

**TROMBOSİT AKTİVASYONU İÇİN ALTERNATİF
MEKANİK YÖNTEMLERİN BELİRLENMESİ VE
GELİŞTİRİLMESİ**

**DETERMINATION AND DEVELOPMENT OF
ALTERNATIVE MECHANICAL METHODS FOR
THROMBOCYTE ACTIVATION**

NAİM YAĞIZ DEMİR

DOÇ. DR. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

TROMBOSİT AKTİVASYONU İÇİN ALTERNATİF MEKANİK YÖNTEMLERİN BELİRLENMESİ VE GELİŞTİRİLMESİ

Naim Yağız DEMİR

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Memed DUMAN

Aralık 2021, 61 sayfa

Trombositler pıhtı oluşumu, yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde görevli kan hücreleridir. Kan plazmasında çeşitli ayırma yöntemleri ile zenginleştirilerek trombositçe zengin otolog plazma elde edilir. Bu plazma PRP (platelet-rich plasma) olarak isimlendirilir. PRP'nin etkinliği yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi üzerine yapılan çeşitli klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bunun yanında aktive edilmiş PRP kullanımında bu etkinliğin arttığı bilinmektedir. Aktive PRP ile yapılan çalışmalarla iyileşme sürecinin hızlandığı gösterilmiştir. Ancak PRP aktivasyonunda kullanılan biyokimyasal yöntemler inflamatuvar etki yaratabilmektedir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında trombosit aktivasyonu için alternatif mekanik yöntemler geliştirmek amaçlanmıştır. Mikroakışkan sistemlerde kayma gerilimi uygulayarak aktivasyon ve ultrasonik ses dalgaları ile uyarım araştırılan yöntemlerdir. Tez çalışması kapsamında mikroakışkan sistemlerde farklı genişliklere sahip sütunlu ve düğümlü tasarımlar yapılmıştır. Bu tasarımlar akış simülasyonunda test edilerek uygulanan kayma gerilimleri belirlenmiştir. Daha sonra bu çipler PMMA (polimetil metakrilat) tabakalardan CO₂ lazer ile işlenerek üretilmiştir. Üretilen çiplerin karakterizasyonu optik profilometre ve USB mini mikroskop ile yapılmıştır. Ultrasonik ses dalgası ile uyarım için iki piezoelektrot tutucu hazne ve bir

plazma haznesinden oluşan bir kit tasarlanmıştır. Bu iki piezoelektrotlardan birisi verici diğeri alıcı olarak kullanılmıştır. Üretilen akustik dalganın validasyonu bu şekilde yapılmıştır. İki piezoelektrotun arasında ise trombositleri içeren plazma haznesi bulunmaktadır. Bu kit PMMA ve asetat tabakalar kullanılarak hazırlanmıştır. Aktive edilen trombositler akım sitometrisi ile CD62P (P-Selektin) ekspresyonuna göre incelenmiştir. . Mikroakışkan iiplerinde en yüksek trombosit aktivasyon oranını %83.0 ile 97.5 dyne/cm² kayma gerilimine sahip 8düğüm500 tasarımı verirken, ultrasonik yöntemlerde en yüksek aktivasyon oranını %53.9 ile 0.55 MHz frekanslı ses dalgaları vermiştir. Bu prototipler biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere üretilecek kitler önemli bir altyapı oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: trombosit aktivasyonu, trombositçe zengin plazma, mikroakışkanlar, piezo seramik, ultrasonik dalga, CO₂ lazer kesim/tarama, akım sitometrisi.

ABSTRACT

DETERMINATION AND DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE MECHANICAL METHODS FOR THROMBOCYTE ACTIVATION

Naim Yağız DEMİR

Master of Science, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Doç. Dr. Memed DUMAN

December 2021, 61 pages

Platelets are blood cells involved in clot formation, wound healing, and tissue regeneration. By enriching the blood plasma with various separation methods, platelet-rich plasma (PRP) is obtained. The effectiveness of PRP has been proven by various clinical studies on wound healing and tissue regeneration. In addition, it is known that this efficiency increases with the use of activated PRP. Studies with activated PRP have shown that the healing process accelerates. However, biochemical methods used in PRP activation can create an inflammatory effect. For this reason, it is aimed to develop alternative mechanical methods for platelet activation within the scope of the thesis. Activation by applying shear stress in microfluidic systems and excitation with ultrasonic sound waves are the methods investigated. Within the scope of the thesis, pillar-shaped and nodal designs with different widths were made in microfluidic systems. These designs were tested in the flow simulation and the applied shear stresses were determined. Subsequently, these chips were fabricated from PMMA (polymethyl methacrylate) sheets by processing with CO₂ laser. Characterization of the fabricated chips was done with an optical profilometer and a USB mini microscope. On the other hand, a kit consisting of

two piezoelectrode holder chambers and a plasma chamber is designed for excitation with ultrasonic waves. One of these two piezoelectrodes is used as a transmitter and the other as a receiver. The validation of the generated acoustic wave was done in this way. Between the two piezoelectrodes is the plasma chamber containing the platelets. This kit was prepared using PMMA and acetate sheets. Activated platelets were examined by flow cytometry for CD62P (P-Selectin) expression. In microfluidic chips, the 8node500 design with a shear stress of 97.5 dyne/cm^2 gave the highest platelet activation rate of 83.0%, while sound waves with a frequency of 0.55 MHz gave the highest activation rate of 53.9% in ultrasonic methods. These prototypes will shed light on the kits to be fabricated for use in biomedical applications.

Keywords: platelet activation, platelet-rich plasma (PRP), microfluidics, piezo ceramic, ultrasonic wave, CO₂ laser cutting/ablation, flow cytometry.

TEŞEKKÜR

Bütün bilgi birikimi, tecrübesi ve akademik donanımı ile lisansüstü eğitimime yön veren, hatalarımı sabır ve hoşgörüyle karşılayarak akademik hayatta özgüven kazanmamı sağlayan, her alanda görüş ve tecrübelerine başvurduğum, yanında çalışmaktan onur ve gurur duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Memed DUMAN'a,

Tez çalışmalarımın elektronik ile ilgili bölümlerinde laboratuvar imkanlarını ve bilimsel bilgi birikimini ihtiyaç duyduğum her anda çekinmeden sunan, manevi destekleriyle akademik hayatta daima motive kalmamı sağlayan kıymetli hocam Doç. Dr. Dinçer GÖKCEN'e,

Hücre çalışmalarım sırasında değerli tavsiyeleriyle yol göstererek deneyim kazanmamı sağlayan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Baran ERMAN'a ve laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren Can Sucak Translasyonel İmmünoloji Araştırma Laboratuvarı'na, Engin görüşleri ve tavsiyelerini esirgemeyerek akademik donanıma katkı sağlayan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Deniz BAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Cem BAYRAM'a,

Yüksek lisans hayatım süresince aynı laboratuvarı ve aynı yolu paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum hem özel hem de akademik hayatımda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım İpek AKYILMAZ, Melih Zeki YILDIRIM, Arş. Gör. Gülgün AYLAZ, Arş. Gör. İbrahim BOZYEL, Seda Nur TOKUÇCU ve Kadir ENSARİ'ye,

Tanıştığım günden bu yana her zaman yanımda durarak güç veren, iyi gün kötü gün ayırt etmeden maddi-manevi her türlü destek olan Bilge DURGUT'a,

Doğduğum günden beri yanımda olmalarından mutluluk duyduğum ve güç kazandığım, her zaman elinden gelen bütün imkanlarla maddi ve manevi desteklerini koşulsuz sunan, iyi bir insan olmanın yolunu göstererek bugünlere gelmemi sağlayan, hiçbir koşulda vaz geçemeyeceğim biricik aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Trombositler.....	3
2.1.1. Yapışma ve Kümelenme.....	3
2.1.2. Granüller.....	5
2.1.3. Yara İyileşmesi.....	8
2.2. Trombositçe Zengin Plazma (PRP).....	10
2.2.1. PRP Hazırlanması.....	11
2.2.2. PRP Uygulamaları.....	13
2.2.3. PRP Aktivasyonu.....	13
2.2.4. Aktive Edilmiş Trombositlerin Belirlenmesi.....	16
2.3. Mikroakışkan Sistemler.....	19
2.3.1. Mikroakışkanlarda Kayma Gerilimi.....	20
2.3.2. Mikroakışkan Çiplerin Üretim Yöntemleri.....	20
2.4. Ultrasonik Sistemler.....	21
2.4.1. Ultrasonik Dalga Oluşturma Yöntemleri.....	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	23
3.2. Kan Numunesinden Platelet Süspansiyonu Hazırlanması.....	24

3.3. Kimyasal Aktivasyon.....	24
3.4. Mekanik Aktivasyon.....	25
3.4.1. Mikroakışkan Çipte Kayma Gerilimi Uygulayarak Aktivasyon.....	25
3.4.2. Ultrasonikasyon Düzenegi ile Aktivasyon.....	28
3.5. Aktivasyon Oranlarının Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi.....	30
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
4.1. Trombositlerin Kimyasal Yöntemle Aktivasyonu.....	32
4.1.1. Pıhtı Oluşumu Denemeleri.....	32
4.1.2. Kimyasal Yöntem ile Aktive Edilen Trombositlerin Akış Sitometrisi ile İncelenmesi.....	34
4.2. Mikroakışkan Çiplerinde Akış Simülasyonu.....	35
4.2.1. Sütunlu Mikroakışkan Çiplerin Akış Simülasyonu.....	35
4.2.2. Dügümlü Mikroakışkan Çiplerin Akış Simülasyonu.....	36
4.3. Mikroakışkan Çiplerin Fabrikasyonu.....	39
4.4. Ultrasonik Dalganın Validasyonu.....	45
4.5. Trombositlerin Aktivasyon Oranlarının Belirlenmesi.....	49
4.5.1. Farklı Sürelerde Uygulanan Kayma Gerilimlerinin Trombositlere Etkisi	49
4.5.2. Çip Tasarımının ve İşlem Sonrası İnkübasyonun Trombositlere Etkisi....	54
4.5.3. Ultrasonik Dalganın Trombositlere Etkisi.....	57
5. YORUM.....	60
KAYNAKLAR.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Durağan (solda) ve aktive olmuş (sağda) plateletlerin şematik görüntüsü. Trombin gibi bir aktivatör molekül ile aktive olan plateletler yalancı ayaklar oluşturarak platelet agregasyonu sağlarlar. Glikoprotein bazlı açık kanaliküler sistemlerden büyüme faktörleri salgılanır(Everts *et al.*, 2006). ..4
- Şekil 2.2. İyileşme kaskatındaki evreleri gösteren diyagram. Kesikli çizgiler yara iyileşmesinde görev alan hücre ve biyomoleküllerin zamana göre artışını, sürekli çizgiler evreleri göstermektedir(Lee *et al.*, 2011).9
- Şekil 2.3. Antikoagülan olarak (a) %3,8’lik sodyum sitrat ve (b) K₃EDTA içeren tüplere alınan kan örneklerindeki aktive olmuş (CD62P pozitif) plateletlerin yüzdesinin saptanması için kullanılan akım sitometrisi dağılım örneği(Ritchie, Alexander and Rea, 2000).17
- Şekil 2.4. Web of Science veri tabanındaki “Mikroakışkanlar (Microfluidics)” anahtar kelimesine sahip yayın sayısının çalışma alanlarına göre dağılımı, Aralık 2021 itibari ile.19
- Şekil 2.5. Ultrasonik dalgaların frekans aralıklarına göre farklı kullanım alanları [53]. 21
- Şekil 3.1. Kullanılan çiplerin fabrikasyonunun şematik gösterimi. (a) PMMA tabakanın CO₂ lazer ile işlenmesi, (b) işlenen tabakanın çift taraflı bant yardımı ile başka bir tabakaya yapıştırılarak kapatılması, (c) kesme ve yapıştırma işlemleri tamamlanmış ultrasonikasyon sisteminin entegrasyonu.27
- Şekil 3.2. Fabrikasyon işlemleri tamamlanmış mikroakışkan çip örneği (a) ve bu çipin uygulama düzeneği (c). Fabrikasyon ve entegrasyon işlemleri tamamlanmış ultrasonikasyon kiti (b) ve onun osilatöre ve güç kaynağına bağlanmış haldeki düzeneği (d).27
- Şekil 3.3. PE ve PerCP floroforlarının uyarılma ve emisyon spektrumları (BD Biosciences).....30
- Şekil 4.1. Farklı oranlarda seyreltilen kan plazmasının trombin ve kalsiyum klorür ile farklı sürelerde etkileşimi sonucu oluşan pıhtılar.....33
- Şekil 4.2. İşlem görmemiş ve 1 U/mL trombin, 22.8 mM CaCl₂ ile 15 dakika inkübe edilmiş trombositlerin akım sitometrisi ile elde edilen nokta grafik sonuçları35

Şekil 4.3. (a) Sütun250, (b) sütun500 ve (c) sütun1000 çiplerinden 200 µL/s akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita.....	36
Şekil 4.4. (a) 8dügüm250 ve (b) 8dügüm250 çiplerinden 200 µL/s akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita	37
Şekil 4.5. (a) 8dügüm500 ve (b) 8dügüm500 çiplerinden 200 µL/s akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita	38
Şekil 4.6. (a) 8dügüm1000 ve (b) 8dügüm1000 çiplerinden 200 µL/s akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita	38
Şekil 4.7. Farklı hız (14 – 20 mm/s) ve interval (0.05 – 0.20 mm) lazer parametreleri ile işlenmiş PMMA tabakanın USB mini mikroskop ile üstten alınmış görüntüleri.....	40
Şekil 4.8. Farklı hız (14 – 20 mm/s) ve interval (0.05 – 0.20 mm) lazer parametreleri ile işlenmiş PMMA tabakanın USB mini mikroskop ile çaprazdan alınmış görüntüleri.....	41
Şekil 4.9. (a) Odaklı ve (b) odak kaydırma yöntemleri kullanarak yapılan lazer işleme yönteminin şematik gösterimi. (c) Odaklı ve (d) odak kaydırma yöntemleri ile elde edilen lazer bölgesinin ve enerjisinin şematik gösterimi(Hong <i>et al.</i> , 2010).	42
Şekil 4.10. Odak kaydırma yöntemi ile işlenmiş PMMA tabakanın profilometre ile elde edilmiş 3 boyutlu görüntüsü. (a) $\lambda = 2.5$ mm, (b) $\lambda = 5.0$ mm, (c) $\lambda = 0$ mm.	43
Şekil 4.11. Farklı hız (20 – 35 mm/s) ve interval (0.03 – 0.05 mm) lazer parametreleri ile işlenmiş PMMA tabakanın USB mini mikroskop ile çaprazdan alınmış görüntüleri.....	44
Şekil 4.12. Eşdeğer akustik empedans devresi	45
Şekil 4.13. Kare dalganın zamana karşı potansiyel grafiği.....	46
Şekil 4.14. Empedansın reaktans ve rezistansa bağlı değişim grafiği	48
Şekil 4.15. Sütun250, sütun500 ve sütun1000 çipleri kullanılarak 15 ve 30 dakika boyunca aktive edilen trombositlerin akım sitometrisi sonuçları.	51
Şekil 4.16. 40dügüm250, 40dügüm500 ve 40dügüm1000 çipleri kullanılarak 4 ve 15 dakika boyunca aktive edilen trombositlerin akım sitometrisi sonuçları.....	52
Şekil 4.17. 8dügüm250, 8dügüm500 ve 8dügüm1000 çipleri kullanılarak 4 ve 15 dakika boyunca aktive edilen trombositlerin akım sitometrisi sonuçları.	53

Şekil 4.18. Sütun500, 40düğüm500 ve 8düğüm500 çipleri ile 3 dakikalık uygulamadan sonra trombositlerin zamana karşı aktivasyon oranları (kontrol: işlem görmemiş trombositler)	56
Şekil 4.19. 1.1 MHz ve 10 V genlikli ses dalgası ile 5, 10 ve 15 dakika etkileşim sonucunda trombositlerin aktivasyon oranı.....	57
Şekil 4.20. Farklı frekans ve genlik parametrelerinde trombosit aktivasyon oranları	58
Şekil 4.21. Ultrasonikasyon sisteminde 1, 2 ve 3 dakikalık uygulamadan sonra trombositlerin zamana karşı aktivasyon oranları (kontrol: işlem görmemiş trombositler)	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Alfa-granüllerin İçerdiği Biyokimyasal Moleküller(Flaumenhaft, 2013)... 6	6
Çizelge 2.2. Delta-granüllerin İçerdiği Biyokimyasal Moleküller(Flaumenhaft, 2013). . 7	7
Çizelge 2.3. Lizozomların İçerdiği Biyokimyasal Moleküller(Flaumenhaft, 2013). 8	8
Çizelge 2.4. PRP hazırlama protokolleri ve kitlerinin kullanıldığı yayınlardan karşılaştırmalar(Hunter, Davis and Fadadu, 2018)..... 11	11
Çizelge 3.1. CO ₂ lazer tarama için uygulanan ilk parametreler..... 26	26
Çizelge 3.2. CO ₂ lazer tarama için uygulanan ikinci parametreler..... 26	26
Çizelge 4.1. Farklı oranlarda seyreltilen kan plazmasının trombin ve kalsiyum klorür ile etkileşimi sonucu oluşan pıhtının zamana göre izlenmesi için planlanan test parametreleri..... 33	33
Çizelge 4.2. CO ₂ lazer tarama için uygulanan ikinci denemeler sonucu elde edilen derinlik değerleri (µm)..... 44	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

m	metre
L	litre
μ	mikro
Hz	Hertz
M	molar
V	volt

Kısaltmalar

PRP	trombositçe zengin plazma
PPP	trombositçe eksik plazma
PMMA	polimetil metakrilat
CaCl ₂	kalsiyum klorür
FA	formaldehit
FSC	ileri saçılma
SSC	yan saçılma
PE	fikoeritrin
PerCP	peridinin-klorofil-protein kompleksi
FITC	Floresein izotiyosiyanat
vWF	von Willebrand Faktörü
PDGF	trombosit kaynaklı büyüme faktörü
VEGF	vasküler endotelyal büyüme faktörü
TGF	transforme eden büyüme faktörü
HIFU	yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason

1. GİRİŞ

Trombositler pıhtı oluşumu ve yara iyileşmesinden sorumlu kan hücreleridir. Hasarlı vasküler duvarda açığa çıkan kolajen ve/veya von Willebrand faktörü ile etkileşime girerek trombositlerin aktivasyon süreci başlar. Aktivasyon reseptörlerinin etkin hale gelmesinden sonra trombosit içerisindeki granüllerde paketlenmiş biyomoleküller açığa çıkar. Bu granüllerden en önemlisi olan alfa-granüllerde bulunan faktör V, faktör IX ve faktör XIII molekülleri pıhtılaşma yolağını destekler. Alfa-granüllerde bulunan büyüme faktörleri ise ilgili bölgede yenilenme ve iyileşme sinyallerini verir [1].

Büyüme faktörleri bu yönleri ile araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Kanın santrifüj edilerek kırmızı kan hücrelerinden arındırılması ile elde edilen kan plazmasının trombosit sayısı tam kandakinden daha yüksektir. Buna bağlı olarak büyüme faktörlerinin derişimi de daha yüksektir. Bu plazmanın hazırlanması için kabul görmüş deneysel protokollerin yanında çeşitli ticari kitler de mevcuttur. Bu yöntemlerle trombositçe zenginleştirilmiş kan plazmasına trombositçe zengin plazma (platelet-rich plasma (PRP)) denilmektedir. PRP doku yenilenmesi için rekonstrüktif ve plastik cerrahi, maksillofasial cerrahi ve oral implantoloji, kas ve eklem hedefli sportif vakalarda tedavi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

PRP'nin etkisini arttırmak isteyen bilim insanları trombositleri aktive ederek büyüme faktör salınımı tetiklemeyi amaçlamışlardır. Bunun için trombosit aktivasyonunu tetikleyen trombin, adenozin difosfat (ADP), kalsiyum klorür gibi uyarıcılar kullanılmaktadır. Bu sayede büyüme faktörlerinin derişiminin arttığı kanıtlanmıştır. Ancak, kullanılan kimyasalların yan etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Bu sebeple alternatif aktivasyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Trombositlerin kimyasal kullanılmadan mekanik etkilerle aktive edilebileceği reolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Sıvının akış sırasında kanal boyunca yüzeye teğetsel uyguladığı kuvvetin bir ölçüsü olan kayma gerilimi trombositlerde aktivasyonu tetiklemektedir. Bu kuvvet mikroakışkan bir düzenek yardımı ile sağlanabilmektedir. Bu çalışmada 50 – 250 dyne/cm² aralığında farklı karakteristiklere sahip kayma gerilimleri iki farklı mikroakışkan çip tasarımı (sütunlu ve düğümlü) kullanılarak uygulanmıştır. Bunların yanında piezoseramik elektrot kaynaklı ultrasonik ses dalgaları kullanılan bir düzenek hazırlanmıştır.

Mikroakışkan çipler ve ultrasonikasyon düzeneğinin hazırlanmasında polimetil metakrilat (PMMA) tabakalar kullanılmıştır. Biyouyumlu bir polimer olan PMMA CO₂ lazer ile işlenerek istenen desenler oluşturulmuştur. Hedef boyut özellikleri optik profilometre yardımı ile karakterize edilmiştir. Piezo elektrotların AC güç kaynağı ile uyarılması ile üretilen ultrasonik ses dalgalarının karakteristikleri osilatör ile belirlenmiştir.

Trombositler hazırlanan aktivasyon düzeneklerinde işlem gördükten sonra trombositlere özgü CD61 ve aktive trombositlere özgü CD62P (P-Selektin) belirteçleri yardımı ile floresan moleküllerle işaretlenmiştir. Floresan işaretli trombositler akım sitometrisi ile incelenmiş ve aktivasyon oranları tespit edilmiştir. Bütün çiplerden alınan sonuçlar karşılaştırılarak en verimli sistem saptanmıştır. Bu çalışmalarda negatif kontrol olarak işlem görmeden fikse edilmiş trombositler ve pozitif kontrol olarak trombin/kalsiyum klorür ile uyarılmış trombositler kullanılmıştır.

Bu çalışmada ekonomik, kayma gerilimi kaynaklı trombosit aktivasyonu prensibine dayalı, mikroakışkan ve ultrasonik yöntemlerde bu aktivasyonu sağlayabilecek cihazlar üretilmesi ve elde edilen trombositlerin akım sitometrisi ile CD62P ekspresyonuna bağlı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Trombositler

Trombosit ya da plateletler, kemik iliğindeki megakaryositlerde üretilen ve pıhtı oluşumundan sorumlu çekirdeksiz kan hücreleridir. Yunanca, pıhtı anlamına gelen “thrombos” ve hücre anlamına gelen “cytos” kelimelerinden türetilmiştir [2,3].

Diğer kan hücrelerine kıyasla oldukça küçük olan trombositlerin boyu 2-3 µm arasındadır. Sağlıklı bir insanda ortalama 10 gün ömre sahip olan trombositlerin kandaki konsantrasyonu 150000 – 400000 hücre/µL arasındadır. Bu aralığın altındaki anormallikler trombosit eksikliği (trombositopeni), üzerindeki anormallikler trombosit fazlalığı (trombositemi) olarak isimlendirilir [2,3].

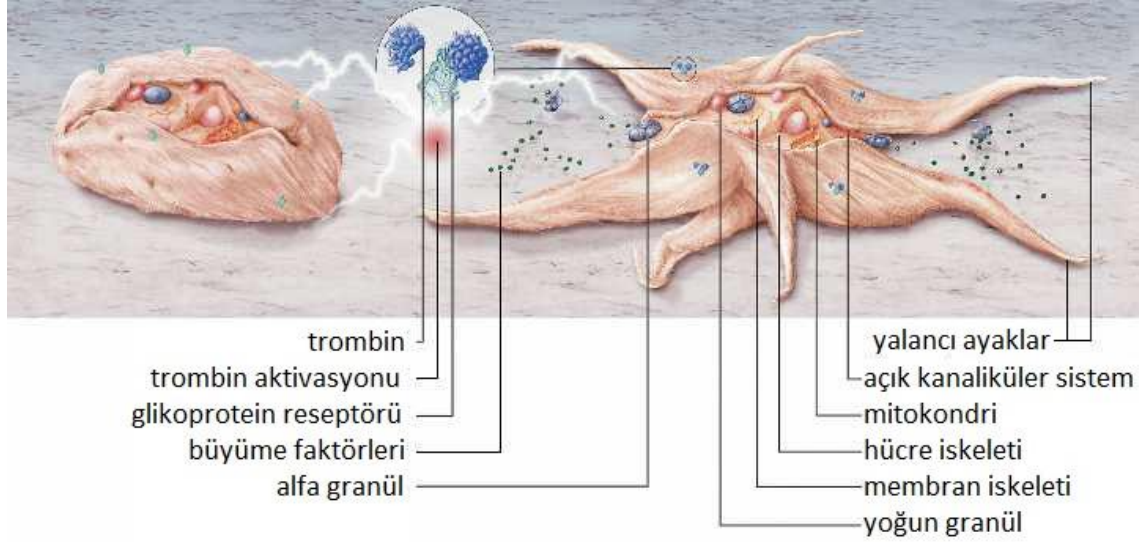
Trombositlerin temel görevi olan kanamayı durdurma, hemostazis denilen bir dizi pıhtılaşma reaksiyonu sonucu gerçekleşir. Bunun için, zedelenen bölge ile etkileşime geçen trombositler aktive olarak birbirlerine yapışırlar ve kümelenirler. Daha sonra, ihtiva ettikleri granüllerden saldıkları trombin ve Ca²⁺ ile kanda çözülmüş halde bulunan fibrinojen monomerinden fibrin polimeri oluşumu reaksiyonunu başlatırlar. Fibrinler çok yapışkan ağsı ipliklerdir. Bu sayede zedelenmiş dokuya ve kan hücrelerine yapışarak hemostazis'i gerçekleştirirler [1].

Trombositlerin salgıladıkları biyolojik materyaller bünyesinde barındırdığı granüllerde paketlenmiş halde bulunur. Trombositlerin aktivasyonu ile birlikte bu granüller yaralı bölgeye salınır ve iyileşme sürecinin başlaması için gerekli sinyalleri verirler [4].

2.1.1. Yapışma ve Kümelenme

Kan damarlarında dolaşım halindeki trombositlerin topaklanması ve aktivasyonu damar iç yüzünde bulunan endotelial hücreler tarafından üretilen kimyasallar ve proteinlerle inhibe edilir. Endotelial hücrelerin ürettiği; prostasiklinler trombosit aktivasyon ve

kümelenme yolağını inhibe eder, nitrik oksit vazodilasyonu sağlayarak trombositler uygulanan kayma gerilimini azaltır, heparin sülfat koagülasyon kaskadında görev alan enzimleri inaktive eden antitrombinleri aktive eder [5].



Şekil 2.1. Durağan (solda) ve aktive olmuş (sağda) plateletlerin şematik görüntüsü. Trombin gibi bir aktivatör molekül ile aktive olan plateletler yalancı ayaklar oluşturarak platelet agregasyonu sağlarlar. Glikoprotein bazlı açık kanaliküler sistemlerden büyüme faktörleri salgılanır [6].

Ancak, damarda bir hasar gerçekleştiğinde trombosit yapışması ve aktivasyonu mekanizmasının başlatan kollajen açığa çıkar. Kan glikoproteinlerinden von Willebrand Faktörü (vWF) kollajene yapışır. Dolaşımdaki trombositlerin membranında yer alan glikoprotein GP Ib kollajene bağlanmış vWF'ye bağlanır. Trombositler membranlarındaki GP Ia ve GP VI glikoproteinleri ile doğrudan kollajene bağlanır. Bu şekilde, kollajen üzerinde trombosit kümelerinden oluşan bir tabaka meydana gelir [2,7]. Mekanizmanın bu kısmı yapışma kısmıdır. GP Ib, GP Ia, GP VI reseptörlerinin bağlanmasıyla trombositleri aktivasyon sinyalleri verilir ve trombosit diskoid şeklini bozarak yalancı ayaklar çıkartmaya başlar (Şekil 2.1). Yapışan trombosit aynı zamanda, sirküle haldeki diğer trombositleri aktive etmek için granüllerini ve onların barındırdığı sinyal moleküllerini de salgılar. Bu konformasyonel değişikliğin sebebi koagülasyonda en önemli görevi üstlenen GP IIb/IIIa integrin reseptörlerini açığa çıkarmaktır. Bu kompleks reseptör, kanda serbest halde dolaşmakta olan fibrinojene bağlanır. Fibrinojen sirküle trombositlerin bağlanması için köprü görevi görmektedir. Her yeni bağlanan

trombosit de bu mekanizmayı çalıştırarak daha fazla trombositin hasarlı bölgede kümelenmesine sebep olarak kanamayı durduracak pıhtıyı oluşturur [3,7].

2.1.2. Granüller

Trombositlerin ekirdeği olmadığından genomik DNA'ları yoktur. Buna karşın, protein üretmeleri gerektiğinde sahip olduğu megakaryosit kaynaklı mRNA'ları kullanırlar. Ancak trombositler bazı proteinleri sentezleyebilse de önemli bir kısmını megakaryositler tarafından paketlenmiş halde sitoplazmasında barındırır. Bu paketler granüller olarak adlandırılmaktadır [2].

2.1.2.1. Alfa-granüller

Trombositlerin içerdiği granüllerden en önemlisi ve en büyüğü alfa-granllerdir. Boyları 200 – 500 nm arasında değişen bu granüllerden her trombositte ortalama 50 – 80 tane bulunur [8]. Plateletlerin periferik kan yaymalarında kullanılan granül hedefli boyalarla pozitif sonuç vermesi alfa-granüller sayesinde. Alfa-granüller trombositin görev aldığı hemostazis ve trombozis mekanizmalarında görev alan bir çok faktörü (faktör V, XI, XIII, fibrinojen, vWF ve yüksek molekül kütleli kininojenler), trombositin damar duvarına yapışmasında etkili molekülleri (fibronektin ve vitronektin) ve inflamasyon, yara iyileşmesi gibi yolakları tetikleyen mitojenik büyüme hormonlarını (platelet (trombosit) kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), vd.) içerir [3]. Alfa-granüllerin içeriğinin tam hali izelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Alfa-granüllerin İçerdiği Biyokimyasal Moleküller [8].

<i>Tür</i>	<i>Örnek</i>
<i>İntegral membran proteinleri</i>	α Ib β 3, GPIb α -IX-V, GPVI, TLT-1, P-selektin
<i>Pıhtılaştırıcılar, antikoagülanlar, fibrinolitik proteinler</i>	Faktör V, faktör IX, faktör XIII, antitrombin, protein S, doku faktörü yolu inhibitörü, plazminojen, plazminojen aktivatör inhibitör 1, α_2 -makroglobülin
<i>Adezyon proteinleri</i>	Fibrinojen, von Willebrand faktörü, trombospondin
<i>Kemokinler</i>	CXCL1 (GRO- α), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, β -TG, CTAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1 α), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES)
<i>Büyüme faktörleri</i>	Epidermal büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü β
<i>Anjiyojenik faktörler ve inhibitörler</i>	Vasküler endotelial büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, platelet kaynaklı büyüme faktörü, metaloproteinazların doku inhibitörleri, anjiyostatin, endostatin
<i>Mikrobisidal proteinler</i>	Timozin- β 4, trombosidin 1 and 2 (NAP-2)
<i>Bağışıklık medyatörleri</i>	Komplement C3 öncülü, komplement C4 öncülü, β 1H Globulin, faktör D, faktör H, C1 inhibitör, IgG

Ayrıca, trombositin aktivasyonu sonrası membranda eksprese olan ve koagülasyondan sorumlu GP Ib kompleksi, GP VI, GP IIB/IIIa kompleksi ve CD62P (P-Selektin) gibi glikoproteinler de alfa-granüllerin membranında bulunur [3]. P-Selektin trombosit aktivasyonu çalışmalarında aktivasyon derecesi belirlenmesi için çokça kullanılan bir antijendir. Florofor bağlanmış anti-CD62P antikoru bu bölgeleri hedef alarak aktive

olmuş trombositlerden floresan sinyal yayarlar. Aktive olmuş hücrelerin sayısı ve yüzdesi akım sitometrisi (flow cytometry) cihazı ile belirlenebilmektedir. Aynı plateletler, bütün plateletlerde bulunan CD61 ve/veya CD41 antijenlerini hedef alan antikörlerle işaretlendiğinde aktive olanların yüzdesi akım sitometrisi dağılımında saptanabilmektedir [9].

2.1.2.2. Delta-granüller

Delta- ya da yoğun (dense)-granüller, alfa-granüller gibi sadece trombositlerde bulunur. Ancak, alfa-granüllerden sayıca daha az (3 – 8) ve boyut olarak daha küçüktürler (150 nm). İnflamasyon ve yara iyileştirmede doğrudan görev almamalarına karşın, en önemli görevleri içerdikleri yüksek katyon (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+) konsantrasyonu ve biyomoleküller (ADP, ATP, UTP, GTP) ile diğer trombositlerin de aktive olmasını tetiklemektir [8]. Delta-granüllerin tam içeriği Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Delta-granüllerin İçerdiği Biyokimyasal Moleküller [8].

<i>Tür</i>	<i>Örnek</i>
<i>Katyonlar</i>	Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+
<i>Fosfatlar</i>	Polifosfat, pirofosfat
<i>Biyoaktif aminler</i>	Serotonin, histamin
<i>Nükleotitler</i>	ADP, ATP, UTP, GTP

Delta-granüller elektron mikroskobu ile analiz edildiğinde yüksek elektron yoğunlukları sayesinde görülebilmektedir. Ayrıca, trombositlerden salındıklarında bulundurdukları CD63 ve LAMP-2 membran proteinlerini eksprese ederler. Bu sayede akım sitometrisi ile saptanabilmektedirler [8].

2.1.2.3. Lizozomlar

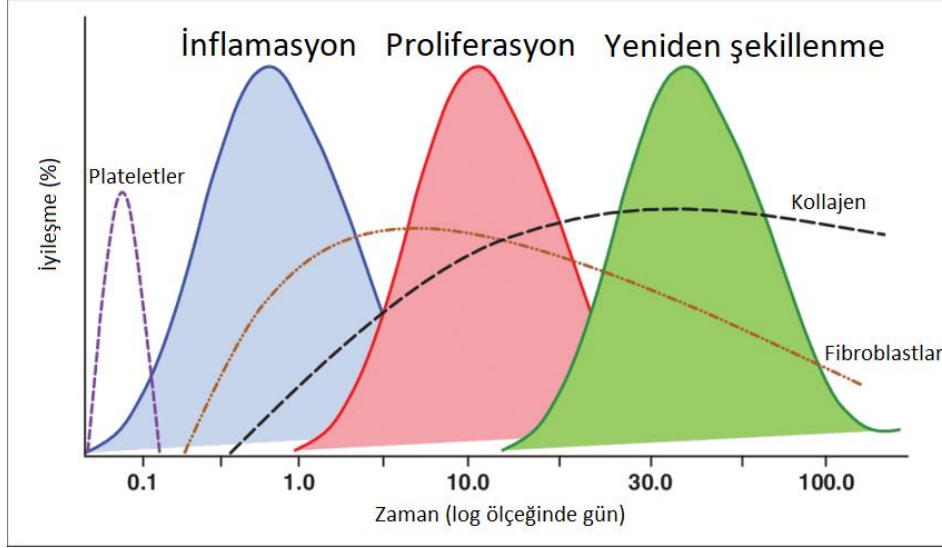
Trombositlerde bulunan lizozomların fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamış olsa da çekirdekli hücrelerdeki lizozomlar gibi endozomal sindirimde görev aldıkları düşünülmektedir. Her bir trombositte 3'ten daha az sayıda bulunan lizozomlar 200 – 250 nm büyüklüğe sahiptir. Delta-granüller gibi membranlarında CD63 ve LAMP-2 membran proteinleri bulunur [8]. Trombositlerin lizozomlarının tam içeriği Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Lizozomların İçerdiği Biyokimyasal Moleküller [8].

<i>Tür</i>	<i>Örnek</i>
<i>Protein sindiren enzimler</i>	Katepsinler, elastaz, kollajenaz, karboksipeptitaz, prolin karboksipeptidaz
<i>Karbohidrat sindiren enzimler</i>	Glukosidaz, fukosidaz, galaktosidaz, glukuronidaz, mannosidaz, heksosaminidaz, arabinofuranosidaz
<i>Fosfat ester parçalayan enzimler</i>	Asit fosfataz

2.1.3. Yara İyileşmesi

İyileşme kaskadının başlaması için vasküler dokuda hasar ve/veya kanama meydana gelmesi gerekmektedir. Bu hasar herhangi bir dokuda oluşacak bir başka hasarla tetiklenebilir. Dokularda kesilme, delinme, künt travma, aşırı kullanım ve yüklenme gibi durumlar söz konusu olduğunda vasküler dokulardaki kanama iyileşme sürecini tetikler. İyileşme süreci sırasıyla; pıhtı oluşumu, inflamasyon, proliferasyon ve doku yeniden şekillendirilmesi evrelerinden oluşur (Şekil 2.2). Ancak, bu evreler birbirinin devamı olarak değil örtüşüm şeklinde gerçekleşir [4,10].



Şekil 2.2. İyileşme kaskatındaki evreleri gösteren diyagram. Kesikli çizgiler yara iyileşmesinde görev alan hücre ve biyomoleküllerin zamana göre artışını, sürekli çizgiler evreleri göstermektedir [11].

Pıhtı oluşumu evresi, bir diğer adıyla hemostazis trombositlerin hasar görmüş vasküler doku altındaki kollajen tabakasıyla etkileşimi ile başlar. Başlıca amaç kanamayı durdurmaktır. Kanamayı durdurmak için trombositler koagüle olarak bir tıpa (pıhtı) meydana getirir. Bu sırada trombositler aktive olur ve salgıladıkları faktörler ile protrombini trombine çeviren protrombinaz enzim kompleksinin oluşumunu tetikler. Trombin de kanda çözünebilir fibrinojeni çözünmeyen fibrine dönüştürerek ağsı ve yapışkan bir yapı oluşmasına neden olur.

Bu ağa yapışan trombositler bir saat içerisinde granüllerinin %95'ini salarlar. Bu granüllerden salınan büyüme faktörleri, iyileşmenin ikinci evresinde görev alan hücrelerin ilgili bölgeye migrasyonunu tetikler [1,2,10].

İnflamasyon evresinde, oluşan hasar sırasında metabolizmaya zarar verebilecek mikrobiyal istilacıları, yabancı maddeleri, nekrotik ya da hasarlı hücreleri yok edecek enflamatuvar yanıt oluşturulur. Bu görevi üstlenen hücreler beyaz kan hücreleridir. Granülosit ve monositler istilacıları fagosite ederken, lenfositler de bağışıklığı güçlendirir [12].

Kaybedilen vasküler dokunun yenilediği evre proliferatif evredir. Trombositlerden salınan büyüme faktörleri hücre bölünmesini tetikleyici sinyaller gönderir. Üretilecek yeni hücreler için gerekli enerji ve oksijenin taşınması için önce vasküler iyileşme sağlanarak hasarlı damar onarılır [4].

Kaybedilen dokunun tam anlamıyla geri kazanılması yaranın büyüklüğüne bağlı olarak birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilir. Yara iyileşmesinin son ve en uzun olan evresi, dokunun yeniden şekillendirilmesidir. Bu aşama kolajenin sürekli üretilip yıkıldığı bölümdür. Dokunun hasardan önceki haline olabildiğince benzeyene kadar bu işlem devam eder [2,4].

2.2. Trombositçe Zengin Plazma (PRP)

Trombositçe Zengin Plazma (Platelet-Rich Plasma (PRP)) kısaca trombosit konsantrasyonu artırılmış kan plazması olarak tanımlanır. Sağlıklı insan kanında mikrolitrede $150 \times 10^3 - 400 \times 10^3$ trombosit bulunur. Bu konsantrasyon değeri, ekstrakorporeal yöntemlerle 10^6 hücreye kadar çıkartılabilir. Perioperatif yöntemlerle otolog tam kandan hazırlanan PRP'nin başlıca kullanımını postoperatif iyileşme sürecinin hızlandırılmasıdır [6].

$$\text{Platelet verimi (\%)} = \frac{\text{PRP hacmi} \times \text{PRP platelet konsantrasyonu}}{\text{Tam Kan hacmi} \times \text{Tam Kan platelet konsantrasyonu}} \times 100$$

$$\text{Zenginleştirme Faktörü} = \frac{\text{PRP platelet konsantrasyonu}}{\text{Tam Kan platelet konsantrasyonu}}$$

Hazırlanan PRP değerlendirilirken, konsantrasyonun kaç kat arttırıldığını ifade eden zenginleştirme faktörü ve tam kandan toplanabilen trombosit sayısını ifade eden trombosit verimi terimleri önemlidir. Bunlarla beraber, uygulama alanına yönelik olarak hazırlanan PRP'nin hacmi ve büyüme faktörü içeriği de dikkat edilmesi gereken faktörlerdir [2,13].

2.2.1. PRP Hazırlanması

PRP hazırlanması için Arteriocyte MagellanPRP, Biomet GPS serisi, Curasan, Harvest Smart PreP, Regenlab RegenKit gibi birçok ticari kit mevcuttur¹³. Bu kitlerde kan alma aparatı, kanın alındığı tüpler, seperatör jel kullanılması ya da kullanılmaması, seperatör jellerin içeriği, alınan tam kan miktarı ve elde edilen PRP miktarı gibi farklılıklar olsa da temelinde santrifüj ile ayırma vardır [6,14]. Bu kitler ile ilgili bazı parametreler Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. PRP hazırlama protokolleri ve kitlerinin kullanıldığı yayınlardan karşılaştırmalar[14].

Sistem	PRP			Hazırlama		
	Platelet $\times 10^3/\mu\text{L}$	Tam kandan platelet arttırım faktörü	PRP hacmi (mL)	Kan Hacmi (mL)	Santrifüj kuvveti	Santrifüj süresi (dk)
Anitua Protokolü	433 ± 129	1.9	9.5 ± 4.1	-	-	-
Arteriocyte MagellanPRP™	780.2 ± 24.7	2.8 ± 0.8	6.0	26	1200 x g	17
	1520	9.05	3	60	610 x g; 1240 x g	4 ve 6
Arthrex ACP®	261	1.7	4.0	9.0	-	-
Biomet GPS® II	477	1.89	6.01	50	180 x g	15
Biomet GPS® III	566.2 ± 292.6	2.07 ± 1.1	6.0	55	1100 x g	15
Harvest® Smart PReP	1228 ± 312	4.43	7.0	48-52	-	12
	1086 ± 227	4.04	7.4	-	-	-
	917.3	3.35	10.0	50	-	-

Sistem	PRP			Hazırlama		
	Platelet x10 ³ /μL	Tam kandan platelet arttırım faktörü	PRP hacmi (mL)	Kan Hacmi (mL)	Santrifüj kuvveti	Santrifüj süresi (dk)
Korea Melsmon Co., Thrombo Kit	700	4.14	1.0	8.5	1720 x g	8
Landesberg Protocol (Mistral 3000i Santrifüj)	336 ± 141	1.5	10.6 ± 2.4	-	200 x g; 200 x g	10; 10
Landesberg Protocol	465	1.7	10.6 ± 2.4	60	-	-

Bu ticari kitlerin dışında literatürde kabul görmüş PRP hazırlama protokolleri mevcuttur [13,15–19]. Bunlardan bir tanesi çift santrifüj işlemine tabi tutulan Landesberg Protokolüdür [13,15,16]. Bu yöntemde önce 30 mL kan antikoagülant içeren kan toplama tüpüne alınır. Bu tüp 200 G’de 15 dakika santrifüjlenir. 18-G küt uçlu iğne ucu ile buffy coat (beyaz kan hücreleri ve trombositlerin bulunduğu tabaka) ve plazmanın tamamı toplanır. Bu noktada ve kan alınırken kullanılan iğnenin 18-G olması, trombositlerin transfer sırasında üzerine uygulanan kayma gerilimi sayesinde aktive olmaması için önemlidir [iğnenin aktivasyona etkisi ile ilgili atıf]. Toplanan plazma konik dipli tüpe aktarılır ve 200 G’de 10 dakika daha santrifüjlenir. Plazmanın üstte kalan yarısı Trombositten Yoksun Plazma (PPP (Platelet-Poor Plasma))’dır. Bu kısım atılarak geri kalan kısmın 4 – 6 mL’lik kısmı konik dipli tüpün dibinden toplanarak PRP elde edilir [14–16].

Santrifüj işlemi tek aşamadan oluşan PRP hazırlama yöntemine Anitua Protokolü örnek verilebilir [13,14,18]. Bu yöntemde antikoagülant içeren 5 mL’lik kan tüpüne alınan kan örnekleri kullanılır. İstenen PRP miktarına göre tüp sayısı arttırılabilir. Tüp veya tüpler 160 G’de 6 dakika santrifüjlendikten sonra plazmanın üstteki 1 mL’lik kısmı PPP olarak

atılır. Kalan plazmanın en alt kısmından 1.2 mL'lik kısmı kırmızı kan hücresi katmanının 1 – 2 mL'lik kısmını da içerecek şekilde toplanır [18].

2.2.2. PRP Uygulamaları

PRP kullanımının geçerliliğinin kabul gördüğü ilk yayınlardan birine ait olan Marx ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, PRP kullanıldığında trombositlerin içerdiği PDGF ve TGF-b sayesinde kemik hücrelerinin yenilenme hızının arttığını ve bir immün cevap oluşturmadığını göstermektedir. Bu sayede PRP, kemik grefti ve ortopedik vakalarda kullanılabilir [17].

Trombositlerin yumuşak doku yenilenmesini hızlandırma özelliği sayesinde rekonstrüktif ve plastik cerrahilerde [20,21], maksillofasiyal cerrahi ve oral implantolojide [22], kas ve eklem hedefli sportif vakalarda [10] kullanılmaktadır.

Trombositlerin aktivasyonu sonucunda açığa çıkan alfa-granüller ve onların içerdiği büyüme faktörleri sayesinde iyileşmenin hızlandığı klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır.

2.2.3. PRP Aktivasyonu

Trombositler yara iyileşmesi ve doku yenilenmesindeki etkisi sayesinde araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Literatürde sıklıkla rastlanan trombositlerin otolog PRP olarak uygulamalarının yanında, aktive edilmiş trombositlerin salgıladıkları büyüme faktörlerinin etkisiyle trombosit aktivasyonu da önemli bir araştırma alanı olmuştur. Aktive edilmiş PRP uygulamalarının öncülerinden olan Marx ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, aktive edilmiş trombositlerin kemik grefti üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Trombin/kalsiyum karışımı ile aktive edilmiş PRP uygulanmış kemik greftinin olgunluk endeksi, uygulanmamış greftinkine oranla ilk 2. ve 4. ayda 2 kat, 6. ayda ise 1,5 kat daha yüksek bulunmuştur [17]. Bu sayede, aktive edilmiş trombosit uygulamaları üzerine yapılan araştırmalar çoğalmıştır.

2.2.3.1. Kimyasal Yöntemle Trombosit Aktivasyonu

Trombositlerin kimyasal yolla aktivasyonu hemostaziste görev alan kalsiyum, trombin, kollajen, fibronektin, tromboksan A2, ADP gibi faktörlerin PRP'ye uygulanması temeline dayanmaktadır [23].

Bunların haricinde, ilgili reseptörle aktive eden trombin reseptör aktivatör peptid (TRAP) gibi moleküllere de literatürde sıklıkla rastlanmaktadır [16,24].

Fufa ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada Tip 1 kollajen ve trombin ile aktive edilmiş trombositlerden salınan TGF, VEGF ve PDGF miktarlarını karşılaştırarak, trombin ile aktivasyon sonucunda ilk 12 saatte ortalama 3 kat daha fazla büyüme faktörü salındığını göstermişlerdir [25].

TRAP ve ADP moleküllerinin, trombosit-trombosit agregasyonuna etkisinin karşılaştırıldığı, Hagberg ve arkadaşlarının çalışmasında trombositlerin agregatlardaki oranları TRAP ve ADP için sırasıyla %33 ve %20 olarak gösterilmiştir. Benzer şekilde trombosit mikroparçacıklarının da trombosit popülasyona yüzdesi hesaplandığında TRAP %6, ADP ise %3 seviyelerinde görülmektedir. Buradan sonuçla TRAP'in trombosit aktivasyonu ve agregasyonu başlatıcısı olarak daha verimli olduğu görülmektedir [24].

Araştırmacılar kalsiyum ve trombinin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığı çalışmalar yaparak aktivasyon üzerine etkilerini araştırmışlardır [15,17,26–30]. Cavallo ve arkadaşlarının araştırmalarında da belirttiği gibi kalsiyum kullanımı pıhtı oluşumu ve büyüme faktörlerinin salınımında 30 dakika gibi kısa bir sürede başarılı olmuştur. Bunun yanında, trombin ve kalsiyumun birlikte kullanılmasıyla bu süre 15 dakikaya düşmüştür [29]. Bu nedenle ve literatürde kabul görmüş bir yöntem olması sebebiyle, yapılacak platelet aktivasyon çalışmasında kalsiyum ve trombinle yapılan aktivasyon çalışması pozitif kontrol olarak seçilmiştir.

2.2.3.2. Mekanik Yöntemle Trombosit Aktivasyonu

Trombositlerin kimyasal agonist kullanmadan, mekanik yöntemlerle aktivasyonunda kullanılan iki yöntem vardır. Bunlardan biri trombositin reometrik olarak uyarılmasıdır. Bu etki trombositte kayma gerilimi uygulanarak sağlanmaktadır. Mikroakışkan çiplerde [31,32] akış ile uygulanabilecek kayma gerilimi reometre [33] (akışölçer) adı verilen bir cihazla da sağlanabilmektedir. Diğer yöntem de ses dalgaları kullanarak trombosit üzerinde stres oluşturulmasına dayanmaktadır. Araştırmacılar bu etkiyi incelemek için yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (high-intensity focused ultrasound (HIFU)) uygulamışlardır [34,35]. Bunun yanında sıradan sonikasyon işlemleri ile de aktivasyon sağlanabilmektedir [33].

Kan ile kayma gerilimi arasındaki ilişki ilk olarak 19. yüzyılda Alman patolojist Doktor Rudolf Virchow tarafından araştırılmıştır. Trombosit agregasyonuna etki eden üç faktörü ortaya koyduğu çalışması Virchow Triadı (Virchow Üçlüsü) olarak anılmaktadır. Bu üç faktör; kanda bulunan çözünmüş ve hücre sel bileşenler, kan damarlarının yapısı ve kanın akışıdır [36].

Takip eden yıllarda bu hipotezi destekleyici çalışmalar yapılmış olmasının yanında, trombositlerin doğrudan reometre cihazıyla kayma gerilimine maruz bırakılarak araştırılması 1975 yılında Brown ve arkadaşları tarafından gerçekleştirmiştir. PRP'ye uygulanan patolojik seviyedeki kayma geriliminin trombositlerde morfolojik değişimler, granül salınımı ve agregasyona sebep olduğunu göstermişlerdir[37]. Bu sonuçların oranındaki artışın uygulanan kayma geriliminin süresiyle doğru orantılı olduğunu Weiss ve arkadaşları 1978 yılında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir [38].

Kan damarlarında oluşan hasar sonucu, laminar akış halindeki kan hücrelerinin akışındaki bozulma sebebiyle de trombositlerin agregasyonu ve aktivasyonu tetiklenmektedir. Bu bozulma sebebiyle trombosit üzerine etki eden kayma gerilimi trombositlerin yapısal şekil bozukluğunu tetikleyerek aktivasyonu sağlar [37–39]. Trombosit üzerinde kayma gerilimini oluşturmak için, araştırmacılar mikroakışkan çip [40,41] ve onların manyetik karıştırıcılı kombinasyonları [42,43] ile in vitro yöntemler geliştirmişlerdir.

Kayma gerilimi ile trombosit aktivasyonu belirleme için uygun markörlerin (CD62P ve PAC-1) karşılaştırıldığı çalışmada kayma gerilimi trombositler üzerine konik reometre ile uygulanmıştır. 120 saniye uygulanan 5 – 20 Pa kayma geriliminin trombositleri aktive ettiği ve uygun markörün CD62P olduğu gösterilmiştir [44].

Mekanik trombosit aktivasyonunun bir başka yöntemi de akustik dalgalarla uygulanmaktadır. Ultrasonik dalgaların karaciğer kanaması üzerindeki etkisini ilk olarak Vaezy ve arkadaşları incelemiştir. Tavşan karaciğerlerinde kesik açılarak yapılan kontrollü deneyde Yüksek Yoğunluklu Odaklanmış Ultrason (High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU)) kullanılarak kanama durdurulmuştur. Bu süreçte iki zaman noktası belirlenmiştir. Bunların ilki, yoğun kanamanın kan sızıntısına döndüğü ana hemostaz; ikincisi de kanamanın tamamen durduğu tam hemostaz süreleridir. HIFU ile gerçekleştirilen bu hemostazın tüm süreci akustik hemostaz olarak adlandırılmaktadır [45].

Vaezy yaptığı incelemede HIFU'nun neden olduğu akustik hemostazın iki mekanizmadan oluştuğunu anlatmaktadır [46]. Bunlardan ilki dokunun ses dalgası formundaki enerjiyi soğurması sonucunda aniden ısınmasıdır. En fazla 70-80 °C'lere kadar çıkan dokuda yapısal bir bozukluk gözlenmese de ilgili bölgede ağarma oluşmaktadır. Bu sıcaklıklarda suyun uzaklaşması ve kolajenin büzülmesi sebebiyle kan damarlarının daralması ve pıhtı oluşumu gerçekleşmektedir [47]. İkincisi ise mekanik etkidir. Burada da sıcaklık artışı sağlayan, sıvı içerisinde oluşan akustik kaviteasyonlardır. Ses dalgasının oluşturduğu çok yüksek ve çok düşük basınç dalgaları arasında bu kaviteasyonlar oluşup yok olurlar. Bu kaviteasyonların sıcaklıkları baloncuğun çökmesi esnasında birkaç bin Kelvin'e kadar çıkmaktadır [48].

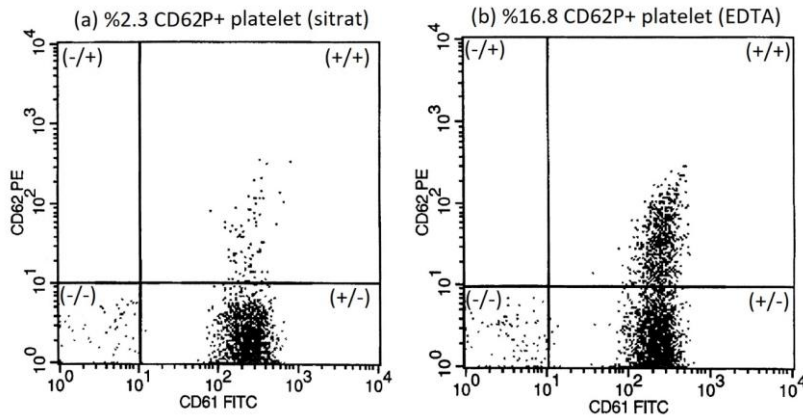
2.2.4. Aktive Edilmiş Trombositlerin Belirlenmesi

Avrupa Klinik Hücre Analizi Çalışma Grubu'nun 1998'de yayınladığı incelemede trombositlerin analizine yönelik birçok yöntem sunulmuştur [49]. Trombosit aktivasyon analizi için işaret edilen ve literatürde de sıklıkla rastlanılan yöntem, trombosit

aktivasyonuna bağılı olarak salınan alfa-granüllerin iç membranında bulunan CD62P (P-Selektin) reseptörünün florofor-antikor kompleksiyle işaretlenmesidir [7,24,26,30,44].

Aynı incelemede bahsedilen bir diğerk antikor ise aktivasyon sonrası konformasyonel değişikliğe uğrayan GP IIb/IIIa'yı hedef alan PAC-1 antikorudur. Ancak, Lu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada P-Selektin'in daha stabil olduğunu, PAC-1'in kullanılan tampona bağımlı olarak kararsız olduğunu göstermişlerdir [44].

Antikor seçiminden bağımsız olarak, boyanmış hücreler akım sitometrisi veya floresan mikroskop ile analiz edilebilir. Akım sitometrisi kısaca, hücrelerin enerjisi bilinen bir lazer önünden tek sıra halinde geçirilmesi ve florofor molekül ile etiketlenmiş hücrelerin yaydığı spesifik dalga boyundaki ışığın analiz edilmesi ilkesine dayanmaktadır. Floresan mikroskop ile yapılan incelemelerde, etiketlenmiş hücreler periferik yayma işleminden sonra belirli dalga boylarındaki ışığı geçiren filtreleri ve belirli enerjide uyarıcı ışıkları bulunan mikroskop altında incelenerek gözlemlenir.



Şekil 2.3. Antikoagülan olarak (a) %3,8'lik sodyum sitrat ve (b) K₃EDTA içeren tüplere alınan kan örneklerindeki aktive olmuş (CD62P pozitif) plateletlerin yüzdesinin saptanması için kullanılan akım sitometrisi dağılım örneği[9].

Şekil 2.3'te farklı antikoagülan içeren tüplere alınan trombositlerin aktivasyon incelemesinde kullanılan akım sitometrisi örneği gösterilmiştir. Nokta grafik dağılımında x-ekseni bir trombosit belirteci olan CD61 antikoruna bağılı FITC floroforunun yoğunluğunu göstermektedir. Aktive olmuş trombositlerin belirteci olarak seçilen

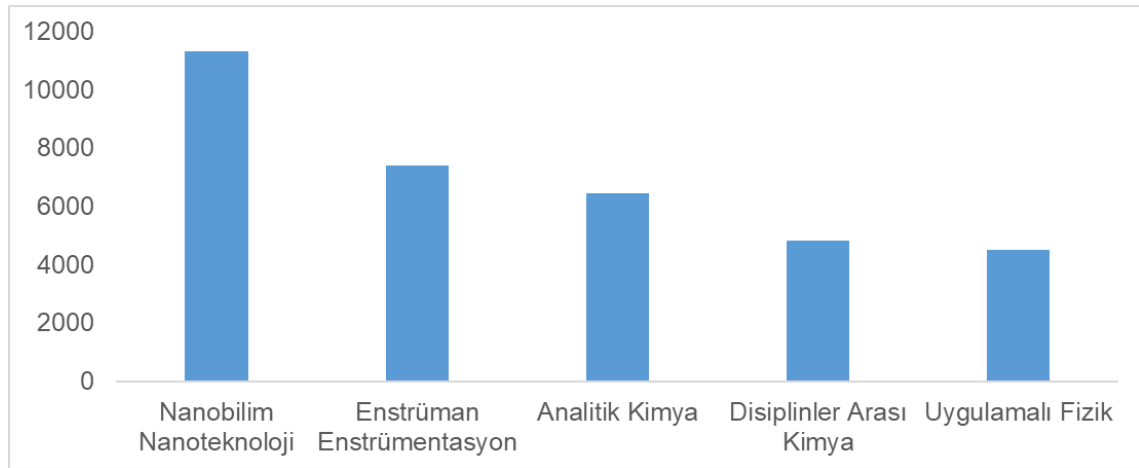
CD62P-PE antikoruna ise y-ekseninde yer almaktadır. Her iki antikorun da yüksek yoğunluk gösterdiği bölgede (++) aktive olmuş trombositler görülmektedir. Sadece CD61+ olan hücreler (+/-) bölgesinde gösterilmektedir. (++) bölgesindeki hücre sayısı, (+/-) ve (++) bölgelerindeki hücrelerin toplamına oranlandığında yüzdece aktive olmuş trombosit oranı saptanabilmektedir. CD61 ile işaretlenmeyen hiçbir hücrenin CD62P ile işaretlenemeyecek olmasından (-/+) bölgesinde hiçbir event görülmemektedir. Hücre sayımı yapılan örnekteki trombosit harici eventler ise (-/-) bölgesinde yer almaktadır.

Floresan mikroskop görsel bir sonuç verirken akım sitometrisi sayısal sonuç vermektedir. Floresan mikroskop ile aktivasyonun yüzdesi net olarak söylenemezken, akım sitometrisi etiketlenmiş hücrelerin sayısını ve oranını vermektedir.

Trombosit aktivasyonunda kullanılan bir diğer yöntem de granüllerden salınan büyüme faktörlerinin belirlendiği Enzime Bağlı Bağışıklık Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA))'dir. Bu yöntemde miktarı belirlenecek her büyüme faktörü için spesifik antikor kullanılır. Renk değişimine dayalı bu yöntemde her büyüme faktörünün konsantrasyonu belirlenebilir. Diğer yöntemlere göre daha detaylı bir sonuç vermesinden dolayı literatürde sıklıkla rastlanan bir analiz yöntemidir [15,16,25,28,29]. Ancak diğer yöntemlere göre oldukça karmaşık ve pahalıdır.

2.3. Mikroakışkan Sistemler

Mikroakışkanlar alanındaki çalışmalar Şekil 2.4'te görüldüğü gibi yoğunlukla nanobilim ve nanoteknoloji alanına odaklanmıştır. Bunun ardından gelen diğer dört alan ise sırasıyla aletsel enstrümantasyon, analitik kimya, disiplinler arası kimya ve uygulamalı fiziktir.



Şekil 2.4. Web of Science veri tabanındaki “Mikroakışkanlar (Microfluidics)” anahtar kelimesine sahip yayın sayısının çalışma alanlarına göre dağılımı, Aralık 2021 itibari ile.

Mikroakışkan sistemler basitçe; sıvı veya gazların kesit boyutları 10-100 µm olan kanallarda geleneksel akış teorisi kullanılarak incelendiği sistemler olarak tanımlanmaktadır [50,51]. En önemli avantajları az miktarda numune ve reaktif madde kullanılması ($10^{-9} - 10^{-18}$ L), düşük maliyet ve kısa analiz süresine sahip olmasıdır. Çeşitli bileşenler ile modifiye edilebilecek bir mikroakışkan sistem kimya, biyoloji ve tıp alanında kullanılabilir. Mikroakışkan sistemler literatürde sıklıkla Çip Üstü Laboratuvar (Lab-on-a-Chip (LOC)) olarak karşımıza çıkmaktadır [52].

LOC ile bir mikroakışkan çip içerisine eklenen sensörler, odacıklar ve bağlantılarla laboratuvarında yapılabilecek bir analizi çok küçük boyutlarda ve yüksek hassasiyetle gerçekleştirmek mümkündür. Sadece analiz için değil yapılacak çip tasarımı ile ayırma yöntemleri için de sıklıkla kullanılmaktadır [52].

2.3.1. Mikroakışkanlarda Kayma Gerilimi

Kayma gerilimi, sıvının yüzey boyunca yatay hareketi tarafından üretilen teğetsel sürüklenme kuvvetidir. Yüzeğe yakın sıvının hız gradyanının bir fonksiyonudur. Büyüklüğü, sıvı akışı ve viskozite ile doğru orantılı ve yarıçapın küpü ile ters orantılıdır [52]. Biyoloji ve mikroakışkanlara uygulanan kayma geriliminin tanımı, hücreler veya dokular üzerinde etkili olan biyolojik bir sıvı akışının sürtünme kuvvetidir. İnsan vücudunda çeşitli genişlikte damarlar bulunmaktadır. Kayma gerilimi akışın olduğu kanalın genişliğine bağlı olduğundan kan akışı sırasında oluşan kayma gerilimi de 1- 50 dyne/cm² arasında çeşitlilik göstermektedir [53].

2.3.2. Mikroakışkan Çiplerin Üretim Yöntemleri

LOC üretmek için yaş dağlama (wet etching), reaktif iyon ile dağlama, litografi, kabartma, enjeksiyon kalıplama, lazer ablasyon, *in situ* üretim, plazma dağlama gibi birçok yöntem mevcuttur. Her yöntemin birbirine karşı üstünlükleri olduğu için araştırmacılar uygulayacakları alana yönelik seçimler yapmaktadır [54].

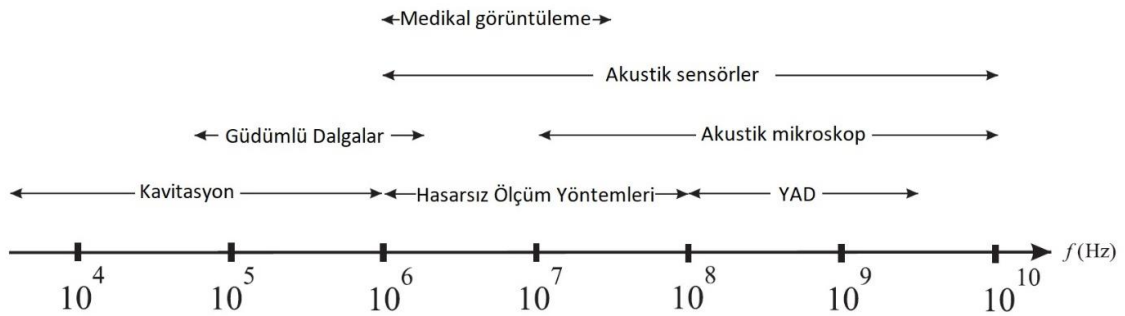
Islak dağlama yönteminde sıvı kimyasallar ve aşındırıcılar kullanılarak kütleli (bulk) haldeki altlıkta tasarlanan desenin oluşması sağlanmaktadır. Bu yöntemde, aşındırıcıdan etkilenmeyen ve genellikle polimer bir malzemedan oluşan maske kullanılarak seçimli aşındırma yapılmaktadır [52,55].

Fotolitografik üretimde de ıslak dağlamaya benzer yöntem uygulanmaktadır. Buradaki fark kullanılan maske malzemesi ve aşındırıcının farklı olmasıdır. Aşındırıcı olarak yüksek enerjili ışık kullanılır. Maske ise belirlenen desene göre negatif ya da pozitif ışık duyarlı seçilebilir [52,56].

Termoplastik tabaka üzerinde istenilen deseni oluşturmak için lazer ablasyon yöntemi kullanılabilir. PMMA, PS, PET, PETG, PC, PVC gibi termoplastik tabakalar kullanılabilir. Ancak, dikkat edilmesi gereken unsur kullanılan lazerin uygun dalga boyu aralığında olmasıdır [54,57].

2.4. Ultrasonik Sistemler

Ses dalgaları frekanslarına (enerji seviyelerine) göre sınıflandırılmıştır. İnsan kulağını algılayabildiği frekans aralığı olan 20 Hz – 20 kHz arası sonik bölge olarak isimlendirilmiştir. Bundan daha küçük frekanstaki bölge infrasonik, daha büyük ve 1 GHz'e kadar olan bölge de ultrasonik olarak adlandırılmaktadır. 1 GHz'ten daha büyük frekansa sahip ses dalgaları ise hipersonik olarak isimlendirilir [58].



Şekil 2.5. Ultrasonik dalgaların frekans aralıklarına göre farklı kullanım alanları [53].

Ultrasonik ses dalgaları; kimya, biyoloji, tıp, fizik, mühendislik, gıda endüstrisi, oşinografi, sismoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Şekil 2.5'te ultrasonik dalgaların frekanslarına göre kullanım alanları özetlenmiştir.

2.4.1. Ultrasonik Dalga Oluşturma Yöntemleri

Ultrasonik enerjinin üretilmesi ve tespit edilmesinde kullanılan cihazlara transdüser denir. Transdüserlerin başlıca görevi bir güç kaynağından alınan enerjiyi başka bir enerji formuna dönüştürmektir. Ultrasonik enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren transdüserlere alıcı (receiver), elektrik enerjisini ultrasonik enerjiye çevirenlere de verici (transmitter) denir [59].

Ultrasonik dalga üretmek için kullanılan transdüserler piezoelektrik, manyetostriktif, elektromanyetik, pnömatik (ışık) ve mekanik cihazlardır. Bunlardan en sık kullanılan piezoelektrik "basınçlı elektrik" tir. Belirli kristalografik eksenler boyunca uygulanan bir fiziksel basınç, tercih edilen kristalografik yüzeyler üzerinde elektrik yükleri üretir. Tam

tersi şekilde elektrik vererek fiziksel basınç uygulamak da mümkündür [59]. Bu basınç ile piezoelektrik malzeme istenilen frekansta titreştirilerek ses dalgaları üretilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Kan hücreleri hematoloji analizörü (Beckman-Coulter, DxH 500, Kaliforniya, ABD) ile sayılmıştır. Kırmızı kan hücrelerini çöktürüp kan plazmasını elde etmek için F1010 rotorlu santrifüj (Beckman-Coulter, Allegra 64R, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Plazmayı ayırmak için 1 mL plastik pastör pipeti (ISOLAB, Almanya) kullanılmıştır. Plazmayı seyreltmek için kullanılan fosfat tampon tuz çözeltisi (10 mM, pH 7.4) PBS tableti (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır. Deneyin tüm aşamalarında kullanılan su Younglin AquaMAX - Basic 360 Series ve Younglin AquaMAX - Ultra 370 Series (Anyang, Güney Kore) cihazları ile saflaştırılmıştır. Elde edilen suyun direnci 18.2 MΩ/cm'dir.

Trombositlerin kimyasal aktivasyonunda ve fiksasyonunda kullanılan sığır trombini, kalsiyum klorür (CaCl₂) ve formaldehit (FA) Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan deney tüpleri, 12 x 75 mm yuvarlak dipli polistiren tüp ve 2 mL polipropilen kapaklı tüp ISOLAB (Wertheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Çiplerin üretilmesinde kullanılan 1 mm ve 5 mm kalınlıktaki polimetil metakrilat (PMMA) tabakalar SDS Ankara Yapı ve Reklam Ürünleri (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Tabakaların yapıştırılmasında kullanılan çift taraflı bant 3M, 468MP BESTEK (Ankara, Türkiye) firmasından edinilmiştir. PMMA tabakalar AEON, NOVA 7 (Jiangsu, Çin) CO₂ lazer (70 W) kesim cihazı ile işlenmiştir. Çip üretim sonuçları Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde HUVITZ, HRM-300 (Anyang, Güney Kore) optik profilometre ile incelenmiştir. Trombosit süspansiyonunun kontrollü enjeksiyonunda kullanılan şırınga pompası NE-1000, New Era Pump (New York, ABD) firmasından temin edilmiştir. Ultrasonikasyon çiplerinde kullanılan piezoseramik elektrotlar, EBL#2 1.0'' square x 5.0 MHz, EBL Products (Connecticut, ABD) firmasından temin edilmiştir. Piezo elektrotların kullanımında AC güç kaynağı olarak Tabor Electronics WW1071, osiloskop olarak Rigol

DS2202A kullanılmıştır. Bağlantı materyali olarak DuPont Pyralux AP kullanılmış ve bağlantılar Rigol DM3058E multimetre ile kontrol edilmiştir. Piezoelektrot denemeleri Doç. Dr. Dinçer Gökçen koordinatörlüğünde Hacettepe Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği'nde yürütülmüştür.

Trombositlerin aktivasyon sonuçları belirlenirken BD FACS Celesta akım sitometrisi cihazı kullanılmıştır. Hücrelerin işaretlenmesinde kullanılan PerCP anti-CD61 ve PE anti-CD62P (P-Selektin) antikoları Biolegend (Kaliforniya, ABD) firmasından temin edilmiştir. Antikolar ile etiketleme işlemi sonrasında yıkama işleminde ISOLAB Yüksek Hızlı Mini Santrifüj ve ISOLAB Vorteks Karıştırıcı kullanılmıştır.

3.2. Kan Numunesinden Platelet Süspansiyonu Hazırlanması

Kan numunesinden PRP elde edilirken Landesberg protokolü temel alınmıştır [15,16]. Bu yöntemde 4 mL kan 200 G'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra kırmızı kan hücrelerinin hemen üstündeki beyaz kısımdan (buffy coat) 1 mL numune başka bir tüpe pastör pipeti ile aktarılır. Bu numune tekrar aynı parametrelerde santrifüjlenir. Tüpün dibinden 500 µL alınarak PRP elde edilir. PRP'nin hücre sayımı yapıldıktan sonra trombosit sayısı mikrolitrede 10000 olacak şekilde PBS tamponu ile seyreltilir. Bütün işlemler sırasında hassas davranılması trombositlerin kendiliğinden aktivasyonunu en aza indirmek için önemlidir.

3.3. Kimyasal Aktivasyon

Aktivasyonun belirlenmesinde pozitif kontrol olarak değerlendirmek için trombosit aktivasyonunda standart olarak kullanılan trombin ve kalsiyum klorür (Tr/Ca) yöntemi temel alınmıştır. Hazırlanan trombosit süspansiyonuna sığır trombinini ve kalsiyum klorür son derişimleri sırasıyla 1 U/mL ve 22.8 mM olacak şekilde eklenerek 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu süreçte büyük fibrin pıhtıları oluşumunu engellemek için hafifçe çalkalanmıştır. Bunun sebebi akım sitometrisinde teker teker analiz edilecek olan trombositlerin pıhtı içerisinde kalmasını ve trombosit agregasyonunu engellemektir. İnkübasyon sonunda son derişimi %1 (v/v) olacak şekilde FA eklenerek trombositler fikse edilmiş ve aktivasyon sonlandırılmıştır.

Negatif kontrol olarak hiçbir işlem uygulanmamış (intact) trombositler farklı zamanlarda (0, 10, 30 ve 60 dakika) fikse edilerek zamanla kendiliğinden aktivasyon seviyesi incelenmiştir.

3.4. Mekanik Aktivasyon

3.4.1. Mikroakışkan Çipte Kayma Gerilimi Uygulayarak Aktivasyon

3.4.1.1. Mikroakışkan Çiplerin Tasarımı ve Üretimi

Çipler tasarlanırken akış sırasında oluşacak kayma geriliminin 50 – 250 dyne/cm² arasında olması hedeflenmiştir. Reolojik çalışmalarla belirlenmiş olan bu aralık trombosit aktivasyonu için gerekli etkiyi yaratmaktadır. Bu kayma geriliminin sağlanacağı akış hızı 200 µL/s olarak seçilmiştir. Geliştirilen çip PRP aktivasyonunda kullanılacağı için kullanıcının el ile uygulayabileceği bir hız seçilmiştir. 1 mL sıvı şırınga ile 5 saniyede çipe enjekte edildiğinde bu hıza ulaşılır. Bu hız da insan elinin orta hızda yapabileceği bir seviyedir.

Tasarımda kayma geriliminin belirlenmesi için SOLIDWORKS programında Flow Simulation eklentisi kullanılmıştır. Bu simülasyonda önce 3-boyutlu olarak tasarlanmış olan çipte giriş ve çıkış delikleri belirlenmiştir. Bu deliklerdeki parametreler basınç, hacimsel akış hızı (debi), kütsel akış hızı veya çizgisel hız olarak belirlenerek akışın karakteristiği belirtilebilmektedir. Daha sonra sıvının geçeceği kanal işaretlenerek sıvı ile doldurulmuştur. Giriş deliğinden sıvının enjekte edilme hızı 200 µL/s, çıkış deliğinde ise atmosfer basıncı girilerek simülasyon çalıştırılmıştır. İşlem sonunda akış ile ilgili kayma gerilimi ve anlık çizgisel hız verileri kontur harita ile elde edilmiştir.

Simülasyon sonucunda uygun bulunan tasarımlar .dxf (drawing exchange format) dosyası olarak dışa aktarılmıştır. Bu dosyalar da RDWorks programı ile CO₂ lazer kesim cihazına gönderilerek PMMA tabakalar işlenmiştir. Bu program ile lazer kesicinin güç ve hız parametreleri kontrol edilmektedir. Mikroakışkan çiplerin üretimi için uygun kesim/tarama parametreleri (P1 – P16) öncelikle 14 – 20 mm/s hız aralığında ve 0.05 – 0.20 mm interval aralığında Çizelge 3.1.'de gösterildiği şekilde denenmiştir.

Çizelge 3.1. CO₂ lazer tarama için uygulanan ilk parametreler

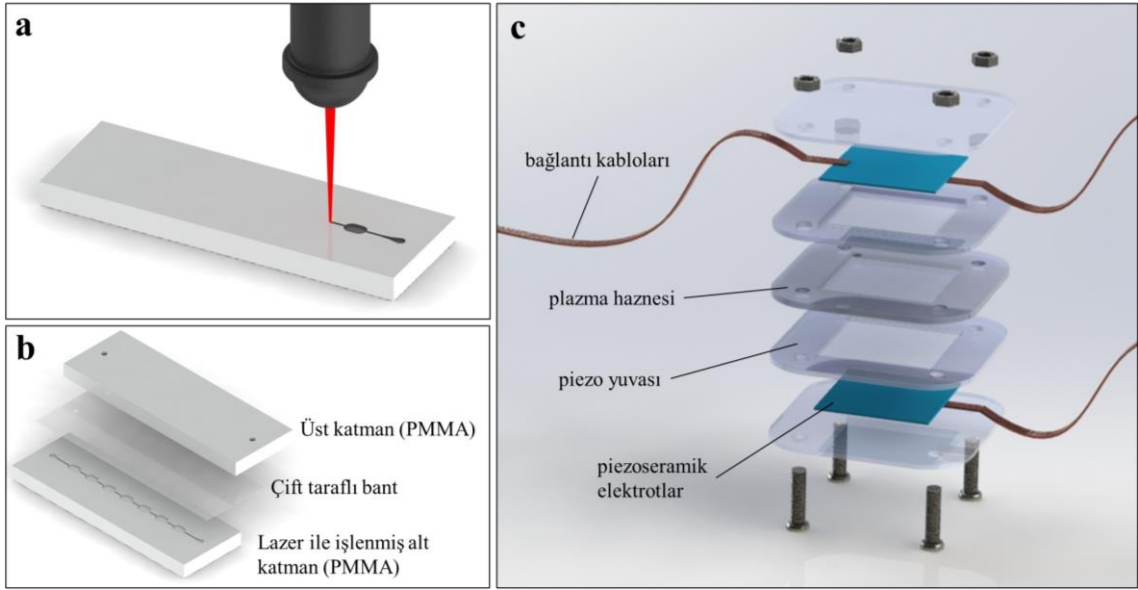
interval/hız	14 mm/s	16 mm/s	18 mm/s	20 mm/s
0.05 mm	P1	P2	P3	P4
0.10 mm	P5	P6	P7	P8
0.15 mm	P9	P10	P11	P12
0.20 mm	P13	P14	P15	P16

Daha sonra elde edilen veriler ışığında Çizelge 3.2'deki parametreler (P17 – P28) denenmiştir. Normalde lazer probundan 11 mm uzaklıkta olan odak noktası daha pürüzsüz bir yüzey elde etmek adına farklı mesafelerde denenmiştir. Bu yöntem uygulanırken Hong ve arkadaşlarının yaptığı araştırmanın sonuçları örnek alınmıştır [60]. Çizelge 3.1.'de 13.5 mm mesafe ve %8 (5.6 W)'lik güç kullanılmıştır.

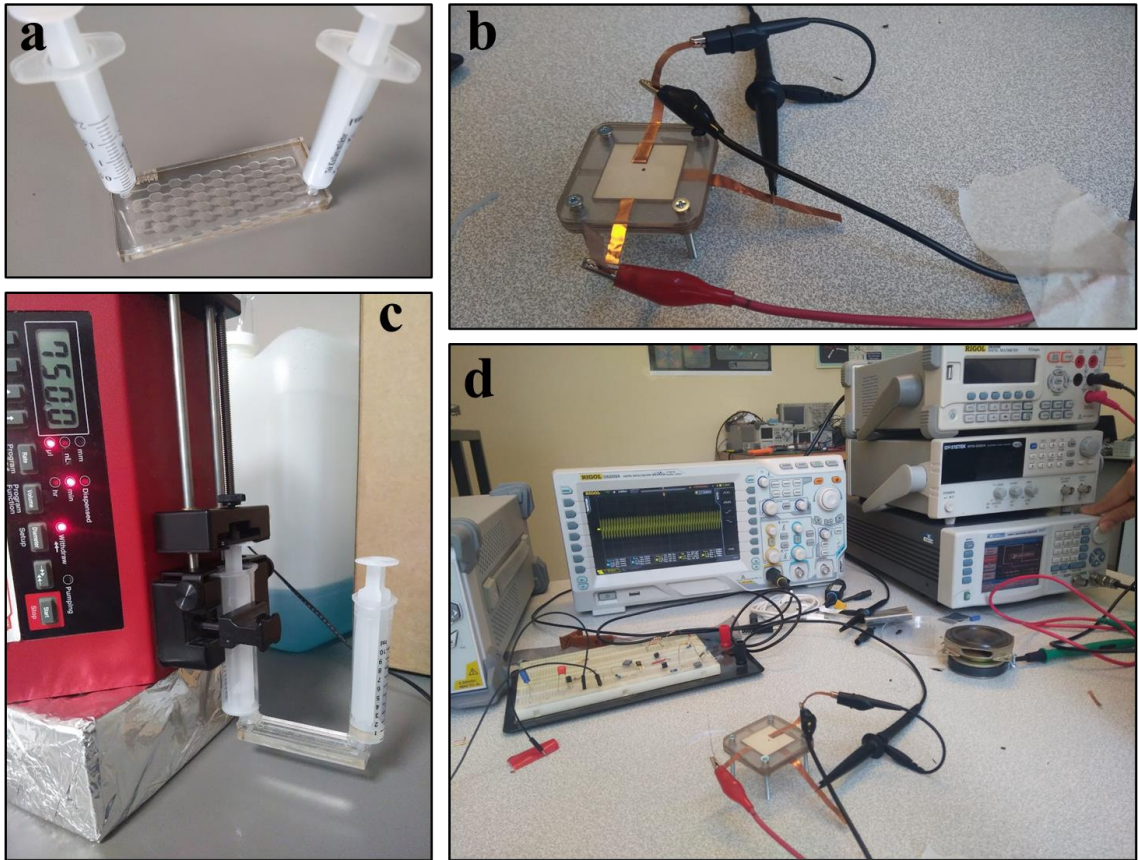
Çizelge 3.2. CO₂ lazer tarama için uygulanan ikinci parametreler

interval/hız	20 mm/s	25 mm/s	30 mm/s	35 mm/s
0.03 mm	P17	P18	P19	P20
0.04 mm	P21	P22	P23	P24
0.05 mm	P25	P26	P27	P28

Bu denemeler sonucunda belirlenen parametreler ile üretilen mikroakışkan çiplerin entegrasyon aşamaları şematik olarak Şekil 3.1'de, uygulamaya hazır halleri ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kullanılan çiplerin fabrikasyonunun şematik gösterimi. (a) PMMA tabakanın CO₂ lazer ile işlenmesi, (b) işlenen tabakanın çift taraflı bant yardımı ile başka bir tabakaya yapıştırılarak kapatılması, (c) kesme ve yapıştırma işlemleri tamamlanmış ultrasonikasyon sisteminin entegrasyonu.



Şekil 3.2. Fabrikasyon işlemleri tamamlanmış mikroakışkan çip örneği (a) ve bu çipin uygulama düzeni (c). Fabrikasyon ve entegrasyon işlemleri tamamlanmış ultrasonikasyon kiti (b) ve onun osilatöre ve güç kaynağına bağlanmış haldeki düzeni (d).

3.4.1.2. Mikroakışkan Çiplerin Uygulaması

Her çip için 1 mL trombosit süspansiyonu kullanılmıştır. Kullanılan şırınga pompasının maksimum sağlayabileceği akış hızı 20 mL ve 10 mL şırıngalarda sırasıyla 268 $\mu\text{L/s}$ ve 169 $\mu\text{L/s}$ 'dir. Bu yüzden istenen akış hızını sağlamak amacıyla 20 mL'lik şırınga kullanılmıştır. Çipin giriş deliğine trombosit süspansiyonunu içeren şırınga ve çıkış deliğine ise 1 mL'lik pistonu çıkartılmış şırınga yerleştirilmiştir. Şırıngalar sıcak silikon ile sabitlendikten sonra pompaya yerleştirilen sistem 200 $\mu\text{L/s}$ hızda çalıştırılmıştır. Belirlenen süre boyunca her 5 saniyede cihazın pistonunun yönü değiştirilerek pompalama ve çekme işlemi tekrar edilmiştir. İşlemi tamamlanan numuneler 2 mL'lik tüpe aktarılmıştır. Başlangıç anında ve belirlenen sürelerde 100 μL numuneler alınarak fikse edilmiştir. Fiksasyon için hacimde %4'lük soğuk FA son derişim hacimce %1'lik olacak şekilde kullanılmıştır. Sonuçlar ve Tartışma kısmında belirtilen süreler sistemin sökülmesinden trombositlerin fiksasyonuna kadar geçen süre (yaklaşık 2 dakika) dahil edilmemiştir. İşlem sonrasında çipte hücre kaybı yaşanıp yaşanmadığını kontrol etmek amacıyla elde edilen numunenin bir kısmı ile trombosit sayımı yapılmıştır. Bir fark gözlemlenmediğinden çiplere, bloklama ve modifikasyon gibi fabrikasyon sonrası işlemler uygulanmamıştır.

3.4.2. Ultrasonikasyon Düzenegi ile Aktivasyon

3.4.2.1. Ultrasonikasyon Sisteminin Tasarımı ve Üretimi

Ultrasonikasyon haznesinin tasarımında plazmanın yükleneceği bir hazneye, piezoelektrotların yerleştirileceği yuvalara ve onların kapaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için tasarlanmış olan sistemin 3-boyutlu modellemesi ve üretimden sonraki halinin fotoğrafı sırasıyla Şekil 3.1c ve Şekil 3.2b'de gösterilmektedir. Bu sistem 45 mm x 45 mm derinlik ve genişliğinde, köşeleri 10 mm çaplı radyuslu ve dört köşesinde 3 mm çapında hizalama delikleri bulunan düzlemsel parçalardan oluşmaktadır. İki adet piezo elektrotlardan biri ultrasonik dalga kaynağı (transdüser) olarak kullanılırken, plazma haznesinin diğer tarafında bulunan elektrot ise absorplanmamış dalgayı analiz etmek için sensör olarak yerleştirilmiştir. Bu çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği bünyesinde Doç. Dr. Dinçer Gökçen koordinatörlüğünde yürütülmüştür.

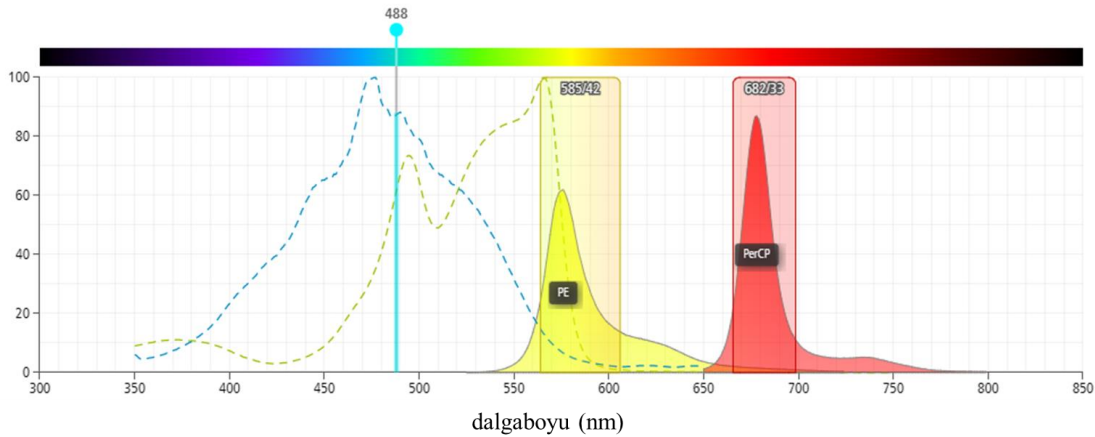
Plazma haznesi altında ve üstünde sistem ile aynı boyutlardaki asetat kağıtları bulunan 1 mm kalınlığındaki PMMA tabakasından oluşmaktadır. Sistem ile aynı boyutlardaki PMMA tabakasının orta kısmında 25.4 mm x 25.4 mm boşluk bulunmaktadır. Alt ve üstü asetat kağıdıyla kapatıldığında plazma yüklemek için 800 µL hacim kalmaktadır. Bu yüklemeyi yapmak için de üst asetatı 1 mm çapında bir delik açılmıştır. Piezo elektrot yuvaları yine aynı yöntemle üretilmiştir. Buradaki farklardan biri, piezo elektrotların takılıp çıkartılabilir olması için plazma haznesiyle temas etmeyecek olan kısmın asetat kağıdı ile kalıcı olarak kapatılmamış olmasıdır. Bu kısımlarda 1 mm PMMA tabaka kapak olarak kullanılmıştır. Diğer bir fark ise orta kısımda açılan boşluğun tam piezo elektrot boyutlarında değil 25.6 cm x 25.6 cm boyutlarında olmasıdır. Bunun sebebi piezo elektrotların alt yüzeyinden bağlantı almak amacıyla aşağıda kalacak kablunun yukarıya çıkarken elektrotu sıkıştırmasını engellemektir. Piezo seramik malzemeler çok kırılabilir malzemeler oldukları için hassas kullanılmalıdırlar. Bu sistemin üretimde 1 mm PMMA kesimi için %20 (14 W) güç ve 15 mm/s hız, asetat kağıtlarının kesiminde %10 (7 W) güç ve 65 mm/s hız parametreleri kullanılmıştır. Tabakalar birbirine çift taraflı bant ile yapıştırıldıktan sonra mengene ile sıkıştırılmış ve gece boyunca bekletilmiştir.

3.4.2.2. Ultrasonikasyon Sisteminin Uygulaması

800 µL trombosit süspansiyonu plazma haznesine yüklendikten sonra yükleme deliği bant ile kapatılmıştır. Diğer parçalar da Şekil 3.1c'deki sırayla M3 vida ve somun ile hizalanmış ve sabitlenmiştir. Şekil 3.2d'de gösterildiği gibi güç kaynağına ve osiloskopa bağlanarak farklı karakteristikteki ultrasonik dalgalar üretilmiştir. Ultrasonik dalgaların trombosit aktivasyonuna etkisi uygulama süresi, dalganın frekansı ve dalganın gücü açısından incelenmiştir. İşlem sonrasında numune 2 mL'lik tüpe aktarılmıştır. Mikroakışkan çiplerde olduğu gibi başlangıç anında ve belirlenen sürelerde 100 µL numuneler alınarak aynı şekilde fikse edilmiştir. Belirtilen sürelerle sistemin sökülmesinden trombositlerin fiksasyonuna kadar geçen süre (yaklaşık 3 dakika) dahil edilmemiştir.

3.5. Aktivasyon Oranlarının Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Trombositlerin akım sitometrisi için floresan etiketlemesi yöntemine, 2.5 µL PerCP anti-CD61 ve 2.5 µL PE anti-CD62P antikoru 2 mL'lik kapaklı tüpe alınmıştır. Daha sonra etiketlemesi yapılacak olan numuneden 100 µL üzerine eklenerek kısa süreyle vortekslenmiştir. Karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda üzerine 1.5 mL PBS eklenerek iyice karıştırılmıştır. 500 G'de 10 dakika santrifüjledikten sonra süpernatant atılarak tekrar PBS eklenmiştir. Toplamda yıkama işlemi 3 kez tekrar edildikten sonra numune akım sitometrisi tüpüne alınarak üzerine 2 mL FACS Flow sıvısı eklenerek akım sitometrisi numuneleri hazırlanmıştır. Bütün aktivasyon işlemlerinden sonra elde edilen numuneler ve dokunulmamış trombosit numuneleri için bu yöntem uygulanmıştır.



Şekil 3.3. PE ve PerCP floroforlarının uyarılma ve emisyon spektrumları (BD Biosciences)

Seçilen antikoru konjuge floroforları seçilirken girişim yapmayacak olması ve aynı lazer ile uyarılması dikkate alınmıştır. Şekil 3.3'te ilgili floroforların uyarılma ve emisyon spektrumları gösterilmektedir. BD FACS Celesta cihazında bulunan uyarıcı lazerlerden biri olan 488 nm her iki floroforu da uyarabilmektedir. PE için birincil uyarım dalgaboyu 561 nm, ikincil uyarım dalgaboyu ise 488 nm'dir. PerCP ise 450 – 500 nm bandında uyarılabilir. Emisyon spektrumları incelendiğinde PE 585/42 kanalında, PerCP 682/33 kanalında tespit edildiği görülmektedir. Bu kanallardan PE için kullanılan 585/42

filtresinde PerCP'den kaynaklanan bir sinyal görülmezken, PerCP kanalında %2.2'lik bir girişim mevcuttur. Bu yüzden cihazın analize uygun hale getirilmesi için kompenzasyon ayarının yapılması gerekmektedir. Bunun yanında kullanılan floroforların cihazda verdiği sinyaller de incelenerek uygun hale getirilmesi gerekmektedir.

Floroforların cihazda incelenmesi için Tr/Ca yöntemi ile aktive edilmiş numuneler etiketsiz, CD61 etiketli, CD62P etiketli ve CD61/CD62P etiketli olarak dört farklı şekilde hazırlanmıştır. Bu numunelerin akım sitometrisi cihazında incelenmesi sonucunda uygun voltaj değerleri FSC (forward scatter) ve SSC (side scatter) için 250, PerCP ve PE için 800 olarak belirlenmiştir. CD61'e karşı CD62P çizilen nokta grafiği (dot-plot) üzerinde yapılan inceleme sonucunda uygun kompenzasyon değeri %0.5 olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasında trombositlerin aktivasyonu için iki mekanik yöntem geliştirilmiş ve standart aktivasyon yöntemi olan trombin ve kalsiyum klorür yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Önerilen ilk mekanik aktivasyon yöntemi mikroakışkan sistemlerde kayma gerilimi yaratarak trombosit üzerinde stres oluşturmaya dayanmaktadır. Diğer yöntem ultrasonik dalga ile trombosit üzerinde ani ve yüksek basınç farkları oluşturarak stres yaratmaya dayanmaktadır.

4.1. Trombositlerin Kimyasal Yöntemle Aktivasyonu

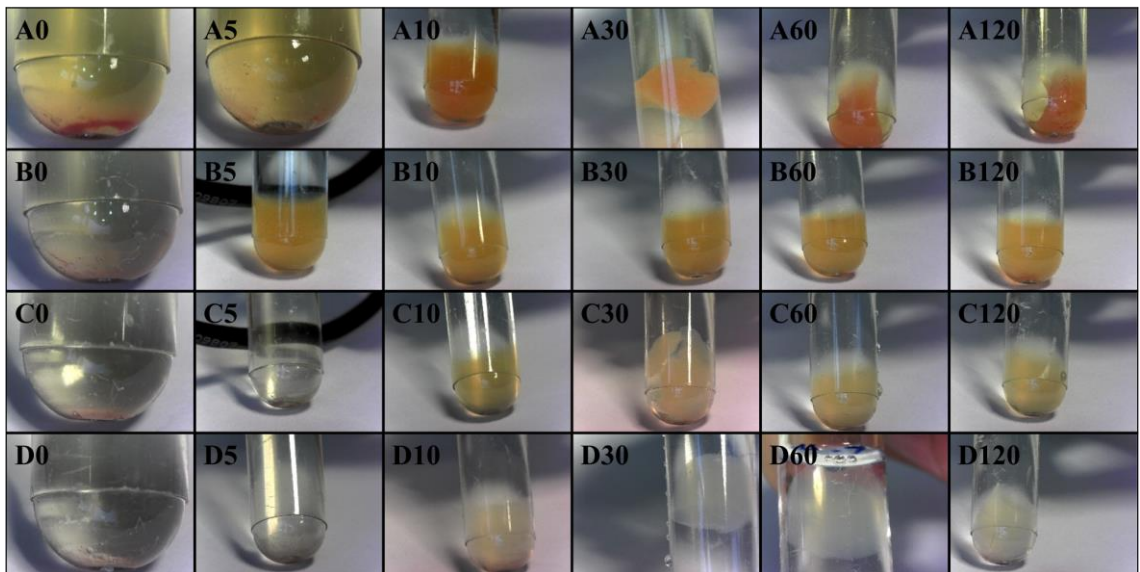
4.1.1. Pıhtı Oluşumu Denemeleri

Kan plazmasında monomer halinde bulunan fibrinojen, kalsiyum ve trombin varlığında fibrin biyopolimerine dönüşerek oldukça yapışkan ağsı yapılar oluşturur. Bu yapıya yapışan trombositler 2.1.1. başlığında anlatılan faktörler ile agregre olarak pıhtıyı oluştururlar. Ortamdaki fibrinojen derişimi azaltılarak ve reaksiyon süresi kısaltılarak fibrin oluşumu azaltılabilir. Bu yüzden sığır trombini ve kalsiyum klorür ile yapılan pıhtı oluşum denemelerinde farklı oranlarda seyreltilen kan plazması farklı zamanlarda fikse edilerek pıhtı oluşumu incelenmiştir. Pıhtı içerisinde kalmış trombositler akış sitometrisi ile incelenemeyeceğinden pıhtılaşmanın gerçekleşmediği, trombositlerin dağılabildiği oranlar araştırılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı oranlarda seyreltilen kan plazmasının trombin ve kalsiyum klorür ile etkileşimi sonucu oluşan pıhtının zamana göre izlenmesi için planlanan test parametreleri

	başlangıç	5 dakika	10 dakika	30 dakika	60 dakika	120 dakika
1:0 Plazma/PBS	A0	A5	A10	A30	A60	A120
1:1 Plazma/PBS	B0	B5	B10	B30	B60	B120
1:3 Plazma/PBS	C0	C5	C10	C30	C60	C120
1:7 Plazma/PBS	D0	D5	D10	D30	D60	D120

Çizelge 4.1’de gösterilen seyreltme oranı ve reaksiyon sürelerinin sonuçları Şekil 4.1’de verilmiştir. Plazmanın seyreltilmeden kullanıldığı A denemeleri incelendiğinde kan plazmasındaki bulanıklaşmaya bakılarak fibrin oluşumunun 5. dakikada başladığı görülmektedir. Pıhtı oluşumu ise 10. dakikada başlamış ve reaksiyon süresi arttıkça pıhtıda çekilme (shrinkage) ve sertleşme gözlemlenmiştir. Aynı şekilde diğer örnekler de 5. dakikada fibrin oluşumu başlamıştır. Ancak yeterli oranda olmadığı için pıhtı çekilerek sertleşme sağlayamamıştır. Pıhtıların sertliği pipetaj yöntemi ile incelendiğinde kan plazmasının çok olduğu örneklerin daha sert olduğu görülmüştür.



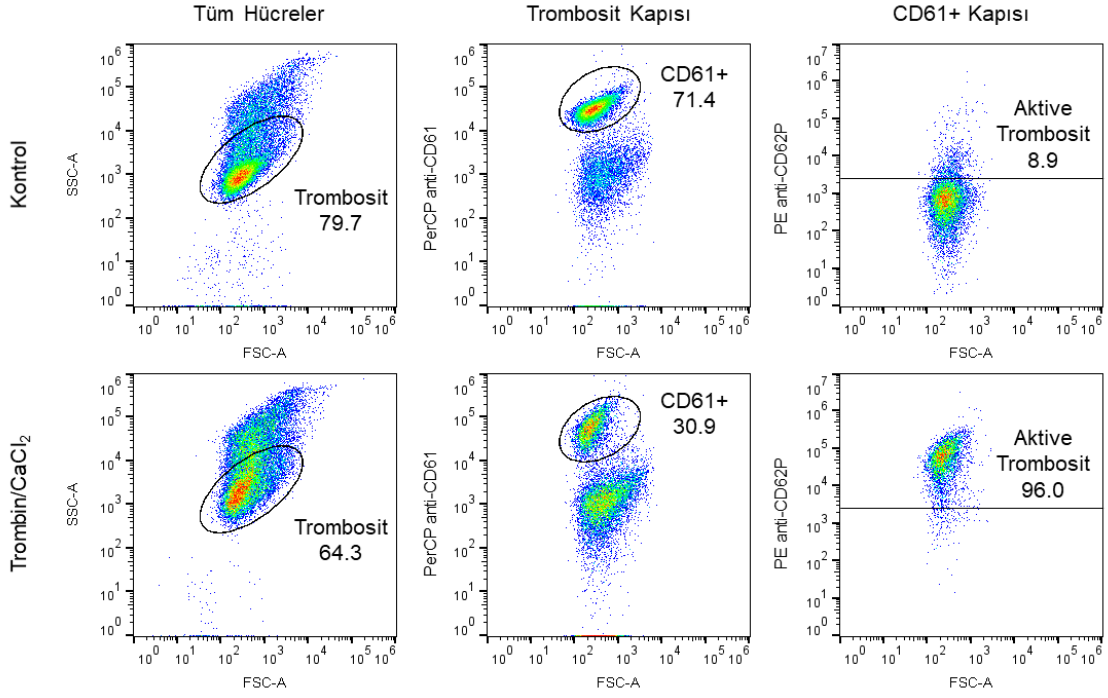
Şekil 4.1. Farklı oranlarda seyreltilen kan plazmasının trombin ve kalsiyum klorür ile farklı sürelerde etkileşimi sonucu oluşan pıhtılar

4.1.2. Kimyasal Yöntem ile Aktive Edilen Trombositlerin Akış Sitometrisi ile İncelenmesi

Trombosit süspansiyonu iki parçaya ayrılarak birisi işlem uygulanmadan, diğeri 1 U/mL trombin ve 22.8 mM CaCl₂ ile 15 dakika inkübe edilerek %1 (v/v) FA ile fikse edilmiştir. Bu hücreler Şekil 4.2’de gösterildiği gibi analiz edilmiştir. Bütün hücreler FSC’ye karşı SSC nokta grafiğine geçirilerek trombositlere özgü bölge kapılanmıştır. Bu kapıdaki hücreler FSC’ye karşı CD61 nokta grafiğine geçirilerek CD61+ kapısı alınmıştır. Son olarak CD61+ kapısındaki hücreler FSC’ye karşı CD62P nokta grafiğine geçirilerek tüm trombositler arasından aktive olanların (CD62P+) oranları belirlenmiştir. CD61+ ve CD62P+ eşik değerleri bu antikolar ile muamele edilmemiş trombositlerden alınan en yüksek floresan yoğunluğu seviyesi olarak seçilmiştir. Bu seviyeye kadar olan ışımalar cihazın trombositlerin otofloresanından elde ettiği değerlerdir. Bunun üzerindeki değerler florofor kaynaklı ışımalar olduğundan CD61+ ve CD62P+ hücreleri ifade etmektedir. Bunun yanında spesifik olmayan bağlanmaların kontrolü CD61 ve CD62P izotip kontroller ile yapılmıştır. Bu tez çalışmasındaki bütün akım sitometrisi incelemeleri bu şekilde yapılmıştır.

Trombosit aktivasyonunda kullanılan standart bir yöntem olan trombin/kalsiyum yöntemi hem önerilen mekanik yöntemler ile kıyaslamak için hem de yapılan incelemenin doğruluğunu kontrol etmek için yapılmıştır. Şekil 4.2’de görüldüğü üzere, işlem görmemiş trombositler %8.9 oranında aktive olurken kimyasal yöntemle uyarılmış trombositlerin %96.0 oranında aktive olması yöntemi doğrulamaktadır.

Trombosit ve CD61+ kapılarında görüldüğü üzere uyarılmış hücrelerin popülasyonunun azaldığı görülmektedir. Bunun sebebi trombositlerin trombin varlığında agregasyona eğilimli olmasıdır. Trombin ayrıca fibrin oluşumunu da tetiklediğinden bazı trombositler fibrin pıhtısında kalarak analiz edilememektedir.



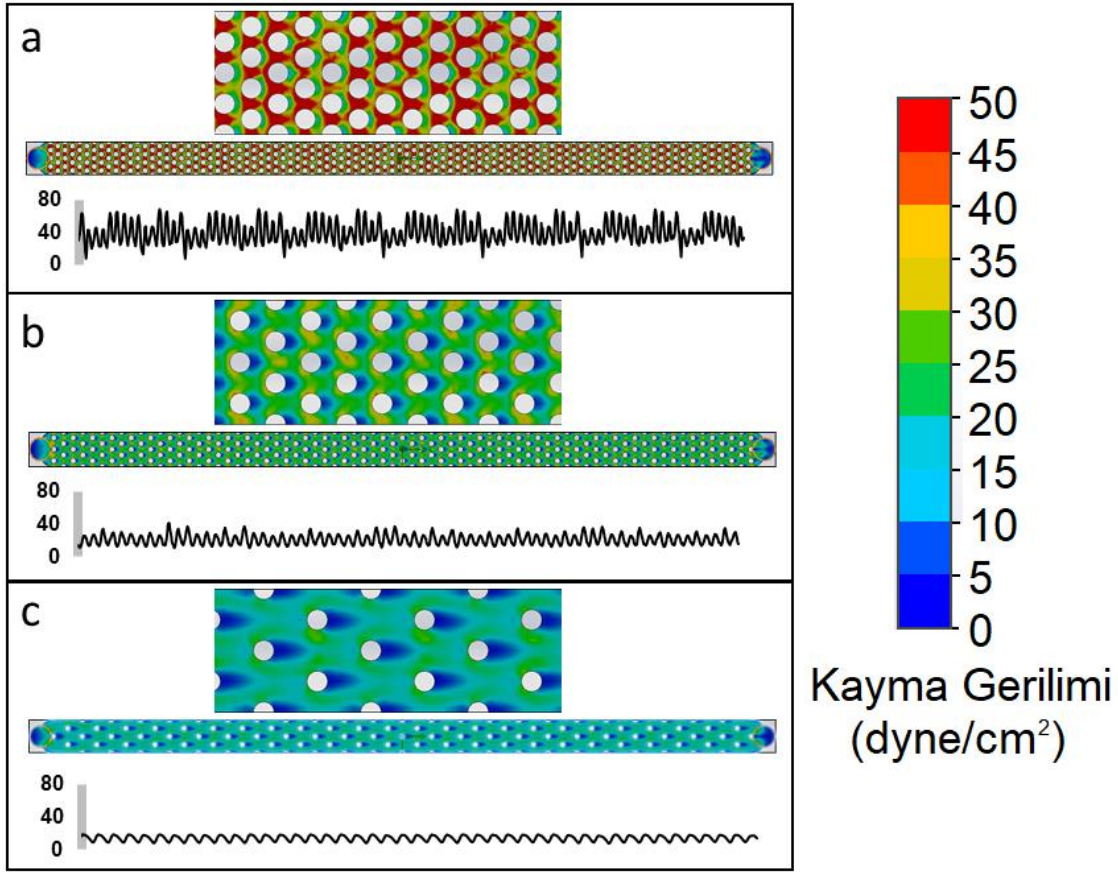
Şekil 4.2. İşlem görmemiş ve 1 U/mL trombin, 22.8 mM CaCl₂ ile 15 dakika inkübe edilmiş trombositlerin akım sitometrisi ile elde edilen nokta grafik sonuçları

4.2. Mikroakışkan Çiplerinde Akış Simülasyonu

Sunulan bu tez çalışmasında iki farklı tasarımla toplamda beş mikroakışkan çip denenmiştir. Sütunlu tasarımlarda 500 µm çaplara sahip sütunların birbirleri arasındaki mesafeler değiştirilerek farklı kayma gerilimleri elde edilmiştir. Dügümlü tasarımlarda ise 500 µm genişlikte 8 ve 40 düğüm noktasına sahip iki farklı çip bulunmaktadır. Bu çiplerde aynı kayma gerilimi farklı tekrar sayılarında uygulanmaktadır. Bütün çiplerde akış hızı 200 µL/s olarak ayarlanmıştır.

4.2.1. Sütunlu Mikroakışkan Çiplerin Akış Simülasyonu

Sütunlu mikroakışkan çiplerin uzunlukları 65 mm, genişlikleri 3 mm ve yükseklikleri 570 µm'dir. Şekil 4.3'te verilen çiplerde çapları 500 µm olan sütunlar bulunmaktadır. Çipler, sütunların birbirleri arasındaki mesafeler (a) 250 µm, (b) 500 µm ve (c) 1000 µm olacak şekilde tasarlanmıştır. Toplam uzunluk sabit kaldığından toplam sütun sayısı değişmektedir. Buna bağlı olarak uygulanan kayma gerilimi vuruşlarının sayısı da değişmektedir.



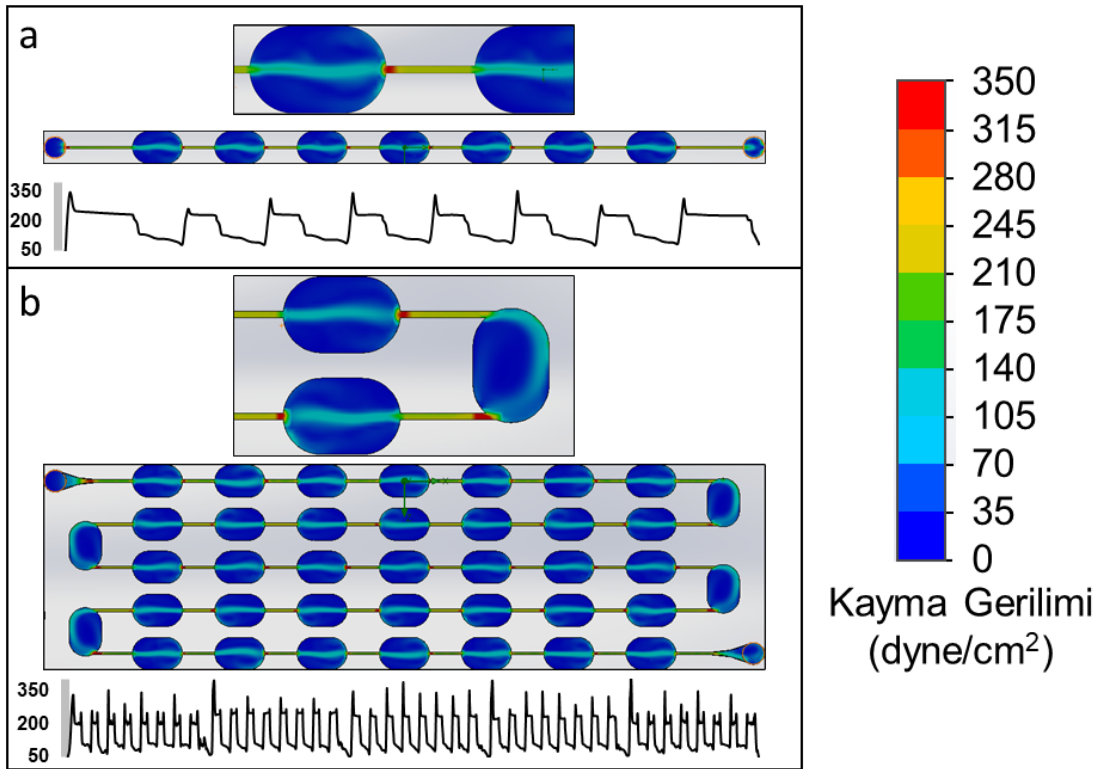
Şekil 4.3. (a) Sütun250, (b) sütun500 ve (c) sütun1000 çiplerinden 200 $\mu\text{L/s}$ akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita

Şekil 4.3'te her çipin altında çipten geçirilen bir taneciğin deneyimlediği kayma gerilimi verilmektedir. Sütun sayısı arttıkça piklerin sayısı artarken, aralarındaki mesafenin azalmasına bağlı olarak da kayma gerilimi artmaktadır. Sütun250 çipinde 94, sütun500 çipinde 70 ve sütun1000 çipinde 46 kayma gerilimi vuruşu vardır. Bu vuruşların pik noktalarının ortalaması sırasıyla 57.6, 30.5 ve 18.6 dyne/cm^2 'dir.

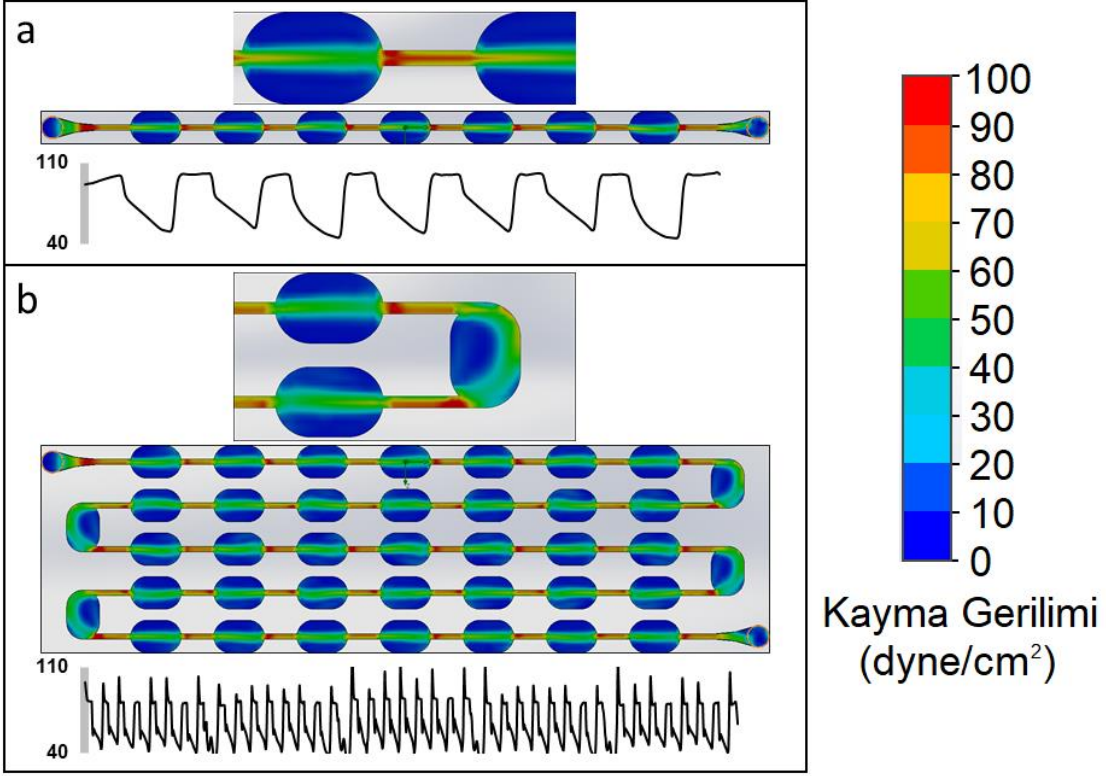
4.2.2. Dügümlü Mikroakışkan Çiplerin Akış Simülasyonu

Dügümlü mikroakışkan çiplerde üç farklı tasarımda 250, 500 ve 1000 μm genişliğinde ve 3 mm uzunluğunda düğümler bulunmaktadır. Bu düğümler arasında 3 mm genişlikte ve 4.5 mm uzunluğunda eliptik gevşeme hazneleri bulunmaktadır. Şekil 4.4'te gösterilen (a) 8 düğümlü çipin uzunluğu 65 mm ve yüksekliği 570 μm 'dir. Bu çipin 5 kat uzatılmış versiyonu olan (b) 40 düğümlü çipin uzunluğu 325 mm'dir. Her iki çipte de aynı karakteristiğe sahip kayma gerilimleri uygulanmaktadır. Bu gerilimler sütunlu çiplere

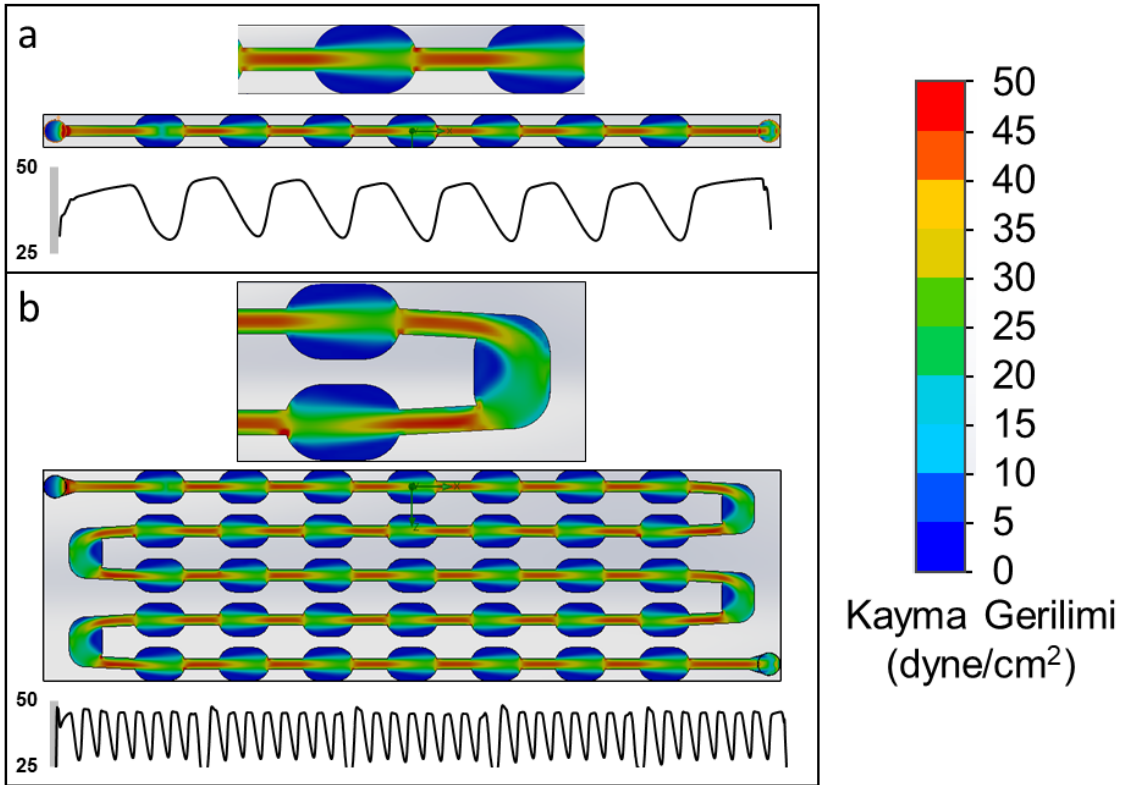
kıyasla daha uzun süreli ve daha yüksektir. Her çipin altında bulunan eğriler uygulanan kayma geriliminin karakteristiğini vermektedir. Buradaki pik noktalarından ortalama alındığında uygulanan kayma geriliminin 231.4 dyne/cm^2 olduğu görülmüştür. Gevşeme haznelerinde bu miktar 112.6 dyne/cm^2 seviyelerine düşmektedir. Aynı şekilde tasarlanan 500 ve $1000 \mu\text{m}$ özellikli düğüm çiplerinin kayma gerilimi konturları sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. $500 \mu\text{m}$ genişlikte düğümlere sahip olan çiplerde azami ve asgari kayma gerilimi ortalamaları sırasıyla 97.5 ve 45.4 dyne/cm^2 'dir. Bu değerler $1000 \mu\text{m}$ genişliğe sahip çiplerde ise sırasıyla 44.8 ve 29.7 dyne/cm^2 'dir. Kayma gerilimi profilleri incelendiğinde $250 \mu\text{m}$ genişlikli çiplerde düğümün başlangıcında kanaldaki ani daralmaya bağlı olarak fazladan bir pik görülmektedir. Bu fazla pik 8düğüm500'de görülmezken 40düğüm500'de görülmektedir. Burada da yine ani daralma etkisinin yanında uzun çip içinde oluşacak akış direnci kaynaklı artan basıncın etkili olduğu söylenebilir.



Şekil 4.4. (a) 8düğüm250 ve (b) 8düğüm250 çiplerinden $200 \mu\text{L/s}$ akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita



Şekil 4.5. (a) 8dügüm500 ve (b) 8dügüm500 çiplerinden 200 $\mu\text{L/s}$ akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita

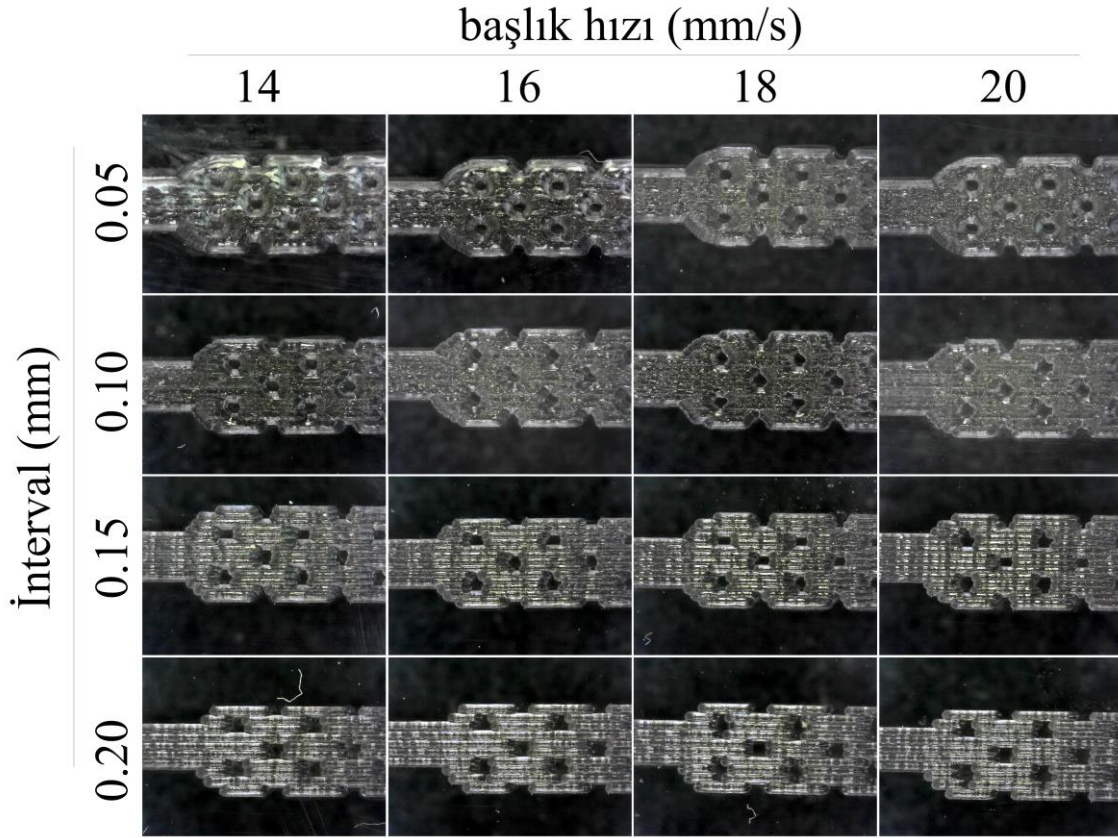


Şekil 4.6. (a) 8dügüm1000 ve (b) 8dügüm1000 çiplerinden 200 $\mu\text{L/s}$ akış hızıyla geçen sıvının yarattığı kayma gerilimini gösterir kontur harita

4.3. Mikroakışkan Çiplerin Fabrikasyonu

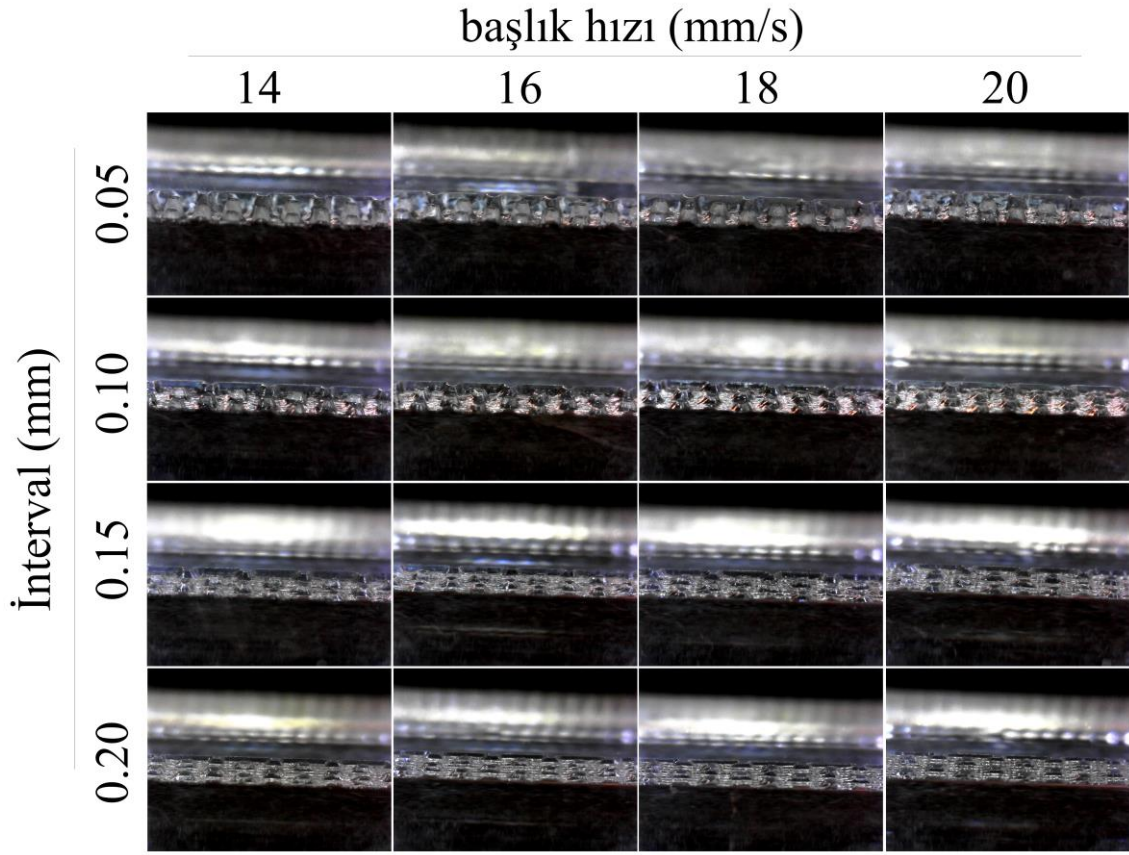
Mikroakışkan çiplerin fabrikasyon yöntemi olarak CO₂ lazer ablasyon/oyma/tarama/aşındırma yöntemi seçilmiştir. Çip materyali olarak ise hidrofobik özellik gösteren, biyouyumlu bir polimer olan PMMA seçilmiştir. Hidrofobik olması trombositler ile muamele edildiğinde yüksek yapışkan özellik gösteren trombositlerin yapışmasını azaltması açısından önemlidir. Aynı zamanda CO₂ lazer ile kolay işlenebilir olması da malzemenin bir diğer avantajıdır.

Bu tez çalışmasında kullanılan PMMA tabakasını lazer ile işlemek için güç, başlık hızı ve tarama adım mesafesi (interval) gibi parametreler optimize edilmiştir. Sütun yapılarının uygun şekilde oluşturulduğu parametreler Çizelge 3.1.'de gösterildiği şekilde denenmiştir. Şekil 4.7'de lazer tarama sonucunda elde edilen sütunların üstten çekilmiş fotoğrafları gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde interval arttıkça yapının çözünürlüğünün azaldığı görülmektedir. Bununla beraber taranan yüzeyde lazer çizgileri de gittikçe belirginleşerek engebeli bir yüzey oluşturmuşlardır. Aynı çalışmanın 30°'lik açıyla çekilmiş fotoğraflarının verildiği Şekil 4.8 incelendiğinde adım mesafesinin derinliği de etkilediği görülmektedir. Bunun sebebi toplam taranacak alanın daha büyük adımlarda geçilerek lazere daha az maruz kalmasıdır.



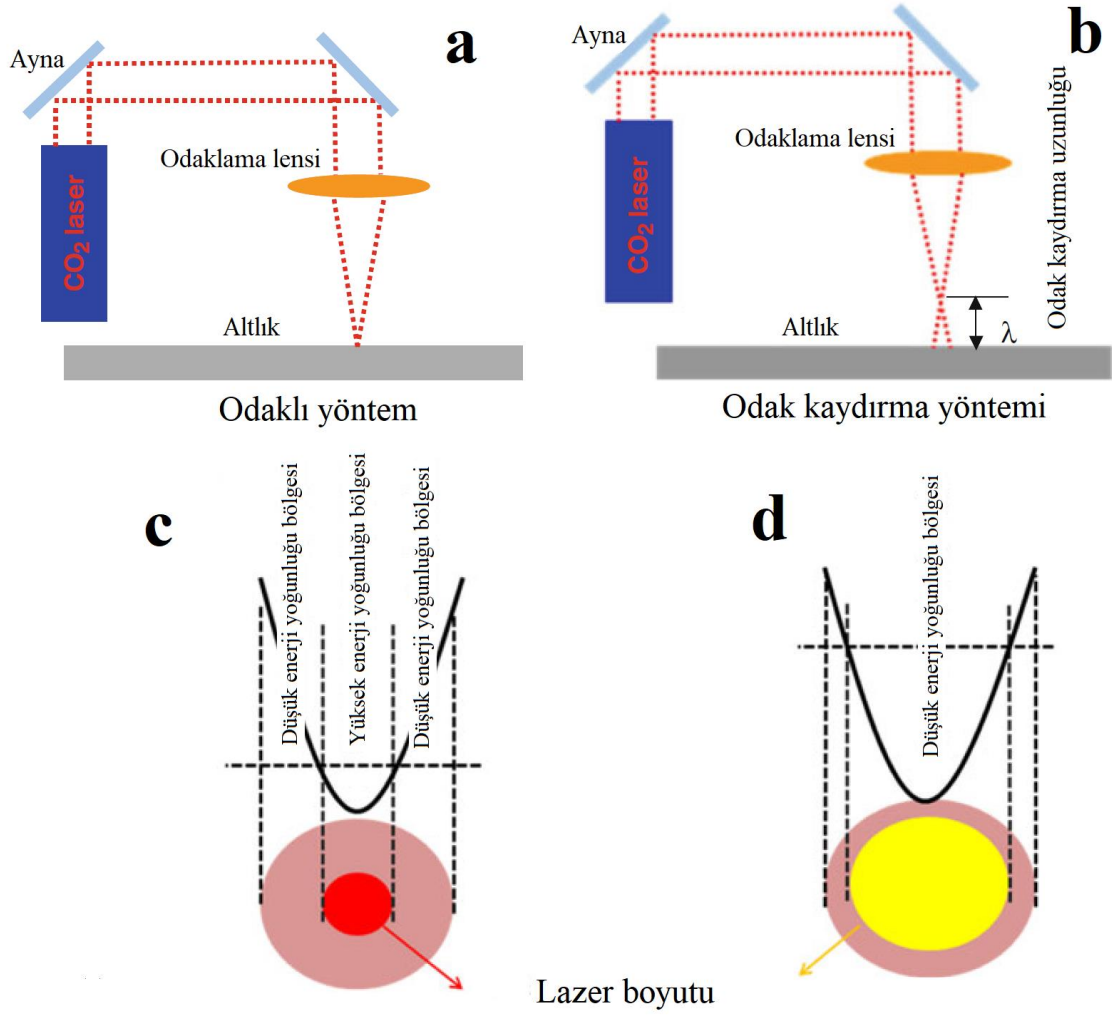
Şekil 4.7. Farklı hız (14 – 20 mm/s) ve interval (0.05 – 0.20 mm) lazer parametreleri ile işlenmiş PMMA tabakanın USB mini mikroskop ile üstten alınmış görüntüleri

Sütunların yapıları incelendiğinde silindirik bir yapı yerine tarama parametresi ile değişen açılara sahip kesik konik yapılarının olduğu görülmektedir. Sütunların açılarının artan tarama hızı ile arttığı tespit edilmiştir. Polimer malzemeyi buharlaştırarak yapılan bu işlemde lazer hızlı geçtikçe derinlere nüfuz edememektedir. Böylece daha yukarıdaki polimer daha fazla buharlaşmakta ve açılı yapılar oluşmaktadır. Başlık hızının etkilediği bir diğer parametre taranan alanın derinliğidir. Şekil 4.8’de sağa doğru gidildikçe bütün oyukların derinliğinin azaldığı görülmektedir. Bu da lazere maruz kalma süresiyle doğrudan ilişkilidir.



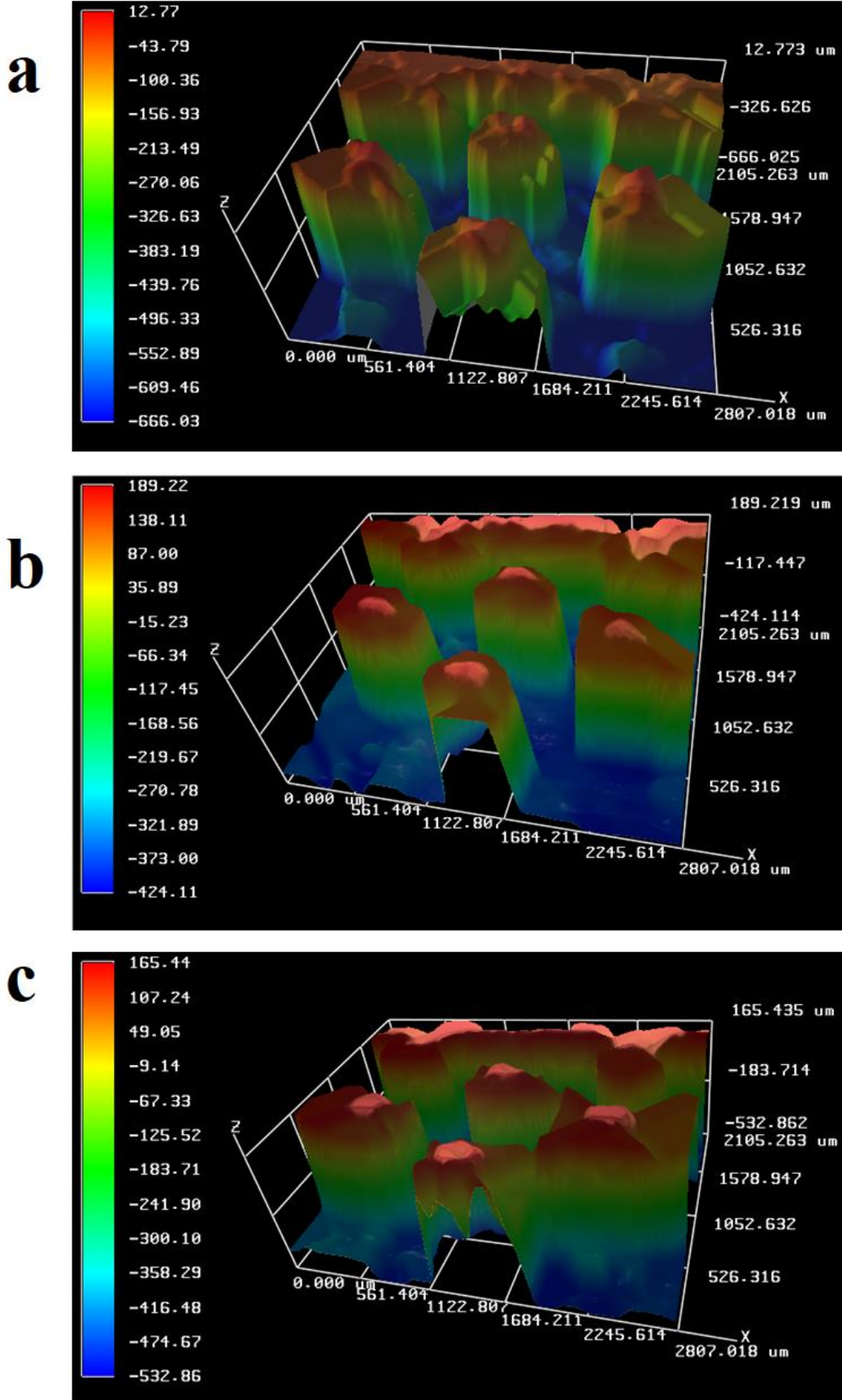
Şekil 4.8. Farklı hız (14 – 20 mm/s) ve interval (0.05 – 0.20 mm) lazer parametreleri ile işlenmiş PMMA tabakanın USB mini mikroskop ile çaprazdan alınmış görüntüleri

Yapılan incelemelerde lazer yollarının sadece adım mesafesi büyük olan örneklerde değil tümünde belirgin olduğu görülmüştür. Yüksek pürüzlülüğe sebep olabilecek bu deformasyon giderilmek için Hong ve arkadaşlarının çalışmalarında önerdiği yöntem denenmiştir [60]. Bu yöntemde lazerin odağı kaydırılarak taranan alan büyütülmektedir. Bu halde noktasal odaklı lazer ile ince bir çizgi halinde oluşan oyuklar geniş odakta daha yumuşak geçişler sağlar. Yöntemin dezavantajı ise daha geniş bir alanda işlem yapıldığı için üretim hassasiyetini azaltmasıdır (Şekil 4.9). Bu yöntemde uygun odak uzaklığını bulmak için λ değeri (odaktan sapma uzaklığı) 0, 2.5 ve 5.0 mm ayarlanarak denemeler yapılmıştır.



Şekil 4.9. (a) Odaklı ve (b) odak kaydırma yöntemleri kullanarak yapılan lazer işleme yönteminin şematik gösterimi. (c) Odaklı ve (d) odak kaydırma yöntemleri ile elde edilen lazer bölgesinin ve enerjisinin şematik gösterimi [60].

Odak kaydırarak üretilen çiplerin optik profilometre ile alınan 3 boyutlu görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekildeki a, b ve c çipleri üretilirken λ değeri sırasıyla 2.5, 5.0 ve 0 mm olarak ayarlanmıştır. Artan λ değeri ile büyüyen lazer alanı sebebiyle sütunların çapında küçülme görülmektedir. Buna rağmen $\lambda = 5.0$ mm çalışmasında x-eksenine bakıldığında sütun çapının yaklaşık 520 μm olduğu görülmektedir. Aynı şekilde görülen sütunlar arası mesafeler de tepe noktalarında yaklaşık 500 μm 'dir. Sütunlar yapısal olarak incelendiğinde silindirik geometriye gittikçe yaklaşmaktadır. Bu sebeple çiplerin üretiminde $\lambda = 5.0$ mm olarak seçilmiştir.

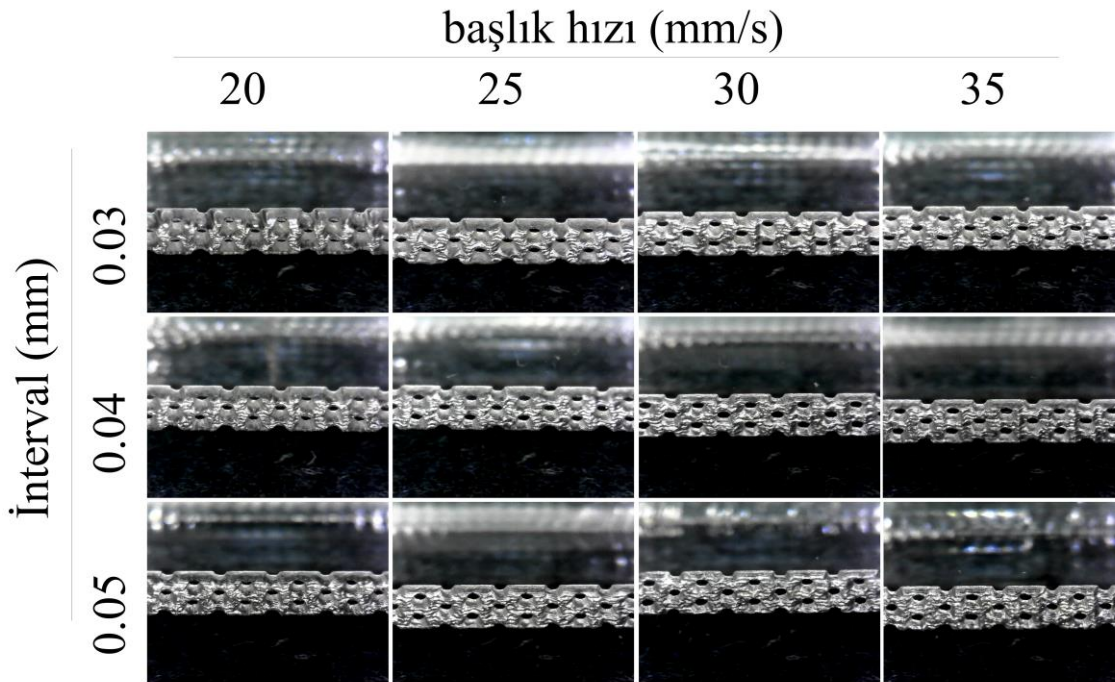


Şekil 4.10. Odak kaydırma yöntemi ile işlenmiş PMMA tabakanın profilometre ile elde edilmiş 3 boyutlu görüntüsü. (a) $\lambda = 2.5$ mm, (b) $\lambda = 5.0$ mm, (c) $\lambda = 0$ mm.

Mikroakışkan çiplerin üretiminde optimize edilen son parametre derinliktir. İstenen kayma gerilmelerinin elde edilmesi için tasarlanan 570 μm derinliğe ulaşmak için Çizelge 3.2’de verilen parametreler denenmiştir ve sonuçları Şekil 4.11’de verilmiştir. Optik profilometre ile yapılan derinlik incelemesi sonucunda en alt noktadan en üst noktaya kadar olan mesafe sonuçları Çizelge 4.2.’de verilmektedir. Profilometre ile yapılan yüzey incelemesinde ortalama pürüzlülük 20 μm olduğu için 582 μm bulunan örnek üretim için uygun bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda çiplerin üretiminde kullanılacak parametreler adım mesafesi 0.04 mm, başlık hızı 20 mm/s, λ değeri 5 mm olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. CO₂ lazer tarama için uygulanan ikinci denemeler sonucu elde edilen derinlik değerleri (μm)

interval/hız	20 mm/s	25 mm/s	30 mm/s	35 mm/s
0.03 mm	679	594	489	379
0.04 mm	582	423	341	313
0.05 mm	447	422	294	349

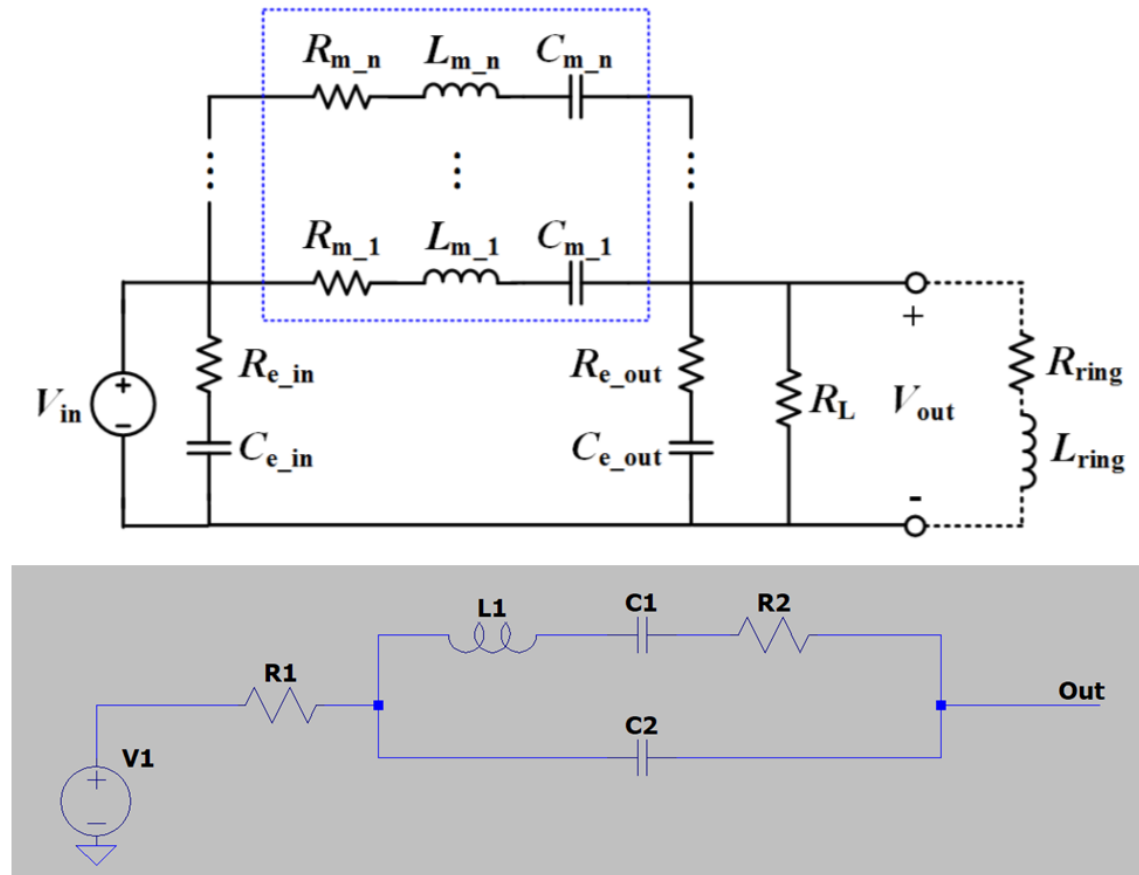


Şekil 4.11. Farklı hız (20 – 35 mm/s) ve interval (0.03 – 0.05 mm) lazer parametreleri ile işlenmiş PMMA tabakanın USB mini mikroskop ile çaprazdan alınmış görüntüleri

4.4. Ultrasonik Dalganın Validasyonu

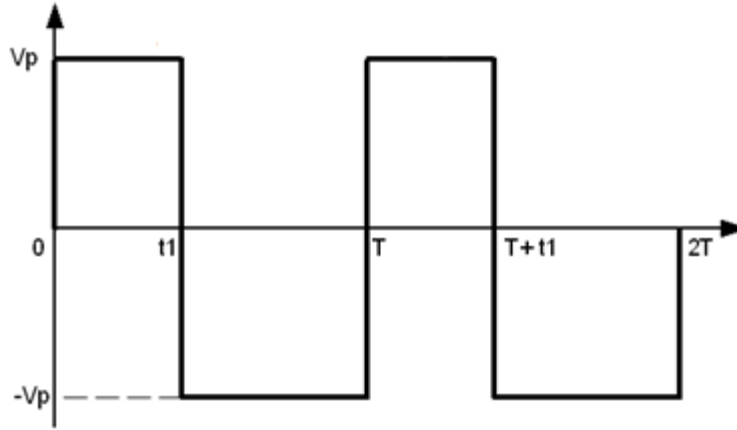
Piezo-Elektrotların karakterleri iletilen sinyalde form değişikliğine neden olabilecekken, ortamın karakteri uygulanan sinyali ve tüm bu etkiler giriş/çıkış sinyalleri ilişkisinden çıkarılabilir. Büyük ölçüde güç kaynağında harcanan enerji; piezolar üzerinde akustik enerjiye dönüşmektedir, bu ifade ideale yaklaştırılarak yeniden yorumlanabilir. Bu nedenle akustik yansıma, elektrotların karakteristiğinden kaynaklı kayıp da göz önünde bulundurularak enerji aktarımı detaylıca incelenmiştir.

Akustik empedansın eşlenik devresi Butterworth-von Dyke metoduyla hesaplanarak modellenmiştir [61]. Bir rezonatör yardımıyla yapılan bu ölçümlerde empedansın R-L-C tüm elektriksel bileşenleri gözlenmektedir. Aynı şekilde piezoelektronik materyallerin karakteri düşünüldüğünde, rezistif ve kapasitif yükler ihmal edilebilir seviyede kayba neden olmaktadır [62,63].



Şekil 4.12. Eşdeğer akustik empedans devresi

Toplam enerji AC güç kaynağının uyguladığı elektriksel güç üzerinden hesaplanmıştır. Kare dalga formunda eşit açık/kapalı sürelerine sahip (%50 Duty cycle) sürekli dalga uygulanmıştır (Şekil 4.13.). Negatif ve pozitif değer aralığında peak-to-peak varyasyonlarıyla oluşan sinyallerin piezonun sürekli harekette kalması sağlanmıştır. AC sinyal RMS değeri ise kare dalga oluşundan aşağıdaki ilişkiyle hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Kare dalganın zamana karşı potansiyel grafiği

$$V_p = 5V \text{ ise;}$$

$$u_{11}(t) = V_p, 0 \leq t < t_1$$

$$u_{12}(t) = -V_p, t_1 \leq t < T$$

Kare dalganın hem pozitif hem de negatif yarı döngüleri aşağıdaki denklemlerle hesaplanır:

$$u_{RMS}^2 = \frac{1}{T} \int_0^{t_1} V_p^2 \cdot dt = \frac{1}{T} V_p^2 \cdot t \Big|_0^{t_1} = \frac{V_p^2}{T} (t_1 - 0)$$

0'dan t_1 'e kadar olan süre, bir kare dalganın pozitif bir döngüsünde t_{on} 'u ifade eder, dolayısıyla hem negatif hem de pozitif döngüler için genel bilgiler aşağıdaki gibi yazılır.

$$u_{RMS} = v_p^2 \frac{t_{on}}{T}$$

Kare dalganın toplam üretilen gücü aşağıdaki gibi yazılır:

$$u_{RMS-total} = \sqrt{u_{11-RMS}^2 + u_{12-RMS}^2}$$

$$u_{RMS-total} = V_p = 5V$$

Aşağıda verilen bağıntıya göre elektromekanik enerji dönüşümü:

$$D = dT + \epsilon^T E$$

$$S = s^E T + dE$$

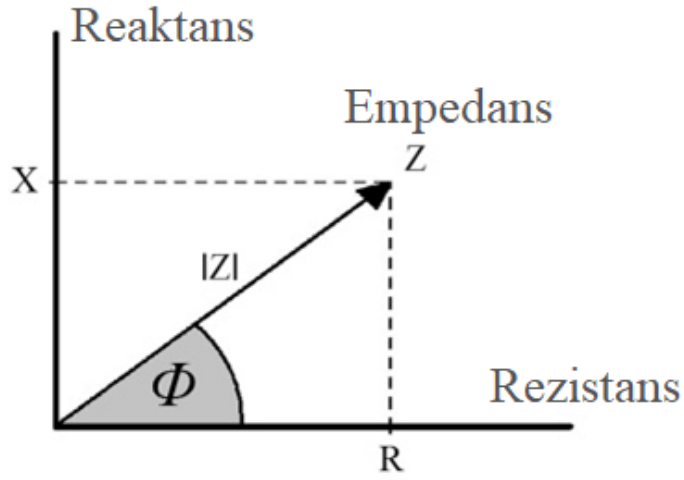
Denklemlerinde; D elektrik akı yoğunluğu ya da dielektrik yer değiştirmeyi, T mekanik stresi, E elektrik alanı, S mekanik gerilimi, d piezoelektrik yük katsayısını, ϵ^T dielektrik geçirgenliği (sabit T için), s^E elastiklik katsayısını (sabit E için) ifade eder. Bu nedenle kare dalganın hesaplanan RMS gerilimi ile üretilen elektrik alan enerjisi gerinime mekanik olarak dönüştürecektir.

$$E = \eta V = \frac{1}{2} \frac{\epsilon A}{d} V^2 = 4637 \text{ Joule}$$

Elektrotlar üzerinde oluşan elektrik-mekanik dönüşümden kaynaklı kayıplar da söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle total harcanan enerjinin bir kısmı elektrotlarda kayıp olarak meydana gelmektedir. Kapasitif ve indüktif yükler akım-gerilim fazında kaymalara neden olmaktadır. Bu faz kaymalarına bağlı olarak aktarılan gücün matematiksel olarak negatif değerler alması söz konusudur. Fiziksel olarak negatif işaretli ifadeler kayıp olarak nitelendirilmektedir.

$$Z = R + jX$$

Yukarıdaki denklemde; Z empedansı, R empedansın gerçek kısmının direncini, X indüktif ve kapasitif yük tarafından üretilen ve dirençli voltaj düşüşü hariç her döngüde 1 W güce ulaşan reaktansı ifade etmektedir. Direnç, reaktans ve empedans arasındaki ilişki Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Empedansın reaktans ve rezistansa bağlı değişim grafiği

Akustik dalga formuna dönüşen enerji, ortam değiştirirken de yansımaya bağlı kayıplar yaşamaktadır. Bu ifade ise akustik yansımaya formülü kullanılarak elde edilebilir[64].

$$|\Gamma| = \left| \frac{Z_{media} - Z_{PZT}}{Z_{media} + Z_{PZT}} \right| = \left| \frac{13.1 - 16.5}{13.1 + 16.5} \right|$$

Akustik yansımaya katsayısı 0.11 olarak bulunmuştur. Bu değer ile aktarılan güç arasındaki ilişkiden örneklere uygulanan net güç hesaplanmıştır.

$$P_{harcanmış} = P_{toplam} \cdot 0.89$$

Hesaplanan net güç zaman göre integrallendiğinden plazma üzerine aktarılan total enerjiye ulaşılmıştır:

$$E_{absorbe} + E_{ikinci\ elektroda\ geçen} = (E_{uygulanan} - E_{empedans\ kaybı}) \cdot 0.89 \cong 3966 J$$

İkinci elektroda iletilen güç, giriş/çıkış voltajı arasındaki ilişki kullanılarak hesaplanmıştır, ayrıca çıkış probundan ölçülen sinyalin gücü, uygulanan giriş sinyalinin %3'ü kadardır. Bu nedenle toplam emilen enerji 3847 J'dür.

4.5. Trombositlerin Aktivasyon Oranlarının Belirlenmesi

4.5.1. Farklı Sürelerde Uygulanan Kayma Gerilimlerinin Trombositlere Etkisi

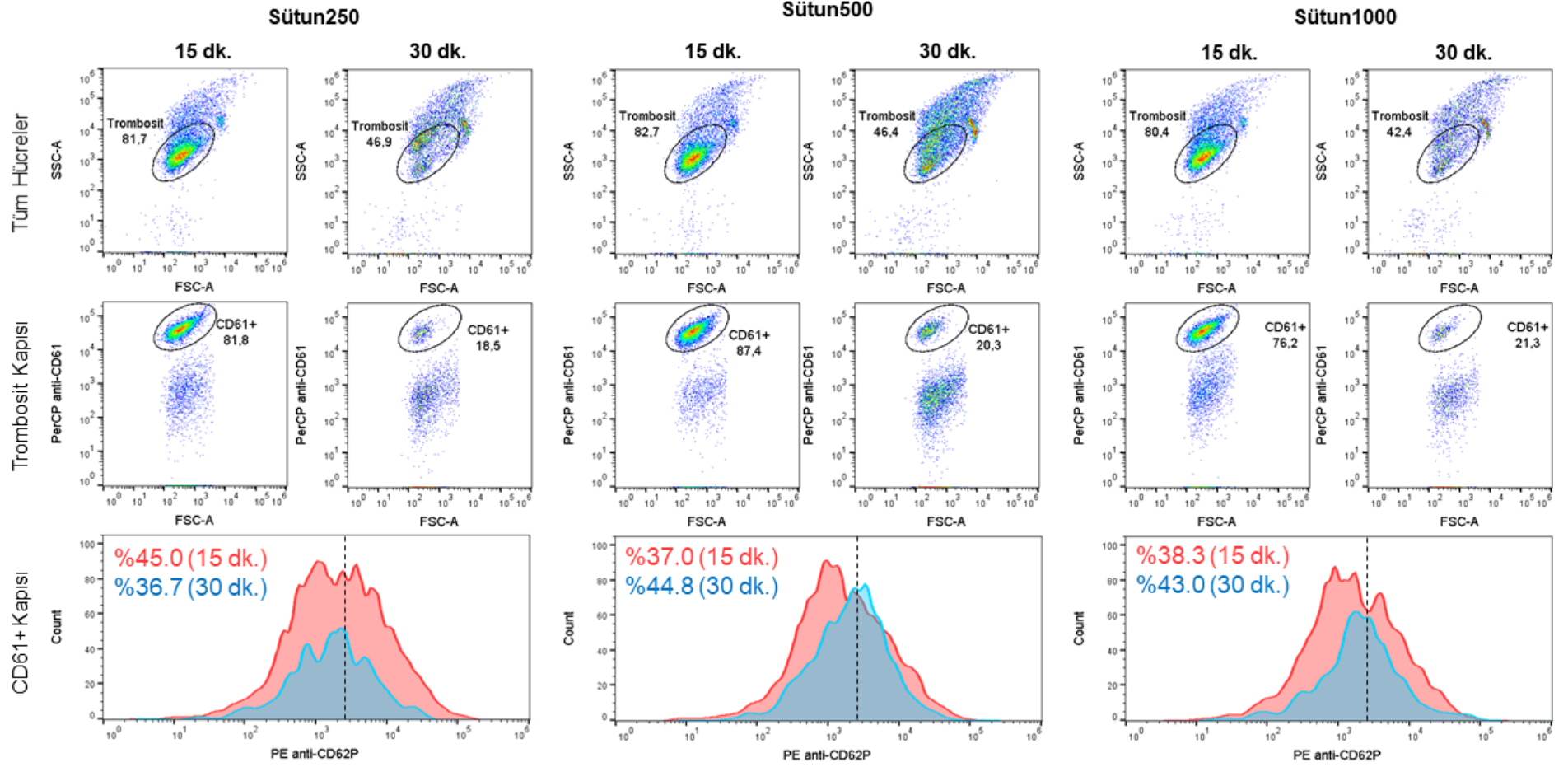
Sütunlu çiplerle yapılan denemelerde trombositler 15 ve 30 dakika boyunca kayma gerilimine maruz bırakılmıştır. Sütun mesafeleri 250, 500 ve 1000 µm olan çiplerde uygulanan maksimum kayma gerilimi sırasıyla 57.6, 30.5 ve 18.6 dyne/cm²'dir. Şekil 4.15'te her üç çip için 15 ve 30 dakika uygulama sonuçları verilmektedir. İlk sırada verilen nokta grafiklerinde FSC'ye karşı SSC grafikleri bulunmaktadır. Şekil 4.2'de belirtilen şekilde trombositler kapılanmıştır. İkinci sırada verilen FSC'ye karşı CD61 grafiğinde bu kapıdaki hücreler bulunmaktadır. En son olarak bu grafikteki CD61+ hücreler kapılanarak üçüncü sıradaki CD62P histogramı oluşturulmuştur.

30 dakikalık işleme maruz bırakılan trombositlerin popülasyonunda bariz bir azalma görülmektedir. Bu sonuç farklı kayma gerilimi uygulanan her üç çipte de benzer olduğundan bu özelliğin kayma geriliminden bağımsız olarak süreyle ilişkili olduğunu göstermektedir. 15 dakikalık işlemlerde bu etkinin görülmemesi süreden kaynaklı olduğunu desteklemektedir.

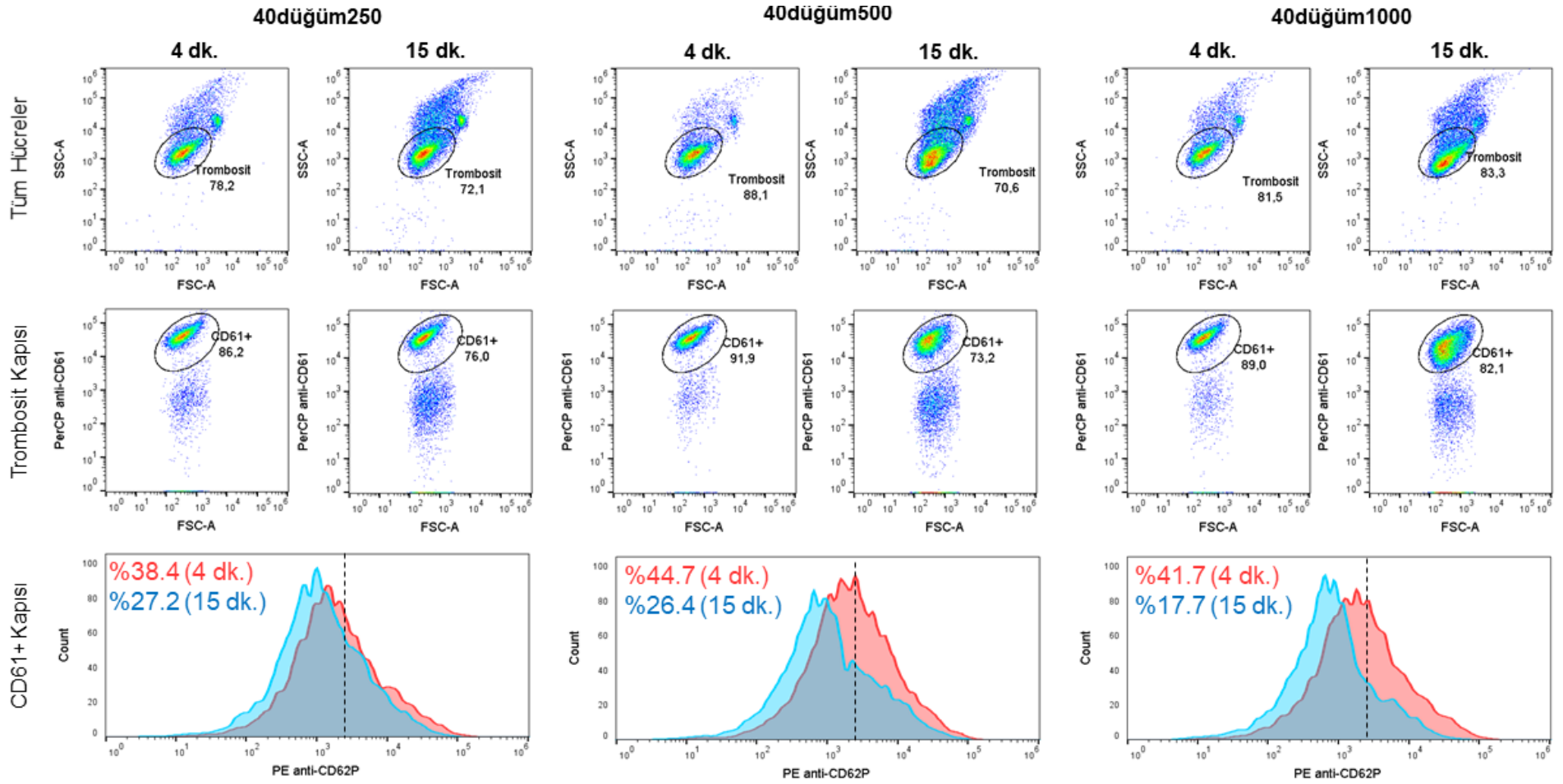
Bu etkilerin dışında bu çalışmada araştırılan aktivasyon oranları Şekil 4.15'te verilen nokta dağılım grafikleri ve histogramlar ile incelenmiştir. Grafikte CD62P+ eşliğinin üstünde kalan hücreler aktive olmuş trombositleri ifade etmektedir. 15 dakikalık işlemler sonucunda elde edilen aktivasyon yüzdeleri 250, 500 ve 1000 µm özellikli çiplerde

sırasıyla %45.0, %37.0 ve %38.3'tür. Bu sonuçlar %8.9 aktivasyon gösteren negatif kontrol ile kıyaslandığında trombositlerin uyarılabildiği görülmektedir. Sütun 500 ve Sütun1000 çiplerinde kendi aralarında belirgin bir fark göstermezken, en yüksek aktivasyona sahip Sütun250 çipi bu denemelerde öne çıkmaktadır.

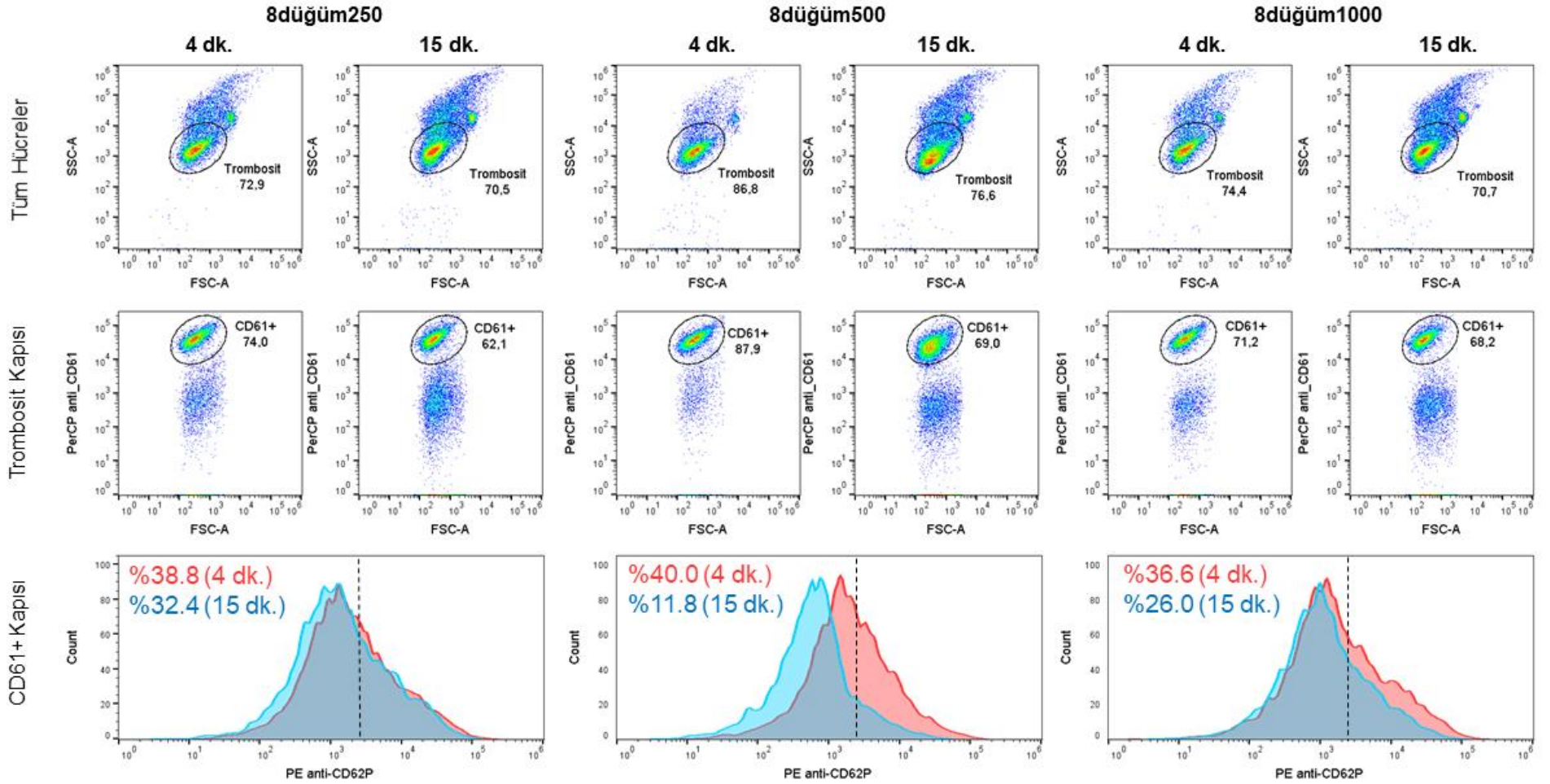
30 dakikalık denemelerde CD61+ hücre sayısı düşük olduğu için bu seviyede bir aktivasyondan vaz geçilmiştir. Bu deneyler sonucunda uygulama süresinin kısa tutulması sonucuna varılmıştır. Bu sebeple diğer çipler ile yapılan denemelerde 4 dakika ve 15 dakika işlem yapmaya karar verilmiştir.



Şekil 4.15. Sütun250, sütun500 ve sütun1000 çipleri kullanılarak 15 ve 30 dakika boyunca aktive edilen trombositlerin akım sitometrisi sonuçları.



Şekil 4.16. 40dügüm250, 40dügüm500 ve 40dügüm1000 çipleri kullanılarak 4 ve 15 dakika boyunca aktive edilen trombositlerin akım sitometrisi sonuçları.



Şekil 4.17. 8dügüm250, 8dügüm500 ve 8dügüm1000 çipleri kullanılarak 4 ve 15 dakika boyunca aktive edilen trombositlerin akım sitometrisi sonuçları.

40-düğümlü çiplerde yapılan denemelerde uygulama süresi 4 dakika ve 15 dakika olarak seçilmiştir. Bir önceki deneyde ifade edildiği şekilde kapılamaları analizleri yapılan deneyin 40-düğümlü çiplerin sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. Trombosit ve CD61+ kapılarındaki popülasyon yüzdelerine bakıldığında 4 dakikalık uygulamanın daha verimli olduğu görülmektedir. Aynı şekilde aktivasyon oranları da 4 dakikalık uygulamada tüm örneklerde belirgin şekilde daha yüksektir. Bu örnekler kendi aralarında kıyaslandığında birbirine yakın sonuçlar verdiği görülse de %44.7 ile en yüksek oran 40düğüm500 çipindedir. Bunun yanında CD61+ hücre oranının da yüksek olması bu çip tasarımını öne çıkaran bir diğer avantajdır.

8-düğümlü tasarımlarda yine 4 ve 15 dakikalık uygulamalar yapılmıştır. Şekil 4.17'deki nokta dağılım grafiklerinde bu denemelerin sonuçları göstermektedir. 40-düğümlü çiplerdeki denemelere benzer şekilde burada da 4 dakikalık çalışmalarda CD61+ yüzdesi ve aktivasyon oranları 15 dakikalık uygulamalara göre daha yüksektir. Aktivasyon oranları kendi aralarında karşılaştırıldığında 8düğüm250 için uygulama süreleri arasında bariz bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. En yüksek CD61+ ve aktivasyon oranları 8düğüm500 tasarımında gözlemlenmiştir.

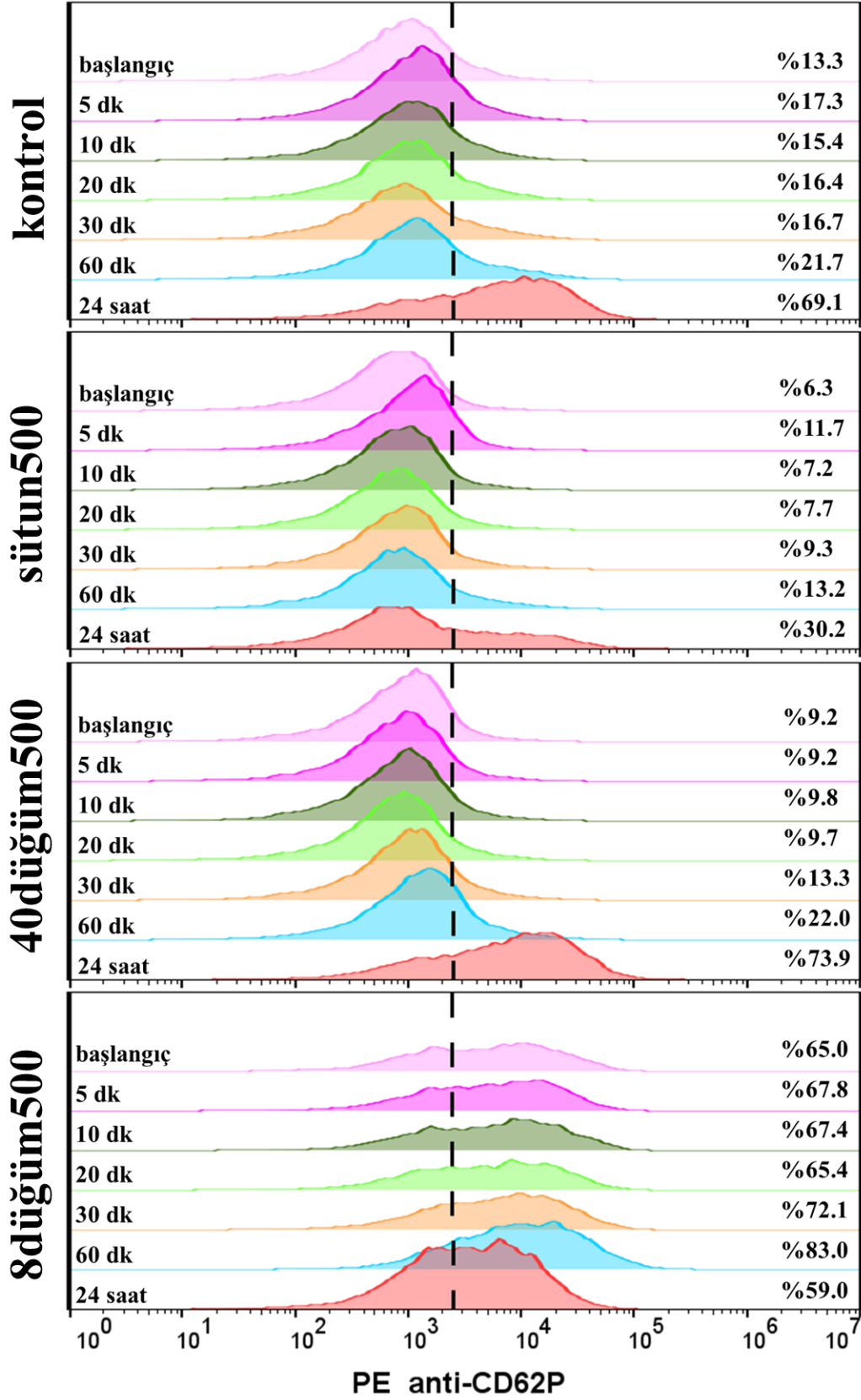
4.5.2. Çip Tasarımının ve İşlem Sonrası İnkübasyonun Trombositlere Etkisi

Sütunlu, 8-düğümlü ve 40-düğümlü tasarımlarda 500 µm özellikte olanlar kendi aralarında işlem sonrasında inkübasyona bağlı olarak kıyaslanmak istenmiştir. Bunun için 3 dakika boyunca 200 µL/s akış hızı ile çiplerden geçirilen trombositler süspansiyonundan 100 µL numune alınarak fikse edilmiştir. Kalan kısım bir tüpe alınarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. 5, 10, 20, 30 ve 60 dakika noktalarında 100 µL örnek alınarak fikse edilmiş ve akış sitometrisine hazırlanmıştır. Sıcak silikon ile mikroçiplere yapıştırılan şırıngaların çözülmesinden fiksasyona kadar olan yaklaşık 2-3 dakikalık süre belirtilen sürelerle dahil edilmemiştir.

Şekil 4.18'de bu deneylerin sonuçları verilmektedir. Her çipin farklı sürelerde inkübasyon sonuçları kendi içinde yarı ofset halinde verilmiştir. Yukarıdan aşağıya doğru artan zaman gösterilmektedir. Çiplerde işlem görmemiş trombositlerde 60 dakikaya kadar giderek

artan biçimde %15 seviyelerinde seyretmektedir. 60 dakikada %21.7 aktivasyon oranı sağlıklı trombositlerin kendiliğinden aktivasyonunu göstermektedir. 24 saat sonra ise trombositlerin büyük çoğunluğu aktive olarak %69.1 seviyelerine ulaşmıştır. Ancak sütunlu tasarımlarda aktivasyon yüzdeleri giderek artmasına rağmen, 60 dakika boyunca %15'in altında kalmıştır. 24 saat sonunda bile ancak %30.2 seviyelerine ulaşabilmiştir. Aynı şekilde 40-sütunlu çiplerde de ilk bir saatteki örnekler kontrolün aktivasyon seviyesinin altında kalmıştır. Şekil 4.3b ve Şekil 4.5b kayma gerilimi profilleri incelendiğinde gerilim piklerinin çok tekrarlı olduğu görülmektedir. Sütunlu çipte kısa kısa uygulanan 30 dyne/cm²'lik 70 kayma gerilimi vuruşuna karşı 40-düğümlü çipte 100 dyne/cm²'lik görece daha uzun 40 kayma gerilimi vuruşu uygulanmıştır. Bu kayma gerilimleri sütunlu çipte sütunlar arasındaki 500 µm'lik mesafede uygulanırken, 40-düğümlü çipte 3 mm'lik kanal boyunca uygulanmaktadır. Buradan hareketle çok sayıdaki kayma gerilim vuruşlarının trombositleri aktive etmekten ziyade fonksiyonlarını olumsuz etkilediği sonucuna ulaşılmıştır. Bir önceki alt bölümde varılan uzun süreli uygulamanın trombositlere zarar verdiği yargısı bu sonuçlarla da desteklenmektedir. Diğer taraftan 40-düğümlü çipte 60 dakika ve 24 saat sonuçlarında görülen sonuçların kontrolün sonuçlarına benzer olması trombositlerin bu stres sonucunda belirli bir süre içinde fonksiyonlarını kazandıklarını göstermektedir. Bu çipte bulunan gevşeme haznelerinin (relaxation chamber) trombositlerin tamamen işlevsiz hale gelmesini engellediği düşünülebilir.

8-düğümlü çip incelendiğine işlemin ilk anından itibaren aktivasyonun yüksek oranda başladığı görülmektedir. İlk 20 dakikada %65 seviyelerinde seyreden aktivasyon oranı 30. dakikada %72.1 ve 60. dakikada %83.0 seviyelerine çıkmıştır. Ancak 24 saat sonunda diğer çiplerden alınan sonuçlarının aksine aktivasyon oranı daha da artmak yerine %59'a düşmüştür.

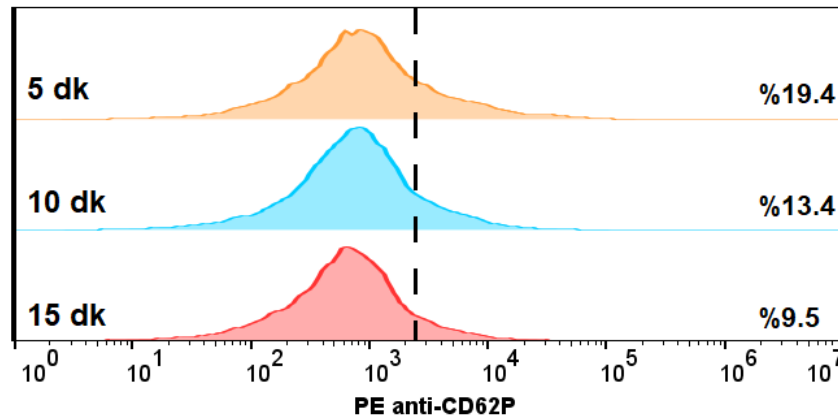


Şekil 4.18. Sütun500, 40dügüm500 ve 8dügüm500 çipleri ile 3 dakikalık uygulamadan sonra trombositlerin zamana karşı aktivasyon oranları (kontrol: işlem görmemiş trombositler)

4.5.3. Ultrasonik Dalganın Trombositlere Etkisi

Piezo elektrotlar ve plazma haznesi 3.4.2.2. bölümünde anlatıldığı gibi entegre edilip bağlandıktan sonra 5, 10 ve 15 dakika boyunca ultrasonik dalgaya maruz bırakılmıştır. Ses dalgasının frekansı seçilirken Poliachik ve arkadaşlarının yüksek-yoğunluklu odaklanmış ultrason yönteminde kullandıkları 1.1 MHz örnek alınmıştır [65]. Çalışmada kullanılan ses dalgası çok küçük bir alana odaklandığı için yoğunluğu W/cm^2 cinsinden çok yüksek olmaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan ses dalgası 4.4. bölümünde anlatıldığı gibi kontrol edilmiştir. Kullanılan parametreler üretilen ses dalgasının frekansı için 1.1 MHz ve uygulanan kare dalganın genliği için (peak-to-peak) 10 V'tur.

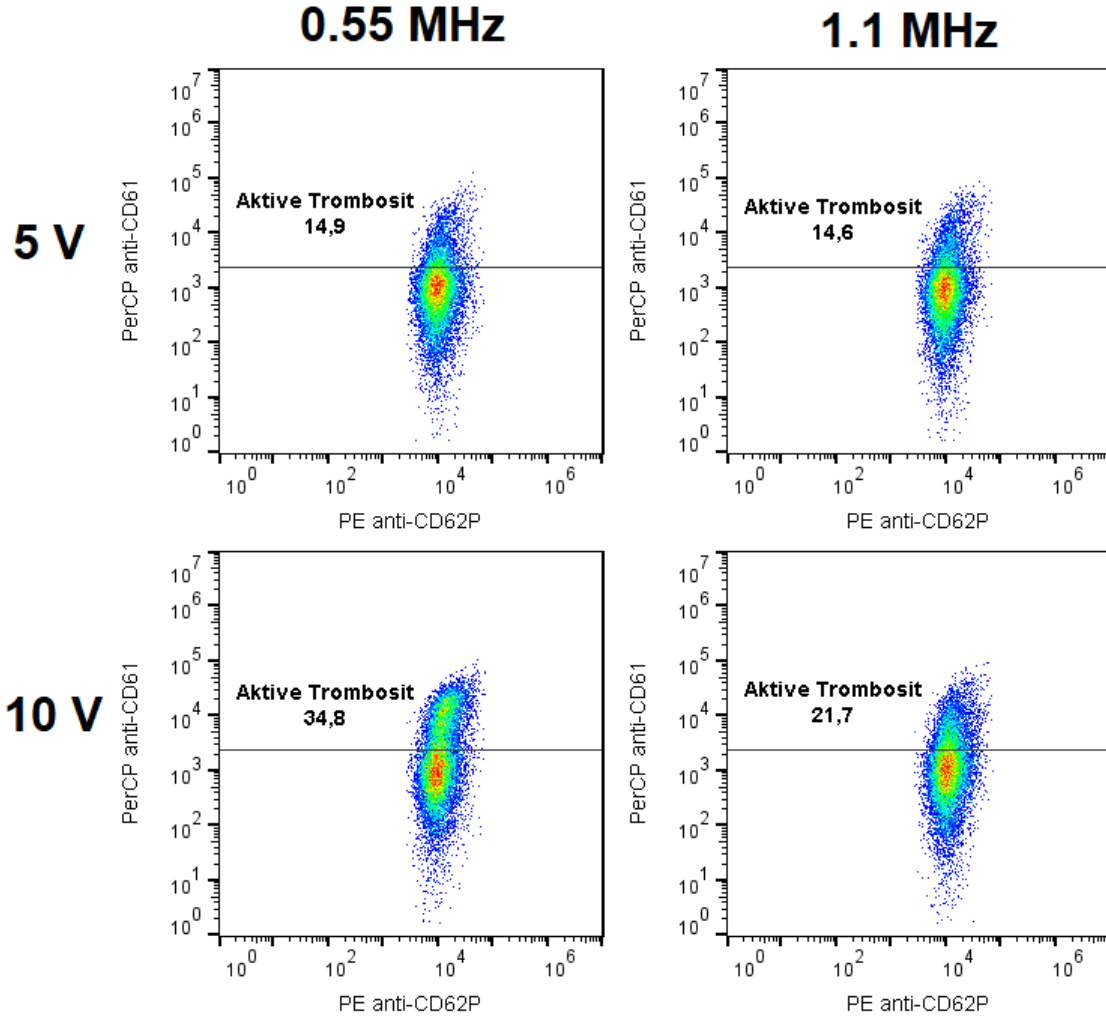
Belirtilen ses dalgasının trombositlere 5, 10 ve 15 dakika uygulandıktan sonraki aktivasyon oranları Şekil 4.19'daki histogramlarda gösterilmektedir. Artan süre ile azalan aktivasyon oranı gözlemlenmiştir. Aktivasyon için optimum uyarım süresinin daha da aşağıda olabileceği düşünülmüştür. Bu yüzden daha kısa süreli çalışmalar yapılarak uygun süre aranmıştır.



Şekil 4.19. 1.1 MHz ve 10 V genlikli ses dalgası ile 5, 10 ve 15 dakika etkileşim sonucunda trombositlerin aktivasyon oranı

Zaman optimizasyonunun yanında ses dalgasının parametreleri de optimize edildi. 5 dakikalık uygulamalarda 5 ve 10 V genlikte 0.55 ve 1.1 MHz frekansa sahip ses dalgaları kullanılmıştır. Şekil 4.20'de aktivasyon oranlarını belirten CD61'ye karşı CD62P nokta dağılım grafikleri verilmektedir. 5 V sonucunda alınan oranlar frekanstan bağımsız olarak birbirine yakın görülmektedir. Diğer yandan 10 V uygulama sonucunda düşük frekansta daha yüksek aktivasyon görülmüştür. Bunun sebebi enerji iletiminin düşük frekansta daha

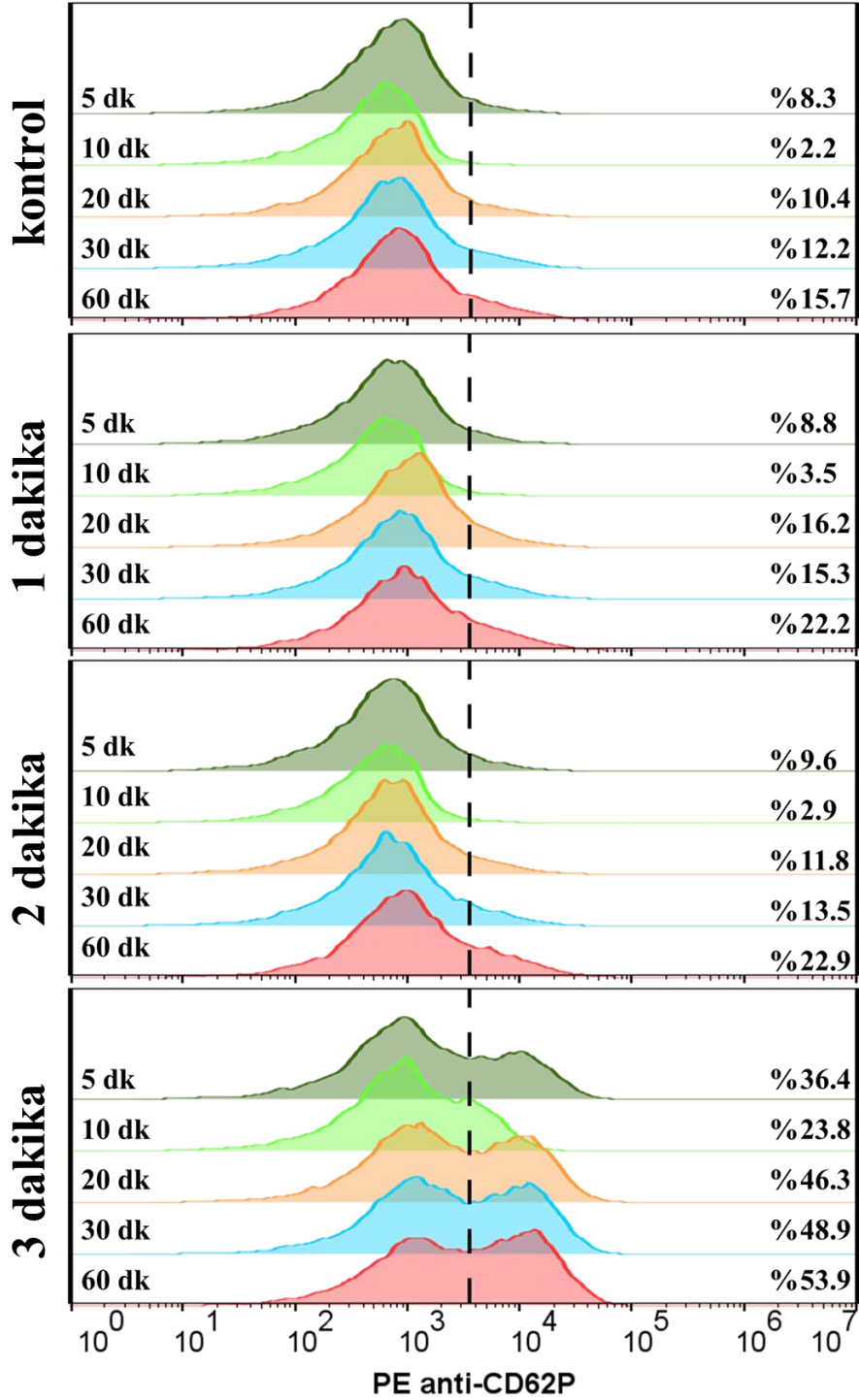
yüksek verimle yapılabilmesi olabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda tez çalışması kapsamında geliştirilen trombositlerin ultrasonik aktivasyonu sistemde kullanılacak ses dalgası parametrelerine 10 V ve 0.55 MHz olarak karar verilmiştir.



Şekil 4.20. Farklı frekans ve genlik parametrelerinde trombosit aktivasyon oranları

Ses dalgasının parametreleri belirlendikten sonra en uygun uygulama süresi için tekrar denemeler yapıldı. Bu kez 1, 2 ve 3 dakika uygulama süreleri uygulandı. Uygulama sonrasında oda sıcaklığında belirli sürelerde bekletilerek yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.21’de verilmektedir. 1 ve 2 dakikalık uygulamalarda kontrolle kıyaslandığında aktivasyonun tetiklendiği görülmektedir. Ancak bu oran bir saatin sonunda dahi %20 seviyelerinde kalmıştır. Öte yandan 3 dakikalık aktivasyonda ise bu oran 5 dakikada %36.4’ten başlayarak 60 dakika sonunda %53.4’e ulaşmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda tez çalışması kapsamında geliştirilen trombositlerin ultrasonik aktivasyonu sisteminde kullanılacak en uygun ses dalgası parametreleri 10 V ve 0.55 MHz ve uygulama süresi 3 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. Ultrasonikasyon sisteminde 1, 2 ve 3 dakikalık uygulamadan sonra trombositlerin zamana karşı aktivasyon oranları (kontrol: işlem görmemiş trombositler)

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında PRP tedavilerinde biyomedikal amaçlarla kullanılmaya uygun sistemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde PRP tedavisinin ortopedik/spinal cerrahi, spor tıbbı, oral ve maksillofasiyal cerrahi, estetik ve rejeneratif tıp, kardiyotorasik cerrahi gibi birçok kullanım alanda klinik olarak uygulandığı ve tedaviyi olumlu yönde etkilediği çalışmalara rastlamak mümkündür. Bu etkiyi arttırmak amacıyla aktive edilmiş PRP kullanan klinik araştırmalarda tedavinin daha verimli sonuç verdiği bulgularına erişilmiştir. Ancak PRP aktivasyon çalışmalarında kullanılan yöntemlerden ilkinde enflamasyona sebep olabilecek kimyasallar içermektedir. Bir diğer yöntem PRP enjekte edilirken ultrason görüntüleme cihazı ile ultrasonik aktivasyondur. Bu yöntemde ultrason cihazına ve uzmanına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında uygun maliyetli, portatif ve kullanımı kolay PRP aktivasyon sistemler geliştirmek amaçlanmıştır. Bunun için yapılan araştırmalarda trombositlerin belirli kayma gerilimi altında aktive olduğu reolojik çalışmalar ile belirlendiği tespit edilmiştir. Belirlenen bu kayma gerilimlerini uygulamak için mikroakışkan çipler tasarlanmış ve akış simülasyonu ile bu gerilimler kontrol edilmiştir. Simülasyon uygulanırken sıvının çipten geçme hızı 200 $\mu\text{L/s}$ olarak seçilmiştir. Bu bir insanın şırıngada eliyle uygulayabileceği bir hızdır. PRP uygulayacak operatörün şırınga pompası gibi ek bir cihaza ihtiyaç duymaması adına bu hız seçilmiştir.

Tasarımları yapılan çipler biyoyumlu bir polimer olan PMMA plakalardan CO₂ lazer işleme yöntemleri ile üretilmiştir. Üretim sırasında yapılan lazer parametreleri optimizasyonları sayesinde istenen ölçeklerde mikroçip üretimi için kullanılacak parametreler belirlenmiştir. Bu sonuçlar ileride PMMA plakalarla üretilen çipler için de kullanılacak parametreler içermektedir.

Trombositlerin aktivasyonu için literatürde bulunan bir diğer yöntem de ultrasonik ses dalgaları ile uyarma yöntemidir. Farklı parametreler ve cihazlarla uygulanan ses dalgaları bu tez çalışmasında piezoseramik elektrotlar ile uygulanmıştır. Ses dalgasının

validasyonu uygulanan sıvının diğere tarafına başka bir piezoseramik elektrot yerleştirilerek yapılmıştır. Üretilen ses dalgası plazma haznesinde absorplandıktan sonra osilatöre bağlanmış olan piezoseramik elektrotta tespit edilerek absorplanan enerji hesaplanmıştır. Bu sayede aktivasyon için gereken enerji seviyesi tespit edilmiştir.

Mikroakışkan ve ultrasonik sistemlerin uygulama sonuçları akım sitometrisi çalışmaları ile incelenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda 18.6 – 195.0 dyne/cm² arasında uygulanan bütün çalışmalarda aktivasyon görülmüştür. Artan uygulama süresinin trombosit aktivasyonunu olumsuz etkilediği saptanmıştır. 3 dakikalık uygulamalar sonucunda elde edilen aktivasyonlar kıyaslandığında 97.5 dyne/cm² kayma gerilimine sahip 8düğüm500 tasarımının mikroakışkan çiplerde en yüksek aktivasyon oranını verdiği görülmüştür. Ultrasonik aktivasyon yönteminde ise en yüksek aktivasyon oranı 0.55 MHz frekanslı 10 V genlikli dalgaların 3 dakikalık uygulamalarında görülmektedir.

Trombositlerin uyarıldıktan sonraki aktivasyon süreci bekletme çalışmaları ile izlenmiştir. Uyarma işlemi uygulandıktan sonra oda sıcaklığında bekletilerek belirli sürelerde fikse edilmiştir. Bu zaman noktalarında aktivasyon oranları incelendiğinde trombositlerin uyarma işlemi son bulduktan sonra da aktivasyona devam ettiği görülmüştür. Bu bulguların trombosit aktivasyonu üzerine yapılacak kinetik çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak PRP tedavisinde kullanılmak üzere bir mikroakışkan çip ve bir ultrasonik sistem geliştirilen geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile 3 dakikalık bir uygulama ile trombositlerin aktivasyonu başlatıldıktan sonra PRP uygulanarak tedavi hızlandırılabilir. Önerilen bu sistemler standardize edilerek seri üretim bantlarında fabrikasyonları sağlanabilecek sistemlerdir.

KAYNAKLAR

- [1] A. Noyan, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, 15th ed., Meteksan, Ankara, 2004.
- [2] I. Laurens, THESIS Development of a new extraction method for platelet-rich plasma and partial purification of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta, Thesis. (2014) 1–148.
- [3] R.E. Rumbaut, P. Thiagarajan, Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis, 2010. <https://doi.org/10.4199/c00007ed1v01y201002isp004>.
- [4] C.A. Jameson, Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel, Lab. Med. 38 (2007) 39–42. <https://doi.org/10.1309/3UA5HWYVKNCE01AR>.
- [5] M. Hamilos, S. Petousis, F. Parthenakis, Interaction between platelets and endothelium: From pathophysiology to new therapeutic options, Cardiovasc. Diagn. Ther. 8 (2018) 568–580. <https://doi.org/10.21037/cdt.2018.07.01>.
- [6] P.A.M. Everts, J.T.A. Knappe, G. Weibrich, J.P.A.M. Schönberger, J. Hoffmann, E.P. Overdeest, H.A.M. Box, A. Van Zundert, Platelet-rich plasma and platelet gel: A review, J. Extra. Corpor. Technol. 38 (2006) 174–187.
- [7] M. Milovanovic, Platelets: with special reference to platelet density subpopulations, stable coronary heart disease and atrial fibrillation, 2010.
- [8] R. Flaumenhaft, Platelet Secretion, Third Edit, Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00018-3>.
- [9] J.L. Ritchie, H.D. Alexander, I.M. Rea, Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood - Methodological considerations, Clin. Lab. Haematol. 22 (2000) 359–363. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2000.00339.x>.
- [10] W.R. Parrish, Physiology of Blood Components in Wound Healing: an Appreciation of Cellular Co-Operativity in Platelet Rich Plasma Action, J. Exerc. Sport. Orthop. 4 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.15226/2374-6904/4/2/00156>.
- [11] K.S. Lee, J.J. Wilson, D.P. Rabago, G.S. Baer, J.A. Jacobson, C.G. Borrero, Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: Fad or future?, Am. J. Roentgenol. 196 (2011) 628–636. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.5975>.
- [12] K. Rogers, ed., Blood: Physiology and Circulation, 1st ed., Britannica Educational Publishing, New York, 2011.

- [13] R.E. Marx, Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use, *J. Oral Maxillofac. Surg.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003>.
- [14] C.W. Hunter, T. Davis, P. Fadadu, Platelet-Rich Plasma, in: *Adv. Proced. Pain Manag.*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 443–457. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68841-1_38.
- [15] R. Landesberg, M. Roy, 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\(00\)90059-4](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(00)90059-4).
- [16] R. Landesberg, A. Burke, D. Pinsky, R. Katz, J. Vo, S.B. Eisig, H.H. Lu, Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63 (2005) 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2004.12.007>.
- [17] R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt, S.R. Schimmele, J.E. Strauss, K.R. Georgeff, Platelet-rich plasma, *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* 85 (1998) 638–646. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4).
- [18] 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 (2000) 529–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453668>.
- [19] B.W. Eby, Platelet-rich Plasma: Harvesting with a Single-spin Centrifuge, *J. Oral Implantol.* 28 (2002) 297–301. [https://doi.org/10.1563/1548-1336\(2002\)028<0297:PPHWAS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1563/1548-1336(2002)028<0297:PPHWAS>2.3.CO;2).
- [20] S. Bhanot, J.C. Alex, Current Applications of Platelet Gels in Facial Plastic Surgery, *Facial Plast. Surg.* 18 (2002) 027–034. <https://doi.org/10.1055/s-2002-19824>.
- [21] M. Valbonesi, G. Giannini, F. Migliori, R. Dalla Costa, A. Galli, The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: A preliminary report, *Int. J. Artif. Organs.* 25 (2002) 334–338. <https://doi.org/10.1177/039139880202500413>.
- [22] D.H. Whitman, R.L. Berry, D.M. Green, Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55 (1997) 1294–1299. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(97\)90187-7](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(97)90187-7).
- [23] V.L. Davis, A.B. Abukabda, N.M. Radio, P.A. Witt-Enderby, W.P. Clafshenkel,

- J.V. Cairone, J.L. Rutkowski, Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria, *J. Oral Implantol.* 40 (2014) 511–521. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOIID-12-00106>.
- [24] I.A. Hagberg, T. Lyberg, Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: Optimised methods for clinical studies, *Platelets.* 11 (2000) 137–150. <https://doi.org/10.1080/095371000403071>.
- [25] D. Fufa, B. Shealy, M. Jacobson, S. Keyv, M.M. Murray, Activation of Platelet-Rich Plasma Using Soluble Type I Collagen, *J. Oral Maxillofac. Surg.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.06.635>.
- [26] T. Toyoda, K. Isobe, T. Tsujino, Y. Koyata, F. Ohyagi, T. Watanabe, M. Nakamura, Y. Kitamura, H. Okudera, K. Nakata, T. Kawase, Direct activation of platelets by addition of CaCl₂ leads coagulation of platelet-rich plasma, *Int. J. Implant Dent.* 4 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40729-018-0134-6>.
- [27] D. Franco, T. Franco, Angélica Maria Schettino, João Medeiros Tavares Filho, F.S. Vendramin, Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use, *Aesthetic Plast. Surg.* 36 (2012) 1254–1259. <https://doi.org/10.1007/s00266-012-9957-3>.
- [28] R. Möhle, D. Green, M.A.S. Moore, R.L. Nachman, S. Rafii, Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 663–668. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.663>.
- [29] C. Cavallo, A. Roffi, B. Grigolo, E. Mariani, L. Pratelli, G. Merli, E. Kon, M. Marcacci, G. Filardo, Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/6591717>.
- [30] V. Leytin, M. Mody, J.W. Semple, B. Garvey, J. Freedman, Flow cytometric parameters for characterizing platelet activation by measuring P-selectin (CD62) expression: Theoretical consideration and evaluation in thrombin-treated platelet populations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 85–90. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2255>.

- [31] A. Dimasi, Y. Roka-Moiia, F. Consolo, M. Rasponi, G.B. Fiore, M.J. Slepian, A. Redaelli, Microfluidic flow-based platforms for induction and analysis of dynamic shear-mediated platelet activation - Initial validation versus the standardized hemodynamic shearing device, *Biomicrofluidics*. 12 (2018). <https://doi.org/10.1063/1.5024500>.
- [32] A. Dimasi, Y. Roka-Moiia, F. Consolo, M. Rasponi, G.B. Fiore, M.J. Slepian, A. Redaelli, Microfluidic flow-based platforms for induction and analysis of dynamic shear-mediated platelet activation - Initial validation versus the standardized hemodynamic shearing device, *Biomicrofluidics*. 12 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1063/1.5024500>.
- [33] Y. Roka-Moiia, R. Walk, D.E. Palomares, K.R. Ammann, A. Dimasi, J.E. Italiano, J. Sheriff, D. Bluestein, M.J. Slepian, Platelet Activation via Shear Stress Exposure Induces a Differing Pattern of Biomarkers of Activation versus Biochemical Agonists, *Thromb. Haemost.* 120 (2020) 776–792. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709524>.
- [34] S.L. Poliachik, W.L. Chandler, P.D. Mourad, R.J. Ollos, L.A. Crum, Activation, aggregation and adhesion of platelets exposed to high-intensity focused ultrasound, *Ultrasound Med. Biol.* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(01\)00444-6](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(01)00444-6).
- [35] S.L. Poliachik, W.L. Chandler, P.D. Mourad, M.R. Bailey, S. Bloch, R.O. Cleveland, P. Kaczkowski, G. Keilman, T. Porter, L.A. Crum, Effect of high-intensity focused ultrasound on whole blood with and without microbubble contrast agent, *Ultrasound Med. Biol.* 25 (1999) 991–998. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(99\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(99)00043-5).
- [36] M.H. Kroll, J.D. Hellums, L. V McIntire, A.I. Schafer, J.L. Moake, Platelets and shear stress., *Blood*. 88 (1996) 1525–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781407>.
- [37] C.H. Brown, L.B. Leverett, C.W. Lewis, C.P. Alfrey, J.D. Hellums, Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear stress., *J. Lab. Clin. Med.* 86 (1975) 462–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1151161>.
- [38] H.J. Weiss, V.T. Turitto, H.R. Baumgartner, Effect of shear rate on platelet

- interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate--dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome., *J. Lab. Clin. Med.* 92 (1978) 750–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/309498>.
- [39] Z.M. Ruggeri, Platelet Adhesion under Flow, *Microcirculation*. 16 (2009) 58–83. <https://doi.org/10.1080/10739680802651477>.
- [40] E. Gutierrez, B.G. Petrich, S.J. Shattil, M.H. Ginsberg, A. Groisman, A. Kasirer-Friede, Microfluidic devices for studies of shear-dependent platelet adhesion, *Lab Chip*. (2008). <https://doi.org/10.1039/b804795b>.
- [41] S.C. Shadden, S. Hendabadi, Potential fluid mechanic pathways of platelet activation, *Biomech. Model. Mechanobiol.* (2013). <https://doi.org/10.1007/s10237-012-0417-4>.
- [42] H. Lee, G. Kim, C. Lim, B.K. Lee, S. Shin, A simple method for activating the platelets used in microfluidic platelet aggregation tests: Stirring-induced platelet activation, *Biomicrofluidics*. (2016). <https://doi.org/10.1063/1.4972077>.
- [43] S.H. Song, C.S. Lim, S. Shin, Migration distance-based platelet function analysis in a microfluidic system, *Biomicrofluidics*. 7 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1063/1.4829095>.
- [44] Q. Lu, R.A. Malinauskas, Comparison of Two Platelet Activation Markers Using Flow Cytometry After In Vitro Shear Stress Exposure of Whole Human Blood, *Artif. Organs*. 35 (2011) 137–144. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2010.01051.x>.
- [45] S. Vaezy, R.W. Martin, U. Schmiedl, M. Caps, S. Taylor, K. Beach, S. Carter, P. Kaczkowski, G. Keilman, S. Helton, W. Chandler, P. Mourad, M. Rice, R. Roy, L. Crum, Liver hemostasis using high-intensity focused ultrasound, *Ultrasound Med. Biol.* 23 (1997) 1413–1420. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(97\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(97)00143-9).
- [46] R.J. Siegal, S. Vaezy, R. Martin, L. Crum, High intensity focused ultrasound: A method of hemostasis, *Echocardiography*. 18 (2001) 309–315. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8175.2001.00309.x>.
- [47] S. Vaezy, R. Martin, H. Yaziji, P. Kaczkowski, G. Keilman, S. Carter, M. Caps, E.Y. Chi, M. Bailey, L. Crum, Hemostasis of punctured blood vessels using high-

- intensity focused ultrasound, *Ultrasound Med. Biol.* 24 (1998) 903–910.
[https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(98\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(98)00050-7).
- [48] T.G. Leighton, What is ultrasound?, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (2007).
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026>.
- [49] G. Schmitz, G. Rothe, A. Ruf, S. Barlage, D. Tschöpe, K.J. Clemetson, A.H. Goodall, A.D. Michelson, A.T. Nurden, T.V. Shankey, European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function, *Thromb. Haemost.* 79 (1998) 885–896.
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1615088>.
- [50] N.-T. Nguyen, S.T. Wereley, A. House, *Fundamentals and Applications of Microfluidics - Second Edition*, 2002.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.466.4414&rep=rep1&type=pdf>.
- [51] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis*. 21 (2000) 27–40. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2683\(20000101\)21:1<27::aid-elps27>3.3.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-2683(20000101)21:1<27::aid-elps27>3.3.co;2-3).
- [52] D. Li, ed., *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Springer US, Boston, MA, 2008. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-48998-8>.
- [53] T.G. Papaioannou, C. Stefanadis, Vascular wall shear stress: basic principles and methods., *Hellenic J. Cardiol.* 46 (n.d.) 9–15.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807389>.
- [54] G.S. Fiorini, D.T. Chiu, Disposable microfluidic devices: Fabrication, function, and application, *Biotechniques*. 38 (2005) 429–446.
<https://doi.org/10.2144/05383RV02>.
- [55] A. Grosse, M. Grewe, H. Fouckhardt, Deep wet etching of fused silica glass for hollow capillary optical leaky waveguides in microfluidic devices, *J. Micromechanics Microengineering*. 11 (2001) 257–262.
<https://doi.org/10.1088/0960-1317/11/3/315>.
- [56] S. Qin, G. Ou, B. Wang, Z. Li, R. Hu, Y. Li, Y. Yang, Photolithography-free fabrication of photoresist-mold for rapid prototyping of microfluidic PDMS

- devices, *Chinese Chem. Lett.* (2021) 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.07.045>.
- [57] Z. Isiksacan, M.T. Guler, B. Aydogdu, I. Bilican, C. Elbuken, Rapid fabrication of microfluidic PDMS devices from reusable PDMS molds using laser ablation, *J. Micromechanics Microengineering*. 26 (2016). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/26/3/035008>.
- [58] J.D. Cheeke, J. Zagzebski, *Fundamentals and Applications of Ultrasonic Waves*, *Am. J. Phys.* 72 (2004) 719–719. <https://doi.org/10.1119/1.1645288>.
- [59] D. Ensminger, L.J. Bond, *Ultrasonics: Fundamentals, technologies, and applications*, third edition, *Ultrason. Fundam. Technol. Appl. Third Ed.* (2011) 1–704.
- [60] T.F. Hong, W.J. Ju, M.C. Wu, C.H. Tai, C.H. Tsai, L.M. Fu, Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO₂ laser, *Microfluid. Nanofluidics*. 9 (2010) 1125–1133. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0633-0>.
- [61] V.F.-G. Tseng, S.S. Bedair, N. Lazarus, Acoustic Power Transfer and Communication With a Wireless Sensor Embedded Within Metal, *IEEE Sens. J.* 18 (2018) 5550–5558. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2018.2839558>.
- [62] M.G.L. Roes, J.L. Duarte, M.A.M. Hendrix, E.A. Lomonova, Acoustic Energy Transfer: A Review, *IEEE Trans. Ind. Electron.* 60 (2013) 242–248. <https://doi.org/10.1109/TIE.2012.2202362>.
- [63] K. Agarwal, R. Jegadeesan, Y.-X. Guo, N. V. Thakor, Wireless Power Transfer Strategies for Implantable Bioelectronics, *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 10 (2017) 136–161. <https://doi.org/10.1109/RBME.2017.2683520>.
- [64] W. Gao, W. Liu, Y. Hu, J. Wang, Study of Ultrasonic Near-Field Region in Ultrasonic Liquid-Level Monitoring System, *Micromachines*. 11 (2020) 763. <https://doi.org/10.3390/mi11080763>.
- [65] S.L. Poliachik, W.L. Chandler, P.D. Mourad, R.J. Ollos, L.A. Crum, Activation, aggregation and adhesion of platelets exposed to high-intensity focused ultrasound, *Ultrasound Med. Biol.* 27 (2001) 1567–1576. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(01\)00444-6](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(01)00444-6).