ATOMİK KUVVET MİKROSKOBU İLE BİYOMOLEKÜLLERİN DOĞAL ORTAMLARINDA TAYİNİ VE KARAKTERİZASYONU

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF BIOMOLECULES WITH ATOMIC FORCE MICROSCOPE IN THEIR NATIVE ENVIRONMENTS

DEMET ÇATÇAT KAYIM

Yrd. Doç. Dr. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

Demet Çatçat Kayım'ın hazırladığı **"Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Biyomoleküllerin Doğal Ortamlarında Tayini ve Karakterizasyonu"** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan
(Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL) .....

Danışman
(Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN) .....

Üye
(Prof. Dr. Şadan ÖZCAN) .....

Üye
(Doç. Dr. Eylem GÜVEN) .....

Üye
(Doç. Dr. Gökhan DEMİREL) .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

***Sevgili Aileme*,**

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

07 / 05 /2014

DEMET ÇATÇAT KAYIM

ÖZET

ATOMİK KUVVET MİKROSKOBU İLE BİYOMOLEKÜLLERİN DOĞAL ORTAMLARINDA TAYİNİ VE KARAKTERİZASYONU

Demet ÇATÇAT KAYIM

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Mayıs 2014, 134 sayfa

Diğer yüksek çözünürlük teknikleri ile karşılaştırıldıklarında, AKM'lerin en önemli özelliklerinden birisi sıvı içerisinde görüntü alabilme yeteneğidir. Ancak sıvı içerisinde görüntü alabilme ambiyant koşullara göre çok daha zordur, çünkü sıvı yüzeyi lazer ışını yansımasına neden olmaktadır ve kantileveri akustik olarak titreştirmek sıvı içerisinde zordur. Ayrıca örnek alttaş yüzeyine sıkıca tutturulmalıdır ve sıvı hücre içerisindeki hava kabarcıkları ve sıvı kaybı iyi bir yalıtım ile minimize edilmelidir. Bu tarz engellerin üstesinden gelebilmek için bu tez kapsamında ilk olarak Nanomanyetik Bilimsel Cihazlar tarafından üretilmiş olan AKM cihazında mekanik, optik ve elektronik olarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu kapsamda iki prototip geliştirilmiştir. İlk prototip geliştirilirken mekanik engeller ortadan kaldırılmış ve sıvı hücre içerisinde mikron ve submikron skalada çeşitli biyolojik örneklerin görüntüleri kaydedilebilmiştir. Bu çalışmalarda varolan sıvı hücre, kantilever tutucu tasarımı ve kullanılan malzemeler literatür verileri ışığında değiştirilmiştir. Daha sonra sıvı içerisinde gerçek atomik çözürlük elde edilebilen AKM geliştirilmesi için optik yolakta ve AKM elektronik düzeneğinde iyileştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde kantilever sıvı içerisinde, istenmeyen frekans eğrilerinden kaçınılarak doğru merkez frekans eğrisinde titreştirilebilmiş ve aynı zaman da düzgün bir rezonans eğrisi kaydedilebilmiştir. Bu şekilde geliştirilen AKM ile kantileverin rezonanstaki termal olarak titreşiminin gürültü tabanları sırası ile havada 19.24 fm/√Hz, sıvıda ise 28.43 fm/√Hz olarak ölçülmüştür ve atomik skalada yüksek çözünürlük görüntüleri kaydedilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci ve son kısımlarında AKM'yi çok kuvvetli bir karakterizasyon cihazı haline getiren kuvvet spektroskopi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yüzeyinde bulunan farklı reseptör ve proteinlerin ilgili ligandları ile etkileşimleri, hücresel yapılanmayı ve hücrelerin birbirleri ile olan ilişkilerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu etkileşimlerin çok daha detaylı ve tek molekül düzeyinde anlaşılması, günümüzde moleküler biyoloji ve biyofizik çalışma alanlarının en önemli sorularındandır. Kuvvet spektroskopisi, reseptör-ligand etkileşimlerini,

uygun fizyolojik koşullarda pikonewton düzeyinde ölçebilen oldukça hassas bir karakterizasyon tekniğidir. Yalnız bu etkileşimlerin ölçülebilmesi ve AKM iğne ucunun hassas bir sensör gibi davranabilmesi için, ucun çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcılar ile modifiye edilmesi gerekmektedir. Tez kapsamında AKM ucu modifikasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve çeşitli yöntemler denenerek kalibrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışması olarak streptavidin-biyotin spesifik bağlanma çalışmaları model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalar lizozim baskılanmış polimer ile lizozim arasındaki bağlanmalar kaydedilerek sonuçlandırılmıştır. Tezin son aşaması olarak AKM'nin biyomedikal uygulamalarına örnek teşkil edecek ostesarkoma benzeri hücrelerin substrat ve inkübasyon günlerine bağlı olarak elastisite tayinleri yapılmıştır. Örneklerin elastik modülü ve sertlikleri AKM'lerin nanoindentasyon özelliği ile tayin edilebilmektedir. Bu özellik sayesinde bu çalışma kapsamında SaOS-II hücrelerinin mekaniği hakkında kantitatif bilgi edinilmiş ve çeşitli parametrelere bağlı olarak hücre elastisite ve mekaniği üzerindeki değişim karşılaştırmaları yapılabilmiştir.

Sonuç olarak tez çalışmasında gürültü kaynakları minimize edilerek, akustik titreştirme ve optik ışık saçılması yöntemi ile çalışan kapalı sıvı hücre AKM geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemin hassasiyeti, tek molekül kuvvet spektroskopisi ve nanoindentasyon çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında tez çalışması boyunca tasarlanan kapalı sıvı hücre AKM'sinin, biyolojik moleküllerin biribileri ile olan etkileşimlerini fizyolojik ortamlarda nano ölçeklerde incelenebilmesinden dolayı temel bilimler ve tıp alanında kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Atomik Kuvvet Mikroskopu, Kuvvet Spektroskopisi, Tek Molekül Tayini, Nanoindentasyon

ABSTRACT

DEDECTION AND CHARACTERIZATION OF BIOMOLECULES WITH ATOMIC FORCE MICROSCOPE IN THEIR NATIVE ENVIRONMENTS

Demet ÇATÇAT KAYIM

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN

Co-supervisor: Prof. Dr. Emir. Baki DENKBAŞ

May 2014, 134 pages

One of the most prominent features of AFM is its ability to operate under aqueous solutions compared to other high resolution microscopes. However, imaging in aqueous solutions is a more difficult process than imaging in ambient conditions, because liquid surface causes refraction of laser beam and vibrating the cantilever becomes more difficult due to acoustical resonances. In addition, sample should be immobilized, air bubbles should be prevented and sealing is essential to avoid liquid loss. In order to avoid these type of obstacles, in the scope of this thesis at first mechanical, optical and electronic optimization studies of AKM, manufactured by Nanomagnetics Scientific Instruments Ltd. Şti., were carried out and two prototypes have been developed in this content . During the development of the first prototype mechanical obstacles were eliminated and micron and submicron scale images of the various biological samples could be recorded in the liquid cell. In these studies, the existing liquid cell , kantilever holder design and materials used were changed in view of the literature. As the second phase of this study, true atomic resolution were obtained in liquid with new developments through optical pathways and improvements in electronics assembly. As a result of this study, kantilever could vibrated and also a resonance curve could be recorded properly in the liquid, avoiding unwanted frequency curves towards the center frequency of the curve. Thus with the developed AKM kantilever was thermally vibrated at its center resonance frequency and noise floors were recorded as 19.24 fm / $\sqrt{\text{Hz}}$, 28.43 fm / $\sqrt{\text{Hz}}$ was measured in air and liquid respectively, and high-resolution images were recorded at the atomic scale.

In the second and final part of the thesis force spectroscopy studies, that makes AFM a most powerful tool for characterization, were carried out . The interactions between membrane proteins/receptors and their cognate ligands initiate most of the cellular response and structural organization. The understanding of these interactions in single molecule level is one of the most important challenges in

molecular biology and biophysics studies. Force spectroscopy is extremely accurate characterization technique that is capable of measuring receptor-ligand interactions at pikonewton levels in appropriate physiological conditions. However measuring those interactions and using AFM tip as a sensor, tip should be modified with various crosslinkers with the help of chemical bonds. In the scope of this thesis AFM tip modification was carried out and calibration tests was carried out by using various methods. Validation studies as streptavidin-biotin specific binding studies were used as templates. These studies with lysozyme imprinted polymer binding between lysozyme have been recorded. As the final stage of the thesis, as an example of AFM biomedical applications, determination of osteosarcoma-like cells elasticity was carried depending on the substrate and incubation days. The elastic modulus and hardness of samples can be assessed by the nano-indentation feature of AFM. With this feature, quantitative information about the mechanics of Saos - II cells was obtained and cell mechanics and elasticity changes based on various parameters could be compared in the scope of this study.

To conclude, closed liquid cell AFM was improved with using acustic osilation and optic light scattering with minimizing noise effects in this study. Single cell force spectroscopy and cell elasticity measurements with nanoindentation were completed with using sensivity of this system. To be capable of dedecting interaction between each other biological molecules in physiological environment with designed closed liquid cell high resolution AFM at nano scale, it can be provided that AFM is usable for fundamental sciences and medicine.

Keywords: Atomic Force Microscopy, Force Spectroscopy, Single Molecule Detection, Nanoindentation

TEŞEKKÜR

Tez boyunca bütün süreçlerde bilgi birikimi ve tecrübeleri ile yaptığı değerli katkılardan, bana verdiği güven, destek ve yol göstericiliğinden dolayı sayın danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN'a,

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, bu çalışmanın tamamlanabilmesi ve laboratuar çalışmalarımı sonuçlandırabilmem için bana laboratuarının tüm imkanlarını sunan, çalışmanın kırılma noktasında bana güven veren ve sonsuz desteğini esirgemeyen sayın eş danışman hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve manevi desteklerinden dolayı sevgili ailesine,

Bilimsel çalışma yapmam için bana destek veren, bu çalışmanın ortaya çıkması için öncü olan, bilgi ve deneyimini esirgemeyen, şirketinin ve laboratuarının olanaklarını sunan sayın Prof. Dr. Ahmet Oral ve Nanomanyetik Bilimsel Cihazlar ailesine,

Tez boyunca sahip olduğu deneyim ve birikimi benimle paylaşan, zamanını ve desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Şadan Özcan ve Doç. Dr. Eylem Öztürk Güven'e,

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Tasarım aşamasında tecrübelerini benimle paylaştığı ve değerli katkılarından dolayı değerli arkadaşım Serhat Çelik'e,

Tezin laboratuar çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen ve büyük bir özveriyle destek veren değerli arkadaşlarım Tamer Çırak, Dr. Erkut Yılmaz, Tayfun Vural, Dr. Cem Bayram, Duygu Usta, Betül Bozdogan Pala ve Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu üyelerine,

Hayatımın her anında benim yanımda olan, beni özenle büyüten ve hayatın zor dönemeçlerine takılmadan yola devam edebilme gücünü ve azmini bana sonsuz destek ve inançları ile veren canım annem ve babama, hayatıma girdiği günden itibaren beni her konuda destekleyen, her zaman bilgi birikimi, tecrübeleri ve yardımları ile yanımda olan çok değerli sevgili eşim Mehmet Kayım'a, bana sevgi ve sıcaklıkları ile hayatın en önemli hediyelerini veren biricik oğullarım Berker ve Casper'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezin tasarım aşaması bölümünde 3070603 No'lu TEYDEB projesi ile önemli desteğini gördüğümüz TUBİTAK'a,

Tezin tayin ve karakterizasyonu bölümünde 012D09604001 No'lu destek projesi ile önemli desteğini gördüğümüz Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Başkanlığı'na teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i

ABSTRACT iii

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

ÇİZELGELER x

ŞEKİLLER xi

SİMGELER VE KISALTMALAR xix

1.GİRİŞ 1

2.GENEL BİLGİLER 6

2.1 Atomik Kuvvet Mikroskopu 6

2.1.1. Çalışma Prensibi ve Temel Bileşenleri 6

2.1.2. Uç ve Yüzey Arasındaki Etkileşim Kuvvetleri 9

2.1.2.1. Van der Waals Kuvvetleri 9

2.1.2.2. Kapiler Kuvvetler 10

2.1.2.3. Sıvı İçerisinde Etki Eden Kuvvetler 11

2.1.3. Görüntüleme Modları 13

2.1.3.1. Temaslı Mod 13

2.1.3.2. Tıklamalı Mod 14

2.1.3.3. Temassız Mod 15

2.1.4. Sıvı İçerisinde AKM ve Biyolojik Örneklerin Görüntülenmesi 15

2.2. Kuvvet Spektroskopisi 20

2.2.1. Tek Molekül Kuvvet Spektroskopisi 21

2.2.1.1. AKM Ucu Modifikasyonu 25

2.2.1.2. Reseptör Ligand Etkileşimlerinin Dinamiği 27

2.2.2. Nanoindentasyon 29

2.3. AKM'ler ile Biyomalzeme Uygulamaları 31

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 33

3.1. Yüksek Çözünürlükte Görüntü Alan AKM Geliştirilmesi ve Test Edilmesi 33

3.1.1. Birinci Kapalı Sıvı Hücre Prototipi 33

3.1.1.1. Kantilever Tutucu Gövdenin Mekanik Tasarımında Yapılan Değişiklikler 35

3.1.1.2. Sıvının Hücre İçerisinde Hapsedilmesi 41

3.1.1.3.Hava Kabarcığı Oluşumunun Engellenmesi 42

3.1.1.4. Yansıyan Işığın Fotoduyar Yüzeye Dik Açı ile Düşmesi 44

3.1.2. Son Prototipin Geliştirilmesi 46

3.1.2.1. Kantileverin Sensör Tutucu Üzerine Tutturulması 48

3.1.2.2. Örnek Tutucu ve Tarayıcı Tasarımı 51

3.1.2.3. Gürültü Kaynaklarının Baskılanması 54

3.1.2.4.Lenslerin ve Prizmanın Belirlenmesi 60

3.2. Kuvvet Spektroskopisi Çalışmaları 64

3.2.1. AKM Sensör Ucu/Çipi Amin Modifikasyonu 64

3.2.1.1. Etanolamin ile Amin Bağlama 65

3.2.1.2. APTES ile Amin Bağlama 65

3.2.2. Aminlenmiş AKM Sensör Uçlarına/Çiplerine PEG Tutturulması 66

3.2.3. Ligand Bağlanması 67

3.2.3.1. AKM ucunun/çipinin NHS-PEG-SPDP bağlayıcı molekülü kullanılarak IgG antibadi ile modifiye edilmesi 67

3.2.3.2. AKM ucunun/çipinin 4-formil-benzamido-dPEG-TFP bağlayıcı molekülü kullanılarak IgG antibadi ile modifiye edilmesi 68

3.2.4. Validasyon Çalışmaları 69

3.2.4.1. AKM Ucuna Bağlanan Molekül Sayısının Tayini 69

3.2.4.1. Kuvvet Spektroskobisi Ölçümleri 69

3.3. Nanoindentasyon Çalışmaları 71

3.3.1. Titanyum Yüzeylerinin Anodizasyon Yöntemi ile Hazırlanması 73

3.3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları 74

3.3.3. AKM ile Biyomekanik Özelliklerin Ölçümleri 75

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 76

4.1. Sıvı İçerisinde Çalışan Yüksek Çözünürlük AKM Geliştirilmesi 76

4.1.1. İlk Prototip ile Alınan AKM Görüntüleri 81

4.1.2. Son Prototip ile Alınan AKM Görüntüleri 85

4.2. Kuvvet Spektroskopisi Çalışmaları 90

4.2.1. AKM'nin KS Validasyonu 90

4.2.2. Tek Molekül Kuvvet Spektroskopisi Çalışmaları 92

4.2.2.1. Uç ve Çipler Üzerindeki Molekül Sayılarının Belirlenmesi için Kalibrasyon Grafiğinin Çıkartılması 92

4.2.2.2. APTES ve Etanolamin Modifikasyon Yöntemlerinin Verimlilik Ölçümü Sonuçlarının Değerlendirilmesi 94

4.2.2.3. AKM Çipi Modifikasyonu Adımlarındaki Spesifik Olmayan Bağlanmaların Kontrol Deneyleri Sonuçları 95

4.2.2.4. Farklı Miktarlarda Alınan IgG'lere Göre Hazırlanan Çiplerin Spektrofotometre ile Ölçümleri 97

4.2.2.5. Aldehit-PEG-TFP Çapraz Bağlayıcısı ile AKM Ucu Modifikasyonu. 98

4.2.2.7. Modifiye Edilmiş Uçların AKM Spektroskopi Ölçümlerinin Sonuçları 98

4.3. Nanoindentasyon Çalışmaları 105

4.3.1. Nanoindentasyon Validasyon Çalışmaları 105

4.3.2. TNT Üzerine Yerleştirilmiş Hücrelerin TEM ve AKM ile Görüntülenmesi 108

4.3.3. TNT Üzerindeki Hücrelerin Elastisite Ölçüm Sonuçları 112

KAYNAKLAR..... 123

ÖZGEÇMİŞ 133

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 3.1. Z tarayıcıların yatay ve dikey çözünürlükleri.....52

Çizelge 4.1. Sistem elektronik gürültü değerleri hesaplamaları.....79

Çizelge 4.2. Seyreltik solüsyonlar içerisindeki konsantrasyon hesaplamaları…....92

Çizelge 4.3. Seyreltik solüsyonlardaki protein miktarı……....93

Çizelge 4.4. Amin modifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması…….…..95

Çizelge 4.5. Kontrol deneyleri spektrofotometre absorbans değerleri sonuçları....96

Çizelge 4.6. SATP molekülünün EAP ile spesifik olmayan bağlanma miktarlarının tespiti……...96

Çizelge 4.7. Madde miktarı farklarının karşılaştırılması..……97

Çizelge 4.8. Aldehit-PEG-TFP ester ile yapılan spektrofotometre deneyi sonuçları…….....98

Çizelge 4.9. Mikanın elastik modülü hesaplamaları.....106

Çizelge 4.10. Polikarbon elastik modülü hesaplamaları.....107

Çizelge 4.11. HOPG elastik modülü hesaplamaları.....108

Çizelge 4.12. Yüzey pürüzlülük parametreleri ve tüp çapları……...……..….112

Çizelge 4.13. İki-yönlü varyans analizi sonuçları……...117

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1. AKM çalışma mekanizması…….....……2

Şekil 1.2. Sıvı hücre sistemi…….……....2

Şekil 2.1. AKM temel bileşenleri…….....…6

Şekil 2.2. Üçgen ve dikdörtgen kantilever şekilleri……7

Şekil 2.3. Piezoelektrik davranış, voltaj uygulandığında $d_2>d_1$ (© 2010, Peter Eaton and Paul West izni ile kullanılmıştır.) [44]……..……...…7

Şekil 2.4. Dört bölmeli fotodedektör üzerinde ucun yanal ve dikey hareketine göre değişen lazer yansımasının şematik gösterimi……..8

Şekil 2.5. Lennard-Jones fonksiyonu tarafından tanımlanan iki atom arasındaki ayırım (r) ile eş-potansiyel enerjinin, $E^{çift}$, şematik olarak gösterimi (© 2010, Imperial College Press izni ile kullanılmıştır) [45]…….. 10

Şekil 2.6. Kapiler kuvvetlerin hesaplanmasındaki açıların ve uzaklıkların tanımı (© 2010, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany izni ile kullanılmıştır) [49]……..……..11

Şekil 2.7. Elektriksel çift tabaka katmanlarının şematik gösterimi (© 2010, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany izni ile kullanılmıştır) [49]……..12

Şekil 2.8. AKM çalışma modlarına göre örnek ile yüzey kuvvetleri arasındaki etkileşim kuvvetleri değişimi grafiği …….….…13

Şekil 2.9. a) Osilasyona bağlı kantilever yerdeğişimi, b) frekans kayması (© 2010, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany izni ile kullanılmıştır) [49]……..14

Şekil 2.10. Uç yüzeye yaklaştığında osilasyon sinyalinde frekans ve faz kayması (© 2010, Peter Eaton and Paul West izni ile kullanılmıştır) [44]……...15

Şekil 2.11. (a) Piezo titreştirmesi ile sıvı içerisinde titreştirilen kantileverin (b) sıvı içerisinde magnetik titreştirilen kantileverin frekansa karşı genlik ve faz grafikleri.İç grafikler termal Brownian titreştirme piklerinin FFT spektrumlarını göstermektedir

(© 2009 American Institute of Physics izni ile kullanılmıştır) [64].....17

Şekil 2.12. Kantileverin havada ve sıvı içerisinde Brownian hareketinin frekans spektrumu (f_o= 294 kHz ve k= 30N/m) (© 2009 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg izni ile kullanılmıştır)[65]..... 18

Şekil 2.13. Mikanın sıvı içerisinde temassız mod görüntüleri. Kullanılan kantilever: Nanosensors: NCH k=42 N/m sıvı içerisindeki rezonans frekansı 136 kHz, *Q*= 30 (© 2005 American Institute of Physics izni ile kullanılmıştır) [54].....18

Şekil 2.14. Sıvı içerisinde plasmid DNA AKM görüntüsü ve yüzey yükseltilerinin dağılımı (© 2010, Peter Eaton and Paul West izni ile kullanılmıştır) [44].....19

Şekil 2.15. a) lipid –iyon kompleksinin şematik gösterimi, b) ve c) DPPC tabakasının PBS içerisinde aynı alanın temassız mod görüntüsü (© 2007 American Institute of Physics izni ile kullanılmıştır) [79].....20

Şekil 2.16. Kuvvet-mesafe eğrisi 20

Şekil 2.17. AKM ucu fonksiyonilize etme yöntemleri (© 2006 Nature Publishing Group izni ile kullanılmıştır.) [34].....25

Şekil 2.18. a) AKM ucunun fonksiyonelleştirilmesi, b) mika yüzeyinin streptavidin kaplanması ve kaplanan streptavidin molekülünün yükselti gösterimi c) streptavidin- biyotin spesifik bağlanmalarının gösterildiği kuvvet mesafe eğrileri (ilgili yazarın izni ile kullanılmıştır) [105].....27

Şekil 2.19. a) INKT-TCR tutturulmuş ucun CD1d-GalCer, b) CD1d-OCH12 kompleksleri arasındaki bağlanma olasılığı grafikleri, c) iki molekülün bağlanma hızına karşı kopma kuvvetleri kinetiği grafiği (© 2011, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. İzni ile kullanılmıştır) [112].....28

Şekil 2.20. Hertz eşitliğinin tanımları.....30

Şekil 2.21. Yüzey sertliğine göre indentasyon eğrileri. [126,127].....30

Şekil 3.1. AKM kapalı sıvı hücre birimleri.....34

Şekil 3.2. İlk tasarımdaki sensör tutucunun alttan görünümü.....34

Şekil 3.3. Sıvı içerisinde alınan (Z skalası 0 μm -0.5 μm) kalibrasyon örneği görüntüsü.....35

Şekil 3.4. (a) Sensör tutucuda piezoların yerleşim yerleri ve (b) bu sensör tutucu ile sıvı içerisinde alınmış merkez frekans eğrisi.....36

Şekil 3.5. Sıvı Hücre sensor tutucu ara prototipleri.....37

Şekil 3.6. (a) Piezonun gövdenin arkasına yerleştiridiği sensör tutucu prototipi, (b) profilden görünümü ve (c) bu şekilde havada titreştirilerek elde edilmiş olan rezonans frekansı eğrisi.....38

Şekil 3.7. (a) Piezonun kantileverin arkasına yerleştirildiği sensör tutucu prototipi, (b) profilden görünümü ve (c) bu şekilde havada titreştirilerek elde edilmiş olan rezonans frekansı eğrisi.....38

Şekil 3.8. (a) KEL-F'den yapılmış sensör tutucu prototipi, (b) prototipin alttan görünümü, (c) profilden görünümü.....39

Şekil 3.9. (a) Sıvı içerisinde kalibrasyon örneği görüntüsü (Z skalası: 0 µm -0.4 µm), b) sıvıdaki rezonans frekansı eğrisi.....39

Şekil 3.10. (a) SS316 çelikten yapılmış sensör tutucunun KEL-F gövdeye tutturulmuş prototipin görünümü, (b) gövdenin profil çizimi, (c) sıvı içerisinde alınmış merkez frekans eğrisi.....40

Şekil 3.11. a) sıvı içerisinde tıklamalı modda alınan kalibrasyon örneği görüntüsü (Z skalası : 0 µm - 0.5 µm), (b) sıvı içerisinde temaslı modda alınmış blu-ray disk görüntüsü (Z skalası: 0 µm – 0.1 µm).....40

Şekil 3.12. Deney aşamalarında kullanılan contalar.....41

Şekil 3.13. Örnek tutucu ara prototipleri.....42

Şekil 3.14. (a) 2.prototip sıvı AKM sistemi için tasarlanmış örnek tutucu ve contanın görünümü, (b) örnek tutucunun alttan görünümü.....42

Şekil 3.15. (a) Hortum çıkışlarının gösterildiği sıvı hücre sensör tutucu çizimi, (b) Hücre içerisine sıvı giriş ve çıkışlarının sağlandığı delikler, (c) Peristaltik pompa uyumu için mikro hortumların uçlarına tutturulan adaptörler.....43

Şekil 3.16. Hava sıvı ortamını birbirinden ayırmak için kullanılan camlar: (a) alt yüzeyi düz, üst yüzeyi açılı olan cam, (b) iki tarafıda açılı olan cam.....44

Şekil 3.17. (a) Sıvı hücre ikinci prototip tasarım çizimi, (b) sıvı hücre sensör tutucu prototipi, (c) sıvı hücre örnek tutucu prototipi, (d) fizyolojik salin içerisinde görüntülenen kırmızı kan hücreleri (Z skalası: 0 µm - 4 µm) [154].....45

Şekil 3.18. (a) PEEK sensör tutucu gövde, (b) profil çizimi.....46

Şekil 3.19. (a) Sensör tutucu gövde, (b) bu prototip ile havada ölçülmüş merkez frekans ve faz grafikleri, (c) hücre içerisine sıvı gönderilmeden önce havada tıklamalı modda alınan kalibrasyon görüntüsü (Z skalası: 0 µm -1 µm).....47

Şekil 3.20. (a) Son prototip ile sıvıda ölçülmüş merkez frekans ve faz grafikleri, (b) sıvıda tıklamalı modda alınan kalibrasyon örneği (Z skalası: 0 µm -1 µm).....48

Şekil 3.21. (a) Farklı yaylar kullanılan sensör tutucuların ara prototipleri, (b) sıvı içerisinde merkez frekans eğrisi görüntüleri.....50

Şekil 3.22. Sensör ve oyuğun optik mikroskop görüntüsü.....51

Şekil 3.23. (a) 1 ve (b) 2 inç uzunluğundaki tarayıcıların görüntüleri.....52

Şekil 3.24. (a) Kantilever tutucu, örnek tutucu ve piezo tarayıcının şematik gösterimi, (b) sıvı hücre örnek tutucu birimleri, (c) 1 inçlik tarayıcı üzerine mıknatıslar ile tutturulmuş sıvı hücre örnek tutucunun görünümü.....53

Şekil 3.25. Optik ışın saçılması metodu kullanılan cihazlar için tipik deneysel düzenek.....54

Şekil 3.26. (a) IV converter ve diferansiyel anfinin şematik çizimi, (b) kantileverin yansımasına göre fotodiyot dedektör üzerinde lazer spotun yer değiştirmesi.....55

Şekil 3.27. Fotoduyar yüzey ve kantilever arasındaki uzaklığı bulmak için kullanılan deneysel düzenek.....56

Şekil 3.28. Amfilere giriş voltajı 20mV gönderildiğinde fotodiyottan frekansa bağlı okunan lazer şiddetlerinin kullanılan anfilere göre değişim grafiği.....58

Şekil 3.29. Lazer diyotun güç değişimine göre kantileverin sapma gürültü yoğunluğu.....59

Şekil 3.30. RF lazer güç modülasyonunun açıldıktan ve kapatıldıktan sonra sıvı içerisinde ölçülen frekans kayma sinyalinin dalgaformu.....60

Şekil 3.31. Montaj hatalarından oluşan havada ve sıvıda lazer ışını yolu farkı farklı iki yol ile gösterilmiştir.....62

Şekil 3.32. (a) Optik yolak birimlerinin yerleştirilme şekli ve açısal değerler, (b) sıvı hücre gövdesine yerleştirilmiş olan silindirik camın üstten görünümü.....63

Şekil 3.33. (a) Su içerisinde Tap300Al kantileverin rezonans frekansı eğrisi, (b) bit aralıkları 320 nm olan BluRay disk topografi görüntüsü. Z skalası : 0 nm - 300 nm.....63

Şekil 3.34. AKM ucunun etanolamin ile amin bağlama (© 2007 Elsevier B.V. izni ile kullanılmıştır) [157].....65

Şekil 3.35. AKM ucunun/çipinin APTES ile amin bağlama (© 2007 Elsevier B.V. izni ile kullanılmıştır) [157].....66

Şekil 3.36. AKM ucuna tutturulmuş Extravidin-IgG-biotin test sisteminin, mika üzerine tutturulmuş avidin ile şematik gösterimi (© 2006, American Chemical Society izni ile kullanılmıştır) [105].....67

Şekil 3.37. Bağlanma veriminin kromojenik ajan ile belirlenmesi (© 2006, American Chemical Society izni ile kullanılmıştır) [105].....69

Şekil 3.38. Kuvvet-mesafe döngüsü.....71

Şekil 3.39. a) SPM programı ile kaydedilmiş KS eğrisi. Kırmızı yuvarlak içerisinde kalan alan indentasyon bölgesi, b) Kantileverin yüzey üzerindeki hareketi.....72

Şekil 3.40. (a) Piezonun yerdeğiştirmesine göre yük eğrilerinin şematik gösterimi, (b) dişleme sonucu oluşan deformasyonun profil görüntü çizimi, (c) Ucun yüzey üzerindeki temas alanı.....73

Şekil 3.41. Anodizasyon düzeneği.....74

Şekil 4.1. Kantilever Brownian hareketinin frekans spektrum ölçümleri, (a) Tap300Al ile havada (b) sıvıda; (c) NCHAu ile havada, (ç) sıvıda alınan ölçümler.....80

Şekil 4.2. Son prototip Sıvı Hücre AKM elektronik, optik, mekanik bileşenleri.....80

Şekil 4.3. Fizyolojik salin içerisinde kırmızı kan hücreleri görüntüsü. Yükseklik skalası 0-5 µm.....81

Şekil 4.4. *Bacillus thurigiensis* AKM görüntüsü. (a) 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-5 µm. (b) 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm [154].....82

Şekil 4.5. *Acinetobacter sp.* bakteri görüntüsü. (a) 256 piksel görüntü havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-5 µm (b) 128 piksel havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm. [154].....83

Şekil 4.6. (a) *Staphylococcus aureus* (koagulaz pozitif) AKM görüntüsü. 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-1 µm, (b) *Staphylococcus epidermidis* (koagulaz negatif) AKM görüntüsü. 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm.....84

Şekil 4.7. a) *Rhodobacter sphareoides* AKM görüntüsü. (a) 256 piksel, sıvıda tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm, (b) 256 piksel, sıvıda tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-5 µm..... 84

Şekil 4.8. *Streptomyces* kolonilerinin AKM görüntüsü. 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-2 µm.....88

Şekil 4.9. (a) Sırasıyla eritrosit, trombosit ve lökosit SEM görüntüsü [165], (b) fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda alınmış trombosit kümelerinin görüntüsü, 256 piksel, yükseklik skalası: 0-5 µm (c) fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda alınmış eritrosit üzerinde trombositlerin görüntüsü, 256 piksel, yükseklik skalası: 0-1 µm.....86

Şekil 4.10. Fizyolojik salin çözeltisi içerisinde çift sarmal λ-faj DNA sarmallarına temassız modda bakılmıştır. Bir DNA sarmalının genişliği 2 nm'dir. Yükseklik skalası: 0-100 nm.....87

Şekil 4.11. (a) Safir (0001) yüzeyi üzerinde teras adımları morfolojisi, 256 piksel, 800nm^2, (b) 256 piksel, saf su içerisinde tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası 0-6 nm.....87

Şekil 4.12. (a) Sıvı içerisinde mikanın atomik adım görüntüsü, 5 µm x 5 µm (b) görüntü üzerinden çizilen çizgi ile ölçülen bir mika adımının Z yükseltisi. (c) Hidroflorik asite maruz bırakılmış mika yüzeyi üzerinde oluşan atomik adımların görüntüsü. 256 piksel, saf su içerisinde temassız modda alımıştır. Çizgi profili görüntü üzerinde çizilen bölgenin Z yükseltisini vermektedir.....88

Şekil 4.13. (a) HOPG (Highly Oriented Prolytic Graphene) görüntüsü. 256 piksel, havada temaslı mod görüntüsü, (b) HOPG atomik latisler arası uzaklık gösterimi.....89

Şekil 4.14. Şekil 4.14. (a) Mika görüntüsü. 256 piksel, 10nm x 10nm, havada temaslı mod görüntüsü, (b) mika atomları arası uzaklık gösterimi, (c) görüntü üzerindeki çizginin Z profil.....89

Şekil 4.15. Mika görüntüsü. 128 piksel, saf su içerisinde temassız mod görüntüsü.....90

Şekil 4.16. SPM programı ile mika üzerinde alınmış KS eğrisi. (Kullanılan kantilever: ContAl-Nanosensors)……...91

Şekil 4.17. SPM programı ile polikarbon üzerinde alınmış KS eğrisi. (Kullanılan kantilever: ContAl-Nanosensors)……91

Şekil 4.18. Kalibrasyon grafiği……93

Şekil 4.19. Seyreltik solüsyonlarda tepkime sonucu oluşan renk değişimi……..94

Şekil 4.20. AKM çiplerinin boyutları……94

Şekil 4.21. Küvet içerisindeki renk değişimleri……...…..96

Şekil 4.22. Renk değişimlerinin görünümleri……..……..97

Şekil 4.23. a) Boş mika yüzeyinin fizyolojik salin içerisinde alınmış AKM görüntüsü, yükseklik skalası: 0-100 nm b) Streptavidin kaplı mika yüzeyinin fizyolojik salin içerisinde alınmış AKM görüntüsü, yükseklik skalası: 0-7 nm c) streptavidin kaplı mika yüzeyi üzerinden alınan Z yükseklik profili……..99

Şekil 4.24. Çizme testi sonuçları. Yükseklik skalası: 0-20 nm (büyük resim); 0-7 nm (küçük resim)……100

Şekil 4.25. Boş mika yüzeyi ve modifiye edilmiş uç ile arasındaki etkileşim sonucu oluşan kuvvet mesafe eğrileri a) mikaya direk bağlanma ve kopmayı gösteren KS eğrisi, b) mikaya bağlanıp belli bir süre sonra ucun kopmasını gösteren KS eğrisi……101

Şekil 4.26.a),b) Streptavidin ve biyotin etkileşimleri kuvvet spektroskopi eğrileri……..……..……102

Şekil 4.27. Uçtaki birkaç biyotin molekülünün yüzeye bağlanması……....103

Şekil 4.28. Bloklanmış yüzey ile modifiye ucun KS eğrisi……103

Şekil 4.29. (a) lizozim molekülünün spesifik olmayan bağlanmasının KS eğrisi. (b) lizozim molekülünün polimer yüzey üzerindeki farklı bağlanma bölgeleri ile arasındaki etkileşimlerinin KS eğrisi……104

Şekil 4.30. Bloklanmış polimer yüzey ile lizozim bağlı uç arasındaki etkileşim……105

Şekil 4.31. Mika üzerinde alınmış indentasyon eğrisi.....106

Şekil 4.32. Polikarbon üzerinde alınmış indentasyon eğrisi.....107

Şekil 4.33. HOPG üzerinde alınmış indentasyon eğrisi.....107

Şekil 4.34. Anotlanmış yüzeylerin (a) TEM görüntüleri, (b) AKM görüntüleri……110

Şekil 4.35. Titanyum nanotüplerin uygulanan potansiyele göre çap dağılımı…...111

Şekil 4.36. Hücre yüzeyi üzerinde seçilen noktalar……...113

Şekil 4.37. a) 1.gün, b) 9.gün, c) 15.gün ve d) tüm günlere ve uygulanan potansiyel farka göre hücrelerin yük, indentasyon eğrileri ve eğrilerden hesaplanmış olan elastik modülü değerleri……115

Şekil 4.38. Hücrelerin elastisitelerinin günlere ve TNT çaplarına göre dağılımları. İki-yönlü varyans analizinden (ing: two-way Anova) sonra yapılan Tukey Post-hoc (ing: Tukey's HSD) testi ile tüm gruplar aralarında karşılaştırılmıştır. Post-hoc testi sonucunda elde edilen *p* değerleri şöyledir: 1) Kontrol ile 10V için *p* = 0.104 (ns), 2) Kontrol ile 30V için *p* = 0.746 (ns), 3) Kontrol ile 40V için *p* = 0.301 (ns), 4) 10V ile 30V için *p* = 0.504 (ns), 5) 10V ile 40V için *p* = 0.001 (***), 6) 30V ile 40V için *p* = 0.027 (*)…….....……..117

Şekil 4.39. Hücrelerin elastisitelerinin TNT çaplarına ve günlere göre dağılımları. İki-yönlü varyans analizinden (ing: two-way Anova) sonra yapılan Tukey Post-hoc (ing: Tukey's HSD) testi ile tüm gruplar aralarında karşılaştırılmıştır. Post-hoc testi sonucunda elde edilen p değerleri şöyledir: 1) 1.gün ile 9.gün için p = 0.157 (ns), 2) 1.gün ile 15.gün için p = 0.000 (***), 3) 9.gün ile 15.gün için p = 0.042 (*)……...……..……118

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

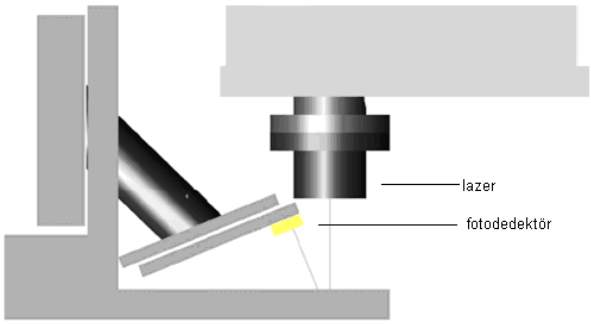
F	Uç ile yüzey arasındaki kuvvet
k	yay sabiti
x	yer değiştirme
d_1, d_2	piezo tarayıcı uzama miktarları
$E^{çift}$	iki atom arasındaki potansiyel enerji
r	uç ve örnek arası mesafe
ε, σ	malzeme sabiti
R_g	gaz sabiti,
γL	sıvının yüzey gerilimi,
P	esas buhar basıncı,
P_0	saturasyon buhar basıncı,
V_m	sıvının molar hacmi,
r_1 ve r_2	menisküs kavisinin yarıçapları
λ_D	Debye uzunluğu,
ε	medyumun dielektrik sabiti,
ε_0	bağımsız uzayın dielektrik sabiti
σ_t	ucun yüzey yük yoğunluğu,
σ_s	örneğin yüzey yük yoğunluğu
z	kantilever osilasyon genliği
ω	kantilever değişen frekans
ω_0	kantilever razonans frekansı
Q	ucun kalite faktörü
f_0	kantilever merkez frekansı
ΔF	frekans farkı

Kısaltmalar

AKM	Atomik Kuvvet Mikroskopu
AFM	Atomic Force Microscopy
TUM	Taramalı Uç Mikroskopları
TTM	Taramalı Tünelleme Mikroskopu
TEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
DPPC	dipalmitoyilfosfatidilkolin
PBS	fizyolojik salin
KS	Kuvvet Spektroskopisi
PEG	Polietilen Glikol
NHS	N-suksinimidil ester
EPDM	Etilen Propilen Dien M sınıfı
HOPG	Highly Oriented Prolitik Grafit
APTES	3-aminopropiltrietoksisilan
TEA	Trietilamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
SPDP	O-suksinimidil 3-(2-piridil)- ditiyopropionat
SATP	N-suksinimidil 3-(acetiltiyo)-propionat
TFP	Trifloropropianat
HCL	Hidroklorik asit
HF	Hidroflorik asit
IgG	Immunoglobin G
OPD	O-fenilendiamin
Z	Yükseklik Skalası

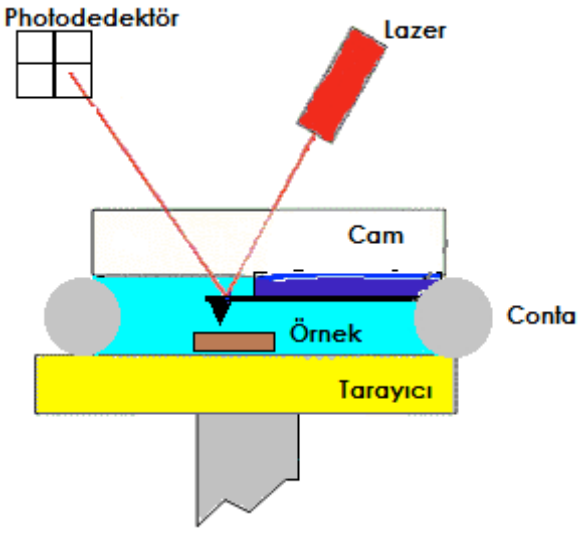
1.GİRİŞ

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) genel olarak Taramalı Uç Mikroskopları (TUM) olarak bilinen mikroskop ailesinin en yaygın üyesidir. Bu mikroskoplar diğer mikroskoplar ile karşılaştırıldığında yüzeye 'bakmak' yerine 'hissetmek' temeline dayandırılmışlardır. Bu görüntüleme sistemlerinin büyütme aralığı, optik ve elektron mikroskoplarının büyütme aralıklarının ikisinide içerisine almaktadır. Ayrıca uygun koşullar sağlandığında atomik boyutlarda çözünürlük elde etmek mümkündür. Atomik boyutta görüntü almaya imkan tanıyan TUM'ların ilk üyesi Taramalı Tünelleme Mikroskobu (TTM) , 'Kuantum Tünelleme' etkisi kullanılarak, 1981 yılında geliştirilmiştir [1]. Çok sivri bir uç ile iletken bir yüzey arasına gerilim uygulanıp, bir kaç atom çapı mesafeye kadar yaklaştırıldığında, uç ile yüzey arasında bir 'elektron tünellemesi' gözlemlenmiştir. Aradaki mesafeye göre akımdaki değişim gözlemlenerek, yüzeyin şekil özellikleri kolay bir şekilde açığa çıkarılabilmektedir. Bu buluş 1986 yılında Binnig ve arkadaşlarına Nobel fizik ödülünü kazandırmıştır. TTM ile örneklerin yüzey iletkenlikleri ve elektron yapıları incelenebilmiştir. İletken olmayan örnekler için ise yine Binnig ve ekibi 1986 yılında TUM'ların ikinci üyesi olan AKM'nin doğuşunu anons etmişlerdir. Çok hassas bir yay ile yüzey arasındaki kuvvet etkileşimlerinden kaynaklanan sapmaları ölçmeye dayanan AKM [2], yalıtkan, yarı iletken, iletken, yansıtıcı, ışık geçiren vb, her türlü yüzeyi incelemeye imkan sağlamıştır. 1980'lerin sonunda ticari olarak piyasaya sürülen AKM'lerin çalışma mekanizması, Şekil 1.1'de şematik olarak gösterilmiştir. Bir yay ve ucunda bulunan sivri bir iğneden oluşan sensöre düşürülen lazer ışığı, bir fotodedektör tarafından algılanmakta ve sensör-yüzey etkileşimlerinden kaynaklanan sapmalar ölçülmektedir. Bu sensörlerde kuvvetin türevi, yayın titreşim frekansındaki kaymalar ya da titreşim genliğindeki değişimlerin elektronik olarak ölçülmesi ile elde edilmektedir. Uç yüzey ile gereken uzaklığa eriştiğinde, yüzey ile uç arasındaki kuvvetler Hooke ($F=-kx$, k:yay sabiti; x: yer değiştirme) yasasına göre yayın sapmasına neden olmaktadır. Bu sapmalar ölçüldüğünde bir kontrol elektroniği ve yazılım aracılığıyla örneğe ait istenilen özellikler ortaya çıkarılabilmektedir. Manyetik özellikler, elektrostatik özellikler, yüzeyin topografisi ve atomik çözünürlük elde edilebilmektedir.



Şekil 1.1. AKM çalışma mekanizması.

TUM'ların, biyolojik sistemleri kendi doğal ortamlarında gerçek zamanlı olarak moleküler veya altmoleküler olarak görüntüleyebilme potansiyeli biyologların ilgisini 1990'lardan bu yana önemli derecede çekmiştir. AKM'nin sıvı içerisinde görüntü alabilmesi de bu uygulamaların en önemlilerinden biridir. AKM'nin sıvı içerisinde görüntü alabilmesi özellikle biyoteknoloji ve tıp alanlarında çığır açmıştır. Sıvı hücre ile örneğin tampon çözeltisi içerisinde canlı bir hücrenin görüntüsünün alınabilmesi mümkündür. Sıvı hücreler açık ve kapalı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Açık sıvı hücre sisteminde, örnek üzerine dökülen sıvı, örnek ile cam arasında sıkıştırılarak sensörün sıvı içerisinde kalması sağlanır. Tarama bu şekilde yapılır. Kapalı sıvı hücre sisteminde ise sıvı contalı bir halka içerisine hapsedilmektedir. Örnek, sıvı hücrenin içerisine yerleştirilir ve sensör yukarıdan sıvı içerisine girerek tarama işlemini gerçekleştirir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Sıvı hücre sistemi.

AKM'nin sıvı içerisinde gözlem yapabilme özelliği ilk defa 1987 yılında gösterilmiştir [3]. Sıvı olarak su yerine parafin yağı kullanılarak sodyum klorür kristalleri yüzeyi gözlemlenmiştir. 1988'lerde mikrofabrikasyon metodları kullanılarak kantileverler imal edilmesi [4], kantilever sapmasını tespit eden optik demet saçılması metodunun kullanılması [5], AKM'nin amino asit kristalleri [6], lipid membranları [7], biyomineraller [8], ve IgG [9] gibi biyolojik örneklerin görüntülenmesinde kullanımını desteklemiştir. Bunun üzerine Hansma ve arkadaşları hareket halindeki biyolojik örneklerin dinamik davranışlarını gözlemleme girişiminde bulunmuşlardır. Trombin aktivasyonu üzerine fibrinojen pıhtılaşma sürecini 1 dakikalık aralıklar ile incelemişlerdir [10]. İzole edilmiş hücreler üzerine viral enfeksiyon süreçleri [11], ve S-layer proteinleri üzerine protein bağlanmalarının gözlemlenmesi [12] yapılan farklı çalışmalar olarak kaydedilmiştir. Bu zamanlarda sadece temaslı mod ile çalışmalar yapıldığından biyomoleküller kolayca yüzeyden uç vasıtası ile ayrılabiliyorlardı. Bu şartlarda bilim adamları yüksek çözünürlük görüntülerine yönelmişlerdir. Engel ve arkadaşları sabit kuvvet modunu kullanarak açıklık bağlantıları (ing.:gap junctions) [13], E-coli OmpF porin [14-15], kırmızı kan hücrelerindeki aquaporin [16], ve bakteriorodopsin [17-18] gibi membran protein sistemlerinin yüksek çözünürlük görüntülerini kaydetmişlerdir.

1993 yılında tıklamalı modun icat edilmesinden sonra [19], bu özellik ile sıvı ortamda çalışmalar hızla artmaya başlamıştır [20]. Kantileveri titreştirmek için akustik yöntem önerilmiştir [21]. Bu yöntem daha sonra membran proteinlerinin yüksek çözünürlük görüntülerini almak için kullanılmıştır [22]. 1994'de, Bustamente ve arkadaşları mika yüzeyi üzerine DNA difüzyonunu [23] ve Lamda-Cro bağlayıcı üzerine DNA bükülmesini gözlemlemişlerdir [24]. Aynı zamanlarda Bezanilla ve arkadaşları DNAz enzimi ile DNA yıkılımını [25], DNA-RNA polimeraz birleşim işlemini görüntülemişlerdir [26]. İki grupta bu çalışmalara devam etmişler ve 30 saniyelik aralıklar ile DNA ve RNA polimeraz arasındaki RNA transkripsiyon reaksiyonunu [27] ve DNA zinciri boyunca RNA polimeraz difüzyonunu 1 boyutlu olarak hızlandırılmış (ing.:time-lapse) görüntülemeyi başarmışlardır [28]. Yapılan yüksek çözünürlük çalışmalarından sonra 1995 yıllarında çalışmaların daha hızlı olması yönünde adımlar atılmıştır. Kısa kantileverler (23um-12um) [29] ve yüksek hızlı tarayıcılar geliştirme yönüne gidilmiştir. 1999 yılında bu yeni tasarımlar ile 1.7

saniyede DNA görüntüsü Viani ve ark. tarafından kaydedilmiştir [30]. Takip eden sene aynı grup GroES ve GroEL komplekslerinin oluşumunu ve bozulumunu görüntülemişlerdir [31]. 2001 yılında Ando ve arkadaşları daha gelişmiş bir sistem ile tampon çözeltisi içerisinde tek miyosin V molekülünün hareketini saniyede 10 görüntü ile gözlemlemişlerdir [32-33]. Bu çalışmalar günümüze film hızında AKM olarak yansımıştır.

Son on sene içerisinde yapılan çalışmalar baktığımız zaman genelde tek molekül tayini [34], proteinlerin kıvrımlarının tanımlama bölgelerinin tayini gibi kuvvet spektroskopisi çalışmaları [35], hücre görüntüleme çalışmaları [36] ve yüzeyin kuvvet haritalandırma [37] çalışmaları yoğun olarak literatürde görülmektedir. Ayrıca kantileverler çeşitli biyomoleküller ile modifiye edilerek mekanik ve kimyasal sensör olarak kullanımlarıda sıvı içerisindeki topografik görüntüleme olmayan uygulamalarından bir diğeridir ve spesifik ajan tayinide yoğun olarak çalışılmaktadır [38-40].

Sunulan çalışmada sıvı ortamda yüksek çözünürlükte çalışan AKM ile biyomoleküllerin yüksek hassasiyet ve kararlılıkta kendi sıvı fizyolojik ortamlarında ya da tampon çözeltileri içerisinde görüntülenmesi ve karakterizasyon çalışmaları amaçlanmıştır.

Bu kapsamda ilk olarak yüksek çözünürlükte sıvı ortamında çalışan AKM düzeneğini oluşturabilmek için Nanomanyetik Bilimsel Cihazlara ait AKM kullanılarak optik ve mekanik problemler minimize edilerek, sözü geçen problemlerden kaynaklı cihazda oluşan gürültü seviyeleri minimuma indirilip atomik çözünürlük elde edilmiştir. Bu mikroskopta mekanik olarak gürültü seviyesini minimize edebilmek için kullanılan gövde, sıvı ortam yalıtım malzemesi ve sıvı aktarım malzemelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Kapalı sıvı hücrede sıvıyı hücre içerisinde tutmada kullanılan en önemli iki malzemeden birisi hava sıvı ortamlarını birbirinden ayıran cam, bir diğeride contadır. Ayrıştırma camının örnekten kopan partikülleri tutmaması, lazer hüzmesini yansıtmaması ve maksimum düzeyde lazer demetinin fotodedektöre geçmesini sağlaması gerekmektedir. Bu yüzden camın optimizasyonu çok önemlidir. Sıvının tutulmasında önemli bir diğer malzeme olan contanın sertliği çok önemlidir ve tarayıcının üzerine yerleştirildiğinde tarama alanına ve alınan görüntüye etkisi olmamalıdır. Bu yüzden sertlik düzeyleri ve kimyasal uygunlukları araştırılarak uygun bir dizayn yapılmıştır. Optik düzenekte

varolan gürültü problemini minimize edebilmek için literatürdeki kaynaklardan da [41-43] faydalanarak optimum seviyedeki lazer ve lazer sürücü düzeneği temin edilmiş ve kantileverden yansıyan ışık demetini dedekte eden fotodedektör düzeneğide yine atomik çözünürlüğe engel olmayacak şekilde optimize edilmiştir. Sıvı içerisinde yayı titreştirmek problemlerden bir diğeridir ve doğru titreştirebilmek için uygun bir yöntem geliştirilmiştir. Oluşturulan bu düzenek kullanılarak farklı kantileverler ile çalışılıp sistemin gürültü durumu tayin edilmiş ve uygun kantileverler ile atomik çözünürlükte görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda literatüre yenilik kazandıracak bir çalışma olarak sıvı içerisinde kapalı ortamda temassız modda yüksek çözünürlük çıktıları alınmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında biyolojik numuneler ile yüksek çözünürlükte görüntüler alınmış ve karakterizasyon çalışmaları olarak tek molekül kuvvet spektroskopisi ve nanoindentasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş AKM uçları kullanılarak kuvvet-yerdeğiştirme eğrileri sayesinde reseptör ve ilgili ligandı ilişkileri tanımlanmıştır.

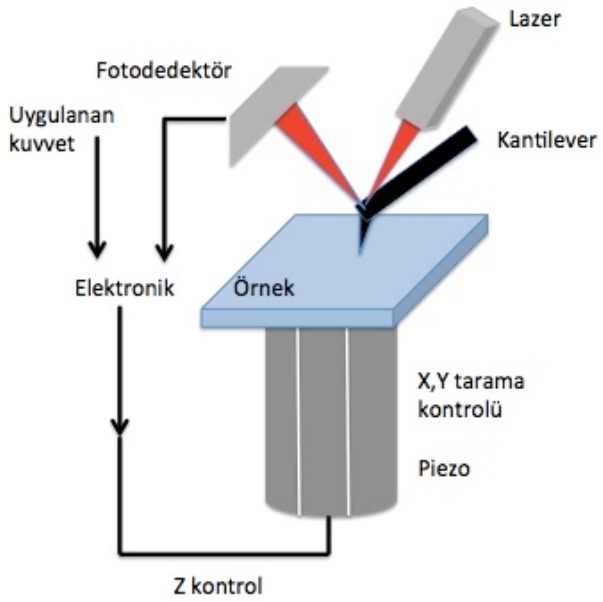
Çalışmanın son aşamasında AKM'nin mekanik sensör özelliklerinden faydalanılarak, nanotübüler metal implant yapıların hücrelerin biyomekanik özellikleri üzerindeki etkilerinin nanoindentasyon çalışmaları ile incelenmesi ve canlı hücreler üzerinde elastisite tayini gerçekleştirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Atomik Kuvvet Mikroskopu

2.1.1. Çalışma Prensibi ve Temel Bileşenleri

Etkileyici ve sofistike ismine rağmen AKM'ler yüzey karakterizasyon cihazları içerisinde anlaşılması ve kullanılması en kolay cihazlardan bir tanesidir. Eğer bir benzetme yapılmak istenirse görme özürlü bir insanın elleri ile yüzeylere dokunarak ve tarayarak yüzeyi hissetmesi ve dokunduğu yüzeyin haritasını zihninde üç boyutlu olarak tanımlaması tam olarak AKM'lerin çalışma mantığını özetlemektedir. Bu insanın parmakları gibi, sadece yüzeyin topografisini değil aynı zamanda malzemenin yapısı ve karakteristiği, yumuşak veya sert oluşu, yapışkan veya kaygan oluşu gibi özelliklerininde anlaşılmasını sağlar. AKM ve bileşenleri sayesinde araştırmacı malzeme hakkında tüm bu verilere sahip olabilir. Şekil 2.1'de AKM'nin temel bileşenleri şematik olarak gösterilmektedir.



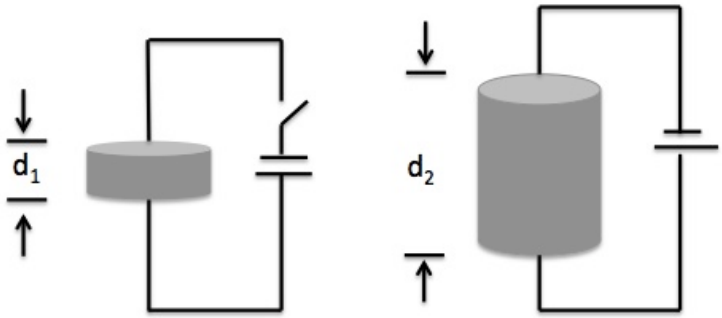
Şekil 2.1. AKM temel bileşenleri.

AKM bileşenlerinden ilki ve tartışmasız en önemli parçası 'kantilever'dir. Kantilever uç noktasında mikrofabrikasyon ve oldukça keskin bir iğne içermektedir. Bu hassas ve ince parça, kolay kullanımı sağlamak için yine kendisi gibi mikrofabrikasyon ile üretilen Si_3Ni_4 çiplerin üzerine monte edilmektedirler. Kantilever, tarama boyunca örnek üzerinde bir gramafon plağı üzerindeki plak iğnesine benzer şekilde, yukarı ve aşağı hareket eder. AKM'ye iğne ve örnek arasındaki kuvvetleri yüksek hassasiyet ile kaydetmesine olanak vermek

açısından, kantileverler tipik olarak çok düşük bir yay sabitine sahiptirler [44]. Şekil 2.2'de çeşitli kantileverlerin şekillerinin şematik görüntüsü gösterilmektedir.

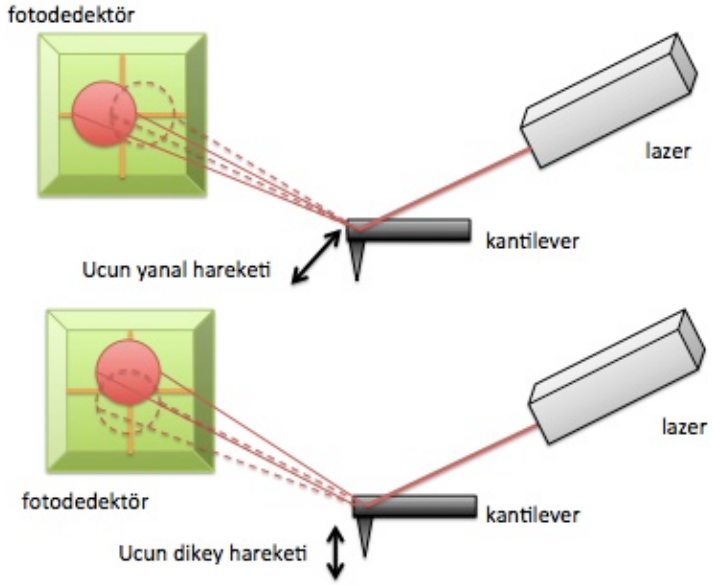
Şekil 2.2. Üçgen ve dikdörtgen kantilever şekilleri.

AKM'lerin en önemli ikinci bileşeni tarama mekanizmasıdır. Sadece çok keskin bir iğneye sahip olmak, onu örnek üzerinde doğru yere konumlandıramadıktan sonra bir anlam ifade etmemektedir. Bu konumlandırma piezoelektrik dönüştürücüler tarafından gerçekleştirilmektedir. AKM'lerde piezoelektrik seramik kullanılmaktadır. Piezoelektrik seramikler fiziksel olarak sıkıştırıldıklarında potansiyel fark üretmektedirler. Bunun tam tersi durumunda yani potansiyel fark seramiğin üzerine uygulandığında ise piezoelektrik seramik genişlemektedir. Piezoelektrik davranış Şekil 2.3'de gösterilmektedir. Bu hareket tekrar üretilebilmektedir ve adımlar doğru sürüldüğü takdirde atomik seviyelerdeki hassasiyetlere ulaşılabilmektedir. Örnek genelde piezoelektrik seramik parçanın üzerine yerleştirilir. Örneğin hareketi X,Y,Z olmak üzere üç yönde kontrol elektroniğine iletilir. Bu şekilde uç neredeyse örnek üzerine değecek şekilde konumlandırılabilir ve çizgi çizgi ileri ve geri taramalar gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.3. Piezoelektrik davranış, voltaj uygulandığında $d_2 > d_1$ (© 2010, Peter Eaton and Paul West izni ile kullanılmıştır.) [44].

AKM'lerin son bileşeni tayin mekanizmasıdır. AKM iğnesi örnek üzerinde bir uçtan diğerine geçerken örneğin üç boyutlu haritasının ortaya çıkabilmesi için monitörlenmesi gerekmektedir. Monitörleme mekanizmaları için AKM'lerde kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Fakat en genel olarak kullanılan yöntem optik ışın tayinidir. Lazer kaynağından çıkan ışık kantleverin arka noktasına odaklanır ve oradan yansıyan ışın fotodiyot dedektöre düşürülür. Modern AKM'lerde bu pozisyon duyarlı fotodedektörler genelde 4 bölmeden oluşmaktadırlar. İğne ucu tarama esnasında örnek topografisine paralel olarak hareket ederken, yansıyan lazer demetinin açısı değişir, ve böylece fotodedektör üzerine düşen lazer noktasıda hareket eder. Dolayısıyla bu lazer noktasının hareketi fotodedektör bölmelerine düşen lazer ışık şiddetinde değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler neticesinde iğnenin hareketlerindeki mekanik veri yanal ve dikey hareketleri elektrik sinyalleri olarak kaydedilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Dört bölmeli fotodedektör üzerinde ucun yanal ve dikey hareketine göre değişen lazer yansımasının şematik gösterimi.

Örnek tarandığında örneğin topografyası iğne ucu ve örnek arasındaki değişen kuvvetlerden dolayı, kantilever sapmaktadır. Çalışma modlarında kantileverin sapmasını muhafaza etmek için önceden tanımlanmış, örneğin ve ucun her görüntüleme noktasında doğru yönlerde hareketine imkan veren bir kontrol döngüsü bulunmaktadır. İmajın oluşturulabilmesi için çalışma modlarında geri dönüşüm mekanizması oldukça önemlidir. Piezoelektrik tarayıcıların X,Y,Z

yönlerindeki yerdeğişimlerinin kaydedilmesi ve görüntülenmesi neticesinde örnek yüzeyinin üç boyutlu topografik görüntüsü üretilir [45].

2.1.2. Uç ve Yüzey Arasındaki Etkileşim Kuvvetleri

Uç yüzeyi taradığında değişen kuvvetler esnek kantilevere yapışık olan iğne ucu tarafından algılanır. Kantileverin itici ve çekici kuvvetleri tanımlamasına bağlı olarak değişik AKM çalışma modları ile örnekleme gerçekleştirilir. Kuvvet mikroskopisinin içerdiği kuvvetler elektromanyetik orijinlidir. Farklı intermoleküler, yüzey, ve makroskopik etkiler farklı mesafe ve geometri bağımlılıklarıyla birlikteki etkileşimlere neden olmaktadır. Dış alanların yokluğunda havadaki baskın kuvvetler van der Waals etkileşimleri, kısa mesafe itici etkileşimler, adhezyon ve kapiler kuvvetlerdir. Sıvıda, iyonların ve elektrolitlerin varlığı ile katı-sıvı arayüzü çift katman elektrik ve çözme kuvvetleri gibi ek kuvvetlerin varlığına neden olmaktadır. Bu kuvvetlerden bazıları çekici bazıları ise itici kuvvetlerdir. Bazı durumlarda, etkileşim kuvvetleri salınımlar gösterebilir. Elektrostatik etkileşimlerin itici ve çekici karakteristiği, iyonik gücün değişimine bağlı olarak sıvı içerisinde değişiklik gösterebilir.

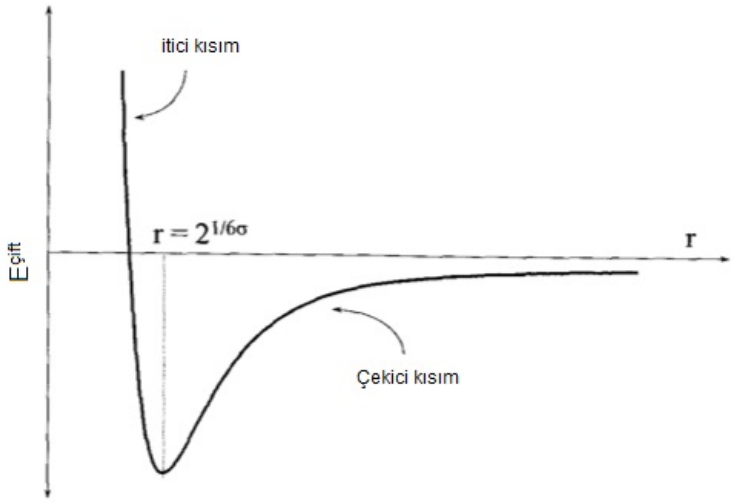
2.1.2.1. Van der Waals Kuvvetleri

Klasik modele göre, madde içerisindeki elektronlar devamlı ve oldukça hızlı hareket etme eğilimindedirler. Zamanın konvansiyonel peryotlarında ve anlık zaman dilimlerinde, madde elektrik yükünün dağılımı, elektronların simetrik olmamasından dolayı elektriksel olarak nötral görünebilir. Bu durum ‘dipol’ yada ‘multipol’ adı verilen dengesiz yük dağılımına neden olmaktadır. Dolayısıyla her molekül sahip olduğu elektron sayısına bağlı olarak anlık zaman dilimlerinde birbirinden farklı yük dağılımı göstermektedirler. Bir moleküldeki yük dengesizliği, komşusundaki benzer dengesizliği elektriksel olarak indükler. Net sonuç olarak, bir molekülün neredeyse pozitif sonu, diğer komşu molekülün negatif sonunu çeker, bu durum van der Waals kuvvetinin temelini oluşturmaktadır [46].

Uç ve örnek arasındaki kuvvet yerdeğişimi ilişkisinin çekici ve itici kısımlarını modellemek mümkündür. Uç ve örnek arası mesafe (r) değiştiğinde, matematiksel olarak çift-potansiyel enerji fonksiyonu $E^{çift}(r)$ olarak tanımlanan potansiyel enerjileride değişmektedir. Lennard-Jones fonsiyonu, çok iyi bilinen ‘Mie’ çift-potansiyel enerji fonksiyonun özel durumu, bu davranışı modellemek için kullanılır.

$$E^{çift}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{6}\right] \quad [2.1]$$

Eşitlik 2.1'de, ε ve σ malzemeye bağlı sabitlerdir. ε yaklaşık olarak içeriğindeki atomların çapına eşittir, ve bazen 'sıkı küre çapı' olarak tanımlanır. Şekil 2.5 iki atom arasındaki çift-potansiyel enerji değişimini göstermektedir. $1/r^{12}$ terimi küçük ayrımlardaki $E^{çift}(r)$ içerisindeki dik artışları tanımlamaktadır. Örneğin Pauli dışlama ilkesine göre $r < \sigma$ olduğunda atomlar birbirlerini sertçe iterler. Van der Waals kuvvetlerinin etkin olduğu bölgelerde, göreceli büyük ayırımlarda, çekici davranışlarda,$1/r^6$ terimi daha yavaş değişimden sorumludurlar.



Şekil 2.5. Lennard-Jones fonksiyonu tarafından tanımlanan iki atom arasındaki ayırım, (r), ile eş-potansiyel enerjinin, $E^{çift}$, şematik olarak gösterimi (© 2010, Imperial College Press izni ile kullanılmıştır) [45].

Atomlar veya moleküller arası itici kuvvetler Pauli ve iyonik itimden kaynaklanmaktadırlar. Fakat, iki nesne arasındaki kontak alanı yüzlerce veya binlerce atom içermektedir, efektif itici kuvvetin tanımı kontak mekanik modeller tarafından açıklanmaktadır [47].

2.1.2.2. Kapiler Kuvvetler

Ambiyant ortamda, su aniden hidrofilik yüzey açıklıklarında yada gözeneklerinde yoğuşur. Kapiler yoğuşma sıvının buhar basıncını onun yoğuşma formundaki eğrisine bağlayan termodinamik bir süreçtir. Bu durum Kelvin eşitliği ile açıklanmaktadır [47].

$$R_g T log \frac{P}{P_0} = \frac{\gamma_L}{r_k} V_m \quad [2.2]$$

Kelvin yarıçapı r_k menisküsün boyutu hakkında bilgi vermektedir.

$$\frac{1}{r_k} = \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \qquad [2.3]$$

R_g= gaz sabiti,

γL= sıvının yüzey gerilimi,

P= esas buhar basıncı,

P_0= saturasyon buhar basıncı,

V_m=sıvının molar hacmi,

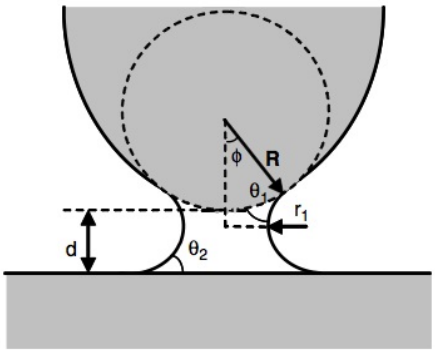
r_1 ve r_2 = menisküs kavisinin yarıçapları,

Su buharlaşması durumunda P/P_0 bağıl nem oranına eşittir. Menisküs içerisindeki basınç, dışarıki basınçtan daha yüksektir. Young Laplace eşittliği menisküs arayüzü boyuncaki basınç değişimini vermektedir.

$$\Delta P = \gamma_L \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right) \qquad [2.4]$$

Yukarıdaki eşitlik menisküs oluşumuna bağlı adhezyon kuvvetlerinin hesaplanmasını sağlamaktadır. Kapiler kuvvetler interfaz geometrisine bağlıdır. Yüzey ve sıvı arasındaki temas açılarının belirlenmesi gerekmektedir. Genel olarak düz bir yüzey ve ucun arasındaki kapiler kuvvet Israelachvili [1] tarafından aşağıdaki eşitlikler ile tanımlanmışlardır [48].

$$F_{cap} = \frac{4\,\pi R \gamma_L \cos\theta}{1 + d/d_0} \qquad [2.5]$$

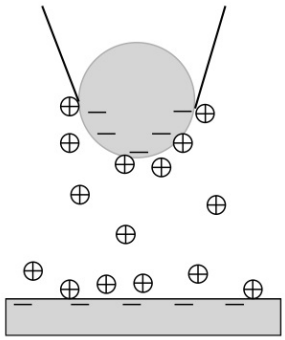


Şekil 2.6. Kapiler kuvvetlerin hesaplanmasındaki açıların ve uzaklıkların tanımı (© 2010, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany izni ile kullanılmıştır) [49].

2.1.2.3. Sıvı İçerisinde Etki Eden Kuvvetler

Uç ve örneğin ikiside sıvı içerisine batırıldığında üzerlerine etki eden kapiler kuvvetler yok olur. Fakat sıvının katı yüzeyler ile etkileşimi, çözünüm ve elektrostatik çift tabaka kuvvetleri gibi diğer kuvvetlerin oluşmasına neden

olmaktadır. Katı yüzeyler polar sıvılar ile temas ettiklerinde yüklenirler (Şekil 2.7). Sıvı içerisindeki yüzey atomlarının kopmasından veya solüsyondaki serbest iyonların yüzeye yapışmasından dolayı yüklenirler. Yükleme sürecinin bağımsızlığıyla birlikte, yüzey yükü sıvıdaki eşit ve zıt yük dağılımının varlığıyla telafi edilir. Elektrik çift tabakanın uzantısı iyonların sıvı içerisinde varolan konsantrasyon ve valansına bağlıdır. Yaklaşık olarak 0.2 nm ve 10 yada 100 nm arasında değişiklik gösterebilir. Elektriksel alan farklı işaretlerdeki iyonların yüzeye yapışması ve sıvı içerisinde dağılmasının çözünmüş iyonları yüzeye geri çekmesi neticeside oluşmaktadır. Fakat bu kuvvet katı yüzey boyunca yük dağılımını destekleyen entropi ile dengelenmektedir. Uzun aralık elektrostatik etkileşimler, tampon çözelti içerisindeki iyon konsantrasyonları değiştirilerek gösterilmiştir [50,51].



Şekil 2.7.Elektriksel çift tabaka katmanlarının şematik gösterimi (© 2010, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany izni ile kullanılmıştır) [49].

Sıvıda çift tabaka kuvvetleri ve van der Waals kuvvetleri Derjaguin Landau Verwey Overbeek (DLVO) teorisinin temellerini oluşturur [52,53]. DLVO teorisinin AKM ölçümlerine uygulanması Butt ve ark. tarafından açıklanmıştır [48].

Küresel uç ve düz bir yüzey için DLVO kuvveti Eşitlik 2.6 ile açıklanır.

$$F_{DLVO} = \frac{4\pi R}{\varepsilon\varepsilon_0}\sigma_t\sigma_s\lambda_D exp(d/\lambda_D)\frac{HR}{6d^2} \qquad [2.6]$$

λ_D=Debye uzunluğu,

ε= ortamın dielektrik sabiti, ε_0= bağımsız uzayın dielektrik sabiti,

σ_t= ucun yüzey yük yoğunluğu, σ_s= örneğin yüzey yük yoğunluğu,

H= Hamaker sabiti,

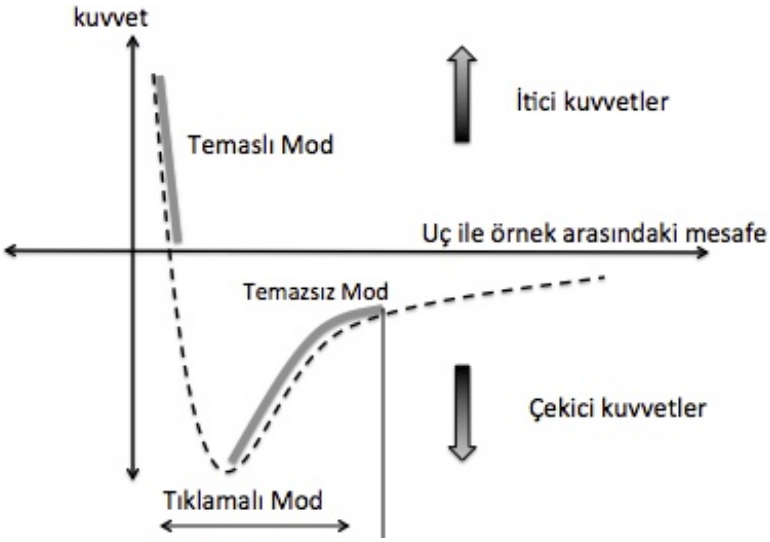
R= ucun yarıçapı,

d= uç ile yüzey arası uzaklık.

Sıvı içerisinde farklı çözme kuvvetleri ve hidrasyon kuvvetleri gibi farklı kuvvetlerde etki etmektedir. Çözme kuvvetleri uç ve yüzey arasında osilasyona neden olabilmektedir. Fukuma ve ark. [54] sıvı içerisinde pikden pike olan kuvveti 0.25 nm üzerinde 0.2 nN dağıldığını raporlamışlarıdır.

2.1.3. Görüntüleme Modları

AKM'lerin statik ve dinamik olmak üzere iki temel çalışma modu mevcuttur. Temaslı modda kantilever örnek yüzeyi boyunca sürüklenir ve yüzey eğilimleri kantileverin sapması olarak direk kaydedilir. Temassız ve tıklamalı modlarda ise, kantilever piezoelektrik bir dönüştürücü vasıtasıyla temel rezonans frekansına yakın bir yerde titreştirilir. Uç ve örnek arasındaki etkileşim kuvvetlerine bağlı olarak AKM, salınım genliği, faz ve rezonans frekansındaki değişimleri hesaplar. Salınımdaki bu değişiklikler örneğin karakteristiği hakkında bilgi vermektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. AKM çalışma modlarına göre örnek ile yüzey kuvvetleri arasındaki etkileşim kuvvetleri değişimi grafiği.

2.1.3.1. Temaslı Mod

Sabit kuvvet modu olarakta anılan temaslı mod AKM'nin ilk olarak keşfedilen çalışma modudur. Uç yüzey ile direk temas kurar ve kantilever sapması tarama esnasında geribesleme devresi ile sabit tutulur. Görüntüdeki renk kontrast farkları örnek ile uç arasındaki kuvvetin değişmesine ve kantileverin yay sabitine bağlıdır. Örnek topografyasına bağlı olarak kantileverde ve dolayısıyla fotodedektör üzerine düşen lazer ışığında sapma olmaktadır. Bu şekilde elde edilen sapmalar ile yüzey topografyası kaydedilir. Yüzeye yakınlaştıkça çekici kuvvetler daha güç

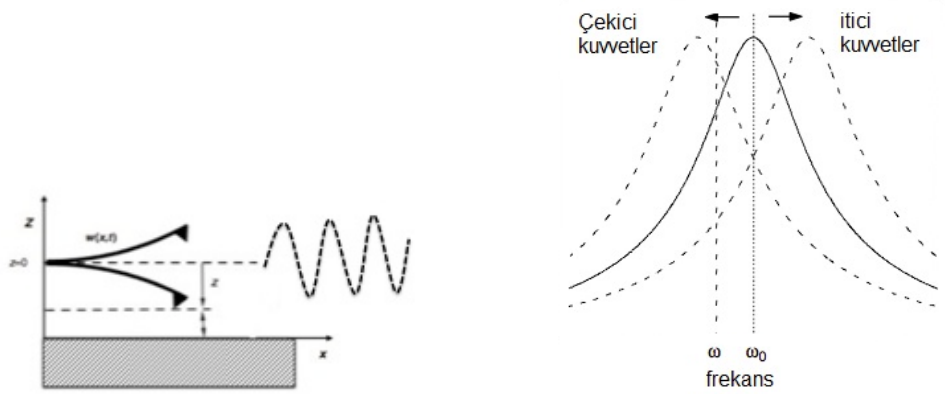
kazanmaya başlayacaktır ve ucun örnek yüzeyi tarafından ani çekilmesi kaçınılmaz olacaktır. Dolayısıyla görüntü üzerinde bu etki ile karşılaşmamak için temaslı modda itici aralıkta çalışılmaktadır.

Yüzey üzerine çok yakın olarak tarama yapmak yırtılma kuvvetlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Bu durum biyomoleküller ya da hücreler gibi yumuşak örnek yüzeyleri üzerinde tahribata neden olacaktır. Bu tahribatı minimize edebilmek için yay sabiti pikonewton seviyelerinde olan esnek kantileverler tarama için kullanılmaktadır.

İdeal şartlar sağlandığında havada ve sıvıda kontak mod ile mika ve HOPG gibi yüzeylerde atomik çözünürlük elde edilmesi mümkündür [55-56].

2.1.3.2. Tıklamalı Mod

Çoğu örnek yüzeyi üzerinde hava ortamında sıvı menisküs tabakası oluşturur. Sonuç olarak kısa mesafe kuvvetleri uç yüzeye çok yakın iken tanımlamak ve aynı zamanda ucun yüzeye yapışmasını engellemek temassız mod için oldukça zordur. Tıklamalı mod bu duruma çözüm olarak geliştirilmiştir [57]. Sert bir kantilever yukarı ve aşağı doğru rezonans frekansına yakın bir yerde osilasyon yapacak şekilde titreştirilir (Şekil 2.9).

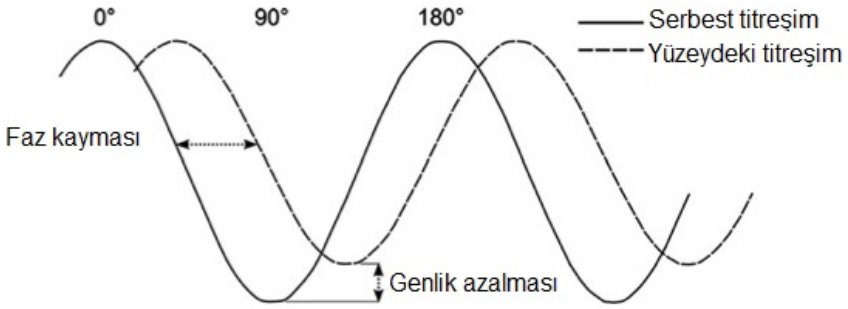


(a) (b)

Şekil 2.9. a) Osilasyona bağlı kantilever yerdeğişimi, b) frekans kayması (© 2010, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany izni ile kullanılmıştır) [49].

Bu osilasyonun genliği genelde 10 nm'nin üzerindedir. Osilasyonların bir kısmı itici aralığa geçer ve böylece kantilever hareketinin yarısı yüzeye değmiş olur. Uç yüzey üzerinde tarama yaparken yüzey ile arasındaki spesifik genliğin korunması için geribesleme devresi yükseklik ayarını yapar (Şekil 2.10). Bu modda örnek

hasarından kaynaklı enerji kaybı değen moda göre daha azdır. Böylelikle bu mod özellikle yumuşak biyolojik moleküllerin görüntülenmesinde ideal bir çalışma modudur [58-59].



Şekil 2.10. Uç yüzeye yaklaştığında osilasyon sinyalinde frekans ve faz kayması (© 2010, Peter Eaton and Paul West izni ile kullanılmıştır) [44].

2.1.3.3. Temassız Mod

Temassız modda tıklamalı mod gibi dinamik modlar kategorisindedir ve yine kantilever rezonans frekansının biraz üzerinde titreştirilir. Tıklamalı mod ile karşılaştırıldığında bu modda kantilever genliği 10 nm'nin altında olacak şekilde titreştirilir. Bu kısımda uç yüzeye tıklamalı moda göre daha fazla yaklaştırılır ve tamamı ile çekici kuvvetlerin alanı içerisinde çalışır. Uç ile yüzey arasındaki kuvvetler pN seviyesindedir. Van Der Waals kuvvetleri bu modda etkilidir ve kantilever frekansının düşmesine neden olmaktadır. Geri besleme devresi ile yüzey topografyası kaydedilirken genlik değişimi sabit tutulur ve frekans değişiminden görüntü kaydedilir. Bu yüzden bu moda frekans değişimi moduda denilmektedir [60]. Yüzeyi çok yakın takip edebilmesinden dolayı değmeyen mod ile sıvı içerisinde yüksek çözünürlük görüntüleri kaydedilebilmektedir.

2.1.4. Sıvı İçerisinde AKM ve Biyolojik Örneklerin Görüntülenmesi

AKM'ler vakumda, havada ve sıvıda çalışabilmektedirler. Ayrıca örneğe özel olarak herhangi bir kaplama, boyama işlemi yapılması gerekmemektedir. AKM'lerin diğer yüksek çözünürlük görüntüleme metodlarına göre bu önemli avantajlarından dolayı, atomik ve moleküler seviyede AKM uygulamaları,biyolojik örneklerin fiziksel ve sıvı ortamlarında in vivo görüntülenmesi özellikle 1990'lardan sonra oldukça yaygınlaşmıştır.

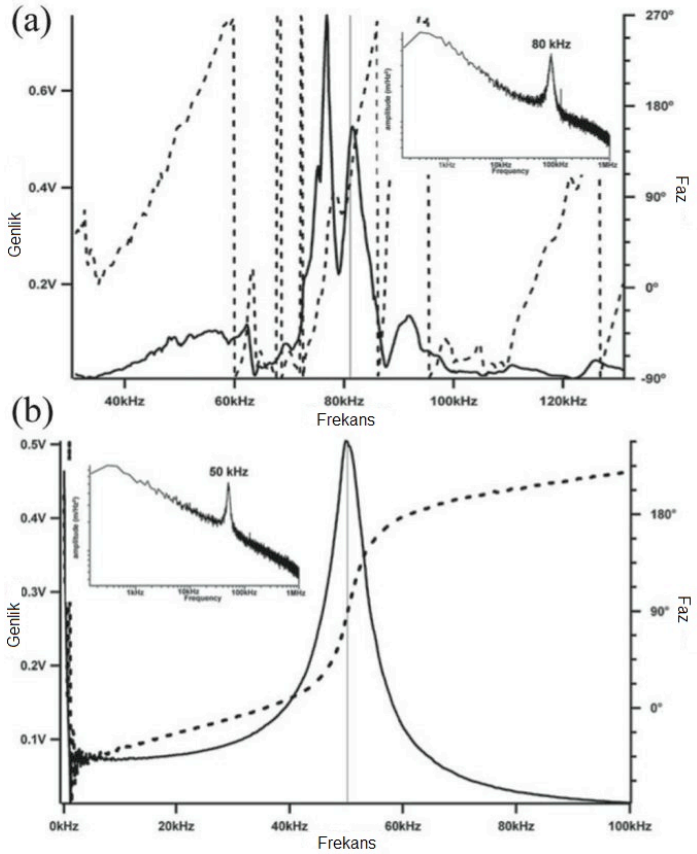
Sıvı içerisinde temaslı mod ile birçok biyolojik örnek görüntüleme AKM çalışmaları mevcuttur. Fakat temaslı modun yumuşak örnekler üzerinde yarattığı tahribat ve

yüzey üzerine Van der Waals kuvvetler nedeni ile yüzey tahribatında kaynaklı parçaların adsorpsiyonu bu mod ile biyolojik örnekler ile çalışmasını zorlaştırmaktadır. Bunun üzerine bu tür etkileşimleri indirgeyen dinamik kuvvet mikroskopisi biyolojik örneklerin taranmasında yaygın bir metod olarak ortaya çıkmıştır [61]. Dinamik modda önceden de bahsettiğimiz gibi genlik modülasyonu ve frekans modülasyonu olmak üzere iki mod ile çalışılabilmektedir. Temaslı mod ile karşılaştırıldığında averaj etkileşim ve değme kuvvetleri bu iki modda oldukça düşmektedir ve yüzey deformasyonundan kaçılınabilinmektedir.

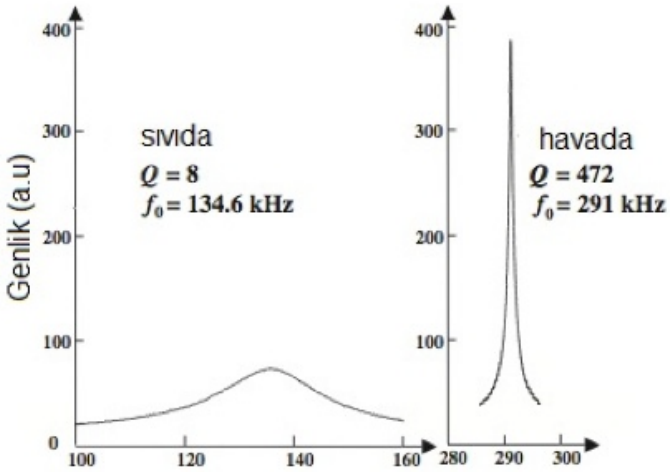
Sıvı içerisinde kapiler kuvvetler etkisini kaybettiği için yüksek çözünürlük verileri elde etmek mümkündür fakat diğer bir yandan sıvı içerisinde çalışmak havada çalışmaktan daha zordur. Sıvıda örneği sabitlemek, sıvı içerisinde tutabilmek, kantilevere sıvı ve yüzey tarafından etkiyen kuvvetler görüntü alır iken bir çok gürültüye neden olmaktadır. Aslında bu gürültü faktörleri havada da etkisini göstermektedir fakat görüntü kalitesini düşürecek boyutlara erişmemektedir. Sıvı içerisinde ise bu etkenler minimize edilmediği takdirde görüntü kaydedebilmek oldukça güçtür. 5 nm ve daha düşük çözünürlüklere inebilmek için kullanılan kantilever çok temiz ve ucu atomik seviyede sivri olmalıdır. Örnek sıvı içerisinde üzerine tutturulan substrata çok iyi yapıştırılmış olmalıdır. Ortam termal olarak eşitlik içerisinde olmalı ve tarama esnasında örnekte herhangi bir kayma olmamalıdır. Ayrıca dışarıdaki vibrasyonel gürültülere karşı koyabilecek iyi bir titreşime karşı izolasyon sağlayabilecek bir masa kullanılmalıdır. Son olarak tarama parametreleri optimize edilmelidir. Z yönündeki servo motor çok iyi çalışmalıdır. Küçük alan yapılan taramalar çok hızlı taranmalıdır.

Yüksek çözünürlük çalışmaları gerçekleştirebilmek için frekans modülasyonu olarakta adlandırılan temassız mod çoğu malzemenin incelenmesinde tercih edilmektedir. Ancak kantilever ve sıvı arasındaki hidrodinamik etkileşimlerin neden olduğu kantileverin kalite, Q faktöründeki düşüş, kantilever sıvı içerisinde titreştirildiğinde bir çok pikin oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla kantilever resonans frekansıda düşük frekans bandına kaymaktadır [62]. Rezonans frekansı dışındaki piklerden kurtulabilmek için sıvı içerisinde manyetik titreştirme yöntemi geliştirilmiştir [63]. Ancak her AKM cihazının mimarisine manyetik olarak titreşim düzeneğinin entegre edilmesi mümkün değildir. Piezo ile titreştirme yöntemindeki eksiklikleri gidermek ve rezonans frekansı dışındaki piklerden sıvı içerisinde

kurtulabilmek için Fukuma ve ark.'ları AKM'lerin elektronik düzeneğinde iyileştirmeler yapmışlardır [41,64]. Şekil 2.11'de sıvı içerisinde akustik ve manyetik olarak titreştirilen kantileverin frekans ve faz grafikleri gösterilmektedir. Şekil 2.12'de havada ve sıvıda tireştirilen aynı kantileverin rezonans frekansındaki ve Q faktöründeki değişim grafiği gösterilmektedir. 291 kHz rezonans frekansına sahip bir kantileverin havadaki Q faktörü 472 iken, sıvı içerisinde 8'e düşmüştür. Ayrıca rezonans frekansıda 134.6 kHz'e ve kantileverin titreşim geniliğide neredeyse 4 kat düşmüştür. Bu düşüşlerin nedeni sıvının hidrodinamik kuvvetlerinin kantilever üzerine etkisidir.

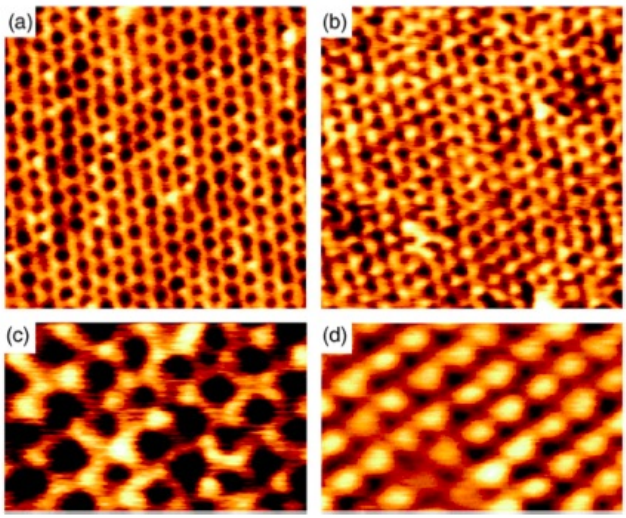


Şekil 2.11. (a) Piezo titreştirmesi ile sıvı içerisinde titreştirilen kantileverin (b) sıvı içerisinde magnetik titreştirilen kantileverin frekansa karşı genlik ve faz grafikleri. İç grafikler termal Brownian titreştirme piklerinin FFT spektrumlarını göstermektedir (© 2009 American Institute of Physics izni ile kullanılmıştır) [64].



Şekil 2.12. Kantileverin havada ve sıvı içerisinde Brownian hareketinin frekans spektrumu (f_o= 294 kHz ve k= 30N/m) (© 2009 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg izni ile kullanılmıştır) [65].

Akustik olarak titreştirilen kantileverin optimizasyonu ve optik düzenekte ve elektronik devrelerin gürültü azaltılmaları neticesinde sıvı içerisinde frekans değişimi dinamik modunda gerçek atomik yüksek çözünürlük mika görüntüleri elde edilmiştir. Mikanın sıvı içerisinde temassız mod ile alınan görüntüleri Şekil 2.13a'da 0.24 nm genlik ve 671 nm/s tarama hızı ile 8 nm x 8 nm tarama, Şekil 2.13b'de 0.20 nm genlik ve 1120 nm/s hız ile 8 nm x 8 nm tarama, Şekil 2.13c'de 0.16 nm genlik ve 934 nm/s hız ile 4 nm x 2.5 nm tarama, Şekil 2.13d'de 0.2 nm genlik ve 671 nm/s hız ile 4 nm x 2.5 nm tarama ile gösterilmektedir. [54].



Şekil 2.13. Mikanın sıvı içerisinde temassız mod görüntüleri. Kullanılan kantilever: Nanosensors: NCH k=42 N/m sıvı içerisindeki rezonans frekansı 136 kHz, *Q*= 30 (© 2005 American Institute of Physics izni ile kullanılmıştır) [54].

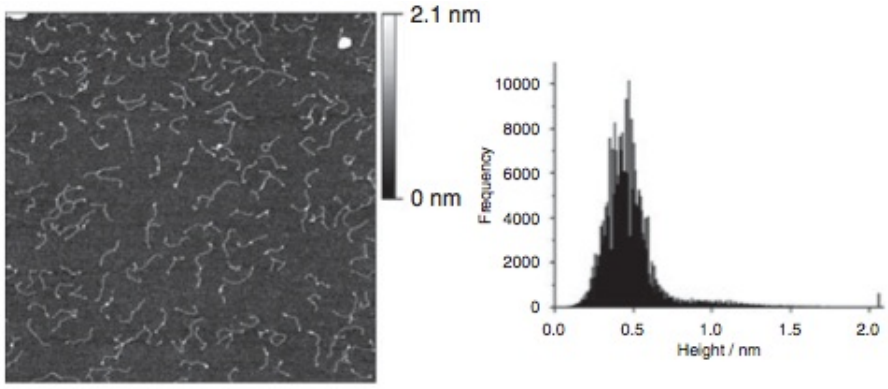
AKM'lerin sıvı içerisinde yüksek çözünürlükte görüntü alabilmesi biyolojik örneklerin detaylarının incelenmesine yönelik bir çığır açmıştır. Sıvı içerisinde

yaşayan ilk hücre görüntüsünün alınması 1990'ların başına dayanmaktadır [65]. Çoğu çalışma bu konuda ilk olarak memeli hücrelerinin görüntülenmesine dayanmaktadır [11,54,66]. Bunun nedeni hücrelerin kullanılan substarata iyi bir şekilde yapışması ve görüntü alma esnasında yüzeyden ayrılmamasıdır. Öte yandan daha küçük bakteri ve maya hücreleri substarata özel bir şekilde tutturulmaları gerekmektedir. Özel yüzey modifikasyonları ile mikrobiyal hücrelerin yüzeye tutuklanması gerçekleştirilmiş ve görüntüleri kaydedilmiştir [67-69].

Hücrelerin görüntülenmesi dışında hücre membranları ve membran üzerindeki proteinlerinde görüntülenmesi ileriki yıllarda daha ilgi çekici boyutlara erişmiştir. AKM ile membran proteinleri üzerinde bir çok görüntüleme, lokalizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır [70-73].

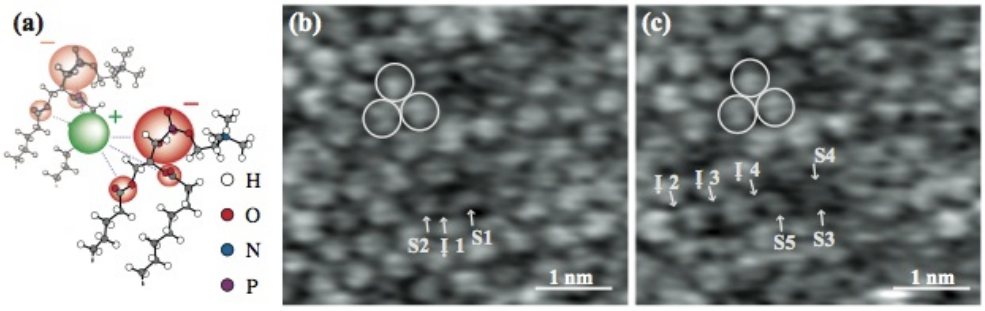
GroEL ve GroES *E.*coli sitoplazmasının içerisinde çözünmüş proteinlerin yapılaşmasını düzelten ATP'ye bağlı moleküler çaperonlardır. Bu moleküllerin yüksek çözünürlük görüntüleri temaslı modda Mou ve ark. tarafından kaydedilmiştir [74].

Subnanometre çözünürlükte kaydedilen bu çalışmaların ilerisinde araştırmacılar atomik seviyeler inmişlerdir. Hansma ve ark. DNA komplekslerini görüntüleme konusunda tıklamalı modda birçok çalışma yapmışlardır [75] (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Sıvı içerisinde plasmid DNA AKM görüntüsü ve yüzey yükseltilerinin dağılımı (© 2010, Peter Eaton and Paul West izni ile kullanılmıştır) [44].

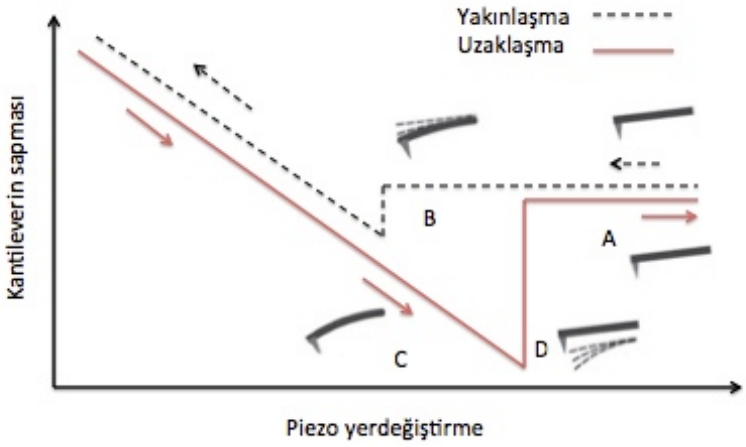
Fizyolojik ortamlarda biyolojik membranlar çeşitli metal katyonları içeren elektrolit solüsyonu ile çevrelenirler. Bu katyonların membran yapısına ve stabilitesine etkileri lipid tabakası kullanılarak AKM ile incelenmiştir [76-78]. Lipid –iyon ağının frekans değişimi görüntüleri ise Fukuma ve Ark. tarafından yüksek çözünürlükte kaydedilmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. a) lipid –iyon kompleksinin şematik gösterimi, b) ve c) DPPC tabakasının PBS içerisinde aynı alanın temassız mod görüntüsü (© 2007 American Institute of Physics izni ile kullanılmıştır) [79].

2.2. Kuvvet Spektroskopisi

AKM primer olarak görüntüleme cihazı olarak dizayn edilmesinin yanısıra AKM kantileverinin kuvvetlere karşı hassasiyeti yüzey kuvvetlerinin kalitatif olarak ölçülebilmesine olanak sağlamıştır. Kantilever ucu yüzeye yakın bir mesafeden yüzeye yakınlaştırılır, yüzeye batırılır ve yüzeyden çekilir. Şekil 2.16'da uç yüzeye yaklaşırken ki konumları ile birlikte gösterilen kuvvet mesafe eğrisi verilmektedir. Şekildeki kesik çizgi yüzeye yaklaşmayı, düz çizgi ise yüzeyden uzaklaşmayı göstermektedir. Kesik ve düz çizgilerde A noktası kantileverin orijinal pozisyonunu gösterir. Kesik çizgi B noktası yüzeye değme anını ve düz çizgi D noktası yüzeyden kopma anını temsil eder. Yaklaşma boyunca kantilever üzerine etki eden kuvvet yine kantileverin kaydettiği mesafeye göre hesaplanır ve kuvvet-mesafe eğrisi olarak elde edilir. Böylece uç ile yüzey arasındaki uzun mesafe çekici ve itici kuvvetlerin etkileşimleri, adhezyon ve elastisite gibi lokal kimyasal ve mekanik özellikler ve moleküller arası bağlanma kuvvetleri üzerinde çalışmalar yapılabilmektedir [46,80,81].



Şekil 2.16. Kuvvet-mesafe eğrisi .

2.2.1. Tek Molekül Kuvvet Spektroskopisi

Tek molekül biliminin tarihçesi en iyi şekilde üç kısa alıntı ile özetlenebilir. 1952 yılında Erwin Schrodinger [82] "İlk olarak şunu söylemek adildir ki, hayvanat bahçesinde iktiyozor besleyebileceğimizden daha fazlasını tek partikül deneylerinde yapmıyoruz." diyerek, o zamanlar moleküllerin bireysel olarak gözlemlenmesinin hayal gücünün ötesinde bir durum olarak belirtmiştir. Daha sonra Richard Feynman, Amerikan Fizik Derneğinin 29 Aralık 1959'daki Kaliforniya'daki toplantısında "Aşağıda birçok oda var" başlıklı konuşmasında mikrokosmos ve nanodünyanın ilk patlamasını deklare etmiştir. Son olarak Joseph M. Beechem [83] 1994'de "Çok iyi ortaya çıkmıştır ki gelecek on yıl içerisinde biyofizik alanlarında tek molekül teknikleri hakim olmaya başlayacaktır." şeklinde yazarak, tek biyomolekülleri gözlemleme potansiyelinin yeni ve heyecan verici bir bilimsel alan açacağını tahmin etmektedir [84].

Gerçekten de tek molekül tayini son yıllarda hızla büyüyen ve giderek artan bir ilgiye sahip olmaktadır. Son on yılda bir dizi yeni biyofiziksel yöntemler tek biyomolekül çalışmalarına ve manipülasyonlarının gelişmesine izin vermektedir. Tek bir molekülün biyolojik süreçlerinin temel düzeyde monitörleyebilme kabiliyeti altta yatan moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesini sağlamaktadır. Grup averajlamasının kaldırılması sayesinde, moleküler özelliklerdeki dağılımları ve dalgalanmaları karakterize edilebilmekte, ara geçişler tespit edilebilmekte ve katalitik mekanizmalar aydınlatılabilmektedir. Konvansiyonel toplu deneyler ile karşılaştırıldığında tek molekül deneyleri bir çok avantaj sunar. Çok sayıda ardışık ölçümler yapmak suretiyle, bu sistemler homojen olmayan sistemlerin moleküler özelliklerinin dağılımlarının tespitine izin vermektedir. Bu anlamda yapılan araştırma süreçleri normalde grup deneylerinde erişilemeyecek moleküler özelliklerin ortaya çıkmasına olanak sağlamıştır. Özellikle, enzimler, moleküler motorlar, reseptörler ve etkin sinyal kompleksleri gibi biyolojik olarak önemli moleküllerin doğrudan karakterizasyonu beklenmeyen anlayışların oluşmasına neden olmuştur. Membranlardaki iyon kanallarının elektriksel tayinleri, tek moleküller arasındaki biyokimyasal reaksiyon dinamiklerinin ölçümleri ve çeşitli mikroskopi teknikleri ile bu moleküllerin görüntülenmesi tek molekül çalışmalarında genel yaklaşımları oluşturmaktadırlar [85].

DNA ve tamamlayıcı zinciri, enzim ve substrat, antijen ve antibadi, lektin ve karbonhidrat, ligand ve hücre yüzeyi üzerindeki reseptörler gibi aralarında spesifik etkileşim oluşturan moleküllerin tanımlanması yaşam bilimleri açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu etkileşimler, genom replikasyonu ve transkripsiyonu, enzimatik aktiviteler, immun cevap, enfeksiyon başlangıcı ve diğer birçok hücresel fonksiyonları içeren önemli biyolojik süreçlerde rol almaktadırlar. Ayrıca nanobiyoteknolojide, bu moleküllerin seçicilik ve özgüllük özellikleri biyosensörler gibi biyoanalitik ve biyomedikal cihazların gelişmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [34]. Mevcut literatürde reseptör-ligand komplekslerinin yapısal ve işlevsel özellikleri hakkında çok miktarda bilgi olmasına rağmen, bu kompleksler içerisindeki birleşme ve ayrışma süreçlerinin moleküler dinamikleri hakkında bilgi eksiği bulunmaktadır. Ayrıca yakın zamana kadar uygun görüntüleme tekniklerinin eksikliğinden dolayı, model ya da hücresel membran yüzeyi üzerinde tek tek bağlanma bölgelerinin mekânsal dağılımının haritalanması mümkün olmamaktadır. Sonuç olarak biyomoleküller arasındaki moleküler etkileşimleri tanımlayabilme, haritalandırabilme ve edinilen bilgiler ile nanobiyoteknoloji uygulamalarına ışık tutabilmek açısından tek molekül tanımlama cihazlarının geliştirilmesi ve bunlardan yararlanma gerekliliği oldukça açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

Atomik kuvvet mikroskopisi ve kuvvet spektroskopisi proteinler, nükleik asitler, membranlar ve hücreler gibi biyolojik moleküllerin, moleküler düzeydeki yapı-işlev ilişkilerini, moleküllerin kendilerine uygun fizyolojik ortamları içerisindeki karakterizasyonlarına yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Diğer mikroskopi teknikleri ile karşılaştırıldıklarında atomik kuvvet mikroskopisinde biyolojik moleküllerin etiketlenmesi gerekmemektedir. Ayrıca örneklerin tampon çözeltileri içerisinde bütün biyolojik aktivitelerine olanak sağlayacak şekilde oda sıcaklığındaki işlevsel dinamikleri, yüksek çözünürlük ve hassasiyette incelenebilmektedir. AKM topografisinin olağanüstü sinyal/gürültü oranları tek bir biyolojik molekülün yapısal ve işlevsel detaylarının incelenmesini mümkün kılmaktadır. Yüksek çözünürlük AKM topografileri makromoleküler yapıdaki bileşiklerin her bir molekülünün subnanometre çözünürlüğünde görüntülenmesinin yanısıra, bu moleküllerin konformasyonal değişikliklerinin, yapısal durumlarının, moleküler dinamiklerinin ve biyolojik reaksiyonlarının detaylı bir şekilde incelenmesine de olanak sağlamaktadır.

Son on sene içerisinde yapılan çalışmalara baktığımız zaman genel de tek molekül tayini, eşzamanlı topografi tanımlama görüntülemesi [34], proteinlerin kıvrımlarının tanımlama bölgelerinin tayini gibi kuvvet spektroskopisi çalışmaları [35], hücre görüntüleme çalışmaları ve yüzeyin kuvvet haritalandırma [37] çalışmaları yoğun olarak literatürde görülmektedir. Ayrıca iğne ucunun çeşitli biyomoleküller ile modifiye edilerek, mekanik ve kimyasal sensör olarak kullanımı AKM'nin diğer uygulama alanlarındandır. Biyolojik moleküllerin kendilerine uygun fizyolojik ortam içerisindeki tanımlama ve bağlanma kinetiklerinin belirlenmesi son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır [38]. Engel ve ark. doğal ve yapay membran proteinlerinin fizibilitelerini görüntüleme, karakterizasyon ve haritalandırma üzerine çalışmalar yapmaktadırlar [86]. Tek proteinin bireysel topografilerinin klasifikasyonu, dışsal yapılarının hareket prensiplerinin anlaşılması ve lokal yapısal esneklikleri hakkında bilgi edinilmesi yönündeki kapıları açmaktadır. Konformasyonel değişikliklere bağlı fonksiyonların görselleştirilmesi ile birlikte bu anlayışlar neden protein fonksiyonlarında bazı esnekliklerin gerekli olduğuna ve yapısal esnek bölgelerin belirli konformasyonel değişikliklere izin verdiğinin anlaşılmasında önemli roller oynamaktadır. AKM görüntüleme tekniğine ek olarak kuvvet spektroskopisi deneyleri, membran proteinlerinin ve reseptörlerinin, ilgili ligandları ile aralarındaki moleküler etkileşimlerini detaylı ve hassas bir şekilde karakterize edebilmektedir. Bu metodun hassasiyeti transmembran alfa heliksleri, polipeptid lupları ve içerisindeki segmentleri gibi stabil sekonder yapıların incelenmesini mümkün kılmaktadır [87-88].

Yeni milenyumun başlangıcından itibaren, Hinderdorfer ve ark. yaptıkları çalışmalarda polietilen glikol (PEG) heterobifonksiyonel bağlayıcı sentezi ve sipesifik ve hassas bağlanma kimyası üzerine çalışmaktadırlar [89-90]. Oluşturdukları PEG uzatıcı kolları kullanarak, moleküllerin kimyasal olarak çeşitli yöntemler ile modifiye edilmiş AKM uçları ile yüzey moleküllerinin kimyasal, kinetik ve mekanik analizi, tespiti, tanımlanması ve topografik haritalandırılması yöntemlerini geliştirmektedirler [34].

2007 yılında Gimzewski ve ekibi AKM'yi kullanarak kanser hastalarından alınan hücreler ile biyomekanik (sertlik, elastiklik, kanser hücre fonksiyonu, yapışkanlık, hareketlilik, motilite ve istila) analiz yöntemini sunmuşlardır ve kanser hücrelerinin normal hücrelere göre %70 daha elastik olduğunu analiz etmişlerdir [91]. Aynı

grup 2008 yılında metastatik kanser hücrelerinin ve insan vücut sıvısından alınan iyi benin mezotel hücrelerinin nano mekanik cevaplarını AKM kullanarak raporlamışlardır [92]. Aynı yıl başka bir ekip (Li ve ark.) AKM kullanarak benin (MCF-10A) ve kanserli (MCF-7) insan meme epitel hücrelerini mikro boyutlu küresel uç ile tayin edip mekanik karakterizasyonunu raporlamışlardır [93]. Benzer bir çalışmayı melanoma hücrelerinin yüzey yapışmasını incelemek için 2011 yılında Shinto ve ark. yine mikroküre bağlı problar kullanarak AKM ile incelemişlerdir [94].

Sonuç olarak yapılan kuvvet spektroskopisi deneylerinde AKM neden kullanılmalıdır ve diğer sistemlere göre üstünlükleri nelerdir sorularının yanıtları aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- AKM yaşayan hücrelerin ve hücresel kompartmanların tek molekül çözünürlüğünde yapı-fonksiyon ilişkisini karakterize etmek için yeni yöntemler sunmaktadır [10,95-98].

- Biyolojik örnekleri tampon çözeltileri içerisinde oda sıcaklığında ve basıncında inceleme imkanı sunmaktadır.

- Florasan mikroskopisi gibi örneği etiketleme prosedürleri gerekmemektedir.

- Kendi doğal ortamlarında membran proteinlerinin değişik oligomerik ve konformasyonel devrelerinde yapısal ve fonksiyonel anlayışlarının gelişmesini sağlamaktadır.

- Sıralanmamış membran proteinlerinin doğal membran üzerinde gözlemlenmesine izin verir.

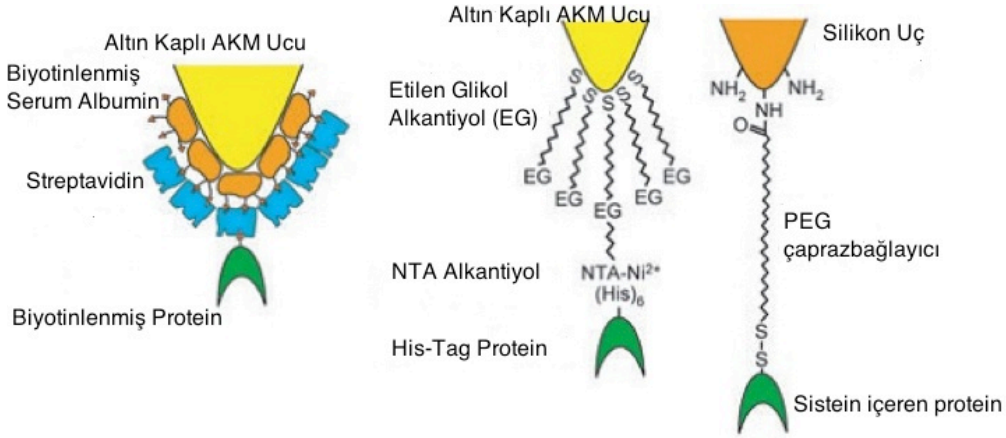
- 0.1 nm'ye kadar inen yüksek çözünürlük kalitesi sayesinde tek molekülleri en ince detayına kadar inceleme imkanı sunar.

- Hızlandırılmış AKM'ler ile bakteriyel yüzey proteinleri [99], nükleer açıklık kompleksleri [100], dış membran porinleri [101], sıkı kavşak kanalları [15], sitolisin açıklıklar [102], potasyum kanalları [103] gibi moleküler motorların kalıcı ve değişen dinamikleri tek molekül seviyesinde görüntülenebilmektedir.

2.2.1.1. AKM Ucu Modifikasyonu

Pikonewton seviyesinde kuvvet hassasiyeti ve nanometre seviyesindeki yatay çözünürlük doğruluğundan dolayı AKM'ler diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında tek ligand ve reseptörlerin, hücresel yüzeylerdeki ve izole edilmiş moleküller arasındaki etkileşim dinamiklerinin ve kuvvetlerin araştırılmasında güçlü bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda, AKM kuvvet spektroskopisi kullanılarak modifiye edilmiş yüzeyler arasındaki bağlanma kuvvetlerinin ölçülebilmesi için spesifik biyomoleküllerin ya da hücrelerin AKM uçlarına ve alt taşa sıkıca bağlanmaları gerekmektedir.

Literatürde varolan yöntemlere baktığımızda, proteinlerin iğne ucuna tutturulması, moleküller arası fiziksel ve kimyasal özelliklerinden faydalanarak geliştirilmiş olan yöntemler ile yapılmaktadır (Şekil 2.17). Bu yöntemlerden ilki altın yüzey üzerine biyotinlenmiş serum albumin, ara bağlantı olarak kullanılan streptavidin ve buna bağlanan biyotinlenmiş protein kompleksinden oluşan fiziksel tutunma yöntemidir. İkinci yöntem, yine altın kaplı uca etilen-glikol alkantiyoller ile NTA (nitrilotriasetikasit)-alkantiyollerin kimyasal tutturulmasına dayalı yöntemdir. His-Tag bağlı proteinlerin ya da antijenlerin etilen glikol alkantiyollerin, NTA alkantiyol kısımlarından bağlanması ile AKM iğne uçları oluşturulmaktadır.

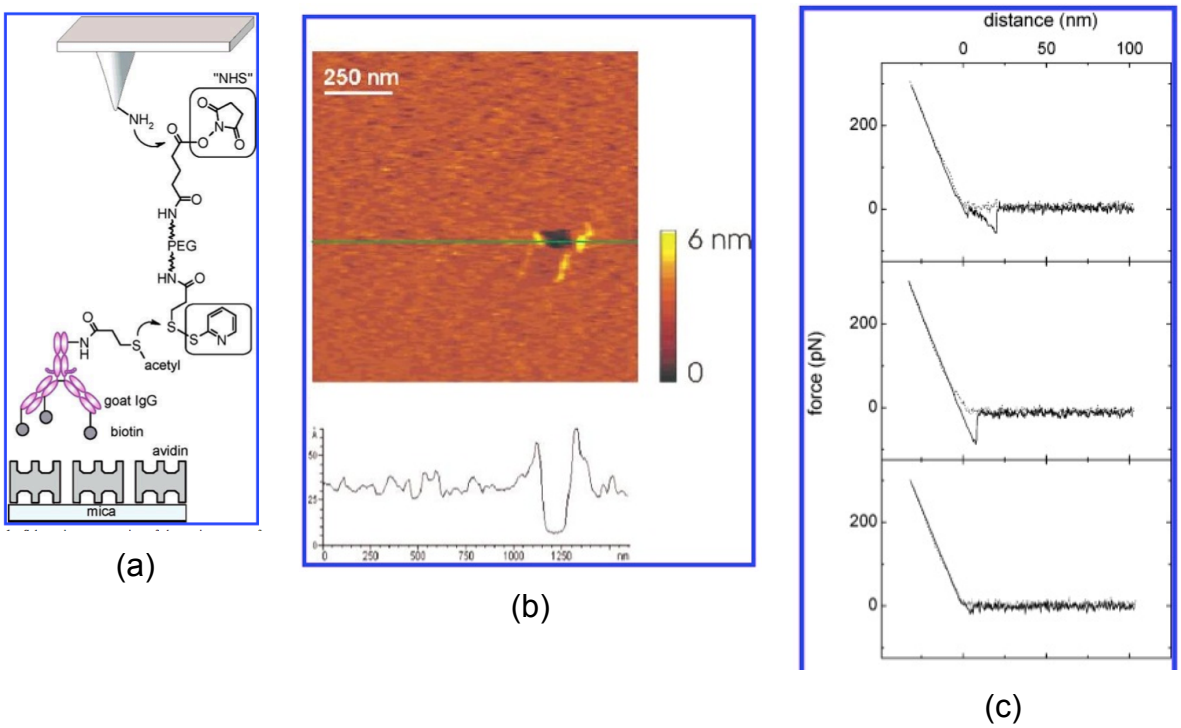


Şekil 2.17. AKM ucu fonksiyonilize etme yöntemleri (© 2006 Nature Publishing Group izni ile kullanılmıştır.) [34].

Son dönemde en yaygın olarak kullanılan modifikasyon yöntemi ise; AKM silikon ucunun silanlanması ve iki ucunda farklı fonksiyonel gruplar bulunduran ve esneyebilen polietilenglikol (PEG) uzatıcı kollar ile seçilen ligandın AKM iğne ucuna kovalent bağlamasıdır. Diğer uzatıcı kollara göre PEG'lerin üstünlüğü, klinik biyoloji çalışmalarında biyouyumlu olduklarının tespit edilmesi, proteinler ile

reaksiyonlarında immunojik tepki vermemeleri ve diğer moleküller ile reaksiyonları sonucu istenmeyen ya da toksik ikinci bir ürün oluşturmamalarıdır. Heterobifonksiyonel PEG'ler AKM iğne uçlarına ve seçili ligandlara amit ya da disülfür bağları ile stabil kovalent bağlar oluşturarak kolayca tutturulabilmektedirler. AKM silikon iğne ucuna PEG ucunda bulunan ester ile amit bağ oluşturularak PEG molekülü ilk önce silikon uca tutturulur ve ligand PEG'in boşta kalan ucundaki reaktif molekül ile amit ya da sülfür bağ yapacak şekilde tutturulur. Kovalent bağların ligand/reseptör bağlarına göre 10 kat daha kuvvetli olduğu bilinmektedir [104]. Dolayısıyla moleküller arası etkileşimler ölçülürken çapraz bağlayıcının AKM iğne ucundan kopma ihtimali minimuma indirgenmiş olacaktır. Bu durum deneylerdeki verimliliği ve doğru veri eldesini arttırmaktadır. Molekülün esnek olması AKM iğne ucu yüzeye değdiği anda, yüzeydeki moleküle ezip zarar vermemesi açısından çok önemlidir. Yüzeydeki molekülün bu etkileşimden zarar görmesi durumunda, kuvvet spektroskopisinde gözlemlenmesi gereken etkileşim eğrileri kaydedilemeyecektir. Ayrıca sterik engellerden etkilenmemesi için ligand ucun çevresinde maksimum hareket özgürlüğüne sahip olmalıdır ki literatürdeki çalışmalarda PEG çapraz bağlayıcının 8 nm uzunluğa sahip olması hareket sahasındaki bu özgürlüğü sağlayacaktır.

AKM kantilever ucuna PEG bağlayarak, uçtaki ligand ve yüzey arasındaki kuvvet-mesafe eğrilerinin kaydedilip, bağlanma kuvvetlerinin incelenmesine bir örnek olarak Kamruzzahan ve ark. [105] 2006 yılında yapmış olduğu çalışmayı verebiliriz. Bu çalışmada AKM ucuna NHS-PEG-SPDP tutturulmuş ve sülfit bağları ile goat-IgG-biyotin molekülü en uç kısma bağlanmıştır. Öte yandan mika substrat üzerine streptavidin molekülleri tutuklanmış ve AKM ucundaki biyotin molekülü ile aralarındaki etkileşim eğrileri kaydedilmiştir. Eğriler kaydedilirken spesifik bağlanmdan emin olmak için boş mika yüzeyi ve bloklanmış mika yüzeyi ile biyotin bağlı uç arasındaki etkileşimlerede bakılmıştır (Şekil 2.18).



(a) (b) (c)

Şekil 2.18. a) AKM ucunun fonksiyonelleştirilmesi, b) mika yüzeyinin streptavidin kaplanması ve kaplanan streptavidin molekülünün yükselti gösterimi c) streptavidin- biyotin spesifik bağlanmalarının gösterildiği kuvvet mesafe eğrileri (ilgili yazarın izni ile kullanılmıştır) [105].

2.2.1.2. Reseptör Ligand Etkileşimlerinin Dinamiği

Reseptör ve ligandlar arasında sabit çekme hızında ölçülen kopma kuvvetleri bağ yapılarının devamlı spektrumunda sadece tek bir noktayı temsil ettikleri çeşitli çalışmalar ile teorik ve deneysel olarak gösterilmiştir [106-111]. Bu durum yüklemedeki zamana bağlı hıza bağlıdır. Buradaki yük ise bağa uygulanan kuvvettir. Böylece farklı deneylerdeki kopma kuvvetleri yükleme hızı değiştirilerek ve kontrol edilerek karşılaştırma yapılabilir. Bu işlemler kinetik parametrelerin ve enerji düzeninin değerlendirilmesinde yol göstericidirler.

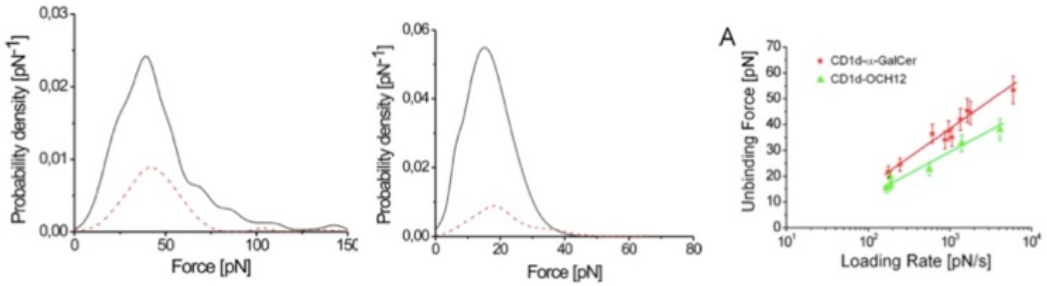
Reseptör ligand bağlarının ömürleri sınırlıdır ve ısıl aktivasyon için kuvvet uygulandığında ömürleri daha da kısaltılmaktadır. Termal enerji dışsal kuvvetin varlığında bağların kopmasına neden olmaktadır. Karakteristik zaman skalası (t (0)) bu spontan ayrışma için gerekmektedir. t=0 anında bağa herhangibir kuvvet uygulanmamaktadır. t ayrışma sabiti ile ters orantılıdır, $t(0)= k_{off}^{-1}$. t(0)'dan daha hızlı çekildiğinde, bağ kopmaya karşı direnç gösterecek ve kopma kuvveti kantitatif olarak ölçülebilecektir. Milisaniyelerden saniye skalasına termal olarak aktif olmuş aralık içerisinde AKM kuvvet deneyleri yapılabilir. Termal impalslar ayrıştırma

işlemini tetikleyecektir. Uygulanan kuvvetin ayrıştırma bariyerini nasıl düşürdüğünü ve bağ ömrünü nasıl azalttığını Boltzman eşitliği açıklamaktadır [109-111].

$$t(F) = t(0)\exp(-x_{\beta}F/k_{B}T) \qquad [2.7]$$

x_{β}, kuvvet yönünde enerji bariyerinin termal averaj projeksiyonudur, t(F), kuvvet altındaki bağın ömrüdür, $k_{B,}$ Boltzman sabitidir, T, mutlak sıcaklıktır.

Bağlanma kinetikleri tek molekül kuvvet spektroskopisi ile Hinterdorfer ve ekibi tarafından 90'lardan bu yana deneysel olarak çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde reseptör ligand ilişkileri arasındaki affinite değerleri belirlenmektedir. Bianca ve ark. tarafından yapılan çalışmada izole CD1d-glikospingolipid (GSL) molekülleri arasındaki bağlanma afinitelerine bakılmıştır. Çalışmada GSL molekülleri olarak α-galactosylceramide (αGalCer) ve OCH12 moleküllerinin CD1d kompleksleri kullanılmıştır. iNKT TCR tutturulmuş ucun, CD1d- αGalCer molekülleri ile bağlanma yüzdesi %17,4 olarak, CD1d- αGalCer molekülleri ile bloklama sonrası bağlanma yüzdesi ise %5.7 olarak kaydedilmiştir. Aynı ucun CD1d-OCH12 kompleksine bağlanma yüzdesi %15, bloklama sonrası bağlanma yüzdesi ise %3.5 olarak kaydedilmiştir. Bloklama sonrası bağlanma yüzdelerinin düştüğü gözlemlenmektedir. Bu veriler sonucunda CD1d-αGalCer kompleksinin k_{off} değeri 1.94 ± 1.44, CD1d-OCH12 kompleksinin k_{off} değeri 2.49 ± 1.47 olarak hesaplanmıştır. Moleküller arası kinetik hesaplamalara göre CD1d-OCH12 molekülünün reseptörden ayrılma hızının CD1d- αGalCer kompleksine göre 2 kat daha hızlı olduğu kaydedilmiştir [112]. Şekil 2.19'da çalışmada kaydedilen olasılık ve yükleme hızı grafikleri gösterilmektedir.



(a) (b) (c)

Şekil 2.19. a) INKT-TCR tutturulmuş ucun CD1d-GalCer, b) CD1d-OCH12 kompleksleri arasındaki bağlanma olasılığı grafikleri, c) iki molekülün bağlanma hızına karşı kopma kuvvetleri kinetiği grafiği (© 2011, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. İzni ile kullanılmıştır) [112].

2.2.2. Nanoindentasyon

Hücre davranışı, büyümeden, gen ekspresyonundan ve hücre döngüsü progresyonundan etkilenir ve fiziksel özelliklerini buna göre belirler [113]. Elastisite ölçümleri bu davranışların anlaşılmasına olanak sağlar. Hücrelerin elastisiteleri indentasyon teknikleri uygulanarak ölçülebilir [114]. Kantileveri önceden belirlenmiş bir kuvvet ile örnek yüzeyi içerisine bastırılması ve yüzeyden çekilmesi ile elde edilen kuvvet mesafe eğrilerinden, indentasyon eğrileri çıkarılmaktadır. Bu eğrilerin karşılaştırılması sonucunda örnek yüzeyinin elastikliği hakkında bilgi edinilmektedir.

90'ların sonundan itibaren hücre mekanik yapısının AKM kullanılarak belirlenmesine yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda farklı hücrelerin Young's modülü, elastik modülü hesaplanmıştır [115-124]. Elastik modülü belirleyebilmek için AKM ile kaydedilen kuvvet-mesafe eğrisini doğru modele uyarlamak gerekmektedir. Yaygın olarak konik geometrik dişleyiciler için iki model tanımlanmıştır. Bunlardan biri 1882'de tanımlanmış olan Heinrich Hertz, diğeri onun genişletilmiş versiyonu olan 1965'de tanımlanmış Sneddon modelidir [116].

Hertz modeli eşitlik 2.12'deki indentasyon ve kuvvet arasındaki ilişki olarak tanımlanır. Şekil 2.20'de eşitliğin tanımlarının görselleri verilmektedir.

$$F = \frac{2}{\pi}\frac{E}{(1-\nu^2)}\tan\alpha\delta^2 \qquad [2.8]$$

S = (h-he) = hc,

he : efektif yükseklik,

hc : yüzeye değme yükseltisi,

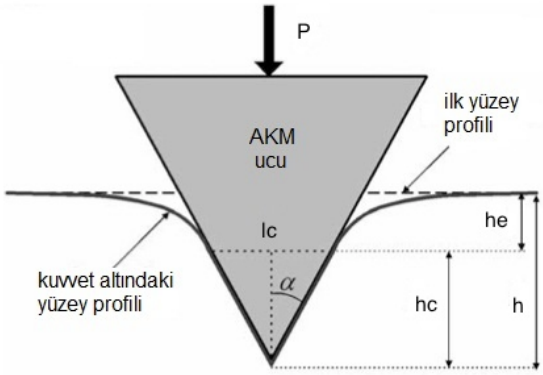
F : yüklenme kuvveti,

S : indentasyon mesafesi,

v : Poisson oranı,

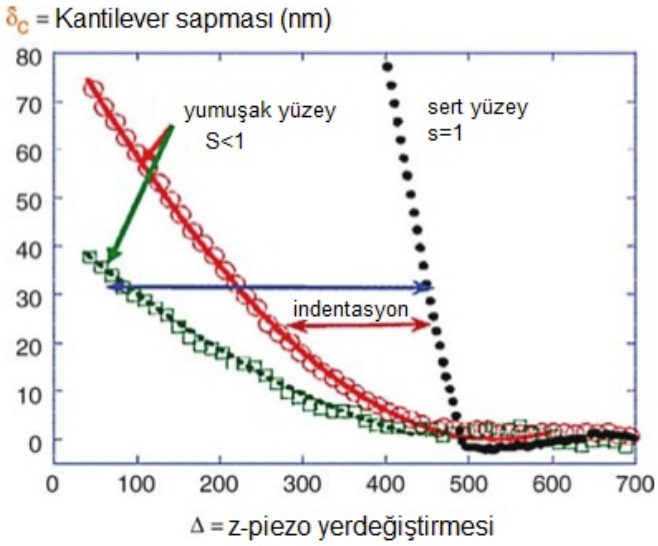
E : elastik modülü,

α : konik ucun yarı açılma açısı.



Şekil 2.20. Hertz eşitliğinin tanımları.

Genelde hücrelerin Poisson oranları 0.5 olarak kabul edilir [125]. Bu şekilde tek bilinmeyen olarak elastik modülü hesaplanabilir. Sert yüzeylerde piezonun Z yönünde yerdeğiştirmesi ve kantileverin yüzey üzerinde yer değiştirmesi birbirleri ile orantılıdır. Yumuşak yüzeylerde ise piezonun yerdeğişimi, indentasyon yükseltisinden fazladır. Şekil 2.21'de çeşitli yüzeylere göre indentasyon eğrileri şematik olarak gösterilmiştir. Sert yüzey deforme olmayan termanoks yüzeyi üzerinde kantileverin yerdeğiştirmesi z piezo hareketi ile orantılıdır ve lineer hareket göstermektedir. Hücre yüzeyi gibi yumuşak yüzeylerde AKM ucu yüzeye z- piezo yerdeğişimine göre daha az batar [126,127].



Şekil 2.21. Yüzey sertliğine göre indentasyon eğrileri [126,127].

Yaşayan hücrelerin elastisite ve adhezyon mekanizmalarının AKM ile ölçülebilmesi küçük objelerin hücre içerisine gönderim mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlamaktadır [128]. Bu parametreler hücrelerin nanopartiküller ile etkileşimlerinin anlaşılmasında önemlidirler ki bu bilgiler nanotoksikolojide ve nanotıpda

kullanılabilmektedir [129-130]. İmplant malzemeleri ile hücrelerin etkileşimi topografik ve kimyasal olarak önemlidir. Dolayısı ile yaşayan hücrelerin sertliği ve adhezyonu nanosklalara inildiğinde implant yüzeyleri ile etkileşimlerinin kalitesi açısından ve buna göre implantların üretimi açısından oldukça önemlidir. Öte yandan üretilen implantlarında sertliği ve yüzeylerinin pürüzlülük oranları yine hücre ile etkileşimleri açısından öenmlidir. AKM ile bu tarz yüzeylerin kalitelerini arttırma çalışmaları yapılmıştır [131].

2.3. AKM'ler ile Biyomalzeme Uygulamaları

Hücre proliferasyonu, morfolojisi, sitoskeletal organizasyonu, spesifik gen ekspresyonları yeni yüzey özellikleri ile değiştirilebilmektedir. Bu konuda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak değişik metal malzeme yüzeylerindeki değişimlerin üzerlerine kültüre edilen hücrelere kazandırdıkları mekanik özellikler hakkında literatürde eksiklikler bulunmaktadır.

Osteoblastlar, in vivo olarak tip I kolojen, fibronektin, ve vibronektin gibi çeşitli proteinlerce zengin hücredışı kemik matrisine tutunurlar. Hücre dışı matrisi ve osteoblastların çeşitli substratlara yapışması, adhezyon, proliferasyon, farklılaşma, sinyal gönderme, protein üretimi, minerilizasyon ve morfoloji gibi kemik hücre fonksiyonlarının modülasyonunda önemli rol oynadığı çok iyi bilinmektedir [132-135].

Titanyum implantların yüzeylerindeki biyouyumlu ince TiO_2 tabakanın kemik dokusu ile fiziksel olarak etkileşimi iyi bilinmektedir. Bu tabaka sayesinde kemik dokusu yabancı cisim cevabı olmadan implant ile direkt olarak bağlanabilir. İmplant yüzeyinin biyoaktivitesi inorganik ve organik temelli farklı komponentler kullanılarak arttırılmaya çalışılsa da uygulama esnasında veya implantasyon sonrası meydana gelebilecek delaminasyon sonucu başarısızlığa uğrayabilir. Bu yüzden uygulama esnasında yüzeyde soyulmanın yaşanmayacağı, nanometre skalasında biyoaktif yüzey modifikasyonları geliştirilmesi önemlidir.

Son zamanlarda yüzey modifikasyonu metodu için anotlama epeyce popüler olmuştur ve bu teknik ile tüp şeklinde titanyum içeren ince tabakalar metallerin üzerine inşa edilmektedir. Böylece anodizasyon parametreleri değiştirilerek farklı çapta ve uzunlukta nanotüp yapıları ve mimarisi elde edilebilmektedir. Yüksek yüzey alanları ve mikroyapılara göre daha yüksek biyolojik plastisitelerinden dolayı nanoyapılanmalara olan yüzey modifikasyonlarına olan ilgi artmaktadır [136-138].

Biyomalzeme geliştirilmesi ve implant teknolojisi yönünden kemik hücrelerinin yüzey nanotopografisine verdikleri cevaplar ile ilgili elde edilen veriler her geçen gün çoğalmaktadır. Nanotopografiye bağlı olarak hücrelerin morfolojisi, düzenlenmesi, sitoskeletal organizasyonu, çoğalması, fenotipe özgü aktiviteleri ve gen ekspresyonları mikro-makro topografiye göre büyük değişimler göstermektedir [139-141].

Anodizasyon işleminde süreç parametreleri ve elektrolitleri değiştirerek nanotüp morfolojisi değiştirilebilir. Farklı çaplara sahip nanotübüler titanya yüzeylerde kültür edilmiş hücrelerin osteoblast hücre çoğalmasına, morfolojisine ve osteojenik fonksiyonlarına ne yönde etki ettiğine dair çalışmalar mevcuttur [142-144]. Konu ortopedik bir uygulamaya yönelik biyomalzeme olduğunda hücre ve oluşacak dokunun mekaniksel dayanım ve elastisitesi önemli parametreler olarak ortaya çıkmaktadır. Literatürde de nanotübüler tabakadaki bu yönde bir değişimin hücrelerin mekanik özelliklerini nasıl değiştirdiğine dair bir çalışmanın eksikliği görülmektedir.

Hücrelerin mekanik özelliklerini belirlemek için çeşitli teknikler uygulanmaktadır. Suspansiyon içerisindeki hücrelerin viskoeleastik özelliklerini belirleme amaçlı, mikropipet aspirasyonu yoğun olarak kullanılmaktadır, fakat hücre membranın siteskeletondan ayrışımından dolayı yapışmış hücreler için bu yöntem pek uygun değildir [145]. Manyetik döndürme sitometresi yapışkan hücreler için daha uygun bir yöntemdir, fakat ölçüm sonuçlarını yorumlamak zordur ve osteoblast gibi hücrelerde uygulanamaz [146]. Diğer bir yöntem ise tek hücre indentasyonunda kullanılan AKM ve buna benzer kuvvet ve derinlik ölçümleri yapabilecek özel tasarımlardır [147-149]. AKM sensörleri ile nanomekanik özelliklerin değişimlerinin implant yüzeylerine yapışan hücrelere etkileşimlerine bakıldığında ise birkaç çalışma ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmalarda yüzeyin sertliği ve elastisite ölçümleri gerek substrata bağlı olarak gerekse zamana ve ortam şartlarına bağımlı olarak verdikleri çeşitli tepkiler AKM probları ile başarılı ve hassas bir şekilde ölçülmüştür [150-152].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

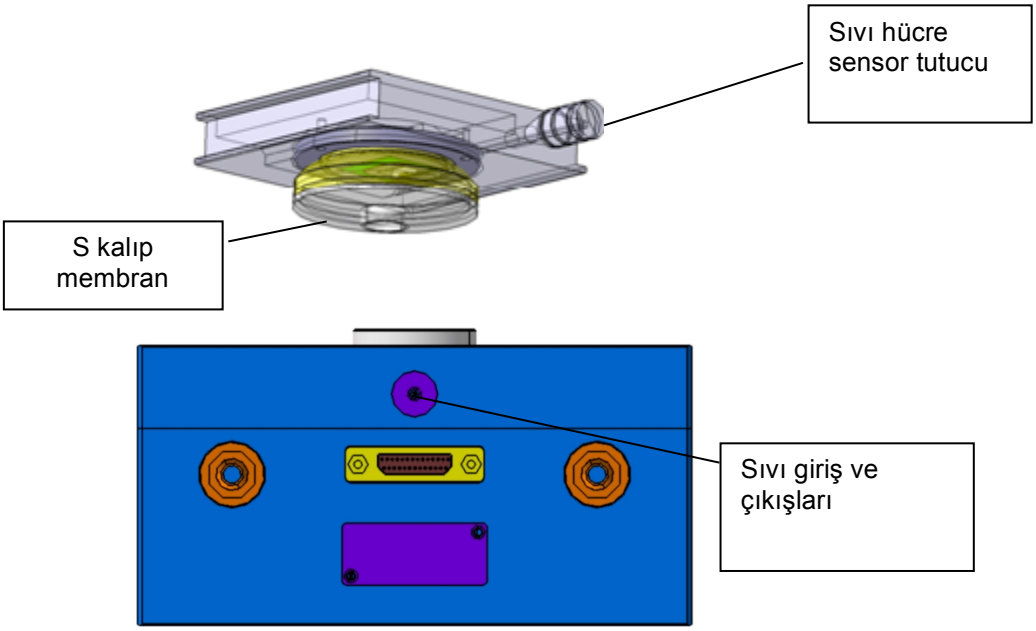
Çalışmalar ilk olarak Nanomanyetik Bilimsel Cihazlar'ın üretmiş olduğu kapalı sıvı hücre birimi ile başlamıştır. Eksiklikler ve gereksinimler yapılan deneyler ışığında belirlenerek mekanik tasarım ve optik düzenek üzerinde modifikasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Sıvı ortamda akışkanlar dinamiğinden dolayı yayın salınımı hava ortamına göre oldukça sönümlenir ve yayın Q (kalite, ingilizcede=quality) faktörü oldukça düşer. Q değeri Gaussian frekans eğrisinin yarı yükseklikteki tam genişlik değeridir ve eğrinin simetrikliği hakkında bilgi vermektedir. Bu durum yayın titreştiği bölgedeki frekans gürültüsünün artmasına neden olduğu için sıvı içerisinde alınan görüntülerin çözünürlüğü düşer. Bu durumu mümkün olduğu kadar minimize edip atomik seviyede görüntü alabilmek için deneysel çalışmalar kapsamında, mekanik olarak sıvı hücre tasarımı ve yay tutucu iyileştirilmiştir. Optik ve elektronik olarak daha düşük gürültü seviyesine sahip lazer ve amfiler kullanılarak ve yeni eklemeler yapılarak gürültü sevilerinde iyileştirmeler yapılmıştır.

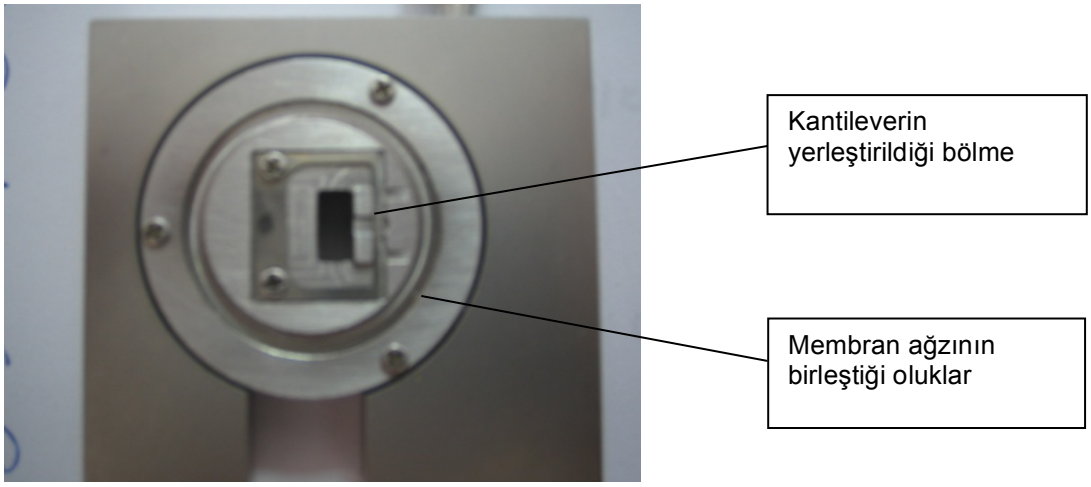
3.1. Yüksek Çözünürlükte Görüntü Alan AKM Geliştirilmesi ve Test Edilmesi

3.1.1. Birinci Kapalı Sıvı Hücre Prototipi

Nanomanyetik Bilimsel Cihazlara ait sıvı hücre biriminde, örnek tutucu sıvıyı hapseden membranın içerisine sıvı giriş ve çıkışlarına imkan verecek şekilde geliştirilmişti. Sensör tutucu yukarı sıvı kaçırmayacak şekilde tasarlanmış lazerin sensörün üzerine geldiği bölme özel açılı camlar ile kapatılmıştı. Sensör tutucu ile örnek tutucu arasındaki sıvıyı muhafaza etmek için 'S' kalıp membran kullanılmıştı (Şekil 3.1). Bu şekilde tarama esnasında piezo tüpe uygulanan kuvvet miktarının az olacağı hesaplanmıştı. Fakat bu kapalı sıvı hücre ile yapılan çalışmalarda, membranın inceliği, iç hacim miktarı ve sensor tutucudaki membran ağzının oturduğu oyuklardaki uyumsuzluk nedeni ile dış ortama sıvı sızması gözlemlenmiştir. Bu şekilde sıvı ortam, stabil duruma getirilememiş ve AKM sıvı içerisinde çalışır iken istenilen görüntüler kaydedilememiştir. Nanomanyetik Bilimsel Cihazlara ait çelik sensör tutucu Şekil 3.2'de gösterilmektedir.

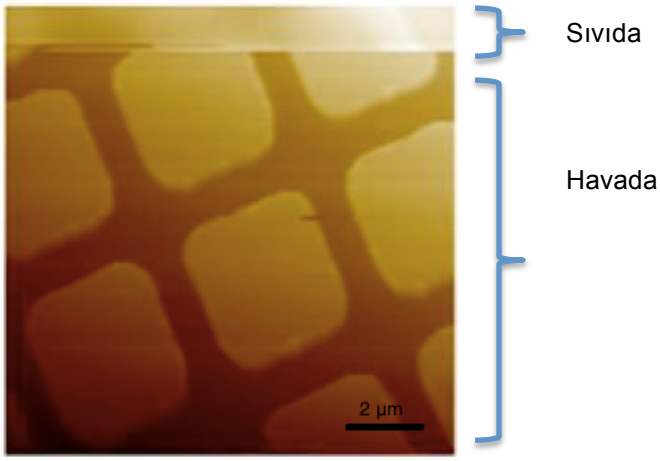


Şekil 3.1. AKM kapalı sıvı hücre birimleri.



Şekil 3.2. İlk tasarımdaki sensör tutucunun alttan görünümü

İlk olarak sıvı içerisinde kalibrasyon örneği (Uzunluk (U) x Uzunluk (U) x Yükseklik (Y); 4x4x0.15 µm kareler) taranmıştır (tarama boyutu: 10 µm x 10 µm). Kaydedilen görüntülerde sıvının yüzeyi tam olarak kaplamadığı ve görüntünün yarısından sonra, farklı ortam (havadan sıvıya) geçişi nedeni ile sensörün merkez frekansını kaydırdığı için görüntünün bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sıvı içerisinde alınan (Z skalası 0 µm -0.5 µm) kalibrasyon örneği görüntüsü.

Bu çalışmalar neticesinde sıvı içerisinde verimli sonuçlar alabilmenin, kantileveri akustik olarak doğru sürebilmek, hücre içerisinde sıvı giriş-çıkışını doğru bölgelerden yapmak, sıvıyı hücre içerisinde tutabilmek ve bütün havayı dışarı atabilmek ile mümkün olduğu yapılan çok sayıda test ile tesbit edilmiştir.

Varolan kapalı sıvı hücre biriminde karşılaşılan zorluklar yüksek çözünürlükte görüntü alabilmek için tasarımda ve optik düzenekte bazı çözüm yolları bulunması gerekliliğini gündeme getirmiştir. Aşağıda varolan problemler ve bunların deneysel olarak desteklenmiş çözüm yolları belirtilmiştir.

3.1.1.1. Kantilever Tutucu Gövdenin Mekanik Tasarımında Yapılan Değişiklikler

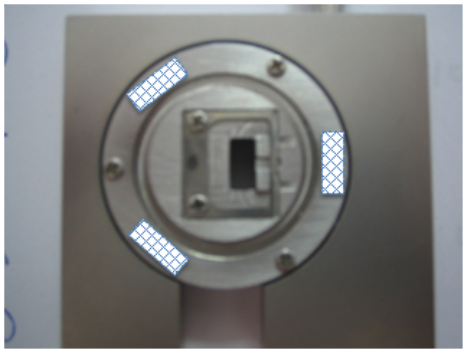
Dinamik modda çalışan AKM'lerde kantilever resonans frekansında mekanik olarak titreştirilir. Titreşen kantileverin genlik, faz ve frekansı tesbit edilir ve uç-örnek uzaklığının belirlenmesinde kullanılır [41]. Kantileveri titreştirmek için değişik metodlar uygulanmaktadır. Tipik olarak kantileveri taşıyan gövdeye entegre edilmiş piezo malzeme ile kantilever titreşimi tahrik edilir. Fakat bu yöntem neticesinde sıvı içerisinde kantilever titreştirildiğinde gerçek olmayan frekans eğrileri gözlemlenmektedir. Bu tür eğrileri elimine etmek için ayrıca manyetik ve fototermal tahrikleme yöntemleride geliştirilmiştir [153]. Fakat basitliğinden ve geniş kullanım alanından dolayı tez çalışmasında piezo ile akustik titreşim metodunu geliştirmeye yönelik çalışmalara odaklanılmıştır.

İki malzemenin akustik empedansı biribirine yakın ise akustik bir bariyer görevi görmezler ve bariyer eksikliği verilen dalganın yayılmasına neden olur [41]. Tasarımda kullanılan paslanmaz çeliğin (SS316) akustik empedans değeri 36 x

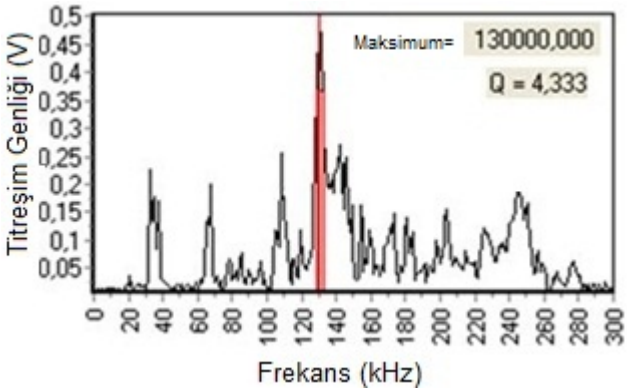
10^6 kg/m^{2}s iken, piezo malzemenin akustik empedans değeri 33 x 10^6 kg/m^{2}s'dir. Akustik bir dalganın, akustik empedans değerleri Z_{a1} ve Z_{a2} kabul edilen, iki malzeme arasındaki bir sınırdan geçerken ki geçiş enerjisi (T_e) aşağıdaki formül ile hesaplanır. Eşitlik 3.1'e göre iki malzeme arasındaki empedans farkı arttıkça, geçiş enerjisi (T_e) düşer.

$$Te = \frac{4\,Z_{a1}\,Z_{a2}}{(Z_{a1} + Z_{a2})^2} \qquad [3.1]$$

Z_{a1} ve Z_{a2} değerlerinin birbirine yakın olması nedeni ile piezoya gönderilen titreşim sadece sensörü titreştirmek yerine, tüm gövdeyi titreştirmektedir. Bu nedenle sensör tutucu gövdenin çelikten oluşması kantileveri titreştirirken gerçek olmayan rezonans eğrilerinin oluşmasına ve kantileverin gerçek merkez frekansının bulunamamasına neden olmaktadır. Ayrıca kantileveri titreştirmek için kullanılan piezo tahrikleyiciler iki çelik levha (sensör tutucu kasa ve gövde) içerisinde baskılanarak yekpare olmayan çelik gövdenin daha çok titreşmesine ve bu eğrilerin etkisinin artmasına neden olmaktadır. Bunun üzerine piezoyu doğru yere yerleştirme deneyleri yapılmıştır. Şekil 3.4'de ilk prototipteki piezoların yerleşim yerleri gösterilmektedir.



Sensör tutucu kasa ve gövdenin arasında bulunan piezo malzemeleri sembolize etmektedir.

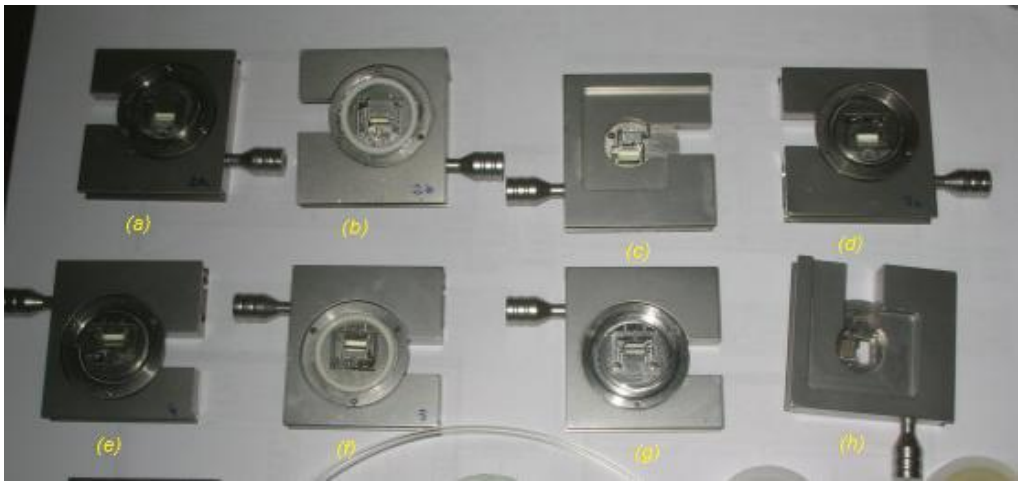


(a) (b)

Şekil 3.4. (a) Sensör tutucuda piezoların yerleşim yerleri ve (b) bu sensör tutucu ile sıvı içerisinde alınmış merkez frekans eğrisi.

Kantilever tutucu gövde de kullanılan malzeme değişimini gerçekleştirmeden önce deneysel olarak tasarımda yapılan deneylerin sonucunda ortaya çıkan sensör ve örnek tutucu ara prototipler Şekil 3.5'de gösterilmektedir. Şekil 3.5 (a)'da 'S' membranın sensor tutucuya yapıştırıldığı 2. sıvı hücre ara prorotipi, Şekil 3.5

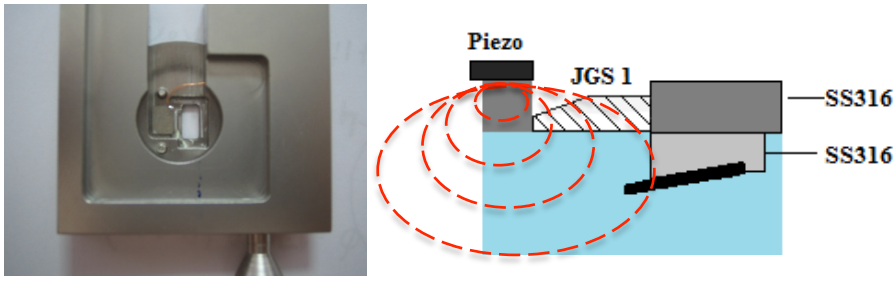
(b)'de contanın sensor tutucuya yapıştırılan 3. sıvı hücre ara prototipi, Şekil 3.5 (c)'de sıvı giriş çıkışları için sensor tutucunun yay vida yerlerinden delikler açılarak 1mm dış çapında paslanmaz çelik boruların geçirildiği 4. sıvı hücre ara prototipi, Şekil 3.5 (d)'de sensorü tutan yayın tutturulduğu 5. sıvı hücre ara prototipi, Şekil 3.5 (e)'de sensörü tutan yayın inceltildiği ve sıvı giriş çıkışlarının karşılıklı zıt taraflardan yapıldığı 5. sıvı hücre ara prototipi, Şekil 3.5 (f)'de conta oyuğunun genişletildiği 6. sıvı hücre ara prototipi, Şekil 3.5 (g)'de lazer hizalamasının örnek tutucunun tam orta noktasına gore dizayn edilmiş 7. sıvı hücre ara prototipi, Şekil 3.5 (h)'de sensörü titreştiren piezonun akustik titreşim iletebilmesi için yerinin tesbitinde kullanılan 8. sıvı hücre ara prototipi gösterilmektedir.



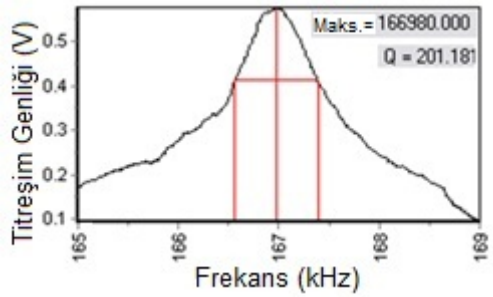
Şekil 3.5. Sıvı hücre sensor tutucu ara prototipler.

Bu tasarımda çözüm olarak önce piezonun yeri değiştirilerek, kantileverin en verimli titreştirildiği yer gövde üzerinde tesbit edilmiştir. Piezonun kantileverin arkasına gelecek şekilde gövdenin sıvı ile temas etmeyen bölgesine yerleştirilmesi sonucunda merkez frekans eğrisinin daha düzgün elde edildiği gözlemlenmiştir. Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de piezonun sensör tutucu gövde üzerinde yerleştirildiği bölgeler ve bu durumda elde edilmiş merkez frekans eğrileri gösterilmektedir.

Piezo yerleştirme bölgesi tesbiti deneyleri esnasında çelik malzemeden yapılmış olan sensör tutucu gövdeleri kullanılmıştır. Gövde malzemesi olarak yukarıda bahsi geçtiği şekilde akustik bariyer görevi görmesi ve işlenme kolaylığından dolayı hidrofobik ve bir çok kimyasala dayanıklı KEL-F (poliklorotrifloroetilen türevi bir homopolimer) (Professional Plastics, Inc., Ca, ABD) kullanılmıştır. KEL-F'in akustik empedans değeri 2.1 x 10^6kg/m^2s'dir. Piezonun empedans değerinden farklı olmasından dolayı bariyer özelliği gösterecektir.

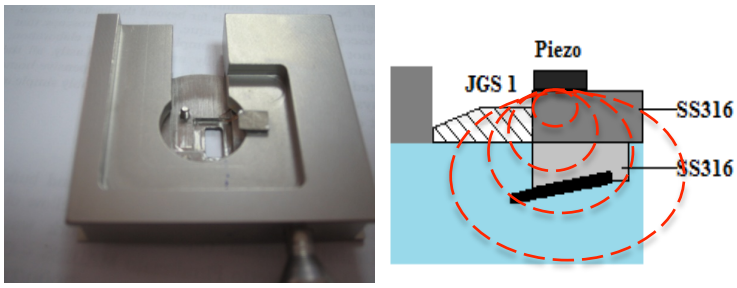


(a) (b)

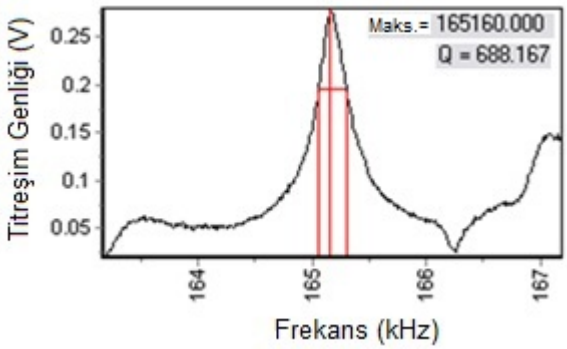


(c)

Şekil 3.6. (a) Piezonun gövdenin arkasına yerleştiridiği sensör tutucu prototipi, (b) profilden görünümü ve (c) bu şekilde havada titreştirilerek elde edilmiş olan rezonans frekansı eğrisi.



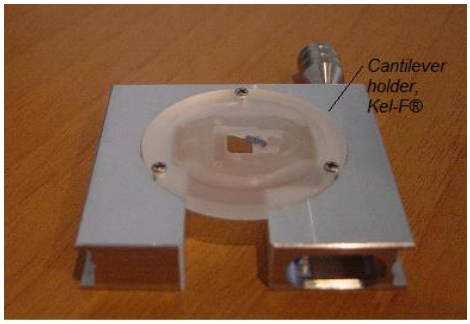
(a) (b)



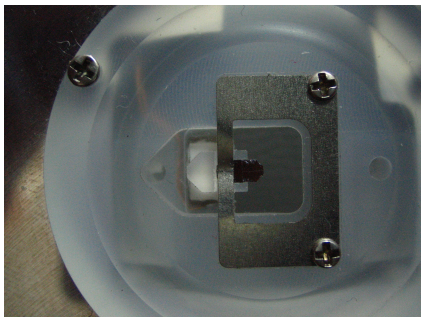
(c)

Şekil 3.7. (a) Piezonun kantileverin arkasına yerleştirildiği sensör tutucu prototipi, (b) profilden görünümü ve (c) bu şekilde havada titreştirilerek elde edilmiş olan rezonans frekansı eğrisi.

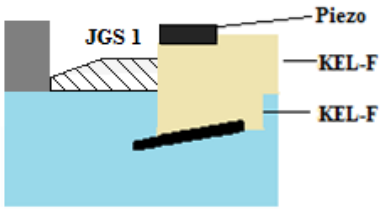
Sensör tutucu gövde ve sensör tutucu ilk denemede gürültü miktarının farklı malzemelerin kullanılmasından kaynaklı artacağı düşünülerek topyekün yapılmıştır. Bu prototipin üsten ve yandan görünümü ve profili Şekil 3.8'de verilmektedir. Bu prototip ile sıvı içerisinde alınan 2 µm çapında dairelerden oluşan kalibrasyon örneğinin 15 µm x 15 µm tarama ve bu prototip ile sıvı içerisinde kaydedilen merkez frekans eğrisi görüntüsü Şekil 3.9'da verilmektedir. Fakat denemeler sonucunda KEL-F'in kantileveri değiştirirken aşınmasından ve yine empedans değerleri farklı malzemeler kullanarak akustik bariyer şiddetini arttırmak için sensör tutucu SS316'dan yapılmıştır (Şekil 3.10).



(a)

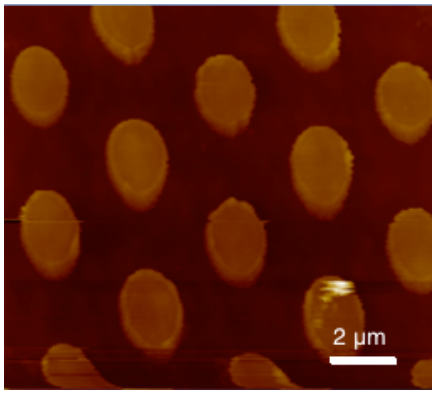


(b)

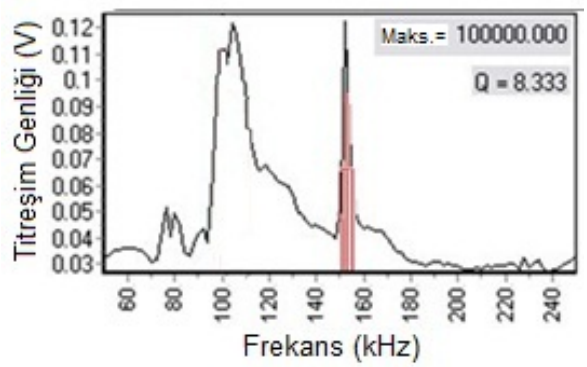


(c)

Şekil 3.8. (a) KEL-F'den yapılmış sensör tutucu prototipi, (b) prototipin alttan görünümü, (c) profilden görünümü.



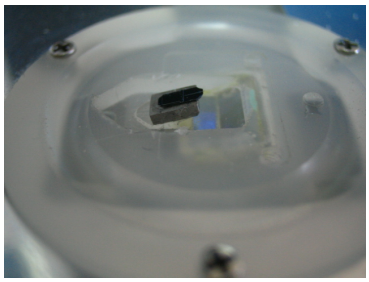
(a)



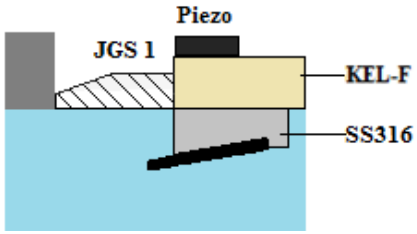
(b)

Şekil 3.9.(a) Sıvı içerisinde kalibrasyon örneği görüntüsü (Z skalası: 0 µm -0.4 µm), b) sıvıdaki rezonans frekansı eğrisi.

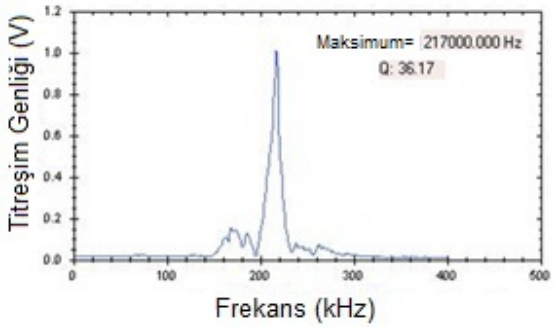
Bu tasarımda gövde malzemesi olarak çelik yerine KEL-F kullanılarak frekans eğrilerinin düzeldiği gözlemlenmiştir. Bu şekilde tasarlanmış olan prototip ile saf su içerisinde Tap300Al (Budget Sensors) kantilever kullanılarak elde edilen merkez frekans eğrisi, 20 µm x 20 µm kalibrasyon örnekleri (UxUxY; 4x4x0.15 µm kareler) tıklamalı mod AKM görüntüsü ve 10 µm x 10 µm temaslı mod bluray disk görüntüsü (bitler arası genişlik: 320 nm; bit derinliği: 60 nm) Şekil 3.11'de gösterilmektedir.



(a)

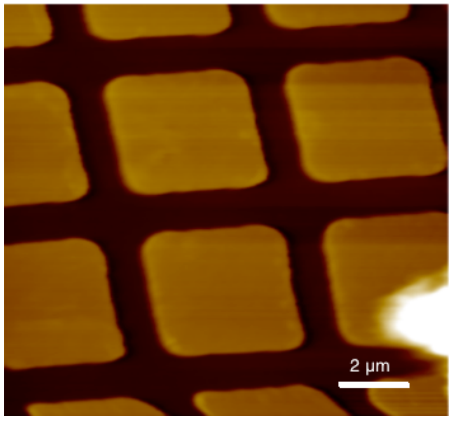


(b)

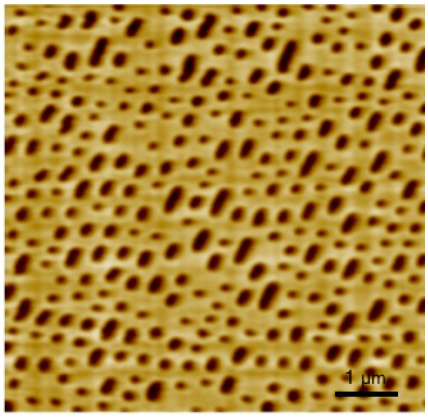


(c)

Şekil 3.10. (a) SS316 çelikten yapılmış sensör tutucunun KEL-F gövdeye tutturulmuş prototipin görünümü, (b) gövdenin profil çizimi, (c) sıvı içerisinde alınmış merkez frekans eğrisi.



(a)

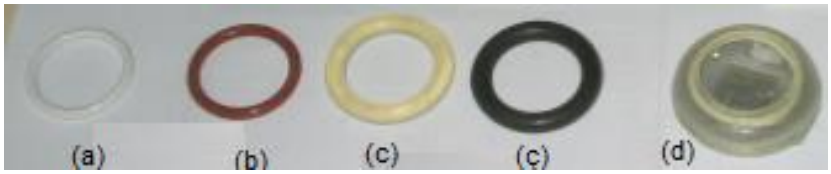


(b)

Şekil 3.11. (a) sıvı içerisinde tıklamalı modda alınan kalibrasyon örneği görüntüsü (Z skalası : 0 µm - 0.5 µm), (b) sıvı içerisinde temaslı modda alınmış blu-ray disk görüntüsü (Z skalası: 0 µm – 0.1 µm).

3.1.1.2. Sıvının Hücre İçerisinde Hapsedilmesi

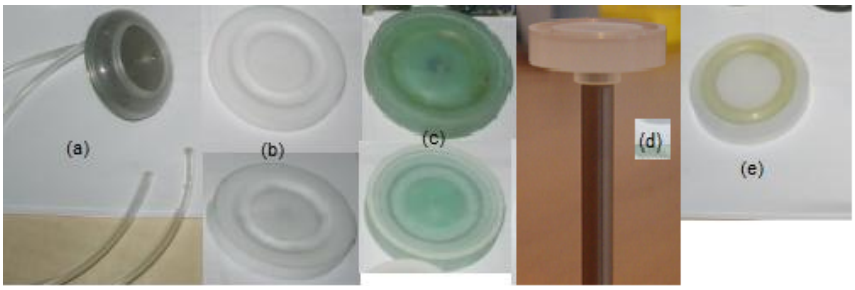
Zamana bağlı olarak yapılan deneylerde örneğin içerisinde bulunduğu ortam sıvısının buharlaşmaması deneyin kaliteli sonuçlar vermesi açısından önemlidir. Ayrıca sıvının sıcaklığı, pH'ı ve içeriği değiştirilerek örnek üzerindeki etkileri incelenecek ise hücre içerisinin dış ortamdan iyice yalıtılması gerekmektedir. Birinci prototipte kullanılan S-membranın kalınlığı (0.5 mm), sıvı hücre içerisinin hacminin büyük olmasından dolayı yeterli olmamış ve hücre içerisine sıvı gönderildiğinde dışarı taşmalara engel olunamamıştır. Ayrıca hücre içerisine sıvı enjeksiyonu için kullanılan sıvı aktarım hortumları piezo tarayıcının kasası üzerindeki deliklerden geçerek örnek tutucuya bağlanmış ve bu durum tarama esnasında çalışma alanını azaltmıştır. Bu probleme çözüm olarak, S-membran kullanılmasından vazgeçilmiş ve onun yerine sıvıyı hücre içerisinde hapsetmek için piyasada varolan silikon contalar denenmiştir. Şekil 3.12 (a)'da 1.5 mm çapında 60 shoreA conta, Şekil 3.12 (b)'de 2 mm çapında 60shoreA conta, Şekil 3.12 (c)'de 4 mm çapında 40 shoreA conta, Şekil 3.12 (ç)'de 4mm çapında 20 shoreA EPDM conta, Şekil 3.12 (d)'de birinci prototipte kullanılan 'S' membran gösterilmektedir. Piyasada varolan contaların sertlik seviyeleri minimum 40°IRHD (shore A)'dır ve bu sertlik tarama yaparken tarayıcı piezoya ekstra yük binmesine ve hatta piezonu hareketini kısıtlanmasına neden olmaktadır. Bunun üzerine daha yumuşak ve sıvı kontaminasyonuna neden olmayacak elastomerden yapılmış inert EPDM (etilenpropilendien M-sınıf plastik), 20°IRHD (shore A) (Presicion Polymer Engineering Ltd., İngiltere) sertlik derecesine sahip conta kullanılmasına karar verilmiştir. Deneyler sonucunda bu contanın tarama yaparken piezo tarayıcıya ilaveten yük uygulamadığı gözlemlenmiştir.



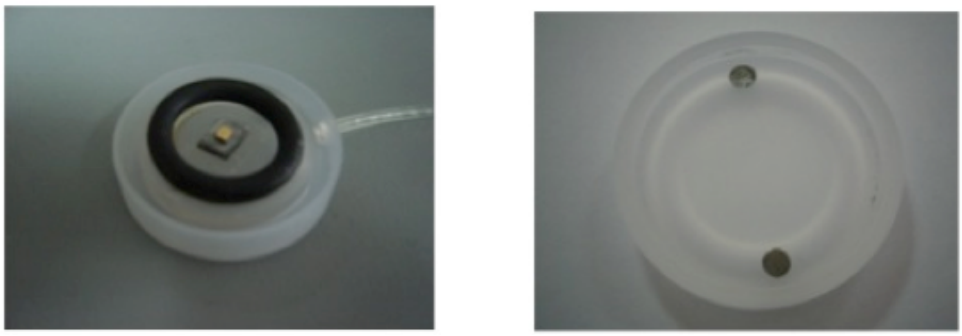
Şekil 3.12. Deney aşamalarında kullanılan contalar.

S-membran değişikliği örnek tutucu kısmınında tasarımsal değişikliğini gerektirmiştir. Önceki tasarımda S-membran iki çelik levha ile sıkıştırılıp piezonun üzerine oturtulmakta idi. Diğer taraftan conta kullanımı, oyuklu bir örnek tutucu tasarımının düşünülmesini gündeme getirmiştir. Bunun üzerine değişik malzemelerden örnek tutucu tasarıları yapılmış ve uygunlukları denenmiştir. Şekil

3.13'de çeşitli malzemelerden yapılmış örnek tutucular gösterilmektedir. Şekil 3.13 (a)'da S-membran birinci prototip örnek tutucu, Şekil 13 (b)'de örnek tutucunun üzerine geçirilen mıknatıssız (üstteki) ve mıknatıslı (alttaki) dayanıklı olması için 'teflon' malzemeden yapılmış 2. ara prototip örnek tutucu, Şekil 3.13 (c)'de sıvının dışarı taşmasını engellemek için dış duvarları yükseltilmiş daha işlenebilir 'G10' malzemeden yapılmış 3. ara prototip örnek tutucu, Şekil 3.13 (d)'de kimyasallara karşı dayanıklı ve işlenme kolaylığından dolayı Kel-F malzemeden yapılmış piezonun üzerine yapıştırılan 4. ara prototip, Şekil 3.13 (e)'de sıvının dışarı taşmasını engellemek için dış duvarları yükseltilmiş ve Kel-f'den yapılmış 5. Ara prototip gösterilmektedir. Sonuç olarak kenarlarında taşmalara karşı havuzu bulunan ve tarayıcı üzerine mıknatıslar ile tutturulabilen ve istenildiği taktirde tak-çıkar şeklinde kullanılabilecek bir sıvı hücre örnek tutucu tasarlanmasına karar verilmiştir. Şekil 3.14'de denemeler sonucunda tasarlanmış olan Kel-F malzemeden yapılmış ikinci prototip sıvı hücre örnek tutucu gösterilmektedir.



Şekil 3.13. Örnek tutucu ara prototipleri.



(a) (b)

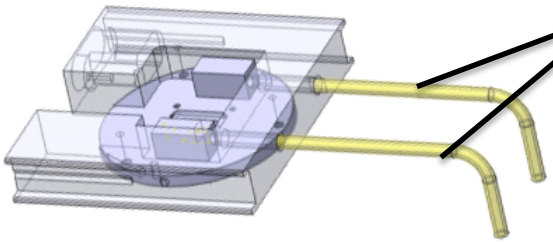
Şekil 3.14. (a) 2.prototip sıvı AKM sistemi için tasarlanmış örnek tutucu ve contanın görünümü, (b) örnek tutucunun alttan görünümü.

3.1.1.3. Hava Kabarcığı Oluşumunun Engellenmesi

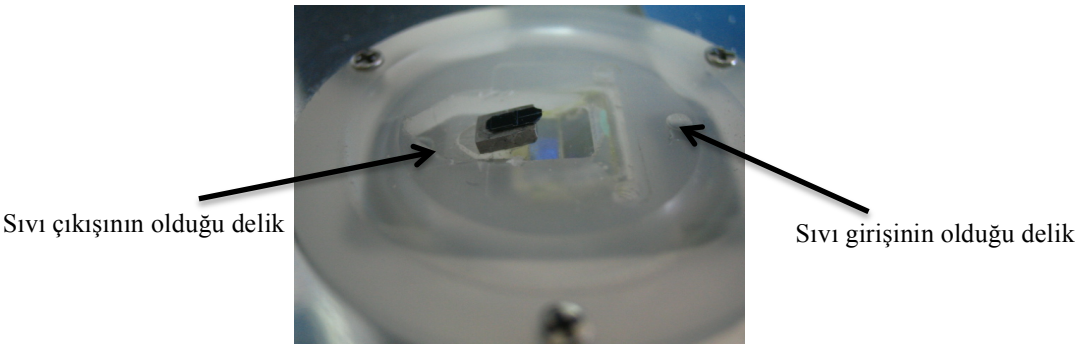
Sıvı hücre içerisinde düzgün ve kaliteli görüntü alabilmek için, hücre içerisinde oluşan hava kabarcıklarının minimize edilmesi gerekmektedir. Çalışmalarda hücre

içerisine gönderilen sıvının, hücre içerisini tam doldurarak çıkması halinde hava kabarcığı oluşmadığını gözlemlenmiştir. Bu akışı sağlayabilmek için hücre içerisine sıvı giriş ve çıkışlarının doğru yerlerden ve doğru miktarlarda yapılması gerekmektedir. Bunun üzerine tasarımda esnek Tygon™ PVC mikro hortumlar kullanılmıştır.

Ayrıca kullanılan bu mikro hortumlar gerekli olan çalışmalarda peristaltik pompalarada uyum sağlayabilecek şekilde adaptörler ile uçları fonksiyonelleştirilmiştir. Hücre içerisinde hapsolan havanın sıvıdan önce dışarı çıkışının sağlanması için ana gövde üzerinde giriş ve çıkış deliklerine seviye farkı verilmiştir. Sıvı akışını sağlayan hortumlar tarama esnasında tarayıcıya yük uygulamaması açısından kantilever tutucu üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.15).



(a)



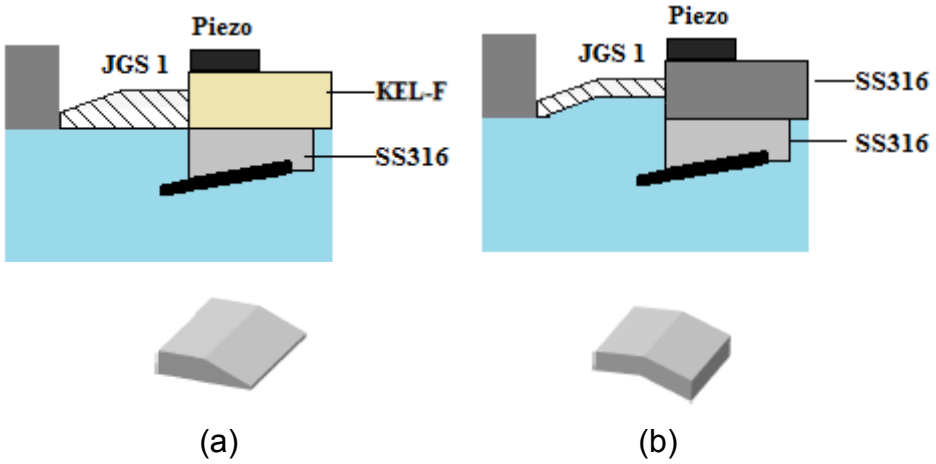
(b)

(c)

Şekil 3.15. (a) Hortum çıkışlarının gösterildiği sıvı hücre sensör tutucu, (b) hücre içerisine sıvı giriş ve çıkışlarının sağlandığı delikler, (c) peristaltik pompa uyumu için mikro hortumların uçlarına tutturulan adaptörler.

3.1.1.4. Yansıyan Işığın Fotoduyar Yüzeye Dik Açı ile Düşmesi

Hava ve sıvı olmak üzere iki fazı birbirinden ayırmak için tasarımda JGS1 kaynaşık silika (ingilizce: fused silica) cam (Foctec Photonics, Inc., Fuji, Çin) kullanılmıştır. JGS1 yüksek saflıkta sentetik amorf silikon dioksittir. Camın iki tarafıda 635 nm dalgaboyunun yansımasına karşı yansıma oranı %0.2'den küçük kaplama ile kaplanmıştır. Ayrıca sıvı yüzeyi camın üzerinde kontaminasyon oluşup lazer hüzmesine engel olmaması için antibakteriyel bir kaplama ile kaplanmıştır. İlk denenen camın yüksekliği 1.00-1.5 mm, yansıdıktan sonra lazerin camı terkettiği açı 20-25 derece, sıvı ile temas ettiği yüzey düzdür. Bu cam ile lazerin fotodedektör yüzeyin üzerine düşmediği gözlemlenmiştir. Lazerin fotodedektör yüzeyine dik açı ile düşürmek için iki farklı camın 150-160 derece açı ile birbirlerine yapıştırılmalarıyla oluşan açılı cam yaptırılmıştır. Camların sensör tutucu gövde üzerindeki konumları ve profil çizimleri Şekil 3.16'da verilmiştir.

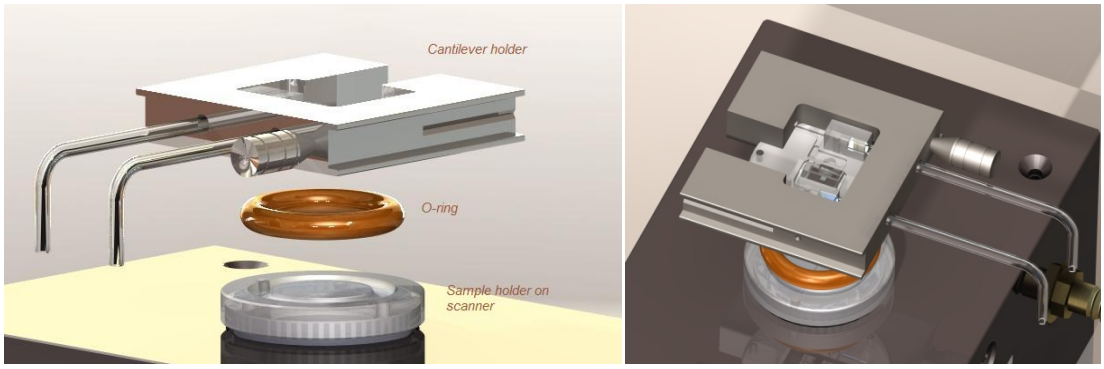


Şekil 3.16. Hava sıvı ortamını birbirinden ayırmak için kullanılan camlar: (a) alt yüzeyi düz, üst yüzeyi açılı olan cam, (b) iki tarafıda açılı olan cam.

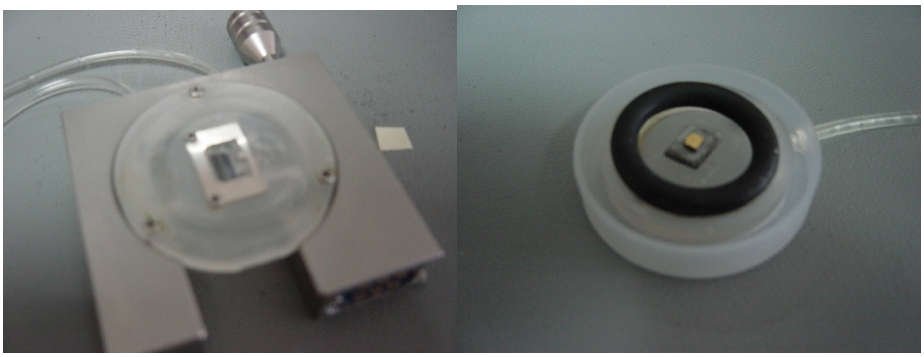
Tasarlanan bu ara prototip ile sıvı, sıvı hücre içerisinde dışarı taşmayacak şekilde saklanabilmiştir. Hücreye sıvı giriş ve çıkışlarını doğru bölgelerden yaparak hücre içerisinde sıvı dinamiği sabitlenmiş ve merkez frekans eğrilerileri düzeltilmiştir. Merkez frekans eğrisi düzgün bir 'Gaussian' eğri çıkmadığı takdirde görüntünün çözünürlük kalitesi düşmektedir. Sıvı içerisinde sıvının dinamiğini minimize etmek için hava kabarcıklarından mümkün olduğu kadar kaçınmak gerekmektedir. Tasarlanan bu ara prototip ile hava kabarcıklarından ve kullanılan malzemelerden kaynaklı olarak ortaya çıkan gürültü eğrileri yok edilmiştir.

Yapılan tüm çalışmalar sonucunda geliştirilen sıvı hücre ve bu prototip ile sıvı içerisinde alınan 10 µm x 10 µm kırmızı kan hücreleri AKM görüntüleri Şekil

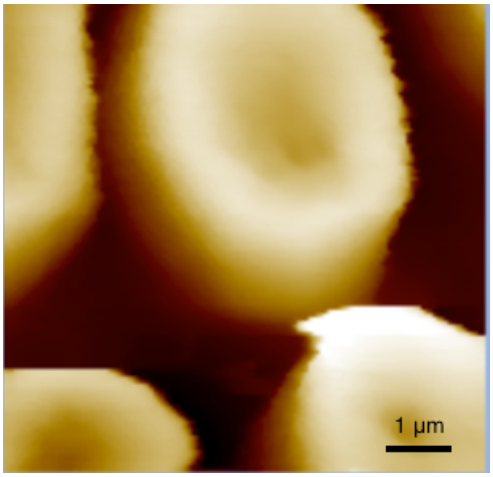
3.17'de gösterilmektedir. Şekil 3.17 (a)'da geliştirilen sıvı hücrenin üç boyutlu mekanik çizimi gösterilmektedir. Şekil 3.17 (b)'de geliştirilmiş olan kantilver ve örnek tutucunun görüntüleri gösterilmektedir. Şekil 3.17 (c)'de bu sıvı hücre içerisinde fizyolojik salin içerisinde başarı kaydedilmiş 10 µm x 10 µm kırmızı kan hücreleri AKM görüntüleri gösterilmektedir. Yaklaşık olarak 6 µm çapında eritrositler kaydedilmiştir. Fakat yüksek çözünürlük kalitesi elde edilememiştir.



(a)



(b) (c)



(d)

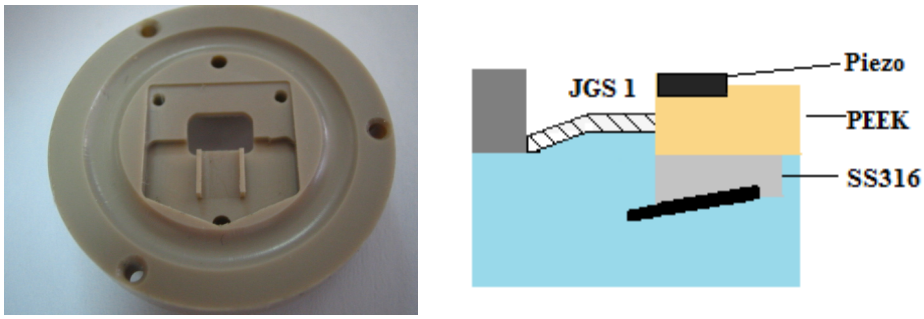
Şekil 3.17. (a) Sıvı hücre ikinci prototip tasarım çizimi, (b) sıvı hücre sensör tutucu prototipi, (c) sıvı hücre örnek tutucu prototipi, (d) fizyolojik salin içerisinde görüntülenen kırmızı kan hücreleri (Z skalası: 0 µm - 4 µm) [154].

3.1.2. Son Prototipin Geliştirilmesi

İkinci prototip ile sıvı içerisinde örnek tarama çalışmalarında başarı kaydettikten sonra, son prototipte yüksek çözünürlükte görüntü alabilmek için yapılması gereken çalışmalara odaklanılmıştır. Atomik çözünürlük kalitesini elde edebilmek için malzemelerin mekanik olarak stabil özellikler göstermesi gerekmektedir. Malzemelerin birbirleri ile mekanik, termal ve gürültü aktarımı bakımından uyumluluk göstermeleri, ve enerji aktarımlarını minimize etmek için mümkün olduğu kadar tek parça üretilmeleri gerekmektedir. Son prototip geliştirilirken tasarımlar bu konuların üzerinde çalışılarak yapılmıştır.

Son prototipte ilk olarak kantilever tutucu gövdenin malzemesi değiştirilmiştir. KEL-F bir çok özelliği bakımından diğer plastiklere göre üstün olmasına karşılık diğer ürünlere göre daha pahalı bir malzemedir. Dolayısıyla Asakawa ve arkadaşlarının [41] çalışmalarında da önerildiği gibi, fiyat/performans oranı KEL-F ile karşılaştırıldığında daha yüksek çıkan ve ayrıca fiziksel, termal ve elektriksel özellikleri KEL-F'e yakın olan PEEK (poli-eter-eter-keton) (Professional Plastics, Inc., Ca, ABD) kullanılmasına karar verilmiştir. PEEK'in akustik empedans değeri 3.3 x 10^6 kg/m^2s'dir ve SS316 ile arasında 10 kat fark vardır. Böylece KEL-F gibi bu malzemede çelik karşısında akustik bariyer özelliği gösterecektir.

Son prototip için tasarlanan ilk kantilever tutucu ve profil görüntüsü Şekil 3.18'de verilmiştir.



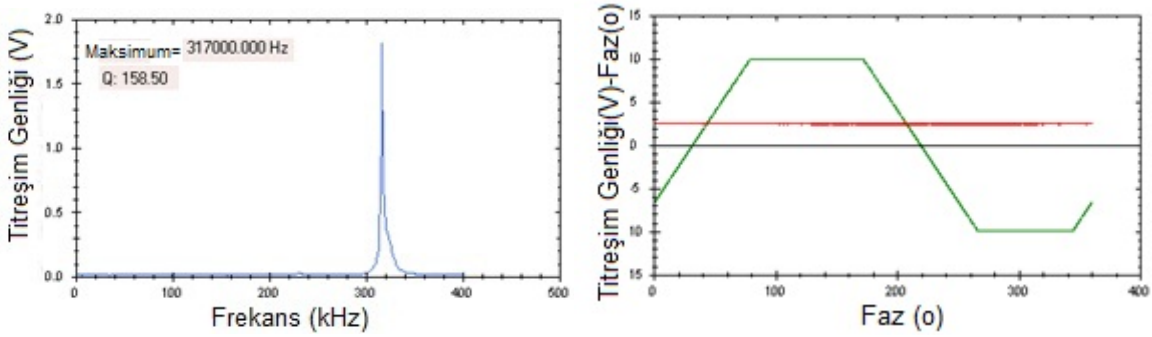
(a) (b)

Şekil 3.18. (a) PEEK sensör tutucu gövde, (b) profil çizimi.

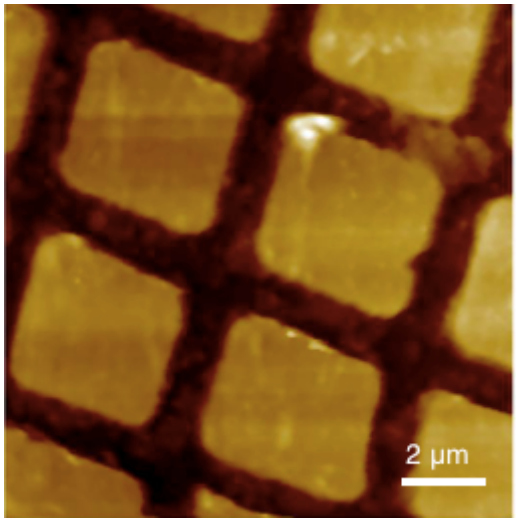
İlk denemelerde prototipin üzerine SS316 sensör tutucu 5 dakikalık Bizon™ epoksi ile yapıştırılmıştır ve sensör tutucu yayın etkisi olmadan Tap 300Al sensör, sensör tutucuya Patex™ yapıştırıcı ile yapıştırılarak havada (Şekil 3.19) ve sıvıda (Şekil 3.20) merkez frekans eğrileri ve 20 µm x 20 µm kalibrasyon örneği (UxUxY; 4x4x0.15 µm kareler) görüntüsü alınmıştır.Havada kaydedilen 317 kHz civarındaki

yayın merkez frekans eğrisi, sıvı içerisinde 187 kHz civarına düştüğü gözlemlenmiştir. Q değeri yaklaşık olarak 8 kat düşmüştür. Bir önceki prototip ile karşılaştırıldığında yayın titreştirmekten kaynaklı gürültünün minimize edilmesinden dolayı sıvı içerisinde kaydedilen görüntünün kalitesinde artma gözlemlenmiştir.

(a)

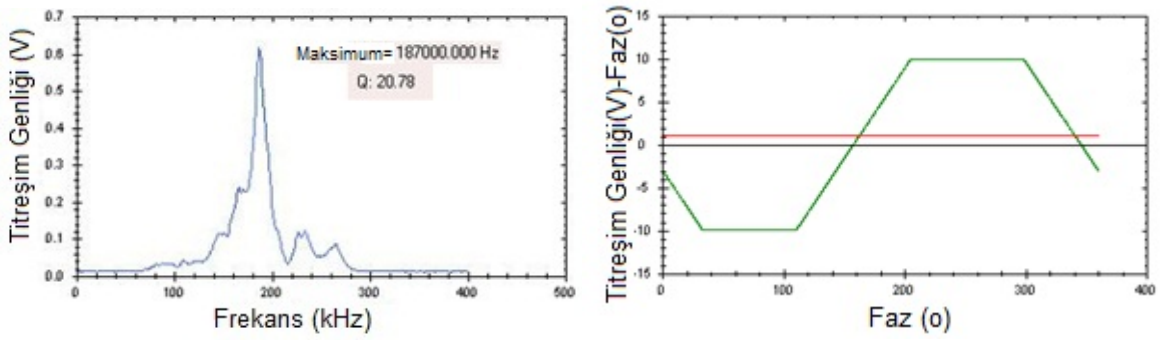


(b)

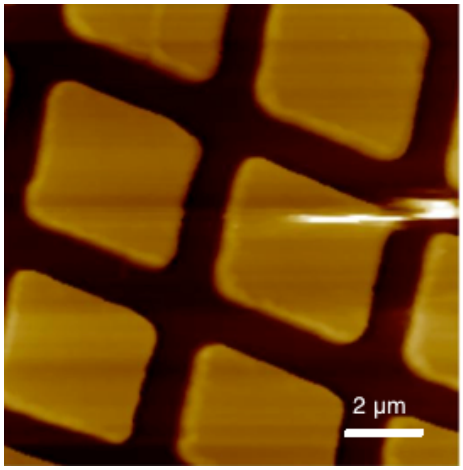


(c)

Şekil 3.19. (a) Sensör tutucu gövde, (b) bu prototip ile havada ölçülmüş merkez frekans ve faz grafikleri, (c) hücre içerisine sıvı gönderilmeden önce havada tıklamalı modda alınan kalibrasyon görüntüsü (Z skalası: 0 µm -1 µm).



(a)

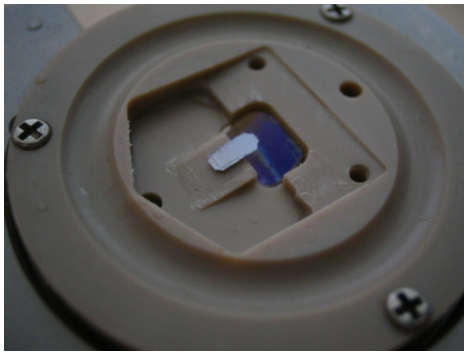


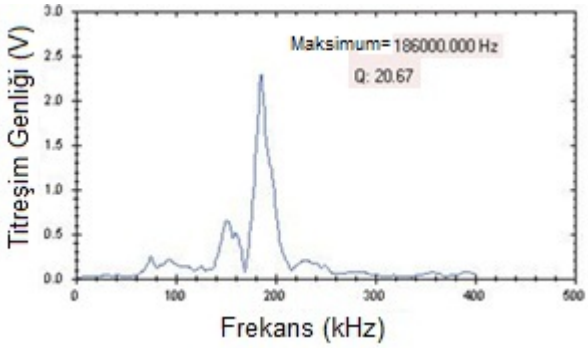
(b)

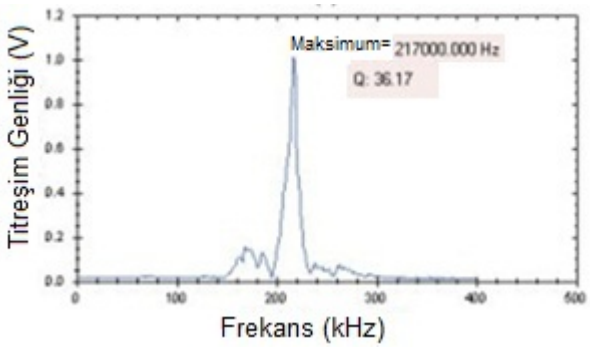
Şekil 3.20. (a) Son prototip ile sıvıda ölçülmüş merkez frekans ve faz grafikleri, (b) sıvıda tıklamalı modda alınan kalibrasyon örneği (Z skalası: 0 µm -1 µm).

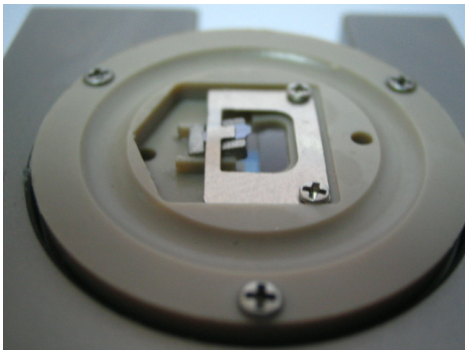
3.1.2.1. Kantileverin Sensör Tutucu Üzerine Tutturulması

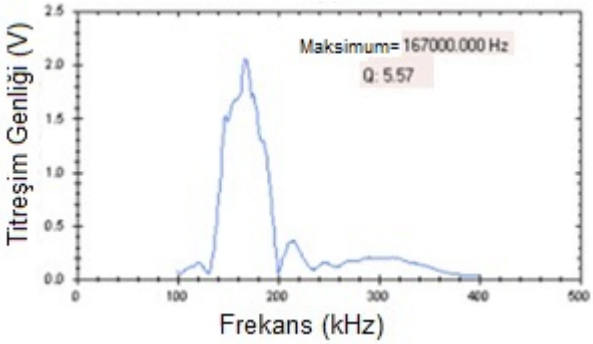
Önceki çalışmalarda gerçek olmayan merkez frekanslarını yoketmek için sıvı hücre malzemelerinin doğru seçimi ile ilgili deneyler yapılmış ve bunun üzerine tasarım değişiklikleri gerçekleştirilmiştir. Farklı malzemelerin akustik bariyer özelliklerinden faydalanarak yayın sıvı içerisindeki merkez frekans eğrilerinin düzgün bir ‘Gaussian’ eğri çıkması ve gerçek olmayan frekans eğrilerini minimize etmek üzere başarılı deneyler kaydedilmiştir. Fakat deneyler esnasında elde edilen eğrilerin tekrarlanabilir olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmalar neticesinde bunun nedeninin sensör üzerine basan yayın, tam olarak basmadığı ve çelikten oluşması nedeni ile sıvı içerisinde verilen titreşimden etkilenerek yine gerçek olmayan eğrilere neden olduğu gözlemlenmiştir. Bunun üzerine çeşitli malzemelerden yapılan yaylar ile deneyler yapılmıştır. Şekil 3.21’de bu yaylar ile hazırlanan prototipler ve sıvı içerisinde Tap300Al ile ölçülmüş merkez frekans eğrileri gösterilmektedir.

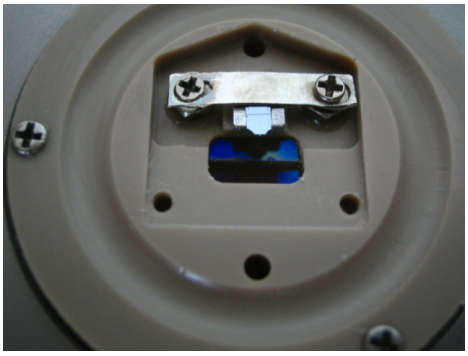


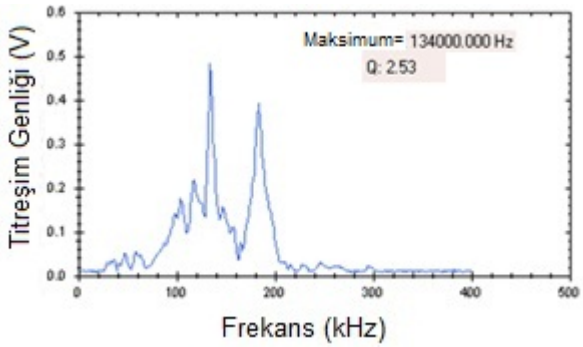

Maksimum= 186000.000 Hz
Q: 20.67
Titreşim Genliği (V)
Frekans (kHz)

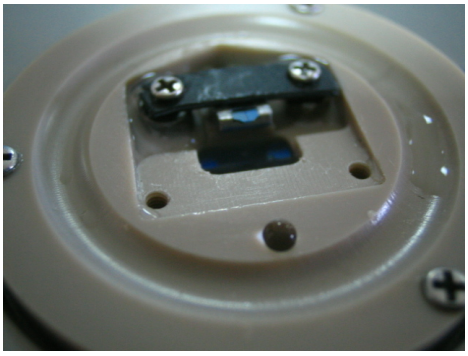

Maksimum= 217000.000 Hz
Q: 36.17
Titreşim Genliği (V)
Frekans (kHz)

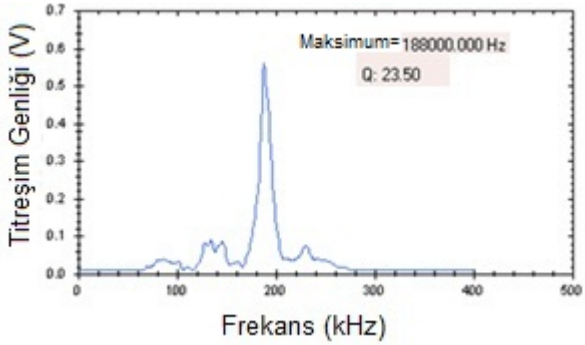


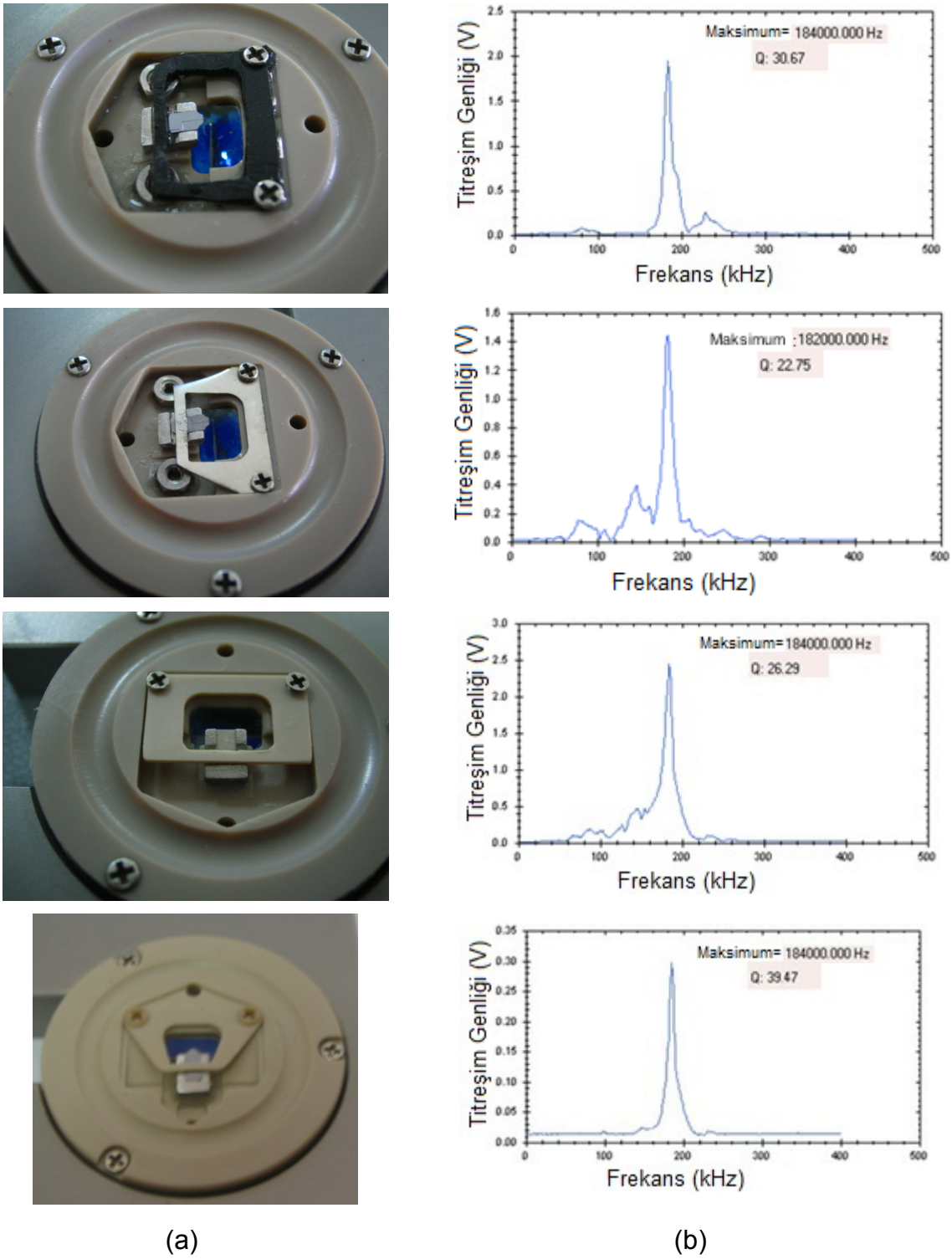

Maksimum= 167000.000 Hz
Q: 5.57
Titreşim Genliği (V)
Frekans (kHz)




Maksimum= 134000.000 Hz
Q: 2.53
Titreşim Genliği (V)
Frekans (kHz)




Maksimum= 188000.000 Hz
Q: 23.50
Titreşim Genliği (V)
Frekans (kHz)

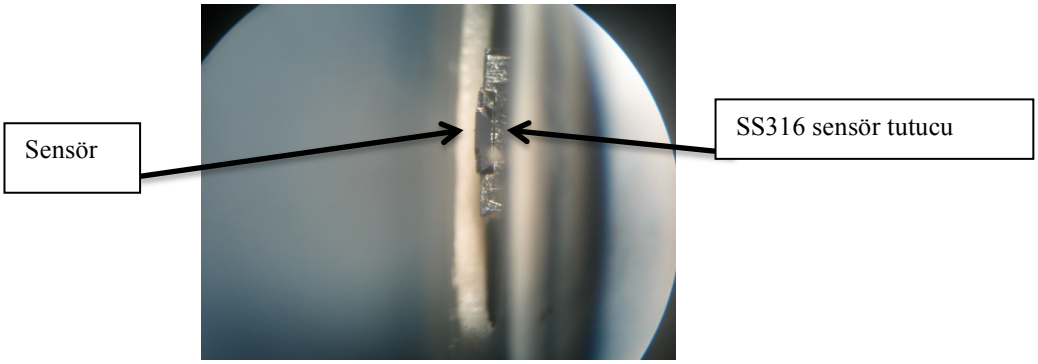


(a) (b)

Şekil 3.21. (a) Farklı yaylar kullanılan sensör tutucuların ara prototipleri, (b) sıvı içerisinde merkez frekans eğrisi görüntüleri.

Çeşitli yayların denemeleri sonucunda ‘V’ şeklinde PEEK yayın kantilever üzerine basması ile sıvı içerisinde elde edilen merkez frekans eğrilerinde ciddi bir düzelme olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.21). İlk gösterilen kantilever tutucu modeli ile kaydedilen merkez frekans eğrisinin Gaussian hareketi ile son gösterilen kantilever

tutucu modelininki ile karşılaştırıldığında gerçek olmayan eğrilerin ciddi oranda yokolduğu ve Q değerinde artış olduğu gözlemlenmekedir. Optik mikroskop altında kantilever tutucuya önden bakıldığında sensöründe alt kısmının tam olarak oyuğa oturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.22). Sensör tabanının alt kısmının oyuğa tam oturması, oyuk ile arasında hava kabarcığı hapsolmaması ve yine istenmeyen frekans eğrilerinin oluşmaması açısından önemlidir.



Şekil 3.22. Sensör ve oyuğun optik mikroskop görüntüsü.

3.1.2.2. Örnek Tutucu ve Tarayıcı Tasarımı

Atomik kuvvet mikroskoplarının yatay ve dikey çözünürlüklerini belirleyen en önemli faktörlerden birisi de tarayıcıdır. İstenilen çözünürlüğü elde edebilmek için uygun tarayıcıyı kullanmak gerekir. Piezo tüpler yatay olarak ‘nm’, dikey olarakta ‘pm’ seviyesinde hassasiyete sahip olmalarından dolayı AKM’lerde ideal tarayıcılar olarak kullanılmaktadırlar. Yalnız atomik çözünürlük elde edebilmek için kullanılan piezo tüpün yüksekliği önemlidir. Çünkü piezolara voltaj gönderildiğinde XY yönünde eğilme ve bükülme hareketlerini göstermelerinin yanısıra, Z yönünde titreşim özelliğide göstermektedirler. Dolayısıyla çözünürlük kalitesini yükseltmek açısından kısa piezo tüp kullanılıp bu titreşim sinyallerinin görüntüden kaynaklı sinyaller tarafından baskılanması gerekmektedir.

Bu konuda yapılan çalışmalar, atomik çözünürlük elde edebilmek için geliştirilen tasarımı içermektedir. İki adet piezo tüpten tarayıcı oluşturulmuştur. Birincisi şu ana kadar yapmış olduğumuz çalışmalarda kullandığımız 2 inç uzunluğundaki piezo tüplü tarayıcı, ikincisi ise yüksek çözünürlük elde etmek için kullandığımız 1 inç uzunluğundaki piezo tüplü tarayıcıdır (Şekil 3.23). Atomik çözünürlük elde etmek için, 25.4 mm uzunluğunda, 10 mm dış çapında, 1 mm duvar kalınlığında tüp piezo kullanılmıştır (EBL products, Inc., CT, ABD) . Teorik hesaplamalara göre tarayıcının +/- 200V potansiyel fark ile 1 inç olan tarayıcı tüpün 2511.285 nm; 2 inç

olan tarayıcı tüpün ise 18596.54603 nm alan tarayabilmesi beklenmektedir. Tüp piezo toplam yer değiştirmesi Eşitlik 3.2 ile hesaplanır.

$$\Delta x \approx \frac{2\sqrt{2} \bullet d31 \bullet L^2 \bullet U}{\pi \bullet ID \bullet d} \qquad [3.2]$$

Δx : simetrik elektrotlar için X ve Y yönünde tarama aralığı [m], $d31$: uzama katsayısı (polarizasyon yönüne doğru yerdeğiştirme) [m/V], U : işlemsel voltaj [V],

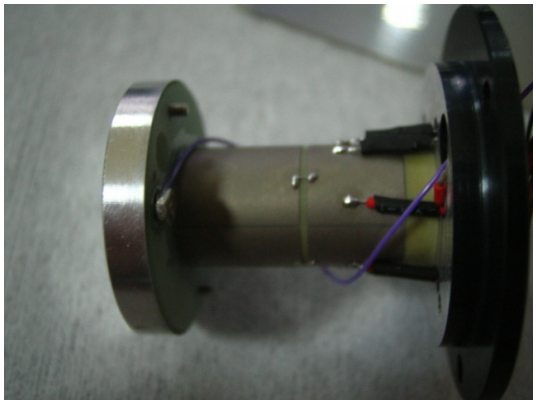
L : uzunluk [m], ID : iç çap [m], d : duvar kalınlığı [m].

Tarayıcıların Z yönünde kalibrasyonları fiber interferometre ile yapılmıştır. 1 inçlik tarayıcı için maximum Z aralığı 2184 nm, 2 inçlik tarayıcı için 4360 nm hesaplanmıştır.

Çalışmalarda tarayıcıyı sürmek için 18 bit DAC kullanılmıştır. Bu durumda DAC ara adımı 2^n olarak hesaplandığında 18 bit DAC'dan 262144 ara adım sinyali kaydedilir. Interferometre ile ölçülen Z aralık değerlerine göre yapılan hesaplamalar sonucunda tarayıcıların yatay ve dikey çözünürlükleri Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Z tarayıcıların yatay ve dikey çözünürlükleri

	1 inç	**2 inç**
Dikey Çözünürlük (Å):	0.083	0.166
Yatay Çözünürlük (Å):	0.192	1.419



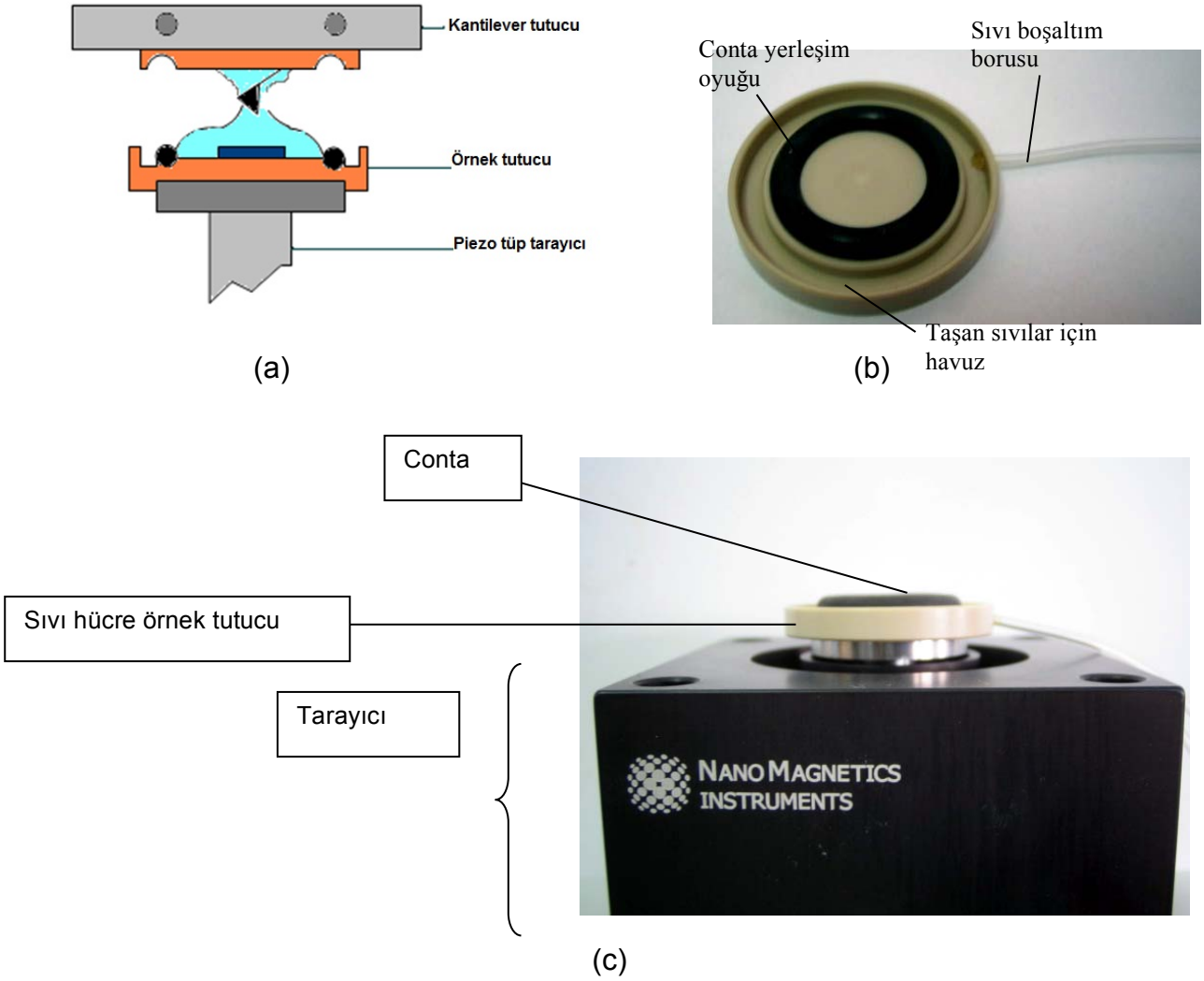
(a)

(b)

Şekil 3.23. 1 ve 2 inç uzunluğundaki tarayıcıların görüntüleri.

Tarayıcılardaki parçalar biribirlerine düşük sıcaklık epoksi yapıştırıcı (Oxford Instruments, OX, BK) ile yapıştırılmışlardır. Mekanik olarak sistemin stabil olması

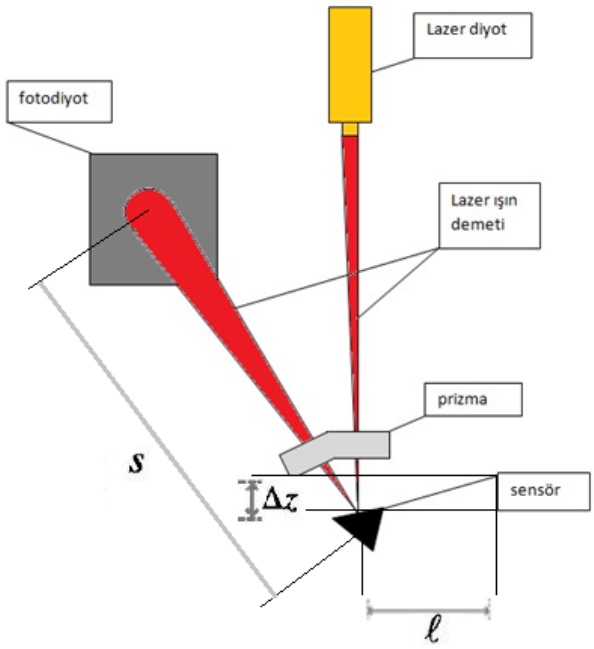
Z yönündeki piezo titreşim gürültülerini engellemeleri açısından önemlidir. Bundan sonra tasarlanan sıvı hücre örnek tutucular bu tarayıcılara sağlam bir şekilde tutturulacak şekilde tasarlanmışlardır. Tasarım malzemesi olarak kimyasal ve mekanik dayanıklığı ve ucuz olması nedeni ile yine PEEK kullanılmasına karar verilmiştir. Tak çıkar olması ve örneği bağımsız hazırlayabilmek için alt kısmından 4 mıknatıs ile havada da çalışan bir tarayıcının üzerine kolayca tutturulabilecek şekilde tasarlanmıştır. 1. ve 2. prototipler ile yapılan deneyler sonucunda hücre içi hacminin küçük olmasının kullanım kolaylığı yarattığı gözlemlenmiştir. Bu yüzden kapalı iken hücre içinin tam olarak sıvı ile dolduğu iç hacmi 0.5-0.6 cm^3 aralığında olacak şekilde boyutlara sahip conta kullanılarak sıvı hücre tasarlanmıştır (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. (a) Kantilever tutucu, örnek tutucu ve piezo tarayıcının şematik gösterimi, (b) sıvı hücre örnek tutucu birimleri, (c) 1 inçlik tarayıcı üzerine mıknatıslar ile tutturulmuş sıvı hücre örnek tutucunun görünümü.

3.1.2.3. Gürültü Kaynaklarının Baskılanması

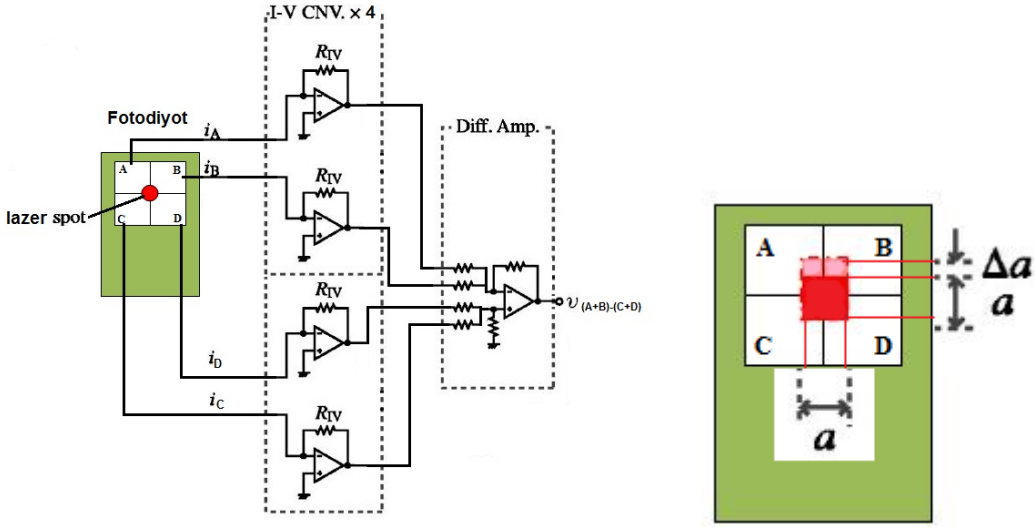
Mekanik tasarımın modifiye edilerek iyileştirilmesinin yanısıra, çözünürlük kalitesini arttırmak için Optik Işın Saçılması (OIS) yönteminin kullanıldığı düzeneklerde kullanılan lazer kaynağı ve fotodedektörün doğru seçilmesi ve yerleştirildikleri yerlerin mesafelerinin doğru belirlenmesi gerekmektedir. Optik yolağı lazer diyot, fotodiyot dedektör ve hava-sıvı ortamını birbirinden ayırması için kullanılan prizma oluşturmaktadır (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. Optik ışın saçılması metodu kullanılan cihazlar için tipik deneysel düzenek.

OIS yöntemi kullanılan AKM'lerde, fotodiyot dedektör ve lazer gibi optik bileşenler sistemde gürültüye neden olmaktadır. Bunlardan dikkate alınması ve minimize edilmesi gerekenler fotodiyot kaynaklı saçma gürültüsü, fotodiyot anfisinin içindeki dirençten kaynaklanan Johnson gürültüsü, ve lazer diyotun iç gürültüleri, mode hop gürültüsü ve kuantum gürültüsüdür.

Kullanılacak olan uygun birimleri bulabilmek ve doğru yerleşimlerini gerçekleştirebilmek için Fukuma metodu kullanılarak aşağıdaki deneyler ve hesaplamalar yapılmıştır [43,54].



(a) (b)

Şekil 3.26. (a) IV converter ve diferansiyel anfinin şematik çizimi, (b) kantileverin yansımasına göre fotodiyot dedektör üzerinde lazer spotun yer değiştirmesi.

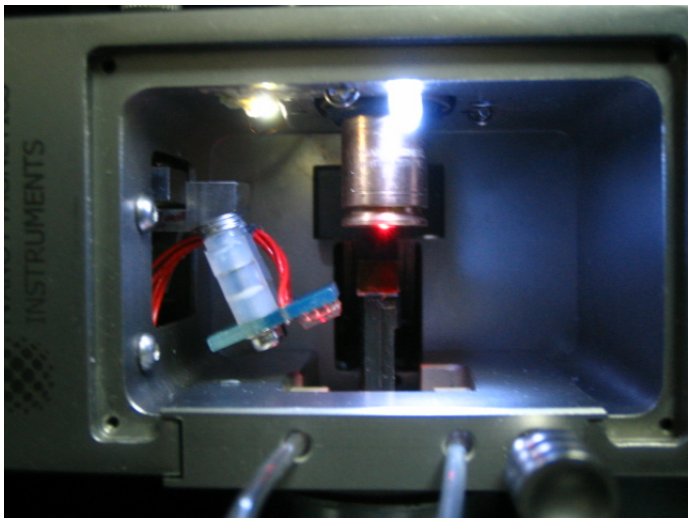
Optik ışın saçılması metodunda lazer ışını sensörün ucunun arka kısmına odaklanır ve yansıyan ışın pozisyon duyarlı fotodiyot dedektör tarafından tayin edilir. Böylece kantileverin yerdeğiştirmesi (Δz) (Şekil 3.26), kantileverin sapmasını indükler. ℓ kantileverin uzunluğu olarak alındığında, kantileverdeki sapma, $\Delta\theta$, Eşitlik 3.3 ile bulunur.

$$\Delta\theta = \frac{3\Delta z}{2\ell} \qquad [3.3]$$

Lazer spotun fotodiyot dedektör üzerinde Δa (Şekil 3.25 (b)) kadar yer değiştirmesi Eşitlik 3.4 ile bulunur.

$$\Delta a = 3\frac{s}{\ell}\Delta z \qquad [3.4]$$

‘s’ kantilever ile fotodiyot dedektör arasındaki mesafeyi göstermektedir. Bu mesafeyi ölçmek için 50 nm hassasiyetindeki servo motora fotodiyot dedektör düzeneği yerleştirilmiş, fotodiyodun tam karşısına üzerine lazer ışını 90 derece açı ile düşecek şekilde lazer diyot yerleştirilmiştir. Motor ile fotodiyot dedektör yaklaştırılarak, programdan okunan lazer şiddetinin maksimum ölçüldüğü uzaklık 18 mm bulunmuştur (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Fotoduyar yüzey ve kantilever arasındaki uzaklığı bulmak için kullanılan deneysel düzenek.

'β' amplifiye faktörü, *β= Δa/Δz* olarak bulunur. Bu değer tipik olarak 1000'dir. Yüksek amplifiye faktörü, yüksek sapma hassasiyetinin göstergesidir. Fotodiyodun foto indüklenen akımları dört bölgeden akım-voltaj dönüştürücü ile tayin edilmiştir (Şekil 3.26 (a)). Bu sinyaller akım farkı ($i_{(a+b)-(c+d)}$) ile orantılı voltaj sinyali ($V_{(A+B)-(C+D)}$) üreten diferansiyel amfi içerisine gönderilir. Lazer spotun yerdeğişimi akım değişimine neden olur. Fotodiyotun foto indüklenen akımı preamfi ile voltaj sinyaline dönüştürülür.

Frekansa bağlı kazanç indirgeme faktörü, ξ_{pd}, ile kantilever sapma sinyalindeki değişim Eşitlik 3.5 ile tanımlanmaktadır.

$$\Delta V_{(A+B)-(C+D)} = \eta \alpha P \xi_{pd} Riv \frac{3s}{\ell a} \Delta z \qquad [3.5]$$

Riv = fotodiyot preanfinin direnç gerikazanımı,

η = fotodiyotun spektral tepkisi,

α = optik yolaktaki lazer gücü atenüasyon katsayısı,

P = lazer diyodun çıkış gücü,

s =kantilever ile fotodiyot dedektör arasındaki mesafe,

Δz = kantileverin yerdeğiştirmesi, ℓ = kantilever ile lazer arasındaki mesafe,

a = fotodiyot kenar uzunluğu.

Sapma gürültüsü (*ing: Shot noise*), δv_s, eşitlik 3.6 ile tanımlanmaktadır.

$$\delta v_s = \xi_{pd} Riv \sqrt{2e\eta\alpha P B_{BPF}} \qquad [3.6]$$

B_{BPF} = bant geçiş filtresinin bant genişliği, e = elementer yük.

Sapma gürültüsünden kaynaklanan kantilever sapma gürültü yoğunluğu, n_{zs}, eşitlik 3.7 ile tanımlanmaktadır.

$$n_{zs} = \frac{\delta v_s / \sqrt{B_{BPF}}}{\Delta V_{(A+B)-(C+D)} / \Delta z} = \frac{\ell a}{3s}\sqrt{\frac{2e}{\eta\alpha P}} \qquad [3.7]$$

Artan güç (P) ile n_{zs}'nin düştüğü Eşitlik 3.7'den anlaşılmakadır. OIS'lerde n_{zs} predominant gürültü kaynağıdır.

Johnson gürültüsü: Rıv kaynaklı gürültü, δvj, eşitlik 3.8 ile tanımlanmaktadır.

$$\delta vj = \sqrt{4k_B T N_{PD} Riv B_{BPF}} \qquad [3.8]$$

N_{PD}= fotodiyot sayısı, k_B= Boltzman katsayısı, T= sıcaklık.

Johnson gürültüsünden kaynaklı kantilever sapma gürültü yoğunluğu, n_{zj}, eşitlik 3.9 ile tanımlanmaktadır.

$$n_{zj} = \frac{\delta v / \sqrt{B_{BPF}}}{\Delta V_{(A+B)-(C+D)} / \Delta z} = \frac{\ell a}{3s}\frac{1}{\eta\alpha P \xi_{PD}}\sqrt{\frac{4k_B T N_{PD}}{Riv}} \qquad [3.9]$$

Eşitlik 3.9'da artan P ve Riv ile n_{zj} 'nin düştüğü görülmektedir. Geliştirilen sistemde Riv 10 kOhm'dur ve Johnson gürültüsü 4.07×10^{-8} V/√Hz olarak hesaplanmıştır.

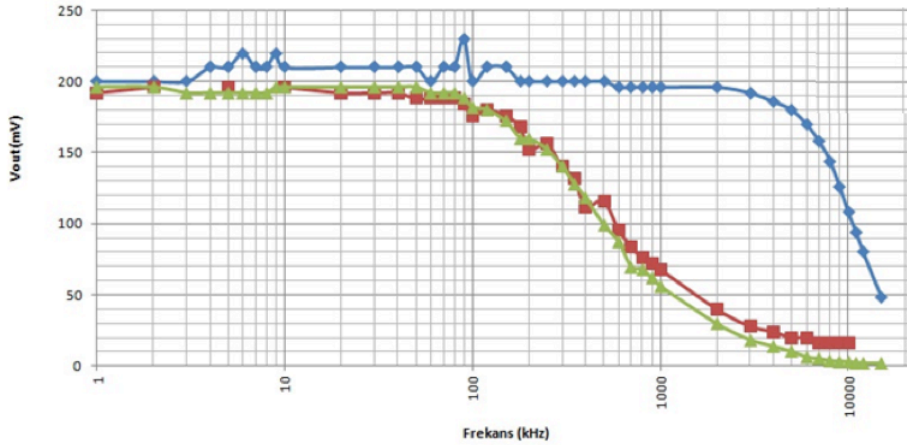
Sistemde kullanılan fotodiyot yeterli bant genişliğini algılayabilecek özelliğe sahip olmalıdır. Yoksa frekansa bağlı kazanç indirgeme faktörünün (ξ_{PD}) düşmesi Johnson gürültüsünü (n_{zj}) arttıracaktır. Ayrıca predominant gürültü kaynağı olan saçma gürültüsü (n_{zs}) azalan ξ_{PD} ile Johnson gürültüsünü aşabilir. $n_{zs} < n_{zj}$ olması için aşağıdaki eşitlik oluşmalıdır.

$$\xi_{PD} \rangle \sqrt{\frac{2k_B T N_{PD}}{e\eta\alpha P Riv}} \qquad [3.10]$$

Geliştirilen sitemde, $\xi_{PD} > 0.43$ dür. (N_{PD} = 4, η= 0.44, P= 2mW, α= 0.4, Rıv=10kΩ).

Genellikle fotodiyotun bant genişliği, fotodiyotun bağlantı direnci ve preamfide kullanılan geribesleme direncinden belirlenir. Tez çalışmasında yansıyan ışığın şiddetinin daha hassas ölçülebilmesi için 4 bölmeli, 2.0 mm x 2.0 mm silikon fotodiyot kullanılmıştır. 4 bölme arasındaki boşluklar 15 µm'dir. Kullanılan fotodiyotun 25°C'da spektral tepkisi 635 nm dalgaboyuna karşılık 0.439130 Å/W'dır.

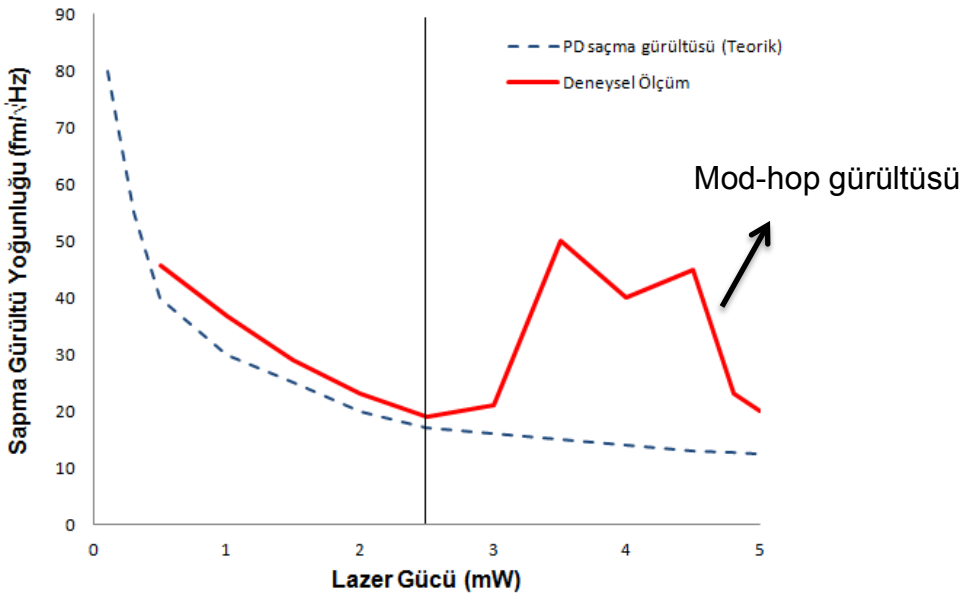
Fukuma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan yola çıkarak gürültü seviyesi düşük olan 3 çeşit amfi, fotodiyot amfisi olarak preamfi ve diferansiyel anfi olarak denenmiştir [43,54]. Geniş bant aralığında istikrarlı çalıştığı gözlemlenen fotodiyot ve lazer diyot amfisi tercih edilmiştir (Şekil 3.28). Fotodiyot amfi kaynaklı voltaj gürültüsü ve akım gürültüsü sırası ile 6.05x10^{-9} V/√Hz ve 5x10^{-10} V/√Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.28. Amfilere giriş voltajı 20mV gönderildiğinde fotodiyottan frekansa bağlı okunan lazer şiddetlerinin kullanılan anfilere göre değişim grafiği.

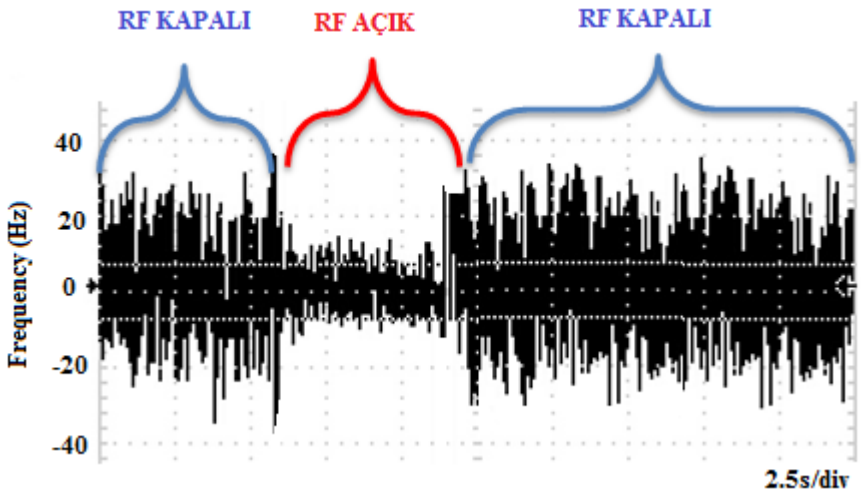
Lazer diyot olarak yapılan deneyler sonucunda gürültü seviyesi en az olan diyot modelinin kullanılması uygun görülmüştür. Bu lazerin optimum güç çıkışı 5 mW ve nominal dalga boyu 635 nm'dir. Sapma gürültü yoğunluğuna bağlı lazer gücü çıkışı Şekil 3.29'da gösterilmiştir. Şekilde kesik çizgiler nzs 'nin teorik olarak hesaplanmış değerleridir. Kırmızı düz çizgi deneysel sonuçları göstermektedir. Lazer gücü 300Mhz radyo frekansı ile modüle edilmiştir. Nanosensor'ün Al kaplamalı NCHR model Si kantilever kullanılmıştır. Lazerin çıkış gücü otomatik güç kontrol devresi ile sabit olarak sürülür. Lazer ışınının yansıması ve saçılması sonucu, ışınların bir kısmı optik rezonatör olarak geri döner. Bu durum mod hop gürültüsünü arttırır. Bu gürültüye optik geri besleme gürültüsü denir. Ayrıca bazı

ışınlar girişim desenleri oluşturarak farklı bir optik yol oluşturabilirler. Bu tarz beklenmeyen yollar ısıl ve mekanik değişimlerden etkilenirler ve stabil olmayan etkiler gösterirler. Dolayısıyla fotodiyotun üzerine yansıyan lazer spotta beklenmeyen sapmalar gözlemlenir ve bunlar optik girişim gürültüsü oluştururlar. [43,54]. Bu gürültüler sıvı ortamda baskınlaşır. Tez çalışmasında bu tarz gürültüleri elimine etmek için optik yolakta mekanik tasarım optimize edilmiştir.



Şekil 3.29. Lazer diyotun güç değişimine göre kantileverin sapma gürültü yoğunluğu.

Ayrıca bu gürültüleri baskılamak için lazer gücü 300-500 MHz'lik radyo frekansı sinyali ile modüle edilmiştir. Bunun nedeni çoklu osilasyon yaratarak tek osilasyona göre hassasiyeti azaltarak geri dönen sinyallerin arada kaybolup algılanma hassasiyetini düşürmektir. Otomatik güç kontrol devresi çıkış akımını kontrol etmek için radyo frekansı üreten voltaj-kontrollü osilatör kullanılmıştır. Radyo frekansının frekans ve büyüklüğü 300 Mhz ve +10 dBm civarında ayarlanmıştır. Şekil 3.30'da rf lazer güç modülasyonu açıkken ve kaplı iken frekans kayması sinyalinin dalga formu gösterilmektedir. Bu şekil rf modülasyonunun optik geridönüşüm ve optik girişim gürültülerinde etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.30. RF lazer güç modülasyonunun açıldıktan ve kapatıldıktan sonra sıvı içerisinde ölçülen frekans kayma sinyalinin dalgaformu.

Deneysel ve teorik olarak hesaplanmış değerler lazer gücü Şekil 3.29'da 2.5 mW'ı geçmesi durumunda farklılık göstermektedir. Bu sistemin gürültü performansının fotodiyot saçma gürültüsü ile limitlendiğini göstermektedir. Yaklaşık 3 mW'a kadar lazer gücü arttıkça sistemin gürültüsünün düştüğü gözlemlenmektedir.

Kantileverler termal enerji ile indüklenerek Brownian hareket özelliği gösterirler [43,54]. Kantilever Brownian titreşiminin frekans spektrumu Eşitlik 3.11 ile hesaplanır.

$$n_{zB} = \sqrt{\frac{2k_B T}{\pi f_0 k Q} \frac{1}{\left[1-(f/f_0)^2\right]^2 \left[f/(f_0 Q)\right]^2}} \qquad [3.11]$$

f = kantileverin titreşim frekansı,

f_0 = kantileverin rezonans frekansı,

k = yay sabiti.

Geliştirilmiş olan son prototip ile kantileverlerin havada ve sıvı içerisinde Brownian hareketleri spektrum analizör (R&S, FSU Spectrum Analyzer 20Hz-67Ghz, Rohde Schwarz, Almanya) cihazı ile ölçülmüştür.

3.1.2.4. Lenslerin ve Prizmanın Belirlenmesi

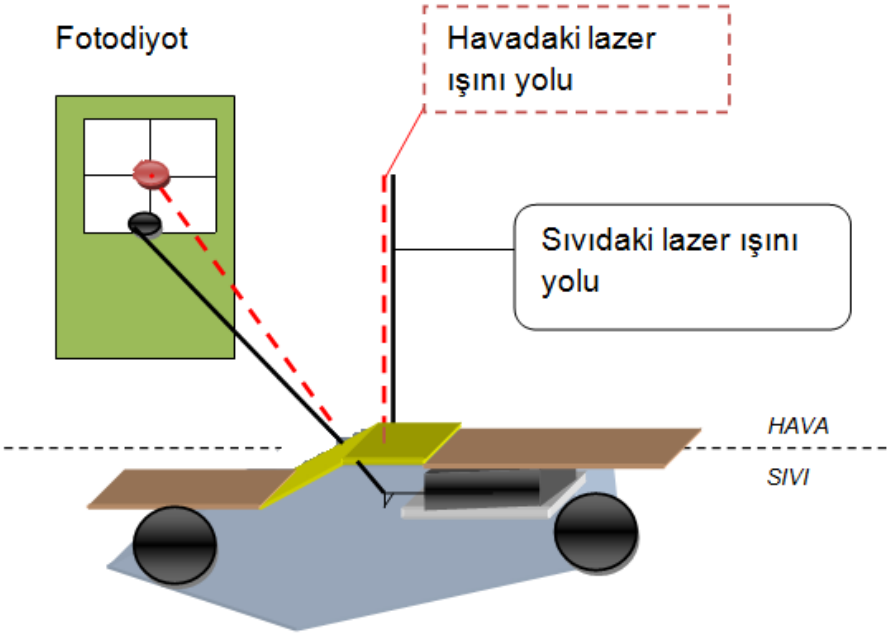
Sistemde lazer ışınını verimli bir şekilde optik geçişi sağlayarak kantilever üzerine odaklamak için bir toplayıcı lens, bir de odaklayıcı lens kullanılmıştır. Toplayıcı lensin numerik açıklığı lazer diyottan dağılan ışığın yüksek miktarda toplayabilmesi için mümkün olduğu kadar büyük olmalıdır [43,54]. Dolayısıyla seçilen lensin numerik açıklığı 0.65 ve buna bağlı olarak odak uzaklığı 2.75 mm'dir. Öte yandan

odaklayıcı lensin numerik açıklığı kantileverin arkasına lazer ışınını odaklarken dağılımın minimum olması açısından düşük olmalıdır. Odaklayıcı lens için numerik açıklığı 0.12 ve odak uzaklığı 18.30 mm olan bir lens kullanılmıştır. Düşük numerik açıklık kantilever üzerinde oluşan lazer spotun çapının küçük olmasına neden olacaktır.

Lazer spot çapının kantileverin genişliğinden büyük olması fotodiyot dedektör üzerine yansıyan ışında kayıplara neden olacaktır. Lenslerin ve kantileverin uzaklıklarına göre lazer spot çapı yaklaşık olarak 30 μm olarak hesaplamıştır. Bu genişlik genelde tüm kantileverler ile aynı genişliğe tekabül etmektedir. Yapılan deneylerde lazer diyottan çıkan ışının kantileverin arkasından fotodiyot dedektöre yansımadan önce %30'unun kaybedildiği gözlemlenmiştir. Fotodiyot dedektöre yansıyan ışığın ise kayıp miktarı kullanılan kantileverin arka tarafının kaplamasına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Genellikle metal kaplı olmayan kantileverlerler için bu kayıp oranı %75'lere kadar çıkabilir. Metal kaplı yansıtan yüzeylerde ise %20-30 oranında bir kayıp gözlemlenmektedir.

Optik yolda lazer kayıplarına neden olan bir diğer faktörde sıvı-hava ortamını birbirinden ayıran camdır. Bu camın içerisindeki gözenek miktarı ve üzerine düşen ışığı yansıtması kaynaklı kayıplarda gerçekleşebilir. Sıvı içerisinde altın kaplı bir kantilever ile alınan ölçümler sonucunda yaklaşık %30-40 verimlilik ile lazer ışınının fotodiyot dedektöre ulaştığı deneysel düzenekler ile ölçülmüştür.

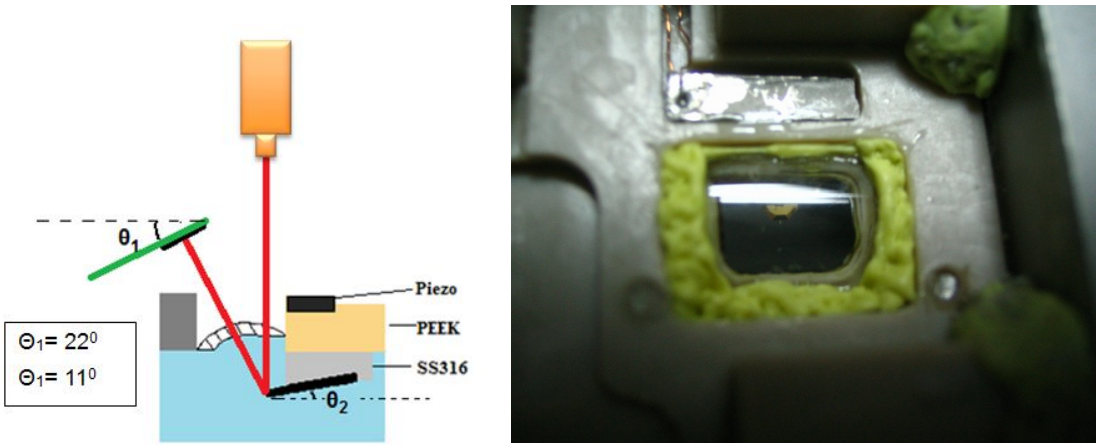
Yapılan optimizasyonların haricinde hava-sıvı otamını birbirinden ayıran camında özelliklerinin optimizasyonu ışın kaybını minimize etmek ve doğru açı ile gelen ışını yine fotodiyot dedektör üzerine dik açı ile düşürebilmek bakımından önem teşkil etmektedir. İkinci prototipte altı düz olan prizmadan açılı cama geçilmiştir. Fakat Şekil 3.31'de gösterildiği gibi açılı camında montaj aşamasındaki hatalardan dolayı gerçek açısının değiştiği ve lazer ışığının %20 oranında kayıba uğradığı tesbit edilmiştir. Montaj hatalarından kaynaklı bu kaybı minimuma indirmek için silindirik bir cam kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.31. Montaj hatalarından oluşan havada ve sıvıda lazer ışını yolu farkı farklı iki yol ile gösterilmiştir.

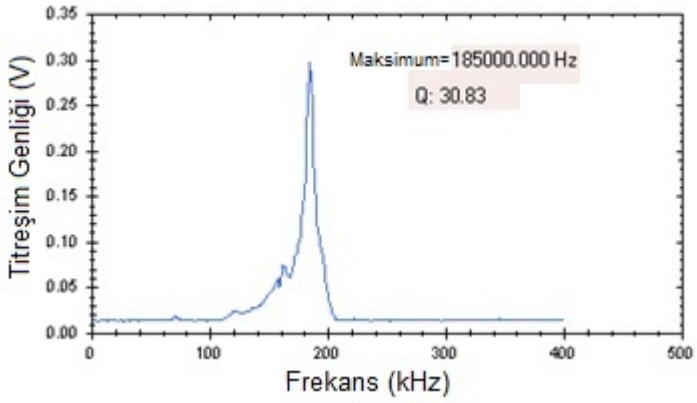
Snell yasasına göre yapılan açısal hesaplamalarda alt yüzeyi düz açısal ve iki tarafıda açısal olan iki camda da ışığın fotodiyot dedektör üzerine ortam farkından etkilenmeden dik açı ile düşmesi gerekmektedir [43,54]. Fakat deneysel olarak istenilen verimlilik elde edilememiştir. Bu sonuç üzerine altta hava kabarcığı yaratmayacak şekilde bütün bir yüzey olan ve montaj hatalarından etkilenmeyecek ve yapıştırılma şekline göre fotodiyot dedektöra düşen ışını çok sapmamasını sağlamak için Şekil 3.32'de profil çizimi gösterilen ve montajı gerçekleştirilmiş cam yaptırılmıştır. Kullanılan cam arkının iç çapı 5.62 mm, dış çapı 7.45 mm'dir.

Silindirik cam ile çalışmak açısal sorunu çözmüştür. Aynı zamanda açısal camda iki camın birbiri ile birleştiği bölgedeki hava kabarcığı hapsolma sorununuda ortadan kaldırmıştır. Şekil 3.33'de bu sistem ile alınmış rezonans frekansı eğrisi ve alınan görüntü gösterilmektedir. Sistemi kalibre etmek için su içerisinde 10 µm x 10 µm bluray disk görüntüsü alınmıştır. Bitler arası uzaklık 320 nm civarında ölçülmüştür. AKM görüntüleri tıklamalı modda Tap300Al (Budget Sensors) kullanılarak elde edilmiştir.

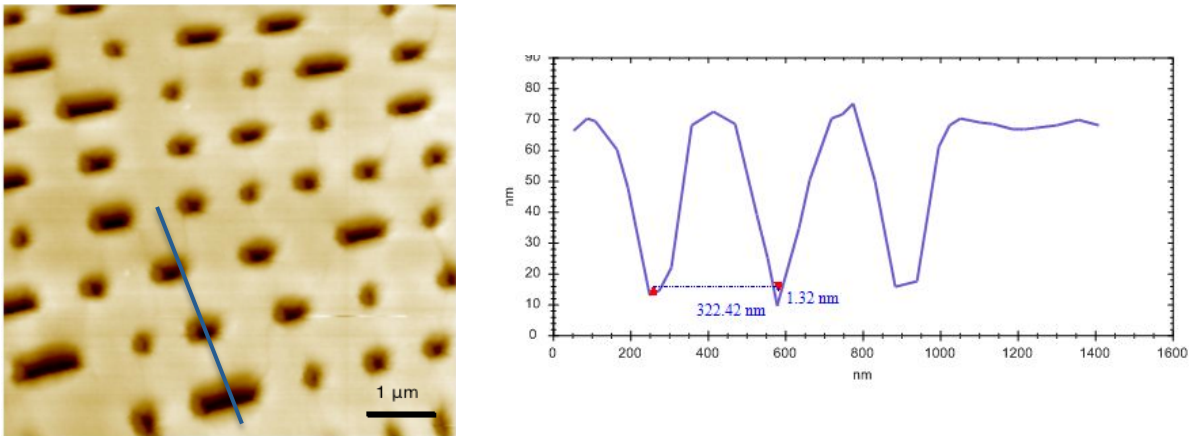


(a) (b)

Şekil 3.32. (a) Optik yolak birimlerinin yerleştirilme şekli ve açısal değerler, (b) sıvı hücre gövdesine yerleştirilmiş olan silindirik camın üstten görünümü.



(a)



(b)

Şekil 3.33. (a) Su içerisinde Tap300Al kantileverin rezonans frekansı eğrisi, (b) bit aralıkları 320 nm olan BluRay disk topografi görüntüsü. Z skalası : 0 nm - 300 nm.

3.2. Kuvvet Spektroskopisi Çalışmaları

Tez çalışmasının ikinci bölümü olarak, geliştirilen AKM ile kuvvet spektroskopisi çalışmalarına başlanılmıştır. Piezo malzemelerin yüksek hassasiyetinden ve kantileverler ile AKM'lerin örneğe temas edebilme özelliğinden faydalanılarak, tek molekül tayini yapılabilmekte ve yüzey karakteristik özellikleri haritalanabilmektedir. Bu çalışmalar içerisinde AKM ile hassas kuvvet spektroskopisi çalışmaları için yazılımsal düzeltme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Nanomanyetik Bilimsel cihazlar bünyesinde geliştirilen 'NMI-SPM' programında yapılan ölçümlerin validasyonu için çeşitli örnekler ile Kuvvet Spektroskopisi (KS) ve indentasyon deneyleri yapılmıştır. Literatür verileri karşılaştırma yapabilme açısından, sistem validasyonu için mika ve HOPG yüzeyleri kullanılmıştır. Temaslı, kontak mod kantileveri kullanılarak KS ve indentasyon eğrileri NMI-SPM programı ile kaydedilmiştir.

Pikonewton seviyesinde kuvvet hassasiyeti ve nanometre seviyesindeki dikey çözünürlük doğruluğundan dolayı AKM'ler diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında tek ligand ve reseptörlerin, hücre yüzeylerindeki ve izole edilmiş moleküller arasındaki etkileşim dinamiklerinin ve kuvvetlerin araştırılmasında güçlü bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Tez çalışmasının bu aşamasında, AKM kuvvet spektroskopisi kullanılarak streptavidin modifiye yüzeyler ile biotin-IgG molekülü arasındaki bağlanma kuvvetleri ölçülmüştür. Bu amaç doğrultusunda AKM uçlarına öncelikle amin grupları oluşturulmuş, daha sonra tiyol ve amin bağlarından faydalanılarak PEG çapraz bağlayıcılar tutturulmuş ve en son olarak biotin-IgG molekülü PEG bağlayıcılara kovalent olarak bağlanmıştır. Ayrıca aynı yöntem izlenerek lizozim molekülünün, lizozim baskılanmış polimer yüzeyler ile etkileşimine bakılmıştır.

3.2.1. AKM Sensör Ucu/Çipi Amin Modifikasyonu

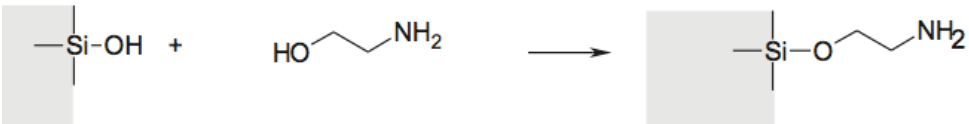
AKM iğne ucunda fonksiyonel amin grublarının oluşturulmasından önce uçlar yüksek saflıktaki kloform solüsyonu içerisinde 3-5 dakika bekletilerek yıkama prosedürü uygulanmıştır [155-156] ve sonrasında azot gazı ile kurutulmuştur. Daha sonra heterobifonksiyonel PEGlerin kovalent bağlanabilmesi için silikon uçlar/çipler üzerine amin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Deneyin bu aşamasında literatürde kullanılan iki aminleme yöntemi denenmiştir. Etanolamin ile sıvı olarak diğeri APTES (3-aminopropiltrietoksisilan) ile gaz

fazında aminleme yöntemidir. Bu iki yöntemin denenmesinin nedeni moleküler bağlanmanın en verimli olduğu yöntemi tayin etmektir.

3.2.1.1. Etanolamin ile Amin Bağlama

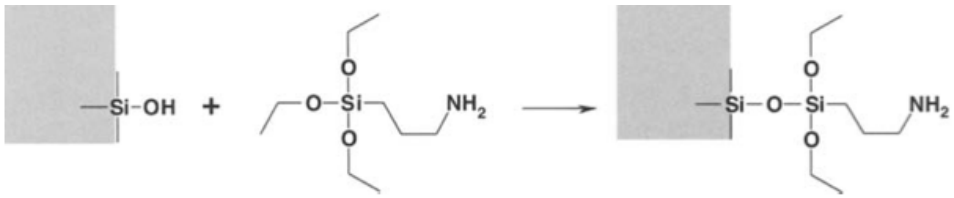
İlk fonksiyonlama adımında amin gruplarının uç yüzeyine kovalent bağlanması için silanol (Si-O-H) grupları arasında esterifikasyon protokolü takip edilmiştir [157]. 100 derecede, 3.3 g etanolamin-HCl (Alfa Aesar, ABD), 0.3 nm kalbur boncuklar (%10 v/v) içeren 6.6 mL dimetilsulfoksit içerisinde eritilmiştir. Silanol grupları ve etanolamin ile esterlenmesi için rekabete bağlı reaksiyon, silanol gruplarının hidrolizidir. Bu nedenle moleküler kalbur boncuklar etanolamin-DMSO çözeltisinden tüm suyu çıkarmak için kullanılmaktadır [158]. Solüsyon oda sıcaklığına ulaştığında, AKM uçları 15 saat bu solüsyonun içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında uçlar/çipler sırası ile üç kez dimetilsülfoksit (DMSO) (Alfa Aesar, ABD) , etanol ve distile su ile yıkanıp, azot gazı ile kurutulmuştur. Şekil 3.34'de silkon ucun etonalamin ile fonksiyonelleştirilerek amin grupların oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.34. AKM ucunun etanolamin ile amin bağlama (© 2007 Elsevier B.V. izni ile kullanılmıştır) [157].

3.2.1.2. APTES ile Amin Bağlama

AKM uçlarında/çiplerinde amin grupları oluşturmak için seçilen ikinci yöntemde ise APTES (3-aminopropiltrietoksisilan) (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Bu yöntem gaz fazında aminosilanlama olarak geçmektedir [157]. Önceden temizlenmiş uçlar/çipler vakumlu desikatör içerisine yerleştirilmiştir. Desikatörün içerisinde iki bölmeli teflon kap yerleştirilmiştir ve bir bölmesine trietilamin (TEA) (Sigma-Aldrich, ABD), diğer bölmesine APTES damlatılmıştır. Desikatörün içerisi argon gazı ile doldurulup, kapağı iyice kapatılmıştır. Uçlar/çipler üzerinde amin tabakası oluşması için bu şekilde iki saat bekletilmiştir. Daha sonra teflon kap çıkartılmış ve uçlar 2 gün desikatör içerisinde oluşan tabakanın stabilizasyonu için bekletilmiştir. Şekil 3.35'de APTES ile fonksiyonelleştirilerek amin grupların oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.35. AKM ucunun/çipinin APTES ile amin bağlama (© 2007 Elsevier B.V. izni ile kullanılmıştır) [157].

Literatürden edinilen bilgilere göre oluşturulan bu iki yöntem çalışmalar esnasında denenerek elde edilen sonuçlara göre bağlanma verimliliği yüksek olan yöntem tespit edilmiş ve bu yöntem ile çalışmalara devam edilmiştir.

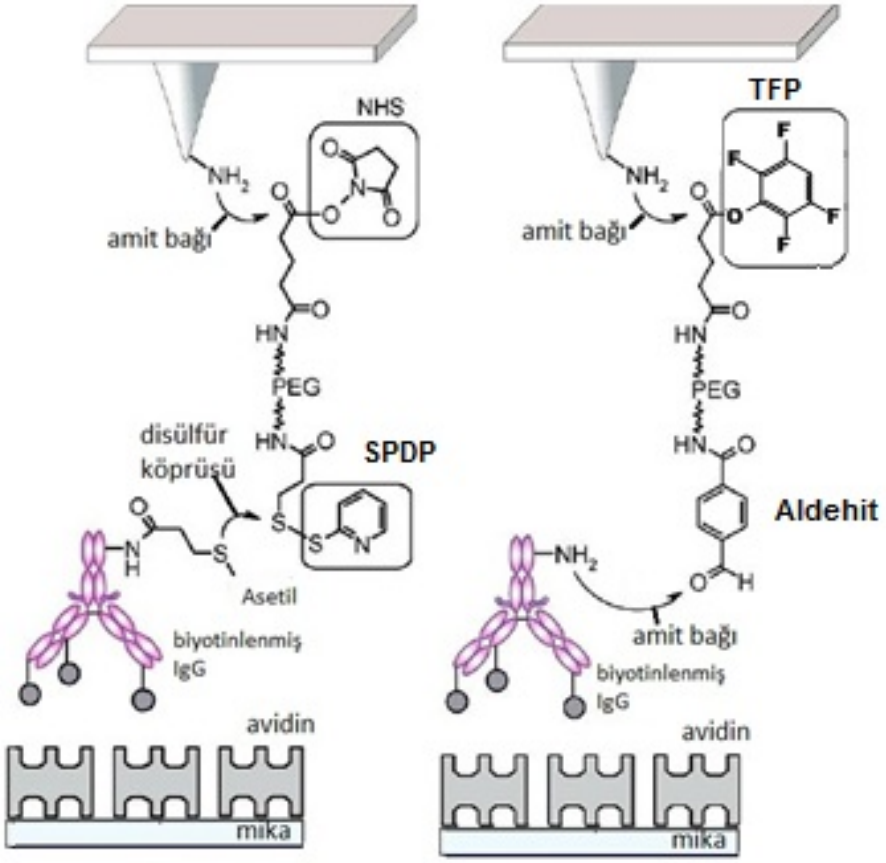
3.2.2. Aminlenmiş AKM Sensör Uçlarına/Çiplerine PEG Tutturulması

Bu aşamada amin modifiye silikon AKM sensör uçlarına/çiplerine heterobifonksiyonel PEG bağlayıcılar kovalent bağ ile tutturulmuştur. Heterobifonksiyonel PEG bağlayıcılar olarak SPDP-PEG-NHS ester ve 4-formil-benzamido-dPEG-TFP ester (Quanta Biodesign Ltd., ABD.) kullanılmıştır (Şekil 3.36). PEG bağlayıcılar ester gruplarından AKM ucundaki amin gruplarına esterifikasyon kimyası ile kararlı amit bağı yaparak bağlandırılmıştır. Esterlerin reaktif amino grupları ile stabil bağ yapmasından ve hidrolize uğramamalarından dolayı heterobifonksiyonel PEG'lerin bir ucu ester olarak tercih edilmiştir. Diğer kısımları ise kullanılan ligand grupları ile yine stabil olarak amit ve sülfür bağ yapmalarından ve literatürde en çok kullanılan gruplar olmalarından dolayı aldehit ve SPDP (*N*-suksinimidil-3-(2-piridilditiyo)- propanat) tercih edilmiştir.

Aminlenmiş AKM iğne uçlarına/çiplerine PEG esterlerin bağlanma prosedürü aşağıdaki gibidir:

- AKM iğne uçları/çipleri 1 mg/ml PEG ester ve %0.5 (v-v) trietilamin içeren kloroform çözeltisi içerisine 3 saat batırılır.
- Çözelti içerisinden çıkarılan uçlar/çipler kloroform ile yıkanır.
- Üzerindeki çözelti artıklarının buharlaşması için etüv içerisinde 1 saat bekletilir.
- Fosfat tampon ile yıkanır.

Bu basamaklar tamamlandıktan sonra AKM iğne uçlarına/çiplerine ligand bağlama basamağına geçilmiştir.



Şekil 3.36. AKM ucuna tutturulmuş Extravidin-IgG-biotin test sisteminin, mika üzerine tutturulmuş avidin ile şematik gösterimi (© 2006, American Chemical Society izni ile kullanılmıştır) [105].

3.2.3. Ligand Bağlanması

Çalışmanın bu bölümünde AKM ucuna/çipine kovalent tutturulmuş PEG bağlayıcılarının serbest gruplarına model sistem olarak belirlenen ligandlar kovalent olarak bağlanmıştır. Yapılarında farklı gruplar bulunduran biyomoleküllerin AKM ucuna/çipine kovalent bağlanması için, uygun kimyasal yöntemler ile ligandlar veya PEG bağlayıcılar üzerine fonksiyonel gruplar eklenerek uç/çip modifikasyonunun çeşitliliği arttırılmıştır.

Çalışmada PEG modifiye AKM uçlarına/çiplerine farklı biyomolekülleri kovalent bağlamak üzere iki farklı yöntem seçilmiştir. Şeçilen biyomoleküller ve bu biyomoleküllerin AKM ucuna/çipine kovalent bağlanması için uygulanacak kimyasal yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

3.2.3.1. AKM ucunun/çipinin NHS-PEG-SPDP bağlayıcı molekülü kullanılarak IgG antibadi ile modifiye edilmesi

Çalışmanın bu aşamasında seçilen IgG (Thermo Scientific-Pierce antibodies, ABD) molekülü, PEG türevinin PDP sonundaki sülfür gruplarından AKM ucuna

tiyol kimyası ile kovalent bağlandırılmıştır. IgG antibadideki serbest amin grupları N-suksinimidil-3-(S-asetiltiyol) propionat (SATP) (Thermo Scientific-Pierce antibodies, ABD) ile türevlendirilerek IgG üzerinde aktif tiyol grupları oluşturulmuştur. Bu gruplar oluşturulduktan sonra disülfür bağı oluşturma adımları ile ligand uca/çipe bağlandırılmıştır. IgG yapısında, SATP molekülü ile sülfür grupları oluşturma ve AKM uç/çip modifikasyonu prosedürü aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır.

- 45, 90, 360 µg/ml Goat IgG-biyotin protein stok solüsyonundan alınır.
- 1 mg (3.3 nmol) SATP, 1 ml DMSO içerisinde hazırlanır ve vortekslenerek yavaşça protein içeren solüsyona eklenir ve karışım oda sıcaklığında inkübe edilir.
- PEG'lerin bağlanması için tiyol gruplarını aktif duruma getirmek için 40 µL yukarıda hazırlanan protein solüsyonu, 380 µL sodyum fosfat tampon ve 80 µL 300 mM hidroksilamin.HCL ile karıştırılır.
- Uçlar/çipler bu karışım içerisinde 1 saat bekletilir ve daha sonra 1 saat fosfat tampon ile yıkama prosedürü gerçekleştirilir [105].

3.2.3.2. AKM ucunun/çipinin 4-formil-benzamido-dPEG-TFP bağlayıcı molekülü kullanılarak IgG antibadi ile modifiye edilmesi

Bir önceki yöntemde tiyol kimyası kullanılarak AKM ucuna/çipine bağlanan IgG antibadi, bu aşamada yapısında bulundurduğu serbest amino grupları ile AKM ucuna amit bağı yardımıyla kovalent bağlandırılmıştır. Çalışmanın bu aşamasının amacı, bir önceki yöntemde kullanılan NHS-PEG-SPDP molekülü ile bu yöntemde kullanılan PEG molekülünün AKM ucunun/çipinin IgG ile modifikasyonu veriminin karşılaştırılmasıdır. Bu yöntemde aldehit ile proteindeki amin gruplarının etkileşimden oluşan Schiff bazını indirgemek için sodyum borohidrit kullanılmıştır. Prosedür aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır.

- 40 µL protein solüsyonu parafilm üzerine tutturulmuş ucunda aldehit bulunan AKM iğneleri üzerine damlatılır.
- Hemen ardından 2 µL 1M $NaCNBH_3$ (500 µL 10 mM NaOH içerisinde 32 mg katı $NaCNBH_3$ çözündürülmüş stok solüsyonundan alınmış) eklenir ve karışım 50 µL damla olarak dikkatlice karıştırılır ve 1 saat inkübe edilir.
- Kullanılmayan aldehit fonksiyonlarını bloke etmek için 5 µL etanolamin hidroklorür 1M'lık stok solüsyonundan eklenir [87].

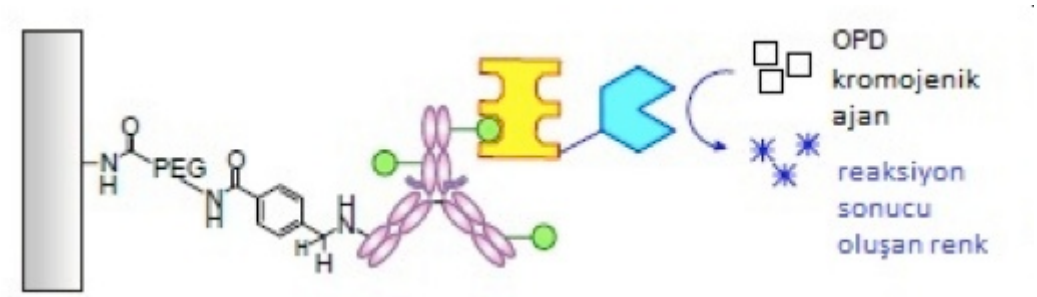
Yukarıda belirtilen iki faklı yöntem ile AKM uç modifikasyonunun nedeni, kuvvet spektroskopi deneylerinde kullanılabilecek en stabil molekülü tayin etmek içindir.

3.2.4. Validasyon Çalışmaları

Çalışmada kullanılan modifiye AKM uçlarının/çiplerini validasyonu, bu uçlara/çiplere tutturulmuş ligandlarının yoğunluğu ve verimliliği yapılacak farklı iki karakterizasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bunlardan ilki enzim ölçümleri, ikincisi spektroskopi ölçümleridir.

3.2.4.1. AKM Ucuna Bağlanan Molekül Sayısının Tayini

AKM ucuna/çipine tutturulan biyotinlenmiş IgG molekülünün yoğunluğu ve bağlanma verimliliği, kromojenik ajan olan OPD (O-fenilendiamin) (Alfa Aesar, ABD) ile belirlenmiştir. AKM ucu ile aynı özellikteki silikon nitrat destek malzemeleri üzerine, yukarıda belirtilen yöntemler ile biyotinlenmiş IgG molekülleri PEG bağlayıcıları ile kovalent bağlanır. Daha sonra Extravidin® Peroksidaz (Sigma Aldrich, ABD) molekülleri, modifiye edilmiş AKM ucu/çipi ile 1 saat etkileştirilmiştir. İnkübasyon sonrası malzemeler fosfat tampon çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra modifiye yüzeyler, önceden hazırlanan OPD ve H_2O_2 karışımı içeren spektrofotometre küvetleri içine daldırılarak, karışımda meydana gelen renk değişiminin 490 nm'deki soğurma miktarı ölçülerek AKM uç/çip modifikasyonunun verimi belirlenmiştir. OPD peroksidaz ile tepkimeye girerek kahverengi tonlarında renk vermektedir (Şekil 3.37) [105].



Şekil 3.37. Bağlanma veriminin kromojenik ajan ile belirlenmesi (© 2006, American Chemical Society izni ile kullanılmıştır) [105].

3.2.4.1. Kuvvet Spektroskobisi Ölçümleri

İkinci validasyon yöntemi olarak AKM ile KS ölçümleri yapılmıştır. Yüzeye kovalent bağlandırılmış olan moleküllerin uca bağlanmış olan ligandlar ile seçici, spesifik bağlar kurması ve bu bağların sayısal değerleri kuvvet spektroskopisi ölçümleri ile belirlenmiştir [87, 112].

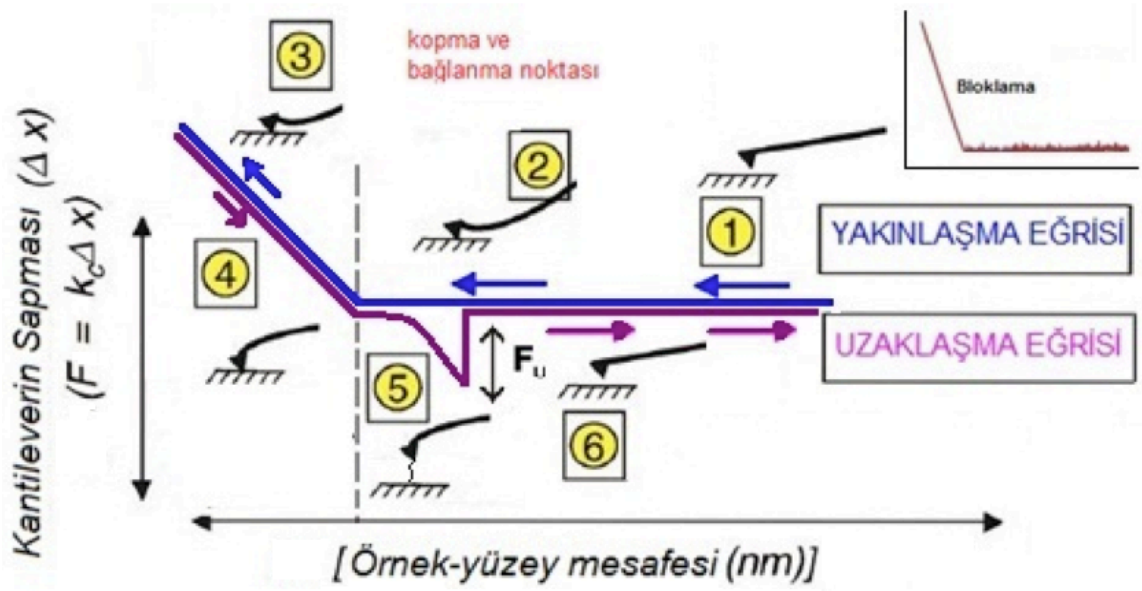
İlk olarak boş mika yüzeyi üzerinde modifiye edilmiş kantileverler ile KS eğrileri sıvı hücre içerisinde kaydedilmiştir. Daha sonra yüzeyi streptavidin molekülü kaplanmış mika yüzeyi ile biyotinli IgG molekülünün etkileşimine bakılmıştır. Son olarak bağlanma spesifitisini göstermek amaçlı olarak, bağlanmayı bloklamak amaçlı streptavidin kaplı mika yüzeyine biyotin molekülleri kovalent bağlandırılmış ve yine modifiye edilmiş kantilever ile etkileşimlerine bakılmıştır. Bu durumda bloklanmış yüzey ile modifiye AKM ucu etkileşime girmemesi beklenmektedir.

Biyotin streptavidin spesifik bağlanma deneyleri dışında AKM ucuna farklı bir ligand olarak lizozim bağlanmıştır. Çalışmada kullanılan lizozim baskılanmış polimerler Dr. Erkut Yılmaz tarafından yüksek lisans doktora tezi kapsamında sentezlenmiştir [159]. Lizozim molekülünün, yapay reseptör olarak hazırlanmış lizozim baskılanmış polimerlerin spesifik bağlanma noktaları ile etkileşimleri yine kuvvet spektroskopisi ile kaydedilmiştir.

Atomik kuvvet spektroskopisinde ligand modifiyeli AKM ucu ile yüzeyde bulunan ilgili reseptör molekülleri arasındaki etkileşimler kuvvet-mesafe döngüsü (ing: force-distance cycle) ile izlenir (Şekil 3.38). Bu döngü esnasında uç sabit bir hızla bulunduğu yerde aşağı (yaklaşma) ve yukarı (uzaklaşma) doğru hareket eder. Uç örnek yüzeyine yaklaşırken (Şekil 3.38, yakınlaşma 1-3. noktalar), uca bağlı ligand molekülü örnek yüzeyi ile etkileşime girer. Bu yüzden kantileverde herhangi bir bükülme meydana gelmez ve bükülme sıfır olarak adlandırılır (Şekil 3.38, yakınlaşma 1. nokta). Uç, yüzey ile temas ettiği zaman ise (Şekil 3.38, yakınlaşma 2. nokta), yüzeyden uygulanan ve ucun aşağıya hareketi ile doğrusal bir şekilde artan itici kuvvet ile uyumlu bir şekilde kantilever yukarı doğru bükülerek kuvvetin negatif kısımda yer almasına sebep olur (Şekil 3.38, yaklaşma 3. nokta). Ucun yüzeyden uzaklaşma döngüsü başladığı zaman (Şekil 3.38, uzaklaşma 4, 5 ve 6. noktalar), kantileverin bükülmesi eski konumuna gelir ve itici kuvvet sıfıra düşer. Uç yüzeyden uzaklaştıkça, iğnede bulunan ligand ile yüzeyde bulunan reseptör molekülü iğne üzerinde yavaş yavaş artan baskıcı bir kuvvet oluşturur. Bu da kantileveri aşağıya doğru büker (Şekil 3.38, uzaklaşma 4. nokta). Uzaklaşma döngüsünün 5. noktasında görülen parabolik (doğrusal olmayan) eğri, ligand molekülün bağlı olduğu esnek birleştirici örneğin uzaması sonucu meydana gelir. Kantileverin aşağıya doğru bükülmesi, ligand-reseptör kompleksinin belli bir kuvvette birbirinden ayrılmasına kadar sürer. İşte bu kritik kuvvete “kopma kuvveti,

F_u" adı verilir ve Hooke kanuna göre; $F_u=k\Delta x$, kantileverdeki bükülme (Δx) ile orantılıdır. Burada *k,* kantileverin yay sabitidir. Kompleksin birbirinden ayrılmasından sonra, kantileverdeki bükülme sonlanır ve eski orijinal pozisyonuna geri döner (Şekil 3.38, uzaklaşma 6. nokta).

Uçtaki ligand ile yüzeyde bulunan reseptör arasındaki bağlanmanın özgünlüğü, bloklama deneyi ile belirlenir. Bloklama deneyi, serbest ligandların solüsyona verilerek yüzey reseptörlerini bloklaması, yada serbest reseptörlerin solüsyona eklenmesi ile iğne üzerindeki ligand molekülünün bloklanması şeklinde uygulanabilir. Bloklama sonrasında, özgül bir bağlanma olmayacağı için, kuvvet-mesafe döngüsündeki yaklaşma ve uzaklaşma eğrileri birbirlerinin aynısı olur (Şekil 3.38, gömülü grafik).

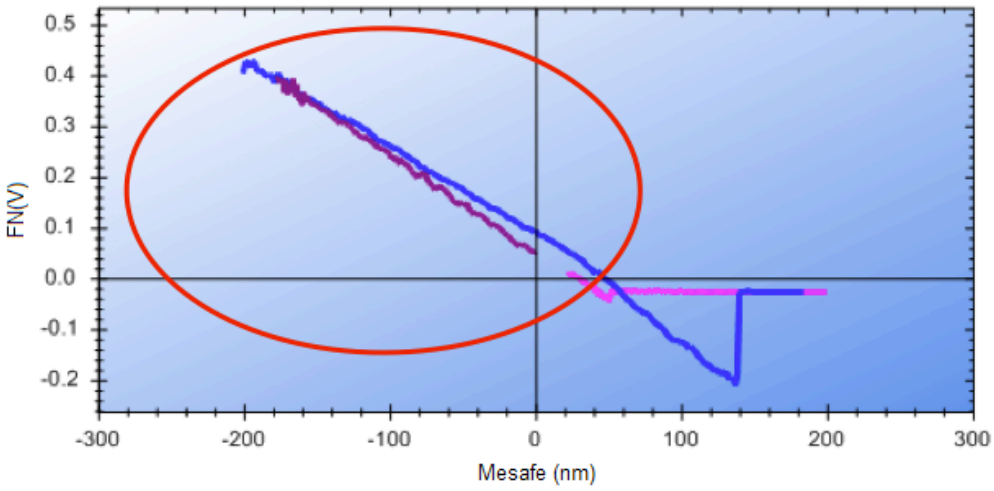


Şekil 3.38. Kuvvet-mesafe döngüsü.

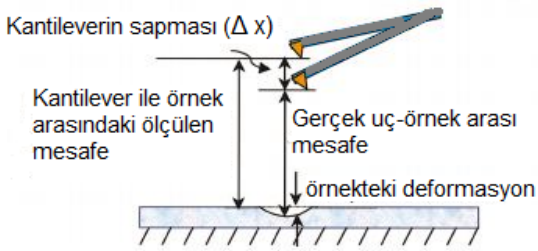
3.3. Nanoindentasyon Çalışmaları

İndentasyon KS eğrisinden elde edilmektedir ve indentasyon eğrisi ile bir malzemenin sertliği ve modulus değeri hakkında bilgi edinilebilir. Dolayısıyla çalışmada bu bilgiden yola çıkarak indentasyon hesaplarını literatür verileri ile doğrulayarak KS eğrilerinin doğruluğu kanıtlanmıştır. Şekil 3.38'de ucun spektroskopi esnasında piezonun hareketi ile yerdeğişimi şematik olarak açıklanmıştır. Şekil 3.39 (a)'da kırmızı yuvarlak içerisinde gösterilen kısım (Şekil 3.39 (b)'de bu kısmın ucun yüzeye temas ettiği ve yüzey üzerinde tahribat bıraktığı kısım olarak gösterilmektedir) indentasyon bölgesidir.

İndentasyon esnasında ucun örnek yüzeyine girmesi ve daha sonra yüzeyden ayrılması neticesinde yükleme ve geri çekme eğrileri kaydedilir. Bu eğrilerden sertlik, temas yüzey alanı, temas yüksekliği ve örneğin esneklik modülü geri çekme eğrisinin eğiminden yola çıkarak hesaplanır. Eğrilere bakılarak maksimum yük ve maksimum yükseklik bilinir. Eğim eğrisinin X eksenini kestiği nokta temas yüksekliğini gösterir (Şekil 3.40). Bu değerler kullanılarak Berkoviç uca göre Eşitlik 3.12-3.14'den temas alanı, sertlik ve örneğin elastik modülüsü hesaplanır. Eşitlik 3.14 ile yüzeyin elastik modülü bilgisine ulaşılmaktadır. Bu eşitlikte F, maksimum yükü, v, Poisson oranını, hc, indentasyon mesafesini, E, elastik modülü temsil etmektedir. *β,* geometri düzeltme faktörü değerini belirtmektedir. Bu eşitlikten yola çıkarak indentasyon eğrisinden elde edilen veriler doğrultusunda yüzey elastikliği hakkında kantitatif veri elde edilir.

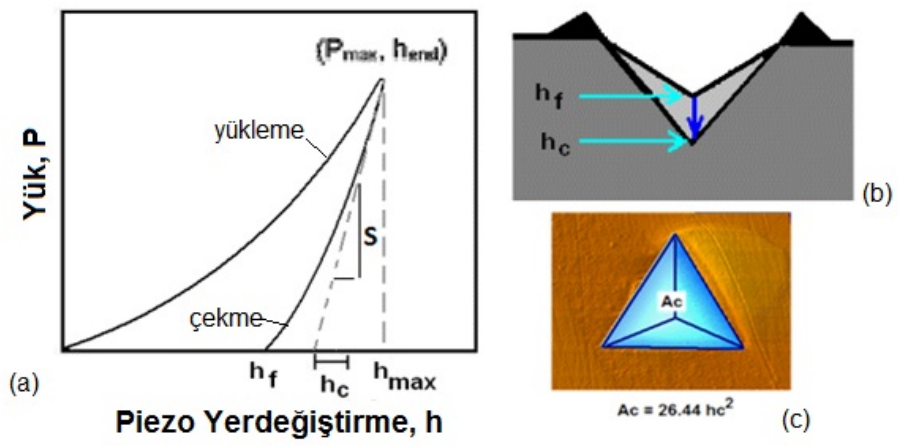


(a)



(b)

Şekil 3.39. a) SPM programı ile kaydedilmiş KS eğrisi. Kırmızı yuvarlak içerisinde kalan alan indentasyon bölgesi, b) Kantileverin yüzey üzerindeki hareketi.



Şekil 3.40. (a) Piezonun yerdeğiştirmesine göre yük eğrilerinin şematik gösterimi, (b) indentasyon sonucu oluşan deformasyonun profil görüntü çizimi, (c) Ucun yüzey üzerindeki temas alanı.

Temas Alanı = $Ac = 24.5hc^2$ [3.12]

Sertlik (S) $= Hc = P/Ac$ [3.13]

$$F = \frac{2}{\pi}\frac{E}{(1-\nu^2)}\beta hc^2 \qquad (\beta = 1.034) \qquad [3.14]$$

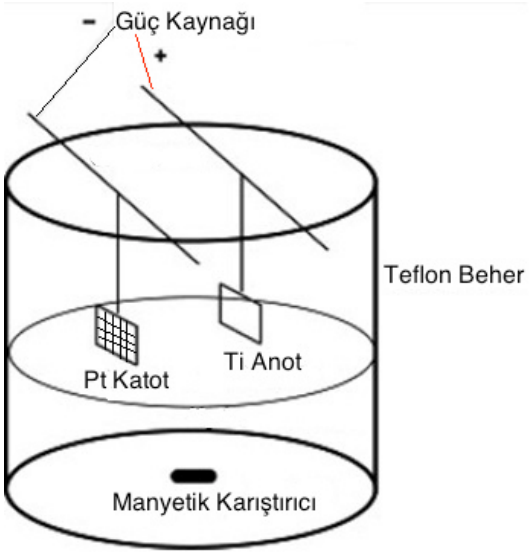
İndentasyon çalışmaları kapsamında elastisitelerine bakılmak üzere Saos-II hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin anodizasyon yöntemi ile hazırlanmış titanyum nanotüp yüzeylere tutunma ve proliferasyon davranışları, indentasyon çalışmalarıyla hücrelerin elastisite hesapları ile belirlenmiştir.

3.3.1. Titanyum Yüzeylerinin Anodizasyon Yöntemi ile Hazırlanması

Çalışma kapsamında farklı çap genişliklerine sahip titanyum nanotüp yüzeyleri elektrokimyasal anodizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Anodizasyon için 0.127 mm titanyum folyo (%99.7, Strem Chemicals, ABD) ve 0.1 mm platinyum tela (%99.9, Alfa Aesar, ABD) kullanılmıştır.

Titanyum plakalar 2'şer cm boylarında kesilerek önce sıvı deterjan ile yıkanmış daha sonra %70 etil alkol ile 10 dakika ulrasonik banyoda temizlenmişlerdir. Anodizasyondan önce titanyum folyoların üzerinde bulunan oksit tabakasının ortadan kaldırılması için plakalar $HF:HNO_3$ (1:1.5 v/v) (Merck, Almanya) solüsyonu ile temizlenmiştir. Daha sonra metaller deiyonize su ile yıkanarak 70°C'da etüv içerisinde kurumaya bırakılmışlardır. Farklı çaplara sahip titanya nanotüp yüzeyler elde etmek için anodizasyon işleminde etilen glikol – amonyum florür (NH_4F) (Merck, Almanya) elektroliti kullanılarak 10V, 15V, 20V, 25V, 30V, 35V, 40 V ve 45

V potansiyel gerilim uygulanmıştır [142]. Her bir plakaya gerilim 15'er dakika uygulanmıştır. Oluşturulan yüzeyler taramalı elektron mikroskopu (Quanta 200 FEG, FEI Instruments, ABD) ve AFM ile yüzeyler karakterize edilmiştir. Anotlama düzeneğinde kullanılan doğru akım güç kaynağı 0-100V potansiyel fark aralığında çalışabilmektedir. Kaynağın pozitif ucuna titanyum (anot), negatif ucuna ise platin (katot) bağlıdır. İki plaka arası 2 cm olarak sabit tutulmaktadır. Anodizasyon düzeneği Şekil 3.41'de gösterilmektedir.



3.41. Anodizasyon düzeneği.

3.3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

AKM ile değişen titanyum nanotüplerin çaplarının hücre esnekliğine etkisini ölçmek için farklı potansiyel fark uygulanarak hazırlanan titanyum plakaların üzerine hücreler ekilmiştir. Hücre hattı olarak Saos-II (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Türkiye) osteoblast benzeri osteosarkoma hücre hattı kullanılmıştır. Saos-II hücreleri %10 Fetal Sığır Serumu ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde çoğaltılmıştır. Besiyere %1 oranında L-Glutamin ile birkaç damla penisilin/streptomisin çözeltileri eklenmiştir. İki gün beklemeden sonra çoğalan hücreler 1 dakika 37°C 400µL Tripsin-Edta enzimine maruz bırakılarak besiyerden kaldırılmıştır.

Çap farklarına göre 10V, 30V ve 40V potansiyel fark uygulanmış ve kontrol amaçlı olarak hiç potansiyel uygulanmamış titanyum yüzeyler üzerine kaldırılan hücre

solüsyonundan 100'er µL alınarak hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. DMEM ile plakalar üzerindeki besiyer 500 µL'ye tamamlanmıştır.

3.3.3. AKM ile Biyomekanik Özelliklerin Ölçümleri

Hücrelerin inkübasyon günlerine göre elastik ve viskoelestik testleri, AKM spektroskopi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde nanoindentasyon işlemi için yaklaşık 0.04-0.05 N/m yay sabitine sahip AKM kantileveri (Hydra6V, AppNano, ABD) kullanılmıştır. İndentasyon hücre üzerine farklı hızlarda bastırılıp, yükleme - yerdeğiştirme eğrileri yüzey üzerindeki farklı noktalardan (her nokta için en az bir kez) kaydedilmiştir. İndentasyon eğrilerinden Herzt Model uygulanarak elastik modulus değerleri hesaplanmıştır. Yüzeylerdeki hücreler, 1., 9. ve 15. inkübasyon günlerinde AKM ile mekanik testlere tabi tutulmuş ve mekanik gelişimleri incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sıvı İçerisinde Çalışan Yüksek Çözünürlük AKM Geliştirilmesi

Tez kapsamında birinci bölümde çalışmalar AKM sisteminin ve kapalı sıvı hücrenin mekanik, optik ve elektroniksel olarak optimizasyonu ve gerekli modifikasyonların sağlanması yönünde ilerlemiştir. Çalışmalar sonucunda sistemin gürültü kaynakları minimize edilmiş ve atomik çözünürlük havada ve sıvıda kaydedilmiştir. Bu çalışmalarda uluslararası literatüre yenilik olarak akustik titreştirme yöntemi kullanılarak, tamamı ile kapalı sıvı hücre içerisinde yüzeye değmeyen modda atom görüntüleri AKM ile alınabilmiştir. Geliştirilmiş olan sistem ile birçok biyolojik örneğin havada ve sıvı içerisinde görüntüleri monitörlenmiştir.

Nanomanyetik Bilimsel Cihazlara ait sıvı hücre tasarımındaki sıvı kaybı, hücre içerisinde oluşan hava kabarcıkları ve kantilever tutucu gövdede kullanılan malzemeler arasındaki uyumsuzluk yalancı merkez frekans eğrilerinin sayısını arttırmakta ve gerçek merkez frekans eğrisinde çalışılmasını imkansız kılmakta idi. Gerçek olmayan merkez frekans eğrilerinden kurtulabilmek için ilk olarak mekanik tasarımda değişikliklere gidilmiştir. Dolayısıyla, iki malzeme arasındaki geçiş enerjisi farkından yararlanılarak kantilever tutucunun gövdesinin malzeme değişikliği gerekliliği neticesine varılmıştır. Akustik empedans değeri 33 x 10^6 kg/m^2s olan piezo malzeme ile arasında 10 kattan fazla fark olan KEL-F, Za= 2.1 x 10^6kg/m^2s, kullanılmasına karar verilmiştir. Böylece KEL-F gövdede akustik bariyer görevi görmekte ve dalganın tüm gövdeye yayılması yerine sadece kantileveri titreştirilmesi sağlanmıştır. Fakat daha sonraki tasarımda daha dayanıklı ve daha uygun fiyatlı olmasından dolayı PEEK malzemenin gövde yapımında kullanılmasına karar verilmiştir. PEEK elektriksel olarak yalıtkandır, hatta bu özelliğinden dolayı çevremizdeki elektriksel malzemelerin yapımında kullanılmaktadır ayrıca agresif kimyasal maddelere karşı oldukça dayanıklıdır.

Bu çalışmalarda yayın titreşimini sağlamak için kullanılan piezoların bulunduğu yer konusunda da yapılan deneysel çalışmalar neticesinde yer değişimine gidilmiştir. Yine akustik bariyer niteliği taşıması açısından kantilever tutucuda farklı malzemeler sandviç şeklinde üstüste gelecek şekilde tasarlanmıştır. Varolan tasarım ile bu aşamada geliştirilen tasarım ile sıvı içerisinde kaydedilen merkez frekans eğrileri teke indirgenmiştir.

Ayrıca kantilever tutucu gövdeyi iyileştirme çalışmalarında kantilever çipinin üzerine basan ve sıvı içerisinde sabit kalmasını sağlayan yayın malzemesinin ve şeklininde çok önemli olduğu alınan deney sonuçları ile kanıtlanmıştır. En son PEEK malzemeden yapılmış üçgen şeklinde olan yay ile elde edilen merkez frekans eğrisinin elde edilen en iyi sonuç olduğu gözlemlenmiştir. Deneyler başında ve sonunda kaydedilen merkez frekans eğrilerindeki değişim sırasıyla Şekil 3.4b ve Şekil 3.19 karşılaştırıldığında açıkca gözlemlenmektedir. Ayrıca frekans eğrisinden kaydedilen Q değeride karşılaştırıldığında eğrilerin kalitesinin mekanik tasarımdaki değişiklikler ile oldukça arttırıldığı gözlemlenmektedir. İlk tasarımda kaydedilen Q değeri 4.333 iken, mekanik tasarım sonrasında kaydedilen eğrideki Q değeri 39.47 olarak kaydedilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde neredeyse 10 kat ilerleme kaydedilmiştir.

Sıvı hücre örnek tutucuda tekrardan tasarlanmıştır. İlk tasarımda piezo üzerinde sabit duran örnek tutucu üzerine S membran oturtularak sıvı hapsedilmeye çalışılıyordu ki bu durum neticesinde sıvı tam olarak hücre içerisinde hapsedilemiyordu. Deneysel çalışmalar ile bir çok sıvı hücre tasarımı denenmiş ve sonuç olarak en yumuşak conta kullanılarak ve piezodan bağımsız kimyasallara dayanıklı olması için PEEK malzeme kullanılarak tak çıkar örnek tutucu tasarlanmıştır. Bu örnek tutucu ile incelenecek olan örnek dışarıda örnek tutucuya oturtularak mıknatıslar vasıtası ile piezo tarayıcı üzerine yerleştirilecek şekilde tasarlanmıştır. Fakat yine arada kalan boşluklar nedeni ile dışarıya bir miktar sıvı taşması engellenememiştir. Bunun üzerine örnek tutucu çevresinde toplama havuzu oyuğu açılmıştır. Geliştirilmiş olan örnek tutucunun son görünümü Şekil 3.24'de gösterilmektedir.

Sıvı içerisinde görüntü almanın en büyük sorunlarından biride hücre içerisinde oluşan hava kabarcıklarıdır. Bu hava kabarcıkları görüntüde gürültülere, bozulmalara ve hatta görüntü alınamamasına neden olmaktadır. Hava kabarcıklarının oluşmasının temelinde hücre içerisinde düzenli sıvı aktarımının yapılamaması yatmaktadır. Dolayısıyla hücre içerisine doğru bir şekilde sıvı gönderilip, içeriden havanın çıkmasıda diğer yönden aynı miktarda sağlandığı takdirle hücre içerisinde hava kabarcığı kalması mümkün değildir. Bunun üzerine deneysel tasarımda örnek tutucu içerisine direk sıvı gönderildiğinde ve yine örnek tutucudan tahliye sağlandığında örneğin üzerinin ve kantileverin sıvı içerisine

batmadığı gözlemlenmiştir. Sıvı üstten ve bir taraftan hücre içerisine gönderilip, diğer taraftan ve yine üstten tahliyesi sağlanması ve iki nokta arasında seviye farkı yaratılıp fazla havanın içeride hapsolmasına engel olunması neticesinde hücre içerisindeki hava kabarcıkları büyük oranda indirgenmiştir.

Sıvı içerisinde çalışırken hava ve sıvı fazı birbirinden ayırmak ve yansıyan lazer ışığın fotoduyar yüzeye dik açı ile düşürülmesi gerekmektedir. Bunun için çalışmalarda yüksek saflıkta (>%95) olan kaynaşık silika camlar tercih edilmiştir. Işığın tam olarak cam içerisinden geçişinin sağlanması ve geri yansımanın engellemesi için camın sıvı ile birleşen yüzeyine 635 nm dalga boyu için %0.2 yansıma oranına sahip yansımayan kaplama yaptırılmıştır. Birleşim yerlerinde hava kabarcıkları kalmaması ve ışığı tam olarak 90 derece ile fotoduyar yüzeye düşürebilmek için dış çapı 5.62 cm ark şeklinde silindirik cam kullanılmıştır. Kullanılan camın son şekli ve açısal değerleri Şekil 3.33'de gösterilmektedir.

AKM'de sıvı hücre birimlerinin dışında kullanılan tarayıcınında özelliği önemlidir. Nanomanyetik Bilimsel Cihazlara ait AKM'nin tarayıcısı tüp piezo içermektedir. Piezolar Bölüm 2.1.1'de anlatıldığı gibi potansiyel fark uygulandığında Z yönünde uzama ve kısalma göstermektedirler. Piezo tüplerin çözünürlüğü ise Bölüm 3.1.2.2'de anlatıldığı gibi boyutlarına göre değişiklik göstermektedirler. Piezo uzunluğu ne kadar küçük olur ise verilen sinyale göre gürültü miktarı o oranda düşecektir. Bu bölümdeki hesaplamalar sonucunda bir inç uzunluğundaki tarayıcı ile atomik çözünürlük elde edilebilmesi mümkündür.

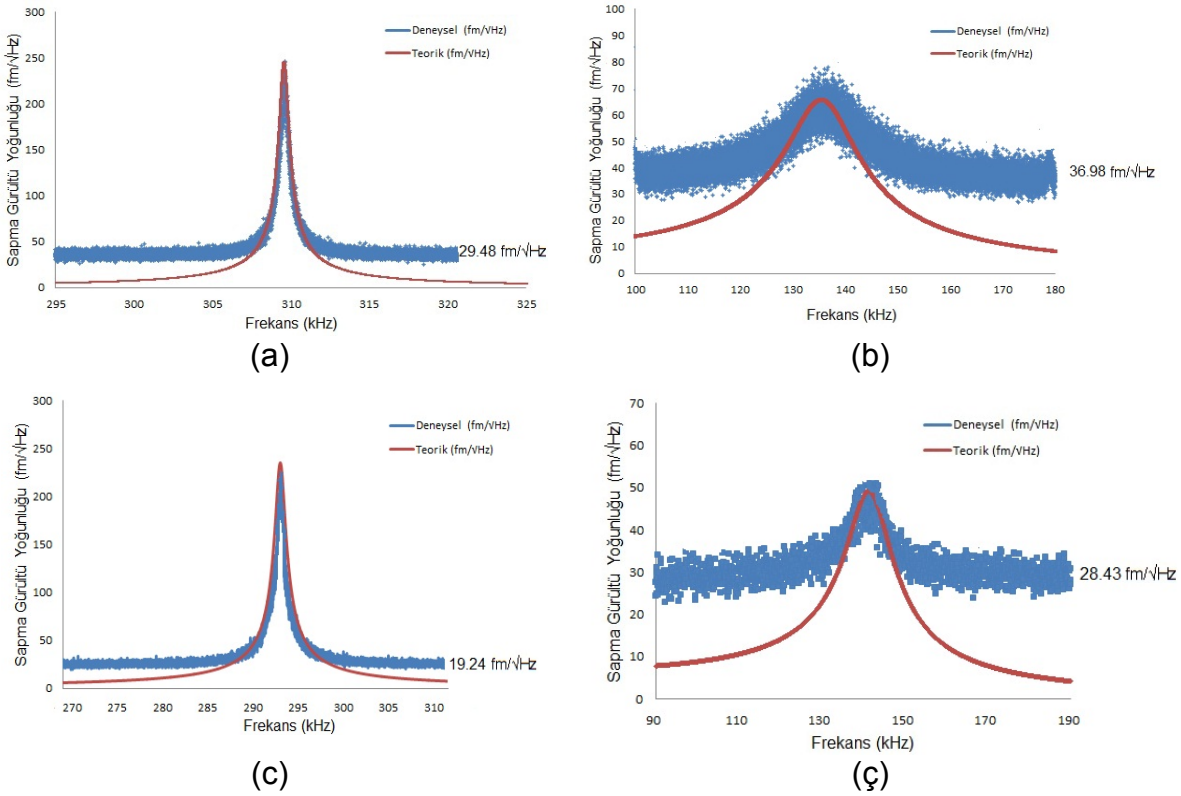
Mekanik tasarımda yapılan değişiklikler ile merkez frekans eğrilerinde kaydedeğer düzelme olduğu ve sıvı içerisinde görüntü alınabildiği gözlemlenmiştir. Ancak tek başına mekanik tasarımda yapılan değişiklikler yüksek çözünürlükte görüntü alınabilmesi için yeterli değildir. Optik düzenekte ve elektronik devrelerde de gürültü oranını azaltmak için iyileştirmeler yapılması gerekmektedir. Dolayısıyla tez kapsamında bu yönde de çalışmalar yapılmıştır. Elektriksel olarak oluşan Johnson ve preamfi gürültüsü seçilen anfiler ile minimize edilmiştir. Bu konuda literatürde Fukuma ve arkadaşlarının çalışmaları takip edilmiştir [43,54]. Elde edilen sonuçlar onların sonuçları ile tutarlılık göstermiştir. Hesaplanan gürültü değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Sistem elektronik gürültü değerleri hesaplamaları

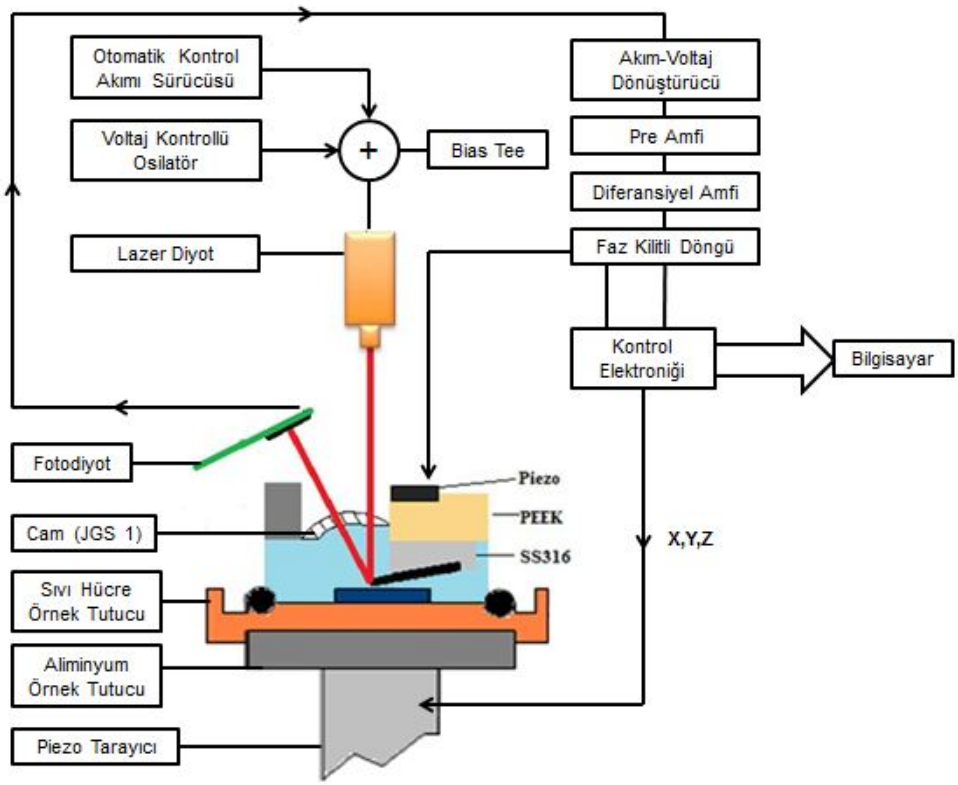
Rıv:	10 k-Ohm
Johnson gürültüsü:	4.07E-08 V/√Hz
Fotodiyot amfisi Voltaj gürültüsü:	6.50E-09 V/√Hz
Fotodiyot amfisi Akım gürültüsü:	5.00E-10 V/√Hz
Fotodedektör gürültüsü:	4.12E-07 V/√Hz

Mekanik, optik ve elektronik olarak yapılan iyileştirmeler neticesinde cihazın kantilevere termal hareketi olarak yansıyan ve spektrum analizör ile ölçülebilen gürültü seviyeleri hesaplanmıştır. İki çeşit kantileverin hava ve sıvı içerisindeki Brownian hareketinin frekans spektrumu Şekil 4.1'de sırası ile gösterilmiştir. Mavi renkteki çizgiler spektrum analizör cihazı ile ölçülen verileri göstermektedir. Kırmızı renkteki çizgiler Eşitlik 3.11'den hesaplanan teorik verileri göstermektedir. Bulunan pikler kantileverin hava ve sıvı içerisindeki herhangi titreşim göndermeden oluşan Brownian hareketidir. Gürültü ölçümleri iki farklı model kantilever kullanılarak yapılmış. Tap300Al (Budget Sensors) ile havada alınan ölçümler sonucunda kantilever hareketine bağlı gürültü yoğunluğu 29.48 fm/√Hz, sıvı içerisinde yapılan deneyler sonucunda 36.98 fm/√Hz olarak ölçülmüştür. NCHAu (Nanosensors) ile ise havadaki ölçümler sonucunda 19.24 fm/√Hz, sıvıda ise 28.43 fm/√Hz olarak ölçülmüştür. Bu değerler optik ışın saçılması metodunu kullanan sistemler arasında sıvıda ölçülen gürültü ölçümlerine göre en alt seviyede olduğu belirlenmiştir.

Geliştirilen son prototipteki elektronik aksamda yapılan değişiklikler ve eklemeler yazılımdaki gelişmeler ile görüntü kalitesinde daha iyi sonuçlar alınmıştır. Deney sonuçlarına göre tasarımları tamamlanmış olan son prototipin optik, mekanik ve elektronik bileşenleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Çözünürlük kalitesini test etmek için sıvı içerisinde mika tabakaları taranıp atomik adımlar ve atomik latisler kaydedilerek test edilmiştir. Ayrıca biyolojik numuneler kendi fizyolojik ortamlarında görüntülenmişlerdir.



Şekil 4.1. Kantilever Brownian hareketinin frekans spektrum ölçümleri, (a) Tap300Al ile havada (b) sıvıda; (c) NCHAu ile havada, (ç) sıvıda alınan ölçümler.



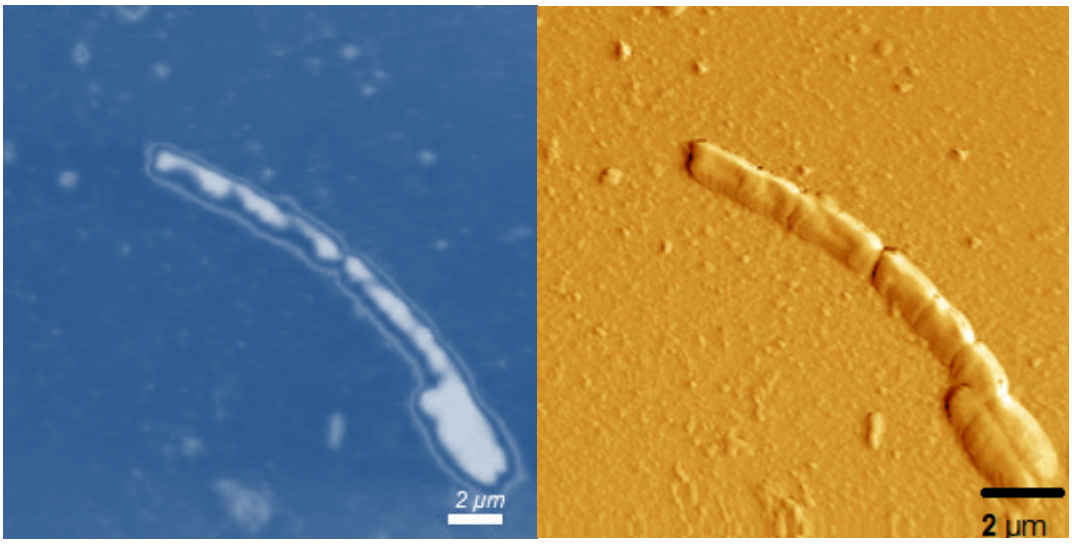
Şekil 4.2. Son prototip Sıvı Hücre AKM elektronik, optik, mekanik bileşenleri.

4.1.1. İlk Prototip ile Alınan AKM Görüntüleri

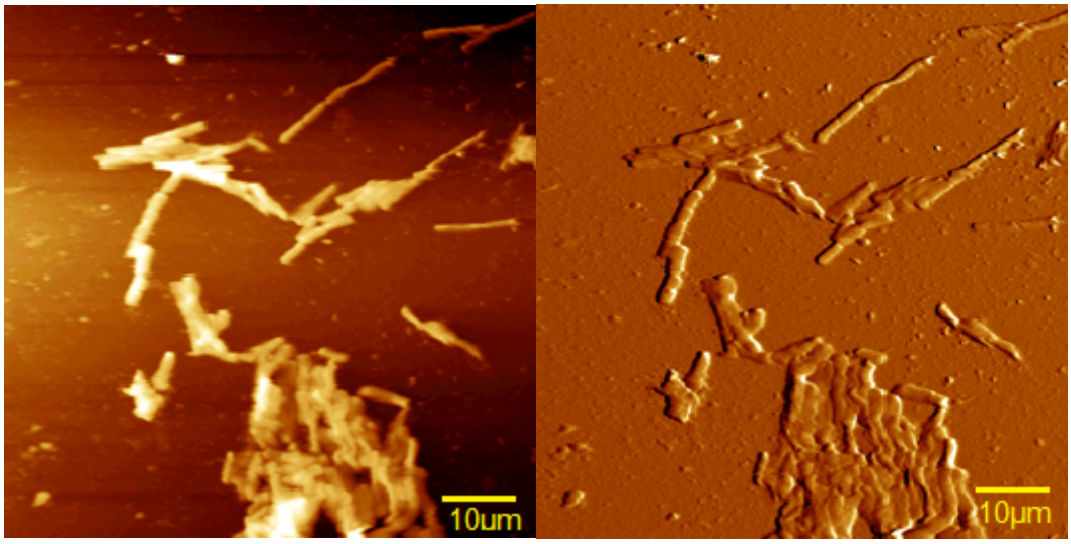
Tasarlanan ilk sıvı hücre prototipin havada ve sıvı içerisinde performansını test edebilmek için çeşitli biyolojik örnekler AKM ile taranmıştır. İlk biyolojik örnek tarama denemelerinde örnek olarak kırmızı kan hücreleri kullanılmıştır. Kırmızı kan hücrelerinin çapları genellikle 4-8 µm arasında değişmektedir [160]. Fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda 20 µm x 20 µm taranarak kaydedilen kırmızı kan hücreleri görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Taranan kırmızı kan hücrelerinin çapları 5-7 µm olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.3. Fizyolojik salin içerisinde kırmızı kan hücreleri görüntüsü (Yükseklik skalası 0-5 µm).

Taranan biyolojik örneklerin çeşitliliği açısından, toprak bakterisi olan ve biyolojik pestisit olarak kullanılan *Bacillus thurigiensis* bakterisinin tasarlanan AKM ile görüntüsü kaydedilmiştir. Bakteri çoğalmasını ve herhangibir enfeksiyona neden olmasını engellemek için bu görüntüler havada kaydedilmiştir. Çubuk şeklinde olan bu gram pozitif bakteri türünün yaklaşık olarak genişliği 1 µm, uzunluğu 5 µm'dir [161]. Şekil 4.4'de birinci prototip ile havada tıklamalı modda 20 µm x 20 µm ve 50 µm x 50 µm taranarak kaydedilmiş *Bacillus thurigiensis* topografi ve genlik görüntüleri gösterilmektedir. Kaydedilen görüntülerde bakterilerin genişlikleri yaklaşık olarak 1 µm ve uzunlukları 4-5 µm olacak şekilde görüntüler kaydedilmiştir.



(a)

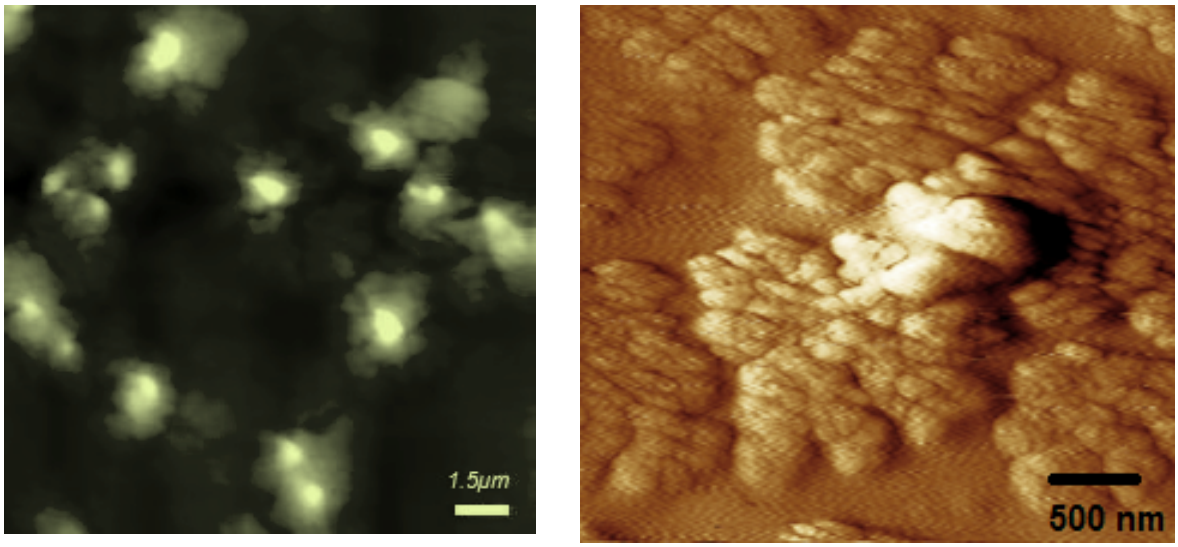


(b)

Şekil 4.4. *Bacillus thurigiensis* AKM görüntüsü. (a) 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-5 µm. (b) 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm [154].

Acinetobacter sp. türündeki bakteri görüntüsü de tasarlanmış olan birinci prototip AKM ile görüntülenmiştir. *Acinetobacter sp.* gram-negatif cinsinden yuvarlak şekilli, 700-800 nm boyutlarında bakteri türüdür [162]. Bakteri çoğalmasını ve herhangibir enfeksiyona neden olmasını engellemek için bu görüntüler havada kaydedilmiştir. Şekil 4.5'da birinci prototip ile havada tıklamalı modda 15 µm x 15 µm ve 3 µm x 3 µm görüntüler taranarak kaydedilmiş olan bakteri görüntüleri gösterilmektedir. Bakteri boyutları birinci prototip ile doğru kaydedilmiştir. Ancak tek bir bakteri görüntüsü kaydedilirken genlik görüntü üzerinde cihazdan kaynaklı gürültününde

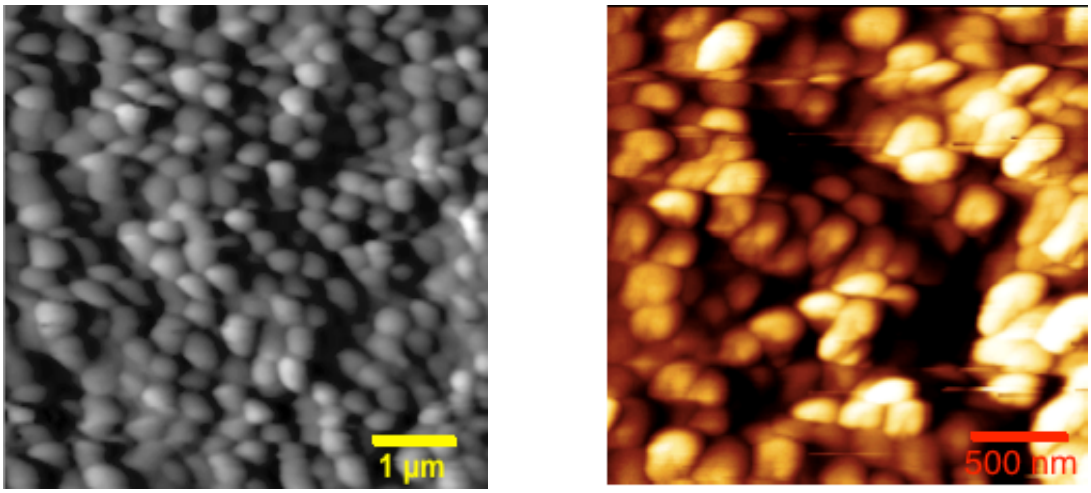
görüntüsü Şekil 4.5 (b)'de görülmektedir. Bu durum neticesinde yüksek çözünürlükte görüntü kaydedilebilmesi için elektronikten kaynaklı gürültü faktörlerinin minimize edilmesi durumu açıkca belirgin hale gelmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.5. *Acinetobacter sp.* bakteri görüntüsü. (a) 256 piksel görüntü havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-5 µm (b) 128 piksel havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm. [154].

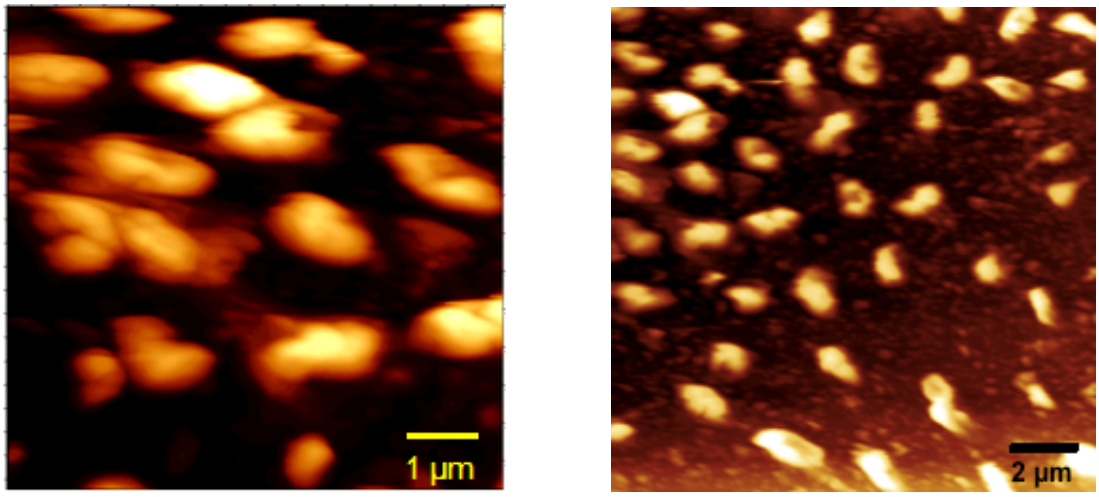
Prototipin görüntü kalitesini ölçme çalışmalarına yönelik olarak farklı bir bakteri türü olan *Staphylococcus aureus* (koagulaz pozitif) ve *Staphylococcus epidermidis* (koagulaz negatif) bakteri çoğalmasını engellemek amaçlı havada görüntüleri kaydedilmiştir. *Staphylococcus aureus* sinüzite neden olabilen gram-pozitif, patojenik bir bakteri türüdür. Bakterinin çap boyutları 500-800 nm civarındadır [163]. *Staphylococcus epidermidis* ise normal insan deri florasında bulunan patojenik olmayan gram-pozitif bakteri türüdür. Bakterinin çap boyutları 500-1500 nm arasında değişmektedir [164]. Şekil 4.6'da 10 µm x 10 µm görüntü taranarak *Staphylococcus aureus* (koagulaz pozitif) havada tıklamalı modda, 5µm x 5µm görüntü taranarak *Staphylococcus epidermidis* (koagulaz negatif) yine havada tıklamalı modda kaydedilmiştir. Görüntüler yine bakterilerin boyutları literatür ile karşılaştırıldığında başarılı bir şekilde kaydedilmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.6. (a) *Staphylococcus aureus* (koagulaz pozitif) AKM görüntüsü. 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-1 µm, (b) *Staphylococcus epidermidis* (koagulaz negatif) AKM görüntüsü. 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm.

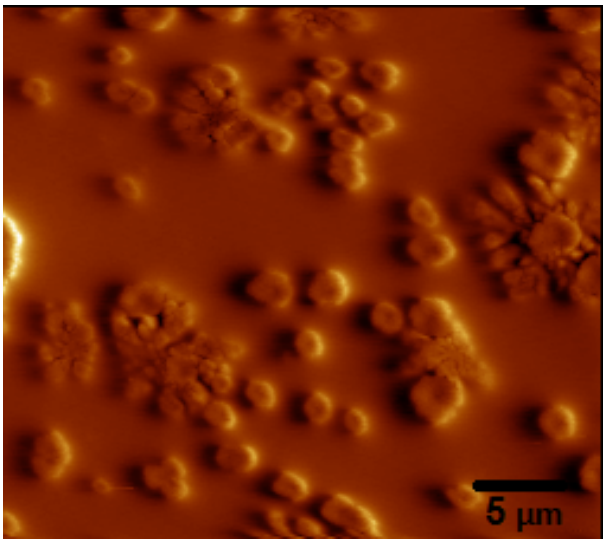
Rhodobacter sphaeroides enerjiyi fotosentez yolu ile üreten mor bakteri türüdür. Çubuk şeklinde, gram-negatif bakterinin uzunluğu yaklaşık olarak 1.5-2 µm, genişliği 0.8-1 µm'dir [165]. İnsan üzerinde patojenik etkisi olmayan *Rhodobacter sphaeroides* sıvı içerisinde görüntüleri kaydedilmiştir. Şekil 4.7'de fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda 8 µm x 8 µm ve 20 µm x 20 µm görüntü taranarak alınan *Rhodobacter sphaeroides* AKM görüntüleri gösterilmektedir. Birinci prototip sıvı hücre içerisinde alınan görüntülerde yine sıvı içerisinde elektroniksel ve optik yolak kaynaklı gürültülerin minimize edilememesinden dolayı, tarama alanı büyük olmasına rağmen bakterilerin net görüntüleri kaydedilememiştir.



(a) (b)

Şekil 4.7. (a) *Rhodobacter sphareoides* AKM görüntüsü. (a) 256 piksel, sıvıda tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-3 µm, (b) 256 piksel, sıvıda tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-5 µm.

Streptomyces bakteri türü antibiyotik çalışmalarında çok fazla çalışılan bozulmaya neden olan bakteri türüdür, aynı zamanda küf bakterisi olarakta anılmaktadır. Koloni şeklinde bulunan bakteri türü çevresinde misel yapılara sahiptir. Bakterinin çapı 0.5-2.0 µm arasında değişmektedir [166]. Şekil 4.8'da havada tıklamalı modda 20 µm x 20 µm görüntü taranarak kaydedilmiş *Streptomyces* bakteri kolonilerinin AKM görüntüsü gösterilmektedir. Görüntülerde bakterilerin koloni şekilleri kaydedilebilmiş fakat misel yapıları görüntülenememiştir.



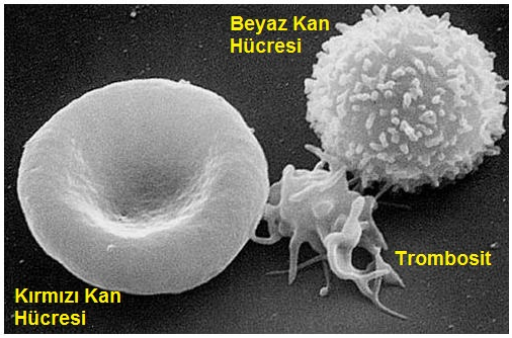
Şekil 4.8. *Streptomyces* kolonilerinin AKM görüntüsü. 256 piksel, havada tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası: 0-2 µm.

İlk prototip ile mikrometre skalasında görüntüler başarılı bir şekilde kaydedilebilmiştir. Fakat cihazda gürültü seviyelerini düşürmeye yönelik çalışmalar son halini almadığı için mikrometrealtı ve nanometre skalada kaydadeğer sonuçlar elde edilememiştir. Bu çalışmalar sonucunda optik, mekanik ve elektroniksel kaynaklı gürültü seviyelerinin indirgendiği bir sıvı hücre prototipine yönelik çalışmalara başlanmıştır.

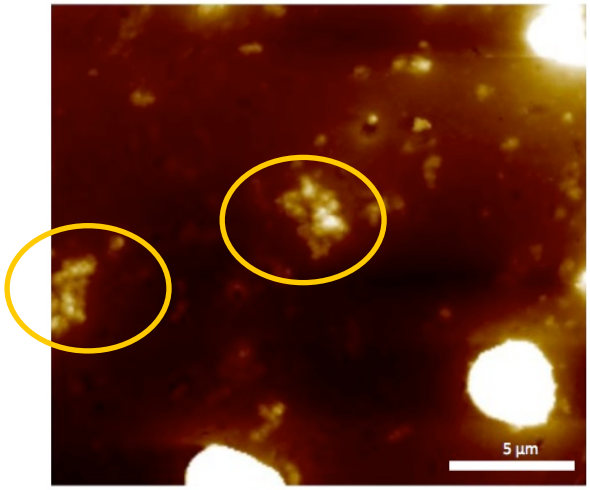
4.1.2. Son Prototip ile Alınan AKM Görüntüleri

Son prototip ile alınan biyomoleküllere örnek olarak, fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda görüntülenmiş trombosit görüntüleri Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Kırmızı kan hücresi, beyaz kan hücresi ve kümeleşmiş trombositlerin görüntüsü Şekil 4.9 (a)'da gösterilmektedir. Kümeleşmiş trombositlerin çapı genellikle 2-3 µm'dir, bir trombositin genişliği 1-2 µm'dir [167]. Şekil 4.9 (b)'de sertbest ve kümeleşmiş trombosit AKM görüntüleri 20 µm x 20 µm görüntüsü taranarak gösterilmektedir. Şekil 4.9 (c)'de kırmızı kan hücreleri üzerine dağılmış

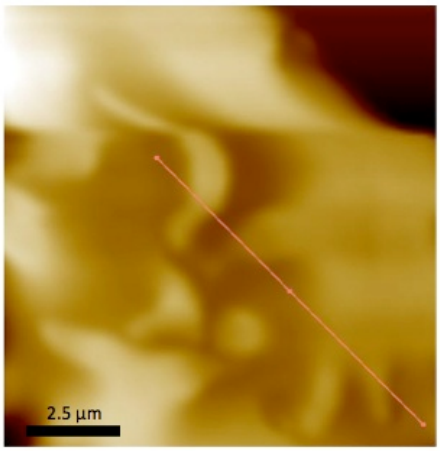
trombositlerin tekli görüntüsü kaydedilmiştir. Alınan kesitte bir trombositin genişliği yaklaşık 1µm olarak ölçülmüştür.



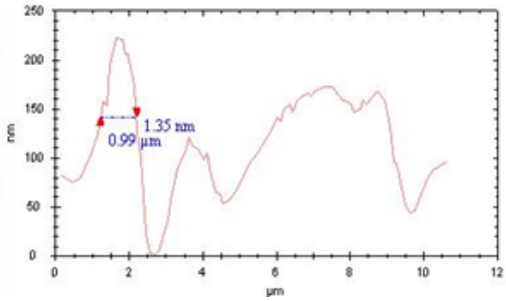
(a)



(b)



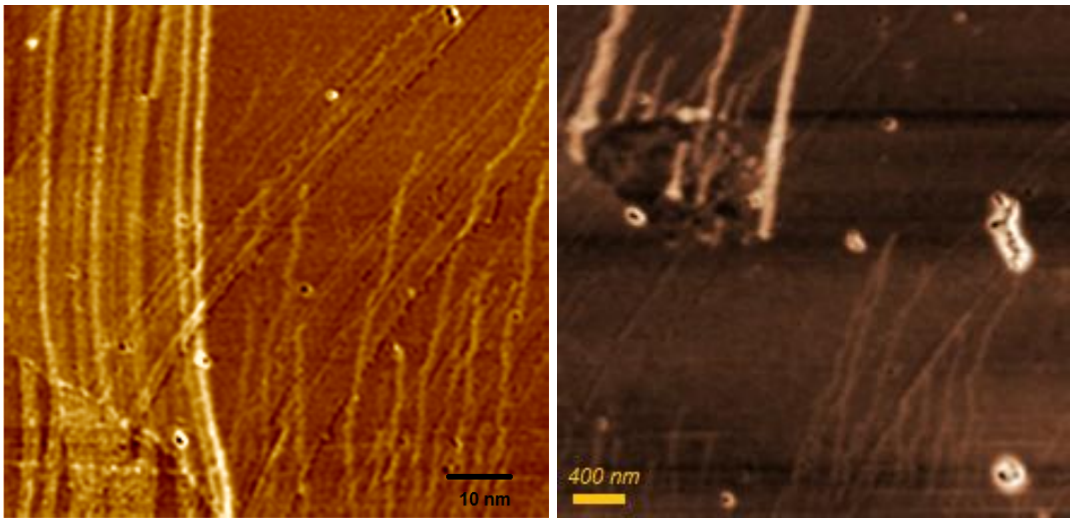
(c)



(d)

Şekil 4.9. (a) Sırasıyla eritrosit, trombosit ve lökosit SEM görüntüsü [166], (b) fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda alınmış trombosit kümelerinin görüntüsü, 256 piksel, yükseklik skalası: 0-5 µm (c) fizyolojik salin içerisinde tıklamalı modda alınmış eritrosit üzerinde trombositlerin görüntüsü, 256 piksel, yükseklik skalası: 0-1 µm [36].

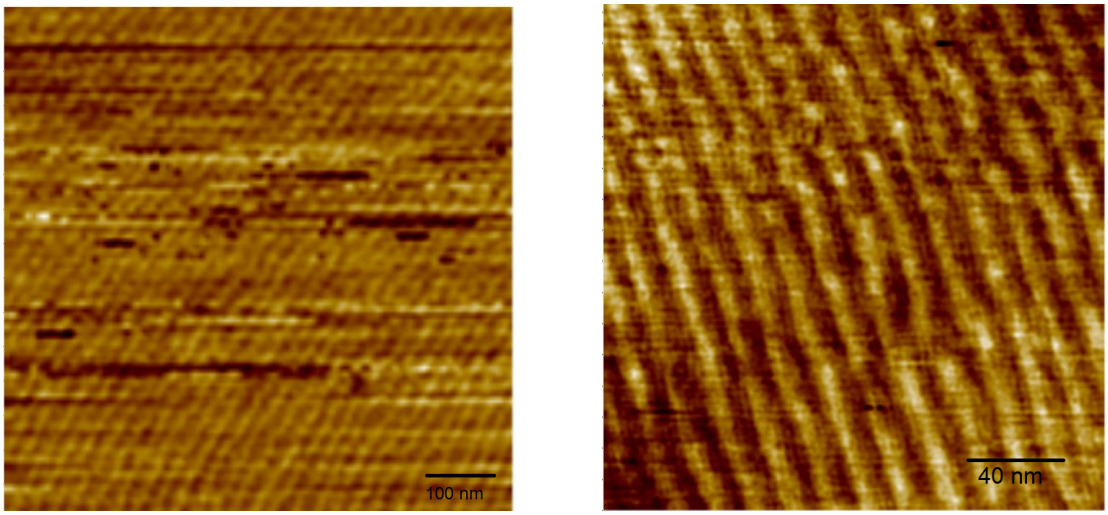
Gürültü kaynakları minimize edildikten sonra geliştirilen son prototip ile yüksek çözünürlük görüntüleri alınması yönünde çalışmalar yapılmıştır. Biyolojik örneklerde sıvı içerisinde yüksek çözünürlük görüntüsü alınabildiğinin kanıtı olarak da yüzeye değmeyen modda fizyolojik salin içerisinde çift sarmal λ-faj DNA sarmallarının AKM görüntüleri alınmıştır. Sarmalların genişliği 2 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Fizyolojik salin çözeltisi içerisinde çift sarmal λ-faj DNA sarmallarına temassız modda bakılmıştır. Bir DNA sarmalının genişliği 2 nm'dir. Yükseklik skalası: 0-100 nm.

Geliştirilmiş olan sıvı AKM görüntüleme yüksek çözünürlük testleri XYZ yönlerindeki çözünürlükleri literatür verileri ile atomik seviyede karşılaştırabilmek için safir, mika ve HOPG gibi düz yüzeyler üzerinde AKM görüntüleri kaydedilmiştir.

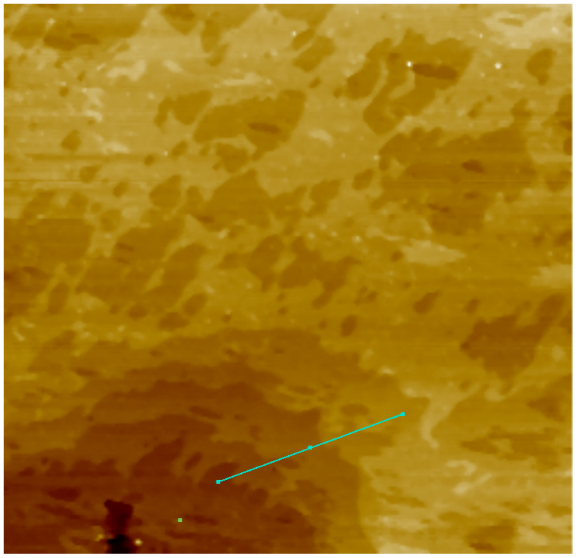
Literatürde Gan ve arkadaşları tarafından safir (0001) yüzeyi üzerindeki teras adımları yükseklikleri ortalama olarak 0.2 nm, genişlikleri 15 nm olarak kaydedilmiştir [168]. Şekil 4.11'de saf su içerisinde safir yüzeyi 800 nm x 800 nm ve 200 nm x 200 nm görüntü tıklamalı modda kaydedilmiştir. Alınan görüntüler literatür verileri ile örtüşmektedir.



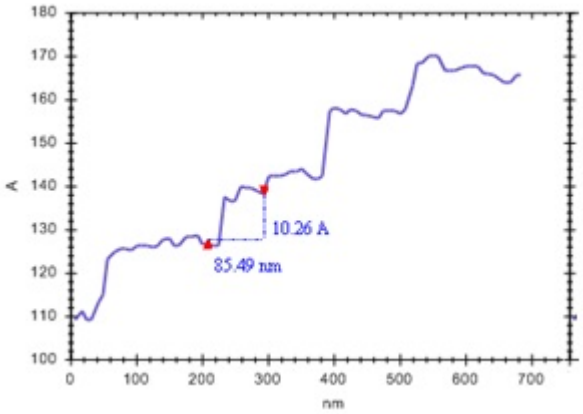
(a) (b)

Şekil 4.11. (a) Safir (0001) yüzeyi üzerinde teras adımları morfolojisi, 256 piksel, (b) 256 piksel, saf su içerisinde tıklamalı modda alınmıştır, yükseklik skalası 0-6 nm.

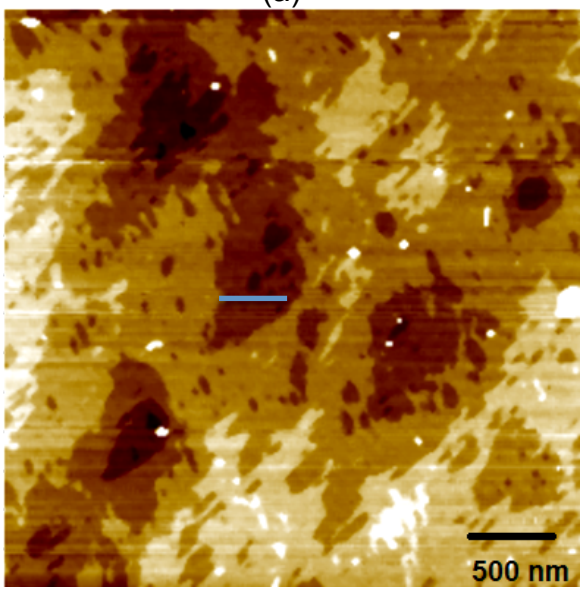
Geliştirilmiş olan AKM ile alınan %49'luk HF ile aşındırılmış mika topografi görüntüsü ve atomik adım kesiti görüntüleri Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Görüntü saf su içerisinde temassız modda 3 µm x 3 µm görüntü taranarak kaydedilmiştir. Mikanın bir atomik adımı yaklaşık 1 nm olarak ölçülmüştür.



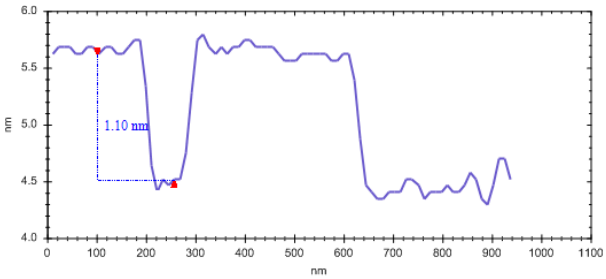
(a)



(b)



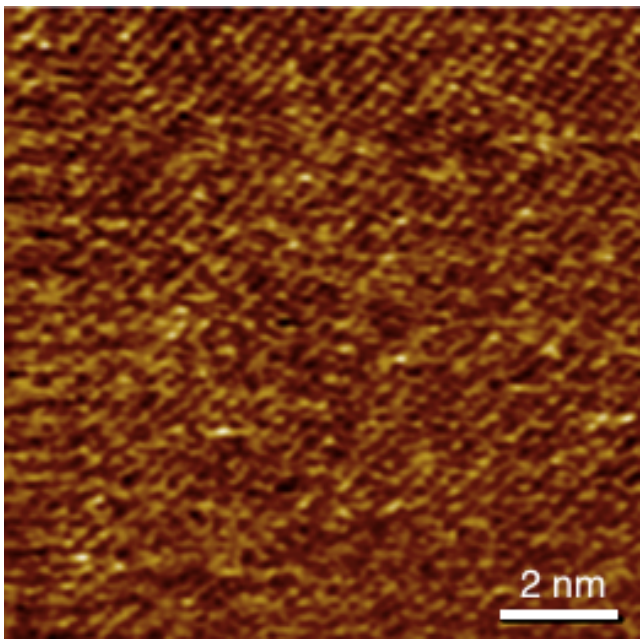
(c)

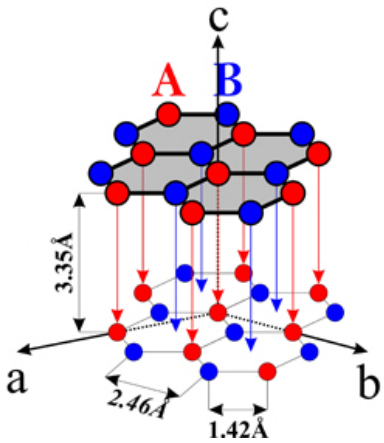


(d)

Şekil 4.12. (a) Sıvı içerisinde mikanın atomik adım görüntüsü, 5 µm x 5 µm (b) görüntü üzerinden çizilen çizgi ile ölçülen bir mika adımının Z yükseltisi. (c) Hidroflorik asite maruz bırakılmış mika yüzeyi üzerinde oluşan atomik adımların görüntüsü. 256 piksel, saf su içerisinde temassız modda alımıştır. Çizgi profili görüntü üzerinde çizilen bölgenin Z yükseltisini vermektedir.

Yüksek çözünürlük görüntülerinin devamı olarak tarama alanları küçültülerek havada değen modda 10 nm x 10 nm görüntü taranarak ile HOPG atom latisleri görüntülenmiştir (Şekil 4.13). Latisler arası mesafe 2.5 Å olarak kaydedilmiştir.

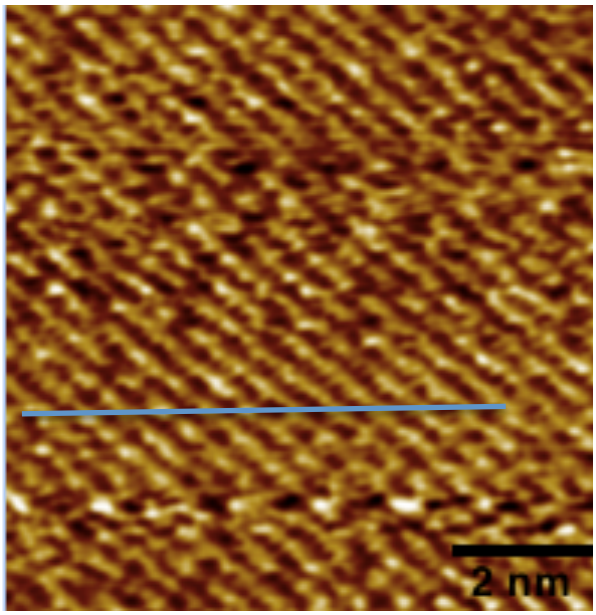


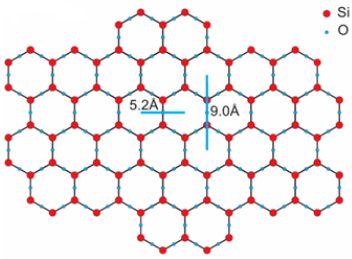


(a) (b)

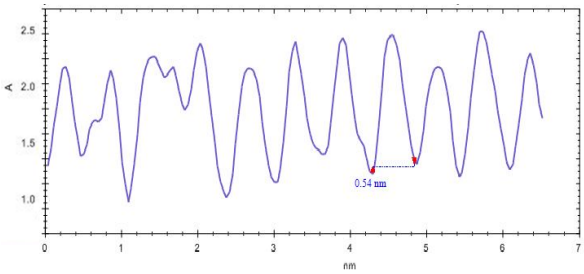
Şekil 4.13. (a) HOPG (Highly Oriented Prolytic Graphene) görüntüsü. 256 piksel, havada temaslı mod görüntüsü, (b) HOPG atomik latisler arası uzaklık gösterimi.

Yüksek çözünürlük görüntülerinin vazgeçilmezi olarak mika atomik latisleri temaslı modda 10 nm x 10 nm alan taranarak kaydedilmiş ve iki latis arası yaklaşık 5Å olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.14).





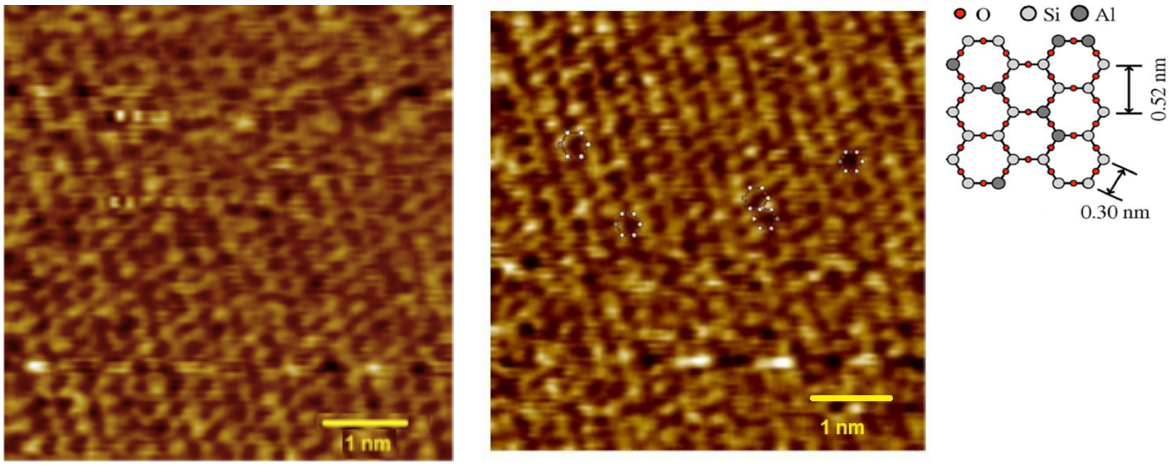
(b)



(a) (c)

Şekil 4.14. (a) Mika görüntüsü. 256 piksel, 10nm x 10nm, havada temaslı mod görüntüsü, (b) mika atomları arası uzaklık gösterimi, (c) görüntü üzerindeki çizginin Z profili.

Geliştirilmiş olan yüksek çözünürlük AKM ile temassız modda saf su içerisinde 5 nm x 5 nm görüntü taranarak mika atomlarının görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Mika görüntüsü. 128 piksel, saf su içerisinde temassız mod görüntüsü.

Geliştirilmiş olan ilk prototip ile karşılaştırıldığında, son prototip ile kaydedilen görüntülerde atomik çözünürlük kalitesine erişildiği gözlemlenmektedir. Ayrıca biyolojik örnekler ilede başarılı görüntülerin kaydedilebildiği ve bunların karakterizasyon amaçlı kullanılabildiği açıkca görülmektedir. Dolayısıyla bundan sonraki seçicilik ve hassasiyetin önemli olduğu çalışmalarda atomik çözünürlük verisi verebilen AKM ile çalışılması doğru sonuçların elde edilebilmesi açısından önem teşkil etmektedir.

4.2. Kuvvet Spektroskopisi Çalışmaları

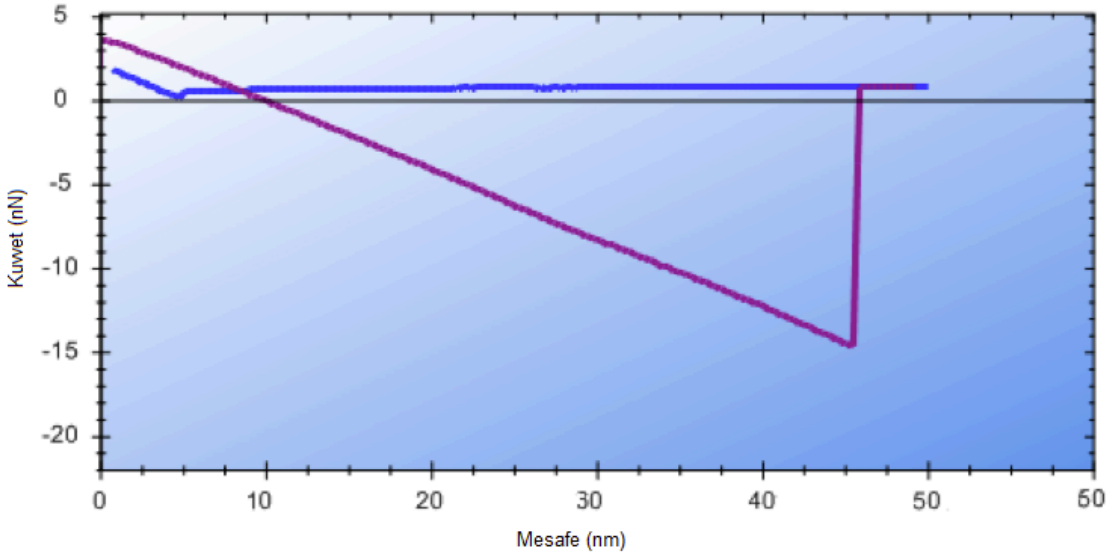
Tezin ikinci aşaması olarak AKM'nin KS özelliği ile biyomoleküllerin birbirleri arasındaki etkileşimlerinin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak cihazın performansını kontrol etmek adına literatürde varolan bazı çalışmalar örnek alınarak bir takım mika ve HOPG gibi substratlar ile cihazın KS ölçümlerinin validasyonu yapılmıştır. Daha sonra fonksiyonalize edilmiş AKM ucu ile reseptör ligand etkileşimlerine bakılmıştır.

4.2.1. AKM'nin KS Validasyonu

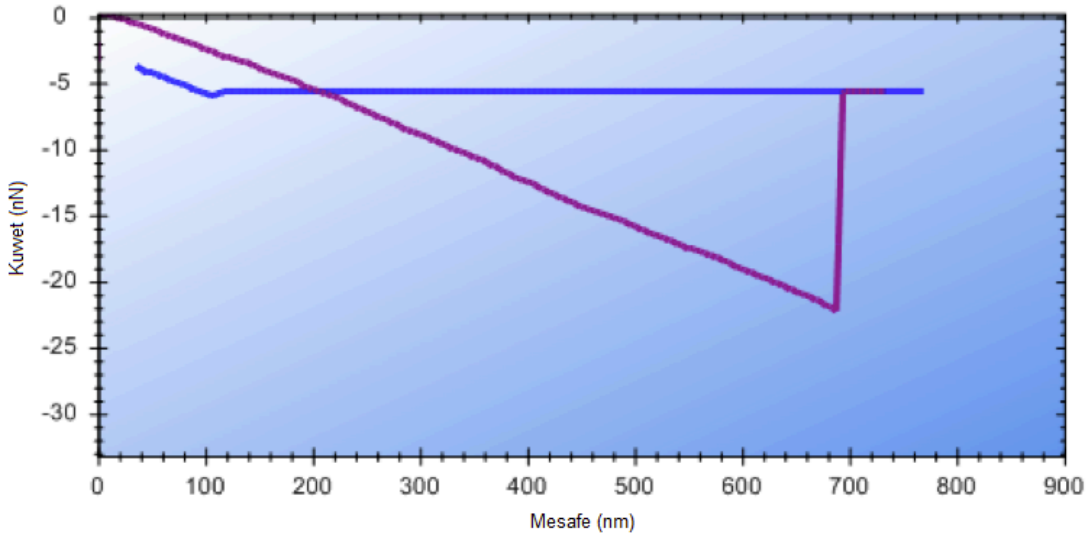
Yapılan bu deneyler sonucunda tasarlamış olduğumuz sıvıda çalışan yüksek çözünürlük AKM ile spektroskopi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ile sistemin hassasiyeti test edilmiş ve sistemi kontrol eden programın bu konudaki eksiklikleri giderilmiştir. Doğru yazılımın oluşturulabilmesi için çeşitli örnekler ile

literatür verilerinden faydalanılarak kuvvet spektroskopisi ve nanoindentasyon çalışmaları yapılmış ve bu konudaki yazılım eksiklikleri giderilmiştir.

Çalışmalarda mika ve polikarbon yüzeyi kullanılarak yüzeye yapışma kuvvet değerleri hesaplanmıştır. Mika için 100 nm piezo yerdeğiştirme ile 15 nN civarında; polikarbon için 1000 nm yerdeğiştirmede 25 nN yüzeye yapıştıkdan sonra kopma kuvveti KS eğrilerinden hesaplanmıştır. Bu sonuçların literatür ile tutarlılık gösterdiği görülmektedir [105]. Mika ve polikarbon için NMI-SPM programı ile elde edilen KS eğrilerinin grafikleri sırasıyla Şekil 4.16 ve 4.17'de gösterilmektedir.



Şekil 4.16. SPM programı ile mika üzerinde alınmış KS eğrisi. (Kullanılan kantilever: ContAl-Nanosensors).



Şekil 4.17. SPM programı ile polikarbon üzerinde alınmış KS eğrisi. (Kullanılan kantilever: ContAl-Nanosensors)

4.2.2. Tek Molekül Kuvvet Spektroskopisi Çalışmaları

AKM'lerin pikonewton seviyesinde kuvvet hassasiyeti ve nanometre seviyesinde konumsal doğrulukları sayesinde KS gibi teknikler, yüzey bilimi, malzeme mühendisliği, biyoteknoloji ve biyoloji araştırmalarında ve daha birçok çeşitli araştırma alanlarında önemli araçlar haline gelmişlerdir. İzole moleküllerin ve hücresel yüzeylerin bireysel ligand ve reseptörler arası etkileşim dinamiklerinin araştırılmasında ve anlaşılmasında bu teknikler büyük önem taşımaktadırlar [84]. Tezin bu kısmında reseptör-ligand etkileşimleri için bir prototip oluşturacak streptavidin ve biotin arasındaki kuvvet spektrumu modellenmiştir.

Biyomoleküller arasındaki etkileşimleri ölçebilmek için ilk olarak AKM sensörlerinin uygun ligand ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Uç modifikasyonu iki aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak AKM ucunun silikon grupları amin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir, daha sonra heterobifonksiyonel PEG bağlayıcılar aminli uca tutturulmuştur. PEG bağlayıcının diğer ucuna ise ilgili ligand bağlanmıştır.

Çalışmalarda her aşamanın doğru gerçekleştiğinden emin olabilmek için ilk olarak validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmalarında ucunda kantilever bulunmayan AKM sensörlerinin çipleri kullanılmıştır.

4.2.2.1. Uç ve Çipler Üzerindeki Molekül Sayılarının Belirlenmesi için Kalibrasyon Grafiğinin Çıkartılması

Deneyler sonucunda uç ve çipler üzerine bağlanan moleküllerin sayılarını tesbit edebilmek için farklı seyreltme oranlarındaki solüsyonlar hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği çıkartılması için bu aşamada Ekstravidin Peroksidaz (EAP) stok solüsyonunun farklı seyreltideki solüsyonları UV spektrofotometre ile ölçülmüştür. 1/200; 1:400; 1/600; 1:800; 1:1000 ve 1:1500 seyreltik solüsyonlar kullanılmıştır. 1 dakikadaki absorbans miktarları ölçülmüş ve peroksidaz molekül sayıları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Seyreltik solüsyonlar içerisindeki konsantrasyon hesaplamaları

Seyreltme Oranı	Konsantrasyon (mg/ml)
1:200	0.0100
1:400	0.0050
1:600	0.0033
1:800	0.0025
1:1000	0.0020
1:1500	0.0013

Spektro küvetinin içerisindeki molekül sayısı hesabı (1:200 seyreltme için anlatılmıştır. Diğer hesaplamalarda bu şekilde yapılmıştır.

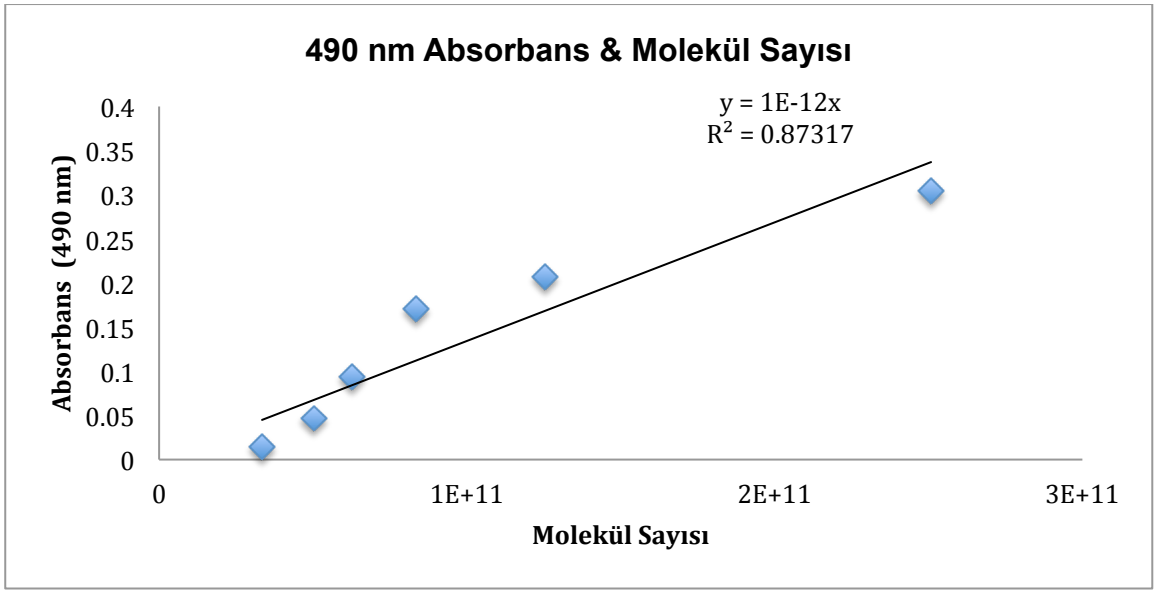
1:200 seyretme miktarı için konsantrasyon değeri 0.01 mg/ml'dir.

Küvet içerisine 5 µl eklenmiştir. Dolayısıyla küvet içerisindeki konsantrasyon miktarı $5*10^{-5}$ mg/ml, molekül sayısı $2.50 * 10^{11}$ molekül olarak hesaplanmıştır.

Diğer seyreltme oranları içinde hesaplamalar aynı şekilde yapılmıştır. Tüm oranlar için hesaplanan konsantrasyon ve molekül sayıları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Absorbansa bağlı konsantrasyon grafiği Şekil 4.18'de gösterilmektedir.

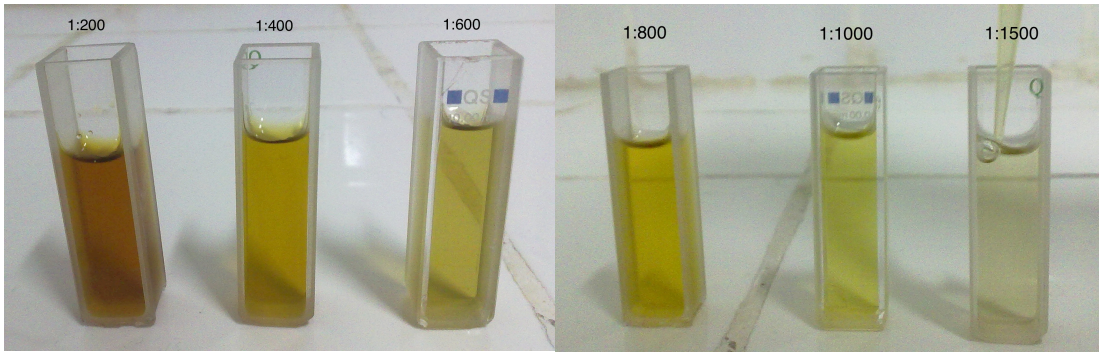
Çizelge 4.3. Seyreltik solüsyonlardaki protein miktarı

Seyreltme Oranı	Konsantrasyon miktarı (mg/ml)	Molekül Sayısı	Absorbans (490 nm)
1:200	0.00005	2.50833×10^{11}	0.304
1:400	0.000025	1.25417×10^{11}	0.207
1:600	0.0000167	8.36111×10^{10}	0.171
1:800	0.0000125	6.27083×10^{10}	0.094
1:1000	0.0000100	5.01667×10^{10}	0.047
1:1500	0.00000667	3.34444×10^{10}	0.014



Şekil 4.18. Kalibrasyon grafiği.

Solüsyonlardaki OPD ve peroksidaz enziminin tepkimesindeki neticesinde ortaya çıkan renk değişimi Şekil 4.19'da gösterilmektedir. Solüsyon içerisindeki molekül sayısı azaldıkça renk skalası kahverengiden açık sarıya yönelmiştir.

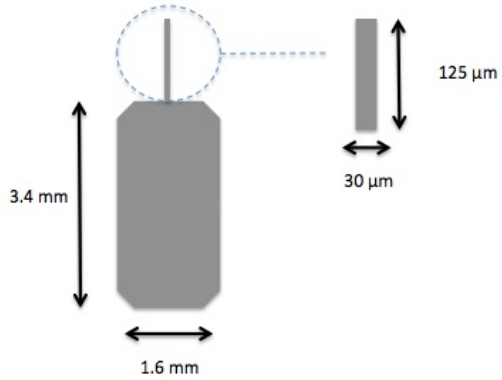


Şekil 4.19. Seyreltik solüsyonlarda tepkime sonucu oluşan renk değişimi

4.2.2.2. APTES ve Etanolamin Modifikasyon Yöntemlerinin Verimlilik Ölçümü Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu kısımda iki farklı amin modifikasyon yöntemi ile modifiye edilen çiplerin üzerindeki molekül sayıları yine enzim ölçüm yöntemi ile UV spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Çıkan sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmektedir. Molekül sayısı hesapları yukarıdaki kalibrasyon grafiğindeki konsantrasyon oranlarına göre hesaplanmıştır.

Kullanılan AKM çiplerinin boyutu 5 mm^2 olarak kabul edilmektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. AKM çiplerinin boyutları.

Yapılan hesaplamalar neticesinde çip yüzeyinde 1μm^2 alan üzerinde 10000 peroksidaz molekülü bulunduğu hesaplanmıştır. Satın alınmış olan EAP ürününün ürün kataloğunda Ekstravidin/Peroksidaz oranı = 0.75 olarak belirtilmiştir. Bu durumda 1μm^2 üzerinde ekstravidin molekül sayısı 7500 olarak hesaplanmıştır.

1 IgG molekülünün ortalama 4 biyotin molekülü barındırdığı kabul edilmektedir [105]. Bu durumda APTES ile aminlenmiş çipler üzerinde 1838 ± 38 adet, ETA ile aminlenmiş çipler üzerinde ise 1276 ± 47 molekülün 1 μm^2 üzerinde bulunduğu hesaplanmıştır. Bundan sonraki hesaplamalar bu şekilde yapılmıştır.

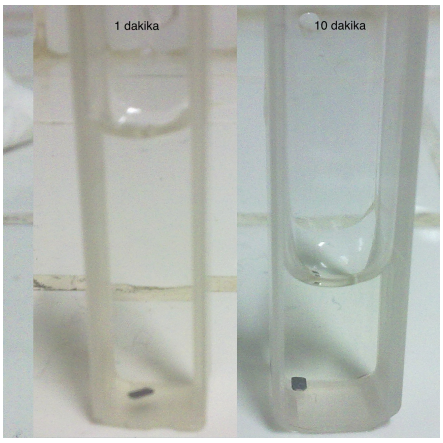
Çizelge 4.4. Amin modifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

MODİFİKASYON YÖNTEMİ	ABSORBANS (490)/1DAK	Molekül Sayısı/1μm^2
APTES	0.050	1875
APTES	0.048	1800
APTES	0.049	1840
ETA	0.030	1130
ETA	0.036	1350
ETA	0.036	1350

Çizelge 4.4'de farklı modifikasyon yöntemlerine göre uç üzerine tutturulmuş biyotin molekül sayıları hesaplamaları gösterilmektedir. Bu sonuçlar neticesinde mikrometre karelik bir alana bağlanan molekül sayıları dikkate alındığında APTES ile aminlemenin, etanolamine göre daha verimli olduğu gözlemlenmiş ve bundan sonraki deneylerde bu yöntem ile devam edilmiştir.

4.2.2.3. AKM Çipi Modifikasyonu Adımlarındaki Spesifik Olmayan Bağlanmaların Kontrol Deneyleri Sonuçları

OPD molekülü EAP ile spesifik etkileşimi sonucu renk değişimine sebebiyet vermektedir. EAP molekülü ise biyotin-IgG molekülü ile spesifik bağ kurmaktadır. Dolayısıyla ortamda biyotin-IgG molekülü bulunmadığında, EAP'nin herhangibir molekül ile bağ yapıp yapmamasını kontrol etmek için deneyin her aşamasından sonra OPD ile absorbans ölçümlerine bakılmıştır. Boş çip üzerine, aminlenmiş çip üzerine, Peglenmiş çip üzerine EAP inkübe edilmiş ve daha sonra spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu kısımda bekleme süresi uzatılmış fakat tepkime sonucu gerçekleşen renk değişimi gözlemlenmemiştir. Sonuçlar Şekil 4.21 ve Çizelge 4.5'de gösterilmektedir. Çip yüzeyleri üzerinde EAP molekülleri bağlanmayıp yıkama ile yüzey üzerinden ayrıldığı için spektrofotometre küvetleri içerisindeki solüsyonlarda OPD'ye bağlı renk değişimi gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.21. Küvet içerisindeki renk değişimleri

Çizelge 4.5. Kontrol deneyleri spektrofotometre absorbans değerleri sonuçları

KAPLAMA	ABSORBANS (490)/1DAK ve 10 dak. bekletilerek
BOŞ+EAP	0.000
APTES+EAP	0.000
ETA+EAP	0.000
APTES+PEG+EAP	0.000
ETA+PEG+EAP	0.000

NHS-PEG-SPDP çapraz bağlayıcı ile biyotin-IgG molekülünün tiyol gruplarından sülfit bağı yapılabilmesi için SATP molekülünün liganda bağlanması gerekmektedir. SATP molekülü biyotin-IgG molekülü üzerinde serbest sülfür grupları oluşturmaktadır. Çalışmada IgG moleküllerine bağlanmayan SATP moleküllerinin spesifik olmayan bağlanmalarının testi için SATP'li ve SATP'siz IgG molekülleri kullanılmış ve yine spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu denemeler 3 çip üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.6'da absorbans ve çiplerin üzerine bağlanan molekül sayıları verilmektedir.

Çizelge 4.6. SATP molekülünün EAP ile spesifik olmayan bağlanma miktarlarının tespiti

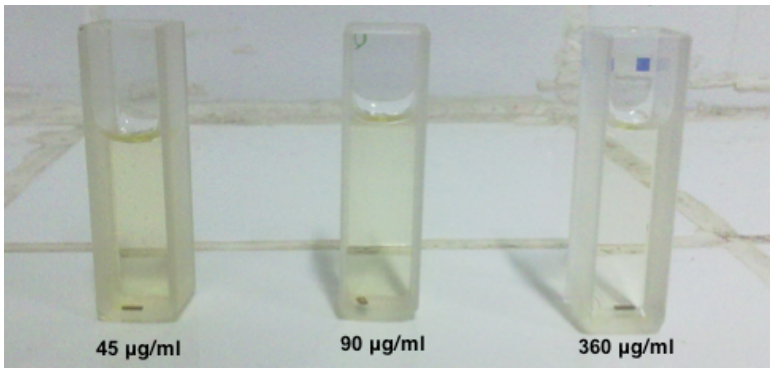
	A(490)/10DAK SATPsis	A(490)/10DAK /SATP'li
1	0.002 / 0*	0.047/ 1760*
2	0.000 / 0*	0.041/ 1540*
3	0.001 / 0*	0.041/ 1540*

*Absorbans miktarı (A 490 nm) / molekül sayısı

4.2.2.4. Farklı Miktarlarda Alınan IgG'lere Göre Hazırlanan Çiplerin Spektrofotometre ile Ölçümleri

Bağlanma verimliliğini arttırmak için kullanılan biyotinli IgG protein miktarları ile farklı oranlarda denemeler yapılmıştır. Şekil 4.22'de farklı miktarlarda biyotin-IgG kaplanmış çiplerin spektrofotometre küveti içerisindeki renk değişimleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.7'de elde edilen absorbans değerleri ve molekül sayıları hesaplamalarının sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 4.22. Renk değişimlerinin görünümleri

Çizelge 4.7. Madde miktarı farklarının karşılaştırılması

dakika	45 µg/ml IgG Abs/(Molekül/µm^2)	90 µg/ml IgG Abs/(Molekül/µm^2)	360 µg/ml IgG Abs/(Molekül/µm^2)	Referans (1:200 EAP solüsyonu) Abs/(Molekül/µm^2)
1	0.000/0	0.000/0	0.000/0	0.072/2700
2	0.005/188	0.002/75	0.002/75	0.108/4050
3	0.008/300	0.004/150	0.004/150	0.200/7500
4	0.015/563	0.006/225	0.006/225	0.223/8360
5	0.018/675	0.008/300	0.008/300	0.250/9380
15	0.039/1460	0.022/825	0.014/525	0.320/12000

Tutunan molekül sayısı en yüksek olduğu için, deneylerde kullanılması gereken protein miktarı 45 mg/µl olarak tesbit edilmiştir. Miktarın artırılması moleküllerin bağlanma yarışınıda arttırmakta, yoğunluktan dolayı sterik engeller ortaya çıkmakta, dolayısı ile moleküller hedef moleküle bağlanamayıp solüsyonda serbest dolanmaktadırlar [88].

4.2.2.5. Aldehit-PEG-TFP Çapraz Bağlayıcısı ile AKM Ucu Modifikasyonu

Çalışma kapsamında iki heterobifonksiyonel PEG alınmıştır. Bunlardan ilki (SPDP-PEG-NHS ester) önceki denemelerde kullanılmıştır. Bundan sonraki deneylerde ekstra SATP adımı ile uğraşmamak ve biyotinli IgG molekülünü direk amin gruplarından kovalent bağlayabilmek için aldehit - PEG-TFP ester kullanılmıştır.

Aldehit-PEG-TFP ester ile de aynı prosedür uç/çip üzerisinde denenmiş ve spektrofotometre ölçümlerine bakılmıştır. Alınan sonuçlar Çizelge 4.8'de gösterilmektedir. Deney adımları yine OPD ile biyotinli IgG ile kovalent bağlanması kontrol edilerek bir sonraki bağlanma adımına geçilmiştir. İlk olarak çipin üzeri APTES ile aminlenmiş ve OPD ile tepkimeye sokulmuştur ve renk değişimi gözlemlenmemiştir. Daha sonra PEG molekülü bağlanmış ve yine OPD ile tepkimeye sokulmuş ve yine küvet içerisinde renk değişimi gözlemlenmemiştir. Sonraki adımda farklı miktarlarda biyotinli IgG molekülü PEG'lenmiş yüzeye tutturulmuş ve renk değişimlerinden konsantrasyon hesaplamaları yapılmıştır. Molekül sayısı hesaplamaları neticesinde, tutunan molekül sayısı en yüksek olduğu için 45 µg/ml biyotinli IgG molekülünün kullanılmasının daha verimli olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.8. Aldehit-PEG-TFP ester ile yapılan spektrofotometre deneyi sonuçları

	Absorbans (490 nm)	**Molekül sayısı/ µm^2**
Aptes bağlanma sonrası	0	0
PEG bağlanma sonrası	0	0
45 µg/ml biyotinli IgG molekülünün bağlanması sonrası	0.041	1540
90 µg/ml biyotinli IgG molekülünün bağlanması sonrası	0.039	1460

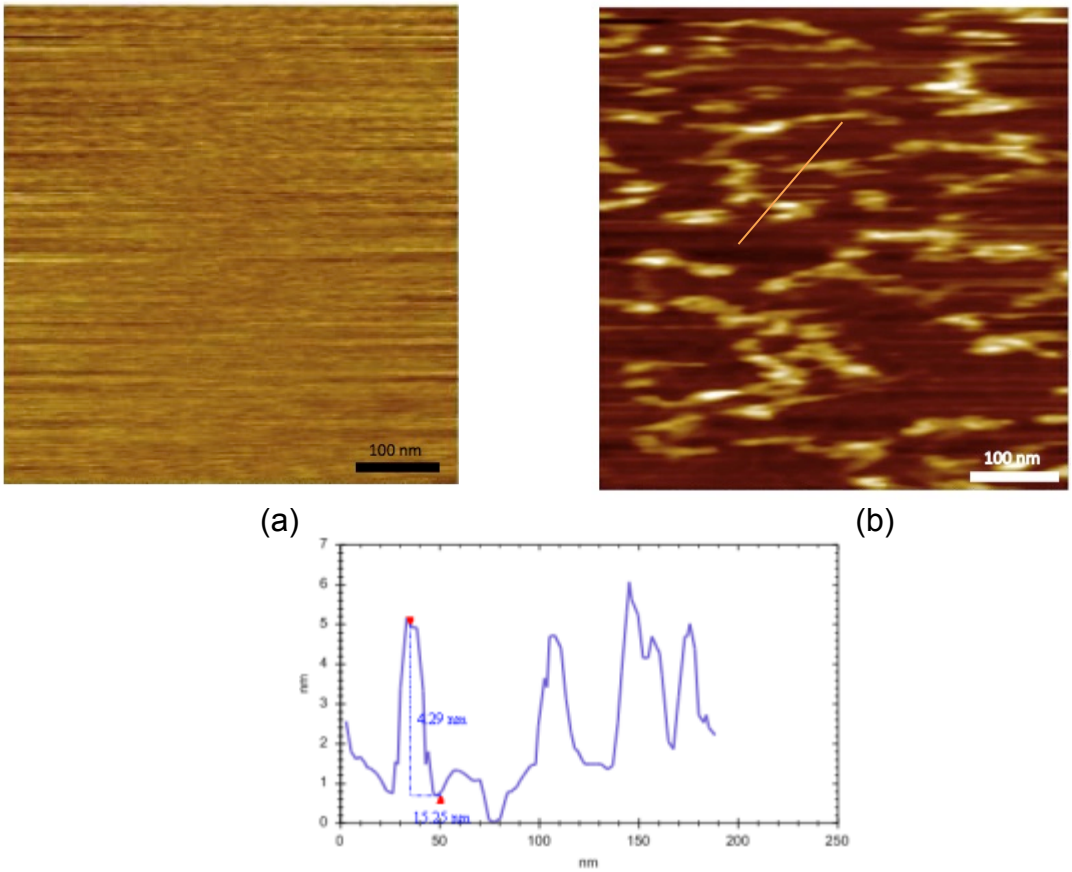
4.2.2.7. Modifiye Edilmiş Uçların AKM Spektroskopi Ölçümlerinin Sonuçları

Modifiye edilmiş uçların validasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra AKM ile kuvvet spektroskopisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında üzerine streptavidin kaplanmış boş mika yüzeyi ve modifiye edilmiş uçlar ile yüzey üzerindeki streptavidin molekülleri arasındaki kuvvet etkileşimlerine bakılmıştır.

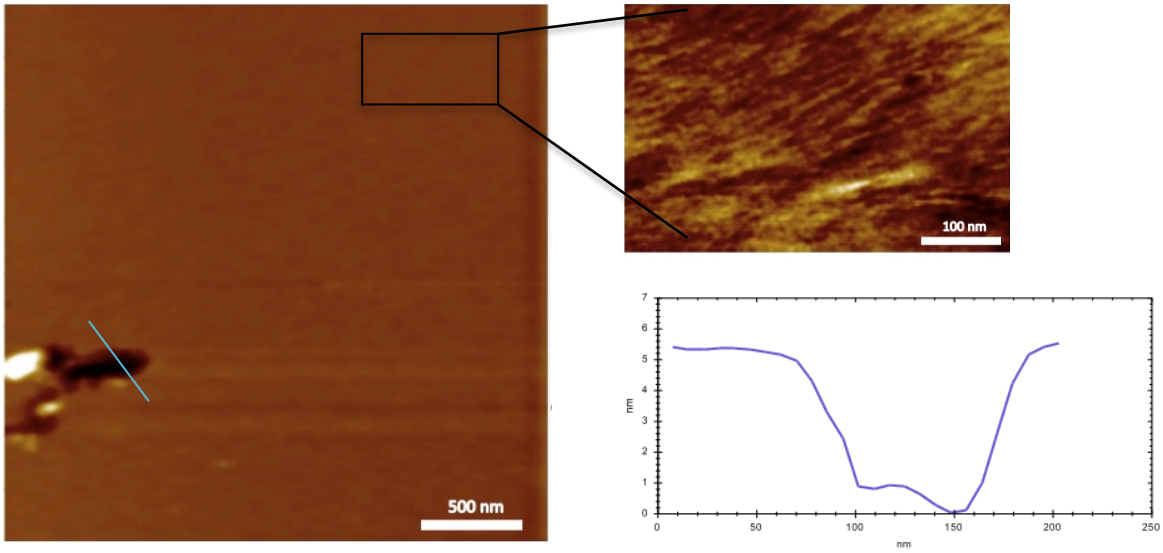
Yüzeyin streptavidin ile kaplandığından emin olmak için streptavidin kaplanmamış ve kaplanmış mika yüzeylerinin AKM ile sıvı içerisinde tıklamalı mod görüntüleri

alınmıştır (Şekil 4.23). Streptavidin molekülünün tek tabaka olarak tüm mika yüzeyini kaplaması, streptavidin-biyotin etkileşimlerini gösteren KS eğrilerinin rastgele bir noktada kaydedilebilmesi açısından önemlidir.

Yüzeyin streptavidin ile tek tabaka kaplı olup olmadığından emin olabilmek için AKM ile yüzey üzerinde çizme testi yapılmıştır. Literatürde kuvvet spektroskopisi deneyleri yapılırken ayrıca mika yüzeyine streptavidin molekülünün bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek için çizme çalışmaları gerçekleştirilmektedir [105]. Bu çalışmada mika üzerine 0.1 mg/ml streptavidin molekülü elektrostatik etkileşimler ile mika yüzeyine tutturulmuştur [105]. Yüzeyde 5 nm streptavidin tek tabakasının oluşturulduğu, AKM ucu ile çizme testi neticesinde gösterilmiştir. Şekil 4.24'de kuvvet spektroskopi eğrileri alınmadan önce yüzeye streptavidin molekülü bağlanarak gerçekleştirilmiş olan çizme testi sonuçları gösterilmektedir.

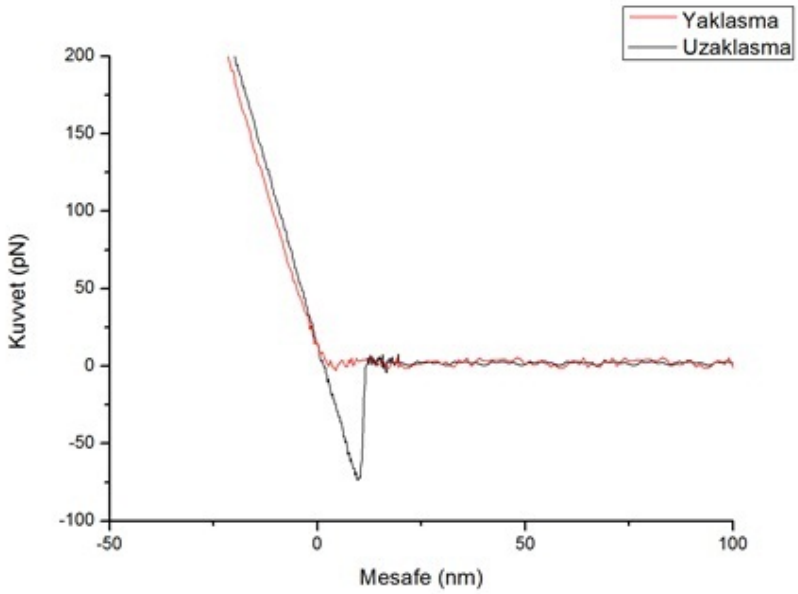


Şekil 4.23. a) Boş mika yüzeyinin fizyolojik salin içerisinde alınmış AKM görüntüsü, yükseklik skalası: 0-100 nm b) Streptavidin kaplı mika yüzeyinin fizyolojik salin içerisinde alınmış AKM görüntüsü, yükseklik skalası: 0-7 nm c) streptavidin kaplı mika yüzeyi üzerinden alınan Z yükseklik profili.

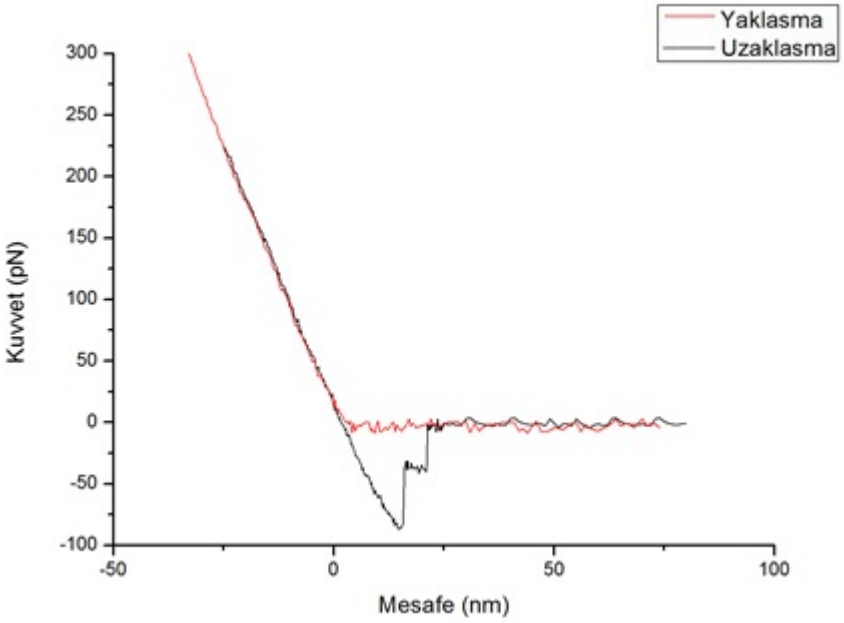


Şekil 4.24. Çizme testi sonuçları. Yükseklik skalası: 0-20 nm (büyük resim); 0-7 nm (küçük resim)

Streptavidin kaplanmamış boş mika yüzeyi üzerinde, modifiye edilmiş AKM ucu ile alınan KS eğrileri Şekil 4.25'de gösterilmiştir. Şekil 4.25 (a)'da ucun mika yüzeyine yaklaşırken bir anda yapışması ile elde edilen kuvvet mesafe eğrisi gösterilmektedir. Şekil 4.25 (b)'de ucun mika yüzeyine bağlanıp bir süre sonra kopmasını gösteren kuvvet mesafe grafiği verilmektedir.



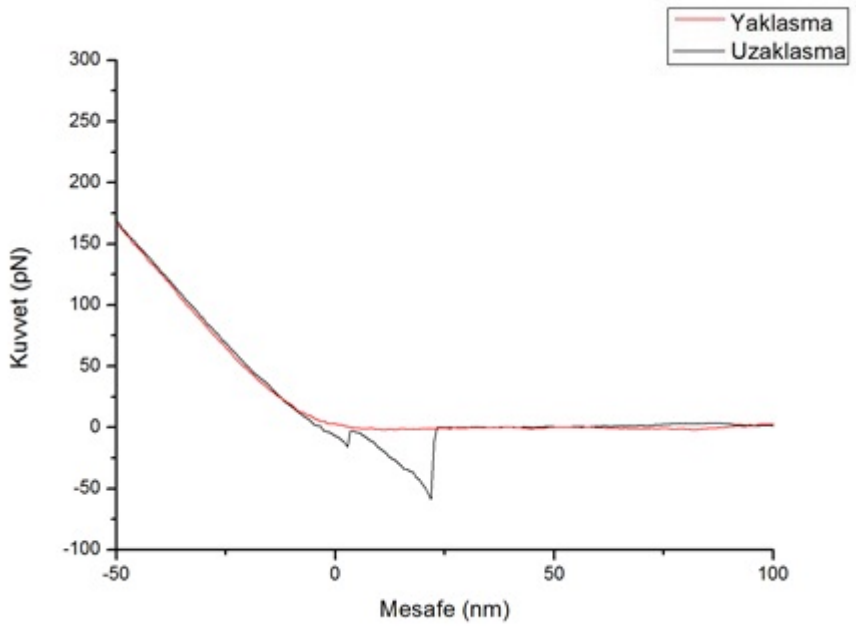
(a)



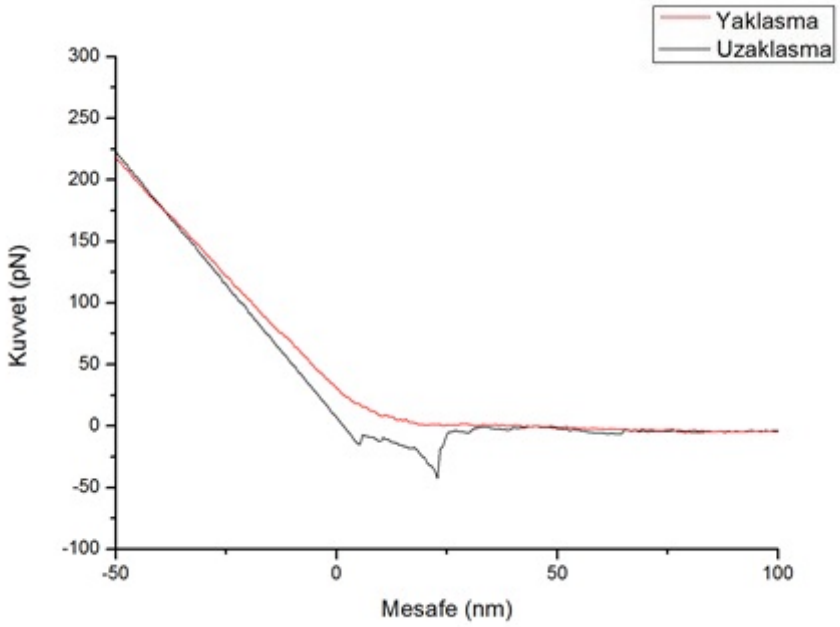
(b)

Şekil 4.25. Boş mika yüzeyi ve modifiye edilmiş uç ile arasındaki etkileşim sonucu oluşan kuvvet mesafe eğrileri a) mikaya direk bağlanma ve kopmayı gösteren KS eğrisi, b) mikaya bağlanıp belli bir süre sonra ucun kopmasını gösteren KS eğrisi.

Çalışma kapsamında streptavidin kaplı olan mika yüzeyi ile modifiye edilmiş uç arasındaki kuvvet etkileşimlerine yüzey üzerindeki birçok alandan ve farklı noktalardan bakılmıştır. Deneylerde birden çok modifiye edilmiş kantilever kullanılmıştır. Herbir ölçümde 100 adet kuvvet mesafe eğrisi kaydedilmiştir. Birkaç farklı bağlanma grafikleri Şekil 4.26'da gösterilmektedir. Uç yüzeyden ayrılırken ilk olarak mika ile yapışma gözlemlenmekte ve daha sonra streptavidin biyotin etkileşiminden kaynaklı olan bağlanma sonucu eğri şeklinde bir uzama ve maksimum kuvvete erişildiğinde ani bir kopma gözlemlenmektedir. Şekil 4.26 (b)'de yaklaşma ve uzaklaşma eğrileri arasında bir miktar hysterisis oluşmuştur. Bu durumun nedeni sistemde tüp piezo kullanılması ve uzun süre çalışma sonucu ısınma kaynaklı olarak Z yönü haricinde XY yönlerine doğru eğilim göstermesi ve böylece tip uzaklaşmdan önce hareket zamanının uzamasıdır.



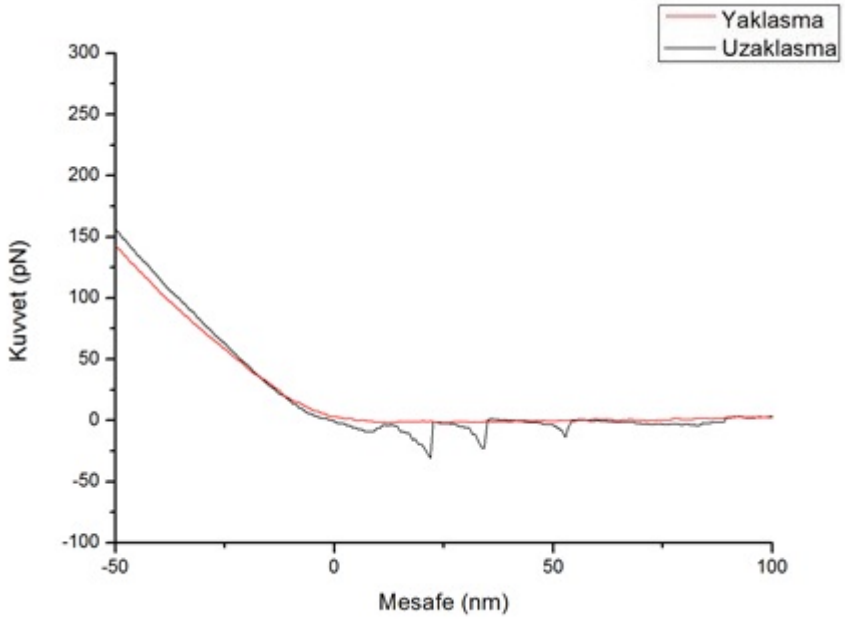
(a)



(b)

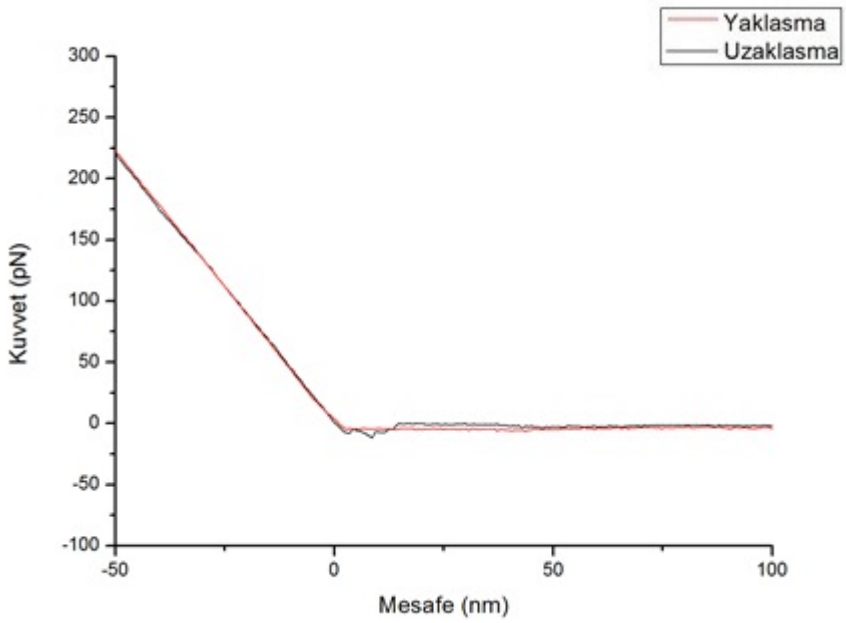
Şekil 4.26. a),b) Streptavidin ve biyotin etkileşimleri kuvvet spektroskopi eğrileri.

Streptavidin biyotin etkileşimlerinde yüzeydeki streptavidin moleküllerinin birden çok biyotin molekülünün streptavidin kaplı yüzeye bağlandığı KS eğrileride gözlemlenmiştir. Şekil 4.27'deki KS eğrisi bu duruma örnek olarak gösterilmektedir.



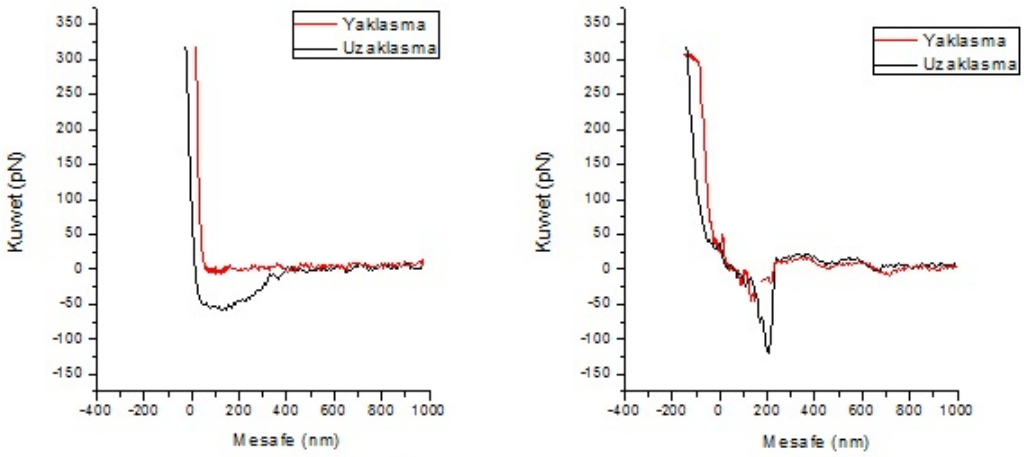
Şekil 4.27. Uçtaki birkaç biyotin molekülünün yüzeye bağlanması.

Streptavidin biyotin KS eğrilerinin doğruluğunun kanıtlamak için streptavidin kaplı mika yüzeyi biyotin ile bloklanmıştır. Böylece streptavidin moleküllerinin AKM ucundaki biyotin moleküllerine bağlanması engellenmiştir. Bloklama neticesinde herhangibir bağlanma kuvveti gözlemlenmemekte ve yaklaşma ve uzaklaşma eğrileri aynı paterni izlemektedirler. Bloklama deneyi sonucunda kaydedilen kuvvet mesafe eğrisi Şekil 4.28'de gösterilmektedir.



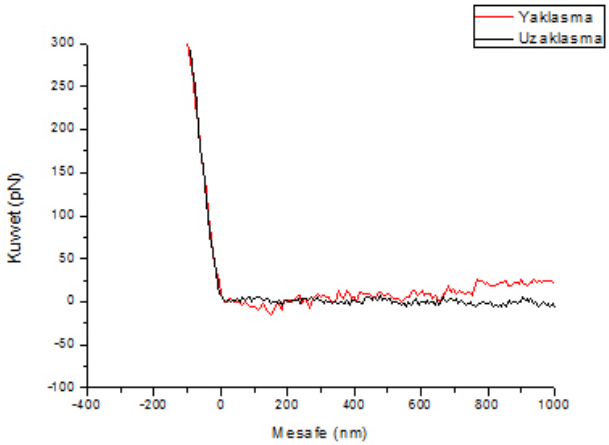
Şekil 4.28. Bloklanmış yüzey ile modifiye ucun KS eğrisi.

Ayrıca lizozim ve lizozozim baskılanmış polimer yüzey arasındaki etkileşim kuvveti KS eğrileri ile kaydedilmiştir. KS eğrileri yine faklı bölgelerden 100 adet alınmıştır. Polimer yüzey üzerinde spesifik bağlanma bölgeleri ile etkileşime girmemiş olan lizozim bağlı uç ile yüzey arasındaki etkileşimi gösteren KS eğrisi Şekil 4.29 (a)'da gösterilmektedir. Bu eğride PEG bağlayıcı molekülün tipik olarak kopma eğrisinde oluşturduğu içbükey parabolik şekil gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla bu bölgede spesifik bağlanma oluşmamıştır. Fakat Şekil 4.29 (b)'deki eğride lizozim molekülü ile lizozim baskılanmış polimer yüzey üzerindeki yapay reseptörlerdeki bağlanma noktaları arasındaki spesifik bağlanma gözlemlenmektedir. Bu etkileşimler piezonun Z yönündeki 1000 nm'lik hareketine karşılık yaklaşık 125 pN olarak ölçülmüştür. Spesifik bağlanmanın gerçekleştiğinin bir kanıtı olarak bu deneylerde de örnek yüzeyi spesifik molekül yani lizozim ile bloklanmış ve lizozim bağlı AKM ucu ile etkileşiminin KS grafiği Şekil 4.30'da gösterilmektedir.



(a) (b)

Şekil 4.29. (a) lizozim molekülünün spesifik olmayan bağlanmasının KS eğrisi. (b) lizozim molekülünün polimer yüzey üzerindeki farklı bağlanma bölgeleri ile arasındaki etkileşimlerinin KS eğrisi.



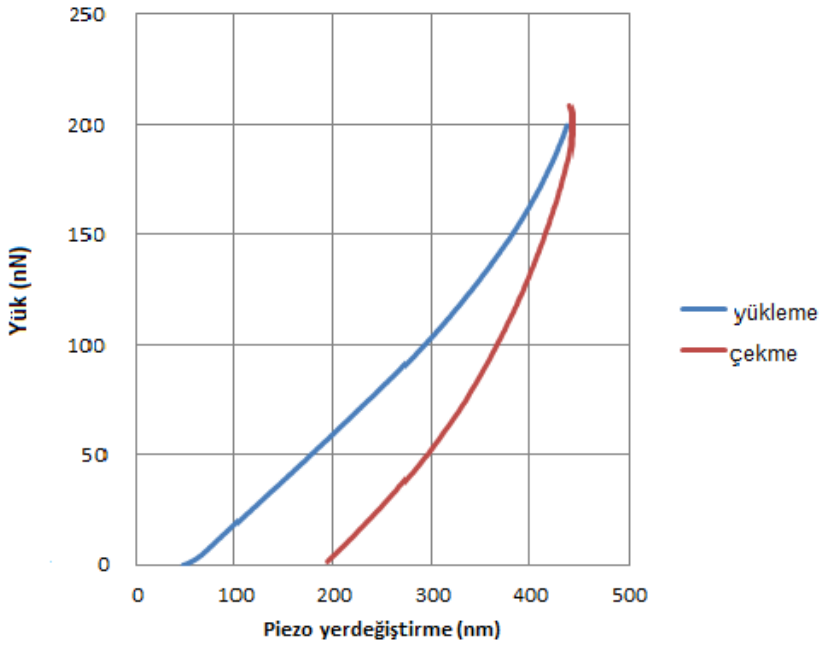
Şekil 4.30. Bloklanmış polimer yüzey ile lizozim bağlı uç arasındaki etkileşim.

4.3. Nanoindentasyon Çalışmaları

Tezin son dönem çalışmalarında AKM'nin yine mekanik sensör özelliklerinden faydalanılarak, nanotübüler metal implant yapıların hücrelerin biyomekanik özellikleri üzerindeki etkileri kuvvet spektroskopisi ile incelenmiştir. İlk olarak cihazın yazılım hesaplarından emin olabilmek için elastik modülü bilinen örnekler ile validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra anodizasyon sonucu oluşturulan TNT'lerin üzerine yerleştirilmiş olan Saos-II hücrelerinin elastisiteleri belirlenmiştir. TNT çaplarının ve hücre kültürü inkübasyon sürelerinin hücre elastikliği üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İndentasyon eğrilerinden elde edilen hesaplamalar sonucunda hücrelerin mekanik özellikleri ile ilgili sonuçlara varılmıştır.

4.3.1. Nanoindentasyon Validasyon Çalışmaları

Hücrelerin biyomekanik özelliklerini belirleme çalışmaları öncesinde yine literatür verileri ile karşılaştırma yapabilmek ve AKM'nin indentasyon validasyonu gerçekleştirmek için mika, polikarbon ve HOPG üzerinde indentasyon eğrileri kaydedilmiştir.



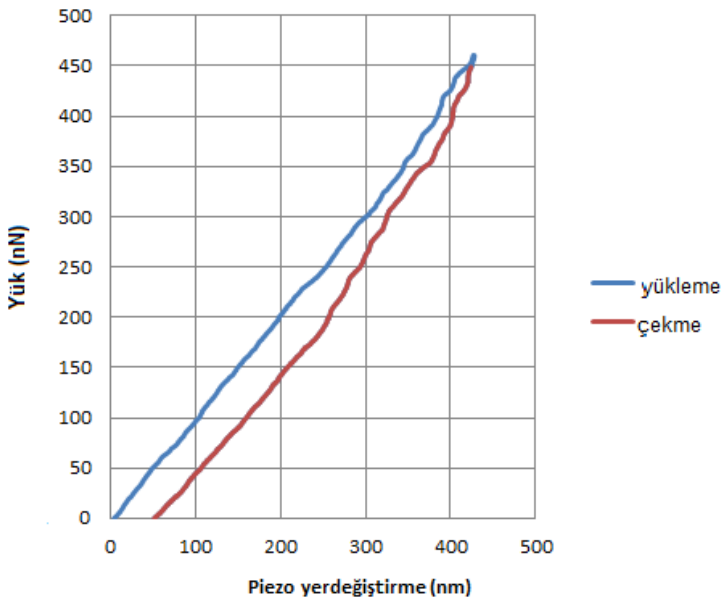
Şekil 4.31. Mika üzerinde alınmış indentasyon eğrisi.

Şekil 4.31'de gösterilen eğriye göre mika üzerine yapılan nanoindentasyon temas alanı, sertlik ve mikanın elastik modülü Çizelge 4.9'da hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9. Mikanın elastik modülü hesaplamaları

Pmax. (maksimum yük):	200 nN
hmax. (maksimum indentasyon yükseltisi):	400 nm
hc (temas yükseltisi):	200 nm
Ac (Temas alanı):	9.8×10^5 nm^2
S (Sertlik):	1.17 GPa
E (Elastik modulus):	173 GPa

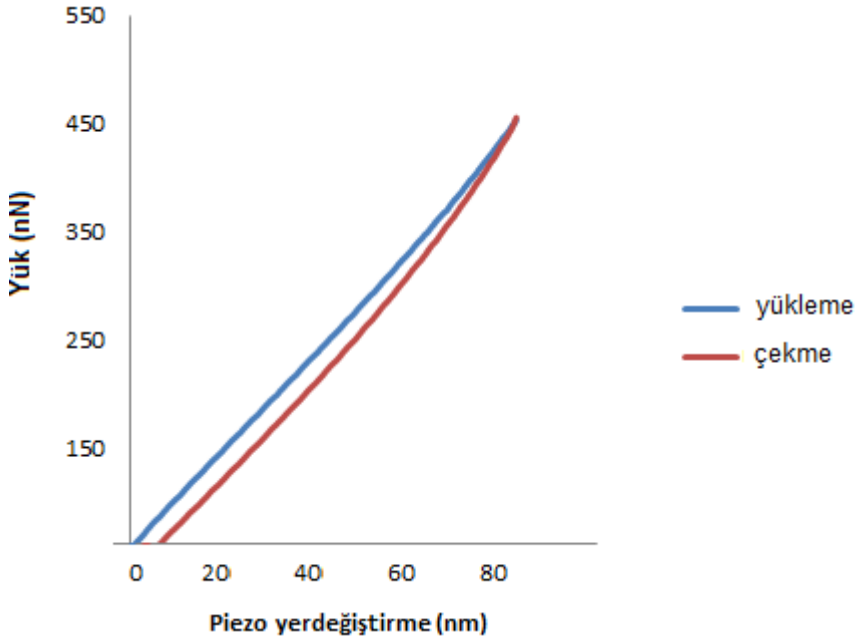
Hesapların tutarlılığı ve çeşitlilik açısından deneyler polikarbon ve HOPG yüzeyleri üzerinde de denenmiştir. Polikarbon yüzeye ait indentasyon eğrisi ve hesaplamalar sırasıyla Şekil 4.32 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir. HOPG yüzeyine ait dişleme eğrisi ve hesaplamalar sırasıyla Şekil 4.33 ve Çizelge 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.32. Polikarbon üzerinde alınmış indentasyon eğrisi.

Çizelge 4.10. Polikarbon elastik modülü hesaplamaları

Pmax. (maksimum yük):	450 nN
hmax. (maksimum indentasyon yükseltisi):	448 nm
hc (temas yükseltisi):	397 nm
Ac (Temas alanı):	$1.9x10^5$ nm^2
S (Sertlik):	0.24 GPa
E (Elastik modulus):	1.76 GPa



Şekil 4.33. HOPG üzerinde alınmış indentasyon eğrisi.

Çizelge 4.11. HOPG elastik modülü hesaplamaları

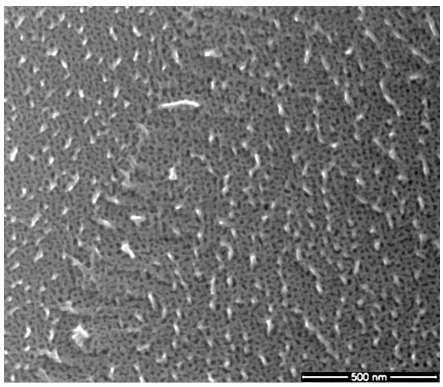
Pmax. (maksimum yük):	456 nN
hmax. (maksimum indentasyon yükseltisi):	82 nm
hc (temas yükseltisi):	79 nm
Ac (Temas alanı):	$1.5x10^5$ nm^2
S (Sertlik):	30.4 GPa
E (Elastik modulus):	52.1 GPa

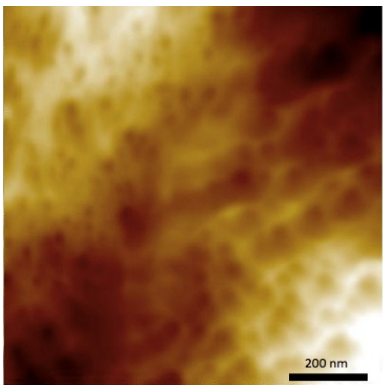
Bu hesaplamalar literatür ile karşılaştırıldığında sonuçlar uyumluluk göstermektedir [169-171]. Cihazın ve yazılım hesaplamalarının doğru çalıştığından emin olduktan sonra hücreler üzerinde elastisite çalışmalarına yönelinmiştir.

4.3.2. TNT Üzerine Yerleştirilmiş Hücrelerin TEM ve AKM ile Görüntülenmesi

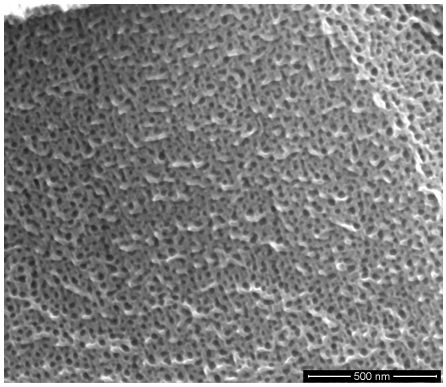
Titanyum plakaların rastgele dağılan tepeleri ve çukurları anodik oksidasyon yöntemi ile uniform nanotübüler yapılara dönüştürülmüştür. Elde edilen yapıların çap genişlikleri, yüzey dağılımları ve yüzey pürüzlülük oranları TEM ve AKM ile görüntülenmiş ve karakterize edilmiştir. 10V,15V, 20V, 25V, 30V, 35V, 40V ve 45V potansiyel fark uygulanarak elde edilen yüzeylerin ve anodizasyona uğramamış yüzeyin TEM ve AKM görüntüleri sırası ile Şekil 4.34'de gösterilmektedir.

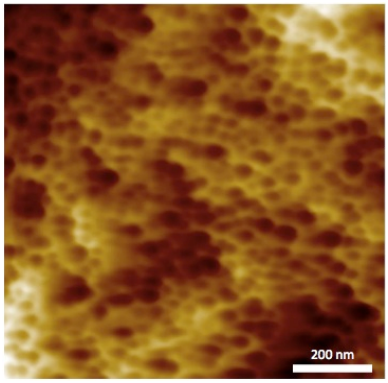
10v



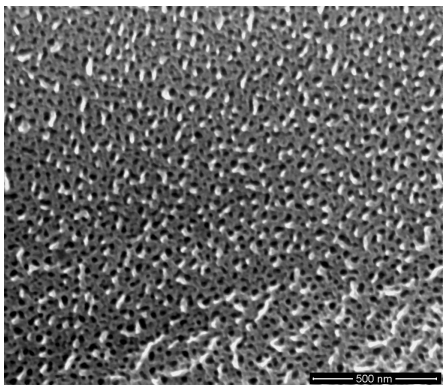


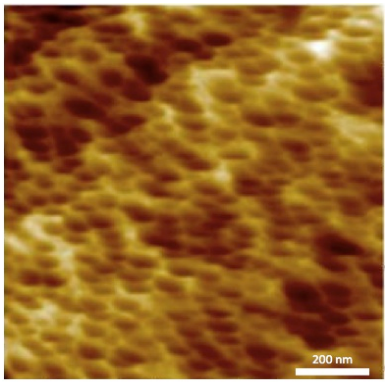
15v



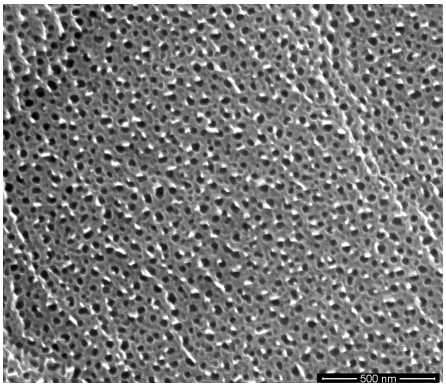


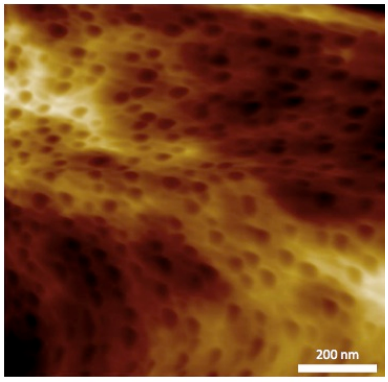
20V



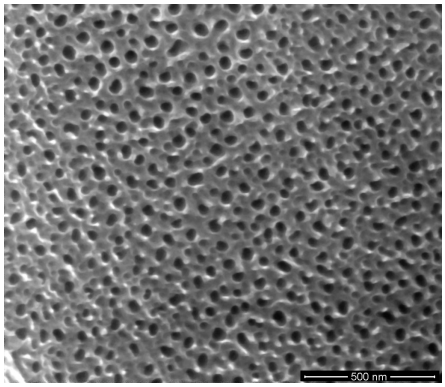


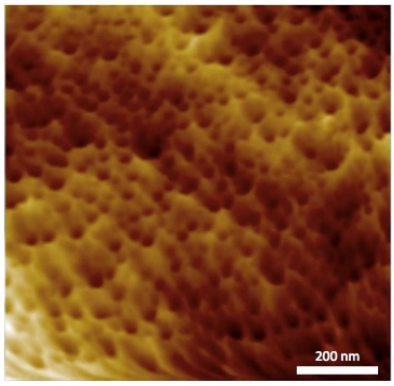
25V



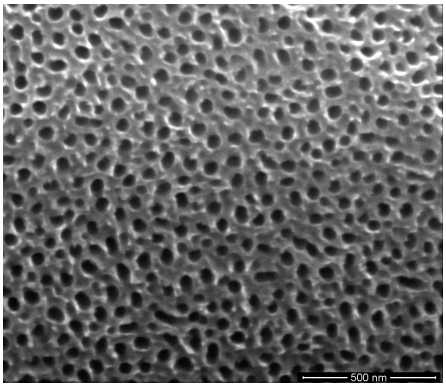


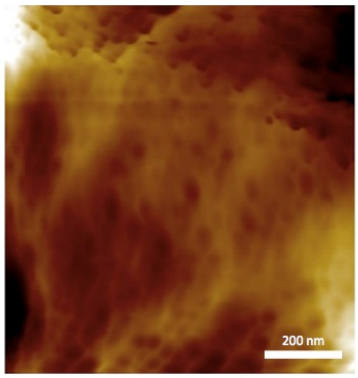
30V

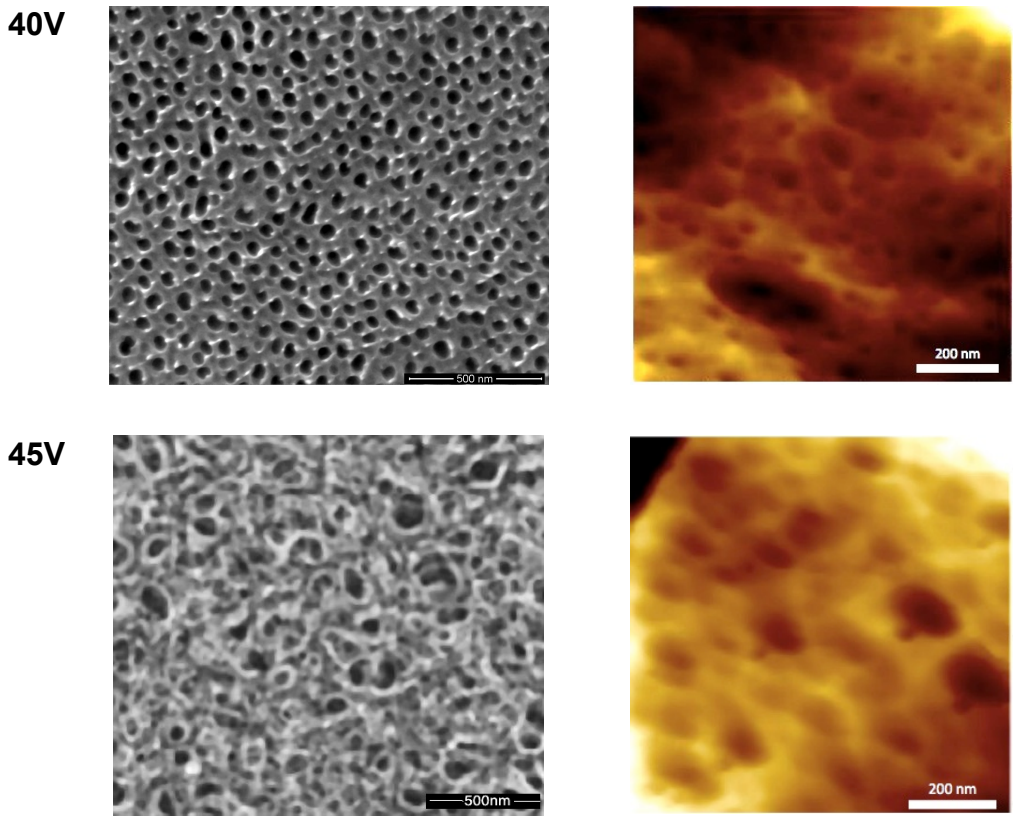




35V



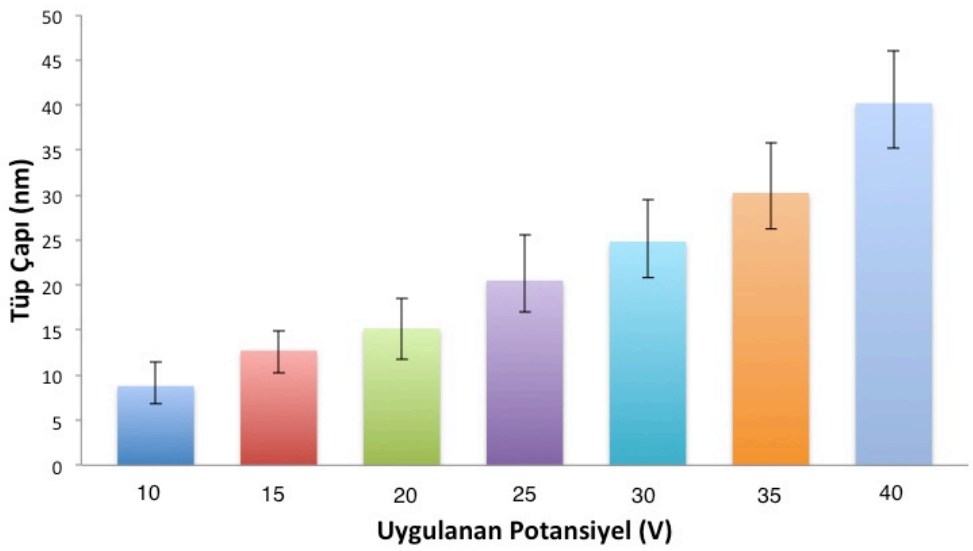




(a) (b)

Şekil 4.34. Anotlanmış yüzeylerin (a) TEM görüntüleri, (b) AKM görüntüleri.

Elde edilen görüntülerde uygulanan potansiyel gerilim değerleri 10 V'dan 40 V'a doğru arttığında yüzey morfolojisinin değiştiği gözlemlenmiştir. Buna göre 10 V potansiyel gerilim uygulanan örneklerde çap genişlikleri 8-10 nm arasında değişen (ortalama 8.8±2.3 nm) nanotübüler bir yapılanma görülürken, voltaj değeri 40 V'a çıkarıldığında ise çap genişliği 4.5 kat artmış ve ortalama 40±5.4 nm olarak hesaplanmıştır. 45V potansiyel fark uygulandığında ise nanotübüler yapıların morfolojisinde bozulmalar gözlemlenmiştir. Titanyum nanotüplerin voltaj değerlerine göre değişen çapları Şekil 4.35'de gösterilmektedir. Çaplar ImageJ programı ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.35. Titanyum nanotüplerin uygulanan potansiyele göre çap dağılımı.

Ayrıca titanyum plakalar AKM ile taranarak taranan bölge üzerinden yüzey pürüzlülük parametreleri NMI-SPM programı tarafından hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Çizelge 4.12'de gösterilmektedir. Pürüzlülük değerlerinden *Ra*, averaj pürüzlülük oranı, *Rq*, bölgenin hesaplanan alansal değerlerinin karekök değerleri, *Ssk*, yükseklik dağılımının asimetrisini, *Sku* değeri ise yüzey topografya dağılımındaki düzensizlik oranını göstermektedir. Artan voltaj değerlerine göre *Ra* ve *Rq* değerlerininde arttığı dolayısıyla tüplerin çaplarının artması ile doğru orantılı olarak yüzey pürüzlülük oranınında da artma gözlemlenmiştir. Bunun nedeni anodizasyon volatjının arttırılması ile florür iyonlarının titanyum çözünmesi ile oluşan tüplerin içine doğru penetrasyonun hızlanması ve böylece yüzey alanını arttırmasıdır [172]. Çap büyüdükçe tüpler arası duvarlarda incelme gözlemlenmiş ve morfolojik yapıda düzensizlik oluşmuştur [173]. *SSk* değerlerine göre ssk=0 ise tepecikli düz bir yüzeydir; ssk<0 ise yüzey çukurlu engebeli bir yüzeydir; ssk>1 ise yüzey üzerinde yüksek çukurların ve tepelerin olduğunu gösterir. Çıkan sonuçlara göre yüzeyler üzerinde yüksek çukurlar ve tepeler bulunmaktadır. *Sku* değerlerine göre değerlerin 3'e yaklaşması oranın Gaussian dağılım verdiğini gösterir, düşük değerler geniş dağılım verirken, büyük değerler dar bir bir dağılım vermektedir. Deney sonuçlarına göre yüzey pürüzlülük dağılımının Gaussian dağılım verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum yüzey yükseltilerinin yani nanotüplerin yüksekliklerinin uniform dağılım gösterdiğini belirtmektedir. Yüzey pürüzlülük parametreleri Çizelge 4.12'de verilmektedir.

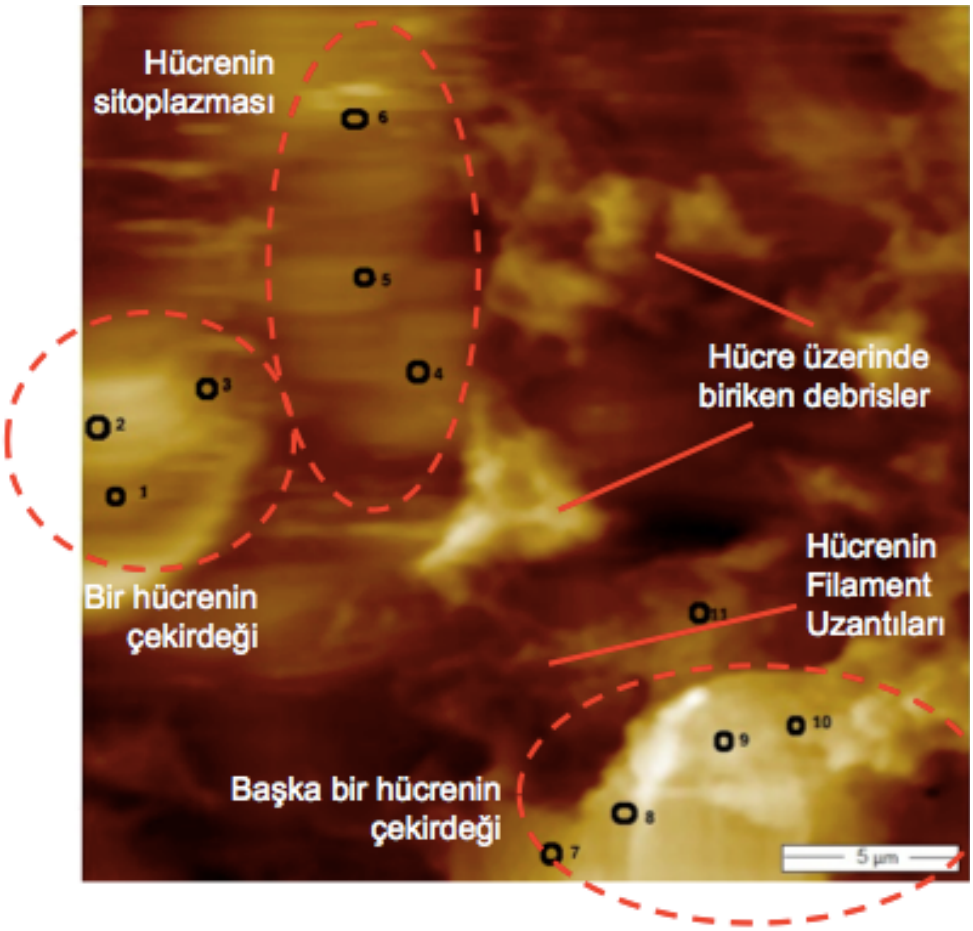
Çizelge 4.12. Yüzey pürüzlülük parametreleri ve tüp çapları

	Çap (nm)	Ra (nm)	Rq (nm)	Ssk	Sku
10V	8.8 +/- 2.3	6,82	8,63	1,71	3,65
15V	12.74 +/-2.4	10,64	12,20	1,30	1,85
20V	15.02 +/-3.4	11,04	14,05	1,64	3,17
25V	20.51 +/- 4.3	14,89	18,03	1,53	2,73
30V	24.83 +/-4.3	16,06	20,20	1,59	2,99
35V	30.24 +/-4.8	23,32	30,38	1,64	3,03
40V	40.21 +/-5.4	30,83	40,20	1,66	3,19

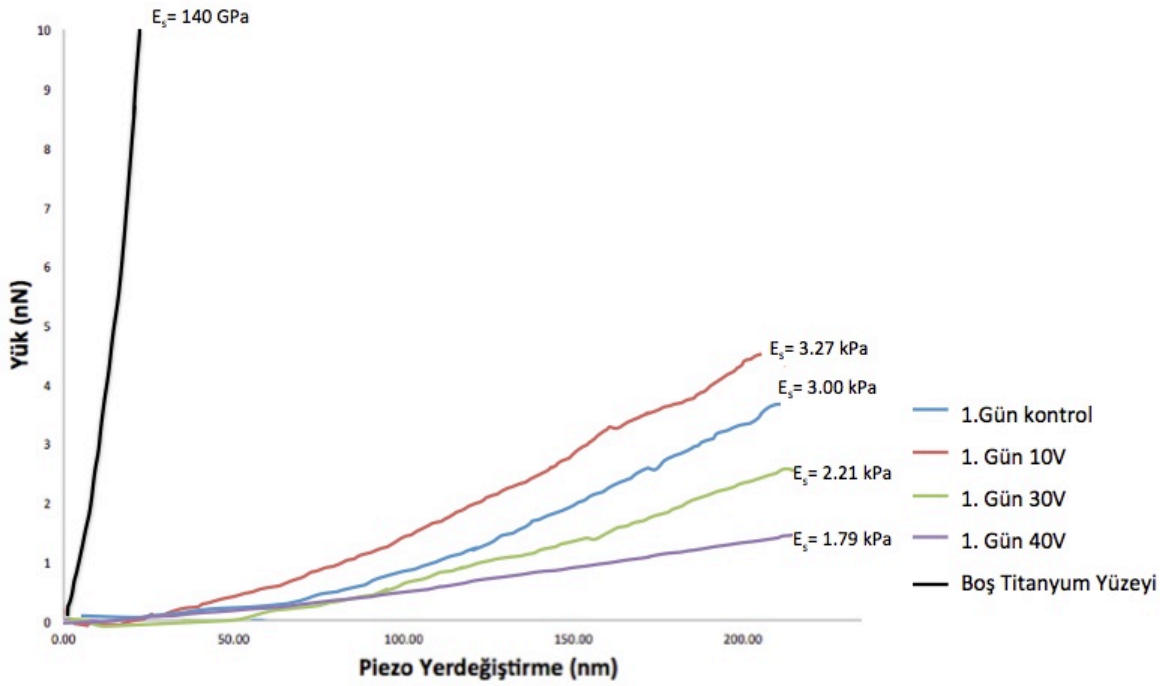
4.3.3. TNT Üzerindeki Hücrelerin Elastisite Ölçüm Sonuçları

Sırasıyla 8.8 +/- 2.3 nm, 24.83 +/-4.3 nm, 40.21 +/-5.4 nm çaplardaki nanotüplerin oluşturulduğu 10V, 30V ve 40V potansiyel farka maruz bırakılmış titanyum plakalar ve anotlanmamış titanyum plakalar üzerine osteosarkoma benzeri Saos-II hücreleri eklenmiştir. Hücrelerin elastiklik tesleri 1., 9. ve 15. günlerde AKM ile nanoindentasyon eğrileri kaydedilerek hesaplanmıştır.

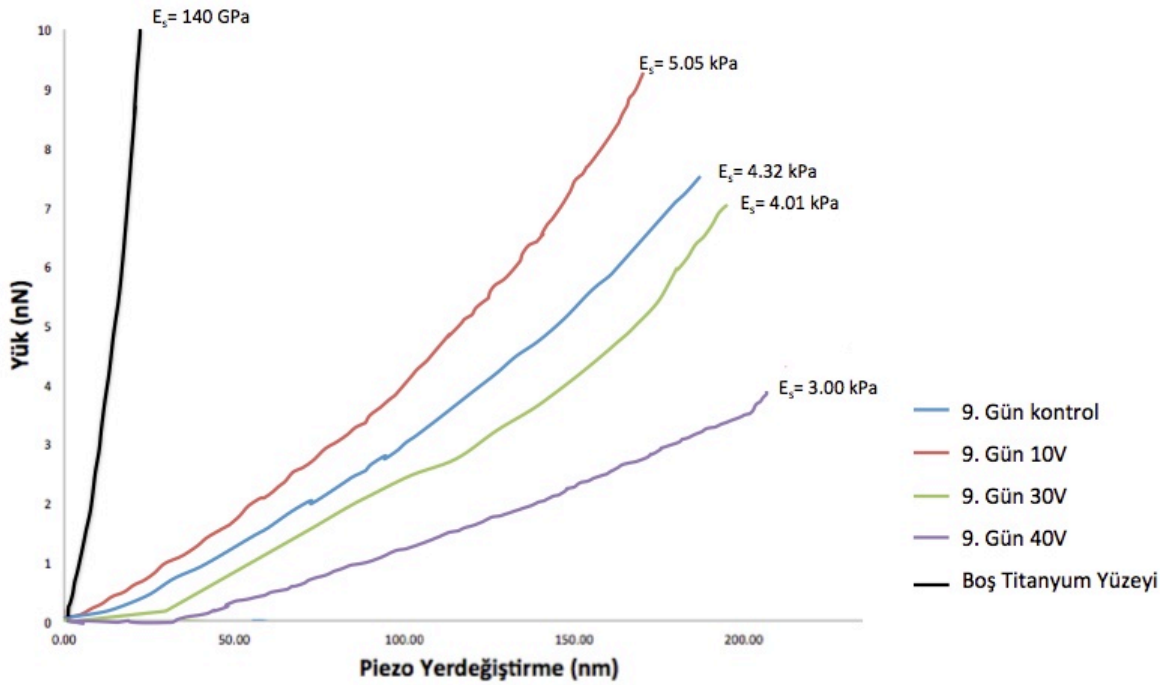
NMI-SPM programının indentasyon özelliği ile tarama yapılan bölgenin üzerinden istenilen noktadan kuvvet yerdeğiştirme eğrileri kaydedilmiştir. 15 günlük inkübasyon sonucu 10V potansiyel fark uygulanarak elde edilmiş olan titanyum plaka üzerinde büyütülmüş hücrelerin üzerinde seçilen noktaları gösteren AKM görüntüsü Şekil 4.36'da gösterilmektedir. Bu görüntüde iki hücre yanyana kaydedilmiş ve hücrelerin sitoplazma, çekirdek ve filamentleri üzerinden indentasyon noktaları belirlenmiştir. Kuvvet-yerdeğiştirme eğrilerinden elde edilen nanoindentasyon eğrileri Şekil 4.37'de gösterilmektedir. Farklı noktalardan her voltaj değeri ve gün için ortalama 25 noktadan elde edilen eğriler ile Saos-II hücreleri için elastik modüller hesaplanmıştır. Veriler IBM SPSS Statistics v.22 programı kullanılarak iki-yönlü varyans analizi (ing: two-way Anova) ile test edilmiştir.



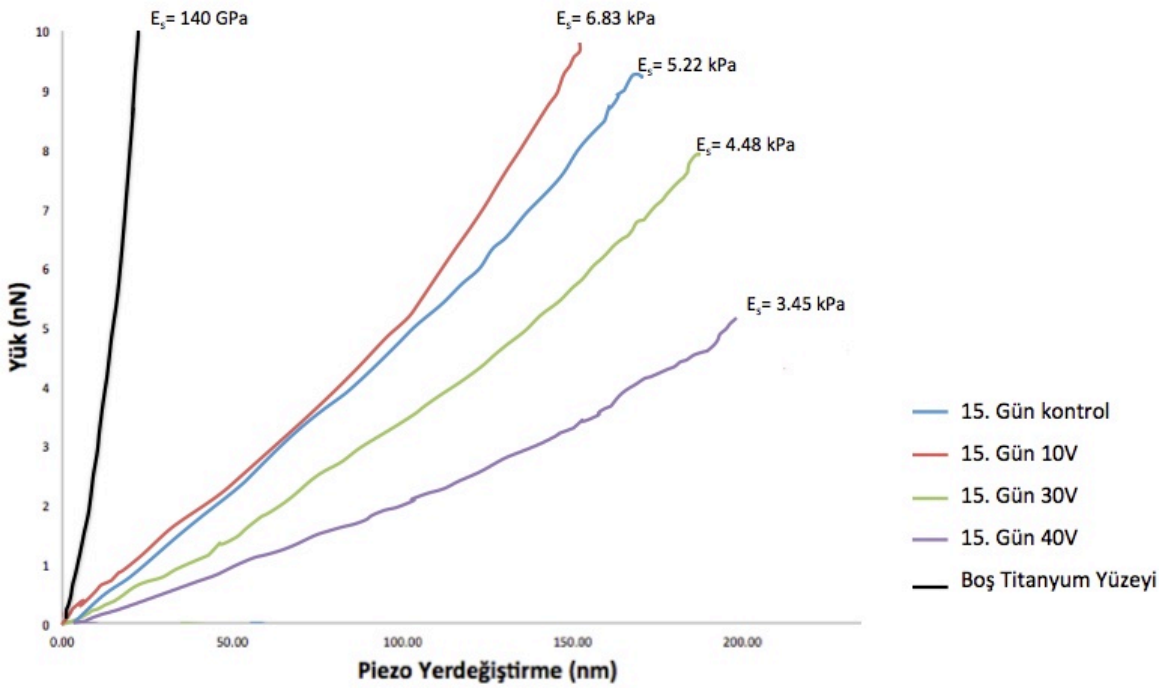
Şekil 4.36. Hücre yüzeyi üzerinde seçilen noktalar


E_s= 140 GPa
E_s= 3.27 kPa
E_s= 3.00 kPa
E_s= 2.21 kPa
E_s= 1.79 kPa
Yük (nN)
Piezo Yerdeğiştirme (nm)
1.Gün kontrol
1. Gün 10V
1. Gün 30V
1. Gün 40V
Boş Titanyum Yüzeyi

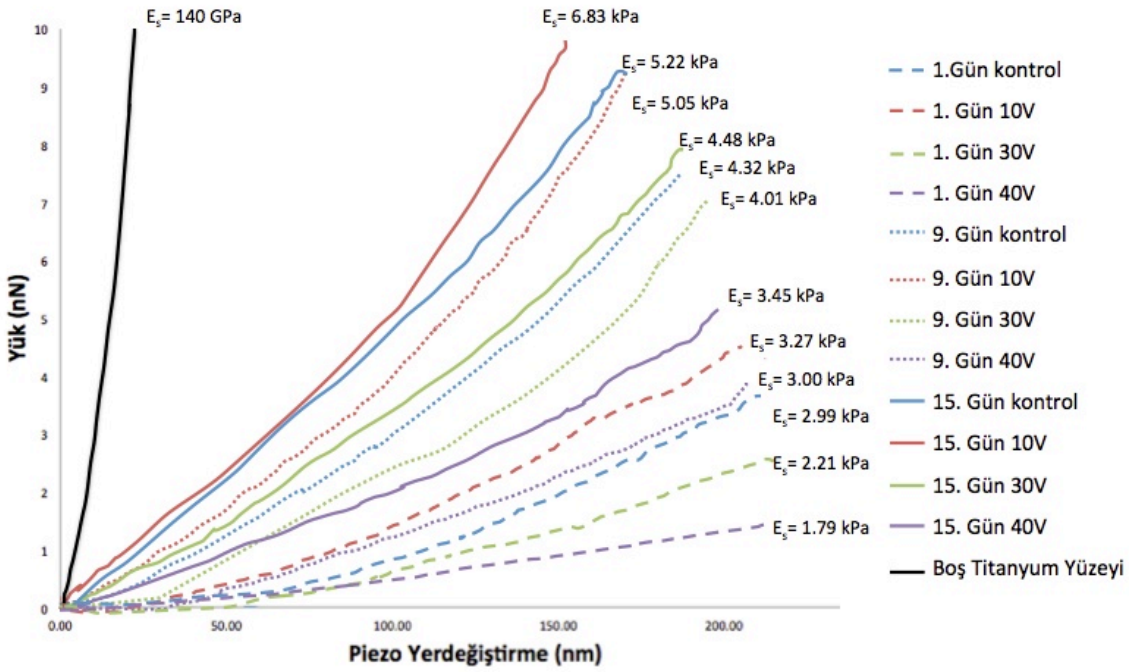
(a)


E_s= 140 GPa
E_s= 5.05 kPa
E_s= 4.32 kPa
E_s= 4.01 kPa
E_s= 3.00 kPa
Yük (nN)
Piezo Yerdeğiştirme (nm)
9. Gün kontrol
9. Gün 10V
9. Gün 30V
9. Gün 40V
Boş Titanyum Yüzeyi

(b)



(c)



(d)

Şekil 4.37. a) 1.gün, b) 9.gün, c) 15.gün ve d) tüm günlere ve uygulanan potansiyel farka göre hücrelerin yük, indentasyon eğrileri ve eğrilerden hesaplanmış olan elastik modülü değerleri.

Nanotopografik yüzeylerin diğer boyutlardaki yüzeyler ile karşılaştırıldığında hücre etkileşimlerini tetiklediği hücre davranışlarını değiştirdiği gözlemlenmiştir [174-176]. Bu hücre davranışları içerisinde protein yapışması, hücre adhezyonu ve spesifitesi, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması ve elastisitesi gibi özellikler bulunmaktadır. Özellikle osteoblast hücrelerinde bu davranışlardaki değişimler belirgindir. Titanyum yüzeyler üzerinde nanotüplerin çapları azaldıkça hücre adhezyonu ve kalsiyum çökmesi artmaktadır [177].

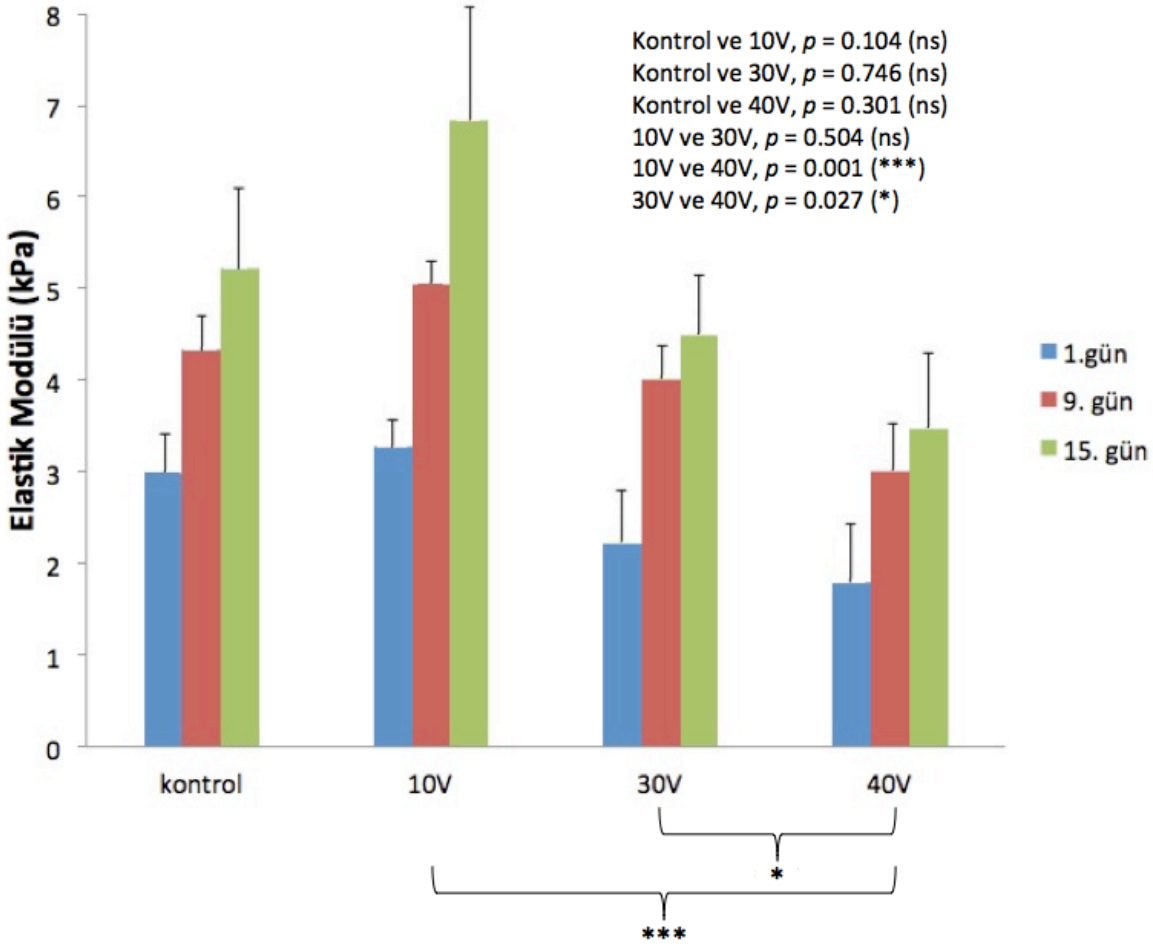
Bu durum neticesinde hücre adhezyonunu arttıran hücre yüzey proteinleri artmaktadır. Artan yüzey proteinleri yani integrinler neticesinde, onlara bağlanan fokal adhezyon kompleksleri artmakta ve hücre yüzeyi elastikliğini belirleyen aktin filamentlerin sayısı artmaktadır. Von der Mark ve ark. [178] çalışmalarında 15 nm çapa sahip olan nanotübüler titanyum yüzeyinin üzerine ekilmiş hücrelerdeki hücre yapışmasının, proliferasyonunun, göçünün ve minerilasyonunun 100 nm çapa sahip olan titanyum yüzeylerin üzerine ekilmiş hücrelere göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Daha birçok çalışmada nano yüzeylerin hücre biyomekaniğini etkilediği belirtilmiştir. Hansen ve ark.'da yaptıkları çalışmada nano topografiye sahip yüzeylerin üzerinde ki hücrelerin diğer yüzeylere göre daha sert olduğunu göstermişlerdir [179]. Domke ve ark. kobalt krom, titanyum ve titanyum vanadyum yüzeyleri üzerine ekilmiş Saos-II hücrelerinin elastik modülünü 2.1-8.8 kPa arasında hesaplamışlardır [147].

Yapılan hesaplamar sonucunda titanyum nanotüpler üzerine ekilmiş hücrelerin elastik modüllerinin 1.8 +/-0.5 kPa ve 6.8 +/-1.2 kPa arasında hesaplanmıştır. Elastik modüllerde çaplara göre azalma gözlemlenmiştir. 10V potansiyel fark uygulanarak ortalama 9 nm çapa sahip olan titanyum nanotüpler üzerinde büyütülmüş olan hücrelerin diğerlerine göre daha sert olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç TNT çapları azaldıkça aktin filamentlerin artması ve böylece hücre yüzeyinin daha sert olması verileri ile örtüşmektedir. Hücreleri besleme gün sayısı arttıkça elastik modülünde de artış gözlemlenmiştir. Gün sayısı arttıkça hücre yayılımı, mineralizasyonu ve adhesyonunda arttış olmaktadır buna bağlı olarak hücre yüzeyleri daha sert bir yapıya bürünmektedirler. TNT çaplarının ve inkübasyon zamanlarının, hücrelerin elastik modülleri üzerindeki etkileri yapılan iki-yönlü varyans analizi (ing: two-way Anova) ile istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$) (Çizelge 4.13). Deneyler sonucunda elde edilen verilerin

anodizasyon voltajına dolayısıyla TNT çaplarına göre ve günlere göre değişimleri sırasıyla Şekil 4.38 ve Şekil 4.39'da gösterilmektedir.

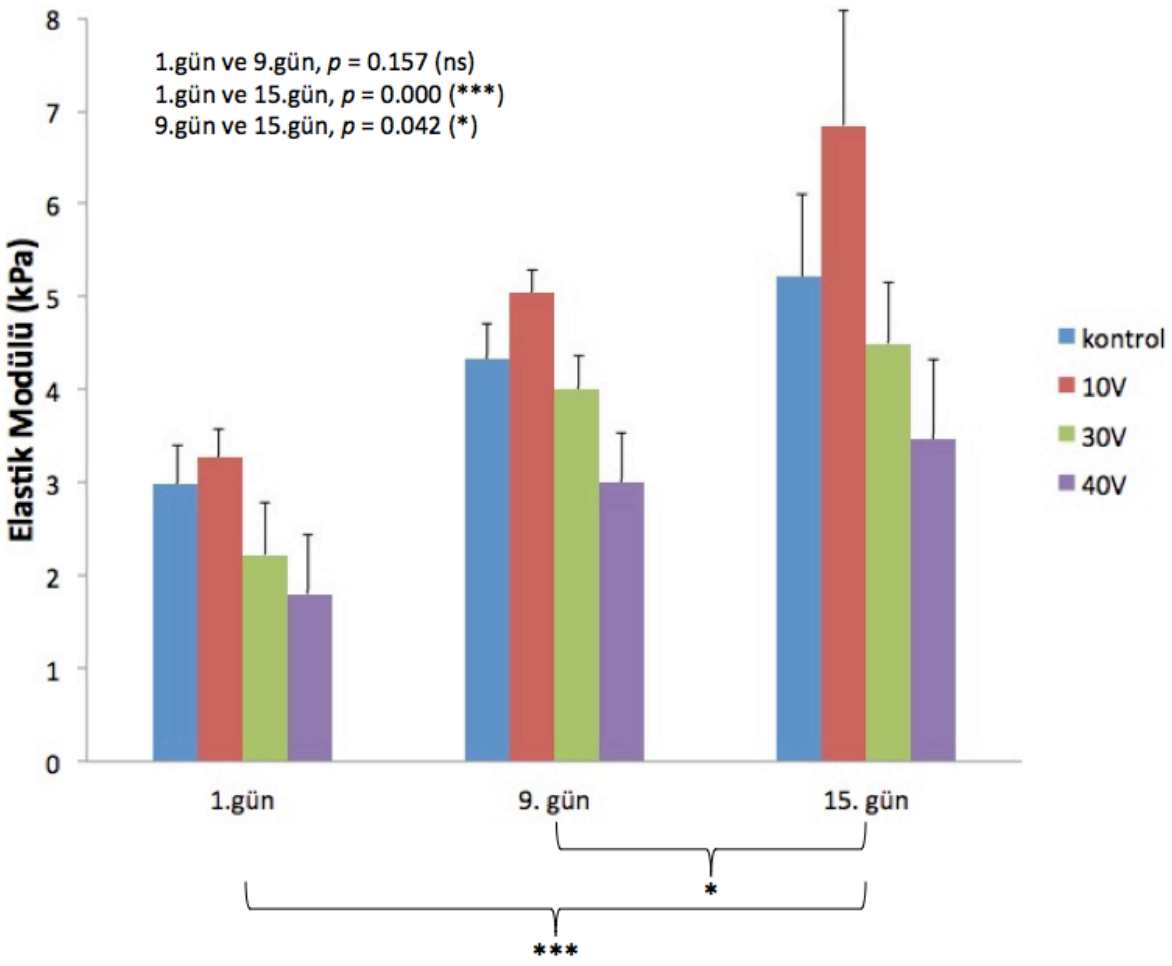
Çizelge 4.13. İki-yönlü varyans analizi sonuçları

	İnkübasyon Zamanı	**TNT çapı**	**Gün x Voltaj**
***p* değerleri**	0.001 (***)	0.001 (***)	0.964 (ns)



Şekil 4.38. Hücrelerin elastisitelerinin günlere ve TNT çaplarına göre dağılımları. İki-yönlü varyans analizinden (ing: two-way Anova) sonra yapılan Tukey Post-hoc (ing: Tukey's HSD) testi ile tüm gruplar aralarında karşılaştırılmıştır. Post-hoc testi sonucunda elde edilen *p* değerleri şöyledir: 1) Kontrol ile 10V için $p = 0.104$ (ns), 2) Kontrol ile 30V için $p = 0.746$ (ns), 3) Kontrol ile 40V için $p = 0.301$ (ns), 4) 10V ile 30V için $p = 0.504$ (ns), 5) 10V ile 40V için $p = 0.001$ (***), 6) 30V ile 40V için $p = 0.027$ (*).

(ns) $p > 0.05$
(*) $p \leq 0.05$
(***) $p \leq 0.001$



Şekil 4.39. Hücrelerin elastisitelerinin TNT çaplarına ve günlere göre dağılımları. İki-yönlü varyans analizinden (ing: two-way Anova) sonra yapılan Tukey Post-hoc (ing: Tukey's HSD) testi ile tüm gruplar aralarında karşılaştırılmıştır. Post-hoc testi sonucunda elde edilen *p* değerleri şöyledir: 1) 1.gün ile 9.gün için $p = 0.157$ (ns), 2) 1.gün ile 15.gün için $p = 0.000$ (***), 3) 9.gün ile 15.gün için $p = 0.042$ (*).

(ns) $p > 0.05$
(*) $p \leq 0.05$
(***) $p \leq 0.001$

Sonuç olarak tez çalışmasında gürültü kaynakları minimize edilerek, akustik titreştirme ve optik ışık saçılması yöntemi ile çalışan kapalı sıvı hücre AKM geliştirilmiştir. Bu sistem ile çeşitli biyolojik örneklerin ve atomik latislerin yüksek çözünürlük görüntüleri kaydedilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları olarak tek molekül kuvvet spektroskopisi ve nanoindentasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tek molekül kuvvet spektroskopisi çalışmalarında farklı model sistemler denenerek kullanılan biyomoleküllerin birbirleri ile olan etkileşimleri incelenmiş ve literatür ile karşılaştırıldığında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Son olarak nanoindentasyon çalışmaları ile hücre yüzeyinin değişken etkenlere göre biyomekanik özelliklerindeki farklılıklar ve bunların hücre elastisitesine olan etkileri

belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, temel bilimler ve tıp alanlarında tek moleküllerin tayini, birbirleri ile olan etkileşimleri, hastalık teşhisi ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, biyomalzemelerin geliştirilmesi gibi konularda yüksek hassasiyette çalışabilen bir AKM ile verimli çalışmaların yapılabileceği öngörülmektedir

KAYNAKLAR

[1] Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., Weibel, E., Surface Studies By Scanning Tunneling Microscopy, *Physics Review Letters*, 49, 57-61, **1982**.

[2] Binnig, G, Quate, C.F., Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Physics Review Letters*, 56, 930–933, **1986.**

[3] Marti O., Drake B., Hansma P.K., Atomic Force Microscopy of Liquid Covered Surfaces: Atomic Resolution Images, *Applied Physics Letter*, 51, 484-486, **1987**.

[4] Binnig G., Gerber C., Stoll E., Albrecht T.R., Quate C.F., Atomic Resolution With Atomic Force Microscope, *Europhysics Letter*, 3, 1281-1286, **1987.**

[5] Meyer G., Amer N.M., Novel Optical Approach To Atomic Force Microscopy, *Applied Physics Letter*, 53, 1045-1047, **1988.**

[6] Gould S., Marti O., Drake B., Hellemans L., Bracker C.E., Hansma P.K., Keder N.L., Eddy M.M., Stucky G.D., Molecular Resolution Images Of Amino Acid Crystals With The Atomic Force Microscope, *Nature,* 332, 332-334, **1988.**

[7] Marti O., Elings V., Haugan M., Bracker C.E., Schneir J., Drake B., Gould S.A., Gurley J., Hellemans L., Shaw K., Weisenhorn A.L., Zasadzinski J., Hansma P.K., Scanning Probe Microscopy of Biological Samples and Other Surfaces, *Journal of Microscopy*, 152, 803-809, **1988.**

[8] Friedbacher G., Hansma P.K., Ramli E., Stucky G.D., Imaging Powders With the Atomic Force Microscope: From Biominerals to Commercial materials, *Science*, 253, 1261-1263, **1991.**

[9] Lin J.N., Drake B., Lea A.S., Hansma P.K., Andrade J.D., Direct Observation of Immunoglobulin Adsorption Dynamics Using the Atomic Force Microscope, *Langmuir,* 6, 509-511,**1990.**

[10] Drake B., Prater C.B., Weisenhorn A.L., Gould S.A., Albrecht T.R., Quate C.F., Cannell D.S., Hansma H.G., Hansma P.K., Imaging Crystals, Polymers, and Processes in Water with the Atomic Force Microscope, *Science,* 243, 1586-1589, **1989.**

[11] Häberle W., Höber J.K.H., Ohnesorge F., Smith D.P.E., Binnig G., In situ Investigations of Single Living Cells Infected by Viruses. *Ultramicroscopy*, 42−44 (Pt. B), 1161-1167, **1992.**

[12] Ohnesorge F., Heckl W.M., Häberle W., Pum D., Sara M., Schindler H., Schilcher K., Kiener A., Smith D.P.E., Sleytr U.B., Binnig G., Scanning Force Microscopy Studies of the S-layers from Bacillus Coagulans E38-66, Bacillus Sphaericus CCM2177 and of an Antibody Binding Process, *Ultramicroscopy,* 42−44(Pt. B), 1236-1242,**1992.**

[13] Hoh J.H., Lal R.,. John S.A, Revel J.-P., Arnsdorf M.F., Atomic Force Microscopy and Dissection of Gap Junctions, *Science*, 253, 1405-1408, **1991.**

[14] Schabert F.A., Engel A., Reproducible Acquisition of Escherichia coli Porin Surface Topographs by Atomic Force Microscopy, *Biophysics Journal*, 67, 2394-2403, **1994.**

[15] Müller D.J., Engel A., Voltage and pH-induced Channel Closure of Porin OmpF Visualized by Atomic Force Microscopy, *Journal of Molecular Biology*, 285, 1347-1351, **1999.**

[16] Walz T., Tittmann P., Fuchs K.H., Müller D.J., Smith B.L., Agre P., Gross H., Engel A., Surface Topographies at Subnanometer-resolution Reveal Asymmetry and Sidedness of Aquaporin-1, *Journal of Molecular Biology,* 264, 907-918, **1996.**

[17] Müller D.J., Schabert F.A., Büldt G., Engel A., Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Subnanometer Resolution by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal,* 68, 1681-1686, **1995.**

[18] Müller D.J., Büldt G., Engel A., Force-induced Conformational Change of Bacteriorhodopsin, *Journal of Molecular Biology*, 249, 239-243, **1995.**

[19] Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V.B., Fractured Polymer/silica Fiber Surface Studied by Tapping Mode Atomic Force Microscopy, *Surface Science*, 290, L688-L692, **1993.**

[20] Putman C.A., Van der Werf K.O., de Grooth B.G., van Hulst N.F., Greve J., Viscoelasticity of Living Cells Allows High Resolution Imaging by Tapping Mode Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*, 67, 1749-1753, **1994.**

[21] Lantz M.A., O'Shea S.J., Welland M.E., Force Microscopy Imaging in Liquids Using AC Techniques, *Applied Physics Letter*, 65, 409-411, **1994.**

[22] Möller C., Allen M., Elings V., Engel A., Müller D.J., Tapping-mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-resolution Images of Protein Surfaces, *Biophysical Journal*, 77, 1150-1158, **1999.**

[23] Bustamante C., Erie D.A., Keller D., Biochemical and Structural Applications of Scanning Force Microscopy, *Current Opinion of Structural Biolology*, 4, 750-760, **1994.**

[24] Erie D.A., Yang G., Schultz H.C., Bustamante C., DNA Bending by Cro Protein in Specific and Nonspecific Complexes: Implications for Protein Site Recognition and Specificity, *Science*, 266, 1562-1566, **1994.**

[25] Bezanilla M., Drake B., Nudler E., Kashlev M., Hansma P.K., Hansma H.G., Motion and Enzymatic Degradation of DNA in the Atomic Force Microscope, *Biophysical Journal*, 67, 2454-2459, **1994.**

[26] Guthold M., Bezanilla M., Erie D.A., Jenkins B., Hansma H.G., Bustamante C., Following the Assembly of RNA Polymerase-DNA Complexes in Aqueous Solutions with the Scanning Force Microscope, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 12927-12931, **1994.**

[27] Kasas S., Thomson N.H., Smith B.L., Hansma H.G., Zhu X., Guthold M., Bustamante C., Kool E.T., Kashlev M., Hansma P.K., Escherichia coli RNA Polymerase Activity Observed Using Atomic Force Microscopy, *Biochemistry*, 36, 461-468, **1997.**

[28] Guthold M., Zhu X., Rivetti C., Yang G., Thomson N.H., Kasas S., Hansma H.G., Smith B., Hansma P.K., Bustamante C., Direct Observation of One-dimensional Diffusion and Transcription by Escherichia coli RNA Polymerase, Biophysical Journal, 77, 2284-2294, **1999.**

[29] Walters D.A., Cleveland J.P., Thomson N.H., Hansma P.K., Wendman M.A., Gurley G., Elings V., Short Cantilevers for Atomic Force Microscopy, *Review of Scientific Instruments*, 67, 3583-3590, **1996.**

[30] Viani M.B., Schäffer T.E., Paloczi G.T., Pietrasanta L.I., Smith B.L., Thompson J.B., Richter M., Rief M., Gaub H.E., Plaxco K.W., Cleland A.N., Hansma H.G., Hansma P.K., Fast Imaging and Fast Force Spectroscopy of Single Biopolymers with a New Atomic Force Microscope Designed for Small Cantilevers, *Review of Scientific Instruments,* 70, 4300-4303, **1999.**

[31] Viani M.B., Pietrasanta L.I., Thompson J.B., Chand A., Gebeshuber I.C., Kindt J.H., Richter M., Hansma H.G., Hansma P.K., Probing Protein-protein Interactions in Real Time, *Nature Structural & Molecular Biology*, 7, 644-647, **2000.**

[32] Ando T., Kodera N., Takai E., Maruyama D., Saito K., Toda A., A High-Speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 12468-12472, **2001.**

[33] Ando T., Kodera N., Maruyama D., Takai E., Saito K., Toda A., A high-Speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules, *Japan Journal of Applied Physics*, 41, 4851-4856, **2002.**

[34] Hinterdorfer P, Dufrene YF., Detection and Localization of Single Molecular Recognition Events Using Atomic Force Microscopy, *Nature Methods*, 3, 347–355, **2006.**

[35] Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub HE., Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy. *Science,* 275, 1295–1297, **1997b**.

[36] Çatçat D., Çelik S., Denkbaş E.B., Oral A., In Situ-AFM and Imaging in Liquids*, 2nd Bio-AFM&Watching Biomolecules in Action*, 14-17 Aralık, Osaka, Japan, **2009.**

[37] Dupres V, Menozzi FD, Locht C, Clare BH, Abbott NL, Cuenot S, Bompard C, Roze D, Dufrene YF.. Nanoscale Mapping and Functional Analysis of Individual Adhesins on Living Bacteria, *Nature Methods*, 2, 515–520, **2005.**

[38] Hansen, K. M., Thundat, T., Microcantilever Biosensors, *Methods,* 37, 57 – 64, **2005.**

[39] Braun, T., Barwich V., Ghatkesar M.K., Bredekamp A.H., Gerber C., Hegner M., Lang H.P., Micromechanical Mass Sensors for Biomolecular Detection in a Physiological Environment, *Physical Review E*, 72, 031907, **2005.**

[40] Thomas P. B., Michel G., Scott M. K., Wenjiang S., Greg C., John S. F., Ken, Scott R. M., Weighing of Biomolecules, Single Cells and Single Nanoparticles in Fluid, *Nature*, 446, 1066 – 1069, **2007.**

[41] Asakawa H., Fukuma T., Spurious-free Cantilever Excitation in Liquid by Piezoactuator with Flexure Drive Mechanism, Review of Scientific Instruments, 80, 103703, **2009.**

[42] Fukuma T., Kimura M., Kobayshi K., Matsushige K., Yamada H., Development of Low Noise Cantilever Deflection Sensor for Multienvironment Frequency-modulation Atomic Force Microscopy, *Review of Scientific Instruments*, 76, 053704, **2005.**

[43] Fukuma T., Jarvis S.P., Development of Liquid Environment Frequency Modulation Atomic Force Microscope with Low Noise Deflection Sensor for Cantilevers of Various Dimensions, *Review of Scientific Instruments*, , 77, 043701, **2006.**

[44] Eaton P., West P., *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press, New York, **2010.**

[45] Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P., *Atomic Force Microscopy for Biologists,* 2. Baskı, Imperial College Press, London, **2010.**

[46] Butt, HJ., Measuring Electrostatic, Van der Waals, and Hydration Forces in Electrolyte Solutions with an Atomic Force Microscope. *Biophysics Journal*, 60, 1438-1444, **1991.**

[47] Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London,**1994.**

[48] Butt, H.J., Capella, B., and Kappl, M., Force Measurements with the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications, Surface Science Reports, 59, 1-152, **2005.**

[49] Garcia R., *Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy*, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschester. 12, 69469 Weinheim, Germany, **2010.**

[50] Muller, D.J. and Engel, A., Atomic Force Microscopy and Spectroscopy of Native Membrane Proteins, *Nature Protocols*, 2, 2191, **2007.**

[51] Sotres, J. and Baró, A.M. AFM Imaging and Analysis of Electrostatic Double Layer Forces on Single DNA Molecules, Biophysical Journal, 19, 98-107, **2010.**

[52] Derjaguin, B.V. and Landau, L. A Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols, *Acta Physicochimica URSS*, 14, 633, **1941.**

[53] Verwey, E.J.W. and Overbeek, J.T.G. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier Publishing Inc., New York. **1948.**

[54] Fukuma, T., Kobayashi, K., Matsushige, K., and Yamada, H., True Molecular Resolution in Liquid by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy, *Applied Physics Letter*, 86, 193108, **2005.**

[55] Baba M, Kakitani S, Ishii H, Okuno T., Fine atomic image of mica cleavage planes obtained with an atomic force microscope (AFM) and a novel procedure for image processing, *Chemical Physics*, 221, 23-31, **1997.**

[56] Gould S.A.C., Burke K., Hansma P.K., Simple theory for the atomic- force microscope with a comparison of theoretical and experimental images of graphite, *Physics Review*, 40, 5363-5366, **1989.**

[57] Garcia R., Perez R., Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Report*, 47(6-8), 197-301, **2002.**

[58] Moreno-Herrero F., Colchero J., Gomez-Herrero J., Baro A.M., Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids. *Physical Review E*, 69(3), 031915, **2004**.

[59] Bustamante C., Keller D., Scanning force microscopy in biology, Physics Today, 48(12), 32-38, **1995.**

[60] Albrecht T.R., Grütter P., Horne D., Rugar D. Frequency Modulation Detection Using High-Q Cantilevers for Enhanced Force Microscopy Sensitivity, *Journal of Applied Physics*, 69, 668–673, **1991.**

[61] Schaffer, T.E.; Cleveland, J.P., Ohnesorge, F., Walters, D. A., Hansma, P. K., Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid. *Journal of Applied Physics,* 80 (7), 3622–7, **1996.**

[62] Hansma P.K., Cleveland J.P., Radmacher M., Tapping mode atomic force microscopy in liquids, *Aplied Physics Letters*, 64, 1738,**1994.**

[63] Higgins M.J., Riener C.K., Uchihashi T., Sader J.E., McKendry, R., and Jarvis, S.P., Frequency modulation atomic force microscopy: a dynamic measurement technique for biological systems, *Nanotechnology,* 16, S85, **2005.**

[64] Fukuma T., Wideband low-noise optical beam deflection sensor with photothermal excitation for liquid-environment atomic force microscopy *Review of Scientific Instruments*, 80, 023707, **2009.**

[65] Kobayashi K., Yamada H., *Non-Contact AFM: Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids*, (eds: Morita S., Giessible F.J., Wiesendanger R.) , Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2009.**

[66] Butt H.J., Wolff E.K., Gould S.A.C., Northern B.D., Peterson C.M., Hansma P.K., Imaging cells with the atomic force microscope, *Journal of Structural Biology*, 105, 54-61, **1990.**

[67] Haberle W., Horber J.K.H., Binnig G., Force microscopy on living cells. *Journal of Vacuum Science & Technology B,* 9, 1210 – 1213, **1991.**

[68] Horber, JK, Haberle, W, Ohnesorge, F, Binnig, G, Liebich, HG, Czerny, CP, Mahnel, H, Mayr A. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope. *Scanning Microscope,* 6:919–929, **1992.**

[69] Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S, Allison DP. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy*,97, 209–216, **2003.**

[70] Eppell S.J., Simmons S.R., Albrecht R.M., Marchant R.E., Cell-surface receptors and proteins on platelet membranes imaged by scanning force microscopy using immunogold contrast enhancement, *Cell,* 68, 671-680, **1995.**

[71] Reed, M. A., Zhou, C., Muller, C. J., Burgin, T. P., Tour J. M., Conductance of a molecular junction, *Science,* 278, 252-254, **1997.**

[72] Braet, F., Rotsch, C., Wisse, E., Radmacher, M., Comparison of fixed and living liver endothelial cells by atomic force microscopy, *Applied Phsics*, 66, 575-578, **1998.**

[73] Pietrasanta, L.I., Schaper, A., Thomas M.,J., Probing specific molecular conformations with the scanning force microscope. Complexes of plasmid DNA and anti-Z-DNA antibodies, *Oxford University Press Nucleic Acids Research*, 22(16), 3288-3292, **1994.**

[74] Mou, J., Sheng, S., Ho, R., Shao, Z., Chaperonins GroEL and GroES: views from atomic fore microscopy, *Biophysical Journal,* 71, 2213-2221, **1996.**

[75] Hansma H.G., Roxana G., Hsieh W., Lollo C.P., Mullen-Ley P., Kwoh D., DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy*, Oxford University Press Nucleic Acids Research,* 26(10), 2481-2487, **1998.**

[76] Rappolt M., Pabst G., Amenitsch H., Laggner P., Salt-induced phase separation in the liquid crystalline phase of phosphatidylcholines, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 171,183-185, **2001.**

[77] Ross M., Steinen C., Galla H.J., Janshoff A., Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in DPPC/DPPS Langmuir-Blodgett layers, *Langmuir*, 17, 2437, **2001.**

[78] Groves J.T., Boxer S.G., McConnell H.M., Lateral reorganization of fluid lipid membranes in response to the electric field produced by a buried charge, *Journal of Physical Chemistry B*, 104, 11409, **2000.**

[79] Fukuma T., Higgins M.J., Jarvis S.P., Direct imaging of lipid-ion network formation under physiological conditions by frequency modulation atomic force microscopy, *Physical Review Letters*, 98, 106101, **2007.**

[80] Vinckier,A., Semenza, G., Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Letters,* 430, 12–16, **1998.**

[81] Jeffrey L.H., Bechhoefer J., Measurement and manipulation of Van der Waals forces in atomic force microscopy., *Journal of Vacuum Science Technology B,* 12, 2251–2253, **1994.**

[82] Schrödinger, E.C., Are the Quantum Jumps?, *British Journal of Philosophy of Science*, 3, 109-123, **1952.**

[83] Becheem, J.M., Single molecule spectroscopies and imaging techniques shed new light on the future of biophysics. *Biophsics Journal*, 67, 2133-2134, **1994.**

[84] Hinterdorfer P.,van Oijen A., *Handbook of Single Molecule Biophysics*, Springer Science and Business Media, LLC, **2009.**

[85] Rigler R., Vogel H., Single Molecules and Nanotechnology, Springer Series in Biophysics 12, Springer-Verlag Berlin Heildelberg 2008.

[86] Engel A., Müller D.J., Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope, *Nature Structural Biology*, 7, 715-718, **2000.**

[87] Duman M., Ebner A., Rankl C., Tang J., Chtcheglova L., Wildling L., Gruber H., Hinterdorfer P., Atomic Force Microscopy (AFM) for Topography and Recognition Imaging at the Single Molecule Level, *Springer-Verlag-Encyclopedia of Biophysics*, 978/3/642, **2012.**

[88] Duman M., Neundlinger I., Zhu R., Preiner J., Lamprecht C., Chtcheglova LA., Puntheeranurak T., Ebner A., Hinterdorfer P., Elucidating Cellular Structures Using Atomic Force Microscopy, *Comprehensive Biophysics*, (eds: Egelman E.) Academic Press, Elsevier, UK, Pp: 2-29, **2012**.

[89] Hinterdorfer P , Schutz G J, Kienberger F and Schindler H., Detection and characterization of single biomolecules in surfaces, *Reviews of Molecular Biotechnology*, 8225–35, **2001.**

[90] Hofer M, Adamsmaier S, van Zanten TS, Chtcheglova LA, Manzo C, Duman M, Mayer B, Ebner A, Moertelmaier M, Kada G, Garcia-Parajo MF, Hinterdorfer P, Kienberger F., Molecular recognition imaging using tuning fork-based transverse dynamic force microscopy, *Ultramicroscopy*, 605-611, **2010.**

[91] Cross S., Gimzewski J., Nanomachanical analyses of cells from cancer patients, Nature Nanotechnology,2, 780–3, **2007.**

[92] Cross S, and Gimzewski J, AFM-based analysis of human metastatic cancer cells, *Nanotechnology*, 19, 203-8, **2008**.

[93] Li Q, Lee G, Ong C, Lim C, AFM indentation study of breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical research communication*, 374, 609-613, **2008**.

[94] Shinto H, Aso Y, Fukasawa T, Higashitani K, Adhesion of melanoma cells to the surfaces of microspheres studied by atomic force microscope, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 91, 114-121, **2012**.

[95] Duman M, Pfleger M, Zhu R, Rankl C, Chtcheglova LA, Neundlinger I, Bozna BL, Mayer B, Salio M, Shepherd D, Polzella P, Moertelmaier M, Kada G, Ebner A, Dieudonne M, Schütz GJ, Cerundolo V, Kienberger F, Hinterdorfer P., Improved localization of cellular membrane receptors using combined fluorescence microscopy and simultaneous topography and recognition imaging, *Nanotechnology*, 21, 115504-115511, **2010**.

[96] Müller DJ and Dufrene YF, Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nature Nanotechnology*, 3, 261-269, **2008**.

[97] Müller DJ, Sapra KT, Scheuring S, Kedrov A, Frederix PL, Fotiadis D, Engel A, Single- molecule studies of membrane proteins, *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 489-495, **2006**.

[98] Scheuring S, AFM studies of the supramolecular assembly of bacterial photosynthetic core- complexes, *Current Opinion Chemical Biology*, 10, 387-393, **2006**.

[99] Oh YJ, Hochleitner M, Huber HP, Duman M, Bozna B, Kastner M, Rangl M, Kienberger F, Hinterdorfer P, High-frequency electromagnetic dynamics properties of THP1 cells using scanning microwave microscopy, *Ultramicroscopy*, 1625-1629, **2011**.

[100] Müller DJ, Baumeister W, Engel A, Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of Deinococcus radiodurans monitored by atomic force microscopy, *Journal of Bacteriology*, 178, 3025-3030, **1996**.

[101] Stoffler D, Goldie KN, Feja B, Aebi U, Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy, *Journal of Molecular Biology*, 287, 741- 752, **1999**.

[102] Czajkowsky DM, Hotze EM, Shao Z, Tweten RK, Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane, *EMBO Journal*, 23, 3206-3215, **2004**.

[103] Jaroslawski S, Zadek B, Ashcroft F, Venien-Bryan C, Scheuring S, Direct visualization of KirBac3.1 potassium channel gating by atomic force microscopy, *Journal of Molecular Biology*, 374, 500-505, **2007**.

[104] Grandbois M, Beyer M, Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE, How strong is a covalent bond, *Science*, 283, 1727–1730, **1999**.

[105] Kamruzzahan, ASM., Ebner A., Windling L., Kienberger, F., Riener, C.K., Hahn, C.D., Pollheimer, P.D., Winklehner, P., Hölzl, M., Lackner, B., Schörkl, D.M., Hinterdorfer, P., Gruber, H.J., Antibody linking to atomic force microscope tips via disulfide bond formation, *Bioconjugate Chemistry*, 17 (6), 1473-1481, **2006.**

[106] Fritz, J., Katopidis, A.G., Kolbinger, F., Anselmetti, D. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proceedings National Academia Science USA,* 95, 12283–12288, **1998**.

[107] Li, F., Redick, S.D., Erickson, H.P., Moy, V.T. Force measurements of the alfa5alfa1 integrin-fibronectin interaction, *Biophysics Journal,* 84, 1252–1262, **2003**.

[108] Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K. & Evans, E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature,* 397, 50–53, **1999**.

[109] Zhang, X.H., Bogorin, D.F. & Moy, V.T. Molecular basis of the dynamic strength of the sialyl Lewis X-selectin interaction, *ChemPhysChem,* 5, 175–182, **2004.**

[110] Evans, E., Ritchie, K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal,* 72, 1541–1555, **1997.**

[111] Bell, G.I. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science,* 200, 618–627, **1978.**

[112] Bozna BL., Podzella P., Rankle C., Zhu R., Salio M., Shepherd D., Duman, D., Cerundolo, V., Hinterdorfer P., Binding strength and dynamics of invariant natural killer cell T cell receptor/CD1d-glycosphingolipid interaction on living cells by single molecule force spectroscopy, *Journal of Molecular Biology*, 286, 15973-15979, **2011.**

[113] Singhvi R, Kumar A, Lopez G, Sephanopoulos GN, Wang DI, Whiteside GM, Ingber DE, Engineering cell shape and function, *Science*, Vol. 264, No. 5159, p. 696- 698, **1994**.

[114] Yao X, Jericho M, Pink D, Beveridge T, Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy, *Journal of Bacteriology*, Vol. 181, No.22, p. 6865-6875, **1999**.

[115] Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK, Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope, *Biophysics Journal*, 70, 556-567, **1996**.

[116] Domke J and Radmacher M, Measuring the elastic properties of thin polymer film with the atomic force microscope. *Langmuir*, 14: 3320-3325, **1998**.

[117] Wu, H. W., Khun, T., and Moy, V. T., Mechanical properties of L292 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking, *Scanning*, 20(5), 389-397, **1998**.

[118] Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, Hrynkiewicz, AZ, Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy, *European Biophysical Journal*, 28, 312-316, **1999**.

[119] Rotsch C, Jacobson K, Radmacher M, Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 921-926, **1999**.

[120] Haga H, Sasaki S, Kawabata K, Ito E, Ushiki T, Sambongi T, Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton, *Ultramicroscopy*, 82, 253-258, **2000**.

[121] Wojcikiewicz EP, Zhang X, Moy VT, Force and compliance measurements on living cells using atomic force microscopy (AFM), *Biology Proceedings*, 6(1),1-9, **2003**.

[122] Mahaffy RE, Park S, Gerde E, Käs J, Shih CK, Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy, *Biophysical Journal*, 86, 1777-1793, **2004**.

[123] Berdyyva TK, Woodworth CD, Sokolov I, Human epithelial cells increase their rigidity with ageing *in vitro*: direct measurements, *Physics of Medical Biology*, 50, 81-92, **2005**.

[124] Rabinovich Y, Esayanur M, Daosukho S, Byer K, El-Shall H, Khan S, Atomic force microscopy measurement of the elastic properties of the kidney epithelial cells, *Journal of Colloid & Interface Science*, 285, 125-135, **2004**.

[125] Radmacher M, Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscopy. (eds: Jena BP, Horber JK) *Methods in Cell Biology*, vol 68. Academic Press, Elsevier, New York, Amsterdam, pp 67–90, **2002**.

[126] Simon, A., Cohen-Bouhacina, T., Porte , M.C., Aime, J.P., Ame dee, J., Bareille, R., Baquey, C, Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy, Cytometry A, 54A, 36–47, **2003.**

[127] Simon, A., Cohen-Bouhacina, T., Porte , M.C., Aime, J.P., Ame dee, J., Bareille, R., Baquey, C, Heterogeneous cell mechanical properties: an atomic force microscopy study, *Cell. Mol. Biol.,* 50(3), 255–266, **2004.**

[128] Sun SX, Wirtz D (2006) Mechanics of enveloped virus entry into host cells, *Biophysical Journal*, 89, 10–12, **2006.**

[129] Oberdorster G and Oberdorster EJ, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ Perspect*, 113:823–839, **2005**.

[130] Robert A and Freitas Jr JD, What is nanomedicine?, *Nanomedical Nanotechnology Biology Medicine*, 1, 2–9, **2005**.

[131] Pesen D and Hoh JH, Micromechanical architecture of the endothelial cell cortex, *Biophysical Journal*, 88, 670–679, **2005**.

[132] Becker D, Geissler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW, Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagencoated titanium alloy, *J. Biomed.Mater. Res.*, 59, 516–527, **2002**.

[133] Carvalho RS, Kostenuik PJ, Salih E, Bumann A, Gerstenfeld LC, Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression, *Matrix Biology*, 22, 241–249, **2003**.

[134] Kaiser E and Chandrasekhar S, Distinct pathways of extracellular signal-regulated kinase activation by growth factors, fibronectin and parathyroid hormone 1–34, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 573–578, **2003**.

[135] Trickey WR, Lee GM, Guilak F, Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage, *J. Orthop. Res.*, 18, 891–898, **2000**.

[136] Wu C, Ramaswamy Y, Liu X, Wang G, Zreiqat H, Plasma-sprayed CaTiSiO5 ceramic coating on Ti–6Al–4V with excellent bonding strength, stability and cellular bioactivity, *J R Soc Interface*, 6(31):159–68, **2009**.

[137] Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S, Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nano-tubes, *Biomaterials*, 26:4938, **2005**.

[138] Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S, Enhanced cellular mobility guided by TiO2 nanotube surfaces, *Nano Lett*, 8: 786, **2008**.

[139] Dalby MJ, Andar A, Nag A, Affrossman S, Tare R, McFarlane S, Oreffo RO, Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies. *J R Soc Interface*, 5(26):1055–65, **2008**.

[140] Gallagher JO, McGhee KF, Wilkinson CD, Riehle MO, Interactionof animal cells with ordered nanotopography, *IEEE Trans Nanobio-science*, 1:24, **2002**.

[141] Bjursten LM, Rasmusson L, Oh S, Smith GC, Brammer KS, Jin S, Titanium dioxide nanotubes enhance bone bonding in vivo, *J Biomed Mater Res*, 88A, **2009**.

[142] Sirivisoot, S., Yao, C., Xiao, X., Sheldon, B.W., Webster, T.J., Greater osteoblast functions on multiwalled carbon nanotubes grown from anodized nanotubular titanium for orthopedic applications, *Nanotechnology*, 18, 365102-6, **2007.**

[143] Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S, Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO_2 nanotube surface, *Acta Biomaterialia*, 5(8), 3215–3223, **2009**.

[144] Park J, Bauer S, Schlegel KA, Neukam FW, von der Mark K, Schmuki P, TiO2 Nanotube surfaces: 15 nm – an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation, *Small*, 5(6), 666–71, **2009**.

[145] Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM, Kelley SS, Hochmuth RM, Guilak F, Alterations in the Young's modulusand volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage, *J. Biomech*, 32:119–127, **1999**.

[146] Wang N, Butler JP, Ingber DE, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton, *Science*, 260:1124–1127, **1993**.

[147] Domke J, Dannöhl S, Parak WJ, Müller O, Aicher WK, Radmacher M, Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 19:367–379, **1997**.

[148] Petersen NO, McConnaughey WB, Elson EL, Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin, *B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:5327–5331, **1982**.

[149] Rotsch C and Radmacher M, Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study, *Biophys. J.*, 78:520–535, **2000**.

[150] Loparic, M., Wirz, D., Daniels, AU., Raiteri, R., VanLandingham, M,R., Guex, G., Martin, I., Aebi, U., Stolz, M., Micro- and Nanomechanical Analysis of Articular Cartilage by Indentation-Type Atomic Force Microscopy: Validation with a Gel-Microfiber Composite, *Biophysical Journal*, 98 (11), 2731-2740, **2010.**

[151] Takai, E., Costa, KD., Shaheen, A., Hung C.T., Guo, X.E., Osteoblast Elastic Modulus Measured by Atomic Force Microscopy Is Substrate Dependent, *Annals of Biomedical Engineering*, 33(7), 963-971, **2005.**

[152] Darling, E., Wilusz, RE., Bolognesi, MP., Zauscher, S., Guilak F., Spatial Mapping of the Biomechanical Properties of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage Measured In Situ via Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*, 98, 2848-2856, **2010.**

[153] Jarvis, S.P., Oral, A., Weighs, T.P., Pethica, J.B., A novel force microscope and point contact probe, *Review of Scientific Instruments,* 64, 3515-3520,**1993.**

[154] Çatçat D., Çelik S., Oral A., In-situ Atomic Force Microscopy and Imaging in Liquids*, NANOTR V, 5th National Nanoscience and Nanotechnology Congress*, 14-18 June 2009, Istanbul, Turkey, **2009.**

[155] Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher K., Schindler H., Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 3477-3481,**1996.**

[156] Hinterdorfer, P., Schilcher K., Baumgartner W., Gruber H. J., Schindler H., A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy, *Nanobiology-Abingdon*, 4,177-188, **1998.**

[157] Ebner, A., Hinterdorfer, P., Gruber H.J., Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers, *Ultramicroscopy*, 107, 922-927, **2007.**

[158] Klein, C.G.D., Stroh, C.M., Jensenius, H., van Es, M., Kamruzzahan A.S.M., Stamouli, A., Gruber, H.J., Oesterkamp, T.H., Hinterdorfer, P., Covalent Immobilization of single proteins on mica for molecular recognition force microscopy, *Chemical Physics of Chemistry*, 4, 1367-1371, **2003.**

[159] Yılmaz, E., *Moleküler Baskılama Temelli Lizozim Sensörlerin Hazırlanması,* Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013.**

[160] Red blood cell, http://en.wikipedia.org/wiki/Red_blood_cell (Mart, **2009**).

[161] Bacillus thuringiensis, http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_ thuringiensis, (Mayıs, **2010**).

[162] Acinetobacter, http://en.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter (Mayıs, **2010**).

[163] Staphylococcus aureus, http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus (Mayıs, **2010**).

[164] Staphylococcus epidermidis, http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_ epidermidis (Mayıs, **2010**).

[165] Slovak, P.M., Wadhams, G.H., Armitage, J.P., Localization of MreB in Rhodobacter sphaeroides under Conditions Causing Changes in Cell Shape and Membrane Structure, *Journal of Bacteriology*, 187-1, 54-64, **2005.**

[166] Streptomyces, http://en.wikipedia.org/wiki/Streptomyces (Haziran, 2010).

[167] Erytrocyte and lyphocyte, http://en.wikipedia.org/wiki/Platelet (Nisan, **2009**).

[168] Gan, Y., Wanless, E.J., Franks G.V., Lattice resolution imaging of the sapphire (0001) surface in air by AFM, *Surface Science*, 601, 1064-1071, **2007.**

[169] McNeil, L.,E., Grimsditch, M., Elastic Moduli of Muscovite Mica, *Journal of Physics: Condensed Matter,* 5, 1681, **1993.**

[170] Iwata F., Matsumoto T., Sasaki A., Local elasticity imaging of nano bundle structure of polycarbonate surface using atomic force microscopy, *Nanotechnology*, 11, 10-15, **2000.**

[171] Tsuji, T., Yamanaka, K., Observation by ultrasonic atomic force microscopy of reversible displacement of subsurface dislocations in highly oriented pyrolytic graphite, *Nanotechnology*, 12, 301, **2001**.

[172] Yin, H., Liu, H., Shen, W.Z., The large diameter and fast growth of self-organized TiO2 nanotube arraysachieved via electrochemical anodization, *Nanotechnology*, 21, 035601, **2010.**

[173] Gong, D., Grimes, C.A., Varghese, O.K., Hu, W., Singh, R.S., Chen, Z., Dickey, E.C., Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation, *Journal of Materials Research*, 16, 3331, **2001.**

[174] Klabunde KJ, Strak J, Koper O, Mohs C, Park D, Decker S, et al. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *Journal of Physical Chemistry,*100, 12141,**1996.**

[175] Wu SJ, DeJong LC, Rahaman MN. Sintering of nanophase g-Al2O3 powder, *Journal of American Ceramic Society,* 79, 2207,**1996.**

[176] Baraton MI, Chen X, Gonsalves KE. FTIR study of nanostructured alumina nitride powder surface: determination of the acidic/basic sites by CO, CO2, and acetic acid adsorptions. *Nanostructural Materials,* 8,435, **1997.**

[177] Mendonça G., Mendonca D., Aragao FJL., Cooper LF., Advancing dental implant surface technology–from micron-to nanotopography, *Biomaterials*, 29, 3822–3835, **2008.**

[178] von der Mark, K., Park, J., Bauer S., Schmuki P., Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix, *Cell Tissue Res*, 339, 131-153, **2010.**

[179] Hansen, J.C., Lim, J.Y., Xu L., Siedlecki C.A., Mauger, D.T., Donahue, H.J., Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblastic cells as determined by atomic force microscopy, *Journal of Biomechanics* , 40, 2865–2871, **2007.**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı : Demet Çatçat Kayım

Doğum Yeri : Bursa

Medeni Hali : Evli

E-Posta : demet.catcat@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Beytepe Ankara

Eğitim

Lise : İnegöl Turgutalp Anadolu Lisesi, Bursa (1992-1999)

Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2000-2006)

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı (2008-2014)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-Çok İyi

İş Deneyimi

Nanomanyetik Bilimsel Cihazlar, Ankara (2006-2007)

Nanosis Bilimsel Cihazlar Teknoloji Danışmanlık Ltd. Şti., Ankara (2007-2011)

Teknotıp Analitik Sistemler, Ankara (2012-)

Deneyim Alanları

Atomik Kuvvet Mikroskopisi,

Üç Boyutlu Topografi Görüntüleme ve Karakterizasyon Teknikleri

Mikro-Nanolitografi ve Nanoindentasyon Teknikleri

Tek Molekül Kuvvet Spektroskopisi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. "Atomik Kuvvet Mikroskobu Geliştirilmesi ve Yeni Donanımlar Eklenmesi", Proje Yürütücüsü, TUBİTAK-TEYDEB, 3070603, 2009, 69022,44.
2. "Atomik Kuvvet Mikroskopisi için Polyetilenglikol Uç Modifikasyonu" Araştırıcı, Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi Projesi, 012D09604001, 2012, 11400,00 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. **Catcat Kayım D.,** Duman M., Dedection of elasticity of Saos-II cells dependig on substrate and incubation date, hazırlanıyor.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. American Physical Society March Meeting, 21-25 March 2011, Dallas, Texas, Atomic Resolution imaging with non-contact Atomic Force Microscope (nc-AFM) in a closed liquid cell, Umit Celik , **Demet Catcat** , H. Ozgur Ozer , Ahmet Oral.
2. NANOTR VI, 6th National Nanoscience and Nanotechnology Congress, 15-18 June 2010, İzmir, Turkey,*"High Resolution AFM imaging in Liquid Environment"* Ümit Çelik, **Demet Catcat**, H. Ozgur Ozer, Ahmet Oral.
3. 17th High Matter Physics Meeting, 5 November 2010, Atomic Resolution imaging with non-contact Atomic Force Microscope (nc-AFM) in a closed liquid cell, Umit Celik, **Demet Catcat** , H. Ozgur Ozer , Ahmet Oral.
4. 13th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy, July 31-August 4, 2010, Kanazawa, Japan, 'Atomic Resolution nc-AFM imaging in a closed liquid cell' Umit Celik , **Demet Catcat** , H. Ozgur Ozer, Ahmet Oral.
5. 2nd Bio-AFM&Watching Biomolecules in Action, 14-17 December 2009, Kanazawa University, Osaka, Japan,*'In Situ-AFM and Imaging in Liquids '* **Demet Çatçat**, Serhat Çelik, Emir Baki Denkbaş and Ahmet Oral.
6. Textile Applications in Nanotechnology, 28-29 April 2009, *'AFM applications in Textile Industry'*, **Demet Çatçat,** Uludağ Universitesi, Bursa, TURKEY.
7. SPIE Smart Materials, Nano+Micro-Smart Systems, 9-12 December 2008, Melbourne, Australia, *"Investigation of K0.5Na0.5NbO3 (KNN) thin films by piezo-response force microscopy"*, Mert Gulleroglu, **Demet Catcat**, Ahmet Oral.
8. NANOTR V, 5th National Nanoscience and Nanotechnology Congress, 14-18 June 2009, Istanbul, Turkey, *'In-situ Atomic Force Microscopy and Imaging in Liquids'* **Demet Çatçat**, Serhat Çelik, Ahmet Oral.