

**PLATELETÇE ZENGİN PLAZMANIN AYRIMI İÇİN
DİSK TABANLI BİR SİSTEMİN TASARIMI VE
GELİŞTİRİLMESİ**

**DESIGN AND DEVELOPMENT OF A DISK-BASED
SYSTEM FOR SEPARATING PLATELET RICH PLASMA**

MELİH ZEKİ YILDIRIM

DOÇ. DR. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Aileme...

ÖZET

PLATELETÇE ZENGİN PLAZMANIN AYRIMI İÇİN DİSK TABANLI BİR SİSTEMİN TASARIMI ve GELİŞTİRİLMESİ

MELİH ZEKİ YILDIRIM

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Memed DUMAN

Eylül 2020, 115 sayfa

Kan, % 55'i plazma denilen sıvıdan ve % 45'i şekilli kan hücrelerinden oluşur. Plazmanın ana görevi besin, atık ürünler, antikorlar, pıhtılaşma proteinleri, hormonlar, vücudun sıvı dengesini korumaya yardımcı proteinler ve kan hücrelerini taşımaktır. Günümüzde yaralı bağ dokunun iyileştirilmesine yönelik kullanımının yanı sıra estetik açıdan da yeni bir yaklaşım sunan plateletçe zengin plazma (PZP) tedavisi, hastanın kendi platelet derişimlerinin enjeksiyonu ile gerçekleştirilen popüler bir uygulamadır. Bu yöntemde, iyileştirme ve geliştirmeye yönelik her bir hastanın kendi iyileşme sistemini kullanarak immun riski en aza indirmek amaçlanmaktadır.

PZP tedavisinin daha etkili sonuç verebilmesi için kandan istenilen oranda ve yüksek saflıkta platelet elde edilmesi gereklidir. Bu amaçla günümüzde sadece ticari olarak piyasada bulunan PZP kan tüpleri ve santrifüj yöntemi kullanılmaktadır. Kullanılan 2 ayrı yöntem bulunmaktadır. Bunlar tek santrifüj ile PZP eldesi ve çift santrifüj işlemi ile PZP eldesidir. Tek santrifüj işleminde genellikle kısa sürede yüksek hızlarda, çift santrifüj işleminde ise uzun sürede ve değişken hızlarda santrifüj işlemi yapıldığından, platelet hücrelerinin strese girmelerine, hasar görmelerine, aktif olmalarına, topaklanmalarına ve istenilen saflıkta elde edilememelerine neden olmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında bu problemlerin en aza indirilebilmesi için, disk tabanlı bir PZP ayırma kiti geliştirilmiştir. Bu ayırma kitinin geliştirilmesinde üç farklı basamak bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, disk tabanlı sistemin geliştirilmesi, santrifüj cihazının geliştirilmesi ve tiksotropik jel'in geliştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda kandaki plateletçe zengin bölgenin hızlı ve basit bir şekilde ayrılmasını sağlamak için ilk olarak, farklı tasarımlara sahip disk tabanlı sistemler Solidworks 2018 Premium programı ile 2-Boyutlu ve 3-Boyutlu olarak geliştirilerek etkinlikleri incelenmiştir. Bu doğrultuda farklı kanal yapıları, kanal tasarımları, yükleme aparatları gibi parametreler kan numunesinin miktarına ve kırmızı kan hücresi/plazma oranına göre optimize edilerek en uygun disk tasarımı belirlenmiştir. Tasarım, lazer kesim cihazı yardımıyla Polimetilmetakrilat (PMMA) tabakalar ve 130 µm kalınlığa sahip çift taraflı bant katmanlarından oluşturulmuştur.

İkinci aşamada, disk tabanlı sisteme uygun bir santrifüj cihazı geliştirilmiştir . Bunun için STM32F103 geliştirme kartı programlanarak BLDC Grand Turbo GT2215/09 motor ile birleştirilerek disk tabanlı sisteme uygun merkezkaç kuvvetinin uygulanmasını sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Disk tabanlı sistemin santrifüj işlemi sırasında görüntülenmesini sağlamak için Arduino Uno geliştirme kartı programlanarak Power led'li stroboskop sistemi ile Canon Eos 450D fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

Üçüncü aşamada ise kandan etkin bir şekilde PZP eldesi için disk tasarımına entegre edilmek üzere tiksotropik jel geliştirilmiştir. Bu jel, ticari olarak piyasada bulunan bir jel ile karşılaştırılarak FTIR ve reolojik özellikleri belirlenmiştir. Reolojik analizler sonucunda, geliştirilen jelin tiksotropik olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak çalışma neticesinde, geliştirilen tiksotropik jelin entegre edildiği uçak tasarımında denemesi yapılan Z şekilli kanal ile elde edilen PZP'nin, platelet sayım analizi yapılmıştır. Analiz sonucuna göre elde edilen PZP'nin tam kandaki platelet sayısını zenginleştirme faktörünün 3,53 kat olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle tam kandan, disk tasarımı nedeniyle uygulamada kolay, platelet hücrelerini strese sokmadan düşük santrifüjleme hızında, daha kısa sürede ve uygun maliyetli kırmızı kan hücrelerini ayırıcı jel içeren bir disk tabanlı sistem kullanılarak, PZP eldesi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu ayırma yönteminin farklı tıbbi amaçlar için PZP uygulamalarında önemli bir ilerleme sağlayacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: PZP, disk tabanlı sistemler, platelet, tiksotropik jel, santrifüj sistemi, biyosensörler.

ABSTRACT

DESIGN AND DEVELOPMENT OF A DISK-BASED SYSTEM FOR SEPARATING PLATELET RICH PLASMA

MELİH ZEKİ YILDIRIM

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Memed DUMAN

September 2020, 115 pages

Blood consists of 55% blood fluid called plasma, and 45% shaped blood cells. The main task of plasma is to transport nutrients, waste products, antibodies, coagulation proteins, hormones, proteins that help maintain the body's fluid balance and blood cells. Platelet-rich plasma (PRP) therapy, which offers a new aesthetic approach as well as its use for the improvement of injured connective tissue, is a popular application performed by injection of the patient's own platelet concentrations. In this method, it is aimed to minimize the immune risk by using each patient's own recovery system for improvement and development.

In order for PRP treatment to give more effective results, it is necessary to obtain the desired rate and high purity platelets from the blood. For this purpose, only commercially available PRP blood tubes and centrifuge method are used today. There are 2 different methods used. These are the production of PRP with a single centrifuge and PRP with a double centrifuge process. Since the centrifugation process is performed at high speeds in a short time in a single centrifuge process, in a long time and at variable speeds in the double centrifuge process, it causes platelet cells to be stressed, damaged, active, agglomerate and not obtain the desired purity.

In this thesis, a disk-based PRP separation kit has been developed in order to minimize these problems. There are three different steps in the production of this separation kit. These are respectively the development of the disc-based system, the production of the centrifuge device and thixotropic gel. First of all, in order to ensure the quick and simple separation of the platelet rich region in the blood, disc-based systems with different designs were designed in 2D and 3D with the Solidworks 2018 Premium program and their effectiveness was examined. The most suitable disc design was determined by optimizing parameters such as different channel structures, channel designs, loading apparatus according to the amount of blood sample and the red blood cell / plasma ratio. The design is produced from Polymethylmethacrylate (PMMA) layers and 130 μm double-sided tape layers using a laser cutting device.

Secondly, A centrifuge device suitable for disc based system was improved. The STM32F103 development board is programmed and combined with the BLDC Grand Turbo GT2215 / 09 engine so as to allow the proper centrifugal force to be applied to the disk-based system. Arduino Uno development board was programmed and Canon Eos 450D camera was used with Power led stroboscope system to display the disk based system during the centrifuge process.

Thirdly, A thixotropic gel was produced to be integrated into the disc design for the efficient isolation of PRP from the blood. By comparing with a commercially gel, the FTIR rheological properties of gels were determined and rheological analysis confirmed that the our gel was show thixotropic behaviour.

Consequently, after the centrifugation process, it was determined that the enrichment factor was increased by 3.53 with the platelet count analysis performed after PRP isolation with a Z-shaped channel disc in which the thixotropic gel produced was integrated. Thus, PRP was successfully obtained from whole blood using a simple, low centrifugation speed, shorter time and cost effective disc-based system with separating gel. We believe that this separation method produced will make a significant progress in the implementation of PRP for medical purposes.

Keywords: PRP, disk based systems, platelet, thixotropic gel, centrifuge system, biosensors

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sadece bilimsel anlamda değil sahip olduğu eşsiz bilgisiyle de hayatıma yön veren, desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Memed DUMAN'a,

Ayrıca çalışmamda değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a, Dr. Öğr. Üyesi Deniz BAŞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Dinçer GÖKCEN'e ve Doç. Dr. Çağlar ELBÜKEN'e,

Bu tezin tamamlanmasında 118S047 numaralı proje ile maddi destek sağlayan ve 2210-C öncelikli alanlar programı ile burs desteği sağlayan TUBİTAK'a,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren laboratuvar arkadaşlarım İpek AKYILMAZ, Gülgün AYLAZ, Naim Yağız DEMİR ve Uğur AYDIN'a, Didem AKSOY KÖRPE'ye, karakterizasyon deneylerimde yardımcı olan Gülçin GÜNAL KARATAŞ'a, Elektronik deneylerimde yardımcı olan Ar. Gör. İbrahim BOZYEL'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, beni motive eden, maddi-manevi her türlü desteği sağlayan, iyi gün ve kötü gün ayırt etmeden yanımda olan Bengisu TOPUZ'a,

Hayatım boyunca her koşulda bana destek veren ve sabır gösteren, önceliklerini her zaman benim önceliklerime göre değiştiren ve bunun karşılığını hiçbir zaman tam olarak ödeyemeyeceğim, bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan, bu hayatta hiç birşeye asla değişmeyeceğim canım aileme,

Sonsuz Teşekkürler...

Melih Zeki YILDIRIM

Eylül 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT..... | iv |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xiv |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Kan Bileşenleri | 3 |
| 2.1.1. Plazma..... | 3 |
| 2.1.2. Kan Hücreleri..... | 4 |
| 2.2. Plateletler (Trombositler)..... | 6 |
| 2.2.1. Platelet Morfolojisi | 6 |
| 2.2.2. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörleri | 7 |
| 2.2.3. Platelet Pıhtılaşma Yolağı..... | 9 |
| 2.3. Plateletçe Zengin Plazma..... | 11 |
| 2.3.1. Tam Kandan PZP Elde Edilmesi ve Hazırlanması | 11 |
| 2.3.2. PZP Tedavisinin Önemi ve Uygulamaları | 13 |
| 2.3.3. PZP Tedavisinin Kullanımının Avantajları | 15 |
| 2.3.4. Ticari PZP Kitleri..... | 16 |
| 2.3.5. PZP Tedavisinin Güvenilirliği ve Karşılaşılan Problemler | 16 |
| 2.4. Plazma/Serum Ayırma Jeli | 17 |
| 2.4.1. Tikotropik Jel | 17 |
| 2.5. Disk Tabanlı Sistemler..... | 18 |
| 2.5.1. Disk Tabanlı Sistemlerin Çalışma Prensibi | 19 |
| 2.5.2. İçsel Kuvvetlere Dayalı Karıştırma | 20 |
| 2.5.3. Disk Tabanlı Sistemlerin Kullanım Alanları | 21 |
| 2.6. Disk Tabanlı Sistemler için Santrifüj Cihazı ve Çalışma Prensibi | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 22 |
| 3.1. Disk Tabanlı Sistem Tasarımı | 22 |
| 3.1.1. Tasarıma Yönelik İlgili Hesaplamaların Yapılması..... | 22 |
| 3.2. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu | 22 |
| 3.2.1. Uygun Disk materyalinin Belirlenmesi..... | 22 |
| 3.2.2. CO ₂ Lazer Parametrelerinin Optimizasyonu | 23 |
| 3.2.3. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu | 23 |
| 3.3. Disk Tabanlı Sistem İçin Uygun Santrifüj Cihazının Fabrikasyonu..... | 24 |
| 3.3.1. Santrifüj Cihazı Tasarlanması | 24 |
| 3.3.2. Disk Tabanlı Sistemler için Geliştirilen Santrifüj Cihazının Çalışma Parametreleri | 24 |
| 3.4. Disk Tabanlı Sistemin Santrifüj Sırasında Görüntülenmesi Amaçlı Kamera Sisteminin Geliştirilmesi..... | 25 |
| 3.5. Tikotropik Platelet Ayırma Jelinin Geliştirilmesi..... | 26 |
| 3.5.1. Hidrokarbon Bazlı Tikotropik Platelet Ayırma Jelinin Geliştirilmesi..... | 26 |
| 3.5.2. Hyaluronik Jel Yapımı | 27 |
| 3.5.3. Tikotropik Jel için Karakterizasyon Testleri | 27 |
| 3.6. Disk Tabanlı Sisteme Uygun Vakumlu ve Vakumsuz Kan Yükleme Aparatı ve Vakumlama Cihazının Geliştirilmesi | 29 |
| 3.6.1. Kan Yükleme Aparatlarının Tasarımı ve Geliştirilmesi | 29 |
| 3.6.2. Vakumlama Aparatının Geliştirilmesi | 31 |
| 3.7. Geliştirilen Disk Tabanlı Sistemlerin Etkinliklerinin İncelenmesi | 31 |
| 3.7.1. Düz kanal Tasarımı | 31 |
| 3.7.2. Farklı Genişliklerde Düz Kanal Tasarımı | 33 |
| 3.7.3. Kan Seviyesi Belirlenmesi Amaçlı Kadeh Tasarımı..... | 35 |
| 3.7.4. Yıldız tasarım | 37 |
| 3.7.5. Kar Tanesi Tasarımı | 39 |
| 3.7.6. Uçak Tasarımı | 40 |
| 4.SONUÇLAR ve TARTIŞMA | 42 |
| 4.1. Disk Tabanlı Sistem Tasarımı | 42 |
| 4.1.1. Tasarıma Yönelik İlgili Hesaplamaların Yapılması..... | 43 |
| 4.1.2. Disk Tabanlı Sistemin Çizimleri | 43 |
| 4.2. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu | 48 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1. Uygun Disk materyalinin Belirlenmesi | 48 |
| 4.2.2. CO ₂ Lazer Parametrelerinin Optimizasyonu..... | 48 |
| 4.2.3. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu..... | 49 |
| 4.3. Disk Tabanlı Sistem İçin Uygun Santrifüj Cihazı Geliştirilmesi | 50 |
| 4.3.1. Santrifüj Cihazı Tasarlanması..... | 50 |
| 4.3.2. Disk Tabanlı Sistemler için Geliştirilen Santrifüj ve Stroboskop Işık Devresinin Değerlendirilmesi..... | 52 |
| 4.4. Tikotropik Platelet Ayırma Jeli | 55 |
| 4.4.1. Tikotropik Platelet Ayırma Jelinin Geliştirilmesi | 55 |
| 4.4.2. Tikotropik Jel için Karakterizasyon Testleri..... | 59 |
| 4.5. Disk Tabanlı Sisteme Uygun Vakumlu ve Vakumsuz Kan Yükleme Aparatı ve Vakumlama Cihazının Geliştirilmesi..... | 66 |
| 4.5.1. Kan Yükleme Aparatlarının Tasarımı ve Geliştirilmesi..... | 67 |
| 4.5.3. Vakumlama Aparatının Değerlendirilmesi..... | 70 |
| 4.6. Geliştirilen Disk Tabanlı Sistemlerin Etkinliklerinin İncelenmesi..... | 70 |
| 4.6.1. Düz kanal Tasarımının Değerlendirilmesi..... | 70 |
| 4.6.2. Farklı Genişliklerde Düz Kanal Tasarımının Değerlendirilmesi..... | 74 |
| 4.6.3. Kadeh Tasarımının Değerlendirilmesi..... | 76 |
| 4.6.4. Yıldız Tasarımının Değerlendirilmesi | 81 |
| 4.6.5. Kar Tanesi Tasarımının Değerlendirilmesi..... | 82 |
| 4.6.6. Uçak Tasarımları..... | 84 |
| 4.7. Disk Tabanlı Sistem ile Elde Edilen PZP Sonuçlarının Ticari Olarak Piyasada Bulunan Kitler ile Karşılaştırılması | 92 |
| 5. YORUM..... | 95 |
| 6. KAYNAKLAR | 98 |
| EKLER..... | 110 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 115 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Platelet yapısı [17]. | 7 |
| Şekil 2. Kanın pıhtılaşması sırasında gerçekleşen biyokimyasal olaylar [22]. | 9 |
| Şekil 3. Düz kanal tasarımı. | 44 |
| Şekil 4. Farklı genişliklerde düz kanal tasarımı. | 44 |
| Şekil 5. Kadeh kanal tasarımı. | 45 |
| Şekil 6. Yıldız tasarımı. | 45 |
| Şekil 7. Kar tanesi tasarımı. | 46 |
| Şekil 8. Vakum kapaklı- kare kanallı uçak tasarımı. | 46 |
| Şekil 9. Vakum kapaklı daralan kanallı uçak tasarımı. | 47 |
| Şekil 10. Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımı. | 47 |
| Şekil 11. Santrifüj cihazı için algoritma akış şeması | 52 |
| Şekil 12. Disk tabanlı sisteme uygun santrifüj cihazı ve BL-DC Motor. | 53 |
| Şekil 13. Arduino Uno ve Power led’li Stroboskop düzeneği. | 53 |
| Şekil 14. Stroboskop cihazı için algoritma akış şeması | 54 |
| Şekil 15. Farklı yoğunluklardaki CuSO_4 çözeltileri kullanılarak jel yoğununun belirlenmesi | 58 |
| Şekil 16. Jellerin kan numunesindeki ayırma etkinliğinin değerlendirilmesi. Santrifüjleme öncesi: Geliştirilen jel (A), Ticari jel (B); Santrifüjlendikten sonra: Geliştirilen jel (C), Ticari jel (D). | 58 |
| Şekil 17. Jellere ait FTIR spektrumun karşılaştırması grafiği: Geliştirilen jel kırmızı çizgi ile ticari jel mavi çizgi ile gösterilmiştir. | 60 |
| Şekil 18. Jellerin viskozite reolojik analizi: Geliştirilen jel (A); Ticari Jel (B). | 62 |
| Şekil 19. Frekansın bir fonksiyonu olarak G' ve G'' ölçen salınım çalışması ile jellerin reolojik analizi: Geliştirilen jel (A); Ticari Jel (B). | 64 |
| Şekil 20. Uygulanan kayma hızı altında jellerdeki kayma incelemesi ve yeniden toparlanma süresini temsil eden üç aşamalı kayma testi. | 65 |
| Şekil 21. Kanın ayrılmasında kullanılan çift jelin ependorf denemesi. (A). Jellerin ve kan numunesinin santrifüjden önce hali. (B). Jellerin ve kan numunesinin 800 g 10 dakika santrifüjden sonraki hali. (C). Jellerin ve kan numunesinin santrifüjden sonra ependorf ters şekilde 10 dakika bekletildikten sonraki hali. | 66 |

| | |
|--|----|
| Şekil 22. Basit kan yükleme tasarımı ve görüntüsü: üç boyutlu Solidworks çizimi (A), Oluşturulan PMMA yapı (B)..... | 67 |
| Şekil 23. Üç yollu musluk ile kan yükleme tasarımı (A) ve görüntüsü (B)..... | 68 |
| Şekil 24. Geliştirilmiş basit kan yükleme tasarımı(A) ve görüntüsü(B)..... | 69 |
| Şekil 25. Vakum kapaklı yükleme tasarımı (A) ve görüntüsü (B). | 69 |
| Şekil 26. Vakum kapaklı kan yükleme tasarımına uygun vakumlama aparatı. | 70 |
| Şekil 27. Düz kanal disk tasarımının katman görüntüsü. | 71 |
| Şekil 28. Düz kanal tasarımı 1. Kanalın kan numunesi ile denenmesi. Disk'in boş durumu (A). 1. Kanala numune yüklenmiş durumu (B). Diskin santrifüj işlemi sonunda yatay halde tutulduğundaki (C) ve dik halde tutulduğunda (D) durumu. | 72 |
| Şekil 29. Kuvvet sabitken farklı dakikalarda kanalların durumu: 800 g 'de 10 dk santrifüj edilmiştir (A). 800 g'de 7 dk santrifüj edilmiştir (B). 800 g 'de 5 dk santrifüj edilmiştir (C)..... | 73 |
| Şekil 30. Düz kanal tasarımındaki uzun kanalın 800 g 10 dk sonraki durumu..... | 73 |
| Şekil 31. Farklı Genişliklerdeki Düz Kanal Disk Tasarımının Katman Görüntüsü | 74 |
| Şekil 32. Geliştirilen disk görüntüsü (A). Kan numunesi yüklenmiş santrifüj öncesi görüntüsü (B)..... | 75 |
| Şekil 33. Jellerin santrifüj işlemi sonucundaki, farklı kanal ve farklı g değerlerindeki hareketi. | 75 |
| Şekil 34. Kadeh Disk Tasarımının Katman Görüntüsü..... | 77 |
| Şekil 35. Kadeh tasarımı disk'in görüntüleri: Santrifüj önceki durumu (A), 800 g'de 21 dakika çevirdikten sonraki durumu (B). | 78 |
| Şekil 36. Kadeh tasarımda 1 numaralı kanalın santrifüj boyunca kırmızı kan hücrelerinin seviyesinin görüntüleri..... | 79 |
| Şekil 37. Kadeh tasarımındaki 6 farklı kanaldaki kan numunesinin 800 g'de zamana bağlı kırmızı kan hücrelerinin çökme mesafesi grafiği..... | 80 |
| Şekil 38. Yıldız Disk Tasarımının Katman Görüntüsü | 81 |
| Şekil 39. Diskin kan yüklenmeden önceki durumu (A). Diskin 9 mL kan numunesi yüklenmiş durumu (B). Diskin 800 g 10 dakika santrifüj edildikten sonraki durumu (C). | 82 |
| Şekil 40. Kar Tanesi Tasarımının Katman Görüntüsü. | 83 |

| | |
|---|----|
| Şekil 41. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g’de 9 dakika çevrilirken durumu (santrifüj devam etmektedir.) (B) Disk 10. Dakika çevrildikten sonraki durumu (C). | 83 |
| Şekil 42. Vakum kapaklı kare kanallı uçak tasarımının katman görüntüsü. | 85 |
| Şekil 43. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g’de 8 dakika çevrildikten sonraki durumu (B). | 86 |
| Şekil 44. Vakum kapaklı daralan kanallı uçak tasarımının katman görüntüsü. | 86 |
| Şekil 45. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g’de 8 dakika çevrildikten sonraki durumu (B). | 87 |
| Şekil 46. Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımının katman görünümü. | 88 |
| Şekil 47. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g’de 8 dakika çevrildikten sonraki durumu (B). | 88 |
| Şekil 48. PZP toplama işleminin gerçekleştirilmesi. | 89 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Platelet büyüme faktörleri ve spesifik özellikleri [21]. | 8 |
| Tablo 2. PZP tedavisinin kullanıldığı alanlar [34] | 14 |
| Tablo 3. Kan Numunesindeki Hematokrit oranına göre PZP Toplama Bölgesinin Hesaplanması. | 43 |
| Tablo 4. Farklı g ve farklı kalınlıklardaki kanalda jellerin konumu. | 76 |
| Tablo 7. Kar tanesi tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları. | 91 |
| Tablo 8. Vakum kapaklı kare kanallı uçak tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları. | 91 |
| Tablo 9. Vakum kapaklı daralan kanallı uçak tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları. | 92 |
| Tablo 10. Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları. | 92 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|---------|-------------------------|
| μ L | Mikrolitre |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| gr | Gram |
| sn | Saniye |
| dk | Dakika |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| g | Yerçekimi ivmesi |
| Hz | Hertz |
| Pa | Pascal |

Kısaltmalar

| | |
|--------|--|
| PZP | Plateletçe zengin plazma |
| PFP | Plateletçe fakir plazma |
| KKH | Kırmızı kan hücreleri |
| MK | Megakaryosit |
| PDGF | Plateletler, platelet türevli büyüme faktörü |
| TGF-b1 | Transforme edici büyüme faktörü beta 1 |
| TGF-b | Transforme edici büyüme faktörü beta 2 |
| EGF | Epidermal büyüme faktörü |
| ECFG | Epitel hücre büyüme faktörü |
| PK | Platelet konsantreleri |
| VEGF | Vasküler endotel büyüme faktörü |

| | |
|---------------|---|
| FGF | Fibroblast büyüme faktörü |
| CTGF | Bağ dokusu büyüme faktörü |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü –1 |
| TF | Doku Faktörü |
| PMMA | Poli(metil metakrilat) |
| COP | Siklik olefin polimer |
| PDMS | Polidimethylsiloxan |
| PG | Propilen glikol |
| TOTM | Trioctyl trimellitate |
| IR | Kızılötesi |
| FTIR | Fouirer dönüşümlü kızılötesi spektrometre |
| PET | Polietilen teraftalat |
| ESC | Elektronik hız kontrolcüsü |
| PWM | Sinyal genişlik modülasyonu |
| AC | Alternatif akım |
| DC | Doğru akım |
| MCU | Merkezi işlem birimi |
| η | Viskozite |
| G' | Depolama modülü |
| G'' | Kayıp modülü |
| $\tan \delta$ | Kayıp tanjant |

1. GİRİŞ

Plateletler, primer olarak hemostazdaki rolleri ile bilinen periferik kandaki küçük ve çekirdeksiz pulcuklardır. Plateletler, diğer adıyla trombositler, kanda %1 oranında bulunan ve boyutları 2-4 mikron olan hücrelerdir. Vücuttaki iltihaplanmada, immun sistemde ve yara iyileşmesinde büyük rol oynarlar [1]. Plateletler, içerisindeki büyüme faktörleri ile yaralanan dokunun iyileşmesinde görev alırlar. Bu sebepten günümüzde yara iyileşmesini hızlandırmak amaçlı plateletçe zengin plazma (PZP) tedavisi kliniklerde sıklıkla uygulanmaya başlanmıştır.

Plateletçe zengin plazma, özellikle tendinopati ve dejeneratif hücresel hastalıkların tedavisindeki potansiyeli nedeniyle klinisyenler için giderek daha popüler bir tedavi olmuştur. Klinik ortamdaki PZP tedavisi, ilk olarak 1987 ve 1990 yıllarında kardiyak cerrahide kullanılmış ve kan kaybının önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür [2,3]. Daha sonra kemik üzerindeki etkisini gözlemlemek için, diş hekimliği alanında kemik olgunlaşması ve kemik oluşumu üzerindeki rejeneratif özellikleri açısından incelenmiştir [4,5]. Zamanla kas-iskelet sistemi için kullanımı artmış, tendon ve doku iyileşmesindeki rolü yoğun olarak araştırılmıştır [6]. Günümüzde ise çoğu yara iyileşmesi alanında PZP tedavisi kullanılmaktadır. PZP tedavisinde, yaralı bölgedeki plateletlerin derişiminin artırılması sağlanır ve yaralı dokunun normalden daha hızlı iyileşmesi amaçlanmaktadır. Bu tedavi, otolog (kişinin kendi kanı kullanılarak) bir yöntem olduğundan kişiye özel tedavi olarak da değerlendirilmektedir. Böylece hastada istenmeyen immun bir reaksiyon görülmemektedir.

Sunulan tez çalışmasında, PZP tedavisi için kullanılacak plateletlerin daha etkili bir şekilde kandan ayrılması için disk tabanlı bir sistemin tasarlanması planlanmış ve bu amaç doğrultusunda farklı geometrilerdeki sistemler geliştirilmiştir.

Disk tabanlı sistemlerde, kanı ayırma mekanizmalarının çalışma prensibi esas olarak farklı kan bileşenleri arasındaki yoğunluk farklarına dayanmaktadır. Genel olarak disk tabanlı sistemlerde santrifüj sırasında kan numunesi üzerine merkezkaç, coriolis ve euler kuvvetleri farklı derecelerde etki etmektedir. Tüm kan hücrelerinden daha yüksek bir

yoğunluğa sahip olan kırmızı kan hücreleri (KKH), merkezkaç kuvvetinden daha çok etkilenerek, disk'in merkezinden en uzak noktasına doğru hareket etmektedir. Disk tabanlı sistemin üzerindeki kanalların kavisli yapıda tasarlanması durumunda, Coriolis kuvvetinin altında olan KKH'leri kanalların dış duvarına doğru hareket etmektedir. Bu şekilde KKH'leri disk üzerinde istenilen rezervuara yönlendirmek mümkündür. Sonuç olarak disk üzerindeki kanallarda farklı yoğunluğa sahip kan hücrelerini farklı rezervuarlarda elde etmek mümkündür [7]. Bu tabaklarda disk'in dış duvarından merkezine doğru sırası ile, kırmızı kan hücrelerinden oluşan bir faz, plateletler ile beyaz kan hücrelerinden oluşan bir faz ve plazma fazı bulunmaktadır.

Yapılan tez çalışmasında PZP'nin daha saf halde elde edilebilmesi için disk tabanlı sistemin yanı sıra santrifüj işlemi sonrasında kanın fazlarının birbirlerine karışmaması ve uygulayıcının plateletleri içeren fazı daha saf bir şekilde elde etmesi için tiksotropik bir jel geliştirilmiştir. Tiksotropik jel, durgun halde jel özellikleri gösteren fakat belirli bir yer çekimi ivmesi (g) kuvveti altında sıvı özelliği gösteren bir polimerdir. Bu jel, KKH'lerinin yoğunluğu ile plateletlerin arasında bir yoğunluğa sahip olacak şekilde sentezlenmiştir. Bu sayede santrifüj kuvveti ile jel sıvılaşır rahatlıkla yoğunluk farkına göre hareket edebilmektedir. Santrifüj sırasında tiksotropik jel, platelet ve kırmızı kan hücrelerinin arasındaki yerini almakta ve işlem bittikten sonrada burada bir bariyer oluşturarak KKH'leri ile platelet hücrelerinin karışmalarını engellemektedir.

Tez çalışmasında ilk olarak, disk tabanlı bir sistemde kandaki plateletçe zengin bölgenin ayrılması için uygun kanal tasarımının geliştirilme çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra ise, tiksotropik bir jelin sentezlenmesi ve jelin hareketine uygun farklı kanal tasarımlarına entegre edilmesiyle plateletçe fakir plazma (PFP) ve plateletçe zengin plazmanın ayrılarak PZP'nin etkin bir şekilde saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır.

Geliştirilen farklı disk tabanlı sistemler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen platelet miktarı ve tam kandaki platelet miktarına göre zenginleştirilme kat sayısı hesaplanarak, ticari olarak kullanılan PZP kitleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda en iyi verim alınan tasarım belirlenmiştir. Sonuç olarak tez çalışmasında

yapılan tiksotropik jel entegreli uçak tasarımında Z kanallı disk tabanlı sistem çizimi ile literatürde yer alan PZP tedavisine uygun kat sayıda platelet elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Kan, vücuda alınan besin ve oksijeni hücrelere iletirken, karbondioksit gibi atık ürünlerinde hücrelerden uzaklaşmasına yardımcı olan bir vücut sıvısıdır. Aynı zamanda vücudun pH'sinin ve sıcaklığının düzenlenmesinde de önemli bir role sahiptir. Genel olarak çoğu yetişkinin vücudunda 4-6 litre kan bulunmaktadır ve bu kan, insan vücut ağırlığının yaklaşık %7-9'unu oluşturmaktadır. Kan sıcaklığı yaklaşık 38°C'dir ve kan 7.35-7.45 arasında değişen hafif bir alkali bir pH'ye sahiptir. Ayrıca kanın vücut dengesini korumak için pıhtılaşma özelliğine sahiptir. Bu özellik ile kanın dolaşım sisteminden çıkıp, vücut hücrelerinin besinsiz ve oksijensiz kalarak ölümcül sonuçlarının olmasını engellemektedir [7].

2.1. Kan Bileşenleri

Kanda çözülmüş halde bulunan çok sayıda kimyasal madde ve farklı hücre türü bulunmaktadır. Kan iki ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; kan hücreleri (kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve plateletler) ve plazmadır. Toplam kan hacminin yaklaşık %45'ini kan hücreleri ve %55'ini plazma oluşturmaktadır [8].

2.1.1. Plazma

Plazma, berrak, saman renginde bir sıvıdır. Plazmadaki su, kanın toplam hacminin %91,5'ini oluşturmaktadır. Plazmanın geri kalanı, proteinlerden (%7) ve proteinler dışındaki çözünen minerallerden (%1,5) oluşmaktadır. Plazma içerisinde bulunan suyun, kandaki maddeler için bir çözücü görevi görmesi, kanın hücresel bileşenlerini homojen olarak tutmak için bir ortam sağlaması ve vücut içerisinde ısının eşit dağılması gibi çeşitli görevleri vardır [9].

Plazmada bulunan proteinler, kan damarı ve interstisyum (hücreler arasındaki boşluk) arasında hareket eden sıvı miktarını düzenlemeye, kan damarı içindeki ozmotik basıncı kontrol etmeye ve kanın viskozitesine katkıda bulunmaktadır. Kan viskozitesi, kan

damarları içerisindeki basıncı dengelemeye yardımcı olmaktadır. Viskozite arttıkça kan akışına karşı direnç artmaktadır (periferik direnç artar). Bu sayede kan basıncı düşmekte ve vücut içerisindeki denge sağlanmaktadır.

Plazmada bulunan diğer bir yapı ise mineral tuzlarıdır. Plazmada çözülmüş halde klorür, fosfat, sodyum, potasyum ve kalsiyum karbonatları bulunmaktadır. Plazma içerisinde çözülmüş bu çeşitli tuzların doğru dengesi, vücut dokularının ve organlarının normal çalışması için hayati önem taşımaktadır. Sitoplazma ve nükleoplazma oluşumu için bu tuzlar gereklidir. Ayrıca vücuttaki asitleri veya alkalileri nötralize eden ve kan pH'sini koruyan tampon maddeler olarak da işlev görürler. Vücudun elektrolit dengesi, plazmada pozitif yüklü iyonların, özellikle sodyum ve negatif yüklü iyonların, klorür ve bikarbonatın düzenlenmesi ile korunmaktadır [10].

2.1.2. Kan Hücreleri

Kan hücreleri, toplam kanının yaklaşık %45'ini oluşturmaktadır ve üç ana kan hücresi türü vardır. Bunlar; Eritrositler (kırmızı kan hücresi), Lökositler (beyaz kan hücresi) ve Plateletlerdir (trombositler). Sağlıklı bir insanın kanında, bir mikrolitrede yaklaşık 5.000.000 kırmızı kan hücresi, 7.500 adet beyaz kan hücresi ve 300.000 platelet bulunmaktadır [8].

Eritrositler, kırmızı kan hücreleri (KKH), insan kanında en fazla bulunan hücre tipidir. Vücut hücrelerinin hayatta kalması için kritik olan oksijen (O₂) taşıma işlemini yerine getirmek için diğer hücre tiplerinde önemli olan çekirdek, ribozom, mitokondri ve diğer organellerden yoksundurlar [11]. Bu geleneksel olmayan hücre, periferik dokulara oksijen verilmesinden sorumlu bir protein olan hemoglobinin birikmesine izin vermek için gelişmiştir. Tipik sağlıklı bir yetişkinde, yeni oluşturulan her 2 milyon KKH'si, kemik iliğinden dolaşıma girer ve aynı zamanda yaklaşık aynı sayıda yaşlı KKH'si makrofajlar tarafından parçalanmaktadır [12]. Tam kanda, eritrosit hacminin tam kan hacmine oranına hematokrit denilmektedir. Hasta olmayan bireylerde hematokrit değeri cinsiyete göre farklılık gösterir. Erkekler için hematokrit değeri %42 ile %52 arasında ve kadınlar için %37 ile %47 arasındadır [13].

Lökositler, Beyaz Kan Hücreleri, araştırmacılar tarafından granülositler, lenfositler ve monositler olmak üzere üç ana kategoride tanımlanmıştır.

Granülositler

Protein içeren küçük granüllere sahip beyaz kan hücreleridir. Üç tip granülosit hücresi vardır:

- Bazofiller: Vücuttaki beyaz kan hücrelerinin %1'inden daha azını temsil eder ve genellikle alerjik reaksiyondan sonra artan sayıda bulunurlar.
- Eozinofiller: Parazitlerin neden olduğu enfeksiyonlara cevap vermekten sorumludur. Ayrıca vücuttaki genel bağışıklık tepkisinin yanı sıra iltihap tepkisinde de rol oynarlar.
- Nötrofiller: Vücuttaki beyaz kan hücrelerinin çoğunu temsil eder. Vücutta bulunabilecek bakteri ve mantarları çevrelemeye ve yok etmeye yardımcı olarak temizleyiciler görevi görürler.

Lenfositler

- B hücreleri: B-lenfositleri olarak da bilinen bu hücreler, bağışıklık sisteminin enfeksiyona bir yanıt oluşturmasına yardımcı olacak antikorlar üretir.
- T hücreleri: T-lenfositleri olarak da bilinen bu beyaz kan hücreleri, enfeksiyona neden olan hücrelerin tanınmasına ve çıkarılmasına yardımcı olur.
- Doğal öldürücü hücreler: Bu hücreler, virüs hücrelerine ve kanser hücrelerine saldırmaktan ve onları parçalamaktan sorumludur.

Monositler

Vücuttaki toplam beyaz kan hücresi sayısının yaklaşık %2-8'ini oluştururlar. Monositler, vücut kronik enfeksiyonlarla savaştığı zaman daha çok görülürmektedirler.

2.2. Plateletler (Trombositler)

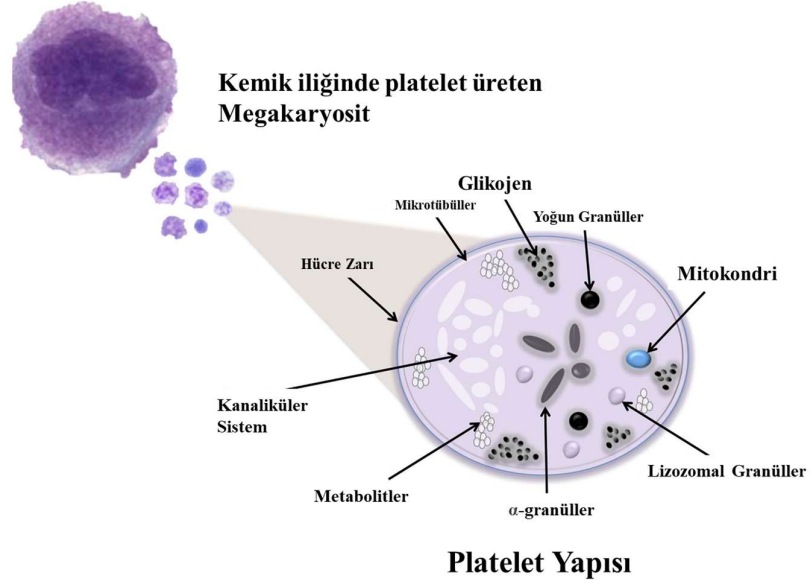
Kanda bulunan en küçük hücrelerdir. En önemli özellikleri hemostaz'ı korumak için kanın pıhtılaşmasında görev almaktadırlar. Dinamik özellikte olmalarına rağmen, genellikle inaktif durumdadırlar. Sadece bir kan damarı hasar gördüğünde aktifleşirler. Ancak hemostaz veya kan pıhtılaşması plateletlerin tek işlevi değildir. Bunun yanı sıra vücudun homeostazını izleyen çeşitli çok işlevli özelliklerde de görev almaktadırlar.

Farklı hastalık durumlarına karşı yüksek duyarlılıkları nedeniyle plateletler, en kolay erişilebilir belirteçlerden biridir. Farklı hastalık patogenezi için platelet reaktivitesi büyük ölçüde CD36, CD41, CD42a, CD42b ve CD61 gibi biyolojik olarak aktif bazı belirteçlere bağlıdır. Bunlar arasında bazı aktif yüzey reseptörleri ve platelet salgı ürünleri yer alır. Platelet, farklı hastalık tanı ve prognozunda bu belirteçlerin ekspresyonunu ve sinyalini değiştirme eğilimindedir ve hastalık ilerlemesini keşfetmek için büyük bir alan sağlamaktadır [14].

2.2.1. Platelet Morfolojisi

Plateletler, çapı 1-3 µm olan küçük diskoid şekilli çekirdeksiz hücrelerdir. Kemik iliğinde bulunan megakaryositlerin (MK'ler) sitoplazmasında üretilirler. Hemostaz ve trombozda ana rol oynamak için vasküler sistemde dolaşırlar. Sağlıklı bir bireyin kanında 150.000-450.000 hücre / µL platelet vardır ve KKH'lerinin yanında en çok bulunan ikinci hücrelerdir. Bu sayı periferik kandaki plateletlerin yaklaşık %70'ini oluşturur. Kalan % 30 vücut plateleti dalakta depolanmaktadır [15].

Ayrıca plateletler yoğunluklarına göre düşük yoğunluklu (1.040 d <1.065 g / ml), ara yoğunluk (1.065 d <1.070 g / ml) ve yüksek yoğunluklu (1.070 d <1.080 g / ml) olarak 3 alt popülasyondan oluşmaktadırlar. [16]



Şekil 1. Platelet yapısı [17].

Plateletler birden fazla yüzey reseptörüne, bir kanaliküler sisteme, mikrotübüllere, mitokondriye, üç tip granüle (lizozomal, alfa ve yoğun) ve glikojen gibi küçük faktörlerin birikimlerine sahiptir [18]. Yoğun granüller trombosit aktivasyonunu güçlendiren faktörleri içerirken, α -granüller hemostaza katkıda bulunan büyüme faktörleri ve pıhtılaşma proteinlerini içermektedir (Şekil 1) [19].

2.2.2. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörleri

Plateletler, platelet türevli büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF-b1), transforme edici büyüme faktörü beta 2 (TGF-b2), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve epitel hücre büyüme faktörü (ECFG) dahil olmak üzere bir dizi farklı büyüme faktörü içerir [20]. Literatürde, Marx ve arkadaşlarının platelet konsantreleri (PK) tarafından sağlanan platelet büyüme faktörlerini kullandıktan sonra kemik oluşumunda ve kemik yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görmüşlerdir [4]. Tablo 1’de platelet büyüme faktörleri hakkında bilgi verilmiştir.

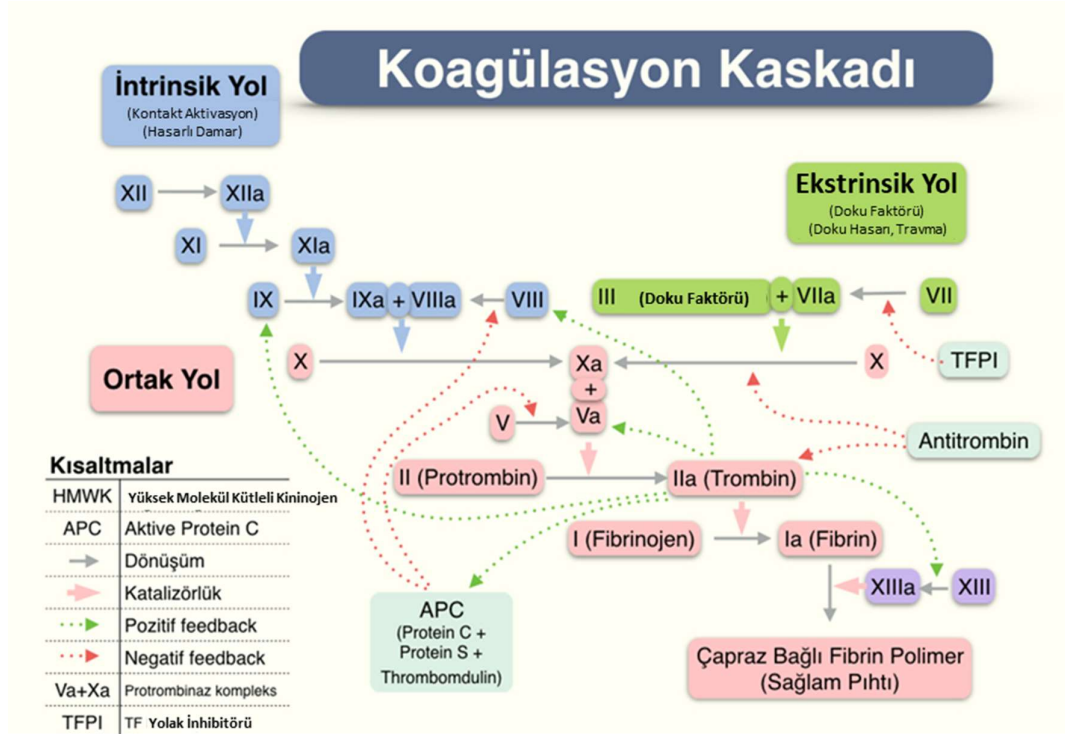
Tablo 1. Platelet büyüme faktörleri ve spesifik özellikleri [21].

| Platelet Büyüme Faktörü Tipi | Kaynağı | Biyolojik Etkileri |
|---|---|---|
| Platelet kaynaklı büyüme faktörü (a-b) | Plateletler, osteoblastlar, endotel hücreleri, makrofajlar, monositler, düz kas hücreleri | Mezenkimal hücreler ve osteoblastlar için mitojenik, fibroblast / glial / düz kas hücrelerinde kemotaksisi ve mitogenezi uyarır, kolajenaz sekresyonunu ve kolajen sentezini düzenler, makrofaj ve nötrofil kemotaksisini uyarır. |
| Dönüştürme büyüme faktörü (TGF (alfa-beta)) | Plateletler, hücre dışı kemik matrisi, kırık matrisi, aktif TH1 hücreleri ve doğal öldürücü hücreler, makrofajlar / monositler ve nötrofiller | Farklılaşmamış mezenkimal hücre çoğalmasını uyarır; endotel, fibroblastik ve osteoblastik mitogenezi düzenler; kollajen sentezini ve kolajenaz sekresyonunu düzenler, büyüme faktörlerinin mitojenik etkilerini düzenler, endotel kemotaksik ve anjiyogenezi uyarır, makrofaj ve lenfosit çoğalmasını engeller. |
| Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) | Plateletler, endotel hücreleri | Anjiyogenezi ve damar geçirgenliğini artırır, endotel hücreleri için mitogenezi uyarır. |
| Epidermal büyüme faktörü (EGF) | Plateletler, makrofajlar, monositler | Endotel kemotaksisi / anjiyogenezi uyarır, kollajenaz sekresyonunu düzenler, epitel / mezenkimal mitogenezi uyarır. |
| Fibroblast büyüme faktörü (FGF) | Plateletler, makrofajlar, mezenkimal hücreler, kondrositler, osteoblastlar | Mezenkimal hücreler, kondrositler ve osteoblastlar için mitojenik olan kondrosit ve osteoblastların büyümesini ve farklılaşmasını teşvik eder. |

| | | |
|---|---|---|
| Bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) | Kemik iliğinde hücre dışı ortamdan endositoz yoluyla plateletler | Anjiyogenez, kırıkta rejenerasyonu, fibrozis ve platelet yapışmasını destekler. |
| İnsülin benzeri büyüme faktörü -1 (IGF-1) | Plazma, epitel hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri, osteoblastlar, kemik matrisi | Fibroblastlar için kemotaksi ve protein sentezini uyarır. Osteoblastların çoğalması ve farklılaşması ile kemik oluşumunu artırır. |

2.2.3. Platelet Pıhtılaşma Yolağı

Kan, insan vücudunun gerekli bir bileşenidir ve bu sıvının kaybı hayatı tehdit edici olabilmektedir. Bu nedenle plateletler pıhtılaşma mekanizmasını başlatarak vücudu kan kaybına karşı korumaktadır. Şekil 2’de pıhtılaşma mekanizmasının şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2. Kanın pıhtılaşması sırasında gerçekleşen biyokimyasal olaylar [22].

2.2.3.1. İntrensik Yol (Kontakt Aktivasyon Yolu)

Kan içerisinde serbest halde olan koagülasyon faktörleri işlemi başlamaktadır.

Hasar alan damardan ayrılan kollajene HMWK veya prekallikrein tutunmaktadır. Oluşan yapı nedeniyle prekallikrein aktive olur ve kallikreine dönüşmektedir. Bu dönüşüm Faktör XII'yi (Hageman Faktör) aktive etmektedir. Aktif olan Faktör XIIa, Faktör XI'i aktive eder. Aktive olan Faktör XIa, Faktör IX'u aktive eder. Bu işlem sonunda aktif olan Faktör IXa, Faktör VIIIa ile birleşir. Bu birleşim sonucunda ortaya çıkan enzime Tenase kompleksi adı verilmektedir. Tenase kompleksi (IXa+VIIIa), Faktör X'u aktive etmektedir. Koagülasyon işlemi Faktör X ve sonrasında ortak yoldan devam etmektedir.

İntrensik yol; HMWK, prekallikrein, Faktör XII, Faktör XI, Faktör IX, ve Faktör VIII'den oluşmaktadır.

2.2.3.2. Ekstrinsik Yol (Doku Faktör Yolu (Doku Faktörü (TF), Faktör III))

Kanın dışında olan doku faktörleri tarafından işlem başlamaktadır. Damar hasar aldığı anda, yara üzerindeki doku faktörleri olan TF ve Faktör III, faktör VIIa bağlanarak kompleks bir yapı oluşturmaktadır. TF ve Faktör VIIa kompleksi, Faktör X'u aktive etmektedir. Koagülasyon işlemi Faktör X ve sonrasında ortak yoldan devam etmektedir.

Ekstrinsik yol; doku faktörü ve faktör VII kompleksini kapsamaktadır.

2.2.3.3. Ortak Yol

Her iki yolla da aktive olan Faktör X, Faktör Va ile birleşmektedir. İki faktörün oluşturduğu Faktör Xa ve Faktör Va yapısına protrombinaz kompleksi denilmektedir. Bu yapı sayesinde protrombin, trombine dönüşmektedir. Trombin ise fibrinojen, fibrine dönüşmektedir. Faktör XIII, fibrin liflerini çapraz bağlayarak pıhtının sağlamlaşmasını sağlamaktadır. Sağlam pıhtı yara iyileşinceye kadar kalır.

Sonuç olarak ortak yoldaki faktörler; Faktör X, Faktör V, Faktör II (trombin), Faktör I (fibrinojen) ve Faktör XIII'tür. [22]

2.3. Plateletçe Zengin Plazma

Plateletçe zengin plazma (PZP) günümüzde farklı tıbbi alanlarda kullanılmaktadır. Doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi, cilt gençleştirme etkileri ve alopesi gibi birçok farklı uygulaması vardır. PZP, otolog olarak alınan kanın santrifüjlendikten sonra plazma kısmındaki, normal değerlerin üzerinde platelet konsantrasyonu olan bir kısmı olarak tanımlanan biyolojik bir üründür. Santrifüjlemeden önce toplanan hastaların kanından elde edilmektedir [23].

2.3.1. Tam Kandan PZP Elde Edilmesi ve Hazırlanması

Literatürde tam kandan PZP elde edilmesiyle ilgili çok sayıda farklı protokol bulunmaktadır. Genellikle, ilk olarak bütün PZP kitlerinde ortak olarak insandan tam kan alındığında platelet kaybının önlenmesi için kanın pıhtılaşma yolağının durdurulması gerekmektedir. Bu nedenle tam kan içerisinde antikoagülant madde kullanılmaktadır. Kanın pıhtılaşmaması için kullanılan bu maddeler genellikle sitratlı antikoagülantlar ve Etilendiamintetraasetikasittir (EDTA). İdeal bir antikoagülant, plateletlerin işlevselliğini, bütünlüğünü ve morfolojisini korumalıdır [21].

Bu nedenle, EDTA plateletlerin hücre zarına zarar verdiği için tercih edilmemektedir [21]. PZP hazırlığı için sitratlı antikoagülantlar ve sodyum sitrat dekstroz önerilmektedir [24]. Bu nedenle PZP hazırlama çalışmalarının hemen hemen hepsinde sitrat içeren antikoagülantlar kullanılmaktadır.

Kahn ve arkadaşları, çalışmalarında yaklaşık 478 mL tam kan kullanarak 4 dakikalık bir süre boyunca 3731 g'lik bir santrifüj işlemi ile en yüksek platelet konsantrasyonunu elde etmek için en uygun koşul olduğu belirlemişlerdir [25].

Slichter ve Harker tarafından hazırlanan PZP protokolünde, 450 mL tam kan örneği 9 dakika boyunca 1000 g'de santrifüjlenmiştir. Ayrılan plazma hesaplandığında platelet verimi %89 olarak belirlenmiştir. Plateletleri plazmadan ayırmak için 2. bir santrifüj yapılması gerektiğini düşünmüşlerdir ve plateletleri çöktürmek için daha yüksek

merkezkaç kuvveti ile (3000 g) 20 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Bu işlem sonunda, 2. santrifüj işleminin platelet canlılığını azalttığını gözlenmiştir [26].

Landesberg ve arkadaşları, 5 mL tam kan örneği kullanarak 2 santrifüj işlemi yapmıştır. İlk santrifüj işleminde 200 g'de 10 dakika çevirmiş ve plazmayı toplamıştır. 2. Santrifüj işleminde de yine aynı şekilde 200 g'de 10dk çevirmiştir. Sonuç olarak tam kan platelet konsantrasyonunun yaklaşık 3,2 katı olan PZP örnekleri elde etmiştir [27].

Jo ve arkadaşları, 39 denekte PZP hazırlamak için iki aşamalı santrifüj kullanmıştır. 9 mL'lik tam kan, 5 dakika boyunca 200 g artışlarla 500 g ila 1900 g ve 10 dakika boyunca 200 g artışlarla 100 g ila 1300 g arasında santrifüjlenmiştir. Toplanan plazmalara 2. santrifüj işlemi yapılmıştır. 2. santrifüj işleminde 15 dakika 1000 g, 15 dakika 1500 g, 5 dakika 2000 g ve 5 dakika 3000 g'de parametreleri kullanılmıştır. İlk ayırma adımı için tam kan'a 900 g'de 5 dakika santrifüjleme ile %92 platelet verimi olarak en iyi parametre olduğuna karar vermişlerdir. İkinci ayırma adımında 1500 g'de 15 dakika santrifüjleyerek %84 platelet verimi almışlardır. İlk santrifüj sonrasında platelet konsantrasyonu $310.7 \pm 78.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ olarak ölçülmüştür. 2. Santrifüjleme işlemi sonunda platelet konsantrasyonu, başlangıç konsantrasyonundan 4.2 kat daha fazla olan $633.2 \pm 91.6 \times 10^3/\text{mm}^3$ olarak bulunmuştur [28].

Bausset ve arkadaşları çalışmalarında iki aşamalı santrifüj kullanmışlardır. 8.5 mL tam kanı 15 dakika boyunca 130 g ve daha sonra 2 mL plazmayı 15 dakika boyunca 250 g'lik kuvvetle santrifüjlemişlerdir. Tam kandan 3.47 kat daha fazla bir platelet konsantrasyonu elde etmişlerdir [29].

Tamimi ve arkadaşları, PZP elde etmek için çift santrifüj (ACE sistemi; Cerrahi Tedarik ve Cerrahi Bilim Sistemleri, Brockton, MA, ABD) ve tek santrifüj (Nahita Sistemi; Nahita, Navarra, İspanya) yöntemlerini karşılaştırmıştır. Her biri 8.5 mL olan tam kan için üç test tüpü bir ACE santrifüj makinesine sokulmuş ve 10 dakika 160 g (1300 rpm) bir kuvvet uygulanmıştır. İkinci santrifüjleme için, 10 dakika boyunca 400 g kuvvet (2000 rpm) uygulanmıştır. Nahita sistemi için kan, antikoagülant olarak 0.5 mL trisodyum sitrat,

sitrat ve ACD içeren 3.5 mL sitratlı tüplere (Venojet; Terumo MR, Tokyo, Japonya) ekstrakte edilmiştir. Test tüpleri, 280 g kuvvetle (1500 rpm) 8 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. ACE ve Nahita sistemlerinden platelet konsantrasyonu sırasıyla % 336 ve % 227 olarak bulunmuştur [30].

Mazzocca ve arkadaşları farklı bileşimlere sahip PZP numuneleri hazırlamak için üç protokol analiz etmiştir: Düşük platelet konsantrasyonu için 10 mL tam kan numunesi kullanılarak 1500 rpm 5 dk çevrilmiştir. Yüksek platelet ve yüksek beyaz kan hücresi ($17 \times 10^3 / \text{mm}^3$) konsantrasyonu için, 3200 rpm'de 15 dakika boyunca tam kan çevrilmiştir.; Daha yüksek bir platelet ve daha düşük beyaz kan hücresi konsantrasyonu elde etmek için 5 dakika 1500 rpm ve 20 dakika 6300 rpm olarak iki aşamalı santrifüjleme işlemi kullanılmıştır [31].

Anitua ve arkadaşları tam kanı %3,8 (a / h) trisodyum sitrat içeren steril tüplerde (4.5 mL) toplamıştır, daha sonra 8 dakika boyunca 460 g'de santrifüjlemiştir (PRGF System, B.T.I. Biotechnology Institute, Vitoria-Gasteiz, İspanya). Bu protokol ile platelet konsantrasyonunu 2.67 kat olarak elde etmiştir [32].

Araki ve arkadaşlarının optimize ettiği PZP hazırlama protokolünde, eğer PZP az sayıda beyaz kan hücresi isteniyorsa 7.5 mL tam kanın 10 dakika boyunca 230-270 g'de santrifüjlenmesi gerektiği ardından plazma toplanıp 2300 g'de 10 dakika daha çevrilip çöken platelet solüsyonunun süpernatant kısmının %90'ının atılarak en iyi platelet verimine ulaşımlardır. PZP'de yüksek sayıda beyaz kan hücresi isteniyorsa 70 g'de 10 dakika çevirmenin yeterli olacağı sonucuna varmışlardır [33].

2.3.2. PZP Tedavisinin Önemi ve Uygulamaları

PZP, yararlı etkilerini erken yara iyileşmesinde önemli olduğuna inanılan büyüme faktörlerini içeren plateletlerdeki alfa granüllerinin degranülasyonu yoluyla gerçekleştirir. Tablo 2'de PZP tedavisinin kullanıldığı alanlar özetlenmiştir. PZP'deki plateletler trombin ile aktive edildiğinde, büyüme faktörlerini ve hücresel proliferasyonu, matris oluşumunu, osteoid üretimini, bağ dokusu iyileşmesini, anjiyogenezi ve kollajen

sentezini artırarak yara iyileşme sürecini hızlandırmaya yarayan diğer maddeleri salgırlar. Bu büyüme faktörlerinin aktif salgılanması, pıhtılaşma sekansından birkaç dakika sonra başlar. İlk saatte büyüme faktörlerinin %90'dan fazlası salgılanır ve 7 gün boyunca ek büyüme faktörlerini salgılamaya devam eder. Aynı büyüme faktörlerinden bazılarını ve ek olanlarını salgılayarak yara iyileşmesini düzenler. Yara iyileşme hızı, greft veya yara içindeki kan pıhtısındaki platelet sayısı ile belirlenir ve PZP bu ilk sayıyı artırır. PZP'nin yukarıda tanımlanan özelliklerinden dolayı yara tedavisindeki önemi büyüktür [34].

Tablo 2. PZP tedavisinin kullanıldığı alanlar [34] .

| PZP Tedavisinin Kullanıldığı Alan | Kullanılma Amacı |
|--|--|
| Sinir Cerrahisi | Hipofiz tümörünün çıkarılması Kafatası tabanı tümör rezeksiyonu Tümör veya bağlı kordonların serbest bırakılmasını içeren intradural prosedürler Dural tümörler Akustik nöroma eksizyonları (laminektomi sırasında dura yırtığı) |
| Ağız ve Çene Cerrahisi | Mandibular rekonstrüksiyon Alveoler yarık onarımı Oral-nazal fistüller |
| Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi | Radikal boyun diseksiyonu Pektoralis major miyokutan fl aps Yüz kırıkları Rekonstrüksiyonlar |
| Kozmetik Cerrahi | Cilt apsleri Kemik greftleri Metal implantlar Doku genişlemesi Estetik Cerrahi (Yüz Liftleri, liposuction, vb.) Büyütme ve küçültme mamoplastisi Rekonstrüksiyonlar |

| | |
|------------------------------|--|
| Üroloji | Radikal retro-pubik prostatektomi ve retroperitoneal Lenf nodu diseksiyonu |
| Periodontal Cerrahi | Diş implantları Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu |
| Ortopedik / Omurga Cerrahisi | Bütün kalça değişimi Toplam Diz Değiştirme Skolyoz Onarımı Omurga Füzyonu Tüm Açık ve Dahili Azaltma Sabitleme İşlemleri El ve Ayak Cerrahisi Kemik Grefti Cerrahisi |
| Kalp ve Damar Cerrahisi | Sternotomi Graft Boru Siteleri Özofagogastrektomi |
| Genel Cerrahi | Tekrarlayan Fıtık Onarımı Anal fistül Bariatrik cerrahi |

2.3.3. PZP Tedavisinin Kullanımının Avantajları

PZP tedavisinin kullanım avantajları şunlardır:

- Otolog bir tedavi olduğundan alerjik reaksiyon riski yoktur.
- Aktifleştirilmiş plateletlerin varlığına yanıt olarak doğal kollajen oluşur.
- PZP, sentetik dolgu istemeyen hastalar için idealdir.
- Sıvı, doğal cilt ortamında asimile olduğu için şişme, morarma veya topaklanma çok azdır veya hiç yoktur.
- PZP, dokunun daha hızlı iyileştirilmesi için lazer prosedürlerini geliştirmede kullanılabilir.
- PZP tedavisi erkeklerde de kadınlarda olduğu kadar etkilidir [35].

2.3.4. Ticari PZP Kitleri

Piyasada birçok ticari PZP kiti bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları aşağıda gösterilmiştir.

- RegenLab PRP(Platelet-Rich-Plasma) (Regen Lab SA, İsviçre)
- DPG PRP (Erdağı Medikal, İstanbul, Türkiye),
- JP200 (BS Medical Co., Ltd., Tokyo, Japonya),
- GLO PRP (Glo fi nn Oy, Salo, Finlandiya),
- Macellan Otolog Trombosit Ayırıcı Sistemi (Med-tronic Inc., Minneapolis, MN),
- KYOCERA Medical PRPKit (KYOCERA Medical Corporation, Osaka, Japonya),
- SELPHYL (Cascade Medical Enterprises, LLC, Wayne, NJ),
- MyCells (Kaylight Technologies Ltd, Holon, İsrail),
- Dr. Shin Sistemi THROMBO KIT (GRAND AES-PIO IMC., Seul, Kore).

2.3.5. PZP Tedavisinin Güvenilirliği ve Karşılaşılan Problemler

PZP, otolog bir preparat olduğundan dolayı diğer sentetik yöntemlere göre daha güvenilirdir. Ancak PZP'nin güvenilirliği son zamanlarda sorgulanmaya başlanmıştır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri üreme kültürü olarak kullanılan kanlı agardan yola çıkarak, PZP'nin de enfeksiyonu arttıracakı öne sürülmüştür. Fakat normal bir kan pıhtısı pH 7 – 7.2 aralığına sahipken, PZP pH 6.5 – 6.7 aralığına sahiptir. Bu yüzden normal bir kan pıhtısına göre PZP'nin bakteriyel büyümeyi inhibe ettiğı öne sürülmüştür [36].

Bunun dışında Plateletler, yaygın olarak kalsiyum klorür ve trombin ile aktive edilmektedir [37,38]. Aktivasyon için kullanılan trombin genellikle sığır kaynaklıdır. Bu yüzden, 1990'ların başında ve ortalarında, sığır ürününün kullanımıyla insan vücudundaki pıhtılaşıma faktörleri ile çapraz reaksiyona giren antibovın antikorlarının (antibovın faktör V) gelişimine dair çalışmalar yapılmıştır [39,40]. Bununla birlikte, mevcut işleme yöntemlerinin çok daha fazla sığır faktörü V kontaminasyonunu ortadan kaldırması, PZP'de sığır trombin kullanımının çok düşük doz olması, uygulamalarının çoğunun lokal uygulama olmasından ve insan epitel dokusu ile temas ettiğinde hızlıca pıhtılaştığından

sistemik dolaşıma katılmaz. Bu nedenle, bu uygulama için böyle bir çapraz reaksiyonun meydana geldiğine dair çok az kanıt vardır [41].

Literatürdeki makalelerde, uygulanan yarada kötüleşme veya enfeksiyon gibi önemli bir yan etki bulunmamıştır. PZP enjeksiyonundan sonra bazı kişiler tarafından sadece hafif baş ağrısı hissedilmiş, enjeksiyon işlemi sırasında geçici ağrı, hafif kaşıntı ve deskuamasyon ve geçici ödem bildirilmiştir [42].

2.4. Plazma/Serum Ayırma Jeli

Kan örneklerinin analizinde, genellikle tam kanın serum fazına ve hücre içeren faza ayrılması gerekmektedir. Kan serumu ayırıcı jel, serum ve plazmanın analit stabilitesini önemli ölçüde iyileştirir. Bununla birlikte depolamayı ve taşımayı kolaylaştırır. Kan alma tüplerindeki serum ayırıcı jelin konumunu etkileyen en önemli faktörler jelin viskozitesi ve yoğunluğu, santrifüjleme hızı, sıcaklık ve saklama koşullarıdır. Tiksotropi ve yoğunluk, tüm ayırma jellerinde serum veya plazmanın hücrelerden ayrılmasını kolaylaştıran iki önemli özelliktir. Tiksotropik malzemelerin viskozitesi, jelin üzerine uygulanan g kuvveti süresi ve bu kuvvetin miktarının artmasına bağlı olarak azalır. Bu özellik jelin, santrifüj sırasında viskozitesinin azaltılmayla, serum ile hücreler arasında düzgün şekilde yerleşmesini sağlamaktadır [43].

2.4.1. Tiksotropik Jel

Tiksotropi, mikroyapıda meydana gelen kayma kaynaklı bir değişikliğin jel yapısındaki değişimi ile ortaya çıkmaktadır. Tiksotropik jelin üzerine mikroyapıdaki kayma işlemi gerçekleştirecek bir kuvvet uygulandığında, mikro yapı kuvvetin neden olduğu çarpışmalar arasında, dakikalar alabilecek bir sürede yeni bir dengeye gelebilmektedir. Daha sonra akış durduğunda, Brownian hareketi mikroyapı elemanlarını daha elverişli konumlara yavaşça hareket ettirmekte ve yapıyı yeniden kurabilmektedir. Bütün süreç tamamen geri dönüşümlüdür.

Bir jelin tiksotropik özellik göstermesi için mikroyapı barındırması yeterli olur. Bu mikroyapılar polimer ya da oligomer olabilir. Polimer çözeltilerinde partiküllerin boyutsal dağılımı veya dolaşma yoğunluğu veya moleküler birleşimler, viskozite ve elastikiyet seviyesini belirler. Bunların kayma veya Brown kuvvetlerinin etkisi altında bir durumdan diğerine geçmesi zaman alır. Hangi RPM’de sıvı özellik gösterdiği jelin tüm bileşenlerinin birbiri arasındaki van der Waals kuvvetleri ve yapılarının büyüklükleri ile değişiklik göstermektedir [44].

2.5. Disk Tabanlı Sistemler

Disk tabanlı sistemler (Lab on a CD/Disc), sıvıları hareket ettirmek için merkezkaç kuvvetini kullanan benzersiz bir mikroakışkan platformdur. Bu sistemler, hasta başı (point of care) cihazlarda birden fazla pompaya ve karmaşık boru bağlantılarına olan ihtiyacı ortadan kaldırdığından birçok avantaj sunmaktadır [45].

Disk tabanlı sistemlerde, merkezkaç kuvveti sıvının kütle yoğunluğuna ve sıvı hacminin dönme merkezinden uzaklığına bağlıdır. Disk tabanlı sistemlerin kullanılacak örneği santrifüjleme kabiliyeti, bu platformu özellikle kan örneklerinin işlenmesini, partiküllerin sedimentasyonunu ve hücre tanımlanmasına dayanan analizlere uygun hale getirmiştir [46].

Son on yılda, laboratuvar çalışmalarını disk platformuna entegre etmeyi amaçlayan bir disk üzerinde laboratuvar sistemleri büyük ilgi görmüştür. Disk üzeri laboratuvar sisteminin minyatürleştirilmesi, biyoanalizler için daha az reaktif kullanımı, daha az işlem süresi ve paralel işleme gibi özelliklere sahiptir. Ek olarak, Disk tabanlı sistem cihazlarının kullanımı için vasıflı bir kullanıcının gerekmemesi, cihazların otomasyon olması ve hataya açık manuel laboratuvar protokollerinin olmamasından dolayı analizlerin sonucunu tutarlı hale getirmektedir. Disk tabanlı sistemler, farklı akışkan manipülasyon stratejileri ile çalışmaktadır. Manipüle edici kuvvetlerin kaynağına göre, bu manipülasyon stratejileri ayrıca aktif ve pasif tipler olarak kategorize edilmektedir. Aktif tipler, dış kuvvet alanlarına dayanan; santrifüj mikroakışkanlar, elektro-kinetik mikro akışkanlar, manyetik mikro akışkanlar, opto-akışkanlar ve yüzey akustik dalga

mikro akışkanları gibi aktif manipülasyon stratejileridir. Pasif tipler ise içsel hidrodinamik kuvvetlere bağlı olarak tamamen kanal geometrisine bağlıdır. Santrifüjlü mikroakışkan veya disk üzerinde laboratuvar platformları, mikroakışkanları manipüle etmek için santrifüj kuvvetinden yararlanmaktadır. Diskin her yerinde doğal merkezkaç kuvveti bulunduğu ve yön daima radyal olarak dışa doğru olduğundan, tıpkı bir "yerçekimi alanı" gibi davranmaktadır. Bunun birçok avantajı vardır. Sıvı aktarımı için yalnızca kompakt bir motor gerektirmektedir. Harici başka bir enstrümana ihtiyaç olmamaktadır. Santrifüjlü mikroakışkan cihazlarda sıvı aktarımı da oldukça verimlidir ve rahatsız edici kabarcık veya artık hacim bırakmamaktadır. Ayrıca, yoğunluğa dayalı numunenin ayrılma prensibi merkezkaç kuvvetini kullanan bir sistem olduğundan mevcuttur [47].

Disk tabanlı sistemin oluşturulması için literatürde polikarbonat, poli(metil metakrilat) (PMMA), siklik olefin polimer (COP), polidimethylsiloxan (PDMS) ve poliüretan malzemelerinin kullanılabilir olduğu görülmüştür [41].

2.5.1. Disk Tabanlı Sistemlerin Çalışma Prensibi

Disk tabanlı sistemler, bilindiği üzere içerisinde kanal ve hazne yapıları bulduran sistemlerdir. Bu sistemin çevrilmesi ile kanal ve haznelere farklı kuvvetler etki etmektedir. Bu kuvvetlere göre disk içerisine enjekte edilen numunenin istenilen şekilde hareket etmesi için bu kuvvetlerin iyi hesaplanması gerekmektedir.

Disk tabanlı platform içinde, dönüş sırasında açılal dönüş frekansına (ω) bağlı olarak sıvı örneğin üzerine etki eden üç kuvvet vardır. Bunlar;

Merkezkaç Kuvveti

$$f_{\omega} = \rho r \omega^2$$

Euler Kuvveti

$$f_E = \rho r \frac{d\omega}{dt}$$

Coriolis Kuvveti

$$f_c = 2\rho\omega v$$

Akışkan üzerine etki eden kuvvetlerin formüllerinde kullanılan ρ sıvının kütle yoğunluğudur, r dönme merkezinden radyal mesafedir, ω dönme sıklığıdır, t birim zamanı gösterir ve v diskin düzlemindeki akışkan hızıdır [48].

2.5.2. İçsel Kuvvetlere Dayalı Karıştırma

İçsel kuvvetler (Merkezkaç kuvveti, Coriolis kuvveti ve Euler kuvveti) sadece santrifüjlemenin varlığı ile indüklenir. Etkili karıştırma genellikle Euler ve Coriolis kuvvetleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Grumann ve arkadaşları, Euler kuvvetine dayanan bir karıştırma yöntemi göstermişlerdir. Burada, Euler kuvveti diskin dönme hızının periyodik olarak değiştirilmesi ile indüklenmiştir. Sonuç olarak, bölme içinde makasla tahrik edilen bir advectif akım ortaya çıkmıştır. Bu strateji ile, sadece difüzyon için karıştırma süresini yaklaşık 7 dakikadan 5 saniyenin altına düşürmüştür [22].

Haeberle ve arkadaşları, Coriolis kuvvetine dayanan bir karıştırma yöntemi göstermişlerdir. İki sıvı başlangıçta iki ayrı kanala enjekte edilmiş ve daha sonra 'Y' şeklinde bir kanalda birleştirilmiştir. Coriolis kuvveti akış yönüne dik olarak hareket etmiş ve daha sonra kanalda enine konveksiyona neden olmuştur. Bu sayede karıştırma işlemi hızlanmıştır [26].

Kuo ve arkadaşları, kombine kanal geometrisi ve Coriolis kuvveti ile karıştırma yöntemini daha verimli yapmak için üç dalga mikro-akışkan karıştırıcının Coriolis kuvveti yardımıyla kare dalga, kavisli ve zikzak mikrokanallarla karıştırma performansını araştırmak için sayısal simülasyonlar yapmış ve kare dalga mikrokanalının en iyi karıştırma performansını sergilediğini bulmuştur [27].

2.5.3. Disk Tabanlı Sistemlerin Kullanım Alanları

Disk tabanlı sistemler, birinci basamak sağlık tesislerinin yanı sıra merkezi olmayan ulaşılması zor olan bölgelerde bile hasta teşhisine izin verir. Literatürde disk tabanlı sistemlerde, örnek hazırlama, hedef molekülün biyolojik olarak tanınması, DNA hibridizasyon Mikrodizileri [49], Gerçek Zamanlı PCR (qPCR) Amplifikasyon [50], Protein Mikrodizileri [51], İmmünoanalizler [52,53] biyokimyasal analizler [54,55], gibi bir çok biyolojik analiz gerçekleştirilmiştir.

Santrifüjlü mikroakışkanlar sadece biyomedikal teşhis için değil aynı zamanda gıda, enerji ve çevresel uygulamalar da dahil olmak üzere daha geniş alanlar için kullanılacak bir platform teknolojisidir. Örnek olarak gıda kaynaklı durumlarda süt numunesinde Salmonella patojeninin moleküler tespiti, 30 dakika içinde tam otomatik bir şekilde tamamlanabilmektedir. Bu işlem için, DNA ekstraksiyonu, izotermal rekombinaz polimeraz amplifikasyonu ve renk tespiti diske entegre edilerek kullanılmıştır [56].

2.6. Disk Tabanlı Sistemler için Santrifüj Cihazı ve Çalışma Prensibi

Mikroakışkan disklerin yüksek devirde dönme hızı nedeniyle, akışı görselleştirmek için yapılan çalışmalarda özel bir deneysel test ekipmanı kullanılır. Özellikle, bu geliştirme aracı akışkan tasarımını optimize etmek için kritik geri bildirim sağlar. Bu teçhizata tipik olarak bir 'spin standı' (döndürme tablası) denir.

Genellikle, dönüş sırasında bir diski görselleştirmek için stroboskopik bir sistem kullanılmaktadır. Burada, bir kamera ve flaş senkronize olacak şekilde ayarlanır ve motor mili belirli bir açısal konumdan geçerken, kameradaki deklanjör tetiklenir. Böylece, diskin her görüntüsü aynı yönde elde edilir; bu hareketsiz karelerden oluşturulan bir video, görünüşte hareketsiz olan bu diskler etrafında hareket eden sıvıyı gösterir. Bir döndürme standının iyi çalışması için en kritik husus, motor ve flaş'ın doğru senkronizasyonudur [57].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Disk Tabanlı Sistem Tasarımı

Tez çalışmasında yapılan, disk tabanlı sistemin amacı kan numunesinin, klasik yöntemlerden daha hızlı ve etkili biçimde ayrılmasıdır. Bu nedenle disk tabanlı sistemde, kan numunesinin viskozitesine uygun geometride ve kan hücrelerinin istenilen hareketine olanak sağlayacak şekilde kanal tasarımları çizilmiştir. Tasarımlar, genel olarak laboratuvarlarda sıvıları fazlarına ayırmak için kullanılan santrifüj cihazının çalışma prensibi olan merkezkaç kuvvetinin etkisini göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır. Disk merkezden çevrilerek içerisinde bulunan kanalların hepsine aynı merkezkaç kuvvetinin etki etmesi amaçlanmıştır. Disk içerisindeki kanallar, merkezkaç kuvvetinin yönü de göz önünde bulundurularak Solidworks 2018 Premium programı yardımıyla çizilmiştir.

3.1.1. Tasarıma Yönelik İlgili Hesaplamaların Yapılması

Yapılan tez çalışmasında, PZP bölgesinin tasarımda hangi konumda olduğunu belirlemek için öncelikle kan hücre oranlarının hesaplamaları yapılmıştır. Literatürdeki araştırmalara göre erkek ve kadın tam kanındaki hematokrit değeri farklıdır. Bu nedenle, erkeklerde %42 ile %52 arasında ve kadınlarda %37 ile %47 arasında olan hematokrit değeri göz önüne alınmıştır. Bu değerlere göre tez çalışmasında geliştirilen PZP kitinin hem erkek ve hem de kadın tarafından kullanılacağı göz önüne alındığında kanal tasarımı hesaplamalarında kadınlarda en düşük %37 değeri ve erkeklerdeki en yüksek %52 değeri alınarak excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Bu hesaplardan yola çıkarak tasarımlarda kullanılan kanal hacimleri Solidworks programında hesaplanmıştır.

3.2. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu

3.2.1. Uygun Disk materyalinin Belirlenmesi

Disk tabanlı sistemde kan numunesi kullanılacağından dolayı disk malzemesi biyo-uyumlu olmalıdır. Literatürde polikarbonat, poli(metil metakrilat) (PMMA), siklik olefin polimer (COP), polidimethylsiloxan (PDMS) ve poliüretan malzemelerinin kullanılabilir olduğu görülmüştür. Bu nedenle disk tabanlı sistemlerde kullanılan biyo-uyumlu

malzemeler arasından seçilerek uygun materyal belirlenmiştir. Uygun disk materyalinin belirlenmesi için lazer cihazındaki kesim performansı malzeme esnekliği gibi özellikler de göz önünde bulundurulmuştur.

3.2.2. CO₂ Lazer Parametrelerinin Optimizasyonu

Disk tabanlı sistem için uygun materyal seçildikten sonra lazer cihazında kesim optimizasyonu yapılmıştır. Bu optimizasyon, seçilen malzemenin yanmaması için gerekli bir işlemdir. Malzemeler, 70 Watt'lık CO₂ cam tüp kullanan AEON Nova 7 (Almira Lazer, Türkiye) cihazında optimize edilmiştir. Kullanılan lazer cihazında lazer gücü % cinsinden ve prob hızı mm/sn cinsinden ve lazer odak noktası mm cinsinden verilmiştir. Lazer kesim cihazı, %100 lazer gücünde 70 Watt güç ile %50 lazer gücünde 35 watt güç ile çalışmaktadır. Bu şekilde malzemenin kaç watt güç ile kesildiği oran-orantı formülü ile hesaplanmıştır. Cihazın girilen yüzde lazer güce göre CO₂ cam tüpün verdiği maksimum güç için prob odak noktası 11 mm'dir. Bu nedenle her optimizasyonda 11 mm'lik lazer odak noktası sabit tutulmuştur. Malzemelerin optimizasyonu için önce 1 mm kalınlıktaki tabakaların belirli bölgelerine 5 mm²'lik alana sahip kare şekli, 70 Watt'lık CO₂ cam tüp kullanan AEON Nova 7 (Almira Lazer, Türkiye) lazer kesim cihazında sırayla lazer gücü %40, %50 ve %60 olarak, prob hızı ise 10-15 mm/sn olarak denenmiştir. Yine aynı cihazda 5 mm kalınlıktaki tabaka için de 5 mm²'lik alana sahip kare şekli, lazer gücü %70 ve %80 olarak, prob hızı ise 3 mm/sn – 5 mm/sn ve 10 mm/sn olarak kesilme işlemi denenmiştir. Bu parametreler karşılaştırılarak en iyi sonuç alınan parametre disk tabanlı sistemde kullanılmıştır.

3.2.3. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu

Disk tabanlı sistemin fabrikasyonunda 1 mm ve 5 mm'lik PMMA tabakalar ve 130 µm'lik 3M 468MP çift taraflı bantlar Solidworks programıyla çizilen tasarımlarda AEON Nova 7 cihazı ile kesilmiştir.

5mm'lik PMMA tabakası kesilmeden önce tabakanın ön ve arka yüzüne 3M 468MP çift taraflı bant bir kart yardımıyla, PMMA tabaka ve bant arasında hava baloncuğu kalmayacak şekilde yapıştırılmıştır. İki çift taraflı bant tabakası ve bir 5 mm'lik PMMA

tabakası aynı anda lazer kesim cihazında kesilmiştir. Bu nedenle çift taraflı tabakalar için tekrardan bir kesim yapılmamıştır.

Oluşturulan iki 1 mm'lik PMMA ve her iki yüzü çift taraflı bant ile kaplı 5mm 'lik PMMA tabakası olmak üzere toplam 5 katman, Solidworks programında çizime eklenen 2,1 mm çapında vida kılavuz delikleriyle hizalanmış ve üst üste çift taraflı bantların diğer yüzlerine oturtularak yapıştırılmıştır. Yapıştırma işlemi sırasında merdane benzeri bir silindir ile katmanlar arasında hava baloncuğu kalmaması için üzerinden geçilmiştir.

3.3. Disk Tabanlı Sistem İçin Uygun Santrifüj Cihazının Fabrikasyonu

3.3.1. Santrifüj Cihazı Tasarlanması

Disk tabanlı sisteme uygun santrifüj cihazı kontrol teorisi temelleriyle tasarlanmıştır. İstenilen hız ve sürede dönme sağlamaktadır. Geliştirilen sistemin temel elemanları:

- Merkezi Kontrol Birimi (Santrifüj cihazının hız ve süre kontrolünün programlanması)
- Lojik Seviye Çevirici (Farklı dijital voltaj seviyelerinde iki cihaz bağlanması için voltaj dönüştürücü)
- Fırçasız DC Motor (Disk'in döndürülmesi)
- Elektronik Hız Kontrolcüsü (Motor'un sürülmesi için)
- AC-DC Voltaj Çevirici (AC gerilimi DC gerilime dönüştüren cihaz)
- Hall Efekt Sensör (Disk için rpm sayacı bu sayaç ile disk hızı kontrol edilmektedir.)
- Disk Tablasından (Disk döndürme işlemi için yerleştirildiği bölüm) oluşmaktadır.

Bu temel birimlerden geliştirilen santrifüj cihazına uygun programlama yapıldıktan sonra disk tabanlı sistemler üzerinde etkinliği değerlendirilmiştir.

3.3.2. Disk Tabanlı Sistemler için Geliştirilen Santrifüj Cihazının Çalışma Parametreleri

Tez çalışmasında geliştirilen santrifüj cihazı üzerinde oluşacak disk ağırlığı ile birlikte en fazla 5000 rpm (dakikadaki devir sayısı)'e kadar çıkabilmektedir. Rpm birimi dakikadaki

devir sayısı olduğundan sabittir fakat disk'in yarıçapına göre disk içerisindeki g kuvveti değişmektedir. Geliştirilen jelin hareket edebilmesi için belirli bir g kuvveti gereklidir. Fakat geliştirilen disk'lerin çapları kan numunesinin disk içerisindeki hacmine göre değişeceğinden dolayı santrifüj cihazı rpm birimi kullanarak tasarlanmıştır. Farklı çapta geliştirilen disklerin rotor çapları ölçülerek g biriminden rpm birimine gidilmiştir. G biriminden rpm birimine dönüşüm için aşağıdaki *Formül 1'* den yararlanılmıştır.

$$RCF (g) = 1.12 \times r \times \left(\frac{rpm}{1000}\right)^2 \quad (1)$$

3.4. Disk Tabanlı Sistemin Santrifüj Sırasında Görüntülenmesi Amaçlı Kamera Sisteminin Geliştirilmesi

Disk tabanlı sistemin santrifüj sırasında fotoğraflayabilmek, kan ve jel numunelerinin hareketini hem canlı hem de detaylı bir şekilde gözlemlemek amacıyla arduino uno tabanlı bir stroboskop ve Canon EOS 450D fotoğraf makinesi kullanılmıştır. Stroboskop, yanıp sönen bir ışık ile bu ışığın yanıp sönmeye frekansı ile aynı olarak dönen cismin duruyor olarak görünmesini sağlamaktadır.

Bu sistem için, Arduino uno geliştirme kartına 10 Watt power led bağlanmış ve led'in enerjisi için ayrıca 12V adaptör kullanılmıştır. 10 Watt'lık power led'in çok ısınması nedeniyle ledin arkasına metal soğutucu yapıştırılmıştır. Led'in yanıp sönmeye frekansı arduino üzerindeki kodlar ile ayarlanmıştır.

Arduino'da kod yazarken arduionun örnek kodu olan "blink" kodundan yola çıkılmıştır. Blink kodu arduino devre kartının üzerindeki entegre led'in belirli sürelerde yanıp sönmelerini sağlayan koddur. Yazılan kodda entegre olan led'in yandığı yol yerine arduino kartın üzerindeki 6 numaralı pine bağlanan power ledin bulunduğu yol değiştirilmiştir. Kodda yer alan "high" ve "low" komutları ile led'in kaç milisaniye açık ve kapalı durumda olacağı disk tabanlı sistemde kullanılan rpm değerine göre değiştirilerek optimize edilmiştir. Fakat rpm frekansı sabit olmadığından disk gözlemlenirken titreme oluşmuştur. Bunun için stroboskop sistemine ek olarak Canon EOS 450D fotoğraf

makinesi ile 1/200 enstantane hızı ile flaşlı olarak çekilmiştir. Bu sayede disk dönerken bozulma olmadan kaliteli fotoğraflar çekilebilmiştir.

3.5. Tikotropik Platelet Ayırma Jelinin Geliştirilmesi

3.5.1. Hidrokarbon Bazlı Tikotropik Platelet Ayırma Jelinin Geliştirilmesi

Çalışma kapsamında kırmızı kan hücrelerinden plateletlerin ayrılması amacıyla tikotropik jel geliştirilerek karakterize edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda jelin üretiminde sikloalfatik hidrokarbon reçine olarak Escorez 5300 (Exxon, Texas, ABD), çözücü olarak trioctyl trimellitate (TOTM), katkı malzemesi olarak propilen glikol (PG, Sigma, ABD) ve geliştirilen jelin viskozite özelliğini ve yoğunluğunu ayarlamak amacıyla silika yapılı Aerosil A 200 ve Aerosil R 972 (Evonik Endüstri, Almanya) kimyasalları kullanılmıştır.

Tikotropik jelin sentezinin ilk aşamasında 5,23 g Escorez 5300, hassas terazi yardımıyla tartılarak 4,42 g TOTM içerisinde 250° C'de ve 250 rpm karıştırma hızına ayarlanan mekanik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. Çözünme gerçekleşikten sonra karıştırma işlemine devam edilerek çözeltinin oda sıcaklığına düşmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığında olan çözülmüş polimerin üzerine 0,08 g PG eklenmiştir. Son olarak jelin viskozitesinin ve yoğunluğunun istenilen şekilde ayarlanması için farklı miktarlarda 0,01 - 0,5 g A 200 ve 0,2- 0,3g R 972 silika tozları oda sıcaklığındaki çözeltiliye yavaşça eklenerek çözelti homojen hale getirilene kadar (24 saat) karıştırılmıştır. Süre sonunda homojen haldeki jeller steril haldeki numune kabına alınarak diğer çalışmalarda kullanılmaya kadar desikatör içerisinde konularak vakumlu ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Elde edilen jelin yoğunluğunun belirlenebilmesi amacıyla jel ile karışmayan bir çözelti içerisindeki jelin hareketi incelenmiştir. Bu doğrultuda farklı konsantrasyonlara sahip bakır (II) sülfat (CuSO₄, Sigma, ABD) çözeltileri kullanılmıştır. Yoğunlukları sırasıyla 1,04 g/mL, 1,05 g/mL, 1,06 g/mL, 1,07 g/mL ve 1,08 g/mL olan CuSO₄ çözeltileri distile su içerisinde hazırlanmıştır. 5 adet 2 mL 'lik ependorf içerisinde 300 µL geliştirilen tikotropik jel konulmuş, üzerlerine sırasıyla 1 mL yoğunluğu farklı CuSO₄ çözeltileri

eklenmiştir. Ependorflar yüksek hızlı mini santrifüj cihazına (Isolab, Almanya) yerleştirilerek 800 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası ependorfların içerisindeki jel konumları değerlendirilerek jelin yoğunluğu hakkında bilgi elde edilmiştir.

3.5.2. Hyaluronik Jel Yapımı

Yıldız tasarımı diskin de kanalların, diskin merkezinde bulunan örnek verme bölgesi ile olan bağlantılarını engellenmek için düşük yoğunluklu hyaluronik jel yapılmıştır. Jelin yapımında %0,5-5'lik hyaluronik jeller denenmiştir. Uygun miktarda Hyatruue sodyum hyaluronat ha-ep-n 1.8 (Hyatruue, Çin) kimyasalı hassas terazi kullanılarak tartılmış ve 100 mL'lik behere alınmıştır. Üzerine jel, istenilen yüzdede olacak şekilde distile su konulmuş ve beherin üzeri parafilm ile kapatılarak manyetik karıştırıcı kullanılarak 24 saat boyunca karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.5.3. Tikotropik Jel için Karakterizasyon Testleri

Çalışma kapsamında geliştirilen ayırma jelinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan piyasada ticari olarak bulunan PZP ayırma jeli de temin edilerek aynı karakterizasyon testlerine tabi tutulmuştur. Jellere ait sonuçlar karşılaştırılarak jellerin tikotropik özellikleri değerlendirilmiştir.

3.5.3.1. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Karakterizasyonu

FTIR Analizi, jel yapısındaki fonksiyonel grubun belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan nicel bir analizdir. Analiz için her jelden 1 mL alınarak cihaza yerleştirilmiştir (her jel için n = 3). Numunelerin kızılötesi (IR) spektrumları, 4000 ile 600 cm⁻¹ arasında bir spektrum aralığına sahip bir FTIR spektrofotometre (Agilent, ABD) ile kaydedilmiştir.

3.5.3.2. Reoloji Karakterizasyonu

Malzemenin reolojik özelliklerini değerlendirmek için cihazın kılavuzuna uygun olarak paralel plaka konfigürasyonunda bir reometre (Malvern, Kinexus) kullanılmıştır. Paralel

plaka reometreye tutturulmuş ve konfigürasyon, bilgisayar sistemi ile sağlanmıştır. Sırasıyla cihaz talimatlarına uygun olarak sıfır boşluğu konum ayarı ve yükleme örneği prosedürü başlatılmıştır. Her örneğin 1,32 mL'si plakaya yüklenmiş ve sıcaklık kapağı numunenin üzerine kapatılmıştır. İlk olarak jellere frekans tarama deneyi uygulanmıştır. Frekans testi 25 ° C'de gerçekleştirilmiştir. Depolama modülü (G'), kayıp modülü (G''), kompleks modül (G*), faz açısı (°) ve jelin kompleks viskozite değerleri gerilim kontrollü frekans testi ile araştırılmıştır. Jellerin bu özellikleri, 0.1-100 Hz frekans gerilme aralığı ile % 0.1 gerilme arasında gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Numune yüklendikten sonra analiz başlatılmış ve yaklaşık 25 dakika devam etmiştir. Analiz sonunda plakalar temizlenmiştir. Jellerin viskozite değerleri ve tiksotropik karakteristikleri sırasıyla kayma hızı testi ve üç aşamalı kesme hızı testi ile araştırılmıştır. Uygulanan testler frekans testinde uygulanan işleme benzer şekilde gerçekleştirilmiştir. Jellerin bu özellikleri 0.001-100 Hz frekans gerilme aralığı arasında gerçekleştirilerek belirlenmiştir.

3.5.3.4. Optimize Edilen Jelin Disk Tasarımına Entegrasyonu

Optimize edilen jel içerisinde hiç baloncuk kalmaması için santrifüj cihazında, 8000 rpm'de 5 dk çevrilmiştir. Disk tabanlı sistemin geliştirilmesinde, disk'in orta ve alt katman yapıştırıldıktan sonra disk üzerindeki kanalın disk kenarına en yakın bölgesine, Solidworks programında hesaplanan kuyuda bulunması gereken jel hacmi, iğnesiz 1 ml'lik insülin şırıngası ile dikkatlice yüklenmiştir. Jel'in yükleme işleminden sonra üst katmanda yapıştırılmıştır. Vakum kullanılmayan disk tasarımlarında, jel entegrasyonu yapılmış disk tabanlı sistem, kan numunesi yüklenmeden önce jelin tam yerine oturması amacıyla 5000 rpm'de 1 dk çevrilmiştir. Bu şekilde jelin, vakumsuz disk tabanlı sisteme entegrasyonu tamamlanmıştır. Vakumlu disk sisteminde ise, jel kanala yine aynı yöntemle yüklenip, diskin üst tabakası kapatılmıştır. Fakat Disk içerisine vakum yapılacağından ve jelin içerisinde mikro baloncuklar kaldığından disk önce 5000 rpm'de 1 dk çevrilmiştir. Daha sonra disk'e 20 mbar değerine kadar Buchi V100 dijital kontrollü vakum pompası (BUCHI, İsviçre) cihazı ile vakum yapılmıştır. Vakum yapılan disk tekrardan 5000 rpm'de 1dk çevrilmiştir. Bu şekilde jel, disk içerisindeki konumuna oturmuş ve entegrasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.6. Disk Tabanlı Sisteme Uygun Vakumlu ve Vakumsuz Kan Yükleme Aparatı ve Vakumlama Cihazının Geliştirilmesi

Tez çalışmasının bu kısmında, kan numunesinin disk tabanlı sisteme zarar görmeden rahat bir şekilde aktarımının sağlanmasını amaçlanmıştır. Bu nedenle bir yükleme aparatı geliştirilmiştir. Bu aparat disk tabanlı sistemin kanallarına kan numunesinin zarar görmeden aktarılmasını sağlamaktadır.

3.6.1. Kan Yükleme Aparatlarının Tasarımı ve Geliştirilmesi

Disk tabanlı sisteme uygun olarak, basit kan yükleme, 3 yollu musluk ile kan yükleme, geliştirilmiş basit kan yükleme ve vakum kapaklı yükleme tasarımları denenmiştir.

Basit Kan Yükleme Tasarımı

Basit kan yükleme tasarımı, kan numunesinin yükleneceği kanalın üzerinde diskin merkezine en yakın olan yerine simetrik olarak diskin en üst katmanına lazer cihazıyla 1 mm çaplı ve 0,5 mm çaplı 2 adet delik açılması ile oluşturulmuştur. Basit kan yükleme tasarımı Disk üzerinde ayrı kanallara farklı denemeler yapmak amaçlı kullanılmıştır.

3 Yollu Musluk ile Kan Yükleme Tasarımı

3 yollu musluk ile kan yükleme tasarımı için öncelikle 5 mm ve 1 mm kalınlıktaki PMMA tabaka'nın iki yüzü de %96'lık isopropanol ile temizlenmiş ve distile su ile mikrofiber bez kullanılarak durulanmıştır. Durulanan tabakanın üzerindeki mikro tozlar asetat kağıdı yapıştırılmış çift taraflı bant ile toplanmıştır. 5 mm kalınlıktaki PMMA tabakanın iki yüzüne de kart ile dikkatli şekilde 3M çift taraflı bant yapıştırılmıştır. Solidworks programında dış çapı 32 mm ve iç çapı 22 mm olan bir daire çizilmiş ve bu dairenin üzerine oturacak şekilde 32 mm çapındaki bir daire ve merkezine 3 yollu musluğun 1. yolu oturacak büyüklükte 4 mm'lik daire çizilmiştir. Çizilen şekillerden 32 mm dış ve 22 mm iç çapı olan şekil iki yüzü de bantlı olan 5 mm kalınlıktaki PMMA tabakadan lazer cihazında lazer gücü % 80 ve prob hızı 3 mm/sn'ye ayarlanarak, diğer çizim ise 1 mm PMMA tabakadan lazer cihazında lazer gücü % 60 ve prob hızı 15 mm/sn olarak kesilmiştir. Kesilen 5 mm kalınlıktaki PMMA halka ile kesilen 1 mm kalınlıktaki PMMA

daire çift taraflı bant sökülerek birbirine yapıştırılmıştır. 1 mm kalınlıktaki tabakanın merkezindeki 4 mm çaptaki deliğe 3 yollu musluğun 1. yolu takılmış ve sıcak silikon ile sabitlenmiştir. Bu tasarım kanın bütün kanallara eşit dağılması ve diskin enjektör ile vakumlu olarak kanallara numunenin yüklenmesi amacıyla geliştirilmiştir.

Geliştirilmiş Basit Kan Yükleme Tasarımı

Basit kan yükleme tasarımına benzer mantıktan yola çıkarak sistem disk tabanlı sistemdeki kanalların her birine aynı anda kan numunesinin yüklenmesi amaçlı geliştirilmiştir. Oluşturulan tasarımda yine disk tabanlı sistemin üst katmanında merkeze lazer cihazı yardımıyla 4 mm çaplı bir delik açılmıştır. Bu delik 10 ml'lik enjektörler için uygun olarak açılarak numunenin enjektör ile verilmesi için uygundur. Yine basit kanaldaki gibi disk içi basıncın dengelenmesi için simetrik olarak 4 mm çaplı deliğin çevresine 4 adet 0,5 mm çaplı basınç dengeleme delikleri açılmıştır.

Vakum Kapaklı Yükleme Tasarımı

Vakum kapaklı yükleme sistemi kan numunesinin disk sistemindeki kanallara eşit olarak dağılması, numunenin kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için dış ortamla olan temasının kesilmesi amaçlı geliştirilmiştir. Vakum kapaklı sistem için, ticari olarak alınan 13 mm çaplı BD Vacutainer SST2 (Becton Dickinson and Company, Amerika) serum ayırma kan tüplerinin vakum kapak bölgesinin disk sistemine entegrasyonu ile geliştirilmiştir. Bunun için BD Vacutainer SST2 serum ayırma kan tüpünün vakum kapağın yerleştirildiği bölgenin 2,5 cm'si makas yardımıyla kesilmiştir. Kan numunesinin sızdırma ihtimaline karşı, tüpün kesilen bölgesi ile disk'e entegrasyonu yapılacak bölgeye 5 mm kalınlığında kesilen tüp bölgesinin içine oturabileceği bir daire kesilmiştir. Kesilen daire geliştirilen disk'in merkezine 3M 468MP çift taraflı bant ile yapıştırılmıştır. Kesilen tüp bölgesi de disk'in merkezine yapıştırılan dairenin içine oturtulmuştur. Ve sızdırma ihtimaline karşı sıcak silikonla tüp ile 5 mm kalınlıktaki daire birbirine yapıştırılmıştır. Vakum kapak kesilen tüp başlığının üzerine kapatılarak vakum kapaklı yükleme tasarımı geliştirilmiştir.

3.6.2. Vakumlama Aparatının Geliştirilmesi

Vakum kapaklı yükleme tasarımına istenilen miktarda kanın kolaylıkla yüklenebilmesi için, tasarlanan diskin istenilen vakum derecesine sahip olması gerekmektedir. Bu sebepten dolayı, diskleri önceden vakumlayabilmek için üretimi ve kullanımı kolay bu aparat geliştirilmiştir. 50 mL'lik enjektör yukarıdan 1 mL seviyesinden yatay şekilde bistüri kullanarak kesilmiştir. Enjektörün pistonu çıkarılmış ve enjektörün tersinden yani 1 mL seviyesinden tekrar takılmıştır. Enjektörün 40 mL'lik seviyesinden matkap yardımıyla 4 mm çapında delik açılmıştır. 3'lü yollu musluğun 1. yolu açılan deliğe sıcak silikon ile yapıştırılmıştır. 3 yollu musluğun 2. yolu ise vakum pompasına bağlanmıştır. Ticari olarak satın alınan silikon tabaka (Kardeşler Kauçuk Silikon, Türkiye) enjektörün iç çapı kadar makas yardımıyla kesilmiştir. Kesilen silikon tabaka enjektörün 50 mL seviyesindeki ucuna eklenmiştir. Bu şekilde vakum aparatı geliştirilmiştir.

3.7. Geliştirilen Disk Tabanlı Sistemlerin Etkinliklerinin İncelenmesi

3.7.1. Düz kanal Tasarımı

Düz kanal tasarımı için Solidworks programıyla iki dikdörtgen geometri kanın davranışını gözlemek amaçlı denenmiştir. Disk Solidworks programında oluşturulurken 5 katman çizilmiştir. 5 mm kalınlıktaki PMMA orta katman için 100 mm çapında disk içerisine kanal tasarımları 30,39 mm uzunluk, 3 mm genişlik, 450 µL hacme sahip ve 19 mm uzunluk 5 mm genişlik, 450 µL hacme sahip, simetrik olarak yerleştirilmiş 4 ince uzun ve 4 kalın kısa geometri çizilmiştir. Kanalların üst iki köşesinden 2 mm çıkıntı çıkarılarak soldaki çıkıntıya kan numunesinin yüklenmesi amaçlı 1 mm çaplı daire ve diğer köşeye kanal içi basıncı dengeleme amaçlı 0,5 mm'lik daire çizilmiştir. Katmanların diğer katmanlarla hizalanması ve diskin santrifüj cihazına oturtulması amaçlı merkezden 45,24 mm uzaklıkta simetrik olarak 3 adet 2,1 mm çapında daire çizilmiştir.

1 mm kalınlıktaki PMMA alt katman için yine 100 mm çaplı bir daire çizilmiş ve dairenin içerisine diğer katmanlarla hizalanması için 3 adet hizalama deliği için daireler çizilmiştir.

1 mm kalınlıktaki PMMA üst katmanı için yine 100 mm çaplı bir daire çizilmiş ve orta katmandaki kan numunesi yükleme ve basınç dengeleme için çizilen dairelerin hizası

dikkate alınarak bu katmana da çizilmiştir. Ayrıca bu katmana da diğer katmanlarda olduğu gibi katmanların hizalaması için daireler açılmıştır.

Oluşturulan çizimler “dxf” formatına dönüştürülmüş ve lazer kesim cihazının programına uygun formata dönüştürülmüştür. Bu şekilde tasarımın çizim kısmı oluşturulmuştur. Çizimin somut hale getirilmesi için 5 mm kalınlığındaki PMMA 25 cm x 25 cm tabaka üzerindeki yağ veya tozların temizlenmesi maksatlı olarak önce mikro-fiber bezle %96 ‘lık isopropanol temizlenmiş ardından distile su ile durulanmıştır. Tabakanın üzerinde bulunan mikro tozlar ise 8 cm² alana sahip kare kesilen asetat parçasına 3M çift taraflı bant yapıştırılmış ve bant’ın yapışkan yüzeyiyle hafifçe PMMA tabakanın üzerinden geçerek toplanmıştır. Temizlenen PMMA tabakasının iki yüzüne de 3M 468MP çift taraflı bant bir kart yardımıyla bant ve tabaka arasında baloncuk kalmayacak şekilde lamine edilmiştir. İki yüzü de bantlı olan PMMA tabakası lazer kesim cihazı tezgahına konulmuş ve lazer prob başlığı 11 mm odak noktasına ayarlanmıştır. Solidworks programında çizilen ve “dxf” dosya formatına dönüştürülen, kanal yapılarını barındıran orta katman lazer cihazının programında açılmıştır. Lazer gücü %80 ve prob hızı 3 mm/sn’ye ayarlanarak lazer kesim cihazına gönderilmiştir. Lazer kesim cihazında PMMA tabasının kesilmesi istenilen bölgesi ayarlanıp kesme işlemi başlatılmıştır.

Aynı şekilde 1 mm PMMA tabakalarda 5mm kalınlıktaki temizleme yöntemi ile temizlenmiş ve Solidworks programında çizilen alt ve üst katman çizimleri ile lazer cihazında lazer gücü %60 ve prob hızı 15 mm/sn olarak kesilmiştir.

Orta katmandaki çift taraflı bantların etiketler çıkartılarak kesilen üst, orta ve alt katman 2 mm çaplı bir vida ile hizalanma deliklerinden geçirilerek önce alt ve orta katman sonra üst katman birbiri üzerine yapıştırılmıştır. Yapıştırılan katmanlar arasında hava baloncucu kalmaması için üzerinden merdane benzeri silindir ile geçilerek laminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tamamlanan disk, çift taraflı bandın %100 yapışması için 72 saat boyunca 2 mengine yardımıyla sıkıştırılmış ve düz kanallı disk tasarımı geliştirilmiştir.

Kanın Tasarıma Yükleneş

Düz kanallı sisteme %3,2 Sodyum sitrat içeren kan numunesi, tasarımda bulunan kan yükleme deliğinden 1000 µL'lik mikro-pipet yardımıyla 450 µL numune disk düz tutularak yüklenmiştir.

Santrifüj Parametreleri Optimizasyonu

Düz kanallı sisteme numune yüklendikten sonra her kanal numaralandırıldı ve 1 numaralı kanal 3600 rpm'de 10 dk 2 numaralı kanal 3600 rpm'de 8 dk 3 numaralı kanal 3600 rpm'de 5 dk ve 5 numaralı kanal 3600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonuçlarına göre diskin fotoğrafları çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

Kan Numunesinin Tasarım Üzerindeki Hareketinin Değerlendirilmesi

Kan numunesinin diske yüklendikten sonra ve santrifüj bittikten sonraki durumunun fotoğrafları çekilmiş ve bu fotoğraflar üzerinde tasarımın uygun olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3.7.2. Farklı Genişliklerde Düz Kanal Tasarımı

Düz kanal tasarımında kanın hareketi gözlemlenmiş ve bunun sonucunda geliştirilen tiksotropik jel'in disk'e entegre ederek kanın santrifüj edilerek ayrılmasına karar verilmiştir. Bunun için hem kan hem de jelin kanallardaki hareketini inceleme amaçlı uzunlukları aynı olan genişlikleri farklı olan kanallar solidworks programıyla çizilmiştir. Disk Solidworks programında oluşturulurken 5 katman olarak çizilmiştir. 5 mm kalınlıktaki PMMA orta katman için, disk 120 mm çapında ve içerisine simetrik olarak uzunlukları sabit 81,84 mm olan genişlikleri sırayla 8 mm, 6 mm, 4 mm, 2 mm ve 1 mm olan dikdörtgen geometride kanallar çizilmiştir. 8 mm genişliğe sahip kanal 1,5 mL kan numunesi ve 150 µL jel, 6mm genişliğe sahip kanal 1,15 mL kan numunesi ve 100 µL jel, 4 mm genişliğe sahip kanal 770 µL kan numunesi ve 70 µL jel, 4 mm genişliğe sahip kanal 400 µL kan numunesi ve 20 µL jel, 2 mm genişliğe sahip kanal 200 µL kan numunesi ve 10 µL jel alabilecek hacme göre çizilmiştir.

Kanalların üst iki köşesinden kan numunesinin yüklenmesi amaçlı 1 mm çaplı daire ve diğer köşeye kanal içi basıncı dengeleme amaçlı 1 mm çaplı daire çizilmiştir. Katmanların diğer katmanlarla hizalanması ve diskin santrifüj cihazına yerleştirilmesi amaçlı merkezden 45,24 mm uzaklıkta simetrik olarak 3 adet 2,1 mm çapında daire çizilmiştir. 1 mm kalınlıktaki PMMA alt katman için yine 120 mm çaplı bir daire çizilmiş ve dairenin içerisine diğer katmanlarla hizalanması için 3 adet hizalama deliği için daireler çizilmiştir. 1 mm kalınlıktaki PMMA üst katmanı için yine 120 mm çaplı bir daire çizilmiş ve orta katmandaki kan numunesi yükleme ve basınç dengeleme için çizilen dairelerin hizası dikkate alınarak bu katmana da çizilmiştir. Ayrıca bu katmana da diğer katmanlarda olduğu gibi katmanların hizalanması için 2,1 mm çaplı daireler açılmıştır. Oluşturulan çizimler “dxf” formatına dönüştürülmüş ve lazer kesim cihazının programına uygun formata dönüştürülmüştür. Bu şekilde tasarımın çizim kısmı oluşturulmuştur.

Çizimin somut hale getirilmesi için 3.7.1.’deki yöntem kullanılmıştır. Diskler katmanları birleştirilirken önce alt ve orta PMMA katmanı yapıştırılmıştır. Sonra kanallara belirtilen jeller iğnesiz 1 ml ‘lik insülin enjektörü kullanılarak kanalların en dibine yüklenmiş ve üst PMMA katmanı kapatılmıştır. Disk 5000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve jellerin kanalın dibine yerleşmesi sağlanmıştır.

Kanın Tasarıma Yüklenmesi

Farklı genişliklerde düz kanal tasarımına kan numunesi, tasarımda bulunan kan yükleme deliğinden 1000 µL’lik mikro-pipet yardımıyla her kuyu dik tutularak sırasıyla 1,5 mL, 1,15 mL, 770 µL, 400 µL ve 200 µL olarak yüklenmiştir.

Santrifüj Parametreleri Optimizasyonu

Disk ilk 5 kuyusuna kan numunesi eklemiş ve 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g ve 1000 g değerlerinde 10’ar dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sırasında disk’in fotoğrafları çekilmiş ve kan numunesi ile tiksotropik jelin kanal içerisindeki hareketleri değerlendirilmiştir.

Kan Numunesinin Tasarım Üzerindeki Hareketinin Değerlendirilmesi

Kan numunesinin diske yüklendikten sonra ve santrifüj bittikten sonraki durumunun fotoğrafları çekilmiş ve bu fotoğraflar üzerinde tasarımın uygun olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3.7.3. Kan Seviyesi Belirlenmesi Amaçlı Kadeh Tasarımı

Önceki disk'lerdeki sonuçlar gözlemlenmiş ve bir kadeh tasarımı belirlenerek kandaki kırmızı kan hücrelerinin belirlenen hızdaki çökme hızının belirlenmesi amaçlı olarak bu disk çizilmiştir. Solidworks programında disk 10 katman olarak çizilmiştir. 5 mm kalınlıktaki PMMA orta katman için, disk 130 mm çapında ve içerisine simetrik olarak 6 kanal yerleştirilmiş uzunlukları ise 50,95 mm olan üst kısmı geniş orta kısma doğru 2 mm genişliğe daralan ve tekrar genişleyen kadeh benzeri geometride kanallar çizilmiştir. Bu kanalın genişleyen alt kısmına kırmızı kan hücreleri ve üzerindeki kısımlara ise plazma gelecek şekilde hesaplanmıştır. Hesaplama excel programında kırmızı kan hücrelerinin insanlarda bulunan en düşük %37 ve en yüksek %52 oranı göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Kanal 1,8 mL kan numunesi alabilecek hacme göre çizilmiştir.

Kanalların üstünde bir adet 3 yollu muslukla kan yükleme aparatına uygun şekilde açılmıştır. Sistem vakumlu olduğundan basınç dengeleme deliği bulunmamaktadır. Katmanların diğer katmanlarla hizalanması ve diskin santrifüj cihazına yerleştirilmesi amaçlı merkezden 45,24 mm uzaklıkta simetrik olarak 3 adet 2,1 mm çapında daire çizilmiştir.

1 mm kalınlıktaki PMMA alt katman için yine 130 mm çaplı bir daire çizilmiş ve dairenin içerisine diğer katmanlarla hizalanması için 3 adet hizalama deliği için daireler çizilmiştir. 1 mm kalınlıktaki PMMA üst katmanı için yine 130 mm çaplı bir daire çizilmiş ve orta katmandaki kan numunesi 3 yollu musluk ile kan yükleme delikleri bu katmana çizilmiştir. Ayrıca bu katmana da diğer katmanlarda olduğu gibi katmanların hizalanması için 2,1 mm çaplı daireler çizilmiştir.

3 yollu musluğun entegrasyonunda 5 mm kalınlıktaki PMMA alt katmanı için 32 mm dış çapı olan ve 22 mm iç çapı olan bir daire çizilmiş ve üzerine 3 yollu musluğun 1. Yolunun

oturacağı 1 mm kalınlığındaki PMMA tabakası için dış çapı 32 mm ve iç çapı 4 mm olan bir daire çizilmiştir. Oluşturulan çizimler “dxf” formatına dönüştürülmüş ve lazer kesim cihazının programına uygun formata dönüştürülmüştür. Bu şekilde tasarımın çizim kısmı oluşturulmuştur.

130 mm çapında olan çizimlerin somut hale getirilmesi için 3.7.1.’deki yöntem kullanılmıştır. Diskin üzerine 3 yollu musluk için çizilen daireler iki yüzü de çift taraflı bant ile kaplanan 5 mm PMMA ve bantsız 1 mm PMMA tabaka lazer cihazı yardımıyla 5 mm PMMA tabaka için lazer gücü %80 ve prob hızı 3 mm/sn’ye ve 1 mm PMMA tabaka için lazer gücü %60 ve prob hızı 15 mm/sn olarak kesilmiştir. Kesilen parçalar 3.7.1’deki yöntemle oluşturulmuş disk merkezinin üzerine önce 5 mm PMMA daire üzerine 1 mm PMMA daire yapıştırılmıştır. 1 mm kalınlığındaki PMMA dairenin ortasındaki 4 mm çapındaki deliğe 3 yollu musluk yerleştirilmiş ve sıcak silikon ile sabitlenmiştir.

Kanın Tasarıma Yüklenmesi

Oluşturulan diskte 3 yollu musluğun 2. yoluna vakum pompası bağlanarak musluk 1 ve 2. yol bağlantılı olacak şekilde ayarlanmıştır. Disk 20 mbar değerine kadar vakumlanmıştır. Musluğun 2 ve 3. yol bağlantılı olacak şekilde ayarlanarak disk hava ile olan bağlantısı kesilmiştir. 15 ml hacmindeki bir enjektöre 10 ml kan numunesi çekilmiş ve musluğun 3. yoluna yerleştirilmiştir. Enjektör yerleştirildikten sonra musluk 1. ve 3. yol bağlantılı olacak şekilde ayarlanmıştır. Disk içindeki vakum nedeniyle kan numunesi enjektörden disk içerisindeki kanallara yüklenmiştir.

Santrifüj Parametreleri Optimizasyonu

Kullanılan tasarım tam kandaki kırmızı kan hücrelerinin 800 g’de kaç dakika da çökmesini belirlemek üzere kullanılmıştır. Bu nedenle disk sadece 800 g de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sırasında 30 sn’de 1 diskin fotoğrafları çekilmiştir. Bu verilerin değerlendirilmesine göre süre optimizasyonu yapılmıştır.

Kan Numunesinin Tasarım Üzerindeki Hareketinin Değerlendirilmesi

Kan numunesinin tasarım üzerindeki hareketi 30 sn'de 1 fotoğraf çekilerek gözlenmiş ve tasarımda kırmızı kan hücrelerinin çökme hareketinin hızı, geometrinin kan numunesinin hareketine nasıl etkide bulunduğu değerlendirilmiştir.

3.7.4. Yıldız tasarım

Tasarım Solidworks programında, 5 katmanlı olarak çizilmiştir. 5 mm kalınlıktaki PMMA orta katman için, disk 135 mm çapında ve içerisine simetrik olarak 5 kanal yerleştirilmiş ve kanallar birbirine bağlanmıştır. Yine önceki tasarımdaki gibi üst kısmı geniş orta kısma doğru 2 mm genişliğe daralan ve tekrar genişleyen kadeh benzeri geometride kanallar çizilmiştir. Ancak kanallar kırmızı kan hücresinin hızlı bir şekilde çökmesi amacıyla 45 derece eğimli olacak şekilde çizilmiştir. 45 derece eğik kanalın altındaki kırmızı kan hücrelerinin toplanacağı bölümün 3.06 mm yukarısına jelin rahat hareketi için 5.75 mm boy ve 3.72 mm genişliğinde olan bir elips çizilmiştir. Bu kanalın genişleyen alt kısmına kırmızı kan hücreleri ve üzerindeki kanal ve kadehin üst kısımlarına ise plazma gelecek şekilde hesaplanmıştır.

Diskin üst 1 mm kalınlıktaki PMMA katmanı için, 135 mm çapında daire çizilmiş ve dairenin merkezine geliştirilmiş basit kan yüklemesi olan çevresinde 4 adet 0.5 mm çapında basınç dengeleme dairesi ile şırınganın yerleştirileceği 4 mm çapında bir daire çizilmiştir. Ayrıca kan numunesi fazlarına ayrıldıktan sonra plateletleri toplamak için orta katman için çizilen 2 mm genişliğe sahip 45 derece eğik duran kanalın üst PMMA katmanındaki hizasına göre 0.5 mm'lik platelet toplama delikleri çizilmiştir. Bu delikler kırmızı kan hücrelerinin insanlarda en düşük %37 ve en yüksek %52 olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak çizilmiştir.

Çizimlerin somut hale getirilmesi için 3.7.1'de uygulanan yöntem kullanılmıştır. Ancak jelin disklerin birleştirilmesi sırasında öncelikle alt ve orta katman yapıştırılmış ve kanal içerisinde jel için tasarlanan bölüme 100 µL geliştirilen jel ve kanaldaki kan numunesinin diğer kanallarla olan bağlantısını kesmek amacıyla her kanalın en üstündeki bölgeye 300 µL düşük yoğunluklu hyaluronik jel konulmuş ve diskün üst PMMA katmanı yapıştırılmıştır. Diskün fabrikasyonu 3.7.1'de anlatılan yöntemle birleştirilmiştir.

Tamamlanan diskin üst PMMA katmanında bulunan plazma toplama deliklerinin üzerine çift taraflı bant yapıştırılmış asetat kâğıdı yapıştırılarak kan numunesinin disk kanalından çıkması engellenmiş ve disk tamamlanmıştır.

Kanın Tasarıma Yüklenmesi

Sodyum sitratlı 8 mL kan numunesi, diske geliştirilmiş basit kan verme girişi olan iğnesiz 15 mL'lik şırınga kullanılarak yavaşça yüklenmiştir.

Santrifüj Parametreleri Optimizasyonu

Yıldız tasarımı, önceki disk parametrelerinin değerlendirilmesine göre 800 g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

Kan Numunesinin Tasarım Üzerindeki Hareketinin Değerlendirilmesi

Santrifüj'den önce ve sonra diskin fotoğrafları çekilmiştir. Kan numunesinin ve jelin 45 derecelik eğik kanaldaki hareketi gözlemlenmiş ve değerlendirilmiştir.

İzole Edilen PZP'nin Toplanması

800 g'de 10 dk santrifüj edilen diskte ayrılan plateletler geliştirilen diskin üst PMMA katmanında plazma deliklerinin üzerine yapıştırılan asetat yapıştırılmış çift taraflı bant 1 mL'lik insülin şırıngası ile kanalda jelin bariyer olduğu bölgenin bir üzerindeki plazma toplama deliği delinerek PZP toplanmıştır

İzole Edilen PZP İçerisindeki Hücre Sayımının Gerçekleştirilmesi

Plazma deliklerinden 1 mL'lik insülin şırıngası ile toplanan PZP, 2 mL'lik ependorflara aktarılarak Düzen Laboratuvarlar Grubu (Ankara) firmasından hizmet alımı yapılarak Sysmex xn-1000 (Sysmex, Japonya) cihazında platelet sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.7.5. Kar Tanesi Tasarımı

Tasarım Solidworks programında, 9 katmanlı olarak çizilmiştir. 5 mm kalınlıktaki PMMA orta katman için, disk 135 mm çapında ve içerisine simetrik olarak 5 kanal yerleştirilmiş ve kanallar birbirine bağlanmıştır. Yine önceki tasarımdaki gibi üst kısmı geniş orta kısma doğru 2 mm genişliğe daralan ve kırmızı kan hücrelerinin toplanacağı bölümde kar tanesini andıran 45 derece sağa ve sola eğik toplam 6 kanaldan oluşan bir geometri ve kanalın merkezine dik olacak şekilde jel yuvası çizilmiştir. Eğik kanallar kırmızı kan hücresinin hızlı bir şekilde çökmesi amacıyla 45 derece eğimli olacak şekilde çizilmiştir. Eğik kanalların başlama seviyesi kırmızı kan hücrelerinin kanın %37'sini oluşturduğu ve 2 mm genişlikteki kanalın üzerinde ise %52'sini oluşturduğu düşünülerek hesaplanmıştır. Diskin üst 1 mm kalınlıktaki PMMA katmanı için, 135 mm çapında daire çizilmiş ve dairenin merkezine vakumlu kan yükleme tasarımı çizilmiştir. Bu tasarım için üst PMMA katmanına her kanalın girişi ayrı olduğundan 2.12 mm genişliğinde ve 1.96 mm genişliğinde hafif eğimli geometride kan numunesinin girişi için delik çizilmiştir. Ayrıca kan numunesi fazlarına ayrıldıktan sonra plateleti toplamak için orta katmanda çizilen 2 mm genişliğe sahip kanalın üst PMMA katmanındaki hizasına göre 0.5 mm çaplı plazma toplama delikleri çizilmiştir.

PMMA tabakalara çizimler, 3.7.1'de uygulanan yöntem kullanılarak kesilmiştir. Disklerin birleştirilmesi sırasında öncelikle alt ve orta katman yapıştırılmış ve kanal içerisinde jel için tasarlanan bölüme 150 µL geliştirilen jelden 1 mL'lik insülin enjektörü ile yüklenmiş ve diskün üst PMMA katmanı yapıştırılmıştır. Birleştirilen 5 katmanın üzerine vakum kapaklı kan yükleme aparatı yerleştirilmiştir. Tamamlanan diskün üst PMMA katmanında bulunan plazma toplama deliklerinin üzerine de tek yüzüne çift taraflı bant yapıştırılmış asetat kâğıdı yapıştırılarak kan numunesinin disk kanalından çıkması engellenmiş ve 72 saat 2 mengene ile sıkıştırılıp bantların %100 yapışması sağlanmıştır. Disk kan numunesinin yüklenebilmesi için vakumlama aparatı yardımıyla 20 mbar değerine kadar vakumlanmış ve disk tamamlanmıştır.

Kanın Tasarıma Yüklenmesi

Sodyum sitratlı 9 mL hacimdeki kan numunesi 10 mL hacmindeki enjektöre alınmış ve vakumlanmış diskün üzerindeki vakum kapak kan yükleme aparatına yeşil uç olan 21G değerindeki iğne ile kapaktaki kauçuk delinerek kanallara kan numunesi yüklenmiştir.

Santrifüj Parametreleri Optimizasyonu

Önceki disk parametrelerinin değerlendirilmesine göre kar tanesi tasarımı 800 g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

Kan Numunesinin Tasarım Üzerindeki Hareketinin Değerlendirilmesi

Kan numunesinin vakumlu sistemden diske yüklenmesi ve tasarımda jelin ve kan numunesinin hareketleri santrifüj sırasında 30 sn'de 1 çekilen fotoğraflar ile değerlendirilmiştir.

İzole Edilen PZP'nin Toplanması

800 g'de 10 dk santrifüj edilen diskte ayrılan plateletler geliştirilen diskin üst PMMA katmanında plazma deliklerinin üzerine yapıştırılan asetat yapıştırılmış çift taraflı bant 1 mL'lik insülin şıngası ile kanalda jelin bariyer olduğu bölgenin bir üzerindeki plazma toplama deliği delinerek PZP toplanmıştır

İzole Edilen PZP İçerisindeki Hücre Sayımının Gerçekleştirilmesi

Plazma deliklerinden 1 mL'lik insülin şıngası ile toplanan PZP, 2 mL'lik ependorflara aktarılarak Düzen Laboratuvarlar Grubu (Ankara) firmasından hizmet alımı yapılarak Sysmex xn-1000 (Sysmex, Japonya) cihazında platelet sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.7.6. Uçak Tasarımı

Tasarım Solidworks programında, kan numunesi yükleme aparatı dahil 9 katmanlı olarak çizilmiştir. 5 mm kalınlıktaki PMMA orta katman için, disk 130 mm çapında ve içerisine simetrik olarak 5 kanal yerleştirilmiştir. Kanal tasarımında üst kısmı geniş orta kısmı jelin santrifüj işlemi sonlandıktan sonra hareket edememesi için kare şeklinde girintili çıkıntılı, daralan kanal ve Z kanallı olarak 3 farklı disk dizayn edilmiştir. Kırmızı kan hücrelerinin toplanacağı bölüm uçak kanadını andıran 45 derece sağa ve sola eğik kanallardan oluşan bir geometri ve kanalın merkezine dik olacak şekilde kar tanesi tasarımına benzer jel yuvası çizilmiştir. Eğik kanallar kırmızı kan hücrelerinin hızlı bir şekilde çökmesi amacıyla 45 derece eğimli olacak şekilde çizilmiştir. Eğik kanalların başlama seviyesi kırmızı kan

hücrelerinin kanın %37'sini oluşturduğu ve her geometrideki ince kanalın orta seviyelerinde ise %52'sini oluşturduğu düşünülerek hesaplanmıştır.

Disk 1 mm kalınlıktaki üst PMMA katmanı için, 130 mm çapında daire çizilmiş ve dairenin merkezine vakumlu kan yükleme tasarımı çizilmiştir. Bu tasarım için üst PMMA katmanına her kanalın girişi ayrı olduğundan kanalın merkeze bakan kısmındaki geometriye uygun genişlikte kan numunesinin girişi için delik çizilmiştir. Ayrıca kan numunesi fazlarına ayrıldıktan sonra plateleti toplamak için orta katmanda çizilen girintili çıkıntılı kare kanalın üst PMMA katmanındaki hizasına göre 1 mm çaplı plazma toplama delikleri çizilmiştir.

PMMA tabakalara solidworks çizimleri, 3.7.1'de uygulanan yöntem kullanılarak kesilmiştir ve diskler, 3.7.5'te uygulanan yöntem kullanılarak birleştirilmiştir.

Kanın Tasarıma Yüklenmesi

Sodyum sitratlı 9 mL hacimdeki kan numunesi 10 mL hacmindeki enjektöre alınmış ve vakumlanmış diskin üzerindeki vakum kapak kan yükleme aparatına yeşil uç olan 21G değerindeki iğne ile kapaktaki kauçuk delinerek kanallara kan numunesi yüklenmiştir.

Santrifüj Parametreleri Optimizasyonu

Uçak tasarımı altında oluşturulan 4 farklı ince kanal yapısına sahip disk 800 g'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.

Kan Numunesinin Tasarım Üzerindeki Hareketinin Değerlendirilmesi

Kan numunesi disklerde sırasıyla kare kanallı, daralan kanallı, Z kanallı ve üçgen engelli Z kanallı olarak denenmiş ve her disk denemesinde çekilen fotoğraflar neticesinde disk

içerisindeki kan ve jel numunesinin hareketleri değerlendirilerek sıradaki diske geçilmiştir.

İzole Edilen PZP'nin Toplanması

İzole edilen PZP'ler plazma toplama deliklerinden 1 mL'lik insülin şırıngası ile toplanan PZP, 2 mL'lik ependorflara aktarılmıştır. İnce kanal içerisinde bulunan bölge PZP olarak ve ince kanalın üzerindeki genişleyen kanal PFP şeklinde 2 aşamada toplanmıştır.

İzole Edilen PZP İçerisindeki Hücre Sayımının Gerçekleştirilmesi

İzole edilen PZP ve PFP Düzen Laboratuvarlar Grubu (Ankara) firmasından hizmet alımı yapılarak Sysmex xn-1000 (Sysmex, Japonya) cihazında platelet sayımı gerçekleştirilmiştir.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Disk Tabanlı Sistem Tasarımı

Disk tabanlı laboratuvar sistemleri, santrifüjlü mikro-akışkan veya disk tabanlı laboratuvar platformları, mikro-akışkanları manipüle etmek için santrifüj etkisinden yararlanır. Merkezkaç kuvveti diskin her yerinde bulunmakta ve yön daima radyal olarak dışa doğru olduğu için, tıpkı bir “yerçekimi alanı” gibi davranır. Oluşan bu yerçekimi alanı birçok avantaj sunmaktadır. Santrifüjlü mikro-akışkan cihazlarda sıvı taşınması da oldukça verimlidir. Sistemde hava balonluğu veya artık hacim bırakmamaktadır. Ek olarak, kullanılan numunede yoğunlukları farklı olan birimler varsa merkezkaç kuvveti kullanıldığından yoğunluğa bağlı fazların ayrılmasını da sağlamaktadır. Bu avantajlar sadece santrifüjlü mikroakışkan araştırma faaliyetlerinde bir artışa katkıda bulunmakla kalmamış, aynı zamanda birçok şirketi santrifüjlü mikroakışkanlara dayalı ürünler geliştirmeye çekmiştir. Panasonic, Roche, Samsung, 3M ve Abaxis, hali hazırda piyasada santrifüjlü mikro-akışkan bazlı ürünlere sahiptir. [58].

4.1.1. Tasarıma Yönelik İlgili Hesaplamaların Yapılması

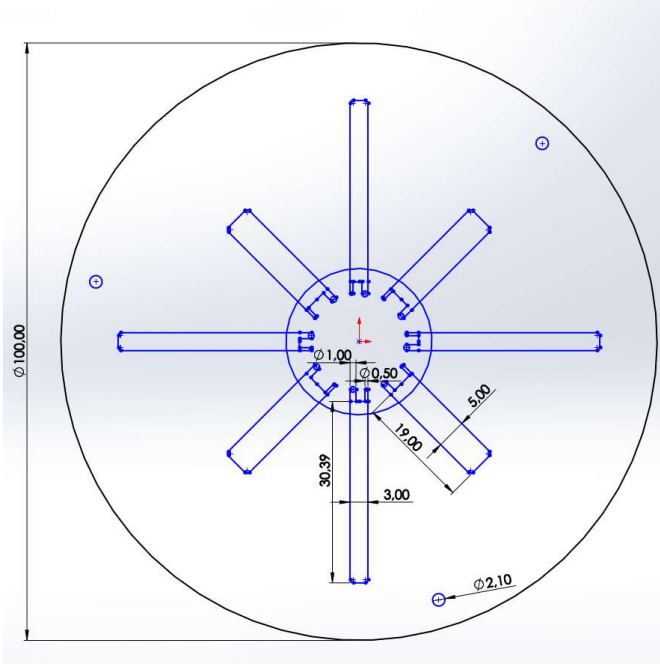
Yapılan tez çalışmasında, disk tabanlı sistemin amacı olan yüksek konsatrasyonda platelet'in elde edilmesi için yaklaşık olarak her insanda ortak olan kan hücre sayılarının hesaplaması yapılmıştır. Bu hesaplama göre, literatürdeki bilgilere dayanarak erkek ve kadın tam kanındaki hematokrit değeri farklıdır. Bu nedenle, erkeklerde %42 ile %52 arasında ve kadınlarda %37 ile %47 arasında olan hematokrit değeri göz önüne alınmıştır. Bu değerlere göre tez çalışmasında geliştirilen PZP kitinin hem erkek ve hem de kadın kişiler tarafından kullanılacağı göz önüne alındığında kanal tasarımı hesaplamalarında kadınlarda en düşük %37 değeri ve erkeklerdeki en yüksek %52 değeri alınarak excel programında disk tasarımlarında kullanılan örnek hacimlerine göre hesaplanmıştır (Tablo3). Bu hesaplardan yola çıkarak tasarımlarda kullanılan kanal tasarımlarının hacimleri Solidworks programında hesaplanmıştır.

Tablo 3. Kan Numunesindeki Hematokrit oranına göre PZP Toplama Bölgesinin Hesaplanması.

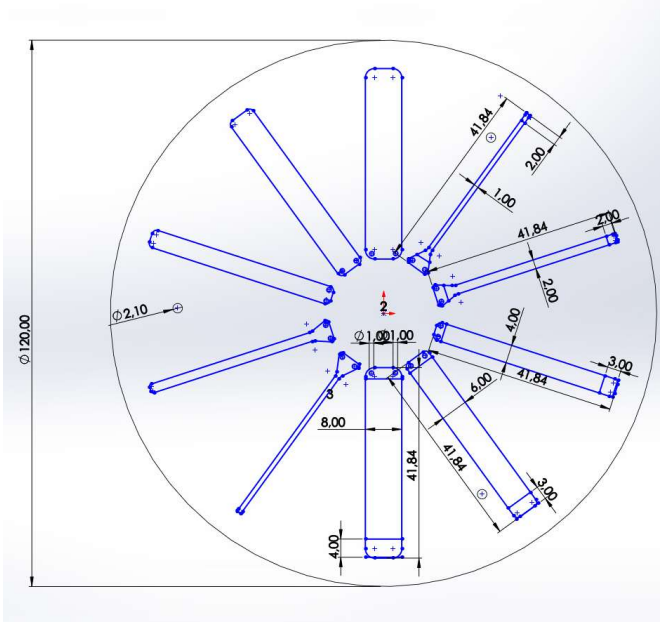
| Disk Kanallarındaki Bölgelerde En Düşük Olması Gereken Hacimler | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------|
| Örnek Hacim (mL) | Tek Kanal Hacmi (mL) | Hematokrit Oranı (%) | Kırmızı Kan Hücreleri Hacmi (mL) | Plazma Hacmi (mL) |
| 10 | 2 | 37 | 0,74 | 1,26 |
| 9 | 1,8 | 37 | 0,666 | 1,134 |
| 8 | 1,6 | 37 | 0,592 | 1,008 |
| Disk Kanallarındaki Bölgelerde En Yüksek Olması Gereken Hacimler | | | | |
| Örnek Hacim (mL) | Tek Kanal Hacmi (mL) | Hematokrit Oranı (%) | Kırmızı Kan Hücreleri Hacmi (mL) | Plazma Hacmi (mL) |
| 10 | 2 | 52 | 1,04 | 0,96 |
| 9 | 1,8 | 52 | 0,936 | 0,864 |
| 8 | 1,6 | 52 | 0,832 | 0,768 |

4.1.2. Disk Tabanlı Sistemin Çizimleri

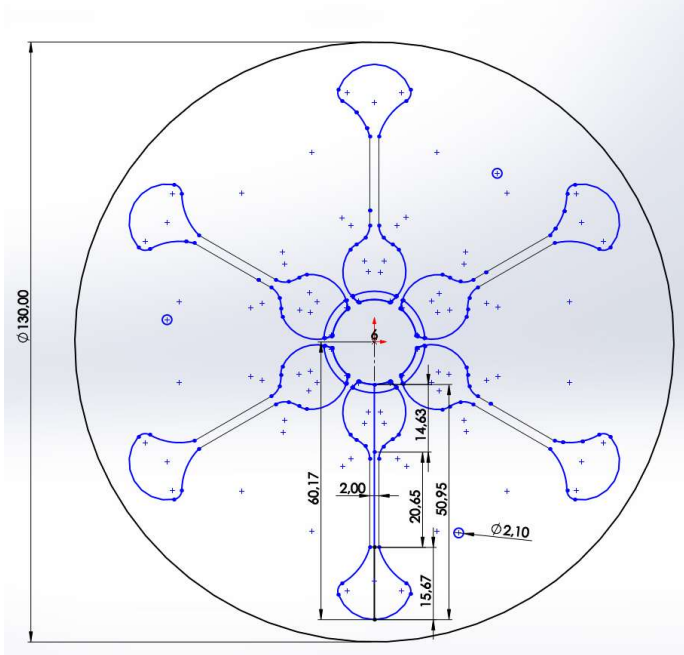
Tez çalışmasında kullanılan disk tasarımlarının çizimleri Bölüm 3.1'de ve 3.1.1'de anlatılan hesaplamalara göre Solidworks programında çizilmiştir. Çizilen disk tabanlı sistemlerin 2 boyutlu tasarımları Şekil 3,4,5,6,7,8,9 ve 10'da gösterilmiştir.



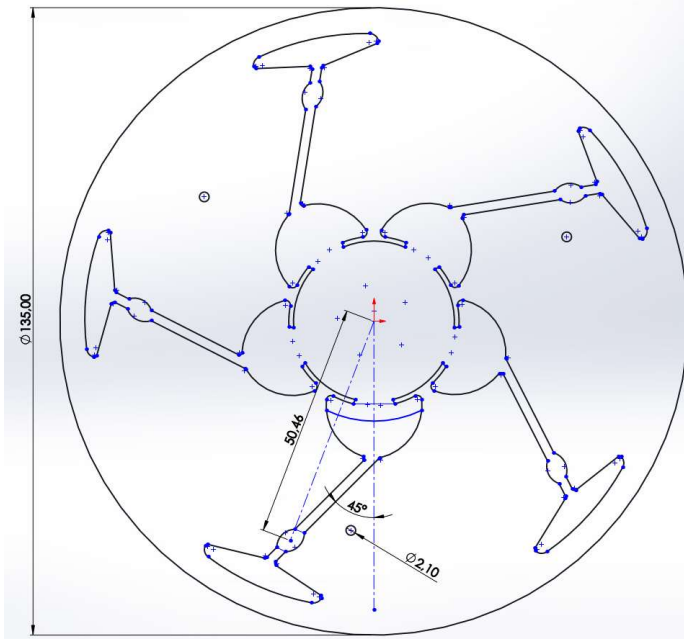
Şekil 3. Düz kanal tasarımı.



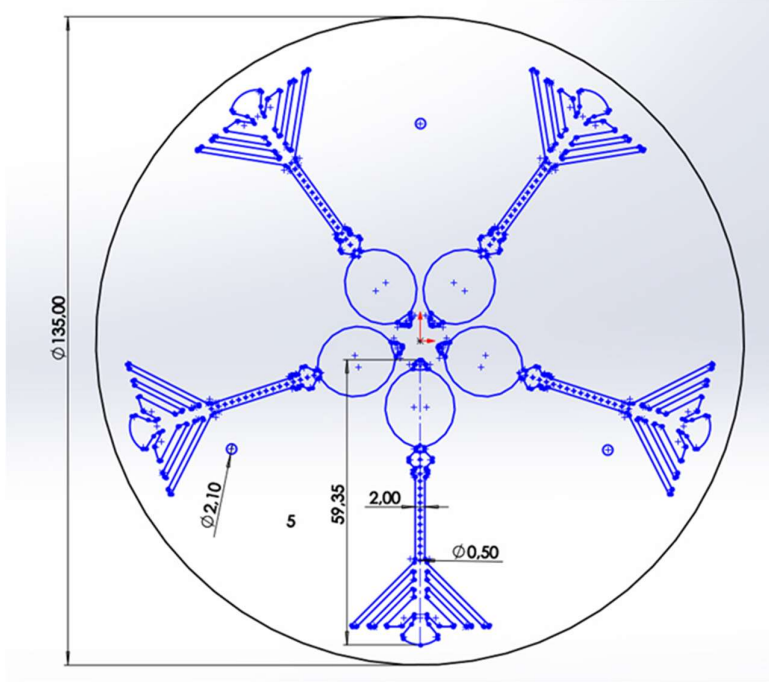
Şekil 4. Farklı genişliklerde düz kanal tasarımı.



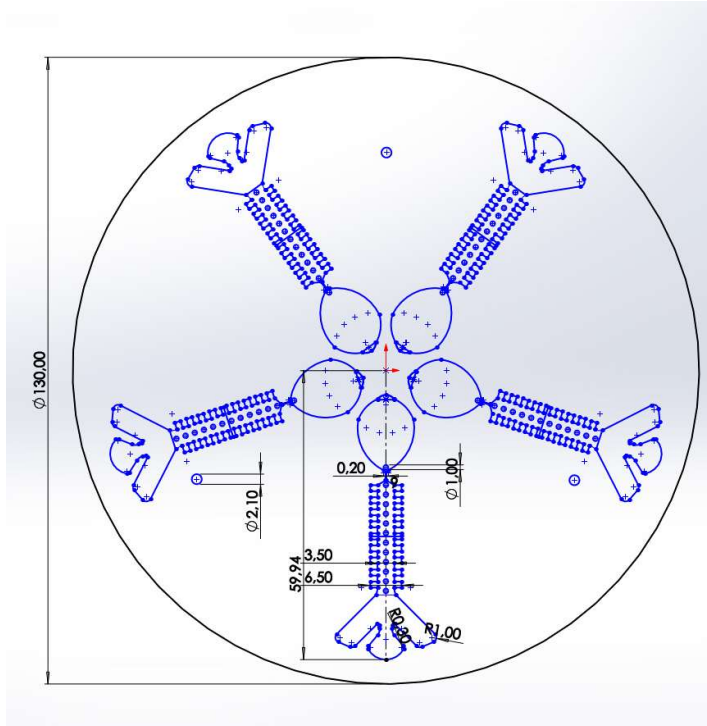
Şekil 5. Kadeh kanal tasarımı.



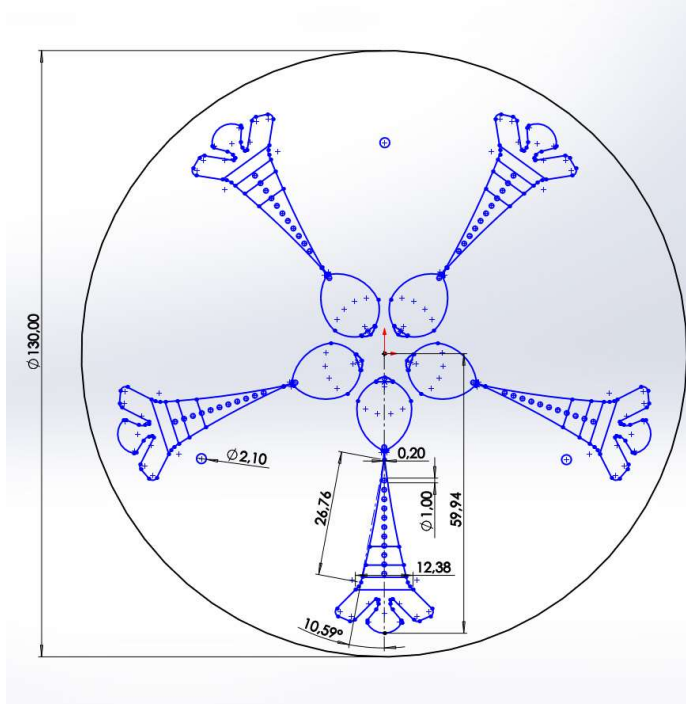
Şekil 6. Yıldız tasarımı.



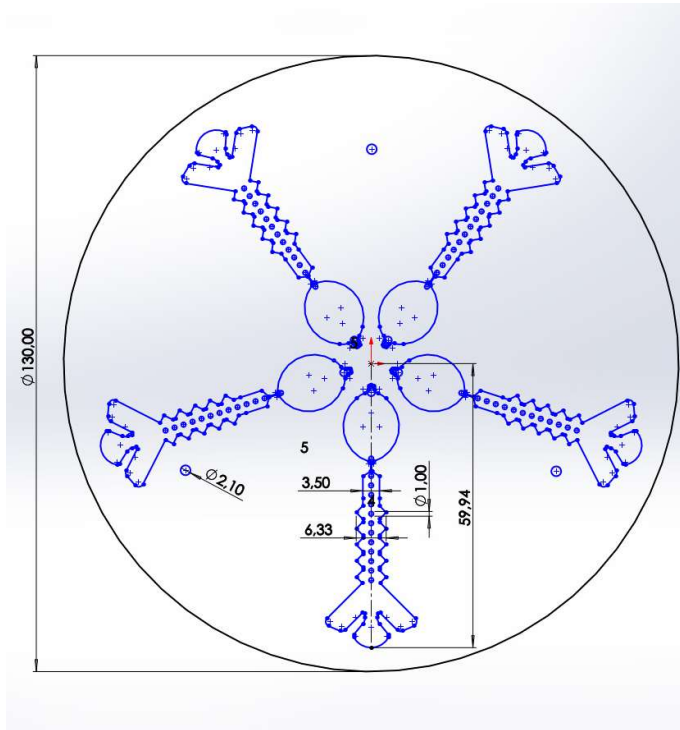
Şekil 7. Kar tanesi tasarımı.



Şekil 8. Vakum kapaklı- kare kanallı uçak tasarımı.



Şekil 9. Vakum kapaklı daralan kanallı uçak tasarımı.



Şekil 10. Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımı.

4.2. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu

4.2.1. Uygun Disk materyalinin Belirlenmesi

Disk tabanlı sistemler için kullanılan biyo-uyumlu malzemelerden PMMA, polikarbonat ve PET tabakalar SDS Ankara Yapı ve Reklam Ürünleri (Ankara) firmasından satın alınmış ve lazer kesim cihazına uygunluğu açısından değerlendirilmiştir.

Deneme için 1 mm kalınlığında PET tabaka lazer cihazında lazer gücü %40- %50 ve %60 ile prob hızı 10 -12 ve 15 mm/sn olarak test edilmiştir. Test sonucunda PET tabaka lazer cihazı ile kesilirken kesim yerlerinde renk değişiklikleri tespit edilmiş kesilen bölgeler eriyik hal almıştır. Kesim yerlerindeki eriyik hal çift taraflı bantın yapışma oranını etkilemekte ve renk değişikliğinin toksik bir problem oluşturması durumu düşünülmüştür. Bu nedenlerden dolayı PET malzemedен vazgeçilmiş ve Polikarbonat tabaka denenmiştir.

Yine deneme için 1 mm kalınlığında polikarbonat tabaka lazer cihazında yine aynı parametrelerle denenmiştir. Fakat polikarbonat yapısındaki malzemelerden dolayı lazer kesime elverişli olmayıp kesim sırasında alev alarak yanmıştır. Bu nedenle polikarbonat malzemesinden de vazgeçilmiştir.

Deneme için 1 mm kalınlığında PMMA tabaka lazer cihazında yine aynı parametrelerle denenmiştir. Kesim sırasında kesilen bölgeler düzgün bir şekilde erimedен kesilmiştir. Kesilen bölgelere çift taraflı bant yapıştırıldığında hava baloncuğu kalmadan yüzeye %100 oturduğu gözlemlenmiş ve disk malzemesi olarak kullanılmıştır.

4.2.2. CO₂ Lazer Parametrelerinin Optimizasyonu

Disk tabanlı sistem için uygun materyal olarak PMMA tabaka seçildikten sonra disk çizimlerine göre uygun 1 mm ve 5 mm kalınlığında PMMA tabakalar için lazer cihazında optimum kesim değerleri denenmiştir. Bu optimizasyon, PMMA malzemesinin yanmaması ve kesilen malzemenin şeklini koruması için gerekli bir işlemdir. Malzemelerin optimizasyonu için önce 1 mm kalınlıktaki PMMA tabakalar lazer kesim

cihazında sırayla lazer gücü %40, %50 ve %60 olarak, prob hızı ise 10-12-15 mm/sn olarak denenmiştir. Yine aynı cihazda 5 mm kalınlıktaki tabaka için de lazer gücü %70 ve %80 olarak, prob hızı ise 3 mm/sn – 5 mm/sn ve 10 mm/sn olarak kesilme işlemi denenmiştir. Bu parametreler sonucunda 1 mm PMMA tabaka için en uygun değer lazer gücü %60 ve prob hızı 15 mm/sn olarak bulunmuş ve 5 mm PMMA tabaka için lazer gücü %80 ve prob hızı 5 mm/sn olarak bulunmuştur. Disk'in somut hale getirilmesi sırasında 5 mm kalınlıktaki PMMA tabakanın iki yüzü de çift taraflı bant ile kaplanarak kesilmiştir. Bu nedenle iki yüzü de bant kaplı tabaka için lazer gücü %80 ve prob hızı 3 mm/sn değeri denenmiş ve başarılı bir şekilde kesilmiştir.

4.2.3. Disk Tabanlı Sistemin Fabrikasyonu

Disk tabanlı sistemin fabrikasyonunda 1 mm ve 5 mm'lik PMMA tabakalar ve 130 µm 'lik 3M 468MP çift taraflı bantlar Solidworks programıyla çizilen tasarımlarda AEON Nova 7 cihazı ile kesilmiştir.

5mm'lik PMMA tabakası kesilmeden önce tabakanın ön ve arka yüzüne 3M 468MP çift taraflı bant bir kart yardımıyla PMMA tabaka ve bant arasında hava baloncuğu kalmayacak şekilde yapıştırılmıştır. İki çift taraflı bant tabakası ve bir 5 mm'lik PMMA tabakası aynı anda lazer kesim cihazında kesilmiştir. Bu nedenle çift taraflı tabakalar için tekrardan bir kesim yapılmamıştır.

Oluşturulan iki 1 mm'lik PMMA ve her iki yüzü çift taraflı bant ile kaplı 5mm 'lik PMMA tabakası olmak üzere toplam 5 katman, Solidworks programında çizime eklenen 2,1 mm'lik çapında vida kılavuz delikleriyle hizalanmış ve üst üste çift taraflı bantların diğer yüzlerine oturtularak yapıştırılmıştır. Yapıştırma işlemi sırasında merdane benzeri bir silindir ile katmanlar arasında hava baloncuğu kalmaması için üzerinden dikkatli şekilde geçilmiştir.

4.3. Disk Tabanlı Sistem İçin Uygun Santrifüj Cihazı Geliştirilmesi

4.3.1. Santrifüj Cihazı Tasarlanması

Disk tabanlı sistem için geliştirilen santrifüj sistemi kontrol teorisi temelleriyle oluşturulmuştur. Geliştirilen sistem istenilen hız ve sürede dönme sağlamaktadır. Sistem kapsamında kullanılan ekipmanlar: Merkezi Kontrol Birimi, Lojik Seviye Çevirici, Fırçasız DC Motor, Elektronik Hız Kontrolcüsü, AC-DC Voltaj Çevirici, Hall Efekt Sensör, Disk Tablasından oluşmaktadır.

Merkezi Kontrol Birimi olarak STM32F103 (BluePill) ARM mimarisi tabanlı bir kontrolcü kullanılmıştır. Seçilen parametreler bu MCU ST-LINK adı verilen bir protokol çevirici ile programlanmaktadır. STM32F103 kullanımındaki en büyük etken "ClockCycle"ın çok daha popüler olan ATMEGA işlemcili Arduino'lara göre hızlı olmasıdır. Sistem üzerinde oluşturulan kodda hızlı reaksiyonlar verip motor kontrolünü sağlayabilmek adına yüksek saat darbelerine sahip bir işlemci tercihine gidilmiştir. Programlama yapılırken STM uyumlu olan embed.CLI kullanılmıştır. Bu sayede hali hazırda kullanılan Arduino uyumlu kodlar, PIN konfigürasyonları düzeltilerek STM üzerinde çalıştırabilir hale getirilmiştir. Böylece detaylı gömülü yazılım bilgisine ihtiyaç duyulmadan daha hızlı bir çözüm sunulmuştur. Önemli olan kontrolcünün stabil şekilde olması ve bunun ayarlanması olmuştur.

Lojik Seviye Çevirici olarak kullanılan MCU'nun GPIOlarının 3V3 olmasından dolayı çevresel bileşenlerle haberleşip kontrol edebilmesi adına (özellikle ESC), dijital sinyallerin voltaj seviyesinde değişiklikler yapılması gerekmiştir. Bunun için bidirectional olan Texas Instruments'in lojik voltaj çevirici IC'si TXS0102DCUR olan bir modül ile kullanılmıştır. Bu sayede ESC kontrolü sağlanabilmiştir.

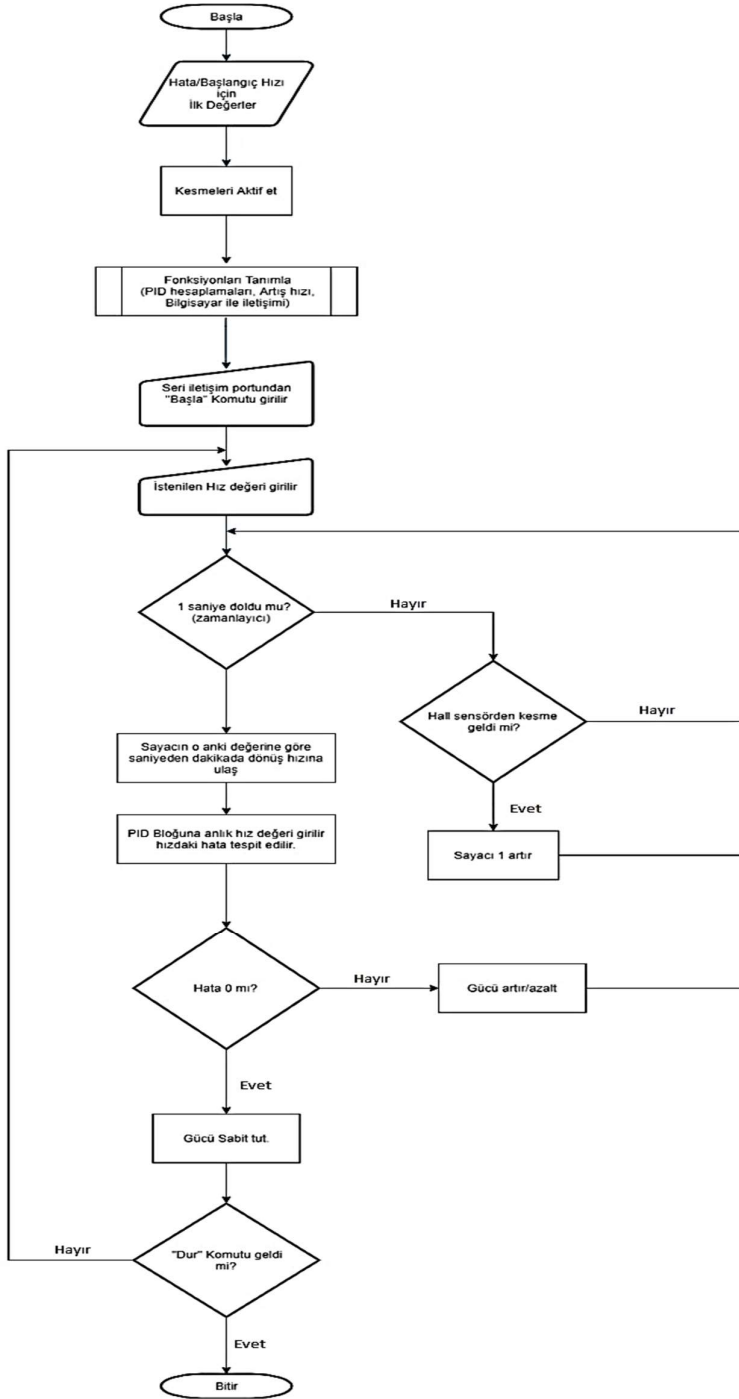
Fırçasız DC Motor, Yüksek RPM değerlerine çıkılmasına duyulan ihtiyaçtan, fırçasız DC motor kullanılmıştır. Tork ve hız gerekliliği göz önünde bulundurulunca GT2215/09 Grand Turbo motor seçilmiştir.

Elektronik Hız Kontrolcüsü (ESC), ESC gelen PWM sinyallerine göre akım geçişini ayarlanan bir vana gibi davranmaktadır. PWM'deki Duty Cycle'a bağlı olarak akım değerini artırıp azalmaktadır. MCU'dan gelen PWM sinyallerinin genişliğine bağlı olarak sistem hızlanıp yavaşlamaktadır. Motorun hızlanma ve yavaşlanmasını kontrol eden birim ESC'dir. Voltaj kontrolü ile fırçasız DC Motor sürmek mümkün olmadığı için bu ara elemana ihtiyaç duyulmaktadır.

AC-DC Voltaj Çevirici, şebekeden gelen 220V AC voltajın 12V DC voltaja çevrilmesini sağlayan elemandır.

Hall Efekt Sensör, dönüş hızı bilgisinin MCU tarafında anlamlandırılması için her tura ait dijital sinyalleri oluşturan sensördür. Buradaki hall efekt sensör miktarını artırarak daha hassas ölçümler alınması da mümkündür. Ancak tez kapsamında geliştirilen sistemde oluşabilecek 50-60 RPM'lik sapmalar yüzde 0 ila 1 arası etkiye sebep olduğundan kabul edilebilecek hata payı diliminde yer almıştır. Tek Hall Efekt sensör ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj sisteminde kullanılan STM32F103 (BluePill) ARM mimarisi tabanlı bir kontrolcüye aşağıdaki algoritma (Şekil.11) ile yazılan kodlar ST-link versiyon 2 ile yüklenerek santrifüj cihazı çalıştırılmıştır. Santrifüj cihazı için kullanılan kodlar ekler-1'de verilmiştir.

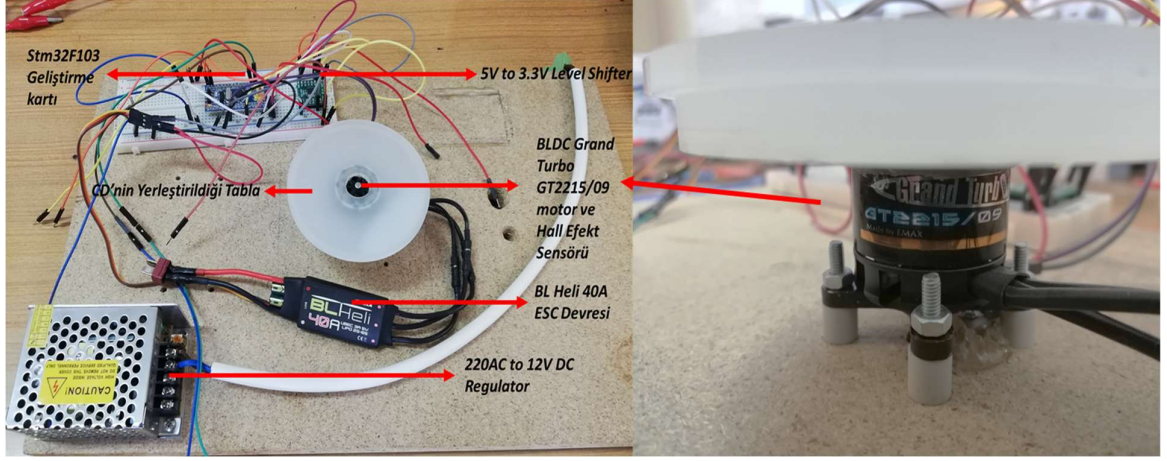


Şekil 11. Santrifüj cihazı için algoritma akış şeması

4.3.2. Disk Tabanlı Sistemler için Geliştirilen Santrifüj ve Stroboskop Işık Devresinin Değerlendirilmesi

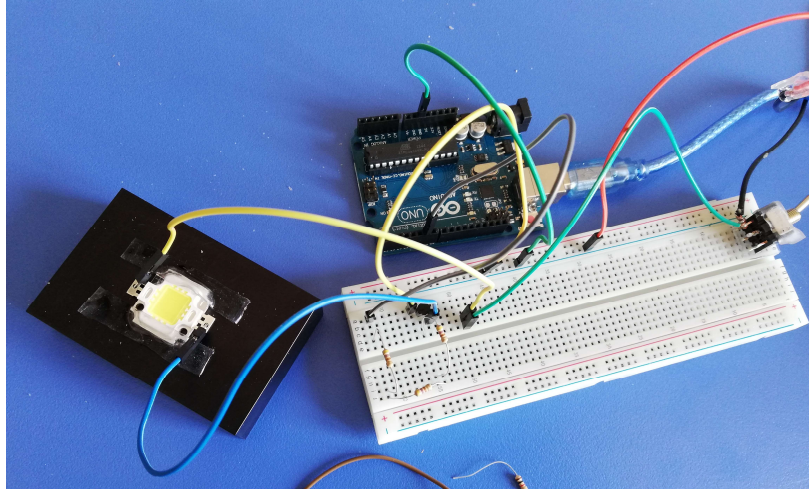
Merkezi Kontrol Birimi, Lojik Seviye Çevirici, Fırçasız DC Motor, Elektronik Hız Kontrolcüsü, AC-DC Voltaj Çevirici, Hall Efekt Sensör ve Disk Tablasından oluşan disk

tabanlı sistemler için uygun santrifüj cihazı (Şekil 12) birleştirilmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Santrifüj cihazı fırçasız DC Motor kullanıldığından performansı çok yüksek ve uzun kullanım için uygundur.



Şekil 12. Disk tabanlı sisteme uygun santrifüj cihazı ve BL-DC Motor.

Arduino Uno geliştirme kartı, 3 adet direnç, anahtar devresi, 10 W Power Led'den oluşan devre (Şekil 13) birleştirilmiş ve arduino kodlarındaki milisaniye değerleri motorun frekansına uygun hale getirilmiştir.

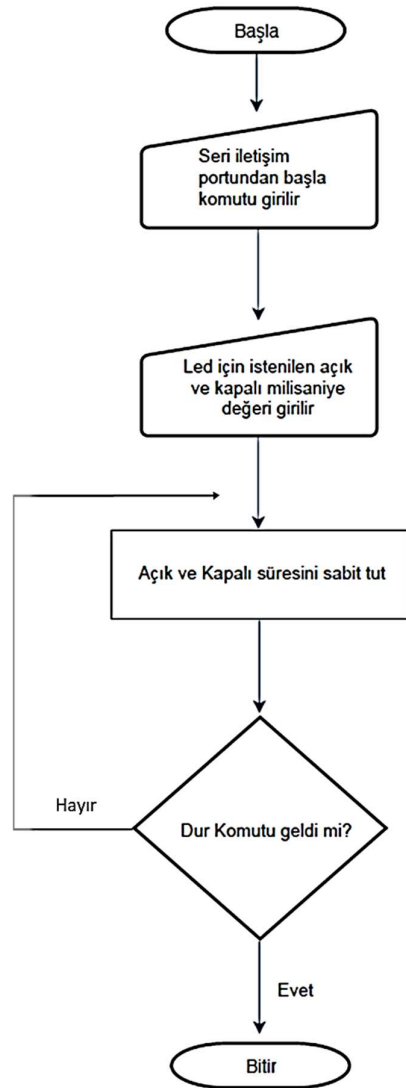


Şekil 13. Arduino Uno ve Power led'li Stroboskop düzeneği.

Kullanılan disk tasarımlarda santrifüj ile merkezkaç kuvveti rpm cinsi üzerinden verilmektedir. Fakat rpm değeri rotor büyüklüğüne bağlı olarak değiştiğinden cihazdan

cihaza fark edecektir. Bu nedenle rpm değerleri g olarak hesaplanmıştır. Rpm'den g birimine dönüşüm formül 1 kullanılarak yapılmıştır.

Stroboskop sisteminde kullanılan Arduino UNO geliştirme kartına aşağıdaki algoritma (Şekil.14) ile yazılan kodlar yüklenerek çalıştırılmıştır. Stroboskop için kullanılan kodlar ekler-1'de verilmiştir.



Şekil 14.Stroboskop cihazı için algoritma akış şeması

4.4. Tikotropik Platelet Ayırma Jeli

4.4.1. Tikotropik Platelet Ayırma Jelinin Geliştirilmesi

Otolog kandan geliştirilen topikal olarak uygulanan PZP solüsyonu, içerisindeki büyüme faktörleri sayesinde lokal doku iyileşmesi ve rejenerasyonuna yönelik tedavilerde son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır [59]. PZP elde yöntemlerinde ticari olarak geliştirilen ayırma kitlerinde santrifüj işlemi ve süpernatantın toplanması esasına dayanmaktadır [60]. Daha etkin PZP eldesinde, plateletlerin kırmızı kan hücrelerinden ayrılması için fiziksel bir bariyere ihtiyaç gerekmektedir. 'Ayırıcı jel' olarak bilinen bu bariyer sayesinde PZP eldesinde çok daha etkili bir sonuca ulaşmak mümkündür [61], [62].

Bugüne kadar PZP eldesinde kullanılmak üzere çeşitli tikotropik jeller geliştirilmiştir [63,64]. Geliştirilen tikotropik jelin, elastik veya katı benzeri davranışlar gösterdiği için bileşen birimlerinin üç boyutlu bir ağ yapısına sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte, jel yapısında kovalent bağdan ziyade zayıf fiziksel bağlardan oluşmalıdır. Bağların zayıf olması, yapıdaki üç boyutlu ağın santrifüjleme sırasında kayma gerilimi etkisi ile jelin bir sıvı gibi akmasına izin vermesini sağlamaktadır. Ayrıca bu bağ yapısı, kayma gerilimi etkisi kaldırıldığında jelin durağan haldeki ağ yapısına hızlıca geri dönmesi bakımından yararlıdır [65,66].

Tez çalışması kapsamında hazırlanan tikotropik jel, Anraku ve arkadaşının geliştirdikleri jel içeriğine benzer bir şekilde yapılmıştır [67]. Buna göre sıvı reçine bileşeni içerisinde hidrofilik inorganik toz, hidrofobik inorganik toz ve propilen glikol bir mekanik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

Jel'in geliştirilmesinde kullanılan Ecsorez 5300, sızdırmazlık ürünleri, yapıştırıcılar, koruyucu kaplamaların üretiminde kullanılan petrol bazlı bir reçinedir [68,69]. Ecsorez 5300 reçinesinin hidrojenlendirilmesi işlemi ile reçinenin termooksidatif stabilitesi artmakta, rengi iyileşmekte ve dien ile aromatik kısımların doygunluğunun sonucu olarak da toksisiteyi ortadan kaldırmaktadır. [70]. Modifiye edilmiş hidrokarbon yapılu reçine

olarak kabul edilen Escorez 5300, yüksek düzeyde stabiliteye ve düşük moleküler ağırlığa sahip, renksiz ve kokusuz bir oligomerdir [71].

Jel yapısında bulunan diğer bir madde ise, trimellitik anhidrit ile 2-etilheksanolün esterleştirilmesiyle üretilen TOTM'dur. Uçuculuğunun düşük olması, yüksek elektrik direnci ve ısı direnci sayesinde plastikleştirici olarak medikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [72].

Jelin viskozitesini ayarlamak amacıyla kullanılan Aerosil A200 ve Aerosil R972 ise, bir oksijen gazı alevi içinde silikon tetraklorürün yüksek sıcaklıkla hidrolizi ile üretilen, ticari olarak temin edilebilen kolloidal silisyum dioksit (SiO_2) ürünlerinden biridir. Özellikleri uygun reaksiyon koşulları ve yüzey modifikasyonları ile kontrol edilebilen oldukça dağınık, amorf ve sıradan bir ışık mikroskobu tarafından görülemeyecek kadar küçük silikadan oluşur. Silikaların modifiye edilmesi ile partikül büyüklüğü, yüzey alanları, hidrofilik yapı ve yoğunluklar etkilenmektedir. [73,74]. Aerosilin hidrofilik özellikteki hali A200 ve hidrofobik özellikteki hali ise R972 olarak adlandırılır. Aerosil A200 silanol grupları içerir [75]. Aerosil R972, dimetildiklorosilan (% 0,6–1,2) bir polimer zincirine bağlandığında polimer hidrofobik özellik göstermektedir [76,77]. Aerosil A200, farklı alanlarda kullanılmasının yanı sıra tiksotropik bir davranışa sahip olduğu da belirlenmiştir [78,79].

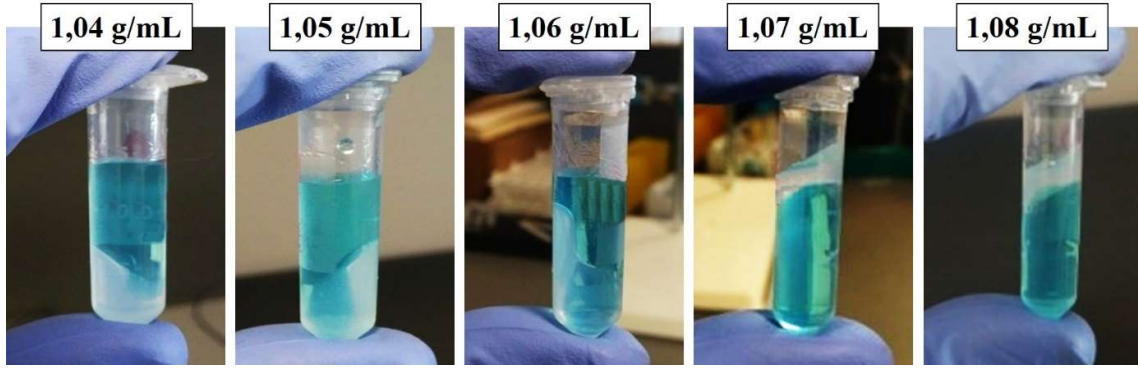
Anraku ve arkadaşının çalışmasında herhangi tiksotropik özelliği arttırıcı bir ajan kullanmadan yapıdaki daha yüksek bir yüzey hidroksil grubu konsantrasyonuna sahip olan Aerosil A200 ve R972 silikon dioksit bazlı inorganik materyaller kullanarak tiksotropik etkiyi oluşturmayı amaçlamıştır. Yapılan çalışmada hidrofilik yapılı inorganik konsantrasyonun yüksek olması jelin kan bileşenlerini ayırmada daha etkili sonuçlar verdiği gözlenmiştir [67].

Anraku ve arkadaşları, tiksotropik özelliği arttırıcı özelliğinden dolayı jel yapısında düşük molekül ağırlıklı propilen glikol kullanmışlardır. Jelin tiksotropik özelliğini arttırmasının yanı sıra yüksek konsantrasyonda kullanımı jel yapısında çatlak oluşumlarına neden olduğu için jel üretiminde ağırlıkça % 0,2 ila % 5 konsantrasyonda kullanılmıştır [67].

Tiksotropik jelin yoğunluğu, diğer kan hücrelerinin yoğunluğu ile platelet hücrelerinin yoğunluğunun arasında bir değer olacak şekilde ayarlanması önemlidir. Jel içerikli tüp, içerisine kan numunesi eklendikten sonra santrifüjleme işlemine tabi tutulur. Merkezkaç kuvvet etkisiyle jel, geri dönüşümlü olarak sıvılaşır ve farklı yoğunluklar nedeniyle daha ağır kan hücreleri ile plazma arasındaki bir konuma akar. Santrifüjlemeden sonra, azalan kuvvet ile beraber ayırıcı bir jel haline döner ve ayrılması istenen kan hücreleri ile istenilen fraksiyon (platelet) arasında yumuşak bir bariyer oluşturur [80].

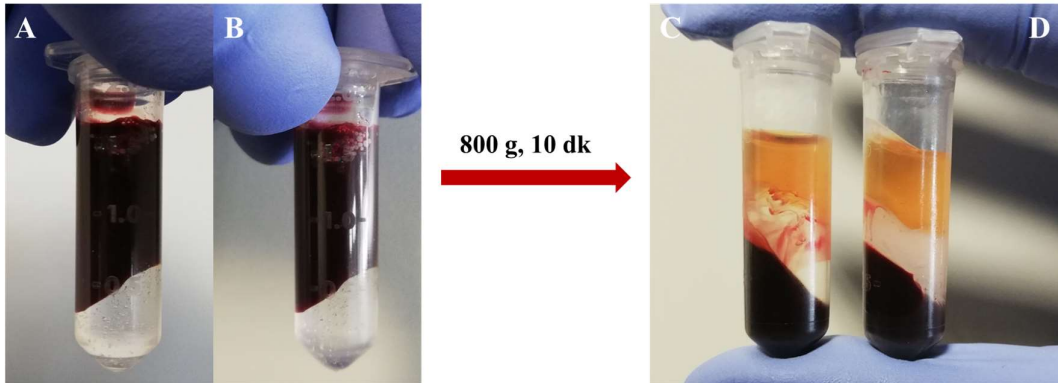
Geliştirilen tiksotropik jelin, uygun yoğunluk ve vizkozitede olması için, 5,23 g Escorez 5300, 4,42 g TOTM kullanılmıştır. Çözünmüş polimerin üzerine 0,08 g PG eklenmiştir. Jelin viskozitesini ve yoğunluğunu belirleyen silikalar için yapılan optimizasyonda 0,15 g Aerosil A 200 ve 0,255 g Aerosil R 972 silika tozları çözeltiye yavaşça eklenmiş ve 24 saat boyunca karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

CuSO₄ yöntemi, kan test merkezlerinde yoğunluk ölçümü için yaygın olarak kullanılan hızlı ve oldukça güvenilir bir yöntemdir. Yoğunluğu bilinen çözeltiden yola çıkarak kanın özgül ağırlığının tespit edilmesine dayanmaktadır. Kan yapısındaki hemoglobin konsantrasyonuna bağlı olarak yüzeyde yüzer ya da CuSO₄ çözeltisinin dibine batar. Böylece kandaki hemoglobin seviyesi belirlenmektedir [81]. Kan içerisindeki plazmanın özgül ağırlığının 1.022 - 1.026 g / mL, beyaz kan hücrelerinin yoğunluğu yaklaşık 1.08 g / mL ve kırmızı kan hücrelerinin yaklaşık 1.11 g / mL'lik yoğunluğa sahip olduğu bilinmektedir [82,83]. Plateletler ise düşük yoğunluklu (1.040 <d <1.065 g / mL), ara yoğunluk (1.065 <d <1.070 g / mL) ve yüksek yoğunluklu (1.070 <d <1.080 g / mL) olarak üç farklı yoğunluk değerine sahiptir [16] . Geliştirilen jelin platelet yoğunluk değerleri göz önünde bulundurularak kırmızı kan hücrelerinden daha düşük yoğunluklu ve plazmadan ise daha yüksek yoğunluklu halde kan hücreleri arasında bir bariyer oluşturacağı göz önünde bulundurularak 1.040 ila 1.080 arasında olacak şekilde optimize edilmiştir. Bu doğrultuda platelet yoğunluk değerlerinden yola çıkarak jelin yoğunluğunun belirlenebilmesi amacıyla sırasıyla 1,04 g/mL, 1,05 g/mL, 1,06 g/mL, 1,07 g/mL ve 1,08 g/mL yoğunluklara sahip CuSO₄ çözeltileri hazırlanarak jelin bu çözeltiler içerisinde konumu değerlendirilmiştir.



Şekil 15. Farklı yoğunluklardaki CuSO_4 çözeltileri kullanılarak jel yoğununun belirlenmesi

Şekil 15’ de verildiği üzere jel 1,04 g/mL, 1,05 g/mL ve 1,06 g/mL yoğunluğundaki CuSO_4 çözeltilerinde dipte kalırken, 1,07 g/mL ve 1,08 g/mL yoğunluğuna sahip CuSO_4 çözeltisinde yüzer konumda olduğu gözlenmiştir. Buna göre jelin yoğunluğunun 1,06 g/mL - 1,07 g/mL değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 16. Jellerin kan numunesindeki ayırma etkinliğinin değerlendirilmesi. Santrifüjleme öncesi: Geliştirilen jel (A), Ticari jel (B); Santrifüjlendikten sonra: Geliştirilen jel (C), Ticari jel (D).

Ticari olarak alınan jel 1,04 - 1,05 g/mL, tez kapsamında geliştirilen jel ise 1,06 – 1,07 g/mL yoğunluğa sahiptir. Bu nedenle ticari olarak alınan jelin plateletleri izole etme kabiliyeti yoğunluğu nedeniyle tez çalışması kapsamında geliştirilen jelden daha kötüdür. Ticari jel plateletlerin alt popülasyonundaki düşük yoğunluklu ($1.040 < d < 1.065$ g / ml) hücrelerin bir kısmını alabilmekte, ara yoğunluk ($1.065 < d < 1.070$ g / ml) ve yüksek yoğunluklu ($1.070 < d < 1.080$ g / ml)’lu plateletleri izole edememektedir. Çalışmada

geliştirilen jel ise düşük ve ara yoğunluklu platelet hücrelerini izole edebilmektedir. Yüksek yoğunluklu platelet hücrelerinin yoğunluğu KKH'lere yaklaştığından dolayı izole edilmesi çok zor olmaktadır.

Geliştirilen jel ve ticari jelin kan ile etkileşimini değerlendirmek amacıyla ilk olarak ependorf içerisinde incelenmiştir. Bu doğrultuda 300 µl jel üzerine 1 mL tam kan konularak 800 g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Şekil 16' de bulunan görüntüler incelendiğinde ilk aşamada iki jel yapısının da kan ile karışmadığı gözlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra ticari jelde herhangi bir renk değişimi gözlenmemiş, kırmızı kan hücreleri dibe toplanmış, plazma ise jel üzerinde kalmıştır. Jelin üzerinde platelet ve beyaz kan hücrelerini barındıran beyaz bulutsu bir tabaka gözlenmiştir. Aynı şekilde geliştirdiğimiz jelin kullanıldığı ependorfta da başarılı bir ayırım gözlenmiştir. Ancak santrifüj sırasında kırmızı kan hücreleri jelin içerisinde geçerken santrifüj bitiminde jel içerisinde sıkıştığından dolayı jel yapısında az miktarda kırmızı kan hücreleri gözlenmiştir. Diğer yandan izole edilecek bulutsu yapı belirgin haldedir.

4.4.2. Tikotropik Jel için Karakterizasyon Testleri

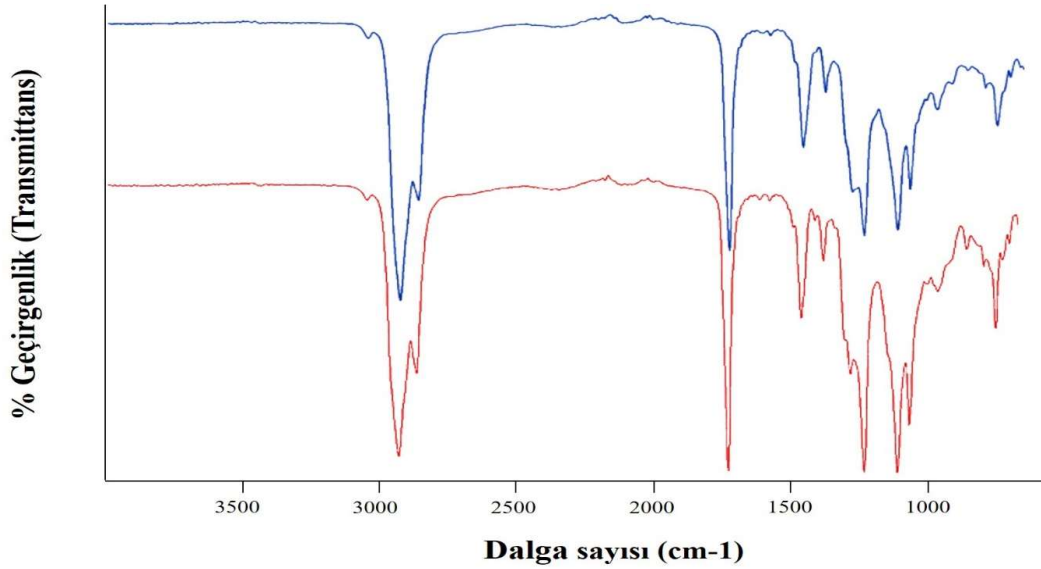
Tez çalışması kapsamında geliştirilen ve ticari jelin kimyasal bileşiminin daha detaylı bir şekilde belirlenebilmesi ve ticari jel ile karşılaştırılması için FTIR analizi yapılmış, reolojik özellikleri incelenerek etkinlikleri değerlendirilmiştir.

4.4.2.1. FT-IR Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında ticari olarak temin edilen ve geliştirilen jellerde bulunan organik grupları tanımlamak ve jellerin kimyasal yapılarını karşılaştırmak için FTIR spektrumları incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Buna göre ticari jel ile geliştirilen jel arasında kimyasal açıdan bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Jellere ait FTIR spektrumunu incelendiğinde 2940 cm⁻¹ civarında gözlenen pikin organik jel geliştirilmesinde kullanılan Escorez 5300, TOTM ve propilen glikol bileşenlerinde ortak olan alifatik C-H gerilmesi olduğu tespit edilmiştir [84].

1465 cm^{-1} 'de TOTM'un göstergesi olan CH_3 asimetrik titreşimi olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde yine TOTM'dan gelen $-\text{CH}_3$ grubunun simetrik açısıl deformasyonuna ait 1390-1370 cm^{-1} absorpsiyon bölgesinde bir pik gözlenmiştir [85]. TOTM varlığının belirteci olan doymuş alifatik esterler, 1750-1725 cm^{-1} bölgesinde $\text{C} = \text{O}$ bağlanma gerilmesi ile ilişkili bir bant, 1275-1185 cm^{-1} 'de C-O-C bağlama gerilmesine bağlı olan oksijen ve karbon ile 1160-1050 cm^{-1} 'de oksijen ve diğer karbon arasındaki gerilmeyi gösteren güçlü bantlar gözlemlenmektedir. Bu piklerin jel yapılarında görülmesi elde edilen jelde TOTM içeriğini doğrular niteliktedir [86,87]. 700 ve 750 cm^{-1} civarında ise Escorez 5300 polimerinden gelen aromatik halkalarda $\text{C} - \text{C}$ bükülme titreşimleri nedeniyle oluşan pikler gözlenmiştir [70]. Propilen glikol'ün yapısında bulunan karboksilik asit grubunun 1730 cm^{-1} 'deki pikin gösterdiği $\text{C} = \text{O}$ bağı, olduğu görülmüştür [88].

Aerosil R972 ve Aerosil A200 polimerlerinin yapısında bulunan silika oksidin Si-O-Si bağlarının asimetrik germe titreşimlerini gösteren FTIR spektrumu, 1100 cm^{-1} 'de belirgin bir pik halinde gözlenmektedir [89]. 820 cm^{-1} 'de ise düşük bir tepe noktasının oluşması Si-O-Si bağlarının simetrik deformasyonuna bağlıdır. Bunlar Si-O-Si ağ titreşimleri için tipik emilim bantlarıdır [90].



Şekil 17. Jellere ait FTIR spektrumun karşılaştırması grafiği: Geliştirilen jel kırmızı çizgi ile ticari jel mavi çizgi ile gösterilmiştir.

Şekil 17’de verilen FTIR sonuçları değerlendirildiğinde 3000-2850 cm^{-1} aralığında iki jelde de aynı şiddete sahip pikler gözlenmiştir. Ester ve karboksilik asit yapılarının varlığından kaynaklanan 1750-1725 cm^{-1} bölgesinde C = O bağlanma gerilmesi ve 1275-1185 cm^{-1} arasında gözlenen C-O-C bağlama gerilmesi incelendiğinde geliştirilen jelde ticari jele göre daha yüksek şiddetli bir pik oluşturduğu gözlenmiştir. Ester yapıları ve karboksilik asitler hidrojen atomlarına bağlanarak hidrojen bağlarını oluştururlar [91]. Geliştirilen jelde bu piklerin daha yüksek şiddette olması jel yapısında daha fazla hidrojen bağ oluştuğunu ve dolayısıyla jel yapısının çapraz bağlanma miktarının daha yüksek olduğunu işaret etmektedir [92]. Jel yapısında bulunan lineer alkil zincirleri arasındaki güçlü van der Waals etkileşimi ile fiziksel çapraz bağlanma yoluyla üç boyutlu ağlar oluşturmak için kurulan zayıf van der Waals etkileşimleri de bulunmaktadır. Kayma gerilmesi uygulandığında yapıdaki fiziksel çapraz bağlar (zayıf van der Waals etkileşimleri) bozulur, ancak güçlü van der Waals ve hidrojen bağlanma etkileşimleri korunmaktadır. Sonuç olarak, ağ yapısı bozularak jel sıvı hale dönüşür. Gerilmenin kaldırılması ile yapıdaki kimyasal bağlar jelin eski formuna dönmesine ve üç boyutlu ağ yapısının yeniden oluşturulmasına olanak sağlamaktadır [93]. Jel içeriğindeki çapraz bağ miktarının yüksek olması kayma geriliminin uygulanması ile jelin sıvılaşma miktarının düşmesine neden olacağı için çapraz bağlanma miktarının artması jelin tiksotropik özelliğini azalmaktadır [94].

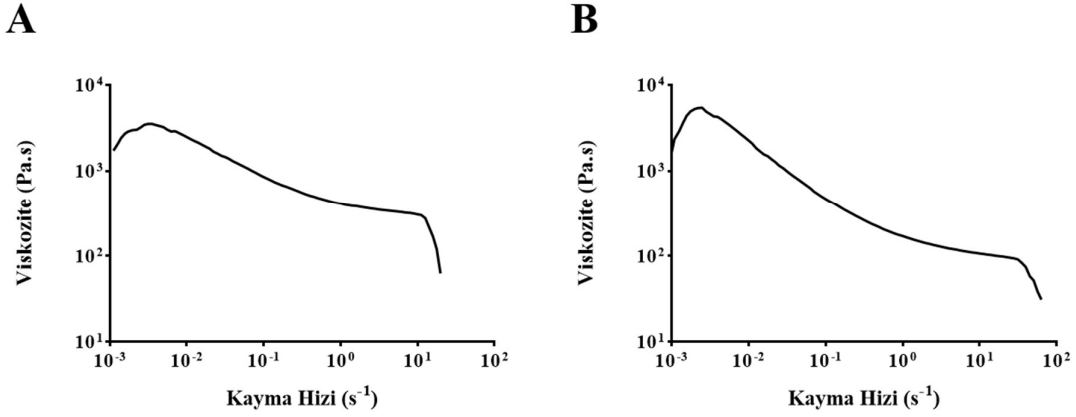
4.4.2.2. Reoloji Karakterizasyonu

Geliştirilen ayırma jelinin ve ticari jelin reolojik davranışı incelemek amacıyla dinamik ve sabit koşullarda görünür vistozite tayini, frekans tarama çalışması ve üç kademeli kayma hızı analizi gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda elde edilen verilerden yararlanılarak reolojinin temel parametreleri olan viskozite (η), depolama modülü (G'), kayıp modül (G'') ve kayıp tanjant ($\tan \delta$) değerleri hesaplanmıştır.

Tiksotropi, jellerin belirli bir mekanik strese maruz kaldıklarında viskozitelerinde kademeli bir azalmaya yol açan, ardından daha fazla veya daha az uzun bir dinlenme süresinden sonra reolojik özelliklerinin geri kazanılmasına dayanan bazı psödoplastik malzemelerin bir özelliğidir. Stres koşulları altında, bir sıvı tabakası bitişik tabaka üzerine kayar ve bu da laminer akışın oluşmasına neden olur. Dolayısıyla malzeme, jel

durumundan sıvı duruma dönüşür ve jel-sol izotermal dönüşümün tersinir bir işlemini temsil eder. Malzemenin bu özelliği zamana bağlıdır [95].

Geliştirilen ve ticari jele uygulanan 'kararlı durum akış testi' ile 10^{-3} - 100 s^{-1} aralığındaki kayma hızlarında jellerin viskozitesi belirlenmiştir. Newton kanununa uygun olmayan bir akışkanlarda, viskozite uygulanan kayma hızına bağlıdır. Şekil 18' de verilen grafiğe göre viskozite, düşük kesme hızlarında son derece yüksek (10^3 - 10^4 Pa.s), artan kesme hızıyla sürekli olarak azaldığı açıkça görülmüştür. Bu davranış, newton yasalarına uygun olmayan sahte plastik bir karakter sergileyen fiziksel bir jelin karakteristik özelliğidir ve jelin tiksotropik olduğunu göstermektedir [96]. Kayma hızı arttıkça, zayıf ilişkili üç boyutlu ağ yapısı bozulur. Bununla birlikte, kayma hızının kaldırılması ile bağlar yeniden oluşturulur ve ağ yapısı yeniden kurulur. Böylece jelin elastik karakterini geri kazanır [65,97].



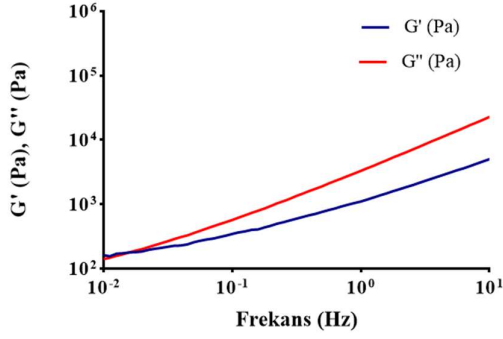
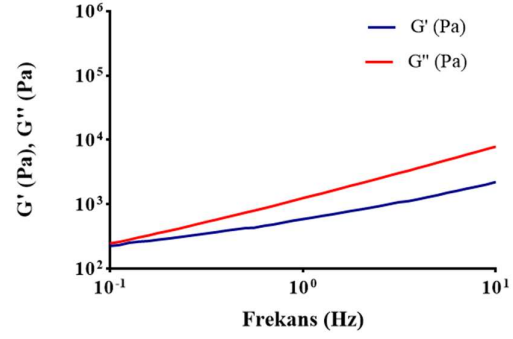
Şekil 18. Jellerin viskozite reolojik analizi: Geliştirilen jel (A); Ticari Jel (B).

Jel ağ yapısının viskoelastik özelliklerini araştırmak ve elastik (G') ve viskozun (G'') modül değerlerinin frekans bağımlılığını belirlemek için jel örneklerin sabit gerinim altında farklı frekans değerlerinde tarama testleri yapılmıştır. Çalışmada frekans değeri 100 Hz' kadar çıkartılmış, bu değer uygulanan santrifüj parametrelerine göre belirlenmiştir. Bu sayede santrifüjleme işlemi sırasında uygulanan merkezkaç kuvvetinin jel davranışı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Uygulanan bu test, jellerin olağandışı akış

davranışı hakkında bilgi sağlar. Malzeme fonksiyon eğrilerinin şekli, malzemenin yapısal özelliklerini ortaya koymaktadır.

Viskoelastik özellik gösteren jel malzemeler için toplam stres, bir faz içi bileşene ve bir faz dışı bileşene dönüştürülebilir; bunların uygulanan tür ile bölünmesi, sırasıyla, örneğin katı benzeri (elastik) yanıtı karakterize eden "depolama modülü" ve sıvı benzeri yanıtı karakterize eden "kayıp modülü" nı verir. Bununla birlikte, kayma geriliminin kullanılması daha yaygındır ve modüller daha sonra G' (depolama modülü) ve G'' (kayıp modülü) ile gösterilir [98]. Kayma depolama modülü (G'), depolanan enerjiyi ölçerek elastik davranışı temsil ederken, kayma kaybı modülü (G''), viskoz davranışı temsil eden ısı olarak yayılan enerjiyi ölçer. G'' değeri ile karşılaştırıldığında yüksek bir G' değeri güçlü moleküller arası etkileşimleri temsil eder ve üç boyutlu ağda meydana gelen gevşek jel yapılarının göreceli mukavemeti nedeniyle moleküller arası kaymaya direnme yeteneğinden kaynaklanır [97].

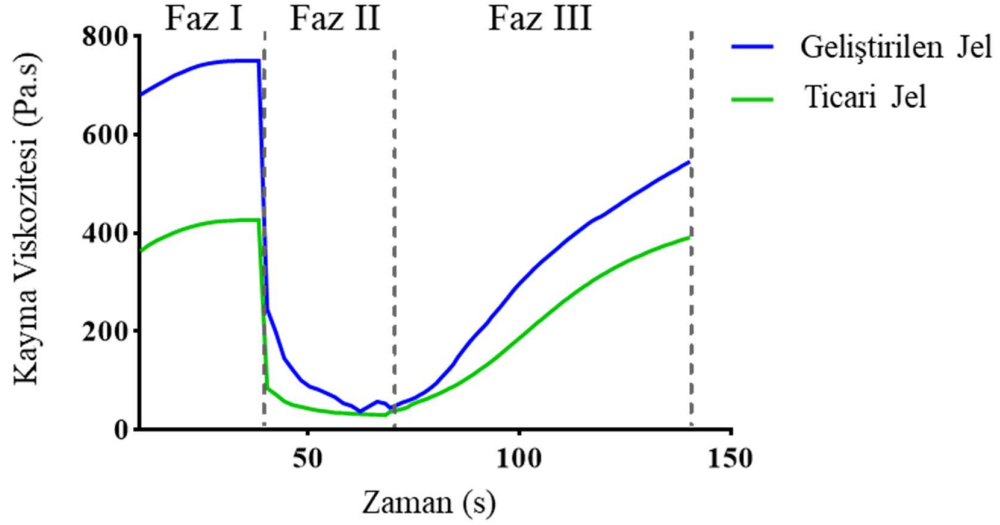
Salınımlı açısal frekansın bir fonksiyonu olarak ölçülen G' , G'' ve $\tan \delta$ değerlerinin elde edildiği grafiğe göre, jellerin davranışları incelendiğinde benzer bir eğri oluşumu gözlenmiştir (Şekil 19). Test edilen iki jel içinde, G' değeri düşük frekanslar için G'' değerinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, jelin ilk koşullarda elastik katı bir davranışa sahip olduğunu gösterir. G' ve G'' değerleri salınım frekansının bir fonksiyonu olarak sürekli artar, bu nedenle modüller arasında bir çapraz geçiş gözlemek mümkündür. Çaprazlama sonucunda G'' değeri G' değerinden daha büyük bir değer almıştır. Bu durum jellerin, viskoelastik sıvı karakter sergilediğini göstermiştir [99].

A**B**

Şekil 19. Frekansın bir fonksiyonu olarak G' ve G'' ölçen salınım çalışması ile jellerin reolojik analizi: Geliştirilen jel (A); Ticari Jel (B).

Tiksotropik jellerin birçoğu kayma kuvveti etkisinde durağan haldeki yapının bozulması ya da hizalanması sonucu görülen kayma incelmeleri davranış sergiler ve ardından eski haline geri döner. Yapılan reolojik analizler jellerin çeşitli özellikleri hakkında bilgi vermesine rağmen jellere uygulanan üç kademeli kayma hızı analizi tiksotropikliğin değerlendirilmesinin en iyi yoludur.

Bu analize göre, birinci aşamada örnekler üzerine jelin durağan halinde olması için düşük bir kayma hızı uygulanır. İkinci aşamada, numunenin yapısının bozulmasına yönelik olarak yüksek bir kayma hızına maruz bırakılır. Üçüncü aşamada ise kayma hızı yeniden birinci aşamada uygulanan kayma hızına eşit bir değere düşürülür ve viskozitenin geri kazanımı, zamanın bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Numuneler arasındaki tiksotropik davranış karşılaştırmak için, başlangıç viskozitesinin %90' ını (veya tanımlanmış bir miktarını) geri kazanmak için gereken süre kullanılabilir. Dolayısıyla bu süre, tiksotropinin göreceli bir ölçüsü olarak kabul edilebilir. Jelin sahip olduğu geri kazanım süresinin daha düşük olması, numunenin uzun bir yeniden oluşturma süresine sahip bir jele göre daha az tiksotropik olduğunu göstermektedir [100].



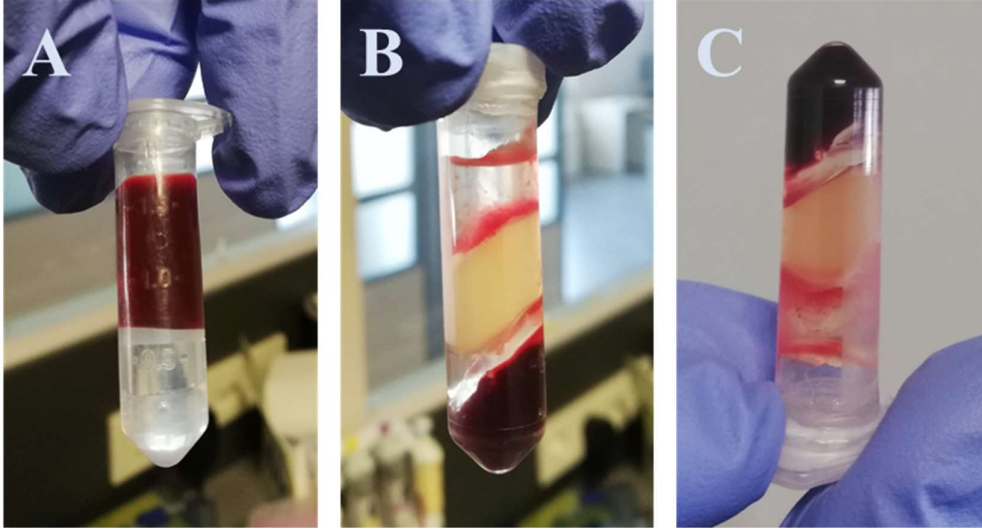
Şekil 20. Uygulanan kayma hızı altında jellerdeki kayma incelemesi ve yeniden toparlanma süresini temsil eden üç aşamalı kayma testi.

Tiksotropik davranış karşılaştırırken, malzemenin ilk andaki viskozitesinin ne kadarının geri döndüğü ve bunun ne kadar sürede tamamlandığı göz önüne alınır. Geri toparlanma süresi uzun süren malzemeler daha tiksotropik olarak tanımlanırlar. Şekil 20’ de verilen grafiğe göre iki jel de tiksotropik özellik göstermiştir. Ticari jelinin geri kazanım yüzdesi tez kapasamında geliştirilen jele göre daha fazladır. Bu sebebi, FTIR sonuçlarında da görüldüğü gibi, geliştirilen jelin çapraz bağ oranının fazla olması ve bunun da geri kazanımının daha yavaş olmasına neden olmaktadır. Bu durumda geliştirilen jel düşük g kuvvetlerinde de sıvı özellikte daha uzun kalarak, platelet hücrelerine zarar vermemek için kullanılan düşük g kuvvetinde jelin hareketi mümkün olabilecek ve plateletlerin KKH’lerinden izolasyonunu sağlayabilecektir.

4.4.2.3. Geliştirilen Düşük Yoğunluklu Hyaluronik Jelin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Tiksotropik özellik gösteren düşük yoğunluklu hyaluronik jelin amacı, yıldız tasarımındaki diskin kan numunesi yüklenen orta kısmındaki kanallardan, plazmanın akmasına engel olmak ve bu sayede platelet konsantrasyonunun düşmesini engellemektir. Bu amaç doğrultusunda düşük yoğunluklu hyaluronik jelin, kan fazlarına ayrıldığında

plazmanın üzerinde kalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda istenilen davranışı gösteren en uygun jelin %2'lik HA içeren jel olduğu görülmüştür. %2'den daha düşük jeller, bariyer özelliği gösterememiş ve %2'den daha konsantre jellerin ise yoğunluklarından dolayı kırmızı kan ve plazma içerisinde tutundukları gözlemlendiğinden bu jeller kullanılmamıştır. Tez kapsamında yapılan deney çalışmada, 300 µL %2'lik hyaluronik jel ve 300 µL platelet ayırmak için geliştirilen tiksotropik jel, 2 mL hacimdeki ependorfa konulmuş ve üzerine 1 mL kan numunesi yüklenmiştir. Ependorf yüksek hızlı mini santrifüjle 800 g'de 10 dakika çevrilmiştir. Sonuç olarak geliştirilen tiksotropik jel kırmızı kan hücrelerinin üzerinde konumlanırken, beklediğimiz gibi düşük yoğunluklu hyaluronik jel plazmanın üzerinde bariyer oluşturmuştur. Ependorf ters çevirilerek 10 dakika boyunca tutulmuş ve hyaluronik jelin dayanıklılığı kontrol edilmiştir (Şekil 21). Sonuç olarak hyaluronik jel sağlam bir bariyer görevi göstermektedir.



Şekil 21. Kanın ayrılmasında kullanılan çift jelin ependorf denemesi. (A). Jellerin ve kan numunesinin santrifüjden önce hali. (B). Jellerin ve kan numunesinin 800 g 10 dakika santrifüjden sonraki hali. (C). Jellerin ve kan numunesinin santrifüjden sonra ependorf ters şekilde 10 dakika bekletildikten sonraki hali.

4.5. Disk Tabanlı Sisteme Uygun Vakumlu ve Vakumsuz Kan Yükleme Aparatı ve Vakumlama Cihazının Geliştirilmesi

Tez çalışmasının bu kısmında, Kan numunesinin disk tabanlı sisteme zarar görmeden rahat bir şekilde aktarımının sağlanmasını amaçlanmıştır. Bu nedenle bir yükleme aparatı

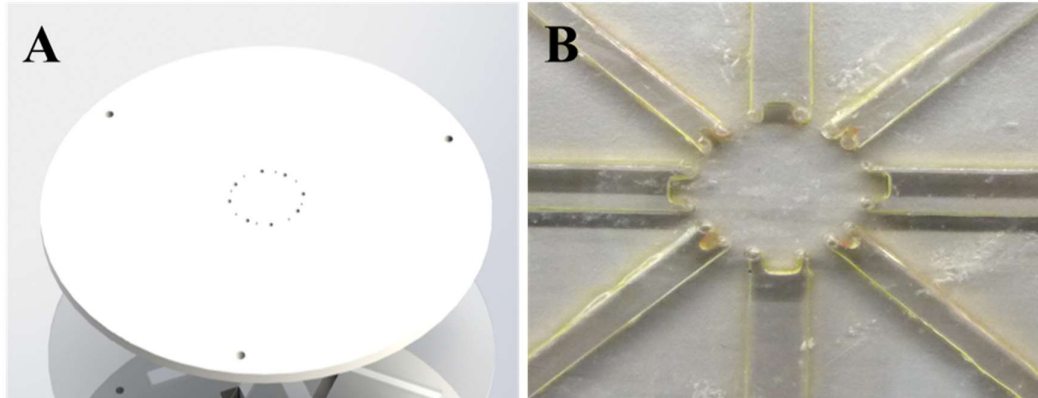
geliştirilmiştir. Bu aparat disk tabanlı sistemin kanallarına kan numunesinin uygulayıcı tarafından kolay bir şekilde aktarılmasını sağlamaktadır.

4.5.1. Kan Yükleme Aparatlarının Tasarımı ve Geliştirilmesi

Disk tabanlı sisteme uygun olarak, basit kan yükleme, 3 yollu musluk ile kan yükleme aparatı, geliştirilmiş basit kan yükleme ve vakum kapaklı tasarımlar denenmiştir.

4.5.1.1. Basit Kan Yükleme Tasarımı

Basit kan yükleme tasarımı, kan numunesinin yükleneceği kanalın üzerinde diskin merkezine en yakın olan yerine simetrik olarak diskin en üst katmanına lazer cihazıyla 1 mm çaplı ve 0,5 mm çaplı 2 adet delik açılması ile oluşturulmuştur. 1mm çaplı delik, kan numunesinin kanala 1000 ul'lik otomatik pipet veya 21G yeşil uçlu iğneli enjektör yardımıyla yüklenmesini sağlamaktadır (Şekil 22). 0,5 mm çaplı delik ise kan numunesi disk tabanlı sistemin kanalına yüklenirken kanal içerisindeki basıncı dengelemek için açılmıştır. Bu sayede kanın içeriye dolma hızının kontrolü de sağlanmaktadır. Basit kan yükleme tasarımı disk üzerinde ayrı kanallara 4.6.1 No'lu bölümde belirtilen farklı denemeler için kullanılmıştır.

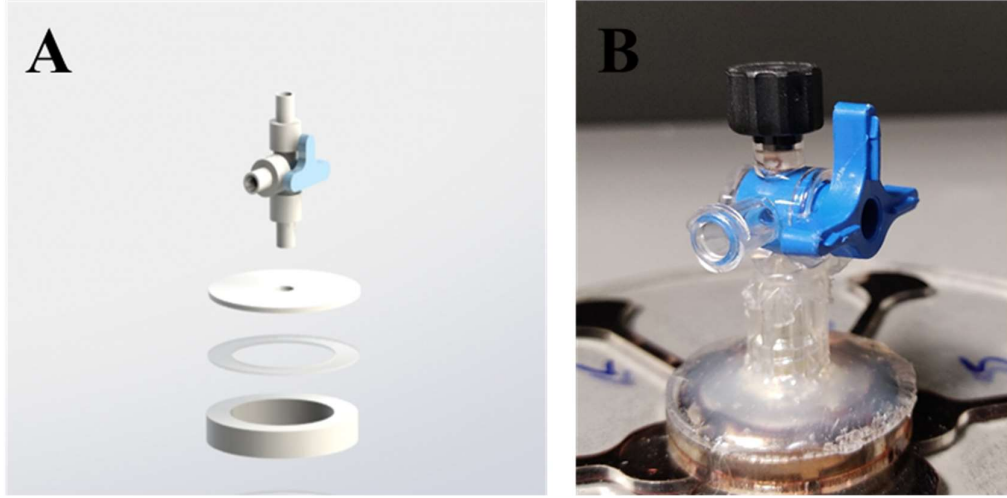


Şekil 22. Basit kan yükleme tasarımı ve görüntüsü: üç boyutlu Solidworks çizimi (A), Oluşturulan PMMA yapı (B).

4.5.1.2. 3 Yollu Musluk ile Kan Yükleme Aparatı

Kullanılan 3 yollu musluk tasarımı Şekil 23 'de verilmiştir. 3 yollu musluk tasarımında; vakum pompası hızlı şekilde diskte bir sıkıntı veya kaçak olmadan vakumlamıştır. 10

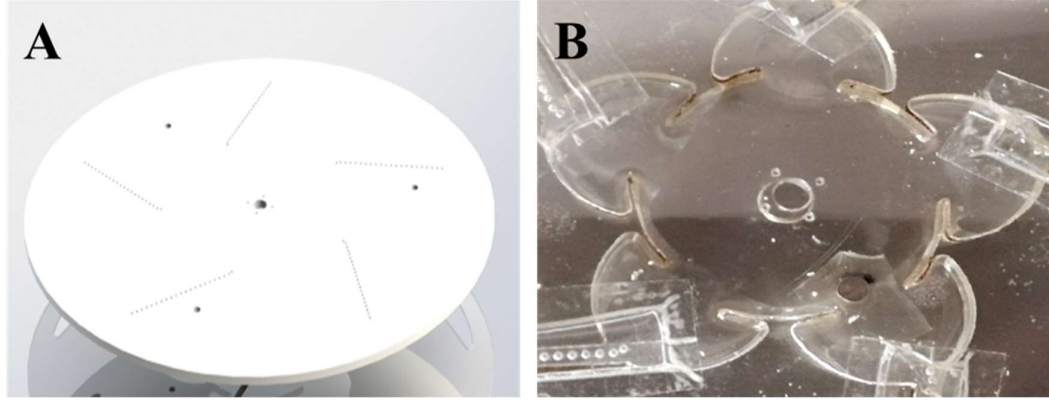
mL'lik şırınga enjektöre çekilmiş kan numunesi musluğun 2. yoluna yerleştirilmiş ve musluğun açılmasıyla hızlı bir şekilde bütün kanallara aynı anda numune yüklenmiştir. Ancak disk, santrifüj sırasında musluğun ağırlık merkezinden dolayı istenmeyen bir dengesizlik yaratmıştır.



Şekil 23. Üç yollu musluk ile kan yükleme tasarımı (A) ve görüntüsü (B).

4.5.1.3. Geliştirilmiş Basit Kan Yükleme Tasarımı

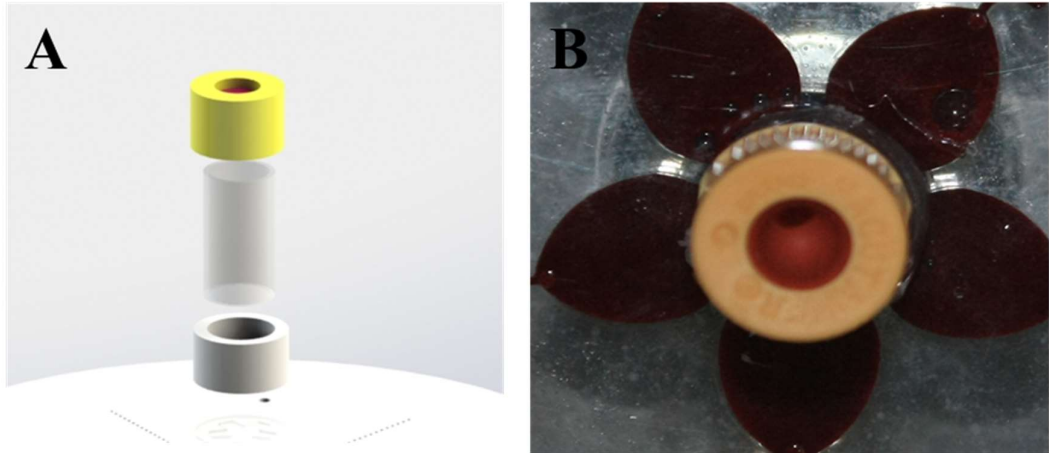
Geliştirilmiş basit kan yükleme tasarımında, diske 10 mL enjektör ile numune verilmiştir. Numunenin verilirken basınç dengeleme deliklerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Aksi halde disk tıkanıp numunenin dışarı taşma durumu söz konusu hale gelebilmektedir. Tasarımın denenmesi sırasında dikkatli şekilde kan numunesi doldurulmuş ve herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır. Ancak bu sistem açık bir sistemdir ve kan numunesine dışarıdan gelen kontaminasyonlara açık haldedir (Şekil 24). Ayrıca kan verme işlemi dikkatli bir şekilde yavaşca yapılması gerektiğinden, hem uzun sürmekte hem de deneyimsiz uygulayıcılar için zor bir işlem olmuştur.



Şekil 24. Geliştirilmiş basit kan yükleme tasarımı(A) ve görüntüsü(B).

4.5.1.4. Vakum Kapaklı Yükleme Aparatı

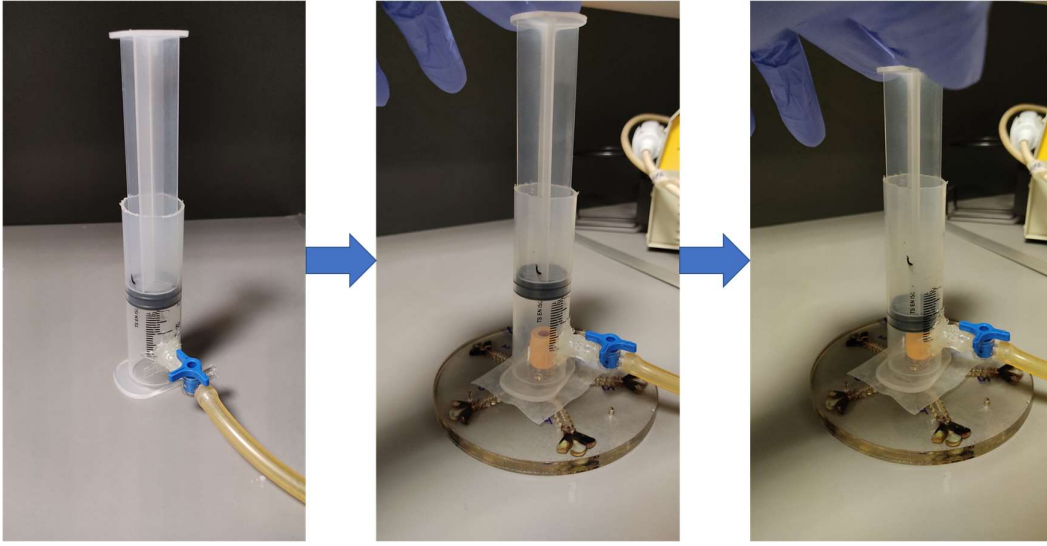
Vakum yapılan diskin tamamen kapalı ve steril olduğu düşünülmektedir. Disk sisteminde herhangi bir kaçak olmadığından emin olmak için bir disk 15 gün boyunca vakumlu olarak bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda disk'e hacmi kadar su verilmiştir ve bütün su disk'e içerisindeki vakum sayesinde yüklenebilmiştir. Sonuç olarak diskin 15 gün boyunca istenilen vakum derecesini tuttuğu gözlemlenmiş ve disk sisteminde kaçak olmadığından emin olunmuştur. Yapılan deneyde vakum kapaklı kan yükleme tasarımının santrifüj edilen disk sistemlerinde güvenli olarak kullanılabilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. Vakum kapaklı yükleme tasarımı (A) ve görüntüsü (B).

4.5.3. Vakumlama Aparatının Değerlendirilmesi

Vakum kapaklı kan yükleme tasarımında, tez kapsamında geliştirilen vakumlama cihazı kullanılmıştır. Geliştirilen vakumlama aparatı, vakum kapak tam kapatılmamışken ortası 15 mm çapında kesilmiş bir silikon tabakanın üzerine kapatılır. Vakum cihazı çalıştırılırken vakum aparatındaki piston el ile tutulmuş ve vakum pompasında 20 mbar görüldüğünde bırakılmıştır bu şekilde açık olan vakum kapak vakumdan dolayı aşağı yönde hareket eden pistonun kuvvetiyle kapanarak disk vakumlu hale gelmiştir (Şekil 26). Geliştirilen vakumlama aparatı kullanılarak oluşturulan diskler hiçbir kaçak olmadan başarılı bir şekilde vakumlamıştır.

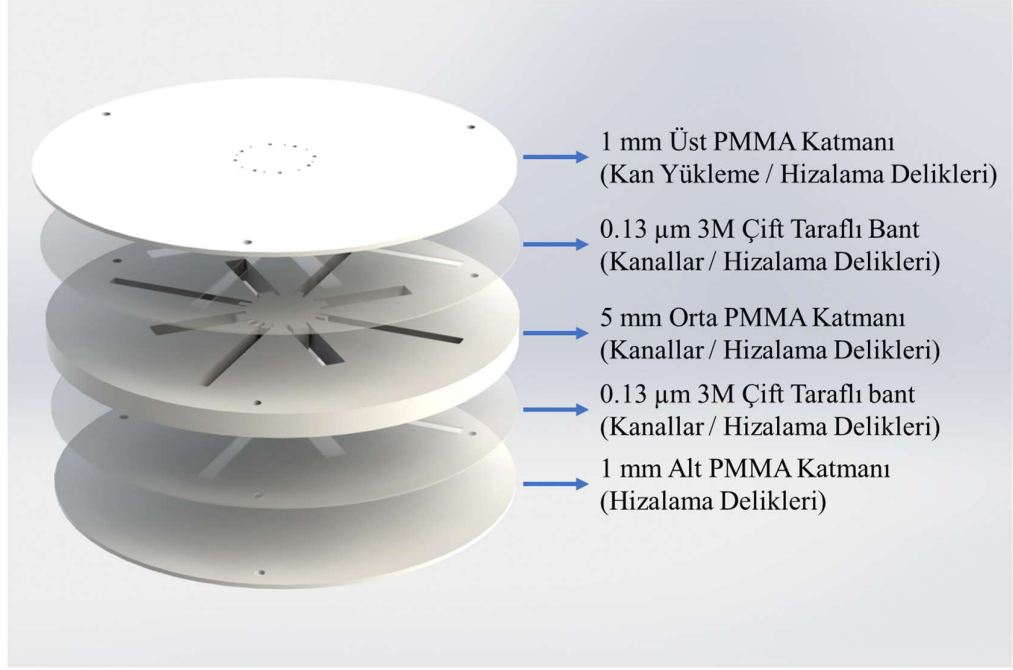


Şekil 26. Vakum kapaklı kan yükleme tasarımına uygun vakumlama aparatı.

4.6. Geliştirilen Disk Tabanlı Sistemlerin Etkinliklerinin İncelenmesi

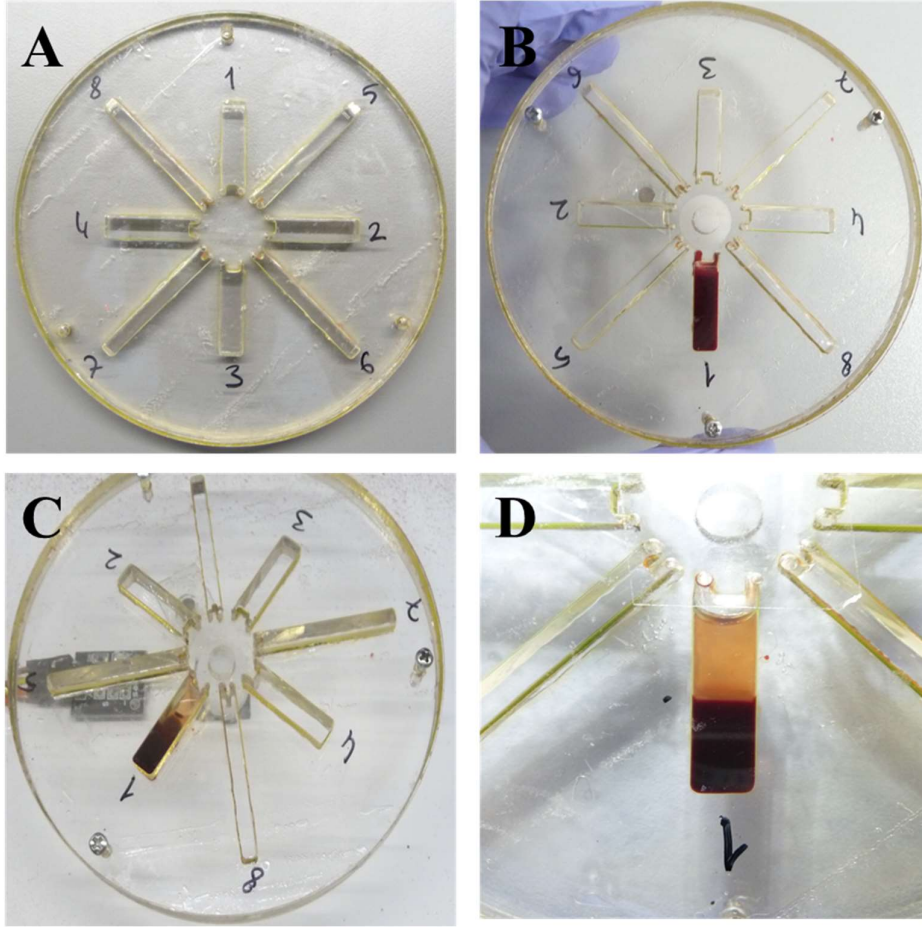
4.6.1. Düz kanal Tasarımının Değerlendirilmesi

Düz kanal tasarımına sahip geliştirilen disk, farklı kan hücrelerinin santrifüj esnasındaki hareketlerini gözlemlemek amaçlı kullanılmıştır. Şekil 27'de görüldüğü gibi disk 5 katmandan oluşmuştur.



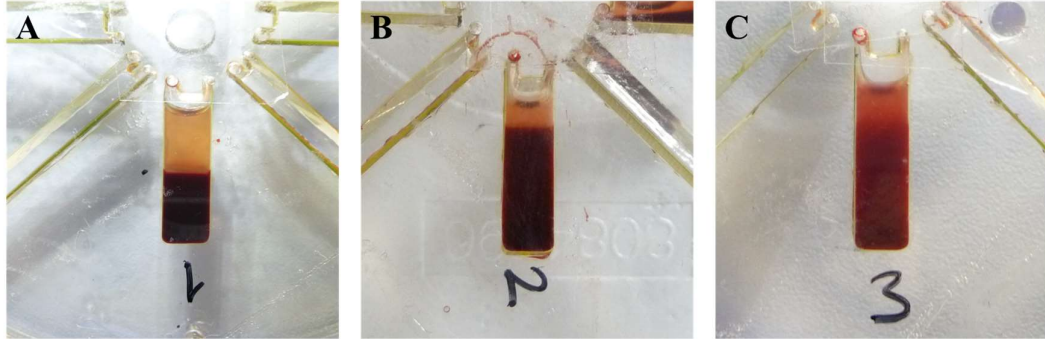
Şekil 27. Düz kanal disk tasarımının katman görüntüsü.

Diske 450 µL kan numunesi kan yükleme deliklerinden 1000 µL'lik mikro-pipet ile yüklenmiş ve 1 numaralı kanal 800 g 'de 10 dk, 2 numaralı kanal 800 g'de 7 dk, 3 numaralı kanal 800 g 'de 5 dk ve 5 numaralı kanal ise 800 g 'de 10 dk santrifüj edilmiştir.



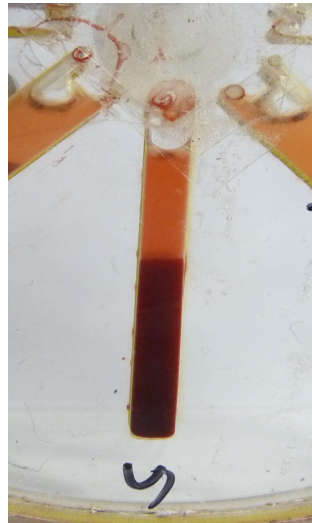
Şekil 28. Düz kanal tasarımı 1. Kanalın kan numunesi ile denenmesi. Disk'in boş durumu (A). 1. Kanala numune yüklenmiş durumu (B). Diskin santrifüj işlemi sonunda yatay halde tutulduğundaki (C) ve dik halde tutulduğunda (D) durumu.

Santrifüj işlemi sonunda şekil 28C'de görüldüğü gibi plazma ve kırmızı kan hücreleri yer çekimi kuvvetinin etkisiyle kanalın altına yayılarak plazma ile karışmaya başlamıştır. Disk hemen kaldırıldığında ise istenmeyen bu karışma engellenmiş ve kırmızı kan hücrelerinin üzerinde platelet ve beyaz kan hücrelerinin oluşturduğu beyaz bulutumsu kısım görülmüştür. Fakat geliştirilmesi düşünülen sistemde, uygulayıcının kanallardaki PZP'yi disk yatay durumda iken toplaması istenildiğinden, sisteme kan hücrelerini ayırıcı bir bariyerin eklenmesine karar verilmiştir.



Şekil 29. Kuvvet sabitken farklı dakikalarda kanalların durumu: 800 g 'de 10 dk santrifüj edilmiştir (A). 800 g'de 7 dk santrifüj edilmiştir (B). 800 g 'de 5 dk santrifüj edilmiştir (C).

Kırmızı kan hücrelerinin üzerinde görünen bulutsu tabakanın en etkin şekilde ayrılması için gerekli sürenin belirlenmesi için ise, aynı kanal tasarımına sahip kanallardaki kanlar 800 g'de farklı zamanlarda çevrilmiş ve kan hücrelerinin ayrılması izlenmiştir. Şekil 29'de de görüldüğü gibi, diskin 800 g'de 10 dakikada çevrilmesi ile istenilen ayrılma elde edilmiştir. Aynı disk üzerindeki uzun geometriye sahip kanal da, aynı hacimde kan numunesi yüklenerek 800 g 'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Buradaki amaç görülen kırmızı bulutsu beyaz tabakanın daha iyi görünebilmesi ve toplama sırasında uygulayıcının bu bölgeyi daha kolay bir şekilde alabilmesi amaçlanmıştır.

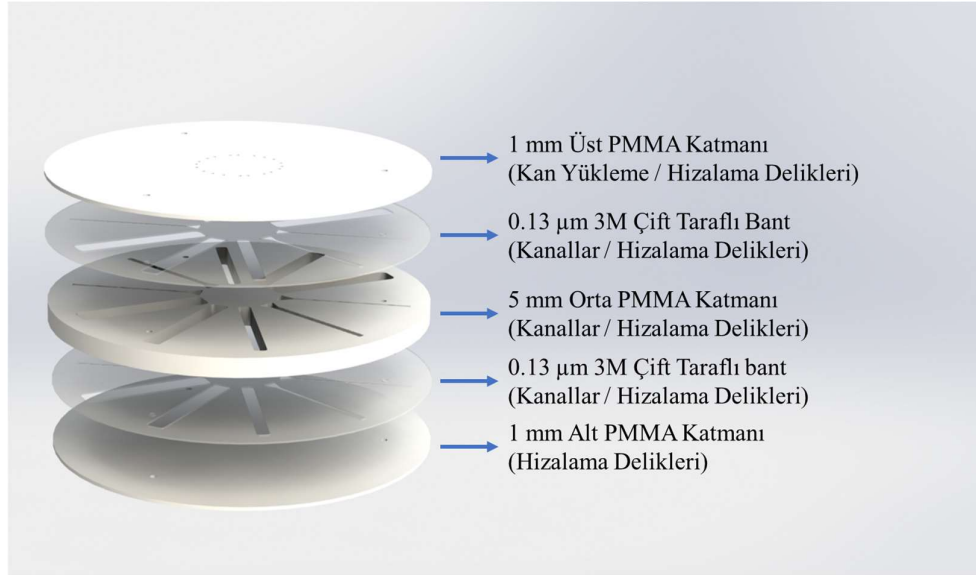


Şekil 30. Düz kanal tasarımındaki uzun kanalın 800 g 10 dk sonraki durumu.

Sonuç olarak ince kanalda bulutsu beyaz kısım tahmin edildiği gibi daha net şekilde seçilmiş (Şekil 30) ve bu sebepten disk tasarımlarında beyaz bulutsu kısmın bulunacağı bölgenin ince kanal geometrisine sahip olmasına karar verilmiştir. Ayrıca daha önceden de belirtildiği gibi kırmızı kan hücrelerine bir bariyer olmadan yatay düzlemde diskten PZP toplanamayacağından dolayı bu tasarımdan sonraki diskler için tiksotropik jel kullanılmasına da kararlaştırılmıştır.

4.6.2. Farklı Genişliklerde Düz Kanal Tasarımının Değerlendirilmesi

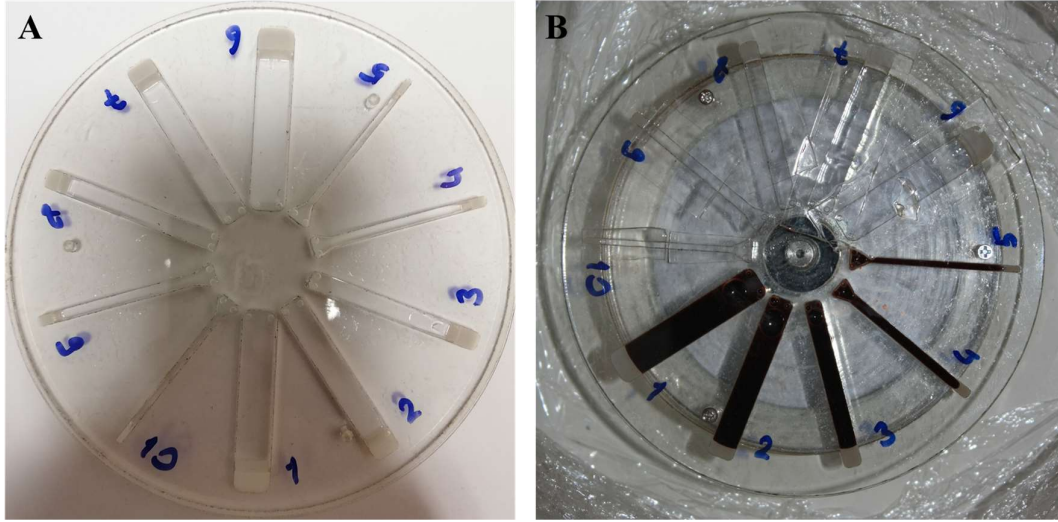
Disk sisteminde düz kanal tasarımının sonuçlarına göre tiksotropik jel yapılmıştır. Jelin farklı kanal genişliklerindeki hareketinin incelenmesi amaçlı bu tasarım çizilmiş ve jelin farklı santrifüj kuvvetlerindeki davranışı izlenmiştir. Geliştirilen disk 5 katmanlı olarak tasarlanmıştır (Şekil 31).



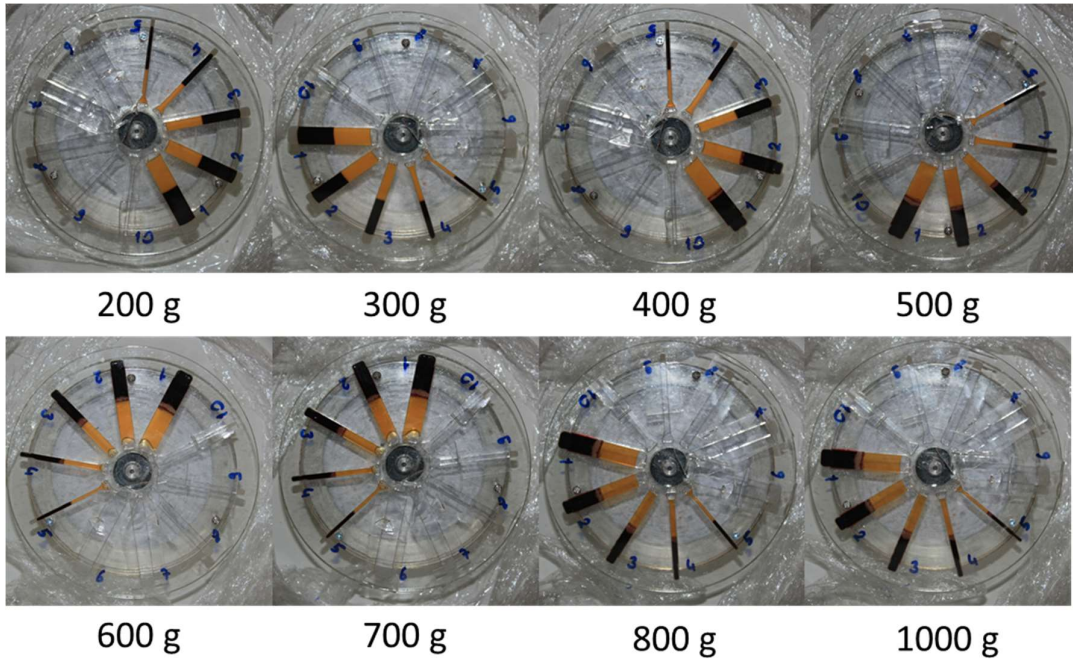
Şekil 31. Farklı Genişliklerde Düz Kanal Disk Tasarımının Katman Görüntüsü

Geliştirilen disk'te 200-300-400-500-600-700-800 ve 1000 g 10'ar dakika denenmiştir. Disk toplam 10 kanaldan oluşmaktadır. Kanallar her birinden 2'şer tane olacak şekilde sırayla 8 mm, 6 mm, 4 mm, 2 mm ve 1 mm genişliğinde kanallardan ve bu kanalların

diplerine sırasında sırayla 150 μ L, 100 μ L, 70 μ L, 20 μ L, 10 μ L tiksotropik jel içerecek şekilde hazırlanmışlardır. Kan numunesi yüklenmiş santrifüj öncesi görüntüsü (Şekil 32).



Şekil 32. Geliştirilen disk görüntüsü (A). Kan numunesi yüklenmiş santrifüj öncesi görüntüsü (B).



Şekil 33. Jellerin santrifüj işlemi sonucundaki, farklı kanal ve farklı g değerlerindeki hareketi.

Şekil 33' da verilen görüntüdeki bütün fotoğraflar 10. dakika sonucunda santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra alınmıştır. Yapılan bu deneyin sonucuna göre aşağıdaki Tablo 4 oluşturulmuştur.

Tablo 4. Farklı g ve farklı kalınlıklardaki kanalda jellerin konumu.

| G Değeri | Süre (dk) | Sonuç | Karışma |
|----------|-----------|--|---------------------------------|
| 200 | 10 | Jeller Hareket Etmedi | Var |
| 300 | 10 | Jeller Hareket Etmedi | Var |
| 400 | 10 | 1.ve 2. kanaldaki jeller hareket etti. | 1. kanalda yok. 2. kanalda var. |
| 500 | 10 | 1, 2, 3, ve 4. kanaldaki jeller hareket etti. | Yok |
| 600 | 10 | 1, 2, 3, ve 4. kanaldaki jeller bariyer oluşturdu. | Yok |
| 700 | 10 | 1, 2, 3, ve 4. kanaldaki jeller bariyer oluşturdu. | Yok |
| 800 | 10 | 1, 2, 3, ve 4. kanaldaki jeller bariyer oluşturdu. | Yok |
| 1000 | 10 | 1,2,3, 4 ve 5. kanaldaki jeller bariyer oluşturdu. | Yok |

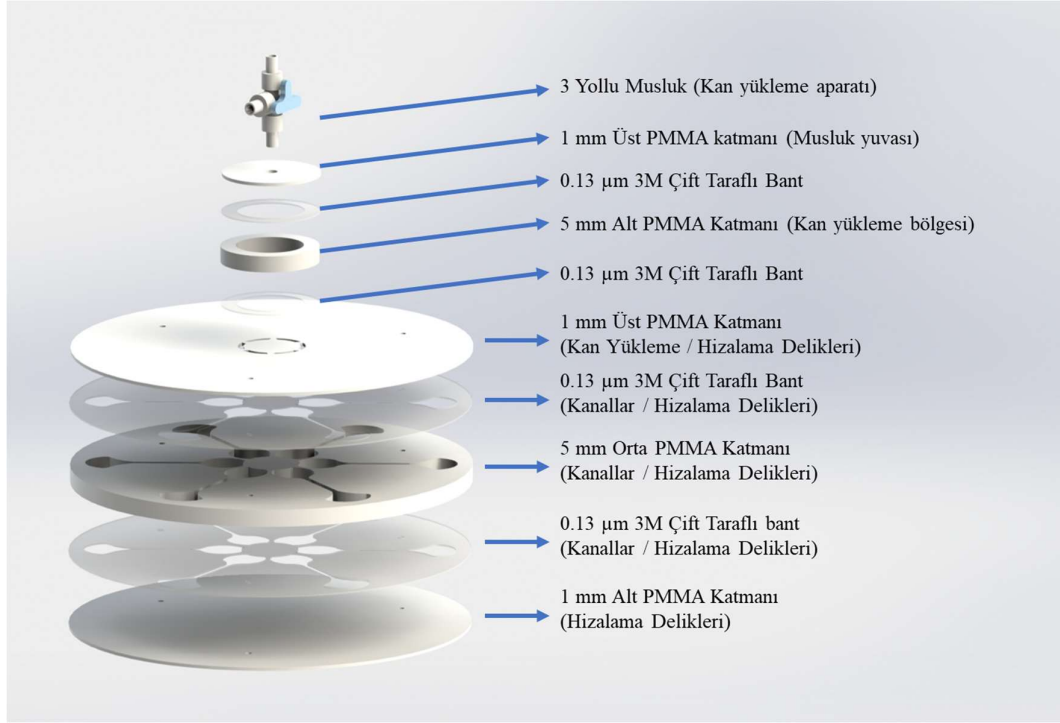
Yukarıdaki tabloya göre 200 ve 300 g'de jeller yeteri kadar kuvvet alamadığından sıvılaşamayıp hareket edememişlerdir.

Toplanması düşünülen bulutumsu tabakanın uygulayıcı tarafından kolay bir şekilde görülmesi geliştirilecek olan disk tasarımında önemli bir noktadır. Ayrıca düşük santrifüj kuvvetleri de plateletleri strese sokmamak için önemlidir. Tüm bu sebeplerden dolayı çalışmanın bu aşamasından sonra geliştirilecek disk sisteminlerinde bulunan kanal genişliğinin 2-3 mm arasında olabileceği ve uygulanacak olan santifüj kuvvetinin ise sentezlenen ayırıcı jele göre en az 500 g olabileceği belirlenmiştir.

4.6.3. Kadeh Tasarımının Değerlendirilmesi

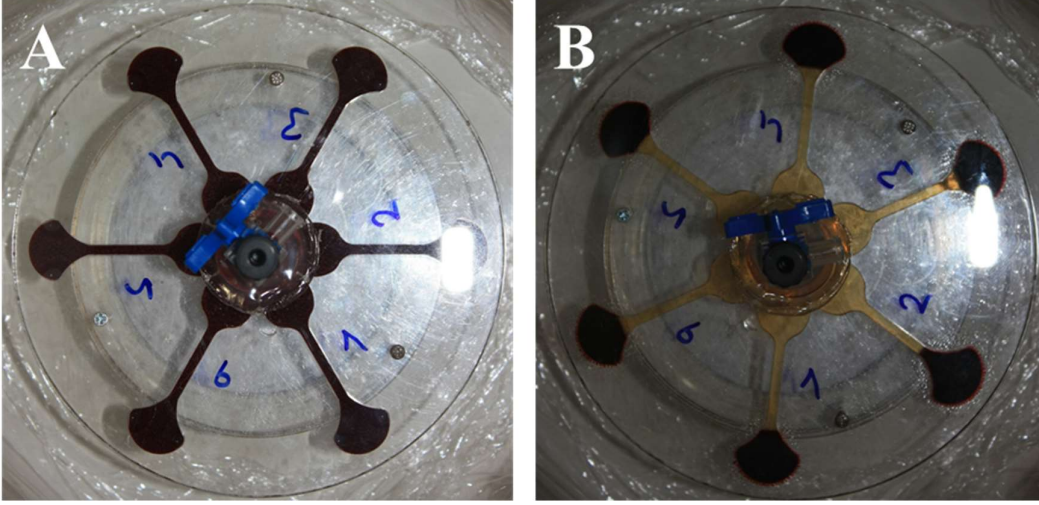
Bu tasarımda ise hem kırmızı kanın çökme süresi için gerekli zaman hem de 10 ml'lik tam kanın tüm disk sistemine tek seferde yüklenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle geliştirilmesi düşünülen bu PZP kitinin, ticari olarak satılan alternatiflerinin sahip olduğu tüm özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ticari olarak satılan PZP kitleri 8 ila 10 mL kan ile çalışmaktadır. Bu nedenle tez çalışmasında 8-10 mL kan kullanılacak şekilde disk tasarımları yapılmıştır. Bunun yanında ticari kitler yüksek g'de (1450-1500 g) santrifüj edildiğinden dolayı daha kısa sürede işlem yapmaktadır. Yapılan önceki disk denemesinde 500 g 'de jelin hareket ettiği ve bariyer özelliğinin olduğunu sonucuna varılmıştır. Fakat 500 g'de kanın ayrılma süresi uzun olduğundan ticari kitlerin yaklaşık

yarısı kadar g kuvveti olan 800 g değerindeki kuvvetin kanın ayrılma süresine yaptığı etkini gözlemlenmesi istenilmiştir. İnce kanalda jelin çıkışının zor olmasından dolayı alt kısmı geniş ve yukarıya doğru daralan kanal şeklinde hibrit tasarım yapılmıştır. Yapılan hibrit, kadeh benzeri tasarım 800 g kuvvetinde döndürülmüştür. Tasarımlarda g kuvvetinin ticari kitlere göre yarıya düşürülmesi, platelet hücrelerinin daha az strese girmesine ve bu nedenle zarar görmemesi amaçlanmaktadır. Kadeh tasarımı kan verme aparatı dahil 10 katman olarak çizilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. Kadeh Disk Tasarımının Katman Görüntüsü

Kadeh tasarımında, kırmızı kan hücreleri kanalın dibine çöktüğünde beyaz bulutumsu kısmın kadeh tasarımının 2 mm'lik ince kanal seviyesine gelmesi amaçlanmıştır. 10 mL kan numunesi enjektöre alınmış ve yine enjektör ile 3 yollu musluk ile kan numunesi diske başarıyla aktarılmıştır. Kandaki kırmızı kan hücrelerinin çökme hızının bulunması amacıyla Disk 800 g'de 21 dk çevrilmiştir (Şekil 35).

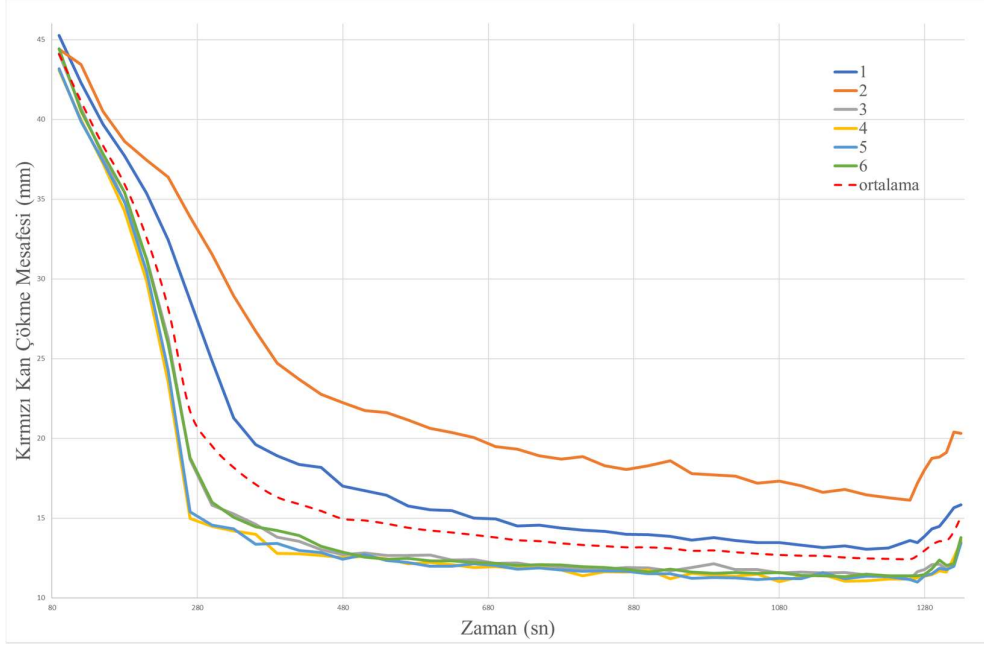


Şekil 35. Kadeh tasarımı disk'in görüntüleri: Santrifüj önceki durumu (A), 800 g'de 21 dakika çevirdikten sonraki durumu (B).

Kadeh tasarımındaki diskin, santrifüj sırasında hareketlerinin fotoğrafları çekilerek kırmızı kan hücrelerinin çökme durumu gözlemlenmiştir. Bu gözlem sonucunda ImageJ programı kullanılarak çekilen fotoğraflardaki kırmızı kan hücrelerinin kanaldaki seviyeleri ölçülmüştür. Şekil 36'de çekilen fotoğraflar her bir dakikadaki kırmızı kan hücrelerinin seviyesini göstermektedir. Image J programında piksel bazlı uzunluk verdiği için 1 pikselin boyutu 0.0486 mm olarak bulunmuş ve excel programında kırmızı kan hücrelerinin çökme zamanları hesaplanmıştır. Bu datalar kullanılarak kanın ayrılma hızı grafiği çizilmiştir (Şekil 37).



Şekil 36. Kadeh tasarımıda 1 numaralı kanalın santrifüj boyunca kırmızı kan hücrelerinin seviyesinin görüntüleri.

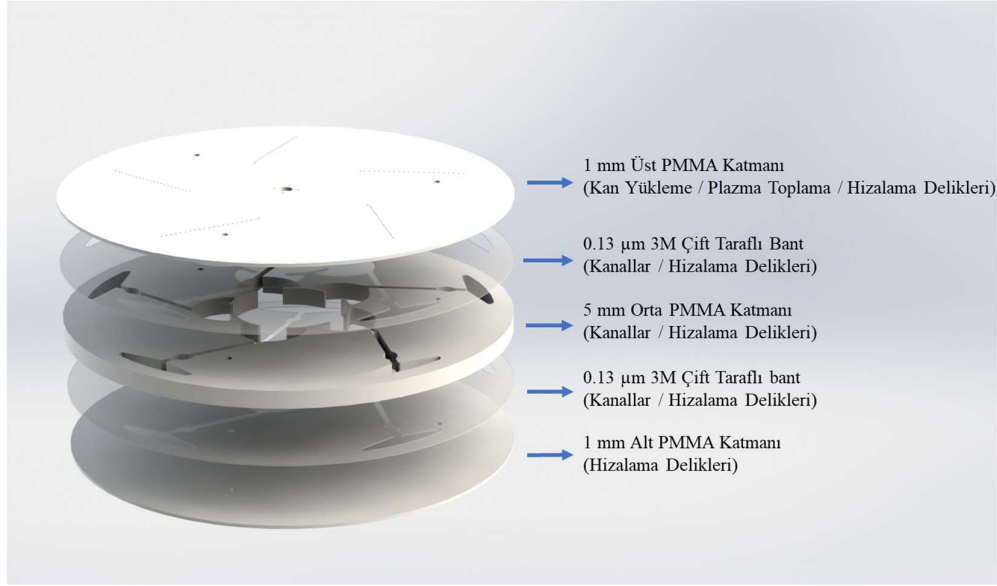


Şekil 37. Kadeh tasarımındaki 6 farklı kanaldaki kan numunesinin 800 g’de zamana bağlı kırmızı kan hücrelerinin çökme mesafesi grafiği.

Şekil 37’ te iki kanaldaki kırmızı kan hücrelerinin diğer kanallara göre daha geç çöktüğü gözlemlenmiştir. Bunun nedeni kullanılan kan verme aparatının ağırlık merkezinin farklı olması ve sabitlemek için kullanılan silikon miktarının her yerde eşit olmamasından dolayı diskin hafif yalpalayarak dönmesinden kaynaklanmaktadır. 6 kanalın ortalamasına bakılacak olursa kırmızı kan seviyesi 480.sn’de yavaşlamış ve yer değiştirmesi azalmaya devam etmiştir. 1280.sn’de ise disk yavaş yavaş durdurulmuştur. Santrifüj sırasında disk kanalları içindeki kırmızı kan hücrelerinin bir miktarı çift taraflı bant arasına girmiş ve verilerde azalmaya sebep olmuştur. Santrifüj cihazı 1280. sn’de yavaş yavaş durdurulurken kırmızı kan hücrelerine uygulanan kuvvetin azalmasıyla çift taraflı bantın arasına giren kırmızı kan hücreleri tekrar kanala dönerek hacim artışında bulunmuşlardır. Bu nedenle Şekil 35’ te 1280’den sonra kırmızı kan hücresi seviyesi artmaktadır. Sonuç olarak bu çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, kanın çökme işleminin 800 g de yaklaşık 7-8 dakikada tamamlanmış olduğu gözlemlenmiştir.

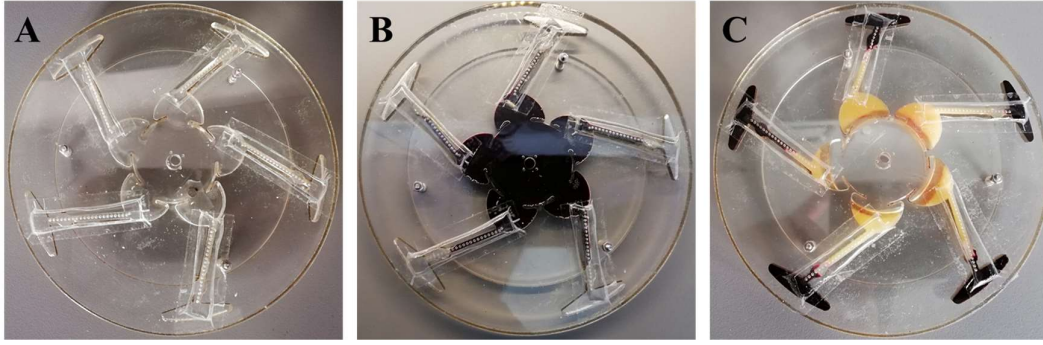
4.6.4. Yıldız Tasarımının Değerlendirilmesi

Literatürde, Kinahan ve ekibinin çalışması olan 0° , 15° , 30° , 45° ve 60° 'lik eğik kanal tasarımlarında kırmızı kan hücresinin çökme hızını gözlemlemiştir [101]. Bu çalışma doğrultusunda 45 ve 60 derece'deki eğik kanal yapısının kırmızı kan hücrelerini daha hızlı çöktürdüğü görülmüştür. Çalışmada 45 ve 60 derecedeki kırmızı kan çökme hızı neredeyse aynıdır. Yıldız tasarımında tiksotropik jel kullanılacağından ve jelin hareketinin rahat olması maksatlı kanal, 45 derecelik açı şeklinde eğik olarak 5 katman şeklinde tasarlanmıştır (Şekil 38).



Şekil 38. Yıldız Disk Tasarımının Katman Görüntüsü

Yıldız tasarımında kırmızı kan hücresinin üzerine gelecek yoğunlukta tiksotropik jel ve plazmanın üzerinde kalacak düşük yoğunluklu hyaluronik jel olmak üzere 2 farklı jel kullanılmıştır. Disk 800 g de 8 dakika dönmesi için planlanmıştır. Ancak disk döndürülürken jeller 8. dakikada yerine tam olarak yerleşmemiştir. Bu nedenle döndürme işlemi 10 dk'ye çıkarılmıştır.

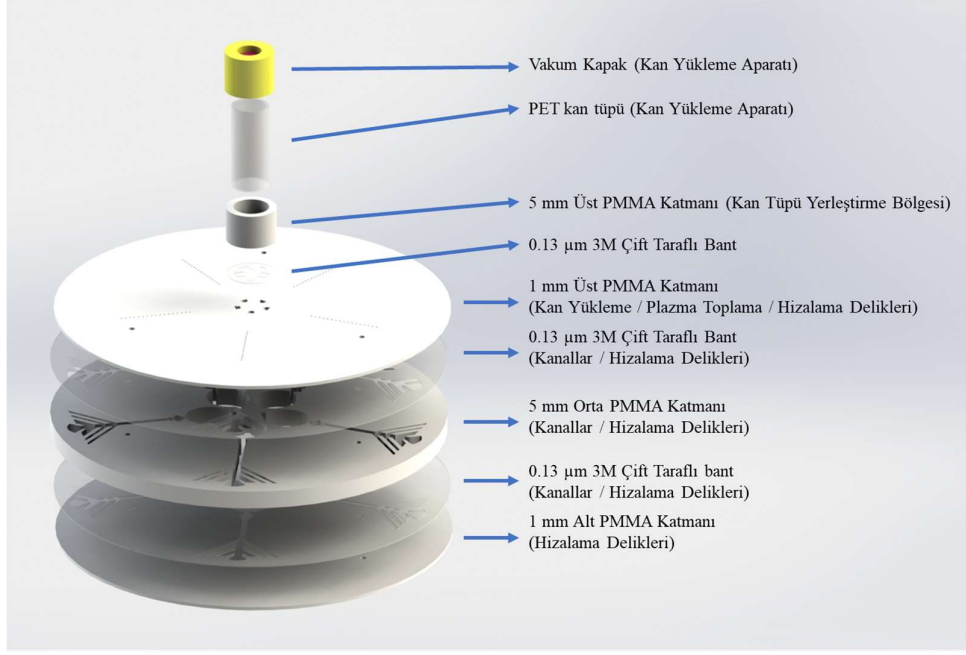


Şekil 39. Diskin kan yüklenmeden önceki durumu (A). Diskin 9 mL kan numunesi yüklenmiş durumu (B). Diskin 800 g 10 dakika santrifüj edildikten sonraki durumu (C).

Santrifüj işleminden sonra kan numunesi düzgün şekilde ayrılmış ve düşük yoğunluklu hyaluronik jel istenen şekilde çalışmıştır (Şekil 39). Ancak kırmızı kanın üzerinde bariyer oluşturacak olan ayırıcı jel kanal boyunca hareket etmemiştir. Bunun nedeni olarak jel merkezkaç kuvvetinden dolayı daha az viskoz olmuş ve merkeze dik yönde hareket etmek istemiştir. Bu nedenle jel, tasarımda jel için çizilen bölgenin üzerindeki açılı kanala yapışmış ve kırmızı kan hücrelerinin arasında bariyer oluşturamamıştır.

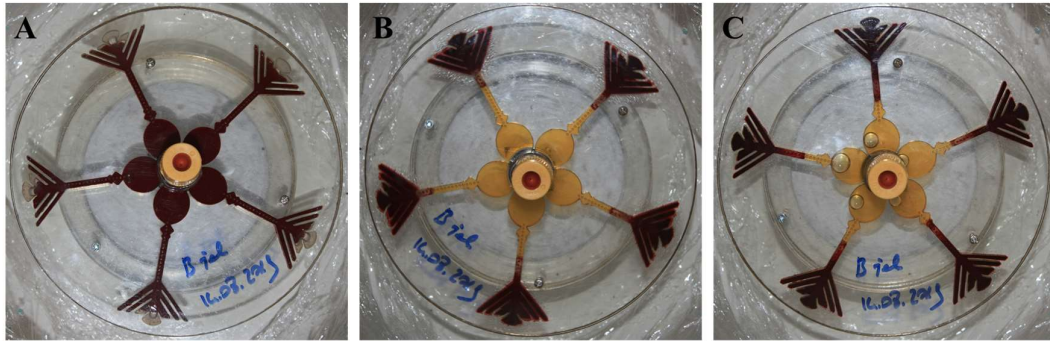
4.6.5. Kar Tanesi Tasarımının Değerlendirilmesi

Yıldız tasarımında ayırıcı jel ile ilgili oluşan problemler nedeniyle jelin düz kanalda hareketinin daha etkili olduğuna karar verilmiş ve kar tanesi tasarımında jel merkeze dik olan kanalın en altındaki bölmeye yerleştirilmiştir. Kırmızı kan hücrelerinin hızlı bir şekilde çökmesi için 45 derecelik eğik kanallar, jeli etkilemeyecek şekilde kırmızı kan hücresinin çökeceği kanalda kullanılmıştır. Ayrıca bu tasarımda vakum kapaklı kan verme aparatı da kullanılmıştır. Bu sayede kanın kanallara eşit bir şekilde yüklenmesiyle hem kullanım kolaylığı hem de kan örneğinin kontaminasyon riskini düşürmesi amaçlanmıştır. Kar tanesi tasarımı kan yükleme aparatı dahil 9 katman olacak şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca bu tasarımda ince kanal 45 derecelik açı yapmağı ve düz olarak indiğinden dolayı kanalın uzunluğu kısalmıştır. Bu nedenle ince kanalın PFP bölgesi ile birleştiği bölge, PZP hacminin ayarlanması için biraz daha geniş tasarlanmıştır (Şekil 40).



Şekil 40. Kar Tanesi Tasarımının Katman Görüntüsü.

Kar Tanesi disk tasarımında 8 mL kan numunesi 10 mL'lik 21G yeşil uçlu iğne ile vakum kapağındaki kırmızı kauçuk delinerek yüklenmiştir. Bu tasarımda tam kanın disk'e kolay ve her kanala eşit şekilde dağıldığı gözlenmiştir. Tam kanın yüklenmesinden sonra, disk 800 g' de 8 dakika santrifüj edilecek şekilde planlanmıştır. Ancak disk döndürülürken 8. dakikadan sonra da kırmızı kan hücrelerinin çöktüğü fark edilmiştir. Çökme işleminin tam olarak bitmesi için disk 10 dakika çevrilmiştir (Şekil 41).



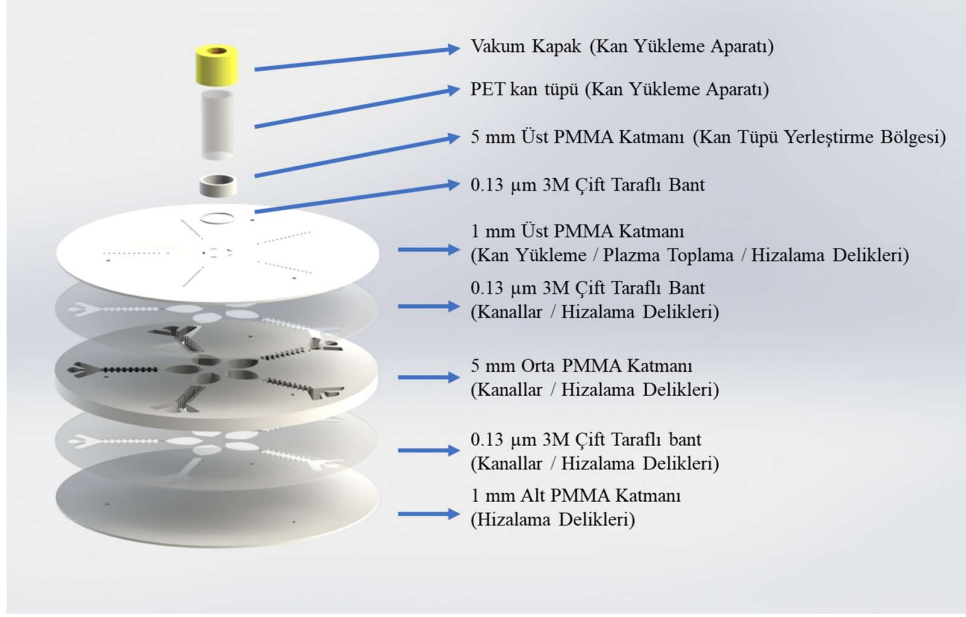
Şekil 41. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g' de 9 dakika çevrilirken durumu (santrifüj devam etmektedir.) (B) Disk 10. Dakika çevrildikten sonraki durumu (C).

Disk santrifüj edilirken 30 sn'de bir fotoğrafları çekilmiş, kırmızı kan hücrelerinin çökme hızı ve jelin durumu gözlemlenmiştir. Kırmızı kan hücreleri santrifüj sırasında eğik kanalların birbirine çok yakın olmasından kaynaklı olarak kanaldan çıkarak çift taraflı bantın arasına girmiştir. 8. dakikadan sonra kırmızı kan hücrelerinin çökmeye devam etmesi de bu nedenden kaynaklıdır. Jel istenilen bölgeye hareketini tamamlamış ve kırmızı kan hücreleri üzerinde bariyer oluşturmuştur. Ancak disk durdurulduğunda çift taraflı bant içerisine giren kırmızı kan hücreleri santrifüj kuvveti kalktığından dolayı kanala geri dönmüş ve kanal içindeki kırmızı kan hücrelerinin hacim artışı nedeniyle jeli yukarı yönde hareket ettirmiştir (Şekil 41C). Jelden plazmaya az miktarda kırmızı kan hücresi geçmesine rağmen jelin üzerindeki plazma toplama deliklerinden 1 mL'lik insülin şırıngası ile PZP ve en üstteki plazma toplama deliklerinden PFP toplanmıştır. PZP ve PFP numuneleri analiz için Düzen laboratuvarlar grubuna götürülmüştür.

4.6.6. Uçak Tasarımları

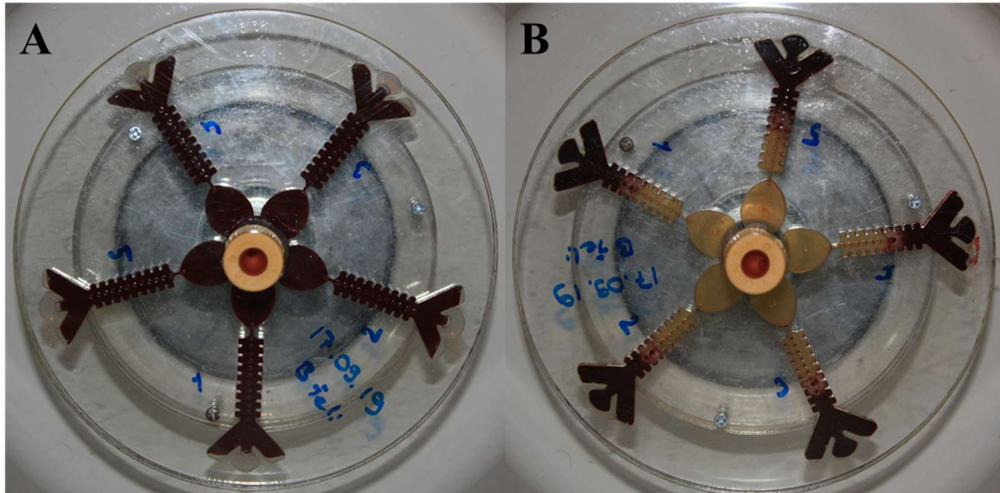
4.6.6.2. Vakum Kapaklı Kare Kanallı Uçak Tasarımının Değerlendirilmesi

Kar tanesi tasarımında oluşan çift taraflı bant arasına kan numunesinin sızması ve kırmızı kan hücrelerinin santrifüj işlemi durduğunda kanala geri dönerek jeli itirme problemlerine çözüm olarak, daha basit 45 derece eğimli kanal tasarımı ve jelin yine bantın arasına girmesi ve merkezkaç kuvvetinin azalmasıyla kanala dönen kırmızı kan hücrelerinin kanaldaki hacim artışı nedeniyle jeli ittirerek bariyer oluşumunu bozmaması için ise kare şekilde girintili çıkıntılı kanal tasarımı çizilmiştir. Bu girinti ve çıkıntılara jel oturarak alttan yukarı doğru kırmızı kan hücrelerinin itirme kuvvetine karşı direnç oluşturarak bariyer özelliğinin bozulmaması amaçlanmıştır. Ayrıca kar tanesi tasarımının platelet sonuçları incelendiğinde PZP bölgesi ve PFP bölgesinin diskin durma anında karıştığı düşünülmüştür. Bu nedenle kar tanesi tasarımında genişletilen ince kanal ve PFP bölgesine bağlanan kısım 0,2 mm'ye daraltılmıştır. Bu daraltma işleminde PZP bölgesindeki platelet hücrelerinin PFP bölgesine karışmasının engellenmesi amaçlanmıştır. Vakum kapaklı kare kanallı uçak tasarımı, vakum kapak katmanı dahil olmak üzere 9 katmandan oluşmuştur (Şekil 42).



Şekil 42. Vakum kapaklı kare kanallı uçak tasarımının katman görüntüsü.

Disk içerisine 8 mL'lik kan numunesi kar tanesi tasarımındaki yöntem ile yüklenmiştir. Disk 800 g'de 8 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sırasında 30 sn'de bir fotoğraf çekilerek KKH'lerinin ve jelin durumu gözlemlenmiştir. Fotoğraflar değerlendirildiğinde çift taraflı bant arasına kırmızı kan hücrelerinin girmesi durumu çözülmüştür. Yalnızca bir kanalın alt kısmındaki bantta KKH'si görünmüştür. Ancak santrifüj işlemi durduğunda kanala geri dönmemiştir (Şekil 43). Bu nedenle kanalın altındaki çift taraflı bant'ın yapışmasında bir problem olduğu tasarımla ilgili problem olmadığı belirlenmiştir.

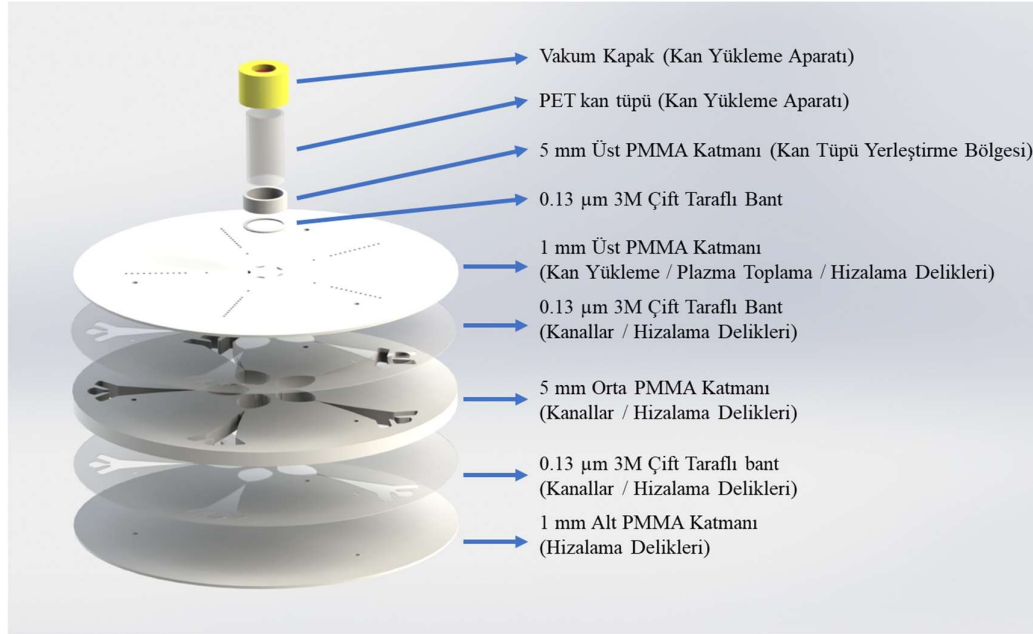


Şekil 43. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g'de 8 dakika çevrildikten sonraki durumu (B).

Diskin santrifüj işlemi bittiğinde jel, kare girinti ve çıkıntılara tutunarak hareket etmemiştir. Ayrıca jelin kenarlarından plazmaya kırmızı kan geçişi olmamıştır. Disk üzerindeki plazma deliklerinden PZP ve PFP toplanmış ve analiz için Düzen laboratuvarlar grubuna götürülerek analizi yaptırılmıştır.

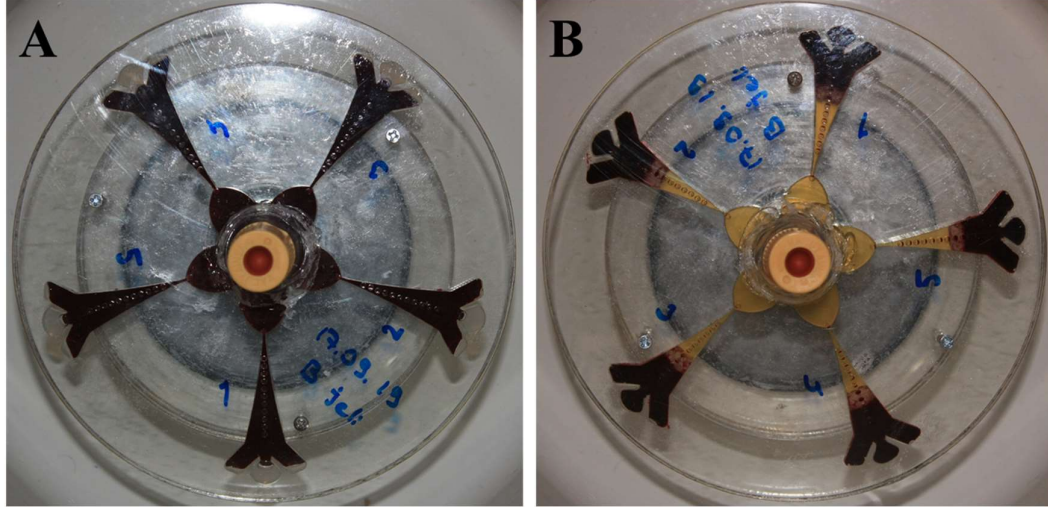
4.6.6.3. Vakum Kapaklı Daralan Kanallı Uçak Tasarımının Değerlendirilmesi

Kırmızı kanın çift taraflı banta sızma problemi uçak tasarımı ile ortadan kalktığı için bu tasarım sabitlenmiştir. Fakat kare kanallı diskin platelet analizi sonuçlarından dolayı kanal yapısında değişiklik yapılarak daralan kanal tasarımı çizilmiştir. Daralan kanal tasarımı yine 9 katmandan oluşacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 44).



Şekil 44. Vakum kapaklı daralan kanallı uçak tasarımının katman görüntüsü.

Daralan kanal yapısına sahip diske 8 ml kan numunesi kar tanesi diskinde kullanılan yöntem ile yüklenmiştir (Şekil 45A). Disk 800 g'de 8 dakika çevrilmiştir (Şekil 45B).

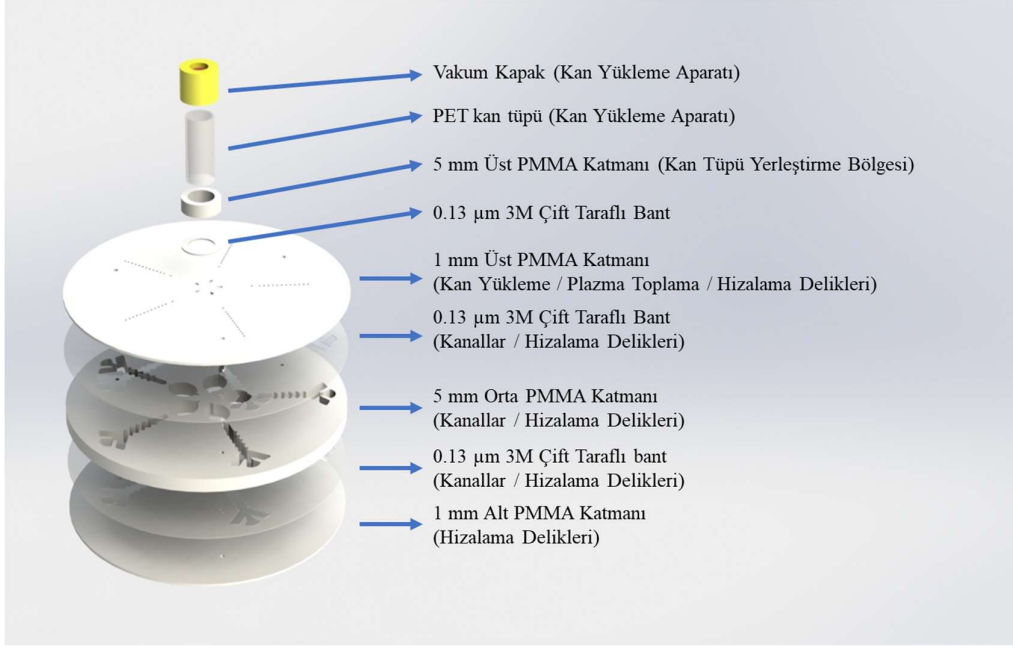


Şekil 45. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g'de 8 dakika çevrildikten sonraki durumu (B).

Diskin santrifüj işlemi sırasında 30 sn'de bir fotoğraf çekilerek jelin durumu gözlemlenmiştir. Santrifüj işlemi bittiğinde jel daralan kanal arasında sıkışarak bariyer oluşturmuştur ancak jelin kenarlarından plazmaya kırmızı kan geçişi olmaktadır. Kanal tasarımından kaynaklı olarak jel tam bariyer oluşturmamıştır. Fakat disk üzerindeki plazma deliklerinden PZP ile PFP toplanmış ve analiz için Düzen laboratuvarlar grubuna götürülerek analizi yaptırılmıştır.

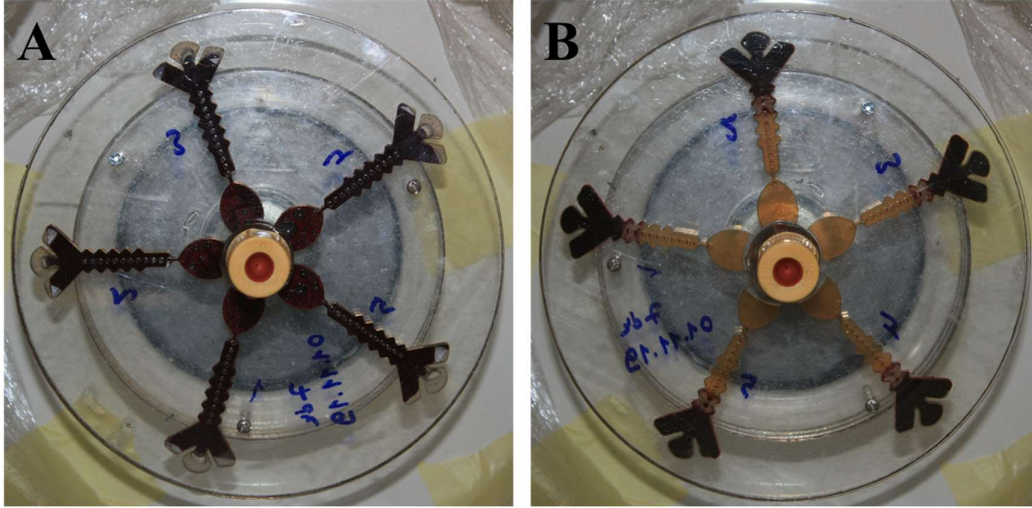
4.6.6.4. Vakum Kapaklı Z Kanallı Uçak Tasarımının Değerlendirilmesi

Vakum Kapaklı Daralan Kanallı Uçak Tasarımı diskindeki kanal tasarımından kaynaklı problem nedeniyle Z kanallı uçak tasarımı çizilmiştir. Çizilen tasarım önceki uçak tasarımları aynıdır sadece kanal yapısı değişmiştir. Tasarım yine önceki denemeler olduğu gibi 9 katmanlı olarak tasarlanmıştır (Şekil 46).



Şekil 46. Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımının katman görünümü.

Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımına 10 mL'lik enjektör yardımıyla 8 mL kan numunesi konulmuştur (Şekil 47A). Disk 800 g'de 8 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 47B).

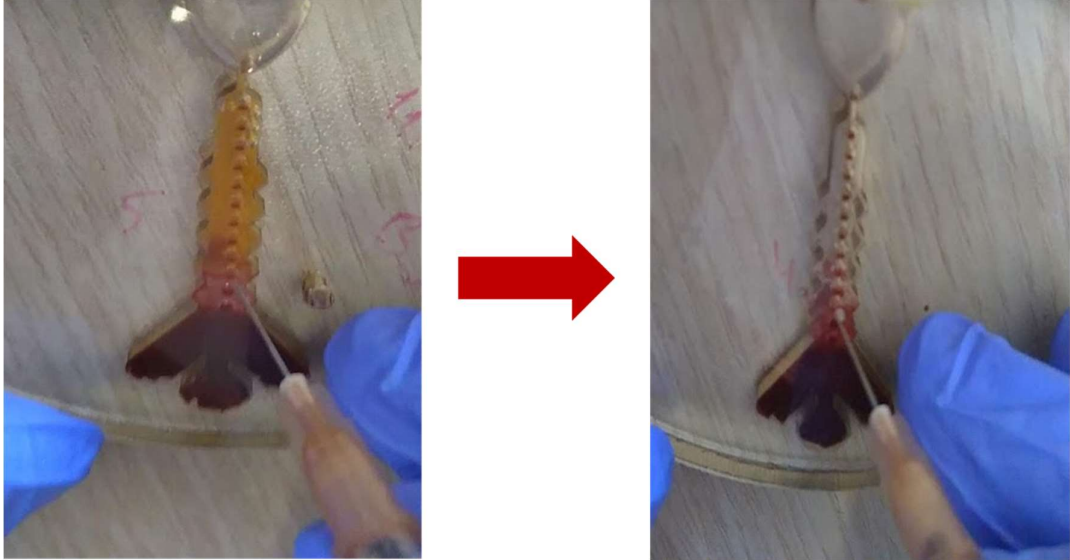


Şekil 47. Disk tasarımına kan numunesi yüklenmiş durumu (A). Disk 800 g'de 8 dakika çevrildikten sonraki durumu (B).

Santrifüj işlemi sırasında 30 sn'de bir fotoğraf çekilerek jelin hareketi gözlemlenmiştir. Santrifüj işlemi bittiğinde jel Z kanallar arasında bariyer olmuş ve kırmızı kan hücreleri plazmaya sızmamaktadır. Diskteki plazma deliklerinden PZP ve PFP toplanmış ve analize gönderilmiştir. Disk'in santrifüj sırasında veya işlem bittikten sonra herhangi bir problem ile karşılaşılmamıştır.

4.6.6.5.1. İzole Edilen PRP'nin Kanal İçinden Toplanması

Disklerin kanallarında fazlarına ayrılan kan numunesinin kırmızı kan hücrelerinin üzerine yerleşen tiksotropik jel sayesinde plazma ve kırmızı kan hücreleri birbiriyle karışmadan yatay şekilde kalmıştır. Yatay olarak duran diskin en üst plazma deliği PFP toplamak için ve kanalda jelin bulunduğu bölgenin üzerindeki plazma toplama deliği PZP toplamak için kullanılmıştır. PZP ve PFP numuneleri toplanmadan önce disk içerisindeki basıncı ayarlamak için vakum kapakta bulunan kauçuk malzemeye 21 G yeşil uçlu iğne batırılmış ve örneklerin diğer kanallarla olan bağlantısı kesilmiştir. Disklerde, kanal içerisinde karışma olmaması için önce PFP daha sonra PZP toplanmıştır (Şekil 48).



Şekil 48. PZP toplama işleminin gerçekleştirilmesi.

4.6.6.5.2. İzole Edilen PZP İçerisindeki Platelet Sayımı ve Hesaplamaları

Kar tanesi ve uçak tasarımı olan disklerden izole edilen PZP ve PFP 1 mL'lik insülin enjektörü ile ayrı olarak toplandıktan sonra 2 mL'lik ependorflara konulmuş ve Düzen Laboratuvarlar Grubu (Ankara) laboratuvarında platelet sayıları analiz edilmiştir. Analiz sonuçları aşağı verilen tablolarda gösterilmiştir. Ayrıca analiz sonuçlarına göre platelet toplama verimi, platelet konsantrasyonu ve PZP ve PFP beraber toplandığındaki toplam plazmadaki platelet toplama verimi hesaplanmıştır.

Platelet toplama verimi için,

$$E_{(Platelet)PZP} = \frac{Pt_{PZP}}{Pt_{Tam Kan}} \times 100 \quad (2)$$

Formül 2 kullanılmıştır. Formül için gerekli olan Pt_{PZP} ve $Pt_{Tam Kan}$ değerleri aşağıdaki *Formül 3* ve *Formül 4* ile bulunmuştur.

$$Pt_{PZP} = N_{(Pt)PZP} \times V_{PZP} \quad (3)$$

$$Pt_{Tam Kan} = N_{(Pt)Tam Kan} \times V_{Tam Kan} \quad (4)$$

Platelet konsantrasyonunun hesaplanması için,

$$F_{(Konsantrasyon)} = \frac{N_{(Pt)PZP}}{N_{(Pt)Tam Kan}} \quad (5)$$

Formül 5 kullanılmıştır [80]. Excel programında veriler hesaplanarak aşağıdaki tablolardaki Platelet değerleri ile birlikte hesaplanmıştır.

Kar tanesi disk tasarımında, yaklaşık 1,5 kat PZP toplanmıştır. Diskin denemesi sırasında çift taraflı bant ile PMMA tabaka arasına giren kırmızı kan hücrelerinin santrifüj durdurduğunda tekrardan kanala dönüp kanaldaki hacmi arttırması ve jeli yukarı yönde

ittirmesi nedeniyle plazma karışmıştır. Bu karışma nedeniyle de kanaldan toplanan PZP ve üst hazneden toplanan PFP konsantrasyonları ve toplama verimi benzerdir (Tablo 7). Ayrıca KKH'ler PZP'de 4,15 M/mm³'ten 0,1 M/mm³ 'e düşürülmüştür. Beyaz kan hücreleri ise 5,09 K/mm³ 'ten 3,7 K/mm³ 'e düşürülmüştür. Literatüre göre PZP içeriğinde beyaz kan hücrelerinin oranının çok ya da az olmasının yara iyileşmesinin durumu hakkında kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda beyaz kan hücresi olan ve olmayan PZP'ler yara iyileşmesi üzerinde denenmiş ve benzer sonuç alınmıştır. Yalnızca beyaz kan hücresi olan PZP'de kullanılan bölgede daha erken sürede ve fazla miktarda inflamasyon görülmüştür. Bu nedenle hastanın daha çok acı çektiği ortaya çıkmıştır [102,103]. Bu bilgilerden yola çıkarak tez kapsamında geliştirilen PZP'nin hastaların acı çekmesini azaltmak için içerisinde beyaz kan hücresi miktarının az tutulması amaçlanmıştır.

Tablo 5. Kar tanesi tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları.

| Örnekler | PLATELET (K/mm ³) | PZP-PFP Hacmi (mL) | Tam Kan Hacmi (mL) | Platelet Toplama Verimi (%) | Zenginleştirme Faktörü | Toplam Plazmada Platelet Toplama Verimi (%) |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| TAM KAN | 56 | | | | | |
| PLAZMA (PFP) | 71 | 2,7 | 9 | 38,03571429 | 1,267857143 | 72,61904762 |
| PLAZMA (PZP) | 83 | 2,1 | 9 | 34,58333333 | 1,482142857 | |

Vakum Kapaklı Kare Kanallı Uçak Tasarımında, platelet konsantrasyonu 1,33 kat olarak hesaplanmıştır. Toplama veriminin düşük olmasının nedeni kare kanal tasarımındaki girinti ve çıkıntıların çok keskin olması nedeniyle plateletlerin köşelere sıkışması ve insülin enjektörü ile toplanamamasından kaynaklıdır (Tablo 8). Bu tasarımda da KKH'ler PZP'de 3,88 M/mm³ 'ten 0,1 M/mm³ 'e düşürülmüştür. Beyaz kan hücreleri ise 4,46 K/mm³ 'ten 1,5 K/mm³ 'e düşürülmüştür.

Tablo 6. Vakum kapaklı kare kanallı uçak tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları.

| Örnekler | PLATELET (K/mm ³) | PZP-PFP Hacmi (mL) | Tam Kan Hacmi (mL) | Platelet Toplama Verimi (%) | Zenginleştirme Faktörü | Toplam Plazmada Platelet Toplama Verimi (%) |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| TAM KAN | 209 | | | | | |
| PLAZMA (PFP) | 157 | 2 | 8 | 18,77990431 | 0,751196172 | 52,27272727 |
| PLAZMA (PZP) | 280 | 2 | 8 | 33,49282297 | 1,339712919 | |

Vakum Kapaklı Daralan Kanallı Uçak Tasarımında, platelet konsantrasyonu 3,35 kat artırılmıştır. Literatürdeki bilgilere göre yeterli seviyede platelet konsantrasyonu elde edilmiştir. Ancak toplama verimi istediğimiz seviyede değildir (Tablo 9). KKH'leri PZP'de 5,02 M/mm³ 'ten 0,03 M/mm³ 'e düşürülmüştür. Beyaz kan hücreleri ise 7,25 K/mm³ 'ten 2,14 K/mm³ 'e düşürülmüştür.

Tablo 7. Vakum kapaklı daralan kanallı uçak tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları.

| Örnekler | PLATELET (K/mm ³) | PZP-PFP Hacmi (mL) | Tam Kan Hacmi (mL) | Platelet Toplama Verimi (%) | Zenginleştirme Faktörü | Toplam Plazmada Platelet Toplama Verimi (%) |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| TAM KAN | 234 | | | | | |
| PLAZMA (PFP) | 85 | 2,9 | 8 | 13,16773504 | 0,363247863 | 65,5849359 |
| PLAZMA (PZP) | 785 | 1,25 | 8 | 52,41720085 | 3,354700855 | |

Vakum Kapaklı Z Kanallı Uçak Tasarımında, platelet konsantrasyonu 3,5 kat artırılmıştır. Literatürdeki bilgiler ile karşılaştırıldığında yeterli konsantrasyon ve toplama verimine sahiptir (Tablo 10). KKH'leri PZP'de 4,98 M/mm³ 'ten 0,01 M/mm³ 'e düşürülmüştür. Beyaz kan hücreleri ise 4,55 K/mm³ 'ten 0,15 K/mm³ 'e düşürülmüştür. Bu sonuçlar neticesinde toplanan PZP içerisinde yeterince saf platelet hücresi izole edildiğini söylemek mümkündür.

Tablo 8. Vakum kapaklı Z kanallı uçak tasarımındaki diskin platelet analiz sonuçları.

| Örnekler | PLATELET (K/mm ³) | PZP-PFP Hacmi (mL) | Tam Kan Hacmi (mL) | Platelet Toplama Verimi (%) | Zenginleştirme Faktörü | Toplam Plazmada Platelet Toplama Verimi (%) |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| TAM KAN | 234 | | | | | |
| PLAZMA (PFP) | 72 | 2,8 | 8 | 10,76923077 | 0,307692308 | 72,61752137 |
| PLAZMA (PZP) | 827 | 1,4 | 8 | 61,8482906 | 3,534188034 | |

4.7. Disk Tabanlı Sistem ile Elde Edilen PZP Sonuçlarının Ticari Olarak Piyasada Bulunan Kitler ile Karşılaştırılması

Ticari olarak piyasada bulunan PZP cihazları düşük platelet konsantrasyonu ve yüksek platelet konsantrasyon olarak ikiye ayrılmaktadır.

Düşük verimli cihazlar arasında Arthrex ACP, Cascade PZP tedavisi, Boitech Institute Vitoria, İspanya tarafından PRGF ve RegenLab PZP yer alır. Bu PZP kitlerinde sistemlerde, Arthrex ACP 16 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 2 ile 3 kat arasında, Cascade PZPtedavisinde 18 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 1 ile 1.5 kat arasında, Boitech Institute Vitoria, İspanya tarafından üretilen PRGF 5 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 2 ile 3 kat arasında ve RegenLab A-PZP kiti 10 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 1.6 kattır.

Yüksek verimli cihazlar arasında Biomet GPS II ve IIISmartPRep 2 APC + ve Arteriosit-Medtronic Macellan bulunmaktadır. Bu PZP kitlerinde sistemlerde, Biomet GPS II ve III 60 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 3 ile 8 kat arasında, SmartPRep 2 APC + 50 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 4 ile 6 kat arasında ve Arteriosit-Medtronic Macellan 60 ml tam kan kullanarak platelet zenginleştirme faktörü 3 ile 7 kat arasındadır [104–107]. Biomet GPS II ve III, SmartPRep 2 APC + ve Arteriosit-Medtronic Macellan yüksek verimde platelet ayırması ve yüksek hacimde tam kan ile çalışmaları nedeniyle genellikle literatürde tendon hasarı görmüş atlar için kullanılmaktadır [108].

Marx ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, insanlar için PZP'nin "terapötik PZP" olarak kabul edilebilmesi için platelet konsantrasyonunun tam kandan %300 ila 400 (3 – 4 kat) daha fazla olması gerekmektedir. Daha düşük konsantrasyonların yara iyileşmesini hızlandırmada etkisiz olduğu bildirilirken, daha yüksek konsantrasyonların da aynı şekilde yara iyileşmesinde etkili olmadığı görülmüştür [109].

Tez çalışmasında geliştirilen disk tabanlı PZP kitlerindeki platelet konsantrasyonları;
Kar tanesi tasarımının platelet konsatrasyonu 1.48 kat,
Vakum Kapaklı Kare Kanallı Uçak tasarımının platelet konsatrasyonu 1.34 kat,
Vakum Kapaklı Daralan Kanallı Uçak tasarımının platelet konsatrasyonu 3.35 kat,
Vakum Kapaklı Z Kanallı Uçak tasarımının platelet konsatrasyonu 3.53 kat ve

Bu veriler göz önüne alındığında tez kapsamında geliştirilen disk tabanlı PZP kitlerinin olumlu ve olumsuz yönleri ile değerlendirilerek en iyi verim alınan disk belirlenmiştir.

Buna göre ‘Vakum Kapaklı Z Kanallı Uçak tasarımı, 3,53 kat platelet konsantrasyonu olarak en iyi sonuç alınan kit tasarımı seçilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen disk tabanlı PZP kiti, portatif bir hasta başı tedavi sistemi olmakla birlikte deneyimli kişilere gerek olmadan herkesin kullanabileceği şekilde tasarlanmıştır. Diske en verimli şekilde kan yüklenmesini sağlayan vakum kapaklı kan yükleme aparatı kan numunesinin disk içerisine dış ortamla en az temas sağlayarak kontaminasyon riskini düşürmektedir. Disk üzerindeki plazma toplama deliklerinden uygulanacak bölgeye uygun miktarda PZP veya PFP toplanabilmektedir. Ayrıca uygulanacak bölgeye göre platelet konsantrasyonu plazma deliklerinden toplanacak PZP miktarına göre konsantrasyonu da ayarlanabilmektedir. Tüm bu özellikler karşılaştırıldığında tez kapsamında geliştirilen disk tabanlı PZP kiti, piyasada satılan PZP ticari kitleri ile hem yarışabilecek hem de ilave bazı yönleri ile daha üstün bir durumda olduğu görülmektedir.

5. YORUM

Tamamlanan yüksek lisans tez çalışması kapsamında geliştirilen disk tabanlı PZP kiti, ticari kitler ile platelet değerleri ve kullanım kolaylığı bakımından karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre;

Ticari olarak piyasada bulunan ürünler PZP hazırlama protokolü olarak çift santrifüj işlemi ve yüksek merkezkaç kuvveti ile tek santrifüj işlemi uygulayarak yüksek platelet konsantrasyonu elde etmektedir. Ancak çift santrifüj işlemi platelet hücrelerinin birden fazla çevirme işlemi yapıldığından strese girmeleri ve hasar görmelerine neden olmaktadır. Ayrıca 2 santrifüj işlemi uygulanarak yapılan PZP eldesi protokolünde ise, ilk çevirmeden sonra KKH kısmı üstü toplanıp başka bir tüpe alınıp 2. santrifüj işlemi yapılmaktadır. İlk santrifüj işleminden sonra toplama ve başka bir tüpe aktarımı sırasında PZP'nin kontamine olma riskini de taşımaktadır. Buna ilaveten bu protokol yaklaşık 30 dakika sürmektedir. Bu süre aktive olmuş plateletlerin hem tüpün duvarına hem de birbirlerine yapışmalarına sebep olmakta ve kitin etkinliğini azaltmaktadır. Yüksek merkezkaç kuvveti ile tek santrifüj işlemi uygulayan kitlerde de yüksek kuvvete maruz kalan platelet hücreleri aynı şekilde strese girerek hem hasar görmekte hem de yine birbirlerine ve KKH'lerine yapıştıklarından dolayı kitlerin etkinliklerini azaltmaktadır. Marx'ın yaptığı çalışmaya göre, PZP'yi elde etmek için kullanılan protokol tarafından hasar gören platelet hücreleri biyoaktif büyüme faktörlerini salgılamamaktadır. Tez çalışması kapsamında geliştirilen disk tabanlı PZP kitinde 8 dakika boyunca 800 g'de santrifüj edilerek istenilen konsantrasyonda (yaklaşık 3,5 kat) ve miktarda PZP kolaylıkla toplanabilmektedir. Geliştirilen disk tasarımı, çevirme süresi ve merkezkaç kuvveti, platelet hücrelerinin strese girerek zarar görmemesi için düşük tutulmuş ve santrifüj işlemi tek aşamalı olarak yapılarak yüksek verimde platelet eldesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca işlem tek aşamalı olduğundan PZP uygulama işlemine kadar kanın veya PZP'nin havayla teması olmamaktadır. Bu nedenle kontaminasyon riski de yok denilecek kadar azdır.

Ticari olarak piyasada bulunan kitlerde santrifüj işleminden sonra hastanın tüm plazması alınıp platelet konsantrasyonu düşürülürken ya da santrifüj edilen PZP kitlerinde bulunan kan tüplerinin PFP bölgesinden (üst kısmından) 2-3 ml atılarak platelet konsantrasyonu

yükseltirirken geliştirilen disk tabanlı sistemde plazma atılmadan veya hepsi toplanarak platelet konsantrasyonu düşürülmeden disk üzerindeki plazma toplama deliklerinden alınan numunenin platelet konsantrasyonu ayarlanabilmektedir. Ticari olarak piyasada bulunan bazı kitlerde PZP tüpünün santrifüj sonrası PZP'yi toplama uygulamasında tüp kapağına bir uzun bir kısa iki iğne batırılarak uzun iğneyi göz kararı bir mesafede batırıp toplamayı gerektirmektedir. Kısa iğne ise içeride basınç oluşmaması için takılmaktadır. Bu işlem göz kararı yapıldığından hem istenilen şekilde toplanması zor hem de deneyimli kişiler gerektirmektedir. Bazı kitlerde ise bu işlem yerine kitte mevcut olan boru sistemiyle PZP toplanmaktadır bu da fazladan ekipman kullanımını gerektirmektedir. Tez kapsamında geliştirilen disk tabanlı PZP kitinin uygulayıcı için kullanımı, disk üzerinde bulunan PZP toplama delikleri nedeniyle piyasada hali hazırda bulunan kitlere kıyasla çok daha kolaydır. Uygulayıcı istediği miktarda ve konsantrasyonda olan PZP'yi belirlenen deliklerden şırınga yardımıyla çekebilmektedir. Geliştirilen disk tabanlı PZP kiti deneyimli kişilere ihtiyaç duymadan herkes tarafından kolaylıkla kullanılabilir şekilde tasarlanmıştır.

Çoğu ticari PZP kitinin hazırlanması için büyük santrifüj cihazları gerektirmektedir. Bu nedenle hastadan kan alındıktan sonra kan, uygun laboratuvar ortamına götürülüp santrifüj edilerek hazırlanmaktadır. Bu durum için yine bu tez çalışması kapsamında geliştirilen portatif santrifüj cihazı ile PZP tedavisi olacak hastanın yanında bu işlem hızlı şekilde gerçekleştirilebilecektir. Ayrıca bütün işlem kanı alınan hastanın yanında yapıldığından hastada herhangi bir tereddüt olmayacaktır.

Tamamlanan yüksek lisans tez çalışması kapsamında PZP tedavisine yönelik merkezkaç kuvveti faz ayrılması presibine dayanan tiksotropik jel entegre edilmiş farklı disk tabanlı sistem tasarımları denenmiş ve hızlı, kolay uygulanabilen, portatif ve kişiye özel tedavi sunabilen bir disk tabanlı PZP tedavi kiti tasarlanmış ve geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemin basitliği ve kullanılan malzemeler nedeniyle kitin maliyeti piyasa bulunan basit kitler ile aynı seviyededir. Oluşturulan sistem kan alımı işlemi hariç olarak kanın disk'e verilmesi 30 sn, disk'in santrifüj cihazına yerleştirilmesi 30 sn, santrifüj cihazı ile çevrilmesi 800 g 'de 8 dk ve 1 dakikada da PZP toplama süresi ile bütün işlem yaklaşık 10 dk'da bitmektedir.

PZP saflaştırmak için geliştirilen yeni disk tabanlı sistem tasarımı ile geliştirilen jelin birlikte kullanılması daha önce denenmemiş olmasından dolayı literatüre yeni verilerin eklenmesini sağlayacaktır. Tez kapsamında geliştirilen tiksotropik jel ise yoğunluğu 1,06-1,07 g/ml olarak ayarlanmıştır. Bu yoğunluk plateletlerin alt gruplarını da toplayacak şekildedir. Ancak ticari kitlerde kullanılan jellerin yoğunlukları 1,04-1,05 g/ml olduğundan orta ve y¼ksek yoğunluklu plateletleri toplayamamaktadırlar. Bu nedenle tez kapsamında geliştirilen jelin, plateletlerin alt gruplarını da KKH'lerinden izole edebileceğini s¼yleyebiliriz.

Ayrıca Panasonic, Roche, Samsung, 3M ve Abaxis gibi önemli şirketlerin disk tabanlı kan ayırımı cihazlarına sahip ve patentlerinin olması, tez önerisinde geliştirilecek sisteminde patentlenebileceğini ve gelecekte bu disk tabanlı sistemlerin birinci basamak sağlık tesislerinin yanı sıra merkezi olmayan ulaşılması zor olan b¼lgelerde bile hasta teşhisi ve tedavisine imkan sağlaması nedeniyle daha yaygın olarak kullanacağını g¼stermektedir.

Bu tez çalışması ile gelecekte yapılacak çalışmalarda, disk tabanlı sistem geliştirilen tasarıma g¼re kandaki kırmızı kan h¼cresi, beyaz kan h¼cresi ve plazma gibi fazların ayrılmasının sağlanması ile birçok analizin disk tabanlı sistem üzerinde yapılması da m¼mk¼nd¼r. Disk tabanlı sistem üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar ile (manyetik alan, antikor immobilizasyonu gibi.) birçok teşhis ve tedavi amacına da hizmet edebilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Y.H. Mekaj, The roles of platelets in inflammation, immunity, wound healing and malignancy, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 9 (2016) 5347–5358.
- [2] M. Ferrari, S. Zia, M. Valbonesi, F. Henriquet, G. Venere, S. Spagnolo, M.A. Grasso, I. Panzani, A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery, *Int. J. Artif. Organs.* 10 (1987) 47–50. <https://doi.org/10.1177/039139888701000111>.
- [3] A.J. DelRossi, A.C. Cernaianu, R.A. Vertrees, C.J. Wacker, S.J. Fuller, J.H. Cilley, W.A. Baldino, Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 100 (1990) 281–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2385125> (erişim 25 Mart 2020).
- [4] R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt, S.R. Schimmele, J.E. Strauss, K.R. Georgeff, Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85 (1998) 638–646. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4).
- [5] E. Anitua, Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants., *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 14 (y.y.) 529–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453668> (erişim 25 Mart 2020).
- [6] R.T. Nguyen, J. Borg-Stein, K. McInnis, Applications of Platelet-Rich Plasma in Musculoskeletal and Sports Medicine: An Evidence-Based Approach, *PM R.* 3 (2011) 226–250. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.11.007>.
- [7] Human Blood: Blood Components, (y.y.). https://www2.palomar.edu/anthro/blood/blood_components.htm (erişim 26 Ağustos 2020).
- [8] K. Patton, G.A. Thibodeau, *Structure & Function of the Body - Hardcover*, 15th Edition, Elsevier Health Sciences, 2016. <https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323357258?role=student> (erişim 31 Mayıs 2020).
- [9] G.J. Tortora, B. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*, Volume 1,

- Wiley, 2009. <https://books.google.com/books?id=bD5TngEACAAJ&pgis=1> (erişim 31 Mayıs 2020).
- [10] N. Ashton, Physiology of red and white blood cells, *Anaesth. Intensive Care Med.* 8 (2007) 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2007.02.003>.
- [11] P.C. Adams, J.C. Barton, How I treat hemochromatosis, *Blood.* 116 (2010) 317–325. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261875>.
- [12] J.M. Higgins, Red Blood Cell Population Dynamics, *Clin. Lab. Med.* 35 (2015) 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.002>.
- [13] E. Cohen, M. Kramer, T. Shochat, E. Goldberg, I. Krause, Relationship between hematocrit levels and intraocular pressure in men and women, *Medicine (Baltimore).* 96 (2017) e8290. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008290>.
- [14] K. Ghoshal, M. Bhattacharyya, Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis, *Sci. World J.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/781857>.
- [15] M. Seyoum, B. Enawgaw, M. Melku, Human blood platelets and viruses: Defense mechanism and role in the removal of viral pathogens, *Thromb. J.* 16 (2018) 16. <https://doi.org/10.1186/s12959-018-0170-8>.
- [16] R. Polanowska-Grabowska, S. Raha, A.R.L. Gear, Adhesion efficiency, platelet density and size, *Br. J. Haematol.* 82 (1992) 715–720. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb06949.x>.
- [17] J.C. Zapata, D. Cox, M.S. Salvato, The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002858>.
- [18] J.N. George, Platelets, *Lancet.* 355 (2000) 1531–1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02175-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02175-9).
- [19] P. Blair, R. Flaumenhaft, Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates, *Blood Rev.* 23 (2009) 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>.
- [20] J. Kiuru, L. Viinikka, G. Myllylä, K. Pesonen, J. Perheentupa, Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor, *Life Sci.* 49 (1991) 1997–2003. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90642-O](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90642-O).

- [21] R. Dhurat, M. Sukesh, Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective, *J. Cutan. Aesthet. Surg.* 7 (2014) 189. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>.
- [22] Anonim, Hemostaz [turkcerrahi.com](http://www.turkcerrahi.com), <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/hemostaz-kan-urunleri-transfuzyonu/hemostaz/> (erişim 31 Mayıs 2020).
- [23] Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP?, 2001.
- [24] E. Anitua, R. Prado, M. Sánchez, G. Orive, Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation, *Oper. Tech. Orthop.* 22 (2012) 25–32. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2012.01.004>.
- [25] R. Kahn, I. Cossette, L. Friedman, Optimum centrifugation conditions for the preparation of platelet and plasma products, *Transfusion.* 16 (1976) 162–165. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1976.16276155111.x>.
- [26] S.J. SLICHTER, L.A. HARKER, Preparation and Storage of Platelet Concentrates: I. FACTORS INFLUENCING THE HARVEST OF VIABLE PLATELETS FROM WHOLE BLOOD, *Br. J. Haematol.* 34 (1976) 395–402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03586.x>.
- [27] R. Landesberg, M. Roy, R.S. Glickman, Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58 (2000) 297–300. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(00\)90058-2](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(00)90058-2).
- [28] C.H. Jo, Y.H. Roh, J.E. Kim, S. Shin, K.S. Yoon, Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation, *J. Oral Implantol.* 39 (2013) 525–532. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-10-00155>.
- [29] O. Bausset, L. Giraud, J. Veran, J. Magalon, J.M. Coudreuse, G. Magalon, C. Dubois, N. Serratrice, F. Dignat-George, F. Sabatier, Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product, *Biores. Open Access.* 1 (2012) 115–123. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0225>.
- [30] F.M. Tamimi, S. Montalvo, I. Tresguerres, L. Blanco Jerez, A Comparative Study of 2 Methods for Obtaining Platelet-Rich Plasma, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 65

(2007) 1084–1093. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2006.09.012>.

- [31] A.D. Mazzocca, M.B.R. McCarthy, D.M. Chowaniec, M.P. Cote, A.A. Romeo, J.P. Bradley, R.A. Arciero, K. Beitzel, Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.* 94 (2012) 308–316. <https://doi.org/10.2106/JBJS.K.00430>.
- [32] E. Anitua, J.J. Aguirre, J. Algorta, E. Ayerdi, A.I. Cabezas, G. Orive, I. Andia, Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 84 (2008) 415–421. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30886>.
- [33] J. Araki, M. Jona, H. Eto, N. Aoi, H. Kato, H. Suga, K. Doi, Y. Yatomi, K. Yoshimura, Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: Maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen, *Tissue Eng. - Part C Methods.* 18 (2012) 176–185. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0308>.
- [34] R.G. Smith, C.J. Gassmann, M.S. Campbell, *Platelet-rich Plasma: Properties and Clinical Applications*, 2007.
- [35] N. Puri, Platelet rich plasma in dermatology and aesthetic medicine, *Our Dermatol Online.* 6 (2015) 207–211. <https://doi.org/10.7241/ourd.20152.57>.
- [36] R.E. Marx, Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62 (2004) 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003>.
- [37] A. Gonshor, Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process., *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22 (2002) 547–57. <https://doi.org/10.11607/prd.00.0495>.
- [38] B.L. Eppley, J.E. Woodell, J. Higgins, Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing, *Plast. Reconstr. Surg.* 114 (2004) 1502–1508. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000138251.07040.51>.
- [39] R.J. Christie, L. Carrington, B. Alving, Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: Report of two cases, *Surgery.* 121 (1997) 708–710. [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(97\)90061-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(97)90061-1).
- [40] J.L. Zehnder, L.L.K. Leung, Development of antibodies to thrombin and factor V

- with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin, *Blood*. 76 (1990) 2011–2016. <https://doi.org/10.1182/blood.v76.10.2011.bloodjournal76102011>.
- [41] B.L. Eppley, W.S. Pietrzak, M. Blanton, Platelet-rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery, *Plast. Reconstr. Surg.* 118 (2006). <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000239606.92676.cf>.
- [42] P. Gentile, Systematic Review of Platelet-Rich Plasma Use in Androgenetic Alopecia Compared with Minoxidil ® , Finasteride ® , and Adult Stem Cell-Based Therapy, (2020) 1–26.
- [43] M.A.-S. Emerson Jane F., STERILIZABLE PHOTOPOLYMER SERUM SEPARATOR Applicant: THE REGENTS OF THE, 2012.
- [44] H.A. Barnes, Thixotropy - A review, *J. Nonnewton. Fluid Mech.* 70 (1997) 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0377-0257\(97\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0377-0257(97)00004-9).
- [45] T.H. Kim, V. Sunkara, J. Park, C.J. Kim, H.K. Woo, Y.K. Cho, A lab-on-a-disc with reversible and thermally stable diaphragm valves, *Lab Chip*. 16 (2016) 3741–3749. <https://doi.org/10.1039/c6lc00629a>.
- [46] M. Madou, J. Zoval, G. Jia, H. Kido, J. Kim, N. Kim, LAB ON A CD, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006) 601–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095758>.
- [47] M. Tang, G. Wang, S.K. Kong, H.P. Ho, A review of biomedical centrifugal microfluidic platforms, *Micromachines*. 7 (2016). <https://doi.org/10.3390/mi7020026>.
- [48] J. Ducrée, S. Haeberle, S. Lutz, S. Pausch, F. Von Stetten, R. Zengerle, The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform, *IOP Publ. J. MICROMECHANICS MICROENGINEERING J. Micromech. Microeng.* 17 (2007) 103–115. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/7/S07>.
- [49] R. Barathur, J. Bookout, S. Sreevatsan, J. Gordon, M. Werner, G. Thor, M. Worthington, New disc-based technologies for diagnostic and research applications, *Psychiatr. Genet.* 12 (2002) 193–206. <https://doi.org/10.1097/00041444-200212000-00002>.
- [50] M. Focke, F. Stumpf, G. Roth, R. Zengerle, F. Von Stetten, Centrifugal

- microfluidic system for primary amplification and secondary real-time PCR, *Lab Chip*. 10 (2010) 3210–3212. <https://doi.org/10.1039/c0lc00161a>.
- [51] H. Kido, A. Maquieira, B.D. Hammock, Disc-based immunoassay microarrays, *Anal. Chim. Acta*. 411 (2000) 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00776-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00776-5).
- [52] G. Czilwik, S.K. Vashist, V. Klein, A. Buderer, G. Roth, F. Von Stetten, R. Zengerle, D. Mark, Magnetic chemiluminescent immunoassay for human C-reactive protein on the centrifugal microfluidics platform, *RSC Adv*. 5 (2015) 61906–61912. <https://doi.org/10.1039/c5ra12527h>.
- [53] R. Mishra, R. Alam, D.J. Kinahan, K. Anderson, J. Ducreé, LIPOPHILIC-MEMBRANE BASED ROUTING FOR CENTRIFUGAL AUTOMATION OF HETEROGENEOUS IMMUNOASSAYS, y.y.
- [54] C.E. Nwankire, G.G. Donohoe, X. Zhang, J. Siegrist, M. Somers, D. Kurzbuch, R. Monaghan, M. Kitsara, R. Burger, S. Hearty, J. Murrell, C. Martin, M. Rook, L. Barrett, S. Daniels, C. McDonagh, R. O’Kennedy, J. Ducreé, At-line bioprocess monitoring by immunoassay with rotationally controlled serial siphoning and integrated supercritical angle fluorescence optics, *Anal. Chim. Acta*. 781 (2013) 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.016>.
- [55] C.E. Nwankire, R. Burger, T. O’Connell, T. Glennon, J. Ducree, Full integration of a liver assay panel on a centrifugal microfluidic platform, içinde: 2013 Transducers Eurosensors XXVII 17th Int. Conf. Solid-State Sensors, Actuators Microsystems, TRANSDUCERS EUROSENSORS 2013, 2013: ss. 377–379. <https://doi.org/10.1109/Transducers.2013.6626781>.
- [56] Y.-K. Cho -Ulsan, *Centrifugal Microfluidics for Biomedical Applications*, 1999. <http://fruits.unist.ac.kr> (erişim 19 Mayıs 2020).
- [57] M. Grumann, T. Brenner, C. Beer, R. Zengerle, J. Ducreé, Visualization of flow patterning in high-speed centrifugal microfluidics, *Rev. Sci. Instrum*. 76 (2005) 025101. <https://doi.org/10.1063/1.1834703>.
- [58] O. Strohmeier, M. Keller, F. Schwemmer, S. Zehnle, D. Mark, F. Von Stetten, R. Zengerle, N. Paust, Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications, *Chem. Soc. Rev*. 44 (2015) 6187–6229.

<https://doi.org/10.1039/c4cs00371c>.

- [59] R. Alves, R. Grimalt, A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification, *Ski. Appendage Disord.* 4 (2018) 18–24. <https://doi.org/10.1159/000477353>.
- [60] E. Sumida, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, S. Kasugai, Platelet separation from whole blood in an aqueous two-phase system with water-soluble polymers, *J. Pharmacol. Sci.* 101 (2006) 91–97. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0060062>.
- [61] V. Bush, R. Cohen, The Evolution of Evacuated Blood Collection Tubes, *Lab. Med.* 34 (2003) 304–310. <https://doi.org/10.1309/jcqe33nbyge0ffqr>.
- [62] M.P.C.D.T.B.M.D.J.M. Wilburta Q. Lindh, *Delmar's Comprehensive Medical Assisting: Administrative and Clinical*, 5th editio, Delmar Cengage Learning, USA, 2013. https://books.google.mw/books/about/Delmar_s_Comprehensive_Medical_Assisting.html?id=I8puCgAAQBAJ&utm_source=gb-gplus-shareDelmar (erişim 26 Mayıs 2020).
- [63] Hugh T. Conway, Device and method for separating components of a fluid sample, U.S. Patent No. 6537503 B1, 2000.
- [64] H. Anraku, R. Okamoto, Composition for blood serum or plasma separation and vessel for blood examination containing the same, U.S. Patent No: 7090970 B2, 2006.
- [65] K. Sun, H. Oh, J.F. Emerson, S.R. Raghavan, A new method for centrifugal separation of blood components: Creating a rigid barrier between density-stratified layers using a UV-curable thixotropic gel †, (y.y.). <https://doi.org/10.1039/c2jm14818h>.
- [66] B. Babakhani, S.O. Movahed, S. Ghazy, A. Ahmadpour, A New Formulation for Polymeric Separator Gels for Potential use in Blood Serum Separator Tubes, *Prog. Rubber Plast. Recycl. Technol.* 34 (2018) 35–53. <https://doi.org/10.1177/147776061803400103>.
- [67] H. Anraku, M. Niunoya, US 2012/0070350 A1 Composition for plasma and serum separation, and container for blood testing, 2011.
- [68] M.J. Zohuriaan-Mehr, H. Omidian, Petroleum resins: an overview, *J. Macromol.*

- Sci. - Rev. Macromol. Chem. Phys. 40 (2000). <https://doi.org/10.1081/MC-100100577>.
- [69] G. Zimmermann, Hydrocarbon Resins. R. Mildenberg, M. Zander, G. Collin. Wiley-VCH, Weinheim, 1997, 179 S., über 100 Abb. und Tab., geb., DM 198,00 ISBN 3-527-28617-9, Chemie Ing. Tech. 70 (1998) 182–182. <https://doi.org/10.1002/cite.330700129>.
- [70] S. V. Antonov, N.N. Petrukhina, O.A. Pakhmanova, A.L. Maksimov, Hydrogenation Process for Producing Light Petroleum Resins as Adhesive and Hot-Melt Components (Review), Pet. Chem. 57 (2017) 983–1001. <https://doi.org/10.1134/S0965544117120027>.
- [71] 金怡 K·L·沃尔顿 G·R·马钱德, Hot melt adhesive composition including a crystalline block composite, 2015.
- [72] D.A.L.F.M.M.M.G.G.G.C.L. Flaminio M L, Leachability of a new plasticizer tri-(2-ethylhexyl)-trimellitate from haemodialysis tubing | Request PDF, Int. J. Artif. Organs. 11 (1988) 435–9. https://www.researchgate.net/publication/20251183_Leachability_of_a_new_plasticizer_tri-2-ethylhexyl-trimellitate_from_haemodialysis_tubing (erişim 23 Mayıs 2020).
- [73] Anonim, AEROSIL®-Fumed Silica, <https://www.productfinder.silica-specialist.com/productCenter/prodlist.php> (Erişim 23 Mayıs 2020).
- [74] B. Albertini, N. Passerini, M.L. González-Rodríguez, B. Perissutti, L. Rodriguez, Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles, J. Control. Release. 100 (2004) 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.013>.
- [75] A. Perino, C. Noïk, C. Dalmazzone, Effect of fumed silica particles on water-in-crude oil emulsion: Emulsion stability, interfacial properties, and contribution of crude oil fractions, Energy and Fuels. 27 (2013) 2399–2412. <https://doi.org/10.1021/ef301627e>.
- [76] A. Raffin Pohlmann, V. Weiss, O. Mertins, N. Pesce da Silveira, S. Stanisçuaski Guterres, Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models, Eur. J.

- Pharm. Sci. 16 (2002) 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00127-6).
- [77] H.A. Pawar, P.R. Shinde, Enhancement of Solubility of Lutein by Solid Dispersion Technique and Development of ITS STABLE Orodispersible Film Formulation, *Curr. Drug ther.* 13 (2018) 140–151. <https://doi.org/10.2174/1574885513666180419162150>.
- [78] J. Santos, M. Jimenez, N. Calero, M.C. Alfaro, J. Muñoz, Influence of a shear post-treatment on rheological properties, microstructure and physical stability of emulgels formed by rosemary essential oil and a fumed silica, *J. Food Eng.* 241 (2019) 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.013>.
- [79] D. M, G. F, D. J, H. MJ, P. J, A Time-Dependent Expression for Thixotropic Areas. Application to Aerosil 200 Hydrogels, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200006\)89:6<790::AID-JPS11>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200006)89:6<790::AID-JPS11>3.0.CO;2-2).
- [80] A.G.M. Perez, R. Lichy, J.F.S.D. Lana, A.A. Rodrigues, Â.C.M. Luzo, W.D. Belangero, M.H.A. Santana, Prediction and Modulation of Platelet Recovery by Discontinuous Centrifugation of Whole Blood for the Preparation of Pure Platelet-Rich Plasma, *Biores. Open Access.* 2 (2013) 307–314. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0015>.
- [81] S. V. Rudmann, *Textbook of blood banking and transfusion medicine*, Elsevier/Saunders, 2005.
- [82] N. Norouzi, H.C. Bhakta, W.H. Grover, Sorting cells by their density, *PLoS One.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180520>.
- [83] J. Mathew, S.S. Bhimji, *Physiology, Blood Plasma*, StatPearls Publishing, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30285399> (erişim 27 Mayıs 2020).
- [84] ESCOREZ 5300 - FTIR Spectrum - SpectraBase, (y.y.). <https://spectrabase.com/spectrum/K0x9BAk3mfP> (erişim 23 Mayıs 2020).
- [85] A. Marcilla, S. Garcia, J.C. Garcia-Quesada, Migrability of PVC plasticizers, *Polym. Test.* 27 (2008) 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2007.10.007>.
- [86] M.G.A. Vieira, M.A. Da Silva, A.C.G. Maçumoto, L.O. Dos Santos, M.M. Beppu, Synthesis and application of natural polymeric plasticizer obtained through

- polyesterification of rice fatty acid, *Mater. Res.* 17 (2014) 386–391. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392014005000017>.
- [87] L. Zhang, J. Zhang, X. Ding, J. Zhu, Y. Liu, Y. Fan, Y. Wu, Y. Wei, Y. Ou, Synthesis and Application of a New Environmental Friendly Plasticizer, 2015. <http://www.aascit.org/journal/ajbse> (erişim 23 Mayıs 2020).
- [88] K. Shameli, M. Bin Ahmad, S.D. Jazayeri, S. Sedaghat, P. Shabanzadeh, H. Jahangirian, M. Mahdavi, Y. Abdollahi, Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 6639–6650. <https://doi.org/10.3390/ijms13066639>.
- [89] M.S.D.S. De Bustamante Monteiro, R.P.C. Neto, I.C.S. Santos, E.O. Da Silva, M.I.B. Tavares, Inorganic-organic hybrids based on poly (ϵ -Caprolactone) and silica oxide and characterization by relaxometry applying low-field NMR, *Mater. Res.* 15 (2012) 825–832. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392012005000121>.
- [90] H. Zou, S. Wu, J. Shen, Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, characterization, properties, and applications, *Chem. Rev.* 108 (2008) 3893–3957. <https://doi.org/10.1021/cr068035q>.
- [91] R.J. Ouellette, J.D. Rawn, Carboxylic Acids and Esters, içinde: *Princ. Org. Chem.*, Elsevier, 2015: ss. 287–314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802444-7.00011-2>.
- [92] Y. Xue, A. Patel, V. Sant, S. Sant, Semiquantitative FTIR Analysis of the Crosslinking Density of Poly(ester amide)-Based Thermoset Elastomers, *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2016) 296–305. <https://doi.org/10.1002/mame.201500190>.
- [93] M. Suzuki, Y. Hayakawa, K. Hanabusa, Thixotropic Supramolecular Gel Based on L-Lysine Derivatives, *Gels.* 1 (2015) 81–93. <https://doi.org/10.3390/gels1010081>.
- [94] J. Li, W. Zhou, Z. Qi, T. Luo, W. Yan, H. Xu, K. Cheng, H. Li, Morphology and rheological properties of polyacrylamide/bentonite organic crosslinking composite gel, *Energies.* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/en12193648>.
- [95] R. Barbucci, D. Pasqui, R. Favaloro, G. Panariello, A thixotropic hydrogel from chemically cross-linked guar gum: synthesis, characterization and rheological

- behaviour, *Carbohydr. Res.* 343 (2008) 3058–3065.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.08.029>.
- [96] B.V.S. Jyoti, M. Varma, S.W. Baek, Comparative Study of Rheological Properties of Ethanol and UDMH based Gel Propellants, EUCASS, 2015.
- [97] B.V.S. Jyoti, S. Wook Baek, Rheological Characterization of Ethanolamine Gel Propellants, *J. Energ. Mater.* 34 (2016) 260–278.
<https://doi.org/10.1080/07370652.2015.1061617>.
- [98] E.R. Morris, K. Nishinari, M. Rinaudo, Gelation of gellan - A review, *Food Hydrocoll.* 28 (2012) 373–411. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.004>.
- [99] I.R.S. Arruda, P.B.S. Albuquerque, G.R.C. Santos, A.G. Silva, P.A.S. Mourão, M.T.S. Correia, A.A. Vicente, M.G. Carneiro-da-Cunha, Structure and rheological properties of a xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds, *Int. J. Biol. Macromol.* 73 (2015) 31–38.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.001>.
- [100] Malvern Panalytical-TECHNIQUES & TOOLS, A Basic Introduction to Rheology, 2017. <https://theanalyticalscientist.com/app-notes/a-basic-introduction-to-rheology> (erişim 28 Mayıs 2020).
- [101] D.J. Kinahan, S.M. Kearney, M.T. Glynn, J. Ducrée, *Spira mirabilis* enhanced whole blood processing in a lab-on-a-disk, *Sensors Actuators, A Phys.* 215 (2014) 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2013.11.010>.
- [102] A. Mishra, K. Harmon, J. Woodall, A. Vieira, Sports Medicine Applications of Platelet Rich Plasma, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 1185–1195.
<https://doi.org/10.2174/138920112800624283>.
- [103] C. Thanasas, G. Papadimitriou, C. Charalambidis, I. Paraskevopoulos, A. Papanikolaou, Platelet-rich plasma versus autologous whole blood for the treatment of chronic lateral elbow epicondylitis: A randomized controlled clinical trial, *Am. J. Sports Med.* 39 (2011) 2130–2134.
<https://doi.org/10.1177/0363546511417113>.
- [104] S. V Kevy, M.S. Jacobson, Comparison of Methods for Point of Care Preparation of Autologous Platelet Gel, y.y.
- [105] S. Marlovits, M. Mousavi, C. Gäbler, J. Erdös, V. Vécsei, A new simplified

technique for producing platelet-rich plasma: A short technical note, *Eur. Spine J.* 13 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00586-004-0715-3>.

- [106] J.H. Waters, K.C. Roberts, Database Review of Possible Factors Influencing Point-of-Care Platelet Gel Manufacture, y.y.
- [107] L. JL, C. N, P. P, W. J, K. G, Platelet-rich Plasma Application in Sinus Graft Surgery: Part I--Background and Processing Techniques, *J. Oral Implantol.* 27 (2001). [https://doi.org/10.1563/1548-1336\(2001\)027<0038:PPAISG>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1563/1548-1336(2001)027<0038:PPAISG>2.3.CO;2).
- [108] R.L. Fontenot, C.A. Sink, S.R. Werre, N.M. Weinstein, L.A. Dahlgren, Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse, *Can. Vet. J.* 53 (2012) 1266–1272. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19605.99043>.
- [109] M.J.H. Nagata, M.R. Messoria, F.A.C. Furlaneto, S.E. Fucini, A.F. Bosco, V.G. Garcia, T.M. Deliberador, L.G.N. de Melo, Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits., *Eur. J. Dent.* 4 (2010) 395–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922159> (erişim 26 Ağustos 2020).

EKLER

EK 1 - Santrifüj cihazında kullanılan kodlar;

```
#include <mbed.h>
PwmOut driver(PA_7);
InterruptIn encoder(PA_2);
Serial pc(PA_9, PA_10); // tx, rx
DigitalOut myled(PC_13);
Ticker time_up;
char mySt[30];
volatile char c = '\0'; // Initialized to the NULL character
int counter1 = 0;
float pv_speed = 0;
float set_speed = 0;
int serial_cnt = 0;
bool stringComplete = false;
bool motor_start = false;
bool motor_mode = false;
float throttle = 0.01;
float e_speed = 0; //error of speed = set_speed - pv_speed
float e_speed_pre = 0; //last error of speed
float e_speed_sum = 0; //sum error of speed
float pwm_pulse = 0; //this value is 0~255
float kp = 0.07;
float ki = 0.04;
float kd = 0.005;
void TIMER1() {
    pv_speed = 60.0*(counter1/7.0)/0.1; //calculate motor speed, unit is rpm
    counter1=0;
    if(motor_mode){
        if (motor_start){
            e_speed = set_speed - pv_speed;
```



```

    pwm_pulse = e_speed*kp + e_speed_sum*ki + (e_speed - e_speed_pre)*kd;
    e_speed_pre = e_speed; //save last (previous) error
    e_speed_sum += e_speed; //sum of error
    if (e_speed_sum >4000) e_speed_sum = 4000;
    if (e_speed_sum <-4000) e_speed_sum = -4000;
}
else{
    e_speed = 0;
    e_speed_pre = 0;
    e_speed_sum = 0;
    pwm_pulse = 0;
}
if (pwm_pulse <1000 && pwm_pulse >0){
    driver.write(pwm_pulse/5000); // 5% duty cycle
}
else{
    if (pwm_pulse >1000){
        driver.write(0.5f); // 5% duty cycle
    }
    else{
        driver.write(0.0f); // 5% duty cycle
    }
}
}
}
void detect_a() {
    counter1 += 1;
}
void onCharReceived()
{
    c = pc.getc();
    if (c == '\n'){
        serial_cnt = 0;
        stringComplete = true;
    }
}

```

```

    }
    else {
        mySt[serial_cnt] = c;
        serial_cnt += 1;
    }
}

int main() {
    pc.baud(115200);
    pc.attach(&onCharReceived);
    pc.printf("Starting...\n");
    driver.period(0.000125f); // 8 KHz
    // driver.write(0.035f); // 5% duty cycle
    time_up.attach(&TIMER1, 0.1);
    encoder.rise(&detect_a);
    // wait(5);
    while(1) {
        if(stringComplete){
            if(strcmp(mySt, "vs_start") == 0){
                pc.printf("START\n");
                motor_start = true;
            }
        }
        else if(strcmp(mySt, "vs_stop") == 0){
            pc.printf("STOP\n");
            throttle = 0.0;
            driver.write(0.0);
            set_speed = 0;
            motor_start = false;
        }

        else {
            set_speed = atof(mySt);
            pc.printf("%f\n",set_speed);
        }
        stringComplete = false;
        memset(mySt, 0, sizeof(mySt));
    }
}

```

```

    }
    e_speed = set_speed - pv_speed;
    if(motor_start){
    if(e_speed > 1000 || e_speed <-1000){
    if(!motor_mode){
    if(e_speed > 600){
    throttle += 0.0007;
    driver.write(throttle); // 5% duty cycle
    }
    else if(e_speed < -600) {
    throttle -= 0.0007;
    driver.write(throttle); // 5% duty cycle
    }
    else{
    motor_mode = true;
    }
    }
    wait_ms(100);
    }
    }
    pc.printf("%f\n",pwm_pulse);
    wait(0.01);

}
}

```

Stroboskop sistemi için ise aşağıdaki kodlar kullanılmıştır.

```
int incomingByte = 11;

void setup() {

  pinMode(6, OUTPUT);

  Serial.begin(9600);

}

void loop() {

  digitalWrite(1, HIGH);

  delayMicroseconds(1);

  digitalWrite(1, LOW);

  delayMicroseconds(incomingByte);

}
```