TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENİLKETONÜRİ TANISINA YÖNELİK QTF-TABANLI KÜTLE HASSAS İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Gizem KALELİ CAN

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

MAYIS 2018

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

……..
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Doktora derecesinin tüm gereksininlerini sağladığını onaylarım.

……
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151717004 numaralı Doktora Öğrencisi **Gizem KALELİ CAN**'ın ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **"FENİLKETONÜRİ TANISINA YÖNELİK QTF-TABANLI KÜTLE HASSAS İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ"** başlıklı tezi **25-05-2018** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı :	**Prof. Dr. Mehmet MUTLU** TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi	.....
Jüri Üyeleri :	**Prof. Dr. Bong Sup SHIM (Başkan)** INHA Universitesi	.....
	Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞİFOĞLU Hacettepe Üniversitesi	.....
	Prof. Dr. A. Birkan SELÇUK İzmir Demokrasi Üniversitesi	.....
	Prof. Dr. Hilal GÖKTAŞ Çanakkale, 18 Mart Üniversitesi	.....
	Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi	.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

.

Gizem KALELİ CAN

ÖZET

Doktora Tezi

FENİLKETONÜRİ TANISINA YÖNELİK QTF-TABANLI KÜTLE HASSAS İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Gizem KALELİ CAN

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniveritesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Tarih: Mayıs 2018

Otozomal resesif bir hastalık olan fenilketonüri, L-fenilalaninin vücutta birikmesi sonucu açığa çıkan ciddi bir hastalıktır. Fenilketonüri hastalığı, ağırlıklı olarak fenilalanin hidrogenaz enzimini sentezleyen 12. kromozomda oluşan mutasyondan kaynaklanmaktadır. Tedavi edilmemesi durumunda, vücut sıvılarındaki L-fenilalaninin miktarı yükselerek; epilepsi, mikrosefali, egzema ve skleroderma benzeri deri lezyonları, gelişim ve zeka geriliği gibi hastalıklara neden olmaktadır. Bu seviyede ciddi sonuçları olan bu hastalığın, erken teşhisinin yapılarak zaman kaybedilmeden tedavisine başlanması büyük önem taşımaktadır. Günümüzde bu hastalığın tanısı, yenidoğan tarama programı kapsamında zorlu bir ön hazırlık süreci gerektiren, karmaşık ve pahalı cihazlar ile koyulmaktadır. Bu nedenle bahsi geçen hastalığın teşhisinde kullanılabilecek, kolay uygulanabilir, hızlı/doğru cevap veren ve ekonomik tanı yöntemlerinin geliştirilerek klinik uygulamalara kazandırılması önem teşkil etmektedir. Bu nedenle doktora tez çalışması kapsamında, fenilketonüri hastalığının teşhisinde kullanılması amacıyla, yüksek performans, hızlı cevap verme ve ekonomik özellikleriyle ön plana çıkan QTF çevirici yüzeyler plazma ile modifiye

edilmiş ve ex-vivo ortamdaki L-fenilalan düzeyinin ölçümünü gerçekleştiren QTF-tabanlı bir immünosensör geliştirilmiştir.

Bu hedef doğrultusunda öncelikle QTF yüzeyleri plazma polimerizasyon işlemi ile iki aşamada fonksiyonelleştirilmiştir. Fonksiyonelleştirilme işleminin ilk aşamasında, amino grubu içeren plazma modifiye filmlerdeki stabilite problemini aşmak amacıyla QTF çevirici yüzeyleri hidrokarbon bazlı bir prekursör olan n-hekzan ile farklı boşalım güç ve uygulama sürelerinde modifiye edilmiştir. Stabilite testleri ve kimyasal analizler sonucunda, 30 gün boyunca kararlı ince film eldesini sağlayan optimum plazma parametreleri 75 W- 10 dakika olarak belirlenmiştir. İkinci aşamada ise; QTF çevirici yüzeyler, amino grubu içeren etilendiamin (EDA) monomeriyle modifiye edilerek antikor immobilizasyonuna uygun olacak şekilde fonksiyonelleştirilmiştir. Karakterizasyon işlemleri sonucunda, fonksiyonel ince filmlerin üretimi için optimum plazma parametreleri; 75 W-1, -5 ve -10 dakika olarak belirlenmiştir. N(hex) ve EDA modifikasyonları gerçekleştirilen çevirici yüzeylerinin aktifleştirilmesi amacıyla, film yüzeyler farklı süre ve ortamlarda glutaraldehit ile muamale edilmiş, antikor immobilizasyonuna uygun yüzeyler %25 (v:v) gluteraldehit çözeltisi içerisinde 2 saatlik inkübasyon süresi sonucunda elde edilmiştir.

İmmünosensör tasarımı aşamasında, aktifleştirilmiş çevirici yüzeyler 1-20 µg/µl konsantrasyon aralıklarında anti-fenilalanin ile dekore edilerek biyolojik tanıyıcı tabaka üretimi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen immünosensörün L-fenilalanine karşı cevabı takip edilerek antikor miktarı 10 µg/µl olarak optimize edilmiş ve ölçüm performansı incelenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma ile litertürde ilk defa fenilketonüri tanısında kullanılabilecek QTF-tabanlı bir kütle hassas immünosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Üretilen immünosensör platformunun gelecek immünosensör çalışmalarına alt yapı niteliğinde olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fenilketonüri, L-Fenilalanin, Kütle hassas sensör, Kuvars ayar çatalı, Plazma polimerizasyonu, Yüzey modifikasyonu

ABSTRACT

Doctor of Philosophy

DEVELOPMENT OF QTF-BASED MASS SENSITIVE IMMUNOSENSOR FOR PHENYLKETONURIA DIAGNOSIS

Gizem KALELİ CAN

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Programme

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Date: May 2018

Phenylketonuria, an autosomal recessive disorder, is a serious disease that causes accumulation of L-phenylalanine in the body. Phenylketonuria is caused by the mutation that occurs in chromosome 12, which mainly synthesizes phenylalanine hydrogenase enzyme. If not treated, the amount of L-phenylalanine in the body fluids increases; epilepsy, microcephaly, eczema and scleroderma-like skin lesions, development and intelligence. It is of great importance that this disease, which has serious consequences at this level, should be diagnosed early and started to be treated without losing time. Today, the diagnosis of this disease is being made with complex and expensive devices, which require a tough preliminary process within the neonatal screening program. For this reason, it is important that the economic diagnosis methods which can be used in the diagnosis of the diseased, easy to apply, fast / correct answer and clinical diagnosis are given. For this reason, a QTF-based immunosensor has been developed for use in the diagnosis of phenylketonuria in a doctoral dissertation study, which has been modified with plasma to provide a high performance, rapid response, and economical properties and to measure the level of

L-phenylalanine in the ex-vivo environment.

To this end, QTF's surfaces have been functionalized in two steps by plasma polymerization process. At the beginning of the functionalization process, with the aim of overcoming the stability problem of amine-rich thin films, the QTF surfaces were modified by plasma polymerization of n-hexane which is a hydrocarbon-based precursor, with different discharge power and exposure times. As a result of the stability tests and chemical characterization, the optimum conditions for stable thin film for 30 days were obtained with 75 W- 10 minutes plasma parameters. In the second step; QTF's surfaces were modified with ethylenediamine (EDA), which is amine-rich monomer, and functionalized for antibody immobilization. As a result of the characterization process, optimal plasma parameters for the production of functional thin films are obtained with 75 W-1, -5 and -10 minutes plasma parameters. Then, functionalized QTF's surfaces were treated with glutaraldehyde at different times and media in order to activate surfaces for antibody immobilization and optimum conditions were obtained as a result of a 2 hour incubation period in a 25% (v: v) glutaraldehyde solution.

During the design of immunosensor, the production biological recognition layer on substrate was performed by decorating the activated transducer surfaces with anti-phenylalanine at concentration intervals of 1-20 µg / µl. The developed immunosensor was followed up against L-phenylalanine and the antibody amount was optimized to 10 µg / µl and the measurement performance was examined. As a consequence, QTF-based mass-sensitive immunosensor were designed for the first time in the literature within this study. It is thought that the produced immunosensor platform will be an infrastructure for future immunosensor studies.

Keywords: Phenylketonuria, L-Phenylalanine, Mass-sensitive sensor, Quartz tuning fork, Plasma polymerization, Surface modification

TEŞEKKÜR

Uzun bir maraton olan doktora süreci boyunca her daim arkamda olan, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Mutlu'ya,

Donanımlı laboratuvar imkanlarıyla çalışmama olanak sağlayan, deneyimli öğretim üyesi kadrosu ile bilime bakış açımı şekillendiren, burs vererek beni destekleyen TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi ailesine,

Zorlu araştırma sürecini keyifli hale getiren pabmed ailemin üyeleri, Hatice Ferda Özgüzar, Gökhan Şahin, Buşra Özlü, Enes Çelik, Merve Demir ve Ahmet Ersin Meydan'a,

Doktora sürecinin bana kazandırdığı en önemli ve değişilmezi olan canım dostum Gözde Kabay'a,

Başından beri bana desteğini maddi manevi hiç eksik etmeyen, sıkıntımda ilk yanıma koşan, sevincimde benden daha çok sevinen canım annem Nevin Kaleli ve canım babam Ali Doğan Kaleli'ye,

Bu süreçte benimle birlikte yorulan, sabahlayan, üzülen ve sevinen en değerlim kardeşim Çiğse Kaleli'ye,

Sanatçı ruhu, farklı bakış açısı ve sonsuz sevgisiyle her zaman kendisine bana hayran bıraktıran ve ilham veren canım eşim Bora Can'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……iv
ABSTRACT……vi
TEŞEKKÜR……...viii
İÇİNDEKİLER……ix
ŞEKİL LİSTESİ……xii
TABLO LİSTESİ……...xv
KISALTMALAR……...xvi
SEMBOL LİSTESİ……xvii
1 GİRİŞ……...1
1.1 Fenilketonüri……3
1.1.2 Fenilketonürinin tarihçesi……....4
1.1.3 Fenilketonürinin biyokimyasal mekanizması……..4
1.1.4 Fenilketonürinin patofizyolojisi ……..5
1.1.5 Fenilketonürinin sınıflandırılması……....6
1.1.6 Fenilketonürinin tanısı……7
1.1.7 Yenidoğan Tarama Programı……...9
1.1.8 Fenilketonürinin görülme sıklığı..……..10
1.1.9 Fenilketonüri hastalığının teşhisinde biyosensörlerin yeri ve günümüze kadar yapılan çalışmalar…….....10
1.2. Biyosensör Tanımı……15
1.2.1. İmmünosensörler……20
1.2.2. İmmünosensörlerde çevirici tipleri……..21
1.2.2.1. Elektrokimyasal çeviriciler……...21
1.2.2.1. Optik çeviriciler……....21
1.2.2.3. Piezoelektrik çeviriciler……22
1.2.3. Biyosensörlerin performans parametreleri……..……..27
1.3. Plazma ile Yüzey Modifikasyonu……...……..29
1.3.1. Plazma kaynakları ve plazma ile yüzey modifikasyon teknikleri……...….30
1.3.1.1. Plazma kaynakları…….……30
1.3.1.2. Plazma ile yüzey modifikasyon teknikleri……...……..31
1.3.2. Plazma polimerizasyonunu etkileyen parametreler……....34
1.3.3. Plazma filmlerinin kararlılığı……..……36
1.4. Yüzey Analiz Teknikleri…….……...……...36
1.4.1. Temas açısı ölçüm cihazı ……..……37
1.4.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR-ATR)……..…….38
1.4.3. X-Işınları Fotoelektron Spektroskopi…….....……..38
1.4.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)……39
1.4.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM)……...40
1.5. Kuvars Ayar Çatalı (QTF) Sensör Denetleyici...……..40

2. MATERYAL VE METOT……..……42
2.1. Materyal……43
2.1.1. Kimyasal malzemeler…….…….43
2.2. Metot……44
2.2.1. Kuvars ayar çatalının hazırlanması ve frekans ölçüm sisteminin çalışma performansının incelenmesi……...…..44
2.2.2. Plazma polimerizasyon yöntemi ile ince filmlerin hazırlanması…..……...45
2.2.2.1. QTF çeviricilerinin yüzeyinde PlzP(n-hekzan) ince filmlerin oluşturulması…….46
2.2.2.2. QTF çeviricilerinin yüzeyinde PlzP(EDA) ince filmlerin oluşturulması…….47
2.2.3. Plazma polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan ince filmlerin karakterizasyonu…….……..……...48
2.2.3.1. PlzP(n-Hekzan) ince filmlerin karakterizasyonu…..…….49
2.2.3.2. PlzP(EDA) ince filmlerin karakterizasyonu..……50
2.2.4. Plazma koşulları optimize edilen ince filmlerin detaylı fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları…….……...…...51
2.2.4.1 Atomik Kuvvet Mikroskop (AKM) ölçümleri……..……..51
2.2.4.2. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ölçümleri…..……..52
2.2.5. Glutaraldehit ile yüzey aktivasyonu…...……..……..52
2.2.6. Antikor (Anti-fenilalanin) immobilizasyonu...……....52
2.2.7. Anti-fenilalanin / L-fenilalanin spesifik etkileşiminin test edilmesi…..…53
2.2.8. Hazırlanan immünosensörlerin L-fenilalanin kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması…….....53
2.2.9. Seçicilik testi…….…….53
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR……...54
3.1. Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Hazırlanan İnce Filmlerin Karakterizasyonu…….……...……...……...57
3.1.1. PlzP(n-Hekzan) modifiye QTF'lerin karakterizasyonu……...57
3.1.1.1. PlzP(n-Hekzan) modifiye QTF'lerin fiziksel karakterizasyonu…….…...58
3.1.1.2. PlzP(n-Hekzan) ince filmlerin kimyasal karakterizasyonu……..……66
3.1.2. PlzP(EDA) ince filmlerin karakterizasyonu…..……...71
3.1.2.1. PlzP(EDA) ince filmlerin fiziksel karakterizasyonu……..……...71
3.1.2.2. Temas açısı ölçümleri…..……..72
3.2. QTF Yüzeylere Ön-kaplamanın Etkisi…..…..……..75
3.2.1. PlzP(EDA) modifiye ön-kaplamasız yüzeylerin hava ortamındaki yıpranma hızı…….……...…...75
3.2.2. PlzP(n-Hekzan) modifikasyonun (ön-kaplama) PlzP(EDA) ince filminin hava ortamındaki yıpranma hızına etkisi……..……....79
3.2.3. Ön-kaplamasız PlzP(EDA) ince filminin kimyasal karakterizasyonu……83
3.2.4. FTIR-ATR ölçüm sonuçları……...83
3.2.5. PlzP(n-Hekzan) modifikasyonlu (ön-kaplama) PlzP(EDA) ince filmlerin kimyasal karakterizasyonu……...85
3.2.5.1. FTIR-ATR ölçümleri.……85
3.2.5.2. XPS ölçüm sonuçları…….....94
3.2.5.3. AKM analizi sonuçları……..……....97
3.3. Çıplak QTF'in Frekans Ölçümü ve Frekans Ölçüm Sisteminin Optimizasyonu……...……...98
3.4. İki Aşamalı Plazma Polimerizasyon İşlemi Sonrası Kalite Faktördeki Değişim……...……102

3.5. Glutaraldehit Aktivasyonu..……...……..……..103
3.6. Anti-fenilalanin İmmobilizasyonu…….……..104
3.7. Anti-fenilalanin /fenilalanin Etkileşiminin İncelenmesi..……..…….104
3.8. L-Fenilalanin İmmünosensörünün Performansının Değerlendirilmesi…..…..105
3.9. Seçicilik Testi……...109
4. SONUÇ, ÖNERİLER VE GELECEK ÇALIŞMALAR ……..……..110
KAYNAKLAR……...……112
ÖZGEÇMİŞ……...119

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : İnsandaki L-fenilalanin metabolizması……5
Şekil 1.2 : Fenilalaninin tirozine dönüşme reaksiyonu…….....6
Şekil 1.3 : Fenilalaninin beyine geçiş yolu…….7
Şekil 1.4 : Biyosensörün çalışma prensibi……...12
Şekil 1.5 : Enzim çiplerinin modifikasyon basamakları…….....13
Şekil 1.6 : Analit çözeltisinde ve enzim ile modifiye edilmiş karbon pastada gerçekleşen reaksiyonlar…….....13
Şekil 1.7 : Fenilalanin analizinde kulanılan elektrotun şematik gösterimi…….....15
Şekil 1.8 : Grafen oksit nanolevha–kitosan film üzerine fenilalanin dehidrogenaz immobilizasyon basamakları……..16
Şekil 1.9 : Grafen nanotabaka-gümüş nanoparçacık hibritlenmesi sonucu oluşan nanokompozitin yüzeyine fenilalanin dehidrogenaz immobilizasyon basamakları ve L-fenilalanine karşı cevabı…….....17
Şekil 1.10 : Bir biyosensörün konfigürasyonu…….....18
Şekil 1.11 : Biyosensör sınıflandırılması……19
Şekil 1.12 : Kuvars kristal mikroterazi (QCM) …….....24
Şekil 1.13 : Kuvars ayar çatalı (QTF) …….....25
Şekil 1.14 : Kuvars ayar çatalı SEM görüntüsü…….....25
Şekil 1.15 : Modifiye edilen QTF elektrotunun avidine karşı frekans sapması grafiği…….....27
Şekil 1.16 : QTF çatallarının üç farklı monomer ve iki farklı plazma sistemiyle modifikasyonu ve model protein, SSA karşı tepkisi…….....28
Şekil 1.17 : Temas açısı ölçüm düzeneği şematik gösterim…….....37
Şekil 1.18 : Fourier transform ınfrared spektroskopi cihazı…….....38
Şekil 1.19 : X-ışınları Fotoelektron Spektroskopi şematik gösterim…….....39
Şekil 2.1 : (a) n-Hekzan moleküler formülü, (b) Etilendiamin moleküler formülü……..……43
Şekil 2.2 : Düşük basınç RF plazma sisteminin şematik gösterimi……44
Şekil 2.3 : QTF çatallarının yüzey modifikasyonuna hazırlanması……45
Şekil 2.4 : Frekans ölçümlerinde kullanılan Asensis Q Master Cihazı ve QTF'lerin takıldığı soket…….....45
Şekil 3.1: n-hekzan prekursöründe ilk olarak kırılması beklenen C1-C2, C2-C3 ve C3-C3 bağları…….....58
Şekil 3.2 : Düşük basınç RF-plazma sisteminde farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile üretilen PlzP(n-hekzan) yüzeylerin temas açısı ölçümleri…..60
Şekil 3.3 : (a) n-Hekzan kaplamalı ince filmlere ait birinci gün temas açısı ölçümleri. (b) n-Hekzan kaplamalı ince filmlere ait otuzuncu gün temas açısı ölçümleri…….....63
Şekil 3.4 : n-hekzan ile farklı plazma parametreleri ile üretilmiş yüzeylere ait temas açısı ölçüm sonuçları (a) 25 Watt boşalım gücüne ait temas açısı

ölçümleri. (b) 50 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri. (c) 75 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri. (d) 100 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri…….....65
Şekil 3.5 : Düşük basınç RF-plazma sisteminde 25W boşalım gücünde elde edilen filmin spekturumu……..……..……..…68
Şekil 3.6 : Düşük basınç RF-plazma sisteminde 50W boşalım gücünde elde edilen filmin spekturumu……..……..…68
Şekil 3.7 : Düşük basınç RF-plazma sisteminde 75W boşalım gücünde elde edilen filmin spekturumu……..……...69
Şekil 3.8 : Karbon elementinin XPS sonucu……...71
Şekil 3.9 : Düşük basınç RF-plazma sisteminde farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile üretilen ön-kaplamasız PlzP(EDA) yüzeylerin temas açısı ölçümleri……...74
Şekil 3.10 : Düşük basınç RF-plazma sisteminde farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile n(hekzan) ön-kaplamalı PlzP(EDA) yüzeylerin temas açısı ölçümleri……...74
Şekil 3.11 : EDA ince filmlerine ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) EDA ince filmlerine ait birinci gün temas açısı ölçüm sonuçları. (b) EDA ince filmlerine ait otuzuncu gün temas açısı ölçüm sonuçları…..……76
Şekil 3.12 : Farklı plazma parametrelerinde üretilen PlzP(EDA) filmlerin yıpranma hızı sonuçları. (a) 25-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (b) 50-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (c) 75-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (d) 100-Watt boşalım gücüne sahip yıpranma hızı sonuçları……..……...78
Şekil 3.13 : PlzP(hex) ve PlzP(EDA) ile kaplaması yapılan ince filmlere ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) PlzP(hex) ve PlzP(EDA) kaplamalı ince filmlere ait birinci gün temas açısı ölçüm sonuçları. (b) PlzP(hex) ve PlzP(EDA) kaplamalı ince filmlere ait otuzuncu gün temas açısı ölçüm sonuçları……..……..……...81
Şekil 3.14 : Farklı plazma parametrelerine ait temas ölçümü ile saptanan yıpranma hızı sonuçları. (a) 25-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (b) 50-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (c) 75-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (d) 100-Watt boşalım gücüne sahip yıpranma hızı sonuçları……..……...82
Şekil 3.15 : 25 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……..……....……..84
Şekil 3.16 : 50 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……....…..……..86
Şekil 3.17 : 75 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu…….……87
Şekil 3.18 : 100 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……..…...……88
Şekil 3.19 : 25 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……..…….90
Şekil 3.20 : 50 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……..…….91
Şekil 3.21 : 75 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……..…….92

Şekil 3.22 : 100 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu……..……93
Şekil 3.23 : Ön-kaplamasız etilendiamin ince filminde bulunan karbon elementinin XPS sonucu……..…….....95
Şekil 3.24 : Ön-kaplamalı etilendiamin ince filminde bulunan karbon elementinin XPS sonucu……..…….....96
Şekil 3.25 : Ön-kaplamasız etilendiamin ince filminde bulunan azot elementinin XPS sonucu……..…….....96
Şekil 3.26 : Ön-kaplamalı etilendiamin ince filminde bulunan azot elementinin XPS sonucu……..…….....97
Şekil 3.27 : (a) PlzP(n-hekzan), (b) ön-kaplamasız PlzP(EDA), (c) ön-kaplamalı PlzP(EDA) ile modifiye edilmiş yüzeylerin 3D AKM mikrografisi……99
Şekil 3.28 : Modifiye edilmemiş QTF'lerin rezonans frekans sonuçları……..100
Şekil 3.29 : Farklı sürelerde rezonans frekans ölçümü……101
Şekil 3.30 : Modifiye edilmemiş farklı QTF'lerin rezonans frekans değerleri…….102
Şekil 3.31 : Anti-fenilalanin miktarının frekans değişimine etkisi……...107
Şekil 3.32 : Belirli miktarlarda L-fenilalanin içeren çözelti ile etkileştirilen anti-fenilalanin ile dekore edilmiş QTF cevabı…….…….....108
Şekil 3.33 : Hazırlanan QTF-tabanlı immünosensörün L-fenilalanine karşı elde edilen kalibrasyon eğrisi…….....108

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 : Fenilketonürinin ülkelere göre görülme sıklığı……....11
Tablo 1.2 : Plazma tekniğinin kullanıldığı alanlar ve kullanım amacı…….....30
Tablo 2.1 : Plazma polimerizasyonunda kullanılan koşullar……..48
Tablo 3.1 : Plazma polimerizasyonu sırasında n-hekzanın reaktöre beslenmesi sonucu oluşabilecek radikaller ve radikallerin yüzeyle çarpıştıktan sonra oluşturabileceği nötr moleküller……..…….....58
Tablo 3.2 : Farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile modifiye edilmiş QTF örneklerinin frekans değişimleri……...70
Tablo 3.3 : Plazma polimerizasyon yönteminin kalite faktörüne etkisi……103
Tablo 3.4 : Glutaraldehit aktivasyonunun kalite faktörüne etkisi…….....104
Tablo 3.5 : Farklı plazma parametreleri ile modifiye edilmiş yüzeylerin aktivasyon ve anti-fenilalanin immobilizasyonu işleminden sonraki frekans ve kalite faktöründeki değişim…….105
Tablo 3.6 : Farklı plazma parametreleri ile modifiye edilmiş yüzeylerin aktivasyon, anti-fenilalanin immobilizasyonu ve anti-fenilalanin / fenilalanin etkileşimi işleminden sonraki frekans ve kalite faktöründeki değişim……....106

KISALTMALAR

AÇSAP : Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlama
ATR-FTIR : Attenuated Total Reflektans- Fourier Transform Infrared Spektroskopi
AKM : Atomik Kütle Mikroskopu
3,4-DHB : 3,4-dihidroksibenzaldehit
DNA : Deoksiribonükleik asit
Ig : Immünoglobulin
EDA : Etilendiamin
IgG : Immünoglobulin G
LAT1 : L-aminoasit taşıyıcı 1
NAD^+ : Nikotinamid adenine dinüklotit
PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi
PlzP : Plazma Polimeri
RF : Radyo Frekans
SEM : Taramalı Elektron Mikroskopu
SSA : Sığır Serum Albumin
QCM : Kuvars Kristal Mikroterazi
QTF : Kuvars Ayar Çatalı
XPS : X-ışınları Fotoelektron Spektroskopi

SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklama**
Δf	Frekans kayma miktarı
f_0	Kristale ait rezonans frekansı
Δm	Kütle değişimi
ρ_q	Kuvarsın yoğunluğu
μ_q	Kuvarsın kayma katsayısı
η_L	Çözeltinin viskozitesi
ρ_L	Çözeltinin yoğunluğu

1. GİRİŞ

Kalıtsal metabolik bir bozukluk olan fenilketonüri, karaciğerde sentezlenen fenilalanin hidrogenaz (PAH) enziminin eksikliğinden kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır [1–5]. Enzimin sentezlenmesinde görevli gendeki (12q kromozomu) mutasyonlar sonucu [6–8], PAH enziminin yokluğu veya yetersizliği ile tirozine dönüşemeyen fenilalanin aminoasidi ve onun transaminasyonu sonucu oluşan metabolitleri (fenilpirüvik asit, fenillaktik asit, fenilasetik asit) bebeğin kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında birikir [9]. Bu durum, zekâ geriliğine neden olabileceği gibi tedavi edilmediği takdirde deri lezyonları, epilepsi, mikrosefali, egzama ve skleroderma gibi hastalıklara da sebep olmaktadır [10]. Normal bir bireyde serum fenilalanin miktarının 50–110 μM aralığında ölçülmesi beklenirken fenilketonüri hastalarında fenilalanin serumda 0,6-3,8 mM, idrarda 20-60 mM seviyelerinde seyretmektedir [11].

Fenilketonüri gibi metabolik hastalıklar nadir görülen fakat yaşam kalitesini ciddi seviyelerde düşüren hastalık türlerindendir. Bu hastalıklar erken dönemde saptandığı takdirde mortalite ve morbiditenin önüne geçilebilmektedir. Bu sebeple, metabolik hastalıklar için tarama programlarının hayata geçirilmesi hastaların daha iyi bir yaşam kalitesine sahip olmalarını sağlamaktadır. Özellikle, Türkiye gibi akraba evliliklerinin yüksek oranlarda gerçekleştiği ülkelerde bu tarz hastalıkların genetik olarak taşınmasından dolayı görülme sıklığı dünya geneline kıyasla çok yüksektir [12].

Tarihte yenidoğan tarama programının ilk örneği fenilketonüridir. Daha sonra başka hastalıklar da eklenerek (konjental hipotiroidi, biyotinidaz eksikliği ve kistik fibroliz) ulusal neonatal tarama programı genişletilmiştir. T.C. Sağlık Bakanlığı, bebeğin doğumundan itibaren (ilk bir haftası içinde) topuk kanından "yenidoğan tarama testi" yapılmasını zorunlu hale getirerek bebeğin gelişimini doğrudan etkileyen fenilketonüri, konjental hipotiroidi, biyotinidaz eksikliği ve kistik fibroliz erken tanısının konup tedaviye başlanmasına olanak sağlamıştır [13]. Fakat ülkemizde alınan

topuk kanları il sağlık müdürlüğü AÇSAP şubelerinde toplanmakta ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu merkezlerine transfer edilmektedir. Haftanın 6 günü çalışan bu merkezler yılda yaklaşık 1.300.000 örnek değerlendirmek zorundadır.

Günümüzde fenilketonüri, mikrobiyal inhibisyon, kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak tayin edilebilmektedir. Ülkemizde ise fenilketonüri tayini tarama merkezlerinde florometrik yöntem kullanılarak yapılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin zaman alıcı ve pahalı olması, karmaşık enstrümantasyon, ön hazırlık ve özel laboratuvar imkânlarına gereksinimi sebebiyle bu alandaki ihtiyaç tam anlamıyla karşılanamamaktadır. Bu nedenle daha basit, hızlı ve ekonomik tayin yöntemlerinin geliştirilip klinikte kolaylıkla kullanılabilir hale getirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır [12,14–16].

Diğer tekniklere nazaran düşük maliyeti, yüksek seçiciliği, yüksek hassasiyeti, hızlı cevap vermesi ve ölçüm kolaylığı, biyosensörlerin son yıllarda bilim insanları tarafından sıklıkla tercih edilmesini sağlamıştır [18]. Fakat bu çalışmada, söz konusu olan fenilketonüri teşhisi için fenilalanin ölçümü ile ilgili kısıtlı sayıda biyosensör çalışmasına rastlanmıştır [11,15,17–24].

Biyosensörler, çevirici türlerine göre elektrokimyasal, optik ve kütle hassas biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu biyosensör çeşitleri arasından kütle hassas biyosensörler, yüksek hassasiyeti, seçiciliği, etiketsiz çalışabilmesi ve düşük maliyeti sebebiyle birçok çalışmada kullanılmaktadır [25,26]. Kuvars kristal mikrobalans (QCM) ise kütle hassas biyosensörlerde en çok tercih edilen kristal tipidir. Fakat son yıllarda, QCM ile aynı prensipte çalışan kuvars ayar çatalı (QTF), yüksek kalite faktörüne sahip olması (Q_F~10000-7000) dolayısıyla gösterdiği yüksek hassasiyeti, yüksek frekans kararlığı, keskin frekans tepkisi, ölçümlerdeki tekrar edilebilirliği, kütle algılama için uygunluğu ve düşük maliyetiyle dikkatleri üzerine çekerek QCM'e alternatif olabileceğini göstermiştir. QTF'nin hem kuvars olmasının hem de çatal şeklindeki geometrisinin getirdiği bu özellikler, çevirici olarak silikon kantilever ve QCM'nin önüne geçmesini sağlamıştır [27].

Bu çalışma ile ilk defa kuvars ayar çatalı (QTF) fenilketonüri tanısında kullanılmak üzere modifiye edilmiştir. Bu modifikasyon aşamalarında ölçüm için uygun olmayan QTF çatallarının fonksiyonelleştirmesi, plazma sistemi ile gerçekleştirilmiştir. QTF

çatallar, literatürde de vurgulanan ve doğrudan oluşturulan amino grubu içerikli filmlerdeki kararsızlık problemini aşmak amacıyla hidrokarbon bazlı bir prekursör (hekzan) ile plazma ortamında modifiye edilmiştir. Bu işlemin ardından tanıyıcı tabaka dekorasyonundan kullanılacak anti-fenilalaninin immobilizasyonu için çevirici yüzeyinde fonksiyonel amino grupları, etilendiamin monomeri kullanılarak yine plazma polimerizasyon yöntemi ile oluşturulmuştur. Bu sayede oluşturulan çok ince filmler ile QTF'nin yüksek kalite faktörünü koruyarak, hassasiyetini kaybetmesinin önüne geçilmiştir. Bu yüzeylere, hedeflenen immunosensörü oluşturmak üzere, ıslak kimya yöntemleri kullanılarak anti-fenilalanin antikoru bağlanmıştır. Hazırlanan immunosensöre ait kalibrasyon eğrisi, farklı derişimler içeren fenilalanin çözeltileri ile etkileştirilmesi sonucu ölçülen frekans sapmalarının, fenilalanin derişimine karşı grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilmiştir. Tüm modifikasyonların sonucunda hazırlanan immunosensörün performansı, yüksek hassasiyet ve seçicilik bazında değerlendirilerek çalışma sonlandırılmıştır.

1.1. Fenilketonüri

Otozomal resesif kalıtsal bir hastalık olan fenilketonüri, L-fenilalaninin (PHE) metabolizmasında oluşan kalıtsal bir bozukluğun sonucunda meydana gelmektedir. Sağlıklı bir bireyde fenilalanin hidroksilaz, L-fenilalanini, tetrahidrobiyopterin (BH_4), oksijen ve demir varlığında tirozine dönüştürmekle görevlidir [28]. Bahsi geçen kalıtsal bozukluk, vücut sıvılarında L-fenilalaninin birikimine sebep olmaktadır. Vücut sıvılarında L-fenilalaninin yüksek derişimlere ulaşması kuvvetle muhtemel nörobilişsel problemlere sebep olduğu için güncel tedavi yöntemleri, L-fenilalaninin azaltılması üzerine kurgulanmıştır [29]. Günümüzde, yenidoğan ve çocuk sağlığına yönelik yapılan çalışmaların temel hedefi; sadece ölüm oranların azaltmak değil aynı zamanda sağlık sorunlarının yarattığı diğer problemleri de önlemek ve gidermektir. Bu nedenle, oldukça ciddi sağlık sorunlarına sebep olan fenilketonüri hastalığının tanısının konulması ve hastalığa yönelik tedavinin yapılması büyük önem arz etmektedir [30].

1.1.2. Fenilketonürinin tarihçesi

Følling hastalığı olarak da bilinen fenilketonüri ilk olarak Norveçli bir biyokimyager ve doktor olan Ivar Asbjörn Følling tarafından yapılan uzun süreli araştırmalar sonucunda 1934 yılında teşhis edilmiştir. İlk olarak, gelişimsel gecikmesi olan 4 ve 7 yaşlarındaki kardeşlerin olağandışı idrar kokusunu farkeden Følling, bu kardeşlerdeki gelişimsel gecikmenin kaynağının idrardaki bir bileşikten kaynaklanabileceğinden şüphelenmiştir [31]. Bir dizi deney sonucunda idrardaki belirtilerin, fenilalanin metabolizmasındaki bir kusurdan kaynaklandığı hipotezini öne sürmüştür. Daha sonra, 430 farklı zihinsel engelli çocuk ile yürütülen çalışma sonucunda 8 vakaya (4 kardeş) daha ulaşılmış ve bu vakalara pedigri analizi yapılması sonucunda bu hastalığın otozomal resesif kalıtım kaynaklı olabileceğini düşünmüştür [31–33]. Følling, bu hastalığı "imbecillitas phenylpyruvica" olarak adlandırmıştır. Daha sonra bu isim İngiliz genetikçi Lionel Penrose tarafından "fenilketonüri" olarak değiştirilmiştir [33].

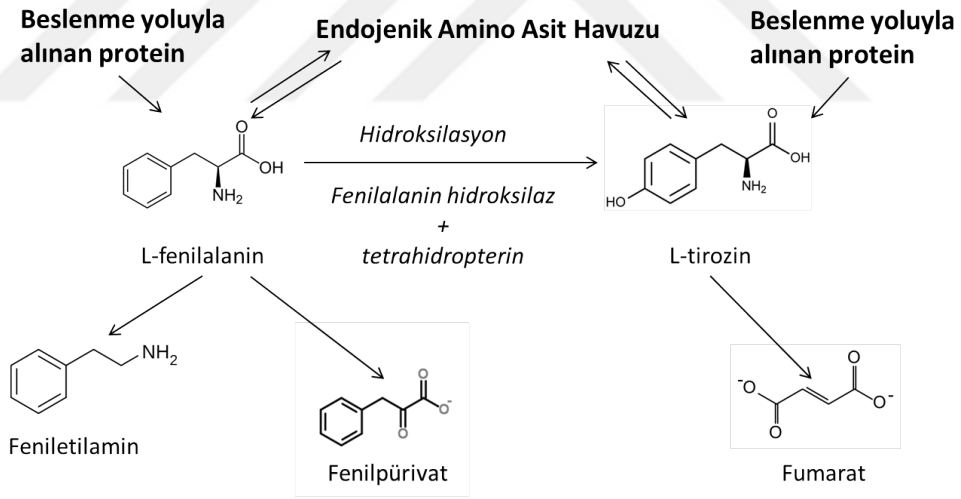
Bu hastalığın tanımlanmasından sonraki, diğer bir önemli dönüm noktası ise George Jervis'in 1945 yılında, hastalığa sebep olan biyokimyasal bozukluğu tanımlayarak literatüre kazandırması olmuştur [6,34]. 1953 yılında Bickel ve ark. gelişimsel problemi olan hastalara fenilalanin içermeyen besinlerle diyet tedavisi uygulaması sonucunda, bu hastalarda önemli derecede iyileşme görüldüğünü rapor etmişlerdir. Fakat, diyet uygulanmadığı takdirde hastalardaki gelişimin tekrar gerilediği gözlemlenmiştir [35]. 1957 yılında, günümüz tarama programlarının keşfedilmesine katkı sağlayan süreç Horner ve ark. tarafından başlatılmıştır. Çalışmada, farklı yaşlardaki üç hasta üzerinde fenilalanin içermeyen besin diyetinin etkileri incelenmiştir. 4 ve 4,5 yaşlarındaki hastaların davranış ve gelişmelerinde dikkate değer bir düzelme gözlemlenmiştir. Fakat aynı diyet 8 haftalık olan hasta kardeşlere uygulandığında kardeşler, sağlıklı bebekler gibi bir gelişim grafiği göstermiştir [36]. Bu durum fenilketonürinin erken teşhisinin ne kadar önemli olduğunu vurgulayan ilk çalışma olarak literatüre girmiştir.

1.1.3. Fenilketonürinin biyokimyasal mekanizması

D ve L olmak üzere iki farklı enantiomeri bulunan fenilalanin, protein sentezinde gerekli olan esansiyel bir amino asittir [37]. Diğer birçok metabolit gibi insan

vücudundaki L-fenilalanin miktarı, dinamik giriş ve çıkışlardaki değişimlerin denge durumunda tutulması ile sağlanır [5]. Giriş ve çıkışlarda oluşan kalıcı bir problem, denge durumundaki derişimin artmasına sebep olmasıdır (Şekil 1.1).

Vücuttaki fenilalaninin temel kaynağı; amino asit rezervlerinden endojen geri dönüşümü ve beslenme yolu ile sağlanmaktadır. Vücuttaki yıkım metabolizması ise; proteine entegrasyonu, hidroksilasyon ile tirozine dönüşümü veya farklı bir metabolite dönüşümü ile gerçekleşmektedir. Bu metabolik yolaklardan fenilketonürinin oluşumunda en kritik rolü oynayan yolak, L-fenilalaninin tirozine dönüşme reaksiyonudur (Şekil 1.2). L-fenilalaninin tirozine hidroksilasyonu için enzim olarak fenilalanin hidroksilaza (FAH), unkonjuge pterin kofaktörü olarak tetrahidropterine (BH_4) ve son olarak BH_4'ü yeniden oluşturmak için dihidropteridin redüktaz ve 4α-karbinolamin dehidrataz enzimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bileşenlerden birinin eksikliği ya da azlığı vücuttaki fenilalanin miktarında artışa dolayısıyla hastalığın oluşmasına neden olmaktadır.

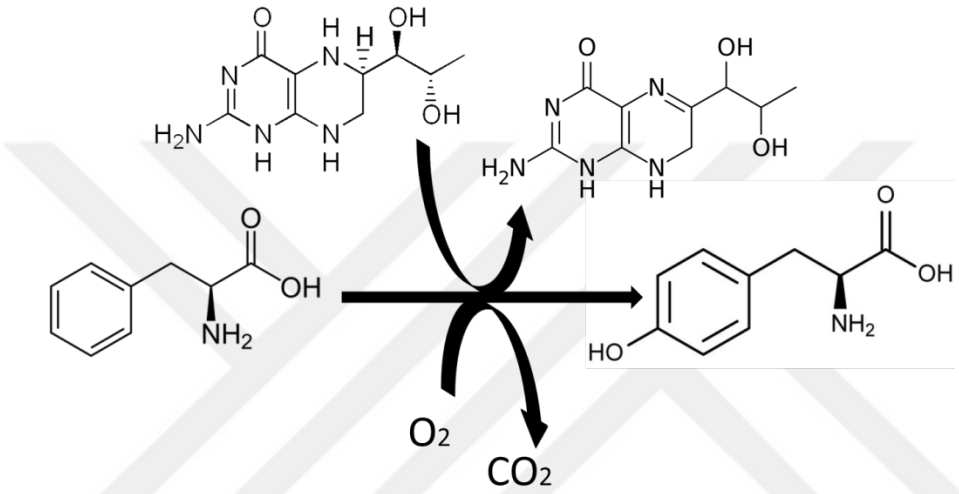


Şekil 1.1: İnsandaki L-fenilalanin metabolizması [6].

1.1.4. Fenilketonürinin patofizyolojisi

Sağlıklı bir bireyde L-fenilalanin, büyük nötr amino asit taşıyıcı olan L-aminoasit taşıyıcı 1 protein (LAT1) ile beyine taşınmaktadır (Şekil 1.3). Fenilketonüri sonucunda, vücut sıvılarında yüksek miktarda biriken L-fenilalaninin, beyinde de

artmaktadır. Bu artış, beyindeki çeşitli mekanizmalar sonucunda nöropsikolojik işlevde bozukluğa sebep olmaktadır. Görüntüleme çalışmaları fenilketonürili bireylerde miyelin oluşumundaki azalma sonucu beyin dokusunda lezyonların oluştuğunu göstermiştir. Fakat demiyelinizasyon ile nöropsikolojik bozulma arasında günümüze kadar herhangi bir bağ saptanmamıştır. Bunun yanısıra literatürde, beyin dokusundaki anomaliler ile nöropsikolojik bozulma arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir [38].



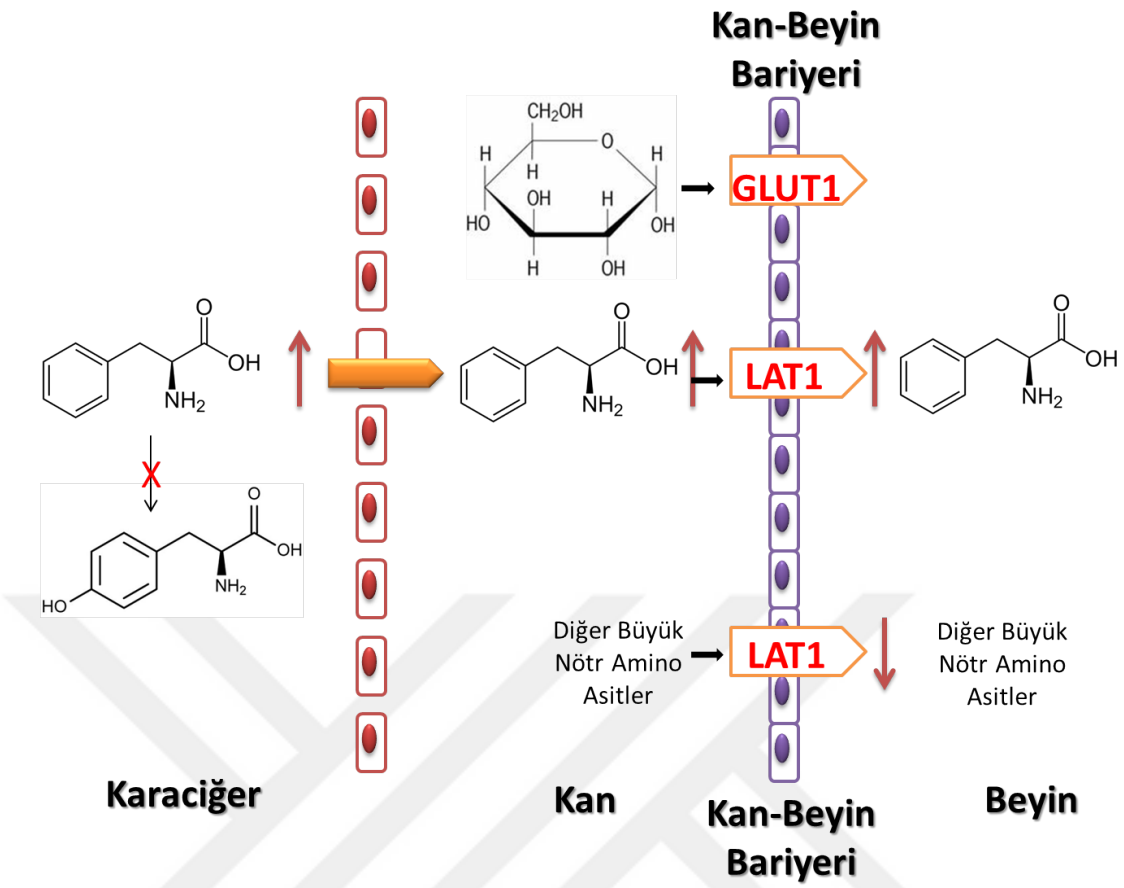
Şekil 1.2: Fenilalaninin tirozine dönüşme reaksiyonu.

LAT1, L-fenilalaninin yanısıra dopamin ve norepinefrinin prekursörü tirozini ve seratoninin prekursörü tirptofanı beyine geçirmektedir. Kanda yüksek derişimlerde L-fenilalanin bulunması durumunda LAT1 inhibe olmakta ve dolayısıyla diğer büyük nötr amino asitlerin beyine geçişi engellenmektedir.

1.1.5. Fenilketonürinin sınıflandırılması

Fenilketonüri, yukarıda detaylı olarak anlatıldığı gibi vücuttaki sıvılarda, özellikle kanda, L-fenilalanin miktarındaki artış sonucunda oluşmaktadır. Dolayısıyla, hastalığın sınıflandırılması da L-fenilalanin miktarı üzerinden yapılmıştır.

Literatürde sılıkla kullanılan fenilketonüri sınıflandırılması hiperfenilalaninemilinin miktarına dayanmaktadır. Normal bir bireyin kanındaki fenilalanin derişimi 50-110



Şekil 1.3: Fenilalaninin beyine geçiş yolu.

µmol/L aralığında seyretmektedir. Tedavi öncesi kandaki fenilalanin derişimi 120-600 µmol/L seviyesinde olan hastalara hafif (mild) hiperfenilalaninemi, 600-1200 µmol/L seviyesindekilere hafif fenilketonüri, 1200 µmol/L nin üzerinde fenilalanin derişimine sahip hastalara ise klasik fenilketonüri teşhisi konulmaktadır [39].

Günümüze kadar fenilketonüri için birçok çalışma yürütülmesine rağmen hala evrensel bir sınıflandırma sistemi tanımlanmamıştır. Bunun sebebi: yenidoğan bebeklerdeki fenilalanin miktarı kanda en yüksek seviyesine ulaşamadan bebeklerden kan alınmasıdır [35].

1.1.6. Fenilketonürinin tanısı

1950'lerin sonlarına doğru, Centerwall yenidoğanlarda fenilketonüri teşhisi için "bebek bezi testini" geliştirmiştir. Bu test Kaliforniya'da birçok fenilketonürili

bebeğin idrarının ferrik klorür ile reaksiyonu sonucu oluşan renk değişimi üzerinden teşhis edilmiştir. Fakat testin sonuç verebilmesi için belirteç bileşiğin idrara geçmesi ve bunun için bebeğin birkaç haftalık olması gerekmektedir. Bu sınırlama, bebeğin doğumu itibari ile birkaç günde ölçüm yapılabilecek bir testin geliştirilmesi konusunda araştırmacıları yönlendirmiştir [33].

Amerikalı bir mikrobiyolog olan Robert Guthrie, bebek bezi testine kıyasla, fenilketonürinin erken teşhisine olanak sağlayan bir test geliştirmiştir. Bu testte yenidoğan bebeklerden alınan topuk kanı filtre kâğıdına emdirilerek fenilalanin antogonisti bir antimetabolit olan beta-2-tienilalanin içeren bir ortama yerleştirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu şekilde, kandaki yüksek fenilalanin düzeyi, besiyerindeki fenilalanin antagonisti bir antimetabolit olan beta-2-tienilalanin baskılanmasını durdurarak *Bacillus Subtilis* bakterisinin üremesi sağlanır. Disk etrafında bakterinin ürediği alan ile belirli miktarda fenilalanin içeren kontrol diski karşılaştırılır. Yenidoğan bebekten alınan kandaki fenilalanin miktarı ile orantılı olarak disk etrafındaki bakterinin ürediği alan genişler. Böylece, bakterinin ürediği alanın büyüklüğü ile kandaki fenilalanin miktarı doğru orantılı olması sonucunda hastalığın varlığı ya da yokluğu ile ilgili yorum yapılabilmektedir [40]. Amerika Massachusetts'te 1963'te bu test sayesinde başlayan fenilketonüri tarama programı, büyük ölçekli tarama programlarının başlatılmasını beraberinde getirmiş ve bu program başka ülkelerde de hızla kullanılmaya başlamıştır.

Günümüzde ise maliyeti düşük Guthrie testinin yerini Avrupa'da florometrik analiz ve Amerika'da ise tandem kütle spektrometresi almıştır. Guthrie testinin 16-18 saat sonra sonuç vermesi, yalancı pozitif sonuç verme oranının fazla olması, sadece Guthrie testiyle hastalığın teşhisinin konulamaması (pozitif sonuç çıktığı durumda spektrometrik yöntemle doğrulamanın yapılması için gerekli olması) tarama testlerinde yeni tekniklerin kullanılmasını beraberinde getirmiştir. Florometrik analiz ve tandem kütle spektrometrisi, nicel sonuç verebilen, yalancı pozitif sonuç verme oranı düşük tekniklerdir. Özellikle tandem kütle spektrometresi birçok metabolik hastalığı aynı anda tarayabilmesi sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Fakat Guthrie testine kıyasla maliyetli bir tekniktir.

1.1.7. Yenidoğan Tarama Programı

Amerika'da yenidoğan tarama programında yenidoğanların topuk kanları ilk 24-48 saat içinde toplanmakta ve tandem kütle spektrometre tekniği ile 120-130 μmol/L fenilalanin düzeyi, fenilalanin/tirozin>2 oranı fenilketonüri için teşhis oranı olarak kullanılmaktadır. L-fenilalaninin yanı sıra fenilalanin/tirozin oranının takip edilmesinin sebebi; yanlış pozitif sonucun önüne geçmek içindir.

Türkiye'de fenilketonürinin görülme sıklığı göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde yenidoğan tarama programı, oldukça geç yürürlüğe girmiştir. Türkiye'de fenilketonüri çalışmalarının temeli zekâ geriliği olan çocuklarda yapılan bir çalışmaya dayanmaktadır. 10000 çocukta yapılan bu çalışmada, fenilketonüri %5 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Bu sonuçlar, fenilketonüri hastalığının tarama programı dâhilinde ülke genelinde yürütülmesinin gerekliliğini göstermiştir. Daha sonra, TÜBİTAK desteği ile 20 ilde yürütülen pilot çalışmada Guthrie testi ile yenidoğan bebeklerde fenilketonüri görülme sıklığının 1:4500 olduğu bulunmuştur. Bu oran, Türkiye'de yenidoğan taramasının ivedilikle başlatılmasının gerekliliğini göstermiştir. 1987 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bakanlığı ve Fenilketonürili Çocukları Tarama ve Koruma Derneği iş birliği ile 26 ilde "Yenidoğan Fenilketonüri Tarama Programı" yürütülmeye başlanmıştır. Daha sonra il sayısı arttırılarak, 1990 yılı itibari ile bütün il merkezlerinde yenidoğan bebekler bu program dahilinde taranmıştır. Günümüzde fenilketonüri testi Avrupa ülkelerindeki gibi florometrik yöntem kullanılarak, doğan her çocuğa zorunlu olarak yapılmaktadır.

Geçmişten günümüze kadar sürdürülen öncü çalışmalar sayesinde fenilketonüri ile başlayan yenidoğan tarama programları birçok hastalığın teşhisini gerçekleştiricek şekilde evrilmiştir. Buna ek olarak teknolojik gelişmelerin etkisi ile daha hassas ve seçici testler geliştirilmiştir. Bebek bezi testinden Guthrie testine doğru ilerleyen evrilmeden sonra, tandem kütle spektrometresinin kullanımı tarama programlarında yeni bir çağın başlangıcını beraberinde getirmiştir. Bu yöntem birçok bileşiği eş zamanlı olarak tarayabilmiş ve böylece birden fazla hastalığın aynı anda tanısı koyulabilmiştir.

1.1.8. Fenilketonürinin görülme sıklığı

Fenilketonürinin görülme sıklığı, toplumdan topluma farklılık göstermekte [41] ve bunun yanında bu sıklık etnik gruplar ile coğrafi bölgelere göre de değişim göstermektedir [42] (Tablo 1.1). Avrupa'ya bakıldığında fenilketonürinin en sık görüldüğü ülkeler: Türkiye, İrlanda, İsrail'de yaşayan Yemenli Yahudiler ve İskoçya'dır. Amerika kıtasına baktığımızda Kanada, Asya da ise Çin hastalığın en sık karşılaşıldığı ülkelerdir. Fenilketonüri, otozomal resesif bir hastalık olduğu için, akraba evliliklerinin yoğun olduğu ülkelerde bu hastalığın görülme sıklığının diğer ülkelere kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple, akraba evliliğinin fenilketonürinin başlıca sebeplerinden biri olduğu düşünülmektedir [12].

1.1.9. Fenilketonüri hastalığının teşhisinde biyosensörlerin yeri ve günümüze kadar yapılan çalışmalar

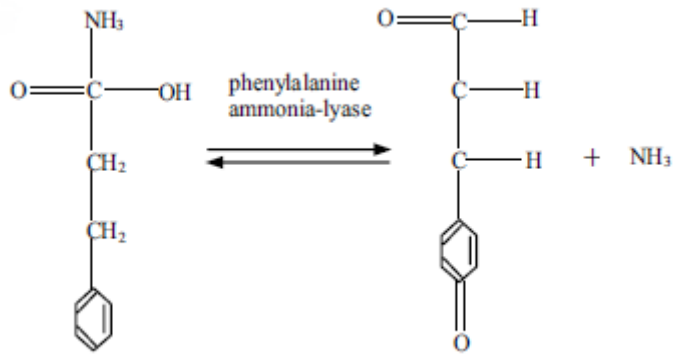
Bugüne kadar kullanılan ve yukarıda bahsi geçen tekniklerin birçok avantajı olmasına rağmen, rutin ve hızlı olarak takip edilmesi gereken fenilketonüri için söz konusu tekniklerde, zaman alıcı ve ölçüm öncesi hazırlığı zahmetli olan pahalı cihazlar kullanılmaktadır. Bu nedenle, yeni tekniklerin ve/veya cihazların ivedilikle geliştirilerek bu konudaki eksikliklerin ve zorlukların giderilmesine büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır [23]. Bu bağlamda, literatürde hassasiyeti, seçiciliği, düşük maliyeti ve hızlı cevap vermesi ile ünlü biyosensörlerin fenilketonüriye adapte edilmesi ile bahsedilen dezavantajların giderilmesi için yeni adımlar atılmıştır.

Fenilketonüri için hızlı cevap veren, hassasiyeti yüksek, maliyeti düşük bir biyosensörün geliştirilmesi, sık rastlanılan bu hastalığın tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Kliniklerde bu hastalığın tanısında kullanılan testler, pahalı, karmaşık süreçlere sahip ve zaman alıcıdır. Bu yüzden, fenilalanin miktarını belirleyebilecek yüksek performansa sahip ve hızlı cevap verebilen bir biyosensörün geliştirilmesi ivedilikle giderilmesi gereken bir ihtiyaçtır. Bugüne kadar fenilalanin miktarının belirlenmesi amacıyla sınırlı sayıda çalışma literatürde yer almıştır.

Tablo 1.1: Fenilketonürinin ülkelere göre görülme sıklığı [6,42–44].

Ülkeler	**Fenilketonürinin Görülme Sıklığı**	**Ülkeler**	**Fenilketonürinin Görülme Sıklığı**
Türkiye	***1:2600***	***Yemenli Yahudiler (İsrail)***	***1:5300***
Çin	1:17000	***İskoçya***	***1:5300***
Güney Kore	1:41000	Çekya	1:7000
Japonya	1:125000	Macaristan	1:11000
İrlanda	***1:4500***	Danimarka	1:12000
Fransa	1:13500	Finlandiya	1:200000
Norveç	1:14500	Amerika	1:10000
İngiltere	1:14300	Kanada	1:22000

Bu hastalıkla ilgili ilk biyosensör denemesini Wang ve ark., 2005 yılında yaparak fenilketonüri tanısının biyosensörler ile yapılabileceği fikrini öne sürmüşlerdir. Amonyak elektrodu üzerine fenilalanin amonyum-liyaz (PAL) enzimi immobilize edilmiş elektrotun, kandaki L-fenilalanin ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan amonyağın (Şekil.1.4) matriksteki su ile reaksiyonu (Denklem 1.1) ortamın pH'ının değişmesine neden olmuştur. Ortamdaki fenilalanin derişimi ile ölçülen potansiyel arasında doğrudan ilişki olması, biyosensörün nicel analiz yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda lineer bölge 10-5000 µM bulunmuş, cevap süresi ise 2 dakika olarak belirlenmiştir [15].

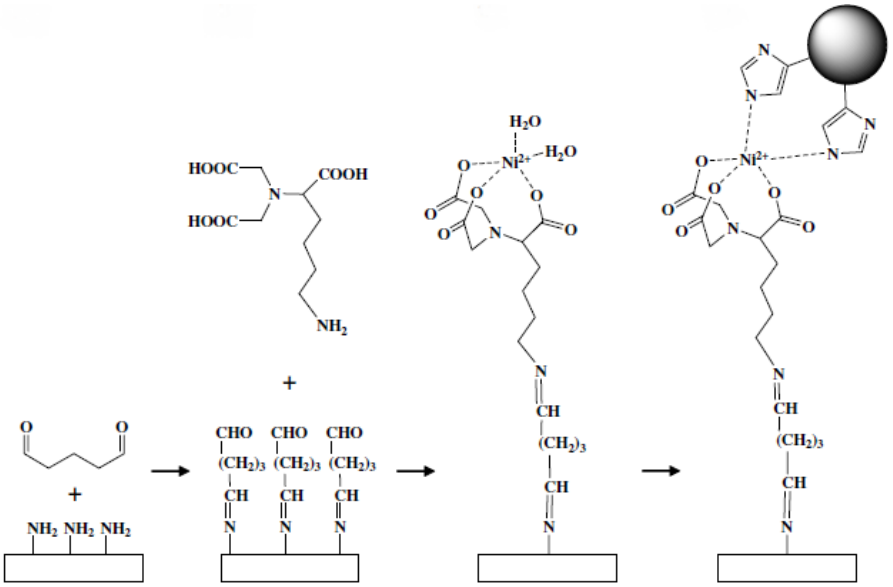


Şekil 1.4: Biyosensörün çalışma prensibi [15].

$$NH_3 + H_2O \Leftrightarrow NH_4^+ + OH^- \qquad (1.1)$$

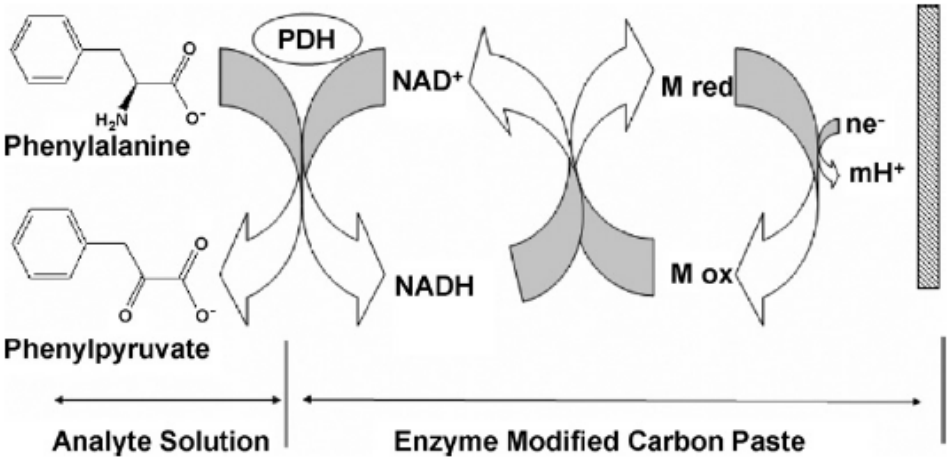
Daha sonra, Tachibana ve ark., (2006), farklı bir yaklaşım izleyerek yüzeyinde His-tag fenilalanin hidroksilaz immobilize edilmiş olan enzim çiplerini tasarlamış, tasarlanan çipledeki değişimi minyatürize edilmiş florometrik yöntem ile takip etmiştir (Şekil 1.5). Ölçümün sonucu matriksteki fenilalanin miktarını başarı ile göstermiştir. Biyosensörün lineer ölçüm bölgesi 0-12,8 mg/dL aralığında bulunmuştur [18].

Weiss ve ark., (2007) ise ölçüm için kan yerine idrarı seçerek, ilk defa fenilalaninin idrarda ölçümü için bir biyosensörün geliştirilmesi üzerine çalışmışlardır. Söz konusu biyosensörde, karbon elektrotları birkaç modifikasyon aşamasından geçilerek içerisinde nikotinamid adenine dinüklotit (NAD^+), fenilalanin hidroksilaz, ürikaz, ve



Şekil 1.5: Enzim çiplerinin modifikasyon basamakları [18].

3,4-dihidroksibenzaldehit (3,4-DHB) bulunacak şekilde modifikasyonu tamamlanmıştır (Şekil 1.6). Çalışmalar sonucunda modifiye edilen sensörün tespit limiti 0,5 mM olarak bulunmuştur [11].



Şekil 1.6: Analit çözeltisinde ve enzim ile modifiye edilmiş karbon pastada gerçekleşen reaksiyonlar [11].

Mirmohseni ve ark., (2008) ise; çevirici olarak kütle hassas biyosensörü tercih etmişlerdir. Kuvars kristal yüzeyleri, poliakrilonitril ve akrilik asitten sentezlenen kopolimer ile kaplayarak, fenilalanini yüzeye adsorplayabilecek bir arayüzey

oluşturulmuştur. Modifiye edilen çeviricinin, lineer bölgesi 50~500 $mg.L^{-1}$, tespit limiti ise 45 $mg.L^{-1}$ olarak bulunmuştur [19].

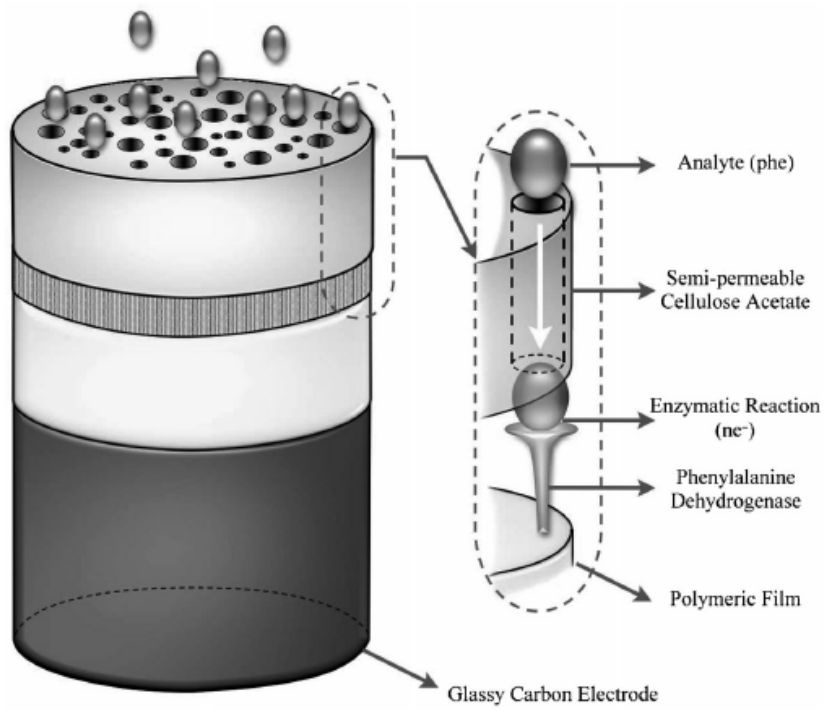
Villalonga ve ark., (2008) ise; öncelikle amin-aktif selüloz membranlar üretip aktif bölgelere fenilalanin hidroksilaz immobilize etmişlerdir. Sonrasında bu membranı camsı karbon elektrota immobilize ederek fenilalanin içeren ortamdaki elektrot cevabını test etmişlerdir. Üretilen biyosensörün lineer bölgesi 25 µM-9,1 mM aralığında olup tespit sınırı 25 µM olarak bulunmuştur [20].

Naghib ve ark., (2011), dekstran bazlı polimer üzerine fenilalanin hidroksilaz immobilize ederek fenilalanin derişimine karşı hassas, hızlı cevap veren ve düşük maliyetli bir biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrot yüzeyi, paralelinde polimer immobilizasyonuna hazır hale getirilmek için gluteraldehit ve lizozomal protein ile modifiye edilmiştir. Daha sonra polimer filmin çözünmesi ve/veya yüzeyden kalkmasını önlemek için selüloz asetat membrane ile elektrot yüzeyine sabitlenmiştir (Şekil 1.7) [21].

Bu hastalık için ilk aptamer biyosensörü, 2014 yılında Omidinia ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Bu amaçla 5-tiyol uçlu aptamer altın yüzeylere immobilize edilmiş ve fenilalanine karşı cevabı incelenmiştir. Tespit limiti 1 nM, lineer ölçüm bölgesi ise 1 ile 10 nM aralığında bulunmuştur [23].

Naghib ve ark., 2014 yılında fenilalanin için tekrar bir biyosensör çalışması yapmıştır. Bu çalışamada, grafen oksit nanolevha–kitosan film üzerine fenilalanin hidroksilaz immobilize edilerek fenilketonüri hastalığının saptaması yapılmıştır (Şekil 1.8). Üretilen biyosensörün lineer bölgesi 500 nm-15 mM aralığında, tespit sınırı ise 416 nM seviyesinde bulunmuştur [22].

Omidinia ve ark., (2015) indirgenmiş grafen nanotabaka-gümüş nanoparçacık hibritlenmesi sonucu oluşan nanokompozitin yüzeyine fenilalanin hidroksilaz immobilize edilerek fenilalanine karşı cevabı üzerine çalışmışlardır (Şekil 1.9). Lineer bölgesi 0.15–900 µM bulunan biyosensörün tespit sınırı 47 nM bulunmuştur [24].

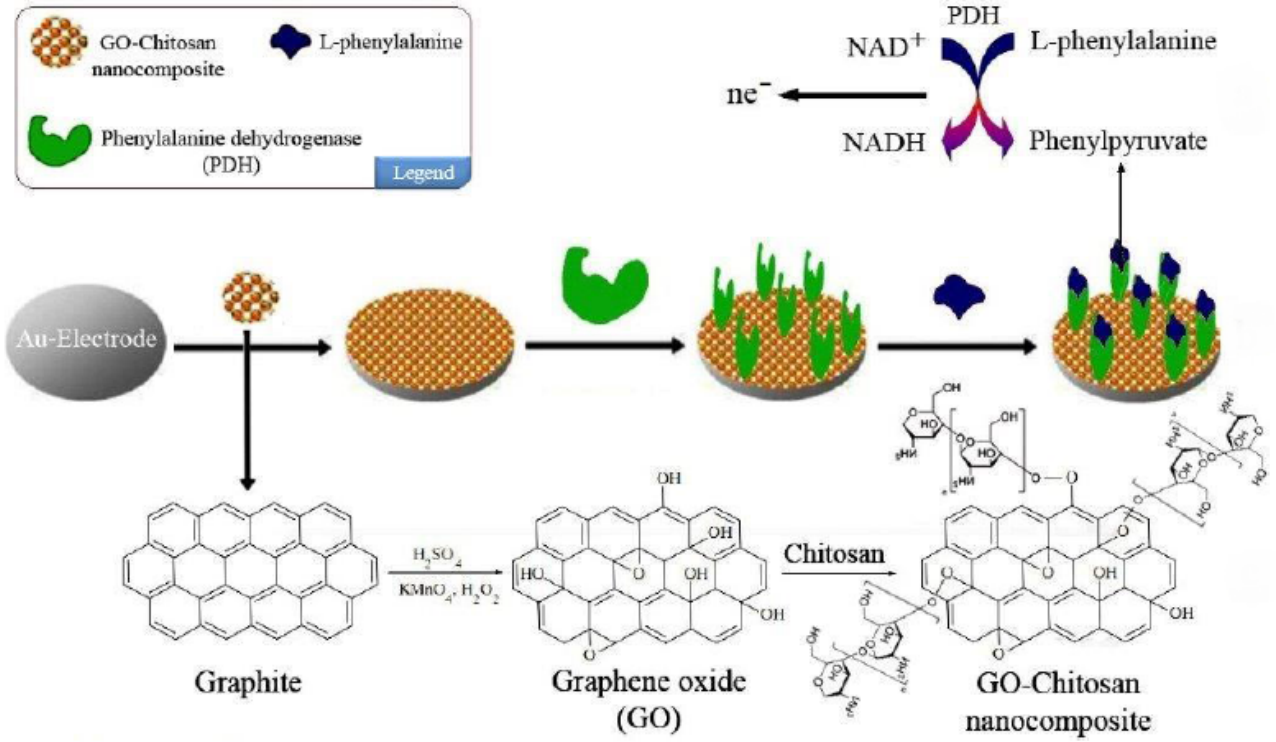


Şekil 1.7: Fenilalanin analizinde kulanılan elektrotun şematik gösterimi [20].

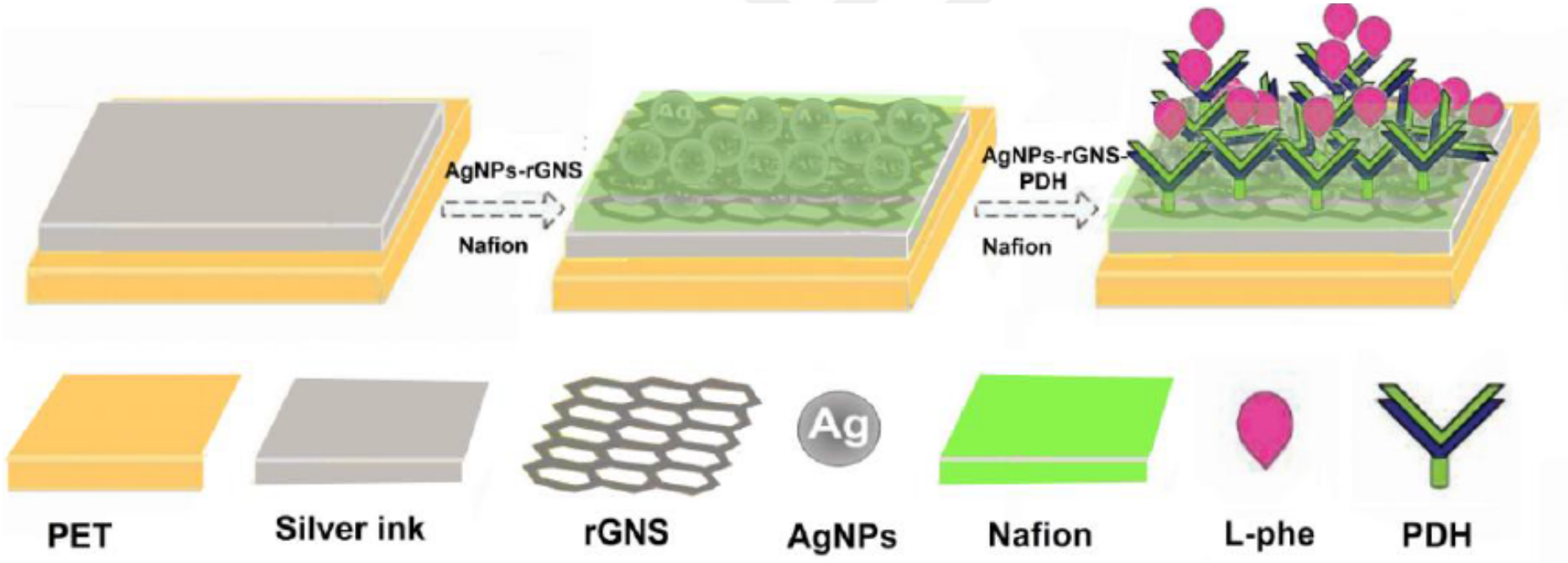
Clark'ın oksijen elektrodundan günümüze kadar uzanan süreçte özellikle son on yılda yaşanan teknolojik gelişmeler, biyosensör tasarımında kullanılan cihazların ve malzemelerin, biyosensörlerin hassasiyet, seçicilik ve sinyal çoğaltma kapasitesi gibi önemli özelliklerini geliştirecek şekilde tasarlanmalarına katkılar sağlamıştır.

1.2. Biyosensör Tanımı

Analitik cihazlar ve biyosensörler arasındaki farkın daha iyi anlaşılabilmesi için biyosensör konseptininin ve sınılarının belirlenmesi ve tanımlanması oldukça önemlidir. 1999 yılında biyosensör için IUPAC; "biyolojik tanıma ajanı kullanılarak seçici kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgi verebilen bağımsız (taşınabilir) cihazlara *biyosensör* denir." tanımını önermiştir [45]. Temelde biyosensörler biyolojik veya biyolojik bir kaynaktan üretilmiş tanıyıcı yüzey ile hedef molekülün yakalandığı ve bunun sonucunda çeviricinin aldığı biyolojik sinyali elektriksel sinyale çeviren analitik cihazlardır [46]. Biyosensörlerin temel amaçları analitik cihazlara göre büyük farklılık göstermemektedir. İki teknikte de genel amaç, hedef molekülün hızlı, güvenilir ve hatasız olarak ölçülebilmesidir.



Şekil 1.8: Grafen oksit nanolevha–kitosan film üzerine fenilalanin hidroksilaz immobilizasyon basamakları [22].

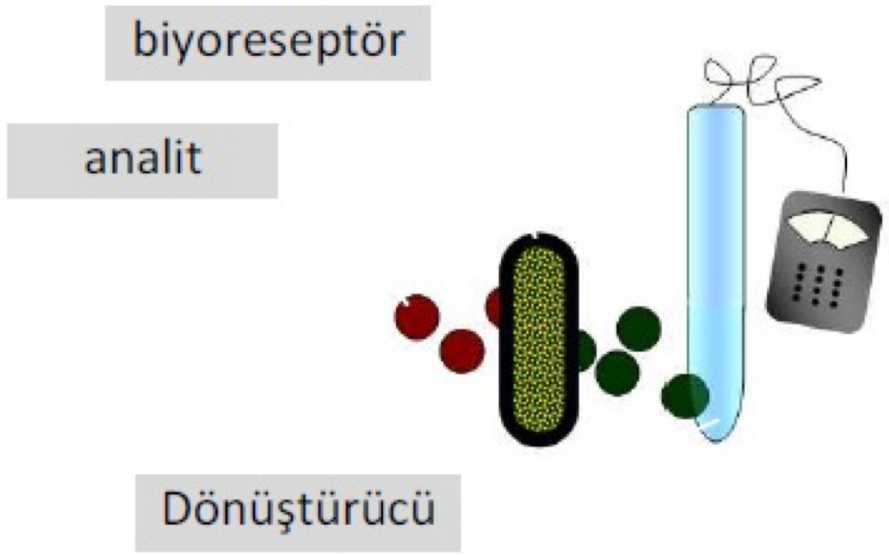


Şekil 1.9: Grafen nanotabaka-gümüş nanoparçacık hibritlenmesi sonucu oluşan nanokompozitin yüzeyine fenilalanin hidroksilaz immobilizasyon basamakları ve L-fenilalanine karşı cevabı [24] .

Biyosensörler biyolojik tanıyıcı yüzey (biyoreseptör), çevirici ve sinyal işleme sistemi olmak üzere üç temel bölümden oluşmaktadır. Biyoreseptör spesifik olarak hedef analiti yakalayabilen immobilize biyolojik bileşendir. Bu biyolojik bileşen antikor, nükleik asit, enzim ve hücre gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Çevirici ise; analit ve biyoreseptör arasında oluşan reaksiyon sonucunda gerçekleşen değişimi algılamaktadır. Bu değişim yeni bir molekülün oluşumu, sıcaklık değişimi, elektron oluşumu ve/veya pH ya da kütledeki değişim olabilir. Ölçülebilir sinyal ise dijital, yazılı çıktı veya optik değişim olarak alınabilir (Şekil 1.10).

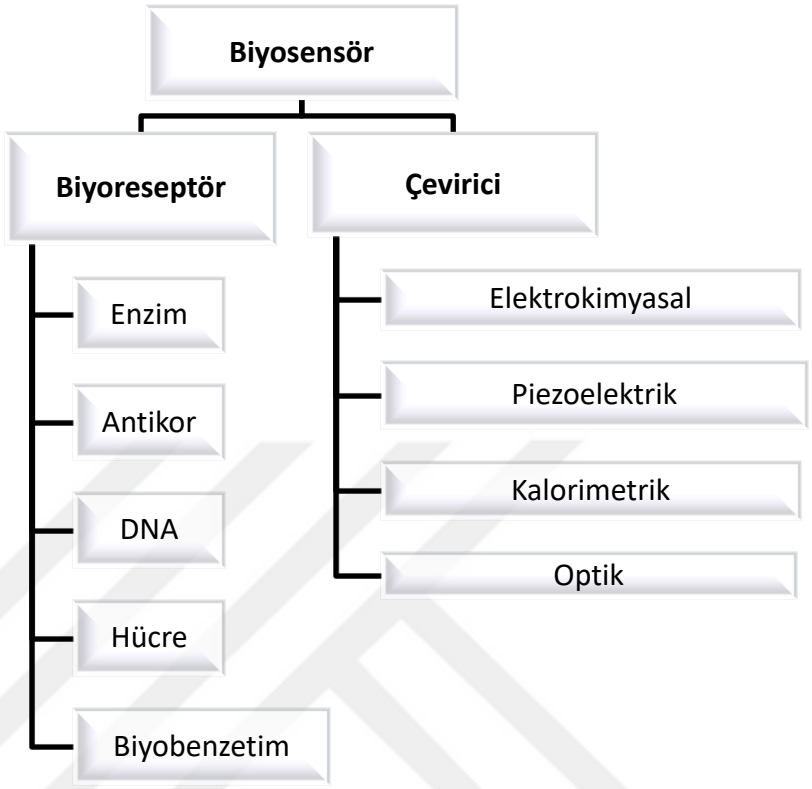
Biyosensörler biyoreseptör ve hedef analitin etkileşimi sonucu oluşan sinyale göre ya da kullanılan çevirici tipine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.11). Genellikle literatürde sınıflandırma biyolojik sinyal mekanizması yani biyoreseptör-hedef analit etkileşim tipine göre gerçekleştirilmektedir. Bu yüzden, bu çalışmada, biyolojik sınıflandırma yöntemi temel alınmıştır.

Biyoreseptörler, biyosensörleri sensörlerden ayıran başlıca bileşen olmasının yanı sıra, biyosensörlerin hedef analiti yüksek seçicilik ve hassasiyetle yakalayabilmesine olanak sağlamaklarıdır. Biyosensör sınıflandırılması biyolojik sinyal mekanizmasına göre 5 temel mekanizmadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla enzim tabanlı biyosensör, DNA sensör, hücre tabanlı biyosensör, biyobenzetim sensör ve antikor tabanlı biyosensör (immünosensör) olarak adlandırılmaktadırlar.



Şekil 1.10: Bir biyosensörün konfigürasyonu [37].

Enzim bazlı biyosensörler tarihte üretilmiş ilk biyosensör çeşididir. Clark ve Lyons 1962 yılında amperometrik enzim elektrotu üreterek glikoz sensörü tasarlamıştır.



Şekil 1.11: Biyosensör sınıflandırılması.

Enzim tabanlı biyosensörler ilk üretilen biyosensör olmasından dolayı günümüze kadar en çok gelişen biyosensör çeşididir. Enzimler sadece substratına seçici biyokatalizörlerdir. Dolayısıyla enzim substrat etkileşimine dayalı biyosensörlerin seçiciliği enzimin doğasına dayanmaktadır. Teoride enzimin katalitik davranışı substratın konsantrayonuna, sıcaklığına, pH'ına, yarışmacı başka bir molekülün varlığına ve inhibitör bulunma durumuna bağlıdır.

Nükleik asit sekanslarının tanı için kullanımı 1953'lere dayanmakta ve o dönemden beri gelişmesini sürdürmektedir. DNA tabanlı biyosensörlerinin temeli, tekli DNA zincirinin eşleniğine (tamamlayıcı sekans) karşı duyduğu afinite üzerine kuruludur. DNA bazlı biyosensör tasarımında ölçülmesi hedeflenen molekülün sekansını tamamlayan sekans, biyoreseptör olarak çevirici yüzeyine immobilize edilmektedir.

Ortamda hedef sekansın olduğu durumda hibridizasyon gerçekleşmekte ve ortamdaki değişim takip edilerek analiz yapılmaktadır.

Hücre bazlı biyosensörlerde, canlı hücreler kullanılarak hücre içi ve hücre dışı değişimleri, fizyolojik parametreleri ölçülmektedir. Bu alanda genellikle bakteri ve mantarlar kullanılarak hedef molekül veya çevredeki değişimler algılanmaktadır. Bu sensördeki en önemli dezavantaj hücrenin stabilizasyonu, diğer bir dezavantaj ise hedef hücrenin multireseptöre sahip olmasının seçiciliği azaltmasıdır. Bu biyosensörler enzim tabanlı biyosensörlere kıyasla daha uç pH ve sıcaklıklara dayanıklı, ucuz ve uzun ömürlü biyosensörlerdir.

Biyobenzetim biyosensörleri ise yapay sensörlerdir. Bu sensör tipinde kullanılan biyoreseptör doğal biyosensörü mimik eder. Bu alt grupta biyoreseptör olarak ağırlıklı olarak yapay nükleik asit ligandları olarak adlandırılan aptamerler kullanılmaktadır. Aptamerlerin ilk kullanımı 1990'ların başına uzanmaktadır. Aptamerler yapı olarak amino asit, oligosakkarit, peptit ve protein tanıyabilen nükleik asite benzemesine rağmen antikor gibi davranmaktadır. Aynı zamanda bağlanma verimi, hayvanların kullanımının önüne geçmesi, küçük ve daha az kompleks olması yönünden antikorlara nazaran daha avantajlıdır.

Antikor tabanlı biyosensörler, immüno tanı dünyasının kapılarını açan ve ilk kullanımı 1950'lere dayanan önemli bir biyosensör çeşididir. O dönemden beri hastalıkların klinik tanısında kullanılmak üzere çeşitli antikor tabanlı sensörlerin (immünosensör) tasarımı devam etmektedir. Bu çalışmada, aşağıda detayları verilecek olan avantajları sebebiyle biyosensör tiplerinden immünosensör seçilmiştir.

1.2.1. İmmünosensörler

Immünosensör; immunoaktif ajanın (antikor) çevirici rolünde olduğu ve antikor/antijen etkileşimi sonucu oluşan sinyalin ortamdaki hedef antijen miktarı ile orantılı olarak değiştiği biyosensörlerdir. Antikor, iki ağır zincir (H) ve iki hafif zincirden (L) oluşan "Y" şeklinde immünoglobinlerdir (Ig). Her zincirin sabit ve değişken bölümleri bulunmaktadır. Değişken bölge, antikorun sadece kendi antijenine

özel ve seçiciliğini sağlayan, dolayısıyla immünosensöre seçicilik özelliğini kazandıran bölgedir [47,48].

1.2.2. İmmünosensörlerde çevirici tipleri

İmmünosensörler çevirici tipine göre elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

1.2.2.1. Elektrokimyasal çeviriciler

Elektrokimyasal immünosensörler yüksek hassasiyeti, düşük maliyeti, hızlı ve kolay ölçüm yapılabilmesi, ekonomik ve minyatürize olması sebebiyle sıklıkla kullanılan immünosensörlerdir. Elektrokimyasal immünosensörler iki farklı temel ilkeyle çalışabilmektedirler. Birincisinde; antikor yüzeye immobilize edilir ve antijenine olan yüksek seçiciliği sebebiyle ortamdan hedefi yakalar. İkincisi ise; birincil antikor önceki gibi yüzeye immobilize edilir ve antikor yüzeye tutuklanır. Daha sonra etiketlenmiş ikincil antikor antijen bağlanmış yüzeye tutunur. Bu işlemlerden sonra yüzeydeki değişim, antijen-antikor etkileşiminin türüne göre amperometrik ya da farklı formlardaki voltametrik (lineer süpürme, diferansiyel puls, kare dalga, sıyırma) çeviriciler tarafından algılanır ve ortamdaki hedef analitin miktarı belirlenir. İki ölçüm tekniğinde de uygulanan potansiyel sonucunda redoks reaksiyonu gerçekleşir ve reaksiyon sonucunda antikora bağlanan antijen miktarı ile orantılı olarak akım oluşur. Yukarıda da bahsedildiği gibi voltametri ölçüm prensibinde farklı formlar bulunmaktadır. Bu formlar uygulanan voltajın dalga formuna ve dalganın fazına göre değişiklik göstermektedir. Amperometrik ölçüm prensibinde ise bu tarz bir ayrım bulunmamaktadır.

1.2.2.2. Optik çeviriciler

Optik immünosensörlerde, yukarıda bahsedildiği gibi antikorun immobilizasyonu gerçekleştikten sonra antijen ile antikorun etkileşimi, floresans veya ışığın iletimindeki değişim izelenerek yorumlanmaktadır. Bu tasarımlar da ışık etkisi ile değişim gösteren boyalar ile gerçekleştirilmektedirler. Dolayısıyla, bu tarz biyosensörlerde antikor/antijen etkileşiminden sonra en önemli etmen ışık iletimidir.

Optik immünosensörlerde ölçüm yöntemi olarak absorbsiyon, yansıma veya floresans kullanılabilmektedir. Bu ölçüm yöntemleri arasında en çok tercih edilen floresans ölçümdür.

1.2.2.3. Piezoelektrik çeviriciler

Kütle hassas çeviriciler, temelde piezoelektrik özellik gösteren, mekanik ve elektriksel değişimleri yüksek hassasiyetle algılayan sistemlerdir. Bu çeviriciler ortamdaki kütle değişimlerini kristalin rezonans frekansındaki değişim üzerinden algılayarak ölçüm alınmasına olanak sağlamaktadır. Bu çeviricilerin yüzeylerinin antikor ile modifiye edilmesi durumunda sadece antikoruna özel bir piezoelektrik immünosensör tasarlanabilmektedir ve antikorun varlığında frekans değişimi takibi ile yüksek seçicilik ve hassasiyetle kütle tayini gerçekleştirilebilmektedir. Günümüzde piezoelektrik çevirici olarak kuvars kristal mikrobalans ve mikrokantilever kullanılmaktadır.

Piezoelektrik özelliğe sahip bir kristal yüzeye fiziksel kuvvet uygulanması durumunda yüzeyler arasında elektriksel potansiyel fark oluşmaktadır. Uygulanan fiziksel kuvvet ile doğru orantılı olarak oluşan elektriksel potansiyel şiddetinin etkisine "piezoelektrik etki" denir. Bahsi geçen kristallerde vibrasyon söz konusudur. Kristal içerisindeki atomların belirli bir zamanda mevcut konumlarından deforme olan bir konuma geçmeleri ve sonrasında tekrar başlangıçtaki konuma dönmelerine vibrasyon denilmektedir. Kristalin rezonans frekansı ise bu döngünün birim zamanda tekrarlanma sayısını ifade etmektedir. Kristal yapısında bulunan negatif ve pozitif yüklü iyonlar, vibrasyon sebebiyle yük dağılımına sebep olmakta ve polarizasyon meydana gelmektedir. Bu durumdan, salınım frekansına karşılık olarak salınan elektrik alan oluşmaktadır.

Piezoelektrik uygulamalarda 10-16 mm kalınlıklı, dikdörtgen ya da disk şekillerine sahip kristaller kullanılmaktadır. Mevcut kristal, sandviç olarak tabir edilmesine sebep olan iki metal elektrot arasına yerleştirilmektedir (Şekil 1.12). Bu konumun amacı, yüzeye dik yönde elektrik alan oluşmasını sağlamaktır. Oluşan elektrik alan ise kristalde mekanik salınıma sebep olmaktadır. Elektrotlarda nikel, altın, alüminyum ya da gümüş metalleri kullanılmaktadır. İnert bir yapıya sahip olması sebebiyle altın,

kullanım açısından diğer metaller arasında bir adım daha öne çıkmaktadır. Rezonans frekans değerleri 5, 9 ya da 10 MHz olabilmektedir. Katkılanacak metal miktarı, kristale ait istenilen çalışma frekans değerinin elde edilmesi için kullanılmaktadır. Piezoelektrik etkinin oluşturulması için BT ve AT olmak üzere iki adet farklı açı kesimleri kristal yapıya uygulanmaktadır. Kararlılık noktasında ön plana çıkan AT kesme kristaller 1 ppm/^{o}C sıcaklık katsayısına sahiptir [49].

Kuvars kristal mikrobalans (QCM)

Piezoelektrik kuvars kristal mikrobalans sistemleri (QCM) immünosensörlerde sıklıkla kullanılan bir çevirici türüdür. Piezoelektrik kuvars kristallerinin çalışma mantığı; elektrotta meydana gelen kütle değişiminin, salınım frekansında değişime neden olması şeklinde özetlenebilir. Bu değişim ise Sauerbrey (1959) tarafından matematiksel olarak modellenmiştir [50].

$$\Delta f = \frac{2 f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

Δf: Frekans kayma miktarı

f_0: Kristale ait rezonans frekansı (Hz)

Δm: Kütle değişimi (g)

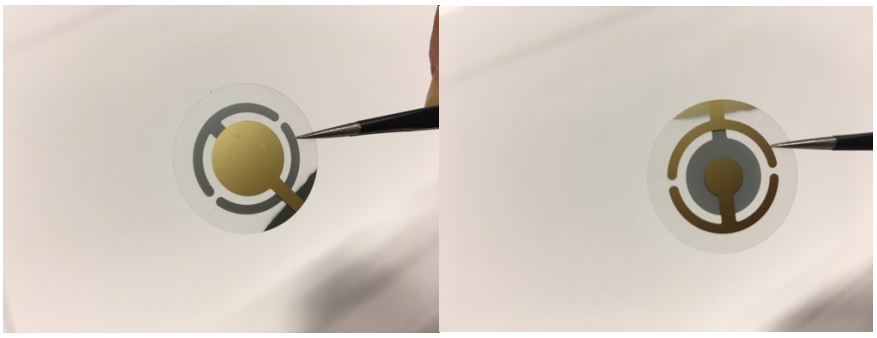
ρ_q: Kuvarsın yoğunluğu (2,648 g cm^{-3})

μ_q: Kuvarsın kayma katsayısı (2,947x10^{-11} g cm^{-2})

Bu denkleme göre AT tipi kesme kristal kullanıldığında, elektrot yüzeyi üzerinde biriken yük kristalin rezonans özelliğini engelleyecek miktarda değilse, birim alandaki kristalin kütle değişimi, kristalin rezonans frekansındaki değişim ile orantılıdır. Bu mantığa göre, rezonans frekansındaki azalma yardımıyla elektrotun aktif alanına bağlanan moleküllerin miktarı ölçülebilir [51,52]. Newton kanunun uygulanabileceği sıvı ortamlar için ise aşağıdaki denklem geçerlidir [53].

$$\Delta f = - f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}}$$

Yukarıdaki denklemde η_L (g.cm^{-1}.s^{-1}) çözeltinin viskozitesini, ρ_L (g.cm^{-1}) ise çözeltinin yoğunluğunu temsil etmektedir.



Şekil 1.12: Kuvars kristal mikroterazi (QCM).

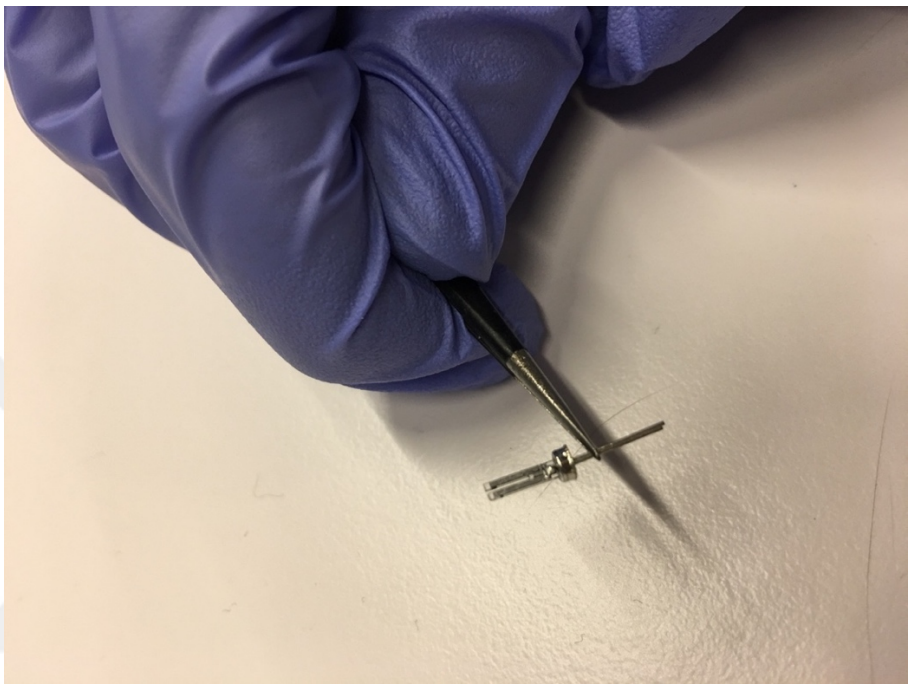
Kuvars ayar çatalı (QTF)

Kuvars ayar çatalı (QTF), sahip olduğu yüksek stabilite, yüksek kalite faktörü dolayısıyla yüksek hassasiyet ve düşük güç tüketimi gibi özellikleri sebebiyle frekans ölçümleri için yaygın olarak kullanılan bir bileşen haline gelmiştir. Bu çatallar 1960'ların sonundan itibaren saatlerde kullanılan mekanik saat sarkacının ve yayının yerine alarak daha istikrarlı saatlerin üretilmesine olanak sağlamıştır. Yüksek kararlılığa sahip bu saatlerin anahtar bileşeni olan QTF düşük maliyete toplu olarak üretilmektedir ve bu QTF kullanımını daha da cazip hale getirmektedir [54–63] .

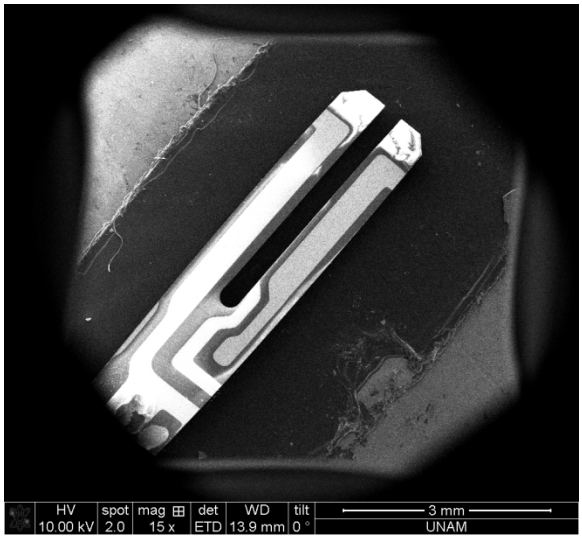
Günümüzde saat endüstrisinin yanısıra QTF'ler iki bitişik kantilever olarak kabul edilebildiği için mikrofabrikasyon silikon kantileverlara alternatif olarak atomik kuvvet mikroskobunda da kullanılmaya başlanmıştır. Fakat silikon kantileverlara kıyasla QTF hem kuvars bir malzeme olmasından hem de geometrisinin çatal şeklinde olmasından dolayı bir adım öne geçmektedir. Bunun nedeni, QTF'de mekanik devinimi iki çatal dişinin birlikte yapması, hava ortamında dahi sönümlenme oranının ve yüksek kalite faktöründeki kaybın azaltılması olarak açıklanmaktadır.

Temel olarak QTF, yüzeyi metal elektrot filmleri ile kaplanmış iki çataldan oluşmaktadır. Bu çatallar, alternatif akım uyarma gerilimi ile stimule edildiğinde yana doğru hareket ederek vakum altında 32758 Hz'lik bir frekansta titreşmektedir (Şekil

1.13-1.14) [51,64]. QTF vakum ortamından ayrılıp farklı bir atmosferde konumlandırıldığında ortamdaki akışkanın özkütle ve viskozitesine göre çatal üzerine ağırlık binmekte ve bu durum rezonans frekansında negatif yönde bir kaymaya sebep olmaktadır. Bu değişim, frekansa etki etmesinin yanı sıra, kalite faktöründe de değişime sebep olmaktadır ($Q_{vakum} \leq 100,000$ ve $Q_{hava} \leq 10,000$).



Şekil 1.13: Kuvars ayar çatalı (QTF).

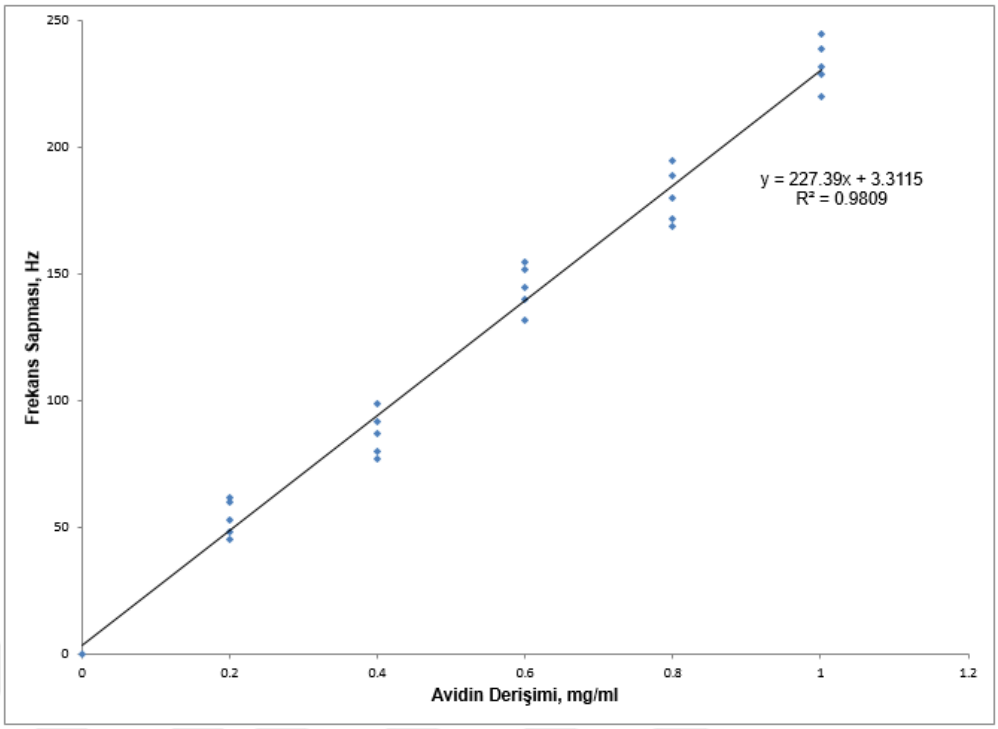


Şekil 1.14: Kuvars ayar çatalı SEM görüntüsü.

Kütle hassas sensörlerde sıklıkla kullanılan QCM ile aynı prensipte çalışan QTF; yüksek frekans kararlılığı, keskin frekans tepkisi, yüksek hassasiyeti, ölçümlerdeki tekrar edilebilirliği, kütle algılama için uygunluğu ve düşük maliyetiyle sensör tasarımı alanında da dikkatleri üzerine çekmiştir. Literatürde QTF'in sensör olarak kullanımı ile ilgili birçok çalışma bulunurken [65–68], biyosensörlerde kullanımı ile ilgili oldukça az çalışma bulunmaktadır. QTF'in biyosensör olarak kullanımı ilk ve tek Su ve ark., (2002) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, polistiren ile modifiye edilmiş yüzeylere anti-IgG tutuklanmış ve dekore edilen yüzeylerin immünoglobulin G (IgG)'ye karşı cevapları test edilmiştir. Sonuç olarak, dekore edilen QTF'in 5-100µg ml^{-1} lineer aralıkta çalışabildiği fakat tekrarebilebilirliği düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumun, polistiren kaplamasının homojen olarak yapılamamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir [69].

Literatürdeki geçmiş çalışmalarda da görüldüğü gibi QTF tabanlı immünosensör üzerine henüz hiç çalışma yapılmamıştır. Bunun en temel sebebi; QTF'in üzerinde bulunan bakır elektrotların sıvı ortamda kısa devre yapmalarından dolayı tercih edilmemesidir. Bu durum QTF'in QCM gibi yaygın kullanımına engel olmaktadır.

Son yıllarda laboratuvarımızda QTF tabanlı sensör tasarım için QTF çatallarının modifikasyonu üzerine çalışmalar yürütülmeye başlanmıştır. Yüzey modifikasyon tekniği olarak plazma polimerizasyonu kullanılarak QTF çatallarının modifikasyonu ve modifikasyonların QTF üzerideki etkileri üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Plazma polimerizasyonun tercih edilme sebebi, nanometreler mertebesinde homojen kaplama yapabilmesi sayesinde kalite faktörünü düşürmeden QTF'in çevirici olarak kulllanılabilmesini sağlamaktır. Grubumuzun çalışmalardan birinde, düşük frekans/düşük basınç (DF/DB) plazma sistemi kullanılarak QTF yüzeyleri hekzan ile elektriksel olarak yalıtkanlaştırılmış, ardından modifiye edilen yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonelleştirilme sonrasında yüzey biyotin ile dekore edilmiş ve avidine karşı cevabı çalışılmıştır. Üretilen QTF'in kalibrasyon eğrisi Şekil 1.15'da verilmiştir [70].

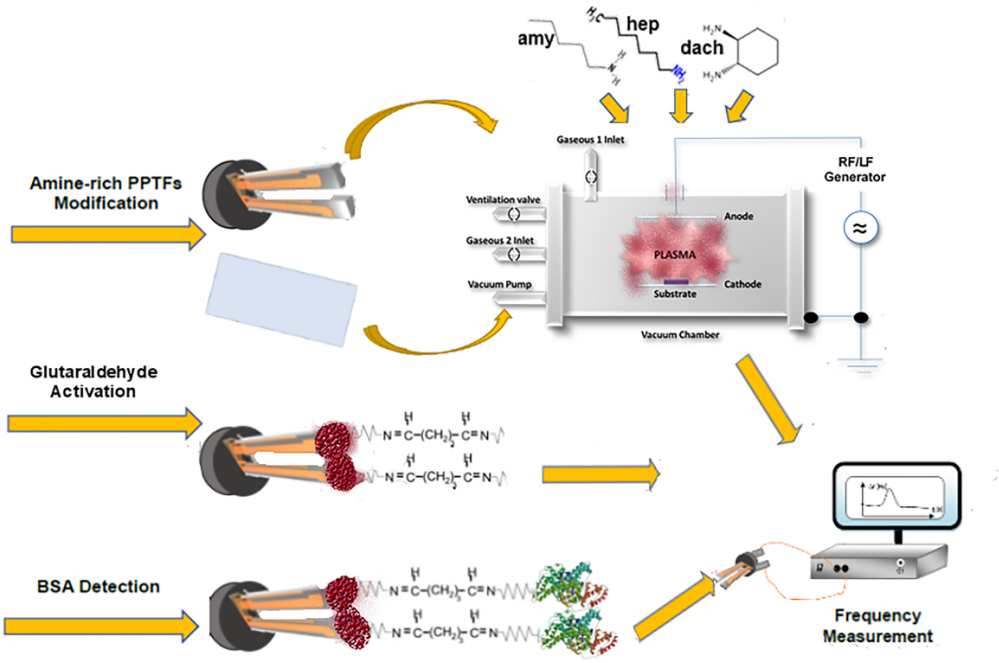


Şekil 1.15: Modifiye edilen QTF elektrotunun avidine karşı frekans sapması grafiği [70].

Başka bir çalışmamızda QTF yüzeyleri, üç farklı monomer (amilamin, heptilamin ve diaminosiklohekzan) ve iki farklı (düşük frekans/düşük basınç ve radyo frekans/düşük basınç) plazma sistemiyle modifiye edilmiş ve serum sığır albumin (SSA) ortamındaki cevabına göre fonksiyonel ince filmin hangi monomer ve plazma sistemiyle üretilebildiğine karar verilmiştir [71] (Şekil 1.16).

1.2.3. Biyosensörlerin performans parametreleri

Biyosensörler birçok farklı senaryo ve çevirici/tanıyıcı yüzey kombinasyonu ile üretilebilmektedir. Üretilen biyosensörlerin arasından ümit vadeden sonuçlar verebilen biyosensör çeşitlerinin seçilmesi için belli performans parametrelerinin tanımlanması ve test edilmesi, bu seçimlerin sistematik olarak yapılabilmesi için önemlidir. Bu performans parametre çalışmaları sayesinde, üretilen sensör diğer benzer sensörler ile kıyaslanabilir ve sensörün kullanım alanı belirlenebilir. Buerk'e göre başarılı bir ölçüm sisteminin hassasiyet, seçicilik, cevap süresi, doğrusallık, ölçüm sınırı ve raf ömrü gibi özelliklerin tanımlanması gerekmektedir.



Şekil 1.16: QTF çatallarının üç farklı monomer ve iki farklı plazma sistemiyle modifikasyonu ve model protein, SSA karşı tepkisi [71].

- Hassasiyet; kimyasal ürünün derişimindeki değişime bağlı olarak, biyosensöre ait çıkış sinyalinin, son andaki durağan değişimi şeklinde tanımlanabilir. Hassasiyeti etkileyen parametreler; ölçüm ortamı, sensör büyüklüğü ve kimyasala ait kütle aktarım ve benzeri şeklinde sıralanabilir.

- Seçicilik; biyosensörün diğer kimyasal türlerden etkilenmemesi yani spesifik ajanın derişimine duyarlı olmasıdır.

- Dinamik cevap; sensörün ölçtüğü hedef analitin derişimindeki değişikliğe verdiği cevabın hızı olarak tanımlanır. Temelde ise, kimyasalın, örnekten iletkenin aktif yüzeyine doğru basit difüzyonudur.

- Doğrusallık; ölçüm ortamında bulunan çözünmüş haldeki analitin maksimum derişimi ile minimum derişimi arasında ortaya çıkan sinyalin, sabit bir duyarlılıkla ölçülebilir olmasıdır.

- Ölçüm sınırı; sensörle ölçülebilen en düşük analit derişimi şeklinde tanımlanabilir.

Yukarıda bahsi geçen parametreler dışında biyosensörler, biyosensör ömrüne, analit derişiminin büyüklüğüne ya da toplamda gerçekleştirilen ölçüm sayısına bağlı olarak da tanımlanabilmektedir. Bu bağlamda, biyosensörün saklanma koşullarını ve yapısında bulunan biyolojik maddenin aktivitesininin korunma şartlarını göz önünde bulundurmak önemli olan bir diğer parametredir.

1.3. Plazma ile Yüzey Modifikasyonu

Plazma, uyarılmış atom, molekül, iyon ve radikallerden oluşmakta ve maddenin dördüncü hali olarak bilinmektedir [72,73]. Plazma hali, radyo frekansı (RF), mikrodalga veya sıcak filament boşalımı sonucu oluşan elektronlar yardımıyla gazın enerjik seviyeye çıkarılması ile oluşur. Bu hal, birçok plazma-yüzey reaksiyonunun gerçekleştiği alışılmışın dışında reaktif kimyasal bir ortamdır. Plazma içerisindeki yoğun miktarda bulunan iyonlar ve uyarılmış türler, inert bir malzeme olan seramiğin bile yüzey özelliklerini değiştirebilmektedir. Bunun yanı sıra, plazma teknikleri kompleks şekle sahip birçok malzemeyi de başarılı olarak modifiye edebilmektedir [74].

Plazma teknikleri, malzemenin yüzey enerjisini değiştirebilme, yapışma mukavemetini ve biyouyumluluğu artırabilme gibi birçok değişimi malzemenin geometrisinden bağımsız olarak gerçekleştirebilmektedir. Ek olarak, plazma modifikasyonu sonucunda, malzemenin geometrisinden ve yapısından (metal, polimer, seramik ve/veya kompozit) bağımsız olarak, ucuz ince filmler üretilebilmektedir. Bu tekniğin en önemli avantajı ise, malzeme yüzeyinin yığın yapısına dokunulmadan, kimyasal, elektriksel, optiksel, mekaniksel ve biyolojik yapısını yani yüzey karakteristiğini, yüksek verimle ve adeta terzi elinden çıkmış gibi başarılı bir şekilde değiştirilebilmesidir. Bu teknik, yüzey değişikliğinin yanı sıra yüzey sterilizasyonu ve temizliğinde, maskeleme yapıldığı durumda, yüzeyin belirli bir desen (pattern) ile modifikasyonu sonucu mikroelektronik endüstrisinde de kullanılabilmektedir.

Tablo 1.2: Plazma tekniğinin kullanıldığı alanlar ve kullanım amacı [75].

Kullanıldığı Alanlar	Kullanım Amacı
Kan ile uyumlu yüzey	Vasküler greftler, kataterler, stentler, kalp kapakçıkları, membranlar (hemodializ), filtre (kan-hücre ayrımı), biyomoleküllerin yüzeye immobilizasyonu
Yapışmayan yüzey	Kontakt lensler, yara örtü materyali, kataterler, biyosensörler
Doku mühendisliği ve hücre kültürü	Hücre büyümesi, vasküler greft
Cerrahi malzemelerin ve cihazların sterilizasyonu	Ameliyat sırasında kullanılan kesme aletleri ve cımbız
Biyosensör	Biyomolekülün yüzeye immobilizasyonu
Bariyer kaplaması	İlaç salınımı, gaz değişim membranları, cihaz koruması, korosyon koruması,

Sonuç olarak, plazma tekniği ile yüzey modifikasyonu biyomedikal dahil olmak üzere birçok alanda popüler hale gelen ekonomik ve etkili bir prosestir. Tablo 1.2'de plazma tekniğinin biyomedikal alanda kullanıldığı yerler ve kullanım amaçları detaylı olarak verilmiştir.

1.3.1. Plazma kaynakları ve plazma ile yüzey modifikasyon teknikleri

Plazma modifikasyonu malzeme yüzeyinin karakteristik özelliklerini değiştirmemize olanak sağlamaktadır. Farklı plazma kaynakları ve plazma teknikleri kullanarak çeşitli modifikasyonlar yapılabilmektedir.

1.3.1.1. Plazma kaynakları

Plazmanın oluşturulabilmesi için gaz halindeki atom veya molekülden elektron koparılmalı ya da iyonizasyon gerçekleştirilmelidir. *İyonizasyon*, atom veya molekülün dışarıdan uyarılması ya da başka bir atom ile çarpıştırılması sonucu

elektron kaybetmesi olarak adlandırılmaktadır. Gaz, metal ve lazer gibi çeşitli plazma kaynakları bulunmaktadır. Genel olarak bakıldığında gazdan plazma oluşumu, ortamdaki gazın uygulanan potansiyel etkisiyle ateşlenmesi yoluyla gerçekleşmektedir. Parçalanma potansiyeli doğrudan basınç ve boşalma aralığına bağlıdır.

Doğru akım (DC), radyo frekans (RF) ışıltılı boşalım ve elektron hızlandırıcı rezonans (ECR) gibi plazma kaynaklarında plazma oluşumunun düşük basınçta gerçekleştiği görülmektedir. Bunun sebebi, düşük basınçta parçalanma potansiyelinin atmosferik basınca kıyasla az olması ve akımın kontrol edilebilir olmasıdır. Düşük basınç plazma kaynaklarında elektron yoğunluğunun kontrol edilebilmesinden dolayı geniş alanda homojen plazma oluşturabilmekte ve bu nedenle düşük basınçlı plazma kaynakları sıklıkla tercih edilmektedir [75,76].

1.3.1.2. Plazma ile yüzey modifikasyon teknikleri

Yukarıda bahsi geçen şekilde plazma oluşturulduktan sonra yüzeyde plazma aşındırma, temizleme, implimantasyon ve biriktirme ile çeşitli değişiklikler yapılabilmektedir. Bahsi geçen uygulamaların detayları aşağıda verilmektedir.

Plazma aşındırma ve temizle

Plazma aşındırma ve temizleme işlemleri, kimyasal reaksiyon sonucu oluşan uçucu ürünlerin yüzeyden uzaklaştırılması ya da fiziksel püskürtme sonucu gerçekleştirilir. Neon ve argon gibi inert gazların kullanıldığı durumlarda ise, oluşturulan plazma, malzemenin yüzeyine etki ederek temizleme işlemini gerçekleştirmektedir. Kullanılan gazlar içerisinde argon gazı ucuz ve yüksek aşındırma verimine sahip olması sebebiyle plazma temizleme işleminde en çok tercih edilen inert gazdır [77].

Plazma aşındırma işlemi diğer tekniklere kıyasla kullanımı kolay ve bu sebeple sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik özet olarak, plazma kaynağı yardımı ile iyonlaştırılmış plazmanın elektrik alan yardımı ile yüzeye çarptırılmasına dayanmaktadır. Elektrik alan, substrata negatif voltaj uygulanarak sağlanmaktadır [78]. Argon gazının iyonlaştırılarak plazma haline geçmesi, RF veya ECR yardımı ile

gerçekleştirilmektedir. Daha sonra, iyonlar yukarıda bahsi geçtiği gibi elektrik alan yardımı ile substrata doğru hızlandırılmaktadır. Hızlandırılan argon iyonları enerjisi çok yüksek olmadığından dolayı substratın alt katmanlarına ilerleyemezler ve böylelikle enerjilerinin büyük bir kısmını elastik ve elastik olmayan çarpışma ile yüzey atomlarına aktarırlar. Çarpışma sonucu yüzey atomlarının birkaçı yeterli enerjiyi kazanır ve yüzeyden ayrılarak vakumla uzaklaştırılır. Bu işlemlerin tümü yüzeyden ilk katmanın kazınmasına sebep olur ve bir alt katmanı açığa çıkarır. Uygulama süresi arttıkça kazıma işlemi daha alt katmanlara doğru ilerler ve yeni açığa çıkan yüzey atomlarına etki ederek devam eder. Bu kazıma işleme sırasında aynı zamanda yüzey temizliği de gerçekleşmektedir [76,77].

Yukarıda bahsi geçen işlem sırasında gerçekleşen reaksiyonlara derinlemesine bakıldığında modifikasyon ve degredasyona (parçalanmaya) sebep olan olası iki farklı yarışmacı reaksiyonun olduğu görülmüştür. Eğer modifikasyon etkisi daha fazla ise, polimerin yüzey kimyası, iyon demeti etkileşimi, plazma-aşılı kopolimerizasyonu ve plazma polimerizasyonu ile değişmektedir. Degredasyonun etkin olduğu senaryolarda ise, polimer yüzeyinde yukarıda detaylı olarak bahsedildiği gibi kazıma işlemi gerçekleşmektedir.

Plazma implantasyon

Plazma implantasyonunda, malzeme yüzeyindeki değişimler termodinamik kısıtlamalardan bağımsız olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknikte, modifiye edilecek malzeme yoğun plazma ile çevrelenmektedir. Plazma halini oluşturan iyonlar kılıf boyunca hızlandırılarak hedefe yani malzemeye doğru gönderilmektedir. Bu teknikte iyon taşıma optikleri, kütle seçici olmamasından dolayı, yoğun iyon akışı ile sağlanmaktadır. Ek olarak, geleneksel ışın demeti ile iyon implantasyonundan farklı olarak görüş hattı bulunmamaktadır.

Bu teknikte homojenite, plazma yoğunluğunun, kısa pals genişliklerinin ve uygulanan voltajın ayarlanması ile sağlanmaktadır. Eğer kullanılan malzeme küçük ve kompleks bir geometriye sahip ise yüksek plazma yoğunluğu, kısa pals genişliği ve yüksek frekans kullanılmalıdır. Böylelikle, plazma kılıfının şekli ile hedef malzeme uyumu sağlanır ve modifikasyon başarı ile gerçekleştirilir [79].

Plazma sprey

Atmosferik basınç plazma sprey tekniği, plazma şaloması ile toz halindeki malzemenin eritilerek plazma bölgesine püskürtülmesi ve hedefteki malzeme yüzeyinin ince tabaka şeklinde kaplanması üzerine kuruludur. Erime işlemi plazmanın yüksek sıcaklığı ve akış hızı ile gerçekleşmektedir. Plazma özünün yüksek sıcaklığa sahip olmasından dolayı bu teknik herhangi bir metalin ve metal gibi yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyan malzemelerin (seramik, sermet ve ısıya dayanıklı malzeme) kolaylıkla kaplama malzemesi olarak kullanımının önünü açmaktadır.

Plazma sprey, plazma kaynağı olarak metalleri dahi kullanmamıza olanak sağlamasıyla birçok tekniğin önüne geçse de alttaş malzeme ile kaplama arasındaki zayıf adhezyon bu tekniğin dezavantajıdır. Kaplama ve malzeme arasında kuvvetli bir etkileşimin olması istenirse bu teknik tercih edilmemelidir [76,80].

Plazma birikim

Plazma birikim yöntemi, elde edilen kaplamanın yığından tamamıyla farklı özellikler gösterebilmesi sebebiyle birçok alanda tercih edilmektedir. İkili plazma birikimi, plazma-aşılı kopolimerizasyon ve plazma polimerizasyonu bu yöntemin gerçekleştirilmesi için kullanılan tekniklerdir.

İkili plazma birikimi, gaz plazmaların eş zamanlı olarak sırasıyla RF ve vakum ark kaynakları kullanılarak üretilmesi ile gerçekleştirilir. İkili plazma birikimi, farklı kombinasyonlarda birkaç farklı elementten oluşan ince filmlerin oluşumuna olanak sağlamasından dolayı ince fim teknolojileri arasında sıklıkla tercih edilmektedir.

Polimerik malzemeler plazmaya maruz kaldığında, polimer zincirlerinde radikaller oluşmaktadır. Bu radikaller sıvı veya gaz fazdaki monomer ile karşılaştığında polimerizasyon reaksiyonunu başlatabilmektedir. Böylelikle, yüzeyde aşılı kopolimerizasyon gerçekleşmektedir. Plazma-aşılı kopolimerizasyonunda ise, öncelikle polimer plazmaya maruz kalarak plazmadaki elektronların elastik olmayan çarpışmaları sonucu yüzeydeki polimer zincirlerinde radikal oluşumu

gerçekleşmektedir. Daha sonra, polimer yüzeyleri monomer buharına maruz bırakılarak yüzeyde plazma-aşılı kopolimerizasyon gerçekleştirilmektedir.

Bu teknik genellikle yüzey hidrofilikliğinin değiştirilmesi amacıyla kullanılır. Bu amaçla, polimer yüzeyinde radikallerin oluşumu için öncelikle argon, helyum veya nitrogen plazmasına kısa süreliğine maruz bırakılır. Daha sonra, yüzey yüksek sıcaklıkta monomer buharında belli bir süre bekletilir ve yukarıda da belirtildiği gibi kaplama gerçekleştirilir.

Plazma polimerizasyon yönteminde ise, monomerden polimer sentezi plazmada bulunan enerjik elektron, iyon ve radikaller yardımı ile yapılmaktadır. Plazma polimerizasyonu, iyon ve radikalllerin yardımı ile gerçekleşmesinden dolayı geleneksel polimerizasyon yöntemlerine kıyasla farklıdır. Genel olarak, plazma polimerizasyonu sonucunda oluşan monomer ile polimerik ince filmin kimyasal kompozisyonu, geleneksel radikal veya iyonik polimerizasyon reaksiyonu sonucunda oluşan monomer ile elde edilen polimerden farklılık göstermektedir. Bu farklılık polimer oluşum mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Plazma ile plazma polimerizasyonu; monomerden radikal oluşumunun plazma aktivasyonu ile sağlanması, oluşan radikallerin rekombinasyonu ve rekombine moleküllerin yeniden etkileştirilmesi aşamalarını içermektedir. Elde edilen polimer geleneksel polimerizasyon reaksiyonları sonucu sentezlenen polimerden farklı olarak, tekrar eden monomer birimleri, çapraz bağlı, parçalı ve yeniden düzenli komplike birimler içermektedir.

Bu çalışmada QTF çatallarının yüzey modifikasyonu, plazma polimerizasyon ile RF plazma kaynağı kullanılarak düşük basınç plazma sisteminde gerçekleştirilmiştir [80–82].

1.3.2. Plazma polimerizasyonunu etkileyen parametreler

Plazma doğası gereği kaotik bir ortam olmasının yanı sıra boşalım gücü, uygulama süresi, basınç, prekursör kimyasal yapısı, modifiye edilecek olan malzemenin reaktör içerisindeki konumu, reaktör dizaynı, sıcaklık ve kullanılan jeneratörün frekans aralığı gibi birçok değişkenden etkilenmektedir. Kullanılan cihazın dizaynına göre bu

değişkenlerden bazıları oluşturulan ince filme etki etmemektedir. Örneğin bu çalışmadaki gibi tek bir düşük RF plazma sistemi üzerinden yürütülen bir çalışmada; reaktör dizaynı, kullanılan jeneratörün frekans aralığı ve sıcaklık parametreleri sabitlenmiştir. Fakat boşalım gücü, uygulama süresi, prekursörün kimyasal yapısı ve basınç (akış hızı) kaplama optimizasyonu yapılırken dikkatlice çalışılması gereken önemli parametrelerdir.

Boşalım gücü, sıvı veya gaz halindeki prekursörden plazma haline geçmek için uygulanan güçtür. Plazma hali, prekursördeki en zayıfın bağın kırılmasına yetecek boşalım gücü verildiğinde oluşmaktadır. Bu eşik geçildikten sonra boşalım gücü artırıldıkça bağ enerji sıralamasına göre düşükten yükseğe göre bağ kırılımı gerçekleşmektedir. Her farklı bağ kırılımı farklı radikallerin oluşumuna sebep olacağından elde edilen ince filmlerin kimyasal yapısı birbirinden farklı olmaktadır. Bu sebeple, boşalım gücü çalışırken dikkat edilmesi gereken en önemli parametredir.

Uygulama süresi ise kaplamanın kimyasal yapısına etki etmeyen fakat kaplama kalınlığı ile doğrudan bağlantısı olan bir parametredir. Uygulama süresi arttıkça ince filmin kalınlığı artmaktadır. Bu sebeple amaca yönelik uygulama süresi optimizasyonu yapılmalıdır.

Plazma işlemi sırasında kullanılan akış hızı doğrudan reaktör içerisindeki basıncı etkilemektedir. Reaktör içi basınç ise reaktörde bulunan prekursör miktarı ile bağıntılıdır. Basıncın yüksek olduğu durumlarda uygulanacak boşalım gücünün düşük olduğu hale göre daha yüksek olması gerekmektedir. Aksi takdire birim prekursördeki hedeflenen bağı kırmak için gerekli güç uygulanamayacak dolayısıla istenilen kimyasal yapıda ince film veya modifikasyon elde edilemeyecektir.

En son ve en önemli parametre ise kullanılan prekursörün kimyasal yapısıdır. Amaca uygun prekursörün seçimi ve modifikasyonu sonucunda beklenen fonksiyonel grupların oluşumu prekursörün kimyasal yapısına bağlıdır. Doğru prekursör seçilmediği takdirde boşalım gücünü, uygulama süresini veya basıncı değiştirmek, istenilen sonuça ulaştırmamaktadır. Ayrıca seçilen prekursörün yapısı (düz zincirli veya halkalı yapıda olması), prekursördeki bağların kırılma önceliğini yani ince filmin yapısını değiştirdiği için bu parametreye özellikle dikkat edilmelidir [83].

1.3.3. Plazma filmlerinin kararlılığı

Katı haldeki bir malzemenin çevresindeki ortamla olan etkileşimleri, malzeme yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri ile tanımlanır. Bu nedenle, uzun yıllardan beri malzeme bilimindeki sürekli araştırma ve geliştirmelerin, günümüzde hala giderek daha fazla dikkat çeken yüzey ve kaplama teknolojilerinin hızlı büyümesine katkıda bulunması şaşırtıcı değildir. Yüzey teknolojileri, bir malzemenin hacim özelliklerini değiştirmeden yüzeyin modifikasyonuna (örn., kimyasal fonksiyonelleştirme, aşındırma, kaplama, vb.) değinmektedir. Örneğin, özel yapım kaplamalar, malzemelerin mekanik (aşınma, sürtünme), kimyasal (korozyon, geçirgenlik, sıcaklık yalıtımı, biyouyumluluk, ıslanabilirlik), elektriksel (iletkenlik) ve optik (iletim, yansıma, absorpsiyon, renk) özelliklerinin ayarlanmasına izin verir.

Yüzey kaplama yoluyla alttaş üzerinde büyütülen ince filmler; oksidasyon, hidrofobik geri kazanım, oligomerik parçaların hidrolizi ve çözünmesi nedeniyle havada veya sıvı ortamlarda yaşlanma eğilimindedir. Bu tür yaşlanma mekanizmaları, ince filmlerle yapılan uygulamaların tekrarlanabilirliklerini düşürmekte dolayısıyla özellikle biyoteknolojik alanda kullanımınlarını oldukça kısıtlamaktadır. Bu durumun engellenmesi için öncelikle üretilen filmin hava/sıvı ortamında gerçekleştirdiği kimyasal değişimlerin kontrol edilmesi gerekmektedir. Plazma polimerizasyon yöntemi, geleneksel polimer kaplamalara kıyasla alttaş üzerinde kararlılığı daha yüksek ince filmlerin oluşturulmasına olanak sağlaması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Film stabilitesini arttırmak amacıyla işlem parametreleri ve reaktör türünü değiştirmenin yanı sıra, çapraz-bağlama (cross-linking) ajanları kullanma, organik monomerlerle katkılama, alttaş ve film arasında arayüzey oluşturma gibi yöntemler sıklıkla uygulanmaktadır. Alttaş yüzeyinde büyütülen ince film kararlılıkları hava/su ortamlarında kontak açısı gonyometre ölçüm cihazıyla test edilerek incelenmektedir.

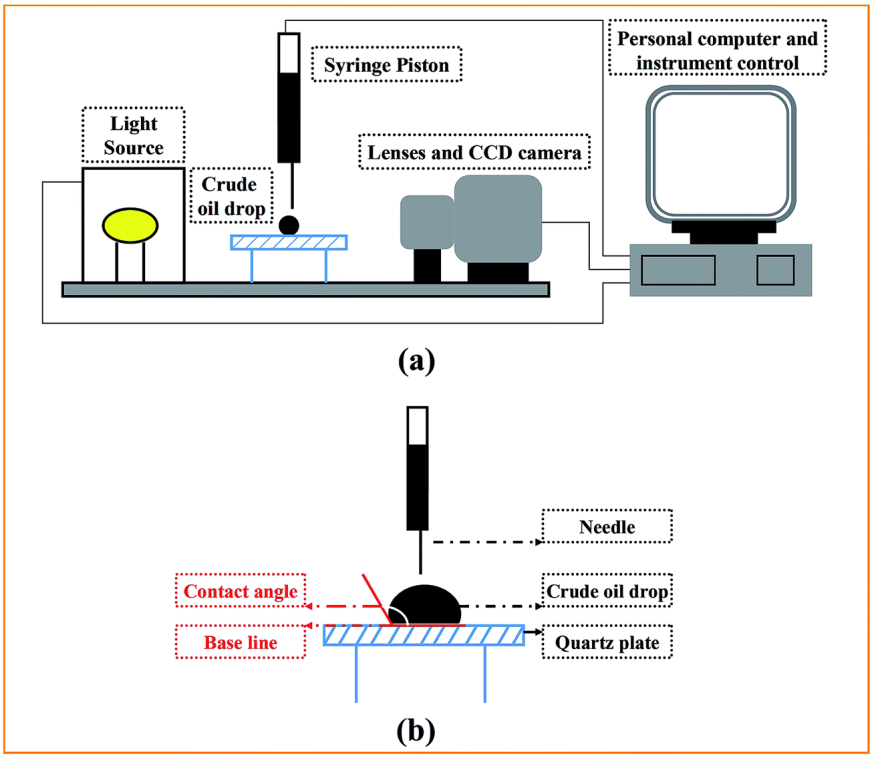
1.4. Yüzey Analiz Teknikleri

Plazma tekniği, malzemenin yığın yapısını değiştirmeden sadece yüzeyde kimyasal ve fiziksel değişiklik yapılmasına olanak sağlayan popüler bir tekniktir. Bu sebeple, malzemede yapılan değişikliklerin yüzey analiz teknikleri ile takip edilmesi daha

anlamlıdır. Bu çalışmada, QTF'lerin her modifikasyon sonrasında fiziksel karakterizasyonu- kontak açısı gonyometre, kimyasal karakterizasyonu ise ATR-FTIR kullanılarak ölçülmüştür. Yüzeyde yapılan değişimlerin QTF'e olan etkisinin test edilmesi için ise frekans ölçümleri yapılmıştır. Bütün karakterizasyonların sonucunda optimize edilen parametreler ise XPS ve AFM ile analiz edilerek yüzeydeki değişimlerin analizi derinleştirilmiştir.

1.4.1. Temas açısı ölçüm cihazı

Temas açısı ölçüm cihazı (kontak açısı gonyometre), malzemenin üst yüzeyindeki (0,5-1 nm) kimyasal yapı ile ilgili fikir verebilen, ucuz ve kullanımı kolay bir yüzey karakterizasyon tekniğidir. Bu cihazının çalışma prensibi, yüzeye damlatılan sıvı ile sıvıyı çevreleyen ortam arasındaki yoğunluk farkı sonucunda oluşan damlanın şekli ve bu damlanın katı yüzey ile arasındaki açısı üzerinden yüzey hidrofilisitesi ile ilgili bilgi edinilmesi üzerine kuruludur. Yüzeyde hidrofilik grupların fazla olması durumunda, yüzey açısı 90°' nin altına düşmekte, hidrofobiklik arttığında ise üstüne çıkmaktadır (Şekil 1.17).



Şekil 1.17: Temas açısı ölçüm düzeneği şematik gösterim [84].

1.4.2. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR)

Düşük enerjili infrared bölgesindeki ışınların kullanıldığı absorbsiyon spektroskopisine *Infrared Absorbsiyon Spektroskopi* denir. Gerekli şartlara sahip moleküller IR ışınını absorblayarak molekül içi titreşimler yaratmaktadır ve bu da enerji düzeyleri arasında geçişlere sebep olmaktadır.

Farklı dalga boylarına sahip beyaz ışığın monokromotörler yardımıyla ayrıştırılarak ölçümün yapıldığı bu sistemlerde, herhangi bir anda seçilen dalga boyuna ait spektroskopik bilgi toplanmaktadır. Ancak bazı yöntemlerde monokromotör bulunmamaktadır. Bu şekilde ölçüm gerçekleştiren sistemlerde spektrum frekans ölçeğinde değil zaman ölçeğinde elde edilmektedir. Bilgisayar aracılığıyla ters Fourier dönüşümü alınan veriler, frekans ölçekli bilgilere dönüştürülmektedir. Bu uygulamaya ise Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FTIR) denilmektedir [85,86].

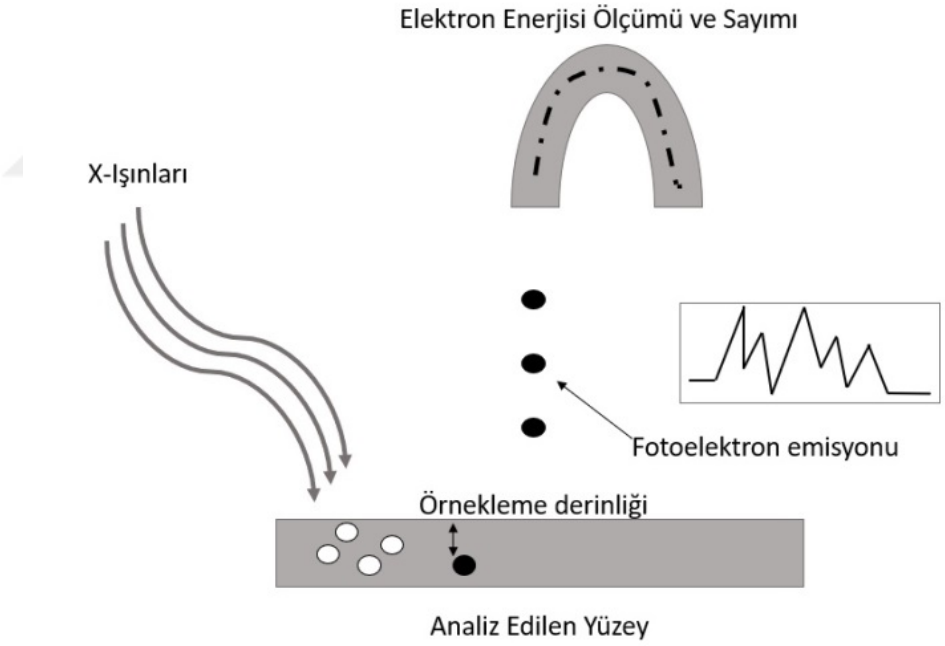
Şekil 1.18: Fourier transform infrared spektroskopi cihazı.

1.4.3. X-Işınları Fotoelektron Spektroskopi (XPS)

Elektron spektroskopisinin temeli; atom ya da moleküllerin X-ışını ile bombardımanı sırasında, molekülden ya da atomdan kopan elektronun kinetik enerjisinin ölçülmesine

dayanmaktadır (Şekil 1.19). Bombardıman sonrasında oluşan iyon, koparılan elektronların, atomun iç kabuklarının herhangi birinden çıkması sebebiyle *uyarılmış iyon* olarak adlandırılmaktadır. X-ışınlarına dayalı bu yöntem *x-ışını fotoelektron spektroskopi* (XPS) olarak adlandırılmaktadır. Atomdan fırlatılan fotoelektronlara ait kinetik enerji dağılımı, örneğe gönderilen x-ışının enerjisine ve elektronun örneğe bağlanma enerjisine bağlı olarak değişmektedir.

Bu ölçüm yöntemi genellikle katı yüzeylerin analizinde kullanılmaktadır. Örnek maddenin elektronlar ile bombardımanı sonucu elde edilen pozitif yüklü iyonlar, malzemenin yüzeyinde pozitif yük birikimine sebep olmaktadır. Bu durum ise fırlatılan elektronların kinetik enerjilerini azaltabilmekte ya da elektronların fırlatılmasını engelleyebilmektedir. XPS yönteminde, kimyasal kayma değerleri ve bağlanma enerji değerleri ölçülmektedir.



Şekil 1.19: X-ışınları fotoelektron spektroskopi şematik gösterim.

1.4.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Taramalı elektron mikroskopu (SEM), yüzey özelliklerinin daha iyi anlaşılması amacıyla topografik ve morfolojik bilgi veren yüzey analiz yöntemidir. Bu teknik

görüntüyü ışık dalgaları kullanmak yerine elektron kullanarak büyütmektedir. Bu yöntemin sağladığı en büyük avantaj; ışık mikroskopuna kıyasla oldukça büyük ölçeklerde ayrıntılı görüntü sağlamasıdır. Görüntünün siyah beyaz olmasının sebebi ise kaynak olarak ışık dalgasının değil elektronların kullanılmasıdır. SEM'de morfolojik analiz yapılacak örneğin iletken olması görüntülemenin gerçekleştirilmesi için oldukça önem taşımaktadır. Analizi yapılacak yüzey yalıtkan ise, ölçüm öncesi çeşitli yöntemlerle yüzey kaplanarak iletkenleştirilmesi sağlanır.

1.4.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM)

Atomik kuvvet mikroskobu, yüzeyin düzgünlük, pürüzlülük gibi topografik özelliklerini yüksek çözünürlük ve doğruluk ile görmemizi ve ölçmemizi sağlayan bir tekniktir. Malzemenin, diğer mikroskoplar gibi büyütülmesinden ziyade, yüzeyinin taranmasına ve yükseklik profilinin ölçülmesine olanak sağlar. Bu şekilde bir numunedeki tek tek atomların düzenini ve/veya moleküllerin yapısını yani kristalografik dizilimini gösteren üç boyutlu görüntülerin elde edilmesini sağlar. Ayrıca, örneğe ait yüzey topografisinin yanı sıra; ince filmlerin kalınlığı, faz farkları, elektrik iletkenlik ve manyetik alan yönündeki farklılıklar da AKM ile saptanabilmektedir.

Bu yöntemde temel olarak, atomik boyutta sivriltilmiş iğne ucu kullanılarak yüzey farklı modlarda taranır ve taranan yüzeyin topografisi, yükseklik profili vb. özellikleri görüntülenerek analiz edilir. Kullanılan iğne ucuyla yüzey etkileşimine bağlı olarak farklı modlarda görüntü oluşturulabilir. Bu modlar, iğnenin yüzeye temas ettirilerek uygulandığı temas yöntemi (contact mode), iğnenin yüzeye temas etmediği temassız yöntem (non-contact mode) ve iğnenin yüzeye vurularak uygulandığı vurma yöntemi (tapping mode) olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle, topografisi belirlenecek malzemenin özellikleri ve yapılacak analizin türü mod seçimini belirlemektedir [85,87].

1.5. QTF Sensör Denetleyici

QTF sensör denetleyici, piezoelektrik tabanlı QTF malzemeye uyguladığı potansiyel etkisiyle ayar çatalının salınımını rezonans frekansında uyarma prensibiyle

çalışmaktadır. Kristal üzerine etki eden herhangi bir dış kuvvet veya çevresel bir değişiklik, QTF salınım frekansını değiştirir. Frekans kayması ölçülerek analit hakkında kantitatif bilgiler elde edilmektedir.

QTF denetleyiciler, taramalı sonda mikroskobisi (SPM), Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM), viskozite / vakum ölçümleri, biyokimyasal algılama, vb. uygulamaları için oldukça kullanışlıdır [88].

2. MATERYAL VE METOT

Fenilalanin tayinine yönelik kütle hassas bir immünosensör geliştirilmesi amacıyla planlanan bu çalışmada izlenen yol aşağıda sıralanmıştır:

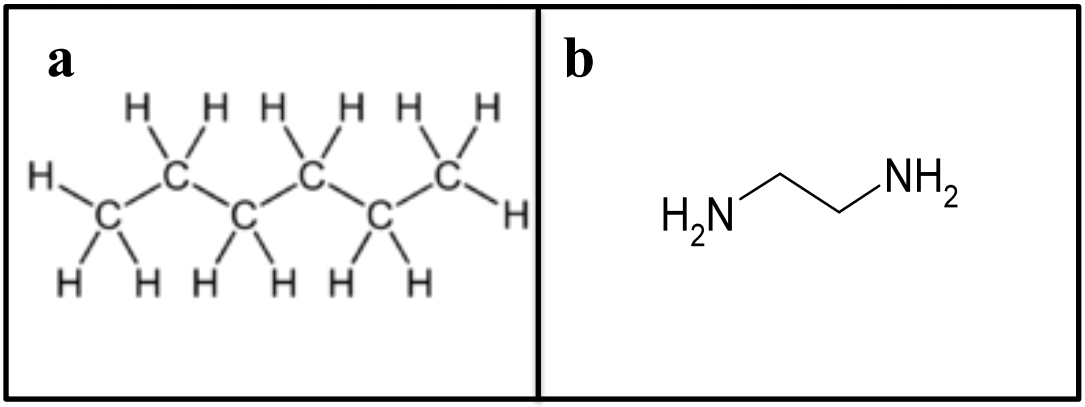
- Kütle hassas bir biyosensör oluşturmak için çevirici olarak kuvars ayar çatalı (QTF) seçilmiştir. Çatal yüzeyinin fenilalanini tanıyacak biyoajanı immobilize edecek şekilde modifiye edilmesi, bu araştırmanın ilk basamağını oluşturmaktadır. Çatal yüzeylerinin modifikasyonu, düşük basınç plazma yöntemi ile amin bakımından zengin etilendiamin (EDA) monomeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- Çatal yüzeyinde fenilalanini tanıyacak biyoajanı immobilize etme hedefi doğrultusunda amin gruplarının oluştuğu tespit edilmiş, buna karşın etilendiamin ince filmlerde stabilite problemi gözlenmiştir.
- Etilendiamin ince filminin kararlılık problemini çözmek için metalik malzeme yani çatal yüzeylerine ön-kaplama olacak şekilde, plazma ortamında n-hekzan (HEX) monomeri kullanılarak ince bir film tabakası oluşturulmuştur.
- Farklı boşalım gücü ve boşalım süresi temelindeki plazma koşullarında, düz zincirli n-hekzan filmi ile ardından amino grubu içeren EDA filmi hazırlanmış, elde edilen filmlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları yapılarak iki monomer için plazma koşulları optimizasyonu yapılmıştır. Yüzey modifikasyonu tamamlanan QTF'ler farklı derişimlerdeki glutaraldehit ile farklı süre ve tekniklerle (buharda bekletme, daldır-kurut yöntemleri) kimyasal aktivasyona tabi tutularak biyolojik ajan bağlayacak fonksiyonellik kazandırılmış, diğer bir deyişle aktivasyonları gerçekleştirilmiştir.
- Yüzeyleri aldehitlenerek aktifleştirilen QTF uçlara, fenilalanin için spesifik tanıyıcı ajan olan anti-fenilalanin'in bağlanması gerçekleştirilmiş, bu işlemde farklı derişimlerde anti-fenilalanin kullanılarak, immobilize edilen ajanın aktivitesinin en yüksek kalacağı derişim değeri saptanmıştır.

- Fenilalanin derişimini tespite yönelik kullanım için yukarıda verilen basamaklarda hazırlanan kütle hassas immunosensör, son basamakta farklı derişimlerdeki fenilalanin çözeltileri ile etkileştirilerek, sisitemdeki frekans sapmaları tespit edilmiş ve bu sapma değerleri, derişime karşı grafiğe geçirilerek immunosensöre ait kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir.

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal malzemeler

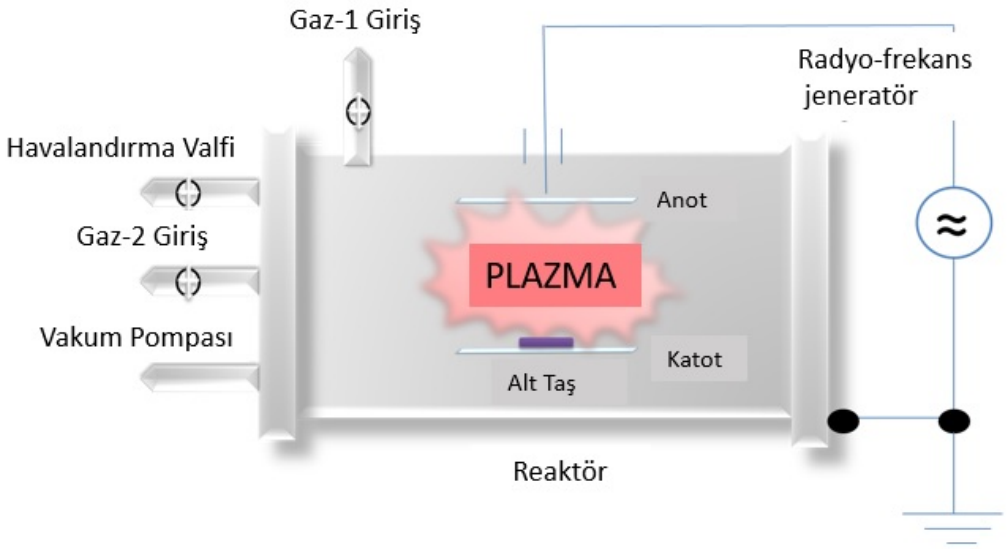
Çalışma boyunca plazma polimerizasyonu ile yüzey modifikasyon aşamalarında kullanılan n-(hekzan) Merck (Almanya) (Şekil 2.1a) firmasından temin edilmiştir. Gluteraldehit (M_w= 100,12 g mol^{-1}) AppliChem (Almanya), etilendiamin (M_w= 57,09$gmol^{-1}$) (Şekil 2.1b) ve fosfat tampon çözeltisi Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır. Sığır serum albumin (SSA) Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA) firmasından satın alınmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar analitik standartlardadır.



Şekil 2.1: (a) n-Hekzan moleküler formülü, (b) Etilendiamin moleküler formülü.

Çalışma boyunca alttaş olarak kuvars ayar çatalının (QTF) yanı sıra karakterizasyon için QTF'in geometrisinin uygun olmamasından dolayı cam yüzeyler (lam) kullanılmıştır. Shoulder Crystal (Çin)'den temin edilen QTF'ler, vakum altında 32768 Hz rezonans frekansta titreşmektedir. Karakterizasyonda kullanılan lamlar ise Interlab'dan (Türkiye) satın alınmıştır.

Plazma polimerizasyon ile QTF çatallarının yüzey modifikasyonu radyo frekans düşük basınç (13.56 MHz) (150 mm çaplı, 320 mm uzunluğa sahip) plazma sistemi kullanılarak (Pico, Almanya) gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2).



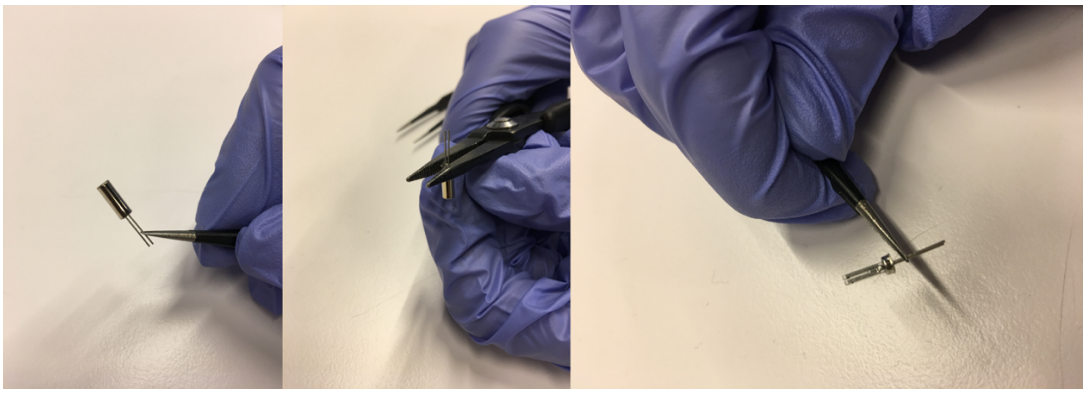
Şekil 2.2: Düşük basınç RF plazma sisteminin şematik gösterimi.

2.2. Metot

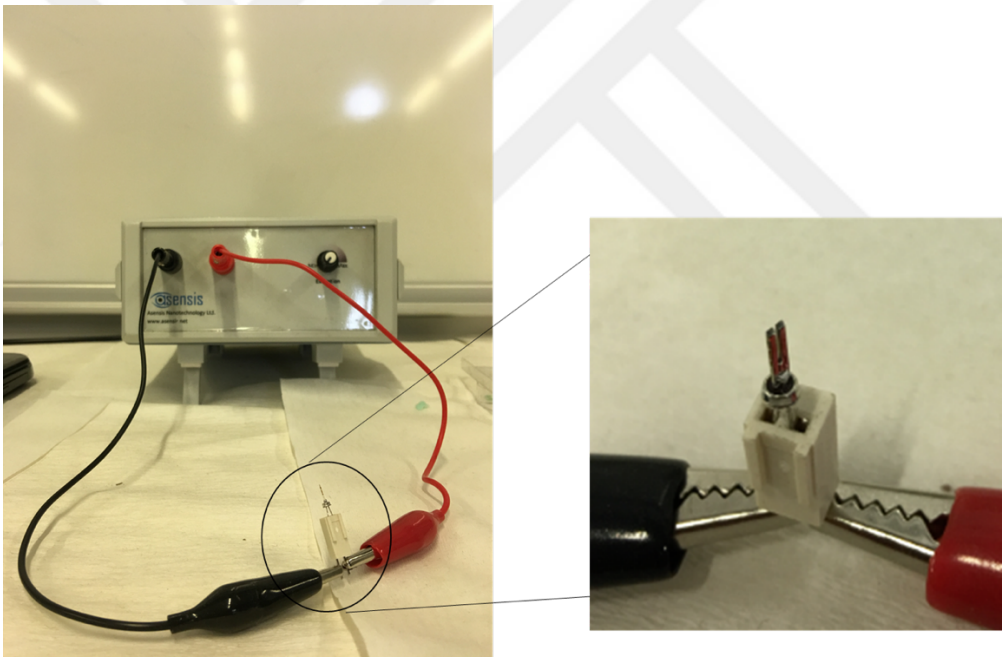
2.2.1. Kuvars ayar çatalının hazırlanması ve frekans ölçüm sisteminin çalışma performansının incelenmesi

Firmadan temin edilen QTF'ler metal bir silindir içinde vakumlu olarak alınmaktadır. Çeviricinin fonksiyonelleştirilme, aktivasyon ve ölçüm aşamalarının tamamı QTF'lerin çatal bölümü kullanılarak gerçekleştirildiği için öncelikle metal silindir, bir kargaburnu yardımıyla QTF'e zarar vermeden çıkarılmıştır (Şekil 2.3). Korumasız konuma gelen ve hava ile temas eden çatalların, bu işlem sırasında zarar görüp görmediği frekans ölçümü yapılarak test edilmiştir. Frekans ölçümü alınan ve havada rezonans frekansı (32 759,1± 0,6 Hz) limitler içerisinde kalan QTF'ler daha sonra üç kere etanol ve üç kere su ile yıkanıp modifikasyon için uygun hale getirilmiştir. Yıkama sonrası tekrar frekans ölçümü alınarak QTF'in modifikasyon öncesi rezonans frekansı kaydedilmiştir. Bahsi geçen frekans ölçümleri Asensis firmasının Asensis Q Master cihazı (Ostim, Ankara, Türkiye) ile yapılmıştır. Rezonans frekansı için QTF,

cihaza 0,2 inç aralıklı 2'li pin lehimlenmiş sokete takılarak bağlanmıştır (Şekil 2.4). Ölçümler 25 ± 1°C ve %17 nem içeren ortamda yürütülmüştür.



Şekil 2.3: QTF çatallarının yüzey modifikasyonuna hazırlanması.



Şekil 2.4: Frekans ölçümlerinde kullanılan Asensis Q Master Cihazı ve QTF'lerin takıldığı soket.

2.2.2. Plazma polimerizasyon yöntemi ile ince filmlerin hazırlanması

Bu çalışmada, fenilalanin seviyesini kütle hassas olarak belirleyecek immünosensörün tanıyıcı tabakasında kullanılacak anti-fenilalanin antikorunun QTF çatalların yüzeyine

immobilize edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, öncelikle n-hekzan kullanılarak plazma polimerizasyon yöntemi ile çatalların metal yüzeyi ile amino grubu içeren üst tabaka arasında, üst ince filmin kararlılığını arttırıcı bir ara yüzey oluşturulmuştur. Ardından PlzP(n-hekzan) ince filmin üzerine etilendiamin monomeri kullanılarak plazma ortamında amino grubu içeren üst katman PlzP(EDA) filmi hazırlanmıştır.

Bu bölüm, plazma işlemi için yapılan hazırlıklar, PlzP(n-hekzan) filmin oluşturulması ve karakterizasyonu, ardından PlzP(EDA) filmin hazırlanışı ve karakterizasyonu, son aşamada yüzeye anti-fenilalanin antibadi bağlanma yöntemi ve bu süreçte fenilalanin için oluşturulan immünosensörün kalibrasyon doğrusunun hazırlanması ve performans parametrelerinin belirlenmesi basamaklarında yapılan çalışmaların detaylarını içermektedir.

QTF çeviricilerin plazma ile yüzey modifikasyonu işlemine başlamadan önce olası kirliliğin önüne geçmek için plazma reaktöründe temizlenme işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, oksijen plazması oksidasyon ajanı olarak 100 Watt boşalım gücü ve 30 dakika sürede reaktörün iç çepherleri temizlenmiştir. Bu işlem 3-4 defa tekrarlanarak temizleme işlemi tamamlanmıştır. Bahsi geçen temizleme işlemi, yüzey modifikasyonunda kullanılan monomerler değiştirildiğinde de tekrar edilmiştir.

2.2.2.1. QTF çeviricilerinin yüzeyinde PlzP(n-hekzan) ince filmlerin oluşturulması

Hidrokarbon orijinli ince filmlerin yüksek çapraz bağlanma, termal ve kimyasal stabiliteleri, ince film teknolojilerinde ulaşılmak istenen yüksek performanslı ince filmlerin örneklerindendir. Bu çalışmada hidrokarbon bir çözücü olan n-hekzan, bahsi geçen özellikleri sebebiyle amince zengin ince filmlerin stabilitesini artırmak amacıyla ön kaplama aşamasında kullanılmıştır.

Temizleme işlemi sonrası ön-kaplama için, yüzeydeki kimyasal değişiklikleri ve oluşan fonksiyonel grupları takip edebilmek amacı ile "model yüzey" olarak seçilen cam lamlar ve/veya QTFler reaktöre yerleştirilmiş ve vakum pompası çalıştırılarak rektör içerisindeki hava boşaltılmış dolayısı ile basınç düşürülmüştür. Ardından, reaktör içerisine 15 dakika boyunca n-hekzan monomer beslemesi yapılarak reaktör

içi hava kaynaklı kirliliğin önüne geçmek için yıkanmıştır. Daha sonra basınç, plazma işleminin gerçekleştirileceği ve önceki çalışmalarımızda da standart olarak belirlediğimiz 0,15 mbar seviyesine düşürülmüştür. İstenilen basınca inildikten sonra, plazma işlemi, farklı uygulama güç ve sürelerinde, örnek yüzeyler üzerine uygulanmıştır. Bu kademede kullanılan parametreler Tablo 2.1'de detaylı olarak verilmiştir. Plazma modifikasyon işlemini takiben, işlem görmüş yüzeyler vakumda bırakılarak enerjik radikallerin sönümlenmesi için 20 dakika beklenmiştir. Son olarak, 15 dakika boyunca reaktöre inert bir soy gaz olan argon beslenerek yıkama yapılmıştır. Bu yöntem ile hazırlanan n-hexan filmler, QTF çatalın yüzeyinde, ikinci aşamada hazırlanacak olan ve amino grubu içeren filmlerin kararlılığı için önemli bir arayüzey olarak kullanılmıştır.

2.2.2.2. QTF çeviricilerinin yüzeyinde PlzP(EDA) ince filmlerin oluşturulması

Biyomoleküllerin, çeşitli amaçlar doğrultusunda immobilizasyonu için uzun süredir kullanılan ve etkinliği artık tartışılmayan yöntemlerin başında, bu tür moleküllerin birbirine veya bir taşıyıcı yüzeye kovalent bağlar ile bağlanmasını sağlayan amino gruplarının varlığıdır. Genellikle bu gruplar, çift taraflı bir çapraz bağlama ajanı ile, örneğin gluteraldehit ile, birbirlerine aldehit grupları üzerinden bağlanır ve kovalent bağ yaparak hem doğal yapılarını hem de fonksiyonelliklerini koruyabilirler.

Bu doğrultuda, bir biyomolekülü immobilize edebilmek için, taşıyıcı yüzeyin plazma ortamında modifikasyonu amaçlanıyor ise, amino gruplarını içeren ve plazma işlemi sonucunda yüzeyde amino gruplarının kullanımına uygun kararlı ince filmler oluşturabilen prekürsorlar seçilmektedir [71,89,90]. Bunların arasında düz karbon zincirin ucunda amino grubunun bulunduğu pentilamin, heptilamin; iki uçta amino grubunun olduğu etilendiamin, siklik yapıda amino grubu içeren aminosiklohekzan gibi monomerlerin kullanılması mümkündür [71]. Bu çalışmada, araştırma grubunun önceki çalışmalarından tecrübesi olduğu, etilendiamin (EDA) monomeri, QTF çatal yüzeylerinde amino grubu oluşturucu prekürsor olarak seçilmiştir.

Etilendiamin ile plazma modifikasyonu yapılmadan önce, etilendiamin sıvı azot ile dondurularak monomer besleme ünitesine bağlanmıştır. Sonrasında monomer besleme vanası açılarak gazsızlaştırma işlemi (degassing) yapılmıştır. Gazsızlaştırma işlemi

tamamlandıktan sonra vakum kırılarak reaktör içerisine alttaşlar yerleştirilip basınç tekrar düşürülmüştür. Daha sonra oda sıcaklığına gelmiş olan EDA, vakum altında 15 dakika boyunca reaktöre beslenerek reaktörün içi yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonlandırıldıktan sonra basınç 0,15mbar'a düşürülerek sistem plazma işlemine hazır hale getirilmiştir. Yüzey kaplaması ön-kaplamada kullanılan plazma parametreleri ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.1). Plazma modifikasyonu sonrası alttaşlar vakum altında tutularak enerjik radikaller sönümlendirilmiştir. Son olarak, 15 dakika boyunca reaktör içine argon gazı beslenerek yıkama yapılmıştır.

Tablo 2.1: Plazma polimerizasyonunda kullanılan koşullar.

Plazma Polimerizasyon Koşulları			
Monomer	**Plazma Gücü (W)**	**Boşalım Süresi (dk)**	
HEX veya EDA	25	1	Basınç:0,15mbar
		5	
		10	
	50	1	
		5	
		10	
	75	1	
		5	
		10	
	100	1	
		5	
		10	

2.2.3. Plazma polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan ince filmlerin karakterizasyonu

Plazma polimerizasyon işlemi yüzeyde nanometreler mertebesinde değişiklik yapılmasına olanak sağlayan ve bu sırada malzemenin yığın özelliğine etki etmeyen bir yüzey modifikasyon tekniğidir. Karakterizasyon için kullanılan cihazlar plazmanın bu özelliği göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Bunun yanı sıra QTF'in çatal

şeklindeki geometrisi bazı analizlerin yapılmasına engel olmaktadır. Bu sebeple, temas açısı ölçümleri elementel içerik bakımından kuvars ayar çatalının kuvars bölümüne eşdeğer olan cam yüzeylerde (lam) gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1. PlzP(n-Hekzan) ince filmlerin karakterizasyonu

PlzP(n-hekzan) ince filmlerin fiziksel karakterizasyonlarının temas açısı ölçümleri, kimyasal karakterizasyonların ise ATR-FTIR (Perkin Elmer Spectrum, Ankara, Türkiye) ile gerçekleştirilmiştir. QTF'lere yapılan her modifikasyon sonrasında frekans ölçümü alınarak rezonans frekanslarındaki değişimler takip edilmiştir.

PlzP(n-Hekzan) ince filmlerde temas açısı ölçümleri

Temas açısı ölçümleri malzeme yüzeyinde plazma modifikasyonu sonucunda değişiklik yapılıp yapılamadığı ve yapılan değişim sonucu prekursör kaynaklı yüzeyde yeni polar ve apolar grupların oluşumu ile ilgili yorum yapabilmemize olanak sağlayan kolay ve hızlı bir yöntemdir. Temas açısı ölçümleri yukarıda bahsi geçen sonuçların takibinin yapılmasının yanısıra belirli periyotlarda temas açısı ölçülerek zamana karşı temas açısındaki değişim incelenerek oluşan ince filmin "aging (yaşlanma)" davranışının izlenmesi amacıyla da kullanılmıştır. Plazma polimerizasyon tekniği yığın yapıyı etkilemeden nano ölçekte ince bir film kaplamamıza olanak sağlasa da oluşan ince filmlerde çarpaz bağlanma kapasitesi düşük olduğu takdirde fonksiyonel hale getirilmiş yüzeyin atmosferle etkileşimi sonucunda birçok değişim oluşabilmektedir. İnce filmler atmosferle etkileşime girdikten sonra termodinamik yasalara göre havanın apolar doğasından dolayı apolar gruplar yüzeyde kalırken polar gruplar içe doğru gömülmektedir. Bu durum, ancak ince film yüksek çapraz bağlanma kapasitesine sahipse engelenebilmektedir. Plazma polimerizasyonu ile oluşan ince filmlerin de yüksek çapraz bağlanma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, 30 gün boyunca belli aralıklarla temas açısı ölçümü (A contact angle analyser, KSV Instruments, Ankara, Türkiye) alınarak ince filmlerin kararlılıkları takip edilmiştir.

PlzP(n-Hekzan) ince filmlerde ATR-FTIR ölçümleri

ATR-FTIR ölçümleri, temas açısındaki ölçüm zorluklarında olduğu gibi, geometrik sebeplerden dolayı lam üzerinde gerçekleştirilmiştir. ATR-FTIR tekniğinin penetrasyonu cihazın kaynağına bağlı olarak yaklaşık 1000 nm civarında olmasından dolayı spektrum, yüzey ve yığın ile ilgili bilgi vermektedir. İnce film yeterli kalınlığa ulaştıktan sonra her örnekte alttaş cam olduğundan penetrasyonun fazla olması analiz bazında zorluk yaratmamıştır. Böylelikle farklı güç ve uygulama süreleri ile üretilen filmler ATR-FTIR spekturumu ile kıyaslanabilmiştir.

2.2.3.2. PlzP(EDA) ince filmlerin karakterizasyonu

PlzP(EDA) ince filmlerin karakterizasyonları, PlzP(n-hekzan) ince filmlerde olduğu gibi, fiziksel yönden temas açısı ölçümleri, kimyasal yönden ise ATR-FTIR ile gerçekleştirilmiştir. QTF çatal yüzeylerine yapılan her modifikasyon sonrasında frekans ölçümü alınarak rezonans frekanslarındaki değişimler takip edilmiştir.

PlzP(EDA) ince filmlerde temas açısı ölçümleri

Bu aşamada, PlzP(n-hekzan) ile önceden kaplanmış ve ön-kaplamasız örnekler etilendiamin ile modifiye edilerek fonksiyonel hale getirilmiştir. Bu çalışmada fonksiyonelleştirmeden kasıt, yüzeyde amino grubu oluşturmaktır. Elde edilen filmlerin fiziksel karakterizasyonları, temas açısı ölçümü aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

Etilendiamin orijinli ince filmlerdeki amino grupların varlığından dolayı öncelikli olarak polar grup oluşumunun görülmesi daha sonrasında ise ön-kaplama olarak kullanılan n-hekzan orijinli ince filmin ön-kaplamasız örneklere kıyasla yaşlanmayı geciktirmesi beklenmektedir. Bu beklentilerin takibi birincil olarak temas açısı ölçümü ile yapılmıştır.

PlzP(EDA) ince filmlerde ATR-FTIR ölçümleri

Plazma polimerizasyon yöntemi ile elde edilen filmlerin kimyasal karakterizasyonları, ATR-FTIR tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

ATR-FTIR ölçümleri temas açısında olduğu gibi, geometrik sebeplerden dolayı lam üzerinde gerçekleştirilmiştir. ATR-FTIR tekniğinin penetrasyonu cihazın kaynağına bağlı olarak yaklaşık 1000 nm civarında olmasından dolayı spektrum yüzey ve yığın ile ilgili bilgi vermektedir. İnce film yeterli kalınlığa ulaştıktan sonra her örnekte alttaş cam olduğundan penetrasyonun fazla olması analiz bazında zorluk yaratmamıştır. Böylece, farklı güç ve uygulama süreleri ile üretilen filmlerdeki amino içeriği ATR-FTIR spekturumu ile kıyaslanabilmiştir.

2.2.4. Plazma koşulları optimize edilen ince filmlerin detaylı fiziksel ve kimyasal karakterizasyonları

Temas açısı ve ATR-FTIR analizi yardımıyla optimize edilen plazma koşulları daha sonra yüzey morfolojisi ve ince film kalınlığı ile igili detaylı analiz için atomik kuvvet mikroskopu (AKM), ince filmlerin detaylı kimyasal yapısının analizi ise x-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.1 Atomik Kuvvet Mikroskop (AKM) ölçümleri

Atomik kuvvet mikroskopu (AKM) (ez-AFM, NanoMagnetics Instruments, Ankara, Türkiye) optimize edilen koşullarda cam yüzey üzerine üretilen PlzP(n-hekzan), ön-kaplamalı ve ön-kaplamasız PlzP(EDA) ince filmlerinin topografik profilini analiz etmek için kullanılmıştır. Örnek hazırlarken cam yüzeylerin yarısı teflon bant ile maskelendikten sonra plazma kaplaması yapılmıştır. Kaplanmamış bölge ile plazmayla modifiye edilen bölge arasındaki yükseklik farkından yararlanılarak filmin kalınlığı ölçülmüştür. Yüzey analizi tapping modda (kesikli kontak mod) PPP tip uç ile yapılmıştır. Pürüzlülük ise 5 farklı noktada alınan ölçüm sonucu elde edilmiştir.

2.2.4.2. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ölçümleri

Temas açısı ve ATR-FTIR sonuçlarına göre optimize edilen koşullarda üretilen PlzP(n-hekzan), ön-kaplamalı ve ön-kaplamasız PlzP(EDA) ince filmlerinin kimyasal kompozisyonu x-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) (Thermo K-Alpha monochromatic high performance XPS spectrometer, Ankara, Türkiye) ile yapılmıştır. İnce filmler 1x1 cm^2'lik cam yüzeylerin üzerine kaplanmıştır. Plazma modifikasyonu yapılmadan önce cam yüzeyler üç kere etanol üç kere deiyonize su ile temizlenmiştir. XPS tekniği ile ince film yüzeyinde olması beklenen C ve N atomlarının olası bağ yapıları incelenmiş ve böylelikle plazma polimerizasyonu sonucunda oluşan fonksiyonel gruplar saptanmıştır.

2.2.5. Glutaraldehit ile yüzey aktivasyonu

QTF yüzeylerinin plazma tekniği ile modifiye edilerek PlzP(EDA) ince filmlerinin oluşması sonucu, yüzeyde oluşan amino grupları kimyasal olarak aktif hale getirilmiştir. Yüzey aktivasyonunun amacı; modifiye edilen yüzeyler üzerindeki fonksiyonel uçlarla anti-fenilalaninin arasında köprü görevi görerek, antikoru yüzeye biyolojik ajanın doğal yapısına zarar vermeyecek güçlü bir bağ ile immobilize etmektir.

Bu amaç doğrultusunda kimyasal aktivasyon ajanı olarak çapraz bağ kapasitesi yüksek olduğu bilinen glutaraldehit seçilmiştir. Fosfat tamponu çözeltisi (Ph:7,4) içerisinde %2, %5, %10, %20 ve %25 lik derişimlerde glutaraldehit kullanılarak örneklerin 5, 10, 15, 30, 60, 120 dakika periyotları ile "daldır-kurut" veya "buharda bekletme" teknikleri uygulanarak tamamlanmıştır.

2.2.6. Antikor (Anti-fenilalanin) immobilizasyonu

Kimyasal aktivasyon aşamasının optimizasyonundan sonra belirlenen örneklere öncelikle 10 µL anti-fenilalanin (10 µg/µL) içerisine 30 dakika süre ile QTF örnekleri daldırılmıştır. Modifikasyon sırasında, antikorların sadece çatalların uç kısmına immobilize edilmesine dikkat edilmiştir. Süre sonunda fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 3 defa yıkanarak bağlanmamış anti-fenilalaninler yüzeyden uzaklaştırılmıştır.

2.2.7. Anti-fenilalanin / L-fenilalanin spesifik etkileşiminin test edilmesi

Öncelikle farklı parametrelerle kaplanan ve anti-fenilalanin ile modifiye edilen yüzeyler 100mM fenilalanin çözeltisine daldırılarak frekans değişimi gözlemlenmiştir. En yüksek değişimi gösteren parametre saptanıp daha sonra farklı konsantrasyonlardaki (1-20 µg/µl) antikorlarla etkileşime sokularak optimum antikor derişimine ulaşılmıştır.

2.2.8. Hazırlanan immünosensörlerin L-fenilalanin kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

Plazma polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan QTF-tabanlı immünosensörler farklı miktarda L-fenilalanin içeren çözelti içerisine daldırılarak etkileştirilmiştir. Fenilalanin derişimine karşı QTF immünosensörün verdiği cevap, yani frekans sapması grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

2.2.9. Seçicilik testi

Tasarlanan immünosensörün seçiciliğinin araştırılması için insan vücudunda bulunan moleküller seçilmiştir. Seçiciliğin anlaşılabilmesi için modifiye edilmiş QTF'ler öncelikle 100mM L-fenilalanin çözelti içerisine daldırılmıştır. Daha sonra seçicilik performansının değerlendirilmesi için QTF'ler ayrı ayrı 200 mM glikoz ve askorbik asit çözeltilerine daldırılmıştır. Yıkama ve kurutma işlemleri gerçekleştirildikten sonra frekans ölçümleri yapılarak frekans sapma değerleri hesaplanmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

Bu çalışmada fenilketonüri hastalığının teşhisinde kullanılmak üzere yüksek performanslı QTF-tabanlı immünosensör geliştirilerek, ex-vivo ortamdaki L-fenilalan düzeyinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, QTF çevirici yüzeyleri, biyomoleküllerin immobilizasyonunda çoğunlukla tercih edilen amino gruplarınca zengin ince filmler ile modifiye edilerek antikor immobilizasyonuna uygun hale getirilmiştir. Biyosensörlerin en temel bileşeni olan tanıyıcı yüzeyin oluşturulması için çeşitli yüzey modifikasyon yöntemleri kullanılmasına rağmen, bu yöntemlerin arasında yığın yapıda değişiklik yapmadan angström (Å) mertebesinde fonksiyonel ve kararlı yüzey kaplaması yapılmasına elverişli olan plazma polimerizasyon yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir.

Guimond vd. (2010), plazma polimerizasyon yöntemiyle üretilen ince filmlerin içerdikleri amino grup miktarı arttıkça yüzey enerjisinin dolayısıyla fonksiyonelliğin arttığını fakat stabilitesinin zayıfladığını belirtmektedir [91]. Bu durum, amino gruplarınca zengin monomerler kullanılarak üretilen ince filmlerde kararlılık ve fonksiyonellik özelliklerinin aynı anda korunamadığını göstermektedir. Bu nedenle, birçok çalışma grubu tarafından, birbirinden farklı yaklaşımlardan yaralanarak hem fonksiyonel özelliklerini koruyan hem de hava ve sıvı ortamlarında kararlılığını koruyabilen ince film eldesi için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Bu yaklaşımlardan en çok kabul gören, amino grup kaynağı monomerin bir hidrokarbon gazı ile farklı oranlarda karıştırılarak reaktör ortamına beslenmesi ve plazma polimerizasyon işleminin bu iki monomer karışımının olduğu ortamda yapılmasıdır. Başka bir yaklaşımda ise, alttaş yüzeyinde öncelikle hidrokarbon orijinli bir monomer kullanılarak arayüzey oluşturulması ardından amino grupları içeren ince filmin polimerizasyonu gerçekleştirilmesi yoluyla film kararlılığının arttırılması gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışma kapsamında ilk aşama olarak, QTF çevirici yüzeylere monomer uygulaması iki aşamada gerçekleştirilmiş ve böylece PlzP(n-hekzan) ile kararlılığı arttırılan yüzeyler ikinci aşamada amino gruplarınca zengin etilendiamin (EDA) monomeri ile modifiye edilerek hem fonksiyonel hem de kararlı ince filmlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen ön-kaplamalı ve ön-kaplamasız filmlerin tek başlarına ve ayrı ayrı kararlılıkları temas açısı ve ATR-FTIR analizleri ile belirlenerek plazma polimerizasyonunda kullanılan işlem parametreleri optimize edilmiştir. Doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmaya ait işlem basamakları aşağıdaki şekilde özetlenmektedir:

1. İlk aşamada, QTF çevirici yüzeylere PlzP(n-hekzan) modifikasyonu uygulanmış ve ön-kaplamalı yüzeyler üretilmiştir. Üretilen filmlerin kimyasal ve fiziksel karakterizasyonları gerçekleştirilerek en yüksek kararlılığa sahip olduğu belirlenen filmlerin üretiminin gerçekleştirildiği plazma işlem parametreleri optimize edilmiştir.

2. EDA modifikasyonu işleminde alttaş olarak, PlzP(n-hekzan) ön-kaplamalı ve ön-kaplamasız QTF çevirici yüzeyleri kullanılmıştır. PlzP(n-hekzan) ile kararlılığı arttırılan film yüzeylerine amino grubu içeriği bakımından zengin bir monomer olan EDA farklı boşalım gücü (25, 50, 75 ve 100 W) ve uygulama sürelerinde (1, 5 ve 10 dk) uygulanarak, arayüzeydeki PlzP(n-hekzan) ön-kaplamaların fonksiyonel PlzP(EDA) ince filmlerin yüzey kararlılıkları üzerindeki etkisi incelenmiştir. QTF yüzeylerinde büyütülen filmlerin fonksiyonellikleri kimyasal kompozisyonlarının ATR-FTIR cihazı ile EDA filmlerinin yüzey kararlılıkları ise temas açısı ölçümleriyle belirlenmiştir. Bu şekilde fonksiyonellik ve kararlılık özelliklerini taşıdığı belirlenen ince filmlerin üretiminde kullanılan plazma işlem parametreleri optimize edilmiştir.

3. Optimize edilmiş plazma parametreleri kullanılarak üretilen yüzeyler glutaraldehit ile aktifleştirilmiştir. Bu doğrultuda, öncelikle amino ile aldehit gruplarının etkileşim sürelerinin (1- 24 s) ve ardından etkileşim ortamının (“daldır-kurut” ve “buharda bekletme”) optimizasyonu yapılarak aktivasyon işlemi maksimum verimle gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Her

bir parametrenin etkisi (yüzey amino grupları ile glutaraldehit etkileşimi süresi, aktivasyon aşamasında kullanılan glutaraldehit derişimi ve etkileşim yöntemi), aktive edilen yüzeylerin SSA ile etkileşimi sonucunda QTF rezonans frekansında oluşan sapma gözlemlenerek test edilmiştir. Bu aşamada yüzey aktivasyonunun SSA proteini ile test edilmesinin sebebi, proteinin yapısında bulunan amino gruplarının aktive ettiğimiz yüzeylere bağlanarak frekansta sapmaya neden olması, dolayısıyla oluşturduğumuz tanıyıcı yüzeyin aktiflik derecesini incelenmesine olanak sağlamasıdır. Frekans sapmasının en yüksek olduğu parametre, aktivasyon işleminin en yüksek seviyede amino grubunun aktifleştirilmesini sağlayan parametreler olarak seçilmiştir. Böylece, QTF yüzeyleri belirlenen parametreler ile modifiye edilerek maksimum miktarda anti-fenilalanin immobilizasyonu için uygun hale getirilmiştir.

4. Dördüncü aşamada; fonksiyonelleştirilip aktive edilen QTF yüzeyleri farklı sürelerde ve farklı derişimlerdeki antikor, anti-fenilalanin, ile etkileştirilmiştir. Ardından tanıyıcı yüzey hazırlığı tamamlanan QTF çatalları, yüksek derişimde (100 μM) L-fenilalanin içeren çözeltilerin içerisinde bekletilerek çeviricinin performansı frekans sapmasına göre belirlenmiştir. Bu aşamada tekrar maksimum sapmanın elde edildiği parametreler belirlenmiştir. Maksimum sapmanın takip edilmesinin sebebi, antikor immobilizasyonu sırasında anti-fenilalaninin L-fenilalanini tanıyan aktif bölgesinin serbestlik miktarını belirlemektir. Bu aşamanın sonucunda QTF tanıyıcı yüzeyleri L-fenilalanine spesifik hale getirilmiştir.

5. Son aşamada, yüzey dekorasyonu tamamlanan QTF'ler belirli derişimlerdeki (1-500 μM) L-fenilalanin ile etkileştirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Daha sonra eğri denklemi çıkarılarak tasarlanan L-fenilalanine spesifik biyosensörün performans parametreleri belirlenmiş ve QTF-bazlı kütle hassas immünosensörün tasarımı başarı ile tamamlanarak çalışma sonlandırılmıştır.

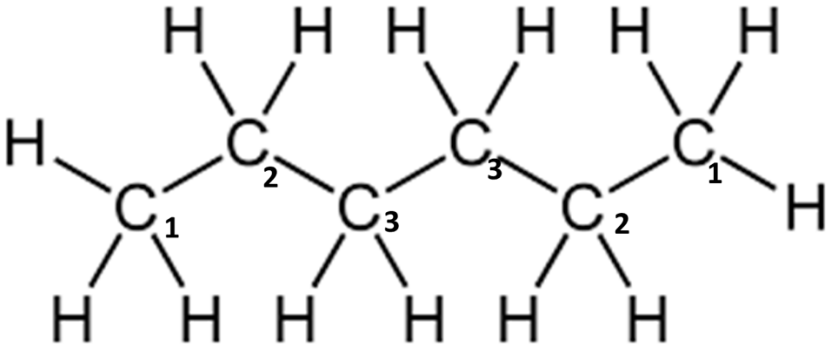
3.1. Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Hazırlanan İnce Filmlerin Karakterizasyonu

3.1.1. PlzP(n-hekzan) modifiye QTF'lerin karakterizasyonu

Karbon bazlı filmler; mekanik, elektriksel ve optik özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar dahil birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle PlzP(n-hekzan) filmlerin mekanik olarak (termoplastik polimere kıyasla sert ve çizilmeye dirençli) dayanımlarının yüksek olması bu hidrokarbon bazlı çözücünün kullanım alanını genişletmiştir.

Plazma polimerizasyon yöntemi ile oluşturulan her bir ince filmin kimyasal kompozisyonu, kullanılan monomer çeşidi ve plazma parametreleri (güç, uygulama süresi ve akış hızı) ile doğrudan bağlantılıdır. Plazma modifikasyonu esnasında uygulanan güç doğrudan monomerin aktivasyonunu, bağlar arası kırılmayı ve dehidrojenizasyonu etkilemektedir. Plazma polimerizasyon işlemi düşük güçte uygulandığı zaman, monomer aktivitesi baskın duruma geçerken, uygulanan gücün artırılması bağlar arası kırılma ve/veya dehidrojenizasyonun gerçekleşmesine sebep olmaktadır [57-59]. Gücün değişmesine bağlı olarak reaktör ortamında oluşan radikaller değişimi sonucunda, büyütülen filmin bağ içeriği ve fonksiyonelliği değişmektedir. Bunun yanı sıra uygulanan güç az olduğu takdirde elektron ile monomerin etkileşimi daha uzun zaman alırken, daha yüksek güç uygulandığında birim zamanda moleküllerin çarpışma sayıları/olasılıkları artarak ayrışma reaksiyonunun gerçekleşme olasığının da artmasına sebep olmaktadır.

n-hekzan prekursörünün ayrışması için yeterli enerji yukarıda da bahsedildiği gibi plazma reaktörü içerisindeki enerjik halde dolaşan elektronlardan sağlanmaktadır. Prekursördeki en zayıf bağı kırmaya yetecek enerji sisteme aktarıldığında, ilk olarak C-C bağının kırılması beklenmektedir. Fakat, molekül içerisindeki etkileşimlerden dolayı n-hekzan içerisindeki her C-C bağı aynı enerjiye sahip değildir. Pierce ve ark. (tarih) ayrışma modelinde de belirttiği gibi C1-C2, C2-C3 ve C3-C3 bağları olmak üç farklı kırılma ihtimali bulunmaktadır (Şekil 3.1). Her bir ihtimal sonucunda oluşabilecek radikaller ve yüzeyle radikalin buluşması sonucu oluşabilecek nötr moleküller Tablo 3.1' de detaylı olarak verilmiştir [92].



Şekil 3.1: n-hekzan prekursöründe ilk olarak kırılması beklenen C1-C2, C2-C3 ve C3-C3 bağları.

Tablo 3.1: Plazma polimerizasyonu sırasında n-hekzanın reaktöre beslenmesi sonucu oluşabilecek radikaller ve radikallerin yüzeyle çarpıştıktan sonra oluşturabileceği nötr moleküller [92].

C1-C2	C2-C3	C3-C3
CH_3 + yüzey → CH_4	C_2H_5 + yüzey → C_2H_4	C_3H_7 + yüzey → C_3H_8
C_5H_{11} + yüzey → C_5H_{12}	C_2H_5 + yüzey → C_2H_2	
	C_4H_9 + yüzey → C_4H_{10}	

Bu senaryoların tamamı reaktör içerisinde safsızlık olmadığı durumlar için geçerlidir. Reaktör içerisinde havadan kaynaklı safsızlığın olduğu durumda, reaktör içerisindeki enerjik ortam çok daha çeşitli olacağı için, plazma polimerizasyonu sonucu elde edilecek polimerlerin yapısı bahsi geçen ayrışma modelinden farklı olacaktır.

3.1.1.1. n-Hekzan ile modifiye edilen QTF'lerin fiziksel karakterizasyonu

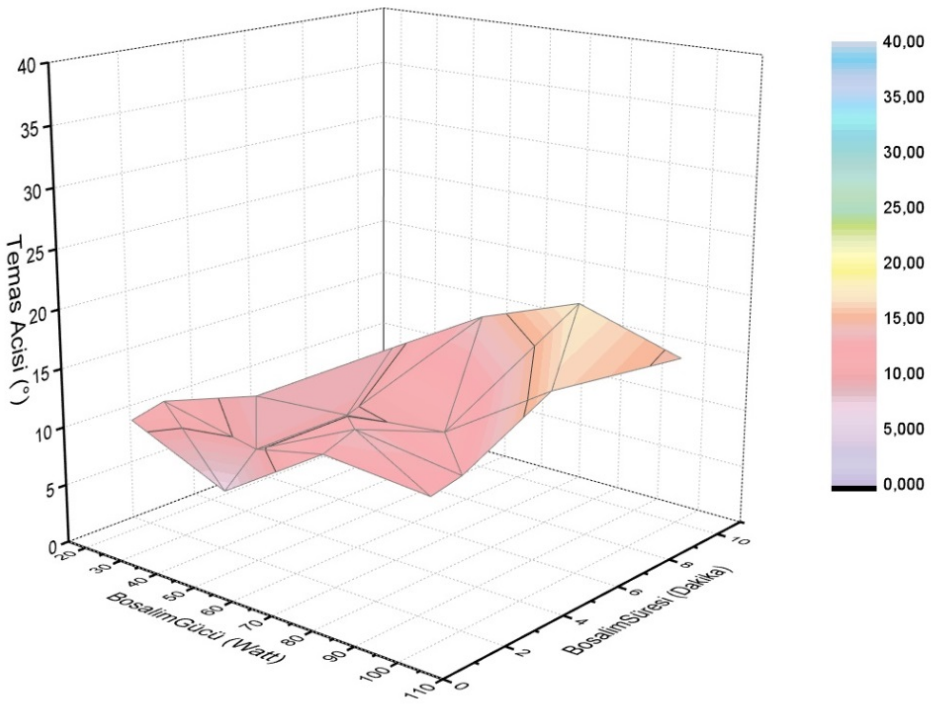
Temas açısı ölçümleri

Temas açısı ölçümleri, plazma polimerizasyon ile yüzey modifikasyonunu ardından yüzeydeki değişimi kolay ve hızlı olarak anlamamıza olanak sağlayan bir tekniktir. Sıvının damlatıldığı bölgedeki polar veya apolar fonksiyonel grupların varlığına göre

yüzeyin ıslanabilirlik davranışı değişmektedir. Plazma polimerizasyonu gibi yüzeyde nanometre mertebesinde değişime sebep olan kaplama teknikleri için bu bilginin elde edilmesi kılavuz görevi görmektedir.

Bir alkan olan n-hekzan apolar özellik göstermektedir. Plazma etkisi sonucu gerçekleşen ayrışma reaksiyonlarının sonucunda çoğunluklu olarak Tablo 3.1'de de görüldüğü gibi alkan (C1-C2 kırılması sonucu; metan veya pentan, C2-C3 kırılması sonucu; bütan, C3-C3 kırılması sonucu; propan) oluşma ihtimali yüksektir. Dolayısıyla oluşturulacak ince filmin apolar gruplarının varlığından dolayı teoride hidrofobik özellik göstermesi beklenmektedir.

Plazma ile modifiye edilmiş örneklerin ölçümlerine geçmeden önce plazma işlemi sonrası kaplama işleminin gerçekleştiğinin teyit edilmesi ve kaplamanın yüzey davranışının anlaşılması için referans olarak modifiye edilmemiş cam örneklerinin (lam) temas açısı ölçülmüştür ve 30° ± 4° (n = 15) olarak hesaplanmıştır. Daha sonra, Tablo 2.1'de verilen boşalım gücü ve uygulama sürelerinde cam yüzeyleri modifiye edilmiş ve sonuçlar, temas açısı değerlerinin boşalım gücü ve uygulama süresine bağlı değişimleri cinsinde grafiksel olarak gösterilmiştir (Şekil 3.2). Tablo 2.1'de verilen plazma parametreleri ile üretilen ince filmlerin tamamı cam referans örneğine kıyasla hidrofilikleşme göstererek, teori ile uyumsuz davranış göstermişlerdir. Diğer bir deyişle, yüzeyde beklenenden farklı olarak apolar gruplarda bir azalma gözlemlenmiştir. Bu hidrofilikleşmenin, reaktör içerisinde kalan hava kirliliğinden (oksijen varlığı) kaynaklandığı düşünülmüştür. Deneyler sırasında havadan gelen kirliliğin önüne geçmek için reaktör ortamının 15 dakika vakumlamaya ek olarak 15 dakika monomer yıkaması yapılmıştır. Bu iki işlemin (vakumlama ve monomer yıkaması) süresi artırıldığında yüzey hidrofilisitesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Bu durumun, plazma sisteminde vakumlama amacıyla kullanılan mekanik pompanın performansından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Oksijenin O-O bağ enerjisi C-C bağ enerjisine kıyasla daha düşük olduğu için plazma reaktörü içerisinde hava kalma durumunda n-hekzan kaplamasının yanı sıra oksijen ile yüzey aşındırma gerçekleşebilir. Ayrıca oksijen kaynaklı radikallerin yüzeyde oluşan n-hekzan orijinli polimerle etkileşimi sonucunda oluşan polar gruplar da yüzeyin hidrofilikleşmesine sebep olabilir.



Şekil 3.2: Düşük basınç RF-plazma sisteminde farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile üretilen PlzP(n-hekzan) yüzeylerin temas açısı ölçümleri.

Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 25W boşalım gücü-1 dakika uygulama süresi sabit tutulup boşalım gücü etkisine bakıldığında, 25W'lık boşalım gücü cam yüzeylerin temas açısını 11°'ye düşürdüğü görülmüştür. Bu düşüş, oksijen aşındırması veya yüzeyde –CO grubu oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Cam yüzeyler boşalım gücü 50W'a yükseltildiğinde 7°, 75 W'a çıkarıldığında 13° ve son olarak 100 W'a ayarlandığında 12°'lik temas açısına sahiptir. Yukarıda bahsedildiği gibi kaplanmamış 15 farklı cam yüzeyde yapılan temas açısı ölçümleri sonucunda 4°'lik bir hata payı değeri bulunmuştur. Bu hata payı cam yüzeylerdeki kusurlardan kaynaklanabileceği gibi ölçüm cihazı kaynaklı da olabileceği kanaati oluşmuştur. Dolayısıyla, boşalım gücündeki artış veya azalış sonucu temas açısındaki değişim ~4° olduğundan bu parametrenin hidrofilisiteyi değiştirdiğine dair bir yorum yapılamamaktadır. Bu sonuçlara ek olarak, uygulama süresi değiştirildiğinde, 25 W boşalım gücünde üretilen ince filmlerin temas açısında bir değişim gözlemlenmezken, diğer boşalım güçlerinde uygulama süresi arttıkça temas açılarında yükselme görülmektedir. Detaylandırılacak olursa; 50 W boşalım gücünde uygulama süresi 1 dakikadan 5 dakikaya çıkarıldığında temas açısında anlamlı bir değişim gözlenmezken, 1 dakika ile 10 dakika arasında

yaklaşık 8°'lik bir yükselme gözlemlenmiştir. Boşalım gücü 75 W olduğunda, 1 dakika uygulama süresi ile üretilen ince filmlerin temas açısı ile 5 dakika ile üretilenler kıyaslandığında 50 W güç altında üretilen filmlerde olduğu gibi anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Fakat uygulama süresi 10 dakikaya çıkarıldığında temas açısı 17°'ye yükselerek, 7°'lik bir hidrofobikleşme gözlemlenmiştir. Boşalım gücü maksimuma çıkarılarak 100 W boşalım gücüne yükseltildiğinde ise 1 dakika uygulama süresi ile 5 dakika arasında 5°, 1 ile 10 dakika arasında 3°'lik bir hidrofobikleşme izlenmiştir.

Üretilen ince filmlerin 1. gün sonuçlarının tamamına bakıldığında temas açısı sonuçları, n(hekzan) prekursörü ile plazma polimerizasyon cam yüzeylerin yüzey karakteristiğini tamamen değiştirdiği, fakat plazma polimerizasyon sonucu yüzeyde oluşan fonksiyonel grupların boşalım gücü veya uygulama süresi parametrelerinden etkilenmediğini göstermektedir. Bazı parametreler ile elde edilen ince filmlerin temas açısı ölçümleri arasında farklar görülse de bu derece düşük değişimler ince filmin yüzeyindeki polar/apolar karakterini etkileyecek seviyede önemli farklar değildir.

PlzP(n-Hekzan) yüzeylerin hava ortamındaki yıpranma hızı

Termodinamik yasalar sonucunda gerçekleşen "yüzey yeniden yapılanması (yüzey yeniden oryantasyonu)" PlzP(n-hekzan) ince filmlerin karakterizayonu başlığı altında detaylı olarak açıklanmıştır. Şekil 3.2'de gösterilen n-hekzan ile plazma polimerizasyonu sonrasında elde edilen temas açısı ölçümleri yüzeyin ağırlıklı olarak polar gruplardan oluştuğunu göstermektedir. Bu açıklamalar ışığında, üretilen ince filmlerin çapraz bağ kapasitesinin düşük olduğu durumlarda bahsi geçen yüzey yeniden yapılanmasının gerçekleşebileceği dolayısıyla zamanla yüzeyde hidrofobikleşmenin görülmesi beklenmektedir.

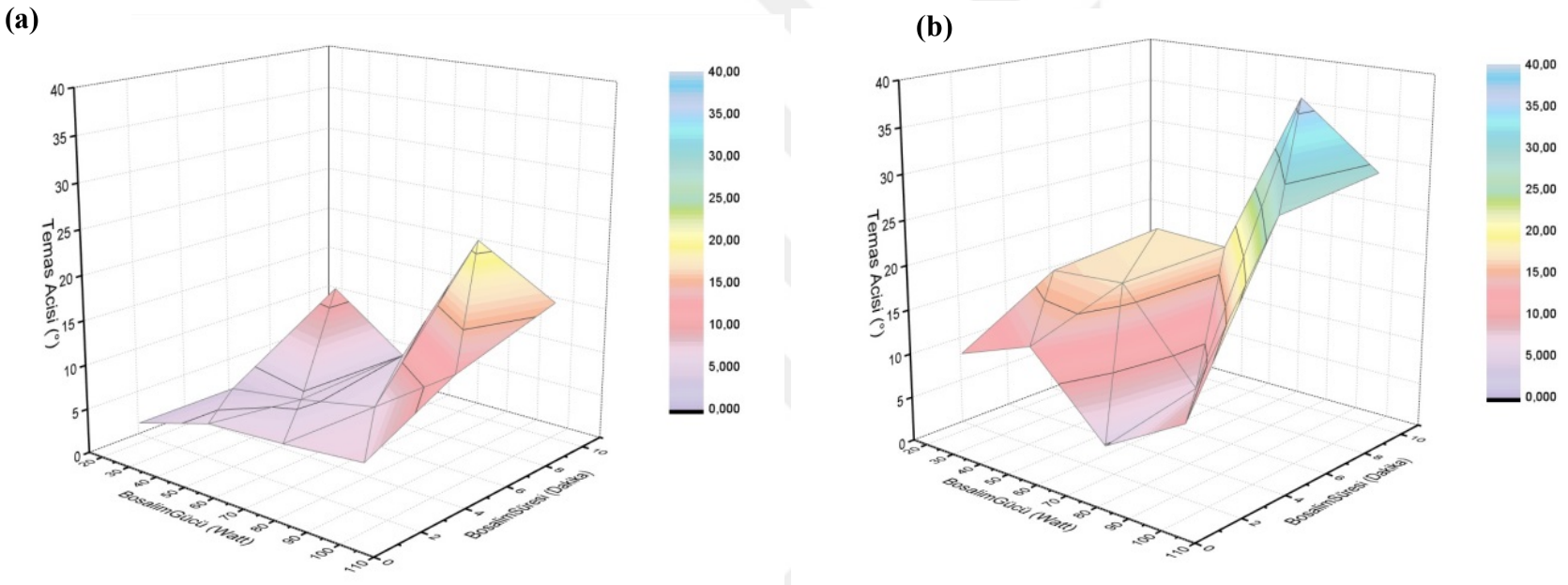
Şekil 3.3'de bakıldığında n-hekzan kaplamasına sahip ince filmlerin farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile modifiye edilen yüzeylerin ilk gün ile otuzuncu gün arasındaki yüzey karakteristiğindeki değişim gösterilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi boşalım gücü ve uygulama süresinden bağımsız olarak elde edilen filmlerin tümünün temas açısının yaklaşık 11° civarlarında değiştiği gözlenmiştir. Otuz gün sonra ise çoğu ince filmde ilk güne kıyasla bir hidrofobikleşme gözlemlenmektedir.

Özellikle yüksek boşalım gücü ve uzun uygulama sürelerindeki hidrofobikleşme diğer koşullara kıyasla daha fazla bulunmuştur.

Boşalım gücü ve uygulama süresinin çapraz bağlanma kapasitesine bir diğer deyişle ince film stabilitesine etkisinin yorumlanabilmesi için yüzeydeki fonksiyonel grupların hava ortamında zamanla değişimleri gözlemlenmiştir (Şekil 3.3). Bu amaçla, otuz gün boyunca periyodik olarak (1, 7, 15 ve 30. gün) temas açıları takip edilmiştir. 25 W boşalım gücü uygulanan tüm örneklerin temas açıları 10° olarak bulunmuştur (n=10). Yedinci günde, 1 ve 10 dakika uygulama süresi ile modifiye edilmiş yüzeylerin temas açısı 20°'ye kadar yükselmiş, 5 dakika uygulama süresinde ise 5° daha yükselerek 15°'ye çıkmıştır. İnce filmlerin 15. gününde ise 1 dakika uygulama süresi ile üretilen filmlerin temas açısı 31°'ye yükselerek camın baz değerine ulaşırken, 5 ve 10 dakika süre ile modifiye edilmiş örneklerin temas açısı sırasıyla 17° ve 22° olarak bulunmuştur. Bu koşullarda üretilmiş filmlerin 7 ile 15. günleri arasındaki değişim ~ 2° bulunmuştur. Bu değişimin, temas açısı ölçüm cihazının ve/veya cam yüzeyindeki kusurlarından kaynaklı hata payından (4°) daha az olmasından dolayı her iki koşulda, 7 ve 15. günlerde bir değişimin olmadığı düşünülmüştür. 30. gün ölçümlerinde ise 1 dakika uygulama süresi ile üretilen filmlerin ortalama temas açıları 25° bulunmuştur. Fakat örnekler arası farklılıktan kaynaklanan hata payı göz önünde bulundurulduğunda 15 ile 30. gün arasında temas açısı değerinde anlamlı bir değişimin olmadığı yorumu yapılabilir.

5 ve 10 dakika uygulama sürelerinde üretilen filmler incelendiğinde ise 15 ile 30. gün ölçümleri arasında bir fark görülememiştir. Özet olarak, 25 W boşalım gücü ile üretilen filmlerde 1 dakikalık uygulama süresinin alttaş yüzeyinde sadece aşındırma kaynaklı bir değişim gerçekleştirdiği ya da ince filmin 15. gününde degredasyona uğrayarak yüzeyden uzaklaştığı düşünülmektedir. Fakat uygulama süresi artırıldıkça filmlerin ilk bir hafta yeniden yapılanmaya uğradığı daha sonra ise oldukça stabil olarak 30. güne kadar alttaş üzerinde kaldığı gözlemlenmiştir.

Boşalım gücü 50 W olarak ayarlandığında, 25 W'tan farklı olarak uygulama süresi arttırıldıkça ilk gün ölçülen temas açılarının da arttığı gözlemlenmiştir. Fakat hata payları dikkate alındığında özellikle 5 dakika uygulama süresi ile üretilen örnekler arası

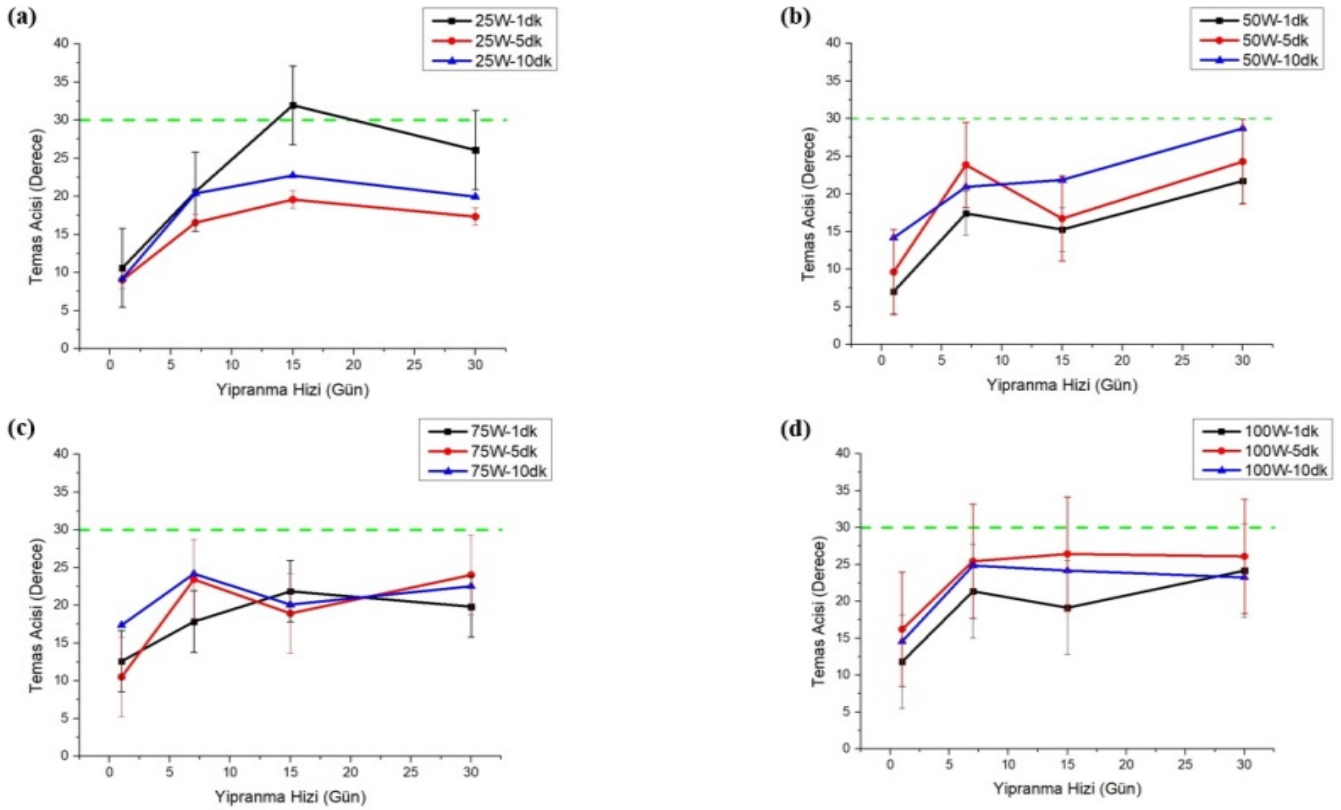


Şekil 3.3: (a) n-Hekzan kaplamalı ince filmlere ait birinci gün temas açısı ölçümleri. (b) n-Hekzan kaplamalı ince filmlere ait otuzuncu gün temas açısı ölçümleri.

bir dalgalanma gözlemlendiği bu sebeple bu artışın anlamlı olmadığı kanaatine varılmıştır. 1 dakika uygulama süresi ile üretilen ince filmlerin 7. gün ölçümlerine bakıldığında ilk gün 7° olan örnekler yaklaşık 8° yükselerek 15° olmuştur. 5 dakika uygulama süresi ile üretilen örnekler 20°'ye, 10 dakika ile üretilenler ise 24°'ye yükselmiştir. 15. Günde 1 ve 10 dakika uygulama süresi ile üretilenler değişmeden kalırken, 5 dakika uygulama süresinde üretilen filmlerde yaklaşık 7°'lik bir düşüş gözlemlenmiştir.

Fakat yukarıda da belirtildiği üzere, örnekler arası dalgalanmanın 50W-5 dakika plazma parametresi ile üretilen filmlerin temas açısını diğerlerine kıyasla yükseltmesinden dolayı, bu parametrede 7. ile 15. günler arasındaki değişimle ilgili yorum yapılamamıştır. İnce filmlerin 30. gün analizlerine gelindiğinde, 10 dakika uygulama süresi ile üretilenlerin 30° modifiye edilmemiş camın temas açısına ulaştığı fakat 1 dakikada üretilen filmlerin temas açısının 3° artarak 17°'ye yükseldiği görülmüştür. Bu yükselişin cihazın hata payından kaynaklı olduğu göz önünde bulundurularak, değişim olmadığı kanaatine varılmıştır. Özet olarak, 5 dakika uygulama süresinde üretilen filmlerin tekrarlanabilirliğinde bir problem olduğu görülmüş ve bu nedenle bu boşalım gücünde en stabil kalan örneğin 1 dakika uygulama süresi ile üretilen filmler olarak belirlenmiştir.

Genel olarak grafik eğilimlerine bakıldığında bütün boşalım güçleri arasından 75 W ile üretilen filmlerin 30 gün boyunca daha stabil olduğu görülmüştür. Analizler detaylandırıldığında, ölçümlerin ilk gününde 1 ve 5 dakika uygulama süresi ile üretilen örneklerin temas açısı yaklaşık 10° civarında, 10 dakika uygulama süresi ile üretilen filmlerin temas açısı ise 17° olarak bulunmuştur. 50 W boşalım gücünde olduğu gibi 5 dakika örneklerinin hata payı diğer örneklere kıyasla fazla bulunmuştur. Bu nedenle, 75 W-1 dk plazma parametreleri ile üretilen filmlerin 75 W-10 dk örneklerine kıyasla daha hidrofilik olduğu söylenebilirken, 5 ile 10 dakika uygulama sürelerinde üretilmiş ince filmlerle ilgili bu tarz bir karşılaştırma yapılamamıştır. 7. gün analizlerine bakıldığında 1 dakika plazma uygulama süresinde üretilen filmlerin temas açısı yaklaşık 5° artarak 17° yi bulurken 5 ve 10 dakika süre ile üretilen filmlerin temas açısı 22°'ye yükselmiştir. Sonrasında bütün ince filmlerin temas açıları ~20°'de sabitlenerek 30. güne kadar sabit kalmıştır.



Şekil 3.4: n-hekzan ile farklı plazma parametreleri ile üretilmiş yüzeylere ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) 25 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri. (b) 50 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri. (c) 75 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri. (d) 100 Watt boşalım gücüne ait temas açısı ölçümleri.

Kullanılan cihazın uygulanabilir en yüksek boşalım gücü olan 100 W'ta, ilk olarak grafiklerdeki büyük hata payları dikkat çekmektedir. 100 W boşalım gücü ile üretilen tüm filmlerin tekrarlanabilirliğinde büyük bir problem olduğu açıkça görülmektedir. Bu sebeple bu parametreler doğrudan elenmiştir.

Fiziksel karakterizasyon sonucuna göre bütün plazma koşulları göz önünde bulundurulduğunda en kararlı ince filmlerin 75 W boşalım gücü ile elde edildiği gözlemlenmektedir. 75 W boşalım gücü ile üretilmiş örneklere bakıldığında ise tekrar edilebilirliği en yüksek örneklerin 75 W-10 dk plazma koşulları ile üretildiği görülmektedir.

3.1.1.2. PlzP(n-Hekzan) ince filmlerin kimyasal karakterizasyonu

Plazma polimerizasyonu, içerikte de sıklıkla bahsedildiği gibi alttaş yüzeyine Å mertebesinde modifikasyon yaparak malzeme özelliklerini yeniden yapılandırmaya olanak sağlayan bir tekniktir. Bu özellik kütle hassas çeviriciler için avantaj olsa da karakterizasyon yöntemleri açısından problem yaratmaktadır. Bu sebeple, nerdeyse 1 mikron penetrasyon derinliğine sahip ATR-FTIR ile kimyasal analizin sağlıklı olarak yapılabilmesi için uygulama süresi 50 dakikaya kadar uzatılmıştır. Böyle bir uygulamanın yapılmasının gerekçesi; plazma tekniğinde uygulama süresi arttıkça film kalınlığının artması dolayısıyla plazma kaynaklı değişimlerin bu teknik ile algılanmasının sağlanmasıdır.

FTIR-ATR ölçüm sonuçları

FTIR-ATR malzemenin kimyasal yapısı ile ilgili bilgi veren etkili bir kimyasal analiz yöntemidir. Analiz sonucu elde edilen spektrumdaki pikler, plazma polimerizasyonu sonrasında oluşan değişimlerle ilgili yorum yapabilmemize olanak sağlamaktadır. Plazma polimerizasyon yöntemi ile n-hekzan modifikasyonu yapıldığında teoride ortamda, C1/C2 bağının kırılması sonucu metan ve/veya pentan, C2/C3 bağının kırılması durumunda etilen, asetilen ve/veya bütan, C3/C3 kırılımında ise sadece propan oluşacağı öngörülmektedir. Fakat verilen güç C-H bağını da kırmaya yetecek seviyeye ulaştığında oluşacak kaotik ortamdaki radikal ve yüzeyde oluşacak nötr moleküllerle ilgili yorum yapılamamaktadır. Ayrıca, temas açısı sonuçlarının

tamamının hidrofilik olması dolayısıyla reaktör içerisindeki hava kaynaklı kirlilikte göz önünden bulundurulduğunda teoride oluşacak moleküllerin yanı sıra oksijen içerikli gruplarında spekturumda görülmesi beklenmektedir.

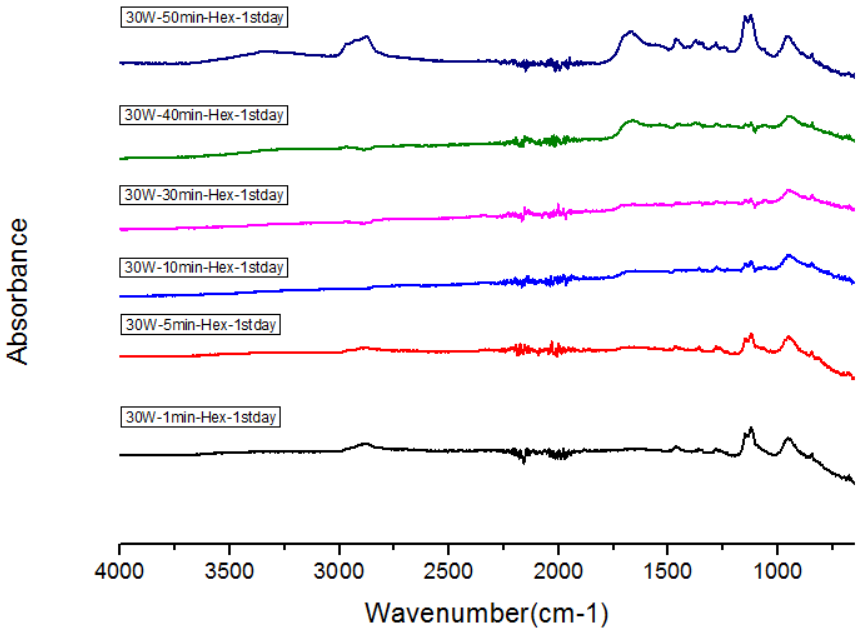
Bir diğer dikkat edilmesi gereken nokta ise plazma tekniği ile elde edilen polimerlerin spekturumlarının kimyasal yöntemlerle üretilenlerden pik şiddeti bazında farklılık göstermesidir. Plazma ile üretilen polimerlerin pikleri kimyasal yöntemle üretilenlere kıyasla daha küçük ve geniştir.

Şekil 3.5'te düşük basınç RF-plazma sisteminde, 25 Watt boşalım gücü uygulanarak elde edilen filmlerdeki pikler görülmektedir. Uygulama süresi kısaldıkça pik şiddetlerinde gözle görülür bir düşüş gözlemlenmektedir. Bu sebeple daha güvenilir bir analiz yapılabilmesi için karakterizasyon en yüksek uygulama süresi üzerinden yürütülmüştür. Spektruma bakıldığında C-H gerilme titreşimi sonucu 2951, 2913 ve 2868 cm^{-1}'de, C-H bükülmesi sonucu 1455 cm^{-1}'de pikler gözlemlenmiştir. 2951 cm^{-1}'de beliren pikin kaynağı asetilen dışında teoride beklediğimiz herhangi bir alkan veya alkenden kaynaklanabilir. Bunun sebebi pentan, butan ve propanın 3000-2850 cm^{-1}, metanın 3170-2890 cm^{-1} ve son solarak etilenin 3175-2945 cm^{-1} aralığında görülmesidir. Yıpranma sonucu oluşabilecek olası ürünlerin çoğunun çakışması C-H bükülmesine bakarak yüzeyde oluşan filmle ilgili bir azaltmayla sonuca gidebilmemizi önlemektedir. Fakat spekturumda 1662 cm^{-1}'de gelen C=C gerilme piki yüzeyde bir alkenin olabileceğine dolayısıyla C2/C3 bağında kırılma olduğu ihtimalini güçlendirmektedir.

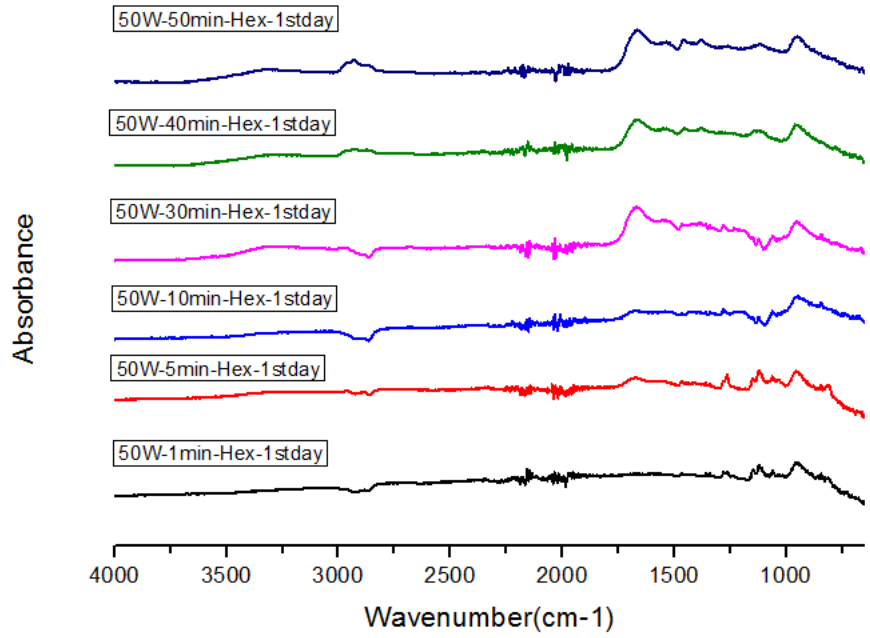
Bunlara ek olarak, temas açısı ölçümünde de bahsedilen oksijen safsızlığı kaynaklı oksijen içeren –OH grubu oluşumu 3337 cm^{-1}'de, C-O oluşumu ise 1278 cm^{-1}'de gözlemlenmiştir.

50 Watt ve 75 watt boşalım gücünde, boşalım süresinin filmin moleküler yapısına etkisi ise Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de verilmiştir. Spektrumlarda 2951, 2913 ve 2868 cm^{-1} de C-H gerilme titreşimi ve 1455 cm^{-1} ise C-H bükülme pikler gözlemlenmiştir. 25W boşalım gücündeki gibi 3337 cm^{-1} ve 1278 cm^{-1}'de -OH ve -CO gruplarından kaynaklı pikler görülmektedir. Açıkça görüldüğü gibi uygulama süresi arttıkça 25W boşalım gücünde de görülen pikler 50 ve 75 W boşalım güçlerinde de gözlemlenmiştir.

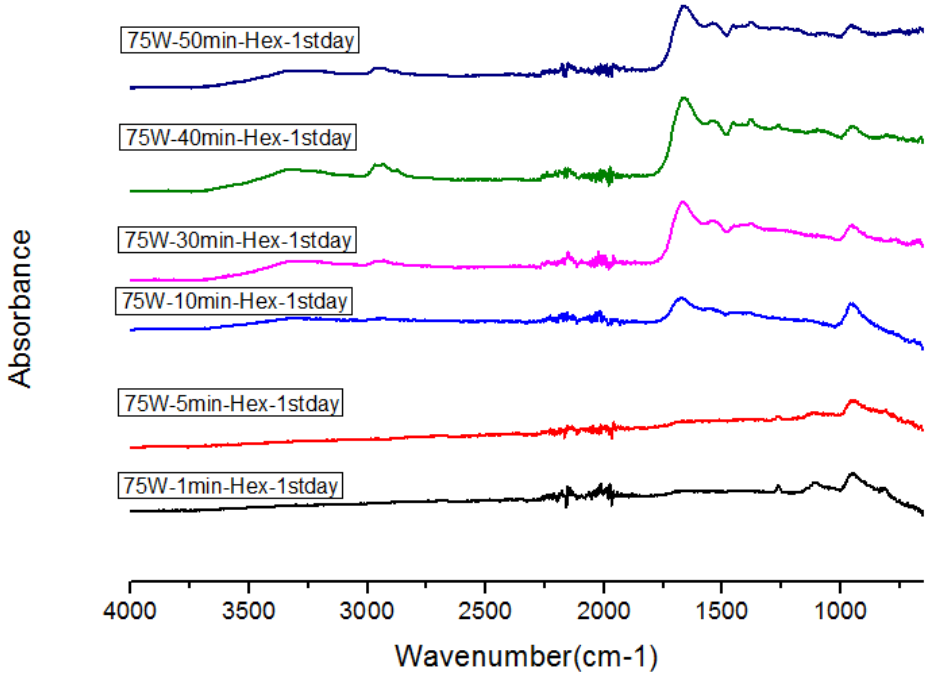
Dolayısıyla, boşalım gücünün artırılmasının yüzey kimyasında kimyasal bazda bir değişime sebep olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.5: Düşük basınç RF-plazma sisteminde 25W boşalım gücünde elde edilen filmin spekturumu.



Şekil 3.6: Düşük basınç RF-plazma sisteminde 50W boşalım gücünde elde edilen filmin spekturumu.



Şekil 3.7: Düşük basınç RF-plazma sisteminde 75W boşalım gücünde elde edilen filmin spekturumu.

Frekans ölçümleri

Karakterizasyon işlemleri ve frekans ölçümü için her modifikasyon işlemi öncesinde reaktör içerisine cam ve QTF alttaşlar eş zamanlı olarak yerleştirilmiştir. Farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile üretilen QTF örneklerinin kaplama sonrasındaki frekans değişimi Tablo 3.2'de verilmiştir.

Frekans değişimlerine bakıldığında değişim seviyelerinin tamamının 0,6 Hz'lik hata payı içerisinde olduğu görülmüştür. Bu durum yapılan modifikasyonun birkaç nanometre olmasından dolayı frekansta sapmaya sebep olmadığını göstermiştir. Ayrıca, plazma modifikasyonunun QTF'in çalışma mekanizmasına herhangi bir zarar vermediği de görülmüştür.

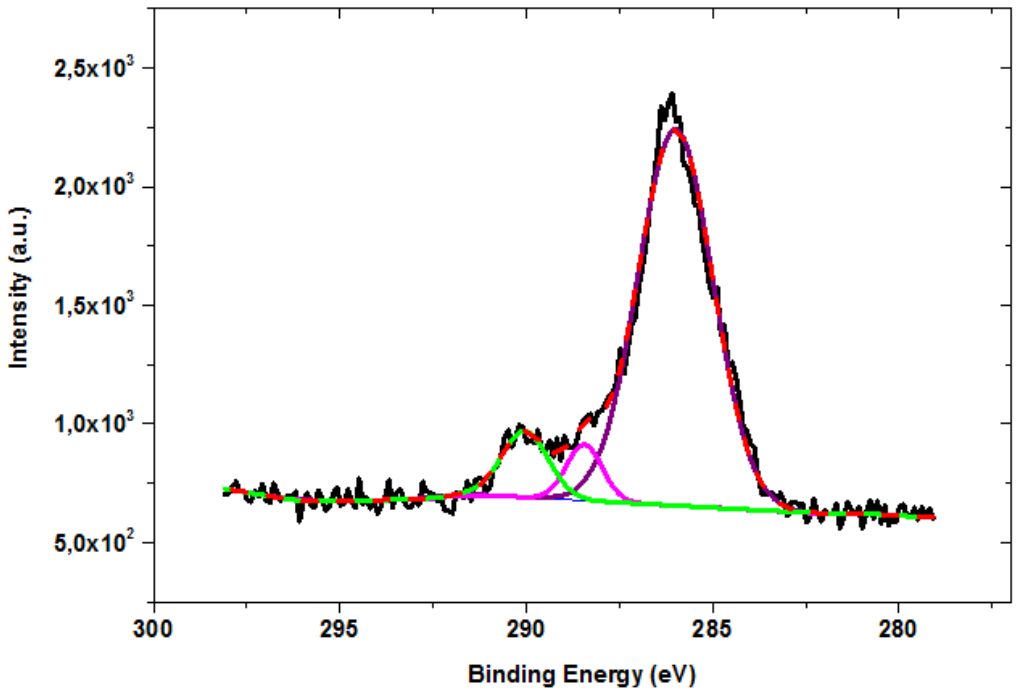
Tablo 3.2: Farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile modifiye edilmiş QTF örneklerinin frekans değişimleri (n=3).

Boşalım gücü (W)	**Uygulama Süresi (dk)**	**Frekans Değişimi (Hz)**	**Boşalım gücü (W)**	**Uygulama Süresi (dk)**	**Frekans Değişimi (Hz)**
25	1	0,6	75	1	0,5
	5	0,2		5	0,5
	10	0,2		10	0,2
50	1	0,6	100	1	0
	5	0,1		5	0,4
	10	0,2		10	0,6

XPS ölçüm sonuçları

n-hekzan ince filmin temas açısı ölçümleri ve ATR-FTIR spektra sonuçlarına göre, her parametrenin karakterizasyon sonuçlarının yakın çıkması optimizasyonun stabilite sonuçları (yaşlanma hızı) üzerinden yapılmasına sebep olmuştur. Yaşlanma hızı çalışmalarına göre seçilen en iyi uygulama koşullarında (75W-10dk) üretilen filmin XPS analizi yapılarak yüzey kimyası belirlenmiştir. C elementinin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

C-1s'in dekonvolüsyon pikleri, 290,04, 288,44 ve 286,10 eV olmak üzere üç bileşene ayrılmıştır. 290,04 eV dekonvolüsyon piki COOH gubunun varlığını işaret etmektedir. 288,44 eV de beliren pik karbonil gubunun varlığını gösterirken (C=O-), 286,10 eV bölgesinde gözlemlenen pik COC/COH gruplarına işaret etmektedir. Piklerde görülen oksijen içerikli grupların varlığı reaktör içerisindeki hava kaynaklı kirliliğin olduğunu onaylamaktadır. Bunun yanısıra XPS sonuçlarında gözlemlenen polar gruplar, plazma modifikasyonu sonrasında gerçekleşen hidrofilikleşme davranışının sebebini de açıklamaktadır. Ek olarak, tahmin edildiği gibi n-hekzan ince filmlerin XPS ölçümleri sırasında azot elementine rastlanmamıştır.



Şekil 3.8: Karbon elementinin XPS sonucu.

Fiziksel ve kimyasal karakterizasyonlar sonucunda PlzP(n-hekzan) ile yüzey modifikasyon işlemi tamamlanan yüzeyler bir sonraki aşama olan biyomolekül immobilizasyonu için yüzeyin amino grupları ile dekore edilmesi bölümüne geçilmiştir. Bu bölümde amino grubu kaynağı olan etilendiamin monomer olarak seçilmiş ve plazma polimerizasyonu işleminde kullanılmıştır. PlzP(n-hekzan) ön-kaplama işleminin etilendiamin ile üretilen ince filmlere etkisinin incelenmesi için ön-kaplamasız PlzP(EDA) ile modifiye edilmiş cam yüzeylerle kıyaslanmıştır. Elde edilen filmlerin tamamının fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu kıyaslanarak en kararlı ve fonksiyonel ince filmler seçilmiştir.

3.1.2. PlzP(EDA) ince filmlerin karakterizasyonu

3.1.2.1. PlzP(EDA) ince filmlerin fiziksel karakterizasyonu

Bu aşamadan sonra deneyler örneklerin Tablo 2.1'de ki plazma parametreleri ile ön-kaplamasız ve ön-kaplamalı yüzeylerin PlzP(EDA) modifiye edilmesi üzerinden devam etmiştir.

3.1.2.2. Temas açısı ölçümleri

Etilendiamin birim molekülde iki amino gruba sahip bir amin bileşiğidir. Etilendiaminin yapısına ve molekülün içerisindeki bağ enerjilerine baktığımızda ilk zayıf bağın C-N bağı olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, eşik enerjinin sisteme aktarılması durumunda bu bağ kırılarak $\bullet NH_2$ radikallerinin reaktör atmosferinde oluşması beklenmektedir. Böylelikle oluşturulacak ince filmin, polar grupların varlığından dolayı teoride hidrofilik özellik göstermesi beklenmektedir. Bu senaryonun yanısıra temas açısındaki düşüş yüzeyde amino grubun oluşmasından kaynaklanabileceği gibi önceki durumda da karşılaştığımız gibi reaktör içerisindeki hava kirliliği kaynaklı oksijen aşındırmasından da kaynaklanabilir. Oksijen aşındırma işlemi n-hekzan ile modifikasyon aşamasında ciddi problem yaratmasa da bu aşamada amino grupların aktifliğini kaybetmesine sebep olabileceğinden sıkıntı yaratmaktadır. Bu nedenle, bu monomer için temas açısı ölçümü bazlı yorum yapmak yanıltabileceğinden kimyasal analizle kesinlikle doğrulanması gerekmektedir.

Plazma modifikasyon tekniklerinde genellikle plazma polimerinin alttaştan bağımsız olarak her türlü yüzeye kaplanabileceği kabul edilmektedir. Fakat kaplama işlemi, plazma fazındaki türlerle alttaşın üst katmanı ve kimyasal yapısı arasındaki etkileşime bağlıdır. Bahsi geçen etkileşimin olmadığı durumda plazma polimeri yüzeye yapışamayacağından kaplama işlemi gerçekleşemez. Bu durum plazma polimerizasyon sırasında alttaş ile plazma polimeri arasındaki etkileşimin tahmin edilememesi ve oluşabilecek etkileri bilinememesinden dolayı göz önünde bulundurulmaktadır [76]. Bu çalışma biyomolekül immobilizasyonu için fonksiyonel yüzey hazırlanmasına olanak sağlamasının yanı sıra ayrıca etilendiamin orijinli ince filmin silikon dioksit ve hidrokarbon bazlı yüzeylere karşı gösterdiği afinite incelenmiştir.

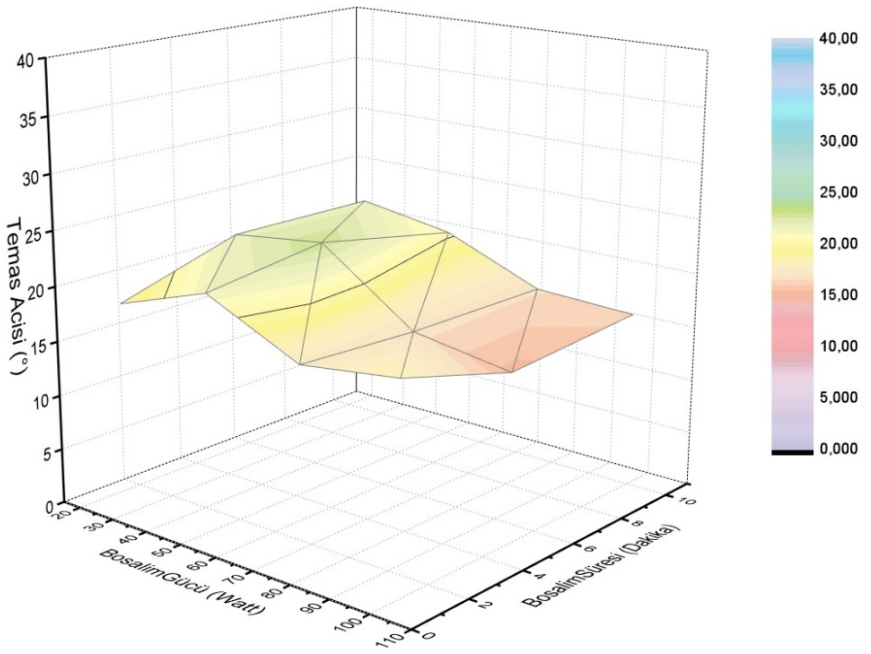
Şekil 3.9 ve Şekil 3.10, sırasıyla ön-kaplamasız PlzP(EDA) ve n-hekzan ön-kaplamalı PlzP(EDA) modifiye edilmiş yüzeylerin plazma parametrelerine karşı temas açısı ölçümlerini vermektedir. Ön-kaplamasız direk cam yüzeylere etilendiamin plazma modifikasyonu uygulandığında, plazma parametrelerinden bağımsız olarak tüm temas açısı ölçümleri 30° olan baz temas açısından düşük ölçülmüştür (Şekil 3.9). Detaylı inceleme için uygulama süresi 1 dakikada sabit tutup boşalım gücü değiştirilerek

gücün etkisine bakıldığında, 25W'lık boşalım gücü cam yüzeylerin temas açısını 17°'ye düşürdüğü görülmüştür. Boşalım gücü 50W'a yükseltiğinde temas açısı 21°'e yükselmiştir. Güç 75W iken 17°, 100W'a ayarlandığında ise 18° bulunmuştur. Genel olarak baktığımızda örnekler arasında anlamlı bir fark gözlemlenememiştir.

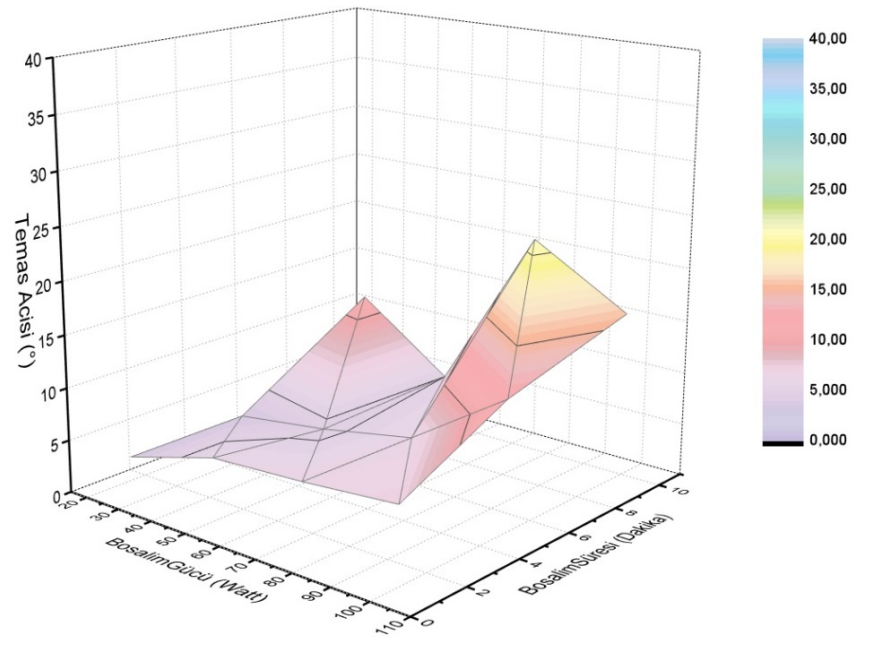
Uygulama süresinin etkisi incelendiğinde, 25W-1dk'da yüzeyler 17° iken süre 5 dakikaya çıkarıldığında 5° artarak 22, 10 dakikaya yükseltildiğinde ise tekrar 22° ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, 25 W boşalım gücünde uygulama süresi artışının temas açısına anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Boşalım gücü 50W'ta sabit tutulup plazma 1 dakika sürede uygulandığında 21° olan temas açısı değiştirilip 5 veya 10 dakikaya artırıldığında 20° olarak ölçülmüştür. 75 W ve 100 W örnekleri de 50 W gibi uygulama süresinden bağımsız olarak yaklaşık 17° ölçülmüştür.

n(hekzan) ön-kaplamalı PlzP(EDA) yüzeylerin temas açılarının boşalım gücü ve uygulama süresine göre değişimi Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Öncelikle uygulama süresi 1 dakika'da sabit tutulup boşalım gücü değişiminden kaynaklı yüzey karakteristiğindeki farklılaşma incelendiğinde, tüm boşalım güçlerinde superhidrofilik yüzeylerin elde edildiği ve boşalım gücü değişiminin anlamlı bir farklılaşmaya sebep olmadığı görülmüştür. Uygulama süresinin etkisine bakıldığında ön-kaplamasız örneklere kıyasla bazı parametrelerde farklılaşmalar gözlemlenmiştir. Örneğin, 25W-10dk ile modifiye edilmiş yüzeyin temas açısı 25W-1 ve 5 dakika yüzeylerinden farklı olarak 11° ölçülmüştür. 75W-10dk ile modifiye edilmiş yüzeyler ise bütün parametreler arasındaki en yüksek açıyı vererek 20° ölçülmüştür. Son olarak 100W-1dk ile üretilen ince filmlerin temas açısı 7° iken, uygulama süresi 5 dakikaya artırıldığında 15° ye yükselmiştir. Uygulama süresi 5 dakika daha uzatılarak 10 dakikaya çıkarıldığında temas açısı yine 15° ölçülmüştür.

Yukarıda ön-kaplamalı ve ön-kaplamasız PlzP(EDA) örneklerinin ilk gün temas açıları detaylı olarak incelenmiştir. Genel olarak ön-kaplamalı ve ön-kaplamasız örneklerin temas açıları karşılaştığında ise ön-kaplamalı örneklerin çok daha fazla hidrofilikleştiği görülmüştür. Bu durum etilendiaminin plazma formuna getirilmesi sonucu oluşan radikallerin hidrokarbon bazlı yüzeylerle etkileşiminin silikon dioksit yüzeylere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.9: Düşük basınç RF-plazma sisteminde farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile üretilen ön-kaplamasız PlzP(EDA) yüzeylerin temas açısı ölçümleri.



Şekil 3.10: Düşük basınç RF-plazma sisteminde farklı boşalım gücü ve uygulama süreleri ile n(hekzan) ön-kaplamalı PlzP(EDA) yüzeylerin temas açısı ölçümleri.

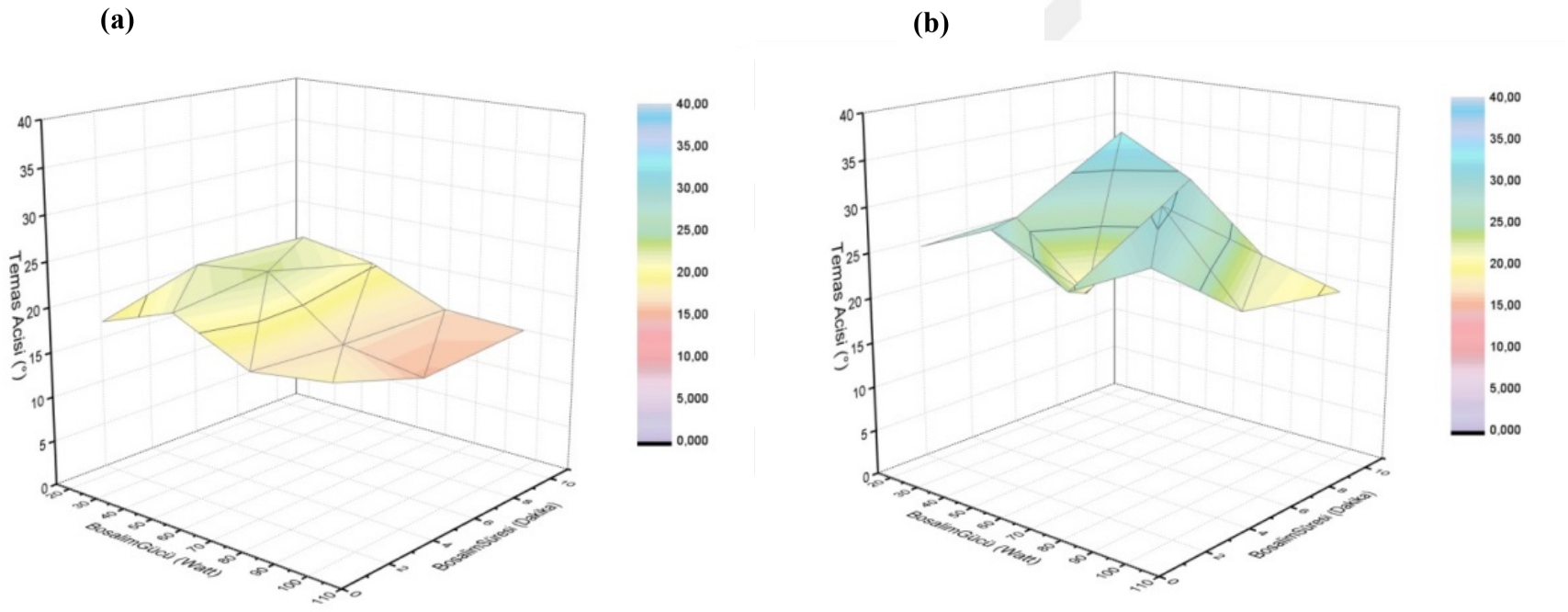
3.2. QTF Yüzeylere Ön-Kaplamanın Etkisi

3.2.1. PlzP(EDA) modifiye ön-kaplamasız yüzeylerin hava ortamındaki yıpranma hızı çalışmaları

Termodinamik yasalar doğrultusunda gerçekleşen "yüzeyin yeniden yapılanması (yüzey yeniden oryantasyonu)", düşük çapraz bağlanmaya sahip ince filmlerde yapısal değişim gözlenmesine neden olabilir. Yeniden oryantasyona ek olarak azot ve oksijen gibi heteroatomlar içeren plazma polimerlerinde post-plazma oksidasyon etkisinde reaksiyon zincirleri etkin hale gelmektedir [93]. Sonuç olarak, plazma polimerizasyon sonucu elde edilen bir filmin farklı günlerdeki davranışının incelenmesi özellikle, amino grubu içeren ince filmlerde ekstra önem taşımaktadır. Doktora tez çalışmasının ikinci aşamasında ön kaplamalı ve ön-kaplamasız QTF yüzeyler, amino grubu içeren EDA monomeriyle modifiye edildiğinden, düşük çapraz bağlanmaya sahip ince filmlerin hava ve sıvı ortamdaki olası yapısal değişimleri 30 gün süresince takip edilmiştir.

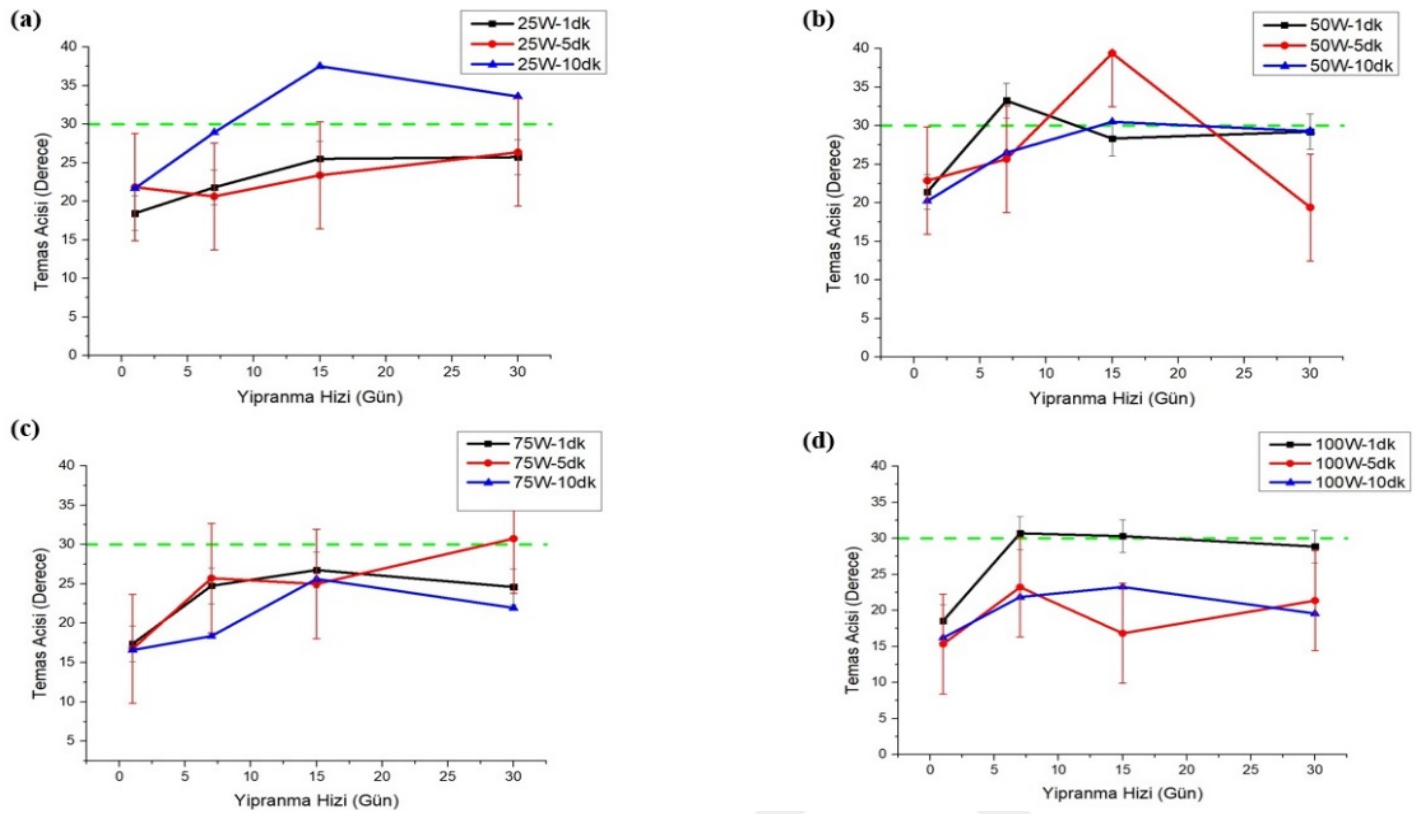
Şekil 3.11'de ön-kaplamasız yüzeylere farklı boşalım güç ve uygulama sürelerinde PlzP(EDA) ile kaplanmış yüzeylerin ilk ve otuzuncu günlerinde alınan temas açısı ölçüm sonuçları verilmiştir. Böylece, ince filmin hava ile teması sonucu yüzeyde oluşan değişimler izlenmiştir. Bölüm 3.1.2.2'de detaylı olarak bahsedildiği gibi boşalım gücü ve uygulama süresi değiştirildiğinde temas açısı ölçümlerinde çoğunlukla anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Filmlerin hava ortamında geçirdikleri otuzuncu gün sonunda ise; 50 W-5 dk, 75 W-10 dk, 100 W-5 dk ve 100 W-10 dk parametrelerinde üretilen ince filmlerin dışındaki tüm filmlerin temas açılarında ciddi seviyede artış gözlemlenmiştir. Bu sonuç, yukarıda belirtilen parametreler dışındaki tüm parametrelerde üretilen filmlerin 30 gün sonucunda hidrofobikleştiğini göstermektedir.

Bahsi geçen temas açısı değişimleri farklı periyotlarda (1-30 gün) takip edilerek Şekil 3.12'de daha detaylı olarak incelenmiştir.



Şekil 3.11: EDA ince filmlerine ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) EDA ince filmlerine ait birinci gün temas açısı ölçüm sonuçları. (b) EDA ince filmlerine ait otuzuncu gün temas açısı ölçüm sonuçları.

Bir dakika uygulama süresinde 25 W güç uygulanarak üretilen filmlerin temas açısı ortalama 17° olarak bulunmuştur. İnce filmlerin yedinci gününde ise, tüm temas açısı ortalama 22°'ye yükselmiştir. 30. güne gelindiğinde filmlerin temas açılarında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Uygulama süresi 5 dakika (boşalım gücü 25W'ta sabit tutulmuştur) çıkarıldığında ise temas açıları ortalama 22°'de sabitlenmiş ve 30 gün boyunca değişmeden stabil olarak kalmıştır. Fakat plazma modifikasyon süresi 10 dakikaya artırıldığında, 1. gün temas açıları ortalama 22° olan film, 7. günde 30°, 15. günde 37°' ye yükselmiş ve son olarak 30. gününde 35°' ye düşerek dalgalanma eğilimi göstermiştir. Boşalım gücü 50 W'a çıkarılıp 1, 5 ve 10 dakika süre ile modifikasyon gerçekleştirildiğinde filmlerin temas açıları ortalama 21° civarında ölçülmüştür. 50 W boşalım gücünde 1 dakika süre ile modifiye edilen yüzeylerin 7. günde temas açıları ortalama 32°'ye yükselmiştir. 15. günlerde ise 27°'ye düşen temas açısı değeri 30. günde sabit kalmıştır. 50 W boşalım gücü altında uygulama süresi 5 dakikaya çıkarıldığında temas açısı yukarıda bahsedildiği gibi sabit kalarak ortalama 21° olarak ölçülmüştür. Üretilen filmin 7. gündeki temas açıları ortalama 25° ölçülmüştür. 15. gün ölçümlerinde ise hızlı bir hidrofobikleşme sonucu ortalama temas açıları 38°'ye yükselmiştir. Uygulama süresi en son parametre olarak seçilen 10 dakikaya çıkarıldığında ise yine temas açıları sabit kalarak ortalama 21° ölçülmüştür. Filmlerin 7. gün temas açıları ortalama 26°, 15. ve 30. günlerde ise 30° ölçülmüştür. 75 W güç uygulanan örneklerin ise 1. gün temas açıları ortalama 17^{o} olarak ölçülmüştür. Birinci gün ölçümleri bütün uygulama sürelerinde aynı olsa da farklı sürelerinde üretileen her filmin zamanla yüzey karakteristiğinde gözlemlenen değişim eğilimi farklıdır. 75 W-1 dk plazma parametresi kullanılarak üretilen filmin 7. gününde temas açısı 24°'ye çıkmış ve 7. günden sonra 30. güne kadar değişmeden kalmıştır. Uygulama süresi 5 dakikaya çıkarıldığında ise 1 dakikada üretilen film gibi 7. gün temas açıları ortalama 24° civarında ölçülmüştür. Fakat, 15. Günde temeas açıları ortalama 30°'ye yükselmiş ve 30. güne kadar sabit kalmıştır. Süre 10 dakikaya çıkarıldığında ise; 7. gün temas açısı 30° ölçülmüş, 15. ve 30. günlerde temas açılarında bir değişim gözlemlenmemiştir. Uygulama süresi 5 dakikaya çıkarıldığında ise 7. gün temas açıları ortalama 22° ölçülmüş ve bu değer 30. Güne kadar sabit kalmıştır. Son olarak, 75 W-10 dk plazma parametreleri ile üretilen filmlerin 30 gün boyunca temas açı değerleri değişim göstermemiştir.



Şekil 3.12: Farklı plazma parametrelerinde üretilen PlzP(EDA) filmlerin yıpranma hızı sonuçları. (a) 25-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (b) 50-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (c) 75-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (d) 100-Watt boşalım gücüne sahip yıpranma hızı sonuçları.

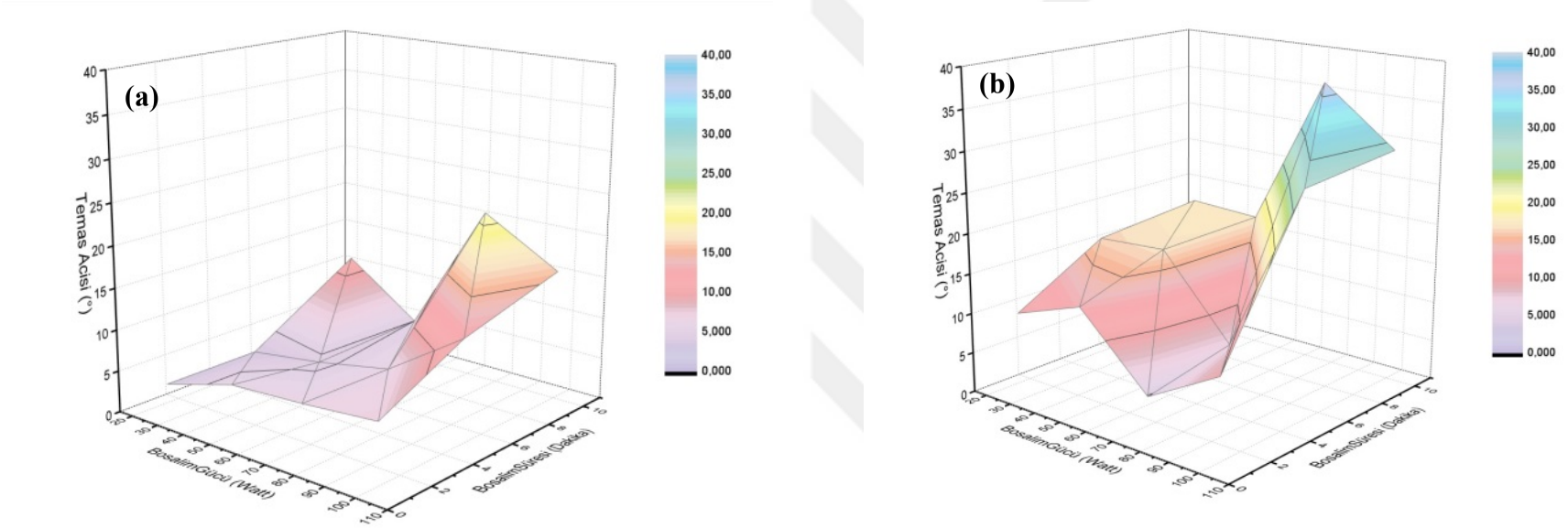
Analiz sonuçları, ön-kaplamasız QTF çevirici yüzeylerine modifiye edilen PlzP(EDA) ince filmlerin yüzeylerindeki polar grupların birçoğunun yüzey yeniden yapılanması ya da post-plazma oksidasyon reaksiyonu sonucunda değişime uğradığını, böylece yüzeyde hızlı bir baz temas açısına yaklaşma trendi olduğunu göstermektedir.

3.2.2. PlzP(n-Hekzan) modifikasyonun (ön-kaplama) PlzP(EDA) ince filminin hava ortamındaki yıpranma hızına etkisi

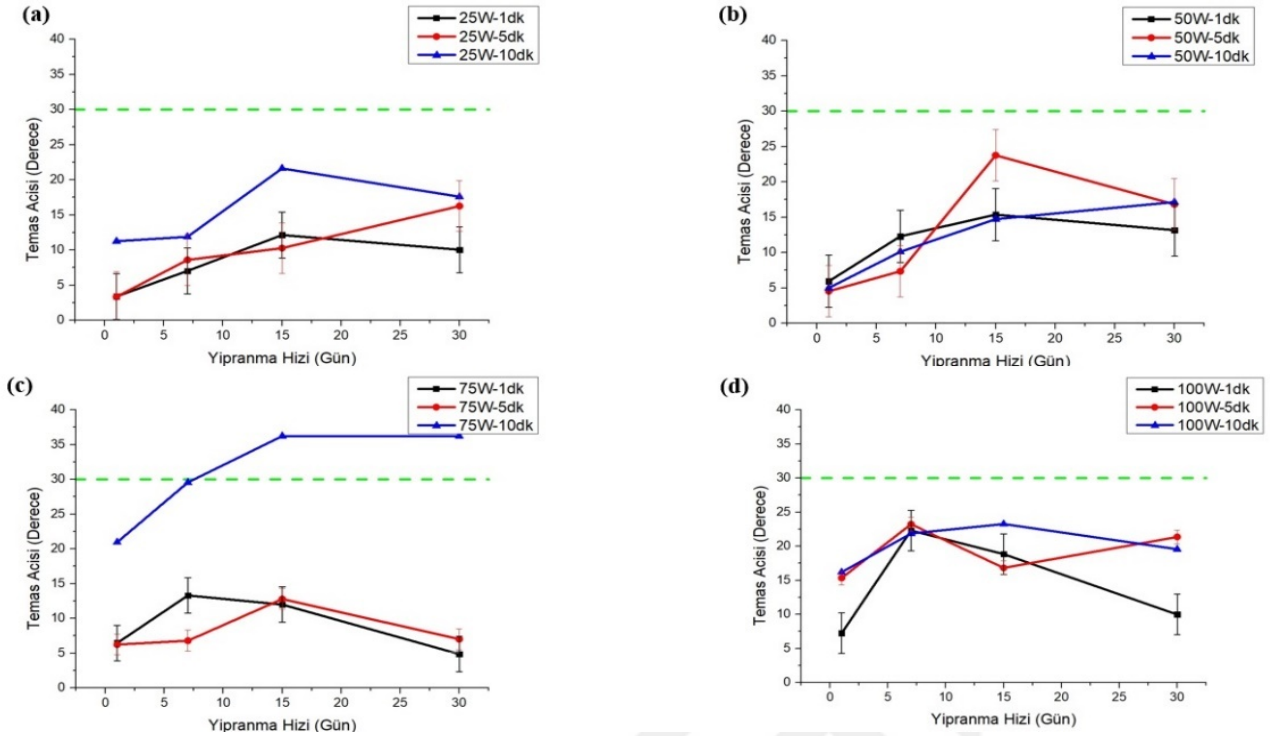
Şekil 3.13'de n(hekzan) ön-kaplamalı yüzeylere farklı boşalım güç ve uygulama sürelerinde PlzP(EDA) uygulanmış yüzeylerin ilk ve otuzuncu günlerdeki temas açısı ölçüm sonuçları verilmiştir. Genel trende bakıldığında 50 ve 75 W ile üretilen filmler dışındaki tüm filmlerde zamanla hidrofobikleşme görülmüştür. Bahsi geçen değişimler 1-30 gün boyunca takip edilmiş, ince filmlerin yüzey polaritelerindeki değişimler Şekil 3.14'te gösterilmiştir. 25 W ile üretilmiş plazmanın 1 dakika boyunca uygulanması sonucu elde edilen ilk güne ait temas açısı ortalama 3° olarak ölçülmüştür. Filmlerin hava ile temasının 7. gününde, açı ortalama 6°, 15. günde ortalama 10° ve son olarak 30. günde ortalama 9° olarak ölçülmüştür. Uygulama süresi 1 dk' dan 5 dk' ya yükseltildiğinde, 1. gün temas açısı ortalama 3° olan yüzeyler, 7. günlerinde 8°, 15. günde 8° ve son olarak 30. günde 11° olarak ölçülmüştür. Son olarak 25 W-10 dk plazma parametreleri ile üretilen ince filmlerin 1. gün temas açısı ortalama 11° olarak ölçülmüştür. Filmlerin hava ile temasının 7. gününde yüzey karakteristiği sabit kalmış ve ortalama 11° olarak ölçülmüştür. İnce filmlerin 15. günlerinde ise temas açılarında ortalama 9°'lik bir artış gerçekleşerek yüzey ıslanabilirliği 20°'ye yükselmiş, 30. günde ise 15°'ye düşmüştür. Özet olarak, 25 W boşalım gücü tüm uygulama sürelerinde ön-kaplama sonrası baz temas açısı olan 17°'den daha düşük bulunmuştur. Kararlılık bazında değerlendirirsek, 25 W-10 dk parametrelerinde üretilen filmler hariç diğer tüm örneklerin kararlı oldukları belirlenmiştir. Boşalım gücü 50 W'a artırıldığında 1 dakika plazma uygulaması sonucunda üretilen filmlerin 1. gün temas açıları ortalama 6° ölçülmüştür. Bu filmlerin hava ile temasının 7. gününde temas açısı 12°'ye yükselmiş ve 30. güne kadar sabit kalmıştır. Uygulama süresi 5 dakikaya artırıldığında ilk ve 7. gün temas açıları ortalama 6° ölçülmüştür. Buna karşın bahsi geçen ince filmler, 15. günde hızlı bir yapısal değişim göstermiş vetemas açıları ortalama 22°'ye yükselmiş, 30. günde ise ortalama 17°'ye düşmüştür. 50 W-10 dk örneklerinde ise 1. gün temas açılarının ortalaması 5°'dir. Filmlerin 7. günde 5°'lik,

15. günde ise yine 5°'lik bir hidrofobikleşme gözlemlenmiştir ve 30. güne kadar 15. gündeki temas açı değeri sabit kalmıştır. Bu durum, bu filmlerin 15 ile 30 gün arasında kalan 15 günlük süreçte 15°'de kaldığını göstermektedir. Boşalım gücü 75 W'a yükseltildiğinde 1 dakikalık uygulama süresi, baz temas açısını 11° düşürmüş ve böylece ortalama 6° olarak ölçülmüştür. Filmlerin 7 ve 15. günlerinde temas açıları sabit kalarak ortalama 11° ölçülmüştür. 30. günde ise film yüzeyler tekrar hidrofilikleşerek temas açısını 4°'ye düşürmüştür. Aynı güç ile üretilen plazmanın 5 dakika süre ile uygulanması sonucunda oluşturulan film yüzeyi 1 dakika ile üretilen filmlerle aynı hidrofilikliği göstermiş ve temas açıları ortalama 6° ölçülmüştür. Hava-yüzey temasının 7. gününde temas açısı değişmeden kalmıştır. Aynı filmlerin 15. gününde ise ortalama 6°'lik bir hidrofobikleşme gerçekleşerek temas açıları ortalama 12°'ye yükselmiştir. Analizin son günü olan 30. günlerinde ise temas açısı tekrar düşerek ortalama 7° olarak kaydedilmiştir. 75 W boşalım gücünde 1 ve 5 dakika uygulama süresinde üretilen ince filmlerin yüksek hidrofiliteleri ve kararlılıklarına karşın, 10 dakika uygulama süresi tamamıyla farklı davranış gösteren bir yüzey oluşturmuştur. Bu uygulama koşulu ile üretilen filmlerin 1. gün temas açıları ortalama 20° çıkarak tüm koşullar arasında en hidrofobik sonucu vermiştir. Filmlerin 7. gününde ise cam yüzey baz temas açısına ulaşarak 30°, 15 ve 30. günlerinde ise ortalama 35° olarak ölçülmüştür. En yüksek boşalım gücü ile üretilen ince filmlere baktığımızda 1 dakika uygulama süresinde üretilen filmlerin ilk gününde yüzey ıslanabilirliği ortalama 7° olarak ölçülmüştür. Fakat 7. günde temas açıları ciddi seviyede yükselerek ortalama 22°'ye çıkmıştır. İnce filmlerin 15. gün temas açıları ortalama 19° ölçülerek anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir. Fakat 30. gün temas açıları ise ortalama 10° ölçülerek yüzeyin kararlılığının düşük olduğunu işaret etmiştir. Diğer bir uygulama süresi olan 5 dakika ile üretilmiş ince filmlere bakıldığında ilk gün temas açısı ortalama 15° ölçülmüş, 7. gün bu açı ortalama 22°'ye yükselmiştir. Ardından 15. günde filmlerin temas açıları ortalama 16°, 30. günde ise 20° ölçülmüştür. 100 W-10 dk ve 100 W-5 dk plazma parametreleri ile üretilen filmler ise benzer davranış göstermiştir.

Ön-kaplamalı yüzeylere baktığımızda 25 W-1 dk, 25 W-5 dk, 75 W-1 dk ve 75 W-5 dk parametreleri ile üretilen yüzeylerin 30 gün boyunca yapısal kararlılıklarını korudukları görülmektedir. Bu sonuç, belirtilen parametrelerde üretilen filmlerin, çapraz bağlanma kapasitesinin yüksek olduğunu dolayısıyla filmlerde yüzeyin yeniden



Şekil 3.13: PlzP(hex) ve PlzP(EDA) ile kaplaması yapılan ince filmlere ait temas açısı ölçüm sonuçları. (a) PlzP(hex) ve PlzP(EDA) kaplamal ince filmlere ait birinci gün temas açısı ölçüm sonuçları. (b) PlzP(hex) ve PlzP(EDA) kaplamalı ince filmlere ait otuzuncu gün temas açısı ölçüm sonuçları.



Şekil 3.14: Farklı plazma parametrelerine ait temas ölçümü ile saptanan yıpranma hızı sonuçları. (a) 25-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (b) 50-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (c) 75-Watt boşalım gücüne ait yıpranma hızı sonuçları. (d) 100-Watt boşalım gücüne sahip yıpranma hızı sonuçları.

yapılanmasının önüne geçilebildiğini göstermektedir.

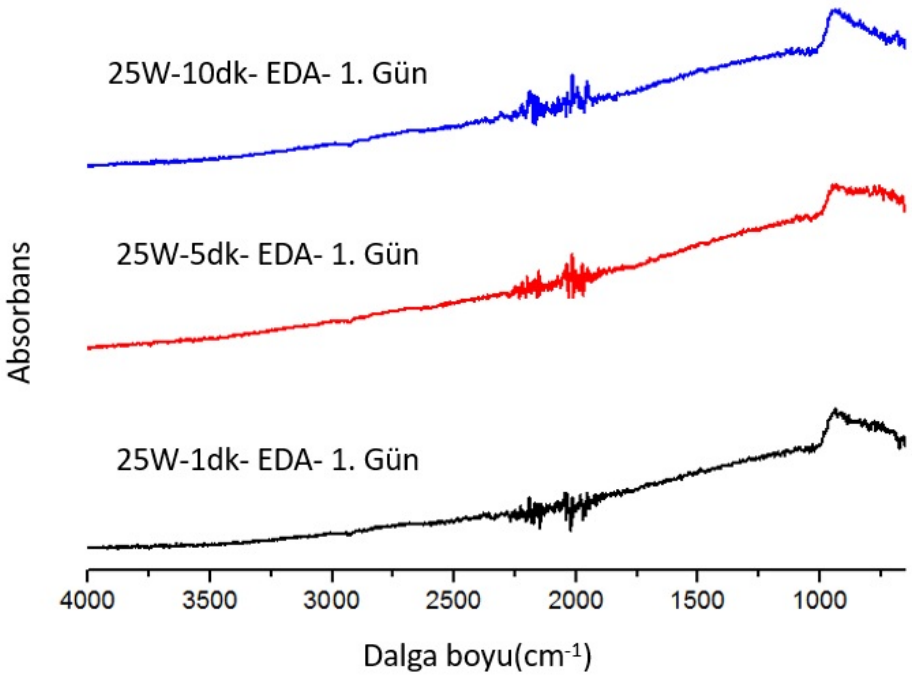
Yukarıda da detaylı bahsedildiği gibi, etilendiamin ile üretilmiş plazma polimerlerinin analizi sadece temas açısı ölçümünden yapılamamaktadır. Bu durumun nedeni, yüzeyin hidrofilikleşmesinin sağlayan grubun $-NH_2$ gruplarından kaynaklanması beklenirken polar bir grup olan ve oksidasyon sonucu açığa çıkan $-NO_2$ grubundan da kaynaklanabilmesidir. Dolayısıyla, yüzey hidrofilitesinin hangi fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı ancak kimyasal karakterizasyon ile analiz edilebilir. Bu amaçla, öncelikle ATR-FTIR ile analiz yapılmış daha sonra seçilen en iyi örneğin XPS ile analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Ön-kaplamasız PlzP(EDA) ince filminin kimyasal karakterizasyonu

3.2.4. FTIR-ATR ölçüm sonuçları

Plazma polimerizasyon yöntemi kullanılarak etilendiamin monomeri ile modifiye edilen yüzeylerin 1. gününe ait ATR-FTIR ölçüm sonuçları aşağıda gösterilmektedir.

Şekil 3.15'te görüldüğü üzere spektrumda herhangi bir pik, dolayısıyla yüzeyde herhangi bir amino grubunun varlığı görülmemiştir. Bunun sebebi, 25 W boşalım gücünün EDA'da bulunan en zayıf bağı (C-N) kırmak için yeterli olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Fakat, literatüre baktığımızda EDA ile çalışan diğer çalışma gruplarının çok daha düşük güçlerde dahi C-N bağını kırarak ince film elde edebildiği görülmüştür [83,94]. Bu çalışmada kullanılan plazma reaktöründe ise etilendiamin monomeriyle plazma oluşturmak için minimum 25 W ve üzerinde güç uygulanması gerekmektedir. Bu durum, çalışma basıncı olarak seçilen ve plazma sisteminin inebildiği minimum basınç olan 0,15 mbarın yüksek kalmış olmasından kaynaklanabilir. Basınç reaktör içerisindeki molekül sayısı ile orantılı olarak değişmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada kullanılan cihazdan kaynaklı olarak reaktör içerisindeki molekül sayısı daha kuvvetli pompa ile çalışan sistemlere kıyasla daha fazladır. Bu durumda, birim moleküldeki C-N bağını kırabilecek enerjiyi moleküle aktarılabilmek için sisteme aktarılması gereken enerji diğer sistemlere kıyasla daha fazla olmalıdır.



Şekil 3.15: 25 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu

Yukarıda belirtilen ihtimale ek olarak, n(hekzan) ile üretilen ince filmlerin çok ince olması, amino gruplarının ATR-FTIR ile ölçülememesine sebep olabilir. EDA filmlerinin temas açılarının ölçümünde 25 W plazma gücüyle üretilen filmlerin hidrofilikleşme davranışı göstermesi, elde edilen sonuçlarda n(hekzan) film inceliğinin etkisinin reaktör türünden daha baskın olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, 50 W boşalım gücü spektrumunun, 25 W boşalım gücü ile elde edilen spektruma benzer olması bu fikri desteklemektedir.

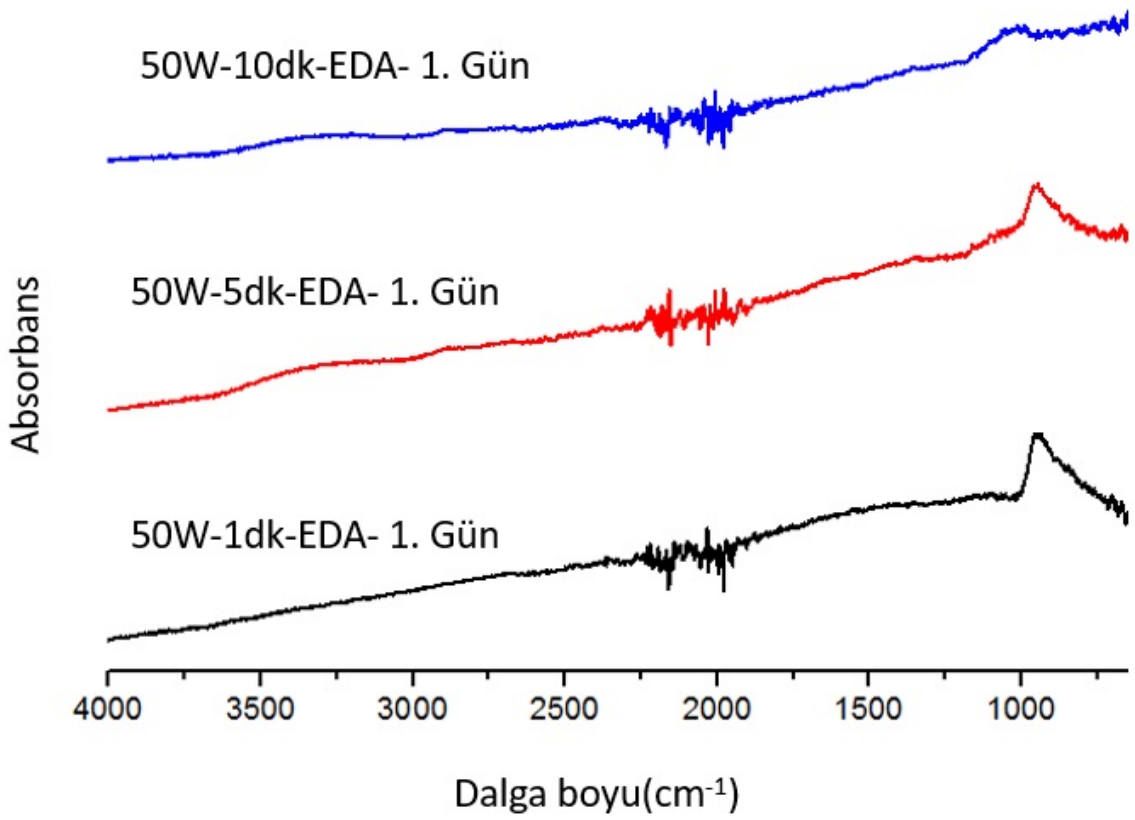
Boşalım gücü 75 W'a çıkarıldığında tüm uygulama sürelerinde üretilen filmlerin spektrum analizlerinde şiddetli piklerin gözlemlenmiştir. Amino grubu bakımından zengin ince filmlerde gözlemlenmesi beklenen birincil amin (N-H) gerilmesi piki 3297 cm^{-1}'de görülmüştür. Bu pikin yanısıra, 1635 cm^{-1}'de amin (N-H) bükülmesi ve 1049 cm^{-1}'de ise C-N gerilmesi pikleri görülmüştür (Şekil 3.17). 75 W boşalım gücü ile elde edilen filmlerin temas açı değerlerine baktığımızda şaşırtıcı bir şekilde diğer boşalım güçlerinden farklı sonuçlar alınmamıştır. Bu durum bir kez daha sadece temas açısı ölçümlerine bakarak amino grubu içeren ince filmler arasında seçim yapılamayacağını göstermektedir.

100 W boşalım gücü ile modifiye edilen film yüzeylerinin ATR-FTIR piklerine bakıldığında ise 25 W ve 50 W spektrumlarına benzer şekilde amino grubunun varlığına dair bir pik görülmemiştir.

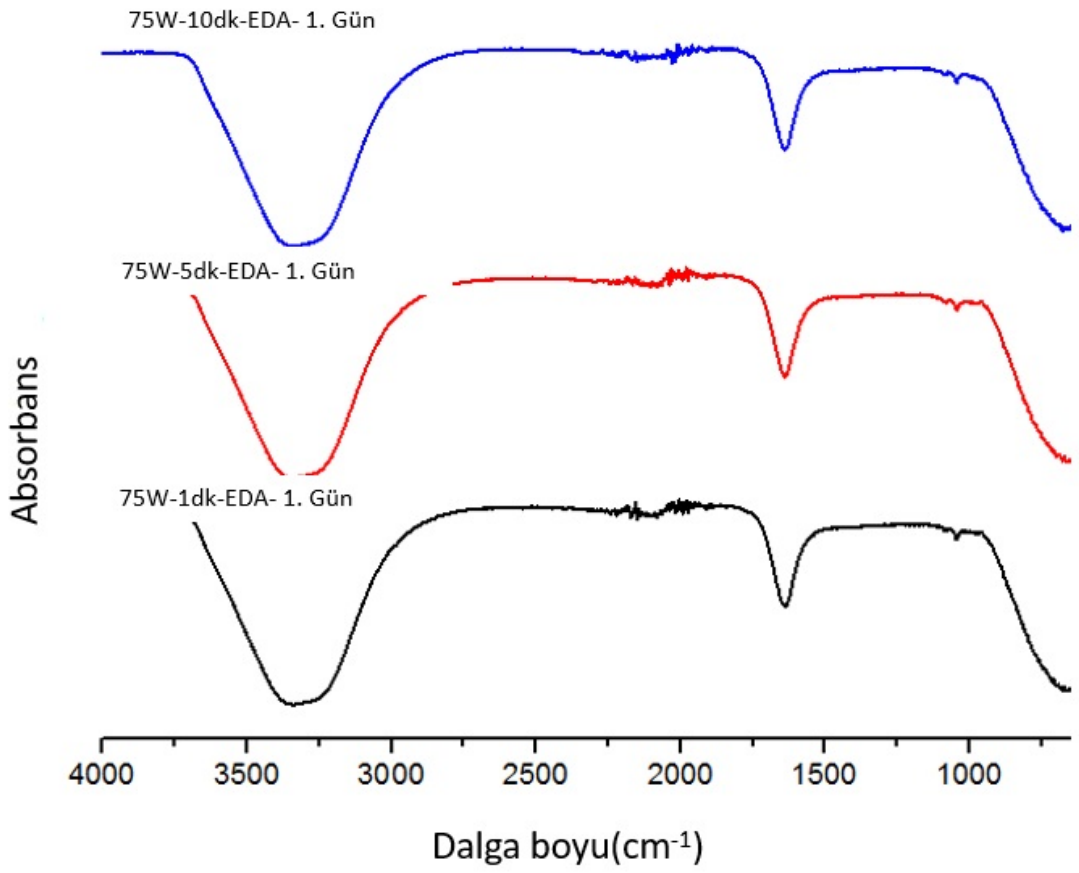
3.2.5. PlzP(n-Hekzan) modifikasyonlu (ön-kaplama) PlzP(EDA) ince filmlerin kimyasal karakterizasyonu

3.2.5.1. FTIR-ATR ölçüm sonuçları

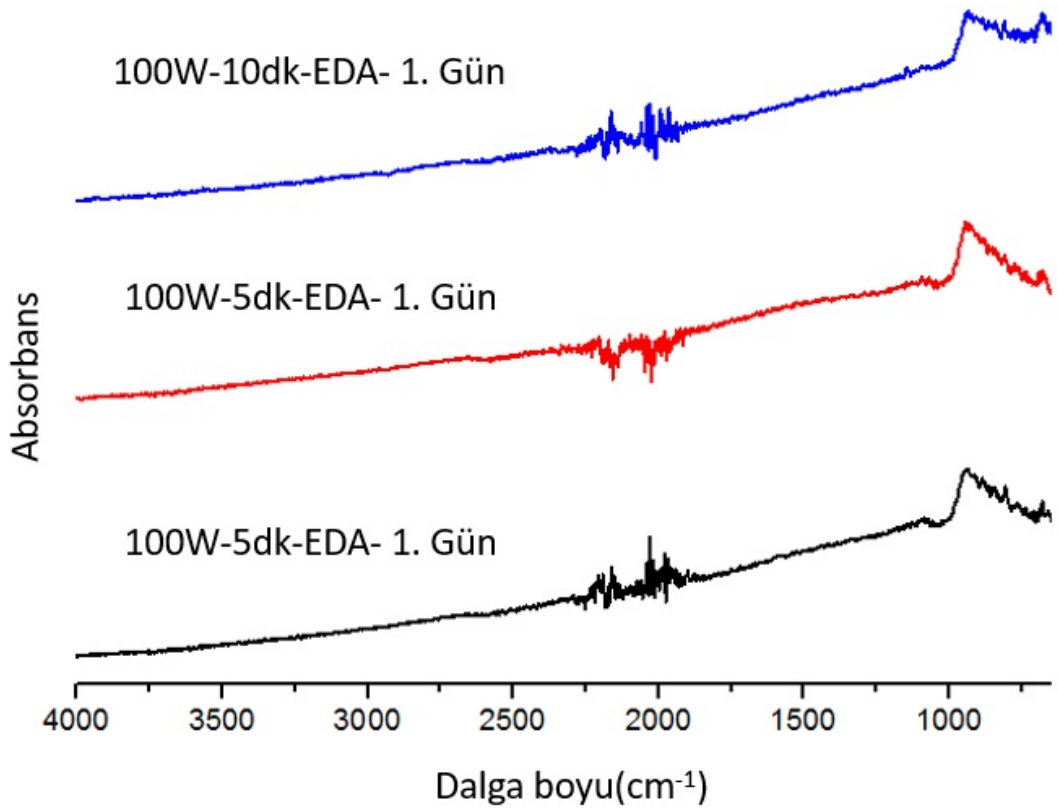
Plazma polimerizasyonu sonrasında yüzeydeki kimyasal değişimler ATR-FTIR ile takip edilmiştir. Bu aşamada, cam yüzeyler referans alınarak ön-kaplamalı yüzeylere farklı boşalım güçleri ve sürelerinde EDA modifikasyonu yapılmıştır. Modifikasyon sonucunda üretilen film yüzeylerinin kimyasal yapıları analiz edilmiştir.



Şekil 3.16: 50 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.



Şekil 3.17: 75 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.



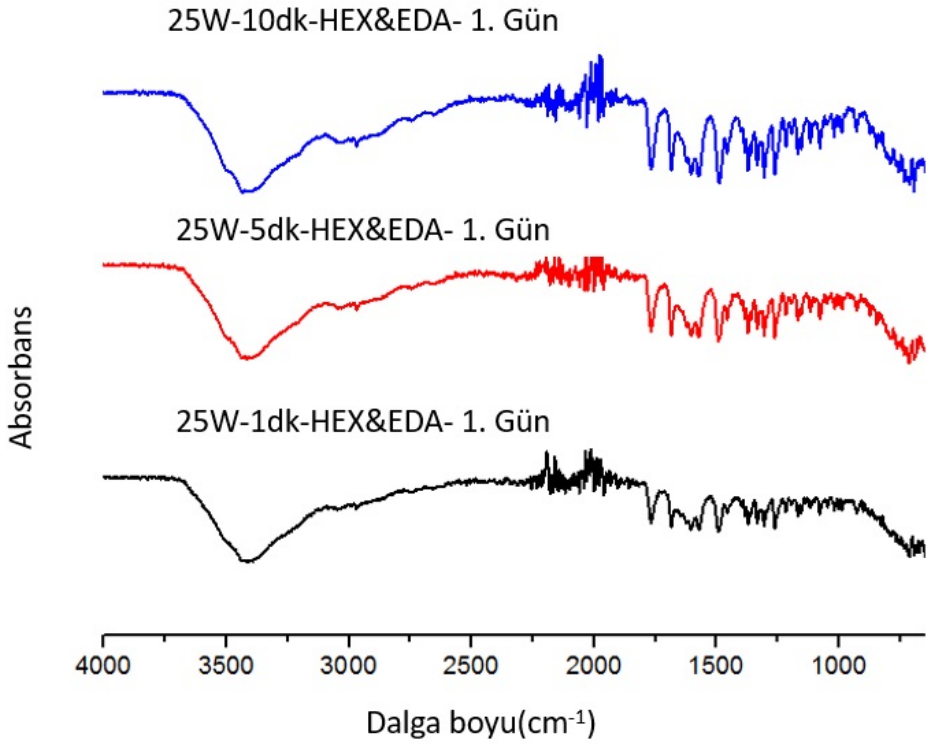
Şekil 3.18 100 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.

Ön-kaplamalı yüzeylere 25 W boşalım gücünde kaplama yapıldığında ön-kaplamasız örneklere kıyasla pik oluşumu gözlemlenmiştir. Bu piklere detaylı bakıldığında, C-H gerilme titreşimleri (2951 cm^{-1}, 2913 cm^{-1} ve 2868 cm^{-1}), C=C gerilmesi (1662 cm^{-1}) ve C-H bükülmesi (1455 cm^{-1}) gözlemlenmiştir. Bu piklerin yanı sıra 3330 cm^{-1} aralığında geniş C-H ve O-H gerilmesi ve 1750 cm^{-1} de keskin C=O gerilmesi gözlemlenmiştir. Bu piklerin, n(hekzan) ön-kaplama aşamasında bahsi geçen alken ve alkan bazlı ince filmin oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu aşamanın nihai amacı olan amino grup eldesi, 25 W boşalım gücü ile elde edilen ince film spektrumdan da görüldüğü üzere amino gruplarına dair herhangi bir karakteristik pik oluşumamasından dolayı gerçekleştirilememiştir (Şekil 3.19). Bu durum görülen piklerin ağırlıklı olarak ön-kaplamadan kaynaklandığını doğrulamaktadır.

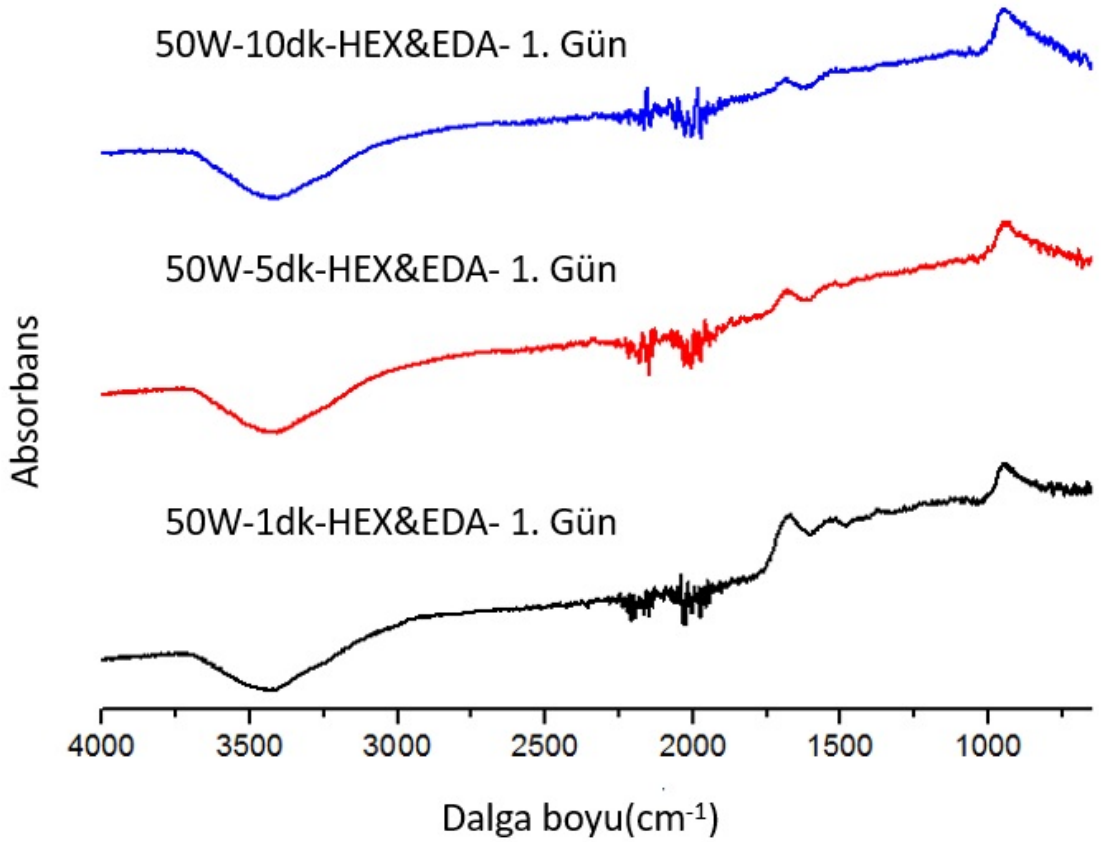
50 W boşalım gücüne ait spektrumda sadece 3370 cm^{-1} civarında geniş O-H gerilme titreşimi ve 1590 cm^{-1} de C=C gerilme titreşimi gözlemlenmektedir. Oksijen plazma ile aşındırılmanın gerçekleşmesi, yüzeydeki diğer piklerin yok olmasının nedeni olarak yorumlanmıştır. 3370 cm^{-1} aralığında görülen pikin varlığı yalnızca EDA ile kaplanan örneğin spektrumuyla paralel sonuç vermekte ve bu görüşü desteklemektedir (Şekil 3.20).

75 W boşalım gücü spektrumunda açıkça görüldüğü üzere amino grup oluşumunu başarı ile sağlanmıştır. Spektrumda amino gruplarına ait karakteristik pikler, 3297 cm^{-1} (birincil amin (N-H) gerilmesi), 1635 cm^{-1} (amin (N-H) bükülmesi) ve 1049 cm^{-1} (C-N gerilmesi) keskin şekilde belirmiştir (Şekil 3.21).

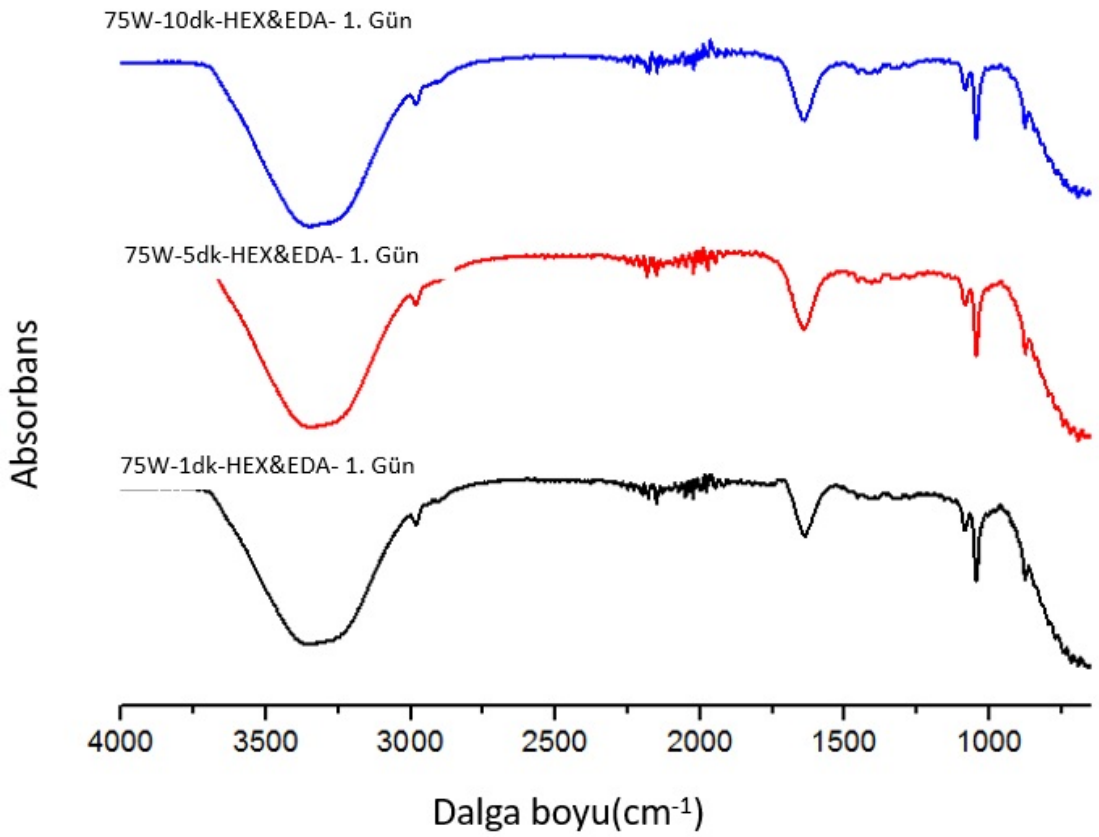
100 W boşalım gücünde ise farklı uygulama sürelerinde farklı spektrumlar elde edilmiştir. 100 W boşalım gücü 1 dakika uygulama süresi ile üretilen ince filmlerde birincil amin gerilmesi (3297 cm^{-1}), amin bükülmesi (1635 cm^{-1}) ve C-N gerilmesi (1049 cm^{-1}) gözlemlenmiştir. Fakat uygulama süresi 5 dakikaya çıkarıldığında bahsi geçen piklerin tamamı kaybolmuştur. Aynı durum 100 W boşalım gücünde 10 dakika uygulama süresi ile üretilen filmlerde de gözlemlenmiştir. Uygulama süresi arttıkça piklerin yok olması yüzeyin zamanla aşındığını göstermektedir. Bu sonuç, reaktör içerisinde hava kaynaklı kirliliğin varlığını kanıtlamıştır (Şekil 3.22).



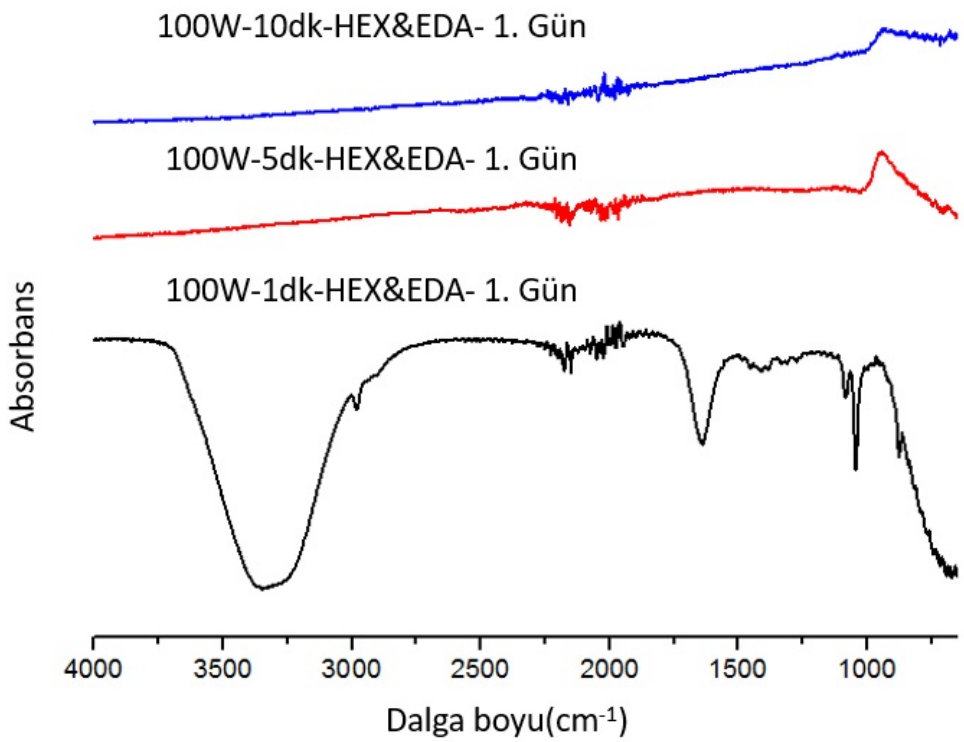
Şekil 3.19: 25 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.



Şekil 3.20: 50 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.



Şekil 3.21: 75 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.



Şekil 3.22: 100 W boşalım gücünde 1,5 ve 10 dk boşalım sürelerinde üretilen ön-kaplamalı EDA filmlerinin ATR-FTIR spektrumu.

Genel olarak ön-kaplamalı yüzeylerin etilendiamin ile farklı boşalım gücü ve uygulama sürelerinde modifiye edilmesi sonucu üretilen filmlerin ATR-FTIR spektrumlarına bakıldığında plazma polimerizasyon tekniği ile amino grubu bakımından zengin ince film eldesi için 75W gücün gerekliliği gözlemlenmiştir.

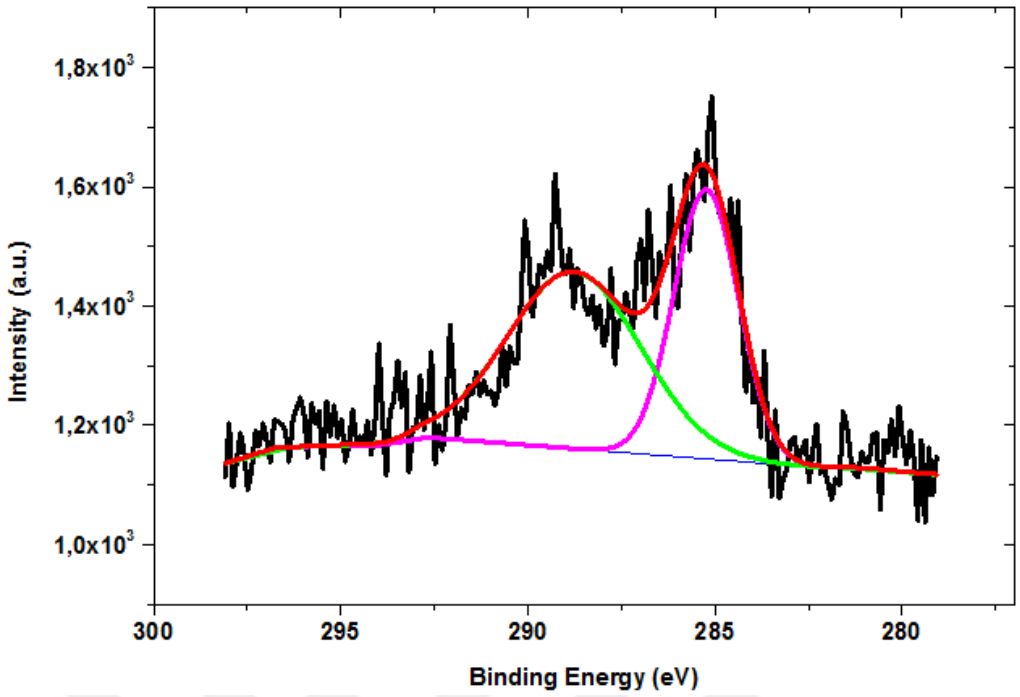
Tüm temas açısı ve ATR-FTIR sonuçları toplu olarak incelendiğinde, amino grubu bakımında zengin ince filmin eldesi 75W boşalım gücü 1, 5 ve 10 dakika uygulama sürelerinde elde edilmiştir.

Yukarıda bahsi geçen çalışma basamaklarının tümü, QTF çevirici yüzeylerinin biyomolekül ile dekorasyonun sağlanabilmesi için gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, seçilecek parametrenin QTF modifikasyonunda kullanılacağı unutulmamalıdır. QTF gibi frekans bazlı çalışan çeviricilerde modifikasyon aşamasında kristal üzerine binen yük miktarı arttıkça kalite faktörü dolayısıyla hassasiyet düşmektedir. Bu sebeple, kullanılacak parametrelerle üretilecek filmin fonksiyonel ve ince olması gerekmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi 75 W boşalım gücünde tüm uygulama sürelerinde fonksiyonel filmler elde edilmiştir. Fakat plazma doğası gereği uygulama süresi arttıkça kaplama kalınlığının da artması beklenmektedir. Bu aşamadan sonra, en uygun plazma parametrelerinin seçimi, ince film modifikasyonunun QTF kalite faktörünü etkisi göz önünde bulundurularak yapılacaktır.

3.2.5.2. XPS ölçüm sonuçları

Yukarıda da detaylı olarak bahsedildiği gibi ATR-FTIR ve temas açısı ölçümü sonuçlarına göre etilendiamin modifikasyonu için en etkin plazma gücü 75 W olarak seçilmiştir. Kimyasal yapının detaylı analizi için, XPS analizi yapılmıştır.

Ön-kaplamasız yüzeylerin 75 W boşalım gücünde etilendiamin ile modifikasyonu sonucu elde edilen XPS spekturumu Şekil 3.23'de verilmiştir. Dekonvolüsyon sonucunda C-1s spektrumunda 285,77 eV ve 288,77 eV'de iki pikin varlığı görülmektedir. Bu pikler sırasıyla, C-O/C-NH ve C=O- gruplarının varlığına işaret etmektedir. Bu sonuç biyomolekül immobilizasyonunda kullanılacak olan amino grubun varlığını kesinleştirmiştir.

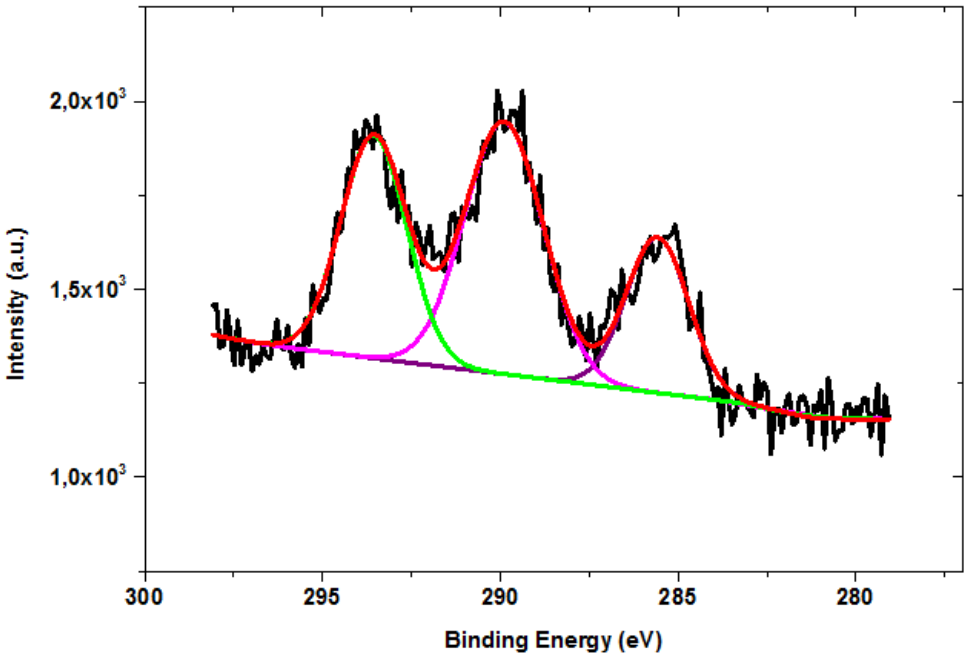


Şekil 3.23: Ön-kaplamasız etilendiamin ince filminde bulunan karbon elementinin XPS sonucu.

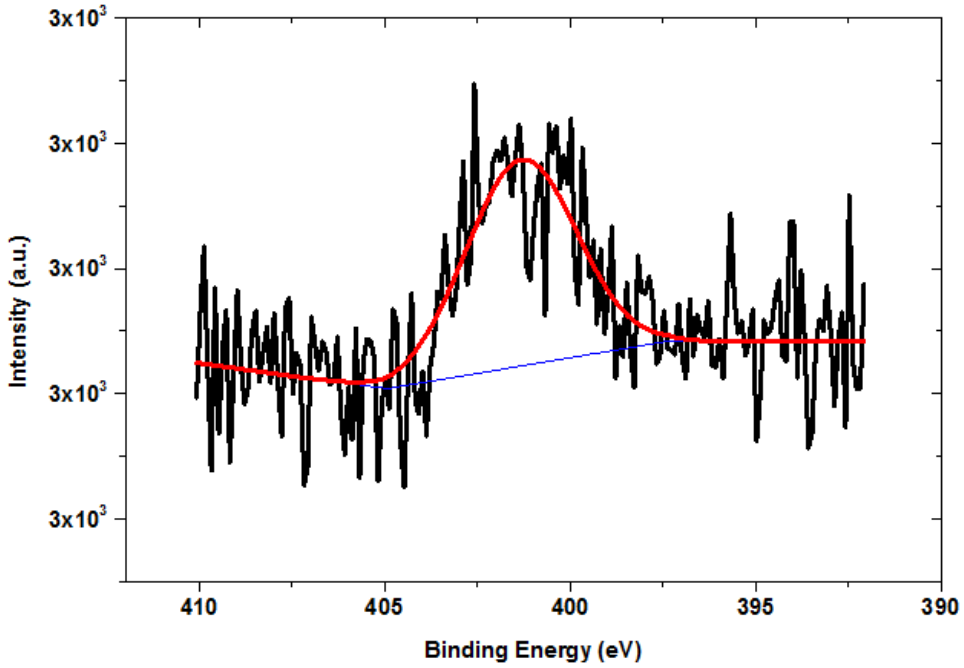
Ön-kaplamalı yüzeylere 75 W boşalım gücünde etilendiamin modifikasyonu yapıldığında ise ön-kaplamasız C-1s spekturumundan farklı bir spektrum elde edilmiştir. Ön-kaplamalı yüzeylerin pik dekonvolüsyonu sonucunda 285,57 eV, 289,90 eV ve 293,55 eV'de üç adet pik görülmektedir. Bu pikler sırasıyla, CO (COC / COH) veya C-NH, OC = O (COOH) ve shake-up uydu piki varlığına işaret etmektedir. Keskin shake-up uydu piki yapıdaki doymamış bağlar sonucu oluşan π-π * geçişinden kaynaklanaktadır (Şekil 3.24). 289,90 ev'da beliren COC/COH ve COOH pikleri PlzP(n-hekzan) ince filmine ait C-1s spekturumunda da görülmüştür. Bu sebeple, ön-kaplamalı PlzP(EDA) spekturumunda bu piklerin görülmesi tamamıyla ön-kaplamadan kaynaklıdır. 289,90 eV' da beliren C-NH piki ise başından beri elde etmeyi amaçladığımız amino grup oluşumunu başarı ile gerçekleştirdiğimizi göstermektedir.

Ön-kaplamasız yüzeylere 75 W boşalım gücünde etilendiamin modifikasyonu yapıldığında amino grubunun varlığından dolayı N-1s spektrumu elde edilebilmiştir. Dekonvolüsyon sonrasında spektrumda 401,32 eV'da bir adet pik görülmüştür. Bu pik

filmdeki C-1s spekturumu ile paralel bir sonuç vererek C-N bağının varlığını göstermektedir (Şekil 3.25).

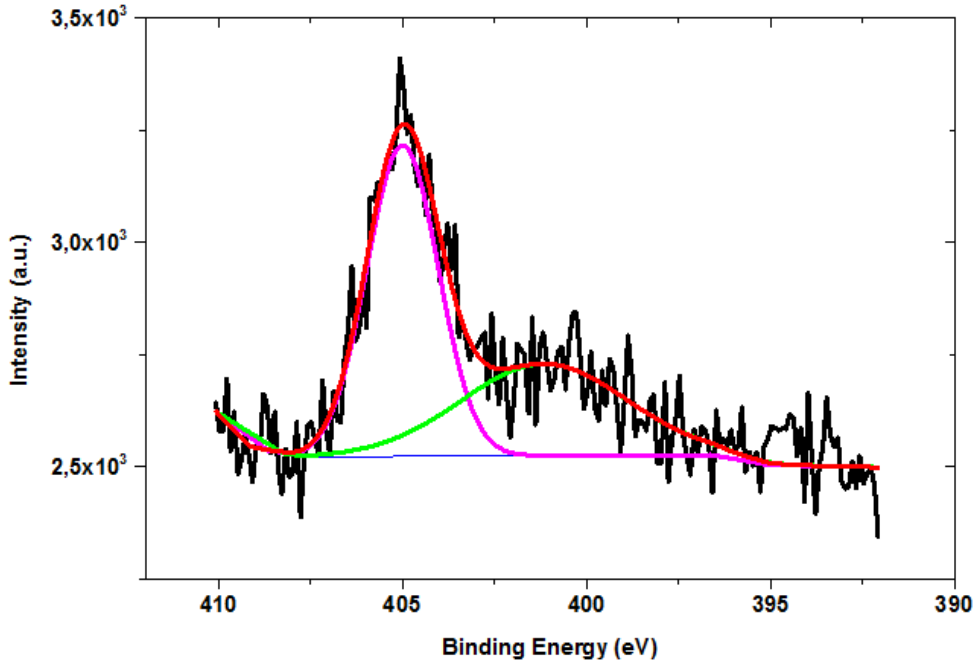


Şekil 3.24: Ön-kaplamalı etilendiamin ince filminde bulunan karbon elementinin XPS sonucu.



Şekil 3.25: Ön-kaplamasız etilendiamin ince filminde bulunan azot elementinin XPS sonucu.

Ön-kaplamalı yüzeylerden elde edilen N-1s spekturumuna baktığımızda, 401,16 eV'ta C-N bağı ve 405,01 eV'ta N-O bağı gözlemlenmektedir (Şekil 3.26). Bu durum yüzeyde amino gruplarının oluşumunun gerçekleştiği fakat bazı amino gruplarının oksidasyon sonucu N-O grubuna dönüştüğünü göstermektedir.



Şekil 3.26: Ön-kaplamalı Etilendiamin ince filminde bulunan azot elementinin XPS sonucu.

3.2.5.3. AKM analizi sonuçları

Kimyasal ve fiziksel analizler sonucunda belirlenen optimum koşulların yüzey morfolojisine etkisinin daha detaylı olarak incelenebilmesi için yüzey AKM ile görüntülenmiştir. Görüntülerin tamamı 2 μm x 2 μm'lik bir alandan alınmıştır. Kaplama yapılan yüzeylerin pürüzlülüğü ortalama karekök (*Rq*) değeri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Öncelikle, modifiye edilmemiş cam yüzeylerin pürüzlülüğü test edilmiş ve 2,28 nm bulunmuştur. Bu pürüzlülüğün cam yüzeydeki kusurların sebep olduğu düşünülmektedir. Plazma ile modifiye edilmiş yüzeylere bakıldığında bütün yüzeylerin eşdağılımda (uniform) kaplandığı görülmektedir. Bütün plazma ile modifiye edilmiş yüzeylerin pürüzsüz olarak kaplandığı görülmektedir (Şekil 3.27). PlzP(n-hekzan), ön-kaplamasız PlzP(EDA) ve ön-kaplamalı PlzP(EDA)

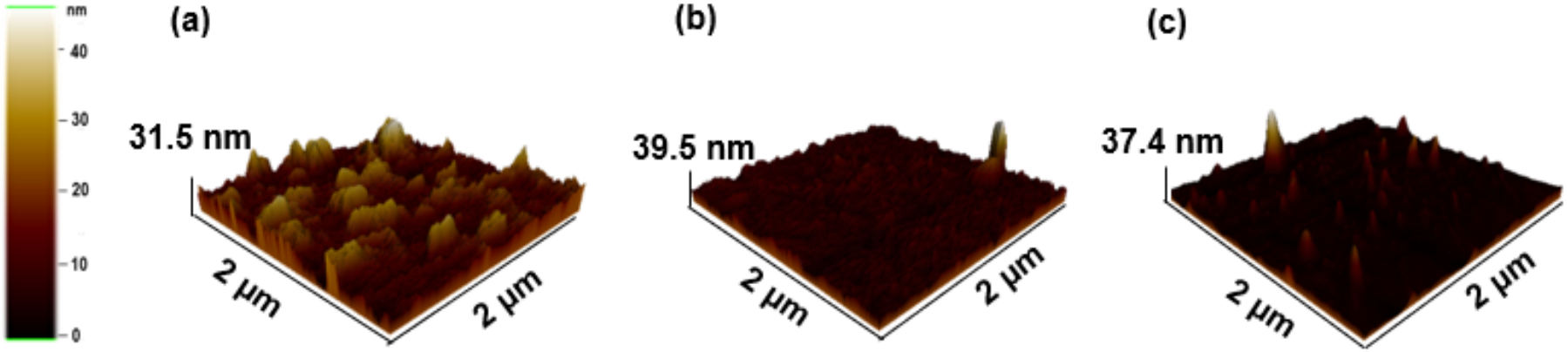
örneklerinin pürüzlülük seviyelerine bakıldığında *Rq* değerleri sırasıyla 3,64, 2,22 ve 2,55 nm bulunmuştur.

Plazma polimerizasyon yöntemi ile 75W boşalım gücü 10 dakika uygulama süresinde n-hekzan prekursöründen ince film eldesi 0,8 nm/dk olarak bulunmuştur. Bu derece düşük birikim hızının ardındaki neden prekursörün plazma polimerine dönüşümü için gerekli enerjinin daha yüksek olması, dolayısıyla 75W düşük gelmesinden kaynaklanabilir. 75W boşalım gücü 1 dakika uygulama süresi ile üretilen PlzP(EDA) ön-kaplamasız yüzeylere kaplandığında pürüzlülük 2,22 nm, birikme hızı ise 7nm/dk bulunmuştur. Aynı koşularda etilendiamin modifikasyonu ön-kaplamalı yüzeye yapıldığında ise kaplama kalınlığı 12 nm bulunmuştur.

Plazma polimerizasyon işlemi başarı ile optimize edilip plazma koşulları sabitlendikten sonra, üretilen filmlerin QTF' in performansına etkisi, yüzey aktivasyonu ve anti-fenilalanin aşamalarına gerçekleştirilmiştir. Fakat, bu aşamadan önce plazma polimerizasyonunun QTF performansına etkisinin anlaşılabilmesi için öncelikle modifiye olmamış QTF'lerin havadaki davranışı ve frekans ölçüm sistemi üzerine çalışılarak frekans değişiminin tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla, sonraki aşamalara geçilmeden önce modifiye olmamış QTF'in frekans ölçümü ve ölçüm sisteminin optimizasyonu çalışılmıştır.

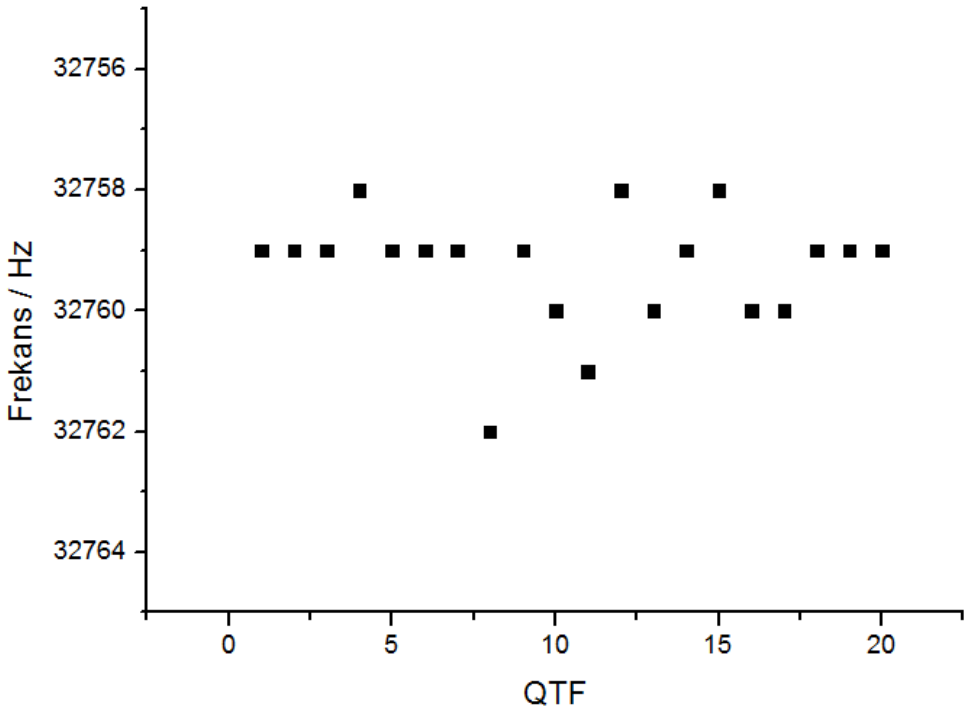
3.3. Çıplak QTF'in Frekans Ölçümü ve Frekans Ölçüm Sisteminin Optimizasyonu

Kuvars ayar çatalı; yüksek stabilitesi, yüksek hassasiyeti ve düşük enerji tüketimi ile frekans ölçüm sistemlerinin vazgeçilmez bir bileşenidir. Bu mikrokantileverler yüksek performansı sebebiyle son zamanlarda görüntüleme ve sensör teknolojilerinde de kullanılmaya başlanmıştır. QTF'in sensör alanında çevirici olarak kullanımı için diğer çevirici türlerinde de olduğu gibi yüzey modifikasyonu ile tanıyıcı yüzeyin aktifleşirilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla, öncelikle metal silindirin çıkarılarak QTF çatallarının açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu işlem sonucunda açığa çıkan çıplak QTF'lerin çevirici olarak kullanılabilmesi için öncelikle hava ile etkileşimi sonucu rezanons frekansındaki sapmanın seviyesi, kalite faktörüne etkisi ve ticari olarak alınan frekans ölçüm cihazının hata payı tanımlanması gerekmektedir.



Şekil 3.27: (a) PlzP(n-hekzan), (b) ön-kaplamasız PlzP(EDA), (c) ön-kaplamalı PlzP(EDA) ile modifiye edilmiş yüzeylerin 3D AKM mikrografisi.

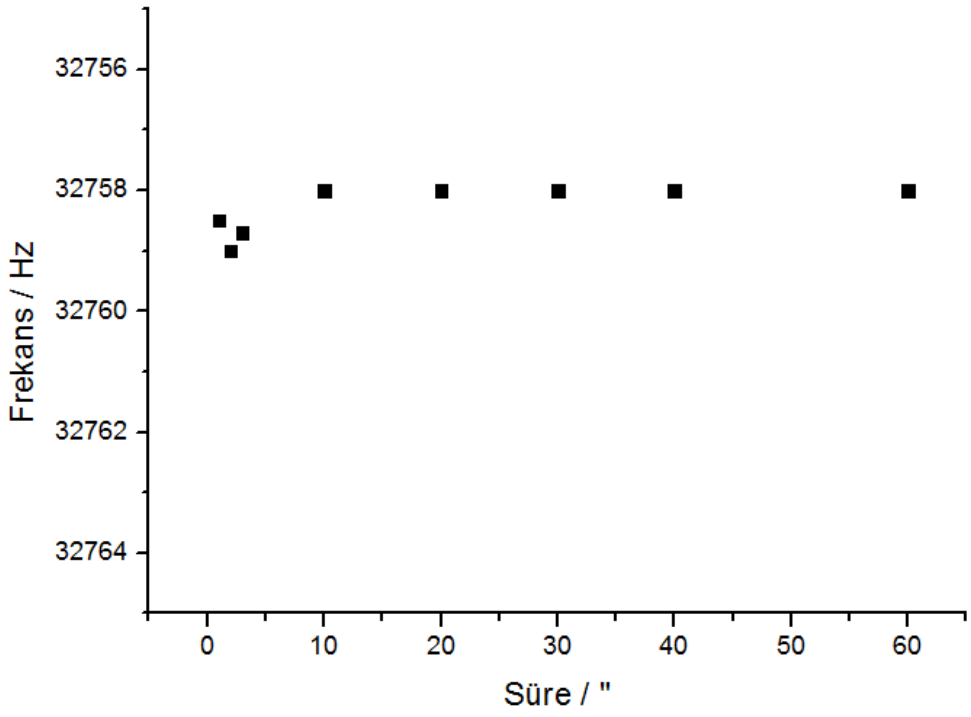
Bu bağlamda, öncelikle 20 farklı çıplak QTF'in rezonans frekansı ölçülmüştür. Normalde metal silindir için vakum altında muhafaza edilen QTF'lerin rezonans frekansı 32768 Hz olarak ölçülmektedir. Fakat, vakum altındaki metal silindir kabından çıkarıldıktan sonra QTF'in hava ile etkileşimi sonucu baskılanmasından dolayı rezonans frekansında düşüş gözlemlenmiştir. Şekil 3.28'de görüldüğü gibi hiçbir QTF örneği vakum altındaki rezonans frekansına yakın bir frekans değeri vermemiştir. Baskılanma kaynaklı minimum değişim 6 Hz, maksimum kayma 10 Hz olarak ölçülmüştür. 20 farklı QTF'ten toplanan rezonans frekanslarının ortalama değeri 32759,1 ± 0,6 Hz olarak bulunmuş ve bu değer modifiye edilmemiş QTF için baz frekans değeri olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma sırasında elde edilen 0,6 Hz'lik hata payının, üretilen QTF'lerin tamamıyla özdeş olmaması ve/veya frekans ölçüm cihazından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmanın geri kalanında vakumdan çıkarılan QTF'lerin frekansı ölçülmüş ve 0,6 Hz'lik hata payı göz önünde bulundurularak belirlenen frekans aralığında olmayan QTF'ler ile çalışılmamıştır. Böylece, vakumdan çıkarılma işlemi sırasında zedelenen QTF'ler elimine edilmiştir.



Şekil 3.28: Modifiye edilmemiş QTF'lerin rezonans frekans sonuçları.

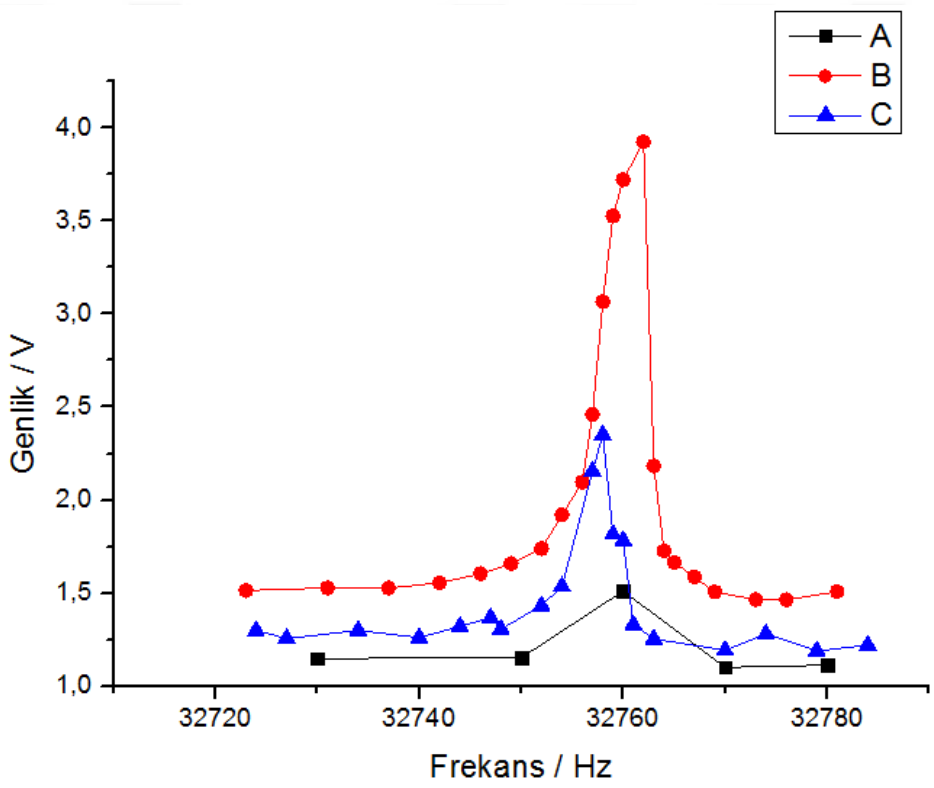
Çıplak QTF'lerin hava ortamındaki rezonans frekansının saptanmasından sonra, rezonans frekansına karşılık ölçüm süresi çalışılarak alınan rezonans frekansının süre ile bağlantısı incelenmiştir.

Bu takip, QTF'in voltaj etkisi ile titreştirilmesinden sonra ne kadar sürede dengeye geldiği yani sabit bir rezonans frekansında salındığı çalışılmıştır. Bu çalışma, ölçüm süresinin getirdiği olası bir frekans farkı kaynaklı hatanın önüne geçilmesi amacı ile yapılmıştır. Şekil 3.29'da da görüldüğü gibi ilk 5 dakikada düşük seviyelerde frekans sapması gözlemlenmiştir. Vakumdan çıkarılmış QTF örneklerinin ayrıldıktan 1 dakika sonraki rezonans frekansı 32758,5 Hz bulunmuştur. Aynı QTF'in 3. dakikadaki frekansı 0,6 Hz'lik bir değişme ile 32759,1 Hz çıkmış, 5. Dakikada 0,2 Hz'lik bir değişme ile 32758,9 Hz'e düşmüştür. 10. dakikadan sonra ise frekans değerinde herhangi bir değişim gözlemlenmemiş ve frekans 32758 Hz'de sabitlenmiştir. Frekans ölçümünden sonra ilk 5 dakikada bir sapma varmış gibi görünmüş olsa da frekans farkı yukarıda hesaplanan 0,6 Hz hata payının altında olmasından dolayı önemli bir değişim olarak kabul edilmemiştir. Bu sonuç aynı zamanda, bahsi geçen hata payının frekans ölçüm cihazından kaynaklandığını da düşündürmüştür.



Şekil 3.29: Farklı sürelerde rezonans frekans ölçümü.

Sensörün hassasiyetini doğrudan etkileyen ve bu sebeple çalışmamız boyunca takip edilen kalite faktörü, öncelikle referans olarak alınacak çıplak QTF'lerle çalışılmıştır. Üç farklı çıplak QTF'den rezonans eğrisi dataları toplanarak kalite faktörü hesaplanmıştır. Şekil 3.30'da görüldüğü gibi kalite faktörü sonuçları sırası ile 5952,8, 6411,6 ve 7001,2 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, üç adet aynı rezonans frekansına sahip örneklerin birbirlerinden tamamıyla farklı kalite faktörüne, dolayısıyla farklı hassasiyete sahip olabileceği görülmüştür. Bu nedenle, çalışma boyunca yüksek performansa sahip immünosensörün eldesi için rezonans frekansının yanı sıra kalite faktörü takibi de yapılarak düşük kalite faktörüne sahip çıplak QTF'ler ile çalışılmamıştır.



Şekil 3.30: Modifiye edilmemiş farklı QTF'lerin rezonans frekans değerleri.

3.4. İki Aşamalı Plazma Polimerizasyon İşlemi Sonrası Kalite Faktördeki Değişim

Daha önceki biyosensör tasarımı denemesinde ıslak kimya kullanılarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Fakat yüzeydeki homojenlik probleminden dolayı

kalite faktöründe düşüş gözlemlenmiştir. Bu sebeple ürettiği filmlerdeki homojenliği ile ünlü olan plazma polimerizasyon kullanılarak yüzey modifikasyonu yapılmıştır.

Tablo 3.3: Plazma polimerizasyon yönteminin Kalite Faktörüne Etkisi.

Örnek İsmi	**Kalite Faktörü (Q)**
Modifiye Edilmemiş QTF	6455,2 ± 429,1
hex + eda-QTF (75W1")	3887,1 ± 1343,6
hex + eda-QTF (75W5")	5361,3 ± 1647,3
Hex + eda-QTF (75W10")	6042,8 ± 1182,5

3.5. Glutaraldehit Aktivasyonu

QTF'lerin plazma polimerizasyon yöntemi ile iki aşamalı modifikasyon sonucunda yüzeyde amino grubu içeriği bakımından zengini ince filmlerin eldesi edilmiştir. Biyolojik ajanın yüzeye bağlanması için sonuncu adım olan yüzey aktivasyonu farklı sürelerde glutaraldehitle muamele edilerek maksimum aktivasyonu sağlayan koşulların saptanması için çalışılmıştır. Glutaraldehit yüzeyin en üst katmanınında (~1-2 nm) modifikasyona sebep olması nedeniyle muamele öncesi ve sonrasındaki frekans ölçümleri üzerinden aktivasyon konusunda başarılı olup olmadığımız anlaşılamamaktadır. Bu sebeple, modifiye edilen yüzeyler 100 μM BSA çözeltisinde bekletilerek frekans kaymaları takip edilmiştir. Glutaraldehite aktivasyon işlemi daldırma ve buharda bekletme şeklinde iki farklı teknik ile %2, %5, %10, %20 ve %25'lik derişimlerde 5, 10, 15, 30, 60, 120 dakika sürelerde uygulanmıştır. Modifikasyon işleminden sonra beklenildiği gibi frekanslarda herhangi bir sapma gözlemlenmemiştir. BSA ile 2 saatlik muamele sonrasında sadece %25 lik derişim ve 120 dakikalık muamele süresinde daldırma yöntemi ile 52 Hz'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu yüzden, sonraki aşamalarda aktivasyon işlemi %25 lik glutaraldehit kullanılarak 2 saat süreyle daldırma yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Glutaraldehit aktivasyonu eniyileştirilmesinden sonra 75W 1, 5 ve 10 dakikalık örneklere belirlenen süreç uygulanmış ve sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi modifikasyon yüzeyde gerçekleşmesinden dolayı beklenildiği gibi kalite faktöründe ciddi bir düşüş gözlemlenmemektedir. Bu durum, yüzeyde yapılan

hem fonksiyonelleştirme işlemi hem de aktivasyon işleminin QTF in hassasiyetinde herhangi bir düşüşe sebebiyet vermeden başarı ile tamamlandığını göstermektedir.

Tablo 3.4: Glutaraldehit aktivasyonunun kalite faktörüne etkisi.

Örnek İsmi	Q_{baz}	$Q_{gluteraldehit}$
Modifiye Edilmemiş QTF	6455,2 ± 429,1	-
hex+eda-QTF (75W1")	3887,1 ± 1343,6	4035,61 ± 1544
hex+eda-QTF (75W5")	5361,3 ± 1647,3	5128,17 ± 250
hex+eda-QTF (75W10")	6042,8 ± 1182,5	5128,17 ± 175

3.6. Anti-fenilalanin İmmobilizasyonu

Aktivasyon sonrası antikor immobilizasyonuna hazır hale gelen QTF'ler 30 dakika 10 µL anti-fenilalanin (10 µg/ µL) damlasının içinde bekletilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında frekans ölçümleri takip edilerek en uygun kaplama parametresine karar verilmiştir. Tablo 3.5'te görüldüğü gibi anti-fenilalanin immobilizasyonundan sonra üç kaplamada da frekansta kayma gözlemlenmiştir. Fakat, 75W-10dk plazma parametreleri ile kaplanan örneklerde 49 Hz seviyesinde büyük bir düşüş gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin 75W-10dk ile hazırlanan örneklerin aktif amino grubu varlığı içermesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu durum, yüzeyin daha fazla antikor immobilizasyonuna ve dolayısıyla daha fazla frekans sapmasına neden olabilir.

3.7. Anti-fenilalanin /fenilalanin Etkileşiminin İncelenmesi

Yüzeyi başarıyla anti-fenilalanin ile dekore edilen QTF'ler 100 mM L-fenilalanin daldırılmış ve 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra yıkanarak bağlanmamış fenilalaninin ortamdan uzaklaştırılmış ve böylece, sadece anti-fenilalanin/L-fenilalanin etkileşiminden kaynaklı frekans değişimi saptanmıştır (Tablo 3.6).

75W-1dk ile modifiye edilmiş QTF örnekleri fenilalanin ile muamele işlemi sonrasında frekansta 43,1 Hz lik bir yükselme gözlemlenmiştir. Bu durum, daldırma işlemi sırasında yüzeydeki bütün fonksiyonelleştirme, aktivasyon ve anti-fenilalaninin yüzeyden kalktığı kanaatini uyandırmıştır. Plazma uygulama süresi 5 dakika olan QTF

lerde ise herhangi bir frekans değişimi gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, yüzeye anti-fenilalanin tutuklanırken aynı zamanda yüzeyden filmin kalktığına işaret etmektedir. 75W-10dk plazma parametreleri ile hazırlanmış örneklerde ise 41,3 Hz lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu sebeple 75W-10dk optimum plazma parametresi olarak seçilmiştir.

Tablo 3.5: Farklı plazma parametreleri ile modifiye edilmiş yüzeylerin aktivasyon ve anti-fenilalanin immobilizasyonu işleminden sonraki frekans ve kalite faktöründeki değişim.

Örnek İsmi	**Q_{baz}**	**$Q_{glutaraldehit}$**	**Δf (glu-baz) (Hz)**	**$Q_{anti-fenilalanin}$**	**Δf (anti-fenil-glu) (Hz)**
Çıplak QTF	6455,2 ± 429,1	-	-		-
hex + eda-QTF (75W-1dk)	3887,1 ± 1343,6	4035,61 ± 1544	-	3813,11	4,1
hex + eda-QTF (75W-5dk)	5361,3 ± 1647,3	5128,17 ± 250	-	2174,54	9,7
Hex + eda-QTF (75W-10dk)	6042,8 ± 1182,5	5128,17 ± 175	-	3354,28	49

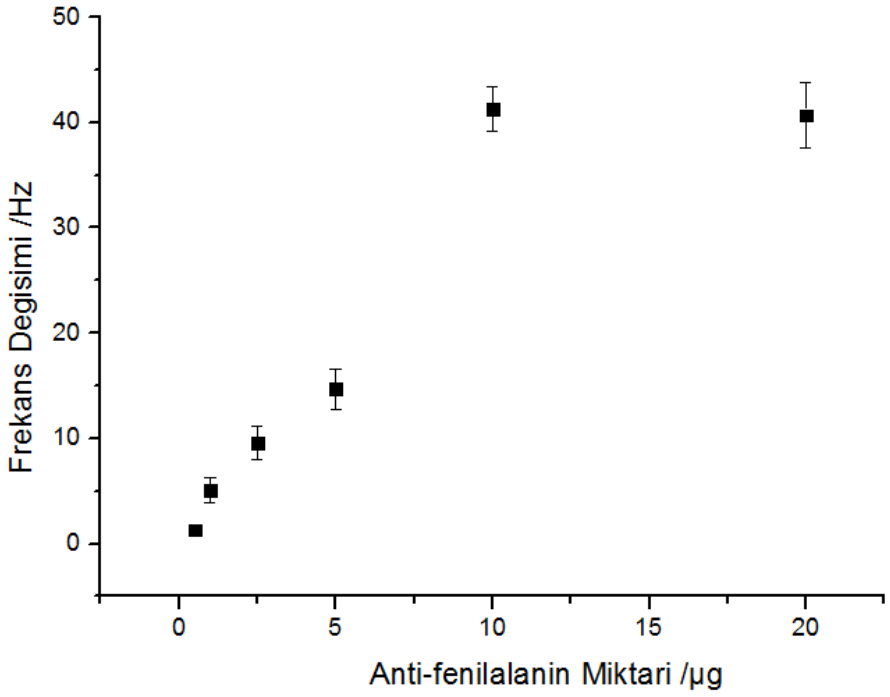
Plazma parametresinin optimizasyonu tamamlandıktan sonra optimum anti-fenilalanin miktarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.31'de de görüldüğü gibi frekans değişimi 10 μg'a kadar artmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlara çıkmak, beklenildiği gibi frekansta herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu durum, modifiye dilen yüzeydeki aktif grupların tamamının 10 μg anti-fenilalanin ile doyurulduğu daha fazla antikor yüklemesi yapılmasının frekansta değişime sebebiyet vermediğini işaret etmektedir.

3.8. L-Fenilalanin İmmünosensörünün Performansının Değerlendirilmesi

QTF yüzeylerinin başarı ile modifiye edilerek tanıyıcı yüzey tasarımı tamamlandıktan sonra bu bölümde immünosensörün performansı üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla, belirli konsantrasyonlarda (0-500 μM) L-fenilalanin içeren çözeltilere daldırılan tüm

Tablo 3.6: Farklı plazma parametreleri ile modifiye edilmiş yüzeylerin aktivasyon, anti-fenilalanin immobilizasyonu ve anti-fenilalanin / fenilalanin etkileşimi işleminden sonraki frekans ve kalite faktöründeki değişim.

Örnek İsmi	**Q_{baz}**	**$Q_{glutaraldehit}$**	**Δf (glu-baz) (Hz)**	**$Q_{anti-fenilalanin}$**	**Δf (anti-fenil-glu) (Hz)**	**$Q_{-fenilalanin}$**	**Δf (fenil-anti-fenil) (Hz)**
Modifiye Edilmemiş QTF	6455,2 ± 429,1	-	-		-		-
hex + eda-QTF (75W-1”)	3887,1 ± 1343,6	4035,61 ± 1544	-	3813,11	4,1	2725,66	-43,1
hex + eda-QTF (75W´-5”)	5361,3 ± 1647,3	5128,17 ± 250	-	2174,54	9,7	2173,89	0
hex + eda-QTF (75W-10”)	6042,8 ± 1182,5	5128,17 ± 175	-	3354,28	49	1483,43	41,3



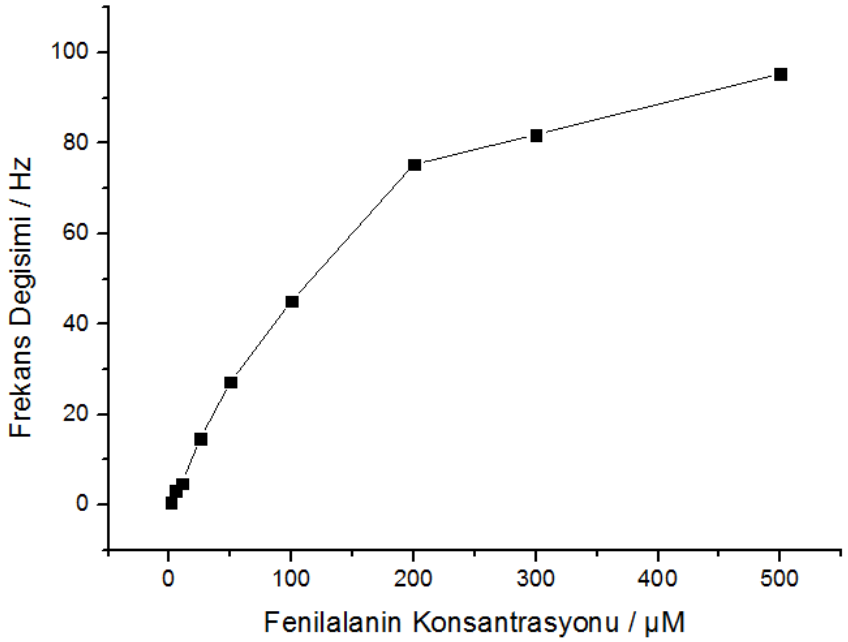
Şekil 3.31: Anti-fenilalanin miktarının frekans değişimine etkisi.

QTF'lerin frekans sapmaları takip edilmiştir. Ölçümleri tamamı QTF'e kurutulduktan sonra alınmıştır (Şekil 3.31).

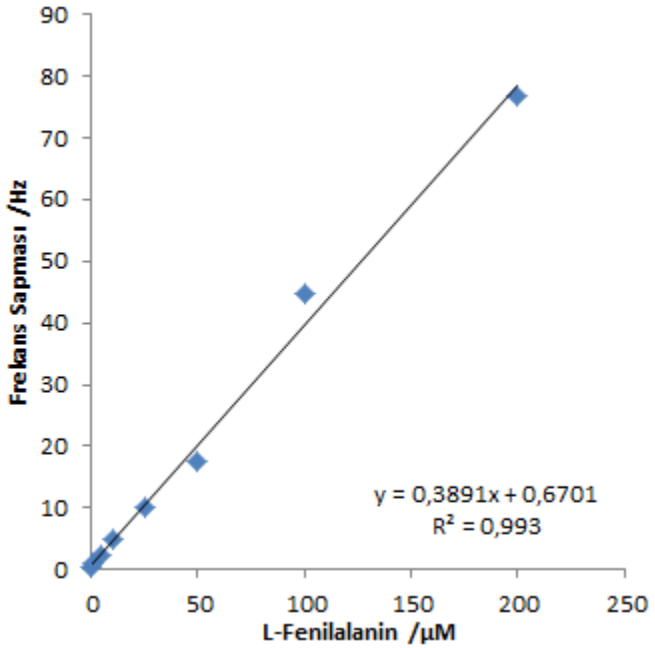
Şekil 3.32'de görüldüğü gibi QTF-tabanlı immünosensörün frekans sapması 200 µM'a kadar lineer bir artış göstermiştir. 200 µM ile 500 µM arasında frekans sapmasında konsantrasyonun yüksekliğine rağmen ciddi bir düşüş görülmektedir. Bu durum, çatal yüzeylerin, 200 µM L-fenilalanin konsantrasyonun derişikliği sonucu aktif alanlarının azaldığı ve dolayısıyla yeni gelecek L-fenilalaninlerin oluşan sterik etki sebebiyle antikoru ile etileşememesinden kaynaklanabilir. Aynı zamanda, QTF-tabanlı immünosensörün 200 µM L-fenilalaninin konsantrayonunun üzerine çıkıldığında hassasiyetini kaybettiğini göstermektedir.

Şekil 3.33'teki tasarlanan QTF-tabanlı immünosensörün kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemi verilmiştir. Birçok modifikasyon basamağından geçen QTF hassasiyetini kaybetmeden son aşamaya kadar ulaşabilmiştir. Elde edilen biyosensörün hassasiyeti

0,3891 µM/Hz olarak bulunmuştur. Bunun yanısıra sensörün %RSD değeri 7,13 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.32: Belirli miktarlarda L-fenilalanin içeren çözelti ile etkileştirilen anti-fenilalanin ile dekore edilmiş QTF cevabı.



Şekil 3.33: Hazırlanan QTF-tabanlı İmmünosensörün L-fenilalanine karşı elde edilen kalibrasyon eğrisi.

3.9. Seçicilik Testi

Belirlenen koşullarda tasarlanan immünosensörün L-fenilalaninin yanısıra glikoz, askorbik asit ve dopamin molekülleri ile etkileşimide incelenmiştir. QTF-tabanlı immünosensör başlanıçta 100 mM L-fenilalanin çözeltisi ile etkileştirildikten sonra 39,2 Hz'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. Daha sonra çatal uçları ayrı ayrı olarak 250 mM glikoz ve askorbik asit çözeltileri ile etkileştirilmiştir. Frekans sapmalarına baktığımızda glikoz etkileşimi sonrasında 0,4 Hz, askorbik asit etkileşiminde ise 1,4 Hz'lik bir değişim gözlemlenmiştir. Girişim yapması olası bu moleküllerin derişiminin fenilalanin derişiminin iki katı olmasına rağmen dikkate değer bir düşüş gözlemlenmemiştir.

4. SONUÇ, ÖNERİLER VE GELECEK ÇALIŞMALAR

Fenolketonüri tanısı koyulmasını, fenilalanin seviyesini vücut sıvılarında saptayarak sağlayacak, kütle hassas bir immünosensör geliştirilmesini amaçlayan bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- Kuvars ayar çatalı (QTF) sahip olduğu özellikler dolayısı ile Kuvars Kristal Mikroterazileri yerini alabilecek bir çevirici olarak bu çalışmada gerekli modifikasyonlar yapılarak kullanılabilecek seviyeye getirilmişlerdir. Bu doğrultuda:
  - QTF yüzeyleri, kararlı bir film oluşturmak için n-hekzan monomeri ile plazma işlemi uygulanmış ve bu çalışma sonucunda 75 W güç ve 10 dakika uygulama süresinde optimum plazma koşulları PlzP(n-hekzan) filmler için saptanmıştır.
  - Bu koşullarda elde edilen PlzP(n-hekzan) filmlerin kalınlığı 8 nm ve temas açısı 17° bulunmuştur. Bunula birlikte, PlzP(n-hekzan) filmlerin kararlılığı hava koşullarında temas açısı takip edilerek saptanmış ve 30 gün boyunca özelliklerde bir sapma görülmemiştir.
  - PlzP(n-hekzan) filmler ile modifiye edilmiş ve kararlılığı en üst düzeyde olan yüzeylerde, fenilalanini tanıyıcı biyomolekülün immobilize edilebilmesi için amin grupları oluşturulmuştur. Bu hedef doğrultusunda, etilendiamin (EDA) monomeri kullanılarak bu yüzeyler plazma ortamında işlenmiş, bu çalışmalar sonucunda, 75 W güç ve 1, 5 ve 10 dakika uygulama süresinde optimum plazma koşulları PlzP(EDA) filmler için saptanmıştır.
  - Optimum koşullarda elde edilen ön-kaplamalı PlzP(EDA) filmlere ait temas açısı değeri ortalama sırasıyla 6°, 6° ve 20° olarak saptanmıştır.
  - Bu yüzeylere fenilalanini tanıyıcı anti-fenilalanin antikoru kovalent bağ yapacak şekilde glutaraldehit çapraz bağlama ajanını yardımı ile immobilize edilmiş, yüzeyde immobilize anti-fenilalanin , en aktif seviyesi

10 µg/µl derişimi kullanıldığında göstermiştir.

- Vücut sıvılarında fenilalanin seviyesinin tespiti için anti-fenilalanin antikoruna bağlı QTF yüzeyler ile hazırlanmış olan immünosensöre ait kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Bu doğru yardımıyla immünosensörün doğrusallık sınırı 1-200 µM / mL ve hassasiyeti 0,3891 Hz/µM bulunmuştur.

Bölüm 2.2.6'da belirtildiği gibi anti-fenilalanin immobilizasyonu sırasında, antikor dekorasyonu sadece çatalların uç kısmına yapılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, çatalların uçları anti-fenilalanin damlasının içinde bekletilmiştir. Fakat, bu işlem sırasında çatal uçlarının cam yüzeye değmesinden dolayı temas halindeki bölümünün modifiye edilememesi ve/veya filmlerin cama temasından dolayı zarar görerek yüzeyden ayrılması gibi durumlar sensörün performasında düşüşe sebep olmaktadır. Ayrıca, bu şekilde kaplama yapıldığı durumda çatal yüzeyleri, damlada bulunan antikorların bir kısmı ile etkileşime girebilmektedir. Bu problemin çözülebilmesi için, çatal modifikasyonu QCM modifikasyonunda kullanılan akış hücresine benzer bir sistem kullanılarak yapıldığı takdirde tasarlanan biyosensörün performansının yükseltilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca tasarlanan bu akış hücresi ile anti-fenilalanin / fenilalanin etkileşiminin daha yüksek olacağı dolayısıyla etkileşim aşamalarında yaşanan kaybın minimuma indirileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma ile birlikte, QTF'in fenilketonüri tanısında kullanılabileceği ve plazma polimerizasyon yönteminin QTF'in yüzey modifikasyonu aşamasında kaplama tekniği olarak seçilebileceği gösterilmiştir. Bahsi geçen yüzey modifikasyonu aşamasında grubumuzun önceki çalışmalarında elde ettiği sonuçlar sebebiyle amince zengin bir monomer olan etilendiamin kullanılmıştır. Gelecek çalışmalarda, farklı monomerlerin yanısıra farklı kaplama teknikleri kullanılarak biyosensör yüzeyi geliştirme çalışmalarının sürdürülmesi düşünülmektedir.

Bu amaçla fenilketonüri tanısında kullanılmak için tasarlanan immünosensör, halen TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Teknoloji Transfer Ofisi bünyesinde, hali hazırda kullanılan ticari yöntemlere alternatif olabilecek seviyeye getirilmek üzere projelendirilmiştir. Bunun yanısıra TÜBİTAK desteği için 1512 projesi verilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] **Mahan, L.K., Escott-Stump, S.** (2004). Krause's food, nutrition & diet therapy., *W.B. Saunders.*

[2] **Hendriksz, C., Walter, J.** (2004). Update on phenylketonuria. *Current Paediatrics,* 14, 400–406.

[3] **Kim, W., Erlandsen, H., Surendran, S., Stevens, R.C.** Gamez, A., Micholls-Matalon, K., Tyring, S.K., Matalon, R., (2004). Trends in Enzyme Therapy for Phenylketonuria. *Molecular Therapy*, 10, 220–224.

[4] **Lord, B., Ungerer, J., Wastell, C.** (2008). Implications of Resolving the Diagnosis of PKU for Parents and Children. *Journal of Pediatric Psychology*, 33, 855–866.

[5] **Williams, R.A., Mamotte, C.D.S., Burnett, J.R.** (2008). Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *The Clinical Biochemist Reviews*, 29, 31–41.

[6] **Scriver, C., Kaufman, S.** (2001). Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. *Metabolic and Molecular Bases Inherited Disease*,1667–1724.

[7] **Lidsky, A.S., Law, M.L., Morse, H.G., Kao, F.T., Rabin M., Ruddle, F.H., Woo, S.L.** (1985). Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 6221–5.

[8] **Réblová, K., Kulhánek, P., Fajkusová, L.,** (2015). Computational study of missense mutations in phenylalanine hydroxylase. *Journal of Molecular Modeling*, 21, 70.

[9] **Lindner, M., Haas, D., Mayatepek, E., Zschocke, J., Burgard, P.,** (2001). Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. *Molecular Genetics and Metabolism*, 73, 104–6.

[10] **Dotremont, H., Francois, B., Diels, M., Gillis, P.** (1995). Nutritional value of essential amino acids in the treatment of adults with phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 18, 127–130.

[11] **Weiss, D.J., Dorris, M., Loh, A., Peterson, L.,** (2007). Dehydrogenase based reagentless biosensor for monitoring phenylketonuria. *Biosensor and Bioelectronics*, 22, 2436–2441.

[12] **Blau, N., Duran, M., Gibson, K.M., Dionisi-Visi, C.,** (2014). Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases., *Springer*, Berlin, Heidelberg.

[13] **T.C. Sağlık Bakanlığı.** "Neonatal Tarama Programı Genelgesi 2006 / 130".

[14] **Jew, K., Kan, K., Koch, R., Cunningham, G.C.,** (1994). Validity of screening early collected newborn specimens for phenylketonuria using a fluorometric method. *Screening*, 3, 1–9.

[15] **Wang, Z., Chen, Y.Z., Zhang, S., Zhou, Z.** (2005). Investigation of a phenylalanine-biosensor system for phenylketonuria detection. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2, 1913–1916.

[16] **Levy, H.** (2016). A Life in Newborn Screening. *International Journal of Neonatal Screening*, 2, 14.

[17] **Nagy, Z.K., Balogh, A., Vajna, B., Farkas, A., Patyi, G., Kramarics, A., Marosi, G.** (2012). Comparison of electrospun and extruded Soluplus®-based solid dosage forms of improved dissolution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 322–32.

[18] **Tachibana, S., Suzuki, M., Asano, Y.** (2006). Application of an enzyme chip to the microquantification of l-phenylalanine. *Analytical Biochemistry*, 359, 72–78.

[19] **Mirmohseni, A., Shojaei, M., Farbodi, M.** (2008). Application of a quartz crystal nanobalance to the molecularly imprinted recognition of phenylalanine in solution. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 592–597.

[20] **Villalonga, R., Fujii, A., Shinohara, H., Tachibana, S., Asano, Y.** (2008). Covalent immobilization of phenylalanine dehydrogenase on cellulose membrane for biosensor construction. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 129, 195–199.

[21] **Naghib, S.M., Rabiee, M., Omidinia, E., Khoshkenar, P.** (2012). Investigation of a Biosensor Based on Phenylalanine Dehydrogenase Immobilized on a Polymer-Blend Film for Phenylketonuria Diagnosis. *Electroanalysis*, 24, 407–417.

[22] **Naghib, S.M., Rabiee, M., Omidinia, E.** (2014). Electrochemical Biosensor for L-phenylalanine Based on a Gold Electrode Modified with Graphene Oxide Nanosheets and Chitosan. *International Journal of Electrochemical Science,* 9, 2341–2353.

[23] **Omidinia, E., Shadjou, N., Hasanzadeh, M.** (2014). Aptamer-based biosensor for detection of phenylalanine at physiological pH. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2070–2080.

[24] **Omidinia, E., Naghib, S.M., Boughdachi, A., Khoshkenar, P.** (2015). Hybridization of Silver Nanoparticles and Reduced Graphene Nanosheets into a Nanocomposite for Highly Sensitive L-Phenylalanine Biosensing. *International Journal of Electrochemical Science,* 10, 6833–6843.

[25] **Ogi, H.** (2013). Wireless-electrodeless quartz-crystal-microbalance biosensors for studying interactions among biomolecules: A review. *Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and Biological Sciences*, 89, 401–417.

[26] **Turner, A.P.F.** (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42, 3184.

[27] **Su, X., Dai, C., Zhang, J., O'Shea, S.J.** (2002). Quartz tuning fork biosensor. *Biosensor and Bioelectronics*, 17, 111–117.

[28] **Blau, N., van Spronsen, F.J.** (2014). Physician's Guid. to Diagnosis, Treat. Follow. Inherit. Metab. Dis., *Springer*, Berlin, Heidelberg, ss. 3–21.

[29] **Van Wegberg, A.M.J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A.M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S.C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A.C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J.H.,**

van Spronsen, F.J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: Diagnosis and treatment. *Orphanet Journal of Rare Disease,* 12, 162.

[30] **Özbaş, S., Tezel, B., Aydın, Ş., Bolat, H., Köse, M.R.** (2012). Türkiye'de çocuk sağlığının durumu. *Çocuk Sağlığı ve Hast. Dergisi*, 2012, 55, 71–76.

[31] **Centerwall, W.R., Centerwall, S.A. (**1961). Phenylketonuria (Folling's Disease). *Journal of the History Medicine and Allied Sciences*, XVI, 292–296.

[32] **Yoo, J.W., Irvine, D.J., Discher, D.E., Mitragotri, S.,** (2011). Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 521–535.

[33] **Centerwall, S.A., Centerwall, W.R.** (2000). The discovery of phenylketonuria: The story of a young couple, two retarded children, and a scientist. P*ediatrics*, 105, 89–103.

[34] **Jervis, G.A.** (1947). Studies On Phenylpyruvic Oligophrenia: The Position Of The Metabolic Error. *The Journal of Biological Chemistry*, 1947, 169, 651–656.

[35] **Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M.,** (1953). Preliminary Communication. *Lancet*, 1953, 262, 812–813.

[36] **Horner, F.A., Streamer, C.W., Clader, D.E., Hassell, L.L., Binkley, E.L., Dumars, K.W.** (1957). Effect of Phenylalanine-Restricted Diet in Phenylketonuria II. *American Journal of Disease of Children*, 93, 615–618.

[37] **Young, V.R., Pellett, P.L.** (1987). Protein intake and requirements with reference to diet and health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45, 1323–1343.

[38] **Anderson, P.J., Wood, S.J., Francis, D.E., Coleman, L., Anderson, V., Boneh, A.** (2007). Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? *Developmental Neuropsychology,* 32, 645–668.

[39] **Blau, N.** (2006). PKU and BH4. Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin., *SPS Publications.*

[40] **Guthrie, R., Susi, A.** (1963). A Simple Phenylalanine Method For Detecting Phenylketonuria In Large Populations Of Newborn Infants. *Pediatrics*, 32, 338–43.

[41] **Hardelid, P., Cortina-Borja, M., Munro, A., Jones, H., Clearly, M., Champion, M.P., Foo, Y., Scriver, C.R., Dezateux, C.** (2008). The birth prevalence of PKU in populations of European, South Asian and sub-Saharan African ancestry living in South East England. *Annals of Human Genetics*, 72, 65–71.

[42] **El-Metwally, A., Yousef Al-Ahaidib, L., Ayman Sunqurah, A., Al-Surimi, K., Househ, M., Alshehri, A., Da'ar O.B., Razzak, H.A., AlOdaib, A.N.** (2018). The Prevalence of Phenylketonuria in Arab Countries, Turkey, and Iran: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 1–12.

[43] **DiLella, A.G., Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., Marvit, J., Woo, S.L.C.** (1986). Molecular Structure and Polymorphic Map of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry*, 1986, 25, 743–

749.
[44] **Lee, D.H., Koo, S.K., Lee, K.S., Yeon, Y.J., Oh, H.J., Kim, S.W., Lee, S.J., Kim, S.S., Lee, J.E., Jo, I., Jung, S.C.** (2004). The molecular basis of phenylketonuria in Koreans. *Journal of Human Genetics*, 49, 617–621.
[45] **Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S.** (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121–131.
[46] **Lowe, C.R.** (2008). Handbook of Biosensors and Biochips, *John Wiley & Sons*, Ltd, Chichester, UK, s. 16.
[47] **Conroy, P.J., Hearty, S., Leonard, P., O'Kennedy, R.J.** (2009). Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20, 10–26.
[48] **Donahue, A.C., Albitar, M.** (2010). Recognition Receptors in Biosensors, *Springer*, New York, NY, ss. 221–248.
[49] **O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G.** (1999). Commercial quartz crystal microbalances - Theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 663–670.
[50] **Sauerbrey, G.** (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wagungdiinner Schichten und zur Mikrowagung. Zeitschrift fur Phys., 155, 206–222.
[51] **Zhang, J., O'Shea, S.** (2003). Tuning forks as micromechanical mass sensitive sensors for bio- or liquid detection. S*ensors and Actuators B: Chemical*, 94, 65–72.
[52] **Skládal, P.** (2003). Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. *Journal of Brazillian Chemical Society*, 14, 491–502.
[53] **Keiji Kanazawa, K., Gordon, J.G.** (1985). The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. *Analytica Chimica Acta*, 175, 99–105.
[54] **Castellanos-Gomez, A., Agraït, N., Rubio-Bollinger, G.** (2010). Carbon fibre tips for scanning probe microscopy based on quartz tuning fork force sensors. *Nanotechnology*, 21, 145702.
[55] **Heyde, M., Kulawik, M., Rust, H.-P., Freund, H.-J.** (2004) Double quartz tuning fork sensor for low temperature atomic force and scanning tunneling microscopy, *Reviews of Scientific Instruments*, 75, 7.
[56] **Labardi, M.** (2007). Dynamic force microscopy with quartz tuning forks at high oscillation amplitudes. *Nanotechnology*, 2007, 18, 084019.
[57] **Song, S.-H.** (2009). Electrical characterization of a tuning fork crystal oscillator using dual-phase lock-in technique. *Review of Scientific Instruments*, 80, 034703.
[58] **Yang, C.H., Chang, T.H., Yang, M.J., Moore, W.J.** (2002). A low noise transimpedance amplifier for cryogenically cooled quartz tuning fork force sensors. *Review of Scientific Instruments*, 73, 2713–2716.
[59]**Bettac, A., Koeble, J., Winkler, K., Uder, B., Maier, M., Feltz, A.** (2009). QPlus: atomic force microscopy on single-crystal insulators with small oscillation amplitudes at 5 K. *Nanotechnology*, 20, 264009.
[60] **Giessibl, F.J.** (1998). High-speed force sensor for force microscopy and profilometry utilizing a quartz tuning fork. *Applied Physics Letters*,

73, 3956.

[61] **Wastl, D.S., Weymouth, A.J., Giessibl, F.J.** (2013). Optimizing atomic resolution of force microscopy in ambient conditions. Physical Review B, 2013, 87, 245415.

[62] **Chen, Y., Li, Y., Shan, G., Zhang, Y., Wang, Z., Wang, M., Li, H., Qian, J.** (2018). Design and implementation of a novel horizontal AFM probe utilizing a quartz tuning fork. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing,* 19, 39–46.

[63] **Friedt, J.-M., Carry, É.** (2007). Introduction to the quartz tuning fork. *American Journal of Physics*, 75, 415–422.

[64] **Vlassov, S., Scheler, O., Plaado, M., Lõhmus, R., Kurgb, A., Saala, K., Kinka, I.** (2012). Integrated carbon nanotube fibre–quartz tuning fork biosensor. *The Proceedings of the Estonian Academy of Sciences,* 61, 48–51.

[65] **Zeisel, D., Menzi, H., Ullrich, L. (**2000). A precise and robust quartz sensor based on tuning fork technology for (SF6)-gas density control. *Sensors and Actuators A: Physical*, 80, 233–236.

[66] **Matsiev, L.F., Bennett, J.W., McFarland, E.W.** (1998). Application of low frequency mechanical resonators to liquid property measurements. *IEEE Ultrasonics Symposium*, 1, 459–462.

[67] **Sampson, A., Panchal, S., Phadke, A., Kashyap, A., Suman, J., Unnikrishnan, G., Datar, S.** (2018). Quartz tuning fork based sensor for detection of volatile organic compounds: towards breath analysis. *Material Research Express*, 5, 045407.

[68] **Zhang, J., Dai, C., Su, X., O'Shea, S.J.** (2002). Determination of liquid density with a low frequency mechanical sensor based on quartz tuning fork. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 84, 123–128.

[69] **Su, X., Dai, C., Zhang, J., O'Shea, S.J. (**2002). Quartz tuning fork biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 111–117.

[70] **Ebadi, A., Atefeh,** (2015). Biyolojik Etkileşim Kinetiğini Algılamada Yeni Bir Yaklaşım: Plazma Polimerizasyonu Ile Modifiye Edilmiş Kuvars Ayar Çatalı. *Yüksek Lisans Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[71] **Kaleli Can, G., Özgüzar, H.F., Kabay, G., Kömürcü, P., Mutlu, M. (**2018). Simultaneous insulation and modification of quartz tuning fork surface by single-step plasma polymerization technique with amine-rich precursors. *MRS Communications*, 1–9.

[72] **Yasuda, H.** (1984). Plasma polymerization for protective coatings and composite membranes. *Journal of Membrane Science*, 18, 273–284.

[73] **Kamińska, A., Kaczmarek, H., Kowalonek, J.** (2002). The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action. *European Polymer Journal,* 38, 1915–1919.

[74] **Mändl, S., Rauschenbach, B.** (2000). Plasma-Immersions-Ionenimplantation. Ein neues Verfahren zur homogenen Oberflächenmodifizierung komplex geformter medizinischer Implantate - Plasma Immersion Ion Implantation. New Technology for Homogeneous Modification of the Surface of Medical Implants . Biomedizinische Technik, 45, 193–198.

[75] **Chu, P.** (2002). Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science & Engineering R: Reports*, 36, 143–206.

[76] **Yasuda, H.K.** (2005). Some important aspects of plasma polymerization. *Plasma Processes and Polymers*, 2, 293–304.
[77] **Coburn, J.W., Winters, H.F.** (1979). Plasma etching—A discussion of mechanisms. *Journal of Vacuum Science & Technology*, 16, 391–403.
[78] **Boulos, M.I.** (1992). RF induction plasma spraying: State-of-the-art review. *Journal of Thermal Spray Technology*, 1, 33–40.
[79] **Anders, A.** (1997). Metal plasma immersion ion implantation and deposition: a review. *Surface and Coatings Technology*, 93, 158–167.
[80] **D'Agostino, R.** (1990). Plasma deposition, treatment, and etching of polymers., Academic Press.
[81] **Martinu, L., Poitras, D.** (2000). Plasma deposition of optical films and coatings: A review. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, 18, 2619.
[82] **Vossen, J.L., Kern, W.** (1991). Thin film processes II., Academic Press.
[83] **Buddhadasa, M., Vandenabeele, C.R., Snyders, R., Girard-Lauriault, P.L.,** 2017. Single source precursor vs. precursor mixture for N-rich plasma polymer deposition: Plasma diagnostics and thin film analyses. *Plasma Processes and Polymers*, 14, 1700030.
[84] **Wang, K., Liu, C., Zhou, W.,** (2016). Investigation on the interfacial properties of a viscoelastic-based surfactant as an oil displacement agent recovered from fracturing flowback fluid. *RSC Advances*, 6, 38437–38446.
[85] **Eaton, P., West, P.,** (2010). Atomic Force Microscopy.vol. 9780199570, Oxford University Press.
[86] **Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S.,** (1993). Enstrümantal Analiz Yöntemleri., Hacettepe Üniversitesi.
[87] **Chatterjee, S., Gadad, S.S., Kundu, T.K.,** (2010). Atomic force microscopy. Resonance, 15, 622–642.
[88] https://www.nanoandmore.com/tuning-fork-sensor-controller alındığı tarih: 21.03.2018
[89] **Guimond, S., Hanselmann, B., Amberg, M., Hegemann, D.,** (2010). Plasma functionalization of textiles: Specifics and possibilities. *Pure and Applied Chemistry*, 82, 1239–1245.
[90] **Mutlu, S., Çökeliler, D., Shard, A., Goktas, H., vd.,** (2008). Preparation and characterization of ethylenediamine and cysteamine plasma polymerized films on piezoelectric quartz crystal surfaces for a biosensor. *Thin Solid Films*, 516, 1249–1255.
[91] **Guimond, S., Hanselmann, B., Amberg, M., Hegemann, D.,** (2010). Plasma functionalization of textiles: Specifics and possibilities. Pure Appl. Chem., 82, 1239–1245.
[92] **Pierce, R.G., Padron-Wells, G., Goeckner, M.J.,** (2009). Gas-phase chemistry of pulsed n-hexane discharge. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 29, 1–11.
[93] **Gengenbach, T.R., Griesser, H.J.,** (1999). Aging of 1,3-diaminopropane plasma-deposited polymer films: Mechanisms and reaction pathways. J*ournal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry,* 37, 2191–2206.
[94] **Buddhadasa, M., Girard-Lauriault, P.L.**, (2015). Plasma co-polymerisation of ethylene, 1,3-butadiene and ammonia mixtures: Amine content and water stability. *Thin Solid Films*, 591, 76–85.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gizem Kaleli Can
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 19.10.1988 Altındağ
E-posta : kaleligizem@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans :** 2011, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yüksek Lisans :** 2013, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Proje Burslu Yüksek Lisans Öğrencisi
- **Doktora :** 2018, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği, Tam Burslu Doktora Öğrencisi

YABANCI DİL: İngilizce

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Kaleli Can, G.,** 22nd International Biomedical Science & Technology Symposium (BIOMED 2017), "The Development of QTF-based mass sensitive immunosensor for Phenylketonuria diagnosis" (12-14 May 2017) (Oral Presentation)

- **Kaleli Can, G.,** Kömürcü, P., Özgüzar, H. F., Kabay, G., Mutlu, M. (2018). Simultaneous Insulation and Modification of Quartz Tuning Fork Surface by Single-step Plasma Polymerization Technique with Amine Rich Precursors. *MRS Communications.https://doi.org/10.1557/mrc.2018.79*

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Bozcaarmutlu, A., Sapmaz, C., **Kaleli, G**., Turna, S., & Yenisoy-Karakaş, S. (2015). Combined use of PAH levels and EROD activities in the determination of PAH pollution in flathead mullet (Mugil cephalus) caught from the West Black Sea coast of Turkey. Environmental Science and Pollution Research, 22(4), 2515-2525.
- Kabay, G., **Kaleli, G.,** Sultanova, Z., Ölmez, T. T., Şeker, U. Ö. Ş., & Mutlu, M. (2016). Biocatalytic protein membranes fabricated by electrospinning. *Reactive and Functional Polymers*, *103*, 26-32.
- Sultanova, Z., **Kaleli, G.,** Kabay, G., & Mutlu, M. (2016). Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanofibers. *International journal of pharmaceutics*, *505*(1-2), 133-138.
- Hortaç, E., **Kaleli, G.,** Çökeliler, D., Yavuzdemir, Ş., Mutlu, M., Ekici, M. D., Göçmen J.S, (2016) GSBL Pozitif Üropatojen Escherichia coli İzolatlarının Plazma Polimerizasyon Tekniği ve Nanomalzemeler ile Modifiye Edilmiş (Mikroplak) Yüzeylerde Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi: Deneysel Model. *Türk Mikrobiyol Cem Der* 45(4):181-187.
- Kabay, G., Meydan, A. E., **Kaleli Can, G.,** Demirci, C., & Mutlu, M. (2017). Controlled release of a hydrophilic drug from electrospun amyloid-like protein blend nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, *81*, 271-279.
- Kabay, G., **Kaleli Can, G.,** & Mutlu, M. (2017). Amyloid-like protein nanofibrous membranes as a sensing layer infrastructure for the design of mass-sensitive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *97*, 285-291.
- Göçmen, J.S., İştar Hortaç, E., Çökeliler, D., Mutlu, M., **Kaleli Can, G.**, Alparslan, S., Çetin, C., Kartal, N., Özçelik, U.C., Aycan, Ç, (2017) Kan ve El Kültüründen İzole Edilen Koagülaz-Negatif Stafilokok İzolatlarının Biyofilm Oluşumunun Plazma Polimerizasyon Tekniği ile Kaplanmış Mikroplaklarda İncelenmesi: Deneysel Model. *FLORA* 22(4):166-174
- Kabay, G., Demirci, C., **Kaleli Can, G.,** Meydan, A. E., Daşan, B. G., & Mutlu, M. (2018). A comparative study of single-needle and coaxial electrospun amyloid-like protein nanofibers to investigate hydrophilic drug release behavior. International journal of biological macromolecules, 114:989-997
- **Kaleli G.,** Sapmaz-Erden C., Turna S., Yenisoy-Karakaş S., Bozcaarmutlu A., 2. Ulusal Öğrenci Kongresi 'Zonguldak Limanı'ndan yakalanan has kefal balığı (mugil cephalus) karaciğer dokusunda antrasen, piren, krisen, benzo(a)antrasen ve benzo(k)floranten derişiminin belirlenmesi ve canlılar üzerine etkisi' (Haziran 2011) (Sözlü Sunum)
- **Kaleli G.,** Sapmaz-Erden C., Yenisoy-Karakaş S., Bozcaarmutlu A., 6th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (BIOMAP)

"Determination of PAH residues in striped red mullet (*Mullus surmuletus*) from the West Black Sea Coast of Turkey" (October 15-19, 2012), (Poster Presentation)

- **Kaleli G.,** Altuntaş S., Büyükserin F., Mutlu M., International Middle East Plasma Science (IMEPS) "Generation of amphoteric surfaces via glow-discharge technique with single precursor on Polycarbonate Nanorod Arrays for Biomedical Applications" (April 23-25, 2014), (Oral Presentation)
- **Kaleli G.,** Sultanova Z., Kabay G., Mutlu M., 2nd International Biosensor Congress, "Plasma Assisted Nanofiber Enriched Mass Sensitive Immunosensor for the Detection of Cardiac Marker Troponin T" (June 10-12,2015) (Oral Presentation)
- **Kaleli Can G.,** Mutlu M., 2017: KONNECT-KICK OFF MEETING: Resources and Sustainability, Nanocellulose Reinforced Composited for Advanced Earthquake-proof Construction Technology (Ncel-CONST) (January 31-February 3), "The development of QTF-based mass sensitive immunosensor for phenylketonuria diagnosis" (Oral Presentation)
- **Kaleli Can G.,** Özgüzar H.F., Eyidoğan A., Demirci C., Kabay G., Mutlu M., 22nd International Biomedical Science & Technology Symposium (BIOMED 2017), "The Development of QTF-based mass sensitive immunosensor for Phenylketonuria diagnosis" (12-14 May 2017) (Oral Presentation)
- **Kaleli Can G.,** Özgüzar H.F., Kabay G., Mutlu M., 2017 MRS Fall Meeting, "The Development of QTF-Based Mass Sensitive Immunosensor for Phenylketonuria Diagnosis" (26 November-1 December 2017) (Poster Presentation)