



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**FİBER HALKA DÖNGÜ SÖNÜMÜ TEKNİĞİ KULLANILARAK ALZHEİMER
HASTALIĞI ERKEN TEŞHİSİ ÇALIŞMASI**

Proje No: 201841074

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Malik KAYA
ESOGÜ, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Okan Esentürk ODTÜ, Kimya Bölümü

Dr. Öğr. Üy. Fatma Nazlı Durmaz Çelik
ESOGÜ, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü

Öğr. Gör. Dr. Semih Öz
ESOGÜ, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu
Yaşlı Bakım Bölümü

Kasım 2021

ESKİŞEHİR

TEŞEKKÜR

Bu projedeki tüm çalışmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) birimi tarafından desteklenmiştir.

Ayrıca bu proje çalışmasında yaptığı katkılardan dolayı ESOGÜ, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Orhan Tansel Korkmaz'a ve ESOGÜ, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Öğretim Üyesi Sedef Hande Aktaş'a teşekkürlerimi sunarız.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. YÖNTEM ve DENEYSEL KURULUM	13
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	18
4. SONUÇ	24

ÖZET

Bu projede Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu bünyesinde, Eskişehir’de ilk ve tek olan, ultra yüksek hassasiyete ve eşzamanlı ölçüm alabilme yeteneğine sahip bir ölçüm sistemi olan Fiber Halka Döngü Sönümleme Spektroskopi (FHDSS) tekniğinin kullanıldığı Fiber Optik Sensör (FOS) sistemi dizayn edilmiş ve Alzheimer Hastalığı (AH) erken teşhisi için fiber optik biyosensör uygulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. FHDSS sistemi; bir sürekli dalga (Continuous Wave (CW)) lazer kaynağı, çok düşük birleştirme oranına sahip birleştiriciler kullanılan tek modlu fiber halka ve elektronik sistem kullanılarak oluşturulmuştur. Sistemin dizaynı ve yüksek hassasiyetli optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar ortamında fiber halkadaki fiberin bir kısmı asit içerisinde aşındırılarak farklı hassasiyete sahip Fiber Optik Sensörler (FOSs) üretilmiştir. Sensör hassasiyetinin optimize edilmesinden sonra en hassas FOS üretilerek, FHDSS sisteminin baseline kararlılığı 1.63% olarak hesaplanmıştır. FOS ilk etapta su ve hava gibi farklı ortamlarda test edilerek sensör hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Sonrasında benzer olarak üretilen sensörler hava, deiyonize su, yapay beyin sıvısı (ACSF) ve farklı konsantrasyonlarda Beta Amyloid çözeltisi içeren ACSF çözeltileri ortamlarında test edilerek, FHDSS sisteminin çözelti ortamlarına göre sönümlenme süreleri, dolayısı ile sistemin toplam optik kayıpları elde edilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar göstermiştir ki; ultra yüksek hassasiyete sahip, anlık ve eşzamanlı ölçümler alabilen, portatif sistem olma özelliği sunan, sade bir dizayna sahip FHDSS tekniğinin kullanıldığı fiber optik sensörler Alzheimer, diyabet, farklı kanser türleri ve ölümcül veya yaygın birçok hastalık için erken teşhis amaçlı yüksek uygulama potansiyeline sahiptir. Bu sensörler sıvı çözeltilerde kullanılabildiği gibi, gaz ortamlarında da kullanılabildiği için nefesten hastalık teşhisinde de biyosensör olarak kullanılmaktadır. Bu proje çalışması ile gelecek projelere temel oluşturacak ultra yüksek hassasiyetli bir ölçüm sistemi dizayn edilmiştir.

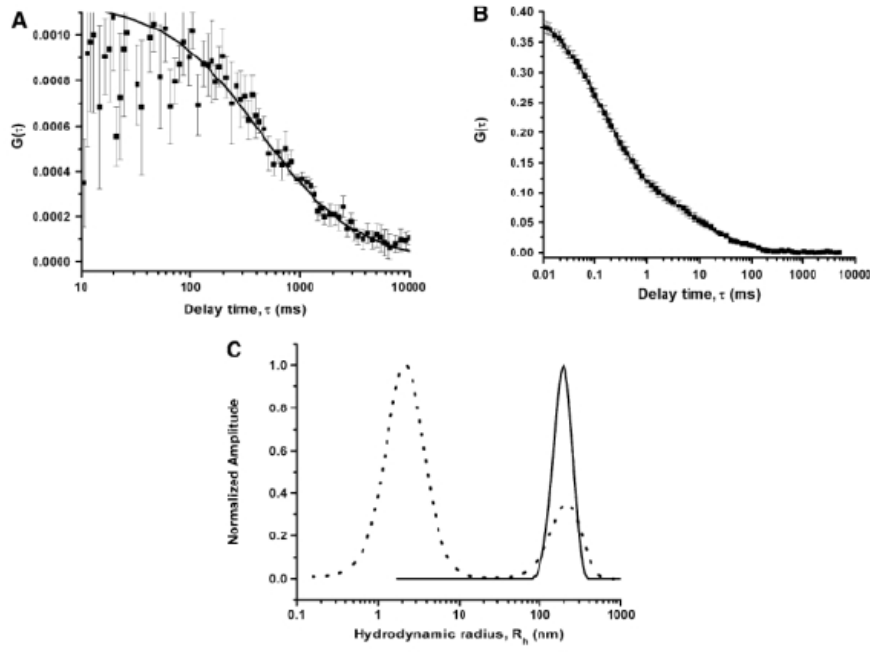
ABSTRACT

In this project, Fiber Optic Sensor (FOS) system with Fiber Loop Ringdown Spectroscopy (FLRDS) technique which allows ultra high sensitivity and simultaneous measurement was setup for the first time in Eskisehir Osmangazi University, Vocational School of Health Service. FLDS system was studied for the detection of Alzheimer Disease (AD). FLRDS system was constructed by using a Continuous Wave (CW) laser source, single mode fiber loop with small percentage couplers and electronic equipment. FLRDS system desing and its high accuracy optimization was carried out. FOSs were fabricated by etching a part of fiber in the fiber loop in asidic solution. After sensitivity optimization of fabricated sensors, the baseline stability of the FLRDS system was obtained as 1.63%. Afterwards, high sensitive sensors were fabricated in laboratory conditions and tested in water and air media. Furthermore, the sensors were tested in air, deionized water, Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF) and ACSF solutions contained different concentrations of Betay Amyloid solutions. Hence, ringdown times (RDTs) of FLRDS system depends of different solutions are obtained. The optical losses of the sensor systems can be calculated by using RDTs. Depends on the obtained results, FOSs with FLRDS tehcnique which allows ultra high sensitivity, simultaneous measurement, portability and simple design has high potential for the applicaiton of early detection in Alzheimer Disease (AD), several cancer diseases and other fatal diseases. Fiber optic sensors can be used in gaseous solutions as much as used in liquid solutions. Therefore, FOSs can be utilized to study Volatile Organic Compounds (VOCs) in breath as a biosensor. Ultra sensitive spectroscopic measurement FLRDS system designed and setup in this project will inspire and be utilized in future projects.

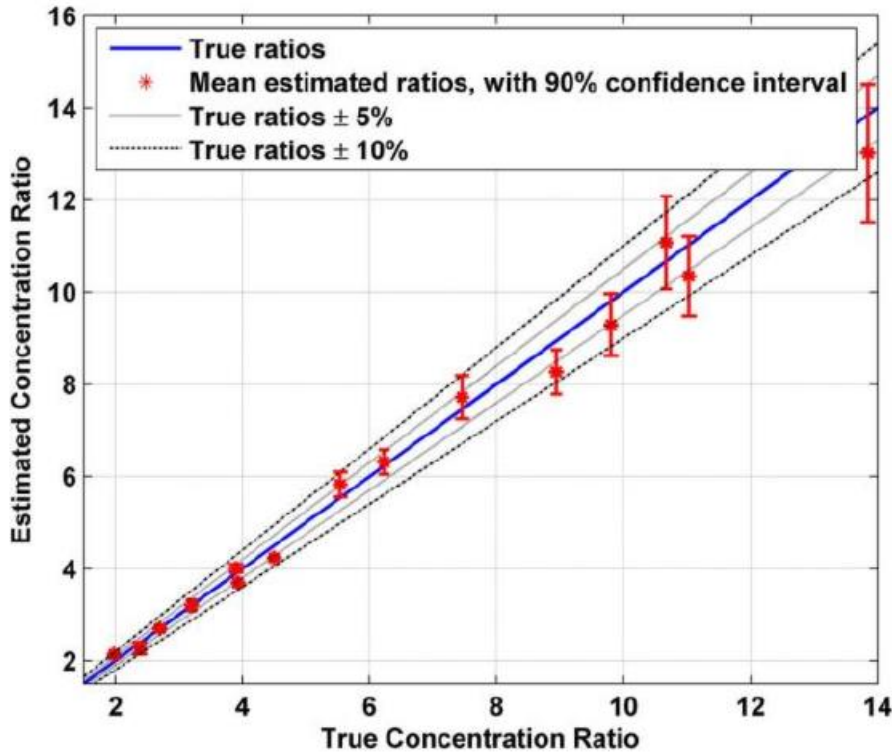
1. GİRİŞ

Küçük hacim, esneklik, gerçek zamanlı, hızlı ve yüksek hassasiyette ölçüm olanağı, elektriksel duyarsızlık, düşük maliyet, ve kolay kurulum gibi bir çok özelliklere sahip olması nedeniyle FOSler biyomedikal uygulamalarda, sağlık alanında ve optik haberleşme sistemlerinde, yapısal sağlık denetimi uygulamalarında ve kimyasal molekül/element takibinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bugüne kadar çeşitli değişik deneysel uygulamalarda FOSler kullanılarak Alzheimer, kanser, diyabet gibi ölümcül hastalıkların tanı ve teşhisi için sıkça kullanılmıştır. FOSlerin kolay kurulumu, yüksek hassas ölçümleri gerçek zamanlı ve hızlı bir şekilde alabilmesi, düşük maliyeti ve esnekliği gibi birçok üstün özellikleri, bu sensörleri biyomedikal uygulamalar için cazip kılar.

Literatürde Alzheimer Hastalığı (AH) beyindeki çeşitli patolojik işaretler tarafından karakterize edildiği belirtilmiştir. Bunlar nörofibriler yumaklar içeren nöronlar tarafından çevrelenmiş büyük sayıda amyloid plaklar, aşırı şekilde plakların birikmesiyle oluşan vasküler zedelenmeler ve nöronal hücre kaybı olarak bilinmektedir [1]. 1992'den beri Amyloid kaskad hipotezi AH'nin açıklanması için önemli bir rol oynamıştır. Hipoteze göre plakların ana bileşeni olan Amyloid-Beta Proteinlerinin (ABP) birikimi AH için en önemli kanıttır [1,2]. Literatürdeki ilk Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) içerisinde tau biyoişaret ölçümü 1993'de yapılmıştır [3]. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar tau proteinlerinin AH için biyoişaret olarak tanınmasını değerlendirmiştir. En tutarlı bulgu ise Sjogren ve ekibi tarafından 2001 yılında yapılmıştır [4]. Bu çalışmada, BOS içerisindeki toplam tau proteinlerinin, sağlıklı insanlar ile AH bireyler arasındaki farklılığı sergilemişlerdir. AH hastalarında bu oran önemli derecede farklı çıkmıştır. İlk BOS içerisinde toplam Beta-amyloid proteini ölçümleri çalışmaları AH ve sağlıklı bireyler için çok küçük farklılıklar göstermiştir [5]. Beta-amyloid 40 biyoişareti için yapılan çalışmalar AH hastaları için büyük bir fark göstermese de [6,7], beta-amyloid 42 biyoişareti için yapılan çalışmalar bu biyoişaretin BOS sıvısı içerisinde AH hastalarında sağlıklı bireylerden daha az çıkmıştır [8,9]. Daha önce yapılmış çalışmalarda AB biyoişaretlerin ölçümlerinde çeşitli tekniklerle FOSler kullanılmıştır, fakat Evanescent Field-Fiber Loop Ringdown (EF-FLRD) sensing tekniği daha önce bu biyoişaretlerin ölçümlerinde kullanılmamıştır. Yapılan bir çalışmada çoklu AB izoformları AB'nin iç elektroaktiflik özelliğinden yararlanılarak elektrokimyasal immunosensörler tarafından ölçülmüştür [10]. Bu çalışmada karbon fiber mikroelektrotları sensör platformu olarak kullanılmıştır. AB tekli Tyr rezidü içermekte ve kolayca elektrot yüzeyine oksitlenebilmektedir. Bu elektrotlara voltaj uygulanarak oksitlenen Tyr ölçümü ile AB aktivitesinin görüntülenmesini mümkün kılmışlardır. Farklı kombinasyonlardaki AB1-40 ve AB1-42 ile spayk edilmiş fare beyin omurilik sıvısına (BOS) voltaj uygulayarak enkübasyon işlemini başlatıp mikroelektrotların tepkisini değerlendirerek AB izoformları ölçümü yapmışlardır. Bir başka çalışmada, fiber-temelli floresan korelasyon spektroskopisi (FKS) ile AB biriktirmesi ölçümü gerçekleştirilmiştir [11]. Bu çalışmada birikmiş AB proteinlerinin fluorophore ile etiketlenerek fiber tekniğiyle ölçülebilir bir hedef haline getirilmiştir. Tek modlu fiber kullanılarak 543 nm dalgaboylu bir ışık ile örnekler uyarıp yine bu fiber yardımıyla floresan etiketli AB ölçümü alınmıştır. Bu örneklerden alınan fiber FKS ölçümlerinden elde edilen özilintili verisi (kalın kareler) Şekil 1A'da gösterilmektedir. Bu verinin hacim dağılımı ise Şekil 1C'de gösterilmiştir (sürekli çizgi). Sonra aynı çözelti geleneksel FKS ile çalışılıp özilintili veri ve fit Şekil 1B'deki gibi elde edilmiştir. Bu verinin hacim dağılımı ise Şekil 1C'de kesikli çizgi ile verilmiştir.



Şekil 1. AB çözeltisinin birikim ölçümleri. Ref. [11]'den alınmıştır. A) Fiber FKS ve B) geleneksel FKS cihazı kullanılarak çözelti hazırladıktan 6 s sonra 10 mM AB + 100 nM RAB' dan elde edilen fit alınmış (kalın çizgi) özilintili veriler (kalın kareler). C) Fiber FKS (sürekli çizgi) ve geleneksel FKS kullanılarak (kesikli çizgi) elde edilen hacim dağılımları.



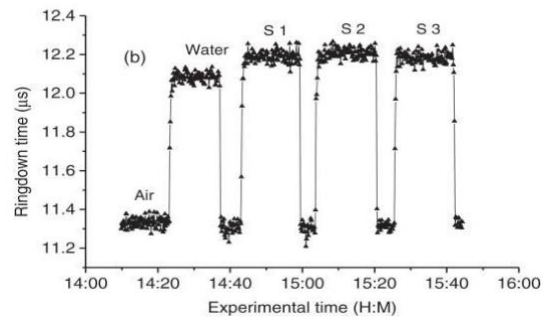
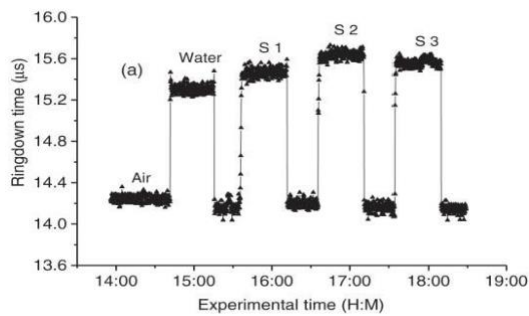
Şekil 2. Çoklu-tabakalı phantom derisi deneyleri için gerçek konsantrasyon oranının bir fonksiyonu olarak tahmini konsantrasyon oranı. Ref. [12]'den alınmıştır. Sürekli çizgi doğru oran değerlerini göstermektedir. Yıldız sembolleri ortalama tahmini değerleri %90 doğrulukla

göstermektedir. Noktasal kesikli çizgiler %5 hata ile gerçek değerleri ve çizgisel kesikli çizgiler %10 hata ile gerçek değerleri göstermektedir.

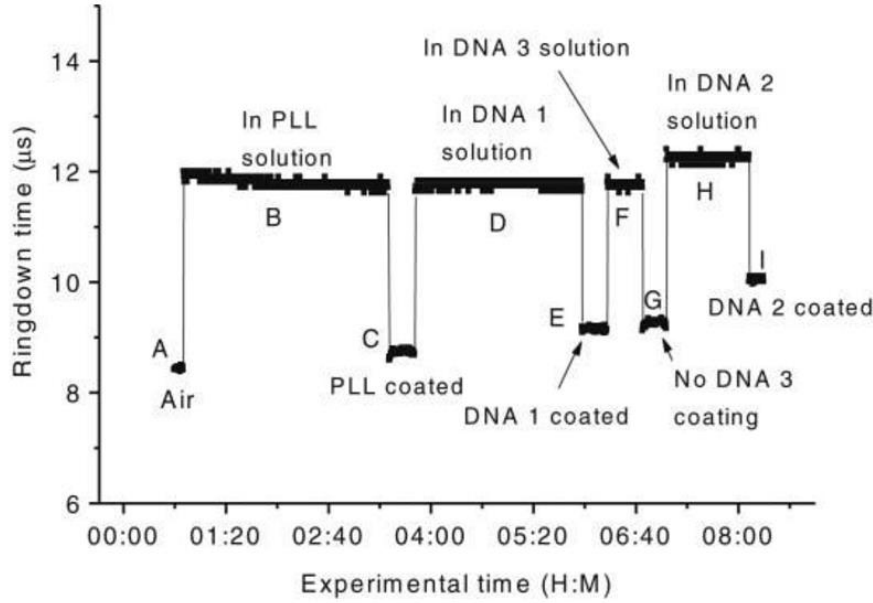
Diğer bir çalışma fiber optik yardımı ile BOS içerisinde AB ve tau proteinlerinin konsantrasyonlarının ölçülmesi üzerine yapılmıştır [12]. Kana özellikle BOS biyoişaretleri ile bağ yapan florasan problemler enjekte edilerek vücuda sokulan fiber optik yardımıyla bu florasan biyoişaretlerin uyarılması sağlanmaktadır. Sonrasında ise emisyon sonucu ve tahmini biyoişaret konsantrasyonunun florasan şiddetine oranını ve AH oluşum riskinin oranlarını kullanarak ölçüm almışlardır. Şekil 2 tahmini ve gerçek konsantrasyonların oranını göstermektedir. Her bir veri noktası 8 tahmini değerlerin ortalamasıdır. 15 tahmini değerlerin ortalama mutlak hatası %2.5'luk bir standart sapma ile %4.4 olarak Şekil 2'de gösterilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise çift kırılma özellikleri temel alınarak olgunlaşmış nöritik AB plaklarının görüntülenmesi için polarize duyarlı optik koherans mikroskobu (PD-OKM) çalışması sergilenmiştir [6]. PD-OKM deriden yansıyan ışının şiddetinin yanı sıra aynı zamanda polarize seviyelerini de ölçmeye dayalı bir görüntü yakalama tekniğidir [13-15]. Bu çalışmada ise AH sahip hastaların beyinlerindeki nöritik AB plaklarının ölü hücre PD-OKM görüntülenmesini sergilemişlerdir. Sonrasında elektron mikroskobu verileri kullanarak kortikal AB plaklarındaki polarizasyonun yayılımı için bir bilgisayar modeli geliştirmişlerdir. Daha sonra, beyinsel amyloid anjiyopati deki (BAA) beyinsel damarlaşmanın çift kırılma özellikleri ve kontrolü araştırılmıştır. Sonuç olarak nöritik plaklar içi çift kırılma özellikleri temel alınarak kortikal bölgelerde başarılı bir şekilde gösterilmiştir [13].

EF-FLRD FOSler ile şimdiye kadar yaptığımız çalışmalardan ilkinde tek sarmallı üç farklı tip DNA ve tek tip bakterinin hacim indeksi ve yüzey indeksi-temelli ölçümü gerçekleştirilmiştir [16]. Şekil 3 üç farklı DNA örneği içeren çözeltilere daldırılan FOS ölçümlerini göstermektedir. Bu çalışmada DNA örnekleri 30 mM ve 15 mM'a kadar saf su içerisinde sulandırılarak konsantrasyon ölçüm limiti belirlenmiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki farklı hacim kırılma indeksine sahip farklı DNA örnekleri içeren çözeltiler sensör tarafından ölçülebilmektedir. Şekil 4 üç farklı DNA örneği için bu sefer yüzey indeksi-temelli ölçüm sonucunu göstermektedir. Sensör önce poly-L-lysine (PLL) çözeltisiyle işlenerek DNA1 çözeltisine daldırılmıştır. Burada sensör 1. DNA örneği ile kaplanarak farklı bir ringdown zamanına sahip olmuştur. Sonra DNA3 örneğine daldırıldığında değişme olmamış, sonrasında DNA2 örneğine daldırılınca 2. DNA örneği ile de kaplanarak farklı bir ringdown zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. DNA örnekleri arasındaki bağlanmadan dolayı ortaya çıkan bu sonuç göstermiştir ki FOS yüzey indeksi-temelli ölçüm ile seçici bir ölçüm sağlamıştır.

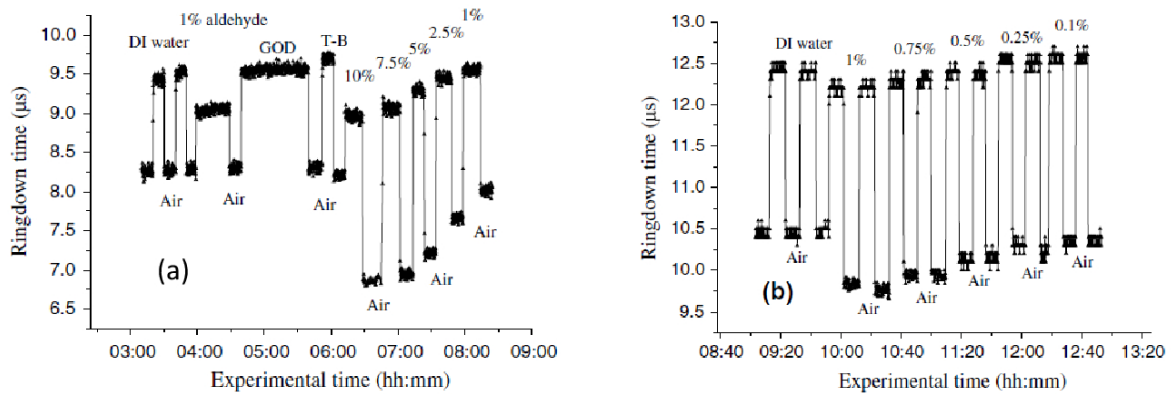


Şekil 3. ssDNA örneği (S1), ssDNA örneği (S2) ve dsDNA örneği (S3) için hacim indeks-temelli DNA ölçümleri için FLRD-EF gösterimi. Ref [16]'dan alınmıştır. a) DNA konsantrasyonu 30 mM ve b) DNA konsantrasyonu 15 mM.



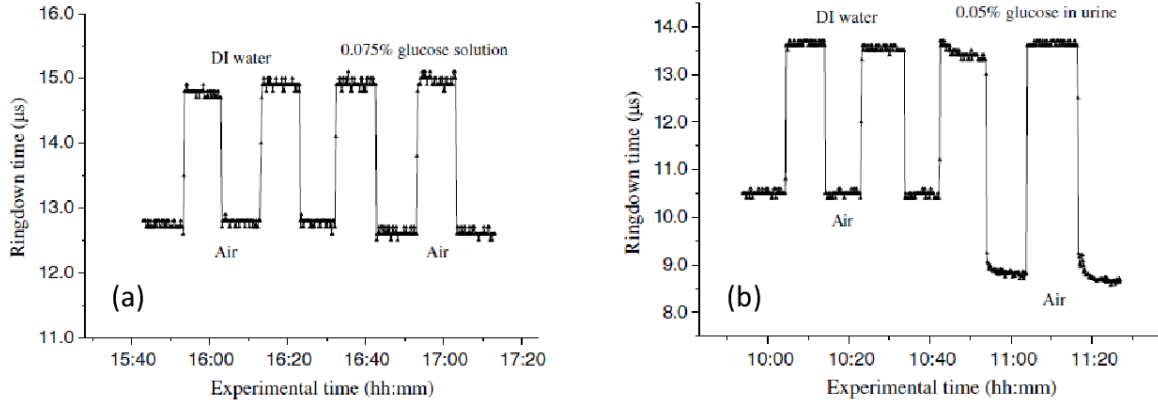
Şekil 4. FLRD-EF sensörünün üç farklı DNA örneği için yüzey indeks-temelli DNA ölçümü. Ref. [16]'dan alınmıştır.

Başka bir çalışmamızda, EF-FLRD glikoz sensörü üreterek hem glikoz çözeltisi içinde hem sentetik üre çözeltisi içinde glikoz ölçümü yapılmıştır [17]. Ayrıca EF-FLRD sensörlerin minimum ölçüm hassasiyetleri de belirlenmiştir. Önce sensörler glikoz oksidaz (GOD) kaplanarak farklı konsantrasyonlardaki glikoz çözeltisi içerisinde, sonra GOD kaplanmadan direk olarak farklı konsantrasyonlardaki glikoz çözeltisi içerisinde test edilmiştir. Her iki testte de sensörler iyi sonuç vermiştir.



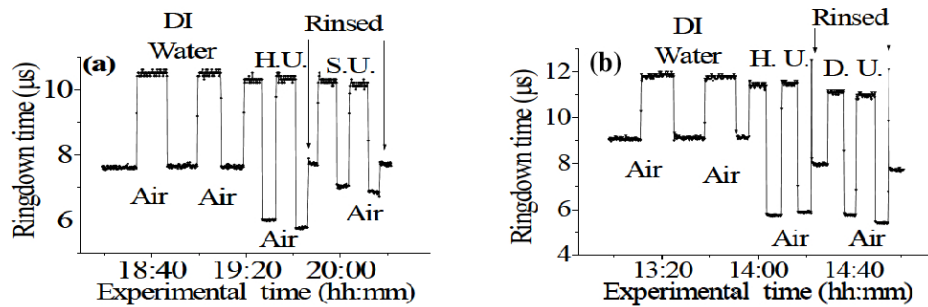
Şekil 5. a) GOD ile kaplanmış EF-FLRD sensör ölçümü. b) GOD kaplanmadan alınmış EF-FLRD sensör ölçümü. Ref [17]'dan alınmıştır.

Benzer şekilde, sensör GOD kaplanarak ve kaplanmadan sentetik üre çözeltisinde test edilmiştir. Sensörün minimum ölçüm hassasiyeti ise Şekil 6'dan görüldüğü üzere bu çalışmadaki sensörlerin ölçüm hassasiyetleri glikoz çözeltisi için 75 mg/dl ve sentetik üre çözeltisi için 50 mg/dl olarak bulunmuştur. En iyi deneysel ölçüm hassasiyeti glikoz çözelti örnekleri için 10 mg/dl ve serum temelli örnekler için 34 mg/dl ile kıyaslanarak EF-FLRD sensörlerin sonuçlarının çok hassas olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6. a) 0.075 mg/dl konsantrasyonlu glikoz çözeltisinde EF-FLRD sensörün ölçüm hassasiyeti. b) EF-FLRD sensörün sentetik üre çözeltisinde ölçüm hassasiyeti. Ref [17]'den alınmıştır.

Bir sonraki çalışmamız ise FLRD glikoz sensörlerin diyabetik hastaların üre örneklerinde test edilmesi üzerine olmuştur [18]. FLRD sensörler sağlıklı, sentetik ve diyabetik hastası üre örneklerinde test edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Şekil 7.a'dan görüldüğü üzere önce FOSlerin yenilenebilirliği ve düzgün veriler alabildiğini göstermek için hava-saf su çözeltisinde tekrarlanan ölçümlerin alınması sonrası, sağlıklı ve sentetik üre çözeltisine daldırılarak elde edilen ringdown zamanları grafiği gösterilmiştir. FLRD sensörlerin her farklı ortama daldırıldıktan sonra ringdown zamanı farklı sonuçlar vermiştir. Bu da sensörün hassas ve düzgün bir biçimde çalıştığının göstergesidir. Şekil 7.b ise FLRD sensörün sağlıklı ve diyabetik hastaların üre çözeltilerindeki sonuçları göstermektedir.



Şekil 7. FLRD sensörün a) sağlıklı ve sentetik üre ve b) sağlıklı ve diyabetik üre çözeltilerinden alınan test sonuçları. Ref [18]'den alınmıştır.

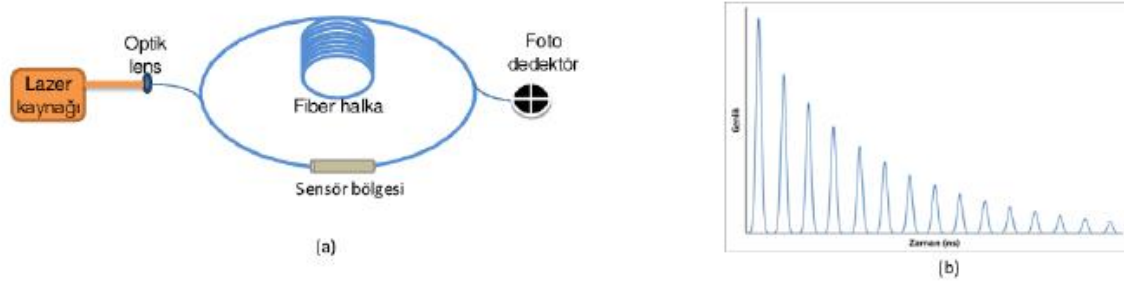
Literatürde çalışılmış fiber optik sensör uygulamaları sensör başlığı üretmek için FBG, LPG gibi ek optik bileşenler gerektirirken bizim sensör dizaynımız düşük maliyet, basit dizayn ve konfigürasyon ve potansiyel olarak daha yüksek ölçüm hassasiyeti gibi özellikleri ile diğer sensör sistemleri ile kıyaslanabilir yahut daha iyi performans gösterebilir seviyededir. Hiç bir ek optik bileşen ve sensör modifikasyonu gerektirmeyen EF-FLRD sensörler hızlı ölçüm, yüksek hassasiyet, düşük maliyet, gerçek zamanlı ölçüm ve elektriksel duyarsızlık gibi birçok özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar için çok büyük avantaj sağlamaktadır.

2. YÖNTEM ve DENEYSEL KURULUM

FHDS yöntemi çoklu lazer pulsu dolanımı sayesinde çok etkili ve hassas bir yöntem olması nedeniyle, son 30 yıldır biyomedikal uygulamalarda ve tıp alanında geniş bir uygulama alanı bulan bir tekniktir. FHDS tekniği, fiber halka içerisinde dolanan lazer ışınının, sensör bölgesindeki emilim veya saçılmasıyla optik kayba uğraması sonucu, halka döngü zamanındaki değişimi belirleme yeteneğine sahip olması nedeniyle çok küçük hacimlerdeki örnekleri dahi yüksek hassasiyetle belirleme kabiliyetine sahiptir. Birçok uluslararası bilimsel çalışmalarda, yüksek kaliteye sahip bilimsel dergilerde yer bulan çalışmalarda, FHDS tekniği mevcut haliyle kabul edilerek yüksek bir potansiyele sahip olduğu kabul edilmiş ve desteklenmiştir.

FHDS tekniği, bir lazer ışınının fiber halka turundaki optik kaybını ölçen zamana dayalı bir tekniktir. Bir FHDS sistemi dört ana bölümden oluşur; lazer ışın kaynağı, fiber halka, sensör bölgesi ve detektör. Lazer ışınları gerekli optik malzemeler yardımı ile fiber halka içerisine gönderilir ve halka içerisine döngüsü sağlanır. Bu lazer ışını her bir turda, döngüdeki bağlaştırmacılar (couplers) yardımıyla çok düşük miktarının halka içerisinden detektöre ulaşımına izin verilir. Her bir tur sırasında oluşan optik kayıplar kullanılan optik bileşenlere, kullanılan lazer ışını dalga boyuna, sensör bölgesinde bulunan ek bir basınç/gerilim uygulaması katsayılarına göre değişir. Optik sistemin bileşenlerinin aynı kalması koşulu ile sensör bölgesinde yapılacak değişiklikler her bir halka turu esnasındaki optik kaybı değiştireceğinden, halkada bulunan ışığın miktarındaki azalma sensör bölgesine uygulanan herhangi bir gerilim ya da basınç hakkında bilgi verecektir. Gerilim uygulanmadan önceki sistemin temel amacı, sensör bölgesinde herhangi bir değişme (gerilim, basınç, vs) olmadan en düşük kayıplı sensör sistemini elde ederek en fazla sayıda halka içerisinde turu sağlayabilmektir. Böylece sensör bölgesinde oluşacak herhangi bir fiziksel değişimin verimli ve doğru ölçümü yapılabilecektir.

Özel üretim fiber optik halkalar lazer ışınının %0.1'ini devre içerisine alıp, bu ışının da %0.1'ini ölçüm alındıktan sonra fotodedektöre gönderecek şekilde dizayn edilmiştir. Bu fiber optik halkalar yapılacak uygulamaya göre 120 m civarında uzunluğa ve iki adet bağlantı koluna sahiptir. 120 m'lik ana halkanın herhangi bir bölgesinden istenilen uzunlukta fiber optik kablolar seçilerek, uygulanacak yapay zemin içerisine hem yatay hem dikey pozisyonda gömülür. Çok daha hassas ölçümler gerekirse, gömülü bölgede hassas sensör bölgesi oluşturularak yüzeye yerleştirilir. Hazırlanan sensörler, lazer ışının fiber döngü içerisinde çoklu dolanımı sayesinde yüksek hassasiyete sahip sensörlerdir. Bir adet FHDS sistemi için ışık kaynağının sadece %0.1 lik kısmının kullanılması nedeniyle aynı ışık kaynağından yüzlerce sistem oluşturulabilir ve birbirine entegre edilerek sensör ağı yapılır.



Şekil 8. a) Fiber halka ringdown sistemi b) Hesapla oluşturulmuş örnek ringdown verisi.

Pulslu lazerle oluşturulmuş bir FHDS sisteminde, fiber optik bir kavitede hapsedilen lazer ışını her bir turdaki kayıpları nedeniyle eksponansiyel bir azalma gösterir. Sürekli dalga lazer kaynağı kullanılarak oluşturulan bir FHDS sisteminde ise fiber halkadan çıkan lazer pulsu fonksiyon üretici yardımıyla kare dalgaya dönüştürülür ve kare dalgadan sönümlenme zamanı (Ringdown time (RDT)) elde edilir. Şekil 8 (b), Şekil 8 (a)'daki fiber halka döngü sistemine hapsedilen tek bir lazer ışını pulsunun eksponansiyel eğrisini göstermektedir. Bu ise lazer pulsunun sönüm (ringdown) zamanı olarak bilinir. Benzer işlemlerden sonra veriler toplanıp azalma katsayısı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır ve referansla karşılaştırılarak sensör bölgesinde oluşan gerilmenin etkisi bulunur. Bir lazer pulsu ışınının her bir geçişteki kaybına uygun olarak, zaman içerisindeki şiddeti şöyledir;

$$dI/dt = - (IAc/nL) \quad (1)$$

Burada I , t zamandaki ışının şiddetini; L , fiber döngü uzunluğunu; c , ışık hızını; n , fiberin kırılma indisini ve A , ışının geçiş kaybını tanımlar. Işının geçiş kayıpları ise fiber soğurma katsayısına (α), fiber optik kabloların birleştirici kaybına (E), toplam fiber saçılma kaybına (γ) ve sensör bölge kaybına (B) göre değişir.

$$A = \alpha L + E + \gamma + B \quad (2)$$

Sensör bölge kayıpları sensör bölgeyi oluşturan optik yapı kayıplarının yanı sıra sensör bölgesinde meydana gelen ekstra gerilim veya basınca da bağlıdır. Böylece detektörde ölçülen ışının yoğunluğu

$$I = I_0 \cdot e^{-(cAt/nL)} \quad (3)$$

olarak belirlenir. Her bir halka tur zamanı ve halka ringdown zamanı ise

$$t_r = nL/c \quad (4a)$$

$$\tau_0 = t_r / A = nL/cA \quad (4b)$$

denklemleri ile verilir.

Sensör bölgesinde bir gerilim olduğu zaman, bu ise ekstra bir optik kayba neden olacaktır ve

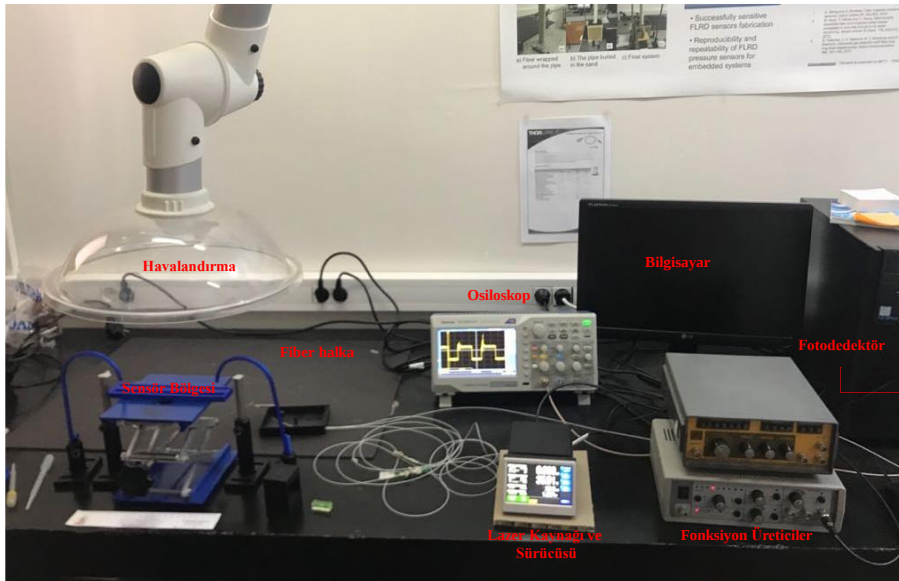
$$B = (nL/c).(1/\tau - 1/\tau_0) \quad (5)$$

ile verilir. Minimum ölçülebilecek optik kayıp ise

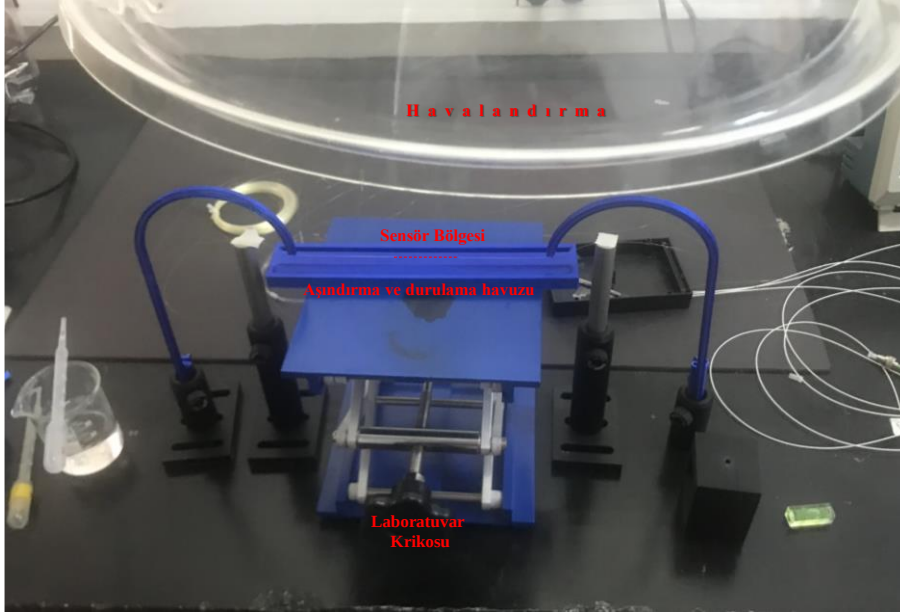
$$B_{\min} = t_r/\tau_0 .(\sigma/\tau_{\text{ave}}) = 1/m (\sigma/\tau_{\text{ave}}) \quad (6)$$

eşitliği ile verilir. Burada m tur sayısı ve s (Sigma) standart sapma olarak verilir. σ/τ_{ave} ölçüm hassasiyeti (baseline stability) olarak bilinir ve 10^{-3} mertebesindedir. Görüldüğü üzere ringdown zamanı lazer ışını şiddetinden bağımsız olup uygulanan gerilime bağlıdır.

Sensör bölgesindeki herhangi bir fiziksel etki (basınç, gerilim, vs) ekstra bir optik kaybına neden olacağı için, FHDS tekniğinin sunduğu avantajlardan yararlanarak çok hassas gerilim değişimleri gözlemlenebilir ve ölçümlenebilir.



Şekil 9. Fiber optik sensör sisteminin şematik gösterimi.



Şekil 10. Sensör başlığı üretimi

Şekil 9 fiber optik sensör sisteminin kurulum şemasını göstermektedir. Lazer ışık kaynağının ve bir çözelti içerisine daldırıldığı zaman sensör bölgesinin mikro titreşimlerden etkilenmesinin minimize edilmesi, FHDSS sisteminin hassasiyetinde büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle proje bütçesinin optik masa temin etmek için yeterli olmaması nedeniyle, 200 cm x 80 cm x 80 cm boyutlarında mermer bloklar kullanılarak oluşturulan masalarda optik masa özelliği sağlanmış oldu. Böylece lazer optimizasyonunun sürekli olarak gerçekleştirilmesinin önüne geçilmiş oldu.

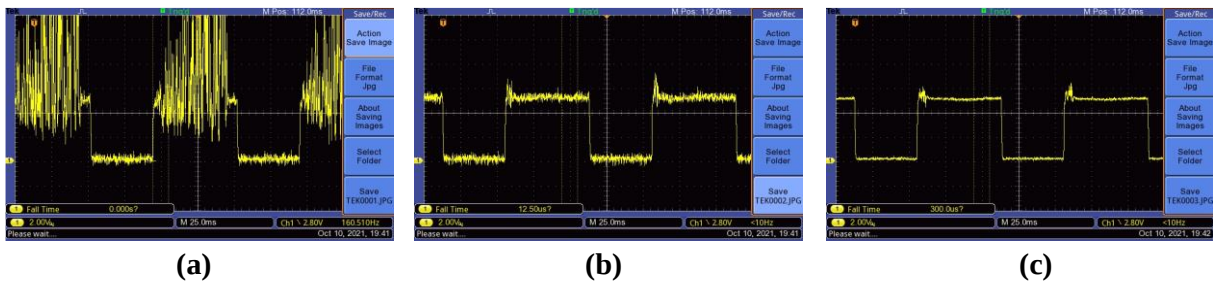
Sensör bölgesi HF asit çözeltisi içerisinde aşındırılarak sensör başlığı üretilmiş olarak gösterilmektedir. Evanescent dalgaları, lazer ışınının bu sensör başlığından geçerken her ortamda farklı saçılma değerlerine sahip olması nedeniyle sistemin optik kaybını ölçümlemede ayırt edici özellik rolü üstlenmektedir. Şekil 10'de ise sensör başlığının üretimi aşaması sergilenmektedir. Hareketli bir platform üzerindeki aşındırma ve durulama havuzunun dar kanalında bulunan HF asit çözeltisinin sensör bölgesini içine alacak şekilde aşağı-yukarı hareket ettirilmesi ile sensör başlığı HF asit çözeltisi içine daldırılır. Sensör başlığı plastik ceket kısmı soyulmuş sensör başlığının aşındırılması işlemidir. Bu bölgenin çapı $40 \pm 10 \mu\text{m}$ mertebelerine indirildiği zaman hassas bir sensör başlığı elde edilebilmektedir. Kritik süreye ulaşıldığında ise sensör başlığı saf su ile temizlenerek sensör elde edilir.

1mg Amyloid Beta Protein Fragment 1-42 (Formül: $\text{C}_{203}\text{H}_{311}\text{N}_{55}\text{O}_{60}\text{S}$, Merck) temin edildi. Beta Amyloid (BA)'in çözünümü için 1 litre, 4mM Dimethyle Sulfoxide (DMSO) sulu çözeltisi Deiyonize Su (DS) kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan DMSO çözeltisinden 1 mL alınarak 1 mg BA ile karıştırıldı. Oluşan çözelti 150 mL'lik alikotlara yerleştirilerek -20 C^0 'de saklandı. Üretilen sensör başlıkları 10 mL hacimli Yapay Beyin Sıvısı (ACSF, Tocris) içerisine daldırılarak FHDSS sisteminin sönümlenme süresi ölçümlendi. Dolayısı ile sistemin toplam optik kaybı hesaplandı. Daha sonra, 5 mL ACSF çözeltisi içerisine alikot içerisinden alınan 10 μL ve 20 μL BA çözeltileri ayrı ayrı eklenerek, oluşturulan çözeltilerde FHDSS sisteminin sönümlenme süresi ölçüldü ve sistemin toplam optik kaybı hesaplandı. Böylece FHDSS

sisteminin Alzheimer Hastalığı ile ilişkilendirilen BA antikoru ACSF çözeltisi içerisinde test edilmiş oldu.

Sadece Alzheimer Hastalığı (AH) erken teşhisi için değil, herhangi bir erken teşhis çalışmasında bir FHDSS sisteminin kurulumu ve optimizasyonu büyük önem arz etmektedir. Sistem bileşenleri ve özellikleri amaca göre dikkatli bir şekilde seçilmelidir. Her bir sistem bileşeninin kendi içinde birçok parametresi mevcuttur ve bütün sistem bileşenlerinin parametrelerinin en uyumlu olduğu durum FHDSS sisteminin en kararlı olduğu durumu vermektedir. Bu proje kapsamında FHDSS sistemi 1550 nm merkez dalga boylu, kelebek diyot, sürekli lazer kaynağı (Thorlabs) ve Termo Elektrik Soğutuculu (TEC) lazer sürücüsü (Thorlabs), 2x1 iki adet benzer 99.9:0.1 birleştiriciye sahip 1550 nm tek modlu fiber halka döngüsü (Opneti, Co.), fonksiyon üretici, fotodedektör (DET08C/M, Thorlabs), osiloskop (TBS1202B, Tektronix) ve bilgisayar kullanılarak dizayn edilmiştir.

Lazer diyotun lazer sürücüye montajı ve sonrasında uygun sürücü sıcaklığı, sürücü akımı ve lazer akımı parametreleri ayarlanarak lazerin minimum taban kararlılığına (baseline stability) sahip olması sağlanmıştır. Lazer diyotun tipik olarak 300 mA çalışma akımında en iyi verimle çalıştığı manuelde belirtilmişse de, çalışma sıcaklığının ± 0.1 °C hassasiyetle dahi değişmesi baseline kararlılığını etkilemektedir. Yapılan testler sonucu FHDSS sisteminden elde edilen verinin grafikleri Şekil 11'de gösterilmektedir. Şekil 11.a'da sensör bölgesi üretilmiş bir FHDSS sisteminden çıkan sinyalin, fonksiyon üretici ile kare dalgaya dönüştürülmüş hali görülmektedir. Bu sinyalin sinyal/gürültü (signal/noise) (S/N) oranı çok fazla olduğu için hassas ölçümlemede kullanılması mümkün değildir. Fonksiyon üretici parametreleri, lazer akımı parametresi, sürücü akımı ve sıcaklığı parametreleri, fiber halka toplam kayıp parametreleri gibi birçok parametrenin ayarlanarak en optimum değerleri elde edilmiştir. Böylece FHDSS sisteminden elde edilen optimize edilmiş sinyal Şekil 11.b'de gösterilmiştir. Bu sinyalin S/N oranı daha düşük olduğu için ölçümleme çalışmalarında kullanılabilir. Şekil 11.c'de ise bu sinyalin 128 ortalama ile toplanmış verisini göstermektedir. Bu sinyal çok daha hassas ölçümler için kullanılabilir, fakat sistem bileşenlerinin özellikleri bu verinin stabil olarak toplanmasını kısıtlamaktadır. Bu nedenle çalışmalarımız tek sinyal modunda toplanmış veriler ile gerçekleştirilmiştir.



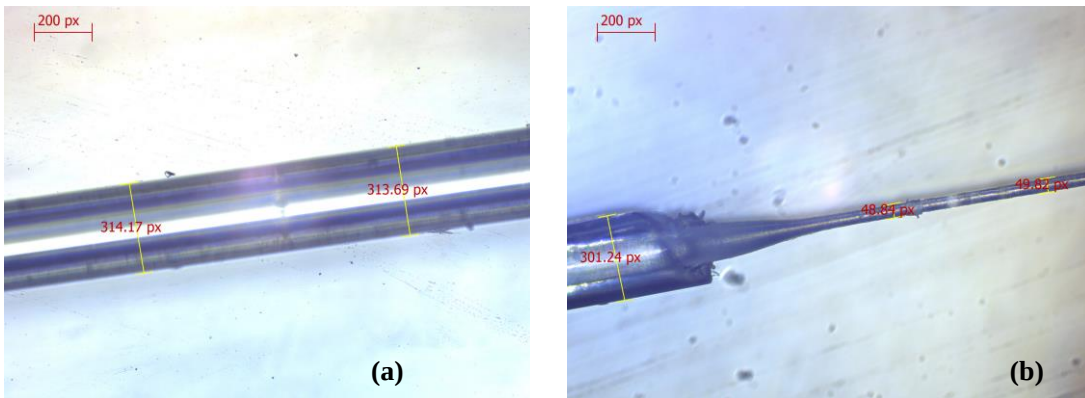
Şekil 11. FHDSS sisteminde sensör üretildikten sonra elde edilen veriler. a) optimizasyon yapılmadan önce b) optimizasyon yapıldıktan sonra ve c) 128 ortalama ile toplanan veri grafikleri.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu projede Alzheimer Hastalığı (AH)'nın erken teşhisi için ultra yüksek hassasiyete sahip bir spektroskopik ölçüm tekniği olan Fiber Halka Döngü Sönümlleme Spektroskopi (FHDSS) tekniği kullanılan Fiber Optik Sensör (FOS) sistemi dizayn edilmiş, fiber optik sensörler üretilmiş ve farklı kırıcılık indisine sahip ortamlarda test edilmiştir. AH ölçümleri için FOS önce hava ve deionize su (DS) ortamlarında test edilerek sensör sisteminin tekrarlanabilir sonuçlar elde edebildiği gösterilmiş, sonrasında yapay beyin sıvısı (ACSF) çözeltisinde test edilerek sensör sisteminin ACSF ve DS ortamlarındaki ayırt ediciliği test edilmiştir. Ardından ACSF içerisinde farklı oranlarda eklenen beta amyloid (BA) ile sensörün AH teşhis edebilirliği çalışılmıştır.

FHDSS sistemi başarılı bir şekilde dizayn edilip kurulduktan ve sistem optimizasyonu tamamlandıktan sonra fiber optik sensörlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Fiber optik sensörlerin üretiminde, 120 ± 10 m uzunluğundaki fiber halkanın bir kısmı kullanılmıştır. 2-10 cm aralığında değişen uzunluklarda, plastik ceket tabakası soyulmuş fiber %48 saflıktaki Hydrofluoric Acid (HF) çözeltisi içinde aşındırılarak inceltilmiştir. Aşındırma öncesi kalınlığı 125 ± 0.7 μm (19) olan fiber, 75 ± 5 dk aşındırma süresi sonunda 35 ± 15 μm kalınlığa düşürülmektedir. Saf HF çözeltisinde sensör çapı kalınlık kontrol çok hassas olmaktadır. Bu hassasiyeti minimum hata ile çözebilmek için %10'luk HF çözeltisi kullanılarak fiber optik sensör başlığı üretimi gerçekleştirilebilir (20, 21).

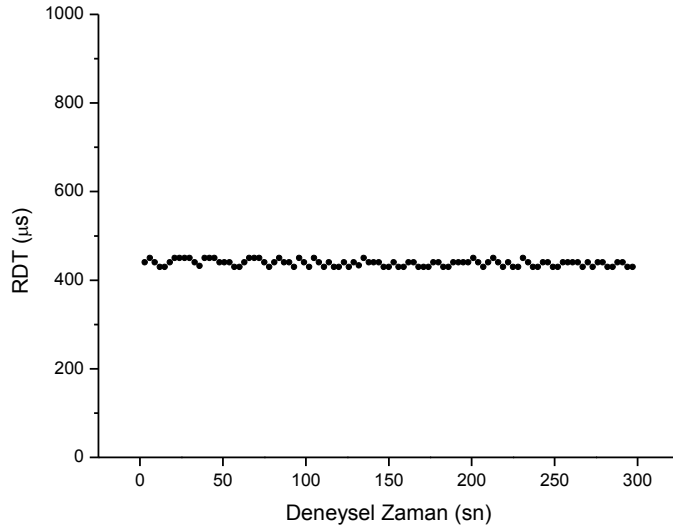
Bu proje kapsamında saf HF çözeltisi kullanılarak elde edilen 5 cm'lik sensör bölgesinin optik mikroskop görüntüleri Şekil 12'de gösterilmiştir. Kaplama kalınlığı üretici firma tarafından 125 ± 0.7 μm olarak verilmiştir. Optik mikroskop altında ölçülen kalınlık, mikroskobun parametre ayarları ile bağlantılı olarak Şekil 11.a'da gösterildiği gibi elde edilmiştir. HF asit içerisinde aşındırma ile elde edilen sensör başlığının optik mikroskop görüntüsü ise Şekil 12.b'de gösterilmiştir. Aşındırma sonunda kaplama kalınlığı 125 μm 'den yaklaşık olarak 20 μm 'ye düşürülmüştür. Bu aşındırma işlemi ile fiber halka içerisinde sönüme ulaşmaya kadar tur atan lazer ışını, bu sensör bölgesinde ilave kayba uğrayacaktır. Bu bölge çözelti içerisinde daldırılarak hassas bir ölçüm elde edilecektir.



Şekil 12. Sensör başlığı üretiminden a) önce ve b) sonra fiberin optik mikroskop fotoğrafları.

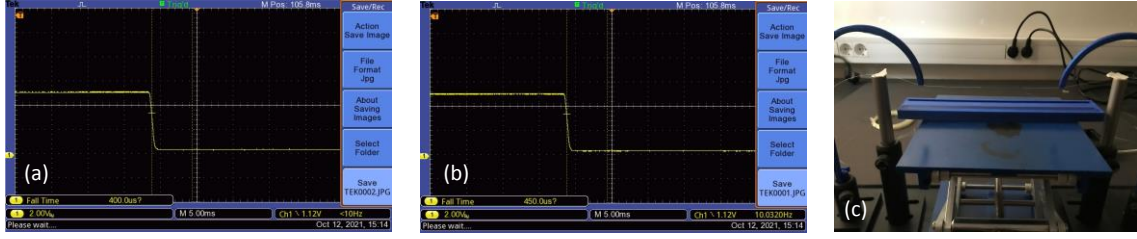
Sensör başlığının hassasiyeti aşındırma süresine direkt olarak bağlıdır. Aşındırma çözeltisi %5-10 HF olacak şekilde sulandırılırsa, aşındırma işlemi daha kontrollü olarak gerçekleştirilir, fakat aşındırma süresi daha uzun olur.

FHDSS sisteminin baseline kararlılığı, sensör başlığı üretildikten sonra fiber halkanın ve sensör başlığının üzerinde, sisteme herhangi bir ek kayıp oluşturacak basınç, bükülme, gerilme vs. olmadan sistemden elde edilen RDT ile hesaplanır. Toplanan verinin standart sapması hesaplanarak aynı verinin ortalamasına bölünür (σ/τ_{ave}). Böylece sistemin kararlılığı hesaplanır. FHDSS sisteminde üretilen sensör başlığı ile hava ortamında 100 adet veri toplanmış ve sistemin kararlılığı hesaplanmıştır. Sistem yazılımı henüz tamamlanamadığı için veriler manuel olarak kaydedilmiş ve hesaplanmıştır. Bu yolla FHDSS sisteminin baseline kararlılığı 1.63% olarak hesaplanmıştır. Sistemin hassasiyetinin daha da düşürülmesi için FHDSS yazılımı ile birlikte ekstra hassas optimizasyon, lazer diyot sıcaklık ve çalışma akımı çalışmaları gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bunların yanından daha hassas osiloskop, sinyal genişliği daha dar olan lazer ışık kaynağı gibi sistem bileşenleri de sayılabilir. Şekil 13 kaydedilen verinin grafiğini göstermektedir. Sistemin hava ortamında ortalama RDT 438 ± 10 μs olarak ölçülmüştür.

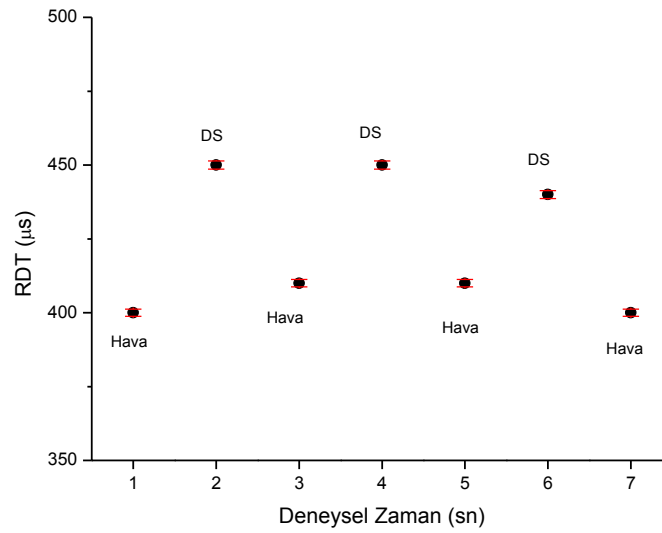


Şekil 13. FHDSS sisteminin baseline kararlılığı

FHDSS sisteminde üretilen fiber optik sensörün hava ve saf su ortamında test edilmesi ile elde edilen RDT değerleri Şekil 14'te gösterilmiştir. Bu veri 128 ortalama ile alınmıştır. Şekil 14.a'da sensör bölgesi hava ortamında iken osiloskoptan direkt olarak ölçülen RDT değeri 400 ± 10 μs iken, DS ortamına daldırıldıktan sonra RDT değeri 450 ± 10 μs 'dir. Şekildeki osiloskop ekranında bulunan Fall Time değeri RDT değeri olarak alınmıştır. Yukarıda baseline kararlılığı ölçümünde sistemin baseline kararlılığı için, sistem üzerinde herhangi bir ek basınç, gerilim vs. olmaksızın, hava ortamında RDT 438 ± 10 μs olarak ölçülmüştü. Burada 400 ± 10 μs olarak ölçülmesinin nedeni Şekil 14.c'de gösterildiği gibi sensör başlığının saf su ortamına daha homojen daldırılması ve su ortamında sensör başlığı bölgesindeki titreşimlerin minimize edilmesi için destekler ile bükülmesi sağlanmıştır. Bu bükülme sistemde ek kayıp oluşturmuş, böylece sistemin RDT azalmıştır. Şekil 14'te verilen osiloskop görüntüleri tek veri için elde edilmiş değerlerdir. Bu deney birden çok kez tekrarlanmış ve FHDSS sisteminin tekrarlanabilir ölçümler aldığı Şekil 15'deki grafik ile gösterilmiştir. Şekil 15'deki her bir veri noktası en az 10 kez tekrarlanmış verilerin ortalamasını temsil etmektedir.



Şekil 14. FHDSS sensörünün a) hava ve b) DS ortamında test edilmesi ile elde edilen RDT değerleri ile c) sensörün saf su haznesine daldırılması için kurulan düzenek.

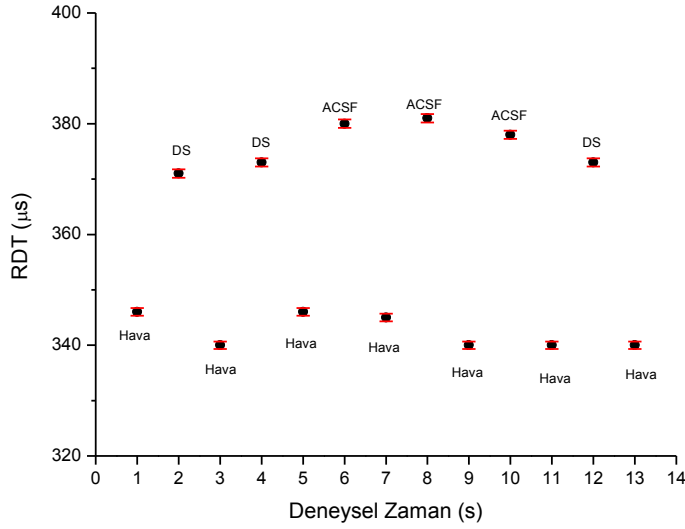


Şekil 15. FHDSS sistemindeki fiber optik sensörün hava ve saf su ortamında test edilmesi.

Şekil 15 üretilmiş sensör başlığının hava ortamındayken ve DS ortamına daldırılmışken FHDSS sisteminden elde edilen RDT değerlerini göstermektedir. Sensör başlığı hava ortamında iken RDT değeri $400 \pm 10 \mu s$, saf su içerisine daldırıldığında RDT değeri $450 \pm 10 \mu s$ olarak ölçümlenmiştir. Eşitlik (5) kullanılarak sistemin optik kaybı 0.16 ± 0.02 mdB olarak hesaplanır. Eşitlik (6)'da verilen m değeri lazer pulsunun sönüme ulaşınca kadar fiber halkada dönme sayısıdır. m değeri ne kadar yüksek olursa, fiber halka içerisindeki lazer pulsunun ölçümlenecek numune etkileşim sayısı o kadar yüksek olacağı için ölçüm hassasiyeti yüksek olacaktır. Bu değer bu çalışmadaki dizayn edilen sistem parametrelerine göre 14 olarak hesaplanmıştır.

Sensörün hava ve DS ortamlarında test edilmesinden sonra sensörün hava ve ACSF sıvısı ortamlarında test edilmesi çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 16'da, sensör önce hava ortamındayken FHDSS sisteminin RDT değerlerini, sonra ACSF sıvısı içerisindeyken FHDSS sisteminin RDT değerlerini göstermektedir. FHDSS sistemindeki fiberin bir yerinden kırılması sonucu tekrar kaynak yapılarak sistem çalışır hale getirilmiştir. Sistemin baseline kararlılığı ayarlaması yapıldıktan sonra hava ortamında RDT değeri $346 \pm 10 \mu s$, DS içerisine

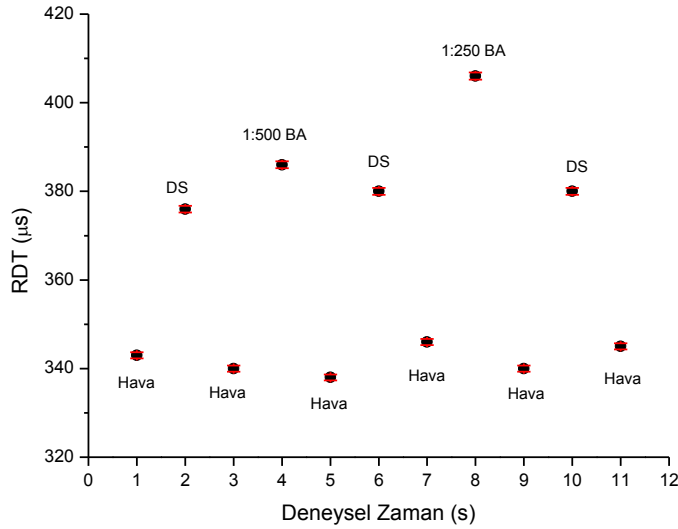
daldırıldığında RDT değeri 370 ± 10 μ s olarak ölçülmüştür. Sensör başlığı ACSF çözeltisine daldırıldığında RDT değeri 375 ± 5 μ s olarak ölçülmüştür. ACSF çözeltisi ile DS çözeltisi pH değerleri sırası ile 7.22 ve 7.00 olarak verilir (22,23). Sensör başlığı, bu çözeltiler içerisinde daldırıldığı zaman, FHDSS sisteminin RDT değerlerinin yakın çıkması pH değerlerinin birbirine yakın olmasına atfedilebilir.



Şekil 16. FHDSS sistemindeki fiber optik sensörün hava, DS ve ACSF ortamlarında test edilmesi.

Sonrasında aynı sensör başlığı, 2. Bölümde anlatıldığı gibi hazırlanmış, alikotlara ayrılmış ve -20°C 'de saklanmakta olan Beta Amyloid (BA) çözeltisi ve ACSF kullanılarak 1:500 (v/v) ve 1:250 (v/v) oranında hazırlanan çözelti ile test edilmiştir. Sensör başlığı önce hava-DS çözeltisinde, sonrasında farklı konsantrasyonlardaki BA çözeltilerinde test edilmiştir. Şekil 17 FHDSS sensörünün, ACSF çözeltisi içerisindeki farklı BA konsantrasyonlarında RDT değerlerini göstermektedir. Sensör başlığının hava ve DS ortamında RDT değerleri önceki sonuçlarla uyumlu olarak ölçülmüştür. Sonrasında sensör başlığının 1:500 (v/v) BA:ACSF çözeltisi içerisine daldırılarak, FHDSS sisteminin RDT değeri 386 ± 10 μ s olarak ölçülmüştür. Bu değer, sensör başlığının BA katkısız ACSF çözeltisi içerisindeyken ölçülen değerden daha büyüktür. ACSF içerisine katılan BA çözeltisi, yeni çözeltinin kırıcılık indisini değiştirerek FHDSS sisteminin toplam optik kaybının farklılaşmasına, dolayısı ile FHDSS sisteminin RDT değerinin değişmesine neden olmuştur. Sensör başlığı tekrar DS ve hava ortamlarına maruz bırakılıp, sonrasında 1:250 (v/v) BA:ACSF çözeltisine daldırıldığında sistemin RDT değeri 396 ± 10 μ s olarak ölçülmüştür. Daha yoğun BA çözeltisi içeren yeni çözeltinin kırıcılık indisi daha farklı olmuştur ve bu, sensör başlığının bu çözelti içerisine daldırılması ile FHDSS sisteminin toplam optik kaybının daha farklı olmasına neden olmuştur. Şekil 16 ve 17'den de açıkça görüldüğü üzere sensör başlığı hangi ortama daldırılırsa daldırılsın, sonrasında DS ve hava ortamına maruz bırakıldığında başlangıçtaki değerine çok yakın değerler vermektedir. Bu ise FHDSS sisteminin tutarlılığını, kararlılığını ve tekrarlanabilir ölçümler alabileceğini gösterir. FHDSS sensörlerin temel çalışma prensibi; sensör başlığı herhangi bir molekül/bileşik veya başka bir şekilde bir tabaka ile kaplanmadığı için sensör başlığının direk çözelti içerisine daldırılması ile sistemin RDT değeri elde edilir. Bu nedenle FHDSS

sensörleri tekrarlanabilir ve yeniden üretilebilir veriler sunabildiği için uzun ömürlü kullanım sunmaktadır. Sensör başlığı kırılmadıkça veya kopmadıkça kullanılabileceğinin göstergesidir.



Şekil 17. FHDSS sistemindeki fiber optik sensörün hava, DS, 1:500 (v/v) ve 1:250 (v/v) çözeltilerinde test edilmesi.

Yapılan çalışmalar FHDSS tekniğinin ultra hassas bir spektroskopik ölçüm tekniği olduğunu göstermiştir. Bu teknik kullanılarak oluşturulan fiber optik sensör sisteminde, laboratuvar ortamında üretilen sensörler farklı ortamlarda test edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda BA çözeltisi içeren ACSF çözeltisi içerisinde test edilerek elde edilen sonuçların FHDSS fiber optik sensörlerinin Alzheimer Hastalığı için potansiyel bir ölçüm tekniği olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

FHDSS sistemi, çok daha dar sinyal genişliğine sahip lazer ışık kaynağı, çok daha hassas sinyalleri yakalayabilecek özellikteki fotodiyot ve okuyabilecek osiloskop kullanılarak ultra hassas bir sistem haline getirilebilir. Böylelikle insan nefesindeki organik bileşiklerin ölçülebilmesi mümkün hale gelebilir. Bu bahsedilen özellikteki cihazlar sistem maliyetini oldukça artırmaktadır. Bu çalışmadaki AH hastalığı teşhisinde kullanılan FHDSS sistemi ise lazer ışığının baseline kararlılığını daha da düşürmek veya fiber halkadan fotodiyota giden sinyallerin yakalanma miktarını artırmak gibi birçok farklı parametrenin optimizasyonu gerçekleştirilerek daha da artırılabilir.

Bu proje kapsamında dizayn edilen FHDSS sisteminin geliştirilerek hassasiyetinin daha da artırılması, ultra hassas sensör başlıklarının üretilerek özel antikorlar ile kaplanması ve hedef molekül ölçümleme çalışmaları gelecek projelerimiz için hedeflerimiz arasındadır.

Dizayn edilen FHDSS sistemi, sonraki projeler ve çalışmalar için daha hassas şekilde optimize edilerek sistemin baseline kararlılığı iyileştirilecek, üretilen sensörlerin ultra hassas hale getirilmesi ve sensör başlıklarının özel antikor ile kimyasal yöntemler kullanılarak kaplanması sağlanacaktır. Böylelikle hedef molekül yakalama yolu ile ultra hassas ölçümleme çalışmaları için erken teşhis amaçlı FHDSS biyosensör çalışmaları gerçekleştirilebilecektir. AH hastalarından alınan örnekler ile çalışabilmek için ESOGÜ Etik Kurul'dan izin alınmalıdır. Bu proje kapsamında yapay ACSF kullanıldığı için etik kurul izni gerekmemesi,

pandemi süreci gibi etkenler nedeni ile gerçek AH hastaları çalışma içerisine dahil edilememiştir. Bu projenin en temel amacı; ultra yüksek hassasiyete sahip FHDSS sisteminin dizyanı, kurulumu ve optimizasyonu ile yüksek hassasiyete sahip fiber optik sensörlerin üretimi ve biyosensör uygulamaları olarak AH teşhisinde kullanılabilirliği üzerine düşünülmüştür. İlk hedef FHDSS sisteminin yüksek hassasiyetle çalışabilir hale getirilmesi için dizayn ve optimizasyon, sonraki hedef sensör üretimi ve son hedef bu sensörler ile teşhis çalışmasıdır. Bu proje çalışması, ESOGÜ bünyesinde ilk defa bir spektroskopik sistem dizaynı ile ön çalışma niteliğinde olması amacıyla gerçek AH örnekleri ile çalışılmamıştır. Ayrıca yapay örneklerle çalışılması planlandığı için etik kurul izni bu proje için alınmamış ve pandemi sürecinin araya girmesi de proje süresinin gerçek hastalarla çalışma olanağını da kısıtlamıştır. FHDSS sistemi başarılı bir şekilde dizyan edilmiş, optimizasyonu gerçekleştirilmiş, sensörler üretilerek biyosensör uygulaması olarak önce hava-DS ortamlarında, sonra hava-DS-ACSF ve farklı BA içeren ACSF çözeltilerinde test edilmiştir. Sonuçlar FHDSS tekniğinin kullanıldığı bu tür fiber optik sensörlerin, sensör başlıklarının özel modifikasyonu sonrası hedef molekül belirleme yolu ile erken teşhis amaçlı biyosensör ve sensör uygulamaları için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Sonraki araştırma projeleri, bu sistem kullanılarak ve etik kurul izinleri alınarak sensör başlığının özel olarak modifiye edildiği, gerçek hastalardan alınan numuneler ile test edilebileceği çalışmalar üzerine olacaktır.

4. SONUÇ

Bu proje kapsamında ESOGÜ’de ilk kez Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu bünyesinde ultra yüksek hassasiyete sahip spektroskopik ölçüm tekniği olan Fiber Halka Döngü Sönümlleme (FHDSS) tekniğinin kullanıldığı Fiber Optik Sensör sistemi dizayn edilerek Alzheimer Hastalığı (AH) erken teşhisi için fiber optik biyosensör uygulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. FHDSS sistemi bileşenleri sistemin hassasiyetini belirlemede büyük öneme sahip olduğu için proje bütçesi kapsamında dikkatli bir şekilde belirlenerek temin edilmiştir. FHDSS sisteminde kullanılan lazer ışık kaynağının ve çözelti içerisinde iken sensör başlığının mikro titreşimlerden etkilenmesini minimuma indirmek için optik masa görevi görece 8 cm kalınlığında mermer masalar laboratuvar ortamında dizayn edildi. Böylece sürekli dalga lazer ışık kaynağının, minimum sinyal/gürültü (S/G) oranına sahip olabilmesi için sistem optimizasyonunun sürekli olarak yapılmasının önüne geçilmiş oldu. FHDSS sistemindeki lazer ışık kaynağı ve sürücüsünün optimum çalışma sıcaklığı, akımı ve sürücü sıcaklığı gibi parametreleri eşleştirilerek minimum S/G oranı elde edilecek şekilde sistem optimize edildi. Bu sistemde kullanılan tek modlu fiber ve 99.9:0.1 birleştiriciler ile oluşturulmuş fiber halka döngüsü içerisinde herhangi bir bölgede 2-10 cm uzunluğu arasında sensör başlıkları üretildi. Sensör başlıkları, fiberin %48 saflıktaki Hidroflorik Asit (HF) çözeltisi içerisinde 75 ± 5 dk süre ile daldırılması sonucu elde edilmiştir. Böylelikle 120 m uzunluğundaki fiber halkada, uzunluğu 4 ± 0.5 cm olan bir sensör başlığı üretilen FHDSS sisteminin taban kararlılığı (baseline stability) 1.63% olarak hesaplanmıştır. Sensör üzerinde hiçbir ek basınç veya gerilim yokken, önce hava ortamında FHDSS sisteminin RDT (τ_0) ölçümlenmiş ve sonrasına DS ortamına daldırılarak sistemin RDT ölçümlenmiştir. Bu işlem tekrarlanarak FHDSS sisteminin hem tekrarlanabilir hem de yenilenebilir ölçümler alabildiği gösterilmiştir. Sonrasında sensör başlığı hava ortamından Yapay Beyin Sıvısı (ACSF) içerisine daldırılmış, tekrar hava ortamına çıkarılmış, sonrasında farklı konsantrasyonlarda Beta Amyloid (BA) çözeltisi içeren ACSF çözeltileri içerisine daldırılmış ve sonra tekrar hava ortamına çıkarılmıştır. Bu işlemlerin her birinde sistemin RDT değerleri, dolayısı ile sistemin toplam optik kaybı ölçülerek FHDSS sisteminin farklı ortamlardaki tepkisi ortaya konmuştur. Böylece hem RDT, hem de sistemdeki toplam optik kayıp parametrelerinin, farklı kırılma indislerine sahip ortamları ayırt etmek için kullanılabileceği için FHDSS sensörlerinin AH hastalığının teşhisinde de kullanılabilişliğini göstermiştir.

Bu proje kapsamında 1550 nm merkez dalga boyuna sahip sürekli dalga lazer ışık kaynağı ve sürücüsü, 120 m uzunluğunda tek modlu fiber ve 99.9:0.1 birleştiriciler kullanılarak oluşturulmuş fiber halka döngüsü, serbest uzay fotodedektör, osiloskop ve elektronik bileşenler kullanılarak ESOGÜ’de ilk kez ultra yüksek hassasiyete sahip bir spektroskopik ölçümlleme sistemi dizayn edilmiş ve AH ölçümleri için test edilmiştir. Bu proje, gelecek projelerde çalışılması planlanan birçok ölümcül veya yaygın hastalıkların erken teşhisinde hedef molekül teşhis çalışmalarına temel oluşturmuştur. Hedef molekül ölçümlleme için FHDSS sisteminin geliştirilerek daha da iyileştirilmesi ve sensör bölgesinin özel olarak modifikasyonu gerçekleştirilerek çalışılacaktır. Bu çalışmaların sonraki projelerde gerçekleştirilerek ultra hassas FHDSS sistemi geliştirilmesi ve hastalıkların erken teşhisi çalışmalarında kullanılması planlanmaktadır.

REFERANSLAR

1. John, A. H., Greald A. H. 1992. "Alzheimer's disease: The Amyloid Cascade Hypothesis", *Science*, 256, 184-185.
2. Reitz C. 2012. "Alzheimer's disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review", *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1-8.
3. Vandermeeren, M., Mercken, M., Vanmechelen, E. et. al. 1993. "Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay." *J Neurochem.* 61, 1828-1834.
4. Sjogren M, Davidsson P, Tullberg M, et al. 2001. "Both total and phosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 70, 624-630.
5. Lönneborg, A. 2008. "Biomarkers for Alzheimer's Disease in Cerebrospinal Fluid, Urine, and Blood." *Mol. Diag. Ter.* 12, 307-320.
6. Palmert, M. R., Usiak, M., Mayeux, R., et al. 1990. "Soluble derivatives of the beta amyloid protein precursor in cerebrospinal fluid: alterations in normal aging and in Alzheimer's disease." *Neurology* 40, 1028-1034.
7. Sjogren, M., Andreasen, N., Blennow, K. 2003. "Advances in the detection of Alzheimer's disease-use of cerebrospinal fluid biomarkers." *Clin Chim Acta.* 332, 1-10.
8. Fukuyama, R., Mizuno, T., Mori, S., et al. 2000. "Age-dependent change in the levels of Abeta40 and Abeta42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of Abeta42 to Abeta40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients." *Eur. Neurol.* 43, 155-160.
9. Galasko, D. 1998. "Cerebrospinal fluid levels of A beta 42 and tau: potential markers of Alzheimer's disease." *J Neural Transm Suppl.* 53, 209-221.
10. Prabhulkar S., Piatyszek, R., Cirrito, J. R., Wu, Z., Li, C.Z. 2012. "Microbiosensor for Alzheimer's Disease Diagnostics: Detection of Amyloid Beta Biomarkers", *J Neurochem.* 122, 374-381.
11. Garai, K., Surekay, R., Maiti, S. 2007. "Detecting Amyloid- β Aggregation with Fiber-Based Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Biophysical Journal*, 92, 55-57.
12. Harbater, O., Gannot, I. 2015. "An optical method for early detection of Alzheimer's disease, *Biomedical Optics & Medical Imaging*", SPIE Newsroom. DOI: 10.1117/2.1201502.005825
13. Baumann, B., Woehrer, A., Ricken, G., Augustin, M., Mitter, C., Pircher, M., Kovacs G. G., Hitztenberger, C. K. 2017. "Visualization of neuritic plaques in Alzheimer's disease by polarization-sensitive optical coherence microscopy", *Scientific Reports*, 7:43477, 1-12.
14. Hee, M. R., Huang, D., Swanson, E. A., Fujimoto, J. G. 1992. "Polarization-sensitive low-coherence reflectometer for birefringence characterization and ranging", *J. Opt. Soc. Am. B* 9, 903-908.
15. De Boer, J., Milner, T., Van Gemert, M., Nelson, J. 1997. "Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarizationsensitive optical coherence tomography", *Opt. Lett.* 22, 934-936.
16. Herath, C., Wang, C., Kaya, M., Chevalier, D. 2011. "Fiber loop ringdown DNA and bacteria sensors", *J. Biomed. Opt.* 16, 050501/1-3.
17. Wang, C., Kaya, M., Wang, C. 2012. "Evanescent Field-Fiber loop ringdown glucose sensor", *J. Biomed. Opt.* 17, 037004/1-10.
18. Kaya, M., Wang, C. 2014. "Fiber loop ringdown glucose sensors- Initial tests for human diabetic urines", *Proc. of SPIE*, 9098, 9098O/1-4.

19. <https://www.corning.com/media/worldwide/coc/documents/Fiber/SMF-28%20Ultra.pdf>
20. Cengiz, B. Fiber Loop Ring Down Spectroscopy for Trace Chemical Detection, MS Thesis Middle East Technology University, Ankara, Turkey, 2013.
21. Yolalmaz A. Utilization of fiber loop ring down technique for sensing applications. MSc, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 2017.
22. https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_coa/3525_71_coa.pdf?1637916528&_ga=2.244424709.166197757.1637916537-2144906769.1636622448
23. https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/w4502?gclid=CjwKCAiAqIKNBhAIEiwAu_ZLDqQ2pqPS5YL0tkBa8nr2lNTHpkx9u_-obDKbBqJ9Hd8Pv6tn5CRnEhoCWFkQAvD_BwE