, 1959.
- [18] MOORTHY, S., and POND, W., Severe circulatory shock following protamine (anaphylactic reaction), *Anesth. Analg.*, vol.59, s.77-78, 1980.
- [19] VANDENHAAR, J., The hemodynamic effects of rapid intravascular injection of protamine sulphate following cardiac surgery. *J. Extra-Corpor. Technol.*, vol.10, s.200-202, 1978.
- [20] VERTRES, R.A., Protamine-induced anticoagulation following coronary bypass, *Proceed Am. Acad. Cardiovasc. Perfusion*, vol.7, s.94-97, 1986.
- [21] McGOWEN, K.J., More precise heparin and protamine management during cardiopulmonary bypass, *Am Acad Cardiovasc Perfusion* vol.11, s.12-16, 1990.
- [22] BRAUER, F.S., Heparin therapy during extracorporeal circulation: The use of a drug response curve to individualize heparin and protamine dosage, *J Thorac Cardiovasc Surg.*, vol.69, s.685, 1975.
- [23] LAWRENCE, A.E., Heparin reversal using varied protamine to heparin ratios. *Proceed Am Acad Cardiovasc perfusion*.
- [24] NAFTEL, D.C., Effects of protamine administration after cardiopulmonary bypass on complement, blood elements, and the hemodynamic state. *Ann Thorac Surg.* s.193-199, 1986.
- [25] PIEHLER, J.M., Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. *J Thorac Cardiovasc Surg*, vol.84, s.505-514, 1982.
- [26] LAPPIS, D.G., Catastrophic pulmonary vasoconstriction associated with protamine reversal of heparin, *Anesthesiology*, vol.59, S.470-473, 1983.
- [27] KARUBE, I. and WILSON, G.S., *Biosensors: Fundamentals and applications*, Oxford, s.770, 1987.
- [28] VIVES, A.A., *Piezoelectric Transducers and Applications*, Springer, 2008)
- [29] JAHNKE M., Thermal enzymes probe: a novel approach to chemical analysis in *Enzyme Engineering*, Plenum, s.411-417, 1974.
- [30] KERKHOF J.C. van, P., BERGVELD, P., The ISFET based heparin sensor with a monolayer, *Biosens. Bioelectron.*, vol.10, s.269-282, 1995.

- [31] GAUS, K and HALL E.A., Evaluation of Surface Plasmon Resonance (SPR) for heparin assay I. Protamine as a heparin affinity surface , Colloid Interf. Sci. vol.194, s.364-372, 1997.
- [32] GADZEKPO, V.P.Y., BUHLMANN, P., et al., Development of an ion-channel sensor for heparin detection, Anal. Chim. Acta., vol.441, 163-173, 2000.
- [33] MA, S.C. and YANG, V.C., et al. Anal. Chem. Vol.65, s.2078. 1993.
- [34] WAHR Wahr J.A, Yun J.H, et al. Development of an ion-channel sensor for heparin detection, J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. Vol.10 (1996) 447.
- [35] HANKEL, W.G., Über die aktinoud piezoelektrischen eigenschaften des bergkrystalles und ihre beziehung zu den thermoelektrischen, Abh. Sächs. vol.12 s.457, 1881.
- [36] CURIE, P., ve CURIE J., Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémièdres à faces inclinées, Comptes Rendus vol. 91, s. 294-295, 1880.
- [37] LIPMANN, G., Principe de conservation de l'électricité" Annales de Physique et de Chimie, vol.24, s.145-178, 1881.
- [38] RASOOLY, A. and HEROLD, K.E., Methods in molecular biology: Biosensors and biodetection, vol. 504, 2009.
- [39] STEINEM, C., JANSHOFF, A., Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors Methods and Applications, Springer, vol.5, s.180, 2006
- [40] SRIVASTAVA A.K., and SAKTHIVEL P. ,Quartz-crystal microbalance study for characterizing atomic oxygen in plasma ash tools, Vac. Sci. Technol, vol.19, s.97-100, 2001.
- [41] URBAN, G.,Springer series on chemical sensors and biosensors methods and applications s.31, 2005.
- [42] ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER. P., Molecular biology of the cell, Molecular Recognition Processes Garland Science, s.161, 2002.
- [43] STEINEM, C., JANSHOFF, A., Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors Methods and Applications, Springer, vol.5, s.248, 2006.
- [44] HERMANSON, G.T., Bioconjugate technics, Acedemic Press, s.266, 2008.
- [45] LEEA, Y.G. and CHANGB, K.S., Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid- vol.65, s.1335–1342, 2005.

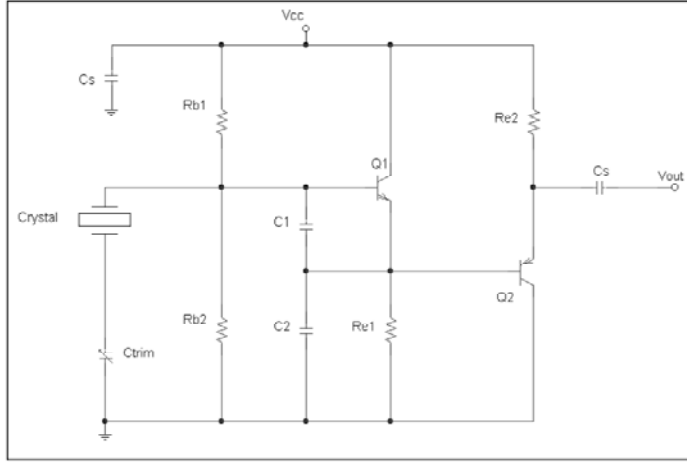
- [46] ALBAYRAK, N. and YANG, S.T., Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnol. Prog.* vol.18(2), s.240-251, 2002.
- [47] European Pharmacopoeia, 3rd edition, Strasburg 1997.
- [48] JILGE, G., UNGER, K. K., and ESSER, U., Retention behaviour of paracelsin peptides on reversed-phase silicas with varying chain length and ligand density, *J. Chrom.* Vol. 476, 37-48, 1989.
- [49] JANZEN, R., UNGER, K. K., MULLER, W., Adsorption of proteins onto porous and nonporous poly-(ethyleneimine) and tentacle-t type anion exchangers, *Chrom* vol. 522, s.77-93, 1990.
- [50] KITAGAWA, N., Polymer coatings as stationary phases in high-performance liquid chromatography, *J. Chrom.* Vol.443, p.133, 1988.
- [51] GAUS, K. and ELIZABETH, A.H., Evaluation of surface plasmon resonance (SPR) for heparin assay II. Polyethylene-Imine (PEI) as an affinity surface, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.194, s.373–378, 1997.
- [52] JEON, O., Heparin-conjugated polyethylenimine for gene delivery, *Journal of Controlled Release*, vol.132, s.236–242, 2008.
- [53] STEINEM, C., JANSHOFF, A., Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors Methods and Applications, Springer, vol.5, s.241, 2006.
- [54] FREDERIX,F. and CAMPITELLI A., Simultaneous AFM and QCM measurements methodology validation using electrodeposition, *Journal of The Electrochemical Society*, vol.150, s.229-234, 2003.
- [55] YETKİN, Ö., TEK, İ., YETKİN, F.,NUMANOĞLU, N., Value of plasma viscosity as an acute phase reactant in patients with pneumonia, *Journal Of Ankara Medical School*, vol. 25(2), 2003.
- [56] MAKOWER, A., and SCHELLER, F.W., A set of piezoelectric biosensors using cholinesterases, *Methods in Molecular Biology*, vol.504, s.3-22, 2008.
- [57] QCM response in a liquid fundametals of mass measurements, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 86, s.9-16, 2006.
- [58] BRAGA, P.C. and RICCI, D., atomic force microscopy: biomedical methods and applications, *Methods in Molecular Biology*, vol. 242, s.3-12, 2003.

- [59] BINNING, G., QUATE, C.F. and GERBER, C., Atomic force microscope, Physics Review Letters, vol.56, s.930, 1986.
- [60] MATTHYS, R.J., Crystal oscillator circuits. Krieger Publishing Company, s.32, 1998.
- [61] TABRIZI Amir Parviz Farsçı, Altın Nanopartikül Üretim ve Kuartz Kristal Mikrobals Sisteminde Kullanımı, Yük. Lis. Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, S.36, 2005.
- [62] LIU, Y-C, WANG, C.M. and HSIUNG K.P., Comparison of different protein immobilization methods ,on quartz crystal microbalance surface, Flow Injection Immunoassay Analytical Biochemistry vol.299, s.130–135, 2001.

EKLER

	<u>Sayfa</u>
EK-1 Colpitts Osilatör.....	59
EK-2 Frekans Sayıcı Devresi.....	60

EK-1 Colpitts Osilatör



Şekil Colpitts Osilatör açık devre şeması

Devrede kullanılan elektronik devre elemanları

Çizelge Direnç değerleri

Referans	Değer	Adet
Rb1	1k	1
Rb2	8,2k	1
Re1	1k	1
Re2	10k	1

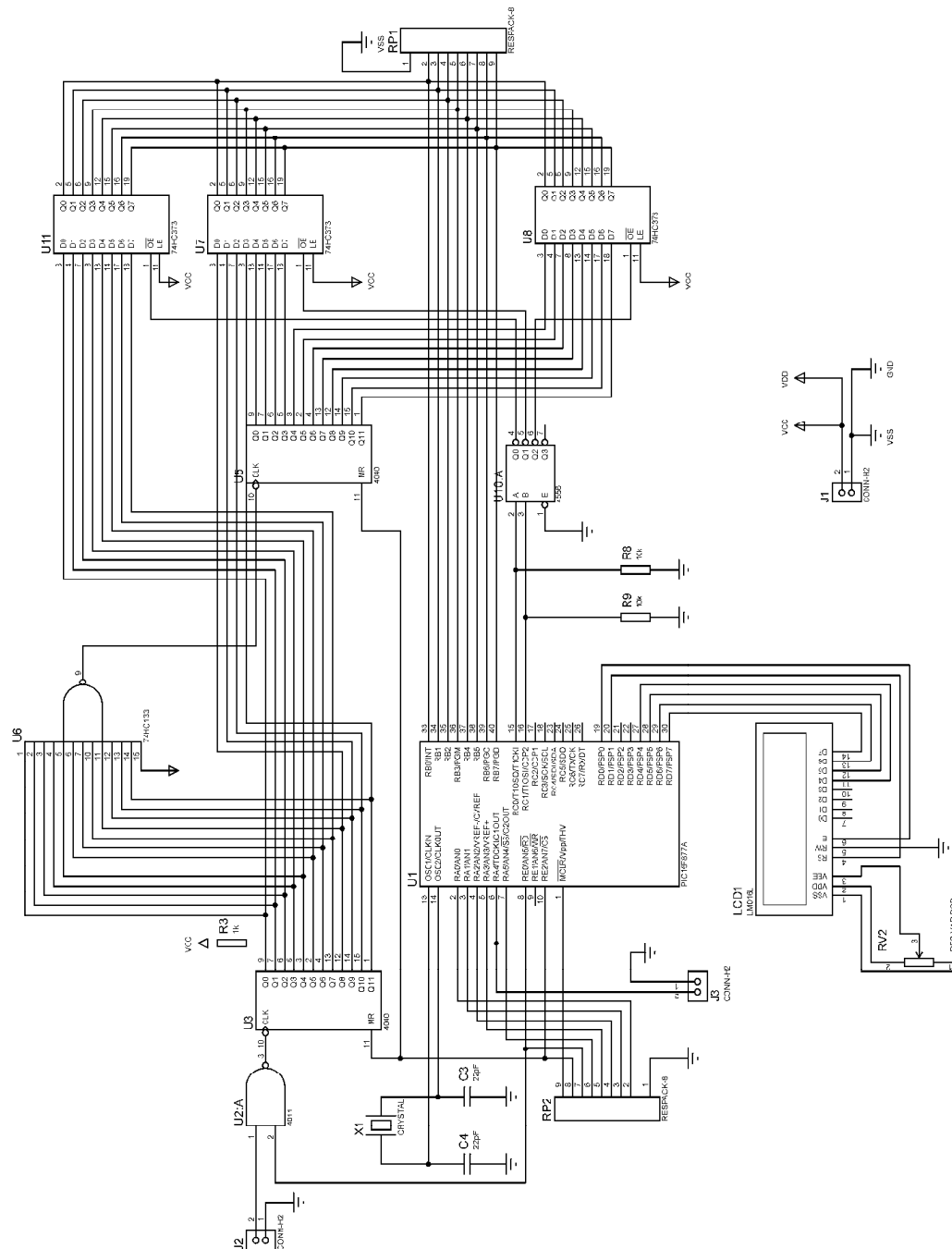
Çizelge Kondansatör değerleri

Referans	Değer	Adet
C1	22pF	1
C2	330pF	1
Cs	22pF	2

Çizelge Transistör değerleri

Referans	Değer	Adet
Q1, Q2	BF255	2

EK-2 Frekans Sayıcı Devresi



Şekil 24 bitlik frekans sayıcı ve display sürücü devresi

Mikrobasic programı ile yazılan 24 bitlik frekans sayıcı

```
program frekans_sayici
dim text as string[11]
dim I, X, Y as longint
dim X1, X3 as byte
dim X2 as word
```

```
main:
TRISA=0
TRISC=0
TRISE=0
TRISB=255
```

```
PORTA=0
Lcd_Config(PORTD,7,6,5,4,PORTD,1,3,0) ' Lcd_Init_EP5, see Autocomplete
LCD_Cmd(LCD_CLEAR) ' Clear display
LCD_Cmd(LCD_CURSOR_OFF) ' Turn cursor off
LCD_Out(1,4, text) ' Print text to LCD, 1st row, 1st
column
```

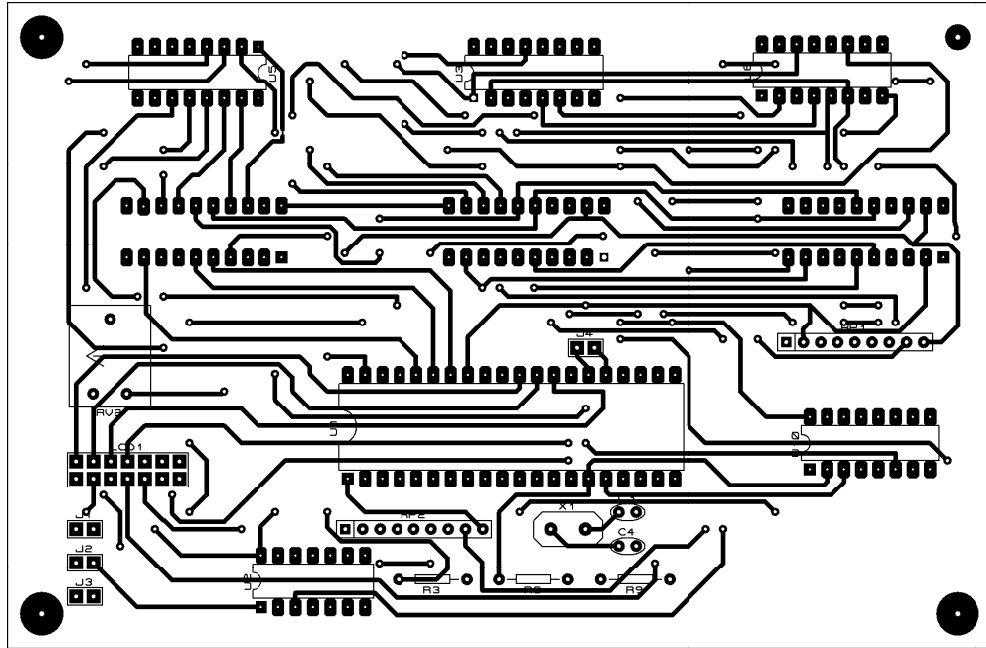
```
ANA:
X=0
I=0
Y=0
X1=0
X2=0
PORTE.2=1
PORTE.0=0
Delay_ms(1)
PORTE.2=0
PORTE.0=1
FOR I=1 TO 100000
    Y=I
NEXT I
PORTE.0=0
'LATCH DE 3. 8 bitlik data GİRİŞİ İÇİN SEÇİM YAP
PORTC.0=0
PORTC.1=1
X1=0
X=0
X2=0
X3=0
X3=PORTB
X=X3
X=X<<16
'LATCH DE 2. 8 bitlik data GİRİŞİ İÇİN SEÇİM YAP
PORTC.0=1
PORTC.1=0
X2 = PORTB
```

```

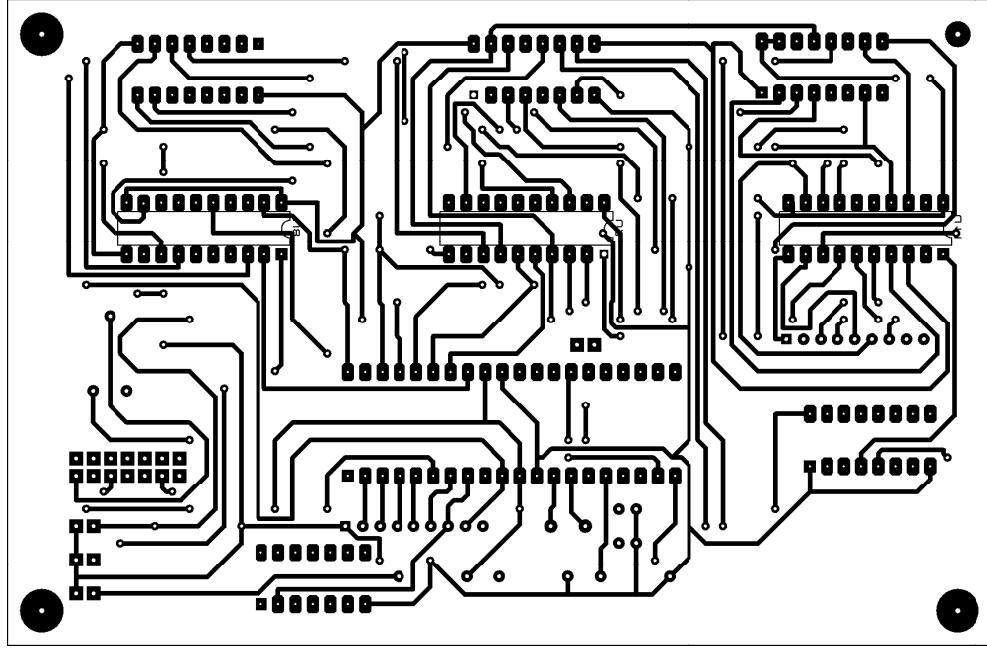
X2=X2<<8
X=X+X2
'LATCH DE 1. 8 bitlik data GİRİŞİ İÇİN SEÇİM YAP
PORTC.0=0
PORTC.1=0
X1=0
X1=PORTB
X=X+X1
PORTC.0 = 1
PORTC.1 = 1
'INTEGER TO TEXT DÖNÜŞÜMÜ
Y=X 'FORMUL EKLENECEK
'INTEGER TO TEXT DÖNÜŞÜMÜ
LongintToStr(Y,text)
LCD_Out(1,1,text)
GOTO ANA
end.

```

Baskı Devre



Şekil Baskı devre üstten görünüm



Şekil Baskı devre alttan görünüm

Devrede kullanılan elektronik devre elemanları

Çizelge Direnç Değerleri

Referans	Değer	Adet
R3	1k	1
R8, R9	10k	2

Çizelge Entegreler

Referans	Değer	Adet
U1	PIC16F877A	1
U2	4011	1
U3, U5	4040	2
U6	74HC133	1
U7, U8, U11	74HC373	3
U10	4556	1

Çizelge Kondansatörler

Referans	Değer	Adet
C3, C4	22pF	2

Çizelge Çeşitli devre elemanları

Referans	Değer	Adet
J1-J3	CONN-H2	3
LCD1	LM016L	1
RP1, RP2	RESPACK-8	2
RV2	RES-VAR-PCB	1
X1	CRYSTAL	1