

**FENİLKETONÜRİ TANISI İÇİN KAĞIT-TABANLI
MİKROAKIŞKAN ANALİTİK CİHAZ GELİŞTİRİLMESİ**

**MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE
FOR DETECTION OF PHENYLKETONURIA**

PELİN KAZANCI

DOÇ. DR. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü


YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

PELİN KAZANCI'nın hazırladığı "FENİLKETONÜRİ TANISI İÇİN KAĞIT-TABANLI MİKROAKIŞKAN ANALİTİK CİHAZ GELİŞTİRİLMESİ" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. HALİL MURAT AYDIN

Başkan



Doç. Dr. MEMED DUMAN

Danışman



Dr. Öğretim Üyesi DENİZ BAŞ

Üye



Doç. Dr. BASRİ GÜLBAKAN

Üye



Dr. Öğretim Üyesi DİNÇER GÖKÇEN

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin / raporunun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “ Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

03. / 10. / 2018

P. Karaca
(İmza)

Pelin Karaca
Öğrencinin Adı SOYADI

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. Şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7. 2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

Aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri tez yazım kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/09/2018

P. Kazancı
PELİN KAZANCI

ÖZET

FENİLKETONÜRİ TANISI İÇİN KAĞIT TABANLI MİKROAKIŞKAN ANALİTİK CİHAZ GELİŞTİRİLMESİ

Pelin KAZANCI

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Memed DUMAN

Eş Danışman: Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL

Eylül 2018, 98 sayfa

Fenilketonüri (FKU), fenilalaninin metabolize edilememesi, kanda ve diğer vücut sıvılarında artması sonucu kişinin beyinde hasara sebep olan bir hastalıktır. Hastalığa sahip bireylerde kan fenilalanin seviyesinin düzenli aralıklarla takibi zorunlu olup, bu testler zaman alıcı, yüksek maliyetli ve uygulamadaki teknik zorluklar ile teknik ekipman ve uzman personel gerektirmesi nedeniyle özellikle hastalığın yaygın olduğu kırsal kesimlerde yeterince uygulanabilir değildir. Gözenekli yapısı, yüzey özelliklerinin geniş bir ölçekte kontrol edilebilmesi ve istenilen uygulamaya göre biyolojik olarak kolay modifiye edilebilmesi nedeniyle kağıt, sensör uygulamaları başta olmak üzere çeşitli biyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir sistemdir. Kağıt tabanlı mikroakışkan sistemlerin üretiminde kullanılan en temel yöntemlerden biri mürekkep püskürtmeli yazıcılardır. Bu yöntemde yazıcı, pikolitre mertebesine kadar inen test sistemi başına örnek sarfiyatı ile, yüksek

keskinlik ve tekrarlanabilirlik ile istenilen molekülün test sistemine aktarılmasını sağlar.

Üretilen test kiti üzerinde gerçekleştirilen enzimatik ve kolorimetrik reaksiyonlar kapsamında, fenilalanin dehidrojenaz enzimi NAD^+ varlığında fenilalanin ile tepkimeye girmektedir. Açığa çıkan $NADH$, reaksiyonun ikinci basamağında mPMS ile yükseltgenerek son ürün olarak formazan üretmektedir. Ortamdaki fenilalanin derişimine bağılı olarak üretilen formazan miktarı test bölgesinde mor tonlarında bir renk değışimine sebep olmakta ve renk seviyesinin optik karakterizasyon yöntemiyle analizi sonucu fenilalanin derişimi tayinine imkan sağlamaktadır.

Yazıcı ile üretilen test sistemi için hesaplanan tayin sınırı 4.01 mg/dL olarak ölçülmüştür. Cihazın kolorimetrik cevap süresi 8 dakika olarak hesaplanırken, toplam üretim süresi 5 dakikaya düşürülmüştür. Püskürtme oranlarının elektronik olarak kontrol edilebilmesi üretim sırasında reaktif madde derişimini daha hassas bir şekilde ayarlama imkanı yaratmış; bu durum da test kitinin doğrusal olarak çalıştığı derişim aralığı olan 0-22 mg/dL bölgesini kontrol etme yetisi kazandırırken, bağımsız üretilen kitler arasındaki ölçüm tekrarlanabilirliğini arttırmıştır.

Sunulan tez çalışması ile fenilketonüri hastalığının takip gerektiren seviyesi, orta hiperfenilalaninemi, orta dereceli fenilketonüri ve klasik fenilketonüri olmak üzere dört ayrı derecesini kolorimetrik olarak anlamlı bir şekilde ölçmesinde kullanılmak üzere üretimi kolay, maliyeti düşük, cevap süresi hızlı bir test sistemi başarıyla geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenilketonüri, Kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar, Mürekkep püskürtmeli baskılama, Kolorimetrik biyosensörler

ABSTRACT

MICROFLUIDIC PAPER-BASED ANALYTICAL DEVICE FOR DETECTION OF PHENYLKETONURIA

Pelin KAZANCI

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Assos. Prof. Dr. Memed DUMAN

Co-supervisor: Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL

September 2018, 98 pages

Phenylketonuria (PKU), is a disease caused by the failure of phenylalanine metabolization and resulting accumulation at blood and other body fluids causing brain damage. Despite periodic phenylalanine monitoring is a necessity for PKU patients; due to being a time consuming test with high costs and requirement of analytical grade equipment along with trained personnel, it is not widely accessible especially at the rural areas where the disease is more common.

Porous structure, precisely controllable surface properties and easy biological modification makes paper a commonly used material in biology, especially in sensor applications. One of the most widely used fabrication methods for preparation of paper based microfluidic systems is inkjet printing. This method enables fast and

vast production of test systems with very high pattern resolution and repeatability with reagent volumes as low as picoliters per test strip.

The first stage of detection mechanism which is an enzymatic process, is the reaction between phenylalanine and phenylalanine dehydrogenase in the presence of NAD^+ . This reaction results with reduction of NAD^+ to NADH. In the second stage, NADH is oxidized again by mPMS and produce formazan as end-product. Consequently the amount of produced formazan is a function of the input phenylalanine concentration. Significantly different color of formazan comparing all the input samples and by-products allow us to detect formazan quantity on test specimen therefor input phenylalanine concentration.

Calculated limit of detection for ink-jet printer fabricated test system is 4.01 mg/dL. Colorimetric response time is calculated as 8 minutes while fabrication time is reduced to 5 minutes. By printer fabrication, the ability to control spraying ratio electronically enables us to control the reactant concentration resulting a better control over the linear range of test system which is 0-22 mg/dL. Same feature also drastically improve sensor-to-sensor repeatability.

Within this study; a low cost and fast responsive test system with minimal fabrication requirement has been successfully developed which can identify monitor required phenylketonuria, mid-hyperalaninemia, mid-phenylketonuria and classic phenylketonuria with colorimetric technique with high trust rate.

Keywords: Phenylketonuria, Paper based microfluidic analytical devices, Inkjet printing, Colorimetric biosensors

TEŞEKKÜR

Akademik donanımı, bilgi birikimi ve ahlaki yönüyle yüksek lisans eğitimim boyunca bana ışık tutarak bu tez çalışmasını gerçekleştirmemi sağlayan, sabrını ve hoşgörüsünü benden ve diğer tüm öğrencilerinden esirgemeyen sadece bilimsel alanda değil her alanda görüş ve tecrübelerine başvurduğum yanında çalışmaktan gurur ve onur duyduğum değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Memed DUMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım kapsamında kullanılan malzemelerin sağlanmasında büyük emeği olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL'e;

Bilgi ve birikimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen ve bana yol gösterici olan sayın Dr. Öğretim Üyesi Deniz BAŞ'a;

Tez çalışmalarım sırasında gösterdiği büyük ilgi ve yardımlarından dolayı sayın Doç. Dr. Basri GÜLBAKAN'a, sayın Doç. Dr. Halil Murat AYDIN'a ve sayın Dr. Öğretim Üyesi Dinçer GÖKÇEN'e çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışırken çok şey öğrendiğim, çalıştığımız dönem içerisinde vermiş oldukları büyük desteklerden dolayı kıymetli çalışma arkadaşlarım Gülgün AYLAZ, Melih Zeki YILDIRIM, İpek AKYILMAZ, Meltem AYDIN'a;

Her türlü destek ve yardımlarından dolayı Dr. Günay TAN, Miray İzgen CANVER'e; Verdikleri sonsuz sevgi ve destekleri nedeniyle hayatım boyunca minnettar kalacağım annem Nermin TAN, babam Hakkı Mükerrerem TAN, kardeşim Ece Aylin TAN'a;

Çalışmalarım sırasında büyük yardımları olan, değerli fikir ve yönlendirmeleriyle hayatımın her adımında büyük desteğini hissettiğim eşim Emre KAZANCI'ya;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Biyosensörler	4
2.2. Biyosensör Türleri	6
2.2.1. Kullanılan Dönüştürme Araçlarına Göre Biyosensörler	7
2.2.2. Biyolojik Materyaline Göre Biyosensörler.....	11
2.3. Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Cihazlar.....	13
2.3.1. Kağıdın yapısı ve özellikleri.....	16
2.3.2. Kağıt tabanlı mikroakışkan testlerde kolorimetrik tespit.....	20
2.4. Mürekkep püskürtmeli baskılama tekniği ile μ PAD tasarımı.....	21
2.5. Fenilketonüri.....	23
2.5.1. Fenilketonürinin tarihsel geçmişi	26
2.5.2. Fenilketonürinin epidemiyolojisi.....	26
2.5.3. Fenilketonürinin sınıflandırılması.....	27
2.5.4. Fenilketonürinin moleküler genetik açıdan incelenmesi	27
2.5.5. Fenilketonüri biyokimyasal açıdan incelenmesi.....	28
2.5.6. Geleneksel tanı yöntemleri.....	29
2.6. Kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz ile kanda fenilketonüri tayini.....	30

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	34
3.1. Kullanılan malzemeler ve çözeltiler	34
3.2. Sıvı ortamda parametrelerin optimizasyonu	36
3.2.1. Kullanılan tampon çözeltinin pH değerinin fenilalanin dehidrojenaz enzimi üzerindeki etkisi	36
3.2.2. NBT için uygun çalışma derişiminin belirlenmesi.....	36
3.2.3. Test sisteminin özgüllüğünün incelenmesi	36
3.2.4. Test süresinin optimizasyonu	37
3.3. Çalışmada kullanılacak uygun test materyalin seçimi ve μ PAD tasarımı	38
3.3.1. μ PAD tasarımında kullanılacak materyallere uygulanan yüzey modifikasyonları	41
3.3.2. Geliştirilen sensör sisteminin çalışma performansının belirlenmesi...	42
3.3.3. Geliştirilen kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın kan plazması ile validasyonu	44
3.3.4. Test kitinin mürekkep baskılama yöntemi ile üretimi	44
4. BULGULAR.....	48
4.1. Sıvı ortamda parametrelerin optimizasyonu	48
4.1.1. Kullanılan tampon çözeltinin pH değerinin fenilalanin dehidrojenaz enzimi üzerindeki etkisi	48
4.1.2. NBT için uygun çalışma derişiminin belirlenmesi.....	49
4.1.3. Test sisteminin özgüllüğünün incelenmesi	50
4.1.4. Test süresi optimizasyonu	51
4.2. Çalışmada kullanılacak uygun test materyalin seçimi ve μ PAD tasarımı	52
4.3. μ PAD tasarımında kullanılacak materyallere uygulanan yüzey modifikasyonları.....	56
4.4. Geliştirilen sensör sisteminin çalışma performansının belirlenmesi	58
4.5. Geliştirilen μ PAD cihazın kan plazması ile validasyonu	60

4.6. Test kitinin mürekkep baskılama yöntemi ile üretimi	62
5. DEĞERLENDİRME VE YORUMLAR.....	67
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 4.1 Fenilalanin çözeltileri için kalibrasyon deneyi verileri.....	59
Tablo 4.2 Fenilalanin çözeltileri için t-testi sonuçları.....	60
Tablo 4.3 Plazma için kalibrasyon grafiği verileri.....	61
Tablo 4.4 Plazma için t-testi değerleri.	62
Tablo 4.5 Yazıcı ile basım sonucu oluşan renk şiddetlerini verileri.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Fenilalaninin, fenilalalin hidroksilaz enzimi varlığında tirozine dönüşümü.1	
Şekil 2.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması.	7
Şekil 2.2 Yanal akış testi çalışma prensibi.	14
Şekil 2.3 Selülozun kimyasal yapısı [65].	18
Şekil 2.4 Nitroselüloz membran yapısı. R grupları NO ₂ 'yi ifade etmektedir [67]. .	19
Şekil 2.5 BSA molekülü kimyasal yapısı [68].	20
Şekil 2.6 Drop-on-demand mürekkep püskürtmeli yazıcının çalışma prensibi.	23
Şekil 2.7 Fenilalanin - tirozin dönüşümünün kimyasal yapısı [4].	24
Şekil 2.8 Fenilalanin - tirozin dönüşümünün diğer metabolitlere etkisi [80].	25
Şekil 2.9 PAH geninin 12. kromozomdaki lokasyonu [90].	28
Şekil 2.10 L-fenilalanin metabolizması [4].	28
Şekil 2.11 Fenilalanin derişimine bağlı formazan sentez reaksiyonu [99].	30
Şekil 2.12 Fenilalaninin kimyasal yapısı [101].	31
Şekil 2.13 NAD ⁺ molekülünün kimyasal yapısı [105].	32
Şekil 2.14 Nitroblue tetrazolyum tuzunun kimyasal yapısı [108].	33
Şekil 3.1 Whatman No.4 membranda test sisteminin oluşturulması ve membranların yanal kesiti.	39
Şekil 3.2 Whatman No.4 membranda tek aşamalı test sisteminin oluşturulması..	40
Şekil 3.3 Whatman No.4 filte kağıdı ile cam fiber filtre membranı arasındaki yatak hacmi farkı.	41
Şekil 3.4 Cam fiber filtre membranının farklı tasarımında uygulama.	42
Şekil 3.5 Test kitinin üretiminde kullanılan yazıcı ve bölümleri.	45
Şekil 3.6 Renk kodlarına göre mürekkep renkleri.	45
Şekil 3.7 Kullanılan mürekkep miktarı ile çizim alanının hesaplanması.	46
Şekil 3.8 Basım aşamasının Microsoft Powerpoint programında tasarımı.	47

Şekil 4.1 Enzimatik reaksiyon sırasında kullanılan tampon çözeltinin a. pH 7.5, b. 9.3, c. 10.5 ve d. 11.5 değerlerinde incelenmesi.	48
Şekil 4.2 Fenilalaninsiz ortam (a), Enzim miktarının 0.0125 ünite (b), 0.025 ünite (c) ve 0.05 ünite (d) kullanılması ile oluşan formazan rengi sonucu.	49
Şekil 4.3 Nitroblue tetrazolyumun a. 1.2 mM, b. 2.4 mM ve c. 4.8 mM derişimlerinde verdiği renk değişimi karşılaştırılması.	50
Şekil 4.4 Soldan sağa sırasıyla; 1.1 mg/dL, 2.2 mg/dL, 4 mg/dL, 6.5 mg/dL, 10 mg/dL, 13 mg/dL ve 22 mg/dL fenilalanin derişimlerinin renk değişimine etkisi.	50
Şekil 4.5 a. pheDH, b. NBT, c. mPMS, d. NAD+ eklenmeden ve e.fenilalanin yerine glisinli ortam ile yapılan kontrol deneyi sonuçları.	51
Şekil 4.6 Enzimatik reaksiyon basamağında uygulanan 0, 6, ve 10 dakika bekleme süresi sonucu renk değişimleri.	52
Şekil 4.7 Nitroselüloz membranda uygulama.	53
Şekil 4.8 Whatman No.4 kağıtta reaksiyonun incelenmesi a. deney düzeneği, b. 8 dakika sonunda renk değişimi.	54
Şekil 4.9 Whatman No.4 tek parça kağıt ile uygulama (akış ok yönündedir).	54
Şekil 4.10 Cam fiber filtre membranında 8. dakikadaki renk değişimi.	55
Şekil 4.11 Cam fiber filtre membranında renk değişimi.	55
Şekil 4.12 Modifikasyon işlemi sonradan uygulanan cam fiber filtre membranı.	56
Şekil 4.13 Modifikasyon işlemi önceden uygulanan cam fiber filtre membranı.	56
Şekil 4.15 Test bölgesinin disk şeklinde tasarlandığı, ön işlem den geçirilmiş cam fiber filtre membranında renk değişiminin incelenmesi.	57
Şekil 4.16 a. 22 mg/dL, b. 13 mg/dL, c. 10 mg/dL, d. 6.5 mg/dL, e. 4 mg/dL, f. 2.2 mg/dL, g. 1.1 mg/dL, h. 0 mg/dL derişimlerinde fenilalanin çözeltilerinin renk değişimleri.	58
Şekil 4.17 Farklı fenilalanin derişimlerine ait çözeltilerin kalibrasyon grafiği (log-lin grafiği).	59
Şekil 4.18 Cam fiber filtre membranının plazma ile uygulanması a. 22 mg/dL, b. 10 mg/dL, c. 4 mg/dL, d. Fenilalanin eklenmeyen plazma.	61

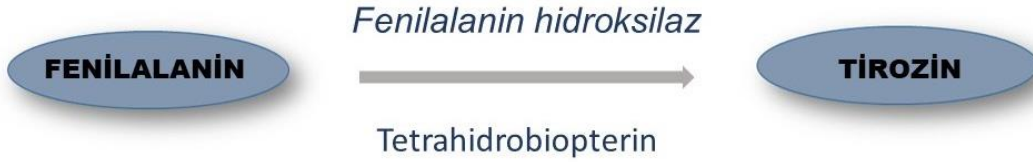
Şekil 4.19 Plazma için kalibrasyon grafiği (log-lin grafiği).....	61
Şekil 4.20 Mürekkep hacmi kullanılarak çizim alanı hesaplanması a. 100 µL mürekkep miktarı ile b. 30 µL mürekkep miktarı ile.	63
Şekil 4.21 Magenta rengi ile µPAD'lerin yerlerinin belirlenmesi.....	64
Şekil 4.22 Poliüretan tüplere biyolojik elementlerin doldurulması.	64
Şekil 4.23 Yazıcı ile cam fiber filtre membranına basım a. 22 mg/dL phe, b. 10 mg/dL phe, c. 4 mg/dL phe, d. 0 mg/dL phe.....	65
Şekil 4.24 Yazıcı ile basım sonucu elde edilen renklere ait kalibrasyon grafiği (lin-lin grafiği).	66

KISALTMALAR DİZİNİ

PAH	Fenilalanin hidroksilaz
L-phe	Fenilalanin
FKU	Fenilketonüri
BH4	Tetrahidrobiopterin
µPAD	Kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
pheDH	Fenilalanin dehidrojenaz
MES	2-(N-Morfolino) etan sulfonik asit hemisodyum tuzu
phePyr	Fenilalanin piruvat
NBT	Nitroblue tetrazolyum klorür
XTT	2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilit
mPMS	1-Metoksi-5-Metilfenazinyum metil sülfat
PBS	Fosfat tamponlu tuz
BSA	Sığır serum albumini
SDS	Sodyum dodesilsülfat

1. GİRİŞ

Fenilketonüri (FKU), otozomal çekinik olarak kalıtılan metabolik bir hastalıktır. Bu hastalık bir karaciğer enzimi olan fenilalanin hidroksilazın (PAH) sentezlenememesi ya da enzimin yeterince aktivite gösterememesi sonucu meydana gelmektedir. Hasta bireyler fenilalanin amino asidini metabolize edemezler, fenilalaninin tirozine dönüşmesi engellenir (Şekil 1.1). İki amino asit arasındaki tek fark tirozinde bulunan hidroksil grubudur. Kanda ve diğer vücut sıvılarında artmış fenilalanin ve onun ürünleri farklı dokularda, beyin-omurilik sıvısında (BOS) birikerek hasara sebep olmaktadır [1][2].



Şekil 1.1 Fenilalaninin, fenilalanin hidroksilaz enzimi varlığında tirozine dönüşümü.

Hastalıkta fenilalanin dokularda, plazmada ve idrarda yüksek miktarda bulunmaktadır. Fonksiyonel fenilalanin hidroksilaz varlığında yüksek miktarlarda oluşmayan fenillaktat, fenilasetat ve fenilpirüvat miktarı da artmaktadır. Klasik fenilketonüriye PAH kodlayan gendeki mutasyon sebep olmaktadır. Hastalık otozomal çekinik olarak kalıtılır; farklı toplumlarda saptanan mutasyonların çeşidi ve görülme sıklıkları büyük değişkenlik göstermektedir. Ülkemiz gibi akraba evliliklerinin sık olduğu toplumlarda hastalığın görülme sıklığı da artmaktadır [2][3]. Hastalığın farklı bir tipi olan hiperfenilalaninemi, ayrıca bir koenzim olan tetrahidrobiopterin (BH4) sentezinde veya indirgenmesinde rol alan enzimlerin eksikliklerinde meydana gelmektedir [4].

Ağır zihinsel özür, nörolojik ve gelişimsel bozukluklar, mikrosefali, gelişme geriliği en tipik fenilketonüri bulgularıdır. Eğer hasta tedavi edilmezse mental ve motor gerilik başta olmak üzere bu tip klinik bulgular görülmeye başlamaktadır. Bunların dışında hastalarda sıklıkla açık renk saç, açık deri rengi, ve mavi gözlerle karakterize pigmentasyon eksiklikleri görülmektedir [5].

Hastalık diyet ile tedavi edilebilir olduğu için erken tanı önemlidir. Yenidoğanda semptom vermediğinden tanı için yüksek fenilalanin düzeyinin saptanması amacıyla laboratuvar testi yapılması zorunludur. Pozitif tarama testine sahip yenidoğanda tanıyı kesinleştirmek için fenilalanin düzeyleri nicel olarak tayin edilmektedir [6].

FKU hastalarında tedavi fenilalanininden fakir, sentetik amino asit preparatları ve fenilalanin içeriğı düşük bazı doğal gıdalar ile beslenerek kandaki düzeyi normal sınırlarda tutarak sağlanmaktadır. Ancak birçok doğal proteinin fenilalanin içermesi nedeniyle normal diyetle fenilalanin sınırını aşmamak mümkün olmamaktadır. Miktarlar kişinin kandaki fenilalanin düzeyi ölçülerek tolere edebileceğı düzeye göre verilmektedir. Fenilalanin esansiyel bir amino asit olduğu için, kanda düzeyini düşürecek aşırı tedaviden kaçınmak gerekmektedir, çünkü bu da büyüme geriliğı ve çeşitli nörolojik bozukluklara neden olmaktadır [7].

Geleneksel tanı yöntemleri arasında Guthrie testi, tandem kütle spektrometrisi (TMS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır. Bu teknikler duyarlılığı yüksek ve kısa süre içerisinde sonucun verildiğı tekniklerdir, ancak zahmetli ve yüksek maliyetlidirler [4].

Selüloz liflerinden oluşan ve doğal olarak hidrofilik özellik gösteren kağıt, fiber matrisi içine sıvının nüfuz etmesini sağlayarak mikroakışkan sistemin kağıt kullanımı için temel oluşturmaktadır. Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar, hidrofobik polimerlerin duvarları ile hidrofilik kanallardan oluşmaktadır. μ PAD'ler klinik tanı, gıda kalite kontrolü ve çevre izleme gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Dr. Whitesides ve araştırma grubunun, idrar örneklerinde glikoz ve proteinin eş zamanlı olarak saptanması amacıyla desenli selüloz kullanması ile kağıt temelli cihazların temelleri 2007'de atılmıştır ve günümüze kadar glikoz, protein, karaciğer fonksiyonunun belirteçlerini saptamak için kağıt bazlı cihazlarda tüm kan-plazma ayrımının gerçekleştirilmesiyle ilgili de birçok çalışma yapılmıştır [8].

Kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar μ PAD denilen desenli kağıtlardan yapılmaktadır. Bu sistemlerin asıl amacı ASSURED (uygun maliyet, hassas, spesifik, kullanımı kolay, hızlı-dayanıklı, ekipman gerektirmeyen, dağıtılabilir) tanı kitleri için yeni bir platform sağlamak ve bu testlerin sadeliğı ile konvansiyonel mikroakışkan cihazların özelliklerini birleştirmektir. μ PAD'lerin çalışma prensibi sıvının hareketinin genellikle kapiler etki ve buharlaşma yolu ile kontrol edilmesinden

dolayı herhangi bir dış destek ekipmanına ihtiyaç duymadan az miktarlarda sıvılar ile çalışmasıdır [8][9].

Bu tez çalışması ile, fenilketonüri hastalığının tanısında hızlı ve pratik bir yöntem geliştirirken, aynı zamanda hastaların yaşam kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmıştır. Hastaların kanında ve çeşitli dokularında birikmiş olan fenilalanin miktarı, hastalığın kalıcı bir hasar bırakmaması adına ciddi bir şekilde takip edilmelidir. Bu da, 2-4 haftada bir düzenli olarak bir tam teşekküllü bir hastanede yaptırmak zorunda oldukları çeşitli testlerin, özellikle çocuk hastalar ve kırsal kesimde yaşayan insanlar için, zaman ve maliyet açısından dezavantajlarını gözler önüne sermekte ve yaşam kalitesinin ciddi bir şekilde düşmesine sebep olmaktadır. Kağıt tabanlı cihazların üretiminde; düşük maliyetli olması, kullanım kolaylığı ve verimli üretim süreci gibi kriterler avantajlı hale gelmelerine sebep olmuştur. Bu çalışmada hedeflenen kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihaz sayesinde hastanın evde kendi başına ya da polikliniklerde renk değişimini görerek, kolaylıkla ölçüm yapabilmesini amaçlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensör bir analiz sonucu alınan yanıtın algılayıcı bir sistemle birleştirilmesini ve optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştürülmesini sağlayan analitik bir cihazdır [10]. Başka bir ifadeyle, immünoresptörler, optroitler, rezonant aynalar, glukometreler, biyoçipler ve biyobilgisayarlar olarak da adlandırılmaktadırlar [11]. Biyosensörler aynı zamanda bir hastalığın erken teşhisinde ve tedavisine yardımcı olmak üzere geliştirilen kullanımı kolay cihazları ifade etmektedir. Yani, genellikle elektriksel, termal veya optik sinyaller ile kimyasal bileşikleri tespit etmek için izole edilmiş enzimler, immünsistem, doku, organel veya bütün hücrelerin aktif olarak rol oynadığı spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanan cihazlardır [12]. Ayrıca biyosensörler, bir hedef molekülü tanımak, bir elektronik sinyalin iletimini sağlamak için malzemenin sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerden benzersiz olanlarına odaklanarak tek bir çip üzerindeki mikroakışkan cihazlar ile bir hasta başı test kiti görevi görmektedirler [13]. İlk biyosensörün ortaya çıkışı 1950'lere dayanmaktadır. Geliştirilme süreci L.C.Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) bir elektrot yardımıyla kanın içerdiği oksijen miktarını hesaplamak istemesiyle başlamaktadır. Daha sonra Clark ve Lyons tarafından geliştirilen çalışmada bir oksido indirgeyici enzim, bir platin elektrodunun yanında sandviç içinde tutulmuştur, temel hedef maddesi glikoz olan sistemde, -0.7 V'de polarize edilmiş platin katot, maddeyle enzimin reaksiyonu sonucu ortaya çıkan peroksite reaksiyon göstermiştir [14].

Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik elementleri inceleyecek olursak bunlar; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, membranda bulunan reseptörler, organeller, hücreler, dokular ve organlardır. Biyosensörlerin, eş zamanlı ve yerinde analizler için sağladıkları kullanım kolaylığı ve yüksek hassasiyet onların tıbbi tanı, çevresel görüntüleme, genetik, gıda işleme, savunma sanayi gibi birçok konuda geniş uygulamalara sahip olmasını sağlamaktadır [15][16]. Biyosensörler, sağlık endüstrisinden gelen büyük bir ivme ile şu anda %60'lık bir yıllık büyüme oranı ile hızla gelişen bir alanı temsil etmektedir. Klinik tanı ve biyomedikal sektörün dışında, gıda üretim ve analizi, proses kontrolü, biyoreaktör kontrol ve analitiği, bakteriyel ve viral tanı, ilaç analizi, endüstriyel atık su kontrolü, çevre koruma ve kirlilik kontrolü, maden işletmelerinde toksik gaz analizleri, askeri uygulamalar, tarla

tarımı ve veterinerlik gibi çok çeşitli alanlarda uygulamaları her geçen gün hızla artmaktadır. Son yıllarda çeşitli biyomedikal ve diğer alanlarda kullanılmak üzere farklı türlerde birçok biyosensör geliştirilmiştir [17].

Biyosensörler iki bileşenli sistemlerden oluşmuştur; Kan, serum, tükürük, ürine gibi analitleri ya da biyomühendislik teknikleri ile elde edilen enzim, antikor, nükleik asit, hücre ve dokular gibi hassas biyoelementleri içeren biyolojik sistemler ve analitin biyolojik elementle etkileşimi sonucu oluşan sinyalin kolay bir şekilde ölçülmesini sağlayıp aynı zamanda başka bir sinyale dönüştüren transdüser ve bu sonuçların anlaşılır, kullanıcı dostu bir şekilde gösterilmesinden sorumlu sinyal işlemcileri veya elektronik bileşen olan amplifikatörden (ekran ünitesi) oluşan fiziksel sistemler. Bu transdüser, elektrokimyasal (voltametri, amperometrik, potensiyometrik, iletken, kapasitif, impedans), optik (emilim, yüzey plazmon rezonans, kimyasal ışıldama (kemiluminesans), biyolojik ışıldama (biyoluminesans), floresans, optik fiber), piezoelektrik (kuartz kristal mikrobals, yüzey ses (akustik) dalgası), kalorimetrik, manyetik olabilmektedir [17][18].

Daha basit bir şekilde ifade edilecek olursa; biyosensörler bir hedef bölgedeki biyokimyasal reaksiyon yada spesifik bağlanma sağlayan bir biyolojik tanıma/bağlanma elementi yani ligand ve bir sinyal dönüştürücü üniteden oluşmaktadır. Başarılı bir biyosensörün sahip olması gereken önemli noktalar vardır; öncelikle, biyokatalizör, analizler için oldukça spesifik, normal depolama koşullarında stabil olmalı, örneğin kolorimetrik enzim şeritleri, daldırma çubukları ile yapılan testlerde çok sayıda deneme sonucu iyi stabilite göstermelidir. Gerçekleşen tepkime, ortamın nem, pH ve sıcaklık değerlerinden ve karıştırma gibi çeşitli fiziksel parametrelerden bağımsız olmalıdır. Bu da asgari ön işlem ile mümkün olmaktadır. Reaksiyonun içerdiği kofaktörler ve koenzimlerin enzimle eş zamanlı immobilize edilmesi bu konuda önemlidir. Reaksiyonun gerçekleşmesiyle alınan kesin yanıt, tekrarlanabilir, elektriksel gürültüden arınmış ve analitik aralık üzerinde doğrusal olmalıdır [19]. Cihazın ölçülecek analitin miktarındaki değişikliklere duyarlı olması, küçük derişim değişikliklerinde bire bir cevap verebilmesi duyarlılık açısından önem taşımaktadır. Cihazın ölçebileceği en küçük derişim tayin sınırı olarak adlandırılmaktadır. Biyosensörün güvenilirliği hangi analit için tasarlandıysa ona olan özgünlüğüyle doğru orantılı olarak değişmektedir. Cihazın sadece analiz edeceği maddedeki özgünlüğü başka reaktiflere ilgi göstermemesi doğru sonuç

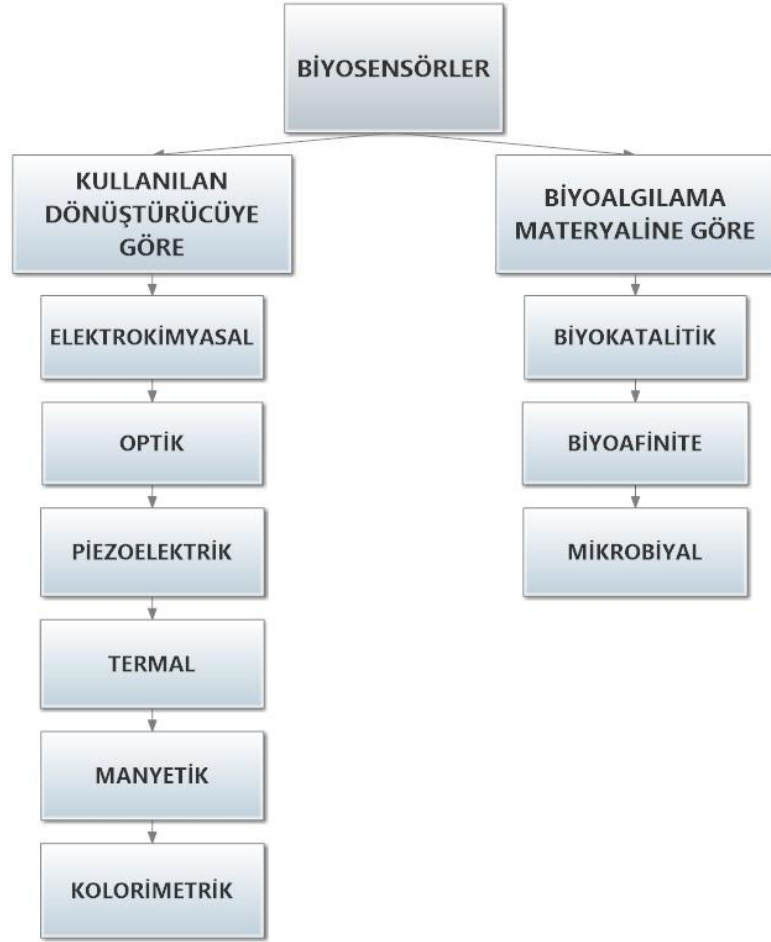
vermesini sağlamaktadır. Biyosensörler klinik durumlarda invaziv görüntüleme için kullanılacaksa, ölçüm ucunun hiçbir toksik veya antijenik etkisi olmayan, biyouyumlu olması önem taşımaktadır. Biyosensörün kullanılabilirliği açısından da kirlenme, proteoliz olma gibi duruma eğilimli olmaması gerekmektedir. Cihazın ömrü, yani performansında bir değişiklik, azalma olmadan hizmet verdiği sürenin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır. Cihazın belirli bir süre içerisinde duyarlılığının değişimlerinin dikkate alınmasıyla oluşturulan bir kalite ölçüm değeri olarak kabul edilen kararlılığı, cihazın ölçebileceği derişim aralığının belirlenmesi, cihazın sonuçlarındaki tutarlılık, ölçme hızının belirlenmesi bir biyosensör tasarımıdaki olmazsa olmaz noktalardır [20][21].

2.2. Biyosensör Türleri

Biyosensörler farklı ölçüm yöntemlerine ve farklı biyoalgılama materyellerine göre sınıflandırılmaktadır ancak genel anlamda bir sınıflandırma yapıldığında biyosensörler doğrudan ve dolaylı olarak ikiye ayrılmaktadır.

Doğrudan biyosensörler (label free); elektrokimyasal, optik ya da piezoelektrik dönüştürücüden gelen sinyallerin doğrudan, bir etiketleme yapılmaksızın analiz edilen materyalin miktarı ya da olup olmadığı hakkında bilgi vermesi şeklinde bir çalışma prensibine sahiptir.

Dolaylı biyosensörlerde analiz edilen maddenin bir enzim, floresan özellikli bir partikül gibi malzemelerle etiketlenerek farklı dönüştürücülerle okunmasıyla sinyal vermesi şeklinde gerçekleşmektedir [22] [23].



Şekil 2.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması.

2.2.1. Kullanılan Dönüştürme Araçlarına Göre Biyosensörler

Biyosensörler dönüştürme araçlarına göre elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal, manyetik ve kolorimetrik olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1).

Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, çalışma şekillerine göre potansiyometrik, amperometrik ve yarı iletkenlik sensörleri olarak üç gruba ayrılmaktadır.

Potansiyometrik sensörler; Bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulmuş bir elektrokimyasal elementte ölçülen gerilim değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki nicel analize potansiyometri adı verilmektedir. Analizi yapılacak olan türün belli derişimdeki çözeltisine daldırılan ve bu çözeltiden bir membran ile ayrılmış elektrot ile yine aynı çözeltide bulunan başka bir karşılaştırma elektrodunun arasında bir gerilim oluşmaktadır. Bu gerilim iki ayrı elektrot arasındaki logaritmik ilişkiye bağlıdır. Bu gerilimin ölçülmesi esnasında uygun bir devrenin kurulmasıyla iki elektrot arasında bir akımın olmaması

sağlanarak ölçüm yapılmaktadır. Membranın iç ve dış taraflarında bulunan çözeltilerde analizin yapılacak olduğu türün derişimi açısından bir farkla karşılaşıldığı anda gerilim farkı meydana gelmektedir ve bu farkın analizi yapılmaktadır. Bu analiz hücrenin türüne ve derişimine, ayrıca membranın cinsine ve diğer bileşenlerin cins ve miktarına da bağlıdır. Amperometrik sensörler; Çalışma mantığı yine elektrot tepkimesine bağlıdır. Mikro çalışma elektrodu olan birinci elektrot ile karşıt elektrot arasında denge geriliminden farklı bir gerilim dışardan verildiğinde sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışacağından bu olay iki elektrodun arasından akım geçmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu yöntem amperometri denir. Bu türdeki sensörlerin en çok kullanılanı oksijen elektrodudur. Yarı iletkenlik sensörleri; Bir çözeltide elektrik yükü, elektriksel bir alandan söz ediliyorsa, iyonlar tarafından taşınmaktadır. Bu bağlamda çözeltideki iletkenlik katsayısı, içerdiği tüm iyonların katkısı ile oluşmaktadır. İki elektrot arasına uygulanan bir alternatif akım, düşük frekanslarda yük taşınımı iyonların elektriksel alandaki göçü ile olurken, yüksek frekanslarda çözücünün kutuplanması nedeni ile yük taşınımına çözücünün de katkısı olmaktadır. İki elektrot arasına alternatif akım uygulanmasının temel nedeni elektrotlarda elektrolizle olabilecek madde kaybını en aza indirmek içindir. Bu tarz sensörlerin bir örneği oksijen sensörleridir. Suda çözünen oksijen molekülünün Ti metali ile oluşturduğu iyonlar nedeni ile artan iletkenliğinin ölçülmesine dayanmaktadır [24].

Optik biyosensörler

Optik biyosensörler, optik kırılma ya da elektrokemiluminesansa dayanarak oluşturulmaktadır. En çok kullanılan biyosensör sınıfıdır. Optik algılama, optik alanın bir biyotanıma elementinin etkileşimiyle gerçekleştirilmektedir. Optik biyosensörlerde hem etiketli kullanım hemde etiketsiz kullanım görülmektedir. Etiketsiz modda sinyal doğrudan analitin transdüser ile etkileşimi ile üretilmektedir. Etiket temelli bir algılama da ise sinyal doğrudan değil bir etiketin kullanımıyla kolorimetrik, floresan veya ışıldama yöntemiyle üretilmektedir. Glikoz gibi basit moleküller, etiket destekli algılama kullanılarak enzimatik oksidasyon ile tespit edilebilmektedir. Kandaki glikoz analizi, diyabetiklerin kullandığı el tipi bir ölçüm cihazı olarak bir biyosensörün ticari anlamda en başarılı uygulamalarından biridir. Optik biyosensörler, optik bir transdüser sistemle birleştirilmiş bir biyotanıma elemanını içeren kompakt analitik cihazlardır. Temel amacı, analitin derişimiyle

orantılı bir sinyal üretmektir. Bu tip biyosensörler, enzimleri, antikorları, antijenleri, reseptörleri, nükleik asitleri kullanabilmektedirler. Absorbsiyon esaslı optik enzim sensörlerinin temelini enzimatik reaksiyon sonucu absorpsiyon farkları oluşturmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan maddedeki derişim farklılıkları sonucu oluşan bu absorpsiyon farklarının belirlenmesiyle ölçüm gerçekleşmektedir. Renkli madde derişiminde meydana gelen değişimlerin nedeni genelde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan pH dalgalanmalarından kaynaklanmaktadır [25]. Floresan esaslı optik enzim sensörlerinde absorpsiyon esaslı optik enzim sensörlerinden farklı olarak floresan bir özellik gösteren belirteç madde kullanılmaktadır. Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri, ateş böceği, yıldız kurdu ve bazı deniz omurgalı ve omurgasız canlılarında, bazı mantarlarda ve bakterilerde kimyasal yolla ışık üretmesine dayanan bir ilkeye dayanmaktadır. Bu ışık lusiferaz adı verilen bir enzim ile üretilmektedir. Bir optik biyosensör çeşidi olan SPR biyosensörlerde, yüksek derecede iletken bir metal (altın) ve bir dielektrik materyal arasındaki arayüz boyunca uzanan yüzey plazmonun optik uyarılmasıyla oluşan yüzey plazmon rezonansı, sensörün arayüzündeki ince biyolojik filmdeki optik yansıma indeksindeki küçük değişiklikleri ölçmede sıklıkla kullanılmaktadır. Bu uyarılma koşulları kullanılan iletken metalin geçirgenliği, analitin geçirgenliği, dalga boyu ve anlık ışının açısı ile ilgilidir. Yüzey ile 800 nm'ye kadar bir mesafede rezonans açısının arayüzdeki dielektrik sabitindeki değişikliklere hassas olması, SPR tabanlı optik biyosensörlerin küçük partiküller üzerinde daha iyi çalışmasını sağlamaktadır. Sensör üzerinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon hassasiyet açısından önemlidir, bundan dolayı bir antijen-antikor sistemi veya DNA tamamlayıcı sistemler SPR tabanlı optik biyosensör üretiminde kullanılmaktadır [25][26].

Piezoelektik biyosensörler

Akustik temelli cihazlar olan piezoelektirik biyosensörler, elektrik, kütle ve viskoelastisitede geliştirilen teorileri temel alan bir çalışma prensibine sahiptir, elektriksel bir potansiyel uygulandığında elastik deformasyona uğrayan kristalleri kullanmaktadır. Alternatif akım kristalin elastik özelliklerine bağlı olarak bir dalga üretmektedir. Genellikle kristal kuartzdır. Kristali biyolojik bir elementle kapladığımızda analit bir reseptöre bağlanarak frekansta bir değişikliğe sebep olmaktadır. Hibrit DNA'nın, DNA bağlayıcı ilaçların ve glikoz derişiminin saptanmasında kullanılmaktadır [13][27]. Diğer tip sensörlere göre çok yönlü

uygulama sağlamaları, düşük maliyet ve kullanım kolaylığı, hassasiyetin yüksek olması ve etiketsiz olmaları kullanım alanlarını genişletmiştir. Temelde kuartz kristal mikrobals (QCM) ve yüzey akustik dalga (SAW) olarak iki tip piezoelektrik cihaz bulunmaktadır. QCM, 15MHz altındaki frekanslarda çalışırken, SAW ise genelde 100MHz frekansın üzerinde çalışmaktadır. SAW cihazları peptit tespiti, DNA sıralaması, patojenler ve pestisitlerde yüksek hassasiyete sahiptir [28].

Termal biyosensörler

Termal (kalorimetrik) biyosensörler, bir biyolojik algılama elementinin (enzim, organel, mikroorganizma, hücre, doku, nükleik asit, antikor) termometre, termopil veya termistör gibi fiziksel bir transdüser ile birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Temel çalışma prensipleri bir enzimatik reaksiyondaki ısı değişiminden yararlanarak substrat derişimini belirlemekten oluşmaktadır. Bu nedenle kalorimetrik enzim sensörleri olarak da isimlendirilmektedir. Biyokimyasal reaksiyonlar için entalpi değişimi 25-100kJ/mol aralığındadır. Termal biyosensörlerin sinyallerin açıklanmasında izotermal koşullar önemlidir. Enzimatik reaksiyonların genel olarak ekzotermik olmasından yararlanılmaktadır. Hassas ve küçültölmüş bir termistöre sahip olmaları ve kolay akış-enjeksiyon analizi sayesinde kullanışlılığı artmaktadır [29][30].

Manyetik biyosensörler

Manyetik biyosensörler, manyetik nanoparçacıkların transdüserine entegre edilmesi ya da analitle birleştirildikten sonra sensörün aktif algılama yüzeyi üzerine manyetik alan uygulanmasıyla bir sinyal alınması şeklinde çalışmaktadır. Duyarlılığı ve sinyal gürültü oranının yüksek olmasının yanında kısa süreli analiz yapılması avantajları arasındadır. Biyomoleküllerin manyetik nanoparçacıklarla etiketlenmesi çoğu numunede manyetik özellik bulunmaması nedeniyle önemli bir uygulamadır. Biyouyumlu, uygun fonksiyonel gruplara sahip ve immobilizasyonu doğru yapılan manyetik nanoparçacık spesifik olmayan bağlanmayı engelleyeceği için kullanımı işlevseldir [31][32].

Kolorimetrik biyosensörler

Kolorimetrik biyosensörler, genellikle metal iyonlarını ya da enzimleri kullanarak hızlı ve maliyetsiz sonuç veren sensörlerdir. Gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar sonucu, kolorimetrik cihazların yardımıyla renk değişikliğini algılanarak ölçüm yapılmaktadır. Sinyallerin görülebilir olması kolorimetrik sensörlerin ek bir ekipmana

ihtiyaç duyulmaksızın ölçüm yapılabilmesini sağlamaktadır. Ek olarak düşük maliyetli olması sensörün kullanılabilirliğini arttırarak son zamanlarda nanoparçacık tabanlı kolorimetrik biyosensörlerin tasarımında önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlamaktadır. Altın nanoparçacıkların yanı sıra, Ag/Au çekirdek-kabuk nanoparçacıklar, CdSe/ZnS gibi quantum noktaları, biyolojik elementlerle kullanılmaktadır [33].

2.2.2. Biyalgılama Materyaline Göre Biyosensörler

Biyosensörler biyalgılama materyaline göre, enzimlerin kullanıldığı biyokatalitik esaslı, antikor ve nükleik asitlerin kullanıldığı biyoafinite esaslı ve mikroorganizmalar, organeller, hücreler, dokular ve organları kapsayan mikrop esaslı biyosensörler olarak üç gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1).

Biyokatalitik esaslı biyosensörler

Enzim esaslı biyosensörler de diğer biyosensörler gibi bir biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm kısımlarından oluşmaktadır. Burada biyoaktif tabakada enzimler vardır. Biyosensör teknolojisi ile ilgili çalışmalar enzim esaslı biyosensörler ile başlamıştır. 1962 yılındaki Clark ve Lyons tarafından kanda glikoz tayinini ölçmeyi amaçlayan cihaz buna bir örnektir. Bir elektrokimyasal sensör özelliği gösteren bu cihazda ölçüm için enzim elektrotları kullanılmıştır [14]. Enzim esaslı biyosensör yapımındaki en önemli aşama enzimin saflaştırılmasıdır. Enzimin bulunacağı ortam şartlarının sağlanması, katalitik sabitliği, enzimin optimum çalışması açısından elzem olduğundan özellikle transdüser yüzeyine immobilizasyonu bu tip sensörlerde oldukça önemlidir. Özellikle küçük moleküle sahip maddelerin analizinde enzim sensörleri oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. İlaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, amino asitler bu tip sensörlere örnektir. Bu kadar geniş kullanım alanı olmasının en önemli nedenleri ölçümlerindeki yüksek duyarlılık, kullanılabilirlik ve farklı birçok transdüser çeşidi ile çalışılabilir olmasıdır [34][35][36].

Biyoafinite esaslı biyosensörler

İmmunobiyosensörler yani biyoafiniteye dayalı antikor sensörlerinin çalışma prensibi antijen-antikor ilişkisine dayanmaktadır. Biyobileşen önemli bir protein sınıfı olan antikorlardır. Kan plazmasının %20'sini oluşturan genel adıyla immünoglobulinler (Ig) denilen glikoprotein grubuna aittirler. IgG plasentayı geçme yeteneğinden ve kan serumunda %70 oranla en çok bulunan immünoglobulin

olmasıyla, antijenlere karşı yüksek eğilim özelliğiyle teşhis için kullanılabilirliği yüksek bir temel antikordur. Bu sensörlerin antikor – antijen ilişkisinin özgüllüğünden dolayı hassasiyeti oldukça yüksektir. Antikorlar, enzimlerin katalitik aktivitelerine sahip değildir ancak ilgili antijene enzimlerden daha güçlü şekilde bağlanmaktadır. Çalışmaları için substrat gerektiği için devamlı ve in vivo şeklinde çalışmamaktadırlar. Elektrokimyasal, piezoelektrik ya da optik transdüserlerle ilaç etken madde ölçümünde, hormon, virüs, bakteri ve pestisitlerin tayini için kullanılmaktadır [37].

DNA biyosensörlerinde biyoelement olarak tek zincirli DNA oligomerleri kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, transdüser üzerine sabitlenen DNA oligomeri ile analitin, bu bir virüs veya bakteri olabilir, sahip olduğu DNA parçasının hibridizasyonu ile oluşan çift zincirli DNA'nın verdiği sinyale dayanmaktadır. Bu elektrokimyasal ya da optik sinyalin transdüser ile okunabilir hale gelmesiyle, sensör analitin patojenitesi ya da kromozomal özelliği hakkında bilgi vermektedir [38].

Nükleik asit sensörleri genellikle genetik araştırmalar üzerine testlerde kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin tek zincirli problemlerinin olması onların sensör üzerinde tamamlanarak hibridizasyon yapmasına olanak sağlamaktadır, bu da sensör üretimi açısından oldukça yararlıdır [39].

Mikrobiyal esaslı biyosensörler

Mikrobiyal biyosensörlerin biyobileşenleri genellikle mikrobiyal hücrelerdir ancak çeşitli mikroorganizmalar, dokular, hücreler ve organeller de bu sensör grubuna dahildir. Analit substrat ya da inhibitör olabilmektedir. Bu tür sensörlerde amaç genellikle metabolik aktiviteyi izlemektir. Amperometrik, potansiyometrik veya impedans elektrokimyasal sensörlerle kullanılmaktadırlar. Aerobik olan canlılarda H₂, CO₂, NH₃ ve organik asitler gibi metabolitler ölçüm için tercih edilmektedir. Mikrobiyal hücre transdüserine immobilize edilmektedir. Mikroorganizmaların olumsuz şartlara uyum sağlama konusundaki yetenekliliği, geniş spektrumdaki kimyasal bileşikleri metabolize edebilmeleri aynı zamanda hücre içi enzim kaynağı olmalarıyla biyosensörlerin yapımında önemli bir kullanılabilirliğe sahiptir. Hücre ve mikrobiyal esaslı biyosensörler gıda güvenliğinde patojenlerin ve toksin maddelerin tespiti amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır ancak enzim esaslı biyosensörler ile karşılaştırıldığında özgüllük açısından zayıftır [40].

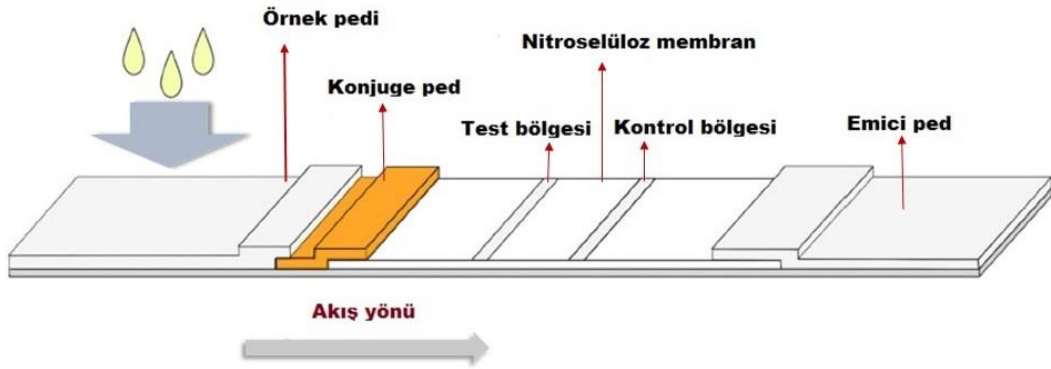
Doku ve organel esaslı biyosensörler, enzimlerin ayrı bir şekilde izole edilmeksizin kullanımını sağlamaktadır. Kompleks yapıları sebebiyle elektrotlara göre verdiği cevabın değişmesi beklenmektedir ancak katalitik sabitlik açısından önemlidir [41].

2.3. Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Cihazlar

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar, hızlı bir şekilde tanı veren yeni nesil hasta başı test cihazlarıdır. Üretimlerinin ucuz ve basit olması, hızlı sonuç vermeleri ve kolay ulaşılabilir olmaları nedeniyle kullanımları hızlı bir şekilde artmaktadır [42]. Son yıllarda dünya nüfusunun giderek artmasıyla bulaşıcı hastalıklar, diyabet, kalp hastalıkları, kanser görülme oranlarında da yükselme olmaktadır. Bir hastalığın uygun şekilde tedavi edilebilmesi için erken ve doğru tanı çok önemlidir. Ancak dünyanın her yerinde bunun kolay bir şekilde sağlanması zordur [42][43]. Hastalık tanısı için gereken teşhis cihazlarının çoğunun sınırlı kaynaklar, temel sağlık hizmetlerinin altyapı bozukluğu gibi nedenlerle ulaşılabilirliği yeteri kadar değildir. Bu tip eksiklikler aynı zamanda testlerin daha uzun süre almasını sağlamaktadır. Teşhisin hem doğru hem de hızlı ve pratik olması ihtiyacı hasta başı test cihazlarına olan ihtiyacı arttırmaktadır. Mikroakışkan temelli hasta başı test (point-of-care) cihazları geleneksel yöntemli testlerin maliyet, uzmanlık gerektirmesi, ulaşımının zor olması ve harcadığı zaman gibi dezavantajlarına çözüm olmayı amaçlamaktadır [44].

Bu testler, mikro üretim teknikleriyle hızlı bir üretim sürecine sahip, uygulaması göreceli olarak zahmetsiz ve ucuzdur. Kendi aralarında el tipi ve geniş tezgah üstü cihazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Küçük taşınabilir cihazlar, otomatik örnek hazırlanması ve analizini yapmak üzere mikro üretim teknikleriyle üretilmektedir. Büyük tezgah üstü cihazlar, üretimdeki karmaşıklığı ve boyutu azaltılmış, geleneksel laboratuvar ekipmanlarının işlevselliğine sahip, ancak minyatür versiyonlarıdır. Ek olarak hasta başı test kitlelerindeki teşhis basamağının önemi biyosensörün üretimi açısından bir takım zorlukları beraberinde getirmektedir. Çok küçük miktarda örnekler kullanılarak yapılan tanılama işlemlerinde doğru sonuca götüren en önemli basamak spesifik bağlanmaların yüksek olması ve hassasiyettir. Diğer bir zorluk ise algılama bileşenleri ve analitlerin tek bir alanda birleşerek sinyal vermesini sağlamaktır. Bu da mikroakışkan cihazın üretiminin çok iyi düşünülmüş olmasını gerektirir [45].

Daldırma çubukları ve yanal akış testleri, hasta başı testlerinin yaygın olarak kullanılan çeşitleridir. İlk kağıt tabanlı diyabet daldırma çubuğu testi, 1950'lerde idrardaki glikoz tespiti için kullanılmıştır [46]. Daldırma çubuğu testlerinin geliştirilmesine paralel olarak, yanal akış testlerinde de gelişmeler aynı tarihlere dayanmaktadır. Filtrasyon amacıyla kullanılan nitroselüloz membranların moleküler tespit için substrat olarak kullanılmaya başlanmış, idrardaki hCG'yi tespit ederek hamilelik tanısında kullanılan testlerin genel adı olan serolojik yanal akış testlerinin ilk adımları atılmıştır [47][48]. Bu tip testlerin çoğu farklı boyut, şekil ve konfigürasyona sahiptir. Son zamanlarda çoklu kanallı testler tek bir numune ile birçok test yapılmasına olanak sağladığı için oldukça revaçtadır. Yanal akış immünotestleri, doğrudan yani çift antikoru sandviç testler ve yarışmalı yani durdurucu format olarak iki ana başlığa ayrılmaktadır. Test formatında bir kart içerisinde bulunan örnek pedi, birleştirici pad, reaksiyon membranı ve bir emici pedi içermektedir (Şekil 2.2). Dikey format gibi diğer formatlar yanal testlere göre daha kompleks yapıdadır. Bu tür testlerin yürütülmesinde birkaç adım gerekmektedir; cihaz üzerine örneğin yerleştirilmesi, analit – koloidal altın konjugatlarının yıkanması ve eklenmesi gibi. Akış formatının çoklu basamağa sahip olması nedeniyle yanal testler daha rağbet görmektedir [49].



Şekil 2.2 Yanal akış testi çalışma prensibi.

Mikroakışkan temelli hasta başı test kitleri klinik uygulamalar dışında hücre büyümesinin izlenmesi ve analizi gibi moleküler biyoloji alanında, biyokimyasal ve kimyasal analizlerde düşük reaktif madde kullanımı, üretim kolaylığı, kısa cevap süresi gibi nedenlerden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Miktarların hassas bir şekilde kontrolü yüksek doğruluk sağlamaktadır [50][51].

Mikroakışkan sistemler, reaktif maddeler, biyomoleküller, kanal tasarımı, substrat seçimi, üretim elementlerinin uygun bir şekilde birleştirilmesi gibi bir dizi aşama içermektedir. Mikroakışkanların üretiminde kağıt dışında silikon, cam, elastomerler, plastikler, hidrojeller kullanılmaktadır. Bu malzemeler cihazın amacına uygun olarak kullanılacak analitin yapısına göre seçilir ve malzemenin türüne göre üretim aşaması değişmektedir [50]. Mikroakışkan cihazın üretimi için yapılacak malzeme seçiminde işlevi kadar biyoyumluluğu, fizyokimyasal özellikleri, potansiyel uygulamaları da önemlidir [52].

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre gelişmekte olan ülkeler için tanısal cihazlar "ASSURED" olmalıdır. Yani uygun fiyatlı, hassas, spesifik, kullanımı kolay, hızlı ve dayanıklı, donanımsız ve son kullanıcıya teslim edilebilir. Özel tekniklerle modifiye edilerek desenlendirilmiş kağıtlar kullanılarak yapılan mikroakışkan cihazlar, teşhis amaçlı tasarlanmış yeni bir platformdur. Geleneksel mikroakışkan cihazların hızlılığı ve kullanılabilirliğine sahipken aynı zamanda tanı amaçlı test striplerinin kolaylığı ile birleşmiş durumdadır. Bu platformda sıvı hareketi üzerinde etkin durumlar kılcallık ve buharlaşma olduğundan dolayı çok küçük hacimlerde sıvılar kullanmak yeterli olmaktadır. Böylece eski yöntemlere göre daha hızlı, basit, az örnek kullanılarak biyoanalizler yapılmasına olanak sağlamaktadır [53][54].

Kağıt kullanımı ince ve hafif olması nedeniyle taşınması kolaydır. Selüloz-polimer yapılar biyoyumludur. Proteinler, DNA ve enzimler gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen gruplara sahiptir. Renginin beyaz olması ışığı saçabildiği için kolorimetrik testler için iyi bir ortamdır. Kağıdın yanıcı olması mikropedlerin kullanım sonrası kolayca imha edilmesini sağlar [55].

Kağıda baskı yaparak modifiye etmek kolaydır çünkü esnek ve kolay şekil alabilen bir yapıdadır. Mikroped yapımında kullanılan özel filtre kağıtları geniş bir ürün yelpazesine sahiptir. İhtiyaca göre gözenek boyutlarına göre değişik işlevlere sahiptirler. Kandan plazma ayırabilmekte, iletken karbon fiberler içeren kağıtlar elektriksel ortamda ve manyetik özellikli kağıtlar manyetik nanoparçacıklarla yüksek afinite göstererek hassasiyeti yüksek test sistemlerinin oluşmasını sağlamaktadırlar [56]. Kağıt aynı zamanda analitik kimyada kromatografi testlerinde hali hazırda sıklıkla kullanılmaktadır. Kağıt kromatografisi ile amino asitlerin, protein ve antikor karışımlarının ayrımı yapılmaktadır [57]. Bunlara ek olarak pH değerlerinin tespitinde kullanılan turnusol kağıdı ve idrar testlerinde kullanılan daldırma çubuğu

testleri tanı amacıyla en sık kullanılan kağıt tabanlı test cihazlarıdır. Çevresel, jeolojik ve gıda mühendisliği analizlerinde analitlerin tespitlerinde kağıt tabanlı cihazlara sıklıkla rastlanmaktadır. Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazların bir çeşidi olan yanal akış testleri genelde immüno testlerde ve tanı amaçlı kullanılan bir çeşit biyosensördür. Etiketli olup çeşitli antikoları kullanarak ya da etiketsiz olarak çeşitli analitlerin saptanmasında kullanılmaktadırlar [58].

Geleneksel mikroakışkan cihazlar cam, silikon, PDMS ya da diğer polimerlerin içine çeşitli yöntemlerle kanalların kazınması ya da kalıplanarak üretilmektedirler. Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazların imalatı da aynı mantığa sahiptir. Kağıt üzerinde biyomoleküllerin ilerlemesini sağlayacak kanallara ihtiyaç vardır. Bu da kağıda hidrofilik ve hidrofobik kanallar açarak yapılmaktadır. Biyomoleküller kağıt üzerinde çeşitli kimyasal aşamalardan geçerek oluşturulan hidrofobik kısımlarla sınırlandırılmış hidrofilik kısımlardan ilerlemektedirler. Bu kanallar açık olabilmekte ya da bir polimer tabakası ile kaplanabilmektedir [59][60]. Kağıda uygulanan desenleme işlemi ile kanalların tasarımı yapılmakta, genişliği, uzunluğu, yerleri ve kağıdın kalınlığına göre yüksekliği belirlenmektedir. Kağıdın hidrofilik kısımlarında biyomoleküllerin ilerlemesi hangi kağıdın kullanıldığına, kağıdın gözenek boyutlarına, selüloz fibrillerin yerleşme durumuna ve kağıdın kimyasal yapısına bağlıyken aynı zamanda ortamın sıcaklığına, nem ve pH oranına bağlı olarak değişmektedir. Selüloz kısım hem sıvı analit içerisindeki biyomoleküllerin, reaktiflerin ilerlemesini hem de bazı biyolojik elementlerin filtrelenmesini ve kromatografiyi sağlamaktadır [61].

2.3.1. Kağıdın yapısı ve özellikleri

Kağıt, selüloz fibrillerin bir araya getirilip preslenmesiyle oluşan ince yapılı bir materyaldir. Günümüzde daha az maliyetli olmasından dolayı odun endüstrideki hammaddenin %90'ını oluşturmaktadır [56]. Ticari kağıtlar genellikle gözeneklilik, partikül tutma, akış hızı gibi özelliklerle sınıflandırılmaktadırlar. Filtre ve kromatografi kağıtları, minimum %98'lik bir selüloz içeriği olan yüksek kaliteli pamuk linterleri kullanılarak üretilmektedirler. Filtre kağıtlarının çoğu genel filtrasyon için tasarlanmaktadır. 2.5 mm'ye kadar partikül tutabilirler ek olarak çeşitlerine göre farklı derecelerde saflık, sertlik ve kimyasal dirence sahiptirler [9].

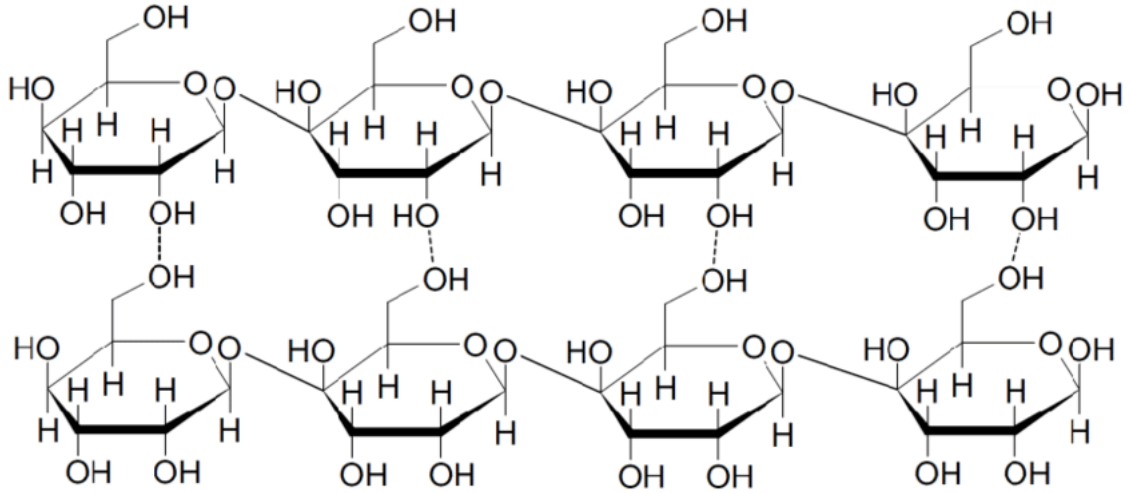
Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlarda genel olarak kromatografi ve filtre kağıtları kullanılmıştır. Düşük gözeneklilik ve yüzey gerilimi özelliklerinden dolayı baskı

kağıdının sıvının taşıdığı hidrofilik kanallar oluşturulması için uygun bir malzeme olmadığı anlaşılmıştır. Diğer yandan gözenekliliğin yüksek olması kontrolsüz difüzyona sebebiyet vereceği için bir dezavantaj da olabilmektedir. Örneğin; standart dereceden daha büyük gözenek boyutlarına sahip filtre kağıtlarının, hidrofobik bariyerlerin sıvıyı tutmasını zorlaştırarak selüloz elyaflarını şişirip kılçak akışı kısıtlaması gibi [62]. Kağıdın yüzey alanı, reaktif madde birikimi, hassasiyet, özgüllük ve tekrarlanabilirlik açısından kritik öneme sahiptir. Diğer parametreler sabit tutulduğunda, yüzey alanı kalınlık ile doğrusal şekilde artarken, gözenek büyüklüğü ile doğrusal olmayan şekilde azalır, gözeneklilikle ise doğrusal olmayan bir şekilde artar [49]. Kağıt bazlı mikroakışkan cihazlarda bir diğer önemli parametre kapiler akış hızıdır. Kapiler akış hızı, numunede mevcut analitin etkili derişiminin, akış hızındaki değişimin karesi ile ters orantılı olmasından ötürü, tahlil için anahtar bir parametredir. Kapiler akış hızı, tahlil bölgesinin konumuna bağlı olarak kritik bir öneme sahiptir. Tahlilin başladığı noktanın örnek bölgesinden uzak olması akışın yavaşlamasına neden olmaktadır [63].

Mikroakışkan cihazların yapımı için gözenekli madde seçiminde bir diğer önemli nokta gözenek büyüklüğü ve dağılımıdır. Gözenek boyutu, filtrasyon sırasında parçacığın tutulmasını sağlayan ana noktadır ve parçacığın büyüklüğü ile de ilgilidir. Geleneksel olarak membranlar nominal gözenek boyutlarına göre karakterize edilmektedir. Nominal büyüklük, filtrasyon yönündeki en büyük gözeneğin çapıdır. Deneysel olarak gözenek boyutunun belirlenmesi zar boyunca sert partiküllerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir [49]. Gözeneklilik, üç boyutlu membran yapısındaki havanın hacmiyle tanımlanan bir başka önemli parametredir. Gözenek büyüklüğü ile karıştırılmaması gereken gözeneklilik zarın boş hacmi olarak tanımlanmaktadır. Gözeneklilik membranın ıslanması için gereken toplam numune hacminin hesaplanmasında yardımcı bir parametredir. Gözenek boyutu, dağılımı ve kalınlığı sabit tutulduğunda, kapiler akış oranı, zarın gözenekliliği arttıkça doğrusal olarak artmaktadır [64]. Kağıt kalınlığı; yatak hacmi, çekme kuvveti ve sinyalin görünürlüğü gibi başka parametreleri de etkileyen bir diğer parametredir. Yatak hacmi numunenin membranda toplam bulunabileceği hacimdir ve membran boyutlarının ve gözenekliliğin bir sonucudur. Kalınlık arttıkça yatak hacmi de artmaktadır. Kağıt tabanlı mikroakışkanlarda yatak hacmi özellikle bir emici pedin yokluğunda önemlidir çünkü toplanan numunenin toplam hacmini bu kısım

belirleyecektir. Yatak hacmindeki değişiklikler testin genişliği ve kontrol çizgileri üzerinde bir etkiye sahiptir. Örneğin, reaktif maddelerin ince bir kağıt üzerine yayılması, aşağıya doğru daha fazla nüfuz etmesi nedeniyle kalın kağıda göre daha büyüktür [9][60]. Kağıdın rengi görüntü analizi açısından önemlidir. Kağıt beyaz olmalı, renk ve ton içermemelidir. Neme, yüksek sıcaklıklara ve güneş ışığına maruz kalınması nedeniyle sürekli depolanmalarda sarımsı ve kahverengiye dönüşme eğilimi vardır. Bu renk çürümesinin kabul edilebilir sınırlarının belirlenmesi ve sinyalin okunması sırasında görmezden gelinmesi doğru bir analiz için gereklidir [46].

Selüloz, kimyasal formülü $C_6H_{10}O_5$, molar kütlesi 162.14 g/mol olan bir moleküldür. Glikozidik bağlarla bağlanmış çok sayıda D-glikoz biriminden oluşan bir polisakkarittir. Yoğunluğu 1.5 g/mL, erime noktası 260 °C'dir. D-glikoz üniteleri birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Bu bağ iki glikoz ünitesinden birinin hidroksil grubundaki oksijen atomu ile diğerinin hidroksilik hidrojen atomu arasında oluşmaktadır (Şekil 2.3).

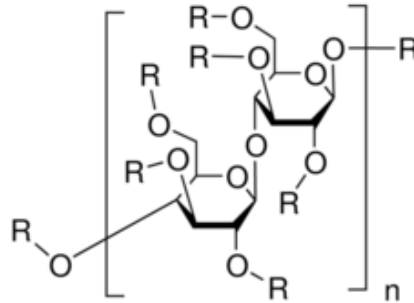


Şekil 2.3 Selülozun kimyasal yapısı [65].

Whatman No.4 filtre kağıdı, kağıt tabanlı mikroakışkan testlerde en sık karşılaşılan kağıtlardan biridir. Sıvı emiciliği, akış oranı yüksektir. Materyallerin belirlenmesinde, nitel analitik tekniklerde kullanılmaktadır. 205 μm kalınlığa, 20-25 μm gözenek boyutuna sahiptir [66]. Ağırlığı 96 g/m², ıslak dayanıklılığı 0.7 psi, kuru dayanıklılığı ise 28.4 psi olarak ölçülmektedir. Whatman selüloz filtre kağıtları alfa selüloz bileşeni en az %98 olacak şekilde yüksek kalitede pamuk ipliklerinden üretilmiştir.

Cam fiber immünokromatografi testlerinde konjuge ped ya da örnek pedi olarak kullanılmaktadır. Düzgün yüzey ve liflere sahiptir. Borosilikat camdan üretilen bu filtre kağıtları, kimyasal olarak inert olan bağlayıcı olmayan cam fiber ya da bağlayıcı olan cam fiber olabilmektedir. Yüksek yüklenme kapasitesine sahiptirler. 500°C sıcaklığa kadar dayanıklı olan bu kağıtlar hava filtreleme gibi tutuşma tehlikesi olan durumlar için de idealdir. Yüksek viskoziteye ve yüksek düzeyde partikül tutma özelliğine sahiplerdir. Mutlak bir gözenek boyutuna sahip değildir. 1.0 µm ile 1.2 µm arasında değişir. Kalınlıkları 190-290 µm, ağırlıkları 50-80 g/m² aralığındadır. Sıvının ilerleme hızı 20-45 mm/60sn, ~500 g/m² sıvı tutma kapasitesine sahiptir. Genel tasarlanma amaçları ön filtrelemedir [63].

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlarda en sık kullanılan kağıt çeşidi filtre kağıtlarıdır. Filtre kağıtlarının yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli modifikasyon teknikleriyle kağıdın özellikleri değişmektedir. Örneğin hidrofobik nitroselüloz kağıtlar enzimler, proteinler ve DNA'ya yüksek afinite göstermektedirler. Nitroselüloz kağıt, bir nitratlama asidi olan sülfürik asit veya nitrik asit ile selülozon esterlenmesi yoluyla üretilmektedir (Şekil 2.4).

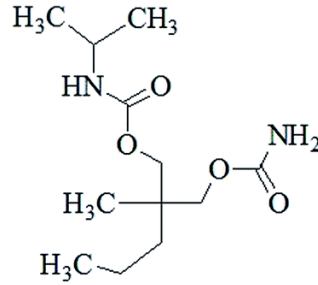


Şekil 2.4 Nitroselüloz membran yapısı. R grupları NO₂ 'yi ifade etmektedir [67].

Sülfirik asit, nitronyum iyonu üretmek için katalizör görevi görmektedir. Esterleşme derecesi reaksiyon karışımındaki su derişimi ile kontrol edilmektedir. Çözünürlük ve yanıcılık ise nitrasyon derecesine göre belirlenmektedir. Teoride esterleşme sırasında üç adet OH grubunun tamamı, NO₂ (nitro) grupları ile yer değiştirdiğinde selüloz trinitrat (%14 azot) oluştururlar. Bununla birlikte çoğu nitroselüloz bileşiği %10.5-13.5 nitrojen oluşturan dinitratlardır. Esterleşme derecesi yüksek olduğunda (nitrojen içeriği %12.6) nitroselüloz, guncotton olarak adlandırılır.

2.3.2. Kağıt tabanlı mikroakışkan testlerde kolorimetrik tespit

Moleküler ve enzimatik boyalar, tespit için kullanılan en basit ve yaygın yöntemdir. Kolorimetrik olarak algılanan sinyal bir kalibrasyon grafiği ile yarı kantitatif olarak ölçülmektedir. Bu tip testlerde reaktif maddeler önceden kağıda immobilize edilmektedir ve analitin gelmesiyle gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonucu bir renk değişikliği görülmektedir. Reaktif maddeler, enzimler, asit-baz indikatörleri veya boyalar olabilmektedir. İmmobilizasyon, enzimin yüksek aktivitesini uzun süre korumasını amaçlayan bir işlemdir. İmmobilizasyon işleminde sıklıkla tercih edilen BSA sığırlardan elde edilen bir tür serum albümin proteindir. Sığır serum albüminin selüloza bağlanmasıyla protein dostu bir yüzey oluşturulmuş olmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 BSA molekülü kimyasal yapısı [68].

BSA'nın küçük, stabil, maliyeti düşük ve kolay ulaşılabilir, orta derece reaktif bir protein olması, spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin BSA ile inkübe edilmesini ve immünohistokimyada bloklayıcı ajan olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bu protein, stabilizasyona ihtiyaç duymayan diğer enzimleri etkilememektedir [69][70]. BSA'nın spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak dışında adsorbsiyon sırasında enzimde oluşacak yapısal değişiklikleri önlemek için sensör yüzeylerini pasifleştirmekte kullanılmaktadır. BSA, selüloz için nispeten düşük aktiviteye sahiptir [71].

BSA, kağıt matris bütünlüğünü korurken aynı zamanda enzime stabilizasyonu sağlayan çok sayıda bağlantıya sahip fonksiyonel grup sağlamaktadır. BSA enzim ve selüloz arasında bir pasifleştirici görevi görür, aynı zamanda gözenekliliği ve enzim aktivitesini korur [70].

Kağıt bazlı mikroakışkanlarda kolorimetrik algılamanın ilk örnekleri yapay idrarda pH, glikoz ve protein analizleridir. Bu testlere örnek olarak glikoz analizinde iyodürün iyodine oksidasyonu sonucu kahverengi bir renk oluşumu gözlenmesi pozitif bir

sonuç olarak kaydedilmiştir. Bu renk değişiklikleri kullanılan analit ve reaktif maddelere bağlı olarak ortalama 8-10 dakika sonra sonuç vermektedir. Yanal akış testlerinin bir dezavantajı rengin homojen olmayışıdır ancak test sonucunda renk değişimi çıplak gözle algılanabilmektedir [6]. Kolorimetrik sensörler örnekteki yada kağıttaki arka plan gürültüsünden etkilenebilir, yani örneğin analit olarak kan kullanacaksa bir plazma/serum ayırıcı ile içeriğindeki eritrositlerden ayrılması gerekmektedir. Kolorimetrik testler en sık kullanılan yanıl akış testi çeşididir ve kalibrasyon şeması ile ya da akıllı telefonlar aracılığı ile kolayca ölçülebilmektedir [72].

2.4. Mürekkep püskürtmeli baskılama tekniğı ile μ PAD tasarımı

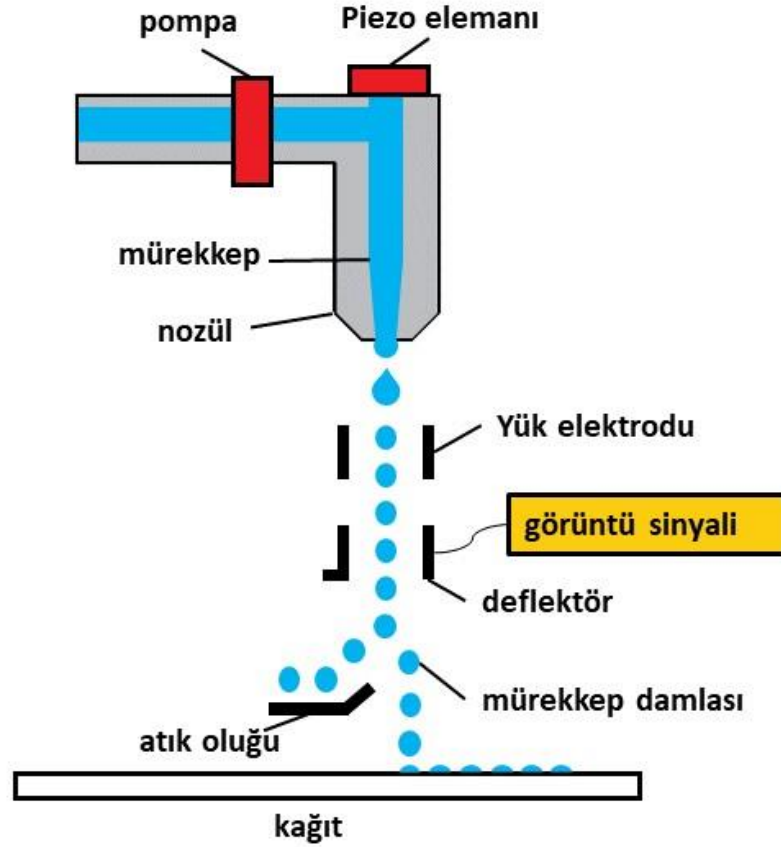
Mürekkep püskürtmeli baskılama tekniğı, kağıt tabanlı mikroakoşkanların bir çoğunda kullanılan test çözeltilisinin kağıt üzerinde algılama bölgelerine yönelmesi ve bu bölgelere renk değişimine izin veren ajanların tutturulmasıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Bu tekniğın en büyük avantajlarının başında, desen hassasiyeti, çözünürlüğün yüksek olması, hızlı ve birden çok test sisteminin basılması, maliyet açısından uygunluk, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması ve pikolitre mertebesinde hacme sahip biyolojik molekül ile çalışılabilir olması gelmektedir. İlk olarak DNA ciplerinin üretiminde nükleik asitlerin belirlenen bölgelere immobilize edilmesi amacıyla kullanılmıştır [73].

Mürekkep püskürtmeli baskı teknikleri karakteristik gözenekliliğı ve yüzey enerjisine sahip çok sayıda yüzeye baskı yapılmasını sağlamaktadır. Uygun substrat seçimi ve doğru modellemenin yapılmasıyla oldukça karmaşık yapıların hızlı, kolay ve maliyetsiz bir şekilde üretimi sağlanmaktadır. Bu teknikle belirlenen substratın üzerine kullanıcı tarafından önceden tanımlanan pozisyonda biyolojik elementlerin temassız dağıtımını sağlamaktadır [74].

Mürekkep püskürtmeli yazıcılar, nokta vuruşlu yazıcıların kullandığı metal iğneler yerine mürekkebi yüzlerce küçük tabancalarla kağıda aktarmaktadırlar. Yazdırılan karakterler yine noktalardan oluşmaktadır ancak çözünürlük çok daha yüksektir. Farklı tiplerdeki mürekkep püskürtmeli yazıcılar mürekkebi farklı şekillerde aktarmaktadırlar. Mürekkebin doğrudan malzeme üzerine aktarımı için piezoelektrik kristaller kullanılmaktadır [75]. Günümüzde mürekkep püskürtmeli yazıcılar sürekli ve isteğe bağlı olmak üzere iki çeşittir.

Sürekli mürekkep püskürtme tekniğinde, yüksek basınçlı bir pompa, sıvı mürekkebi bir tabancadan ve bir mikroskopik ağızlıktan geçirerek sürekli bir akış yaratmaktadır. Piezoelektrik kristal, mürekkebi gönderen tabanca gövdesi içerisinde titreşirken akustik bir dalga oluşturur ve sıvı akışının düzenli dalgalara dönüşmesine neden olur [76].

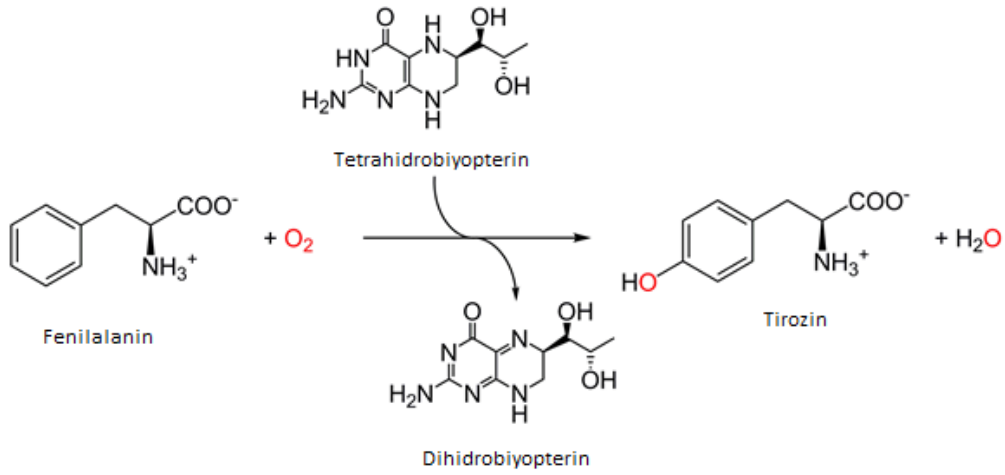
İsteğe bağlı mürekkep püskürtmeli yazıcılar çalışma prensiplerine göre termal ve piezoelektrik olarak iki çeşittir. Termal yazıcılarda, her biri fotolitografi tekniği ile oluşturulmuş ısıtıcılar içeren yazıcı kartuşları bulunmaktadır. Isıtıcı elemanın içinden geçen akım sayesinde mürekkep hızlı bir şekilde buharlaşarak, büyük bir basınç artışına neden olan bir baloncuk oluşmasını sağlamaktadır. Bu baloncuk bir miktar mürekkebi dışarıya iterek damlamasını sağlamaktadır. Bu teknikte baloncuğun oluşması için mürekkebin uçucu bir bileşene sahip olması şarttır [77]. Piezoelektrik özellikli yazıcılarda ısıtma elemanı yerine her bir nozülün arkasında bir piezoelektrik materyal bulunmaktadır (Şekil 2.6). Bir voltaj uygulandığında piezoelektrik materyal şekil değiştirerek sıvıda bir basınç etkisi oluşturmakta ve bir miktar mürekkebin akmasını sağlamaktadır. Piezoelektrik yazıcılar, uçucu bir bileşene gerek olmaması ve mürekkep artığı birikmesi ile ilgili bir sorun olmaması nedeniyle termal yazıcılardan daha geniş bir mürekkep çeşidine izin vermektedir, ancak baskı kafaları üretim nedeniyle daha pahalıdır. Yazıcının çalışma sürecinde nozüllerden her nokta için 0-8 damlacık arasında mürekkebi yalnızca gerektiğinde uygulanacak şekilde yönlendiren bir yazılım kullanılmaktadır [78].



Şekil 2.6 Drop-on-demand mürekkep püskürtmeli yazıcının çalışma prensibi.

2.5. Fenilketonüri

Fenilketonüri, yenidoğanda sık rastlanan kalıtsal metabolik bir hastalıktır. Fenilalanin metabolizmasında rol oynayan fenilalanin hidroksilaz adı verilen enzimin görevini yerine getirememesi sonucu vücutta fazla birikmesi hastalığın genel sebebidir. Fenilalanin rutin diyet sırasında vücuda alınan proteinlerin yapıtaşlarından biridir. PAH (fenilalanin hidroksilaz) enziminin eksikliği sonucu vücut için esansiyel bir amino asit olan fenilalanin metabolize edilemez, bu da vücut sıvılarında (kan, idrar...) fazla miktarda birikmesine sebep olmaktadır [1]. Fenilalanin hidroksilaz fenilalanini tirozine dönüştüren bir enzimdir (Şekil 2.7). FKU fenilalanin hidroksilazı oluşturan gendeki bir kusurdan kaynaklanmaktadır. Yükselen fenilalanin seviyesi bireyde bilişsel işlevi olumsuz yönde etkilemektedir [79].



Şekil 2.7 Fenilalanin - tirozin dönüşümünün kimyasal yapısı [4].

Fenilketonürinin belirti ve bulguları hastalığın hangi aşamada olduğuna bağlı olarak değişmektedir. En şiddetli formu klasik FKU olarak bilinmektedir [5]. Bebeklerde klasik FKU birkaç aya kadar güçlü bir belirti göstermemektedir, bu nedenle teşhis edilmesi zordur. Bu noktada yenidoğan testleri oldukça önem kazanmaktadır. Tedavi edilmemesi durumunda kanda biriken yüksek fenilalanin miktarı yenidoğanda kalıcı beyin hasarına yol açmaktadır. Nöbetler, gelişimde gecikme, davranış bozuklukları ve öğrenme güçlüğü şeklinde bulgulara sahip bu hastalıkta, bireyler vücutlarında birikmiş fazla miktarda fenilalanin nedeniyle küf veya fare benzeri bir kokuya sahiptirler. Bunlara ek olarak klasik FKU'ya sahip çocuklar aile bireylerine göre daha açık saç ve ten rengine sahiptirler ve egzama gibi cilt rahatsızlıklarına eğilimli olmaktadır. Hasta bireylerin saç ve ten rengindeki değişimin sebebi, melanin pigmenti oluşumunun ilk önemli basamağı olan tirozinin, tirozinaz enzimi ile hidroksilasyonunun (Şekil 2.8) FKU'da mevcut olan yüksek fenilalanin derişimi nedeniyle yarışmalı olarak inhibe edilmesidir [79].

2.5.1. Fenilketonürinin tarihsel geçmişi

Fenilketonüri hastalığının geçmişi 1920'lere dayanmaktadır. Norveç'te yaşayan ve metabolik hastalıklar konusunda çalışmakta olan Dr. Asbjorn Folling, kendisine tedavi amaçlı getirilen zeka engelli iki çocuğun idrar örneklerine, normalde diyabet hastalarına uyguladığı, idrarda keton tespiti yapan bir ferrik klorür solüsyonu eklediğinde daha önce görmediği koyu yeşil bir renkle karşılaşmıştır. Bu renk değişikliğinin sebebi fenilpirüvik asittir. 1934 yılında Folling, ilk bulgularla paralel, zekasal gelişim bozukluğu ile ilişkili bir biyokimyasal bozukluk tanımlamıştır. Bu çalışmalar Lionel Penrose tarafından yorumlanarak tanımlanan biyokimyasal bozukluk "fenilketonüri" olarak adlandırılmıştır. 1950'lerde hastalığın enzim eksiliği sonucu ortaya çıktığının anlaşılmasıyla diyet tabanlı tedaviler önem kazanmaya başlandı [83][84]. 1960'larda fenilketonürinin ilk rutin görüntüleme testleri yapılmaya başlandı. Dr. Robert Guthrie tarafından geliştirilen ve daha sonra yıllarca kullanılacak Guthrie testi kan örneklerindeki fenilalanin derişiminin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu testle, FKU'nun izlenmesi ve diyetle kontrol altına alınması adına önemli bir adım atılmıştır [85]. 1980-90 yıllarında FKU'ya sebep olan PAH geni üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve PAH geniyle ilişkilendirilen 500'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. 2000'lerde National Institutes of Health FKU hastalığının sonuçları üzerine bir konferans düzenlemiştir ve yaşam için diyet önerisiyle FKU'da yeni bir çağ başlatmıştır [86].

2.5.2. Fenilketonürinin epidemiyolojisi

Dünyada görülen FKU vakalarının ortalama sayısı farklı insan popülasyonlarına göre değişiklik göstermektedir. Japonya ve Finlandiya gibi gelişmiş ülkelerde hastalığa 120.000 doğumda 1 rastlandığı tespit edilmiştir. Birleşik Krallık'ta 15.000 doğumda 1 oranla en sık görülen amino asit kaynaklı metabolik bozukluktur. Fenilketonüri hastalığının görülme sıklığı Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da 1/10.000-1/30.000 iken Türk toplumunda bu hastalık çok daha yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan yenidoğan tarama programları kapsamında taranmakta olan fenilketonürinin görülme sıklığı Sağlık Bakanlığının yenidoğan tarama program kayıtlarına göre 1/2600 dür. Buna göre her yıl ülkemizde ulusal yenidoğan programı ile tespit edilen yaklaşık 350-400 yeni fenilketonüri bebek dünyaya gelmektedir [87][88][89].

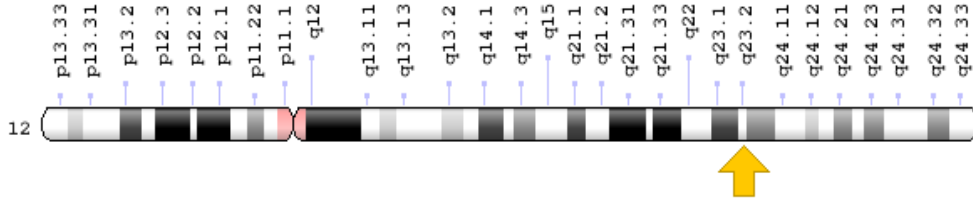
2.5.3. Fenilketonürinin sınıflandırılması

Fenilketonüri için klasik ve klinik açıdan daha hafif alt tipler tanımlanmaktadır. Klasik FKU'da hastanın kanındaki fenilalanin düzeyi >20 mg/dL olarak ölçülmektedir. Ayrıca idrarda fenilalanin metaboliti olan fenilketonlara rastlanmaktadır. Hafif alt tiplerde ise kanda fenilalanin düzeyi 2-20 mg/dL arasındadır ve idrarda fenilketonlar yoktur. Nörolojik hasarın önlenmesi için kandaki fenilalanin düzeyi >6 mg/dL üzerine çıktığı zaman izlenmesi şarttır. Kandaki fenilalanin miktarlarına göre hastalığın derecesi şöyledir; 2-10 mg/dL orta hiperfenilalaninemidir, FKU hastası olarak kabul edilmemektedir ancak takibi önemlidir. 10-20 mg/dL orta dereceli FKU, >20 mg/dL ise klasik FKU olarak kabul edilmektedir [86]. Kanda bulunan 2 mg/dL ve altı fenilalanin miktarında birey hasta değildir. 6 mg/dL değerinde takip önemlidir ve uygun diyetin uygulanması gerekmektedir. 7-11 mg/dL aralığı orta derece fenilketonüri kabul edilmektedir. Bu aralık birey açısından önemlidir çünkü hastalığın belirtileri ortaya çıkmaya başlamıştır, geri dönüşümsüz hasarın olmaması için hastalığın takibi ve tedavi kaçınılmazdır. 12 mg/dL ve üzerinde artık beyinde geri dönüşümsüz hasar meydana gelmektedir ve diyet tedavisiyle normal fenilalanin değerlerine inmesi beklenmemektedir. 20 mg/dL klasik tip FKU kabul edilmektedir.

2.5.4. Fenilketonürinin moleküler genetik açıdan incelenmesi

FKU, otozomal resesif bir metabolik bozukluktur. Yani, bir bireyin bu hastalığın semptomlarına sahip olabilmesi için hem anneden hemde babadan iki adet FKU alel genine ihtiyacı vardır. Her iki ebeveyninde FKU taşıyıcısı olması durumunda sahip olacakları herhangi bir çocuğun hastalığa yakalanma olasılığı %25, taşıyıcı olma olasılığı %50, sağlıklı olma ihtimali ise %25'tir. FKU, hepatik enzim bir enzim olan fenilalanin hidroksilazın genetik kodlanmasındaki bir hata ile karakterize edilmektedir.

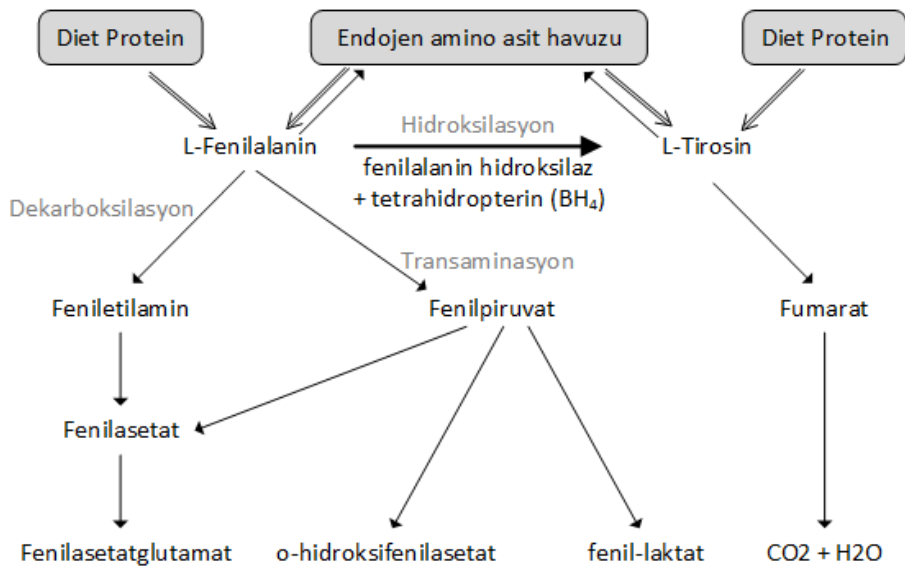
PAH geninin birinci kodonunda meydana gelen bir mutasyon sonucu translasyon başlatılamamakta, bundan dolayı fenilalanin hidroksilaz eksikliği oluşmaktadır (Şekil 2.9). Bu enzim fenilalanini tirozine çevirmektedir. PAH aktivitesi azaldığında fenilalanin birikmekte ve idrarda fenilpiruvat (fenilketon olarak da bilinir) haline dönüştürülmektedir [84].



Şekil 2.9 PAH geninin 12. kromozomdaki lokasyonu [90].

PAH geninde gerçekleşen 500'den fazla mutasyon tanımlıdır ve bu mutasyonlar enzim aktivitesinde bozukluk ile sonuçlanmaktadır. Mutasyonların çoğu ekzon adı verilen, genin ifade olan yerlerindeki tekli baz değişiklikleri olup tek bir amino asit değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Bazı mutasyonlar ise, intronlarda yani ifade olmayan bölgelerde görülmektedir. FKU, tek bir gendeki mutasyon sonucunun bireydeki majör etkisinin bir örneğidir. Bu durum alışılmamıştır çünkü tek bir gendeki mutasyonun hastalığa sebep olması durumu nadirdir. FKU mutasyonları, birey fenilalanin diyetine devam ettiği sürece latent durumdadır. Bu da genlerin çevresel etkileşiminin bir örneğidir. Tek bir FKU aleli taşıyıcıları, hastalığın semptomlarını göstermemektedir, ancak bir fungal toksin olan okratoksin A'ya karşı bir derece korundukları tespit edilmiştir. Bu da, belirli popülasyonlarda alellerin, seçici bir avantaj sağlaması bakımından kalıcılığını açıklamaktadır. Yani heterozigot olmanın avantajlı olduğu görülmektedir [91].

2.5.5. Fenilketonüri biyokimyasal açıdan incelenmesi



Şekil 2.10 L-fenilalanin metabolizması [4].

Fenilalanin hidroksilaz enzimi fenilalanini tirozine çevirmektedir. Bu reaksiyon gerçekleşmediği takdirde fenilalanin birikirken tirozin eksikliği oluşmaktadır. Aşırı fenilalanin minör yoldan glutamat ile bir transaminaz yolundan fenilketonlara metabolize edilebilmektedirler (Şekil 2.10). Metabolitleri fenilasetat, fenilpirüvat ve fenetilamin içermektedir [79]. Fenilketonürinin klasik FKU dışında daha az şiddetli formları bulunmaktadır; bunlar hafif FKU ve hafif hiperfenilalaninemidir. Hastalığın farklı bir tipi olan hiperfenilalaninemi, ayrıca bir koenzim olan tetrahidrobiopterin (BH4) sentezinde veya indirgenmesinde rol alan enzimlerin eksikliklerinde de dihidrobiopterinden (BH2) tekrar BH4 sentezlenmesinde görev alan dihidrobiopterin redüktaz enziminin eksikliğinde meydana gelebildiği görülmektedir. Bu mutasyonlar BH4 sentezini önlemekte ve fenilalanin hidroksilaz enzimi koenzim olarak BH4'e ihtiyaç duyduğu için indirekt olarak fenilalanin derişimini yükseltmektedir [4].

2.5.6. Geleneksel tanı yöntemleri

Guthrie testi, geleneksel tanı yöntemlerinin başında gelmektedir. Kanda bulunan içinde fenilalaninin de bulunduğu metiyonin, tirozin, lösin ve histidin amino asitlerinin belirlenmesi için uygulanan bir inceleme yöntemidir. Yenidoğandan bebek beslendikten sonra ilk 24 saatten sonra bir filtre kağıdına topuk kanı alınarak fenilketonüri taraması yapılmaktadır. Ortamda fenilalanin olmadan üreyemeyen *Bacillus subtilis* isimli bakterinin ekiminin yapıldığı ve üremenin gözlenmesiyle hastalık tanısının konulduğu bir tarama testidir [85].

Tandem kütle spektrometresi, yüksek vakum sistemi varlığında örnekte bulunan bileşiklerin iyonlara dönüştürülmesiyle moleküler ağırlıkları ve yük oranlarına göre sıralanmasıyla kandidatif bilgiler vermektedir. Bu teknik ile az miktarda plazma örneğinden hangi amino asidin ne kadar derişimde bulunduğu güvenilir bir şekilde ölçülmektedir [92].

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyümekte ve kolonun etkinliği arttırılmış olmakta, bu çok sıkı kolondan hareketli fazın geçmesi belirli bir hız gerektirmektedir. Duyarlılığı yüksek ve kısa süre içerisinde bir amino asidin nicel analizini veren bir tekniktir, ancak zahmetli ve yüksek maliyetlidir [93].

2.6. Kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz ile kanda fenilketonüri tayini

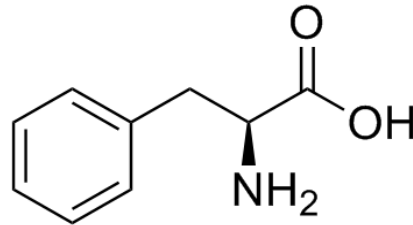
Laboratuvar tabanlı testlerin uygulama sırasında çeşitli gereksinimlere sahip olması, maliyet ve zaman açısından zorluk getirmektedir. Bu durum kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlara olan ihtiyacı arttırmaktadır. Kağıt tabanlı cihazların düşük maliyeti, üretim kolaylığı, tek kullanımlık olması, hızlı sonuç vermesi ve sonuçların kolay anlaşılır olması kullanım alanlarının hızla büyümesine yol açmaktadır [42][94]. Kağıdın diğer mikroakışkan cihaz üretiminde kullanılan silikon vb. materyallere göre ucuz ve işlenmesinin kolay olması tercih edilmesinde önemli bir etkidir. Whitesides grubunun 2007 yılında idrar örneklerinde glikoz ve proteinin eş zamanlı olarak tespitinde desenli selüloz kullanmasıyla kağıt tabanlı cihazlara ilgi artmıştır [53]. Birçok metabolik hastalıkta olduğu gibi fenilketonüri hastalığında da takip çok önemlidir [95]. Fenilketonüri hastalarının şiddetli nörolojik sorunlara sebep olmaması adına hayatları boyunca kanlarındaki fenilalanin oranına dikkat etmeleri gerekmektedir. Bu bireyler için en iyi tedavi yöntemi diyetdir. Hastaların diyetlerinde kullandıkları sentetik proteinler ile yeteri kadar fenilalanin ve tirozin almaları sağlanırken aynı zamanda kanlarındaki fenilalanin oranının 2-6 mg/dL aralığında kalması gerekmektedir [96]. Bu nedenle hasta bireyler için kanlarındaki fenilalanin oranının kolay, hızlı, maliyetsiz ve ulaşılabilir şekilde ölçülmesi oldukça önemlidir [97]. Mikroakışkan cihaz üzerinde fenilalanin miktarının algılanması Şekil 2.11'de görülen temeli iki basamaklı bir enzimatik-kolorimetrik reaksiyona dayanmaktadır [98].



Şekil 2.11 Fenilalanin derişimine bağlı formazan sentez reaksiyonu [99].

Campbell ve grubunun geliştirdiği reaksiyonun ilk aşamasında fenilalaninin NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotidin oksitlenmiş formu) varlığında pheDH (fenilalanin dehidrojenaz) enzimi ile katalizlenerek, NADH (nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş şekli), phePyr (fenilalanin pirüvat) ve NH_4^+ (amonyağın protonlanmış formu) oluşturduğu görülmektedir. İkinci aşamada NBT (nitroblue tetrazolyum) ve

mPMS (metoksifenazin metosülfat) ile tepkimeye giren NADH tekrar NAD⁺a yükseltgenir ve tetrazolyum tuzunun tepkimeye girmesiyle mor renkli formazan ürünü meydana gelir. Thiessen ve grubu tarafından fenilalanin tespit reaksiyonlarında NBT kullanılmasının, test kitinin oda sıcaklığında saklanabilirliğinin ve üretilen mor renkli formazan ürününün kağıt bazlı mikroakışkan bir cihaz için çok uygun bir seçenek olarak bulunmuştur. Thiessen ve arkadaşları aynı zamanda iki reaksiyonu ve mevcut reaktif maddelerin pH'dan nasıl etkilendiğini de incelemiştir. Enzimatik reaksiyon en iyi pH 9.1 olan bazik ortamda gerçekleşmektedir. Fenilalanin dehidrojenaz en iyi performansı bazik pH'da gösterirken, NAD⁺ daha asidik pH'da daha iyi çalışmaktadır. NAD⁺ yüksek pH'da indirgenerek NADH oluşturmakta ama deiyonize suda stabilitesini korumaktadır. Bu durumdan ötürü pheDH pH 9.3 olan tampon çözelti içerisinde hazırlanmış ve böylece ilk reaksiyonun pH 9.1'de gerçekleşmesi sağlanabilmiştir. Kolorimetrik reaksiyon için en iyi pH değerinin nötral değer üzerinde olduğu bulunmuştur. Ancak mPMS ve NBT en iyi asidik pH'da çalışmaktadırlar. Bu nedenle İlk reaksiyondaki yüksek pH'ı düşürmek için tetrazolyum tuzu (NBT) ve elektron medyatörü (PMS) pH 6.3 tampon içinde hazırlanmıştır [100].



Şekil 2.12 Fenilalaninin kimyasal yapısı [101].

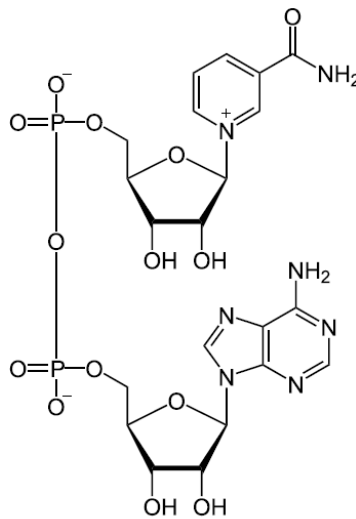
L-fenilalanin (L-2-Amino-3-fenilpropionik asit)(Şekil 2.12), organizma tarafından sentezlenemeyen ancak esansiyel bir amino asittir. Bu nedende dışardan besin maddeleriyle alınması gerekmektedir. Fenilalaninin aspartam eldesinde diyet amaçlı kullanımı da mevcuttur [102]. Vücutta tirozine dönüşmesi nörotransmitter maddelerin (epinefrin, dopamin ve norepinefrin) üretiminde kullanılmaktadır. Büyük, nötr amino asitler grubuna giren fenilalanin, L-tipi amino asit transportu (LNAAs) yoluyla kan-beyin bariyerinden geçebilmektedir. Fenilalanin dışında bu gruptaki diğer amino asitler; dopamin ve norepinefrinin öncüsü olan tirozin ve seratoninin

öncüsü olan triptofandır. Fenilalanin miktarının fazla artması L-tipi amino asit transportunda rekabete yol açmaktadır. Tirozin ve triptofanın kan-beyin bariyerini aşamaması sonucu nörolojik bozukluklar ortaya çıkmaktadır.

Amino asitlerdeki amino gruplarının amonyak ve keto asitlere ayrılması ile iki aşamada gerçekleşen, mikrozomal enzim aracılığıyla oluşan yükseltgenme tepkimeleri oksidatif deaminasyon olarak tanımlanmaktadır [103]. Mikrozomal enzimler karaciğerin parenkim hücrelerinde bulunan endoplazmik retikulumlarda yaşamını sürdüren, biyotransformasyon sırasında yükseltgenme, indirgenme reaksiyonlarını yöneten enzimlerin ortak adıdır [103].

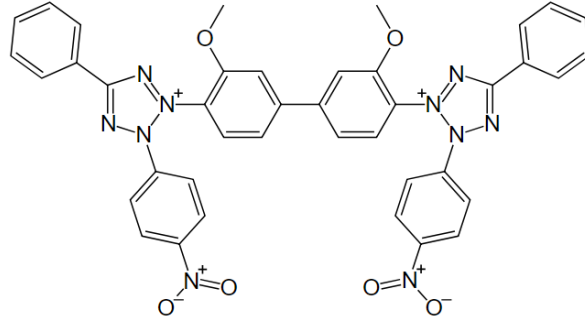
L-fenilalanin dehidrojenaz, amonyak, fenilpiruvat ve NADH oluşturmak için NAD⁺ bağımlı, tersinir olarak L-fenilalaninin oksidatif deaminasyonunu katalize etmektedir. Bu enzim, fenilalaninin fenilalanin pirüvata oksidatif deaminasyonunu tersinir olarak sağlayan NAD⁺ bağımlıdır. Fenilalanin miktarından yeterli NADH oluşabilmesi için yeteri miktarda NAD⁺ bulunması önemlidir. 1 ünite pheDH enzimi 30°C'de dakikada 1 µmol NADH dönüştürmektedir [6].

NAD⁺ (Nikotinamid adenin dinükleotit), tüm canlı hücrelerde bulunan bir koenzimdir. Metabolizmada, redoks tepkimelerinde elektron taşıyıcı olarak görev yapmaktadır. NAD⁺ oksitleyici bir maddedir. Diğer moleküllerden elektron alarak indirgenmektedir. Bu reaksiyon sonucu indirgeyici bir ajan olarak kullanılacak NADH oluşmaktadır. Fizyolojik pH'da anyon durumundadır (Şekil 2.13) [104].



Şekil 2.13 NAD⁺ molekülünün kimyasal yapısı [105].

Tetrazolyum tuzları, farklı renklerde ve çözünürlüklerde son ürünler oluşturmaktadırlar. Kolorimetrik, kağıt tabanlı bir mikroakışkan cihaz için ideal tetrazolyum tuzu çözelti içinde çözünebilirliğine sahip ancak çözünmez bir son ürüne sahip olmalıdır. Bu noktada en kullanışlı tetrazolyum tuzları XTT ve NBT olarak seçilmiştir. XTT -20°C 'nin altında depolanması gereken, turuncu renkte bir formazan boyası üreten ve reaksiyon sırasında dönüşüm oranı NBT'ye kıyasla düşük olan bir tetrazolyum tuzudur. NBT (nitroblue tetrazolyum) stabilitesinin yüksek olması ve beyaz, gözenekli membran üzerinde kolayca görülebilen koyu mor renkli formazan boyasına dönüşmesi nedeniyle tetrazolyum tuzu olarak seçilmiştir (Şekil 2.14) [106][107].



Şekil 2.14 Nitroblue tetrazolyum tuzunun kimyasal yapısı [108].

mPMS (1-Metoksi-5-Metilfenazinyum Metil Sülfat), fotokimyasal olarak kararlı, çok yönlü bir elektron taşıyıcısıdır. 5-metilfenazinyum metil sülfat (PMS) gibi NADH ile tetrazolyum tuzu (NBT) veya bir enzimatik elektrik hücresinin elektrodu gibi çeşitli elektron alıcıları arasında elektron transferine aracılık etmektedir. NAD bağımlı dehidrojenazların analizi için bir elektron aracı olarak kullanılmaktadır. mPMS çözeltisi pembe renge sahiptir ve standart redoks potansiyeli yaklaşık olarak $+0.063\text{ V}$ 'dur [109].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar, kağıt seçimi ve ön işlemler, enzim ve diğer biyolojik elementlerin kağıda immobilizasyonu, çalışma derişimlerinin belirlenmesi, µPAD sistemin üretimi ve test sisteminin validasyonu şeklinde özetlenebilir.

3.1. Kullanılan malzemeler ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan %98 reaktiflik derecesine sahip L-Fenilalanin (L-phe), 1-metoksi-5-metilfenazinyum metil sülfat (mPMS) %95'lik, β-Nikotinamid adenin dinükleotit sodyum tuzu (NAD⁺), *Sporosarcina spp.*'dan izole edilmiş L-Fenilalanin dehidrojenaz (pheDH), BIS-TRIS propan (BTP), kağıtlara uygulanan ön işlem için MES tampon çözeltisi, sığır albümin serum (BSA), dipotasyum fosfat (K₂HPO₄), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve pH ayarlamaları için kullanılan hidroklorik asit (HCl), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS), sodyum hidroksit (NaOH) ve Whatman No.4 filtre kağıdı Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA)'den temin edilmiştir.

Nitroblue tetrazolyum klorür (NBT) Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Cam fiber filtre membranı RB65 Kinbio Tech. (San Diego, CA, USA) ve nitroselüloz kağıt Millipore (Bedford, MA, USA)'dan temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak tampon çözeltilerden BTP, 200 mM çalışma derişiminde oda sıcaklığında deiyonize suyla pH 9.3 ve pH 6.3 olarak iki farklı pH derecesinde hazırlanmıştır. Bu tampon çözeltilerden pH 9.3, test kitinde reaksiyonun ilk basamağı olan enzimatik aktivitede, pH 6.3 olan çözelti ise reaksiyonun kolorimetrik basamağında görev almaktadır. Gözenekli materyalde fenilalanin dehidrojenaz enziminin immobilize edileceği bölgeye önce pH 9.3'lük BTP; mPMS ve NBT boyasının emdirildiği bölgeye pH 6.3'lük BTP 10 µL hacimlerinde emdirilmiştir.

Çözeltiler +4°C'de muhafaza edilmiştir ve iki ayda bir yeniden hazırlanmıştır. Molekül ağırlığı 282.33 g/mol olan BTP'den her iki pH değeri için de, 1 M NaOH ve %36'lık HCl kullanılmıştır.

L-phe, aromatik yapıda ve deiyonize suda kolay çözünmeyen bir amino asittir. Bu nedenle fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS) oda sıcaklığında farklı derişimlerde hazırlanmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir. 1.1 mg/dL – 22 mg/dL aralığında değişen derişimde 8 adet fenilalanin çözeltisi hazırlamak için molekül ağırlığı 165.19

g/mol olan fenilalanin PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. PBS çözeltisi pH 7.4 değerinde, 200 ml hacminde 10 mM hazırlanmıştır.

Molekül ağırlığı 817.65 g/mol olan NBT, mPMS ile birlikte renk değişimini sağlayarak formazan ürünü oluşturan tetrazolyum tuzudur. Test sisteminin daha önceden pH 6.3 BTP tamponu emdirilmiş bölgesinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. NBT çözeltisi, oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 1.2-4.8 mM derişim aralığında, pH 6.3 BTP çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır, +4 °C'de ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir. Hazırlanan solüsyon iki haftalık periyotlarla yenilenmiştir.

Molekül ağırlığı 336.36 g/mol olan mPMS, test sisteminin belirlenen bölgesinde tetrazolyum boyası ile kolorimetrik reaksiyonda elektron taşıyıcı olarak görev almaktadır. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda, pH 6.3 BTP tampon içerisinde, 1.2 mM hazırlanmıştır ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

pheDH, fenilalanin varlığında renk değişimini gerçekleştirecek olan enzimdir. Test sisteminde 2-4 ünite aralığında kullanılmıştır. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 2 mL pH 9.3'lük BTP tampon içerisinde 50 ünitenin tamamı kullanılarak çözülmüştür. -20°C'de muhafaza edilmiştir.

NAD⁺, reaksiyonun ilk basamağında pheDH enzimi varlığında fenilalanini fenilpirüvata dönüştürmesi amacıyla kullanılmaktadır. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda, deiyonize suda çözünerek 20-40 mM derişim aralığında hazırlanmıştır. -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Molekül ağırlığı 66.463 g/mol olan BSA, kağıtlara uygulanacak ön modifikasyon işlemi için hazırlanmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir. %2'lik hazırlanan BSA çözeltisi içerisinde ön modifikasyonun ilk basamağı gerçekleştirilmiştir. Kağıtlar, BSA çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra ikinci aşamaya geçilmiştir.

Ön modifikasyon işleminin ikinci aşamasında kullanılan dipotasyum fosfat (K₂HPO₄) çözeltisi ile spesifik bağlanmayan BSA'ların ortamdaki uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Molekül ağırlığı 174.2 g/mol olan bu madde, deiyonize suda çözünerek 5 mM derişiminde hazırlanmıştır. pH derecesi %36'lık HCl ile 7.5'a ayarlanmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir.

İşlemin son aşamasında kullanılan SDS çözeltisi ile, hidrofobikleşmiş kağıtların tekrar hidrofilleştirilmesi sağlanmıştır. Molekül ağırlığı 288.5 g/mol olan sodyum dodesil sülfat (SDS) %0.01 hazırlanmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Sıvı ortamda parametrelerin optimizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, test sonucunda görülmesi gereken renk şiddetinin istenilen düzeyde olması için pheDH enzimi, fenilalanin ve NBT tuzunun farklı derişimleri kullanılarak sıvı ortamda denemeler yapılmış ve reaktif maddelerin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.2.1. Kullanılan tampon çözeltinin pH değerinin fenilalanin dehidrojenaz enzimi üzerindeki etkisi

Enzimatik ve kolorimetrik reaksiyonların gerçekleşmesi sırasında kullanılan biyolojik elementlerin pH'dan nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu nedenle reaksiyonun pH 7.5, pH 9.3, pH 10.5 ve pH 11.5 değerlerindeki performansları incelenmiştir.

Uygun bulunan pH değerine sahip tampon belirlendikten sonra ilk enzimatik reaksiyondaki enzim miktarının reaksiyon süresine etkisinin incelenmesi için pheDH enziminin çalışma miktarının etkisi incelenmiştir. 0.0125, 0.025 ve 0.05 ünite olarak üç farklı miktarda enzim ile reaksiyonun 8. dakika sonunda renk değişiklikleri karşılaştırılmıştır. Her bir derişim ile en az üç deneme yapılmıştır. Enzimin uygun çalışma miktarı seçilmiştir.

3.2.2. NBT için uygun çalışma derişiminin belirlenmesi

Uygun enzim miktarının belirlenmesine ek olarak tetrazolyum tuzunun miktarının değişmesinin kolorimetrik cevaba olan etkisi de araştırıldı. pheDH enzimi maliyet açısından yüksek bir enzimdir. Bu nedenle optimum renk değişikliği için daha kolay ulaşılabilir olan tetrazolyum tuzunun miktarındaki değişikliklerle daha az miktarda enzim kullanarak istenilen renk değişiminin, en kısa sürede görülmesi amaçlanmıştır. NBT için belli bir derişim aralığı belirlenerek renk değişiminin en yoğun olduğu ve en optimum sürede renk değişimi veren derişim seçilmiştir. Derişimin doğru seçilmesi reaksiyonun kolorimetrik olan ikinci kısmında mPMS elektron alıcısı ile birlikte formazanın meydana getirdiği sinyalin gücü açısından önem taşımaktadır. 1.2 mM, 2.4 mM ve 4.8 mM derişimlerin üçer farklı denemesi yapılarak uygun derişim seçilmiştir.

3.2.3. Test sisteminin özgüllüğünün incelenmesi

Enzim ve NBT tuzunun uygun derişimlerine karar verilmesine eş zamanlı olarak çalışılacak farklı fenilalanin derişimleri de belirlenmiştir. Bu derişimler hastalığın şiddetine göre sınıflandırıldığı değerler doğrultusunda seçilmiştir. 2 mg/dL ve altı değerde hastalık gözlenmemektedir. 4-6 mg/dL diyet ve takibin gerekli olduğu

aralıktır. 7-11 mg/dL aralığı orta düzey fenilketonüri hastalığını ifade etmektedir. 12 mg/dL ve üzeri durumlarda geri dönülemez hasar meydana gelmektedir. 20 mg/dL klasik fenilketonüri olarak adlandırılmaktadır. Bu sebeple, 1.1, 2.2, 4, 6.5, 10, 13 ve 22 mg/dL derişimler denenerek her bir derişimin verdiği renk değerleri ve farkları gözlemlenmiştir.

Bu aşamada ek olarak, renk oluşumunun kendiliğinden ya da çeşitli fiziksel dış etkenlerden oluşup, yanlış pozitif cevap vermesi olasılığına karşı kontrol denemeleri yapılmıştır. pheDH, NBT, mPMS, NAD⁺, fenilalanin ve glisin içeren kontrol grupları bu reaktif maddelerden birini içermeyen beş farklı şekilde oluşturulmuştur. pheDH, NBT, mPMS ve NAD⁺ kontrollerinde kullanılan fenilalanin miktarı sabit tutularak 16 mg/dL belirlenmiştir.

İlk eppendorfta pheDH kontrolü yapılmıştır. BTP tampon üzerine 10 µL NAD⁺, 10 µL fenilalanin koyulmuştur. 6 dakika bekleme süresinden sonra 2.5 µL mPMS ve 2.5 µL NBT eklenmiştir. Renk değişimi olup olmadığı gözlenmiştir.

Daha sonra NBT kontrolü yapılmıştır. Tetrazolyum boyasının NAD⁺ varlığında oda sıcaklığında ve ışıklı ortamda hatalı bir renk oluşumu verip vermediği incelenmiştir. BTP tampon üzerine 0.05 ünite pheDH, 10 µL NAD⁺, 10 µL fenilalanin koyulmuştur. 6 dakika bekleme süresinden sonra 2.5 µL mPMS eklenmiştir. Renk değişimi olup olmadığı gözlenmiştir.

Diğer üçüncü eppendorfta mPMS kontrolü yapılmıştır. BTP tampon üzerine 0.05 ünite pheDH, 10 µL NAD⁺, 10 µL fenilalanin koyulmuştur. 6 dakika bekleme süresinden sonra 2.5 µL NBT eklenmiştir. Renk değişimi olup olmadığı gözlenmiştir.

Diğer bir kontrol ise NAD⁺ için oluşturulmuştur. BTP tampon üzerine 0.05 ünite pheDH ve 10 µL fenilalanin koyulmuştur. 6 dakika bekleme süresinden sonra 2.5 µL mPMS ve 2.5 µL NBT eklenmiştir. Renk değişimi olup olmadığı gözlenmiştir.

Son kontrol grubu glisin için oluşturulmuştur. BTP tampon üzerine 0.05 ünite pheDH ve 10 µL NAD⁺ koyulmuştur. 6 dakika bekleme süresinden sonra 2.5 µL mPMS ve 2.5 µL NBT eklenmiştir. Glisin eklendikten sonra renk değişimi olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.4. Test süresinin optimizasyonu

Kontrol grupları incelendikten sonra reaksiyonun birinci basamağı olan enzimatik aktivitenin gerçekleşmesi için gereken süre incelenmiştir. Kullanılan enzim

miktarıyla ters orantılı olan bu süre kolorimetrik sonucun oluşma hızı ve belirlenen sürede alınan en yoğun renk için önemli bir parametredir. Kullanılan enzim miktarı sabit tutularak 0.05 ünite olarak belirlenmiş ve üç farklı varyasyon denenmiştir. 0, 6 ve 10 dakika sürelerde bekletilen enzimatik aşama sonucu kolorimetrik yanıtlar incelenmiştir.

3.3. Çalışmada kullanılacak uygun test materyalin seçimi ve μ PAD tasarımı

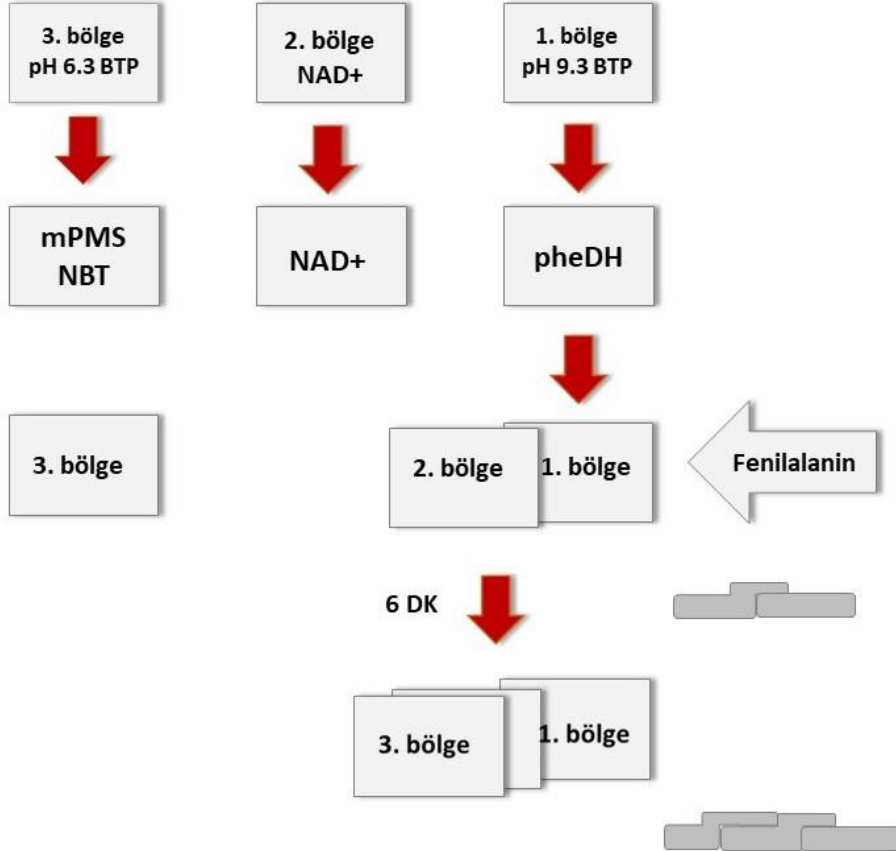
Uygun reaktif madde derişimleri belirlendikten ve kontrol denemeleri sıvı ortamda tamamlandıktan sonra reaksiyonun yüksek performanslı olarak gerçekleşmesi için en uygun pH değeri ve süreye karar verilmiştir. Daha sonra çalışmada kullanılacak olan selüloz materyalin seçimi yapılmıştır.

Çalışmada Whatman No.4 filtre kağıdı, cam fiber filtre membranı ve nitroselüloz membran üzerinde denemeler yapılmıştır. Sıvıyı tutma kapasiteleri, emicilikleri, yatak hacimleri, kimyasal yapılarındaki farklılıklar, biyolojik molekülün immobilizasyon özellikleri ve kalınlıklarının birbirlerinden farklı olması ve tamponların kağıtlar üzerinde yayılma miktarları göz önünde bulundurularak kağıt üretimleri ve boyutları birbirlerinden farklı oluşturulmuştur.

İlk olarak nitroselüloz membran üzerinde bir deneme yapılmıştır. Önceden PBS çözeltisi içerisinde hazırlanan 2-4-8-16 mg/dL derişimlerde fenilalanin çözeltileri kullanılmıştır. Eşit belirlenmiş alanlara önce 200 mM, pH 9.3, BTP tamponu 10 μ L damlatılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika kuruması sağlanmıştır. Tamponların üzerine, 0.05 ünite pheDH enzim ve 10 μ L, 20 mM NAD⁺ damlatılmıştır. Oda sıcaklığında, 30 dakika kuruması sağlandıktan sonra, 3 μ L 1:1 oranında karıştırılmış 2.4 mM mPMS – NBT karışımı damlatılmıştır. Oda sıcaklığında, ışıksız ortamda, 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Son aşamada farklı derişimlerdeki fenilalanin örnekleri kağıda damlatılmıştır. 5, 10 ve 30. dakikalardaki renk değışimleri incelenmiştir.

Çalışmanın nitroselüloz kağıt üzerinde nasıl gerçekleştiği incelendikten sonra Whatman no.4 filtre kağıdına geçilmiştir. Bu kısımda üretimde değışiklik yapılmıştır. Belirlenen boyutlarında üç adet kağıt kesilmiştir. Bu kesilen üç ayrı parça, reaktif ajanların bulunduğu üç ayrı bölgeyi temsil etmektedir. İlk bölgeye 5 μ L, 200 mM, pH 9.3 olan BTP tamponu emdirilmiştir. İkinci bölgeye 5 μ L, 40 mM NAD⁺ ve üçüncü bölge olarak belirlenen alana ise 5 μ L, 200 mM, pH 6.3 BTP tamponu emdirilmiştir. Kağıtların oda sıcaklığında 6 saat kuruması sağlanmıştır. Birinci bölgeye 0.05 ünite pheDH, üçüncü bölgeye 3 μ L 1:1 oranında karıştırılmış 2.4 mM mPMS – NBT

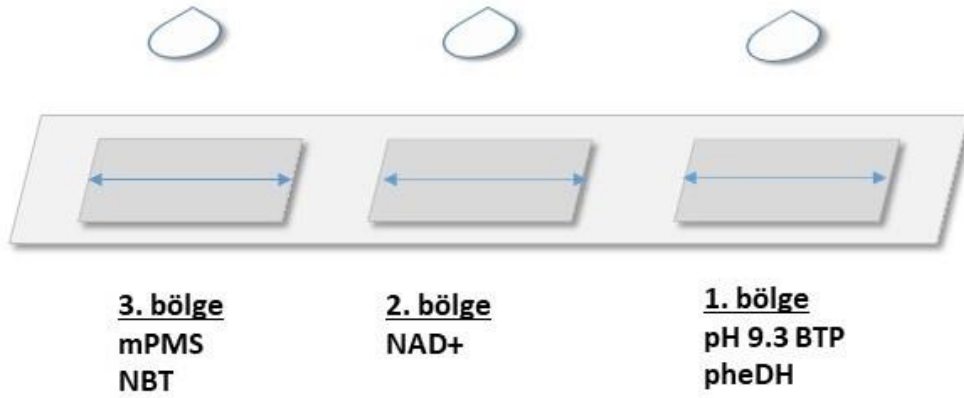
karışımı damlatılmıştır. Yine oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Kurumaları sağlandıktan sonra NAD⁺'ın bulunduğu ikinci bölge, birinci bölgenin üzerine üzerine 1 mm çakışacak şekilde yerleştirilmiştir. 16 mg/dL fenilalanin çözeltisinden 10 µL damlatılmış ve 6 dakika sonunda üçüncü bölge ikincinin tam üzerine gelecek şekilde yerleştirildikten sonra 2. ve 8. dakikalardaki renk değişimi incelenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Whatman No.4 membranda test sisteminin oluşturulması ve membranların yanal kesiti.

Whatman filtre kağıdında çalışılan diğer bir üretimde kağıt Şekil 3.2'de görüldüğü gibi tek parça halinde kullanılmıştır. Önceki Whatman denemesinde üç ayrı parça halinde hazırlanan reaksiyon bölgeleri bu düzenekte, reaktif maddelerin emdirilmesiyle kağıtta kapladıkları hacim göz önüne alınarak belirlenmiştir. Kağıda herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. 2 mm x 100 mm boyutlarında kesilen işlem görmemiş Whatman kağıt kullanılmıştır. Kağıda önce birinci bölgeyi oluşturmak için 200 mM, pH 9.3 değerinde 10 µL BTP tamponu, ikinci bölgeye, 20 mM derişimde 10 µL NAD⁺ ve üçüncü bölgeye 200 mM pH değeri 6.3 olan 10 µL BTP tamponu

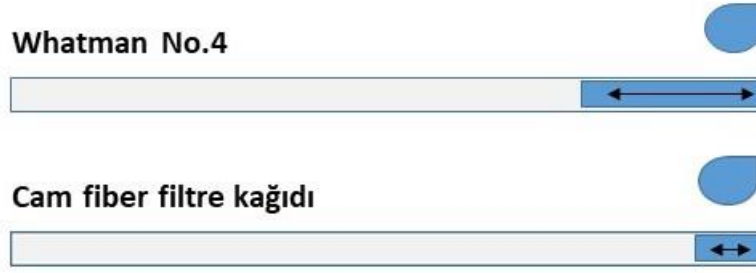
emdirilmiştir. Böylece bölgelerin sınırları oluşmuştur. Oda sıcaklığında 6 saat kuruması sağlandıktan sonra, birinci bölgeye 0.05 ünite pheDH enzimi, üçüncü bölgeye 1:1 oranında karıştırılmış 2.4 mM mPMS – NBT karışımı 3 µL damlatılmıştır. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 2 saat kurumaya bırakılmıştır. 16 mg/dL derişimdeki fenilalanin çözeltisinden yeterli miktarda damlatılmıştır. 2. ve 8. dakikalardaki renk değişimi incelenmiştir.



Şekil 3.2 Whatman No.4 membranda tek aşamalı test sisteminin oluşturulması.

Daha önce Whatman filtre kağıdında denenen üç ayrı parça içeren düzenek cam fiber filtre membranına uygulanmıştır. Birinci, ikinci ve üçüncü bölgeleri oluşturmak için 2 mm x 3 mm boyutlarında üç adet cam fiber filtre membranı kesilmiştir. Whatman No.4 membranda yapılan birinci test sistemi ile aynı üretim metodu uygulanmıştır (Şekil 3.1). Yukarıda uygulanan üretim işlemleri tekrarlandıktan sonra, 16 mg/dL derişimindeki fenilalanin çözeltisinden 10 µL damlatılarak 2 ve 8 dakika sonunda renk değişimi incelenmiştir.

Cam fiber filtre membranında yapılan bir diğer incelemede, daha önce Whatman filtre kağıdında denendiği gibi (Şekil 3.2) önce 2 mm x 100 mm boyutlarında kesilmiştir. Cam fiber filtre membranının Whatman filtre kağıdına göre yatak hacmi daha geniş olduğundan aynı miktarda kullanılan tampon ve çözeltilerin membran üzerinde yayılma miktarlarının daha az olduğü görülmüştür. Bu nedenle bölgeler Whatman membrandakine göre 1/3'ü kadar daha kısa kalmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Whatman No.4 filtre kağıdı ile cam fiber filtre membranı arasındaki yatak hacmi farkı.

Cam fiber filtre membranı bu nedenle farklı boyutlandırılmıştır; kağıdın eni 100 mm yerine 55 mm olarak belirlenmiştir. Üretim işlemleri 16 mg/dL fenilalanin çözeltisinden yeterli miktarda damlatılarak 2. ve 8. dakikalardaki renk değişimi incelenmiştir.

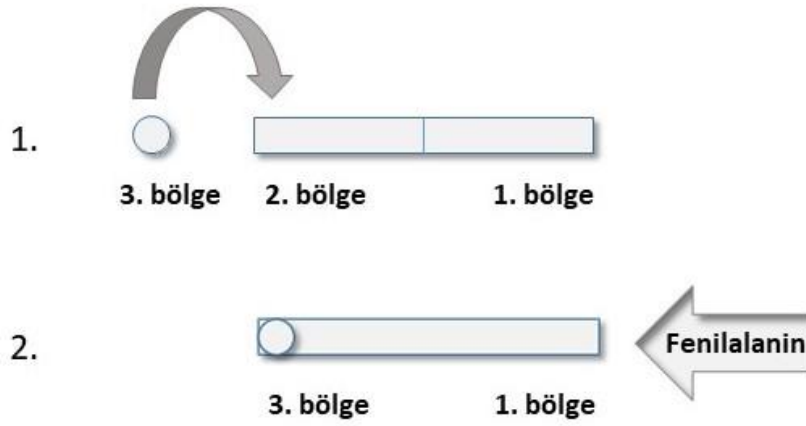
3.3.1. μ PAD tasarımında kullanılacak materyallere uygulanan yüzey modifikasyonları

Deneyde kullanılacak selüloz materyal seçildikten sonra, birtakım ön işlemlerle muamele edilerek sinyalin güçlenmesi sağlanmıştır. Bu ön işlemlerle, örnek çözeltisinin membrandaki akışının homojen ve istenilen düzeyde olmasıyla, test kitinden en yüksek verimin alınması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 2 mm x 100 mm boyutlarında tek parça halinde kesilen cam fiber filtre membranına ön modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Tampon çözeltiler ve reaktifler emdirilmeden önce ön işlemin birinci aşaması olarak membran, %2'lik hacimde hazırlanan BSA solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 5 mM'lık derişime sahip zayıf bazik bir solüsyon olan K_2HPO_4 pH 7.5 solüsyonda 20 dakika bekletilmiştir. Bu aşamada membrana fiziksel tutunmayan BSA'ların temizlenmesi sağlanmıştır. Sonraki aşamada membranın, %0.01 SDS çözeltisi içerisinde 20 dakika boyunca yıkanarak işlem sırasında hidrofobik olan kağıdın yeniden hidrofilik olması sağlanmıştır. Tamamen kuruması sağlandıktan sonra bölgeleri belirlemek için tampon çözeltiler ve reaktif maddeler önceden belirtildiği gibi emdirilmiştir. Son olarak, 16 mg/dL derişimdeki fenilalanin çözeltisinden yeterli miktarda damlatıldıktan sonra 2. ve 8. dakikalardaki renk değişimi incelenmiştir.

Test kitinin cam fiber kullanılarak yapılan farklı bir tasarımında ise, önceki denemede üç bölgesinin de aynı tek parçada bulunduğu cam fiber filtre membranı

iki parça halinde tasarlanmıştır. Tetrazolyum tuzunun ve mPMS'in emdirildiği üçüncü bölge, çapı 2 mm olan bir disk şeklinde tasarlanmıştır. Geriye kalan birinci ve ikinci bölgeler, 2 mm x 200 mm boyutlarında kesilmiştir. Her bir parçadan dört adet hazırlanmıştır. Bu parçalara tampon çözeltiler ve reaktifler emdirilmeden önce belirtilen ön işlem uygulanmıştır. Sonrasında ise bölgeler aynı reaktif maddeler ve yöntem ile hazırlanmıştır. 16 mg/dL derişimdeki fenilalanin çözeltisinden birinci bölgeye 10 µL damlatıldıktan sonra üçüncü bölge, ikinci bölgeye yerleştirilmiş, 2 ve 8 dakika sonunda renk değişimi incelenmiş, optik karakterizasyon yöntemiyle hesaplanarak sensörün çalışma performansı belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Cam fiber filtre membranının farklı tasarımında uygulama.

3.3.2. Geliştirilen sensör sisteminin çalışma performansının belirlenmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında, karar verilen malzeme derişimleri ve membran ile sensör performansı incelenmiştir. 2 mm x 100 mm olarak boyutlandırılan membrana yukarıda belirtilen ön işlem ve üretim yöntemi uygulanmıştır. Son aşamada, yedi farklı fenilalanin derişiminin cam fiber filtre membranında uygulaması yapılmıştır. Her derişim üçer kez denenmiştir. Kağıtlardan ilk üçü kontrol olarak kabul edilmiştir. Diğerlerine sırasıyla 1.1 mg/dL, 2.2 mg/dL, 4 mg/dL, 6.5 mg/dL, 10 mg/dL, 13 mg/dL ve 22 mg/dL fenilalanin çözeltilerinden yeterli miktarlarda damlatılmış ve 2 ve 8 dakika sonunda renk değişimleri incelenmiştir. Sonuçların optik karakterizasyon yöntemi kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Renk değişimi verdiği tespit edilen en düşük derişim değeri hesaplanmıştır.

Optik karakterizasyon yöntemi

Çalışmada test kitleri ve örnekler Samsung marka 12 MP, odak uzunluğu 26 mm, sensör çapı 1/2,5 inç, piksel boyu 1,4 µm, dual pixel PDAF kamera lensi kullanılarak ışıksız ortamda fotoğraflanmıştır. Plazma ve fenilalanin çözeltileri için yapılmış deneylerin derişime bağılı olarak renk değişimlerinin kantitatif olarak analiz edilebilmesi için ImageJ programı kullanılmıştır. Bu amaçla her bir set veri kendi içinde mümkün olduğunca homojen beyaz ışık altında fotoğraflanmıştır. İki grup deney de sağlıklı veri setleri oluşturulabilmesi için üçer kez tekrarlanmış ve herbir tekrar ayrı birer fotoğraf olarak kaydedilmiştir. Beyaz ışık kompanzasyonu herbir fotoğraf için ayrı ayrı yapılmıştır.

ImageJ programında içe aktarılan herbir fotoğraf önce 8 bit gri ölçek formata döndürülmüş ve her bir derişim bağımlı olarak sonuç vermiş olan her bir test stripin ölçüm noktasından yazılımın ROI (region of interest) özelliği kullanılarak beşer adet rastgele büyüklüklü ölçüm alanı seçilmiş ve herbir alanın ortalama piksel şiddet değeri program üzerinden ölçülmüştür. 8 bit gri ölçek fotoğrafta 28-1=255 mutlak beyazı, 0 ise mutlak siyahı ifade etmektedir. Geriye kalan tüm renkler bu iki değer arasında bir gri tonu olarak dağılır. Orijinal resimlerde, deney sonunda renk değişimi oluşan test noktaları bu ölçekte bir gri değer alır. Test kitindeki renk yoğunluğu arttıkça grinin tonu koyulaşmaktadır. 0 derişimindeki ölçüm değeri ideal bir sistemde 255 olarak beklenmektedir, ancak arka plan kağıdının ideal beyaz olmaması, kamera sensörünün sınırlı ayırma gücü ve ışığın sonsuz olmaması ve nedeniyle bu değer hiçbir zaman 255 değerine ulaşamaz. Bu nedenle 0 kompanzasyonu, 0 mg/dL derişimli örneğin ölçülen değerinin offset kabul edilmesi yoluyla yapılmıştır. Belirlenen ofset değeri tüm ölçüm değerlerinden çıkartılmış ve bu sayede nümerik değer ile koyuluk arasındaki ters korelasyon da düzeltilmiştir. Sonuçlar kısmında verilen grafiklerin oluşturulması sırasında;

- Tüm derişim değerlerindeki kağıtlardan alınan beşer rastgele ölçümün ortalaması alınmıştır.
- Kendisi de dahil olmak üzere tüm ortalama değerler 0 mg/dL ortalamasından çıkartılmıştır.
- Herbir test kağıdı için alınmış beşer adet ölçüm sonucunun en düşük ve en yüksekleri arasındaki fark hata değeri olarak kabul edilmiştir.

- Üçer kere tekrarlanmış olan her iki grup değer için de yukarıdaki işlemler tekrarlanmıştır.
- Her derişim değeri için elde edilen üçer adet test sonucu ve bu test sonuçlarının hata değerin ortalamaları tekrar alınarak elde edilen sonuçların derişime bağıli olarak grafiğı çizilmiştir.

3.3.3. Geliştirilen kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın kan plazması ile validasyonu

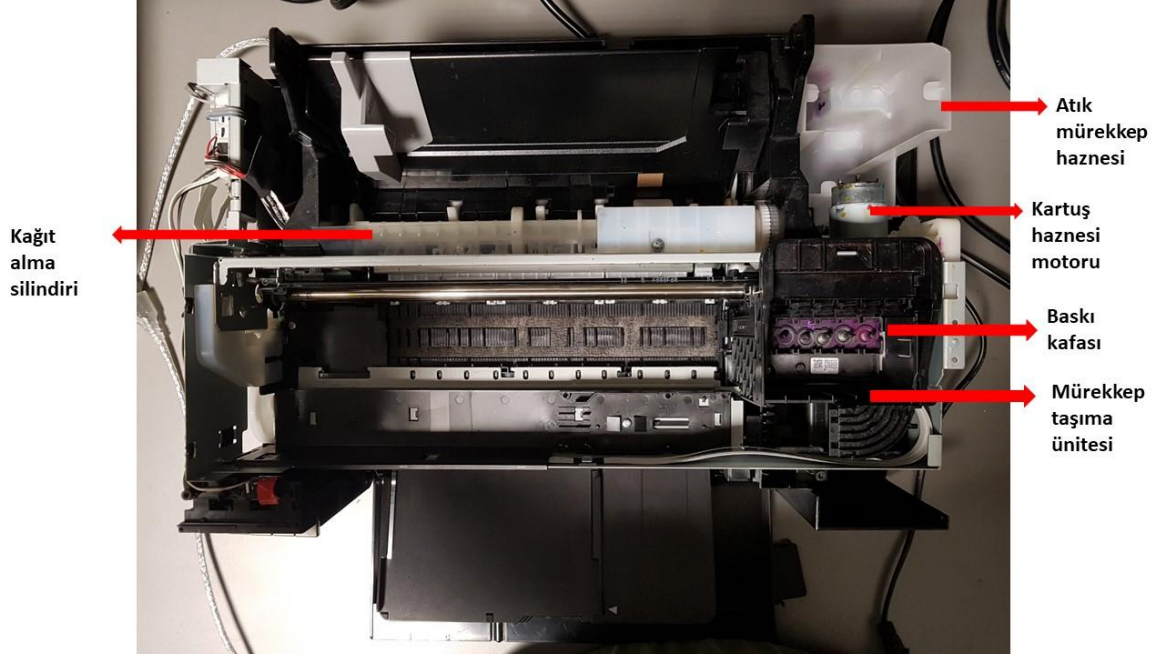
Malzemelerin istenilen çalışma koşulları belirlendikten ve kullanılacak selüloz materyal seçimi yapıldıktan sonra kağıt tabanlı mikroakışkan cihazın gerçek matriks ortamındaki (kan plazması) cevapları bu kısımda incelenmiştir. Cam fiber filtre kağıtlara sırasıyla 0 mg/dL, 4 mg/dL, 10 mg/dL ve 22 mg/dL fenilalanin derişimine sahip matriks ortamlarından yeterli miktarda örnek bölgesine damlatılmıştır. 2 ve 8 dakika sonundaki renk değışimleri incelenmiştir.

3.3.4. Test kitinin mürekkep baskılama yöntemi ile üretimi

Kullanılacak selüloz materyale karar verildikten ve yüzey modifikasyonları tamamlandıktan sonra kağıdın yazıcı ile üretimi aşamasına geçilmiştir. Çalışmanın bu kısmında kullanılacak olan Epson L805 mürekkep püskürtmeli yazıcıya istenilen şekilde modifikasyonlar uygulanmıştır. 5.760 x 1.440 çözünürlüğe sahip, isteğe bağıli mürekkep atışı yapan piezoelektrik özellikli bu yazıcı 1.5 pikolitre mertebesinde damlacık bırakma özelliğine sahiptir.

3.3.4.1. Kullanılacak yazıcının modifikasyonu

Biyolojik moleküllerin selüloz materyal üzerine basılması için önce kartuş modifikasyonları yapılmıştır. Bu bağlamda önce yazıcının kapak kısmı çıkartılmış, yazıcı bilgisayara bağlanmıştır. Yazıcının sağ yan kısmında altı farklı kartuşu bulunmaktadır. Bu kartuşlar sarı, siyah, açık camgöbeğı, açık magenta, magenta ve camgöbeğı renklerinden oluşmuştur. Kağıda basılacak olan biyolojik elementler bu altı renk tarafından temsil edilmiştir. Uygulama sırasında çok küçük hacimde biyolojik materyaller kullanılacağı için mürekkep damperi adaptörü, kartuş kısımları ve onları mürekkep haznelere bağlayan gri boruları tamamen çıkartılmıştır. Kartuşlar yerine, onların bağıli olduğu mürekkep haznelere yerleştirilen poliüretan tüpler kullanılmıştır. Özdeş bu tüpler 100 µL sıvı hacmi alabilecek şekilde boyutlandırılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Test kitinin üretiminde kullanılan yazıcı ve bölümleri.

3.3.4.2. Test materyaline biyolojik moleküllerin basılması

Cam fiber filtre membranına basım yapılmadan önce, yazıcıya ait yazılımla kağıt çeşidi ve basım kalitelerinin optimizasyonunun ve baskı kafasına yapılan modifikasyonların denenmesi amacıyla önce standart A4 kağıt üzerinde denemeler yapılmıştır.

Modifikasyon sonrası A4 kağıt üzerinde yazıcının kendi mürekkepleri ile bir deneme yapılmıştır. Yazıcı mürekkeplerinin kodları kullanılarak Microsoft PowerPoint programında çizilen renklerin çıktısı alınmıştır. Bu çizimler renk kodları kullanılarak yapılmıştır. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi sarı renk için; rgb(255,255,0), siyah renk için; rgb(0,0,0), açık camgöbeği rengi için; rgb(224,255,255), açık magenta rengi için; rgb(231,139,231), magenta rengi için; rgb(255,0,255) ve camgöbeği rengi için; rgb(0,255,255) renk kodları kullanılmıştır.



Şekil 3.6 Renk kodlarına göre mürekkep renkleri.

Mürekkep ağızlıklarına takılan poliüretan tüplerin içerisine şırınga yardımıyla mürekkepler sırasıyla koyulmuştur. Basım aşamasına geçmeden önce yazıcının özelliklerinden kafa temizliği seçilmiştir. Kafa temizliği aşamasıyla tamamen yazıcı tarafından çekilen mürekkeplerin, tanınması ve mürekkep haznelерinin alt kısmına geçmesi sağlanmıştır. Kafa temizliği aşaması bittikten sonra mürekkepler poliüretan tüplere tekrar doldurulmuş, boş bir şırınga yardımıyla hafif basınç uygulayarak iyice emilmesi sağlanmıştır. A4 kağıt üzerine basım aşaması uygulanmıştır. Yazıcı özelliklerinden Epson Premium Glossy ve düz kağıt seçenekleri yüksek ve standart kalitede uygulanmış, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Mürekkep denemesinden sonra %10 izopropanol içeren deiyonize su ile yazıcının mürekkep hazneleri tamamen temizlenmiştir.

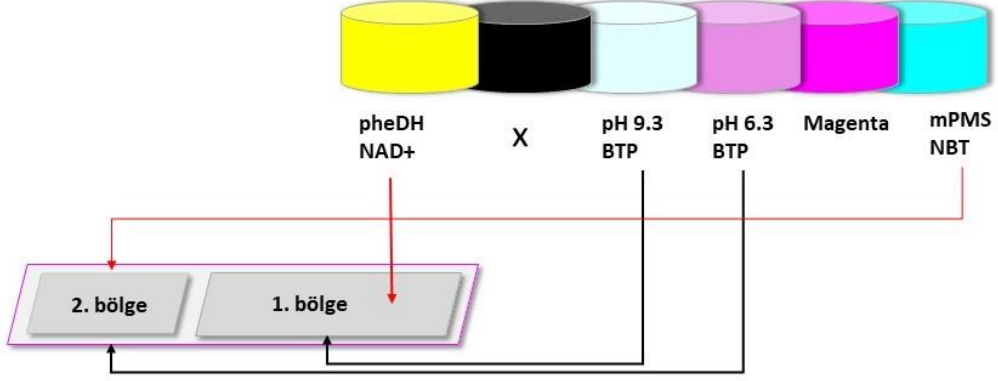
A4 kağıt üzerinde uygulamalardan sonra Microsoft PowerPoint programında test kiti tasarlanmıştır. Bu aşamada sadece sarı renkli mürekkep ve haznesi kullanılmıştır. Poliüretan tüp içerisindeki 100 µL hacimdeki mürekkep ile ne kadarlık bir alanın boyanabildiği hesaplanmıştır. Çizimdeki alanlar boyut olarak üçte birine indirildiğinde yaklaşık 30 µL mürekkep ile çizildiği hesaplanmıştır (Şekil 3.7). Ne kadar miktarda biyolojik örnek kullanılacağı hesaplanmıştır.



Şekil 3.7 Kullanılan mürekkep miktarı ile çizim alanının hesaplanması.

Belirlenen tasarıma göre test kitinin üretimi iki aşamada gerçekleşmiştir. Şekil 3.8'de siyah oklar birinci aşamada tampon çözeltilerin, kırmızı oklar ise ikinci aşamada pheDH enzimi ve NAD⁺ ile mPMS ve NBT basıldığını ifade etmiştir. Buna uygun olarak yapılan tasarımda mürekkep haznelerinde kullanılacak reaktif maddeler şu şekilde belirlenmiştir; sarı renk pheDH enzimi ve NAD⁺, açık camgöbeği rengi pH değeri 9.3 olan BTP tampon çözeltisi, açık magenta rengi pH değeri 6.3 olan BTP tampon çözeltisi, camgöbeği rengi mPMS+NBT içermektedir. Magenta rengi kendi ağızlığında şekillerin yerlerini belli etmek için kullanılmıştır. Dört farklı derişimde fenilalanin çözeltisi yeterli miktarda örnek damlatma bölgesine uygulanmış, 6 dk

sonunda görülen renk kaydedilerek optik karakterizasyon yöntemiyle incelenmiştir (Şekil 3.8).



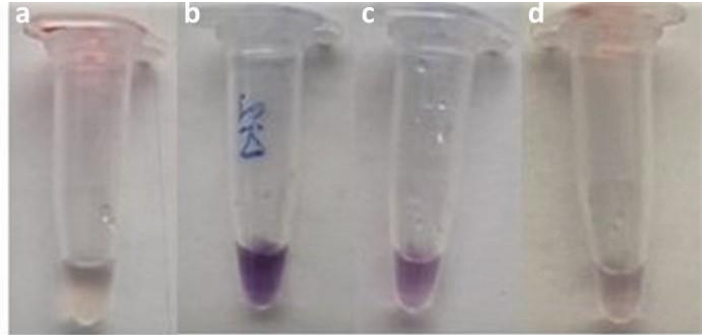
Şekil 3.8 Basım aşamasının Microsoft Powerpoint programında tasarımı.

4. BULGULAR

4.1. Sıvı ortamda parametrelerin optimizasyonu

4.1.1. Kullanılan tampon çözeltinin pH değerinin fenilalanin dehidrojenaz enzimi üzerindeki etkisi

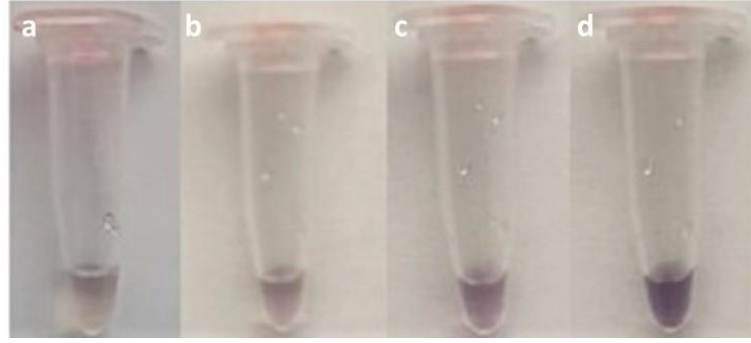
Çalışmanın ilk kısmında kolorimetrik ve enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi sırasında kullanılan biyolojik elementlerin pH'dan nasıl etkilendiği araştırılmıştır. İlk olarak enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tampon çözeltilerin farklı pH değerlerindeki (pH 7.5, pH 9.3, pH 10.5 ve pH 11.5) performansları incelenmiştir (Şekil 4.1). Reaksiyonun 7.5 ve 11.5 pH değerinde renk değişimi olmamıştır fakat 9.3 ve 10.5 pH değerlerinde renk değişimi gözlenmiştir. Bunun yanı sıra pH 9.3, pH 10.5'e göre daha yoğun bir renge sahip olmasından dolayı enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği çözeltinin pH değeri 9.3 olarak seçilmiştir. Her ne kadar literatürde pheDH enziminin optimum çalışma pH'ı 10.5 olarak gözükse de [99], test sisteminin ikinci reaksiyonu olan kolorimetrik reaksiyona katılan reaktif maddelerin optimum çalışma pH'ları asidik değerlere yakın olması, renk değişiminin pH 9.3'lük çözeltide daha iyi olmasını açıklamaktadır.



Şekil 4.1 Enzimatik reaksiyon sırasında kullanılan tampon çözeltinin a. pH 7.5, b. 9.3, c. 10.5 ve d. 11.5 değerlerinde incelenmesi.

Enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tampon çözeltinin pH değeri belirlendikten sonra optimum enzim derişimi, 0.0125-0.05 ünite aralığında çalışılarak incelenmiştir (Şekil 4.2). 10 µL miktarındaki fenilalanin çözeltisi (16 mg/dL), test çözeltisine eklendikten sonra, her bir ünite için renk değişiminin 2. dakikadan sonra başladığı görülmüştür. 8. dakikada ise renk değişiminin son halini aldığı belirlenmiştir. Bu da, her iki reaksiyonun (enzimatik ve kolorimetrik) ilk 8 dakika içerisinde tamamlandığını

göstermektedir. Fenilalanin eklenmeyen çözeltide ise ilk 8 dakika boyunca herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir.

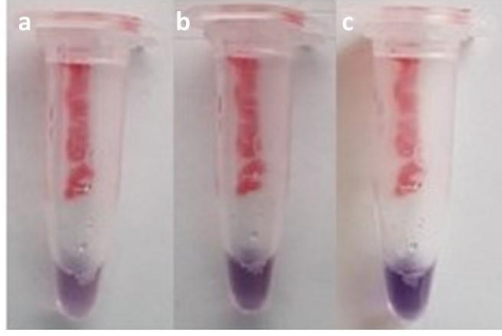


Şekil 4.2 Fenilalaninsiz ortam (a), Enzim miktarının 0.0125 ünite (b), 0.025 ünite (c) ve 0.05 ünite (d) kullanılması ile oluşan formazan rengi sonucu.

Fenilalanin dehidrojenaz maliyet açısından yüksek bir enzimdir. İstenilen renk değişimi 0.05 ünitelik pheDH kullanılarak elde edildiğinden dolayı test sisteminde bu derişimde enzim kullanılması belirlenmiştir.

4.1.2. NBT için uygun çalışma derişiminin belirlenmesi

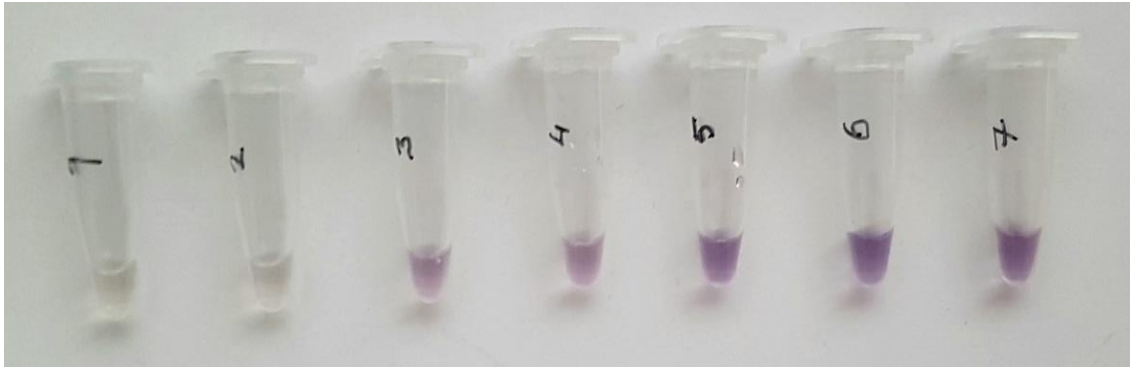
İstenilen renk derişiminin elde edilmesi için her ne kadar enzim ünitesi etkiliyse de, aynı zamanda renk derişimi reaksiyonunda görev alan tetrazolyum tuzunun miktarı da etkilidir. Aynı zamanda, NBT derişimin doğru seçilmesi reaksiyonun kolorimetrik olan ikinci kısmında mPMS elektron alıcısı ile birlikte formazanın meydana getirdiği sinyalin gücü açısından önem taşımaktadır. Çalışmanın bu aşamasında renk derişiminin iyileştirilmesi için kullanılan tetrazolyum tuzunun (NBT) derişim ayarlamaları yapılmıştır. NBT için 1.2 mM, 2.4 mM ve 4.8 mM derişimlerin üçer farklı denemesi yapılmış, renk derişiminin en şiddetli ve en kısa sürede olduğu derişim belirlenmiştir (Şekil 4.3). 2.4 mM ve 4.8 mM derişimdeki NBT çözeltileri, 1.2 mM'lık olan çözeltiliye göre daha yoğun renk vermiştir. Ancak 2.4 mM derişimde, 4.8 mM'a göre daha hızlı renk derişimi gözlenmesinden dolayı, 2.4 mM uygun NBT derişimi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3 Nitroblue tetrazolyumun a. 1.2 mM, b. 2.4 mM ve c. 4.8 mM derişimlerinde verdiği renk değişimi karşılaştırılması.

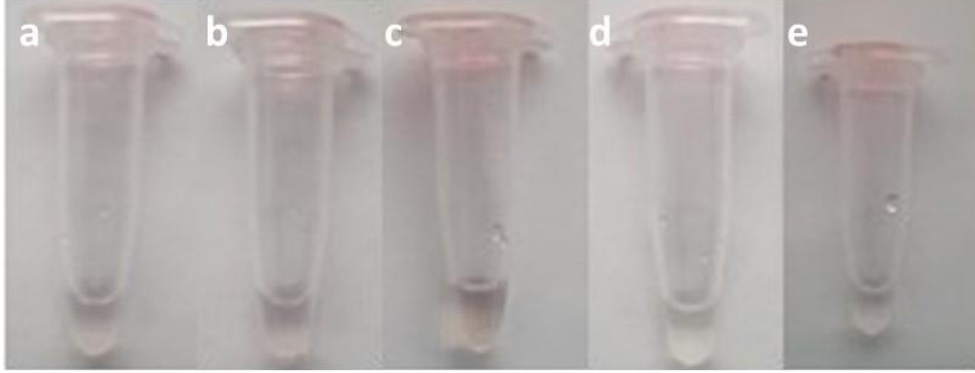
4.1.3. Test sisteminin özgülüğünün incelenmesi

Çalışmanın bu bölümünde son olarak her iki reaksiyon için gerekli olan reaktiflerin uygun derişimleri belirlendikten sonra, test çözeltisinin farklı derişimlerdeki (1.1-22 mg/dL) fenilalanin çözeltilerine verdiği cevaplar gözlenmiştir. Bu derişimler hastalığın şiddetine göre sınıflandırıldığı değerler doğrultusunda seçilmiştir. 2 mg/dL ve altı değerde hastalık gözlenmemektedir. 4-6 mg/dL diyet ve takibin gerekli olduğu aralıktır. 7-11 mg/dL aralığı orta düzey fenilketonüri hastalığını ifade etmektedir. 12 mg/dL ve üzeri durumlarda geri dönülemez hasar meydana gelmektedir. 20 mg/dL klasik fenilketonüri olarak adlandırılmaktadır. Çalışılan fenilalanin derişimlerinden 1.1 ve 2.2 mg/dL derişimlerde renk değişikliği görülmemiştir. 4-6.5 mg/dL fenilalanin derişiminde hafif renk değişimi görülmüştür. 10 mg/dL fenilalanin derişiminde orta derecede renk değişimi oluşurken 13 mg/dL ve 22 mg/dL derişimlerde belirgin renk değişimi meydana gelmiştir (Şekil 4.4). Yapılan bu çalışma ile dört farklı hastalık derecesinin yapılan test sistemine göre belirlenebileceği görülmüştür.



Şekil 4.4 Soldan sağa sırasıyla; 1.1 mg/dL, 2.2 mg/dL, 4 mg/dL, 6.5 mg/dL, 10 mg/dL, 13 mg/dL ve 22 mg/dL fenilalanin derişimlerinin renk değişimine etkisi.

Son olarak test sisteminin özgülüğünün belirlenmesi için kontrol çalışmaları yapılmıştır. Test sistemi için gerekli olan pheDH, NBT, mPMS, NAD⁺ reaktif maddelerinin herhangi birini içermeyen kontrol gruplarında renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.5).

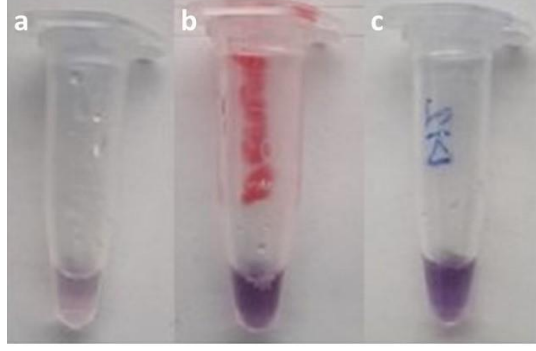


Şekil 4.5 a. pheDH, b. NBT, c. mPMS, d. NAD⁺ eklenmeden ve e.fenilalanin yerine glisinli ortam ile yapılan kontrol deneyi sonuçları.

Test sistemine fenilalanin yerine, apolar bir amino asit olması nedeniyle fenilalanine benzeyen, glisin ile hazırlanmış çözelti eklendiğinde renk değişimi vermemesi test sisteminin özgül olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).

4.1.4. Test süresi optimizasyonu

Kontrol grupları incelendikten sonra reaksiyonun birinci basamağı olan enzimatik aktivitenin gerçekleşmesi için gereken süre incelenmiştir. Kullanılan enzim miktarıyla ters orantılı olan bu süre kolorimetrik sonucun oluşma hızı ve belirlenen sürede alınan en yoğun renk için önemli bir parametredir. Kullanılan enzim miktarı sabit tutularak (0.05 ünite) üç farklı süre denenmiştir. Hiç bekletilmeyen (0 dakika), 6 ve 10 dakika sürelerde bekletilen enzimatik aşama sonucu kolorimetrik yanıtlar incelenmiştir. İlk 8 dakikada örnekleri incelediğimizde bekleme süresi iptal edilen reaksiyondaki renk değişiminin gözle görülür bir farkla daha yavaş, 6 ve 10 dakika bekleme süresi olan örneklerde ise renk değişiminin çok daha hızlı ve yakın sürelerde gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.6). Bu nedenle enzimatik reaksiyonun tam anlamıyla gerçekleşmesi ve istenilen renk değişiminin elde edilmesi için 6 dakikalık enzimatik reaksiyon süresinin yeterli olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.6 Enzimatik reaksiyon basamağında uygulanan 0, 6, ve 10 dakika bekleme süresi sonucu renk değişimleri.

4.2. Çalışmada kullanılacak uygun test materyalin seçimi ve μ PAD tasarımı

Nitroselüloz membran, Whatman no.4 filtre kağıdı ve cam fiber filtre membranı olmak üzere üç farklı membran üzerinde test materyali seçimi çalışmaları yapılmıştır.

İlk olarak nitroselüloz membran üzerinde yapılan denemede membran, deneysel kısımda bahsedilen tasarım ve üretim metodu uygulanarak oluşturulmuştur (Şekil 4.7). Önceden PBS çözeltisi içerisinde hazırlanan farklı (2-4-8-16 mg/dL) derişimlerde fenilalanin çözeltileri belirlenerek test sistemi üzerindeki renk değişimleri gözlenmiştir. 2 ve 4 mg/dL fenilalanin içeren çözeltiler ile yapılan denemelerde reaksiyonun ilk 30 dakikasında belirgin bir renk değişimi görülmemiştir. 8 ve 16 mg/dL hazırlanan çözeltilerin 5. dakikada hafif renk verdiği görülmüş, 10. ve 30. dakikalardaki incelemelerde renk değişiminin belirgin bir hal aldığı görülmüştür.

Ayrıca bu çalışma sırasında, nitroselüloz kağıtta tamponlar emdirildikten sonra kağıdın su tutma kapasitesinin üzerine çıkılmasından dolayı reaktif maddelerin emilmesinin zorlaştığı ve yüzeyin hidrofobikleştiği gözlemlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı iyi bir renk değişiminin istenilen seviyede olmadığına karar verilerek nitroselüloz kağıt test materyali olarak tercih edilmemiştir.

	C	2	4	8	16
0					
5					
10					
30					

Şekil 4.7 Nitroselüloz membranda uygulama.

Daha sonraki aşamada Whatman no.4 filtre kağıdı test sistemi olarak seçilmiştir. İlk belirlenen üretim yöntemine göre üç farklı bölgeden oluşan test sistemine, renk değişimi gözlenmesi kesin olan 16 mg/dL derişimdeki fenilalanin çözeltisi damlatılmış ve sistemin renk değişimi incelenmiştir. İlk 8 dakika boyunca herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.8). 1 saat sonra test sistemi tekrardan incelendiğinde renk değişiminin Whatman filtre kağıdındaki üçüncü bölgede değil de, üçüncü bölgenin altındaki tüm test sisteminin üzerinde bulunduğu destek malzemesinin üzerinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu da fenilalanin çözeltisinin sisteme eklediğinde sistem boyunca ilerleyen bu çözelti ile sisteme daha önce tutturulmuş olan reaktif maddelerinde ilerlediği göstermiştir. Whatman filtre kağıdına herhangi bir modifikasyon işlemi yapılmadan reaktif kimyasalların tutturulamayacağı bu çalışma sonunda belirlendiği için Whatman no.4 kağıdı test sisteminde kullanılmak için tercih edilmemiştir.



Şekil 4.8 Whatman No.4 kağıtta reaksiyonun incelenmesi a. deney düzeneği, b. 8 dakika sonunda renk değişimi.

Yukarıda yapılan çalışmadaki veriler doğrultusunda Whatman filtre kağıdının üretim yönteminde değişikliğe gidilmiştir. Üç ayrı parça halinde hazırlanmak yerine reaksiyon bölgeleri ve sınırları bu yeni üretimde, tek parça kağıt üzerinde hazırlanmıştır (Şekil 4.9). Kağıda herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Bu tasarımda önemli olan nokta, test sisteminin uzunluğunun verilecek olan örnek miktarının test sistemi boyunca ilerlemesini ama destek materyalinin üzerine çıkmayacak şekilde olmasıdır. Böylece renk değişimi, reaktif maddeler Whatman filtre kağıdı tarafından tutunmasa bile gözeneklerinden ilerleyip renk değişiminin filtre kağıdı üzerinde olmasını sağlayacaktır.

Kağıdın tasarımı ve belirlenen üretim işlemleri yapıldıktan sonra 16 mg/dL derişimdeki fenilalanin çözeltisinden yeterli miktarda damlatılmıştır. İlk 8 dakika boyunca test bölgesinde renk değişimi olmadığı gözlemlenmiştir.

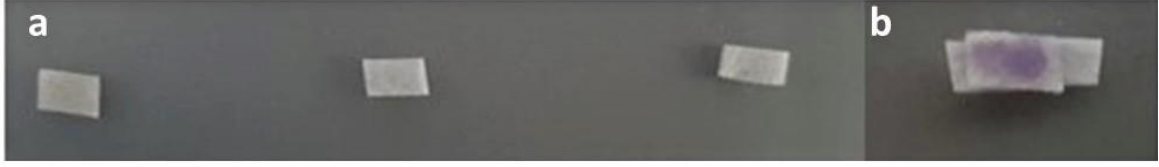
Ancak 1 saatin sonunda akış yönü doğrultusunda, test bölgesinin hemen altında hafif bir renk değişimi görülmüştür. Böylece reaktiflerin kağıda tutunmadığını ancak test sistemi üzerinde kaldıkları görülmüştür. Fakat renk değişiminin istenilen yoğunlukta olmaması nedeniyle Whatman kağıdı ile yapılan bu tasarım seçilmemiştir.



Şekil 4.9 Whatman No.4 tek parça kağıt ile uygulama (akış ok yönündedir).

Daha önce Whatman filtre kağıdında denenilen üç farklı parçadan oluşan test sistemi (Şekil 4.8) cam fiber filtre membranına uygulanmıştır. Belirlenen tasarım ve üretimde hazırlanan membrana, 16 mg/dL derişimindeki fenilalanin çözeltisinden

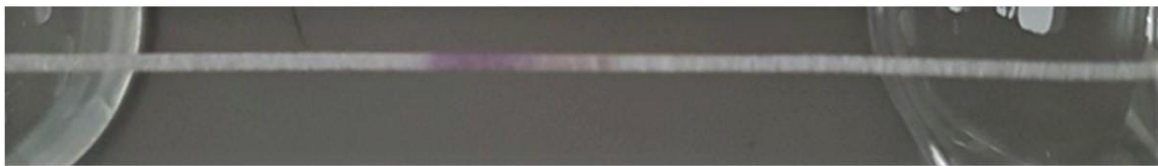
yeterli miktarda emdirilerek 2. ve 8. dakikalardaki renk değişimi incelenmiştir. 8. dakikanın sonunda renk değişimi elde edilmiştir (şekil 4.10).



şekil 4.10 Cam fiber filtre membranında 8. dakikadaki renk değişimi.

Cam fiber filtre membranının yatak hacminin, Whatman filtre kağıdına göre daha geniş olmasından ve Whatman kağıdının emiciliğinin daha yüksek olmasından dolayı sıvı Whatman kağıt üzerinde hızlı bir şekilde ilerleyip rengin dağılmasıyla sonuçlanırken, cam fiber filtre kağıdında tek bir noktada toplanarak yoğun renk vermiştir. Fakat burada karşılaşılan sorun akışın istenilen düzeyde olmamasıdır.

Cam fiber filtre membranında yapılan bir diğer incelemede ise, üç ayrı parça halinde hazırlanmak yerine reaksiyon bölgeleri ve sınırları, tek parça kağıt üzerinde hazırlanarak belirlenen üretim yöntemi uygulanmıştır. Cam fiber filtre membranının Whatman filtre kağıdına göre yatak hacmi daha geniş olduğundan aynı miktarda kullanılan tampon ve czeltilerin membran üzerinde yayılma miktarlarının daha az olduğu görülmüştür. Bu nedenle test bölgelerinin Whatman membrandakine göre 1/3 oranında daha kısa olduğu belirlenmiştir. Bu yeni yöntemle tasarlanan test sistemine 16 mg/dL fenilalanin czeltisinden yeterli miktarda damlatılarak, test bölgesinde gerçekleşen renk değişimi 2. ve 8. dakikalarda incelenmiştir. 8. Dakikanın sonunda sabitlenmiş renk değişikliği incelendiğinde Whatman filtre kağıdındaki şiddete göre daha şiddetli bir renk değişikliği belirlenmiştir. Fakat test sistemindeki akışın istenilen şekilde (homojen akış) olmaması, oluşan rengin akış yönüne doğru yayılması ve reaktif maddelerin cam fiberler üzerine istenilen seviyede tutturulamaması nedeniyle test sistemine bir n modifikasyon işlemi uygulanması kararlaştırılmıştır (şekil 4.11).



şekil 4.11 Cam fiber filtre membranında renk değişimi.

4.3. μ PAD tasarımında kullanılacak materyallere uygulanan yüzey modifikasyonları

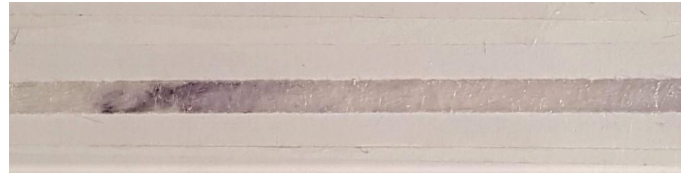
Yanal akış test sistemlerinde, örnek çözeltisinin test sistemi üzerindeki akışının istenilen şekilde olması için bir modifikasyon işlemi uygulanmaktadır. Modifikasyon işleminde membran sırasıyla sığır serum albümini (BSA) çözeltisi, zayıf bazik bir solüsyon olan K_2HPO_4 ve %0.01 SDS çözeltisi ile etkileştirilir.

Bu modifikasyon işlemi, hem spesifik olmayan maddelerin membrana tutunmasını önlediği gibi, hem de akışın homojen ve istenilen seviyede olmasını sağlamaktadır [110].

Çalışmanın bu kısmında modifikasyon işlemi yanlışlıkla test kitinin üretim aşamasından önce membrana uygulanmıştır. Fakat bu yanlışlık anlaşıldıktan sonra ise test sistemini oluşturan reaktif maddelerin membrana tutturulmasından sonra üretim işleminin son basamağı olarak da kullanılmıştır. Her iki durumda hazırlanan test sistemlerinin cevapları da çalışmanın bu kısmında karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12)(Şekil 4.13).



Şekil 4.12 Modifikasyon işlemi sonradan uygulanan cam fiber filtre membranı.



Şekil 4.13 Modifikasyon işlemi önceden uygulanan cam fiber filtre membranı.

Beklenmedik bir şekilde modifikasyon işlemi önce yapılan membran filtre kağıdındaki renk değişiminin, modifikasyon işlemi sonra yapılanaya göre belirli bir şekilde arttığı görülmüştür. Modifikasyon işlemi sırasında, filtre kağıdı yukarıda belirtilen çözeltilere batırılarak yaklaşık 15 dakika boyunca etkileştirilmektedir. Bu etkileştirme sırasında test sisteminde kullanılan ve önceden filtre kağıdına zayıf bir şekilde tutturulan reaktif maddelerin bir kısmının kağıt yüzeyinden koparak çözeltilere geçmesi, beklenen renk değişiminin olmamasını açıklamaktadır. Bunun yanında modifikasyon işlemi, reaktif maddelerin tutturulmasından önce yapılan filtre

kağıtlarında ise, kullanılan BSA'nın membranda bulunan fonksiyonel grupları bloke etmesi ve böylece enzimatik reaksiyon sırasında meydana gelen elektron transfer olayının daha kolay gerçekleşmesini sağladığı düşünülmektedir. Bu durum, cam fiber filtre membranı yapısındaki fonksiyonel grubun elektron transferi sırasında alıcı olarak davranması ve reaksiyonun yavaşlamasına neden olması ile açıklanabilmektedir. BSA ile modifikasyon sonrasında membranın kaplanması ve fonksiyonel grupların pasifize edilmesi ile reaksiyonun hızlanması ve böylece reaksiyon sonucunda oluşan rengin artmasını sağladığı şeklinde yorumlanabilmektedir [110].

Örnek çözeltisinin cam fiber membran üzerindeki akışının ise modifikasyon işleminin ne zaman yapıldığından bağımsız olarak her iki durumda da istenilen seviyede olduğu belirlenmiştir.

Fakat hala hazırlanan sistemin test bölgesindeki renk değişiminin, sistem üzerinde geniş bir bölgeye dağılmasından dolayı istenilen şiddetin elde edilemediği görülmektedir. Bu sebeple, test sisteminin üçüncü bölgesi olarak kabul edilen test bölgesi test sisteminde ayrı bir parça olarak disk şeklinde tasarlanmıştır.

Test kitini oluşturan iki parçadan ilki, pheDH enzimini ve NAD⁺'ı içerirken, disk kısmı ise tetrazolyum tuzunun ve mPMS'in bulunduğu kolorimetrik yanıt alınması beklenen bölge olarak oluşturulmuştur. Belirlenen üretim yöntemi uygulandıktan sonra, 16 mg/dL derişimdeki fenilalanin çözeltisinden örnek bölgesine yeterli miktarda damlatıldıktan sonra üçüncü bölge olan disk, ikinci bölgenin sonuna (akış yönüne doğru) yerleştirilmiş, 2. ve 8. dakikalardaki renk değişimi incelenmiştir. Bu denemeden yoğun bir renk değişimi sonucu alınırken, akışın istenilen düzeyde ve homojen olduğu görülmüştür (Şekil 4.14).

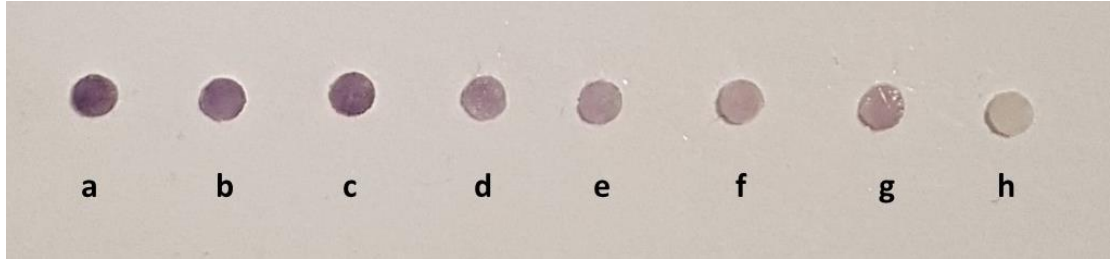
Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, hem test sisteminin üretimine ön basamak eklenmiş hem de test sisteminin iki ayrı parçadan oluşmasına karar verilmiş ve sistemin validasyon çalışmalarına geçilmiştir.



Şekil 4.14 Test bölgesinin disk şeklinde tasarlandığı, ön işlemden geçirilmiş cam fiber filtre membranında renk değişiminin incelenmesi.

4.4. Geliştirilen sensör sisteminin çalışma performansının belirlenmesi

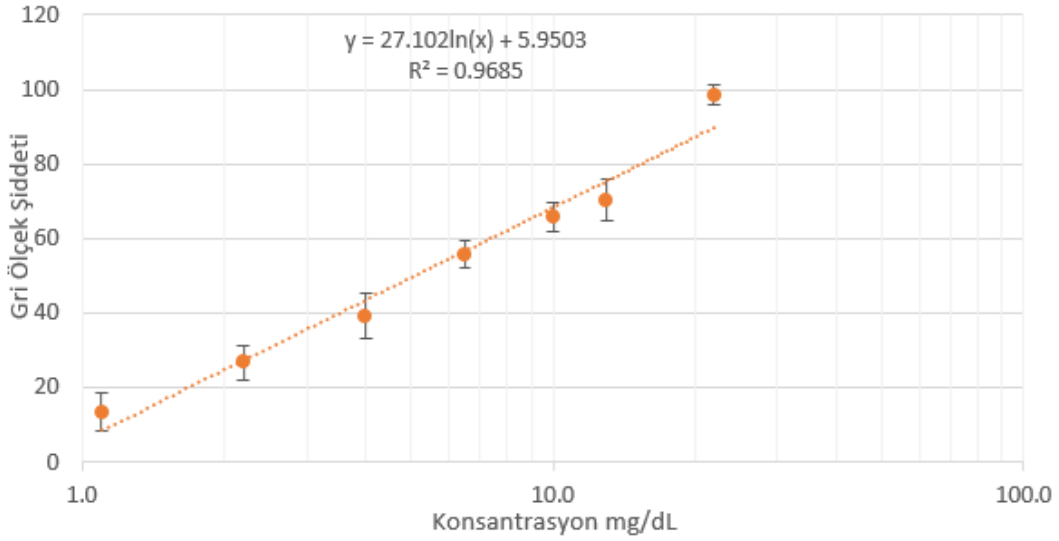
Test sisteminin validasyon çalışmaları, 7 farklı fenilalanin derişimi (1.1 mg/dL, 2.2 mg/dL, 4 mg/dL, 6.5 mg/dL, 10 mg/dL, 13 mg/dL ve 22 mg/dL) içeren örnek çözeltilerin cam fiber filtre membranlarına uygulanması ve 8. dakika sonunda disk şeklindeki test bölgesinde oluşan renk değişimlerinin optik karakterizasyon yöntemi ile karşılaştırılmaları ile tamamlanmıştır (Şekil 4.15). Her bir örnek derişimi için üçer kez yapılan çalışma sonucunda derişimle doğru orantılı artan yoğunlukta renk değişimi görülmüştür. Oluşan formazan ürünlerinin ImageJ programında optik karakterizasyonu yapılmıştır ve her bir çalışma için elde edilen renk şiddetlerinin gri skala değerleri deneysel kısımda belirtildiği gibi hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Geliştirilen test sisteminin performansı ise bu değerler kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği ile incelenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15 a. 22 mg/dL, b. 13 mg/dL, c. 10 mg/dL, d. 6.5 mg/dL, e. 4 mg/dL, f. 2.2 mg/dL, g. 1.1 mg/dL, h. 0 mg/dL derişimlerinde fenilalanin çözeltilerinin renk değişimleri.

Derişimler mg/dL	Ortalama Şiddet
0.0	0.0
1.1	13.5±9.8
2.2	26.7±9.3
4.0	39.1±12.0
6.5	55.8±7.7
10.0	65.8±7.7
13.0	70.2±11.2
22.0	98.5±5.4

Tablo 4.1 Fenilalanin çözeltileri için kalibrasyon deneyi verileri.



Şekil 4.16 Farklı fenilalanin derişimlerine ait çözeltilerin kalibrasyon grafiği (log-lin grafiği).

Kalibrasyon grafiği incelendiğinde, test sisteminin 1.1 mg/dL ile 13 mg/dL aralığında doğrusal olduğu gözlemlenmiştir. Grafikten yararlanarak, sensörün ölçebileceği en düşük derişim olan tayin sınırı sıvı fenilalanin çözeltileri için 0.84 mg/dL olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Yapılan testin güvenilirliği istatistik analiz yöntemlerinden T-testi ile hesaplanmıştır. T testi, iki grup veri arasındaki ortalama farkın istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığını, bu farkın şans eseri meydana gelebilecek farklılardan büyük olup olmadığını yani aradaki farkın gerçekliğini tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Tez kapsamında, fenilalanin çözeltilerinde ölçülen derişim farkının anlamlı olup olmadığı incelenmiştir. H_0 hipotezi; "Test sisteminde denenen iki ardışık derişim arasında anlamlı bir fark yoktur" olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, aşağıda verilen denkleme göre (1) ardışık ölçümler arasındaki t değerleri hesaplanmıştır.

$$t - \text{değeri} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\frac{\sigma_2^2}{n} + \frac{\sigma_1^2}{n}}} \quad (1)$$

Burada, \bar{x} her bir derişimdeki ortalama ölçüm değerini, σ^2 her ölçümdeki varyans değerini ve n, yapılan deney tekrarını ifade eder. Böylece her bir derişim için bir t değeri elde edilmiştir. Bu t değerlerinden N=3 serbestlik derecesi için p değerleri hesaplanmıştır. Seçilen güvenilirlik katsayısı $\alpha=0.05$ 'tir. Bonferrini düzeltmesine

göre serbestlik derecesi 3 olduğu için güvenilirlik katsayısı $0.05/3=0.017$ 'ye indirgenmiştir. Bu doğrultuda hesaplanan p değerinin güvenilirlik katsayısından yüksek olduğu durumlar için H_0 önermesi yanlış, diğer durumlarda doğru olarak kabul edilmiştir.

Derişimler mg/dL	1.1 - 2.2	2.2 - 4.0	4.0 - 6.5	6.5-10.0	10.0- 13.0	13.0- 22.0
N	3	3	3	3	3	3
α	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
α/N	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
t değeri	8.0	2.4	4.3	3.9	3.9	13.3
p değeri	0.008	0.071	0.025	0.031	0.031	0.003
H_0 hipotezi	doğru	yanlış	yanlış	yanlış	yanlış	doğru

Tablo 4.2 Fenilalanin çözeltileri için t-testi sonuçları.

Yapılan t testi sonucu test sisteminin 1.1-2.2 mg/dL aralığı arasında anlamlı bir fark olmadığı yani H_0 hipotezinin kabul edildiği, 2.2-4.0 mg/dL, 4.0-6.5 mg/dL, 6.5-10.0 mg/dL ile 10.0-13.0 mg/dL aralığında anlamlı bir farkın olduğu, 13.0-22.0 mg/dL aralığı içinse, anlamlı bir farkın olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo 4.2). Buna göre, test sistemi ile fenilketonüri hastalığının takip gerektiren seviyesi, orta hiperfenilalaninemi, orta dereceli fenilketonüri ve klasik fenilketonüri olmak üzere dört ayrı derecesi kolorimetrik olarak anlamlı bir şekilde ölçülebileceği görülmüştür (Tablo 4.2).

4.5. Geliştirilen μ PAD cihazın kan plazması ile validasyonu

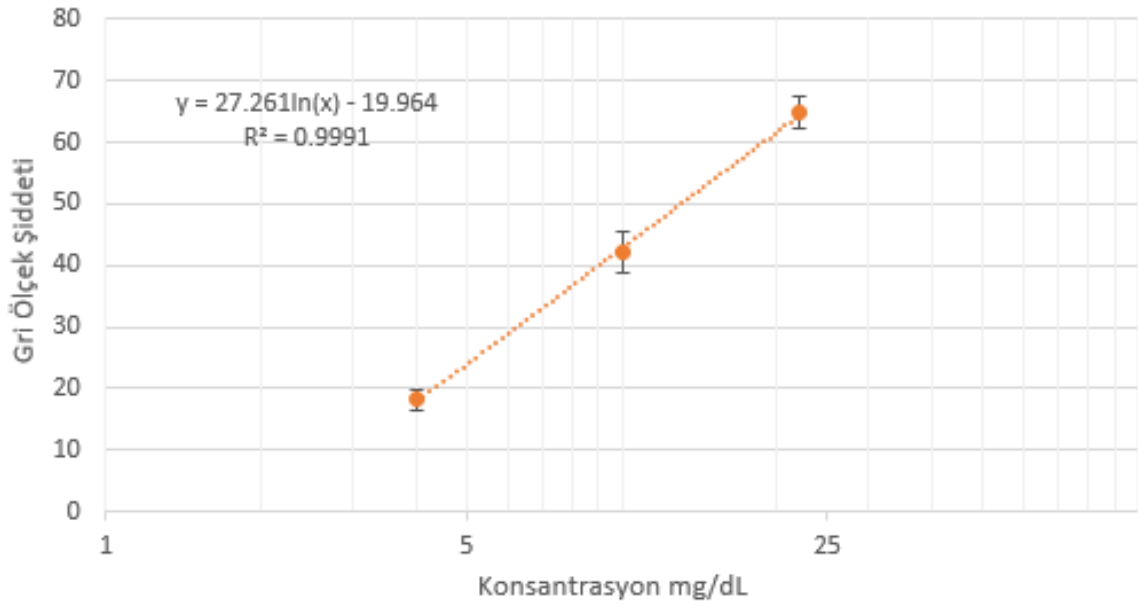
Mikroakışkan cihazın kan plazması gibi karmaşık bir matriks ortamındaki çalışması da incelenmiştir. Cam fiber membranlara ön işlem uygulandıktan sonra belirlenen üretim işlemi yapılmıştır. Tamamen kurumaları sağlandıktan sonra birinci filtre membranı kontrol olarak kabul edilirken, sadece fenilalanin eklenmeyen kan plazması kullanılmıştır. Diğer test kitlerine sırasıyla 4 mg/dL, 10 mg/dL ve 22 mg/dL fenilalanin derişimine sahip kan plazması 25 μ L damlatılmıştır. 8. dakikanın sonunda ise test kitlerinde farklı yoğunluklarda renk değişimleri gözlenmiştir (Şekil 4.17). Optik karakterizasyon yöntemi ile analiz edilen veriler Tablo 4.3 kullanılarak kalibrasyon grafiği Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.17 Cam fiber filtre membranının plazma ile uygulanması a. 22 mg/dL, b. 10 mg/dL, c. 4 mg/dL, d. Fenilalanin eklenmeyen plazma.

Derişimler mg/dL	Ortalama şiddet
0.0	0.0
4.0	18.2±3.4
10.0	42.0±6.8
22.0	64.7±5.2

Tablo 4.3 Plazma için kalibrasyon grafiği verileri.



Şekil 4.18 Plazma için kalibrasyon grafiği (log-lin grafiği).

Değişimler mg/dL	4.0 – 10.0	10.0 – 22.0
N	3	3
α	0.05	0.05
α/N	0.02	0.02
t değeri	17.3	4.6
p değeri	0.003	0.044
H₀ Hipotezi	doğru	yanlış

Tablo 4.4 Plazma için t-testi değerleri.

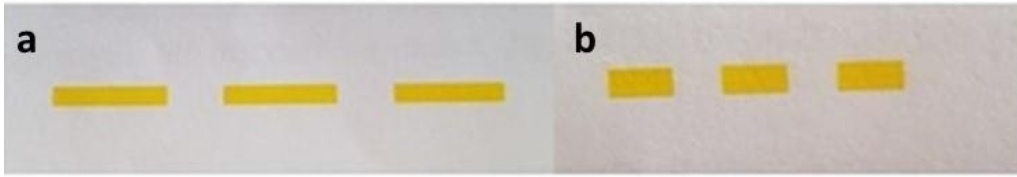
Kandan plazma ayrımı yapılmasına rağmen, kan plazması ortamında bulunan plateletler, kan proteinleri ve az miktarda kan hücreleri nedeniyle sahip olduğu karmaşık yapısından dolayı test kitinin istenilen doğrulukta çalışmasını engellediği düşünülmektedir. Plazma ile çalışılan test sisteminin bu nedenle logaritmik olarak çizilen kalibrasyon grafiğinin 4-22 mg/dL aralığında doğrusal olduğu görülmüştür. Yapılan t-testi sonucu 4-10 mg/dL değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülürken, 10-22 mg/dL arasında ise anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Tablo 4.4). Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak test sisteminin plazma uygulamasında ölçülebilen tayin sınırı, 2.68 mg/dL olarak hesaplanmıştır.

4.6. Test kitinin mürekkep baskılama yöntemi ile üretimi

Çalışmanın bu kısmında test sistemi üretiminin basit bir şekilde yapılabilmesi için tüm test sistemi mürekkep baskılama yöntemi ile hazırlanması düşünülmüştür. Çalışmanın yapılacağı Epson L805 cihazının modifikasyonu sonrası, önce A4 kağıt üzerinde yazıcının kendi mürekkepleri kullanılarak yazıcının püskürttüğü mürekkep miktarlarının belirlenmesi için farklı denemeler yapılmıştır.

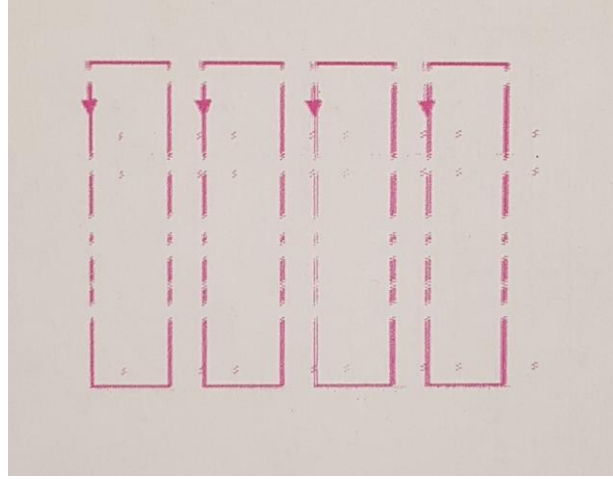
Yazıcının püskürtme miktarını optimize etmek amacıyla, yazılımında bulunan basım özelliklerinden yüksek kalitede uygulanmış "Epson Premium glossy" seçeneği ve düz kağıda standart kalitede basım seçenekleri karşılaştırılmıştır. Epson Premium glossy seçeneğinde kağıda püskürtülen mürekkep miktarının aynı alanda daha fazla olduğu görülmüştür. Test kiti üzerine daha fazla sıvı bırakılması ve daha yoğun renk

almak için, basım aşamasında Epson Premium glossy seçeneği yüksek kalitede uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle sadece tek bir mürekkep haznesi kullanılmıştır. Bu hazneye 100 µL hacimdeki mürekkep doldurulmuş ve bu miktarla ne kadarlık bir alanın boyanabileceğine bakılmıştır. Şekil 4.19 a'daki alanlar (18 mm²) boyut olarak üçte birine indirildiğinde yaklaşık 30 µL mürekkep harcanabileceği hesaplanmıştır. 3 eşdeğer alan için toplam 30 µL mürekkep kullanıldığında her bir alan için yazıcının 10 µL mürekkep kullandığı mantığına dayanan bir hesaplama yapılmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Mürekkep hacmi kullanılarak çizim alanı hesaplanması a. 100 µL mürekkep miktarı ile b. 30 µL mürekkep miktarı ile.

Daha sonra test kitinin deneysel kısımda anlatıldığı gibi tasarımı yapılmıştır. Bu tasarıma göre test kitinin üretimi iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada tampon çözeltilerin emdirilmesine, ikinci aşamada ise pheDH enzimi ve NAD⁺, mPMS ve NBT emdirilmesine karar verilmiştir. Buna uygun olarak yapılan tasarımda haznelerde kullanılacak biyolojik elementler şu şekilde belirlenmiştir; sarı renk pheDH enzimi ve NAD⁺, açık camgöbeği rengi pH değeri 9.3 olan BTP tampon çözeltisi, açık magenta rengi pH değeri 6.3 olan BTP tampon çözeltisi, camgöbeği rengi mPMS+NBT içermektedir. Magenta rengi kendi ağızlığında test kitinin sınırlarını belli etmek için kullanılmıştır (Şekil 4.20)(Şekil 4.21).

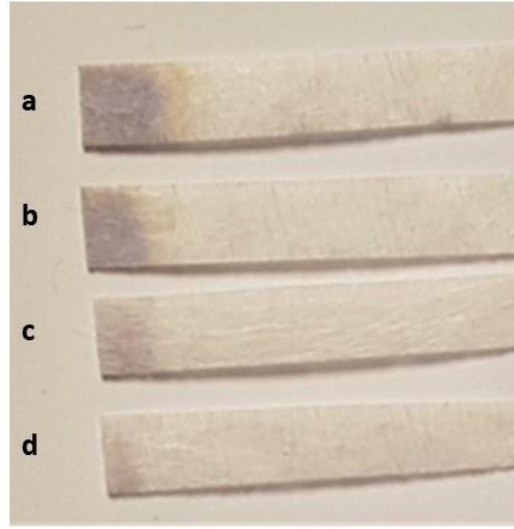


Şekil 4.20 Magenta rengi ile μ PAD'lerin yerlerinin belirlenmesi.



Şekil 4.21 Poliüretan tüplere biyolojik elementlerin doldurulması.

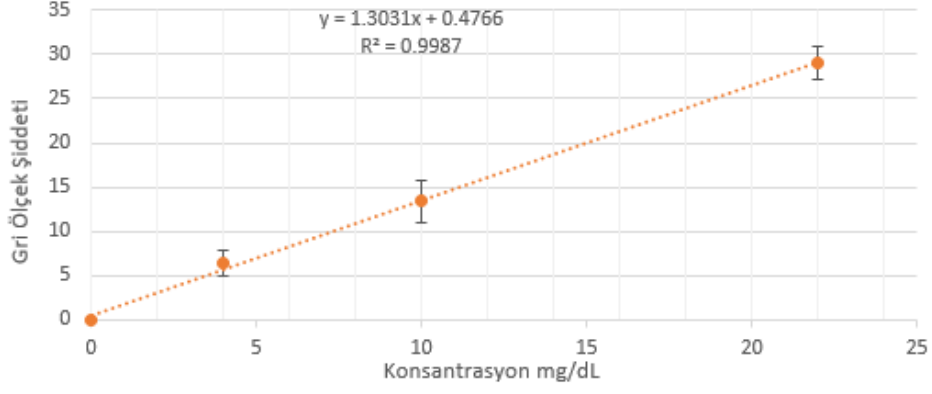
Cam fiber filtre kağıt üzerine iki aşamalı basım yapılarak hazırlanan test kitleri üzerine sırasıyla 22, 10, 4 ve 0 mg/dL fenilalanin çözeltileri damlatılmış ve kit üzerindeki test bölgesindeki renk değişimi gözlenmiştir (Şekil 4.22). kitin çalışma performansının belirlenmesi için oluşan renk şiddetlerinin optik karakterizasyonu yapılarak, kalibrasyon grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.22 Yazıcı ile cam fiber filtre membranına basım a. 22 mg/dL phe, b. 10 mg/dL phe, c. 4 mg/dL phe, d. 0 mg/dL phe.

Derişimler mg/dL	Ortalama şiddet
0.0	0
4.0	6.3±2.9
10.0	13.4±4.8
22.0	29.1±3.9

Tablo 4.5 Yazıcı ile basım sonucu oluşan renk şiddetlerini verileri.



Şekil 4.23 Yazıcı ile basım sonucu elde edilen renklere ait kalibrasyon grafiği (lin lin grafiği).

Hesaplanan renk şiddetleri (Tablo 4.5) kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinde; test kitinin 0-22 mg/dL derişim aralığında yüksek doğrusallıkta çalıştığı belirlenmiştir (Şekil 4.23). Yazıcı ile üretilen test sistemi için hesaplanan tayin sınırı 4.01 mg/dL olarak ölçülmüştür.

5. DEĞERLENDİRME VE YORUMLAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar temelde altı basamaktan oluşmuştur. Bu aşamalar kullanılacak reaktif maddelerin hazırlanması, test materyalin seçimi ve μ PAD tasarımı, test sistemi üzerinde uygulanan modifikasyonlar, geliştirilen μ PAD cihazın validasyonu, alternatif bir sonuç alınabilmesi için uygulanan optik karakterizasyon yöntemi ve geliştirilen μ PAD cihazın mürekkep püskürtmeli yazıcıda üretimidir.

Tez çalışmasının genel amacı olan fenilketonüri hastalığı tanısında kullanılmak üzere, üretimi maliyet açısından avantajlı, kullanıcı dostu, ölçümleri tekrarlanabilen kağıt tabanlı mikroakışkan cihaz tasarımı başarıyla yapılmıştır. Çalışma kapsamında geliştirilen cihazın üretim aşaması ve tasarımı çeşitli modifikasyon aşamalarından geçmiş bir mürekkep püskürtmeli yazıcı ile gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kan plazması içindeki fenilalaninin, iki basamaklı bir kimyasal reaksiyonu tetiklemesi ile oluşan renk değişimi gözlenmiş ve bu sayede hastalığın dört farklı derecesi tayin edilmiştir.

Birinci aşama olan enzimatik reaksiyon sırasında fenilalanin dehidrojenaz enzimi NAD^+ varlığında fenilalanin ile tepkimeye girmektedir. Bu tepkime sırasında $NADH$ 'a indirgenen NAD^+ , ikinci basamakta mPMS ile yükseltgenmekte ve bu NAD^+ döngüsü son ürün olarak formazan üretmektedir. Sonuç olarak, üretilen formazan miktarı ortamdaki fenilalanin derişimine bağlıdır. Doğal rengi, ortamda bulunan diğer tüm moleküllerden bariz şekilde farklı olan formazan, test bölgesinde mor tonlarında bir renk değişimine sebep olmakta ve renk seviyesinden fenilalanin derişim tayinine imkan sağlamaktadır. Bu sayede test sistemi başına 25 μ L kan plazması kullanılarak 8 dakika içerisinde derişim tayini 2.68 mg/dL deteksiyon limiti dahilinde yapılmıştır. Glisin ile yapılan kontrol denemelerinde hazırlanan test kitinin sadece fenilalanine spesifik olduğu belirlenmiştir.

Test sisteminin istenilen sürede ve en uygun şekilde cevap vermesi için test sistemi farklı boyut ve tasarımlarda çeşitli malzemeler kullanılarak geliştirilmiştir (Whatman No.4, cam fiber filtre membranı ve nitroselüloz membran). Yapılan çalışmalar sonrası hem yatak hacminin diğer materyallere göre daha geniş olması, hem de son ürün olan formazanın ortaya çıkardığı rengi, yani kolorimetrik yanıtı en iyi şekilde göstermesinden dolayı cam fiber filtre membranı test materyali olarak seçilmiştir. Bu

özelliklerine ek olarak test materyali, uygun bir ön işlemde geçirilerek iyileştirilmiştir. Bu ön modifikasyon işlemi, cam fiber filtre membranı üzerindeki akışın istenilen seviyede olmasını, çalışmada kullanılacak reaktif maddelerin kağıt fibrillerine daha iyi sabitlenmesini sağlarken aynı zamanda spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesini ve görülen renk değerlerinin daha yoğun bir hal alarak geliştirilen test kitinden maksimum seviyede verim alınması sağlanmıştır.

Fenilalanin çözeltilerinin cam fiber filtre membranında verdiği kolorimetrik sonucun gri skala şiddetinin okunması amacıyla kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. T testi ile 1.1-2.2 mg/dL aralığı ile 13.0-22.0 mg/dL aralığında anlamlı bir farkın olmadığı, geriye kalan dört aralık için ise anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür. Kalibrasyon grafiğinde 22 mg/dL derişime sahip fenilalanin örneğine kadar doğrusallık gözlenmiştir. Tayin sınırı 0.84 mg/dL olarak ölçülmüştür.

Dahasıra daha karmaşık bir ortam olan kan plazmasında kalibrasyon grafiği çizilmiş, en düşük tayin sınırı hesaplanmıştır. Plazma için logaritmik olarak çizilen kalibrasyon grafiğinin 4-22 mg/dL aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. Yapılan t-testi sonucu 4-10 mg/dL değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülürken, 10-22 mg/dL arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak test sisteminin plazma uygulamasında ölçülebilen tayin sınırı 2.68 mg/dL olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın son aşamasında ise, hazırlama yöntemi ve tasarımı belirlenen test sistemi mürekkep baskılama tekniği ile bu amaç için modifiye edilmiş mürekkep püskürtmeli yazıcı ile üretilmiştir. Bu sayede test sistemini üretmek için kullanılan reaktif madde miktarı yarı yarıya azaltılmıştır. Yazıcı ile üretilen test sistemi için hesaplanan tayin sınırı 4.01 mg/dL olarak ölçülmüştür. Bunun yanı sıra, test sisteminin üretim süresi ciddi ölçüde kısalırken, yöntem iki basamağa indirilerek basitleştirilmiştir. Cihazın kolorimetrik cevap süresi 8 dakika olarak hesaplanırken, toplam üretim süresi 5 dakikaya düşürülmüştür.

Test kitinin üretiminde mürekkep püskürtmeli yazıcı kullanımı; kit başına kullanılan reaktif madde miktarında çok ciddi oranda tasarruf sağlamanın yanında, hız açısından da büyük avantaj sağlamıştır. Ancak bunlardan daha önemli olarak test kitinin aktif bölgesinde reaktif madde homojenitesini artmasını sağlamıştır. Bu durum da ölçüm hatalarını azaltmış, dolayısıyla sistem hassasiyetini arttırmıştır.

Bununla birlikte, püskürtme oranlarının elektronik olarak kontrol edilebilmesi üretim sırasında reaktif madde derişimini daha hassas bir şekilde ayarlama imkanı yaratmış; bu durum da test kitinin doğrusal olarak çalıştığı derişim aralığını olan 0-22 mg/dL aralığını kontrol etme yetisi kazandırırken, bağımsız üretilen kitler arasındaki ölçüm tekrarlanabilirliğini arttırmıştır. Sunulan tez çalışması ile fenilketonüri hastalığının takip gerektiren seviyesi, orta hiperfenilalaninemi, orta dereceli fenilketonüri ve klasik fenilketonüri olmak üzere dört ayrı derecesini kolorimetrik olarak anlamlı bir şekilde ölçmesinde kullanılmak üzere üretimi kolay, maliyeti düşük, cevap süresi hızlı bir test sistemi başarıyla geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Blau, N., Van Spronsen, F.J., Levy, H.L., Phenylketonuria, *The Lancet*, 376, 1417–1427, **2010**.
- [2] Vockley, J., Andersson H.C., Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline, *Genetics in Medicine*, 16, 188–200, **2014**.
- [3] El-Metwally, A., The Prevalence of Phenylketonuria in Arab Countries, Turkey, and Iran: A Systematic Review, *BioMed Research International*, 2018, 1–12, **2018**.
- [4] David, L., Nelson, A.L., Cox, M.M., Lehninger principles of biochemistry, 5. Basım, Palme Yayıncılık, **2008**.
- [5] Griffin, R.F., Elsas, L.J., Classic phenylketonuria: Diagnosis through heterozygote detection, *The Journal of Pediatrics*, 86, 512–517, **1975**.
- [6] Robinson, R., Wong, L., Monnat, R., Fu, E., Development of a Whole Blood Paper-Based Device for Phenylalanine Detection in the Context of PKU Therapy Monitoring, *Micromachines*, 7, 28, **2016**.
- [7] Wang, Z., Chen, Y.Z., Zhang, S., Zhou, Z., Investigation of a Phenylalanine-Biosensor System for Phenylketonuria Detection, *2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*, 2, 1913–1916, **2005**.
- [8] Liu, S., Su, W., Ding, X., A Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Glucose Detection, *Sensors*, 16, 2086, **2016**.
- [9] Martinez, A.W., Phillips, S.T., Whitesides, G.M., Carrilho, E., Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Analytical Chemistry*, 82, 3–10, **2010**.
- [10] Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., Chaudhury, A., Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*, 28, 1–12, **2011**.
- [11] Mohanty, S.P., Kougianos, E., Biosensors: a tutorial review, *IEEE Potentials*, 25, 35–40, **2006**.

- [12] Rai, M., Gade, A., Gaikwad, S., Marcato, P.D., Durán, N., Biomedical applications of nanobiosensors: the state-of-the-art, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 14–24, **2012**.
- [13] Bhalinge, P., Biosensors: Nanotools of Detection-A Review, *International Journal of Healthcare and Biomedical Research*, 4, 3–26, **2016**.
- [14] Clark, L.C., Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29–45, **1962**.
- [15] Koudelka, M., Performance characteristics of a planar 'clark-type' oxygen sensor, *Sensors and Actuators*, 9, 249–258, **1986**.
- [16] Updike, S.J., Hicks, G.P., The Enzyme Electrode, *Nature*, 214, 986–988, **1967**.
- [17] Mehrotra, P., Biosensors and their applications - A review, *Journal of oral biology and craniofacial research*, 6, 153–9, **2016**.
- [18] Vo-Dinh, T., Cullum, B., Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366, 540–51, **2000**.
- [19] A. Rasooly, Biosensor technologies, *Methods*, 37, 1–3, **2005**.
- [20] Ali, J., Najeeb, J., Ali, M.A., Aslam, M.F., Raza, A., Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review, *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 8, 1–9, **2017**.
- [21] Turner, A.P.F., Biosensors: sense and sensibility, *Chemical Society Reviews*, 42, 3184, **2013**.
- [22] Monošík, R., Stred'anský, M., Šturdík, E., Biosensors — classification, characterization and new trends, *Versita*, 5, 109–120, **2012**.
- [23] Iqbal, M., Label-Free Biosensor Arrays Based on Silicon Ring Resonators and High-Speed Optical Scanning Instrumentation, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 16, 654–661, **2010**.
- [24] The Â Venot, D.R., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, 71, 2333–2348, **1999**.

- [25] Dey, D., Goswami, T., Optical biosensors: a revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication, *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 348218, **2011**.
- [26] Dambors, P., Svitel, J., Katrlík, J., Optical biosensors, *Essays in Biochemistry*, 60, 91–100, **2016**.
- [27] Skládal, P., Piezoelectric biosensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 127–133, **2016**.
- [28] Janshoff, A., Galla, H.J., Steinem, C., Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors—An Alternative to Optical Biosensors?, *Angewandte Chemie*, 39, 4004–4032, **2000**.
- [29] Cöpel, W., Biosensoren: Biosensors: Theory and Applications, *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, 41, 1156–1157, **1993**.
- [30] Ramanathan, K., Rank, M., Svitel, J., Dzgoev, A., Danielsson, B., The development and applications of thermal biosensors for bioprocess monitoring, *Trends in Biotechnology*, 17, 499–505, **1999**.
- [31] Rocha-Santos, T.A.P., Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 62, 28–36, **2014**.
- [32] Megens, M., Prins, M., Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 702–708, **2005**.
- [33] Yuan, J., Gaponik, N., Eychmüller, A., Application of Polymer Quantum Dot-Enzyme Hybrids in the Biosensor Development and Test Paper Fabrication, *Analytical Chemistry*, 84, 5047–5052, **2012**.
- [34] Lobel, E., Rishpon, J., Enzyme electrode for the determination of glucose, *Analytical Chemistry*, 53, 51–53, **1981**.
- [35] Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., Mohapatra, E., Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis, *Biochemistry research international*, 2016, 3130469, **2016**.
- [36] Van Beilen, J.B., Li, Z., Enzyme technology: an overview, *Current opinion in biotechnology*, 13, 338–44, **2002**.

- [37] Sharma, S., Byrne, H., O'Kennedy, R.J., Antibodies and antibody-derived analytical biosensors., *Essays in biochemistry*, 60, 9–18, **2016**.
- [38] Drummond, T.G., Hill, M.G., Barton, J.K., Electrochemical DNA sensors, *Nature Biotechnology*, 21, 1192–1199, **2003**.
- [39] Du, Y., Dong, S., Nucleic Acid Biosensors: Recent Advances and Perspectives, *Analytical Chemistry*, 89, 189–215, **2017**.
- [40] Su, L., Jia, W., Hou, C., Lei, Y., Microbial biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1788–1799, **2011**.
- [41] Wijesuriya, D.C., Rechnitz, G.A., Biosensors based on plant and animal tissues, *Biosensors and Bioelectronics*, 8, 155–160, **1993**.
- [42] Chin, C.D., Linder, V., Sia, S.K., Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities., *Lab on a chip*, 7, 41–57, **2007**.
- [43] Yager, P., Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature*, 442, 412–418, **2006**.
- [44] Martinez, A.W., Phillips, S.T., Carrilho, E., Thomas, S.W., Sindi, H., Whitesides, G.M., Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis, *Analytical Chemistry*, 80, 3699–3707, **2008**.
- [45] Srinivasan, B., Tung, S., Development and Applications of Portable Biosensors, *Journal of Laboratory Automation*, 20, 365–389, **2015**.
- [46] Jeong, S.G., Kim, J., Nam, J.O., Song, Y.S., Lee, C.S., Paper-based analytical device for quantitative urinalysis, *International neurourology journal*, 17, 155–61, **2013**.
- [47] Berson, S.A., Yalow, R.S., Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody, *The Journal of clinical investigation*, 38, 1996–2016, **1959**.
- [48] Vaitukaitis, J.L., Braunstein, G.D., Ross, G.T., A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone, *American journal of obstetrics and gynecology*, 113, 751–8, **1972**.

- [49] Yetisen, A.K., Akram, M.S., Lowe, C.R., Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab on a Chip*, 13, 2210, **2013**.
- [50] Ren, K., Chen, Y., Wu, H., New materials for microfluidics in biology, *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 78–85, **2014**.
- [51] Rackus, D.G., Shamsi, M.H., Wheeler, A.R., Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields, *Chemical Society Reviews*, 44, 5320–5340, **2015**.
- [52] Nge, P.N., Rogers, C.I., Woolley, A.T., Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications, *Chemical Reviews*, 113, 2550–2583, **2013**.
- [53] Martinez, A.W., Phillips, S.T., Butte, M.J., Whitesides, G.M., Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays, *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 1318–1320, **2007**.
- [54] Nilghaz, A., Guan, L., Tan, W., Shen, W., Advances of Paper-Based Microfluidics for Diagnostics—The Original Motivation and Current Status, *ACS Sensors*, 1, 1382–1393, **2016**.
- [55] Martinez, A.W., Phillips, S.T., Whitesides, G.M., Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 19606–11, **2008**.
- [56] Kakoti, A., Siddiqui, M.F., Goswami, P., A low cost design and fabrication method for developing a leak proof paper based microfluidic device with customized test zone, *Biomicrofluidics*, 9, 26502, **2015**.
- [57] Stahl, E., Advances in chromatography, *Archiv der Pharmazie*, 308, 800–801, **1975**.
- [58] Su, S., Ali, M.M., Filipe, C.D.M., Li, Y., Pelton, R., Microgel-Based Inks for Paper-Supported Biosensing Applications, *Biomacromolecules*, 9, 935–941, **2008**.
- [59] Whitesides, G.M., The origins and the future of microfluidics, *Nature*, 442, 368–373, **2006**.

- [60] Martinez, A.W., Phillips, S.T., Wiley, B.J., Gupta, M., Whitesides, G.M., A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices, *Lab on a Chip*, 8, 2146, **2008**.
- [61] Fenton, E.M., Mascarenas, M.R., López, G.P., Sibbett, S.S., Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1, 124–129, **2009**.
- [62] Zhong, Z.W., Wang, Z.P., Huang, G.X.D., Investigation of wax and paper materials for the fabrication of paper-based microfluidic devices, *Microsystem Technologies*, 18, 649–659, **2012**.
- [63] Xu, Y., Enomae, T., Paper substrate modification for rapid capillary flow in microfluidic paper-based analytical devices, *RSC Advances*, 25, 1–3, **2013**.
- [64] Rendón, M.Y., Dos Santos Scholz, M.B., Bragagnolo, N., Physical characteristics of the paper filter and low cafestol content filter coffee brews, *Food Research International*, 108, 280–285, **2018**.
- [65] Karpe, A.V., Beale, D.J., Harding, I.H., Palombo, E.A., Optimization of degradation of winery-derived biomass waste by Ascomycetes, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90, 1793–1801, **2015**.
- [66] Delaney, J.L., Hogan, C.F., Tian, J., Shen, W., Electrogenerated Chemiluminescence Detection in Paper-Based Microfluidic Sensors, *Analytical Chemistry*, 83, 1300–1306, **2011**.
- [67] Anonim, Nitrocellulose membranes for blotting, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n8142?lang=en®ion=TR>, (Eylül, **2018**).
- [68] Bolattin, M.B., Nandibewoor, S.T., Joshi, S.D., Dixit, S.R., Chimatadar, S.A., Interaction between carisoprodol and bovine serum albumin and effect of β -cyclodextrin on binding: insights from molecular docking and spectroscopic techniques, *RSC Advances*, 6, 63463–63471, **2016**.
- [69] Samanta, A., Jana, S., Ray, D., Guchhait, N., Modulated photophysics of a cationic DNA-staining dye inside protein bovine serum albumin: Study of binding interaction and structural changes of protein, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, 23–34, **2014**.

- [70] Riccardi, C., McCormick, S., Kasi, R., Kumar, C., A Modular Approach for Interlocking Enzymes in Whatman Paper, *Angewandte Chemie International Edition*, 57, 1–6, **2018**.
- [71] McCann, L., Benavidez, T.E., Holtsclaw, S., Garcia, C.D., Addressing the distribution of proteins spotted on μ PADs, *The Analyst*, 142, 3899–3905, **2017**.
- [72] Smith, G.T., Robust dipstick urinalysis using a low-cost, micro-volume slipping manifold and mobile phone platform, *Lab on a chip*, 16, 2069–78, **2016**.
- [73] Okamoto, T., Suzuki, T., Yamamoto, N., Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology, *Nature Biotechnology*, 18, 438–441, **2000**.
- [74] Sirringhaus, H., High-resolution inkjet printing of all-polymer transistor circuits, *Science*, 290, 2123–6, **2000**.
- [75] Yoshioka, Y., Jabbour, G.E., Desktop inkjet printer as a tool to print conducting polymers, *Synthetic Metals*, 156, 779–783, **2006**.
- [76] Calvert, P., Inkjet Printing for Materials and Devices, *Chemistry of materials*, 13, 3299–3305, **2001**.
- [77] Cui, X., Boland, T., D’Lima, D.D., Lotz, M.K., Thermal Inkjet Printing in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 6, 149–155, **2012**.
- [78] Wu, H.C., Lin, H.J., Kuo, Y.C., Hwang, W.S., Simulation of Droplet Ejection for a Piezoelectric Inkjet Printing Device, *Materials Transactions*, 45, **2004**.
- [79] Lenke, R.R., Levy, H.L., Maternal Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia, *New England Journal of Medicine*, 303, 1202–1208, **1980**.
- [80] Anonim, Phenylalanine metabolic pathway, https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_04-01.html, (Eylül, **2018**).
- [81] Cerone, R., Schiaffino, M., Di Stefano, S., Veneselli, E., Phenylketonuria: diet for life or not, *Acta Paediatrica*, 88, 664–666, **2007**.
- [82] Waisbren, S., White, D.A., Screening for cognitive and social–emotional problems in individuals with PKU: Tools for use in the metabolic clinic, *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, S96–S99, **2010**.

- [83] Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M., Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria, *Lancet*, 265, 812–3, **1953**.
- [84] Følling, I., The discovery of phenylketonuria, *Acta paediatrica Supplement*, 407, 4–10, **1994**.
- [85] Hanley, W.B., Newborn phenylketonuria (PKU) Guthrie (BIA) screening and early hospital discharge, *Early human development*, 47, 87–96, **1997**.
- [86] Hennermann, J.B., Langenbeck, U., Lichter-Konecki, U., Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies, *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, 2–9, **2011**.
- [87] Hardelid, P., The Birth Prevalence of PKU in Populations of European, South Asian and Sub-Saharan African Ancestry Living in South East England, *Annals of Human Genetics*, 72, 65–71, **2008**.
- [88] Bickel, H., Neonatal mass screening for metabolic disorders, *European Journal of Pediatrics*, 137, 133–139, **1981**.
- [89] Ozalp, I., Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future, *The Turkish journal of pediatrics*, 43, 97–101, **2001**.
- [90] Anonim, PAH gene, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAH#location>, (Eylül, **2018**).
- [91] Woolf, L.I., The heterozygote advantage in phenylketonuria, *American journal of human genetics*, 38, 773–5, **1986**.
- [92] Cipriano, L.E., Rupar, C.A., Zaric, G.S., The Cost-Effectiveness of Expanding Newborn Screening for up to 21 Inherited Metabolic Disorders Using Tandem Mass Spectrometry: Results from a Decision-Analytic Model, *Value in Health*, 10, 83–97, **2007**.
- [93] Atherton, N.D., Green, A., HPLC measurement of phenylalanine in plasma, *Clinical chemistry*, 34, 2241–4, **1988**.
- [94] Urdea, M., Requirements for high impact diagnostics in the developing world, *Nature*, 444, 73–79, **2006**.
- [95] Kolodny, E.H., Cable, W.J.L., Inborn errors of metabolism, *Annals of Neurology*, 11, 221–232, **1982**.

- [96] Singh, R.H., Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency, *Genetics in Medicine*, 16, 121–131, **2014**.
- [97] Gregory, C.O., Yu, C., Singh, R.H., Blood phenylalanine monitoring for dietary compliance among patients with phenylketonuria: comparison of methods, *Genetics in Medicine*, 9, 761–765, **2007**.
- [98] Campbell, R.S., Development and validation of a robust specific enzyme mediated assay for phenylalanine in serum, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 210, 197–210, **1992**.
- [99] Robinson, R., Wong, L., Monnat, R., Fu, E., Development of a Whole Blood Paper-Based Device for Phenylalanine Detection in the Context of PKU Therapy Monitoring, *Micromachines*, 7, 28, **2016**.
- [100] Thiessen, G., Robinson, R., De Los Reyes, K., Monnat, R.J., Fu, E., Conversion of a laboratory-based test for phenylalanine detection to a simple paper-based format and implications for PKU screening in low-resource settings, *The Analyst*, 140, 609–15, **2015**.
- [101] Mossou, E., The self-assembling zwitterionic form of L -phenylalanine at neutral pH, *Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry*, 70, 326–331, **2014**.
- [102] Evans, C.T., A Novel, Efficient Biotransformation for the Production of L–Phenylalanine, *Nature Biotechnology*, 5, 818–823, **1987**.
- [103] Buda, S., Crich, D., Oxidative Deamination of N -Acetyl Neuraminic Acid: Substituent Effects and Mechanism, *Journal of the American Chemical Society*, 138, 1084–1092, **2016**.
- [104] Kato, M., Lin, S.J., Regulation of NAD⁺ metabolism, signaling and compartmentalization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair*, 23, 49–58, **2014**.
- [105] Creeke, P.I., Dibari, F., Cheung, E., Van den Briel, T., Kyroussis, E., Whole blood NAD and NADP concentrations are not depressed in subjects with clinical pellagra, *The Journal of nutrition*, 137, 2013–7, **2007**.

- [106] Robinson, R., Wong, L., Monnat, R., Fu, E., Development of a Whole Blood Paper-Based Device for Phenylalanine Detection in the Context of PKU Therapy Monitoring, *Micromachines*, 7, 28, **2016**.
- [107] Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S., Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152, **2005**.
- [108] Anonim, Nitro blue Tetrazolium Chloride (NBT), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N6495>, (Eylül, **2018**).
- [109] Hisada, R., Yagi, T., 1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate. A photochemically stable electron mediator between NADH and various electron acceptors, *Journal of biochemistry*, 82, 1469–73, **1977**.
- [110] Jeyachandran, Y.L., Mielczarski, J.A., Mielczarski, E., Rai, B., Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 341, 136–142, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Pelin Kazancı
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Evli
E-posta : pelintan4@gmail.com
Adresi : Ozan City Konutları A1 Blok No.52 Bağlıca Ankara

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi - Biyoloji
Yüksek Lisans :

Yabancı Dil

İngilizce

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 11/09/2018

Tez Başlığı / Konusu: Fenilketonüri Tanısı İçin Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Analitik Cihaz Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç e) Referanslar kısımlarından oluşan toplam 86 sayfalık kısmına ilişkin, 11/09/2018 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~çalışmam~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

12/09/2018

P. Kazancı

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Pelin Kazancı

Öğrenci No: N15123022

Anabilim Dalı: Biyomühendislik ABD

Programı: Biyomühendislik

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Harun Özyürek
Doç. Dr. Meriç Demirel
(Unvan, Ad Soyad, İmza)