İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NONWOVEN TEKSTİL YÜZEYLERİNE MİKRO KANAL SİSTEMİ ENTEGRASYONU İLE BİYOSENSÖR TASARIMI, ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin BAYSAL

Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

Tekstil Mühendisliği Programı

OCAK 2014

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NONWOVEN TEKSTİL YÜZEYLERİNE MİKRO KANAL SİSTEMİ ENTEGRASYONU İLE BİYOSENSÖR TASARIMI, ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin BAYSAL
(503111805)

Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

Tekstil Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Burçak KARAGÜZEL KAYAOĞLU

OCAK 2014

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 503111805 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Gülçin BAYSAL**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **"NONWOVEN TEKSTİL YÜZEYLERİNE MİKRO KANAL SİSTEMİ ENTEGRASYONU İLE BİYOSENSÖR TASARIMI, ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU"** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde basarı ile sunmustur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Burçak KARAGÜZEL KAYAOĞLU**
İstanbul Teknik Üniversitesi
.....

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Burçak KARAGÜZEL KAYAOĞLU**
İstanbul Teknik Üniversitesi .....

Doç. Dr. Ali KOŞAR .....
Sabancı Üniversitesi

Prof. Dr. Levent TRABZON .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **12 Aralık 2013**
Savunma Tarihi : **23 Ocak 2014**

Aileme,

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasına başladığım günden beri yardımlarını, önerilerini ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Burçak Karagüzel KAYAOĞLU'na, teşekkür ederim.

Tez çalışmalarının yürütülmesinde, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Levent TRABZON'a, Doç. Dr. Hüseyin KIZIL'a, Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK'e ve sayın hocam Yrd. Doç. Dr. İkilem GÖCEK'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Deneysel çalışmaların yürütülmesinde verdiği katkıdan dolayı Sakip ÖNDER'e, İTÜ MEMS arge merkezindeki çalışmalarım esnasında yardımları ve destekleri ile yanımda olan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK'a projede (proje no. 111M483) çalıştığım süre boyunca bursiyer olarak sağladığı finansal destekten dolayı teşekkür ederim.

Tüm lisans ve lisansüstü eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve manevi desteğini her zaman derinden hissettiğim sevgili arkadaşım, meslektaşım Saadet Selda ŞENBAŞ'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi en büyük destekçim olan kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2013

Gülçin BAYSAL
(Tekstil Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xi**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xiii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xxi**
SUMMARY ..... **xxiii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Tezin Amacı 3
2. LİTERATÜR ÖZETİ **5**
2.1 Mikroakışkan Sistemler 5
2.2 Mikroakışkan Cihazların Üretim Yöntemleri 6
2.3 Mikroakışkan Cihazlara Biyolojik İşlevsellik Kazandırılması 9
2.4 Mikroakışkan Analitik Cihaz Uygulamaları 12
2.4.1 Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar 13
2.4.2 Polimer tabanlı mikroakışkan cihazlar 31
2.4.3 Tekstil tabanlı mikroakışkan cihazlar 42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR **53**
3.1 Malzemeler 53
3.2 Ekipmanlar 55
3.3 Metotlar 61
3.3.1 Nonwoven kumaşların morfolojik, sıvı geçirgenliği ve mekanik testleri 61
3.3.2 Maske tasarımı ve fotolitografi prosesi 63
3.3.3 Nonwoven yüzey üzerinde üretilen mikroakışkan sistemin test ve karakterizasyonu 63
3.3.4 Mikroakışkan cihaza biyolojik işlevsellik kazandırılması 70
3.3.4.1 Enzim, boyarmadde ve analit (simüle ter) solüsyonlarının hazırlanması 72
3.3.4.2 Enzim, boyarmadde ve analit (simüle ter) oranlarının optimizasyonu 73
3.3.4.3 Fizyolojik sınırlar içerisinde pH değerinin ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi 73
3.3.4.4 Mikroakışkan cihazın depolama ömrü 73
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA **75**
4.1 Nonwoven Kumaşların Morfolojik, Sıvı Geçirgenliği ve Mekanik Testleri 75
4.2 Nonwoven Yüzey Üzerinde Mikroakışkan Sistem Fabrikasyonu 79
4.3 Nonwoven Yüzey Üzerinde Üretilen Mikroakışkan Sistemin Test ve Karakterizasyonu 93
4.4 Mikroakışkan Cihaza Biyolojik İşlevsellik Kazandırılması 102
4.4.1 Enzim, boyarmadde ve analit (simüle ter) oranlarının optimizasyonu. 102

4.4.2 Kumaş yüzeyinde laktat derişiminin renk yoğunluğuna bağlı yarı-kantitatif olarak izlenmesi 107
4.4.3 Fizyolojik sınırlar içerisinde pH değerinin ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi 111
4.4.4 Mikroakışkan cihazın depolama ömrü 112
5. ÖNERİLER 113
KAYNAKLAR 115
ÖZGEÇMİŞ 121

KISALTMALAR

ABTS : 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)
BCG : Bromokresol Yeşil
BCP : Bromokresol Mor
BSA : Bovine Serum Albümin
BTM : Bromotimol Mavi
GOD : Glikoz Oksidaz
G : Analit Besleme Haznesi
KH : Kontrol Haznesi
LED : Işıklı Diyot
LOC : Çip Üzerinde Laboratuar
LOX : Laktat Oksidaz
MEMS : Mikro Elektro-Mekanik Sistemler
NEMS : Nano Elektro-Mekanik Sistemler
NIPAAm : İzopropil Akrilamid
OECT : Organik Elektrokimyasal Transistörler
ÖH : Ölçüm Haznesi
PBS : Fosfat Tampon Çözelti
PE : Polietilen
PMMA : Polimetilmetakrilat
POC : Bakım Noktası
POX : Horseradish Peroksidaz
RTIL : Oda Sıcaklığı İyonik Sıvıları
SAB : Süper Emici Malzeme
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
SPE : Ekran Baskılı Elektrod
TBPB : Tetrabromofenol Mavi
UAO : Ürat Oksidaz
UA : Ürik Asit

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.1 : Evolon® kumaşın mekanik özellikleri 76
Çizelge 4.2 : Spunbond kumaşın mekanik özellikleri 76
Çizelge 4.3 : Spunbond kumaşa ait su geçirmezlik testi verileri 77
Çizelge 4.4 : Değişen ABTS miktarları ile spektrofotometrede alınan absorbans verileri 104

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Biyosensör şematik gösterimi 10
Şekil 2.2 : Enzim immobilizasyon metotları 11
Şekil 2.3 : Elektro-kimyasal tanımlama yapan kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın temel tasarımı 14
Şekil 2.4 : Kağıt tabanlı mikro akışkan cihazın tasarımı 15
Şekil 2.5 : Metal maske kullanılarak plazma reaktörü ile elde edilmiş kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz..... 16
Şekil 2.6 : Kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz için bilgisayarda üretilmiş ink jet baskı deseni 16
Şekil 2.7 : Kağıt yüzey üzerine mum kalemi kullanılarak oluşturulan mum kanallar ..... .18
Şekil 2.8 : Kağıt yüzeyde balmumu ile modelleme çeşitleri 19
Şekil 2.9 : SU-8 2010 fotorezist ile modellenmiş kromotografik kağıt ve analit analizi sonucunda reaktörlerin verdiği renk değişimi 20
Şekil 2.10 : Farklı kanal ve bariyer genişliğine sahip iki farklı kağıt tabanlı mikro akışkan analitik cihazda su içerisine damlatılmış gıda boyası sıvı iletiminin gözlemlenmesi 21
Şekil 2.11 : Mikroakışkan kağıt tabanlı kemilüminesans analitik cihazın fabrikasyonunun şematik gösterimi 21
Şekil 2.12 : (a) Mürekkep püskürtmeli baskı cihazı mikroakışkan cihazın fabrikasyon aşamaları ve (b) analit içeriğindeki bileşenlerin kimyasal reaktifler yardımıyla renk ayrımı yapılarak gözlemlenmesi 22
Şekil 2.13 : Farklı metotlarla solvent uçurarak kağıt yüzeyde arka plan sinyallerinin karşılaştırılması. A) Oda sıcaklığında 60 dakika süre ile buharlaştırma, B) etüv'de 37 °C'de 10 dakika süreyle kurutma 23
Şekil 2.14 : Mikroakışkan kağıt tabanlı elektrokimyasal algılama cihazı 24
Şekil 2.15 : Toner bazlı mikroakışkan cihazın şematik gösterimi, (A): Cihazın üç boyutlu görünümü, (B): Kesit görüntüsü, (C): Cihazın kalorimetrik deney sonrası görüntüsü 25
Şekil 2.16 : SiO_2 parçacıklarının immunoglubin emilime olan etkisi 26
Şekil 2.17 : Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazda mum baskı yöntemi kullanılarak hidrofilik kanal ve haznelerin oluşturulması ve toner baskısı yaparak son ürün elde etme adımları 27
Şekil 2.18 : Mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihaz yapımı için laser kesme metodunun şematik görüntüsü 28
Şekil 2.19 : Üç boyutlu mikroakışkan analitik cihazda eş zamanlı glikoz ve BSA deneyi 29
Şekil 2.20 : Kağıt tabanlı elektrokemilüminesans sensörün üretim ve analiz prosesi 30
Şekil 2.21 : Dört pH indikatör boyasının aktivasyon aralıkları ile barkot sistemi ... 32

Şekil 2.22 : Sporcunun sırtında ve kolundaki barkot sistemler 32
Şekil 2.23 : 50 dakikalık egzersiz süresi boyunca kişin ter pH'nın analizi 33
Şekil 2.24 : 50 dakikalık egzersiz süresi boyunca barkottaki indiakator boyaların renk değişimi. (MR: Metil kırmızısı, BCR: Bromokresol yeşil, BCP: Bromokresol mor, BTP: Bromo timol mavi) 33
Şekil 2.25 : Altı katmandan oluşan barkot sistemi ile mikroakışkan cihazın üretim aşamaları..... 34
Şekil 2.26 : Farklı pH'larda yapay ter ile test edilmiş mikroakışkan sistem 34
Şekil 2.27 : (a)Mikroakışkan sistemin zamana göre performansının şematik sunumu ve b) mikro akışkan sistemde boya ile renklendirilmiş yapay ter ile kanal performansını gösteren resim serisi..... 35
Şekil 2.28 : Mikroakışkan çipler ve üretim adımları 36
Şekil 2.29 : 55 dakikalık egzersiz süresi boyunca kablosuz detektör ve mikroakışkan çip ile kaydedilen terin pH değerinin zamanla değişimi .. 37
Şekil 2.30 : Barkod temelli giyilebilir mikroakışkan cihaz 37
Şekil 2.31 : İyonojel kısımları, iyonojel/enzim karışımı içeren OECT cihazının şematik gösterimi 39
Şekil 2.32 : Laktat ölçüm sensörünün prototipi..... 39
Şekil 2.33 : OECT üzerindeki kapı elektrottaki ve kanaldaki reaksiyon..... 40
Şekil 2.34 : Biyolojik bileşen ve dönüştürücü arasındaki ilişkinin önemini vurgulayan örnek biyosensör tasarımı..... 40
Şekil 2.35 : Quartz kristal mikrobalance immunosensörlere antikor tutundurulması için plazma polimerize film yöntemi 41
Şekil 2.36 : İç içe geçmiş 48 elektrod içeren sensör aray çipinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü ve tekli sensorün iç içe geçmiş elektrod yapısı 42
Şekil 2.37 : Wax (mum) ile modellenmiş katlı tabakalardan oluşan tekstil tabanlı mikroakışkan cihazın fabrikasyonunun şematik görüntüsü 44
Şekil 2.38 : Balmumu desenlendirme yöntemi ile üretilen iki ve üç boyutlu tekstil tabanlı mikroakışkan cihazın şematik görüntüsü 45
Şekil 2.39 : Sıvı tutma platformu..... 46
Şekil 2.40 : Optik tanımlama sistemi..... 47
Şekil 2.41 : Terin toplanıp taşınmasını sağlayan nem emici kumaş ve süper emici malzemenin bileşiminden oluşan tekstil tabanlı akışkan sistem 47
Şekil 2.42 : Tekstil tabanlı sıvı toplama platformu..... 50
Şekil 2.43 : pH göstergesi, iletkenlik, sodyum ve sıcaklık sensörü içeren çok değişkenli yol 50
Şekil 2.44 : Akış hızı ve yönü değiştirilerek analit içeriğinin uygun aktivatörlerle test edilmesi..... 51
Şekil 3.1 : PP spunbond kumaş örnekleri 53
Şekil 3.2 : Evolon® mikrofilament teknolojisi ve kumaşın görünümü..... 54
Şekil 3.3 : Spincoater cihazının kapalı görüntüsü..... 55
Şekil 3.4 : Spincoater cihazının kullanım esnasındaki görüntüsü 55
Şekil 3.5 : (a) Isıtıcı yüzeyler ve (b) etüv 56
Şekil 3.6 : a) Litografi cihazı ve b) cihazdaki UVışık kaynağı..... 57
Şekil 3.7 : RF plazma cihazı kapağı açık ve kapalı hali 58
Şekil 3.8 : Optik mikroskop..... 58
Şekil 3.9 : SEM cihazı 59
Şekil 3.10 : Shirley Hydrostatic Head Tester su geçirmezlik cihazı 59
Şekil 3.11 : Kopma mukavemeti cihazı..... 60

Şekil 3.12 : Spektrofotometre cihazı 60
Şekil 3.13 : (a) Spunbond kumaşa ait ve (b) Evolon® kumaşa ait kopma mukavemeti test cihazındaki ölçüm görüntüleri 62
Şekil 3.14 : Su geçirmezlik testi. 62
Şekil 3.15 : Asetat maskeler 64
Şekil 3.16 : L-Edit programı ile çizilen maske modelleri, a) Farklı kanal uzunluklarında ve 800 mikron genişliğinde kanallardan oluşan çoklu sistem, b) Farklı kanal uzunluklarında ve 800 mikron genişliğinde kanallardan oluşan dörtlü sistem. 66
Şekil 3.17 : L-Edit programı ile çizilen 900 mikron kanal genişliğine sahip maske modeli. (1): Ter toplama haznesi, (2): Mikro kanal, (3): Eliptik toplama bölgesi, (4): Kontrol ve ölçüm haznesi 66
Şekil 3.18 : Kanal bağlantılı üçlü hazne sistemlerinden oluşan maske modeli. 67
Şekil 3.19 : Litografi uygulamasının adımları. 68
Şekil 3.20 : Enzimatik reaksiyonlar 72
Şekil 4.1 : (a) Evolon® ve (b) Spunbond kumaşların optik mikroskopta 10x büyütülmüş yüzey görüntüleri. 75
Şekil 4.2 : Evolon® kumaşın (a) 1000X büyütmede yüzey görüntüsü ve (b) 500X büyütmede kesit görüntüsü. 75
Şekil 4.3 : (a) Evolon® ve (b) Spunbond kumaşa ait kopma mukavemeti-uzama grafikleri 77
Şekil 4.4 : Evolon® kumaşta ve filtre kağıdında makine yönde sıvı iletim hızının karşılaştırılması 78
Şekil 4.5 : Evolon® kumaşta ve filtre kağıdında enine yönde sıvı iletim hızının karşılaştırılması 78
Şekil 4.6 : PE film kaplı spunbond nonwoven kumaşın SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü. 80
Şekil 4.7 : 75°C'de etüvde 3 saat ısıl işlem uygulanan PE film kaplı PP spunbond nonwoven yüzeyde oluşturulan 4 mm, 6 mm ve 8 mm çaplı hazne örnekleri 81
Şekil 4.8 : 45°C'de etüvde 2 saat ısıl işlem uygulanan a) 8 mm çaplı haznenin, b) 6 mm ve 4 mm çaplı haznelerin üstten görünümü. 81
Şekil 4.9 : Spunbond nonwoven kumaşın tek kat SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü 82
Şekil 4.10 : 75°C'de etüvde 2 saat ısıl işlem uygulanan film kapsız PP spunbond nonwoven yüzeyde oluşturulan 8 mm, 4 mm ve 6 mm çaplı hazne örnekleri. 82
Şekil 4.11 : Spunbond nonwoven kumaşın (a) iki kat ve (b) üç kat SU-8 ile kaplanması ile elde edilen hazneli numunenin şematik kesit görünümü. 83
Şekil 4.12 : PP spunbond nonwoven yüzeyde (a) çift kat ve (b) üç kat SU-8 kaplama ile oluşturulan 4 ve 6 mm çaplı hazne örnekleri 84
Şekil 4.13 : Spunbond kumaş yüzeylerinde (a) fotolitografi prosesi ve (b) üretim parametreleri 84
Şekil 4.14 : Evolon® nonwoven kumaşın her iki yüzeyinin SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü 87
Şekil 4.15 : (a) Evolon® kumaşta üretilen 4 mm çaplı hazneler ve (b) üretimde kullanılan asetat make 87
Şekil 4.16 : (a) Evolon® nonwoven kumaşda hazneli numunenin şematik kesit görünümü ve (b) yüzeyde elde edilen desen 88

Şekil 4.17 : (a) 5 ve (b) 6 mm dairesel haznelerden oluşan krom maskeler. 89
Şekil 4.18 : Evolon® kumaşta krom maske ile oluşturulan 5 ve 6 mm çaplı hazneler……. 89
Şekil 4.19 : Evolon® kumaşta fotolitografi prosesi ve üretim parametreleri 90
Şekil 4.20 : (a) 80, (b) 100 ve (c) 130 g/m² Evolon® kumaşta (d) krom maske ile üretilen tasarım modeli 91
Şekil 4.21 : (a) 100 g/m² Evolon® kumaşta (b) çift kat asetat maske ile edilen mikro kanal sistemi 92
Şekil 4.22 : 100 g/m² Evolon® nonwoven kumaşın her iki yüzeyinin tek kat SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü 93
Şekil 4.23 : Evolon® kumaşta asetat maske ile üretilen 4mm çaplı hazneler ve sızdırmazlık kontrolü 94
Şekil 4.24 : (a) Evolon® kumaşta (b) krom maske ile oluşturulan 5 ve 6 mm çaplı hazneler ve sızdırmazlık kontrolü. 94
Şekil 4.25 : 130g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde (a) krom maske ve (b) asetat maske ile üretilen hazne desenlerinin sınırlarını gösteren SEM görüntüsü. 95
Şekil 4.26 : 130 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde üretilen hidrofil ve hidrofob bölgelerin SEM cihazından alınmış kesit görüntüsü 96
Şekil 4.27 : (a)130 g/m² Evolon® kumaşta krom maske ile edilen tasarım modeli ve (b) desen üzerinde sıvı iletiminin gözlemlenmesi. 96
Şekil 4.28 : 130 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş hidrofil kanalın 125x büyütme yapılmış SEM görüntüsü (Kanal genişliği: 807,2 µm) 97
Şekil 4.29 : 80 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş kanalın kesit görüntüsünün 150 x büyütme ile SEM cihazında görüntüsü (Kanal derinliği: 144,2 µm) 98
Şekil 4.30 : 100 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş kanalın kesit görüntüsünün 150 x büyütme ile SEM cihazında görüntüsü (Kanal derinliği: 282,5 µm) 99
Şekil 4.31 : 130 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş kanalın kesit görüntüsünün 125 x büyütme ile SEM cihazında görüntüsü (Kanal derinliği: 393,1µm). 99
Şekil 4.32 : Boya çözeltisi damlatılmış numunede sıvı sızdırmazlık kontrolü. 100
Şekil 4.33 : 5 dakika ıslak aşındırma ile Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulan hidrofil hazne yüzeyinin SEM görüntüsü. 101
Şekil 4.34 : 20 dakika ıslak aşındırma ile Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulan hidrofil hazne yüzeyinin SEM görüntüsü. 101
Şekil 4.35 : 60 dakika ıslak aşındırma ile Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulan hidrofil hazne yüzeyinin SEM görüntüsü. 102
Şekil 4.36 : Analit konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 103
Şekil 4.37 : ABTS miktarının enzim aktivitesi üzerine etkisi 104
Şekil 4.38 : Sübstrat konsantrasyonunun 0,5, 5 ve 10 mg/ 7,5 ml PBS ABTS miktarlarına göre enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 105
Şekil 4.39 : Hazır ABTS ve H_2O_2 kullanılarak POX aktivitesinin belirlenmesi 106
Şekil 4.40 : a) Enzim-ABTS çözeltilerinin karıştırılması ile a) ependorflara, b) kumaş yüzeyine ilavesi, c) enzim- ABTS çözeltilerinin ayrı ayrı direkt kumaş yüzeyine konulması sonucu yüzeyde oluşan renk yoğunlukları. 107
Şekil 4.41 : (a) 6 mm haznelerden oluşan prototip yüzey, (b) 1-100 mM ve (c) 1-8 mM konsantrasyon aralığında laktat analizi, K: Kontrol haznesi 108

Şekil 4.42 : 1-20 mM analit konsantrasyonuna sahip haznelerdeki renk değişimi . 110
Şekil 4.43 : Analit (laktat) pH değerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi..... 111
Şekil 4.44 : Analit pH değerinin enzim aktivitesi üzerine 10 dakika sonra etkisi... 112
Şekil 4.45 : Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi..... 112

NONWOVEN TEKSTİL YÜZEYLERİNE MİKRO KANAL SİSTEMİ ENTEGRASYONU İLE BİYOSENSÖR TASARIMI, ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Metabolit, biyolojik gösterge ve proteinlerin kantitatif (nicel) ölçümleri genellikle hassas tıbbi teşhis amacıyla yapılmaktadır. Teşhis için kullanılan taşınabilir teknolojiler hafiflik, sağlamlık ve kolay kullanım gibi ihtiyaçları karşılamalıdır. Bu sebeple, yakın geçmişte laboratuvar testleri minyatürleştirilmiş ve bu amaçla hastane ortamı dışında test yapmaya imkan veren taşınabilir, tek kullanımlık, çok düşük hacimde analit ve kimyasal belirteç (reaktif) kullanan cihazlar geliştirilmiştir.

Mikroakışkan teknolojisi uygulamaları, biyokimyasal ve kimyasal analiz alanında hızla gelişmektedir. Bu teknolojiler, hızlı teşhis amacıyla çok düşük miktardaki sıvı numunelerinin kontrolü ve taşınmasına olanak vermektedir. Şimdiye kadar, biyolojik analizler için kullanılan mikroakışkan cihazlar, cam, PDMS (polidimetilsilokzan), silikon, plastik ya da diğer polimerler üzerinde kanalların kalıplanması ya da aşındırılması yolu ile üretilmiştir. Günümüzde, bu tip uygulamalar için kağıt tabanlı mikroakışkan teşhis cihazları da kullanıma uygun adaylar olarak araştırılmaktadır. Desenlendirilmiş kağıtlardan elde edilen teşhis cihazları kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar (μPADs) olarak bilinmektedirler ve geleneksel mikroakışkanların sağladığı olanakları ve teşhis için kullanılan basit şerit testlerinin kolaylığını birarada sunmaktadırlar. Mevcut kapiler özelliklerinden dolayı sıvı akışını kontrol etmek için bir güce ihtiyaç duymamaktadırlar.

Kağıt tabanlı analitik cihazlar dışında son zamanlarda tekstil kumaşı, vücut sıvılarından biyo-kimyasal analiz yapılması amacıyla, esnek ve giyilebilir mikroakışkan cihazların üretiminde uygun bir platform olarak araştırılmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle ter, kan gibi vücut sıvıları, pH, iletkenlik, terleme oranı gibi bazı kimyasal ve fiziksel parametrelerin izlenmesi için kullanılmış ve teşhis, ölçüm cihazının teşhis bölgelerinde sinyal ya da renk değişimi şeklinde görsel yolla yapılmıştır. Literatürde yer alan kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlara göre daha esnek ve giyilebilir bir alternatif olan tekstil tabanlı bir mikroakışkan platform, vücuttan biyo-kimyasal analiz yapılabilmesi için potansiyel bir biyosensör uygulaması olarak görülmektedir. Mevcut çalışmada simüle edilmiş vücut terindeki laktat seviyesinin, invaziv olmayan, hızlı ve yarı kantitatif bir yöntemle analizini sağlayan ve potansiyel olarak bir sporcunun fiziksel aktivite esnasındaki form durumunu izleyebilmesini sağlayabilecek, tekstil tabanlı, esnek ve giyilebilir bir mikroakışkan sistem tasarlanması amaçlanmaktadır.

Ter, fiziksel aktivite sırasında üretilen, kolay ulaşılabilir bir vücut sıvısı olmanın yanında amonyak, sodyum, potasyum, klorid, kalsiyum, bikarbonat gibi farklı maddeleri ve ayrıca laktat ve glikoz gibi organik bileşikleri içeren kan plazmasının filtresidir. Ter içeriği, kişiden kişiye değişmekle birlikte, terleme oranına, hidrasyon

seviyesine, aktivite türüne ve ortam ısısına bağlı olarak değişmektedir. Buna bağlı olarak, ter içeriğinin izlenmesi kişinin fizyolojik durumu hakkında önemli bilgiler içermektedir. Mevcut çalışmada yeni, tek kullanımlık ve giyilebilir bir biyo-kimyasal analitik cihaz tasarlanmış ve kendinden emici bir nonwoven (dokunmamış) kumaş üzerinde mikro kanalların ve haznelerin fotolitografi tekniğiyle desenlendirilmesiyle üretilmiştir. Bu analitik cihaz, kılcal etki ile numune sıvıyı toplayabilecek ve fotolitografi tekniğiyle yüzeyinde üretilmiş kanallar vasıtasıyla teşhis haznelerine etkili bir şekilde iletebilecek şekilde tasarlanmıştır.

Kumaş yüzeyi üzerinde hidrofob bariyerlerle sınırlandırılmış hidrofil kanal ve hazne alanlarını oluşturmak için epoksi bazlı, SU-8 negatif fotodirenç polimeri kullanılmıştır. Fotolitografi ile üretim sonrasında, tarayıcı elektron mikroskobu ile kumaş yüzeyinde oluşturulan desenlerin hidrofilik/hidrofobik kontrastı ve fotodirenç polimerinin kumaşa penetrasyon davranışı karakterize edilmiştir. Mikroakışkan cihazda sızma olmadan sıvı emiliminin sağlanması, işlevsellik ve tekrarlanabilirlik açısından çok kritik bir özelliktir; çünkü sıvının sızması çapraz reaktiviteye neden olarak teşhis haznelerindeki reaksiyonu etkilemektedir. Bu yüzden hidrofil alanlar hidrofob bariyerler ile düzgünce çevrilmiş olmalıdır. Bir başka deyişle desende iyi bir hidrofilik/hidrofobik kontrast gereklidir. Mevcut çalışmada, kumaş yüzeyindeki desende iyi seviyede elde edilen hidrofilik/hidrofobik kontrast, sıvının kanallar boyunca kapiler olarak nüfuz etmesini sağlamış, hazne ve kanalların çevresinde hiçbir sıvı sızması gözlemlenmemiştir.

Mikroakışkan cihazın üretiminden sonra biyolojik aktivite testleri, biri teşhis, diğeri kontrol ve sonuncusu örnek solüsyonun toplanması için kullanılan, mikro kanallarla birbirine bağlantılı üç hazne içeren mikroakışkan sistemde gerçekleştirilmiştir. Laktat analizi için, teşhis hazneleri LOX (laktat oksidaz) ve POX (horseradish peroksidaz) enzimlerinin ko-immobilizasyonu ile işlevsel hale getirilmiştir. LOX, L-(+)-Laktik asiti (simüle teri) sübstratı olarak kullanır ve H_2O_2 üretir ve daha sonra H_2O_2, POX enzimi tarafından sübstrat olarak kullanılır. Diğer yandan indirek olarak reaksiyonu izlemek için, 2,2'-Azino-Bis(3- Etilbenztiyazolin-6-Sülfonik Asit) Diamonyum Tuzu (ABTS), H_2O_2 varlığında POX tarafından oksidasyona uğratılan bir boyar madde, ölçüm haznelerine eklenmiştir ve reaksiyon sonucu renk oluşumu gözlenmiştir. Laktat düzeyine bağlı olarak renk değişimini belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır ve en yüksek renk yoğunlunu elde etmek için farklı enzim, analit ve ABTS miktarları test edilmiştir. Analit konsantrasyonuna bağlı olarak renk yoğunlukları spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir.

Çalışmalar sonucunda fazla miktarda analit varlığının, analit inhibisyonuna (blokajına) sebep olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca pH ve sıcaklığın renk oluşumu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Efektif sonuçlar elde etmek için, analit pH seviyesinin 5'in üzerinde olması, sıcaklığın ise 25-30ºC olması gerekmektedir. Daha düşük analit pH'ı ve daha yüksek sıcaklık değerleri enzim aktivitesinde düşmeye neden olmuştur. Tekstil tabanlı biyosensör sistemi normal (< 5 mM) ve yüksek (≥ 5 mM) laktat seviyesini ayırt etmek için yarı-kantitatif görsel bir teşhis yapabilmiştir: Yüksek laktat seviyesi daha yoğun mor renk oluşumuna sebep olurken, normal seviyeler açık mor renk vermiş ve yeşil bir rengin oluşmaya başladığı tespit edilmiştir.Bu çalışmada tarif edilen, başarılı şekilde fabrikasyonu yapılan, yeni, giyilebilir ve tek kullanımlık tekstil tabanlı bir mikroakışkan cihazın, analitlerin hızlı biyo-kimyasal teşhisi için analitik cihaz tasarımında, özellikle malzeme seçimi açısından, örneğin emici nonwoven kumaş, yeni algılar yaratacağı tahmin edilmektedir.

DESIGN, FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF A BIOSENSOR ON NON-WOVEN TEXTILE SURFACES THROUGH THE INTEGRATION OF A MICRO CHANNEL SYSTEM

SUMMARY

Quantitative measurements of metabolites, biomarkers and proteins are usually performed for an accurate medical diagnosis. Detection technologies must be lightweight, robust and easy-to-use in order to meet the requirements of portable diagnostic testing. Therefore, laboratory tests were miniaturized and automated using lab-on-a-chip (LOC) devices which have been developed recently. LOC devices, utilized for point-of-care testing, allow the construction of portable and disposable systems that use very little volume of analytes and reagents.

Microfluidic technology applications are developing rapidly in the fields of biochemical and chemical analyses. These technologies provide the control and transmission of small quantities of liquid samples for rapid analysis. So far microfluidic devices for biological analysis were manufactured by molding or etching channels into glass, PDMS (polydimethylsiloxane), silicone, plastics or other polymers. Nowadays, paper based microfluidic diagnostic devices are also explored as suitable candidates for such applications. Diagnostic devices made of patterned papers are known as microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) combining the capabilities of traditional microfluidics with the simplicity of diagnostic strip tests. They do not require any power to control the fluid flow, since it is controlled by the inherent capillarity.

Apart from the paper based analytical devices, recently the textile fabric has been investigated as suitable a platform for the fabrication of flexible and wearable microfluidic devices to perform bio-chemical analysis of body fluids. In these studies, body fluids such as sweat, blood etc., have been usually used for the monitoring of some chemical and physical parameters like pH, conductivity, sweat rate, etc. and detection has been done visually as a signal or color change on the detection zones of the sensing devices.

A fabric-based microfluidic platform, being more flexible and wearable alternative to the existing paper-based devices in the literature, appeared to be a potential bio-sensor application to perform on-body bio-chemical analysis. In the current study, it is aimed to design a flexible, wearable, textile-based microfluidic device enabling a non-invasive, rapid, semi-quantitative analysis of lactate level in simulated sweat solution, which may be potentially used for the observation of an athlete's physical condition during physical performance.

Sweat is not only an easily accessible body fluid generated during physical activity but also a filtrate of blood plasma including various substances such as ammonia, sodium, potassium, chloride, calcium, bicarbonate, also organic compounds e.g. lactate and glucose.

Content of sweat not only varies between individuals, but also varies according to the sweat rate, the degree of hydration, the type of exercise, and the state of heat acclimatization. Considering this fact, monitoring sweat content reveals rich and valuable information about the physiological condition of the individual.

In the current study, a novel, disposable and wearable biochemical analytical device was designed and fabricated by patterning micro channels and reservoirs through photolithography technique on an inherently absorbent nonwoven fabric. This analytical device was designed to be able to collect and deliver the sample liquid effectively by the capillary action through the channels to the detection zones fabricated on its surface via photolithography technique.

An epoxy-based SU-8 negative photoresist polymer was used to form defined areas of hydrophilic channels and reservoirs separated by hydrophobic barriers on the fabric surface. After fabrication steps in photolithography, scanning electron microscopy analysis was conducted to analyze the hydrophilic/hydrophobic contrast of the patterns fabricated on the fabric sample and the penetration behavior of photoresist polymer within the textile material.

Fluid absorption without leakage was a very critical property in the microfluidic device to achieve functionality and reproducibility, because it affected the reaction on the detection zones causing cross-reactivity. This is required to avoid the escaping of the aqueous fluid through the channels and spreading through the device. Therefore, hydrophilic areas must be surrounded by hydrophobic barriers smoothly, in other words a good hydrophilic/hydrophobic contrast of the pattern is required.

The full penetration of the channel forming SU-8 polymer through the plane of fabric was also achieved which contributed to the well-defined pattern in the fabric. Scanning electron microscopy images, it was observed that fibers on the fabric surface were covered completely by the SU-8 negative photoresist. The well formed hydrophilic/hydrophobic contrast of the pattern provided the control of capillary penetration of liquids through channels of the pattern and no liquid leakage was observed around the reservoirs and channels.

Lactate analysis on textile based microfluidic device showed that enzyme behavior was different in the solution and on the textile surfaces. After fabrication of microfluidic device, biological activity tests were conducted on the final design of the microfluidic system which consisted of three connected reservoirs with micro channels, one for detection, one for control and a last one in the middle, for the introduction of the sample solution. The reservoirs were functionalized by co-immobilization of lactate oxidase (LOX) and horseradish peroxidase (POX) enzymes.

LOX uses L-(+)-Lactic acid as substrate and produces H_2O_2 which is then used as a substrate by POX. In order to indirectly follow the reaction, 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt (ABTS), a dye which is prone to oxidation by POX in the presence of H_2O_2, was added to the measurement chambers and colour formation based on the reaction was observed for detection.

The color change based on the lactate level, was determined by the optimization studies and different enzyme, analyte and ABTS amounts were tested to obtain best colour visualization. Colour densities depending on the analyte concentration were measured by using spectrophotometer. The studies showed that excess amount of analyte presence resulted in analyte inhibition.

It was also shown that analyte pH and temperature were effective on the color formation. For effective results, analyte pH and temperature should be ≥5 and 25-30 ºC, respectively.

Lower pH and higher temperature values resulted in a decrease in the enzyme activity. Although pH measurement range is suitable for sweat analysis, the temperature range of the biosensor should be extended to higher values (37-40ºC) to determine the lactate level in sweat.

The textile based biosensor system could make a semi-quantitative visual detection to differentiate between the normal (< 5 mM) and high (≥ 5 mM) lactate level: While high lactate level led to a denser purple color formation, normal levels led to a light purple formation and a green color started to be observed. The successful fabrication of a novel, disposable textile based microfluidic device as described in this study, is expected provide new insights especially into the choice of materials, i.e. an absorbent nonwoven fabric, for the design of analytical devices to perform rapid biochemical detection of various analytes.

1. GİRİŞ

Sağlık alanındaki teşhis cihazlarına yönelik efektif teknolojilerin geliştirilmesi sayesinde, eğitimli sağlık personeline ulaşımın zor olduğu az gelişmiş ülkelerde de sağlık hizmetlerine ulaşım kolaylaştırılabilmektedir. Bu teknolojilerin güvenilir, hafif, kolay kullanılabilir, ucuz olması ve analitlerin pratik bir şekilde tespit ve ölçümünü sağlaması gerekmektedir. Hızlı ve kolay teşhis sağlayan düşük maliyetli mikroakışkan cihaz uygulamaları dünyanın sağlık hizmetleri bakımı açısından yetersiz olan gelişmekte olan yerleşim alanlarında kullanılmaktadır [1].

Mikroakışkanların analitik teşhis alanındaki uygulamaları, son yirmi yılda yapılan çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Ancak, son teknoloji ile üretilen LOC (Lab-on-a-chip) yani çip üzerinde laboratuvar cihazları ya da entegre biyoçipler hem çok pahalıdır, hem de kullanım için eğitimli bir personele ihtiyaç duyulmaktadır [2].

Dünya nüfusunun yaklaşık üçte ikisi sağlık kaynakları bakımından sınırlı, gelişmekte olan bölgelerde yaşadığı için sağlık bakımı için düşük maliyetli, portatif, hızlı teşhis yapan, kullanımı için eğitimli personele gereksinim duymayan analitik cihazlara olan ihtiyaç artmaktadır [2].

Bu ihtiyaçlar göz önüne alınarak "Lab-on-a-chip" uygulamaları ve diğer biyolojik analizler için kullanılan mikroakışkan cihazlar, cam, PDMS (polidimetilsilokzan), silikon, plastik ya da diğer polimerler üzerinde kanalların kalıplanması ya da aşındırılması yolu ile üretilmiştir. Günümüzde, bu tip uygulamalar için kağıt tabanlı mikroakışkan teşhis cihazları da kullanıma uygun adaylar olarak araştırılmaktadır. Kağıt tabanlı mikroakışkan aygıt tasarımlarında yüzey olarak çoğunlukla yüksek absorban özelliğine sahip kromatografi kağıdı kullanılmıştır.

Üretim yöntemi olarak balmumuna baskı, mürekkep püskürtmeli baskı, şablon baskı, fotolitografi teknikleri uygulanarak kağıt yüzeyde hidrofobik bariyerlerle sınırlandırılmış hidrofil alanlar oluşturulmuştur. Yüzeyde oluşturulan hidrofil teşhis bölgelerinde biyolojik sıvıların analizinin yapılması sağlanmıştır. Kağıt yüzeylerin ucuz ve depolanabilir özellikte olması, selüloz ve selüloz-polimer karışımlarından

oluştuğu için biyolojik örneklerle uyumlu olması mikroakışkan cihazlarda taban olarak seçilmesini sağlamıştır. Kağıtların, kimyasal olarak modifiye edilip işlevsel grupların entegre edilmesine olanak vermesi, analit teşhisi için DNA, protein ve diğer küçük moleküllerin yüzeye kovalent olarak bağlanmasını sağlaması, genellikle beyaz olması, kolorimetrik testler için görsel ayırım sağlaması ve baskı teknolojileri için esnek ve uyumlu olması gibi özellikleri mikroakışkan aygıtlarda yüzey olarak kullanılabilme kolaylığı sağlamıştır.

Kağıt tabanlı analitik cihazlar dışında son zamanlarda tekstil kumaşı, vücut sıvılarından biyo-kimyasal analiz yapılması amacıyla, esnek ve giyilebilir mikroakışkan cihazların üretiminde uygun bir platform olarak araştırılmaktadır. Literatürde yer alan kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlara göre daha esnek ve giyilebilir bir alternatif olan tekstil tabanlı bir mikroakışkan platform, vücuttan biyo-kimyasal analiz yapılabilmesi için potansiyel bir biyosensör uygulaması olarak görülmektedir.

Kağıt yüzeyler kullanılarak üretilen cihazlar, yüzeyde oluşturulan desene ait teşhis bölgelerine analit sıvısının üstten damlatılması yolu ile çalışmaktadır. Tekstil yüzeylerinin herhangi bir güç sistemine ihtiyaç duymadan, kapiler etki ile vücut sıvısını (ter vb.) vücuttan toplayıp analizini mümkün kılması bu tür sistemlerin kağıt yerine yeni bir alternatif olarak kullanılmaya başlanmasına neden olmuştur.

Bu çalışmada, nonwoven tekstil yüzeylerine mikro kanal sistemi entegrasyonu ile simüle terden laktat analizini invaziv olmayan, hızlı ve yarı kantitatif bir yöntemle yapmaya imkan verecek tekstil tabanlı bir mikroakışkan cihaz tasarlanması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile geliştirilen tekstil tabanlı mikroakışkan cihazın potansiyel uygulamasında egzersiz sırasında sporcunun form durumunu izleyebileceği bir biyosensör olarak kullanımı öngörülmektedir. Bu tez çalışması dört bölümden oluşmaktadır.

İlk bölümde literatür özeti yer almaktadır. Bu kısımda mikroakışkan sistemler, mikroakışkan cihazların üretim yöntemleri, ve bu cihazlara biyolojik işlevselliğin kazandırılması, ve kağıt, polimer ve tekstil tabanlı mikroakışkan analitik cihaz uygulamaları özetlenmiştir. İkinci bölümde; tekstil tabanlı mikroakışkan cihazın tasarım, fabrikasyon ve karakterizasyonu, ayrıca teşhis bölgelerinin biyolojik olarak işlevsel hale getirilebilmesi için kullanılan malzeme ve metotlar yer almaktadır.

Üçüncü bölümde; geliştirilen mikroakışkan cihazın test ve karakterizasyonu, analit teşhisi için optimizasyon çalışmaları, analit konsantrasyonuna bağlı olarak bir renk skalası oluşturulması ve analit pH'ı ve sıcaklığının kumaş yüzeyindeki renk oluşumuna etkisi tartışılmıştır. Dördüncü bölümde ise gelecek çalışmalar için öneriler yer almaktadır.

1.1 Tezin Amacı

Giyilebilir sensörler, kullanıcının, fizyolojik durumunu hastane ortamından uzakta iken izleyebilmesine olanak sağlamakta ve aynı zamanda taşınabilirlik, hafiflik, esneklik, sağlamlık ve kolay kullanım gibi avantajlar sunmaktadır. Bu kapsamda vücut sıvısından biyo-kimyasal analiz yapılabilmesine olanak sağlayan, giyilebilir, tek kullanımlık, düşük hacimde analit kullanan teknolojilerin geliştirilmesi yönünde araştırmalar artan bir öneme sahiptir. Mikroakışkan teknoloji uygulamaları biyo-kimyasal teşhis alanında hızla gelişmektedir. Günümüzde, bu tip uygulamalar için kağıt tabanlı mikroakışkan teşhis cihazları kullanıma uygun adaylar olarak araştırılmaktadır. Desenlendirilmiş kağıtlardan elde edilen teşhis cihazları kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar (μPADs) olarak bilinmektedirler ve geleneksel mikroakışkanların sağladığı olanakları ve teşhis için kullanılan basit şerit testlerinin kolaylığını birarada sunmaktadırlar.

Mevcut çalışmada simüle edilmiş vücut terindeki laktat seviyesinin, invaziv olmayan, hızlı ve yarı kantitatif bir yöntemle analizini sağlayan ve potansiyel olarak bir sporcunun fiziksel aktivite esnasındaki form durumunu izleyebilmesini sağlayabilecek, tekstil tabanlı bir mikroakışkan sistem tasarlanması amaçlanmaktadır. Literatürde yer alan kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlara göre daha esnek ve giyilebilir bir alternatif olan tekstil tabanlı bir mikroakışkan platform, vücuttan biyo-kimyasal analiz yapılabilmesi için potansiyel bir biyosensör uygulaması olarak görülmektedir. Giyilebilir bir pazu bantı ya da alına takılan bir bant şeklinde teri toplayabilen bir tekstil malzemesi yoluyla, potansiyel olarak fiziksel aktivite sırasında eş zamanlı bir dayanıklılık/performans ölçümü yapılabilmesi amaçlanmaktadır. Bu bağlamda; mikro kanal ve hazneleri içeren sistemin mevcut literatürdeki kağıt taban üzerinde geliştirilen sistemlerden farklı olarak nonwoven yüzeyler üzerine uygulanması nedeniyle geliştirilen teknoloji yenilikçi ve öncü bir çalışma olarak sınıflandırılabilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mikroakışkan Sistemler

Mikro elektro-mekanik sistemler (MEMS), mikro boyutlardaki elektriksel ve mekanik bileşenlerden oluşan cihazları ifade eder [3]. Mikro ve mikro-elektronik teknolojisi entegre devre üretiminde gerçekleşen yenilikler ışığında ortaya çıkmıştır ve son on yıldır MEMS alanındaki çalışmalar artış göstermiştir [4].

Mikroakışkan teknolojisinde oluşturulan sistemlerde mikro ve nano hacimlerdeki sıvılar, mikrometre boyutlarındaki kanallar aracılığıyla taşınıp iletilebilmektedir [5,6].

Mikroakışkan sistemlerde kılcalllık, sıvının kanal duvarlarıyla olan etkileşimi ve yüzey gerilimi gibi yüzeysel kuvvetler etkili olmaktadır. Mikroakışkan teknolojisi ile çalışan cihazların üretiminde genellikle akışı sağlayacak mikropompaları, işleyişi düzenlemekten sorumlu olan mikrogiriş noktalarını ve mikrovanaları ve akışkanların iletimini sağlayacak kanalları içeren farklı tasarımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mikron ve nano boyutlarda akışkanlarla kontrollü bir şekilde yapılan çalışmalarla analiz yöntemleri hassaslaştırılarak bu yöntemlerin geliştirilmesi kolaylaştırılmıştır [5].

MEMS arasında yer alan ve mikro teknolojinin en son gelişmekte olduğu alan, Biyo-MEMS'lerdir. Biyo-MEMS'ler biyolojik malzemelerin analizini, ölçümünü ve aktivitelerinin gözlemlenmesini sağlayan mikro elektro-mekanik yapılardır. Bio-MEMS'in gelişmekte olduğu alanlar, mikroakışkanların uygulama alanları olan çip-üstü-laboratuar (LOC) uygulamaları, biyomedikal cihazlar, kimya ve biyokimya uygulamalarında kullanılan sistemlerdir [7].

Biyo-MEMS olarak bilinen biyolojik mikro analiz çipleri, birçok biyokimyasal ve tıbbi analizleri laboratuar cihazlarına ihtiyaç duymadan, ucuz, hızlı ve yüksek hassasiyetle gerçekleştirebilmektedir. Bu cihazlar var olan uygulamaları geliştirirken daha önce yapılamayan teşhis ve tedavi yöntemlerini de ucuz ve ulaşılabilir hale getirmektedir [4].

Biyo-MEMS alanındaki mikroakışkan sistem uygulamalarında mikro ve nano boyutlarda akışkanların kullanılmasıyla, tıbbi teşhis ve kimyasal analiz için gerekli olan pahalı reaktiflerin kullanımı azaltılmış, az miktarda örnek sıvı ile kontollü bir akış sağlanarak, analizler gerçekleştirilmiştir. Böylece çok küçük hacimdeki örneklerin hızlı ve doğru teşhisi sağlanmıştır [5].

Biyo-MEMS uygulamaları arasında yer alan (LOC), gelişen teknolojiyle birlikte son yıllarda artan bir öneme sahiptir. (LOC) bir laboratuarda yapılabilecek analizlerin birkaç mm uzunluğundaki minyatürleştirilmiş cihazlarda gerçekleştirilmesini ifade eder. Tıp ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda kimyasal/biyo-kimyasal analizlere olan ihtiyaçların artmasıyla (LOC) teknolojisinin pratik uygulamaları önem kazanmaya başlamıştır. Böylece klasik yöntemlerin gereksinimi olan büyük laboratuvarlar, kompleks cihazlar yerini mikroakışkanların uygulamalarından olan entegre biyo-chip'lere yani (LOC) teknolojisinin uygulamalarına bırakmıştır. Bu yapıları üretmek için çoğunlukla silikon, polimer veya cam malzemeler yüzey olarak kullanılmaktadır [5].

2.2 Mikroakışkan Cihazların Üretim Yöntemleri

Kimyasal ve biyolojik analizlerde kullanılan mikroakışkan cihazların üretiminde en sık kullanılan yöntemler mikro-işleme, fotolitografik tabanlı işlemler, mikro-şekillendirme, lazer mikro-üretimi, lazer mikro-sinterleme, mikro-erezyon tekniği ve mikro-enjeksiyon kalıplamadır [8].

2.2.1 Mikro-işleme

Bu yöntem mikro boyutlarda kesici uçlar yardımıyla malzemenin istenmeyen kısmının uzaklaştırılmasını ifade eder. Medikal ve biyoteknoloji uygulamalarında kullanılmakta olan biyo uyumlu malzemeler ve üç boyutlu mikro-parçalar bu yöntem ile üretilmektedir [8].

2.2.2 Fotolitografik tabanlı işlemler

Fotolitografi yöntemi mikroakışkan sistemlerin üretim metotları arasında yer alan birçok mikroakışkan çalışmasında tercih edilen bir yöntemdir. Litografi tekniği, belli bir desenin ışığa duyarlı malzeme (rezist) üzerine, ışınım ile aktarılmasıdır. Işığa duyarlı malzemelerin fiziksel özellikleri (negatif veya pozitif rezist özellikleri),

ışınım etkisi altında değişir. Eğer bir ışığa duyarlı malzeme, maske kullanılarak ışınıma maruz bırakılırsa, ışığın temas ettiği bölgeler ile ışık almayan bölgeler arasındaki fiziksel özellikler farklılık gösterir. Yani pozitif reziste ışınıma maruz kalmayan bölgeler polimerleşirken, negatif reziste ışınıma maruz kalan alanlar polimerleşmektedir. Böylece litografi ile MEMS yapıların oluşumunda polimerleşmeyen kısımlar bir takım kimyasal süreçlerden geçirilerek desen ortaya çıkarılmaktadır [8].

2.2.3 Mikro-şekillendirme

Mikro-şekillendirme yönteminde mekanik kuvvet uygulayarak yüzeyin kalıbın şeklini alması sağlanır. Bu yöntemde üretilen parçaların maliyeti oldukça düşüktür. Bu yöntem şekillendirme limitlerinden dolayı her malzemeye uygulanamamaktadır. Mikro-şekillendirme kalıpları mikro-frezeleme ve mikro-erozyon gibi diğer mikro-üretim yöntemleri kullanılarak üretilmektedir [8].

2.2.4 Lazer-mikro üretimi

Lazer-mikro üretim yönteminde, optik yöntemlerle mikro boyutlarda odaklanmış lazer hüzmesi kullanılmaktadır. Lazer enerjisi ile işlenecek olan yüzeyin istenmeyen kısımları ısıtılarak eritilir ve eriyen mazleme basınçlı gaz kullanılarak yüzeyden uzaklaştırılır. Bu yöntemin dezavantajlarından birisi işlenen yüzey ile mekanik temas olmadığı için üretilen parça boyutlarının kontrol edilememesidir. Ayrıca üretim sonrasında işlenen parçada ısıdan etkilenen bir tabakanın oluşması ve eriyen malzemenin yüzeyde birikmesi istenmeyen sonuçlardandır. Lazer mikro-üretim yönteminde bu sorunları azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır [8].

2.2.5 Lazer mikro-sinterleme

Lazer mikro-sinterleme yüksek hassasiyete sahip hızlı bir üretim yöntemidir. Bu yöntem ile yüzey sıvı malzemeden katman katman katılaştırılarak üretilmektedir. Katılaşmanın sağlanabilmesi için lazer ışığın iş parçasının üretileceği çözeltiye odaklanması gerekmektedir. Bu yöntem ile yüksek geometrik karmaşıklığa sahip mikro parçalar üretmek mümkündür. Lazer mikro sinterleme gibi yöntemlerle montajlanmış mikroakışkan sistemler üretilebilmektedir [8].

2.2.6 Mikro-erozyon tekniği

Mikro-erozyon yönteminde yüksek akımlı elektrik kullanılarak üretilecek iş parçasının istenmeyen kısımları aşındırılır. Yüksek akımla yüklenmiş elektrot, iş parçasına yaklaştırıldığında kıvılcımlar üreterek elektriği parçanın üzerine boşaltır ve elektiriğin boşaldığı yerdeki yerel sıcaklık yükseltilerek yüzeydeki istenmeyen kısımlar uzaklaştırılır. Bu yöntem kullanılarak iletken ve çok sert malzemeler kolaylıkla işlenerek mikroakışkan sistemler üretilebilmektedir [8].

2.2.7 Mikro-enjeksiyon kalıplama

Mikro-enjeksiyon kalıplama yöntemi eritilen malzemenin bir kalıp içerisine enjekte edilip katılaştırılmasıyla parça üretilmesini kapsamaktadır. Hızlı bir yöntem olduğu için seri üretime uygundur. Polimerden yapılmış tek kullanımlık medikal malzemelerin üretiminde bu yöntem kullanılmaktadır. Bu konu üzerindeki araştırmalar daha çok boyut doğruluğunun iyileştirilmesi ve kullanılan malzeme çeşidinin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır [8].

2.2.8 Mürekkep püskürtmeli baskı (ink jet printing) yöntemi

Kağıda mürekkep püskürterek yazan yazıcı teknolojisi, artık sadece bir ofis baskı teknolojisi olmaktan çıkıp, yavaş yavaş çeşitli endüstriyel üretim süreçleri için çok çeşitli yüzeylerde (kağıt vb.) belirlenen noktalara malzemelerin (mürekkep, erimiş mum vs.) çok küçük miktarlarda basılması için kullanılan çok yönlü bir yöntem haline gelmiştir. Bu tip yazıcıların çalışma ilkesi genel olarak nokta vuruşlu yazıcılar ile aynıdır. Vurma noktalarının yerini yüksek hızla baskı ortamına püskürtülen boyar madde alır [9].

Yarı iletken teknolojisindeki gelişmeler bu tür yazıcıların baskı çözünürlüğünü yüksek düzeylere çıkarmıştır. Günümüzde en yüksek baskı çözünürlüğüne sahip yazıcılar bu tür yazıcılardır. Bu tür yazıcılarda, matris biçiminde düzenlenmiş çok sayıda püskürtme başlığına sahip olan yarı iletken baskı kafaları kullanılır. Kullanılan püskürtme yöntemine göre; piezoelektrik, ısıl ve sürekli türleri mevcuttur [9].

Şimdiye kadar, bu teknoloji çoğunlukla plastik elektroniği ve ışık yayan polimer diyotların imalatı için uygulanmıştır. Mürekkep püskürtmeli baskı, mikroakışkan cihazların üretiminde sıklıkla uygulanan fotolitografi yöntemine göre zaman

tasarrufu sağlayan ve ucuz bir yöntemdir. Çünkü bu yöntem çok aşamalı işlemlerden oluşan fotolitografi yöntemiyle karşılaştırıldığında yüzeye doğrudan desen oluşturmayı mümkün kılmaktadır.

Belirli bir maske kullanımına dayanmaz ve temiz oda tesisleri bu yöntemin uygulanması için bir ön koşul değildir.

Mürekkep püskürtmeli baskı, biyolojik numune analizleri için alternatif bir yöntem haline gelmiştir. Biyolojik analizler için kullanılabilecek kağıt tabanlı mikroakışkan sistemlerin üretilmesinde uygulanan bir yöntemdir. Düşük maliyeti ve seri üretim kolaylığına rağmen analitik kimyada hala potansiyel olarak uygulaması mevcut değildir ve şu ana kadar elektro-kimyasal algılama cihazlarının imalatı için sınırlı kalmıştır [9].

2.3 Mikroakışkan Cihazlara Biyolojik İşlevsellik Kazandırılması

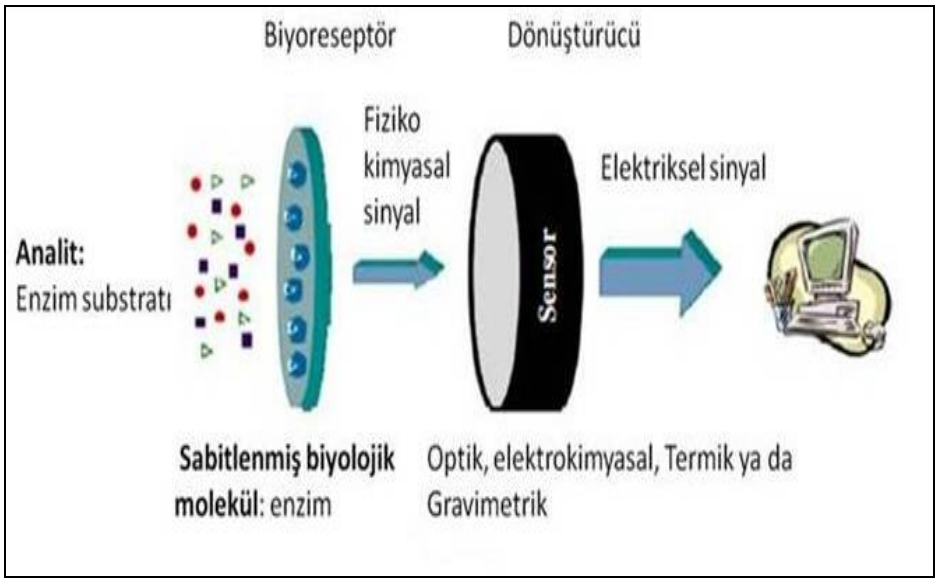
Mikroakışkanların belirlenen üretim yöntemleri ile üretilmesi ve devamında fonksiyonelleştirilmesi son ürün elde etmenin en önemli kısmıdır. Bütün canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri algılayarak yaşamlarını devam ettirebilmek için bulundukları ortama adaptasyon sağlamaya çalışırlar. Bu algılama ve uyumluluk mekanizması biyosensörlerin kullanımı için temel oluşturmuştur. Biyosensör, biyolojik olaylardaki biyokimyasal reaksiyonları algılayarak, biyolojik olayın teşhisini sağlayan bir ölçme sistemidir [10].

Biyosensörlerin geçmişi 1950'li yılların ortalarına uzanmaktadır ve biyosensörler ile ilgili ilk uygulama L.C. Clark'ın kandaki glikoz seviyesini ölçmesiyle başlamıştır. Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler dışında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller (hücre içerisinde bulunan kendi içinde özelleşmiş yapılar), antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilmektedir [10].

Biyosensörler ölçme tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak sınıflandırılmaktadırlar [10].

Biyosensörler eşsiz özellikleri, doğal basitlikleri, nispeten düşük maliyetleri, minyatür yapıları ile klasik analitik metotlara göre tamamlayıcı bir araç olarak kabul edilebilir. Bir biyosensör Şekil 2.1'de gösterildiği gibi özel olarak birleştirilmiş iki elementten oluşan bir cihazdır. Bunlar analiti (enzim sübstrat, DNA, antijen vs.)

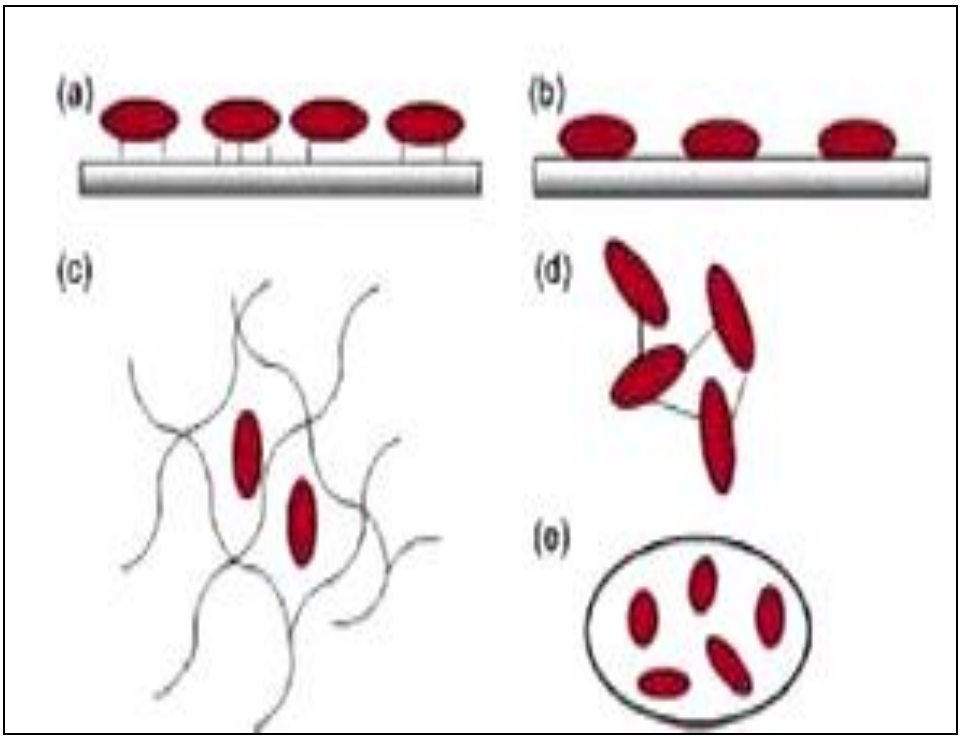
algılayan sabitlenmiş duyarlı bir biyolojik element (enzim, antikor vs.) olan **biyoreseptör** ve analit ile etkileşime giren biyoreseptörden alınan biyo-kimyasal sonuçları elektronik verilere dönüştüren **dönüştürücüdür** [11].



Şekil 2.1: Biyosensör şematik gösterimi [11].

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da araştırılarak ortaya çıkarılmasına imkan vermiştir. Bunun sonucu olarak çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye de devam edilemektedir. Günümüzde elektro-kimyasal esaslı olan biyosensörlerin kullanımı oldukça yaygındır, pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu sonuçtaki en büyük etken canlı sistemlerde her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılacak pek çok enzimin varlığının bilinmesidir [10].

Enzimatik biyosensörleri geliştirmek için enzim sabitleme (immobilizasyon) yöntemleri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Dönüştürücü (biyoreseptörden alınan biyo-kimyasal sonuçları elektronik verilere dönüştüren element) yüzey üzerindeki enzim sabitlenmesi biyosensör tasarımında gerekli ve kritik bir adımdır. Mikroakışkan cihaz çalışmalarında, tasarımda yer alan biyolojik algılama bölgesindeki enzim sabitlenmesi (immobilizasyonu) önemli bir aşamadır ve yapılmış çalışmalarda enzim immobilizasyonu için çoğunlukta kullanılan yöntemler arasında jel içinde tutuklama, moleküller içi çapraz bağlama, adsorbsiyon, kovalent bağlama ve kapsülleme yer almaktadır (Şekil 2.2) [12].



Şekil 2.2: Enzim immobilizasyon metotları, a) kovalent bağlanma, b) adsorbsiyon, c) Jel içinde tutuklama, d) moleküller içi çapraz bağlama, e) kapsülleme [10].

Kovalent bağlama: Polimer tabanlı yüzeylere enzimlerin kovalent olarak bağlanması enzimatik biyosensörleri geliştirmek için kullanılan yaygın kimyasal sabitleme metotlarından biridir. Bu amaçla biyokatalistler (enzimler) yüzeye fonksiyonel gruplar boyunca bağlanır [10].

Başlangıçta katı yüzeye enzimlerin bağlanması genellikle yüzeyin çok fonksiyonlu reaktörlerle aktifleştirilmesiyle gerçekleşir ve bunu takiben aktifleştirilen yüzeye enzim bağlanması gerçekleşir, ardından bağlanmamış fazla moleküller uzaklaştırılır [10].

Adsorbsiyon: Bu sabitleme yöntemi katı desteklerde (enzim sabitlemenin yapılacağı yüzey) enzim tutunmasını temel almaktadır. Van der Walls kuvvetleri, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerin avantajına sahiptir. Enzim, solüsyon içerisinde çözünür, katı destek enzim solüsyonu ile temas halinde kalır ve tutunmamış enzim tampon çözelti ile yıkanarak uzaklaştırılır. Tutunma mekanizması Van der Waals güçleri ve elektrostatik etkileşimler gibi zayıf bağlanmalara dayalıdır [10].

Jel içinde tutuklama: Biyoreseptörün bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Böylece polimerizasyonun gerçekleştiği ortamda, çapraz bağlı taşıyıcılarla enzim tutularak hapsedilir ve enzimlerin ortamdan uzaklaşması Bu yöntem enzimler yanında organeller (hücre içerisinde bulunan kendi içinde özelleşmiş yapılar), hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir [10].

Moleküller içi çapraz bağlama: Bu sabitleme tekniğinde enzimler birbirine çapraz olarak bağlanır ya da işlevsel sabit bir proteinin varlığında tutunurlar. Bu metot moleküller arasında ihtiyaç duyulan güçlü kimyasal bağlanma ve basitliği yüzünden dikkat çekici bir yöntemdir. Ana sorun çapraz bağlama esnasında aktif bölgenin kimyasal değişikliği ve aktif enzim biçimlenmesinin bozulması yüzünden ortaya çıkan aktivite kaybıdır [10].

Kapsülleme: Bu yöntemde enzimler çeşitli tipteki membranlar içine alınırlar. Bu membranlar yarı geçirgendir. Düşük molekül ağırlıklı sübstratı ve molekülleri geçirirler. Ekonomik olması ve kolay kullanımı ile son yıllarda çoğunlukla kağıt taban üzerinde ve tekstil kumaşları kullanılarak üretimi yapılan mikroakışkan cihazlarda, ölçüm yapılacak test bölgeleri genellikle fiziksel adsorbsiyon tekniği ile kimyasal reaktiflerle aktive edilerek renk değişimine bağlı gelişmiş hassasiyetle gözle görülür sonuçlar elde edilmektedir [10].

2.4 Mikroakışkan Analitik Cihaz Uygulamaları

Mikroakışkan teknolojisi uygulamaları biyo-kimyasal ve kimyasal analiz alanlarında hızla gelişme göstermektedir. Son yıllarda geliştirilen Lab-on-a-chip cihazlarının kullanımıyla laboratuar testleri minyatür hale getirilen cihazlarla otomatik olarak yapılmaktadır. Hasta bakım noktası (point-of-care) testleri için kullanılan taşınabilir ve tek kullanımlık olan bu cihazlar, çok az miktarda reaktif ve analit kullanırlar [13].

Bu teknolojiler, hızlı analiz için sıvı örneklerinin küçük miktarlarda iletimini ve kontrolünü sağlarlar [14]. Şimdiye kadar biyolojik analiz için kullanılan mikro akışkan cihazlar cam, PDMS, silikon, plastik ya da başka polimerler içine kalıplama ya da mikro-işleme ile kanallar yapılarak üretilmişlerdir [15].

Günümüzde, kağıt tabanlı mikroakışkan teşhis cihazlarının geliştirilmesi adına birçok çalışma yapılmaktadır. Fotolitografi, ink jet baskı gibi yöntemlerle desenlendirilmiş kağıtlardan yapılan tanı cihazları, biyolojik analizler için kullanılan şerit testlerinin

basitliğini geleneksel mikroakışkan cihazların işlevselliği ile birleştiren ucuz yöntemlerle kolay üretim sağlayan mikroakışkan kağıt-tabanlı analitik cihazlar (μPADs) olarak bilinir [13-17].

Oluşturulan cihaz yüzeyinde sıvı akışı için herhangi bir güç sistemine (pompa vb.) ihtiyaç duyulmaz ve yüzey kapilaritesi ile sıvı iletimi sağlanır. Mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihazların fabrikasyonu hidrofil kanalların hidrofobik bariyerler ile çevrilerek oluşturulması esasına dayanır. Şu anda, kağıt-tabanlı cihazların geliştirilmesi çekici bir teknoloji haline gelmiştir ve literatürde yer alan çalışmalarda fotolitografi, mürekkep püskürtmeli baskı, lazer kesimi, gibi yöntemlerle üretimler yapılmıştır. Kağıt tabanlı çalışmaların yanı sıra polimer yüzeylere lazer kesimi ile desenlendirme yapıldıktan sonra enzim immobilizasyonu ya da pH duyarlı boyaların enjeksiyonu ile vücut sıvılarının analizi ve pH değerlerinin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur.

Kağıt tabanlı analitik cihazlar haricinde, tekstil kumaşı, esnek ve giyilebilir mikro akışkan cihazların üretiminde vücut sıvılarından biyo-kimyasal analiz yapılması amacıyla uygun bir taşıyıcı malzeme olarak incelenmektedir. Şu zamana kadar yapılan çalışmalarda, teşhisi ölçüm cihazının teşhis bölgelerinde sinyal ya da renk değişimi şeklinde görsel yolla yapılabilen ter, kan gibi vücut sıvıları genellikle analit olarak kullanılmıştır.

Mikroakışkan analitik cihazlar düşük maliyetleri, tek kullanımlık olmaları ve uygulama için teknik personele ihtiyaç duymamaları açısından bireysel olarak tıbbi teşhiste kullanım kolaylığı sağlarlar. Bu cihazlar litaretürde kağıt, polimer ve son yıllarda da üzerinde çalışmalar yürütülen tekstil tabanlı mikroakışkan cihazlar olarak araştırma konusu olmuşlardır.

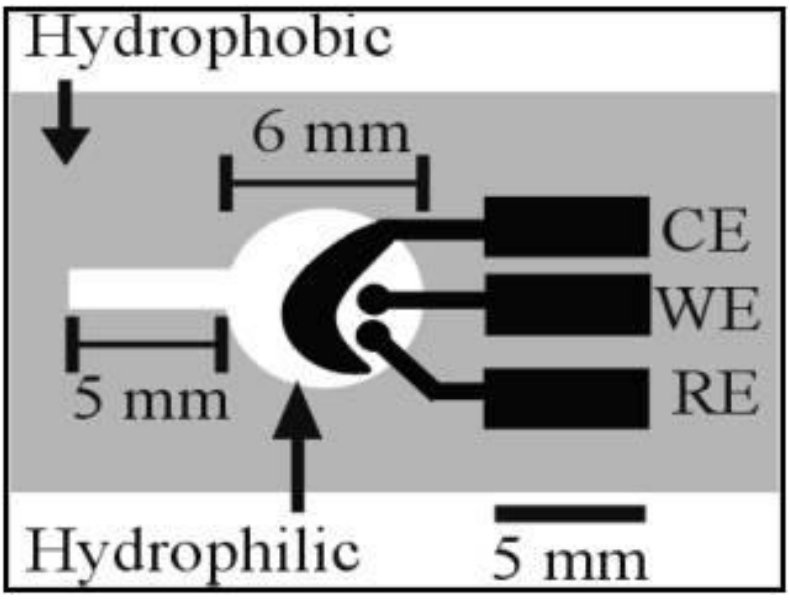
2.4.1 Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar

Lab-on-a-chip uygulamaları için kağıt tabanlı olarak üretilmiş mikro akışkan aygıtlarda bireylerin sağlık durumu hakkında bilgi veren analitlerin (glikoz, protein, laktat, laktoz, ürik asit, kolesterol, alkol, antijen ve antikor gibi) analizi yapılmıştır. Bu çalışmalarda malzeme yüzeyi (kağıt), seçilen hidrofobik malzemelerle (PMMA (polimetilmetakrilat), SU-8 (fotodirenç malzeme), balmumu) kaplanarak istenilen desen çoğunlukla litografi, bunun yanında mürekkep püskürtmeli baskı, balmumu ile baskı ve plazma uygulaması yöntemleri gibi tekniklerle yüzeye aktarılmıştır.

Elde edilen desen üzerinde, teşhis edilmek istenen numunenin (analitin) ölçüm alanlarına iletimi yüzeyin kılcallık özelliği ile sağlanmıştır. Analit tek bir bölgeden beslenip ölçüm alanlarına hidrofob bariyerlerle çevrilmiş hidrofil kanallar sayesinde iletilmiştir. Bu ölçüm alanları kimyasal reaktiflerle (enzim, antijen, antikor vs.) çoğunlukla adsorpsiyon yöntemi kullanılarak aktifleştirilmiş, analit teşhisi için elverişli hale getirilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalardan bir tanesi SU-8 negatif fotodirenç polimeri kullanılarak fotolitografi tekniği ile filtre kağıdı üzerine mikro kanalların oluşturulduğu ve oluşturulan mikro kanallarda screen-printing (şablon baskı) yöntemi ile elektrotların üretildiği, elektro-kimyasal olarak analit tanımlama yapma özelliğine sahip kağıt tabanlı mikro akışkan cihazdır (Şekil 2.3). Elde edilen bu mikro akışkan cihaz sayesinde biyolojik numunelerdeki glikoz, laktat ve ürik asit tayini, oksidaz enzim reaksiyonu ile gerçekleştirilebilmektedir.

Enzim sabitleme işlemi adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, kağıt tabanlı mikro akışkanlar ile elektro-kimyasal tanılama yönteminin başarılı bir şekilde entegre edilmesiyle kullanımı kolay, ucuz, tanı koyma ve ölçümleme yapmada alternatif bir yöntemi açıklamaktadır [18].

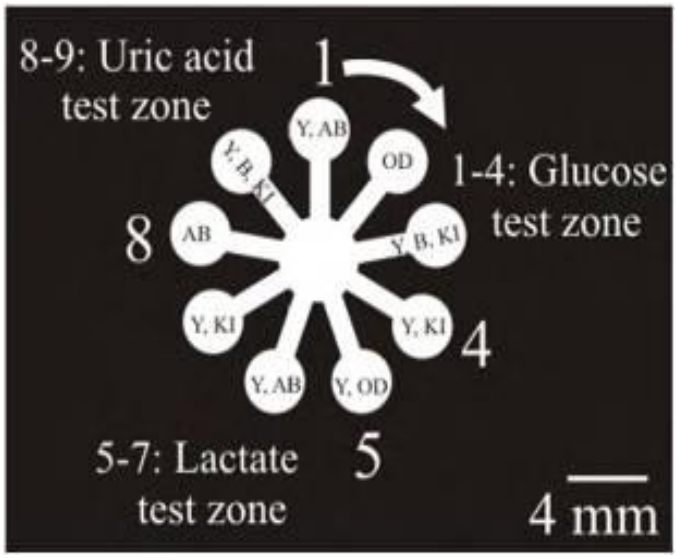


Şekil 2.3: Elektro-kimyasal tanımlama yapan kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın temel tasarımı [18].

Kağıt tabanlı olarak yürütülmüş bir diğer mikroakışkan cihaz çalışmasında hedef, çoklu indikatör kullanılarak tek bir analit örneğini analizleyebilmektir. Tek analit için

çoklu indikatör kullanımı, analitin konsantrasyonu değiştikçe indikatörlerdeki renk farkının daha belirgin hale gelmesi ile tanımlama yapabilmeyi kolaylaştırmaktadır [19].

Bu çalışmada da kağıt üzerine mikro kanal ve hazne desenleri oluşturmak için fotolitografi tekniği uygulanmıştır. Sıvı akışı ise kağıt dokusu boyunca kılcal kuvvet (kapilarite) ile sağlanmaktadır. Tasarımı yapılan mikroakışkan cihaz ile glikoz, laktat ve ürik asit tayini optimize edilen hacimlerde kolaylıkla yapılabilmektedir (Şekil 2.4) [19].



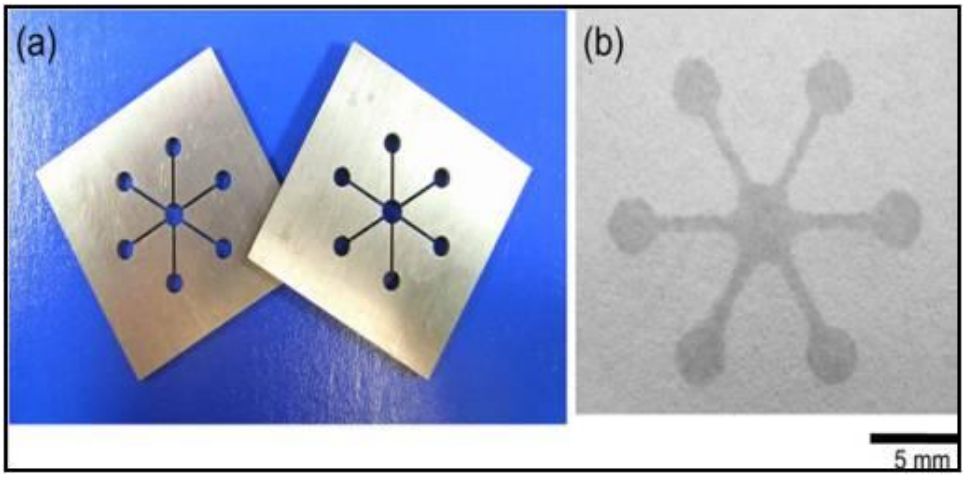
Şekil 2.4: Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın tasarımı [19].

Şekil 2.4'te siyah ve beyaz bölgeler sırayla hidrofobik ve hidrofilik alanları temsil etmektedir. Konumlandırılmış numaralar 1-4: glikoz test bölgesini, 5-7: laktat test bölgesini, 8-9: ürik asit test bölgesini ifade etmektedir [19].

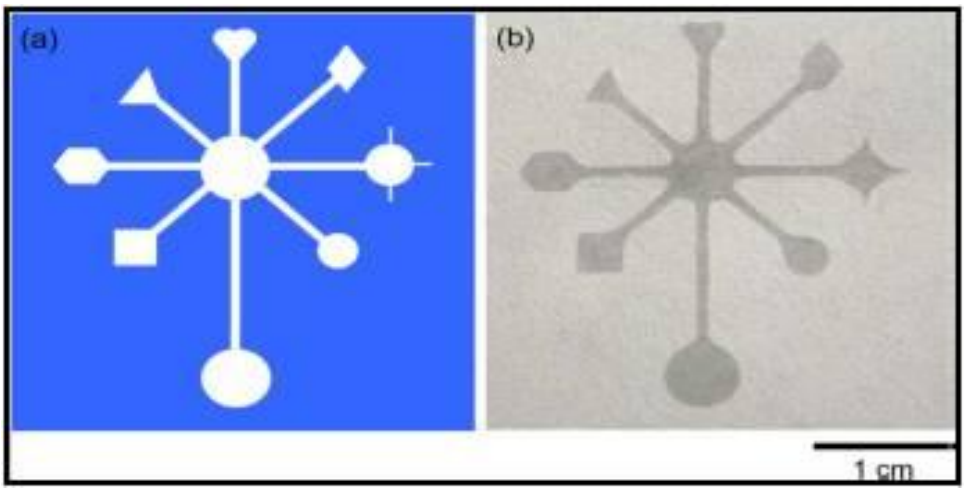
Literatürde yer alan başka bir çalışmada ise kağıt apreleme (haşıllama) kimyası ve inkjet printing (mürekkep baskı) yönteminin birleştirilmesi ile biyo-kimyasal sensör olarak kullanılabilen kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz konu edilmiştir. Bu çalışmada mürekkep püskürtmeli baskı tekniği ile farklı kartuşlar kullanılarak hem hidrofob madde ile desenin oluşturulduğu hem de biyomolekülllerin aktarılarak analit algılama bölgelerinin oluşturulduğu çalışmalardan bahsedilmiştir. Selüloz kağıdı hidrofobik hale getirmek için alkil keten dimer ve alkenil keten dimer çözeltileri kullanılmıştır. İlk yöntemde taban olarak kullanılan Whatman filtre kağıdı, alkil keten dimer-heptan çözeltisi ile hidrofobik hale getirilmiş ve paslanmaz çelikten

mekanik olarak kesilen metal maskelerin arasına sıkıştırılarak 15 saniye boyunca vakum plazmaya tabi tutulmuş, hidrofob bariyerler ile çevrilmiş hidrofil analit iletim ve teşhis alanları oluşturulmuştur (Şekil 2.5) [14].

İkinci yaklaşımda ise filtre kağıtları, ink jet baskı yöntemi ile elektroniksel olarak alkenil keten dimer-heptan çözeltisini basabilen dijital yazıcı ile şekillendirilmiştir. Şekillendirilen kağıtlar sonra ısıl işleme tabi tutularak alkenil keten dimerin selüloz lifleri üzerinde aktifleşmesi sağlanmıştır. Elde edilen yüzeylerde üstten damlatma yöntemiyle farklı analitler için farklı kimyasal reaktiflerin test bölgelerine ilave edilmesiyle analitler analiz edilmiştir. Şekil 2.6'da ise ink jet baskı ile filtre kağıdı üzerine oluşturulan mikroakışkan desen gösterilmiştir [14].



Şekil 2.5: Metal maske kullanılarak plazma reaktörü ile elde edilmiş kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz [14].



Şekil 2.6: Kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz için bilgisayarda üretilmiş ink jet baskı deseni [14].

Üretilen kağıt tabanlı mikro akışkan cihazın çoklu analit ölçümleri için kullanımını göstermek amacı ile, kişinin sağlık durumunu belirlemede önemli bio işaretçilerden olan NO_2^- ve ürik asit (UA) çözeltisi ile örnekleme yapılmıştır [14].

Raporlanan çalışmalardan biri de kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz üretiminde uygulanan bir yöntem olan mum daldırma metodudur. Daldırma yöntemi için lazer kesme yöntemi ile demir kalıp oluşturulmuştur. Tasarlanan desen erimiş mum içerisinde kalıp yardımıyla kağıt yüzeyine aktarılmış, analizin yapılacağı hidrofil alanlar ile bu alanlanları çevreleyen hidrofobik bariyerler elde edilmiştir. Cihazın performansını değerlendirmek için ise çoklu kolorimetrik tahlil ile gerçek numunedeki glikoz ve protein ayrımı yapılmıştır [13].

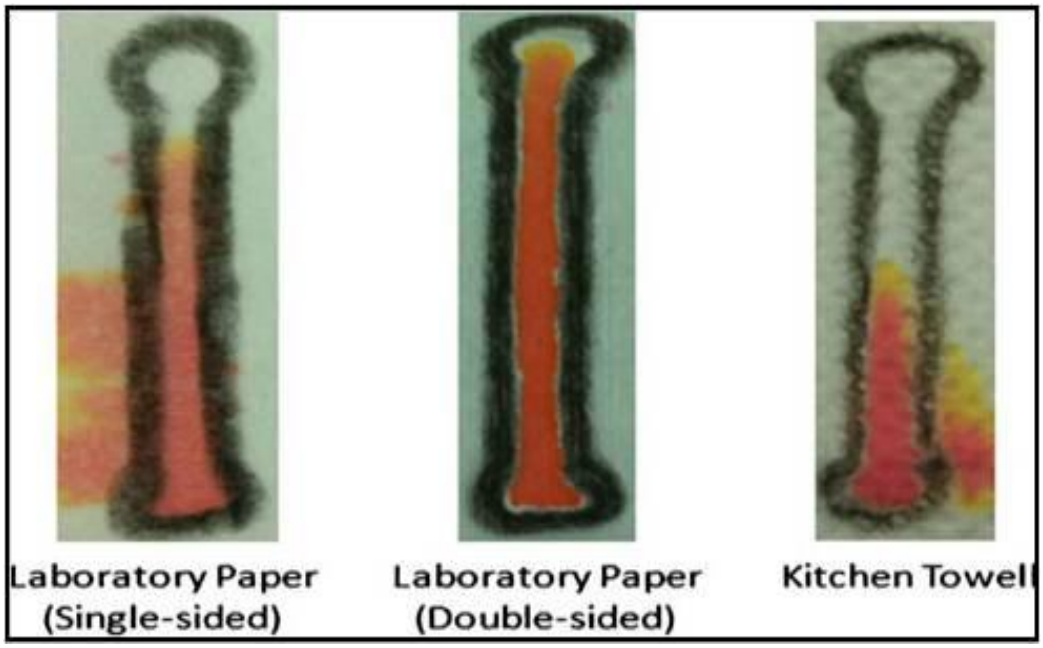
Teknikte bilinen bir diğer uygulamada ise filtre kağıdı üzerine hidrofilik kanal üretmek için baskı devre teknolojisi kullanılmıştır. Kanalların deseni Protel soft programıyla tasarlanmış ve boş kağıt üzerine basılmıştır [15].

Daha sonra bu desenler kağıttan termal iletim yazıcısı ile bakır plaka üzerine transfer edilmiştir. Desen üstüne geçen bakır plaka, demir klorit çözeltisine daldırılarak aşındırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak termal iletim öncesinde boş baskı tablasına tutturulan bakır plak oradan ayrılmış, su ile yıkanmış ve normal koşullarda kurumaya bırakılmıştır. Aşındırma işleminden sonra bakır plaka parafin ile kaplanmış ve üzerine de kalitatif filtre kağıdı monte edilmiştir.

Elde edilen bu sistemin sonra masanın üzerinde ters döndürülüp ısıtılmasıyla eriyen parafin kağıt üzerinde tutunarak hidrofobik duvarları oluşturmuştur. Desen alanında bakır olmadığından ve parafinle kaplanmadığından dolayı bu alan hidrofilik kanalı oluşturmuştur. Elde edilen mikroakışkan cihaz idrardaki fazla glikoz ve proteini analiz etmek için kolorimetrik tahlil cihazı olarak kullanılmıştır. Cihazdaki iki test bölgesi kimyasal indikatörlerle yüklenmiş, glikoz ve protein konsantrasyonu ölçümlenmek istenmiştir [15].

Bir diğer çalışmada kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz üretmek için birçok mum ve kağıt malzemesi incelenmiştir. Mum ile üretimde, mum kağıt derinliğince tutunarak hidrofilik mikro kanalların kağıt yüzeyinde oluşmasına olanak sağlamıştır (Şekil 2.7). Yapılan çalışmalar esnasında hidrofobik bariyerler oluşturmak amacıyla uygun mum kullanımı için fizibilite çalışmaları yapılmış ve kağıdın geçirgenlik, gözenek çapı gibi özellikleri deneylerle tespit edilmiştir. Deneyler boyunca kağıtların emicilik

özelliklerini test etmek için A4 kağıdı, kağıt mutfak havlusu, ince kağıt peçete ve laboratuarlar için uygun olan peçetelerden faydalanılmıştır. Kullanılan mumlar ise mum/gres kalemler, mum boyalar, kandil mum şeklindedir [20].

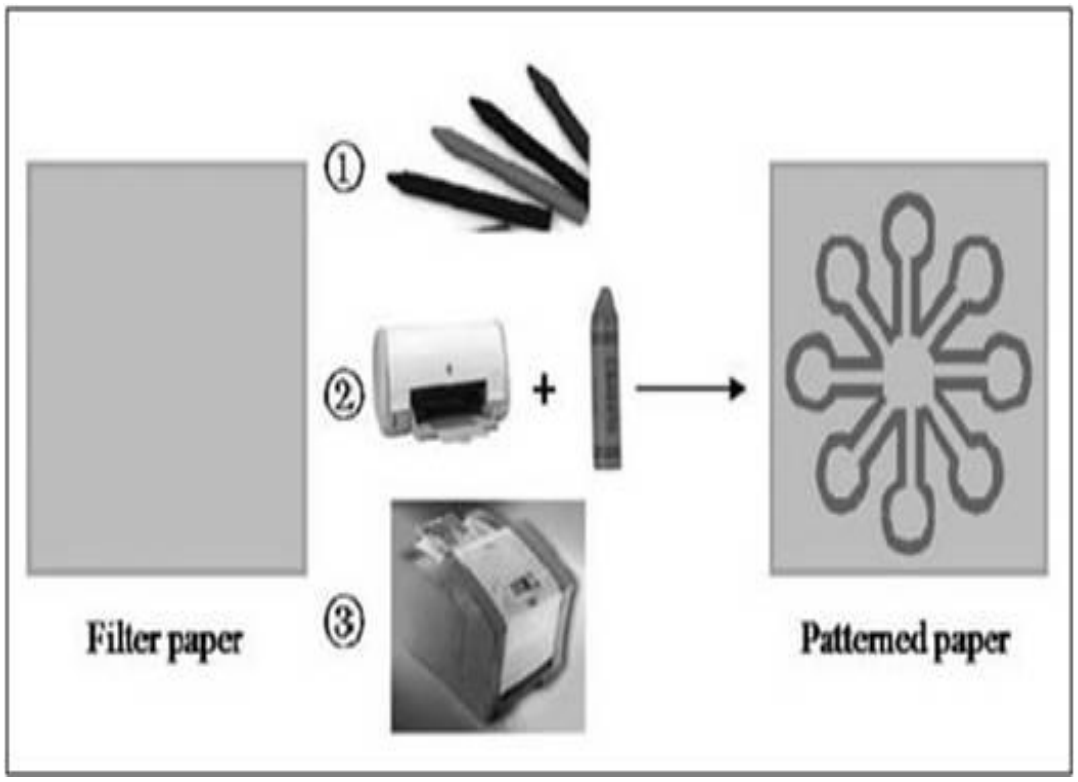


Şekil 2.7: Kağıt yüzey üzerine mum kalemi kullanılarak oluşturulan mum kanallar [20].

Bu çalışmalara ilaveten başka bir çalışma ise biyolojik sıvılardaki analit konsantrasyonunu belirlemek için mikroakışkanları, kağıt tabanlı analitik cihazları ve taşınabilir optik kolorimetreyi açıklayan bir hasta bakım noktası sistemini (point-of-care (POC) systems) içermektedir. Cihazdaki analit konsantrasyonunun ölçüldüğü hidrofil bölmeler, fotolitografi tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Hidrofobik bölgeler SU-8 fotorezistin kağıt yüzeye kaplanmasıyla sağlanmıştır [21].

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazdaki hidrofil bölmelere, üre içerisindeki protein analizini gerçekleştirmek için kimyasal reaktif (ayıraç) damlatılmıştır. Mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihaz deney esnasında gerçekleşen reaksiyon sonucu ortaya çıkan renklerin optik emilişine bağlı olarak kolorimetre ile analit konsantrasyonunu ölçümlemiştir [21].

Bir diğer çalışmada, taşınabilir biyolojik analizleri gerçekleştirmek için düşük maliyetli ve basit bir üretim yöntemi olan balmumu ile kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz üretimi sunulmuştur. Burada balmumu ile modelleme işlemi üç farklı yöntemle şekil 2.8'de gösterilmiştir [22].



Şekil 2.8: Kağıt yüzeyde balmumu ile modelleme çeşitleri [22].

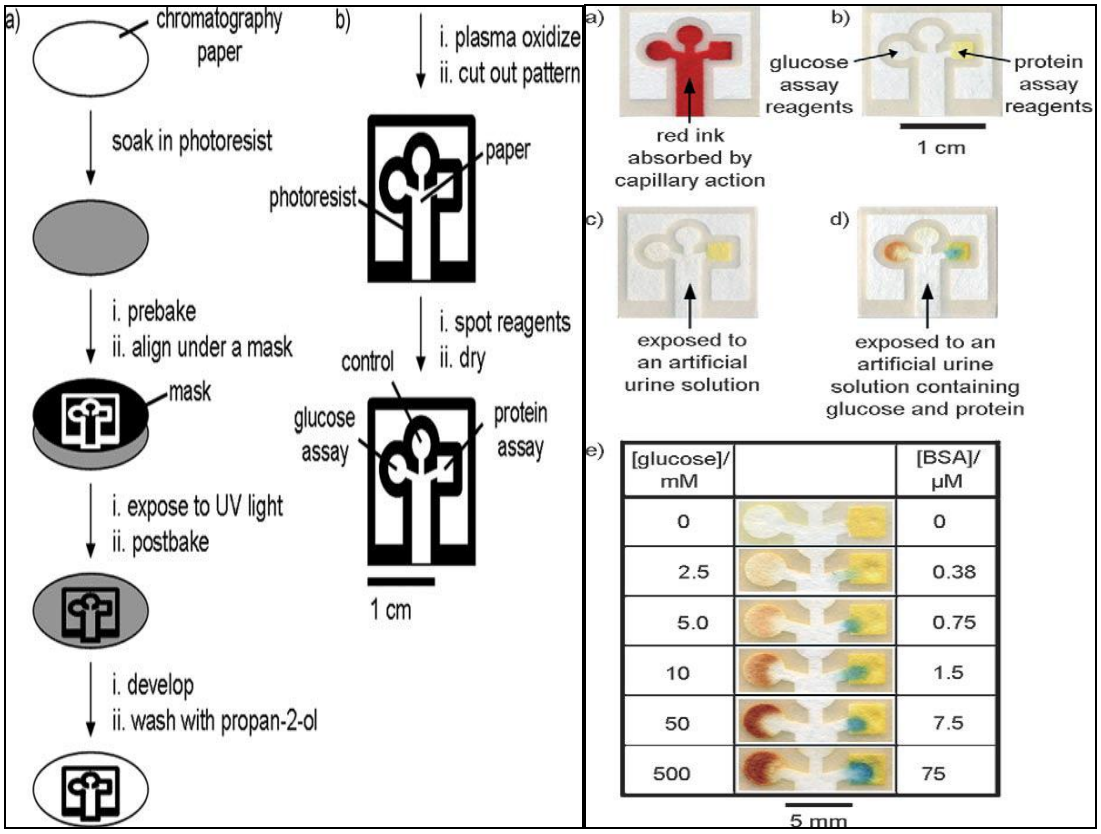
Birincisi; balmumu kalemi ile boyama, ikincisi; mürekkep püskürtmeli yazıcı ile desen basıldıktan sonra balmumu kalemi ile boyama, son olarak da balmumu yazıcısıyla direkt olarak desenin basılmasıdır. Bu prosesin gerçekleştirilmesi oldukça kolaydır ve kısa bir süre içinde tamamlanır, çünkü fotolitografi tekniğindeki gibi temiz odaya, UV ışığa ve organik çözücüye ihtiyaç yoktur [22].

Bu malzeme ucuz olması, kolay kullanım sağlaması ve baskı için elverişli olması gibi önemli avantajlar sunmaktadır. Metotlar arasında, uygulanması en basit ve zaman açısından tasarruflu teknik olan balmumunun yazıcıyla direkt olarak kağıda basılması sonrasında, fırında ısıl işlemle yüzeyde hidrofobik bariyerler oluşturulması daha başarılı bulunmuştur. Balmumu ile modellenen kağıt tabanlı mikro analitik cihazının performansının belirlenmesi için, test bölgesine reaktörler damlatılıp kurutulduktan sonra glikoz ve protein analizleri yapılmıştır [22].

Benzer şekilde başka bir çalışmada kağıt yüzeyi SU-8 hidrofobik polimerle kaplanmış, litografi tekniği ile hidrofob bariyerlerle çevrilmiş hidrofil kanallar ve test alanları oluşturulmuştur.

Sistemin çalıştığının kontrolü için test alanlarında üre içerisindeki glikoz ve proteinin eş zamanlı analizi yapılmıştır.

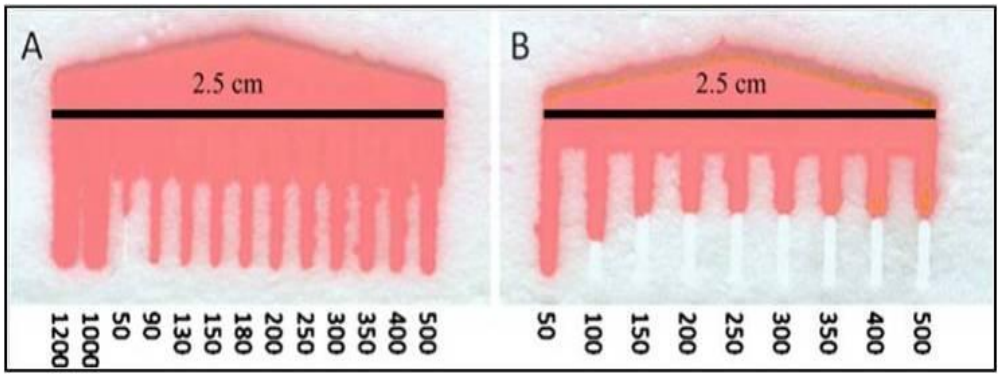
Cihazın fabrikasyon aşamaları ve biyolojik analiz sonunda konsantrasyon değişikliğine göre aktivatörlerin verdiği renk değişimi şekil 2.9'da gösterilmiştir [23].



Şekil 2.9: SU-8 2010 fotorezist ile modellenmiş kromotografik kağıt ve analit analizi sonucunda reaktörlerin verdiği renk değişimi [23].

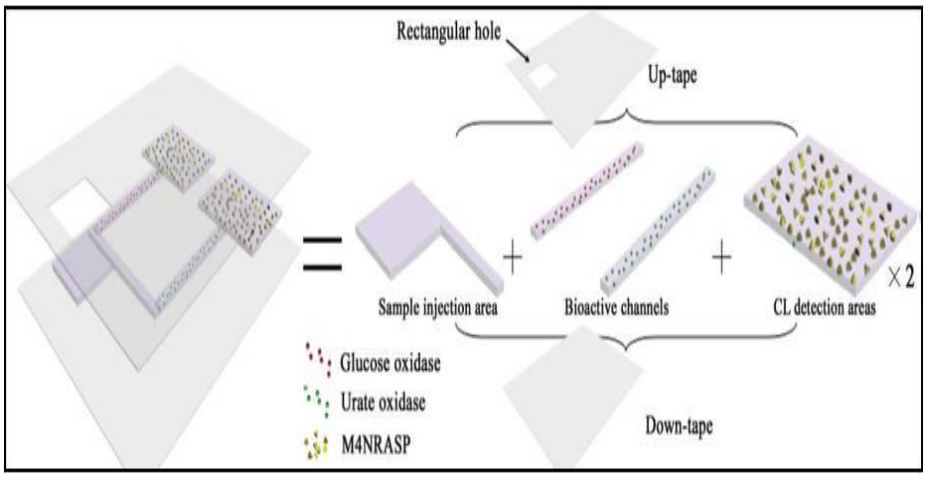
Sıvı örnek, test bölgesindeki kanal girişine damlatılmadan önce, analiz bölgeleri sıvı içerindeki glikoz ve protein ile aktifleşen ve renk değişimini sağlayan kimyasal reaktifler ile duyarlı hale getirilmiştir. Analiz esnasında, kanal girişinden test bölgesine doğru olan sıvı akışı, kullanılan kromotografik kağıdın kapilarite (kılcal ıslanma) özelliği ile sağlanmıştır [23].

Fotolitografi tekniğinin kullanılarak fabrikasyonun yapıldığı başka bir çalışmada üre ketonu, glikoz ve tükürük nitritinin gözlemi için yeni polimer karışımından üretilen, Şekil 2.10'da gösterilen kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın kullanımı rapor edilmiştir. Hidrofobik bariyerlerin yapımında kullanılan polimer, akriloksi ile sonlandırılmış siloksan ve akrilat tabanlı polimerlerin karışımıdır. Bu polimer SU-8 fotoreziste göre fabrikasyon zamanını ve cihazın üretim karmaşıklığını azaltmıştır [24].



Şekil 2.10 : Farklı kanal ve bariyer genişliğine sahip iki farklı kağıt tabanlı mikro akışkan analitik cihazda su içerisine damlatılmış gıda boyası sıvı iletiminin gözlemlenmesi [24].

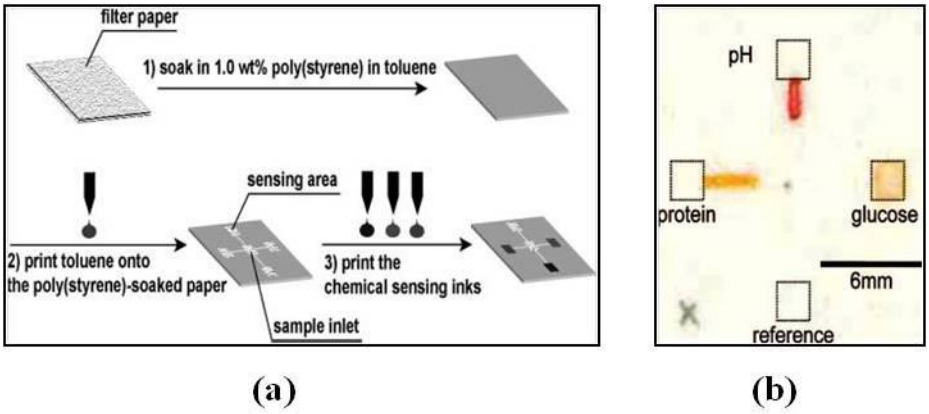
Diğer bir çalışmada ise amaç; taşınabilir, hızlı, basit ve eş zamanlı glikoz ve ürik asit ölçümü yapabilen, kağıt tabanlı cihazlara dayalı kemilüminesans enzimli biyosensör geliştirmektir. Kemilüminesans; basitliği, yüksek duyarlılığı, düşük maliyeti, düşük güç talebi ve mikro işleme teknolojilerindeki yüksek uyumluluğu ile biyosensörlerde etkili bir metot olmuştur. Şekil 2.11'de gösterilen cihazın fabrikasyonu x-y bıçak çizici ile yapılmıştır. Enzimatik bölge aktivasyonu ise kromotagrafik kağıdın kimyasal reaktiflerin yer aldığı solüsyona emdirilip kurutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Örnek sıvı girişi ise cihazın üst tabanına lazer kesici ile boşluk açılarak yapılmıştır [25].



Şekil 2.11 : Mikroakışkan kağıt tabanlı kemilüminesans analitik cihazın fabrikasyonunun şematik gösterimi [25].

Kağıt tabanlı diğer bir çalışmada, nicel analizler için uygun, hammaddesi kağıt olan ve çoklu kimyasal analize duyarlı tek bir baskı aparatına ihtiyaç duyan mürekkep püskürtmeli baskı tekniği ile üretilen mikro akışkan cihazı geliştirmişlerdir (Şekil

2.12). Mürekkep püskürtme cihazı; üç boyutlu hidrofil mikroakışkan modellerin ve bu modellerin algılayıcı bölgelerinin üretimi için kullanılır. Bu hidrofil bölmeler kağıt yüzeyinin toluen içerisinde çözülmüş polistirene emdirilmesinden sonra mürekkep püskürtmeli oyma ile elde edilir. İkinci aşamada aynı mürekkep püskürtmeli cihaz, gerekli kimyasal reaktifleri içeren kimyasal algılayıcı mürekkebi mikroakışkan analitik cihazın hidrofil bölgelerine püskürtür. Bu şekilde hazırlanan cihaz örnek sıvı numunesi (analit) olan üre içerisindeki protein ve glikoz miktarını ve analitin pH analizini yapmaktadır. Yapılan analizlerin nicel verileri renk uzayındaki dijital renk analizi, yani renk tarayıcısı ve basit bir bilgisayar programı ile elde edilir [26].

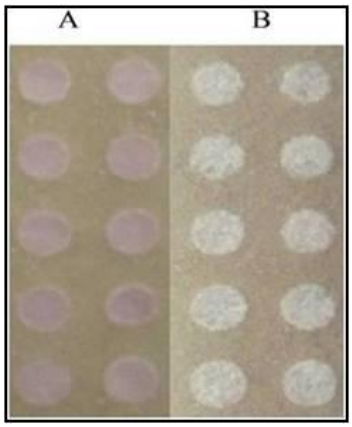


Şekil 2.12 : (a) Mürekkep püskürtmeli baskı cihazı mikroakışkan cihazın fabrikasyon aşamaları ve (b) analit içeriğindeki bileşenlerin kimyasal reaktifler yardımıyla renk ayrımı yapılarak gözlemlenmesi [26].

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada, mikroakışkan kağıt tabanlı analiz cihazında kurutma metotu ile birlikte glikoz ve ürik asidin bienzim kalorimetrik saptanması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada analit içeriğindeki glikoz ve ürik asidin varlığında renk oluşumunu gözlemlemek için glikoz oksidaz (GOD)-horseradish peroksidaz ve ürat oksidaz (UAO)-horseradish peroksidaz bienzim sistemlerinin sulu çözeltileri kullanılmıştır. Bienzim sistemi bir enzimin diğer enzime katalatik olarak bağlandığı basamak halinde aşamalardan oluşur. İkinci reaksiyonda Horseradish peroksidaz (HRP) tarafından tüketilecek olan ilk reaksiyonun ürünü hidrojen peroksit renk yoğunluğunun artmasını sağlar ve bu yüzden hassasiyet gelişir [27].

Sonuçlar jel dökümantasyon sistemi (beyaz ışık ve UV ışığı altında nükleik asit ve proteinlerin görüntülenmesi) ve genellikle bir kamera ile elde edilmiştir. Bunlara ek olarak klinik test sonuçlarına karşılık gerçek insan serum örneği tespit edilmiştir.

Benzer yayınlarda olduğu gibi, bu çalışmada da tasarımlar fotolitografi tekniği ile yapılmıştır. Test alanları dışındaki bölgeler SU-8 foto-direnç polimeri ile kaplanmıştır. Glikoz ve ürik asit tespiti için Şekil 2.13'de gösterilen analitik cihazda yer alan dairesel bölgeler algılama kitleri (örnek ile etkileşecek enzim) ile aktifleştirildikten sonra farklı konsantrasyonlarda glikoz ve ürik asit solüsyonları eklenmiştir. Analiz işlemi ile farklı kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Jel dökümantasyon işlemi ve kamera ile fotoğrafı alınan görüntülerin photoshop ile analizi yapılmıştır [27].



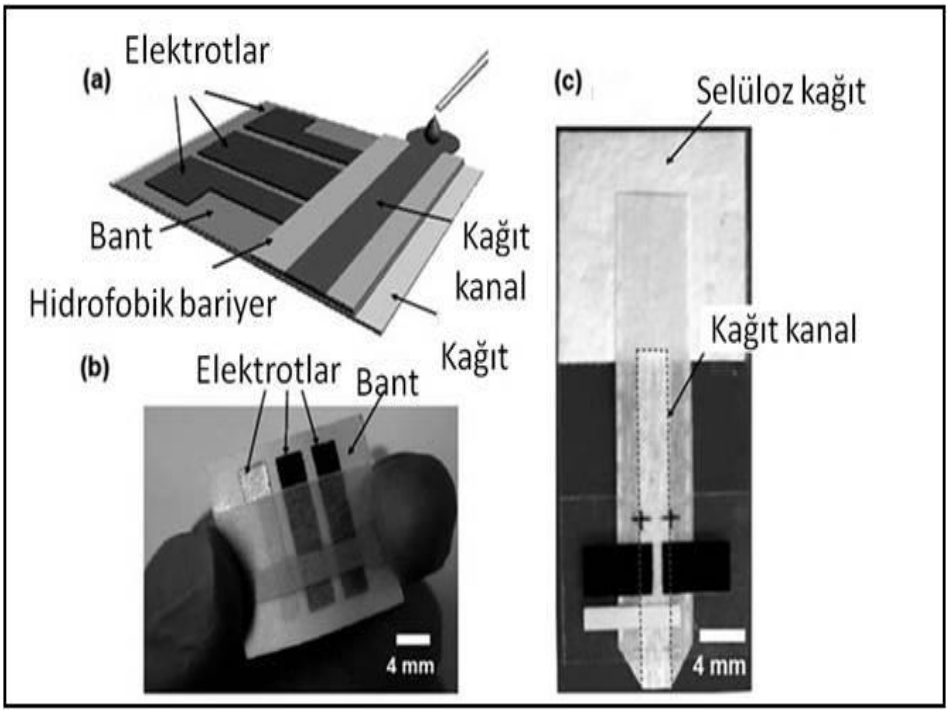
Şekil 2.13 : Farklı metotlarla solvent uçurarak kağıt yüzeyde arka plan sinyallerinin karşılaştırılması. A) Oda sıcaklığında 60 dakika süre ile buharlaştırma, B) etüv'de 37 °C'de 10 dakika süreyle kurutma [27].

Bu çalışmada eş zamanlı glikoz ve ürik asit tespiti için iki tabakadan oluşan üç boyutlu mikroakışkan kağıt tabanlı analiz cihazı tasarlanmıştır. İki tabakadan oluşan cihazda enzim solüsyonları ikinci tabakaya damlatılarak kurutulmuş ve standart glikoz ve ürik asit solüsyonları ilk tabakanın giriş bölgesine ilave edilmiştir. Örnek solüsyonların ikinci tabakadaki aktif bölgelere ulaşması sağlanarak reaksiyon ile birlikte her analit için renk değişimi gözlenmiştir [27].

Başka bir uygulamada, mikroakışkan kağıt tabanlı elektrokimyasal algılama cihazlarının performansı ve fabrikasyonu üzerine çalışılmıştır. Mikroakışkan kağıt tabanlı elektrokimyasal cihaz Şekil 2.14'de gösterildiği gibi fotolitografi ya da mum baskı tekniği ile yapılan kağıt taban üzerinde oluşturulmuş mikroakışkan kanallar ve karbon ya da Ag/AgCl iletken mürekkepleri ile basılan elektrotlardan oluşur. Mikroakışkan kağıt tabanlı elektro-kimyasal cihazlar sulu çözeltide (üre, serum, kan

v.b) birçok analitin (ağır metal iyonları, glikoz v.b.) konsantrasyonlarını belirleyebilecek özelliktedirler [28].

Bu cihazın kullanılmasıyla glikozun tespiti, idrarda bulunan glikoz konsantrasyonunun tüm oranlarda klinik olarak uygunluğu yüksek hassasiyet ve doğrulukla gösterilmiştir. Kronoamperometrik (elektroanalitik teknik) ölçümler ile sulu çözeltiden glikoz tayini yapılmıştır [28].



Şekil 2.14 : Mikroakışkan kağıt tabanlı elektrokimyasal algılama cihazı [28].

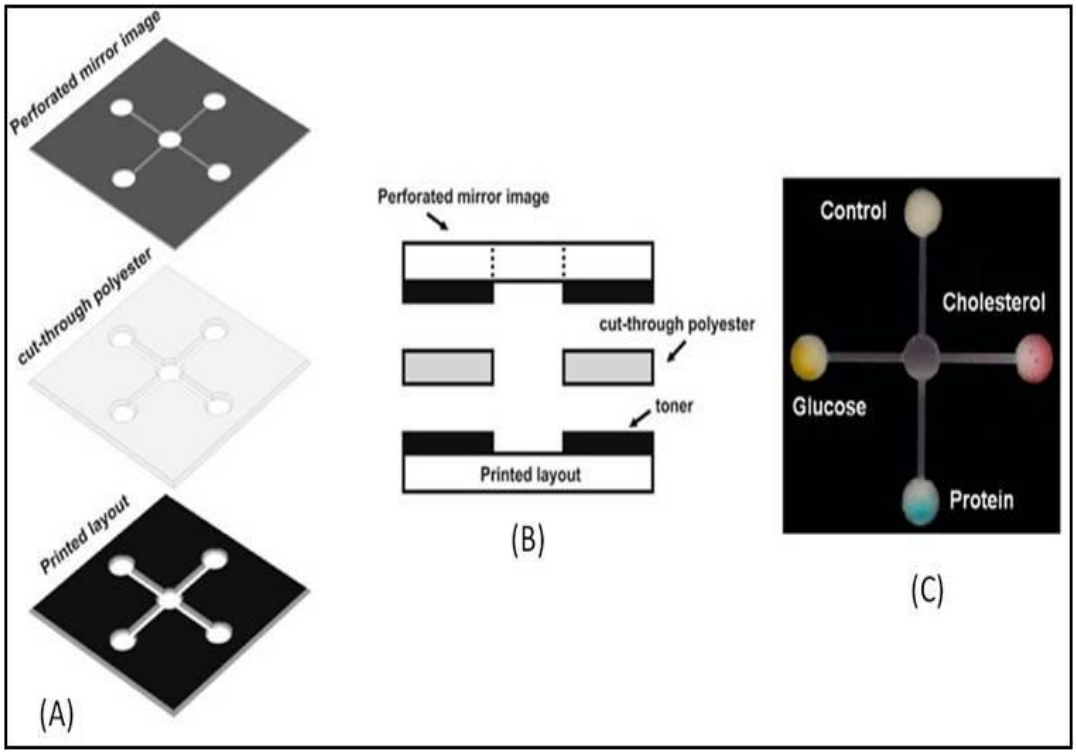
Şekil 2.14'de gösterilen **(a)** sensör, bir parça kağıt yüzeyine ya da plastik malzemede oluşturulmuş üç tane elektrot ve bir kağıt kanalı içermektedir. **(b)** Kağıt kanallar elektrotlar ile konformal temas halindedir ve elektrotları çevreleyen çift taraflı yapışkan bir bant ile sabitlenmiştir. **(c)** Glikozun analizi için kağıt tabanlı elektrokimyasal algılama cihazını göstermektedir. Cihaz bir tanesi çalışma, diğeri sayaç görevi yapan karbon elektrotlar ve Ag/AgCl olan referans elektrotundan oluşmaktadır. Kanalı çevreleyen hidrofobik bariyerleri oluşturmak için kağıt yüzeyi SU-8 fotodirenç malzemesi ile kaplanmıştır [28].

Bir diğer çalışmada ise mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihaz ile kemilüminesans metodu birleştirilerek ilk olarak kemilüminesans mikro akışkan kağıt tabanlı analitik cihaz üretilmiştir. Bu kemilüminesans mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihaz rodanin türevi ile asit ortamında üretilen H_2O_2 (Hidrojen peroksit) arasındaki

kemilüminesans reaksiyonu ve sübstrat yıkımı esnasında üretilen H_2O_2 gibi enzim reaksiyonuna bağlı bir biyosensördür. Rodanin türevi sistem, bu biyosensör için iyi tanımlanmış teşhis sinyali ile yüksek hassasiyete ulaşmayı amaçlar. Cihaz yapay idrardan ürik asit belirlenmesinde kullanılmıştır [29].

Başka bir çalışmada kalorimetrik tespit ve kapiler etki ile klinik teşhislerde performans göstermesi için toner bazlı mikroakışkan cihazın üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapay serumdan analizi yapılan protein, glikoz ve kolesterol için kalorimetrik deneyler bir masaüstü tarayıcı kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Cihaz direkt baskı işlemi ile üretilmiştir. Cihaz fabrikasyonu Şekil 2.15'de gösterilmiştir [30].

Biyolojik analiz ve kalorimetrik tespit için reaktiflerin sabitlenmesi amacıyla test bölgelerine selüloz tozundan yapılmış pat eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle kurutulmuştur. Daha sonra biyolojik analizleri gerçekleştirmek için kurutulmuş test bölgelerine kimyasal reaktifler damlatılmıştır. Yapay örnek merkez bölgesinden eklenmiş ve kapiler etkiyle kanal içinde ilerleyerek test bölgesine ulaşmıştır [30].

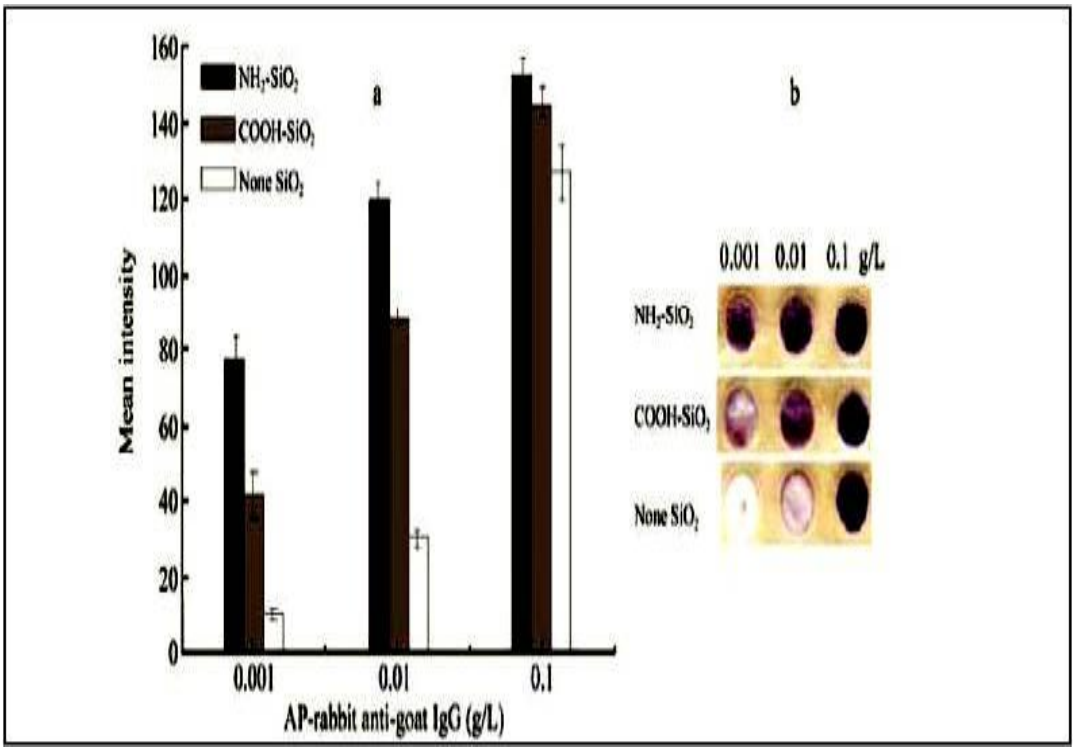


Şekil 2.15 : Toner bazlı mikro akışkan cihazın şematik gösterimi, (A): Cihazın üç boyutlu görünümü, (B): Kesit görüntüsü, (C): Cihazın kalorimetrik deney sonrası görüntüsü [30].

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada, teşhis bölgeleri oluşturmak için fotolitografi tekniği kullanılmıştır. Protein moleküllerinin tutunmasını artırmak için yüzeye mikro boyutta SiO_2 boncukları koyulmuştur. Bu yöntem ile biyolojik reaktif kullanımı azaltılıp maliyet düşürülmüş aynı zamanda test süresinin kısalması sağlanmıştır. Mikro bölgelerin yer aldığı kağıt tabanlı cihazlarda enzim bağlı bağışıklık deneyleri üzerine yapılan bu çalışma, teşhis cihazlarının gelişimi için yeni bir yöntemdir [31].

SU-8 fotodirenç polimeri kullanılarak litografi yöntemiyle filtre kağıdı üzerine cihazın fabrikasyonu yapılmıştır. Yüzeyde elde edilen dairesel bölgelere immobilizasyon için antijen modeli damlatılıp kurutulmuştur [31].

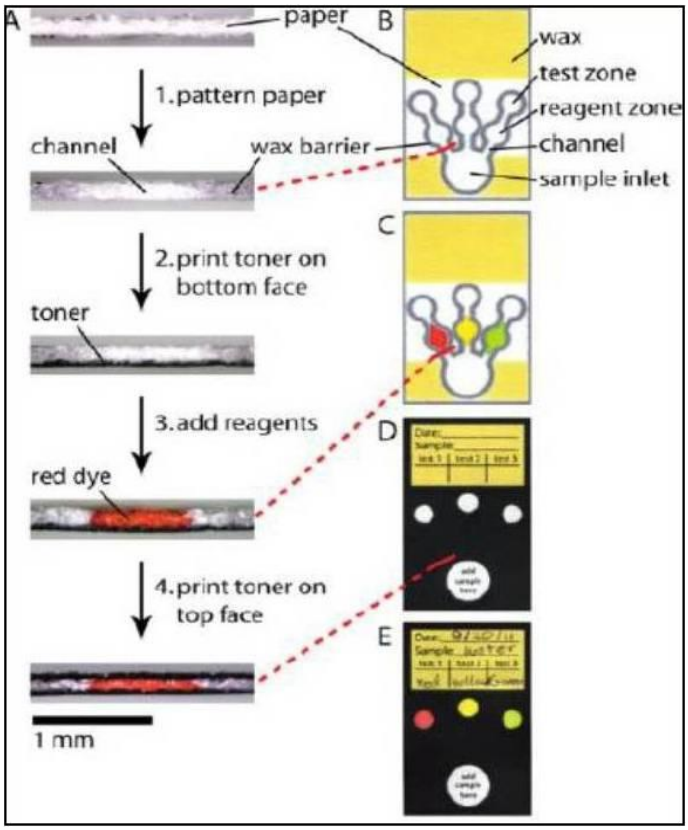
Daha sonra immunoglubulin (antijen ile etkileşecek örnek) eklenerek enzim substrat reaksiyonu gerçekleşmiştir. SiO_2 parçacıklarının yüzeydeki aktif gruplarla bağlanmasına bağlı olarak reaksiyon sonucu renk yoğunluğu grafik olarak Şekil 2.16 (a) ve görsel fotoğraf olarak Şekil 2.16 (b)' de gösterilmiştir [31].



Şekil 2.16 : SiO2 parçacıklarının immunoglubin emilime olan etkisi [31].

Kağıt taban üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazın toner kullanılarak üretimi ele alınmıştır. Cihaz fabrikasyonu Şekil 2.17'de gösterilmiştir [32].

Şekil 2.17 A)'da kanal oluşturmak için gerekli olan dört aşamalı üretim prosesi süresince mikroakışkan analitik cihazın kesit alanı gösterilmiştir.



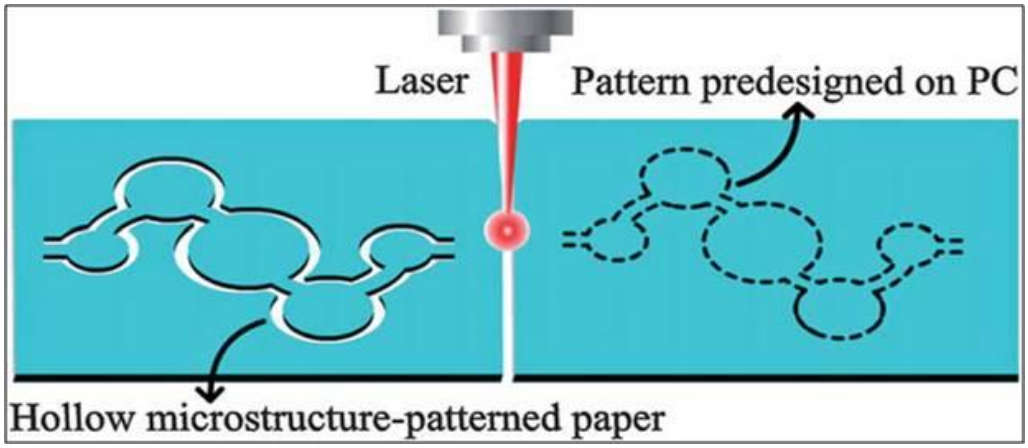
Şekil 2.17 : Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazda mum baskı yöntemi kullanılarak hidrofilik kanal ve haznelerin oluşturulması ve toner baskısı yaparak son ürün elde etme adımları [32].

Kanallar yanlardan mum ile altta ve üstte ise toner kullanılarak oluşturulmuştur. B)'de ise cihazın mum baskı yöntemi uygulandıktan sonraki görünümü gösterilmiştir. Cihaz altta tek bir analit girişine sahip olup yukarıda ise üç farklı test bölgesi ve reaktif bölgesi içermektedir. C) Cihazın reaktif bölgelerine 1 µL kırmızı, sarı ve yeşil boya ilave edildikten sonraki görünümüdür. D) Mikroakışkan cihazın üstten tamamen tonerle kapatılmış görünümüdür. E) Mikroakışkan cihazın analit giriş bölgesine 20 µL su uygulanması ile elde edilen görüntüsüdür [32].

Su reaktif bölgelerine kapileri etki ile taşınmış olup oradaki boyaları çözerek test bölgelerine taşımıştır. Potasyum iyodid, trehalose, glikoz oksidaz ve horseradish peroksidaz içeren fosfat tampon çözeltisi Şekil 2.17'de olduğu gibi mikroakışkan cihazın reaktif bölgelerine uygulanmış ve oda koşullarında 5 dakika kurumaya bırakılmış ve daha sonrasında bölgeleri kapatmak için dört kat toner baskısı

uygulanmıştır. Glikoz içeren potasyum çözeltisi analit giriş bölgesine uygulanarak reaktif bölgerine taşınımı sağlanmış ve oradaki enzimleri çözüp test bölgelerine iletmiş ve test bölgelerinde renk değişimleri gözlenmiştir [32].

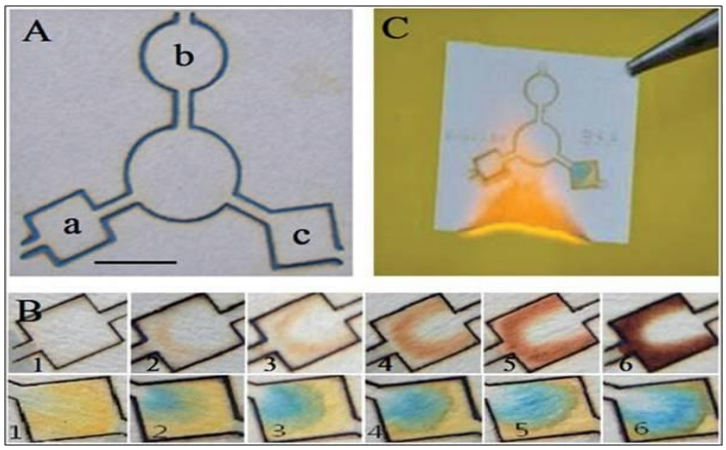
Bir diğer çalışmada mikro analitik kağıt tabanlı cihaz üretmek için hızlı, aynı zamanda basit ve ucuz bir teknik olan CO_2 lazer kesme makinesini kullanılmıştır. Bu metot kesimi yapılacak olan bir parça kağıda ihtiyaç duyarak önceden tasarlanmış modeli yüzeye aktarma işlemini gerçekleştirir (Şekil 2.18). Bu yüzeyde elde edilen modelin çözünürlüğü aynı zamanda çok sayıda analitik test kapasitesi ile karakterize edilmiştir [33].



Şekil 2.18 : Mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihaz yapımı için laser kesme metodunun şematik görüntüsü [33].

Cihazın fabrikasyonu tamamlandıktan sonra yarı kantitatif biyolojik analizler için yapay idrardan glikoz ve BSA (bovine serum albümin) teşhisi yapılmıştır. Bu testler için öncelikle her cihazda yer alan kare bölgeye 0.5 µL potasyum iyodid (0.6 mM) çözeltisi damlatılmıştır. Daha sonra glikoz oksidaz ile horseradish peroksidaz karışımı içeren enzim solüsyonu glikoz deneyini yürütmek için test bölgesine damlatılmıştır. Dairesel bölgeye sadece potasyum iyodid çözeltisi damlatılarak kontrol bölgesi oluşturulmuştur [33].

Bunlara ek olarak BSA deneyi için 0.5 µL tampon çözelti ve 0.5 µL tetrabromophenol blue (TBPB) (3.3 mM) çözeltisi eşkenar dörtgen biçimli test bölgesine damlatılmıştır. Reaktörlerin damlatıldığı test bölgeleri oda sıcaklığında (25°C) kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra farklı konsantrasyonlarda glikoz ve BSA içeren yapay idrar örneği analiz için kullanılmıştır (Şekil 2.19) [33].



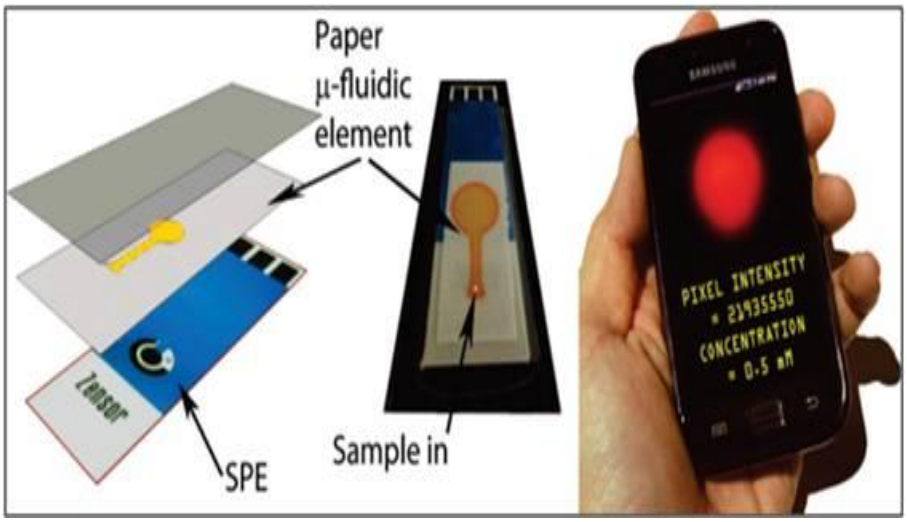
Şekil 2.19 : Üç boyutlu mikroakışkan analitik cihazda eş zamanlı glikoz ve BSA deneyi [33].

Şekil 2.19'da A)'da yer alan kare bölge (a) glikoz tespiti için, dairesel bölge (b) glikoz testi için gerekli olan kontrol bölgesi ve eşkenar dörtgen şeklindeki bölge (c) ise BSA teşhisi için tasarlanmıştır. (B)'de glikoz ve BSA konsantrasyonları değişen 6 yapay idrar örneğinin kalorimetrik tespit sonuçları [Glikoz/BSA: (1) 0 mM/0 mM; (2) 25 mM/12 mM; (3) 50mM/30 mM; (4) 75 mM/60 mM; (5) 100 mM/20 mM; and (6) 125 mM/600 Mm], (C)'de ise kullanılan cihazın yakma yoluyla güvenli olarak yok edilmesini gösterilmiştir [33].

Kağıt taban kullanılarak yapılmış bir diğer çalışmada fenolik (aromatik halkaya bir ya da daha fazla hidroksil grubunun bağlandığı aromatik bileşik) bileşenlerin kalorimetrik tespiti için yeni bir kağıt tabanlı biyolojik tahlil cihazı geliştirilmiştir. Sensör, kağıt üzerinde kitosan ve alginat polielektrolitlerine alternatif olarak katmanlar arasına tirozinaz enzimin tutundurulmasıyla katmanlı montaj yaklaşımı ile oluşturulmuştur. Sensörün çalışabilirliği, kağıt üzerinde tutundurulmuş kitosanda enzimatik olarak üretilen quinone (halkalı bileşiklerden bir grubun ortak adı)'un bağlanmasıyla ortaya çıkan renk değişimi ile gözlemlenmiştir [34].

Bu çalışmadaki metot ile trosinaz enzimi tarafından moleküler oksijen varlığında üretilen kinonun filtre kağıdına sabitlenen kitosana bağlanmasıyla reaksiyon sonucu renk değişiminin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Hem entegre, hem de reaktif algılama platformu oluşturularak kitosan ve enzim, filtre kağıdı üzerine immobilize edilmiştir. Kitosan kaplama malzemesi ve selülozik malzemeler için katkı malzemesi olarak kullanılmakla birlikte biyolojik moleküllerin güçlü bir şekilde tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Kitosan ile fonksiyonelleştirme kağıt yapının dayanımını, morfolojisini, nem kapasitesini, mekanik ve optik özelliklerini geliştirmektedir [34].

Bir diğer çalışmada kağıt tabanlı sensörlerdeki gelişmeler sunulmuştur. Kağıt tabanlı biyosensörler fotolitografi, mum baskı, screen printing (serigrafi) gibi çeşitli üretim yöntemleri ile elde edilmişlerdir. Sayılan yöntemlerle üretilen biyosensörler ile renksel, elektrokimyasal, elektriksel, kemilüminesans ve elektrokemilüminesans olarak niteliksel şekilde tanılama yapılmasına olanak sağlanmıştır. Şekil 2.20'de gösterilen biyosensörde kemilüminesans tanılama yöntemi ile glikoz ve ürik asit tayini yapılmıştır. Mikroakışkan cihaz; numune uygulama bölgesi ve glikoz oksidaz-ürat oksidaz enzimi yerleştirilebilen iki biyoaktif kanaldan oluşmaktadır. Cihaz ayrıca rodanin türevleri yerleştirilmiş iki tane tanı bölgesi de içermektedir. Tanı bölgesi ve kanallardan oluşan kağıt tabanlı cihaz su geçirmez tek tarafı yapışkanlı katmanlar arasına sabitlenmiştir. Cihaz, glikoz ve ürik asit içeren numunenin oksidaz enzimleri ile tepkimeye girdiklerinde oluşan hidrojen peroksit ürünü ile rodanin türevlerinin etkileşip kemilüminesans oluşması esasına dayanmaktadır. Tüm bunlar sonucu oluşan niteliksel tanı yöntemi analit konsantrasyonuna bağlı olarak yayımlanan ışık yoğunluğuyla ölçümlenmiştir [35].



Şekil 2.20 : Kağıt tabanlı elektrokemilüminesans sensörün üretim ve analiz prosesi [35].

Kağıdın hidrofilik bölgesi (sarı bölge) ($Ru(bpy)3^{2+}$) ile yüklenip ekran baskılı elektroda (SPE) transparan plastik ile tutturulmuştur. Numune kanalın altındaki küçük numune açıklığından uygulanmış ve telefon kamerası kağıt tabanlı sensöre yakın bir şekilde yerleştirilerek 1.25 V potansiyel altındaki yayınım kaydedilmiştir. Kemilüminesans yöntemi tek başına yeterli olmakla birlikte elektrokimyasal yöntemlerle birleştirildiğinde daha iyi seçicilik özelliği ortaya çıkmaktadır ve

dinamik konsantrasyon aralığı artmaktadır. Akışkan kanal tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ($Ru(bpy)3^{2+}$) ile yüklendikten sonra kağıt ekran baskı yöntemi ile elde edilen elektroda yapıştırılmıştır. Elektrokemilüminesans yayınımını tanımlamak için telefon kamerası kullanılmış olup Şekil 2.20'de gösterildiği gibi analit konsantrasyonunu tanımlamak için kırmızı ışık gösterge olarak tanımlanmıştır [35].

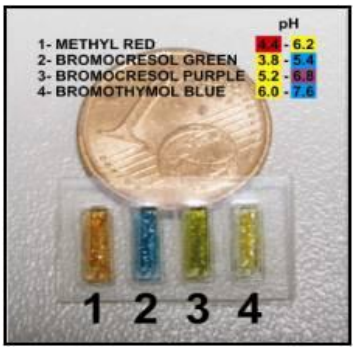
Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlarda örnek iletiminin düşük verimlilik ile gerçekleşmesi ve kağıt yüzeyinde liflerin x,y yönündeki yönlenmesinden dolayı sıvıların z yönüne karşı x,y düzleminde anizotropik bir şekilde yayılması gibi yapısal sınırlamalar literatürde yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir [36-38]. Ayrıca, kağıtda z yönünde sıvı örneklerinin sınırlı dağılımı çoklu analiz işlemleri için daha kompleks üç boyutlu mikroakışkan cihazların oluşturulması için bir sınırlama teşkil etmektedir [36]. Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlarda mevcut sınırlamalar nedeniyle yeni mikroakışkan sistemlerinin üretimi için alternatif malzemeler, imalat teknikleri ve teşhis yöntemlerinin kullanımı ile ilgili daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır [35, 37].

2.4.2 Polimer tabanlı mikroakışkan cihazlar

Kağıt tabanlı analitik cihazlara ilaveten polimer yüzeylere enzim immobilizasyonu ile biyolojik analizlerin yapıldığı algılama cihazları da literatürde yer almaktadır. Kağıt tabanlı çalışmalardan farklı olarak egzersiz sırasında oluşan terden gerçek zamalı pH ölçümü yapabilmek için esnek ve giyilebilir, barkod şekilli, iyonik sıvı polimerlerden elde edilmiş mikroakışkan cihazlar üretilmiştir. İyonik sıvılar özellikle mükemmel termal ve kimyasal dayanımları, düşük buhar basıncı, yüksek iyonik iletkenliği, ayarlanabilir hidrofilik ve hidrofobik doğası yüzünden optik sensörlerde nadiren de olsa kullanılmaktadır [33].

Literatürde yer alan polimer tabanlı mikroakışkan cihaz üretimi çalışmasında, egzersiz sırasında oluşan terden, gerçek zamanlı pH ölçümü yapmak için üretilen tek kullanımlık, esnek, giyilebilir, barkot şekilli ve iyonik sıvı polimerlerden elde edilmiş bir analiz cihazı tanıtılmıştır. pH değerleri, barkottaki renk değişimleri ile gözlenerek, standart renk tablosuyla karşılaştırılarak bulunabilmektedir. Ayrıca renksel olarak alınan cevap, cihaza entegre edilmiş ve güç gerektirmeyen ya da düşük güçle çalışabilen ışık yayan diyotlar (LED) ile de elde edilebilmiştir. Şekil

2.21'de gösterilen 18 mm x 10 mm ebatlarındaki birbirinden bağımsız dört hazneli barkot sistem polimetilmetrakrilat (PMMA) ve basınç duyarlı yapıştırıcı (PSA) ile kolayca üretilmiştir. Üretim aşamalarında taban olarak kullanılan PMMA'ın üzeri yapıştırıcı ile kaplanmış ve CO_2 laser ile 2 mm x 6 mm boyutlarında kesilmiş hazneleri oluşturan ikinci kat PMMA, taban üzerine yapıştırılmıştır. Sistemi kapatmak için iki kat halinde PMMA ve yapıştırıcıdan oluşan kapak hazneler açık kalacak şekilde CO_2 laser ile kesilmiş ve önceden yapılan üçlü katmanın üzerine yapıştırılmıştır [39].



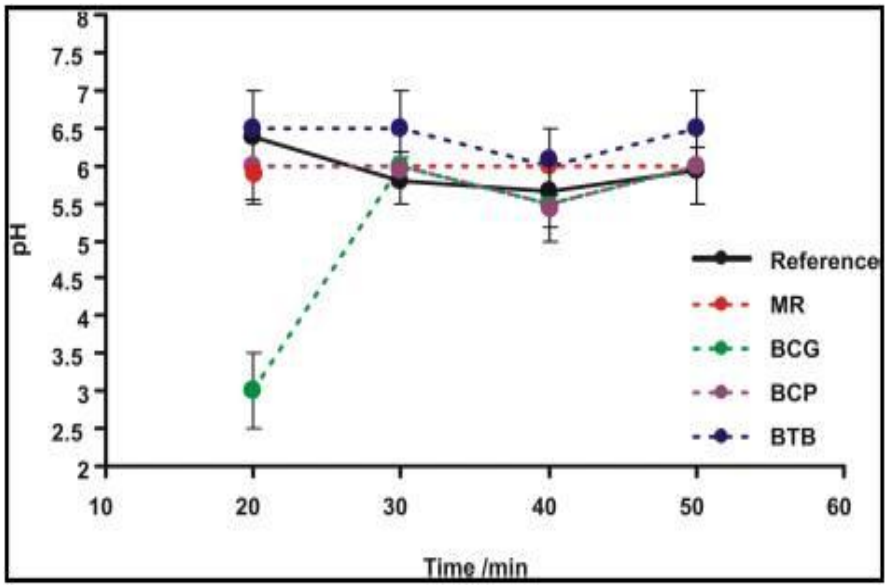
Şekil 2.21 : Dört pH indikatör boyasının aktivasyon aralıkları ile barkot sistemi [39].

Terin pH ölçümlemesini yapmak için kalorimetrik yöntem kullanılmıştır. İnsan terinin pH aralığı egzersiz sırasında 5-7 arasında değişmektedir bu nedenle bu aralığa uygun boyalar seçilmiştir. Ölçümleme yapmak için LED ve foto diyot, algılama alanının alt ve üst tarafına yerleştirilmiştir. Mikro kontroller tarafından kontrol edilen LED ve foto diyottan alınan veriler bilgisayara aktarılmıştır. Egzersiz sırasında ölçümleme yapabilmek için elde edilen barkot sistem Şekil 2.22'de görüldüğü gibi yapışkan banda, spor kıyafetlerine, bel ve baş için olan ter bantlarına entegre edilmiştir. Ter kumaş veya bant tarafından emilerek iyonojel/boya içeren haznelere yönlenmiştir [39].

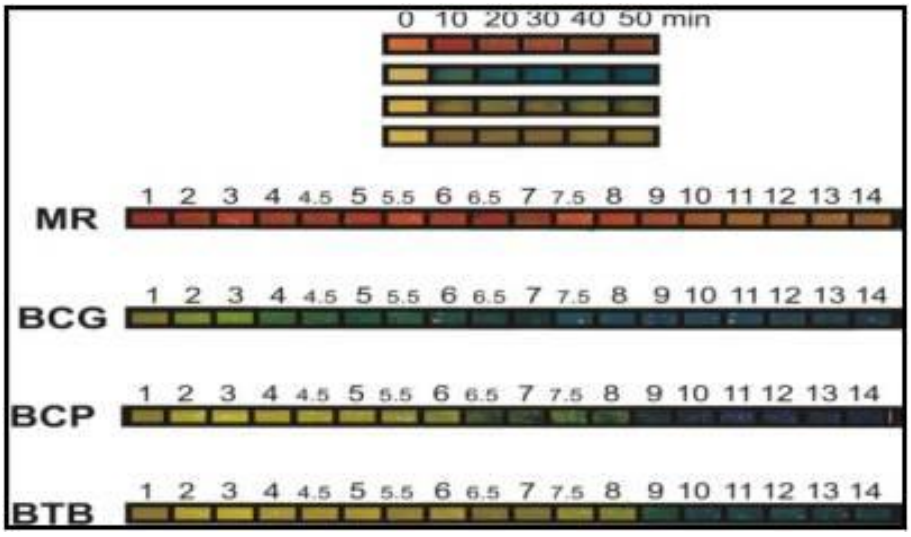


Şekil 2.22 : Sporcunun sırtında ve kolundaki barkot sistemler [36].

Ter hızı ve sıvı kaybı kişiden kişiye değişmekle beraber vücut büyüklüğüne, cinsiyete, egzersiz yoğunluğuna, iklimsel koşullara ve kişinin metabolizmasına bağlanmaktadır. Kullanımdan önce barkot tampon çözelti ile 5 dakika boyunca aktive edilmiştir. 10 dakikalık egzersiz süreci sonunda düzenli pH ölçümleri devamlı olarak alınmaya başlanmıştır. Yapılan denemeler göstermiştir ki, gerekli ter miktarına ulaşabilmek için 10-15 dakika geçmelidir. Egzersiz süresi arttıkça terin pH'ına göre pH indikatörlerinin renginde değişmeler olduğu gözlemlenmiş ve sonuçlar Şekil 2.23'de grafikle ve Şekil 2.24'de renk skalasında gösterilmiştir [36].

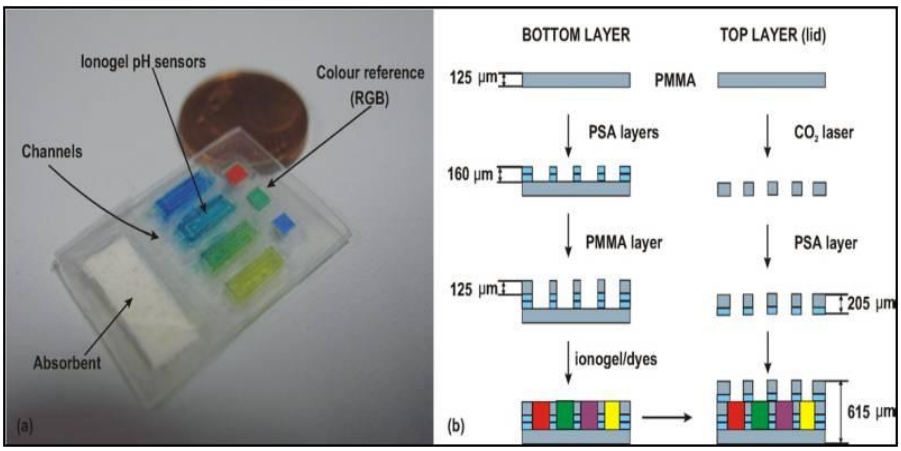


Şekil 2.23 : 50 dakikalık egzersiz süresi boyunca kişin ter pH'nın analizi [39].



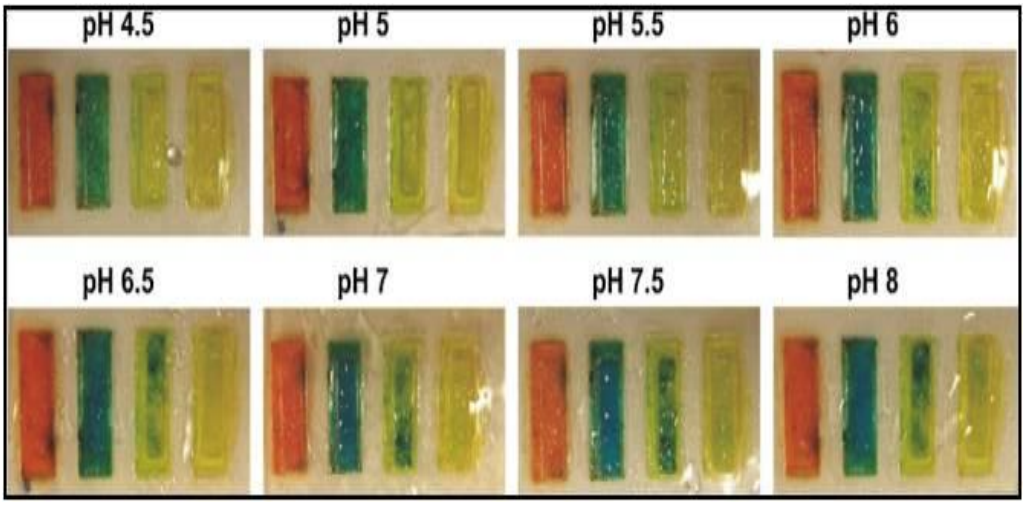
Şekil 2.24 : 50 dakikalık egzersiz süresi boyunca barkottaki indiakator boyaların renk değişimi. (MR: Metil kırmızısı, BCR: Bromokresol yeşil, BCP: Bromo kresol mor, BTP: Bromo timol mavi) [39].

Üretim teknikleri ve aşamaları bir önceki çalışma ile birebir aynı olan bir diğer çalışmadaki farklılıklar barkot sistemin altı katmandan oluşması, haznelerin alt kısmının 5 mm x 1 mm ölçülerinde 160 µm derinliğinde mikro kanallar ve absorban (emici yüzey) içermesidir. Cihazın üretim aşamaları Şekil 2.25'de gösterilmiştir [40].

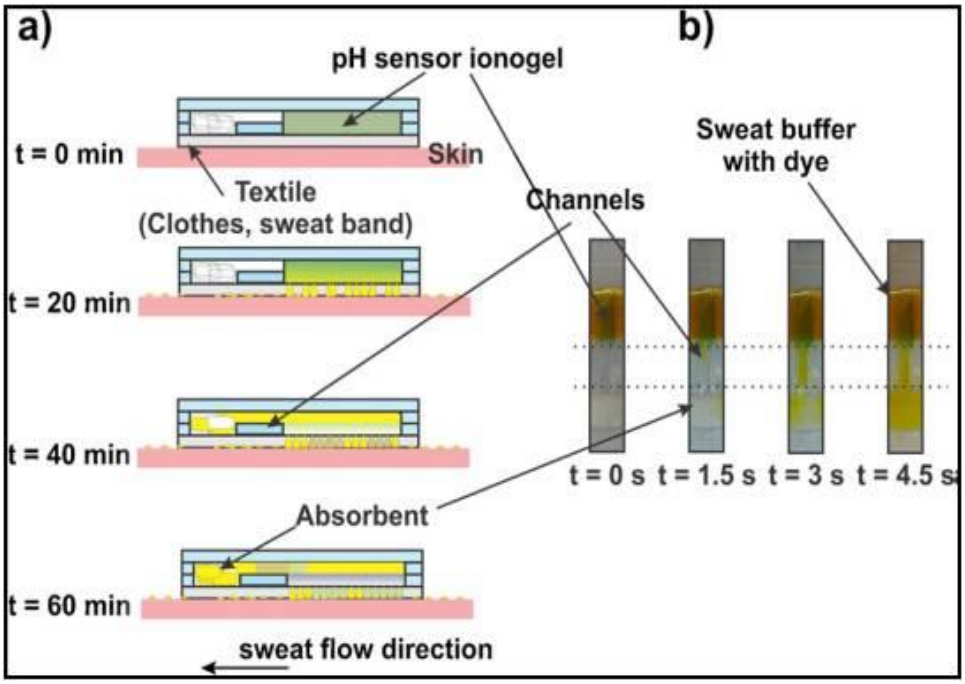


Şekil 2.25 : Altı katmandan oluşan barkot sistemi ile mikroakışkan cihazın üretim aşamaları [40].

[36] nolu çalışmayla aynı pH duyarlı boyaların kullanıldığı bu çalışmada da boyalar metil kırmızısı (MR), bromo kresol yeşil (BCG), bromo kresol mor (BCP) ve bromo timel mavi (BTM) olup 4,5-8 pH aralığındaki renk değişimleri Şekil 2.26'da gösterilmiştir. Mikroakışkan sistemin zamana göre performansının şematik sunumu Şekil 2.27'de gösterilmiştir [40].



Şekil 2.26 : Farklı pH'larda yapay ter ile test edilmiş mikroakışkan sistemin görüntüsü [40].



Şekil 2.27 : (a) Mikroakışkan sistemin zamana göre performansının şematik sunumu ve b) mikroakışkan sistemde boya ile renklendirilmiş yapay ter ile kanal performansını gösteren resim serisi [40].

Bir diğer çalışma, ter pH'ını gerçek zamanlı olarak ölçümlemek amaçlı yapılmış, tekstil taban ve polimer yüzeyleri beraber kullanılarak mikroakışkan cihaz üretilmiştir. Cihazda kumaş tabanlı akışkan sistem vücut yüzeyinden ter girişini sağlayacak şekilde tasarlanmış ve terin kanal boyunca kapiler etki ile ilerleyerek kanal sonunda absorban yardımı ile toplanması sağlanmıştır [41].

Elde edilen kanalın genişliği 8 mm ve genel uzunluğu 30 mm'dir. Bu çalışmada da tanımlama yapmak için kolorimetrik yöntem uygulanmış ve kumaştaki renk değişimini gözlemlemek için LED sistem kullanılmıştır [41].

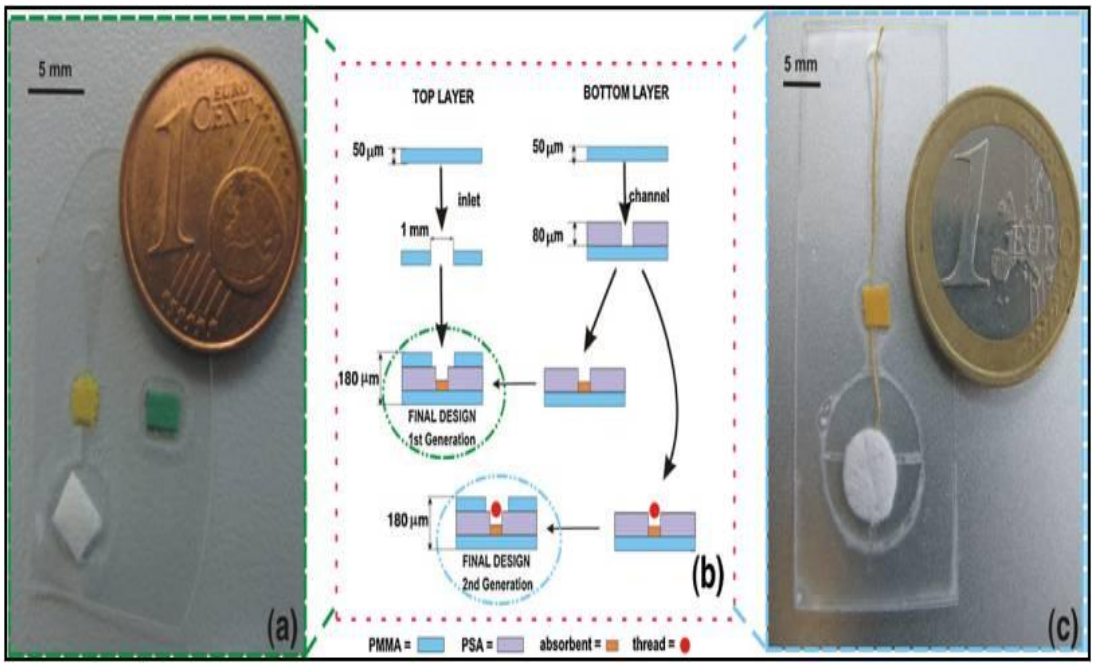
Şekil 2.28'de görülen mikroakışkan çipler çok katmanlı laminasyon yöntemi uygulanıp CO_2 lazer kullanarak kanalların açılması ile üretilmiştir (Şekil 2.28 (b)). Her iki nesil çiplerin üretimi için 80 μm kalınlığındaki PSA'dan kesilen mikro kanallar 50 μm kalınlığındaki PMMA yüzeye yapıştırılmıştır. Kanalın ortasında algı alanı oluşturmak için pH duyarlı boya bromo kresol mor (BCP) emdirilmiş 3 mm x 3 mm ebatlarında naylon-likra tekstil yüzey kullanılmıştır [41].

Birinci nesil mikroakışkan çip (Şekil 2.29 (a)), kanalın üst kısmında 2 mm çapında giriş bölgesi içermektedir. Kanalın genel uzunluğu 8 mm olup ilk 6 mm'lik kısmı ciltten taze teri toplamak için damla şekilde tasarlanmış ve geriye kalan 2 mm kısım

ise algılama işlemi için kullanılmıştır.Kanal boyunca en ve derinlik sırayla 400 µm ve 80 µm'dir. Kanalın sonundaki 5 mm çapındaki bölüm ise 4 mm x 3 mm ebatlarındaki absorban malzemeyi içermektedir [41].

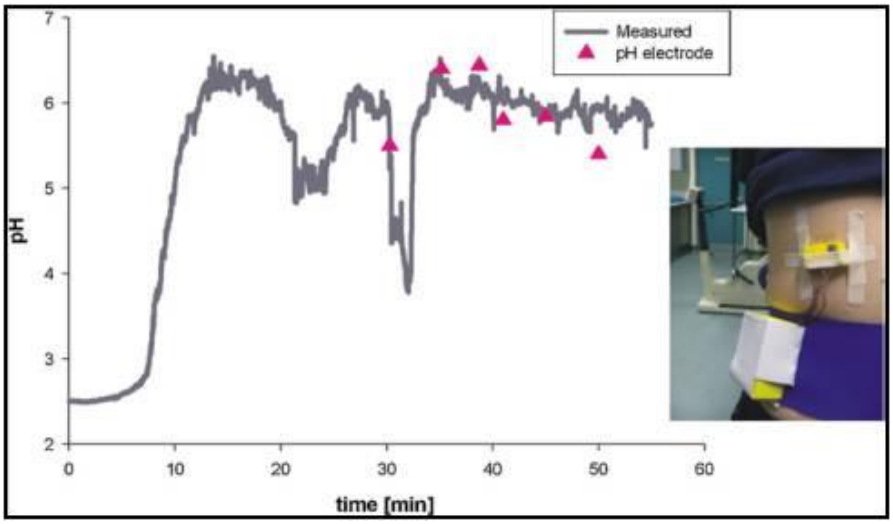
İkinci nesil mikroakışkan çipte (Şekil 2.28 (c)) ise ilkinden farklı olarak kanal boyunca homojen bir ter akış hızı ve akış kontrolü sağlamak amaçlı kanal içerisine pamuk iplik entegre edilmiştir [41].

Genel ebatları 45 mm x 2 mm olan mikro akışkan çipin giriş çapı, kanal genişliği ve derinliği, toplama kısmı birinci nesil çiple aynı olmakla birlikte çıkış kanalı 4 mm uzunluğundadır ve 6 mm çaplı absorban malzeme 12 mm çapındaki dairesel bölgeye yerleştirilmiştir [41].



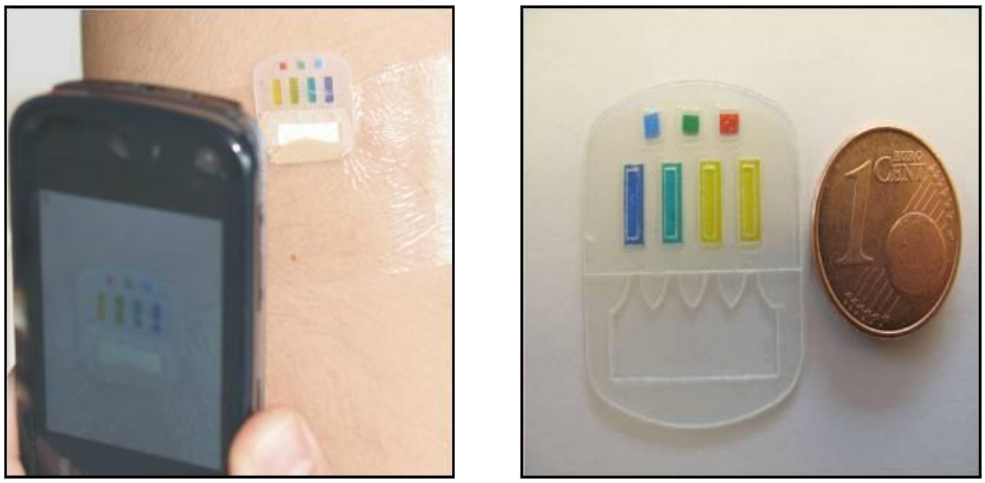
Şekil 2.28 : Mikroakışkan çipler ve üretim adımları [41].

Üretilen mikroakışkan çip kullanılarak yapılan gerçek zamanlı pH ölçümlerine baktığımız zaman ise ilk 5 dakikalık ısınma süresinin ardından atletin terlemeye başladığı ve sistemin terle hızlı bir şekilde dolduğu gözlemlenmiştir. Şekil 2.29'da pH-zaman grafiğinde görüldüğü gibi pH değerinde iki büyük düşüş gözlemlenmiştir. Çalışma grubu düşüşlerin sebebini fizyolojik nedenlere bağlamıştır. Grafikten de görüldüğü gibi oluşturulan çiple alınan gerçek pH ölçümleri ile standart pH elektrodu ile alınan ölçümler örtüşmektedir [41].



Şekil 2.29 : 55 dakikalık egzersiz süresi boyunca kablosuz detektör ve mikroakışkan çip ile kaydedilen terin pH değerinin zamanla değişimi [41].

Bir diğer çalışmada ise araştırmacılar [41] nolu kaynaktaki cihazı geliştirmişlerdir. Cihaz; giyilebilir ve fiziksel açıdan dayanıklıdır, ayrıca pH değişimine bağlı renk değişiminin optik olarak algılanmasına yardımcı olması için geliştirilmiştir ve elde edilen veriler cep telefonu kullanılarak toplanıp kalorimetrik görüntüleme analizleri için daha doğru algoritmalar oluşturmuştur. Önceki çalışmada bahsedildiği gibi polimetilmetakrilat yüzeye CO_2 ablasyon laser yardımıyla rezervuar açıldıktan sonra pH duyarlı boyanın iyonejel içerisine ilave edilip haznelere doldurulmasıyla test bölgeleri elde edilmiştir. Sonuç olarak elektronik aparat içermeyen cihazda kalorimetrik ölçüm sonuçları, test bölgesindeki renk değişimine paralel olarak görüntü alındıktan sonra analiz edilmiştir (Şekil 2.30) [42].



Şekil 2.30 : Barkod temelli giyilebilir mikroakışkan cihaz [42].

Vücut sıvılarının analizine dayanan analitik cihazlarda analit örneği olarak kolayca erişilebilir bir vücut sıvısı olan terin analizine yönelik çalışmalar son zamanlarda artmıştır. Çok iyi bilindiği üzere laktat konsantrasyonunun egzersiz ile doğru orantılı olarak artması; laktatı sağlığın, fiziksel kabiliyet ve egzersizin etkilerini ölçümleyebilmekte önemli bir parametre haline getirmektedir. Terde laktat tespit edilmesi ise daha az invazif ve dinamik bir yoldur [43].

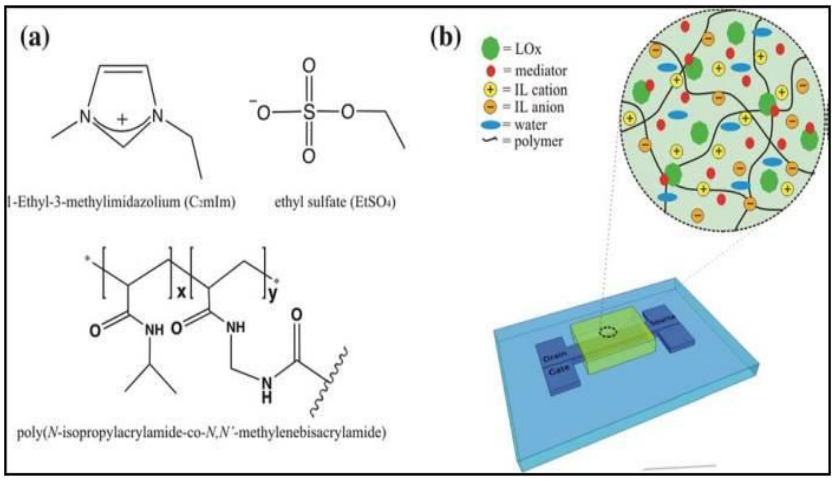
Güncel laktat analiz yöntemleri optik fiberleri, iletken polianilin filmleri, karbon nanotüpleri, baskı yöntemi ile elde edilmiş prussian mavisi elektrodları ve biyosensör tabanlı elektrokemilüminesans tanıları içermektedir. İletken polimerler düşük fiyatları, mekanik esneklikleri ve iyonik iletkenlikleri ile ilginç biyo algılama malzemelerdir [43].

Bu tür malzemeler biyosensör üretimi için organik elektronik alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin; organik elektrokimyasal transistörler (OECT) metabolit, hücre, DNA, antikor, nörotransmitter ve iyon tanılama gibi çeşitli biyosensör uygulamaları için fonksiyonelleştirilmişlerdir [43].

Oda sıcaklığı iyonik sıvıları (RTIL) ise katyon ve anyonlardan oluşmakta olup enzim ve protein gibi biyomolekülleri çözmek ve sabitlemek için etkileyici bir organik çözgen özelliği göstermektedir. RTIL içerisinde biyomolekülleri çözmek için üç ana adım uygulanır [43].

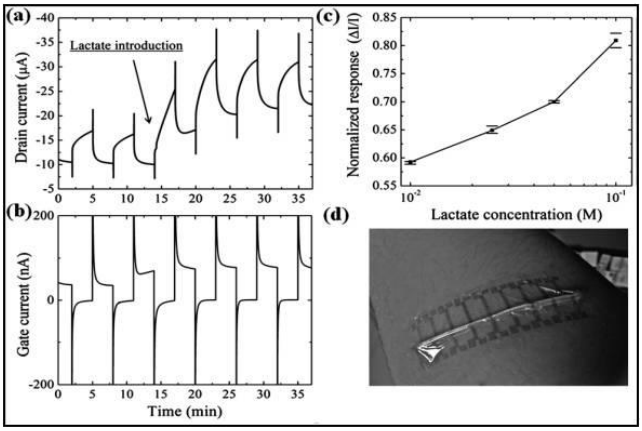
Birinci direkt dağıtma, ikincisi PEGylation yöntemi (polietilen glikol polimerinin proteinlere kovalent bağlarla tutunması) ile yüzey proteini modifikasyonu ve üçüncüsü sulu RTIL oluşturmaktır. Bu çalışmada OECT ve RTIL entegrasyonu ile glikoz sensoru elde edilmiş olup, laktik asit ölçümü yapabilmek için yapılan geliştirmeler aktarılmıştır [43].

Şekil 2.31(a) iyonojelin kimyasal yapısını göstermekte olup iyonojel N-izopropilakrilamid (NIPAAm) ve N,N-o-metilen-bis(akrilamid) olarak iki monomerik alt birim içermektedir. OECT standart litografi ve sonrasında O_2 plazma ile kuru aşındırma yöntemi ile elde edilmiştir. Şekil 2.31(b) OECT'in PEDOT: PSS 100 μm ve 1 mm genişlikte olan kapı elektrot ve kanal olmak üzere iki paralel daldan oluşan düzlemsel modelini göstermektedir. Sulu iyonojel ise LOx enzimi ve freson arabulucu içermekte olup OECT'nin kanal ve kapı kısımlarını kapatmaktadır [43]. OECT cihazının şematik gösterimi Şekil 2.31'de gösterilmiştir.

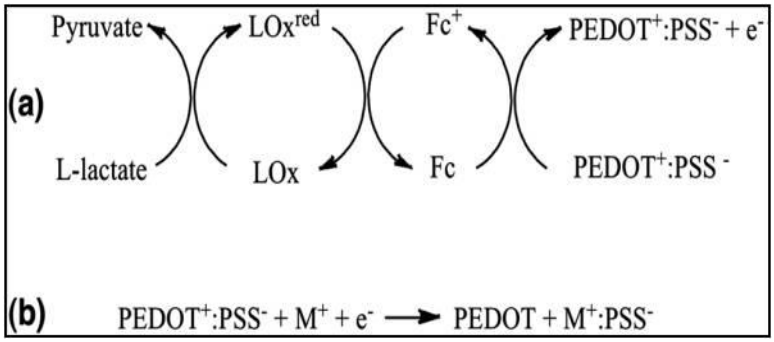


Şekil 2.31 : İyonojel kısımları, iyonojel/enzim karışımı içeren OECT cihazının şematik gösterimi [43].

Şekil 2.32(a) istenilen seviyede laktat konsantrasyonu içeren 20 µl fosfat tampon çözeltisinin sensöre uygulanmasından önceki ve sonraki, cihazdaki akım değişim modülünü götermektedir. Şekil 2.33(a)'da ise laktatın sensöre uygulanması ile gerçekleşen tepkimeler serisini göstermektedir. Laktatın pruvata oksitlenmesi ile laktat oksidaz enzimi indirgenir ve ferosan/ferricinum metal iyon çifti döngüsü tamamlanır. Böylece eletronlar kapı elektrotuna taşınmış olur. Bu durum kapı-elektrot ara yüzeyinde potansiyel azalmasına ve kanal-elektrot ara yüzeyinde potansiyel artışına yol açar. Sonuç olarak çözeltiden kanala daha fazla katyon taşınım ve depolanması Şekil 2.33(b)'de olduğu gibi gerçekleşmiş olur. Şekil 2.32(b) ve 2.32 (c) kapı elektrotun akımını ve laktat konsantrasyonu fonksiyonuna göre transistörün normalize cevabını göstermektedir. Sensörün prototibi ise Şekil 2.32(d)'de gösterilmiştir [43].



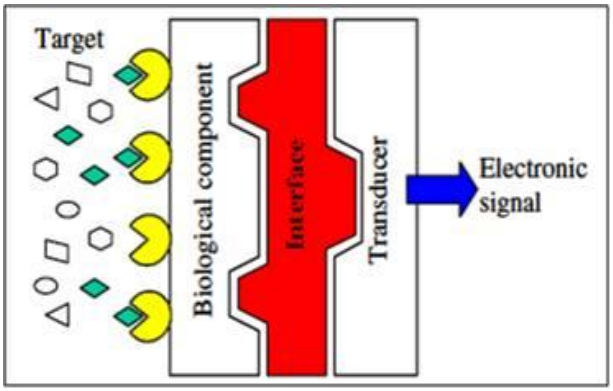
Şekil 2.32 : Laktat ölçüm sensörünün prototipi [43].



Şekil 2.33 : OECT üzerindeki kapı elektrottaki ve kanaldaki reaksiyon [43].

Sonuç olarak bu çalışmada iyonojel katı hal elektrodu ile OECT sensorü ile laktat tayini açıklanmış ve sensörün bandaj halinde kullanımı ile egzersiz sırasında giyilip terden laktat difüzyonu ile sağlık izleniminin sağlandığı belirtilmiştir [43].

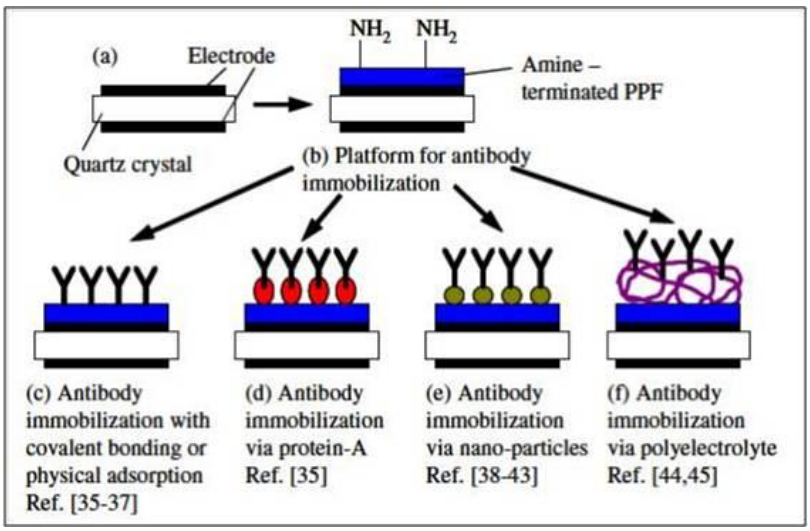
Başka bir çalışmada biyosensörler için kullanılabilecek plazma polimerize filmler konu alınmıştır. Plazma polimerize filmler son derece ince (<1μm), substrat yüzeyine iyi yapışma sağlayan, düz ve küçük kabarcıklar ve delikler içermeyen, mekaniksel-kimyasal olarak stabil ve yoğun bir şekilde biyolojik bileşenlerin film yüzeyine uygulanabilmesini sağlayan özellikler göstermektedir. Biyosensörler konsept tasarımı temel alınarak analiz edilecek hedef moleküle, dönüşüm sinyaline ve biyolojik özellikleri karşılayabilecek mekanik özelliklerine göre sınıflandırılabilmektedir. Şekil 2.34'de tipik biyosensör modeli gösterilmektedir [44].



Şekil 2.34 : Biyolojik bileşen ve dönüştürücü arasındaki ilişkinin önemini vurgulayan örnek biyosensör tasarımı [44].

Yapılan sınıflandırmaya göre biyosensörler Amperometrik, Potansiyometrik, İmmunosensor, Biyoçip, Biomems olarak adlandırılabilir. Şekil 2.35'de plazma polimerize filmlere kesin tutunma kategori yöntemleri gösterilmiştir. Glikoz oksidaz enziminin elektrot içeren gözenekli plazma polimerize filme tutunması Şekil 2.35(a)

-35(b)'de gösterilmiştir. Şekil 2.35(c)'de ise vakum biriktirme prosesi ile minyatürize edilmiş elektrot eldesi şematize edilmiştir. Şekil 2.35(d)'de ise oluşturulmuş elektrot üzerine kovalent olarak tutunmuş glikoz oksidaz enzimi üzerine plazma biriktirme yöntemi uygulanılmıştır [44].



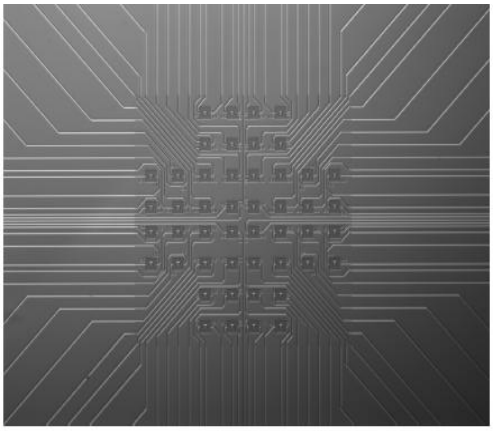
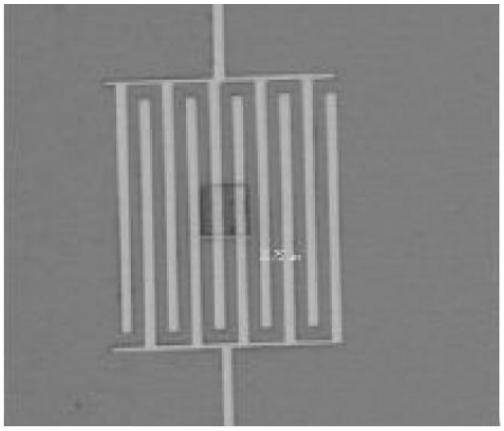
Şekil 2.35 : Quartz kristal mikrobalance immunosensörlere antikor tutundurulması için plazma polimerize film yöntemi [44].

Her iki tarafı elektrot kaplı quartz kristalinin yüzeyinde oluşturulan plazma polimerize film, amino gruplar içermekte olup antikor tutundurulması Şekil 2.35'de gösterilmiştir. Ayrıca antikorların tutundurulma yöntemleri doğrudan tutundurma, protein A sayesinde tutundurma, nano parçacık ile tutundurma ve polielektrolit ile tutundurma olarak tanımlanmıştır [44].

Bir diğer çalışmada; pH ve glikoz seviyelerini tayin etmek için kullanılan dijital elektrod tabanlı mikro sensör uygulamalarındaki gelişmeler raporlamıştır. pH ve glikozun tanı prosesi, polimerlerin özelliklerine bağlı olup farklı konsantrasyonlardaki pH ve glikoz çözeltilerinin uygulanması ile polimerdeki elektriksel karakteristik değişimine göre anlaşılmaktadır. Glikoz sensorü elde etmek için glikoz oksidaz enziminin poliortofenilendiamin polimerine immobilize edilmesi yeterli olmuştur [45].

Dijital elekrodlu sensorü üretmek için p-tip silikon pul sıcak fırında oksitlendirilerek silikon oksit tabakası oluşturulmuş, sonrasında fotodirenç malzeme ile kaplanıp ışına maruz bırakılmıştır. Developer içinde yıkanarak polimerleşmesi sağlanamamış fotodirenç malzeme uzaklaştırılmıştır. Daha sonrasında elektron ışın buharlaştırıcı ile 200 nm altın uygulanıp fazlası temizlenmiş ve böylece silikon oksit film üzerinde

altın elektrod üretilmesi gerçekleşmiştir. Şekil 2.36(a)'da üretilen sensör düzeninin taramalı elektron mikroskop görüntüsü ve Şekil 2.36(b)'de tekli sensör görüntüsü gösterilmiştir [45].

a)  b) 

Şekil 2.36 : İç içe geçmiş 48 elektrod içeren sensör aray çipinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü ve tekli sensorün iç içe geçmiş elektrod yapısı [45].

2.4.3 Tekstil tabanlı mikroakışkan cihazlar

Biyolojik analizlerin yürütülmesinde kullanılan kağıt ve polimer tabanlı mikroakışkan cihazların dışında benzer çalışmalar tekstil yüzeyler üzerinde yapıldığı zaman numune (analit) vücut sıvısı (ter vb.) olarak toplanıp yüzeyde fotolitografi vb. tekniklerle oluşturulan desende kanallar boyunca kumaş yüzeyinin kılcallık özelliği ile taşınıp ölçüm alanlarında test edilmiştir. Tekstil yüzeyde numune vücut yüzeyinden emilip kanal boyunca pasif pompa görevi gören emici malzemelerle yönlendirilmiştir.

Tekstil yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi konusundaki gelişmeler ile birlikte literatürde tekstil tabanlı mikroakışkan cihazlar üzerine bazı çalışmalar yer almaktadır. Gelişen teknoloji ile birlikte araştırmacılar, son yıllarda tekstil terbiyesi üzerinde köklü değişim yapma potansiyelinde olan teknolojileri tartışmaktadırlar. Tekstil yüzeylerinde enzim immobilizasyonu, tabakalı montajlama, nano ölçekteki bitim uygulamaları için plazma uygulaması ve nano kaplamanın geliştirilmesi bu teknolojiler arasında yer almaktadır. Bu işlemler tekstil yüzeyine fonksiyonellik katarken yüzeyin mukavemetine, tutumuna ya da nefes alabilirliğine çok az etki eder. Bu teknolojilerin bir kısmı laboratuarda test edilip onaylanmıştır fakat birçoğu hala

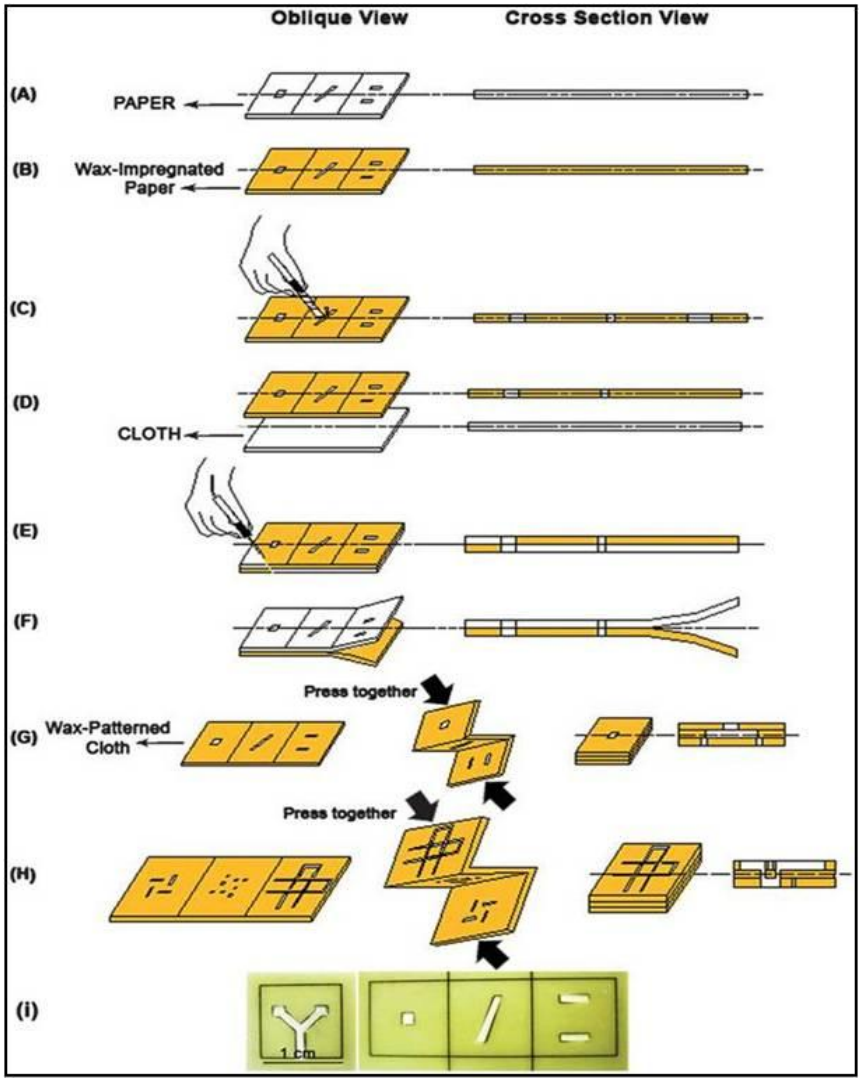
araştırma aşamasındadır. Fonksiyonel özelliği olan bitim işlemi alanındaki ilerlemeler ve gelişmeler ortaya çıkmaya devam etmektedir ve gelecekteki akıllı tekstil üretimlerinde artan bir şekilde kullanılacaktır. Yenilikçi teknolojilerin genel olarak ilkesi ve tekstil imalatı alanında uygulamalardan bazı örnekler verilmiştir [12].

Enzimatik işlemler geleneksel kimyasal bitim uygulamalarına alternatif olarak çevreyi kirletmezler çünkü ılık ortam şartlarında işlev görürler, uygulandıkları yüzeye özgüdürler, toksik madde içermezler, biyolojik olarak parçalanırlar ve tehlikeli yan ürün oluşturmazlar. Enzimler biyo teknolojik metotlarla endüstriyel ölçekte üretilebildiği için tekstil yaş işlemlerinde uzun süredir kullanılmaktadırlar. Enzimatik haşıl sökme, biyolojik pişirme, ağartma, biyolojik yıkama ve parlatma işlemleri pamuklu kumaşlarda köklü ticari teknolojiler arasındadır [12].

Enzim immobilizasyonunun yaygın olarak kullanılan metotları; tutunma (adsorbsiyon), kovalent bağlanma, tutulma, kapsülleme ve çapraz bağlamadır. Tekstil yüzeyine sabitlenen enzimler tekstile kalıcı bir şekilde tutunarak yüzeye eşsiz özellikler katmaktadır bu yönüyle serbest enzimlerden farklıdırlar. Serbest enzimler ilk uygulamadan sonra işlev görmezken sabitlenen enzimler yapılması istenen reaksiyonları katalize etmeye devam eder [12].

Tekstil taban üzerine yürütülen bir mikroakışkan cihaz çalışmasında, pamuklu kumaşlarda mum modelleme metodu kullanılarak kalorimetrik biyolojik deneyler için kumaş tabanlı mikroakışkan analitik cihazın fabrikasyonu açıklanmıştır (Şekil 2.37). Pamuklu kumaş iki ve üç boyutlu mikroakışkan sistemler için ucuz, düşük ağırlıklı ve esnek bir platform olarak önerilmiştir. Pamuklu yüzeyde oluşturulan mikroakışkan kanalın emici özelliği soda çözeltisinde temizlenmesiyle sağlanmıştır. Yüzeydeki doğal wax (mum) soda çözeltisi ile aşındırılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından iki boyutlu mikroakışkan cihazı oluşturmak için hidrofob bariyerler ile çevrili dar hidrofil kanallar mum baskı ile desenlendirilerek elde edilmiştir. İstenilen model mum ile emdirilen kağıtta oyularak elde edilmiştir sonrasında ısı ile pamuklu kumaş yüzeyine desen aktarılmıştır. Bu basit ve ucuz fabrikasyon aşamalarında özel bir alete ihtiyaç duyulmamıştır. Tekstil tabanlı teşhis uygulamaları simüle edilmiş mikro hacimdeki vücut sıvılarının emilip hidrofil kanal boyunca iletilip test bölgelerinde reaktörlerle etkileşmesini açıklayan cihazlar ile yapılmıştır. Yapay

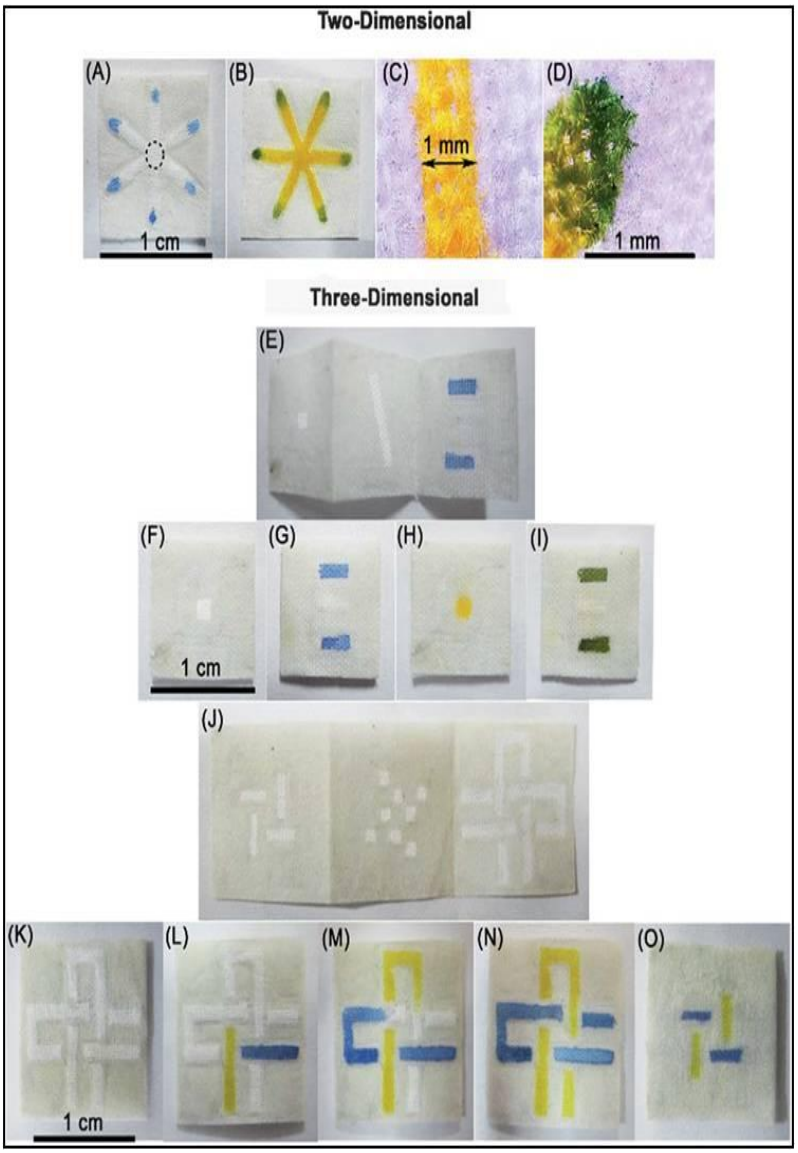
idrardaki bovine serum albümin (BSA) proteini reaksiyon bölgelerinde reaktörlerle etkileştiğinde bromophenol mavisi olarak gözlemlenerek tespit edilmiştir [46].



Şekil 2.37 : Wax (mum) ile modellenmiş katlı tabakalardan oluşan tekstil tabanlı mikroakışkan cihazın fabrikasyonunun şematik görüntüsü [43].

Şekil 2.37'de kağıt örneğine **(A)** emilimin gerçekleşmesi için sıcak wax (mum) emdirilmiştir **(B)**. Kağıttaki hidrofillik kısımlar delinerek uzaklaştırılmıştır **(C).** Hidrofob alanları oluşturmak ve ısı uygulaması ile modeli kumaşa aktarmak için **(E)** wax(mum) emdirilmiş kağıt kumaş üzerine tutundurulmuştur **(D).** Wax (mum) kumaşa transfer edildikten sonra kağıt model yüzeyden alınmıştır ve iki boyutlu cihaz oluşturulmuştur **(F)**. Örnek girişi ve reaksiyon bölgeleri cihazın üst ve alt tabakasında tanımlanmıştır **(G)**. Üç boyutlu cihazlar mikro hacimdeki örneklerin hidrofil kanallarda farklı akış hızlarında birbirine karışmadan dağıtılması için tasarlanmışlardır **(H)**. İki ve üç boyutlu cihazların wax (mum) ile emdirilmiş

görüntüleri gösterilmiştir **(İ).** Tekstil tabanlı cihazda kumaşın emicilik özelliği farklı boyalar kullanılarak test edilmiştir (Şekil 2.38) [46].



Şekil 2.38 : Balmumu desenlendirme yöntemi ile üretilen iki ve üç boyutlu tekstil tabanlı mikroakışkan cihazın şematik görüntüsü [46].

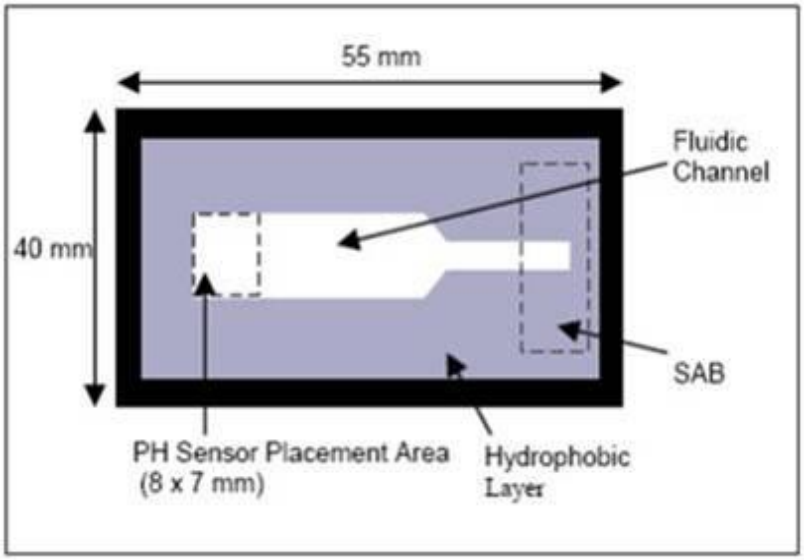
Şekil 2.39'da **(A-D)** iki boyutlu cihaz görüntüsünü ifade etmektedir. (0.1–2.5 ml) miktarında mavi boya mikro pipet kullanılarak test bölgelerine sarı boya ise daire şeklinde olan merkez giriş bölgesinden damlatılmıştır **(A)**. Sarı boya merkezden damlatıldıktan bir dakika sonra fotoğraf alınmıştır **(B)**. Hidrofilik kanallardaki boya transferi **(C)**, reaksiyon bölgelerindeki karışım **(D)** ve hidrofobik bölgeye herhangi bir sızıntı olmadığını gösteren mikroskop resimleri verilmiştir **(E-O)**. Üç boyutlu cihaz modeli bir dakika içerisinde hidrofilik kanalları ve test bölgelerini dolduracak şekilde 5 µl örneğe ihtiyaç duymaktadır **(E-I)**. Cihaza sarı boya damlatıldıktan sonra

alt yüzeydeki mavi boya ile karışımının görüntüsü alt ve üst yüzeylerde gösterilmiştir **(H)-(I)**. Farklı boya çözeltilerinin iki hidrofil kanalda dikey ve yatay yönde birbirine karışmadan üç tabakada ilerlemesinin cihazın ön yüzeyindeki görüntüsü **(J)-(O)**'da gösterilmiştir. Cihazda boyanın farklı kanallara damlatıldıktan 5sn, 2 ve 5 dakika

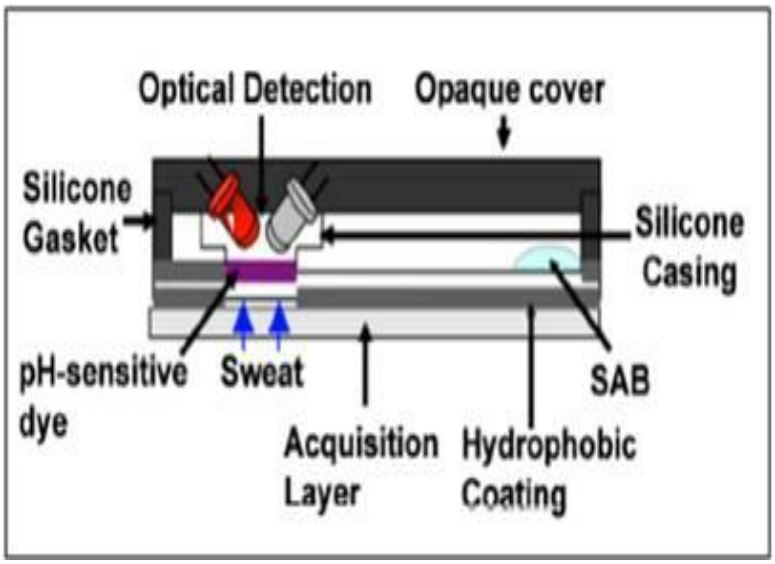
sonraki görüntüleri gösterilmiştir **(K)-(N)**. Boya damlatıldıktan 5 dakika sonra cihazın alt yüzeyindeki görüntüsünü göstermektedir **(O)** [46].

Bir diğer tekstil tabanlı çalışmada noninvaziv bir metot ile gerçek zamanlı ter elektrolitini ve pH'ını ölçümlemek için tekstil tabanlı ter örneklendirme ve ölçümleme üzerinde çalışmışlardır. Tekstil malzemeler kullanılarak yapılan bu çalışmada nem emici özelliğinin iyi olmasından dolayı poliamid/likra karışımlı yüzey terin kanala yönlendirilmesi için kullanılmıştır [47].

Kanal sonundaki süper absorban malzeme (SAB) ile pasif pompa mekanizması sağlanarak kanal içindeki sıvının akışı kontrol altına alınmıştır. İnsan terinin pH aralığı 5-7 arasında [36] olduğundan bu aralığa uygun bromo kresol mor (BCP), pH duyarlı boya, kanala yerleştirilerek analiz yapılması sağlanmıştır. Boyanın pH değişimine göre renk farklılıkları göstermesi emitter ve detektörden oluşan LED sistemi ile optik tanımlama yöntemi ile izlenmiştir. Şekil 2.39'da kullanılan kanal ve Şekil 2.40'da optik tanımlama sistemi şematik olarak gösterilmiştir [47].



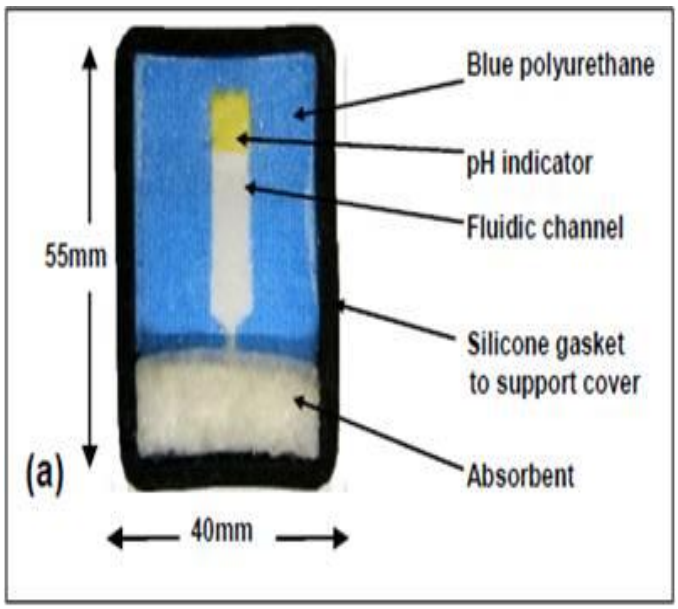
Şekil 2.39 : Sıvı tutma platformu [47].



Şekil 2.40 : Optik tanımlama sistemi [47].

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada, egzersiz anında gerçek zamanlı ter analizini gözlemlemek için yeni, giyilebilir, sağlam, esnek, tek kullanımlık ve teşhis sistemi olarak minyatür optik parçalar dahil edilen mikroakışkan cihazın üretimi yapılarak, performans özellikleri incelenmiştir [48].

Şu ana kadar ki en uygun yaklaşım vücut yüzeyine konulan tekstil yüzeyi ile sıvı örneği toplanarak ardından standart ölçüm teknolojilerini kullanarak laboratuar analizi yapmaktır. Şekil 2.41'de terin toplanıp taşınmasını sağlayan tekstil tabanlı akışkan sistem gösterilmiştir [48].



Şekil 2.41 : Terin toplanıp taşınmasını sağlayan nem emici kumaş ve süper emici malzemenin bileşiminden oluşan tekstil tabanlı akışkan sistem [48].

Cihaz tasarımı polimetilmetakrilat yüzeyde basınç duyarlı yapışkan madde ile ara yüz oluşturulup CO_2 ablasyon lazer ile kanal açılarak yapılmıştır. Test bölgesine ter içeriğinin asit baz durumuna göre renk değiştiren pH duyarlı boya yerleştirilmiştir. İnsan terinin pH'ı genelde 5-7 arasındadır ve bromocresol purplem boyası bu aralıkta sarıdan maviye renk değişimi gösterdiği için seçilmiştir.

Mikroakışkan sistem farklı pH aralıklarındaki tampon çözeltilerin kalibrasyonu ile değerlendirilmiştir. pH analizi cihaz üzerine yerleştirilen mikro kontroler ile denetlenen led ve fotodiyot ile sağlanmıştır. Alınan renk yoğunluğuna göre elde edilen veriler bağlantı kabloları ile bilgisayara aktarılmıştır. Bu mikroakışkan cihaz egzersiz anında ter pH'ındaki değişiklikleri gözlemleyerek bireysel kullanıcıya anında bilgi veren bir gösterge sistemi olarak çalışır [48].

Bir diğer çalışma grubu çalışmalarında gerçek zamanlı ter aktivasyonu ile ilgili bilgi sağlayabilen giyilebilir tekstil tabanlı sensörler sunmuşlardır. Kumaşta yer alan akışkan vücut sıvısının geçtiği kanala, ter pH'ını ölçmek için pH duyarlı boya yerleştirilmiştir. Ter oranını belirleyen sensör, bel bandı içerisine yerleştirilmiş ve ağ bağlantısı ile birlikte merkez birim tarafından kontrol edilmektedir. Ter analizi için bu tür sensörlerin kullanımı, sağlık bakımının yanında, spor performansındaki uygulamalar için değerli fizyolojik bilgiler sağlamaktadır [49, 50].

Kumaştaki kanal, bir baskı yöntemiyle elde edilmiştir. Kanal girişinde ter toplanması için bir açıklık vardır ve kanal sonunda akışın hem kapilaritesini sağlamak, hem de kanalın temizliği için teri toplayacak olan bir süper emici malzeme yerleştirilmiştir. Kumaşın alt yüzeyi, ter giriş haznesi hariç, üst yüzeyi de hazne ve kanal boyu hariç, akrilik içerikli hidrofobik malzeme ile kaplanmıştır. Bu çalışmada egzersiz anında ter pH'ını ve ter oranını ölçmek için tekstil tabanlı sensörler sunulmuştur [49, 50].

Bu sensörler, sporcuların susuzluk ihtiyaçları ile ilgili ve hiperhidrozis gibi şartların teşhisi ve tedavisi için klinik uygulamalarda önemli bilgi sağlayabilmektedir. İki farklı bay örnekte yapılan testlerde, pH sensöründen alınan sonuçlar ile referans değerler karşılaştırılmıştır ve oldukça yakın değerler elde edilmiştir. Farklı parametrelerin ölçümü ile terleme mekanizması anlaşılmış ve farklı bir uygulama alanı olarak fizyolojik ölçümlere yeni bir araştırmanın alanı açılmıştır. Geliştirilmiş olan tekstil tabanlı sıvı taşıma sistemi, giyilebilir biyolojik ve kimyasal sensörlerin uygulamaları için yeni bir platform sağlamıştır [49, 50].

Bu araştırma grubu devam eden çalışmalarında, fizyolojik parametreleri ve vücut sıvılarının, özelliklede terin kimyasal bileşenini ölçmek için tekstil sensörlerini geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu tür giyilebilir analiz cihazları, sıvının toplanması ve toplanan sıvının, pH ölçümleri gibi ölçümleri yapan sensörlere taşınması için tekstil tabanlı sıvı toplama mekanizmasını içerirler [51].

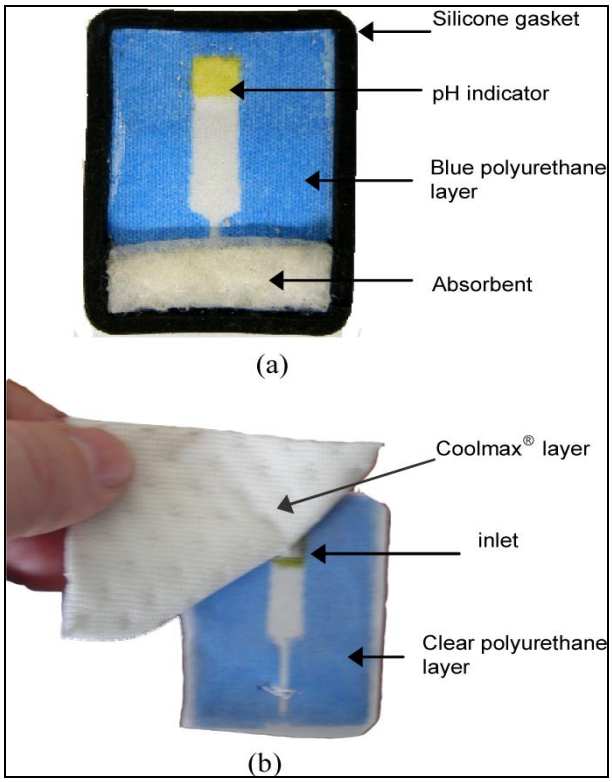
İlk aşamada gerçek zamanlı fizyolojik parametreleri ve ter bileşimini gözlemlemek mümkündür, bu bilgi, örnek kullanıcının vücuduna sensörlerle birlikte yerleştirilen iletişim ağı ile sağlanır. Bu çalışma, spor ve insan performansı alanı için muazzam bir içeriğe sahiptir ve klinik uygulamalardaki araştırmalar için yeni bir alan açmıştır [51].

Sistemde, pasif pompa mekanizması, nem emici kumaş ve süper emici malzemenin kullanımı ile sağlanmıştır. Tekstil kanalı kanal sonuna yerleştirilen süper emici malzeme ve sıvı girişini sağlayan emici kumaş yüzeyi ile oluşturulmuştur [51].

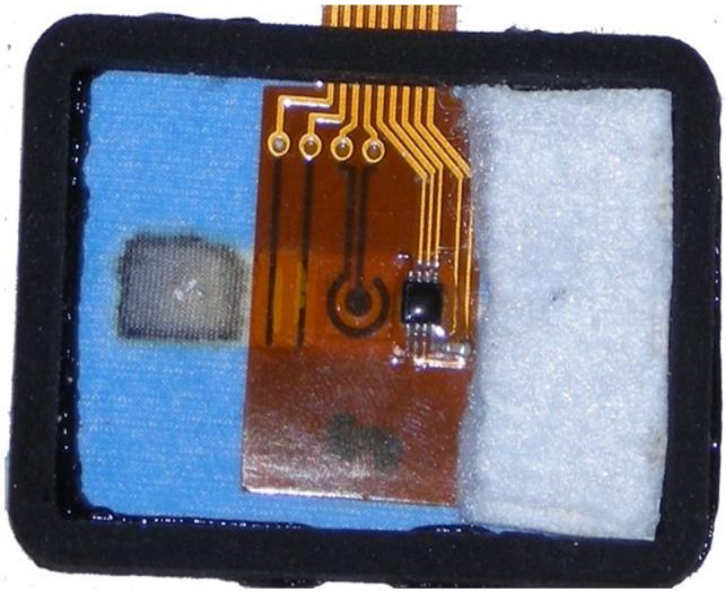
Kanal polyester/likra karışımından oluşan yüzeyin her iki tarafının hidrofobik malzeme ile kaplandıktan sonra şablon baskı yöntemiyle oluşturulmuştur. Kumaşın deri ile temas ettiği bölgede ise, vücut sıvısının gireceği açıklık harici bölgeler poliüretan film ile kaplanmıştır. Sistemde pH ölçümü, test bölgesine yerleştirilen pH duyarlı boyalar ve örnek konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişiminin belirlendiği LED düzeneği ile sağlanmıştır, ayrıca sitemde sıcaklık, sodyum ve iletkenlik sensörleri de yer almıştır [51].

Egzersiz anında, ter pH'ındaki gerçek zamanlı değişimleri ölçmek üzere üretilen tekstil tabanlı pH sensörününden elde edilen ölçüm sonuçları ile deri yüzeyinin pH'ını ölçen, taşınabilir pH-metre ile yapılan test sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu sayede tekstil tabanlı sensörün kullanılabilirliği gösterilmiştir. Sonuçlara göre tekstil tabanlı sensör ve taşınabilir aygıt sonuçları arasında benzerlik olduğu gözlemlenmiştir.

Üretilen tekstil tabanlı cihazlar Bir başka çalışmada iplik tabanlı mikroakışkan cihazlardaki sıvı kontrolü kavramı üzerine çalışma yapmışlardır (Şekil 2.44). Karmaşık ve aynı zamanda işlevsel olan iplik tabanlı sensör tasarımı için cihaz içerisindeki sıvı akışının ve kontrolünün iyi bilinmesi gerekmektedir. Şekil 2.42'de ve Şekil 2.43'te gösterilmiştir [51].



Şekil 2.42 : Tekstil tabanlı sıvı toplama platformu [51].

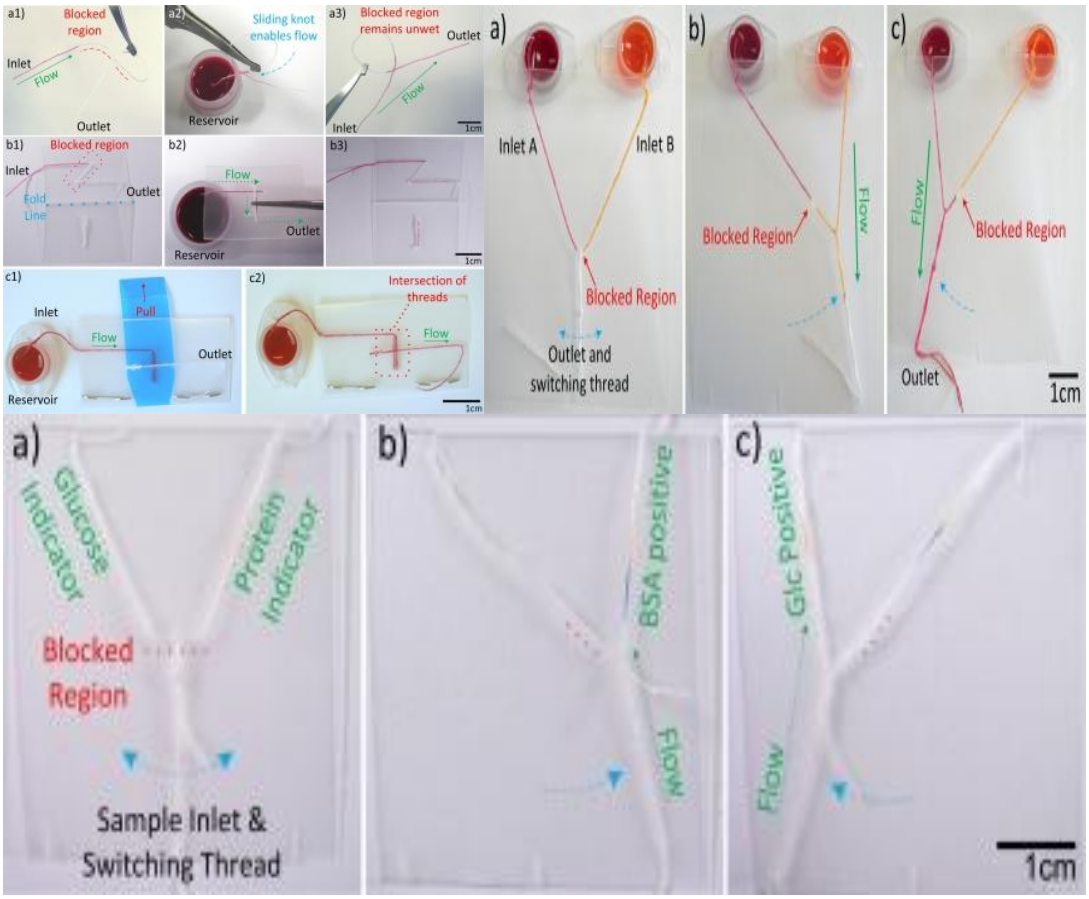


Şekil 2.43 : pH göstergesi, iletkenlik, sodyum ve sıcaklık sensörü içeren çok değişkenli yol [51].

Bunun üstesinden gelmek için reaktörün ve sıvı örneğinin iplik tabanlı mikroakışkan cihazdaki kontrolü için birçok mekanizma bu çalışmada araştırılmıştır. Tek ve bükümlü ipliklerdeki sıvı akış hızının belirlenmesi tasarım için pratik bir bilgi oluşturmuştur.

Bu mikroakışkan iplik tabanlı analitik cihaz, basit araçlar kullanılarak, ucuz bir şekilde yeterli eğitime sahip olmayan kişiler tarafından rahatlıkla üretilebilmektedir. Bu cihazlar, tıbbi sensörlerin kullanımında büyük bir potansiyele sahiptir. Örnek sıvı, iplik boyunca liflerin kapiler etkisiyle taşınmış ve önceden kimyasal reaktiflerle duyarlı hale getirilen algılama alanlarına iletilmiştir. Analitin içeriğinde tespit edilmek istenen parçacıklar kimyasal reaktiflerle etkileşime girerek renk değişimi ile görsel bilgi sunulmuştur [52].

Düğüm sitilinde, polyester iplikte düğümler oluşturularak iplik boyunca ilerleyen sıvı akışı durdurulmuştur. Akış ayırıcı yönteminde ise, bir iplik orta kısmından yapıştırıcı ile polipropilen tabana sabitlenip iki farklı giriş bölgesi oluşturulmuştur ve bu seçici giriş bölgelerinden alınan sıvı tek bir çıkışta toplanmıştır. Mikro karıştırıcı yönteminde ise, iki farklı iplik bükülerek tek iplik formunda renk karışımı gözlemlenmiştir. Açıklanan bu yöntemlerle akış hızı ve iletimi kontrol edilmiştir [52].



Şekil 2.44 : Akış hızı ve yönü değiştirilerek analit içeriğinin uygun reaktiflerle test edilmesi [52]

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Malzemeler

Mevcut çalışmada mikroakışkan sistemin oluşturulacağı taşıyıcı yüzeyler olarak; 35 g/m^2 birim alan ağırlığında ekstrüzyon yöntemi ile PE (polietilen) film kaplanmış 45 g/m^2 PP (polipropilen) spunbond nonwoven kumaş (Mogul, Türkiye) ve farklı gramajlarda (60, 80, 100 ve 130 g/m^2) poliester/poliamid içerikli Evolon® (Freudenberg, Almanya) nonwoven kumaşı kullanılmıştır. **Spunbond**, genel olarak %100 PP hammaddeden oluşan ve diğer kumaş üretimlerinden farklı olarak dokunmamış (nonwoven) olarak tanımlanan bir teknik tekstil kumaş türüdür (Şekil 3.1). Spunbond kumaş PP hammaddesinden dolayı hidrofobik bir üründür. Bu nedenle su iticidir. Ancak çeşitli aplikasyonlarla kumaşa emicilik, iticilik, mukavemet, yumuşaklık, yanmazlık, yıkanabilirlik, filtreleme, bakterilerden koruma, hava geçirgenliği ve esneklik gibi bir takım teknik özelliğin kazandırılması mümkündür [53].

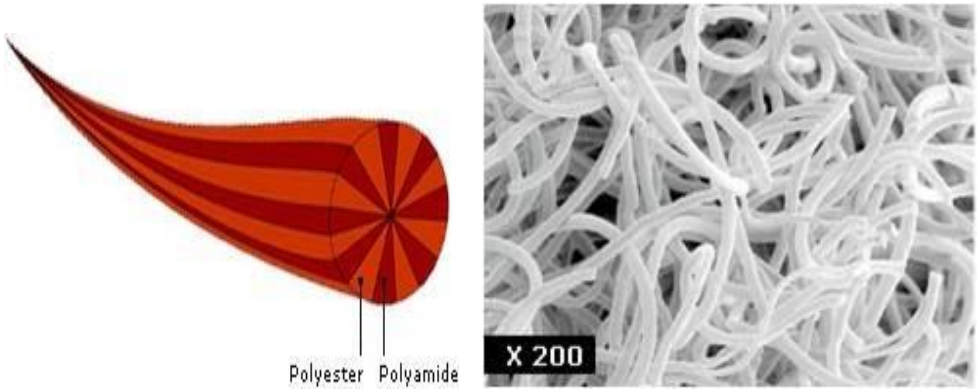


Şekil 3.1: PP spunbond kumaş örnekleri [54-55].

Evolon® bir bikomponent (poliester/poliamid) mikro filament dokunmamış kumaştır (Şekil 3.2). Evolon® teknolojisinde bilinen tüm üretim tekniklerinden daha yeni, farklı ve yüksek performanslı, çevreye duyarlı bir üretim tarzı benimsenmiştir. Evolon® kumaş dünya çapında patentli (Freudenberg® firmasına ait) sürekli bir tekstil üretim yöntemi ile üretilmektedir. Evolon® teknolojisi, poliester ve poliamid hammaddenin filament olarak eriyikten çekim ile elde edilmesi ve toplayıcı bir bant

üzerinde tülbent şeklinde toplanması ve sonrasında basınçlı ve yüksek hızdaki su jetleri ile bağlama işlemi esnasında filament içeriğindeki poliester ve poliamid'in birbirinden ayrılarak mikro filamentlerden oluşan üç boyutlu kumaşın üretimi prensibine dayanır [56].

Evolon® kumaşın temel özellikleri; yüksek seviyede emici, yumuşak, dökümlü, mukavemetli, klasik kumaşlardan daha hafif, ve izotropik özellikte olması aynı zamanda da nefes alabilir ve çok iyi nem yönetimine sahip, çabuk kuruyan, 95°C'de yıkanabilir, dayanıklı ve çevre dostu olmasıdır [56].



Şekil 3.2 : Evolon® mikrofilament teknolojisi ve kumaşın görünümü [56].

Kumaş yüzeyi üzerinde hidrofob bariyerlerle sınırlandırılmış hidrofil kanal ve hazne alanlarını oluşturmak için Microchem firmasının SU-8 3000 serisine ait ürünü olan epoksi bazlı, **SU-8 3050** negatif fotodirenç polimeri temin edilerek fotolitografi prosesinde kullanılmıştır. Fotolitografi süresince desene göre UV ışığa maruz kalmayan ve foto polimerleşmeye uğramamış olan SU-8 polimerini uzaklaştırıp tanımlanan deseni ortaya çıkarmak için 1-metoksi-2-propanol asetat çözeltisi (developer), izopropanol alkol ve deiyonize su kullanılmıştır. Mikroakışkan cihazın üretiminden sonra laktat analizi için teşhis haznelerini işlevsel hale getirmek üzere laktat oksidaz (L0638 Sigma) (LOX) ve horseradish peroksidaz (P8375 Sigma) (POX) enzimleri kullanılmıştır. Laktat kaynağı olan ve LOX enziminin sübstratı olan simüle ter (L-(+)-Laktik asit (L1750 Sigma)) ve renk oluşumunu sağlayan, POX enziminin sübstratı olan 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium tuzu (A1888 Sigma) (ABTS) boyası ve enzimler (LOX, POX) Sigma Aldrich firmasından temin edilerek biyolojik analizlerde kullanılmıştır. Dikey ıslanma testlerinde Evolon® nonwoven kumaşın emicilik özelliğinin üstünlüğünü

göstermek için literatürde kağıt tabanlı mikroakışkan çalışmalarında kullanılan filtre kağıdı temin edilmiştir.

3.2 Ekipmanlar

3.2.1 Spincoater cihazı

Kumaş yüzeyinde mikroakışkan platformu oluşturmak için, üretim aşamasında SU-8 negatif fotodirenç polimeri **spincoater (dönel kaplama)** cihazı ile nonwoven tekstil yüzeyleri üzerine kaplanmıştır. Bu amaçla Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilen WS-400B-6NPP/LITE model spin coater cihazı kullanılmıştır.

Spincoater ile kaplama işlemi düz yüzeylere ince film kaplama amaçlı uygulanmaktadır. Yüzey üzerine dökülen polimerin (SU-8 fotodirenç malzeme) homojen olarak yayılması için merkezkaç kuvvetinin etkisinden faydalanmak amacıyla, spincoater cihazı yüksek hızlarda çalışmaya programlanmıştır. Spincoater saniyede 20-80 devirle dönerek fotodirenç malzemeyi yüzeye kaplama işlemini 30 ile 60 saniye aralığında gerçekleştirir [57].



Şekil 3.3 : Spincoater cihazının kapalı görüntüsü.



Şekil 3.4 : Spincoater cihazının kullanım esnasındaki görüntüsü.

3.2.2 Isıtıcı yüzeyler ve etüv

Kumaş yüzeylerine SU-8 fotodirenç polimerinin kaplanması sonrasında, polimerin solventinin uçurulup kumaş yüzeyine kimyasal bağlanmasını sağlamak amacıyla, ısıl işlem uygulamalarını gerçekleştirmek için PARAZITHERM marka ısıtıcı yüzeyler (Şekil 3.5(a)) ve SHE LAB marka etüv (Şekil 3.5(b)) cihazı kullanılmıştır.



(a) **(b)**

Şekil 3.5 : (a) Isıtıcı yüzeyler ve (b) etüv.

3.2.3 Litografi cihazı

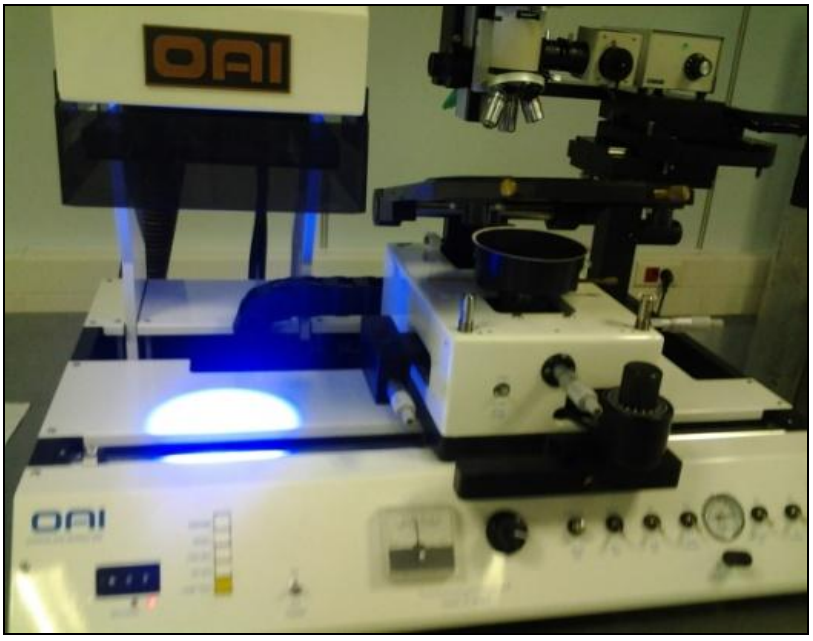
Deneysel çalışmada SU-8 ile kaplanan ve ısıl işlemleri tamamlanan kumaş yüzeyine maskeye göre desenin aktarılması ve mikroakışkan sistemin oluşturulması için litografi tekniği kullanılmıştır. Bu işlem için OAI HYBRALIGN SERIES 200 model litografi cihazı kullanılmıştır.

SU-8 negatif fotodirenç ile kaplanıp polimerin kimyasal bağlanmasını sağlamak amacıyla ısıl işlemleri tamamlanan örnek, silikon taban ile birlikte cihaza yerleştirilip litografi cihazında 8 saniye boyunca UV ışığa maruz bırakılarak kumaş yüzeyi üzerinde desen oluşması sağlanmıştır. Şekil 3.6(a)'da kullanılan fotolitografi cihazı ve Şekil 3.6(b)'de cihazdaki UV ışık kaynağı gösterilmiştir.

Litografi cihazı, ışık gibi radyasyon kaynağına maruz bırakılarak maske yardımıyla desenin ışığa duyarlı malzemelere (fotodirenç malzemesi) geçmesini sağlamak amacıyla genellikle mikro elektro-mekanik sistemlerin (MEMS) üretiminde kullanılmaktadır [58].



(a)

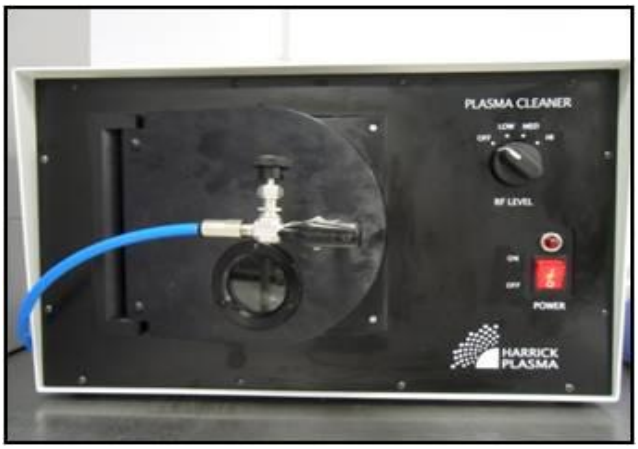


(b)

Şekil 3.6 : a) Litografı cihazı ve b) cihazdaki UVışık kaynağı.

3.2.4 Plazma cihazı

Nonwoven yüzeylerde yapılan üretimlerde hidrofob özellikteki spunbond nonwoven kumaş yüzeyine hidrofilik özellik (kaplama malzemesi olan SU-8 polimerini yapıştırmak için) kazandırmak amacıyla oksijen plazma işlemi uygulanmıştır. Plazma, materyallerin yüzeyini modifiye eden bir teknolojidir. Plazma uygulamasını gerçekleştirmek için HARRICK PLAZMA RF marka plazma cihazı (Şekil 3.7) kullanılmıştır.



Şekil 3.7 : RF plazma cihazı

3.2.5 Optik mikroskop

Tasarımı yapılan mikroakışkan platformu üretmek için taban yüzey olarak kullanılması planlanan Evolon® ve spunbond nonwoven kumaşın yüzey morfolojisi OLYMPUS BX41M-LED marka optik mikroskopta (Şekil 3.8) incelenmiştir.



Şekil 3.8 : Optik mikroskop.

3.2.6 SEM (Tarayıcı elektron mikroskobu)

Fotolitografi ile üretim sonrasında, kumaş yüzeyinde oluşturulan desenlerin hidrofilik/hidrofobik kontrastı ve fotodirenç polimerinin kumaşa penetrasyon davranışı EVO MA10 model SEM cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 : SEM cihazı.

3.2.7 Su geçirmezlik cihazı

Hidrofob özellikte olan PP spunbond kumaş için su geçirmezlik testi Şekil 3.10'da yer alan Shirley Hydrostatic Head Tester cihazında TS 257 EN 20811 standardı [59] kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.10 : Shirley Hydrostatic Head Tester su geçirmezlik cihazı.

3.2.8 Kopma mukaveti test cihazı

Mikroakışkan sistemin oluşturulacağı taban olarak kullanılması düşünülen spunbond ve Evolon® nonwoven kumaşların mekanik özelliklerini belirlemek için kopma mukavemeti testi Şekil 3.11'de yer alan Tinius Olsen marka kopma mukavemeti test cihazında TS EN ISO 13934-1 standardı [60] kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.11 : Kopma mukavemeti cihazı.

3.2.9 Spektrofotometre cihazı

Biyolojik analizlerde ependorf tüplerde hazırlanan solüsyonlara (enzimler-boya) farklı konsantrasyonlarda analit (simüle ter) ilavesinin ardından analit konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen renk yoğunluklarının ölçümü, Biorad Model 3559 UV Microplate spektrofotometre cihazında yapılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 : Spektrofotometre cihazı.

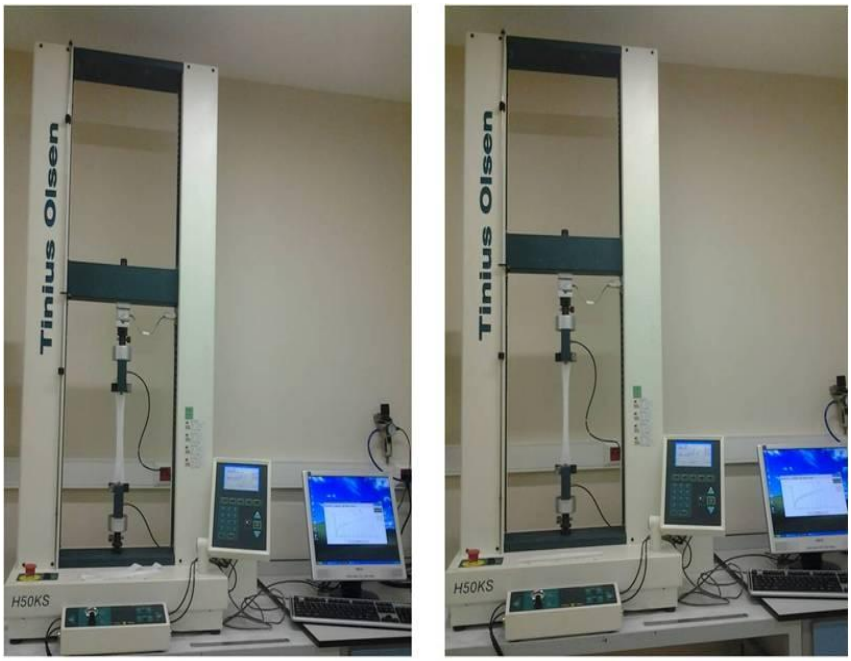
3.3 Metotlar

Tekstil tabanlı mikroakışkan sistemin tasarımında, taşıyıcı yüzey olarak kullanılması planlanan spunbond ve Evolon® nonwoven kumaşların morfolojik, sıvı geçirgenliği ve mekanik testleri yapılmıştır. Devamında mikroakışkan sistemin üretiminde kullanılacak maskelerin tasarlanması ve fotolitografi prosesi ile nonwoven yüzeyler üzerinde mikroakışkan sistemin fabrikasyonu için çalışmalar yürütülmüştür.

3.3.1 Nonwoven malzemelerin morfolojik, sıvı geçirgenliği ve mekanik testleri

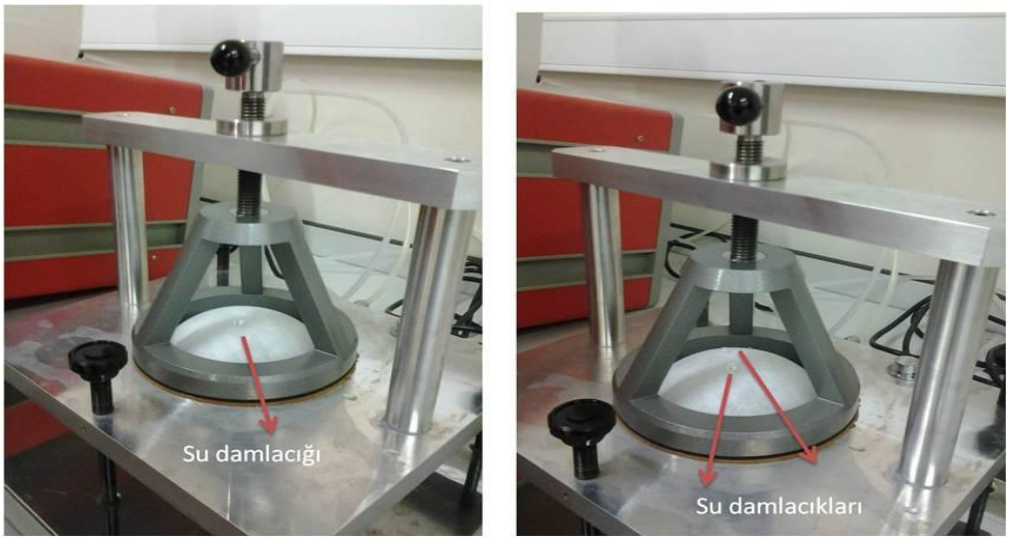
Evolon® ve spunbond nonwoven kumaşların yüzey morfolojisi optik mikroskopta incelenmiştir ve kumaş yüzeylerinin 10x büyütme ile görüntüleri alınmıştır. Ayrıca poliester/poliamid mikro elyaf içerikli Evolon® kumaşın yüzey ve kesit görüntüleri SEM cihazında incelenmiştir. Nonwoven tekstil yüzeylerinde mikroakışkan cihaz tasarımı kapsamında, üretimlerde kullanılmış olan 60, 80, 100 ve 130 g/m^2 Evolon® kumaşların her birinin gramaj tayini yapılmıştır. Kumaşların birim alan kütlesinin tayini, kumaşın bir metrekaresinin gram olarak ağırlığını ifade eder ve kumaş gramajı (metre kare ağırlığı) olarak adlandırılır. Kumaş örneklerinin her birinden 10 cm x 10 cm boyutunda kesilen beş adet numune hassas terazide tartıldıktan sonra ortalama gramajları g/m^2 cinsinden hesaplanmıştır.

Gramaj tayininden sonra kumaşların mekanik özelliklerini belirlemek için kopma mukavemeti testi, kopma mukavemeti test cihazı (Şekil 3.13) kullanılarak TS EN ISO 13934-1 [60] standardına göre yapılmıştır. Bu testin amacı tekstil kumaşlarında en büyük kopma kuvveti ve bu kuvvet altında boyca uzamayı şerit metodu ile tespit etmektir. Ölçüm için Evolon® (130 g/m² poliester/poliamid) ve 35 g/m^2 birim alan ağırlığında PE (polietilen) film kaplanmış 45 g/m^2 PP (polipropilen) spunbond nonwoven kumaşların her birinden üç adet makine yönünde, üç adet de enine yönde 27cmx5cm boyutunda numuneler kesilmiştir. Kumaşların gramajları 200 g/m^2'den küçük olduğu için ölçüm için ön yük 2 N, çeneler arası mesafesi 20 cm ve test hızı 100 m/dk olacak şekilde ölçümler yapılmıştır. Kopma dayanımları Newton cinsinden ve kopma uzamaları yüzde olarak tespit edilmiştir. Mekanik testlerden sonra hidrofob özellikte olan PP spunbond kumaş için su geçirmezlik testi hidrostatik basınç metodu kullanılarak TS 257 EN 20811 standardına göre [59] su geçirmezlik cihazında test edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.13 : Spunbond kumaşa ait ve Evolon® kumaşa ait kopma mukavemeti test cihazındaki ölçüm görüntüleri.

Spunbond kumaş numunesinden üç adet ölçüm alınmıştır ve her bir ölçümde kumaşın maksimum dayanabileceği su basıncı düzeyi cm/wg cinsinden ölçülmüştür. Kumaş numunesi, üç yerden su damlacığı geçirinceye kadar, standart şartlar altında bir yüzeyinden sabit hızla artan su basıncına maruz bırakılmış ve kumaştan üçüncü su damlacığının geçtiği andaki su basıncı, cihazın sayacından okunarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.14 : Su geçirmezlik testi.

Spunbond kumaşa uygulanan su geçirmezlik testinden sonra Evolon® kumaşın emicilik özelliğini test etmek için BS 3424-18 standardına [61] göre dikey ıslanma testi yapılmıştır. Evolon® kumaşın kılcal emme kapasitesi filtre kağıdı ile karşılaştırılmıştır. Test için her numuneden (kağıt ve kumaş) 150 mm × 50 mm boyutlarında iki tane makine yönünde ve iki tane enine yönde parçalar kesilmiştir. Kesilen örnek uzunluğunun 5 mm kadarı deiyonize suda kırmızı mürekkep çözülerek elde edilen boyalı solüsyona daldırılmıştır. Renkli çözelti, emme yüksekliğinin daha kolay okunması için kullanılmıştır. Ardından boyalı solüsyona daldırılan şeritte sıvının alt kısımdan yukarıya doğru yükselme miktarı her 5 dakikada bir ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiştir. Makine yönü ve enine yönde ikişer kez ölçüm alınmıştır. Kağıt ve Evolon® kumaş için sıvı yükselme değerleri her iki yönde hesaplanarak zamana bağlı değişim grafiği oluşturulmuştur.

3.3.2 Maske tasarımı ve fotolitografi prosesi

Mevcut çalışmada taşıyıcı yüzey olarak kullanılması planlanan kumaşların morfolojik, sıvı geçirgenliği ve mekanik testlerinin tamamlanmasından sonra bu yüzeylerde üretilecek olan mikroakışkan sistemlerin tasarım aşamasına geçilmiştir.

Üretilmesi planlanan tekstil tabanlı mikroakışkan platformda simüle terden laktat analizi yapılabilecek şekilde mikro kanallarla bağlantılı hazne desenlerinden oluşan farklı tasarımlar yapılmıştır. Hazne desenlerinin yer aldığı maskeler kullanılarak Evolon® ve spunbond kumaş yüzeylerinde ayrı ayrı üretim parametrelerinin optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

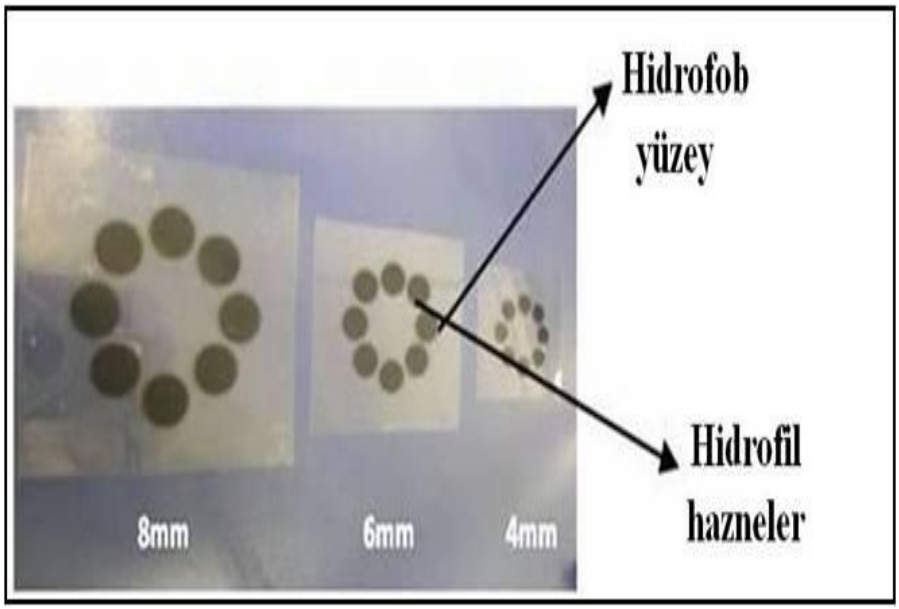
Mikroakışkan platform için uygun yüzey belirlendikten sonra, çizimi yapılan tasarımlar arasından kullanılması düşünülen sistemler seçilip optimize edilen üretim parametreleri ile kumaş yüzeyinde fotolitografi yöntemiyle üretildikten sonra karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Devam eden çalışmalarda üretilen mikroakışkan sistemde simüle terden laktatın yarı kantitatif teşhisini yapmak üzere biyolojik çalışmalar yürütülmüştür.

3.3.2.1 Maske tasarımı

Çalışmanın kapsamında üretimi yapılacak mikroakışkan sistemlerin mikro kanallar ile bağlantılı haznelerden oluşacak şekilde tasarlanması planlanmıştır. Üretilecek mikroakışkan sistemde giriş bölgesinden beslenen analit içeriğinin, herhangi bir güç

sistemine ihtiyaç duymaksızın yüzeyin kılcal etkisiyle kanallar boyunca iletilip haznelerde toplanması ve teşhisi hedeflenmiştir. Buna göre tasarımda mikro kanallarla bağlantılı bir ölçüm, bir de kontrol haznesinin yer alması düşünülmüştür. Teşhis hazenelerinde enzim aktivitesine bağlı renk değişiminin gözlemlenebileceği optimum hazne boyutunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla Tanner Tools L-Edit 13.0 çizim programı kullanılarak farklı çap boyutlarına sahip (4, 6 ve 8 mm) dairesel hazneler çizilmiş ve Şekil 3.15'de gösterildiği gibi asetat kağıt üzerine basılmıştır. Daha sonra asetat maske örnekleriyle fotolitografi tekniği kullanılarak nonwoven tekstil yüzeylerinde üretimler yapılmıştır. Yapılan üretimlerden sonra biyolojik analizlerde enzim immobilizasyonunun yapılabileceği ve enzim aktivitesine bağlı renk değişiminin etkin bir biçimde gözlemlenebileceği hazne boyutu 6 mm olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.15 : Asetat maskeler.

Hazne boyutunun belirlenmesinin ardından, mikro kanallar ve bu kanallarla bağlantılı haznelerden (ölçüm ve kontrol haznesi) oluşan birden fazla mikroakışkan sistem tasarımı yapılmıştır. Bu sistemler analit (simüle terdeki laktik asit) teşhisi için beslenen simüle terin mikro kanallar ile iletimini ve haznelerde birikmesini sağlayacak şekilde tasarlanmışlardır.

İlk tasarım ile Şekil 3.16'da görüldüğü üzere, örnek sıvının merkez bölgeden toplanması ve farklı kanal uzunlukları ile ölçüm ve kontrol haznelerine iletilmesi amaçlanmıştır. Kanal uzunluklarının farklı tasarlanmasının nedeni ise farklı zaman

aralıklarında laktat konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimlerinin gözlenmesini sağlamaktır.

Şekil 3.16(a)'da görülen maske tasarımına ait sistem bileşenleri şunlardır:

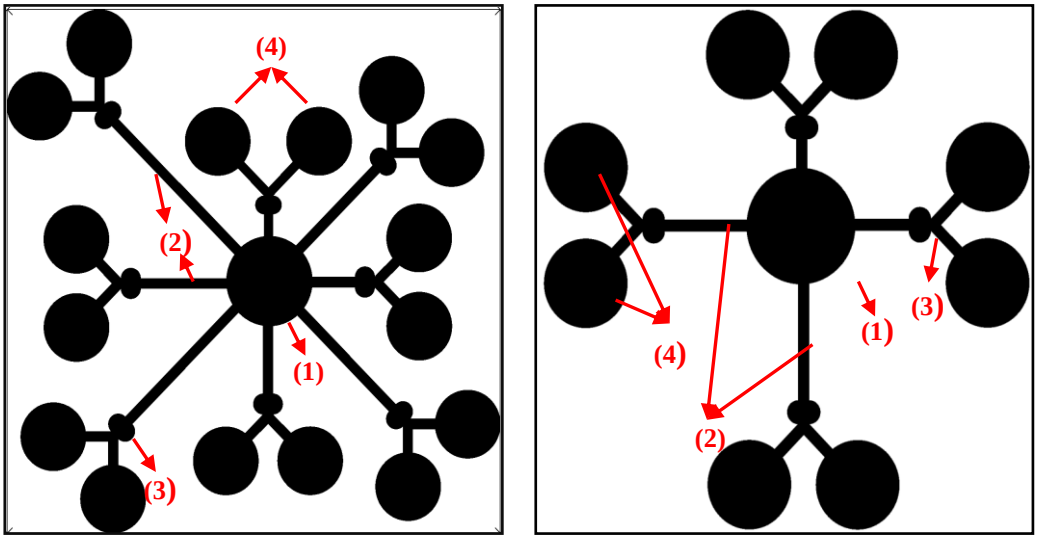
1. terin emilimini sağlayacak 8 mm çaplı dairesel hazne,
2. kanal uzunlukları en kısası 6,6 mm ve en uzunu 20,6 mm olacak şekilde 8 farklı kanal (kanal genişliği 800 μm),
3. ölçüm ve kontrol haznelerine ulaşmadan önce homojen (kümülatif-farklı anlardaki) ter karışımı elde etmek üzere eliptik toplama bölgesi,
4. kanallarla bağlantılı 6 mm çapındaki ölçüm ve kontrol hazneleri.

Şekil 3.16(b)'de görülen diğer maske tasarımına ait sistem bileşenleri ise şunlardır:

1. Terin emilimini sağlayacak 8 mm çaplı dairesel hazne,
2. kanal uzunlukları en kısası 6,6 mm ve en uzunu 12,6 mm olacak şekilde 4 farklı kanal (kanal genişliği 800 μm),
3. ölçüm ve kontrol haznelerine ulaşmadan önce homojen (kümülatif-farklı anlardaki) ter karışımı elde etmek üzere eliptik toplama bölgesi,
4. boyutları 6 mm çaplı dairelerden oluşan ölçüm ve kontrol haznesi.

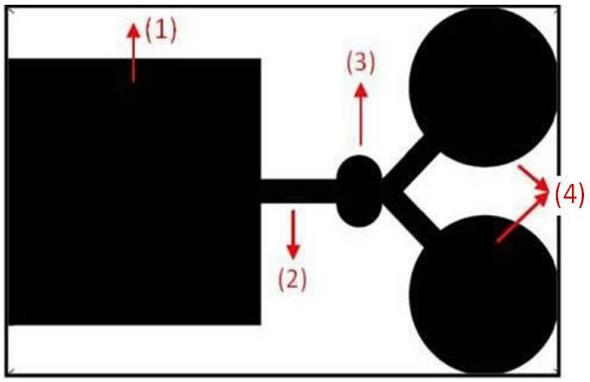
Şekil 3.16(a)'da ve 3.16(b)'de **(1):** Ter toplama haznesi, **(2):** Mikro kanal, **(3):** Eliptik toplama bölgesi, **(4):** Kontrol ve ölçüm haznelerini ifade etmektedir. Merkezde yer alan hazne (1) analiz edilecek simüle terin girişini sağlamaktadır. Desende (4) numara ile belirtilen ölçüm ve kontrol haznelerine sıvının iletimi yüzeyin kılcallık özelliği ile sağlanacaktır. Sıvı merkez hazneden beslendiğinde kanallar aracılığıyla teşhis haznelerine iletilecektir.

Desende yer alan eliptik bölge (3) haznelerde teşhis gerçekleşmeden önce toplanan sıvının (kümülatif farklı anlardaki) homojen olarak karışması için tasarlanmıştır. Çoklu hazne bağlantılı modeller dışında tasarlanan diğer bir model ise Şekil 3.17'de gösterildiği gibi, analit giriş bölgesi (1), mikro kanal (2), eliptik toplama bölgesi (3) ve ölçüm-kontrol haznelerinden (4) oluşmaktadır. Boyutlandırma ise analit toplama girişi 1cm x 1cm olan karesel bölge, uzunluğu 7,8 mm ve genişliği 900 μm olan kanal ve 6 mm çaplı dairesel ölçüm ve kontrol haznesi şeklinde yapılmıştır.



(a) (b)

Şekil 3.16 : L-Edit programı ile çizilen maske modelleri, **a)** Farklı kanal uzunluklarında ve 800 mikron genişliğinde kanallardan oluşan çoklu sistem, **b)** Farklı kanal uzunluklarında ve 800 mikron genişliğinde kanallardan oluşan dörtlü sistem.



Şekil 3.17 : L-Edit programı ile çizilen 900 mikron kanal genişliğine sahip maske modeli**. (1):** Ter toplama haznesi, **(2):** Mikro kanal, **(3):** Eliptik toplama bölgesi, **(4):** Kontrol ve ölçüm haznesi.

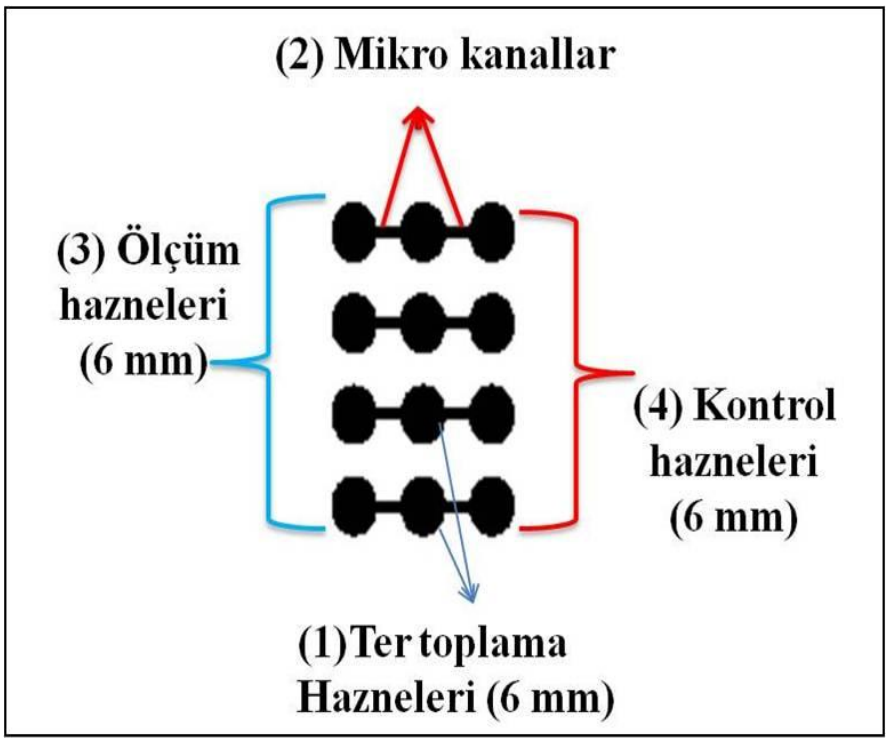
Son olarak Şekil 3.18'de yer alan maske tasarlanmıştır. Bu tasarımda Şekil 3.16 ve 3.17'de yer alan tasarımlardan farklı olarak birden fazla ter toplama haznesi yer almaktadır. Bu tasarımda her bir sırada ter toplama haznesi (1) ölçüm haznesi (3) ve kontrol haznesi (4) olmak üzere üç hazne 4 mm uzunluğundaki mikro kanallarla (1) bağlantılı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde farklı konsantrasyonlardaki simüle ter çözeltilerinin merkez haznelerinden beslenmesiyle ölçüm ve kontrol haznelerine iletilmesi ve analit konsantrasyonuna bağlı olarak bir renk skalası oluşturulması amaçlanmıştır. Potansiyel uygulamasında ilk tasarımda olduğu gibi

sistemin arka yüzeyinde sadece toplama haznelerinin girişi açık yani hidrofil olacak şekilde (tek bir girişten sıvının toplanması için) mikroakışkan cihazın üretilmesi düşünülmüştür. Böylece vücut yüzeyi ile temas halinde olacak olan hidrofil toplama bölgesinden emilen ter kanallar boyunca iletilerek ölçüm ve kontrol haznelerinde toplanıp laktat analizi yapılabilecektir.

Bu tasarıma ait sistem bileşenleri şunlardır:

1. ter emilimini sağlayacak 6 mm çaplı dairelerden oluşan toplama hazneleri.
2. teri hem ölçüm hem de kontrol haznelerine taşıyacak 800 µm genişliğinde ve 4 mm uzunluğunda mikro kanallar.
3. boyutları 6 mm çaplı dairelerden oluşan ölçüm hazneleri.
4. boyutları 6 mm çaplı dairelerden oluşan kontrol hazneleri.

800 µm genişliğinde kanallardan ve 6 mm haznelerden oluşan çoklu sistem, **(1):**Ter toplama hazneleri, **(2):** Mikro kanal, **(3):** Ölçüm hazneleri, **(4):** Kontrol haznelerini içermektedir.



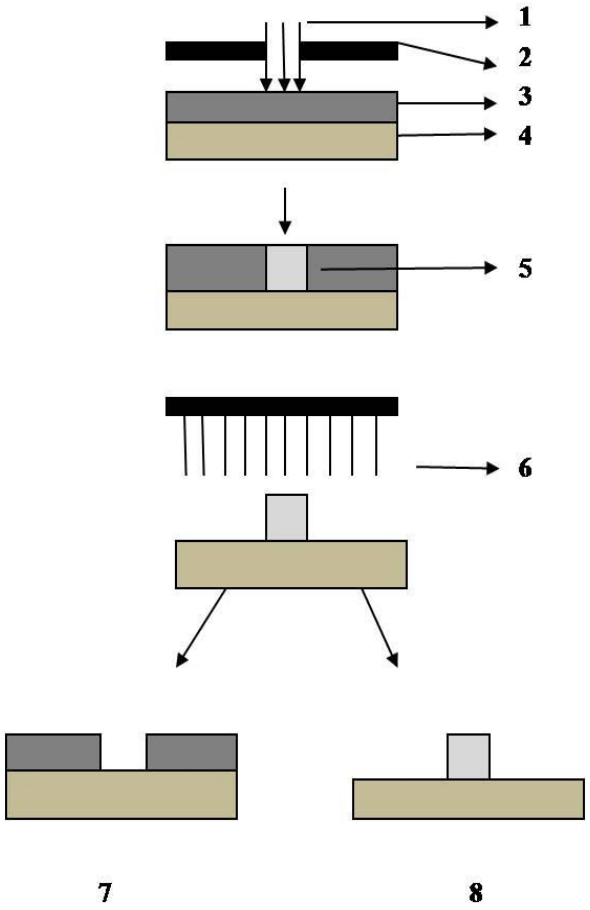
Şekil 3.18 : Kanal bağlantılı üçlü hazne sistemlerinden oluşan maske modeli.

Şekil 3.18'deki son sistem tasarımının kumaş yüzeyinde üretiminden önce, uygun litografi üretim parametrelerinin belirlenmesi için Şekil 3.15'deki hazne desenleri kullanılmıştır.

3.3.2.2 Fotolitografi prosesi

Bu çalışmada mikro kanal ve haznelerden oluşan tasarlanmış deseni nonwoven yüzeyde üretmek için fotolitografi tekniği kullanılmıştır. Kumaş yüzeyi üzerinde hidrofob bariyerlerle sınırlandırılmış hidrofil kanal ve hazne alanlarını oluşturmak için epoksi bazlı, SU-8 negatif fotodirenç polimeri kullanılmıştır. Nonwoven kumaş SU-8 negatif fotorezist kullanılarak spincoater cihazında kaplanmıştır.

Kumaşın doğal emici yapısından dolayı polimer, nonwoven tarafından kumaş kalınlığı boyunca emilmiştir. Isıl işlemleri biten örnek yüzeyine maske yerleştirilerek litografi cihazında UV ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra kumaş yüzeyi ıslak aşındırma işlemine tabi tutulmuş ve maskeye göre UV ışık almayan bölgelerdeki katılaşmamış polimer uzaklaştırılarak desen ortaya çıkarılmıştır. Böylece hidrofobik bariyerlerle çevrilmiş hidrofil alanlar ortaya çıkarılmıştır. Litografi uygulamasının adımları Şekil 3.19'da gösterilmiştir.



1. Işık kaynağı
2. Maske
3. Fotodirenç malzeme
4. Tekstil yüzeyi
5. Fotodirenç malzeme özelliği sadece radyasyona maruz kalan bölgelerde değişir.
6. Yüzeyden fotodirenç malzemenin uzaklaştırılması.
7. Pozitif fotodirenç malzeme
8. Negatif fotodirenç malzeme

Şekil 3.19 : Litografi uygulamasının adımları.

3.3.3 Nonwoven yüzey üzerinde üretilen mikroakışkan sistemin test ve karakterizasyonu

Mikroakışkan cihazda sızma olmadan sıvı emiliminin ve iletiminin sağlanması, işlevsellik ve tekrarlanabilirlik açısından çok kritik bir özelliktir; çünkü sıvının sızması çapraz reaktiviteye neden olarak teşhis haznelerindeki reaksiyonu etkilemektedir.

Bu yüzden hidrofil alanlar hidrofob bariyerler ile düzgünce çevrilmiş olmalıdır. Bir başka deyişle desende iyi bir hidrofilik/hidrofobik kontrast gereklidir. Elde edilen yüzeylerdeki hidrofob/hidrofil kontrastın sağlanması sızdırma problemi olmayan numuneler üretmek açısından önem taşımaktadır.

Mikroakışkan cihazda teşhis alanındaki analitin ve reaktiflerin sızarak ortamdan uzaklaşması teşhisin etkili bir şekilde gerçekleşmemesiyle cihazın verimliliğini düşürür, çünkü biyolojik analizlerde yüzeye tutunamayan enzimler, açık lifler boyunca test alanlarından uzaklaşacak ve analit (simüle ter) ile etkileşime giremeyecektir. Bu nedenle enzimlerin yüzeyden uzaklaşmayacak şekilde hidrofobik alanlarla izole edilmiş kanal bağlantılı haznelerde immobilizasyonunu sağlayan sızdırma problemi olmayan sistemlerin üretilmesi gerekmektedir.

Bu yüzden desendeki hidrofil alanlar hidrofob bariyerlerle düzgünce çevrilmiş olmalıdır. Bir başka deyişle desendeki hidrofobik/hidrofilik kontrast ya da çözünürlük iyi bir şekilde sağlanmalıdır. Evolon® kumaş yüzeyinde optimize edilen üretim parametreleriyle hem asetat hem de krom maske kullanılarak üretilen hazne desenlerinin sızdırmazlık testleri deiyonize suda kırmızı mürekkep çözülerek elde edilen kırmızı boya çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

Hazne desenlerinin sızdırma kontolünden sonra mikro kanal bağlantılı haznelerden oluşan mikroakışkan sistemlerin çalıştığını, yani sıvı iletiminin sızma olmadan mikro kanallar boyunca gerçekleştiğini ve haznelerde toplandığını gözlemlemek için kumaşta elde edilen desende kırmızı boya çözeltisi kullanılarak sızdırmazlık kontrolleri yapılmıştır.

Sızdırma kontrolü dışında kumaş yüzeyinde elde edilen desenlerin hidrofilik/hidrofobik kontrastı ve fotodirenç polimerinin kumaşa penetrasyon davranışı tarayıcı elektron mikroskobu (SEM (Zeiss EVO MA10)) kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.3.4 Mikroakışkan cihaza biyolojik işlevsellik kazandırılması

Mevcut çalışmada simüle edilmiş vücut terindeki laktat seviyesinin, invaziv olmayan, hızlı ve yarı kantitatif bir yöntemle analizini sağlayan ve potansiyel olarak bir sporcunun fiziksel aktivite esnasındaki form durumunu izleyebilmesini sağlayabilecek, tekstil tabanlı bir mikroakışkan sistem tasarlanması amaçlanmaktadır.

Ter, fiziksel aktivite sırasında üretilen, ulaşılabilir bir vücut sıvısı olmanın yanında amonyak, sodyum, potasyum, klorid, kalsiyum, bikarbonat gibi farklı maddeleri ve ayrıca laktat ve glikoz gibi organik bileşikleri içeren kan plazmasının da filtresidir. Ter içeriği kişiden kişiye değişmenin yanında, terleme oranına, hidrasyon seviyesine, aktivite türüne ve ortam ısısına göre değişmektedir. Buna bağlı olarak, ter içeriğinin izlenmesi kişinin fizyolojik durumu hakkında önemli bilgi içermektedir.

Terde laktat tespit edilmesi daha az invazif ve dinamik bir yoldur. Sporcuların fiziksel aktivite sırasında zamana bağlı olarak vücut sıvılarındaki laktat konsantrasyonundaki değişim göz önüne alındığında, laktat testi egzersiz sırasında sporcunun kanındaki laktik asit seviyesinin takip edilerek kondüsyon durumunun ve dayanıklılık kapasitesinin belirlenmesini sağlayan bir testtir. Bireylerin form durumunun belirlenmesinde ve bireye özgü antrenman ağırlığının belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem laktat testidir [62].

Laktik asit, kaslarda oksijensiz ortamda enerji üretimi esnasında oluşan bir maddedir. Düşük tempolu egzersizde vücutta kullanılan enerjinin büyük bir kısmı oksijenli solunum ile sağlanır. Bu reaksiyonlarla solunum ve boşaltım sistemi dokulara yeterince oksijen taşıyabilmekte ve reaksiyon sonucu oluşan metabolitleri de uzaklaştırabilmektedir. Egzersizin başlamasından sonra enerji üretimi ile beraber laktik asit üretimi de artmaya başlar, üretilen laktik asit kaslardan karaciğere taşınır ve yeniden enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere parçalanır.

Bu tepkimeler arasında bir denge vardır ve bu şekilde egzersiz glikojen depoları boşalana kadar sorunsuz bir şekilde sürdürülebilir. Egzersiz şiddetinin artmasıyla kasların oksijene olan ihtiyacı da artar. Daha fazla oksijen alabilmek için solunum derinliği ve şiddeti artar, dolayısıyla kalp kaslara daha fazla kan pompalamak için daha hızlı çalışmaya başlar. Bu aşamada oksijen sıkıntısı oluştuğu için kaslar enerji üretimi için anaerobik (oksijen kullanmayan) yolu daha fazla kullanmaya başlar [62].

Laktik asit ise bu oksijensiz solunum esnasında ortaya çıkan bir üründür. Bu solunum yolunun kullanılmasıyla kandaki laktik asit oranı yükselmeye başlar. Egzersiz şiddeti belli bir seviyeye ulaşana kadar laktat yapım ve yıkımı arasındaki denge korunur. Ancak sınır değerin üzerine çıkıldığında laktat miktarı yıkım kapasitesini aştığı için denge bozulur ve kaslarda laktik asit birikmeye başlar [63]. Buna bağlı olarak egzersiz yapan bireyde yorgunluk hissi ortaya çıkar.

Laktik asidin yoğun olduğu ortamda H iyonlarının da artışıyla asidik bir ortam oluşur. Yüksek asidik ortam kasların zorlanmasıyla beraber dokuların yıpranmasına sebep olur ve bir süre sonrada egzersizin sürdürülmesini engelleyen bir tablo oluşur. Bu yapım ve yıkım dengesinin oluştuğu maksimum laktik asit miktarına "**laktat eşiği"** denir. Bu miktar kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte ortalama 3,5 ila 5,5 mmol/l arasındadır [63]. Şiddetli egzersiz yapan sporcularda maksimum dayanıklık düzeyinde laktat seviyesi 11-13 mmol/l seviyesine kadar çıkabilmektedir [64].

Laktat eşiği, egzersiz tiplerinin sınıflandırılmasında, farklı seviyede bulunan bireylere uygun antrenman yükünün belirlenerek egzersiz ve rehabilitasyon programlarının hazırlanmasında, hastaların fonksiyonel kapasitelerinin sınıflandırılarak rehabilitasyon sırasında hastaların egzersiz performanslarının takibinde kullanılmaktadır [65].

Mevcut çalışmada, ölçüm haznelerini biyolojik olarak işlevsel hale getirmek için lactate oxidase (LOX) ve horseradish peroxidase (POX) enzimlerinin yüzeyde ko-immobilizasyonu yapılmıştır. Boyarmadde olarak ABTS, 2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenztiyazolin-6-Sülfonik Asit) Diamonyum tuzu, ve analit olarak simüle ter (laktik asit çözeltisi) kullanılmıştır.

Laktat oksidaz (LOX) enzimi, L-(+)- laktik asiti (simüle teri) sübstratı olarak kullanır ve H_2O_2 üretir. Oluşan H_2O_2, **horseradish peroksidaz (**POX) enzimi tarafından sübstrat olarak kullanılır.

Diğer yandan indirek olarak reaksiyonu izlemek için, H_2O_2 varlığında POX tarafından oksidasyona uğratılan bir boyar madde olan 2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenztiyazolin-6-Sülfonik Asit) Diamonyum tuzu (ABTS) ölçüm haznelerine eklenmiştir ve reaksiyon sonucu renk oluşumu gözlenmiştir.

Simüle terdeki laktat miktarının belirlenmesinde gerçekleşen reaksiyonlar ve sırası Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20 : Enzimatik reaksiyonlar.

3.3.4.1 Enzim, boyarmadde ve analit (simüle ter) solüsyonlarının hazırlanması

Laktat analizlerinin yürütülmesi için kullanılacak enzim ve boya solüsyonları hazırlanmıştır. Buna göre **lactate oxidase (LOX)** enzim çözeltisi 10 mM PBS (HK_2PO_4 (pH 7.0, 37 °C)) tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Fosfat tampon çözelti (PBS), asit veya baz eklendiği zaman pH değişikliklerine direnç gösteren çözeltidir. Çözelti hazırlık aşamasında 1.82 mg/ml $HK_2PO_4.3H_2O$ iyonsuz su içerisinde çözülmüştür. Bazı enzimler etkinliklerini göstermek için ek bir bileşiğe kofaktör denen, protein olmayan moleküllere gerek duyarlar [65]. Bu sebeple, HK_2PO_4 çözeltisi içerisine LOX enziminin kofaktörü Flavin Adanine Dinucleotide (FAD) çözeltisi 0.009 mg/ml olacak şekilde eklenmiştir. pH ayarlamak için 1 mM NaOH ve HCl çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan karışım içerisinde 2 ünite/ml olacak şekilde toz halde gelen enzimler çözülerek LOX enzim çözeltisi hazırlanmıştır. Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler [66]. Çözeltinin pH değeri enzimin optimum çalışma değeri olarak kabul edilen 6,5 olacak şekilde ayarlanmıştır [67].

Horseradish peroxidase (POX) enzim solüsyonunun hazırlanmasında yine 0,1 mM PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır. Toz halde gelen enzimler, 0,1 mM PBS içerisinde 2000 ünite/ml olacak şekilde çözülmüştür. Ortamın pH değeri, enzimin optimum çalışma değeri olarak kabul edilen 7 olacak şekilde ayarlanmıştır [68].

ABTS (boya) solüsyonunun hazırlamasında kullanılmak üzere, öncelikle 0,1 mM PBS tampon çözeltisi toz haldeki ABTS boyasını çözmek için hazırlanmıştır. Daha sonra ölçümlerde kullanılmak üzere 0,1 mM PBS içerisine toz haldeki ABTS boyası koyularak 9,1 mM ABTS çözeltisi hazırlanmıştır. ABTS çözeltisinin pH değeri 7 olarak ayarlanmıştır [69]. Sonraki adımda, farklı konsantrasyonlarda (1-200 mM) **laktik asit** çözeltileri hazırlanmıştır. Toz olarak tedarik edilen laktik asit 0,1 mM

PBS içerisinde çözülmüş, egzersiz anında terin pH değeri 5-7 arasında olduğu için çözelti ortamının pH değeri 6,5 olarak ayarlanmıştır [42].

3.3.4.2 Enzim, boyarmadde ve analit (simüle ter) oranlarının optimizasyonu

Öncelikle çalışmalar ependorf tüpler içerisinde yapılmış ve lineer çalışma aralığı belirlenmiştir. Bunun için 450 µl ABTS (boya) içerisine 20 µl LOX (0,04 ünite) ve 30 µl POX (60 ünite) enzim çözeltilerinden eklenmiştir. Ölçümler için hazırlanan çözeltiden (enzim ve boya) 50 µl alınmış ve her bir ependorfa ilave edilmiştir. Sonrasında hazırlanmış olan laktik asit konsantrasyonlarından (1-200 mM) sırasıyla her bir ependorfa 1 µl analit (laktik asit) konulmuştur. Analit ortama eklendikten sonra 37 °C de 10 dakika beklenmiştir ve 404nm'de spektrofotometrik ölçümler alınmıştır. Daha sonra ABTS miktarının etkisini belirlemek ve daha yoğun renk yoğunluğu elde etmek için farklı ABTS solüsyonları hazırlanmıştır. Son olarak en iyi renk görüntülemesini elde edebilmek için farklı enzim miktarları test edilmiştir.

3.3.4.3 Fizyolojik sınırlar içerisinde pH değerinin ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi

Teşhis haznelerinde renk oluşumu üzerine pH'ın etkisini belirlemek için farklı pH değerlerinde (pH: 5 ve 6) (ter pH'ı 5-7 arasında değiştiği için [39]) analit solüsyonları hazırlanmıştır. Farklı pH değerlerindeki analitler enzim yüklenmiş ölçüm haznelerine (25ºC) eklenmiş renk oluşumunu incelemek için farklı zamanlarda yüzeyin fotoğrafı çekilmiştir. Sıcaklığın renk oluşumu üzerindeki etkisini belirlemek için renk oluşumu farklı sıcaklıklarda (25-40 ºC) test edilmiştir. Analit solüsyonları istenilen sıcaklık değerine ulaşıncaya kadar en az 30 dakika süreyle etüv içerisinde tutulmuşlardır. Ardından ısıtılan analit solüsyonları tekstil yüzeyindeki haznelere ilave edilmiş ve numune aynı sıcaklıktaki etüv içinde tutulmuştur. Renk oluşumunu gözlemlemek için farklı zamanlarda yüzeyin fotoğrafı çekilmiştir.

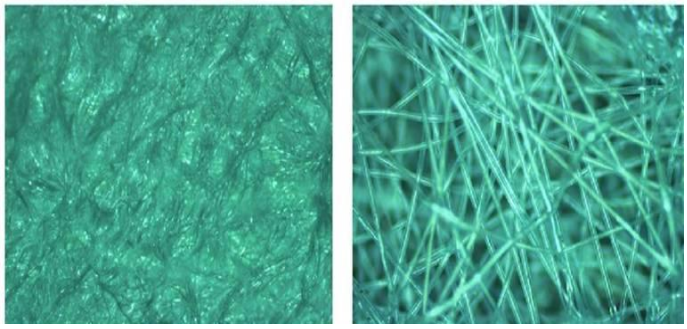
3.3.4.4 Mikroakışkan cihazın depolama ömrü

Enzimlerin raf ömrünün belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda hazneler içerisine enzimler immobilize edilmiş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Enzim immobilize edilmiş yüzeylerde enzimlerin işlevselliğini kontrol etmek için 1-25 gün arasında farklı zamanlarda hazneler üzerinde ölçümler alınmış ve haznelerdeki renk oluşumunun fotoğrafı çekilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

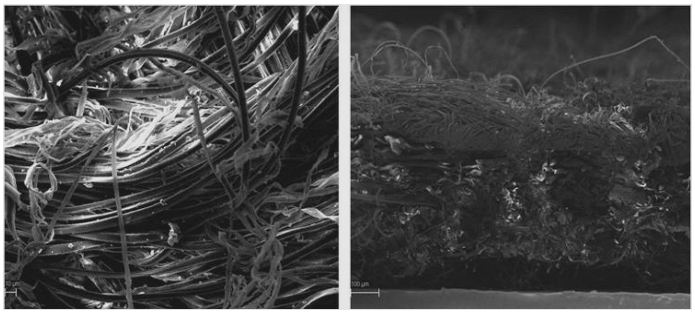
4.1 Nonwoven kumaşların morfolojik, sıvı geçirgenliği ve mekanik testleri

Evolon® ve spunbond nonwoven kumaşların yüzey morfolojisi optik mikroskopta incelenmiş ve kumaş yüzeylerinin 10x büyütme ile görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.1). 130 g/m^2 gramajlı poliester/poliamid mikro elyaf içerikli Evolon® kumaşın optik mikroskopta yüzey morfolojinin incelenmesinden sonra yüzey (1000x büyütme) ve kesit görüntüsü (500x büyütme) SEM cihazında incelenmiştir. Su jeti yöntemiyle mikroliflere ayrılarak üretilen Evolon® kumaşın üç boyutlu yoğun yapısının SEM cihazından alınan yüzey ve kesit görüntüleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



(a) **(b)**

Şekil 4.1 : (a) Evolon® ve (b) spunbond kumaşların optik mikroskopta 10x büyütülmüş yüzey görüntüleri.



(a) **(b)**

Şekil 4.2 : Evolon® kumaşın (a) 1000X büyütmede yüzey görüntüsü ve (b) 500X büyütmede kesit görüntüsü.

Kumaşların yüzey morfolojinin incelenmesinden sonra nonwoven tekstil yüzeylerinde mikroakışkan cihaz tasarımı kapsamında, üretimlerde kullanılmış olan 60, 80,100 ve 130 g/m^2 Evolon® kumaşların her birinin gramaj tayini yapılmıştır.

Buna göre gramaj tayininde birinci numune 60 g/m²,ikinci numune 80 g/m²,üçüncü numune 100 g/m², dördüncü numune 130 g/m² olan kumaş numunelerinden alınmıştır. Buna göre numunelerin gramajları 59,16 g/m² ± 0,035, 76,80 ± 0,018g/m², 101,98 ± 0,065 g/m², 128,60± 0,066 g/m² olarak hesaplanmıştır.

Gramaj tayininden sonra kumaşların mekanik özelliklerini belirlemek için kopma mukavemeti testi kopma mukavemeti test cihazı (Şekil 3.11) kullanılarak yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda spunbond ve Evolon® kumaş için her numuneye ait kopma mukavemeti (N) ve (%) uzama verileri Çizelge 4.1 ve 4.2'de, numunelere ait kopma mukavemeti (N)-(%) uzama grafikleri ise Şekil 4.3(a) ve 4.3(b)'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : Evolon® kumaşın mekanik özellikleri

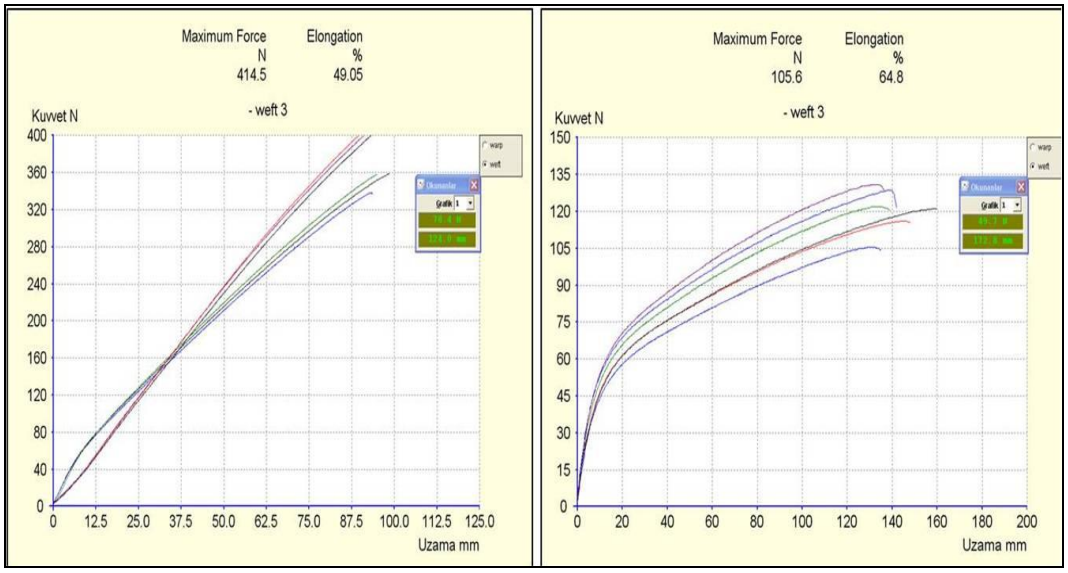
Kopma mukavemeti (makine yönü) (N)	Kopma uzaması (%)	Kopma mukavemeti (enine) (N)	Kopma uzaması (%)
351,6±11,43	47,41±1,34	417,3±13,96	48,53±1,73

Çizelge 4.2 : Spunbond kumaşın mekanik özellikleri

Kopma mukavemeti (makine yönü) (N)	Kopma uzaması (%)	Kopma mukavemeti (enine) (N)	Kopma uzaması (%)
127,2±4,7	66,9±2,5	114,3±7,9	72±7,3

Mekanik testlerden sonra hidrofob özellikte olan PP spunbond kumaş için su geçirmezlik testi hidrostatik basınç metodu kullanılarak su geçirmezlik cihazında test edilmiştir. Her bir ölçüm için kumaş yüzeyinin maksimum dayandığı su basıncı değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Bu basınç değerlerinde kumaşın bir yüzeyinden diğer yüzeyine sıvı (su damlacıkları şeklinde) geçmiştir.

Maksimum su basıncı değeri, yüzeyin su geçirmezliğinin yani basınçlı suya karşı dayanımının bir ölçüsüdür. Evolon® emici bir kumaş olduğu için cihazda direkt suyu emerek geçirmiştir ve su basıncı değeri cihazın sayacından okunamamıştır.



(a) (b)

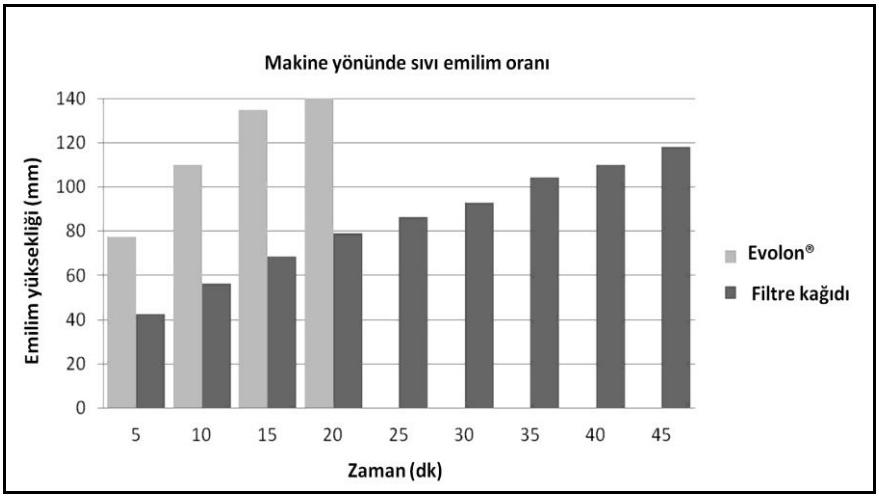
Şekil 4.3 : (a) Evolon® ve (b) spunbond kumaşa ait kopma mukavemeti-uzama grafikleri.

Çizelge 4.3 : Spunbond kumaşa ait su geçirmezlik testi verileri.

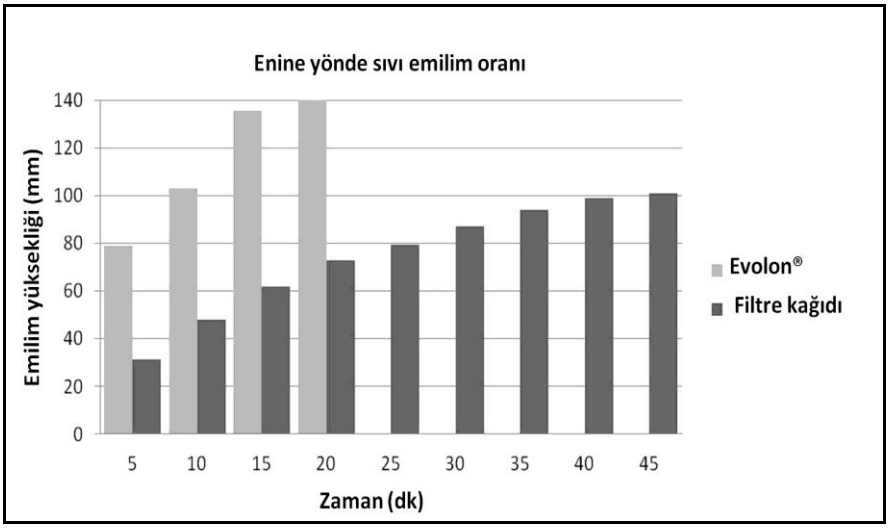
Ölçüm sayısı	Basınç(cm/wg)
1	453
2	497
3	434
Ortalama(cm/wg)	461,3
Standart sapma	32

Evolon® kumaşa ve filtre kağıdına uygulanan dikey ıslanma testlerinden sonra Evolon kumaş için yapılan testte ilk 5 dakika içerisinde boyalı solüsyon kumaşta yaklaşık olarak 80 mm yüksekliğe ulaşmış ve hem makine yönünde hem de enine yönde yaklaşık 20 dakika içinde kesilen örnek boyutu olan 140 mm'ye ulaşmıştır. (Şekil 4.4). Ancak kağıt için yapılan testte, boyalı solüsyon ilk 5 dakika içinde makine yönünde 43 mm, enine yönde ise 32 mm'ye ulaşmıştır. Kağıtta sıvı iletimi 45 dakika sürenin sonunda makine yönünde 118 mm'de, enine yöde ise 100 mm mesafede durmuştur (Şekil 4.5). Dikey ıslanma test sonuçları Evolon® kumaşın

kapiler etkiyle sıvı emilimi için filtre kağıdına göre oldukça yüksek emicilik özelliği olduğunu göstermiştir. Evolon® kumaştaki mikroliflerin yüksek yüzey-hacim oranı yüksek emicilik özelliği sağlamaktadır.



Şekil 4.4 : Evolon® kumaşta ve filtre kağıdında makine yönde sıvı iletim hızının karşılaştırılması.



Şekil 4.5 : Evolon® kumaşta ve filtre kağıdında enine yönde sıvı iletim hızının karşılaştırılması.

Sonuçlara göre Evolon® kumaş analitlerin hızlı teşhisi için gerekli örnek sıvının toplanması ve teşhis bölgelerine iletimi açısından kağıt yüzeye göre daha avantajlı bulunmuştur. Mikroakışkan cihazlara kullanılan malzemelerin emicilik oranı çok kritik bir özelliktir. Çünkü mikroakışkan cihazlarda örnek sıvı iletimi kanal boyunca mümkün olduğunca hızlı bir şekilde gerçekleşmelidir. Çünkü iletim esnasında örnek

sıvının buharlaşması azaltılarak cihazın verimliliğinde meydana gelecek düşüş engellenmiş olur [36, 37]. Ayrıca cihazlarda analit besleme noktası ile teşhis bölgelerindeki mesafe uzun olduğunda analitin beslenmesi ve emilimi esnasında konsantrasyonunda düşme meydana gelebilir ve bu durum cihazın verimliliğini sınırlandırır [35]. Sonuçlar Evolon® kumaşın yüksek emicilik özelliği ile teşhis alanı örnek giriş bölgesine uzak olarak tasarlanmış mikroakışkan desenlerde yüzey olarak tercih edilebileceğini göstermiştir.

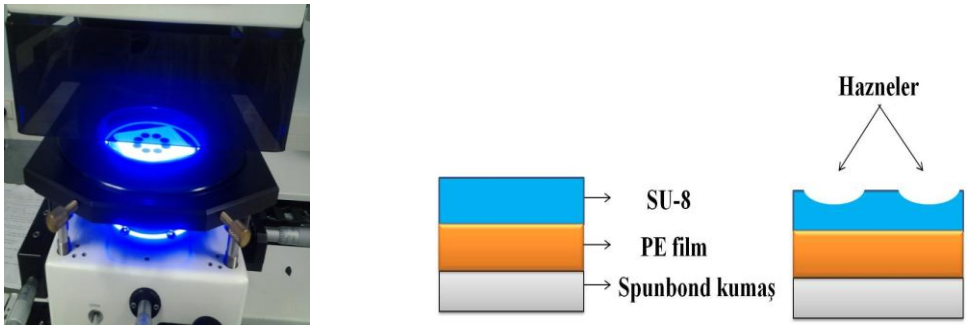
4.2 Nonwoven yüzey üzerinde mikroakışkan sistem fabrikasyonu

4.2.1 PE film kaplanmış spunbond nonwoven kumaş yüzeyinde ölçüm haznelerinin üretimi

Tasarımda yer alacak haznelerin (ölçüm ve kontrol) boyutunu belirlemeye yönelik hazırlanan 4, 6 ve 8 mm çaplı haznelerden oluşan asetat maskeler kullanılarak ilk üretimler spunbond tekstil yüzeyleri üzerinde yapılmıştır.

PE film kaplı PP spunbond nonwoven kumaş yüzeyi, silikon taban üzerine yapıştırılarak sabitlenmiştir. Hidrofob PE film yüzeyine 15 dakika süreyle oksijen plazma işlemi uygulanmıştır. Spunbond kumaş PP hammaddesinden dolayı hidrofobik bir üründür. Yüzeye hidrofob yapıdaki SU-8 polimerini yapıştırabilmek için kumaş yüzeyine oksijen plazma işlemi uygulanarak yüzey hidrofil hale getirilmiştir. Böylece kumaş yüzeyi ile SU-8 polimeri arasındaki yapışma sağlanmıştır. Silikon taban üzerine yapıştırılan kumaş, tutucu ile spincoater'a yerleştirildikten sonra vakum ile sabitlenmiş ve yaklaşık 4 ml miktarındaki SU-8, hazırlanan numunenin tam ortasına dökülmüştür. Spincoater iki ayrı programa ayarlanmıştır. Cihaz, SU-8'in yüzeye yayılmasını sağlamak için, 100 rpm hızlanma ile 500 rpm'de 10 saniye, istenilen SU-8 yüksekliğini elde etmek için ise 300 rpm hızlanma ile 3000 rpm'de 30 saniye çalıştırılmıştır ve yüzey Microchem'in verdiği değerlere [70] göre tek seferde yaklaşık 50 µm kalınlığında SU-8 ile kaplanmıştır.Bu işlemden sonra numune SU-8 polimerinin solventinin uçurulması ve kumaş yüzeyinde yoğunlaşması için 95ºC'de 15 dakika süreyle ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Bu işlemin ardından 1-2 dakika soğuk zeminde, sonrasında 95ºC sıcak yüzey üzerinde 1-2 dakika bekletilmiştir. Sıcak yüzeyde ısıl işlemden geçirilen SU-8 kaplı yüzey, litografi cihazına götürülerek asetat maskeler yüzeye yerleştirilmiş, hazneler haricindeki kısımlar 8 sn ile UV ışığına (Şekil 4.6(a)) maruz bırakılarak,

hazneleri çevreleyen hidrofobik yüzey elde edilmiştir. Litografinin ardından tekstil yüzeyi silikon taban ile birlikte 1-2 dakika süreyle 65 ºC' de bekletildikten sonra 95 ºC'de 5 dakika süreyle bekletilmiş ve devamında ıslak aşındırma işlemi uygulanmıştır. Islak aşındırma yönteminde, numune üzerinde UV ışığa maruz kalmayan hazne kısımlarındaki SU-8, developer (1-metoksi-2-propanol asetat çözeltisi) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Islak aşındırma developer ile 5 dakika süreyle yapılmıştır. Böylelikle yüzeydeki hazne desenleri UV ışık ile katılaştırılan hidrofobik yüzeyle çevrelenmiştir. Developer ile kalan SU-8 atıkları uzaklaştırıldıktan sonra, isopropil alkol ile yüzeydeki developer temizlenmiştir. Yüzeyde kalan alkolün temizliğinde ise deiyonize su kullanılmıştır. Bu işlemler sonucunda haznelerin yer aldığı tasarım kumaş yüzeyi üzerinde elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra ısıl bağlanmayı tamamlamak için örnekler etüv'de 75°C' de 3 saat bekletilmiştir. Şekil 4.6(b)'de PE film kaplı spunbond nonwoven kumaş üzerinde SU-8'in aşındırılması ile elde edilen haznelerin şematik kesit görüntüsü verilmiştir. Fakat kurutma sıcaklığı ve süresine bağlı olarak Şekil 4.7'de görüldüğü gibi yüzeyde sertleşmeye bağlı kumaş tuşesi bozulması ve numune kenarlarında hafif kıvrılma görülmüştür.



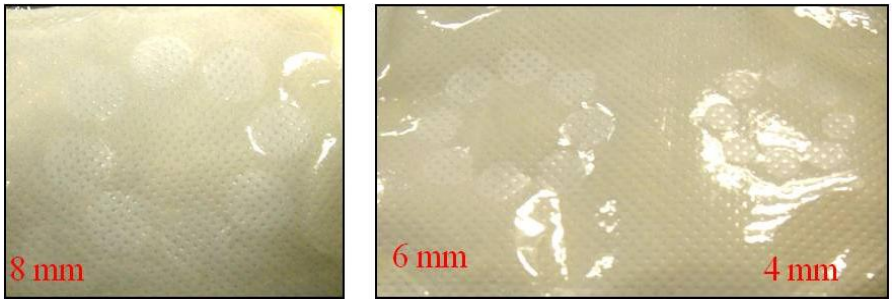
(a) (b)

Şekil 4.6 : PE film kaplı spunbond nonwoven kumaşın SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü.

Yukarıda belirtilen sorunlardan dolayı aynı üretim adımları uygulanarak kumaş tutumunu iyileştirmek için kurutma aşamasındaki sıcaklık değeri ile birlikte süre değiştirilerek çalışma tekrarlanmıştır. Aynı üretim sürecinden sonra elde edilen yeni hazneler etüvde 45°C sıcaklıkta, 2 saat süreyle bekletilmiştir. Sıcaklığın ve sürenin düşürülmesiyle kumaş yüzeyinde oluşan sertleşme ve kıvrılma belirgin derecede azalmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7 : 75°C'de etüvde 3 saat ısıl işlem uygulanan PE film kaplı PP spunbond nonwoven yüzeyde oluşturulan 4 mm, 6 mm ve 8 mm çaplı hazne örnekleri.



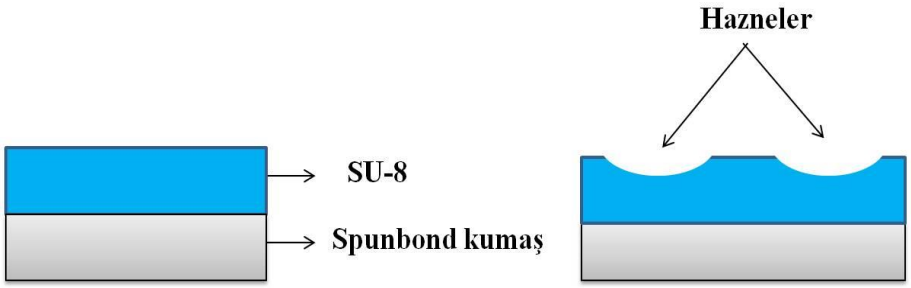
(a) (b)

Şekil 4.8: 45°C'de etüvde 2 saat ısıl işlem uygulanan **a)** 8 mm çaplı haznenin, **b)** 6 mm ve 4 mm çaplı haznelerin üstten görünümü.

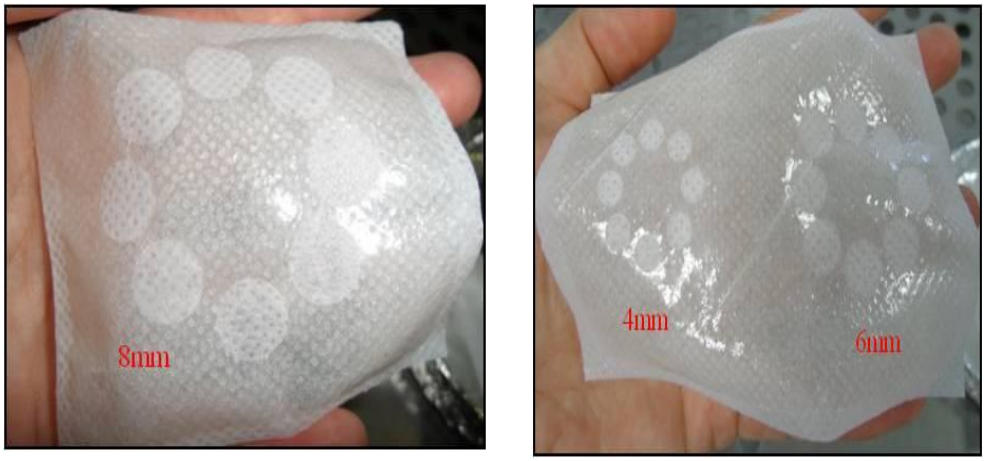
4.2.2 Film kaplanmamış PP spunbond nonwoven kumaş yüzeyinde ölçüm haznelerinin üretimi

Devam eden çalışmada, PP spunbond nonwoven kumaşın film kaplı olmayan arka yüzeyinde üretim yapılmıştır. 15 dakika oksijen plazma işlemi uygulanan kumaş silikon taban üzerine sabitlenmiştir. Tabana yerleştirilen kumaş yüzeyi spincoater'da 3000 rpm'de, 50 µm kalınlığında SU-8 ile kaplanmıştır. Bundan sonra kimyasal bağlanma işleminin daha iyi gerçekleşmesi için kaplanmış kumaş 95ºC'de 20 dakika (filmli yüzeyde 15 dakika uygulanmıştı) ısıl işleme maruz bırakılmıştır. 1-2 dakika soğuk zeminde, sonrasında tekrar 1-2 dakika 95ºC sıcak yüzey üzerinde tutulmuştur. Isıl işlemleri biten örnek litografi cihazına yerleştirilmiş, maske yardımıyla 8 sn süreyle UV ışığa maruz bırakılarak hazneler oluşturulmuştur. Bu işlem 4, 6 ve 8 mm çaplı hazneler için ayrı ayrı uygulanmıştır. Litografinin ardından kumaş yüzeyi 65ºC'de 1-2 dakika ve 95ºC'de 5 dakika sıcak yüzeyde bekletildikten sonra ıslak aşındırma adımı uygulanmıştır. Islak aşındırma yönteminde developer kullanılarak (5

dakika ıslak aşındırma süresi), numunede UV ışığına maruz kalmayan desenin yer aldığı bölgelerdeki (hazneler) katılaştırılmamış SU-8 uzaklaştırılmıştır. Böylelikle yüzeydeki hazne açıklıkları UV ışığı ile katılaştırılan hidrofobik yüzeyle çevrelenmiştir. Developer ile kalan SU-8 atıkları uzaklaştırıldıktan sonra, isopropil alkol ile yüzeydeki developer temizlenmiştir. Yüzeyde kalan alkolün temizliğinde ise deiyonize su kullanılmıştır. Aşındırma işleminin ardından yüzey azot gazı ile kurutulmuştur. Son olarak örnekler kurutma işleminin tamamlanması için 75°C'de etüvde 2 saat bekletilmiştir. Kumaş yüzeyinde elde edilen haznelerin şematik kesit görüntüsü Şekil 4.9'da ve elde edilen hazne desenleri 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : Spunbond nonwoven kumaşın tek kat SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü.

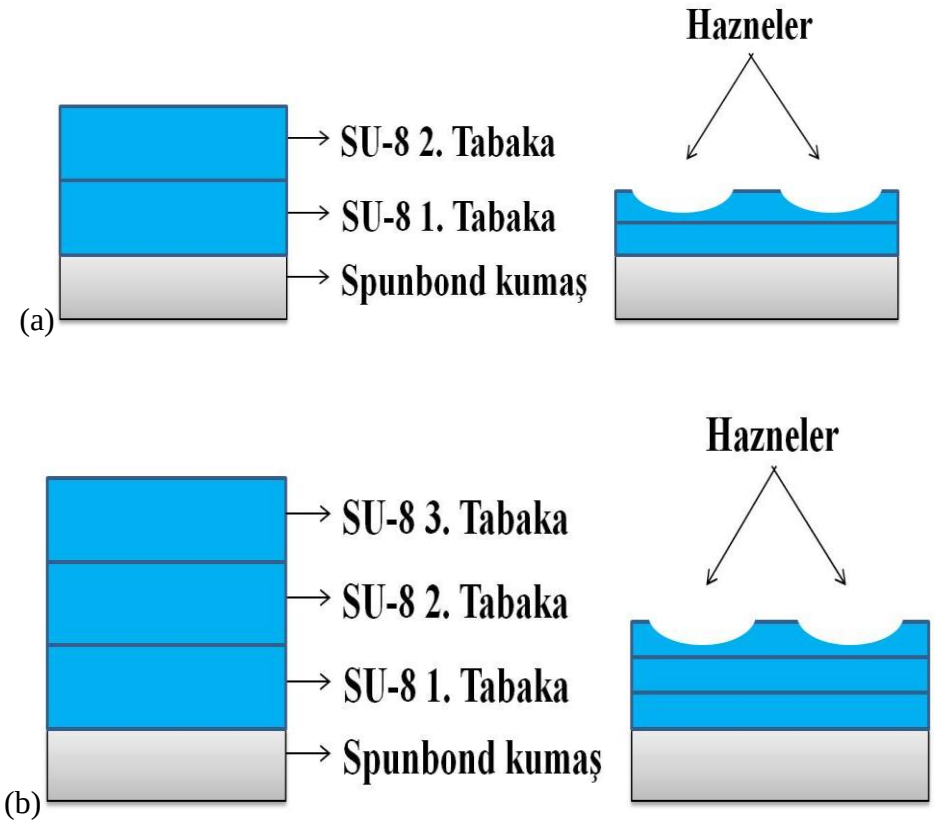


Şekil 4.10 : 75°C'de etüvde 2 saat ısıl işlem uygulanan film kaplı olmayan PP spunbond nonwoven yüzeyde oluşturulan 8 mm, 4 mm ve 6 mm çaplı hazne örnekleri.

75°C'de 2 saat süreyle ısıl bağlanma gerçekleştirilen numunelerde istenilen yüzey esnekliği sağlanamadığı için süreden bağımsız sıcaklık azaltılarak deneme sıcaklığı

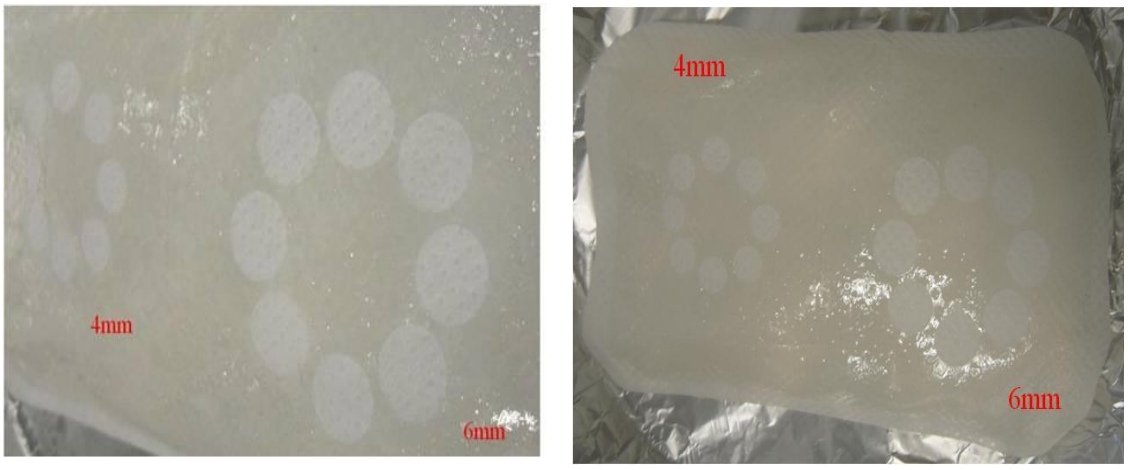
tek kat SU-8 kaplama için 55°C olarak belirlenmiştir. 55°C'de elde edilen numunelerin yüzey esneliğinde göre gözle görülür ilerleme olmasına rağmen yeterli bulunmamıştır.

Çalışma sıcaklığının belirlenmesinde bu denemeler referans oluşturmuştur ve numuneye uygulanan son ısıl işlem çalışma sıcaklığı 45ºC ve süresi 2 saat olarak belirlenmiş, ara ısıl işlemler 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiş, ıslak aşındırma 5 dakika süreyle uygulanmıştır. Bu parametreler ile spunbond kumaş yüzeyinde elde edilen hazneleri belirli bir derinlikte oluşturabilmek için yüzeye iki kat ve üç kat SU-8 kaplamalar her kaplamada aynı işlem adımları uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Islak aşındırma sonucunda kumaş yüzeyinde iki ve üç kat SU-8 kaplama ile elde edilen hazneli numunelerin şematik kesit görünümü Şekil 4.11(a) ve 4.11(b)'de gösterilmiştir.



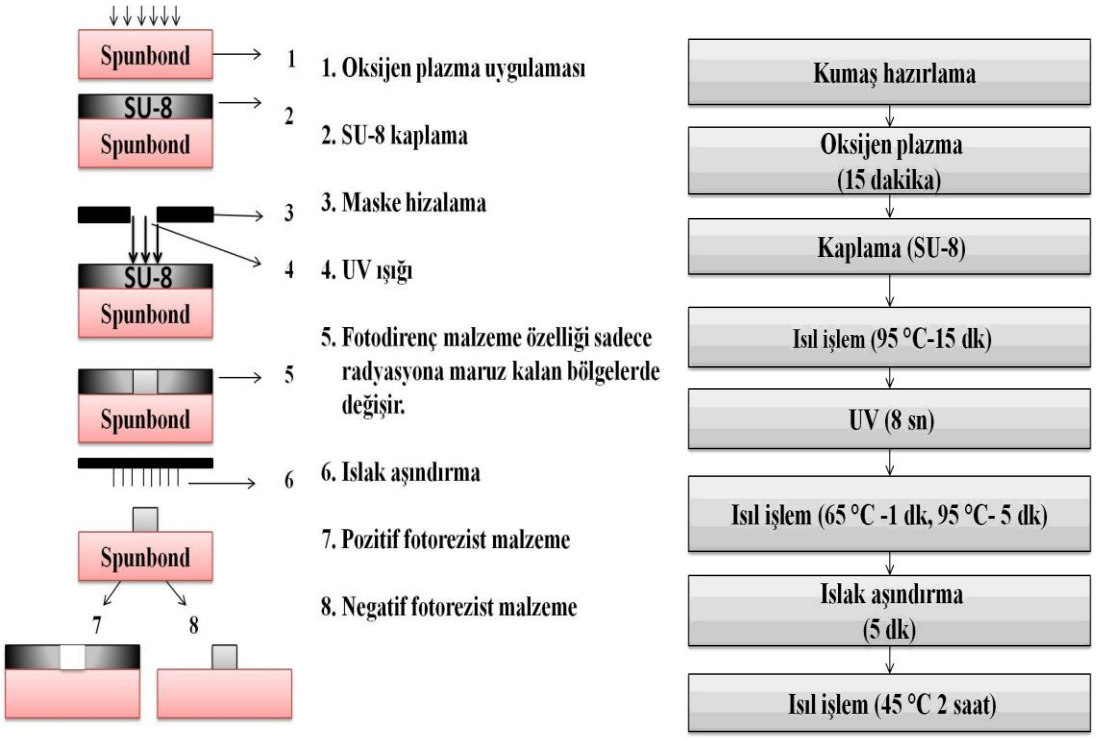
Şekil 4.11 : Spunbond nonwoven kumaşın (a) iki kat ve (b) üç kat SU-8 ile kaplanması ile elde edilen hazneli numunenin şematik kesit görünümü.

PP spunbond kumaş yüzeyinde Şekil 4.12(a)'da iki kat ve Şekil 4.12(b)'de üç kat SU-8 kaplama ile elde edilen haznelerin görüntüsü ve gösterilmiştir.



Şekil 4.12 : PP spunbond nonwoven yüzeyde (a) çift kat ve (b) üç kat SU-8 kaplama ile oluşturulan 4 ve 6 mm çaplı hazne örnekleri.

Spunbond kumaş yüzeyinde farklı yüzeylerde (film kaplı ve film kaplanmamış) yapılan üretimler sonucunda üretim parametreleri optimize edilmiştir. Buna göre spunbond yüzeylerde uygulanan fotolitografi proses adımları ve üretim parametreleri Şekil 4.13(a) ve Şekil 4.13(b)'de gösterilmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.13 : Spunbond kumaş yüzeylerinde (a) fotolitografi prosesi ve (b) üretim parametreleri.

Üretim öncesinde spunbond nonwoven kumaş yüzeyini hidrofil hale getirmek için oksijen plazma işlemi uygulanmıştı. Aynı şekilde enzim immobilizasyonu (enzim sabitlemesi) öncesinde yüzeye hidrofil özellik kazandırmak için 15 dakika süreyle oksijen plazma işlemi uygulanmıştır. Plazma uygulanan hazne desenlerine hazırlanan enzim solüsyonları emdirilmeye çalışılmıştır. Fakat plazma işlemi yüzeydeki her bir haznede homojen olarak etkisini göstermemiştir ve bazı haznelerde enzim solüsyonlarının emilimi gerçekleştirilememiş ve analit ilavesi ile beklenen reaksiyon gerçekleşmemiştir. Polipropilen spunbond yüzeyin enzim immobilizasyonu (simüle terden laktat tayini için) yapılabilmesi için yeterli hidrofil özelliğe sahip olmaması ve plazma uygulamasının zamanla etkisini kaybetmesi sebebiyle ileriye dönük çalışmalarda, spunbond kumaşa mikro fabrikasyon uygulamasından vazgeçilmiştir.

Devam eden çalışmalarda mikroakışkan sistemin oluşturulacağı taban olarak emicilik özelliği ve sıvı iletimi yüksek olan Evolon® nonwoven kumaşın kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.3 Evolon® nonwoven kumaş yüzeyinde fotolitografi prosesi

Kendinden emici yapısıyla sıvı toplanmasını ve emilimini sağlayan Evolon® kumaş mikroakışkan platformların üretilmesi için taşıyıcı yüzey olarak seçilmiştir. Öncelikli çalışmalar hazne desenlerinin yer aldığı asetat maskeler ile gerçekleştirilmiş ve bu kumaş yüzeyi için uygun üretim parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Mikroakışkan cihazda sızma olmadan sıvı emiliminin sağlanması, işlevsellik ve tekrarlanabilirlik açısından çok kritik bir özelliktir; çünkü sıvının sızması çapraz reaktiviteye neden olarak teşhis haznelerindeki reaksiyonu etkilemektedir. Bu yüzden hidrofil alanlar hidrofob bariyerler ile düzgünce çevrilmiş olmalıdır. Bir başka deyişle desende iyi bir hidrofilik/hidrofobik kontrast gereklidir. Çünkü desendeki hidrofil/hidrofob kontrastı iyi olmayan numunelerde yapılacak biyolojik analizlerde yüzeye tutunamayan enzimler, açık lifler boyunca test alanlarından uzaklaşacak ve analit (simüle ter) ile etkileşime giremeyecektir.

Evolon® kumaşta üretim parametrelerinin optimizayonuna yönelik denemeler yapılmıştır. Fakat ilk yapılan çalışmalarda elde edilen desenlerde hidrofilik/hidrofobik kontrast tam olarak sağlanamamıştır. Bu problemin desen oluşumu için litografi esnasında kullanılan asetat maskenin çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. Devam eden çalışmalarda asetat

maskeye göre yüksek çözünürlüğe sahip krom maskeler ile denemeler yapılmış ve yüzeyde oluşturulan desenlerde hidrofilik/hidrofobik kontrast iyi bir şekilde sağlanmıştır. Evolon® kumaş yüzeyinde mikroakışkan platform oluşturmaya yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları ve elde edilen sonuçlar aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

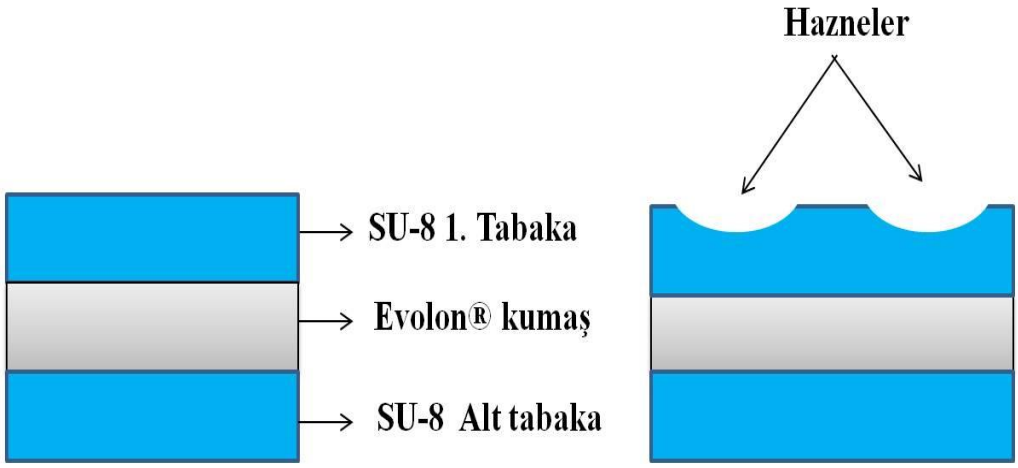
İlk denemelerde Evolon® kumaşın ön ve arka yüzeyi tek kat SU-8 ile kaplanarak spunbond kumaş yüzeyleri için optimize edilen parametreler ile üretimlere başlanmıştır. İlk aşamada, silikon tabana sabitlenmiş 130 g/m² Evolon® kumaşın ön yüzü spincoater'da 3000 rpm'de SU-8 ile tek kat olarak kaplanmıştır. Hidrofob özellikteki polimer (SU-8) emici Evolon® kumaş tarafından kumaşın kalınlığı boyunca emildiği için kumaş yüzeyinde istenen seviyede kaplama sağlanamamıştır ve kalınlığı boyunca hidrofob bir kumaş elde edilmiştir. SU-8 ile kaplanmış kumaş kimyasal bağlanma gerçekleşmesi için 95ºC sıcak yüzeyde 20 dakika ısıl işleme maruz bırakılmıştır. Daha sonra yüzey 1-2 dakika soğuk zeminde, sonrasında tekrar 95°C sıcak yüzeyde 1-2 dakika tutulmuştur. İkinci aşamada ise kumaşın arka yüzeyi spincoater'da tek kat SU-8 ile kaplanmıştır. Kaplamadan sonra kumaş tekrar sıcak yüzeyde 95ºC'de 20 dakika ısıl işleme maruz bırakılmıştır.

Ardından 1-2 dakika soğuk zeminde, sonrasında tekrar 95°C sıcak yüzey üzerinde 1-2 dakika bekletilmiştir. Bu kaplamanın ardından tekstil yüzeyi litografi cihazına yerleştirilmiş, 4 mm haznelerden oluşan asetat maske (Şekil 4.15(b)) kaplanmış kumaş yüzeyine yerleştirildikten sonra numune 8 sn süreyle UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sonrasında kumaşın ters yüzeyine kaplanmış polimer UV ışık ile katılaştırılarak hidrofobik bir yüzey elde edilerek numunenin alt yüzeyinden sızdırma olması engellenmeye çalışılmıştır.

Litografinin ardından silikon tabana sabitlenmiş numune 65ºC'de 1-2 dakika ve 95ºC sıcak yüzeyde 5 dakika bekletildikten sonra ıslak aşındırma adımı uygulanmıştır. Islak aşındırma yönteminde 5 dakika boyunca developer (1-metoksi-2-propanol asetat çözeltisi) içerisinde bekletilen numunenin asetat maskeye göre UV ışığına maruz kalmayan (katılaşmayan) hazne kısımlarındaki SU-8 uzaklaştırılmıştır.

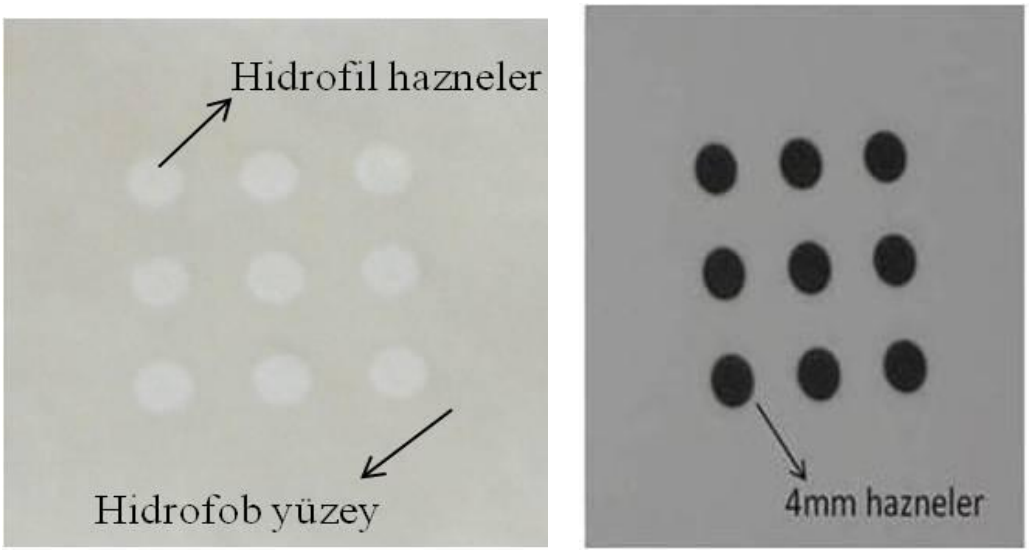
Böylelikle yüzeydeki hidrofil hazne açıklıkları UV ışığı ile katılaştırılan hidrofobik yüzeyle (maskeye göre haznelerin dışında kalan alanlar) çevrelenmiştir. Developer ile kalan SU-8 atıkları uzaklaştırıldıktan sonra, isopropil alkol ile yüzeydeki

developer temizlenmiştir. Yüzeyde kalan alkolün temizliğinde ise deiyonize su kullanılmıştır. Bu işlemden sonra yüzey 45ºC sıcaklıktaki etüvde 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Şekil 4.15'de Evolon® kumaş üzerinde SU-8'in aşındırılması ile elde edilen haznelerin şematik kesit görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.14 : Evolon® nonwoven kumaşın her iki yüzeyinin SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü.

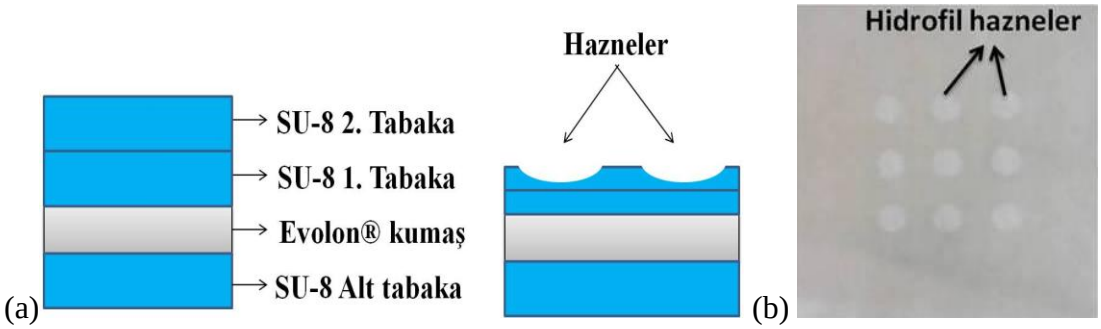
Üretimden sonra kumaş yüzeyinde elde edilen hazneler Şekil 4.15(a)'da gösterilmiştir.



(a) (b)

Şekil 4.15 : (a) Evolon® kumaşta üretilen 4 mm çaplı hazneler ve (b) üretimde kullanılan asetat maske.

SU-8 kaplama ve ardından yapılan litografi prosesinden sonra kumaş yüzeyinde (Şekil 4.15(a)) elde edilen desende hidrofilik/hidrofobik alanlar tam olarak tanımlanamamış ve yüzeyde ıslak aşındırma sonrasında açıkta kalan lif yüzeylerine rastlanmıştır. Bu denemenin sonucunda kumaş yüzeyine kaplanan SU-8'in miktarının yetersiz olduğu düşünülerek yeni bir deneme yapılarak ara işlemler aynı olmakla beraber kumaşın üst yüzeyine ikinci kat bir SU-8 kaplaması yapılmıştır. Şekil 4.16(a)'da Evolon® kumaşın üst yüzeyinde çift kat SU-8'in aşındırılması ile elde edilen haznelerin şematik kesit görüntüsü Şekil 4.16(b)'de üretimden sonra kumaş yüzeyinde elde edilen hazneler gösterilmiştir.

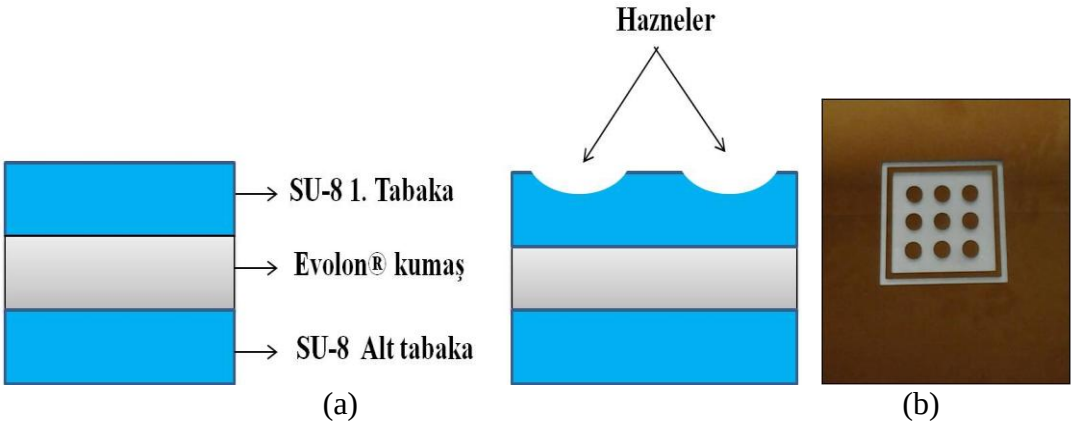


Şekil 4.16 : (a) Evolon® nonwoven kumaşda hazneli numunenin şematik kesit görünümü ve (b) yüzeyde elde edilen desen.

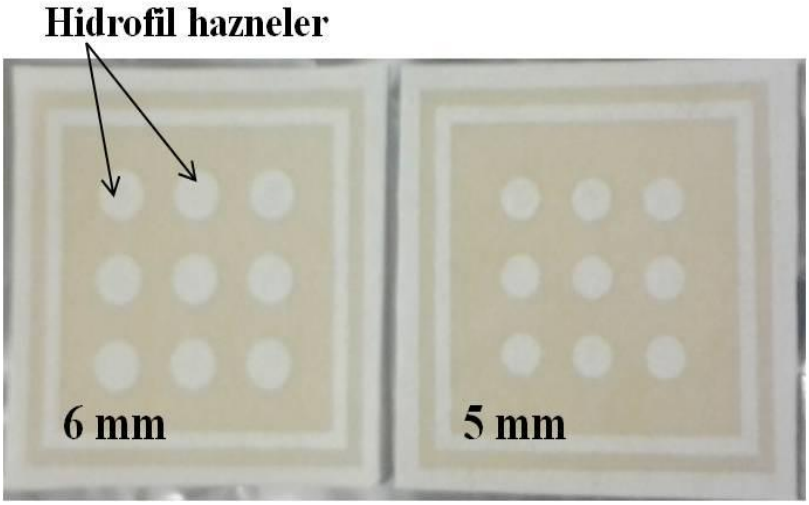
Bu denemede de ıslak aşındırmada developer içerisinde bekletme süresi yetersiz olduğu için yüzeyde kalan SU-8 kalıntıları nedeniyle hazneler yeterince hidrofil elde edilememiş, sızdırmazlık çalışmalarında sıvı emilimi geç sağlanmış ve SEM cihazında yapılan yüzey hidrofilliğinin karakterizasyon çalışmalarında haznelerde SU-8 kalıntıları gözlemlenmiştir. Bu denemelerden sonra üretim parametrelerinin uygun olmamasına ilaveten kullanılan asetat maskenin çözünürlüğünün düşük olmasının yüzeyde elde edilen desenin hidrofilik/hidrofobik kontrastını direkt olarak etkileyebileceği düşünülmüştür.

Devam eden çalışmada asetat maske yerine çözünürlüğü daha yüksek olan krom maske kullanılarak üretimler yapılmıştır. Proses akışında kumaşın ön ve arka yüzeyi aynı şekilde tek kat SU-8 kaplama yapılarak, ara ısıl işlem adımlarında polimerin kumaşa ısıl bağlanmasını artırmak için sıcak yüzeyde bekletme süresi 20 dakikadan 25 dakikaya çıkarılmış, developer (1-metoksi-2-propanol asetat çözeltisi) ile yapılan ıslak aşındırma süresinin uzatılması ile (5 dakikadan 20 dakikaya çıkarılmıştır) haznelerde SU-8 kalıntıları tamamen temizlenmeye çalışılmıştır. Son ısıl işlem olan

etüvde kurutmada ise sıcaklık 45°C'den 65°C'ye ve bekleme süresi 1,5 saatten 2 saate çıkarılmıştır. Evolon® kumaş üzerinde 5 ve 6 mm haznelerden oluşan krom maske (Şekil 4.17(b)) kullanılarak tek kat SU-8'in aşındırılması ile elde edilen haznelerin şematik kesit görüntüsü verilmiştir (Şekil 4.17(a)). Kumaş yüzeyinde elde edilen hazneler Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



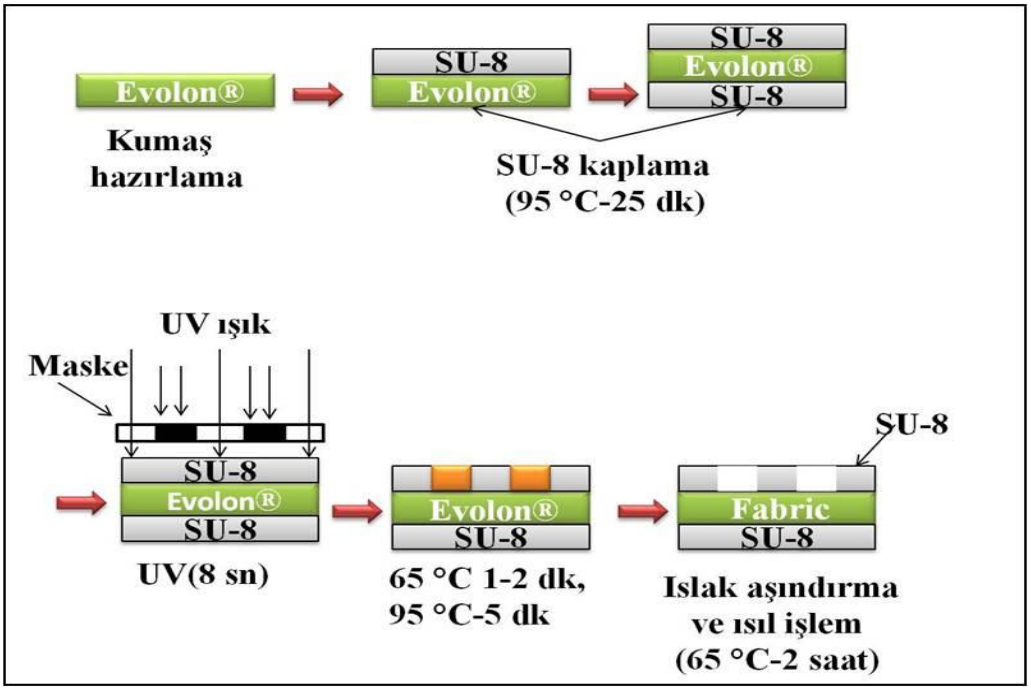
Şekil 4.17 : (a) 5 ve (b) 6 mm dairesel haznelerden oluşan krom maskeler.



Şekil 4.18: Evolon® kumaşta krom maske ile oluşturulan 5 ve 6 mm çaplı hazneler.

Sonuç olarak optimize edilen üretim pamatereleri kullanılarak yüksek çözünürlüğe sahip krom maskeler ile üretimler yapıldığında yüzeyde oluşturulan desendeki hidrofilik/hidrofobik kontrastın asetat maskeler ile oluşturulan desenlere göre daha iyi oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

Şekil 4.19'da Evolon® kumaş yüzeyinde fotolitografi prosesi ve optimize edilen üretim parametreleri verilmiştir.

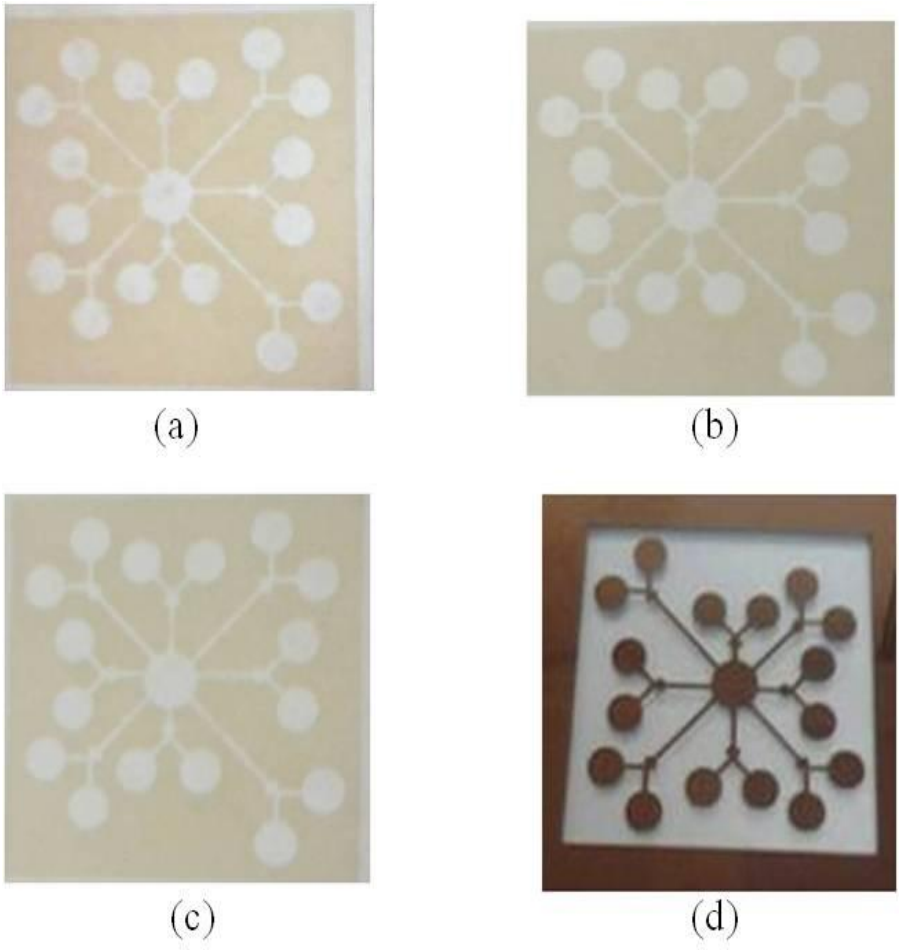


Şekil 4.19 : Evolon® kumaşta fotolitografi prosesi ve üretim parametreleri.

Evolon® kumaş yüzeyinde farklı boyutta hazneler (4, 5 ve 6 mm) ile üretimler yapıldıktan sonra biyolojik analizlerde hem enzim immobilizasyonunun sağlanması hem de enzim aktivitesine bağlı renk değişiminin etkin bir biçimde gözlemlenmesi için hazne boyutu 6 mm olarak belirlenmiştir. Hazne boyutunun belirlenmesinin ardından, mikro kanallar ve bu kanallarla bağlantılı haznelerden (ölçüm ve kontrol haznesi) oluşan, daha önce yapılmış mikro akışkan sistem tasarımlarından olan Şekil 3.16(a)'daki tasarım, krom maske (Şekil 4.21(d)) olarak tedarik edilip, belirlenen üretim parametreleri kullanılarak Evolon® kumaş yüzeyinde üretilmiştir. İlk tasarım ile Şekil 3.16'da görüldüğü üzere, terin merkez bölgeden toplanmasıyla farklı kanal uzunlukları ile ölçüm ve kontrol haznelerine iletilmesi amaçlanmıştır. Kanal uzunluklarının farklı yapılmasının nedeni ise değişen zaman aralıklarında laktat konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimlerinin gözlenmesini sağlamaktır.

Ayrıca SU-8 fotorezist kullanımını minimize etmek amacıyla bu tasarım modeli kullanılarak 130 g/m²' lik kumaş örneklerinden daha düşük gramajlara (60, 80 ve 100 g/m^2) sahip kumaş örnekleri kullanılarak üretimler yapılmıştır. Çünkü alansal yoğunluğu (gramajı) düşük olan kumaşların kullanılmasıyla kumaşın birim alanındaki lif miktarının azalmasına paralel olarak kumaşta hidrofob yüzey oluşturmak amacıyla daha az SU-8 kullanımı hedeflenmiştir.

Böylece sarf malzeme kullanımı azaltılarak az miktarda polimer ile homojen olarak kaplanmış bir yüzey oluşturulduktan sonra krom maske kullanılarak litografi yöntemiyle istenen desenin yüzeye aktarılması hedeflenmiştir. 80 g/m²'den daha düşük gramajlı olan 60 g/m^2'lik kumaş ile yapılan denemelerde kumaşın lif yoğunluğunun düşük olması nedeniyle kumaş yapısında desen oluşturabilecek miktarda SU-8 polimeri emdirilememiştir ve kumaş yüzeyinde desen oluşturulamamıştır. Mikro akışkan sistem Şekil 4.20(d)'de yer alan krom maske kullanılarak 80, 100 ve 130 g/m² kumaş örnekleri üzerinde üretilmiştir (Şekil 4.20). Farklı gramajlı Evolon® kumaş örnekleri üzerinde krom maske kullanılarak üretilen numunelerde (Şekil 4.20(a), (b) ve (c)) hidrofil kanal ve hazneler (toplama, teşhis ve kontrol hazneleri) hidrofob bariyerler ile düzgün bir biçimde çevrelenmiş ve desende hidrofil/hidrofob kontrast sağlanmıştır. Bu tasarım modeli ile farklı kanal uzunlukları kullanılarak, potansiyel uygulamasında değişen zaman aralıklarında terdeki laktat konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimlerinin gözlenmesi amaçlanmıştı.

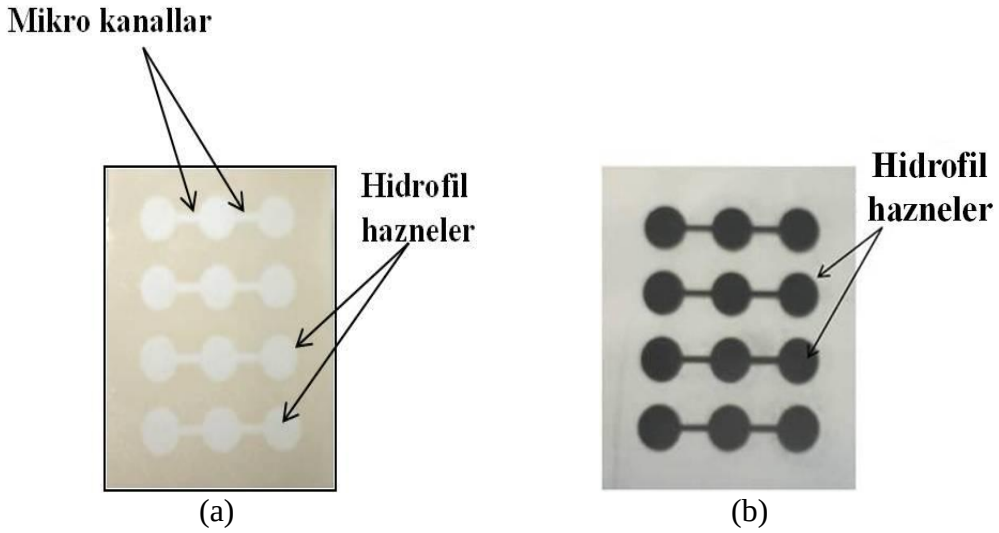


Şekil 4.20 : (a) 80, (b) 100 ve (c) 130 g/m² Evolon® kumaşta (d) krom maske ile üretilen tasarım modeli.

Fakat tasarım modelinde ter besleme haznesi olarak sadece bir tane hazne (merkez hazne) yer aldığı için farklı konsantrasyonlarda analit teşhisinin aynı numunede gerçekleştirilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Bu tasarım modeli bünyesinde yer alan birden fazla kontrol ve teşhis haznesiyle tek bir sıvı örneğinden, örneğin idrar, farklı analitlerin (glikoz, ürik asit vb.) farklı ölçüm haznelerinde eş zamanlı teşhisinin yapılabilmesini mümkün kılacak bir tasarım olarak düşünülebilir.

Ancak bu tez çalışması kapsamında geliştirilen mikroakışkan cihaz ile terdeki farklı konsantrasyonlardaki laktat seviyesinin tespitinin sağlanması hedeflenmiştir. Böylece potansiyel uygulamasında farklı toplama hazneleriyle fiziksel aktiviteye bağlı olarak farklı zamanlarda terdeki laktat konsantrasyonu takip edilerek bireyin form durumu hakkında bilgi sahibi olunabilecektir. Bu sebeple Şekil 3.18'de yer alan mikroakışkan sistem final tasarımı olarak belirlenmiştir.

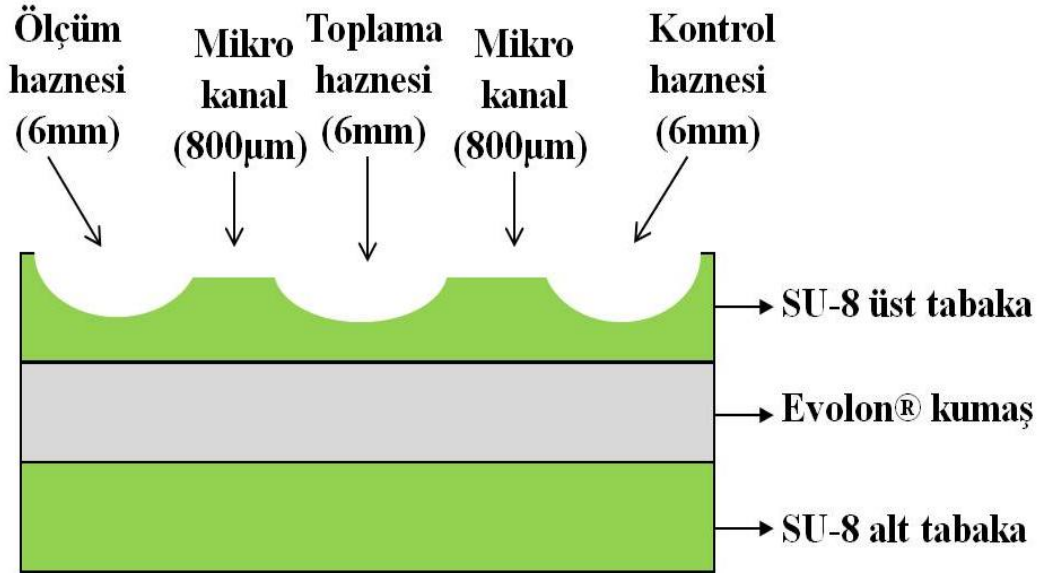
Bu tasarım biri teşhis, diğeri kontrol ve sonuncusu örnek solüsyonun toplanması için kullanılan, mikro kanallarla birbirine bağlantılı üç hazne içeren bir mikroakışkan sistemdir. Bu şekilde farklı konsantrasyonlardaki simüle ter çözeltilerinin merkez haznelerinden beslenmesiyle ölçüm ve kontrol haznelerine iletilmesi ve analit konsantrasyonuna bağlı olarak bir renk skalası oluşturulması ile laktatın yarı kantitatif teşhisi sağlanmıştır. Bu amaçla Şekil 4.21 (b)'de yer alan mikroakışkan sistemin üretimi, 100 g/m² gramajlı Evolon® kumaş üzerinde yapılmıştır (Şekil 4.21(a)).



Şekil 4.21: (a) 100 g/m² Evolon® kumaşta (b) çift kat asetat maske ile edilen mikro kanal sistemi.

Bu tasarımda numunelerdeki sızdırma problemini önlemek ve yüksek hidrofob/hidrofil kontrast elde etmek için önceki üretimlerde kullanılan krom maskelerden farklı olarak çift kat asetat maske (Şekil 4.21(b)) kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. Çift kat asetat maske üretimi kolay ve zaman kazandırma açısından avantajlı olması nedeniyle bu aşamada krom maskeye tercih edilmiştir.

Asetat maskenin iki kat olarak kullanılması ile desenin hidrofil/hidrofob kontrastı ve çözünürlüğü iyileştirilmiş, elde edilen yüzeylerde hidrofob/hidrofil sınırlar keskin bir biçimde oluşturulmuştur. Bu tasarım modeli ile kumaş yüzeyinde elde edilen desenin şematik kesit görüntüsü Şekil 4.22'de verilmiştir.



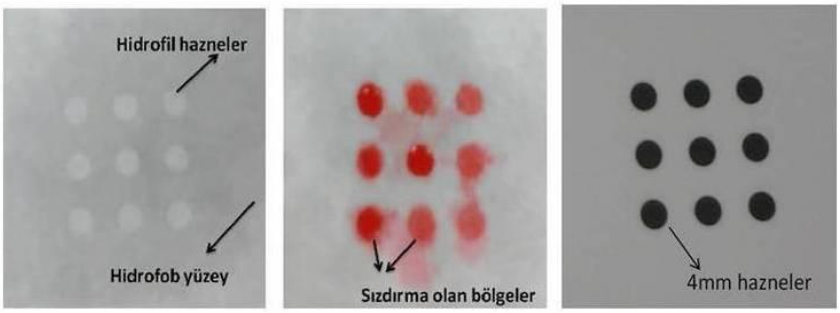
Şekil 4.22 : 100 g/m² Evolon® nonwoven kumaşın her iki yüzeyinin tek kat SU-8 ile kaplanması ve hazneli numunenin şematik kesit görünümü.

4.3 Nonwoven Yüzey Üzerinde Üretilen Mikroakışkan Sistemin Test ve Karakterizasyonu

Evolon® kumaş yüzeyinde farklı maskeler (asetat ve krom) kullanılarak fotolitografi ile kumaş yüzeyinde elde edilen desenlerin karakterizasyonu sızdırmazlık testleri ve SEM analizleri olmak üzere iki şekilde yürütülmüştür. Krom maskeler kullanılarak kumaş yüzeyinde üretilen desenlerdeki hidrofilik/hidrofobik kontrast asetat maske ile

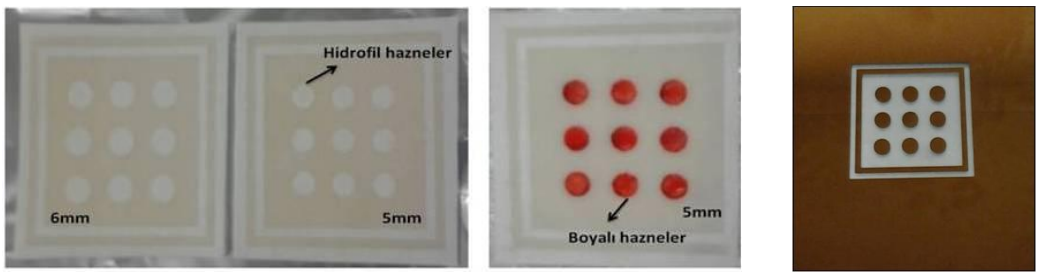
üretilen yüzeylere göre daha iyi oluşmuştur. Asetat maskeler ile üretilen haznelerde sıvı emilimi deiyonize suda kırmızı mürekkep çözülerek elde edilen kırmızı boya çözeltisi kullanılarak gözlemlenmiştir.

Boya çözeltisi kullanılarak kumaş yüzeyindeki her bir hazneye mikro pipet yardımıyla 2µl çözelti damlatılmıştır. Böylece hem haznelerin hidrofilliği kontrol edilmiş hem de haznelerde sızdırmazlık testi yapılmıştır. Damlatılan boya çözeltisi hidrofil hazneler tarafından emilmiş, ancak kumaş yüzeyinde üretilen desende hidrofil/hidrofob kontrastın yetersiz olması sebebiyle hazne sınırlarından bir miktar sıvı sızması gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 : Evolon® kumaşta asetat maske ile üretilen 4mm çaplı hazneler ve sızdırmazlık kontrolü.

Yüksek çözünürlüğe sahip olan krom maskeler (Şekil 4.24(b)) ile nonwoven yüzeylerde üretilen desenlerde (Şekil 4.24(a)) sızdırmazlık kontrolleri yapılarak, krom maskenin numunenin çözünürlüğünü direkt olarak etkilediği test edilmiştir. Deiyonize suda kırmızı mürekkep çözülerek elde edilen kırmızı boya çözeltisi kullanılarak her bir hazneye 2µl çözelti damlatılarak haznelerde sıvı emilimi izlenmiştir. Hidrofil hazneler hidrofob bariyerlerle keskin bir biçimde çevrildiği için hazne sınırlarından sıvı sızması gözlemlenmemiştir (Şekil 4.24(a)).



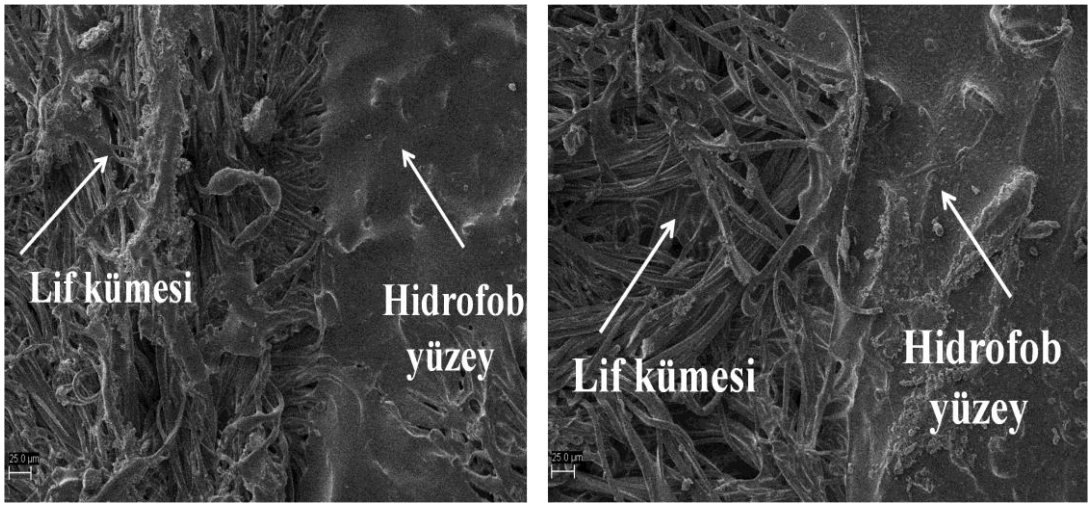
(a) (b)

Şekil 4.24: (a) Evolon® kumaşta **(b)** krom maske ile oluşturulan 5 ve 6 mm çaplı hazneler ve sızdırmazlık kontrolü.

Yapılan sızdırmazlık çalışmaları sonucunda krom maske ile nonwoven yüzeyde elde edilen desenlerde hidrofob/hidrofob kontrastın etkin bir biçimde sağlandığı gözlemlenmiştir. SU-8 ile kumaş yüzeyinde olması istenen homojen kaplama gerçekleştirildikten sonra krom maske kullanılarak fotolitografi yöntemiyle maskedeki desen kumaş yüzeyinde üretilmiş ve hidrofil alanlar hidrofobik bariyerler ile (SU-8 kaplama) tamamen izole edilmiştir.

Asetat ve krom maske ile üretilen numunelerin yüzey ve kesit görüntülerinin karakterizasyonu SEM cihazında yapılmıştır. Asetat ve krom maske kullanılarak üretilmiş örneklerin SEM cihazında alınan yüzey görüntüleri Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

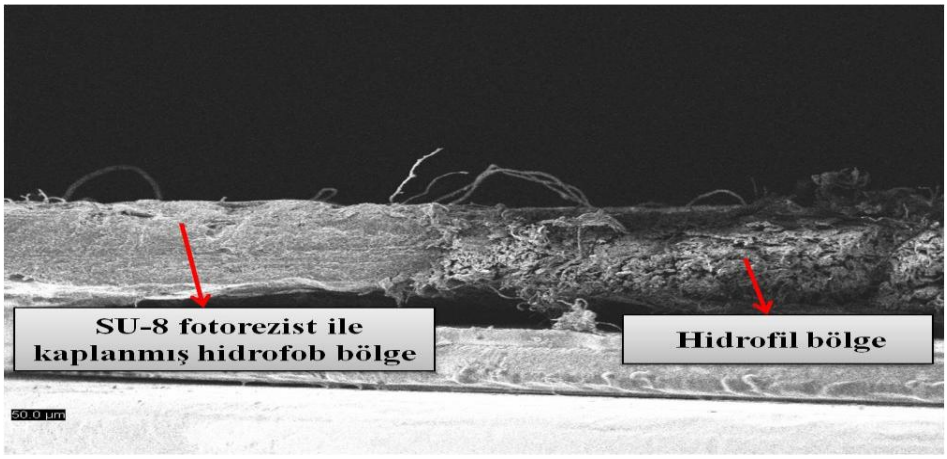
Şekil 4.25'de "lif kümeleri" hidrofil alanları, "hidrofob yüzey" ise SU-8 ile kaplanmış bölgeleri temsil etmektedir. Çözünürlüğü düşük olan asetat maske ile kumaş yüzeyinde üretilen desende hidrofob/hidrofil kontrast yeterince sağlanamadığı için (Şekil 4.25(b)) yüzeyde boya çözeltisi ile yapılan sızdırmazlık testinde açık kalan lif yüzeylerinden dolayı sızdırma problemi oluşmuştur. Kumaş yüzeyinde en iyi hidrofobik/hidrofilik kontrast krom maske kullanılarak üretilen yüzeyde elde edilmiştir, yani kumaş yüzeyindeki hidrofil alanların sınırları hidrofob bariyerlerle keskin bir biçimde sınırlandırılmıştır (Şekil 4.25(a)). Sonuçlar açıkça göstermiştir ki kullanılan maskedeki desenlerin çözünürlüğü kumaş yüzeyinde elde edilen desenin hidrofobik/hidrofilik kontrastını direkt olarak etkilemektedir.



(a) (b)

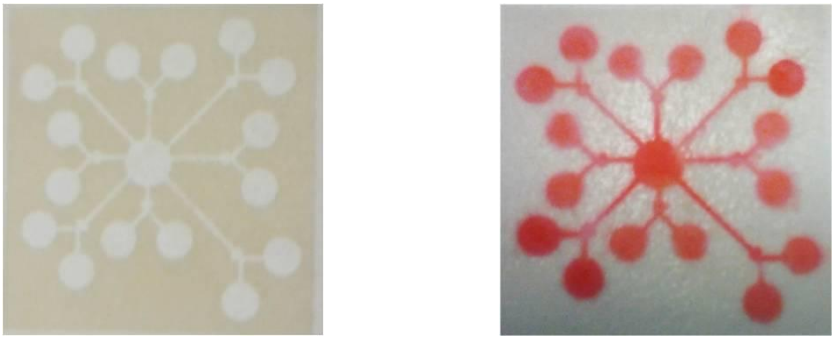
Şekil 4.25 : 130g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde (a) krom maske ve (b) asetat maske ile üretilen hazne desenlerinin sınırlarını gösteren SEM görüntüsü.

Şekil 4.26'da Evolon® kumaşta üretilmiş desenin SEM cihazından alınan kesit görüntüsünde, liflerden oluşan "hidrofil bölge" ile kumaş kalınlığı boyunca SU-8 fotorezist ile kaplanmış "hidrofob bölge" arasındaki ayrım net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.26 : 130 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde üretilen hidrofil ve hidrofob bölgelerin SEM cihazından alınmış kesit görüntüsü.

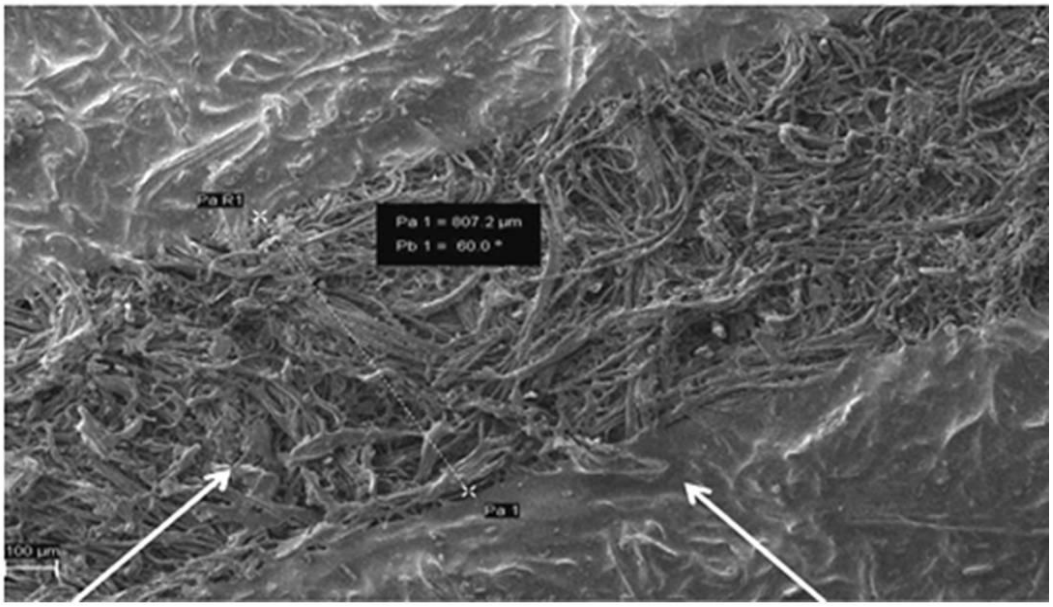
Evolon® kumaş yüzeyinde krom ve asetat maske kullanılarak oluşturulan hazne desenlerinin yer aldığı yüzeylerin sızdırmazlık testleri ve karakterizasyonları yapıldıktan sonra mikro kanal ve haznelerden oluşan mikroakışkan sistemlerin sızdırmazlık testleri yapılarak çalışabilirliği kontrol edimiştir. 130 g/m² yüzeyde üretilen mikroakışkan sistemin (Şekil 4.27(a)) çalıştığını test etmek için deiyonize suda kırmızı mürekkep çözülerek elde edilen kırmızı boya çözeltisi merkez hazneden damlatılarak mikro kanallarla hazne sistemlerine sıvı iletimi gerçekleşmiş, hazne ve kanal sınırları boyunca sıvı sızması gözlemlenmemiştir (Şekil 4.27(b)).



(a) (b)

Şekil 4.27 : (a) 130 g/m² Evolon® kumaşta krom maske ile edilen tasarım modeli ve (b) desen üzerinde sıvı iletiminin gözlemlenmesi.

130 g/m² kumaş yüzeyinde üretilmiş hidrofobik bariyerler (SU-8 fotodirenç polimeri) ile çevrilmiş hazne bağlantılı hidrofil kanalın görüntüsü Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.28 : 130 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş hidrofil kanalın 125x büyütme yapılmış SEM görüntüsü (Kanal genişliği: 807,2 µm).

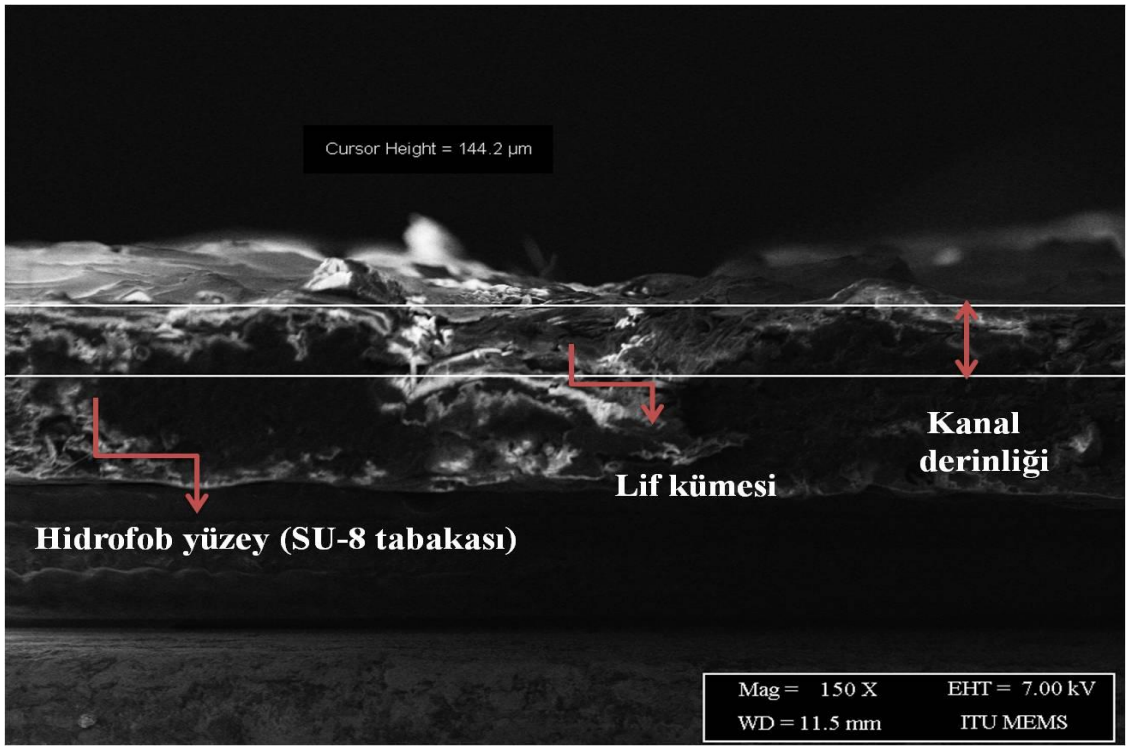
SEM görüntüsünden de anlaşıldığı üzere hidrofil kanal hidrofob bariyerlerle keskin bir biçimde sınırlandırılmıştır. Şekil 4.27'de yer alan mikroakışkan sistem tasarımı SU-8'in kullanımını minimize etmek amaçlı olarak 130 g/m² kumaş örneği dışında 80, ve 100 g/m² gramajlı kumaş örnekleri kullanılarak üretilmiştir. 80,100 ve 130 g/m² gramajlarda kumaşlar kullanılarak litografi ile oluşturulan hidrofil kanalların hangi derinlikte oluşturulduğunun tespiti SEM cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kanal ve haznelerin belirli bir derinlikte oluşturulması ve sıvının kontrollü bir şekilde iletiminin sağlanabilmesi için kumaşın yeterli lif yoğunluğuna sahip olması gerekmektedir.

80,100 ve 130 g/m² ağırlıktaki kumaşlarda oluşturulan kanal derinliği sırasıyla Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de gösterilmiştir. Şekil 4.31'degösterilen 130 g/m² ağırlıktaki kumaşta oluşturulan kanal derinliği (393,1 µm), gramajı 80 g/m² ve 100 g/m² olan kumaşlarda oluşturulan kanal derinliğine göre oldukça yüksektir. 130 g/m² gramajlı kumaşta kanal derinliği kumaş kalınlığının yaklaşık % 60'ı kadardır.

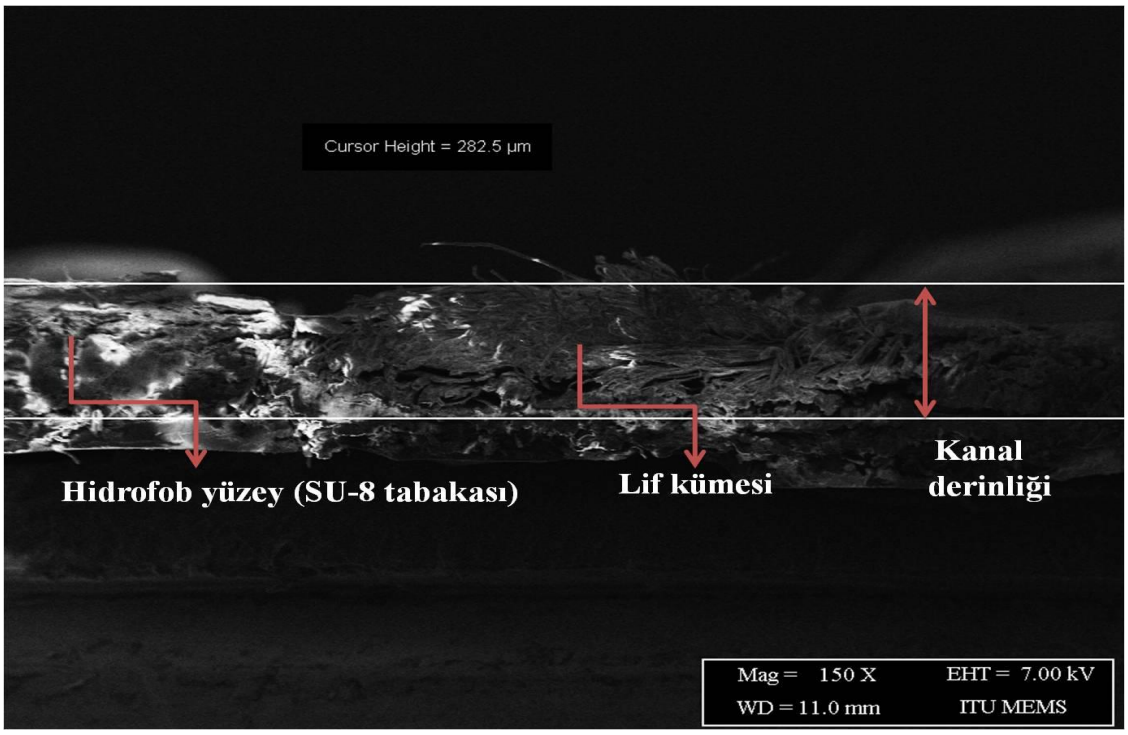
Yapılan SEM analizlerinde, gramajı 100 g/m² olan kumaşta elde edilen kanal derinliği (282,5 µm) gramajı 130 g/m² olan kumaştaki kanal derinliğine (393,1 µm) göre düşük, gramajı 80 g/m² olan kumaştaki kanal derinliğine (144,2 µm) göre yüksek çıkmıştır.

80 g/m² gramajlı kumaşta kumaş kalınlığının yaklaşık % 40'ı kadar kanal derinliği elde edilmişken bu miktar 100 g/m² olan kumaşta yaklaşık % 65-70 arasındadır.

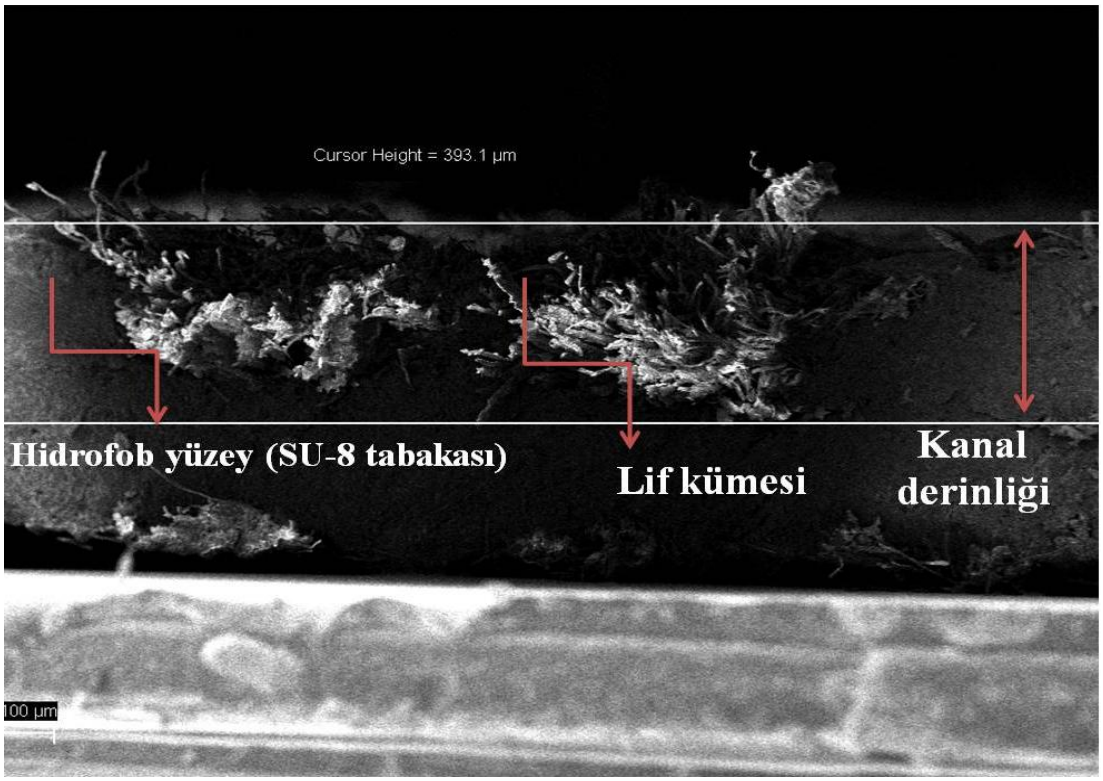
Bu da kumaşın lif yoğunluğunun yüksek olmasının kumaş kalınlığı boyunca yeterli derinlikte kanal oluşumunu sağladığını göstermiştir. Sonuç olarak; 80, 100 ve 130 g/m² gramajlı kumaş örneklerinde yapılan üretimler sonucunda, 100 g/m² gramajlı Evolon® kumaş örneği hem SU-8 kullanımını azaltması, hem de yüzeyde elde edilen kanal derinliği (282,5 µm) açısından biyolojik analizlerde sistemin düzgün çalışabilmesi için yeterli görülerek taban olarak seçilmiştir. Devam eden çalışmalarda 130 g/m² gramajlı kumaşa alternatif olarak 100 g/m² gramajlı kumaşların kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.29 : 80 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş kanalın kesit görüntüsünün 150 x büyütme ile SEM cihazında görüntüsü (Kanal derinliği: 144,2 µm).

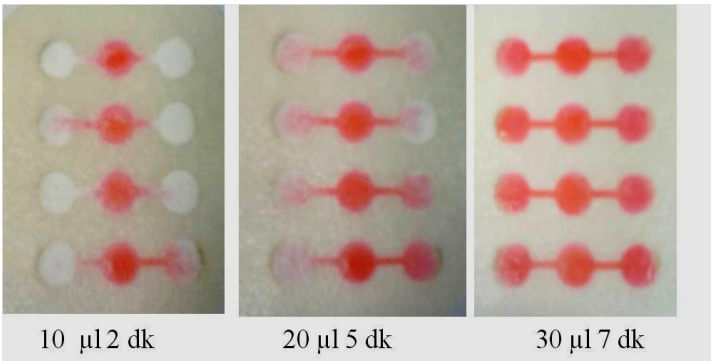


Şekil 4.30 : 100 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş kanalın kesit görüntüsünün 150 x büyütme ile SEM cihazında görüntüsü (Kanal derinliği: 282,5 µm).



Şekil 4.31 : 130 g/m² Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulmuş kanalın kesit görüntüsünün 125 x büyütme ile SEM cihazında görüntüsü (Kanal derinliği: 393,1µm).

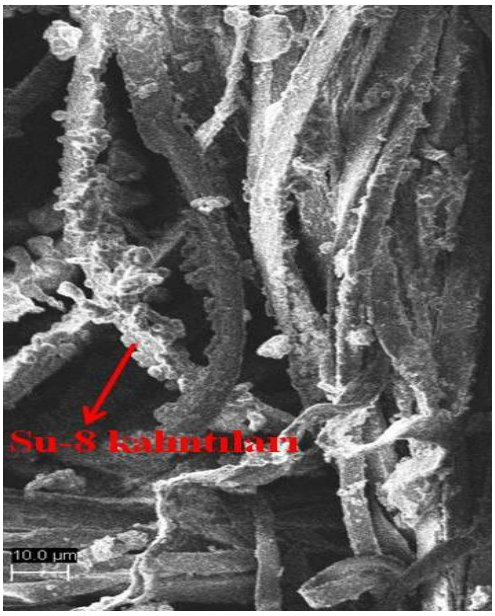
Şekil 4.27'de yer alan tasarımda bir tane analit giriş bölgesi olduğu için farklı konsantrasyonda analit teşhisi bu sistemde gerçekleştirilemeyeceği için devam eden çalışmalar Şekil 4.21'de yer alan mikroakışkan sistemde yürütülmüştür. Üretilen sistemin çalıştığını test etmeye yönelik olarak sızdırmazlık testi yapılmıştır. Buna göre deiyonize suda kırmızı mürekkep çözülerek elde edilen kırmızı boya çözeltisi kullanılarak kumaş yüzeyindeki merkez hazneye mikro pipet yardımıyla çözelti damlatılmıştır. Her bir sıradaki merkez hazneden ilave edilen boya çözeltisinin kanal boyunca sol ve sağda yer alan ölçüm ve kontrol haznelerine iletimi izlenmiştir. Her bir merkez hazneye toplamda 30 µL boya çözeltisi 10'ar µL'lik miktarlarda damlatılarak, sıvının kanal boyunca iletimi ile ölçüm ve kontrol haznelerinde toplanması izlenmiştir. Merkezden pipet yardımıyla damlatılan çözelti haznelerde toplanmış, kanal ve haznelerin hatları dışına sıvı sızması gözlemlenmemiştir (Şekil 4.32).



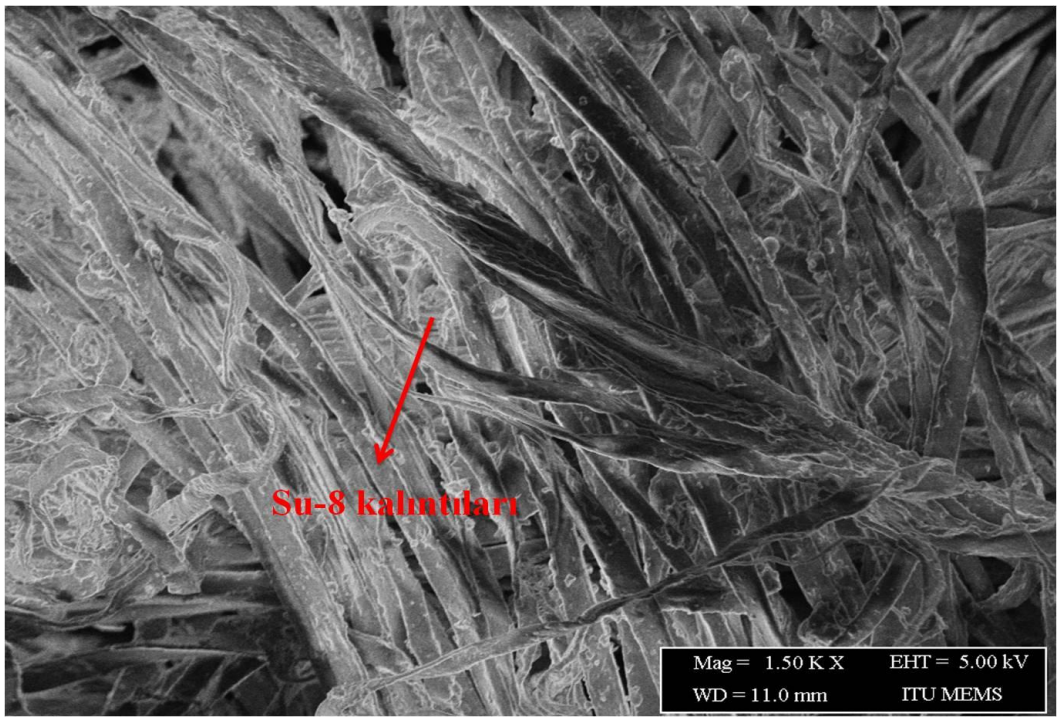
Şekil 4.32 : Boya çözeltisi damlatılmış numunede sıvı sızdırmazlık kontrolü.

Numunelerde bazı bölgelerde sıvı iletimi geç tamamlanmıştır. Bu gözlemden sonra yüzey hidrofilliğini kısıtladığı düşünülen, kumaş yüzeyinde elde edilen haznelerde ıslak aşındırma sonrasında olası SU-8 kalıntılarının varlığı, SEM cihazında incelenmiştir. Karakterizasyon sonrasında SU-8 kalıntıları tespit edildiğinden, üretim parametreleri içerisinde yer alan ıslak aşındırma süresinin uzatılmasına karar verilerek bu problem büyük oranda giderilmiştir. Evolon® kumaşta üretim parametrelerini optimize etmeye yönelik yapılan ilk çalışmalarda 5 dakika ıslak aşındırma süresi ile oluşturulan haznelerin SEM cihazından alınan yüzey görüntüsü Şekil 4.33'te, optimize edilen üretim parametreleri arasında yer alan 20 dakika ıslak aşındırma süresi ile elde edilmiş numunede yer alan hidrofil haznenin SEM cihazından alınan yüzey görüntüsü Şekil 4.34'de gösterilmiştir. Lif yüzeylerinde görülen SU-8 kalıntılarını bir miktar daha azaltmak amaçlı olarak ıslak aşındırma

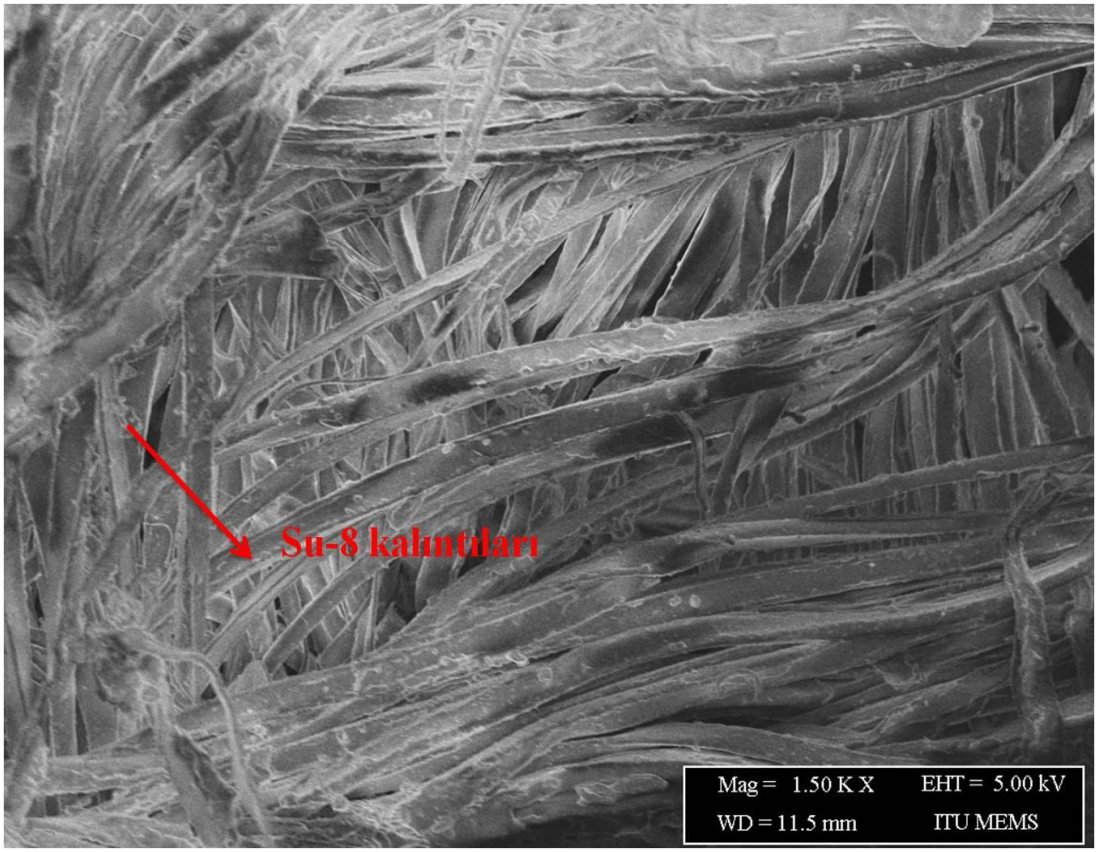
süresi 20 dakikadan 60 dakikaya çıkarılmış ve elde edilen numunede yer alan hidrofil haznenin SEM cihazından alınan yüzey görüntüsü Şekil 4.35'de gösterilmiştir. Yüzey görüntülerinden de anlaşılacağı üzere ıslak aşındırma süresinin uzatılması etkili olmuş ve SU-8 kalıntıları bir miktar azalmıştır.



Şekil 4.33 : 5 dakika ıslak aşındırma ile Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulan hidrofil hazne yüzeyinin SEM görüntüsü.



Şekil 4.34 : 20 dakika ıslak aşındırma ile Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulan hidrofil hazne yüzeyinin SEM görüntüsü.



Şekil 4.35 : 60 dakika ıslak aşındırma ile Evolon® kumaş yüzeyinde oluşturulan hidrofil hazne yüzeyinin SEM görüntüsü.

4.4 Mikroakışkan Cihaza Biyolojik İşlevsellik Kazandırılması

Enzim, boyarmadde ve analit oranlarının optimizasyon çalışmaları ependorf tüplerde ve tekstil yüzeyinde olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüplerdeki optimizasyon çalışmalarından sonra hazne desenlerinin yer aldığı prototip yüzeylerde enzim, boya ve analit oranlarının optimizasyonu tekrarlanmış ve final tasarımını işlevsel hale getirmeye yönelik olarak biyolojik çalışmalar yürütülmüştür.

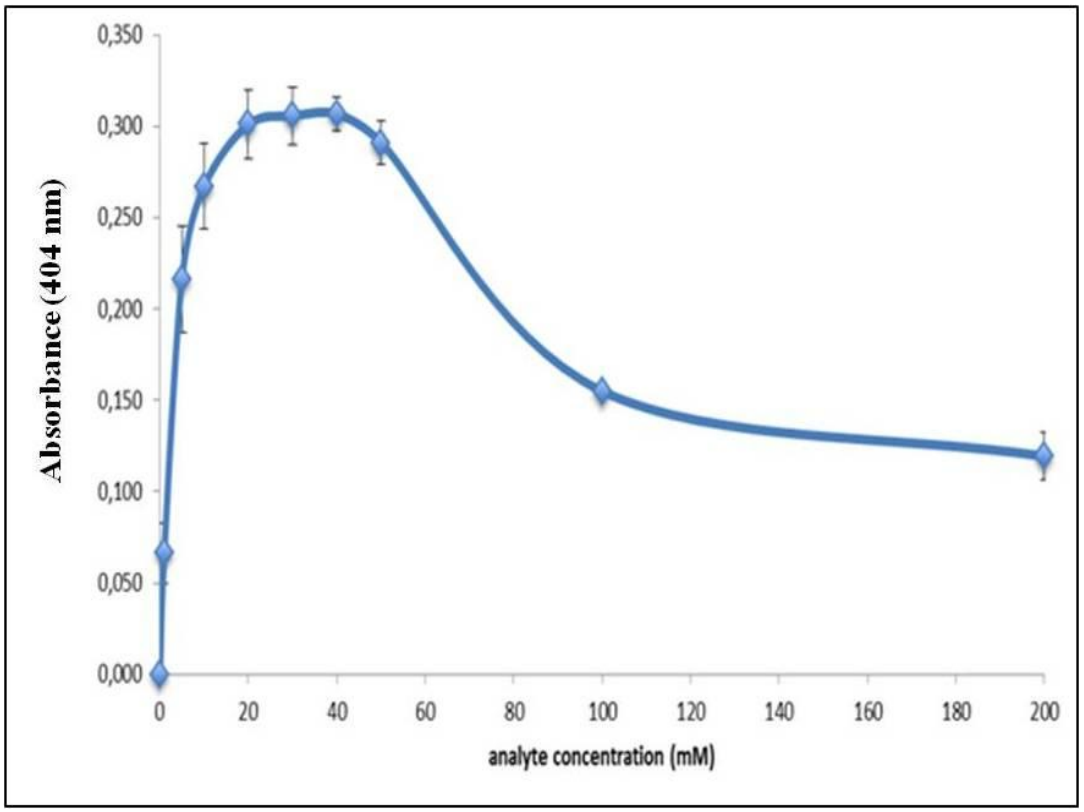
4.4.1 Enzim, boyarmadde ve analit (simüle ter) oranlarının optimizasyonu

Ependorf tüplere enzim, boya ilavesi ve ardından her bir ependorfa farklı konsantrasyonda analit eklenmesinden sonra spektrofotometrede alınan ölçümler, yüksek konsantrasyondaki analit varlığında sübtsrat inhibisyonunun (blokajının) olduğunu göstermiştir (Şekil 4.36).

Renk yoğunluğu 1-20 mM analit konsantrasyonunda lineer olarak artış gösterirken 20-40 mM analit konsantrasyonunda sabit kalmış ve 40 mM konsantrasyon

seviyesinden sonra renk yoğunluğu analit inhibisyonundan dolayı düşüş göstermiştir. Bu yüzden 1-20 mM analit konsantrasyonu aralığında çalışmaların yürütülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Terdeki maksimum laktat seviyesinin 11-13 mmol/l [64] seviyesinde olduğunu düşünülürse, bu seviyeden (>20 mM) sonraki değerlerin ölçümü fizyolojik olarak çok da anlamlı olmamaktadır. Burada amaç yüksek analit konsantrasyonunun (>20 mM) enzimler üzerinde inhibisyon etkisi yarattığını göstermektir.



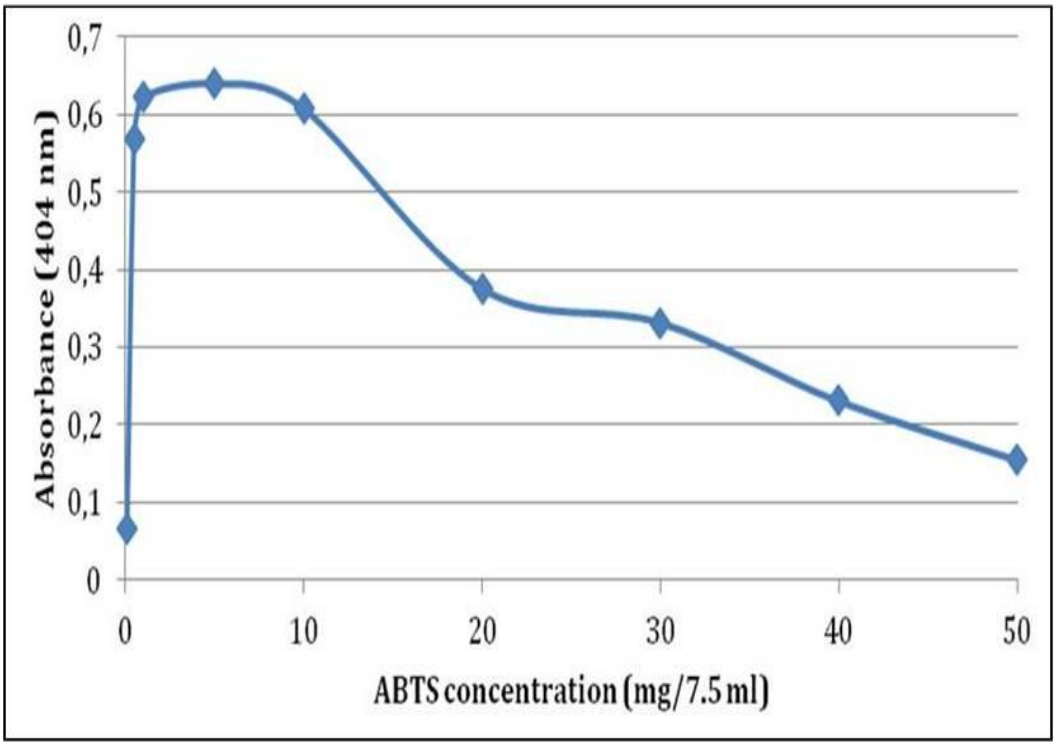
Şekil 4.36 : Analit konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

Tüplerde elde edilen renk konsantrasyonunu arttırmak için **ABTS** miktarı optimize edilmiştir. Bunun için analit konsantarasyonu 20 mM olarak sabit tutulup ABTS konsantrasyonları (0.1-50 mg/7,5 ml PBS) değiştirilmiştir. ABTS miktarları ile sübstrat üzerindeki renk değişimine göre absorbans verileri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. En iyi renk yoğunluğu 5 mg ABTS/ 7.5 ml PBS miktarı ile sağlanmış bu değerden sonra renk yoğunluğunda düşme gözlemlenmiştir (Şekil 4.37).

Bu sonuçlar ABTS miktarının da enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi oluşturduğunu göstermektedir.

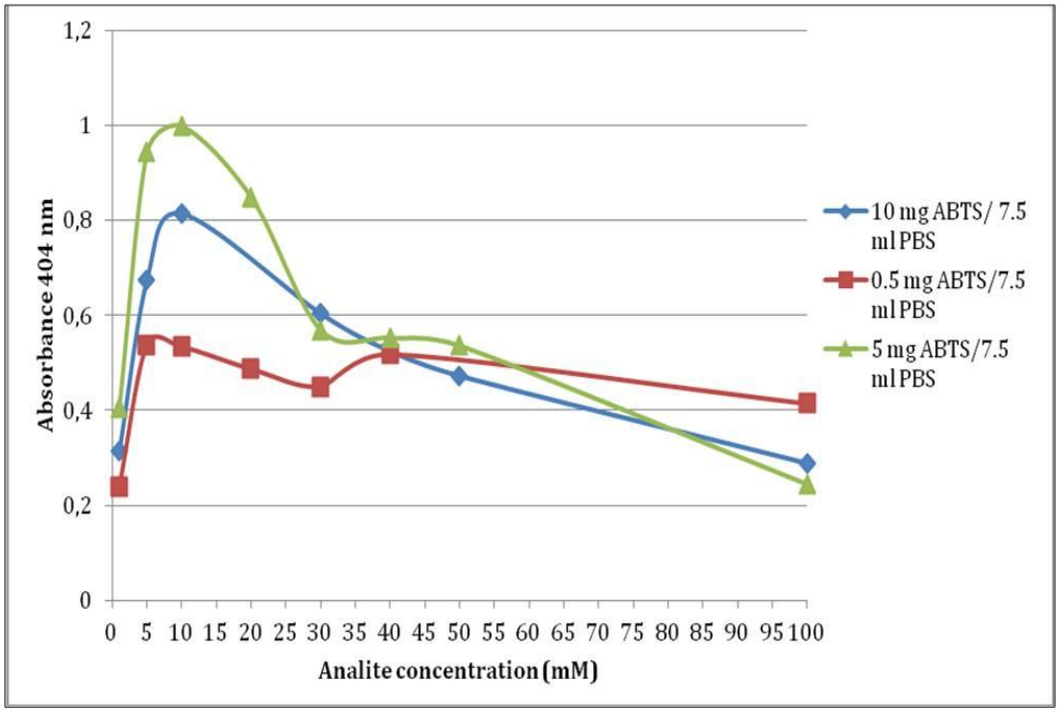
Çizelge 4.4 : Değişen ABTS miktarları ile spektrofotometrede alınan absorbans verileri.

ABTS concentration (mg/7,5 ml PBS)	Absorbance (404 nm)
0,1	0,067
0,5	0,568
1	0,622
5	0,640
10	0,608
20	0,376
30	0,332
40	0,231
50	0,231



Şekil 4.37 : ABTS miktarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.

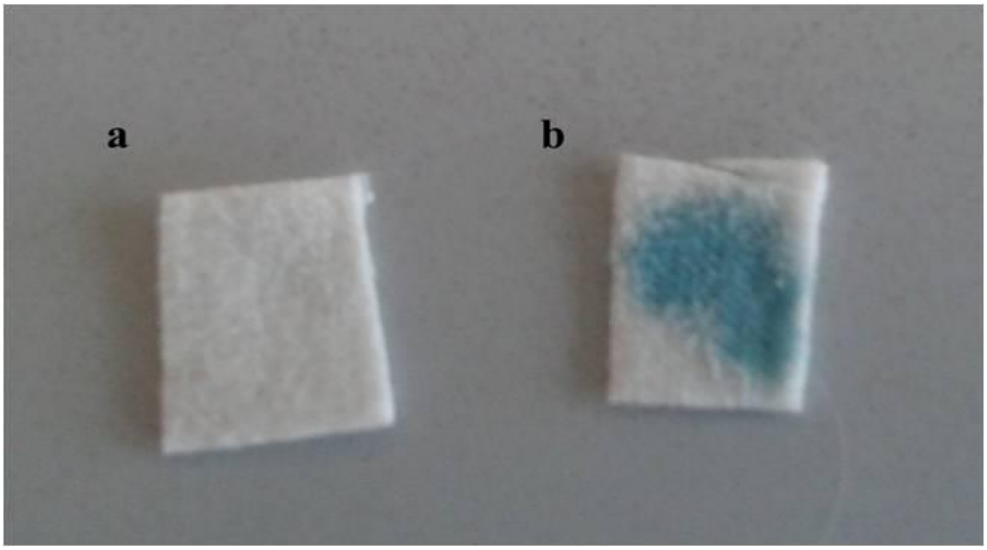
0,5, 5 ve 10 mg ABTS miktarı ile sübstrat miktarı optimize edilmiş enzim aktivite grafiği Şekil 4.38'de verilmiştir. Farklı ABTS miktarları (0,5, 5 ve 10mg/7,5 ml PBS) ile farklı analit konsatrasyonlarına bağlı olarak spektrofotometrede ölçümler alındığında ABTS optimizayonu ile ortamdaki renk konsantrasyonu yaklaşık 2 kat arttırılmıştır.



Şekil 4.38 : Sübstrat konsantrasyonunun 0,5, 5 ve 10 mg/ 7,5 ml PBS ABTS miktarlarına göre enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.

Solüsyondaki optimizasyon çalışmalarından sonra optimize edilen ABTS miktarı (5mg/7,5 ml PBS) kullanılarak Evolon® kumaşta yapılacak analizler için enzim ve ABTS çözeltileri yeniden hazırlanmıştır (450 µlt ABTS (5mg/7,5 ml PBS) içerisine 20 µlt LOX (0,04 ünite) ve 30 µlt POX (60 ünite)). Daha sonra kumaş yüzeyine bu karışımdan 50 µl eklenmiş ve yüzey 37 °C'de çözeltiyi emene kadar bekletilmiştir. Enzim eklenen yüzeye daha sonra analit (simüle ter) eklenmiştir. Fakat kumaş yüzeylerinde herhangi bir renk oluşumu gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla enzimlerin kumaş yüzeyindeki davranışı ile ependorf tüpler içerisindeki davranışlarının farklı olduğu görülmüştür. Bu denemenin devamında, kumaş yüzeylerinde görüntü elde etmek için öncelikle 450 µl ABTS içerisine eklenen enzim miktarları 1-10 µl aralığında arttırılmış fakat yine de kumaş yüzeylerinde herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir. Ayrıca bunlara ek olarak, ABTS miktarı da 10 kat arttırılmış, kumaş yüzeylerine konularak kurutulmuş ve ortama enzimler eklenmiştir. Fakat kumaş yüzeyinde bu değişikliklere rağmen renk değişimi gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlardan sonra, kumaş yüzeylerinde enzimlerin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek üzere hazır ABTS ve hidrojen peroksit (H_2O_2) karışımı kullanılmasına karar verilmiştir. Bu karışım sayesinde, sadece POX aktivitesinin olup olmadığı kontrol edilebilmiştir. Kumaş yüzeyine, hazır olarak alınan ABTS ve hidrojen peroksit

(H_2O_2) karışımı eklendikten sonra ortama sadece POX enzimi eklenmiş ve kumaş yüzeyinde renk değişiminin oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.39(b)).

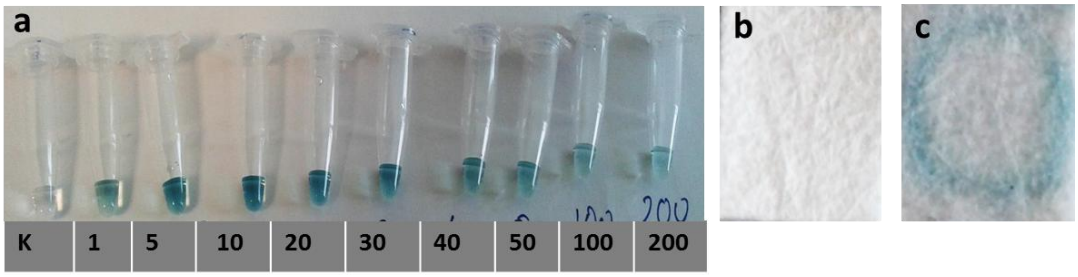


Şekil 4.39 : Hazır ABTS ve H_2O_2 kullanılarak POX aktivitesinin belirlenmesi.

Bu renk değişikliği, POX enziminin gayet iyi çalıştığını ve miktarının uygun olduğunu göstermiştir (Şekil 4.39(b)). Buradan, LOX enziminin aktivitesi sonucunda üretilen H_2O_2'in üretilemediği veya renk değişimini gerçekleştiremeyecek derecede çok az üretildiği belirlenmiştir. Devamında, LOX enzim miktarını ve laktik asit miktarını arttırarak üretilecek olan H_2O_2 miktarının arttırılması hedeflenmiştir. Fakat kumaş yüzeyinde yine görüntü elde edilememiştir (Şekil 4.39(a)).

Ependorflarda (Şekil 4.40(a)) ve kumaş yüzeyindeki çalışmalarda, enzimler ve ABTS boyası karıştırıldıktan sonra kumaş yüzeyine eklenmiştir fakat devam eden denemelerde enzimlerin ve ABTS'in karıştırıldıktan sonra değil de direkt olarak sırayla kumaş yüzeyine eklenmesine karar verilmiştir. Çalışmanın bu kısmında, daha konsantre (yoğun 5mg/7µl PBS) ABTS çözeltisi hazırlanmıştır.

Çünkü kumaş, enzim ve ABTS miktarına doyurulurken aslında sızmalardan dolayı enzimler eklendiği ortamdan uzaklaştırılıyor olabilirdi. Dolayısıyla, enzimler ve ABTS ortama daha küçük hacimlerde fakat aynı miktarlarda eklenmiş olacaktır. Kumaşı doyurmadan ayrı ayrı enzim ve ABTS solüsyonları eklendiğinde görüntüler oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.40(c)). Yapılan çıkarsamanın doğruluğunun test edilmesi için enzim ve ABTS karışımından alınarak yüzeylere eklendiğinde ise, beklenildiği üzere analit (laktik asit) ilavesinden sonra kumaş yüzeyinde herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.40(b)).



Şekil 4.40 : a) Enzim-ABTS çözeltilerinin karıştırılması ile a) ependorflara, b) kumaş yüzeyine ilavesi, c) enzim- ABTS çözeltilerinin ayrı ayrı direkt kumaş yüzeyine konulması sonucu yüzeyde oluşan renk yoğunlukları.

Sonuç olarak kumaşa sırayla farklı oranlarda LOX: POX, ABTS (1,65 mg) ve analit (laktik asit) eklenmiştir (LOX: POX, 0,001-0,10 (ünite/hazne): 1-10 (ünite/hazne)). Kumaşa çözelti (laktik asit) eklendikçe yeni eklenen çözelti (laktik asit) merkezde, daha öncekiler (enzimler (LOX, POX) ve ABTS) ise en dışta yer almaktadır.

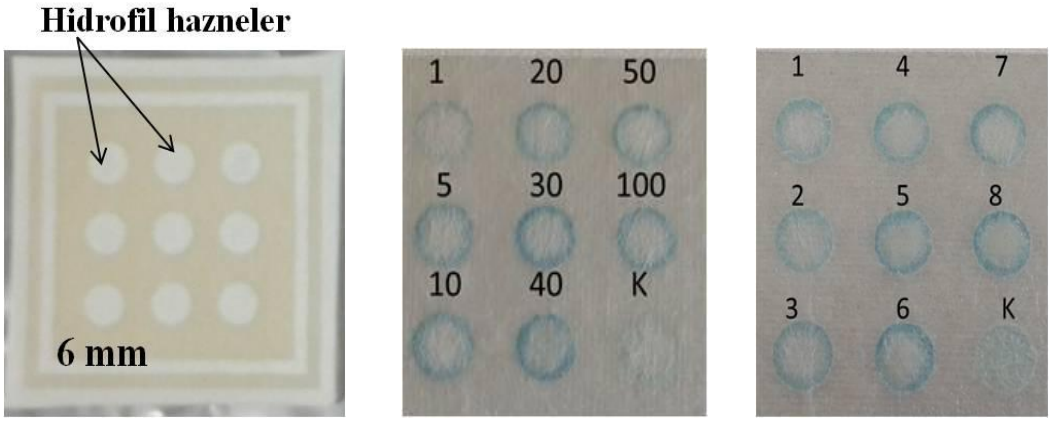
Fakat oluşan görüntünün şekli (Şekil 4. 40(c)) içi boş çember şeklinde oluşmuştur. Oluşan çemberin ortasındaki boşluk, enzimlerin ve boyanın kumaşa eklendiği noktadır. Oluşan görüntü, enzimlerin yüzeyi neredeyse terk etmek üzere olduklarını göstermektedir (Şekil 4.40 (c)). Buradan, kumaşta görüntünün daha net ve yoğun oluşmamasının sebebi kumaşın enzimleri hapsedememesi ve yayması olarak yorumlanabilir. Dolayısıyla buradan çıkarılabilecek sonuç; enzim yüklenecek kumaş alanının enzimlerin belirlenen alanın dışına çıkmayacak şekilde her yönden çevresinden izole edilmiş olması gerektiği ve enzim-ABTS çözeltilerinin küçük hacimlerde ve konsantre bir şekilde sırasıyla kumaş yüzeyine eklenmesi gerektiğidir. Haznelerde en yüksek renk yoğunluğu elde edebilmek için ideal enzim oranları LOX: POX, 0,006:6 (ünite/hazne) olarak belirlenmiştir.

4.4.2 Kumaş yüzeyinde laktat derişiminin renk yoğunluğuna bağlı yarı-kantitatif olarak izlenmesi

Solüsyonda ve kumaş yüzeyinde yapılan enzim, boya ve analit optimizasyon çalışmalarından sonra haznelerin yer aldığı prototip yüzeylerde (Şekil 4.41 (a)) haznelere 0,006 ünite LOX, 0.06 ünite POX ve ABTS (1,65 mg) eklenmiş ve haznelerin çözeltileri tamamen emmesi beklenmiştir. Daha sonra haznelere sırasıyla Şekil 4.39'de belirtildiği şekilde farklı konsantrasyonlarda (1-100 mM) analit eklenmiştir. Numune yüzeylerinde bir adet kontrol haznesi (K) yer almakta olup, bu hazneye sadece enzimler (LOX ve POX) ve analit eklenmiştir. Bu kontrol haznesine

ABTS konulmadığı için herhangi bir renk değişiminin olmaması gerekmektedir. Hidrofil haznelere 10'ar µlt şeklinde farklı konsantrasyona sahip analitler eklenmiştir. Haznelere konulan analitin bitmesinden sonra yerine yenisi eklenmiş, çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu haznelerde yeşil renk oluşumu gözlemlenmiştir ve analit konsantrasyonuna göre renk yoğunluğu artmış, belli konsantrasyon düzeyinden sonra analit inhibisyonu gerçekleşmiştir.

Yani; analit konsantrasyonunun artması, enzimlerin aktivitesini sınırlandırdığı için renk yoğunluğunun düşmesine sebep olmaktadır. Laktat konsantrasyonuna bağlı oluşan renk yoğunlukları Şekil 4.41 (b) ve 4.41 (c)'de gösterilmiştir. Geniş konsantrasyon aralığında çalışıldığında 40 mM analit konsantrasyonundan sonra analit inhibisyonu nedeniyle renk yoğunluğunda düşme gözlemlenmiştir (4.41(b)). Ancak terdeki maksimum laktat seviyesi 11-13 mM [64] düzeyinde olduğu için terdeki laktat seviyesini belirleyen bir biyosensör için 40 mM laktat düzeyinin üzerinde ölçüm almak fizyolojik olarak anlamlı değildir. Bu sebeple, aralık daraltılıp 1-8 mM laktat miktarında analiz yapıldığında Kumaş yüzeyinde oluşan görüntüler kontrol edildiğinde laktat miktarına bağlı olarak 2 farklı renk yoğunluğu oluştuğu gözlemlenmiştir. Şöyle ki;1-3 mM: Düşük ; 4-8 mM: Yüksek



(a) (b) (c)

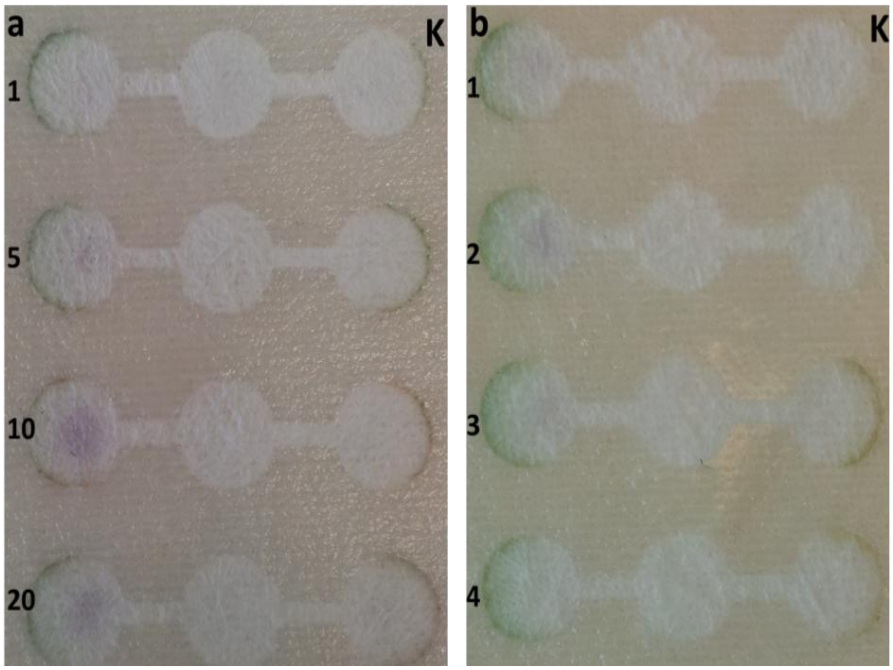
Şekil 4.41 : (a) 6 mm haznelerden oluşan prototip yüzey, (b) 1-100 mM ve (c) 1-8 mM konsantrasyon aralığında laktat analizi, K: Kontrol haznesi.

Prototip yüzeylerde yapılan analiz çalışmalarından sonra tasarımı yapılıp üretilen ve sızdırmalık kontrolünden geçirilen son tasarım olan Şekil 4.21'deki mikroakışkan sistem üzerinde çalışmalar tekrarlanmıştır. Bu geometride her bir sırada en soldaki haznenin enzimleri ve ABTS içermesi, en sağdaki haznenin kontrol amaçlı sadece enzimleri içermesi ve merkezdeki hazneden ise analit ilavesinin yapılması

düşünülmüştür. Kontrol haznesine boya koymayarak boyanın enzim ve analit (laktik asit) aktivitesi (LOX-laktik asit) sonucunda oluşan ara ürünü (hidrojen peroksit) POX enzimi ile yıktığı ve renk oluşumunu sağladığı desteklenmiştir. Şekil 4.42'deki geometriye sahip numuneler üzerindeki çalışmalarda solda yer alan ölçüm haznelerine enzimler ve ABTS konulduğu zaman, enzimlerin ve ABTS'in merkez hazneye (analit ekleme haznesi) doğru ilerlediği görülmüştür. Dolayısıyla 3 µlt (0,006 unite) LOX, 3 µlt (0,06 ünite) POX ve 3 µlt (1,65 mg) ABTS en soldaki hazneye koyulduğunda, enzimlerin sadece ilgili haznede (ölçüm haznesi) durması mümkün olmamış, yüzeyin kapiler özelliğinden dolayı enzim ve boya solüsyonları diğer haznelere doğru (analitin ilave edildiği merkez hazne ve kontrol haznesi) ilerlemiştir. Sadece hazne desenlerinin yer aldığı bir önceki çalışmada (Şekil 4.41) haznelerin etrafı kapalı olduğundan (hidrofob bariyerler ile çevrili) yani hidrofil kanallarla bağlantılı olmadıkları için enzimler ve ABTS haznelerin içerisinde yer almıştır. Dolayısıyla haznelere ilave edilen enzimlerin ve ABTS'in kanal boyunca ilerlemesini engellemek için daha küçük hacimlerde ve daha yoğun bir şekilde haznelere eklenmesine karar verilmiştir. Devam eden çalışmalarda daha yoğun enzim ve ABTS solüsyonları hazırlanmıştır. Bu kısımda LOX (0,05 ünite/hazne), POX (5 ünite/hazne) ve ABTS (1,65 mg/hazne) olacak şekilde solüsyonlar hazırlanmıştır.

Konsantre enzim ve boya çözeltileri hazırlandıktan sonra Şekil 4.42'de yer alan numunede ölçüm haznelerine sırasıyla 2 µlt LOX (0,05 ünite), 2 µlt POX (5 ünite) ve 2 µlt ABTS (1.65 mg/hazne) eklenmiştir. Enzimler ve ABTS'in her birinin 2'şer µlt çözeltiler şeklinde ölçüm haznelerine eklenmesi durumunda solüsyonların analit giriş haznesine (merkez hazne) doğru ilerlediği gözlemlenmemiştir. Hazneler içerisine toplamda 6 µlt (LOX, POX ve ABTS) eklenebilmektedir, fazlası analit haznesine doğru ilerlemeye başladığından teşhis gerçekleştirilememiştir. Şekil 4.42'de yer alan mikroakışkan sisteminde ölçüm hazneleri aktifleştirildikten sonra analit ekleme haznelerine (merkez hazne) konsantrasyonları 1-20 mM arasında değişen analitler eklenerek doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir. Analitin giriş haznelerine ilave edilmesinden sonra farklı zaman aralıklarında farklı analit konsantrasyonuna sahip haznelerdeki renk değişimi Şekil 4.42'de gösterilmiştir. 1-20 mM analit miktarının tayinine yönelik yapılan çalışmalarda enzim miktarının arttırılması (LOX:POX oranı 10 kat arttırılmıştır) sonucunda 5mM analit konsantrasyonundan sonra haznelerde mor renk oluşumunun hız kazandığı ve 10 mM'lık haznede en yoğun mor rengin elde

edildiğini gözlemlenmiştir (Şekil 4.42(a)). 20 mM seviyelerinde analit inhibisyon etkisi tekrar gözlemlenmiştir. Analit miktarının <5 mM olduğu durumlarda ise yeşil renk oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.42(b)).



Şekil 4.42 : 1-20 mM analit konsantrasyonuna sahip haznelerdeki renk değişimi

Kumaş yüzeyinde oluşan görüntüler kontrol edildiğinde laktat miktarına bağlı olarak 2 farklı renk yoğunluğu oluştuğu gözlemlenmiştir. Şöyle ki; 1-4 mM : Yeşil 5-10 mM: Mor renk vermiştir. Mevcut sonuçlara göre, eğer kişinin terindeki laktat miktarı 1-4 mM ise sol tarafta yer alan ölçüm haznelerinde yeşil renk yoğunluğu, 5-10 mM ise mor renk yoğunluğu oluşacaktır. Sağda yer alan kontrol haznelerinde ise ABTS yer alamadığı için hiç renk oluşumu gözlemlenmemiştir.

Deneyler farklı sıcaklık ve pH değerlerinde tekrarlanmış ve 5 mM laktat konsantrasyonundan sonra mor renk yoğunluğu görülmüştür. Denemelerin sadece iki tanesinde kontrol haznesinde ve 3 mM laktat uygulanmış haznede mor renk oluşumu gözlemlenmiştir. On denemenin dokuzunda yeşilden mora doğru olan renk değişimi 5 mM laktat konsantrasyonundan sonra gerçekleşmiş ve bu yüzden terdeki normal ve yüksek laktat değerlerinin ayrımında iyi bir tekrarlabilirliğin sağlandığı söylenebilir. Mevcut sistem >10 mM analit miktarını sağlıklı bir şekilde gösterememektedir. Çünkü >10mM analit miktarı enzimlerin aktivitesini inhibe etmektedir.

4.4.3 Fizyolojik sınırlar içerisinde pH değerinin ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi

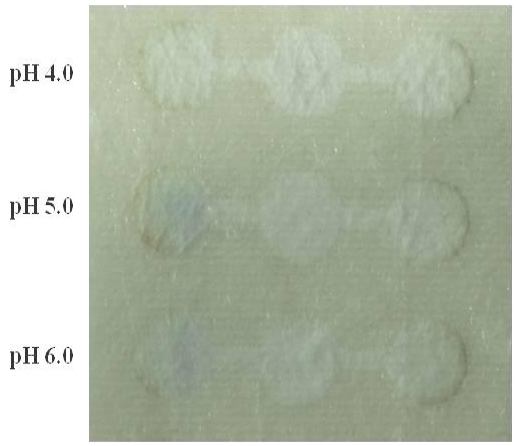
Prototip yüzeylerdeki enzim-ABTS optimizasyonundan sonra aynı yüzeyde pH değerinin etkisini gözlemlemek için çalışmalar yürütülmüştür. Egzersiz anında terin pH değeri 5-7 [39] arasında değiştiği için, ortamın pH değerinin enzim aktivitesi üzerinde etkisinin belirlenmesi için yüksek renk yoğunluğuna sahip (5 mM) analitin, farklı pH (3-7) değerlerindeki solüsyonları hazırlanmıştır ve ölçüm ve kontrol (K) haznesindeki reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4.43). Çalışmalar sonunda ortam pH'ının enzim aktivitesi üzerinde çok etkili olduğu ve ortamın pH değerinin 5'in altına düşmesi durumunda renk oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bunun enzimlerin asidik ortamda aktivite kaybına uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.43 : Analit pH değerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Daha sonra şekil 4.42'de yer alan kanal bağlantılı haznelerden oluşan mikroakışkan sistemde pH değerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla en yüksek mor renk yoğunluğunun elde edildiği 10 mM analit miktarı kullanılmıştır. Çalışmalar sonunda aynı şekilde enzim aktivitesinin azalan pH değerlerinde düşüş gösterdiği ve pH 5'in altında hiç renk oluşmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.44). Egzersiz anında ter pH degerinin 5-7 arasında olduğu bilinmektedir [39]. Dolayısıyla egzersiz anında terin pH değeri 5,0'a düşse bile terdeki laktat seviyesinin bu biyosensör sistemi ile tespit edilebileceği söylenebilir. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve renk oluşumu üzerindeki etkisini belirlemek için analizler 10 mM analit solüsyonu kullanılarak farklı sıcaklıklarda yapılmıştır. Sonuçlara göre 25-35°C sıcaklık aralığında renk oluşumu daha yoğun gözlemlenmiştir (Şekil 4.45). 30°C'nin

üzerindeki sıcaklıklarda ise renk yoğunluğunda azalma olmuştur. Bu azalmanın optimizasyon çalışmalarında kullanılan ölçüm haznelerinin açık yüzeyinden solüsyonun hızlı bir şekilde buharlaşması ile ilişkili olduğu söylenebilir. Final tasarımında cihazın yüzeyi koruyucu bir bariyer ile kapatılabilir.



Şekil 4.44 : Analit pH değerinin enzim aktivitesi üzerine 10 dakika sonra etkisi.



Şekil 4.45: Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.4 Mikroakışkan cihazın depolama ömrü

Son olarak enzim immobilize edilmiş kumaş yüzeylerinin raf ömrü incelenmiştir. +4 °C'de depolanan enzim immobilize edilmiş yüzeylere analit ilavesinden sonra yapılan ölçümlerde mor renk yoğunluğunun daha düşük fakat haznelerde daha homojen şekilde oluştuğu ve enzimlerin aktivitesini en az 25 gün koruduğu gözlemlenmiştir.

5. ÖNERİLER

Sonuç olarak, çalışma kapsamında yapılan deneysel çalışmalar ile hazne bağlantılı mikro kanallardan oluşan tekstil tabanlı mikroakışkan cihaz fotolitografi tekniği ile başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bu giyilebilir ve tek kullanımlık biyo-kimyasal analitik cihaz, vücut terindeki laktat seviyesinin invaziv olmayan, hızlı ve yarı kantitatif bir yöntemle analizini ve potansiyel olarak bir sporcunun fiziksel aktivite esnasındaki form durumunu izleyebilmesini sağlayabilecek şekilde tasarlanmıştır. Yüksek seviyede emici nonwoven kumaş herhangi bir güç sistemine ihtiyaç duymaksızın üretilen mikro kanallar boyunca kapiler etki ile sıvının iletimini ve haznelerde toplanmasını sağlamıştır.

SU-8 polimeri kumaşa kalınlığı boyunca nüfuz ettiği için kumaş yüzeyindeki desende iyi seviyede elde edilen hidrofilik/hidrofobik kontrast, sıvının kanallar boyunca kapiler olarak nüfuz etmesini sağlamış, hazne ve kanalların çevresinde hiçbir sıvı sızması gözlemlenmemiştir. Laktat tayininde analit ilavesinden sonra renk değişiminin etkin bir şekilde gözlemlenmesi enzim ve analit arasındaki etkileşime bağlıdır. Bu sebeple mikroakışkan cihazda sızma olmadan sıvı emiliminin sağlanması, işlevsellik ve tekrarlanabilirlik açısından çok kritik bir özelliktir; çünkü sıvının sızması çapraz reaktiviteye neden olarak teşhis haznelerindeki reaksiyonu etkilemektedir.

Dikey ıslanma test sonuçları Evolon® kumaşın filtre kağıdına gore emicilik oranının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. Evolon® kumaş yapısındaki liflerin üç boyutlu oryantasyonu ile, desende verimli örnek iletimi için hidrofilik-hidrofobik kontrast iyi bir şekilde tanımlanmış, hem dikey hem yatay sıvı akışı desende sağlanmıştır. Sonuçlara göre Evolon® kumaş analitlerin hızlı teşhisi için gerekli örnek sıvının toplanması ve teşhis bölgelerine iletimi açısından kağıt yüzeye göre daha avantajlı bulunmuştur.

Tekstil tabanlı mikroakışkan cihazdaki laktat analizinde enzim davranışının solüsyonda ve kumaş yüzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden her bir durum için farklı optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Ancak her iki optimizasyon çalışması yüksek analit konsantrasyonunun analit inhibisyonuna sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca pH ve sıcaklığın renk oluşumu üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir.Efektif sonuçlar elde etmek için, analit pH seviyesinin 5'in üzerinde olması, sıcaklığın ise 25-30ºC olması gerekmektedir. Daha düşük pH ve daha yüksek sıcaklık değerleri enzim aktivitesinde düşmeye neden olmuştur. Tekstil tabanlı biyosensör sistemi normal (< 5 mM) ve yüksek (≥ 5 mM) laktat seviyesini ayırt etmek için yarı-kantitatif görsel bir teşhis yapabilmiştir: Yüksek laktat seviyesi daha yoğun mor renk oluşumuna sebep olurken, normal seviyeler açık mor renk vermiş ve yeşil bir rengin oluşmaya başladığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma düşük maliyette ve yüksek hacimde üretilen nonwoven kumaşların, farklı analitlerin hızlı biyo-kimyasal analizini gerçekleştiren tek kullanımlık mikro akışkan cihaz üretiminde uygun yüzey olarak tercih edilebileceğini göstermiştir. Mevcut çalışmanın devamı niteliğinde, ilerleyen çalışmalarda enzimlerin tekstil yüzeyinde immobilizasyonu için jel içerisinde immobilizasyon (tutuklama) yönteminin kullanılması planlanmaktadır. Jel içinde tutuklama, biyoreseptörlerin polimer jel tabakası veya yarı-geçirgen bir membran içerisine hapsedilmesidir. Bu yöntem jel polimerizasyonunun gerçekleştiği ortamda, çapraz bağlı taşıyıcılarla enzimin tutularak hapsedilmesi esasına dayanır. Bu yöntemin kullanılmasıyla enzimlerin eklendikleri ortamdan yüzeyin kılcallık etkisi ile uzaklaşmasının engellenmesi ve analit ilavesi ile oluşacak reaksiyon sonucunda kumaş yüzeyinde daha yüksek renk yoğunluğunun elde edilmesi planlanmaktadır.

Ayrıca, ilerleyen aşamada, mikro kanallarla bağlantılı birden çok ölçüm haznesi içeren desenin nonwoven yüzeyde üretimi yapılarak, çoklu analit teşhisi için kullanılabilecek çok fonksiyonlu bir mikroakışkan cihaz geliştirilmesi planlanmaktadır. Böylece üretilen bir sistem üzerinde aynı anda farklı analitlerin teşhisi sağlanabilecektir. Bu sistemde her ölçüm haznesine, her bir analit için spesifik olan enzimlerin immobilize edilmesi ve tek bir sıvı örneği kullanılarak, örneğin idrar, farklı analitlerin (glikoz, ürik asit vb.) farklı ölçüm haznelerinde eş zamanlı teşhisinin yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] **Martinez, A. W., Phillips, S.T. ve Whitesides G. M.** (2010). Plasma-polymerized films for biosensors II. *Analytical Chemistry*, ***82(1)***,3-10.

[2] **Li, X., Tian, J. ve Shen W.** (2010). Thread as a Versatile Material for Low-Cost Microfluidic Diagnostics. *Applied Materials and Interfaces, **2(1)***: 1-6.

[3] **Bao, M. ve Wang, W.** (1996). Future of microelectromechanical sytems (MEMS). *Sensors and Actuators A: Physical*, ***56(1-2)***, 135-141.

[4] **Gad-El-Hak Mohammed.** (2004). Liquids: The Holy Grail of Microfluidics Modeling. *MEMS, NANO and Smart Systems*, ISBN: 0-7695-2189-4.

[5] <*http://www.acikbilim.com/2012/10/dosyalar/incecik-kanallar-ve-sivilar-mikroakiskanlar.html*>, alındığı tarih: 12.12.2013

[6] **Chen, K. S., Lin K. I. ve Ko, H. F.** (2005). Fabrication of 3D polymer microstructures using electron beam lithography and nanoimprinting technologies. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, ***15***, 1894-1903.

[7] **McDonald, J. C, Duffy, C. D, Anderson, R. J, Chiu, D. T, Wu, H., Schueller, Oliver J. A. ve Whitesides, M. G.** (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, ***21***, 27-40.

[8] <*http://www.hamit.bilkent.edu.tr/mikrosistemler.html*>, alındığı tarih:12.12.2013.

[9] **Abe, K., Suzuki, K., ve D. Citterio.** (2008). Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. *Analytical Chemistry*, ***80***, 6928-6934.

[10] **Aydın, Y.** (2012). İletken polimerlerin içerisine enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler. Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman.

[11] **Sassolas, A. L., Blum, Béatrice, J. ve Bouvier, D. L.** (2011). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, ***30(3)***,489-511.

[12] **Gulrajani, M. L. ve G. Deepti.** (2011). Emerging techniques for functional finishing of textiles. *Indıan Journal of Fibre and Textile Research*, ***36***, 388-397.

[13] **Songjaroen, T., Dungchai, W., Chailapakul, O. and Laiwattanapaisale, W.** (2011). Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*, ***85***, 2587-2593.

[14] **Li, X., Tian, J., Shen, W.** (2010). Progress in patterned paper sizing for fabrication of paper-based microfluidic sensors. *Cellulose*, ***17***, 649-659.

[15] **Zhang, A. ve Zha, Y.** (2012). Fabrication of paper-based microfluidic device using printed circuit technology, *AIP Advances*, ***2***, 022171(1-6).

[16] **Martinez, A. W., Phillips, S.T. ve Whitesides, G. M.** (2010). Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices, *Analytical Chemistry*, ***82***, 3-10.

[17] **Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho E., S. Thomas, W., Sindi, H. ve Whitesides, G. M.** (2008). Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis, *Analytical Chemistry*, ***80***, 3699-3707.

[18] **Dungchai, W., Chailapakul, O., ve Henry C. S.** (2009). Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics, *Analytical Chemistry*, ***81***, 5821-5826.

[19] **Dungchaia, W., Chailapakula, O., Henry, C. S. (**2010). Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices, *Analytica Chimica Acta*, ***674***, 227-233.

[20] **Zhong, Z. W., Wang, Z. P. ve Huang, G. X. D.** (2012). Investigation of wax and paper materials for the fabrication of paper-based microfluidic devices. *Microsystem Technologies*, ***18***, 649-659.

[21] **Ellerbee, A. K., Phillips, S.T., Siegel, A. C., Mirica, K.A., Martinez, A. W., Striehl, P., Jain, N., Prentiss, M. ve Whitesides, G. M.** (2009). Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring theTransmission of Light through Paper, *Analytical Chemistry*, ***81***, 8447-8452.

[22] **Lu, Y., Shi, Jiang, W. L., Qin, J. ve Lin B.** (2009). Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay, *Electrophoresis*, ***30***, 1497-1500.

[23] **Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J. ve Whitesides G. M.** (2007). Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low- Volume, Portable Bioassays, *Angewandte Chemie International Edition*, ***46***, 1318-1320.

[24] **Klasner, S. A., Price, A. K., Hoeman, K.W., Wilson, R. S., Bell, K.J. ve Culbertson, C. T.** (2010). Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **397**, 1821-1829.

[25] **Yu, J., Ge, L., Huang, J., Wang, S. ve Ge, S.** (2011). Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid, *Lab Chip*, ***11***, 1286-1291.

[26] **Abe, K., Suzuki, K., ve Citterio, D.** (2008). Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper", *Analytical Chemistry*, ***80***, 6928-6934.

[27] **Chen, X., Chen, J., Wang, F., Xiang, X., Luo, M., Ji, X. ve Hea, Z.** (2012). Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices, *Biosensors and Bioelectronics*, ***35***, 363- 368.

[28] **Nie, Z., Nijhuis, C. A., Gong, J., Chen, X., Kumachev, A., Martinez, A. W., Narovlyansky, M. ve Whitesides, G. M.** (2010). Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab Chip*, ***10***, 477-483.

[29] **Yu, J., Wang, S. Ge, L. and Ge, S.** (2011). A novel chemiluminescence paper microfluidic biosensor based on enzymatic reaction for uric acid determination, *Biosensors and Bioelectronics*, ***26***, 3284-3289.

[30] **Ribeiro, F. de Souza. Liberato, Alves, G. ve Karlos Tomazelli Coltro, W.** (2012). Capillary-Driven Toner-Based Microfluidic Devices for Clinical Diagnostics with Colorimetric Detection, *Analytical Chemistry*, ***84***, 9002-9007.

[31] **Peng, B., Yan, L., Ying, L., Dong, Y.X. ve Yuan, C. H.** (2013). Study on Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Paper-based Micro-zone Plates, *Analytical Chemistry*, ***41***, 20-24.

[32] **Schilling K. M., Lepore, A. L., Kurian, J. A. ve Martinez, A. W.** (2012). Fully Enclosed Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Analytical Chemistry*, ***84***, 1579-1585.

[33] **Nie, J., Liang, Y., Zhang, Y., Le S., Li, D. ve Zhang, S.** (2013). One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices, *Analyst*, ***138***, 671-676.

[34] **Alkasir, Ramiz S. J., Ornatska, M. ve Andreescu, S.** (2012). Colorimetric Paper Bioassay for the Detection of Phenolic Compounds, *Analytical Chemistry*, ***84***, 9729-9737.

[35] **Liana, Devi D., Raguse, B., Justin Gooding, J. ve Chow, E.** (2012). Recent Advances in Paper-Based Sensors, *Sensors*, ***12***, 11505-11526.

[36] **Martinez, A.W.** (2011). Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA, *Bioanalysis*, ***3(23)***, 2589-2592.

[37] **Li, X., Ballerini, D.R., Shen W.** (2012). A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends, *Biomicrofluidics*, ***6***, 011301-1-011301-13.

[38] **Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M. ve Whitesides, G. M.** (2008). FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices, *Lab on Chip*, ***8***, 2146-2150.

[39] **Lopez, F. B., Coyle, S., Byrne, R., O'Toole, C., Barry, C. ve Diamond, D.** (2010). Simple Barcode System Based on Inonogels for Real Time pH-Sweat Monitoring. *International Conference on Body Sensor Networks*, ISBN: 978-1-4244-5817-2.

[40] **Curto, V.F., Coyle, S., Byrne, R., Angelov, N., Diamond, D., Benito-Lopez, F.** (2012). Concept and Development of an Autonomous Wearable Micro-Fluidic Platform for Real Time Ph Sweat Analysis, *Sensors Actuators B: Chemical*, ***263*** (175).

[41] **Benito-Lopez, F., Coyle, S. Byrne, R. ve Diamond, D.** (2010). Sensing Sweat in Real-Time Using Wearable Micro-fluidics. *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 3-7 October.

[42] **Curto, V. F., Fay, C., Coyle, S., Byrne, R., Diamond, D. B. ve Lopez, F.** (2011). Wearble Micro-fluidic PH Sweat Sensing Device Based on Colorimetric Imaging Techniques. *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* 2-6 October.

[43] **Khodagholy, D., Curto, V. F., Fraser, K. J., Gurfinkel, M., Byrne, R., Diamond, D., Malliaras, G.G., Benito-Lopez, F. ve Owens, R. M.** (2012). Organic electrochemical transistor incorporating an ionogel as a solid state electrolyte for lactate sensing. *J. Mater. Chem.*, ***22***, 4440.

[44] **Muguruma, H.** (2007). Plasma-polymerized films for biosensors II. *Analytical Chemistry*, ***(26)5***: 433-44.

[45] **Korostynska, O., Arshak, K., Arshak, A., Gill, E., Creedon, P. ve Fitzpatrick, S.** (2010). Polymer Based Micro Sensors Arrays for Ph and Glucose Monitoring. *Key Engineering Materials*, ***437***, 354-358.

[46] **Nilghaz, A., Wicaksono, Dedy H. B., Gustiono, D., Majid, F. A. A., Supriyanto, E. ve Abdul Kadir M. R.** (2012). Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique, *Lab Chip*, ***12***, 209-218.

[47] **Morris, D., Coyle, S., Wu, Y., Lau, K.T., Wallace, G. ve Diamond, D.** (2009). Bio-sensing textile based patch with integrated optical detection system for sweat monitoring, *Sensors Actuators B*, ***139***, 231-236.

[48] **Benito-Lopez, F., Coyle, S., Byrne, R., Curto, V. F. ve Diamond, D**. (2010). Sweat-on-a-Chip": Analysing Sweat in Real Time with Disposable Micro-devices. *Sensors 2010 IEEE*, Kona, HI, ISBN: 978-1-4244-8170-5.

[49] **Coyle, S., Morris, D., Tong Lau, K. ve Diamond, D.** (2009). Textile sensors to measure sweat pH and sweat-rate during exercise. *Pervasive Health*, ISBN 978-963-9799-42-4.

[50] **Coyle, S., Lau, K., Moyna, N. ve Diamond, D.** (2010). BIOTEX - Biosensing textiles for personalised healthcare management, *IEEE Transactions on Information Technology in BioMedicine*, ***14***, 364-370.

[51] **Coyle, S., Morris, D., Lau, K.T. ve Diamond, D**. (2009). Textile-Based Wearable Sensors for Assisting Sport Performance. *Proc. of the Wearable and Implantable Body Sensor Networks*, USA.

[52] **Ballerini, David. R., Li X. ve Shen, W.** (2011). Flow control concepts for thread-based microfluidic devices. *Biomicrofluidics*, ***5(1).***

[53] **Batra, S. K. ve Pourdeyhimi, B.** (2012). Introduction to Nonwovens Technology, *Destech Publications, Inc*., Pennsylvania.

[54] *<http://www.best-b2b.com/Products/808/830-1/spunbond-nonwoven fabric_371044.html>* alındığı tarih: 10.09.2012.

[55] <*http://www.asia.ru/en/ProductInfo/742155.html*>, alındığı tarih: 10.09.2012.

[56]<*http://tr.evolon.com/?module=website&action=Display&cmpref=10230&lang=tr*>, alındığı tarih: 10.09.2012.

[57] <*http://en.wikipedia.org/wiki/Spin_coating*>, alındığı tarih: 26.06.2012.

[58] < *https://www.memsnet.org/mems/processes/lithography.html*>, alındığı tarih: 09.10.2013.

[59] TS 257 EN 20811 standardı, Su geçirmezlik tayini hidrostatik basınç deneyi.

[60] TS EN ISO 13934-1 standardı, Kumaş kopma mukavemeti.

[61] BS 3424-18–1986. Testing coated fabrics–Part 18: Method 21A: Determination of capillary action wicking.

[62] <*http://basketbolegitim.com/neden-laktat-testi-yapilmali.html*>,alındığı tarih: 15.10.2013.

[63] <http://sbsam.org/anaerobik-esik-ve-laktat/>, alındığı tarih: 15.10.2013.

[64] **Akbaş S., Pelvan, S. O. ve Ateş, O.** (2011). 100m Koşusu Sonrası Sporcuların Kan LaktatSeviyeleri. *Uluslararası Hakemli Akademik Sosyal Bilimler Dergisi*, ***1***, 101-107.

[65] <*http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim*>, alındığı tarih: 25.10. 2013.

[66] <*http://www.genetikbilimi.com/genbilim/enzimler.html*>, alındığı tarih: 25.10.2013.

[67]<*http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/2/lactate_oxidase.Par.0001.File.tmp/lactate_oxidase.pdf*>, alındığı tarih: 08.07.2013.

[68] <*http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html*>, alındığı tarih: 08.07.2013.

[69]<*http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a1888pis.pdf*>, alındığı tarih: 08.07.2013.

[70] <*http://microchem.com/pdf/SU-8%203000%20Data%20Sheet.pdf*>, alındığı tarih: 08.07.2013.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Gülçin Baysal

Doğum Yeri ve Tarihi: 23.05.1985-Ankara

Adres: Pınarbaşı Mah.Çiğdem sk. Üstel Apt No:6/4 Sincan /Ankara

E-Posta: baysalglin@gmail.com

Lisans: Erciyes Üniversitesi-Tekstil Mühendisliği

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- **Baysal G.,** Kök F. N., Trabzon L., Kızıl H., Göcek İ., and Karagüzel Kayaoğlu B., 2013: Microfluidic Nonwoven-Based Device as a Potential Biosensor for Sweat Analysis. *Proceedings of 2013 4th International Conference on Nanotechnology and Biosensors (ICNB 2013)*, Paris, France, December 20-21.