T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MODEL TÜKÜRÜKTE QCM SENSÖR İLE SENTETİK GENETİK MATERYAL TESPİTİ

Hazırlayan
Furkan SOYSALDI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2017
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

MODEL TÜKÜRÜKTE QCM SENSÖR İLE SENTETİK GENETİK MATERYAL TESPİTİ

(Yüksek Lisans Tezi)

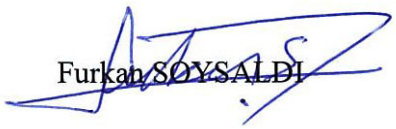
Hazırlayan
Furkan SOYSALDI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Temmuz 2017
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.



Furkan SOYSALDI

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Model Tükürükte QCM Sensör İle Sentetik Genetik Materyal Tespiti" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Furkan SOYSALDI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mehmet Emin YÜKSEL

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU danışmanlığında **Furkan SOYSALDI** tarafından hazırlanan "**Model Tükürükte QCM Sensör İle Sentetik Genetik Materyal Tespiti**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomedikal Mühendisliği** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

18 /07/2017

JÜRİ:

Başkan : Doç. Dr. Semra İÇER

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kutay İÇÖZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ONAY:
Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ...01/08/2017... tarih ve 2017/32-24 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...01.../08.../...2017...

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince maddi, manevi desteklerini eksik etmeyen, beni daima destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Furkan SOYSALDI

Temmuz 2017, Kayseri

MODEL TÜKÜRÜKTE QCM SENSÖR İLE SENTETİK GENETİK MATERYAL TESPİTİ

Furkan SOYSALDI

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2017
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ÖZET

Erken teşhis, hastalıkların tedavisinde çok kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle günümüzde Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (Polymerase Chain Reaction) (PCR) genetik olarak hastalıkların teşhisi için Altın Standart olarak kullanılmaktadır. PCR yerine kullanılabilecek alternatif yöntemler araştırılmaktadır, çünkü; işlem süresi uzun, yatırım maliyetleri pahalı ve sadece gelişmiş ülkelerin erişebildiği ve sahip olduğu tam donanımlı laboratuvarlar gerektiriyor. Tükürük üzerinden genetik tespit yapabilen alternatif bir yöntem, göreceli olarak daha düşük bir enfeksiyon riskine sahip olur ve hasta konforu invaziv işlem uygulanmadığından dolayı çok daha yüksek olur. İşlemi sağlayan sağlık personeline ve diğer hastalara enfeksiyonların bulaşma riski kan örneklerine kıyasla tükürükte çok daha az olmaktadır.

Bu çalışmada, sensör yüzeyindeki toplam kütle değişimini 0.5 ng/cm^2 hassasiyetle, rezonans frekansındaki değişimden algılayan bir algılayıcı cihaz olan Kuvars Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance) (QCM) cihazı kullanılmıştır. Sensör yüzeyi, sensörün kararlılığını artırmak ve yeterli immobilizasyon için uygun yüzey sağlamak için (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) kaplama ajanına maruz bırakılmıştır. Sentetik Prob DNA (pDNA), Sentetik Target DNA'yı (tDNA) tespit edebilmek için sensör yüzeyine yerleştirilmiştir. pDNA immobilizasyonu ve sensör yüzeyini Büyükbaş Serum Albümin (Bovine Serum Albumin) (BSA) ile bloke ettikten sonra, yüzey her bir konsantrasyon seviyesi için negatif kontrole ve 3 farklı tDNA konsantrasyonuna en az 3 kez maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, simüle edilmiş tükürükteki genetik materyalin, 1.2 ng/cm^2 (10^8 kopya/mL) hassasiyet seviyesinde izolasyon, saflaştırma ve amplifikasyona ihtiyaç duyulmaksızın tespit edildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör; QCM; DNA Tespiti

SYNTHETIC GENETIC MATERIAL DETECTION WITH QCM SENSOR IN MODEL SALIVA

Furkan SOYSALDI

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Science Thesis, July 2017
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ABSTRACT

Early diagnosis plays a crucial role in curing the diseases. Especially, nowadays, PCR (Polymerase Chain Reaction) is used as a Gold Standard for genetically diagnosing illnesses. Alternative ways are being searched to be used instead of PCR because it takes more time to process, needs more investment, requires fully-armed laboratory condition which is available and accessible only in developed-countries. An alternative method which is able to make genetic detection in saliva would have relatively lower infection risks, and patients comfort would be much higher by the reason of invasive treatment is not processed. The risk of transmission of contagious infections to medical officials or patients is lower with saliva compared to blood samples.

QCM (Quartz Crystal Microbalance) which is a sensing device to be able to detect total mass-change on sensor surface with 0.5 ng/cm^2 sensitivity by the alteration of resonance frequency has been used in this study. Sensor surface has been exposed to (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) coating agent to increase the stability of sensor and provide a proper surface for sufficient immobilization. Synthetic Probe DNA (pDNA) has been placed on the sensor surface to make it able to detect the Synthetic Target DNA (tDNA). After pDNA immobilization and blocking sensor surface with Bovine Serum Albumin (BSA), the surface has been exposed to negative control and 3 different concentrations of tDNA at least 3 times for each concentration level. Results show that genetic material in simulated-saliva has been detected without the need of isolation, purification and amplification at 1.2 ng/cm^2 (10^8 copies/mL) of sensitivity level.

Keywords: Biosensor; QCM; DNA Detection

İÇİNDEKİLER

MODEL TÜKÜRÜKTE QCM SENSÖR İLE SENTETİK GENETİK MATERYAL TESPİTİ

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
KABUL ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ve SİMGELER xi
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii

1. BÖLÜM
GENEL BİLGİLER

1.1. Tükürük 1
1.1.1. Tükürük Sıvısı 1
1.1.2. Tükürük Bezi Salgıları 2
1.1.3. Tükürük Sekresyonunun Bileşenleri 4
1.1.3.1.Tükürüğün Organik Bileşenleri 6
1.1.3.2. Tükürüğün İnorganik Bileşenleri 7
1.1.4. Tükürüğün Görevleri 8
1.1.5. Tükürük İle Hastalık Teşhisi Ve Önemi 10
1.1.6. Girişimsel Olmayan Ve Erken Tespitin Önemi 11
1.1.7. Tükürük İle Yapılan Genetik Tespitler 12

1.2. DNA Tespit Yöntemleri 15
1.2.1. Ticari Yöntemler 15
1.2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 15
1.2.2. Gelişmekte Olan Yöntemler 20
1.2.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler 20
1.2.2.1.1. Amperometrik/Voltmetrik Biyosensörler 20
1.2.2.1.2. Potensiyometrik Biyosensörler 21
1.2.2.1.3. İletkenlik/Kapasitans/İmpedans Biyosensörler 22
1.2.2.2. Optik Biyosensörler 23
1.2.2.2.1. Emilim ve Yansıtma Biyosensörleri 23
1.2.2.2.2. Işınım Biyosensörleri 23
1.2.2.2.3. Işıma Biyosensörleri 25
1.2.2.2.4. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler 25
1.2.2.2.5. Optik Fiber Biyosensörler 27
1.2.2.3. Kantilever Biyosensör 27
1.2.3. Piezoelektrik Biyosensörler 29
1.2.3.1. Piezoelektrik Tarihçesi 29
1.2.3.2. Piezoelektrik Hakkında Teorik Bilgi 32
1.2.3.2.1. Ferroelektrik Özellik Ve Polarizasyon 32
1.2.3.2.2. Piezoelektrik Özellik 32
1.2.3.2.3. Piezo / Ferroelektrik Etki ve Polarizasyon 33
1.2.3.2.4. Piezoelektriklerde Sınırlamalar 42
1.2.3.2.4.1. Elektrodaralma (Elektrostriksiyon) 42
1.2.3.2.4.2. Depolarizasyon 43
1.2.3.2.4.3. Frekans Sınırlamaları 43
1.2.3.2.6. Piezoelektrik Malzemelerin Kullanıldığı Yerler / Uygulama Alanları 45
1.2.3.2.6.1. Sensör 46
1.2.3.2.6.2. Üreteçler 46

1.2.3.2.6.3. Aktuatörler 47

1.2.3.2.6.4. Transdüserlar 48

1.3. Kuvars Kristal Mikrodenge 48

1.3.1. Kuartz 50

1.3.1.1. Kuartzın Kullanım Alanları 51

1.3.1.2. QCM'in Avantajları 51

1.3.1.3. Piezoelektrik Etki Ve QCM'in Çalışma Prensibi 52

1.3.2. QCM İle Biyosensör Tasarımı 55

1.3.3. QCM Uygulamaları 56

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE METODLAR

2.1. Deney Malzemeleri ve Kimyasalları 61

2.1.1. Kullanılan Cihazlar 61

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar 62

2.1.3. Kullanılan Sentetik DNA'lar 64

2.1.4. Kullanılan Deney Düzenekleri 64

2.2. QCM Temizlik İşlemi 66

2.2.1. QCM Sensör Yuvası ve Bileşenlerinin Temizliği 66

2.2.2. QCM Sensör Yuvasındaki Conta ve O-ring Parçalarının Temizliği 66

2.2.3. QCM Sensörün Temizlenmesi 67

2.3. MPS Kaplama 67

2.3.1. MPS Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması 69

2.3.2. MPS Kaplama İşleminin Yapılması 69

2.3.3. MPS Kaplama İşleminin QCM İle Takibi 70

2.4. SULFO-SMCC Kaplama İşlemi 72

2.4.1. SULFO-SMCC Solüsyonunun Hazırlanması 72

2.4.2. SULFO-SMCC Kaplama İşleminin Uygulanması 72

2.4.3. SULFO-SMCC Kaplama İşleminin QCM İle Takibi 73

2.5. pDNA İmmobilizasyonu 74

2.5.1. pDNA Solüsyonunun Hazırlanması 74

2.5.2. pDNA İmmobilizasyon İşleminin Uygulanması 75

2.5.3. pDNA İmmobilizasyonun İşleminin QCM İle Takibi 75

2.6. Model Tükürük 76

2.7. BSA Bloklama 76

2.7.1. BSA Solüsyonunun Hazırlanması 77

2.7.2. BSA Bloklama İşleminin Uygulanması 77

2.7.3. BSA Bloklama İşleminin QCM İle Takibi 78

2.8. tDNA Tayini 78

2.8.1. tDNA Solüsyonunun Hazırlanması 79

2.8.2. tDNA Solüsyonlarının Uygulanması 80

2.8.3. tDNA Hibridizasyon İşleminin QCM İle Takibi 81

2.9. Sıcaklık tDNA Deneyi 82

3. BÖLÜM

BULGULAR VE SONUÇLAR

3.1. Deney Aşamalarının Frekans Analizi 84

3.2. Sistemin Hassasiyet Analizi 86

3.3. tDNA Hibridizasyonlarının Mukayesesi 87

3.4. Vücut İçi ve Vücut Dışı Sıcaklıklarda Yapılan Kıyaslama 89

3.5. Sistemin T-Test Bilgisi 90

4. BÖLÜM

TARTIŞMA 91

KAYNAKÇA 93

ÖZGEÇMİŞ 110

KISALTMALAR ve SİMGELER

Sembol	Anlamı	Birimi
QCM	Kuartz Kristal Mikrodenge	-
MPS	(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane	-
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	-
BSA	Büyükbaş Serum Albümin	-
PBS	Fosfat Tamponlu Serum	-
DIW	Deiyonize Su	-
Sulfo-SMCC	4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt	-
Hz	Hertz	s^{-1}
ω	Açısal Hız	w
I	Akım	A
Δm	Birim alandaki kütle değişimi	g/cm^2
R	Direnç	ohm
Z	Empedans	ohm
V	Gerilim	V
f_0	Kristalin temel rezonans frekansı	Hz
f	Frekans	Hz
dk	Dakika	s
s	Saniye	s
ml	Mililitre	L
ul	Mikrolitre	L
mg	Miligram	N
ng	Nanogram	N
nl	Nanolitre	L

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Tükürük Proteinlerinin Bazı Vücut Sıvılarında Dağılımı 5
Tablo 1.2. İlk Keşfedilen Bazı Ferroelektrik Kristaller 33
Tablo 2.1. Sentetik DNA Özellikleri 64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Tükürük Örneği 2
Şekil 1.2. Büyük Tükürük Bezleri 3
Şekil 1.3. Tükürüğün Görevleri 8
Şekil 1.4. Thermal Cycler Cihazı 16
Şekil 1.5. PCR İşlemi Aşamaları 18
Şekil 1.6. Gözden Çabuk Kaybolan Dalga Kullanan Işınır Biyosensörlerin Üç Farklı Formatı 24
Şekil 1.7. SPR Biyosensörü Prensipleri 26
Şekil 1.8. Kantilever Biyosensör Yapısı 28
Şekil 1.9. Ferroelektrik Bellek (Feram) (Ramtron Co.) 31
Şekil 1.10. Perovskite Baryum Titanatın Kristal Yapısı 34
Şekil 1.11. Kutuplaşma Sürecinin Şematik Çizimi 34
Şekil 1.12. A) PZT'nin Dielektrik (P-E) Histeresiz Eğrisi; B) PZT'nin Kutuplaşma Yönündeki, S_3-E_3, Deformasyonu 36
Şekil 1.13. Piezoelektrik Elemanın Davranışı (a) Elemandaki Polarizasyon Doğrultusu (b-c) Üreteç Davranışı (d-e) Motor Davranışı 38
Şekil 1.14. $LiTaO_3$ (LT) Ve $LiSbO_3$ (LS) Modifiye Edilmiş KNN Sistemleri İçin Bir Sıcaklık Fonksiyonu Olarak Piezoelektrik Katsayıları Ve Bağlanma Faktörleri. 39
Şekil 1.15. %5 KNN-LS Malzemesi İçin Bir Sıcaklık Fonksiyonunun Dielektrik Geçirgenliği 40
Şekil 1.16. Piezoelektrik Malzemenin İnce Diskinin Düzlemsel Salınımları 41
Şekil 1.17. Frekansın Bir Fonksiyonu Olarak Bir PZT Diskin Özdirenci 44
Şekil 1.18. Provskit Kristalinin Şematik Görüntüsü 45
Şekil 1.19. Temel Piezoelektrik Sensör Çeşitleri, (a) Eksenel Sensör, (b) Fleksör Sensör 46
Şekil 1.20. Piezoelektrik Eleman Kullanılarak Oluşturulan Elektrik Enerjisi, (a) Ark Üretimi, (b) Şarj Üretimi 47
Şekil 1.21. Temel Aktuatör Çeşitleri (a-c) 48

Şekil 1.22. QCM Sensörleri (Biolin Scientific) 49
Şekil 1.23. Kuartz Kristali 50
Şekil 1.24. Kuartz Kristalinin AT Kesimi 51
Şekil 1.25. QCM Sisteminin Şematik Diyagramı 54
Şekil 1.26. SH-Modifiye Probun Altın Yüzeye Bağlanması 56
Şekil 2.1. QCM Cihazı (Biolin Scientific QCM-D) 61
Şekil 2.2. MPS Yapısı 63
Şekil 2.3. Sulfo-SMCC Yapısı 63
Şekil 2.4. Bovine Serum Albumin Yapısı 63
Şekil 2.5. Oda Sıcaklığı Kapalı Döngü Sistem Düzeni 65
Şekil 2.6. Oda Sıcaklığı Açık Döngü Sistem 65
Şekil 2.7. 37°C Sıcaklıkta Kapalı Döngü Sistem 66
Şekil 2.8. MPS Kaplamanın Yüzey ile Etkileşimi 68
Şekil 2.9. MPS Kaplama Sonrası Kaplamanın a) Kesit Alanı ve b) Üstten Görünüşü c) Optimum Koşullardaki Kaplamanın Sinyal Gürültüsü Üzerindeki Etkisi ve d) Gürültü Değişimi [175] 69
Şekil 2.10. MPS Kaplama İşleminin QCM İle Takibi 70
Şekil 2.11. MPS Eğri Uydurma Uygulanmadan Önceki Grafik 71
Şekil 2.12. Sulfo-SMCC'nin MPS ile Etkileşimi 72
Şekil 2.13. Sulfo-SMCC Kaplama İşleminin QCM İle Takibi 73
Şekil 2.14. pDNA'nın Sulfo-SMCC İle Etkileşimi 74
Şekil 2.15. pDNA İmmobilizasyon İşleminin QCM ile Takibi 75
Şekil 2.16. BSA'nın Yüzey İle Etkileşimi 77
Şekil 2.17. BSA Bloklama İşleminin QCM ile Takibi 78
Şekil 2.18. tDNA ile pDNA Arasındaki Etkileşim (Hibritleşme) 79
Şekil 2.19. tDNA Hibridizasyonunun QCM İle Takibi 81
Şekil 2.20. Sıcaklık tDNA Deneyleri İçin Dizayn Edilen Açık Döngü Sistem Şematiği 83

Şekil 3.1. Deney Aşamalarının Frekans Değişimi.....84
Şekil 3.2. Sistemin Hassasiyet Analizi.....86
Şekil 3.3. Farklı tDNA Konsantrasyonlarının Frekans Analizi.....87
Şekil 3.4. Logaritmik Eksende Doz Kıyaslama.....88
Şekil 3.5. Vücut İçi ve Vücut Dışı Verimlilik Kıyaslaması.....89

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Tükürük

1.1.1. Tükürük Sıvısı

Ağız içindeki birleşik sıvının genel adı olarak tanımlanan tükürük renksiz, kokusuz, hafif bulanık ve az kıvamlı bir sıvıdır. Tükürük, % 95-99.4'ü su olmak üzere çeşitli minerallerden, elektrolitlerden, hormonlardan, enzimlerden, immunglobulinlerden, sitokinlerden ve diğer komponentlerden oluşmaktadır. Tükürüğün tamamı homojen olmayıp birçok farklı kaynaktan salgılanmaktadır [1].

Ankara Diş Hekimleri Odasınca (2009), "Sindirim fonksiyonunda rolü olan ve birçok fonksiyonel immün maddeyi içeren tükürük oral kavite ve tüm organizma için önemli bir akışkandır. Büyük tükürük bezleri (parotis, submandibular, sublingual) ve ağzın farklı yerlerine dağılmış (damak, yanak, dudak, dil) minör tükürük bezleri tarafından salgılanan tükürük makromoleküller ve su olmak üzere iki ana bileşenden oluşur" şeklinde raporlamıştır [2, 3].

Tükürüğün % 99'luk kısmını su, % 1'lik kısmını ise inorganik iyonlar, salgısal glikoproteinler, serum elemanları ile enzimler oluşturur [4].

Ankara Diş Hekimleri Odasının aynı raporunda (2009), "Tükürüğün yoğunluğu 1003–1009 g/ml arasında değişir. Hipotoniktir, viskozitesi 19-35 mPa.s (milipaskalsaniye) arasındadır. Pityalin, musin, rodanürler, glikoproteinler, maltaz, mukopolisakkarit tükürüğün organik maddelerini oluştururlar. Tükürüğün ihtiva ettiği enzimler ise amilaz, muramidaz (lizozim), laktoferrin, maltaz, alkalen ve asit fosfataz, adenozin trifosfataz, peroksidaz, laktoperoksidaz, kalikrein, laktik dehidrogenazdır" olarak belirtilmiştir [2, 4].

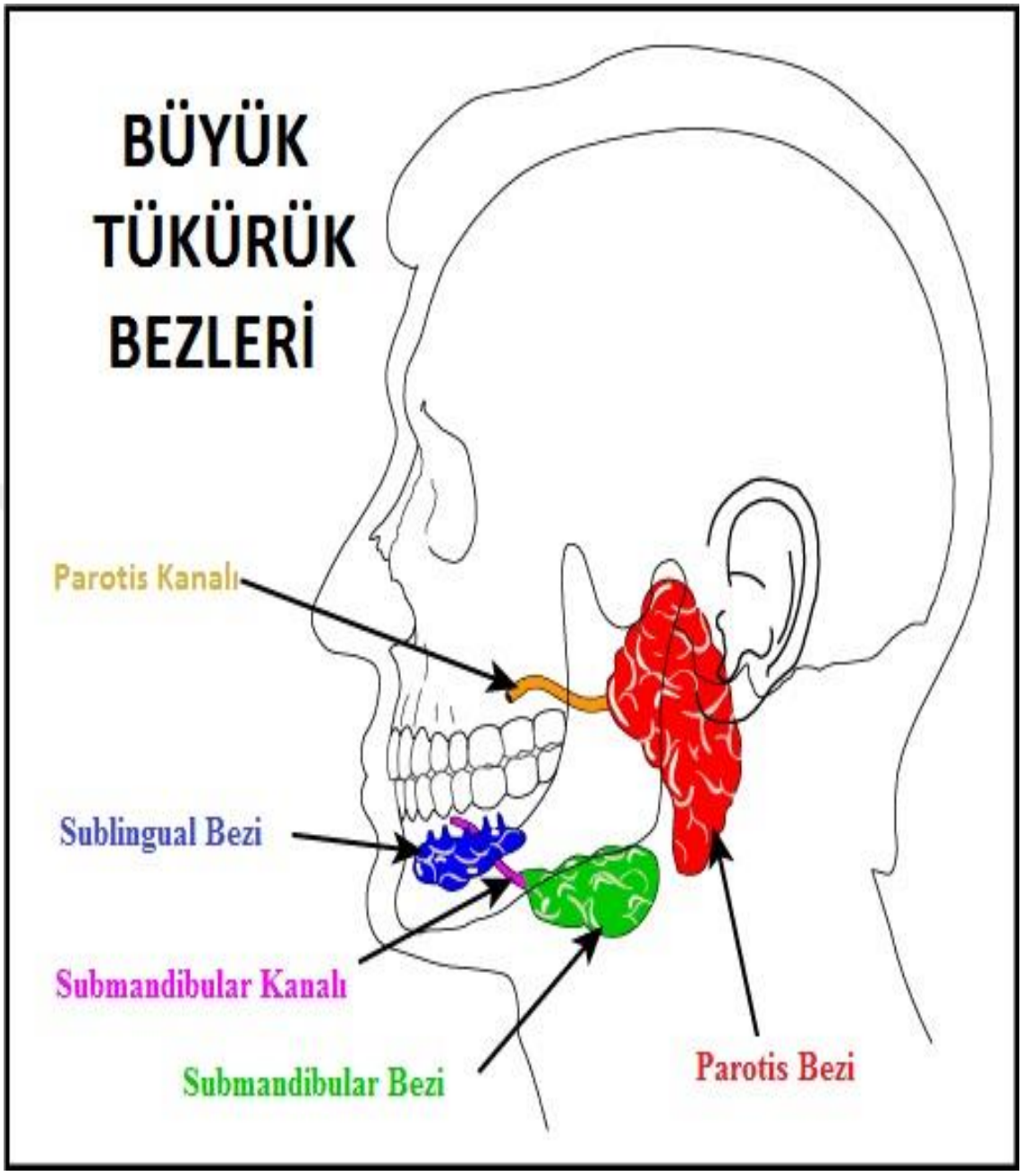


Şekil 1.1. Tükürük Örneği [5]

Tükürük bezleri sürekli fonksiyon gösteren organlardır. Erişkinde günde 1-1.5 L tükürük salgılanır. Uyarılmamış tükürük bezlerinde tükürüğün hacminin %65'ini submandibuler bez, %20'sini parotis, %7-8'ini sublingual bezler ve %10'dan az kısmını da minör salgı bezleri sağlar [5]. Akılda kalması açısından ortalama 70 yıl yaşayan bir kişi ömrü boyunca yaklaşık 25.000 litre tükürük salgılamaktadır.

1.1.2. Tükürük Bezi Salgıları

Tükürük sekresyonu yapan bezler majör ve minör olarak iki şekilde incelenir. Majör tükrük bezlerini glandula parotis, glandula sublingualis, glandula sunmandibularis oluşturur. Minör tükrük bezleri ağız boşluğunun neredeyse tamamında bulunur; lakin labial, palatinal, bukkal ve lingual bölgelerin bazı yerlerinde (sert damağın 1/3 ön bölümünde yapışık dişetinde dilin 1/3 ön bölümünde) yer almazlar [6-7].



Şekil 1.2. Büyük Tükürük Bezleri [8]

Gl. Parotis; tükürük bezlerinin en büyüklerinden olup, ağırlığı 20-30 gram arasındadır. Ramus mandibulanın arkasında, kulağın ön alt kısmında fossa retromandibulariste bulunur ve bu fossayı tamamen doldurur. Parotis salgısını ”ductus paratidicus” (stenon kanalı) aracılığı ile üst ikinci molar dişin medial yüzü hizasında ağız boşluğuna döker. Kanalın uzunluğu 4-5.5 cm kalınlığı ise 4 mm kadardır. Parotis salgısı, tükürük hacminin %30’luk kısmını meydana getirir.

Bu salgı seröz berrak ve az miktarda müsin içermesi sebebiyle akıcı kıvamdadır. Kuru gıda maddelerini ıslatıp yumuşatmaya yarar. Yalnız kuru gıdayla değil asidik ve alkalen maddelerle de bol parotis salgısı meydana gelebilir. Böylece parotis salgısı ile de alkali ve asidik ortam pH'ı nötr hale getirilmeye çalışılır [6-8].

Gl. Submandibularis, mandibulanın iç yüzü ve m.digastricusun iki karnı arasında bulunan, üçgen biçiminde olan alanın orta ve arka kısmını doldurur. Ağırlığı 7-12 gram kadardır. Tükürüğün %55-65'inin meydana getirir. Salgısını "dustus submandibularis" (wharton kanalı) adı verilen kanal aracılığı ile plika sublingualisin iç kısmında karankula sunbilgualis hizasında ağız boşluğuna döker.

Mikst tip bir bezdir. Ancak seröz hücreleri daha fazla olduğundan salgısı daha ziyada serözdür. Az miktarda müsin içerir. Gıda maddelerinin eriterek tat vermesini temin eden salgı olduğu için "tat salgısı" veya "sindirim salgısı" da denir [6-7].

Gl. Sublingualis, ağız tabanında mukoza altında, m.mylohyoideusun üstünde mandibulanın eksenine paralel olarak uzanmış olup ağırlığı 3-4 gramdır. Birçok bezin birleşmesinden meydana gelmiştir. Bu bezlerin her birinin ayrı ayrı kanalları olup genellikle 8-15 küçük kanal halinde plika sublingualis üzerine ağız boşluğuna açılırlar. Küçük kanallara "dustuli sublingualis minores" (ricinus kanalları) adı verilir. Bu kanalların en büyüğü "dustuli sublingualis major" (bartholin kanalı) adını alır.

Tükürüğün 1/5'ini meydana getirir. Sublingual bez de mikst tür bir bezdir. Ancak müköz hücreleri daha fazla olduğundan salgısı müsinden zengindir. Sublingual bez bu özelliği ile ağızda parçalanmış ve ufalanmış besin maddelerinin birbirine yapışmasını sağlar. Onun için bu bezin salgısına "yutma salgısı" da denir.

Minör tükürük bezleri ise; yalnız mukus salgılar. Diğerlerinin yanında rolleri azdır. Total sekresyon hacminin %5-8'ini karşılarlar. Buna rağmen majör tükürük bezlerinden bir veya daha fazlasının fonksiyon yapmaması halinde mukozanın yeterli nemlilikte kalmasını sağlarlar [6-7].

1.1.3. Tükürük Sekresyonunun Bileşenleri

Tükürük proteinlerinin bazı vücut sıvılarına nasıl dağıldığı aşağıdaki tabloda ifade edilmiştir.

Tablo 1.1. Tükürük Proteinlerinin Bazı Vücut Sıvılarında Dağılımı [9]

	Tükürük	**Gözyaşı Sıvısı**	**Nazal Mukus**	**Bronşial Mukus**	**Meni Sıvısı**	**Rahimağzı Sıvısı**	**Ter**	**Kan Sıvısı**
Mucins	++++	+	++++	++++	+	++++	++++	-
Acidic PRPs	++++	-	-	-	-	-	-	-
α-Amylase	++++	+	+	+	+	+	+	+
Basic PRPs	+++	-	+	+	-	-	-	-
Basic PRG	+++	-						
Secretory IgA	+++	++++	++++		+		+	-
Cystatins	++	+	+		+		+	++
Statherin	++	+	+	+				
IgG	+	+	+	+	+		+	++++
EP-GP	+	+	+		+	-	+	-
VEGh	+	++++	-					
Histatins	+	-	-	-	-	-	-	-
Lysozyme	+	++++	++++	++++		+	+	+
Kallikrein	+		+		+		+	+
Lactoferrin	+	++++	++++	++++	+	+		+
Lactoperoxidase	+	+	+			+		
Haptocorrin	+	+	+		+			+
B-Microseminoprotein	+	+	++	+++	++++	+	+	+
IgM	+	+	+	+				++
Albümin	+	+	+	+		+	+	++++
Zn- α2 Glycoprotein	+	+					+	+

- : Algılanmadı
+ : Toplam protein miktarın %1'inden daha az
++ : Toplam protein miktarının %1 ile %5 arası
+++ : Toplam protein miktarının %5 ile %15 arası
++++ : Toplam protein miktarının %15'inden daha fazla
BOŞ : Belirlenemedi

Tükürük içerik olarak oldukça zengin bir yapıdadır. Tükürüğün %99'u su, %1'i suda çözünmüş organik ve inorganik maddelerdir.

Organik maddeler; üre, amonyak, ürik asit, glikoz, kolesterol, lipid, aminoasit ve proteinlerdir. Organik maddelerden en önemlileri pityalin (amilaz) ve daha az oranda bulunan maltaz, üre ve ürik asittir.

İnorganik maddeler; Na^{+} (sodyum), K^{+} (potasyum), Ca^{+2} (kalsiyum), Cl^{-} (klor, pityalinin aktivite kazanması için gereklidir), tampon özellikteki sülfatlar ve bikarbonatlardır. Kalsiyum karbonat ve fosfatlar alkali pH'da çökerler ve diş taşlarının meydana gelmesine sebep olurlar. Diğer inorganik elementler ise tiyosiyonat, iyot, flor,

demir, magnezyum, kobalt, molibden, brom, kalay, krom, kurşun ve çinkodur [9,10,11,12]. Tükürükte rodanürler de bulunur. Protein metabolizmasının sonucu olarak ortaya çıkan rodanürler diş taşlarının sarı kahverengi renginin meydana çıkmasına sebep olur [12].

1.1.3.1.Tükürüğün Organik Bileşenleri

Tükürüğün içinde bu sıvıya özel ve ağız sağlığına önemli katkıları bulunan birçok protein vardır.

Bu proteinlerin çoğu %35-40 oranında prolin içerir ve prolinden zengin proteinler (proline rich proteins-PRP) olarak adlandırılırlar. Parotis kaynaklı tükürüğün %70'ini oluşturan PRP'ler asidik, bazik ve glikozile PRP'ler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Parotis salgısının PRP'ler dışında kalan kısmını ise büyük oranda amilaz oluşturur. Lizozom, salgısal IgA, laktoferrin ve peroksidaz gibi diğer proteinler çok daha küçük miktarlarda bulunurlar. Genetik heterojeniteye sahip olan asidik PRP'ler, enamel pelikülünde bulunan multifonksiyonel proteinlerdir. Bakteriyel ve hidroksiapatit bağlanma bölgeleri içerdiklerinden diş yüzeyine yapıştıklarında oral bakteriler için yüksek spesiteye sahip bağlanma bölgeleri oluştururlar.

Bir başka protein olan staterin; kalsiyum ve fosfat tuzlarının bulunduğu ortamda tükürüğün aşırı doygun olma durumunu korumasını sağlar, böylelikle spontan kalsiyum fosfat presipitasyonunu ve kristal oluşumunu önleyerek oral sağlığa katkıda bulunur.

Küçük, bazik, histidinden zengin preteinler olan histatinler ise potemt anti-candidal etkilere sahiptirler.

Submandibular/sublingual tükürüğün bir başka organik bileşeni olan müsinler büyük glikoproteinlerdir. Yüksek derecede glikozile olduklarından, hidrasyon potansiyeline sahiptirler ve kurumayı önleyerek lubrikasyona yardımcı olurlar [10].

Yukarda bahsedilen proteinlerin dışında tükürüğün bir başka önemli bileşeni de amilazdır. Diyet bileşenlerimiz arasında önemli bir yer tutan nişastanın sindiriminde rol oynayan bu enzim, tükürük bezi ve pankreastan salınır. Tükürük amilazı α amilaz, pankreas kökenli olan ise P amilaz olarak tanımlanır. Nişasta (Amiloz+Amilopektin) yapılarından meydana gelir. Amiloz 1,4 bağlı glukoz moleküllerinden ve amilopektin

ise 1,4 bağlı glukozların her 24-30 glukozda bir 1,6 bağları ile dallanmasından oluşur. A amilaz, 1:4 glukon-4-gloanohidrolaz; P amilaz ise α 1:4 glukon-maltohidrolaz diye tanımlanır [12].

1.1.3.2. Tükürüğün İnorganik Bileşenleri

Tükürüğün inorganik yapısında bulunan, minenin dekalsifikasyon ve remineralizasyon olaylarında önemi bilinen ana element ise, Na, K, Ca, Mg, P'dur [11].

Sodyum, ekstrasellüler sıvının temel katyonu olup, asit-baz dengesinin düzenlenmesinde klorür ve bikarbonat ile birlikte görev alır. Sodyumun serumdaki düzeyi 140 mEq/L, tükürükteki düzeyi ise 5-6 mEq/L'dir.

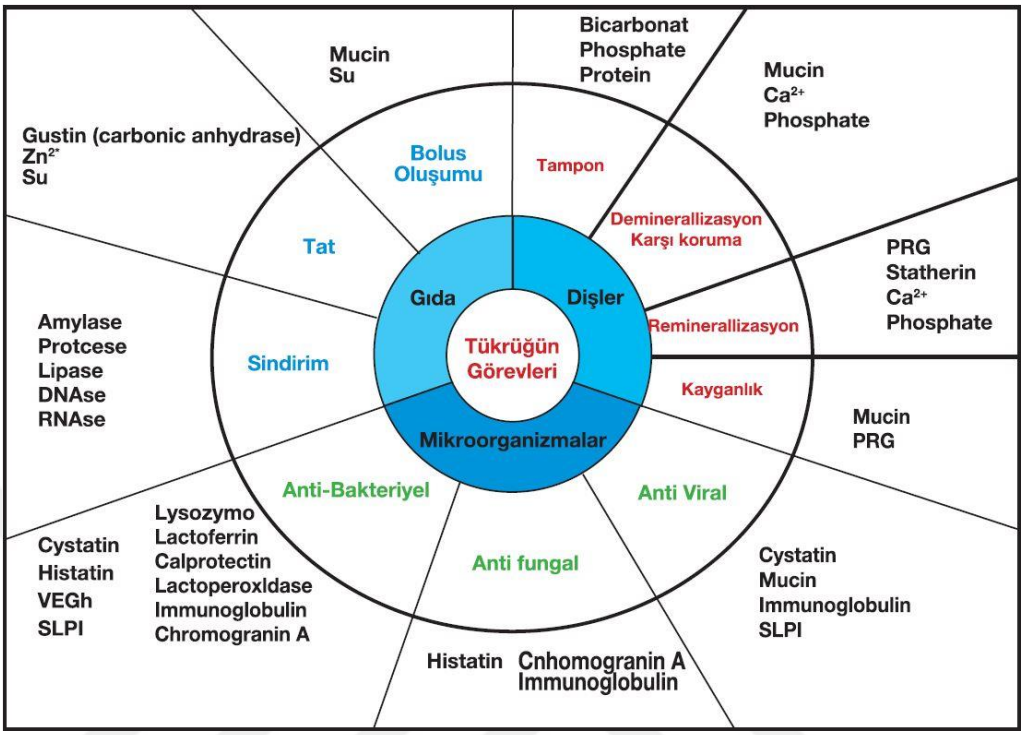
Potasyum, intrasellüler sıvının temel katyonu olup serumdaki total miktarı 5 mEq/L, tükürükte ise 21 mEq/L'dir.

Erişkin bir kişinin vücudunda en fazla bulunan element olan kalsiyumun plazmadaki miktarı; 5 mEq/L, tükürükte ise; 1.5-2 mEq/L'dir. Tükürükte bulunan kalsiyumun %25'i proteine bağlıdır, ancak henüz yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır.

Magnezyum, hücre içi sodyum-potasyum metabolizmasının ayarlanmasında önemi bilinen bir katyondur. Plazmadaki miktarı 1.5-2.5 mEq/L, tükürükte ise 0.6 mEq/L kadardır.

İnorganik fosfatın kandaki değeri 1-1.5 mM/L iken, uyarılmamış tükürükte 6 mM/L'dir. Tükürük bezlerinden salgılanan inorganik fosfat miktarı farklıdır. En fazla parotis bezinden salgılanmaktadır [13].

1.1.4. Tükürüğün Görevleri



Şekil 1.3. Tükürüğün Görevleri [3]

Şekil 1.3. de görüldüğü üzere tükürük insan organizmasında hayati önem taşıyan birçok görevleri üstlenmiştir.

Sindirim işlemini ağızda başlamaktadır. Tükürüğün ana görevi yiyeceklerin sindirilmesine yardım etmek ve sindirim kanalının giriş bölgesinin korunmasıdır. Gıdaların çiğnenmesi sırasında; gıdaların ufalanması, kimyasal olarak parçalanması ve lokmanın özofagusa taşınmasında yardımcıdır. Ağızda çiğnenerek küçültülmüş besinler tükürük musini yardımı ile yumuşak kıvamlı bir kitle şekline dönüşürler. Gıdalar sulandırılıp kaygan şekle geldiklerinden yutma daha kolaylaşmış olur. Tükürükteki musin, ufalanan parçaları birbirine yapıştırarak yutulabilir hale getirir. Ağız kuruluğu olan kişilerde yutmanın zorlaştığı bilinir [14,16,17,18,19]. Tükürük yapısından bulunan pityalin (amilaz), karbonhidrat sindiriminde önemli rol oynar. İnsan tükürüğünün amilotik aktivitesi α-amilaza bağlıdır. Amilolitik aktivite karbonhidrattan zengin diyet ile belirgin şekilde artar. Dilin posterior kısmındaki von-Ebner bezlerinden salgılanan lipaz da trigliseritlerin parçalanmasında görev alır. Fazla miktarda alınacak yağlı diyet sonrası, pankreatik lipaz ile birlikte salgı miktarında artış görülür [14,16,17,18,20].

Ağızdaki gıdaların tadının alınabilmesi için, onların suda erimiş halde olmaları gereklidir. Tükürük; hem yiyeceklerin eritilmesinde hem de tat cisimciklerine taşınmasında görev alır. Ayrıca dildeki tat cisimcikleri tükürükle temizlenerek yeni uyaranlara hazır duruma getirilir [14,16,17,18].

Ankara Diş Hekimleri Odası (2009) yılında tükürükteki bağışıklık sistemi bileşenlerini; "Tükürük yapısında mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen ve mukozayı enfeksiyonlardan koruyan birçok madde yer alır. Bunlardan birisi, asiner hücrelerden salgılanan peroksidaz ve duktal sistemden salgılanan iyodittir. Peroksidaz, bakteriyel proteinlerdeki tirozini parçalar. Tükürükteki diğer antibakteriyel protein, lizozimdir. Lizozim, bakteriyel hücre membranının polisakkaritlerini hidrolize ederek etki gösterir. Birçok mikroorganizmanın destrüksiyonunda ve inhibisyonunda önemli göreve sahiptir. Normal olarak tükürük bezlerinde aminopeptidaz, histoşimik yöntemlerle gösterilmiştir. Oral kavitedeki bradikinin gibi fizyolojik olarak aktif peptitlerin inaktivasyonunda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Oral kavite hastalıklarında bu enzimin aktivitesi artar. Çeşitli ağız hastalıklarında enzim aktivitesi değişiklik gösterir. Diğer bir savunma elemanı tükürük immunglobulinleridir. Burada IgA daha önemlidir. Bezlerin stromasındaki bağ dokusunda yer alan plazma hücrelerinden salgılanan IgA mukozanın dış yüzeylerini mikroorganizmalara karşı korur. Tükürükte IgG ve IgM de görülür. Demire bağlı protein olan laktoferrin de antibakteriyel özellik gösterir. Parotis ve submandibuler bezlerin seröz hücrelerinde immunofloresan yöntemlerle lokalize edilebilmiştir. Tükürüğün, sayısız antibakteriyel etkinliğinin yanında non-karyojenik mikro floraya ait bazı bakterilerin üremesine olan katkısı ilginçtir" şeklinde raporlamıştır [2,14,16,18,21,22].

Tükürük, ağız temizliği ve diş sağlığında önemli rol oynar. Oral kavitede optimum düzeyde tükürük salgısı olmalıdır. Tükürük bakteriler üzerine bakteriostatik ve bakterisit etki gösterdiğinden ağız kokusuna neden olan bakterilerin üremesini engeller. Ayrıca tükürük azlığında; karbonhidratların fermantasyonu ile oluşacak asit dişlerin çürümesine de yol açar. Tükürük ve diş çürümeleri arasındaki ilişki, eskiden beri bilinmektedir. Dişler arasındaki yemek artıklarının çözerek ağız temizliğine katkı sağlar. Salgılanma hızının dişlerin yüzeylerinin mekanik olarak temizlenmesinde payı büyüktür. Yapısındaki glikoproteinler dişin mine tabakasında bir ağ oluştururlar. Çürük oluşturucu mikroorganizmalar, karbonhidratların fermantasyonuna yol açarak asit ve

dekstranları ortaya çıkarırlar. Asitler mine tabakasında demineralizasyon yaparak çürüğü oluştururlar. Dekstran, bakteriler için besin kaynağıdır. Ağızda asiditenin görülmesinde diyet, tükürük pH'sı ve tamponlama özelliği amonyak ve üre miktarları rol oynarlar. Tükürükle salgılanan bikarbonat tamponlama görevi ile çürük oluşmasını engeller. Tükürükteki karbonik asit-bikarbonat sistemi ve daha az olarak da fosfat ve proteinler tamponlama görevlerini sağlar. Dişlerinde çürük olmayan kişilerde tamponlama özelliği daha yüksek bulunmuştur. Tükürükteki amonyak ve üre; diş çürümelerine karşı nötralizasyon yolu ile etki yaparken, kalsiyumunun yüksek düzeylerde bulunması çürük oluşumunu engeller. İnorganik fosfat ise, çürük oranı fazla olan bireylerde daha yüksek bulunmuştur. Tükürükteki kalsiyum/fosfat oranının, dişlerin remineralizasyonunda etkili olduğu, dolayısıyla çürüğün önlenmesinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür [14,15,16,17,18].

1.1.5. Tükürük İle Hastalık Teşhisi Ve Önemi

İnsan sıvılarından bir takım hastalıkların teşhisi yapılabilmektedir. Kan ile tükürük mukayese edilirse; tükürüğün alınması işlemi kan almaya nazaran çok daha hızlı, hasta konforu açısından göreceli olarak üst düzey, işlem maliyeti daha azdır. Tükürük için sağlık personeli ihtiyacı yok, girişimsel değil, saklanması kolay bir vücut sıvısıdır. Bu sebeplerden mütevellit, gerek hastaya gerek sağlık personeline olabilecek enfeksiyon riski minimum seviyelerdedir [19].

Ayrıca kan sıvısında işlem yapacak olan PCR cihazları çok pahalı ve uzmanlık gerektirmesi dolayısıyla sadece büyük laboratuvarlarda bulunan cihazlardır. Ölçüm yapılabilmesi için çeşitli kitlerin kullanılması gerekmektedir ve işlem süresi uzun sürmektedir. Kan alma sonrası, kanın PCR cihazına ulaşması süresince yapısında bulunan proteinler kanı pıhtılaştırmaya çalışmaktadır. Bu istenmeyen bir durum olduğu için karıştırıcı (shaker) olarak bilinen cihazlarda sürekli karıştırılması gerekmektedir [23].

Tükürük ise hastadan, herhangi bir sağlık personeli yardımına ihtiyaç duyulmadan kolayca temin edilebileceği gibi saklanması için herhangi bir teçhizata gerek duyulmamaktadır. Girişimsel bir işlem yapılmaması hasta konforunu maksimuma çıkartırken, enfeksiyon riskini minimuma indirmektedir. İşlem süresi olarak 30 dk gibi

bir sürede kesin sonuçlar alınabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı işlem maliyetlerinde büyük oranda bir azalma söz konusu olabilecektir.

1.1.6. Girişimsel Olmayan Ve Erken Tespitin Önemi

Erken tanı, tedavi başarısında önemli bir rol oynamaktadır. Hastalığın erken aşamada saptanması, şiddetli etkilerin azalmasını, oluşacak komplikasyonların engellenmesini, ya da geciktirilmesini sağlayabilmektedir [25]. Erken tanı hastanın hayat konforunu artırırken tedavi maliyetlerini ve hastaya olacak sıkıntıların azaltılmasını sağlamaktadır.

Tükürüğün serum bileşenleri, kaynağını karotid arterinden alan lokal damar ağından elde edildiğinden, tükürük sistemik dolaşımda bulunan birçok molekülü içeren çok büyük bir sıvı kaynağıdır. Bu nedenle, tükürük hastalıkların erken tanısında çok değerli bir sıvı özelliği taşımaktadır [24].

Düzenli sağlık kontrolü yaptırmanın önemi bilinmekle beraber, birçok hastalık ciddi semptomlar göstermeden teşhis edilememekte; bu nedenle, araştırmacılar gizli kalmış hastalık riskine ilişkin tehditlerin saptanmasında moleküler biyomarkırların önemini vurgulamaktadır [26,27,28,29].

Biyomarkır, teşhis edilmiş ya da görüntülenmiş normal, anormal ya da biyolojik sürecin hücresel, biyokimyasal, moleküler ve genetik değişiklikleridir. DNA, RNA ya da protein molekülleri olan biyomarkırlar doku, hücre ya da kan, üre ve serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılardan ölçülebilmektedir. Bir biyomarkır, salgılanan malign bir molekül olduğu gibi kanser varlığında vücudun verdiği spesifik bir cevap da olabilmektedir [29,30].

Son yıllardaki moleküler teşhisler klinik uygulamalarda da önem kazanmış, ancak tam bir moleküler tanının gerçekleştirilmesi üç majör etken nedeniyle sınırlı kalmıştır. Tanıyı zorlaştırıcı bu etkenler; hastalığa özgü moleküler biyomarkır eksikliği, kolay ve ucuz örnekleme yönteminin eksikliği ve hassas, kullanılması kolay, portatif platform eksikliği olarak bildirilmektedir. Ulusal Dental ve Kraniyofasiyal Araştırma Enstitüsü (NIDCR), 2002 yılından itibaren ağız sıvılarındaki bu kısıtlamaları ortadan kaldırmaya çalışmaktadır [31,32].

Tükürük, protein ve genetik moleküller içeren, noninvaziv yaklaşım gerektiren, kolay, güvenilir örnekleme yöntemi ile çalışmayı sağlayabilen bir ağız sıvısıdır [24]. Tükürük toplama, saklama, gönderme ve hacimli örnekleme açısından serum ve üreye göre çok daha ekonomiktir.

Kanın pıhtılaşması gibi bir durum tükürükte olmadığından tükürüğün taşınması kolaydır; bu özelliklerin yanı sıra, tükürük testlerinde sağlık çalışanları için hastalığın bulaşma riski olmadığından seruma göre daha güvenilirdir; noninvaziv bir yöntem olması da hastalarda endişe ve rahatsızlık oluşturmamaktadır. Tükürük biyomarkırlarındaki ve tükürük tanı yöntemlerindeki gelişmeler ile gelecekte hastalığa özgü moleküler biyomarkır eksikliği ve hassas, kullanılması kolay, portatif platform eksikliğine ilişkin sorunların da ortadan kalkabileceği öne sürülmektedir. Son zamanlarda, biyoteknoloji ve tükürük tanı yöntemlerinin birleşimi ile tükürükte saptanan birçok değerli tıbbi maddenin kanser, otoimmun hastalıklar, viral hastalıklar, bakteriyel hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve HBV, HIV gibi çeşitli hastalıkların biyomarkırı olarak tanıda kullanılabildiği bildirilmektedir [25].

1.1.7. Tükürük İle Yapılan Genetik Tespitler

Tükürük kolay elde edilebilmesi, elde edilme yönteminin ucuz olması ve minimal enfeksiyon riski taşıması, sağlık personeline ihtiyaç duyulmadan hasta tarafından kolaylıkla elde edilebilmesi ve değerlendirilmesinin hasta tarafından evde yapılabilme imkânı nedeni ile çeşitli hastalıkların tanısında ve tedavisinin değerlendirilmesinde kolaylıkla kullanılabilmektedir. Kan serumuna oranla lokal faktörleri de içeriyor olması avantajıdır [35].

Blicharz ve ark. (2008) nitrit ve ürik asit gibi tükürük biyomarkırlarının ölçümünün hemodiyalizin etkinliğinin ölçülmesinde alternatif bir ölçüm yöntemi olabileceğini belirtmişlerdir [36].

İnsan tükürüğünde üre olduğu ilk defa 1841 de Wright tarafından bildirilmiştir. Ferris 1920 de, tükürükte artmış ürenin bulunmasının böbrek hastalığını gösterdiğini ileri sürmüştür [33].

Meucci ve ark. (1998) diyalize giren hastalardan diyalize girmeden aldıkları tükürük örneklerinde sağlıklı bireylere oranla artmış ürik asit seviyesini saptamışlardır [37].

Lütfioğlu ve ark. (2008), diyalize giren 15 çocuk hasta üzerinde kronik böbrek yetmezliğinin tükürük hacmi ve osmotik basıncı üzerine etkisini inceleyerek tükürük sıvı dinamiğinde oluşan değişimleri ve bu değişimlerin ağız sağlığına etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda kontrol grubuna göre, tükürük osmotik basıncında artma, hacminde azalma saptamışlardır. KBY'nin çocuklarda tükürük sıvı dinamiğini değiştirebileceğini ve bu şekilde ağız sağlığı üzerine etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir [38].

Sreebny ve Zhu (2007), tükürük akış hızı, pH, tamponlama kapasitesi, lactobasillus ve mantar konsantrasyonunun tükürük bezlerindeki hipofonksiyonu gösterebileceğini belirtmişlerdir. Sjögren Sendromu'nun teşhisinde tükürükteki sitokin, interleukin-2 (IL-2) ve interferon (IFN) seviyelerin [39] ve serum antijenlerinden anti Ro/SS-A ve anti La/SS-B değerlerinin saptanmasının yeterli olacağını savunmuşlardır [40].

Chatterton ve ark. (1996) egzersiz, stresli durum gibi kalp atım hızının arttığı durumlarda tükürükte α-amilaz seviyesinde artma saptamışlar ve kalp atım değişimlerinin başarılı bir şekilde saptanabileceğini belirtmişlerdir [41]. Dengesiz hipertansiyonlu hastaların tükürüklerinde, yüksek lizozom seviyesinin saptandığı çalışmalar vardır [42]. Kardiyovasküler rahatsızlıklarda kişilik özelliklerinin öneminin incelendiği çalışmada, tükürüğün kolay elde edilebilir örnek olma özelliği değerlendirilerek tükürük kortizol seviyesi araştırılmıştır [43].

Matinez (1999) yaptığı çalışmada, tükürükte HIV antikorlarını enzim bağlantılı floresan tahlil ile araştırmış (ELFA) ve sonuçlarını Western Blot test yöntemi ile kontrol etmiştir. HIV pozitif hastalarda virüsün tükürükten izole edilebildiğini ve tükürüğün hastalığın teşhisinde kullanılabileceğini belirtmiştir [44].

Çeşitli hastalıkların tanısı amacıyla tükürükten birçok bakteri ve virüs izole edilebilmektedir. Li ve ark. (1996), Helicobacter pylori'yi teşhis etmek amacıyla tükürükte PCR yöntemi ile araştırmışlar ve serum oranlarına yakın sonuç elde etmişlerdir [45].

Oral kavitede bulunan bakteriler ve mantarlar da tükürükten izole edilerek incelenebilir. Oranlarına göre koruyucu önlemler alınabilir [46].

Parry ve ark. (1989), hepatit A virüsü (HAV) ve hepatit B virüsünün (HBV) teşhisi amacıyla tükürük IgM ve IgG antikorlarını araştırdıkları çalışmalarında tükürüğün HAV'ın tanımlanmasında başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir [47].

Hepatit B yüzey antijeninin tükürükte araştırıldığı çalışma ise HBV teşhisinde başarılı sonuç vermiştir [48].

Thieme ve ark. (1994), kızamık, kızamıkçık ve kabakulak antikorlarının tükürükte serum seviyesine yakın olarak saptandığını ve bu oranların güvenilir ve kolay bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir [49].

Diğer doku sıvılarına benzer şekilde tükürükten de ilaç taraması yapılabilmektedir [50]. İlacın tükürükte saptanabilmesi için tükürük serumdan tükürük bezlerine ilerleyebilmeli ve oradan da salgılanmalıdır. Bu yüzden araştırılacak ilacın fizikokimyasal özellikleri önemlidir. İlacın molekül büyüklüğü, yağda eriyebilirliği, iyonizasyon, tükürüğün pH'sı ve ilacın proteine bağlanabilme özelliği önemlidir [50,51].

Tükürük, hastanın hormonal rahatsızlığının teşhisi amacıyla hormon miktarının tespitinde kullanılabilmektedir. Yağda eriyebilirliklerine bağlı olarak kortizoller tükürükten kan serum seviyesine çok yakın bir şekilde izole edilebilmektedir [52].

McVie ve ark.'nın (1979) yaptığı çalışmada tükürük aldosteron seviyesini kan serum seviyesine oranını 0.96 şeklinde saptamışlar ve teşhis için kullanılabileceğini belirtmişlerdir [53].

En kullanışlı alan olabilecek diyabet hastalarının tükürüklerinden insülin seviyelerinin ölçebilmesi amacıyla yapılan çalışmada, Fekete ve ark. (1993) , insülin düzeyini tükürükten radyoimmünoessay tekniğiyle saptamaya çalışmışlar ve sonucun kan serum düzeyine oranının 0.74 olduğunu açıklamışlardır. İnsülinin kan serumunda maksimum seviyeye ulaşmasından 30 dakika sonra tükürükte maksimum seviyeye ulaştığını belirtmişlerdir [54].

Hastalar tarafından pratik olarak kullanılabilecek tükürük testleri için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Tükürük değerlerinden prekanseröz lezyonların teşhisinin amaçlandığı çalışmada, ağız kanserine sahip bireylerle sağlıklı bireylerin interlokin-1β, IL-6, IL-8 ve osteopontin miktarları karşılaştırılmış ve bu sitokinlerin ağız kanserli bireylerde daha yüksek olduğu özellikle IL-6 farkının çok belirgin olduğu saptamışlardır [55].

Oral sukuamoz ve verrüköz karsinoma hastalarının kan serum ve tükürüklerinden p53 teşhisinin değerlendirildiği çalışmada tükürüğün, kan serumuna yakın değerler verdiği, erken teşhis amacıyla kullanılabileceği ancak ileri çalışmaların gerekli olduğu belirtilmiştir [56].

Tavassoli ve ark. (1998) p53'ün tükürükten izolasyonunun gelecekte kanser teşhisinde başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir [57].

Suçluların kimliğinin saptanmasında da tükürükten yoğun şekilde faydalanılmaktadır. Mittal ve ark. (2008) , elde edilebilecek tükürük örneğinden kişinin cinsiyetinin tayinini yapabileceklerini belirtmişlerdir. Tükürüklerden Barr cisimciklerinin miktarını tayin etmişler ve oranın erkeklerde ortalama %1.14 ve kadınlarda ise %39.29 olduğunu belirtmişlerdir. Bu yöntemle yanılma payı olmadan cinsiyet tayininin yapılabileceğini belirtmişlerdir [58]. Suç mahallinde bulunacak sigara izmaritinden veya çiğnenmiş sakızdan DNA tayini yapılarak suçlunun kimliğinin saptandığı çalışmalar mevcuttur [59,60].

Tükürük kullanılarak yapılacak teşhis yöntemleri üzerine çalışmalar popülerliğini korumaktadır ve çeşitli teşhis yöntemleri üzerine çalışmalar sürmektedir. Kullanıma sunulmuş çeşitli testler bulunmaktadır. Daha fazla tükürük test yöntemi bulunacaktır ancak bu yöntemlerin güvenirliği klinik olarak ortaya konulmalıdır [33,34,35].

1.2. DNA Tespit Yöntemleri

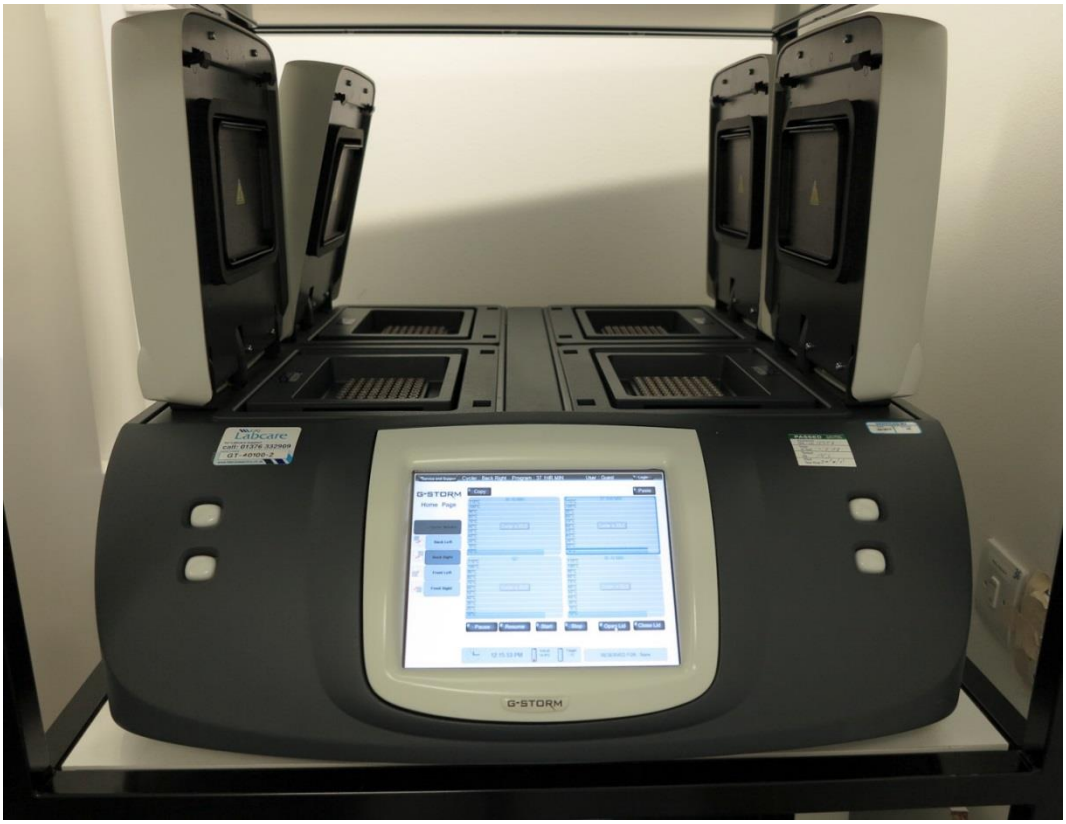
1.2.1. Ticari Yöntemler

1.2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, Polimeraze Chain Reaction kelimelerinin baş harflerinden oluşan bir kısaltmadır ve Türkçe'de Polimeraz Zincir Reaksiyonu anlamına gelmektedir. PCR ilk defa 1985 yılında Celera Genomics çalışanı Carry Mullis tarafından tanımlanmış ve günümüze kadar birçok defa geliştirilerek kullanılmaya devam edilmiştir.

PCR bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan; oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir

tekniktir [64,67,69]. Bu hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA'lar arasında olsalar bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilip kolayca identifiye edilebilir [61,69].



Şekil 1.4. Thermal Cycler Cihazı [65]

PCR, ortamda polimeraz enzimi ve DNA sentezi için uygun maddeler bulunması halinde DNA'nın karşıt sıralarını sentezleyebilme yeteneğinden faydalanılarak oluşturulan bir reaksiyondur. Seçilen DNA dizisi çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir. Böylece DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır [74].

PCR'ın başlıca kullanım alanları; mikrobiyolojik çalışmalar, adli tıp ve genetik bozuklukların belirlenmesi şeklinde özetlenebilir [61]. PCR'ın tıp ve diğer bilim alanlarında oldukça yaygın olarak kullanılmasında önemli rol oynayan faktörler arasında sıcaklığa dirençli DNA polimeraz enziminin bulunması ve PCR cihazlarının (Thermocycler) geliştirilmesi sayılabilir.

PCR'ın 6 adet temel bileşeni vardır. Bunlar Kalıp DNA, Primerler (Oligonükleotidler), Polimeraz Enzimleri, Deoksinükleotid-Trifosfat (dNTPs) karışımı, Tampon Solüsyonlar

ve Reaksiyon koşulları olarak ifade edilebilinir. Bu temel bileşenleri sırasıyla inceleyelim.

Kalıp DNA: PCR için başlangıç materyali yani çoğaltılacak baz dizisine sahip genetik materyaldir. Eğer hedef zincir olarak RNA'dan faydalanılacaksa, reaksiyon başlamadan önce revers transkriptaz enzimi kullanılarak RNA komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir, sonra da bu cDNA, PCR için kalıp olarak kullanılır. Tüm bu işlemlerde en önemli nokta, amplifiye edilecek DNA'nın fonksiyonel özellikte olmasıdır [61,66].

Primerler (Oligonükleotidler): İşaretlenmiş 4-10 nükleotidden oluşmuş sekanslar olup sentez için basamak oluşturan, DNA'yı PCR tekniği ile amplifiye edebilmek için kullanılan, başlatıcı yardımcı oligonükleotidlere primer denir. Bu kısa, tek sarmallı DNA molekülleri DNA matrisinin belli bir bölümünün sonu ile komplementer yapıya sahiptir. Bunlar hedef DNA'nın öyle sekanslara karşı hazırlanmışlardır ki, başka kontaminant DNA'lar ile çapraz reaksiyon vermezler. Bu sebeple de hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi gerekmektedir [61,67,73].

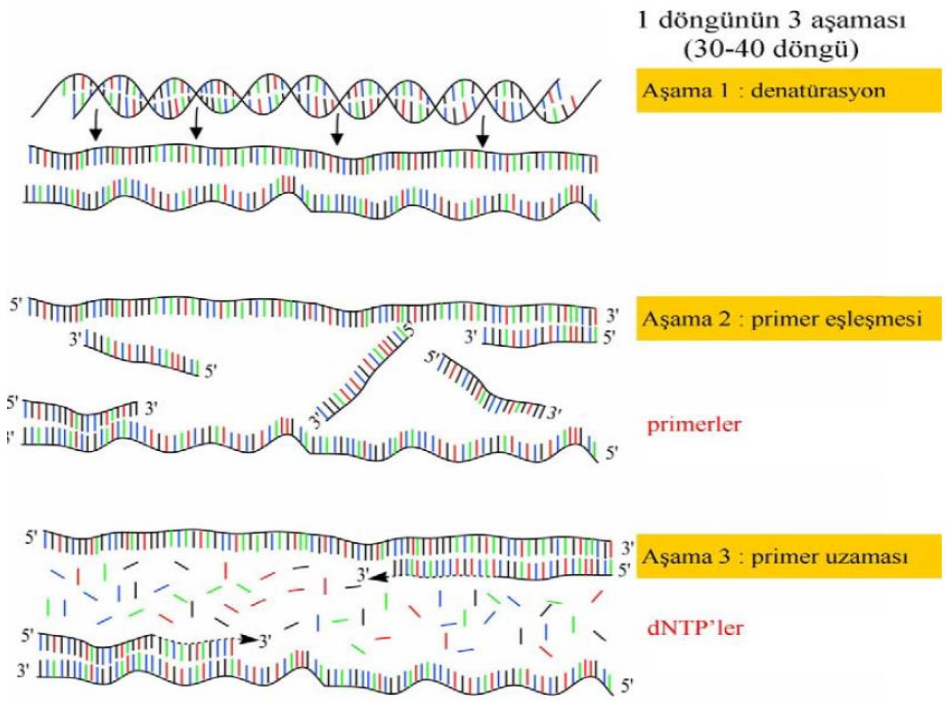
Polimeraz Enzimleri: PCR'da in vitro olarak DNA'nın amplifikasyonu işleminde, 1987 yılında bulunan, Thermus aquaticus'dan elde edilen sıcaklığa dirençli bir DNA polimeraz enzimi (Taq-DNA polimeraz) kullanılmıştır. Böylece Taq-DNA polimeraz, sıcaklığa dirençli olarak kullanılan ilk enzim olmuştur. Taq-DNA polimeraz enzimi sıcaklığa duyarlı olan diğer enzimlere göre daha kullanışlıdır. Çünkü; her denatürasyon siklusunda ortama yeni enzim ilavesine gerek yoktur. Ayrıca, primerlerin bağlanmaları yüksek sıcaklıklarda daha spesifik olmaktadır. Taq-DNA polimeraz dışında Thermus thermophilus DNA-polimeraz, Bacillus sterotermophilus DNA-polimeraz, Thermus brockianus DNA-polimeraz ve çok yüksek termofilik özellikteki thermus litorolis DNA polimeraz ticari olarak bulunan diğer enzimlerdir [61,67,73].

Deoksinükleotid-Trifosfat (dNTPs) Karışımı: Nükleik asit ya da yeni DNA sarmallarının sentezlenebilmesi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP'a gereksinim duyulmaktadır. Nötralize edilmiş, molaritesi belirlenmiş dörtlü setler halinde kullanılmaları halinde reaksiyonun güvenilirliği artmaktadır. Sentezlenecek olan hedef DNA'nın uzunluğu, sayısı, döngünün kaç kez tekrarlanacağı doğrudan doğruya dNTPs miktarı ile yakından ilgili olup; bunlar reaksiyondaki fosfat grubunun esas kaynağını oluştururlar.

PCR'da Kullanılan Tampon Solüsyonlar: 10 mM Tris (pH: 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, jelatin, %0.01 Np_4O ve Tween 20'dir.

Reaksiyon Koşulları: PCR'da zaman, sıcaklık ve siklus sayısı; hangi DNA'nın hangi primer ile amplifiye edileceğine bağlıdır [62,63,64,67].

PCR hücre içinde (in vivo) DNA'nın kendini eşlemesi mekanizmasına dayanır. Çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) biçimine çözülür, kopyalanarak çoğaltılır ve tekrar bağlanır. DNA'nın PCR ile çoğaltılması; zaman, sıcaklık ve döngü sayısı düzenlenerek aşağıda belirtilen 3 aşama ile gerçekleştirilir. Her bir PCR döngüsü aşağıdaki 3 aşamada gerçekleştirilir.



Şekil 1.5. PCR İşlemi Aşamaları [68]

1. Ayrıştırma (Denatürasyon) : Bu aşamada, çift iplikçikli kalıp DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Test ortamında buffer, dNTPs, hedef DNA'ya spesifik olan primer olarak isimlendirilen sentetik tek iplikçikli 15-30 bazlık oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı bir enzim (Taq polimeraz) bulunmaktadır. Bu aşamada ısı 91-95 °C olmalıdır. Reaksiyon 5 dakika sürmektedir. (Döngüye başlamadan önce 3-5 dakika ön ısıtma yapılabilir)

2. Primerlerin bağlanması (Birleşme) : Birinci aşama sonucunda denatüre olarak tek iplikçikli hale dönüşen DNA sekanslarının her birinin 3′ uçlarındaki (terminus) nükleotidlere uygun sıcaklıkta primerlerin bağlanması (primer annealing) bu aşamada gerçekleşir. Isının birden bire 50 °C dolaylarına düşürülmesiyle primerler DNA martisi üzerinde yoğunlaşır. Bu aşama genellikle 37-65 °C arasında değişmekte olup; reaksiyon 5 dakika sürmektedir.

3. Polimerizasyon (Uzama) : Isıya dayanıklı polimeraz enzimi, primerler ve kalıp olarak da tek iplikçikli DNA kullanılarak in vitro koşullarda çift iplikçikli DNA'nın sentezlenmesinin (primer elongation, primer extension) sağlandığı aşamadır. Reaksiyon 70-72 °C arasında yani Taq DNA polimeraz enzimi için optimal sıcaklıkta yaklaşık 5 dakikada tamamlanmakta olup; polimerizasyon işlemi 5′→3′ yönünde gerçekleşmektedir [64,65,67,70].

1 DNA molekülünden 30 döngünün sonunda milyarlarca (tam rakamı vermek gerekirse 1.073.741.764 adet) hedef DNA kopyası elde edilirken 60 adet değişik uzunluklarda DNA parçaları ortaya çıkar. Thermal Cycler adı verilen bu cihaz PCR örneğini 30 adet döngü işlemini yaklaşık 4 saat kadar sürede yapmaktadır.

Burada hatırlanması gereken bir husus bulunmaktadır. PCR gibi amplifikasyon teknikleri hiçbir zaman direkt teşhis metodları olarak kabul edilemezler. Bu yöntemler, hastalıkların tanısında büyük yardımı ve desteği olan çok duyarlı, spesifik, çabuk, güvenilir sonuçlar veren biyoteknolojik amplifikasyon yöntemleridir. Tanı ise, sonraki aşamalarda hidridizasyon yöntemleri ile konulmaktadır.

PCR'nun Avantajları:

1) Tekniğin çok hızlı aynı zamanda da oldukça spesifik oluşu en önemli özelliklerindendir.

2) Kan, serum, doku, hücre gibi materyallerin yanısıra, oldukça eski zamanlara ait olan kurutulmuş örneklerden (antropolojik çalışmalarda) de nükleik asitler eksrakte edilebildiğinden ve hedef DNA'nın çok küçük konsantrasyonlarının bile bu iş için yeterli olabilmesi nedeniyle oldukça pratik bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

3) Toksin oluşturan etkenlerin ve saptanması güç olan toksinlerin, bakteri alt tiplerinin laboratuvar koşullarında üretilmesi oldukça güç olan virüslerin teşhis edilebilmesini sağlar.

4) Dirençliliğe neden olan genin belirlenmesi ile antibakteriyel ilaçlara dirençli olan bakterilerin saptanmasında kullanılır.

5) Adli tıpta başta babalık tespiti olmak üzere pek çok alanda, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalarda giderek yaygınlaşarak kullanılmaktadır [61,64,69,71,72,73].

PCR'nun Dezavantajları:

1) PCR'ın en büyük avantajı aslında tekniğin en önemli dezavantajının da kaynağını oluşturur. Şöyleki, ortamda bulunan tek bir kontaminant DNA, eğer reaksiyonda kullanılan primer ile ortak baz sırasına sahip ise aynı oranda çoğalarak reaksiyon sonrası elde edilecek sonuçları olumsuz yönde etkileyecektir.
2) PCR, deneyimli personel gerektirir. Tekniğin yeterinde duyarlı ve özgün olması, sonuçların doğru bir şekilde yorumlanmasına bağlıdır.
3) Yöntemin pahalı olması kullanılan alet ve malzemeden kaynaklanmaktadır [62,63,64,67].

1.2.2. Gelişmekte Olan Yöntemler

1.2.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, diğer biyosensörler ile mukayese edildiğinde içlerindeki gelişmişliğini neredeyse tamamlamış ve en eski olanlarıdır. İlk yıllarında biyosensörler, kandaki glikoz (şeker) seviyesinin tespiti için çalışılmış birer enzim elektrotları şeklindeydi. Sonrasında elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini artırmak için, enzim-bağlantılı imünoelektrokimyasal (IEC, Immunoelectrochemical) sensörler geliştirildi [76].

1.2.2.1.1. Amperometrik/Voltmetrik Biyosensörler

Amperometrik sensörlerde, elektrokimyasal hücrelere sabit bir potansiyel fark uygulanır ve sonra ilişkili akım bir kimyasal reaksiyonuna bağlı olarak elde edilir.

Amperometrik biyosensörler, biyolojik olarak aktif materyalle kaplanmış olduğundan dolayı elektrokimyasal elektrot yardımıyla, konsantrasyon bağımlı akımı ölçer. Amper-

metrik dönüştürme, oksidasyon ve elektro aktif türlerin bir elektrot yüzeyinde indirgenmesi üzerine çalışır.

Amperometrik bir transdüser, her hangi bir enzim, antikor, DNA probu, tam hücreler ve dokular da dâhil biyoalgılama materyali ile birlikte kullanılabilir. Örneğin, çeşitli kompozit materyaller kullanarak, glutamat biyosensörü geliştirmek amacıyla stabil bir enzim elektrodu tasarlamışlardır. Sensörlerinin geniş lineer aralıkta, uzun ömürlü, yüksek hassasiyet ile çalıştığını ifade etmektedirler [77]. Bir başka çalışmada ise trigliserid algılamak için amperometrik bir biyosensör hazırlanmıştır [78], ve başka bir çalışmada meyve suyu ve benzeri sıvılardaki nispi antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla yüksek hassasiyetli amperometrik enzim biyosensörü oluşturmuşlardır [79].

1.2.2.1.2. Potensiyometrik Biyosensörler

Potensiyometrik biyosensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu transdüserler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilimdeki değişiklikleri takip eder. Potensiyometrik tespit, biyolojik algılama elementi içeren bir elektrokimyasal hücre içerisinde genellikle ya bir ürünün aktivitesi ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir tepkenin aktivitesinin gerilimini ölçer.

Bunlar çeşitli şekillerde kullanılabilirler. Alan etkili transistör (FET, Field Effect Transistor), Bergveld [80] önermiştir. Ve etiketsiz olarak bağlanmayı gerçekleştirmek için elverişlidir. FET'lerin boyutlarının küçük olması istenen özelliklerindendir [75].

Diğer bir potensiyometrik biyosensörler grubu ise daha büyük partikülleri tespit edebilmek için tasarlanmıştır. Bunlar ışıkla yön gösterilebilir potensiyometrik sensör (Light Addressable Potentiometric Sensor) (LAPS) [81,82] olarak adlandırılmaktadır. Bir çalışmada LAPS potensiyometrik biyosensörü, gıdada E. coli O157:H7 tayininde [83] kullanılmıştır. Diğer bir çalışmada ise LAPS anyon seçici olarak, sülfat ve nitrat iyonlarının [84] bulunması için kullanılmıştır. Başka bir çalışmada ise bir enzim-potensiyometrik biyosensör gıda bitkilerinde siyanitlerin bulunabilmesi amacıyla [85] tasarlanarak geliştirilmeye çalışılmıştır. Güncel çalışmalardan örnek verilecek olunursa, 2016 yılında çapılan bir araştırmada bal ve propolisin farklı örneklerinde toplam fenol miktarının tespiti için katı-temas bir potensiyometrik biyosensör geliştirilmiştir [86].

Başka bir çalışmada Escherichia Coli'nin (E. Coli), pH'ya duyarlı hidrojel nanofiber-ışıklı adreslenebilir potansiyometrik sensör (NF-LAPS) ile tespiti yapılmıştır [87]. Diğer bir çalışmada da vanadyum pentoksit nanorodların spin yardımlı montajı ile kimyasal türlerin potansiyometrik tespiti yapılmıştır. Görüldüğü gibi elektrokimyasal uygulamalar sıklıkla kullanılmaktadır [88].

1.2.2.1.3. İletkenlik/Kapasitans/İmpedans Biyosensörler

İletkenlik, kapasitans ve impedans biyosensörleri elektrik alandaki değişimleri ölçmek amacıyla tasarlanmıştır. İmpedans biyosensörleri daha ziyade patojenik bakteri tayini amacıyla kullanılmıştır. İmpedans biyosensörlerinin birçok tipi, Listeria monocytogenes ve E. coli O157:H7 [89-93]'nin hızlı tespiti için tasarlanmıştır. Saha kullanımı için kullan at şeklinde sensör içeren taşınabilir bir impedans temelli bir biyosensör [94] geliştirilmiştir. İletkenlik, kapasitans ve impedans biyosensör konusuyla ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bunlardan bazılarını açıklayacak olursak, ilk olarak ultra hassas tayinlerde kullanılması için kapasitif biyosensörler kullanımı ile ilgili bir araştırmada kapasitif bağlama deneylerinin, uzun zamandan beri oldukça hassas kabul edildiğinden bahsediyor. Bu tahlillerdeki temel metodolojinin, kısa potansiyel darbeler gönderilmesi ve ardından akımın kaydedilmesi olduğunu anlatıyor. Bununla birlikte, akım darbelerinin girişi ve potansiyel tepkiler kaydedildiğinde, kararlılığın önemli derecede geliştiğini ve aşırı duyarlılık testlerin önünü açtığını ifade ediyor. Yeni tahlil teknolojisi, immünodizilerden DNA baz eşleştirmesi yoluyla moleküler imprint polimerlerin (MIP'ler) kullanımına kadar bir dizi afinite bağlama tahlilinde uygulandığını ve genel olarak, çok iyi duyarlılıklar kaydedildiğini ve MIP'ler yüksek istikrar ve yeniden kullanılabilirlik sergilediği bahsediliyor [95]. Başka bir çalışmada ise 2017 yılında yapılmış olup, Escherichia coli'nin tespiti için, hücre bazlı mikro kontakt baskılı kapasitif biyosensör geliştirmişlerdir [96]. Diğer bir çalışmada ise, son yıllarda, kapasitif elektrotların yüzeyleri üzerinde çok hassas ve seçici biyotanıma boşlukları oluşturmak için mikro kontakt imprint yönteminin kullanıldığını ve kapasitif biyosensörün prostat spesifik antibadileri ile kaplandığında gerçek zamanlı olarak prostat kanserinin biyomarkırı olan PSA (prostat spesifik antijen) algılanmıştır [97]. Son olarak, çaprazlanmış elektrotları kullanan hassas bir DNA kapasitif biyosensörü tasarlayan çalışma ekibinin, biyosensör teknolojisini 3 yönde geliştirdikleri ifade ediliyor [98].

1.2.2.2. Optik Biyosensörler

Optik yöntemlerde, kimyasal yöntemler gibi önceden beri yaygınca kullanılan ve artık daha fazla gelişme kaldırmayan teknikler arasındadır. Biyosensörlerin üretiminde çeşitli optik teknikleri kullanılmıştır. Optik biyosensörler temel olarak 5 bileşenden oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla, ışık kaynağı, ışık demetini oluşturan optik kısım ve bu ışığı yönlendirecek kısımlar, algılayıcı ve ışık dedektörüdür.

Optik biyosensörler için yapılan bir başka tanım ise optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilerek absorbans, emilim ve saçılım yöntemleriyle ölçüm yapan aygıtlardır [99].

Optik biyosensörlerde dönüştürücüden çıkan sonuç türü ışıktır. Optik kırılma veya elektrokemiluminesansa dayanarak bu çeşit biyosensörler yapılmaktadır. Bu biyosensörler, dönüştürücü yüzeyinde olan reseptörlerle hücrelerin (analit) etkileşimi sonucunda ortaya çıkan kırılma indeks veya ufak kalınlık değişikleri tespit edebilmektedir. Işık özellikleri konsantrasyon, kütle veya moleküllerin sayısının değişmesi ile bağlantılıdır [100].

1.2.2.2.1. Emilim ve Yansıtma Biyosensörleri

Enzimatik reaksiyon sonucunda sistemin pH bilgisindeki farklılıklardan dolayı sistemdeki renkli madde konsantrasyonunda değişimlere bağlı bir takım absorbsiyon farklılıkları söz konusu olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalardan örnekler verilirse, bir çalışmada yiyeceklerdeki penisilinin algılanabilmesi için bir sensör geliştirmişlerdir [101]. Başka bir çalışmada ise E. Coli O157:H7'nin tespiti için, immüno manyetik ayırma ile floresan bağışıklık tahlili kombine edilmiştir [102]. Diğer bir çalışmada ise su numunelerinde nitrat tayini için kullan at biçimde optik biyosensör tasarlanmıştır [103].

1.2.2.2.2. Işınım Biyosensörleri

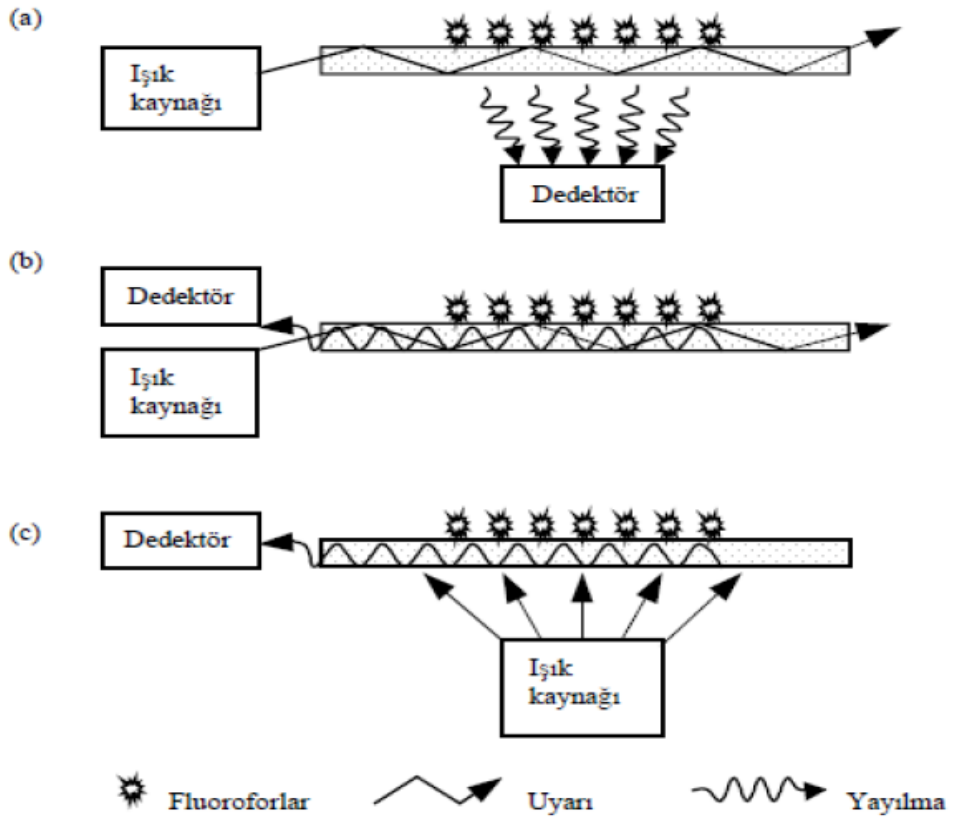
Moleküllerin uyarı verildikten sonra temel durumlarına geri dönebilmek için ışın yayarlar. İki çeşit ışıma vardır. Bunlar, kimyasal ışınım ve biyolojik ışıma olarak sınıflandırılır. Kimyasal ışınım, kimyasal reaksiyon ile sebebiyle olurken, biyolojik ışınım canlı organizmaların enzimlerle katalize edilen reaksiyonlar sebebiyle

olmaktadır. Işınım biyosensöründe, algılama tabakası, numunedeki hedefi tayin edebilmektedir.

Işıldayan enzimatik bir sensör, hassas bir şekilde ışıldayan sistemlerle düzen içinde çalışan yardımcı enzimler de dahil daha karmaşık sistemlerle tespit edilebilir [104].

2014 yılında yapılan bir çalışmada optik biyosensörler kıyaslanmıştır [105].

Genellikle ışınım biyosensörler; enzimler, antikorlar, canlı mikroplar, kırmızı hücreler veya bunlardan herhangi ikisinin kombinasyonunun biyoalgılama materyalleri olarak kullanılmasıyla tasarlanır. Bunlar, pestisitlerin, patojenlerin ve gıda bileşenlerinin tespitinde kullanılırlar. Örneğin, 2003 yılında yapılan bir çalışmada bir çalışmada biyolojik ışıma temelli biyosensör su numunelerinde H_2O_2 tayininde kullanılmıştır [106]. Başka bir çalışmada ise imüno-manyetik kimyasal ışıma biyosensörü, et ve sebzelerde E. Coli O157:H7'in tayininde kullanılmıştır [107]. Diğer bir çalışmada ise bir ATP biyolojik ışıma biyosensörü, gıdalarda patojen varlığını tespit etmek için kullanılmıştır [108].



Şekil 1.6. Gözden Çabuk Kaybolan Dalga Kullanan Işınır Biyosensörlerin Üç Farklı Formatı: (A) Dalga Kılavuzu İle Uyarılma, (B) Dalga Kılavuzu İle Uyarılma Ve Yayma Ve (C) Dalga Kılavuzu İle Yayılımın Toplanması [99].

1.2.2.2.3. Işıma Biyosensörleri

Işınır boyalar, fluoroforlar ve fluorokromlar gibi moleküllere harici bir ışık kaynağından uyarı verildiğinde, günlük hayatta kullandığımız kol saatlerimizin aydınlık bir ortamdan loş veya karanlık bir ortama geçtiğimiz anda kadranlarının parlaması gibi bir parıltı ortaya çıkar.

Burada ortaya çıkan ışık, uyarı olarak verilen ışığa göre göreceli olarak daha zayıftır ve daha çok daha uzun bir dalga boyuna sahiptir. Liley'e göre [99], yüzey-bağlantı ışınır etiketlerin tespitinde çabuk kaybolan dalga kullanımının temel olarak üç farklı yönü vardır: çabuk kaybolan dalga kullanarak fluoroforu uyarır (Şekil 1.6.a), fluoroforu uyarma ve dalga kılavuzundan yayılan ışınları toplama (Şekil 1.6.b) ve optik dalga kılavuzundan yayılan ışını toplama (Şekil 1.6.c).

Burada ifade edilen sistemlere artı olarak, ışıkla etiketlenen habercilerin uyarılması için çabuk kaybolan dalgadan yararlanan fiber optik ve düzlemsel diziliş ışıma sensörleri, örnek bileşenlerinin yüzey tutunmasında belirli bağlanmayı, belirsiz bağlanmadan ayırma noktasında gelişme kazanmıştır [109].

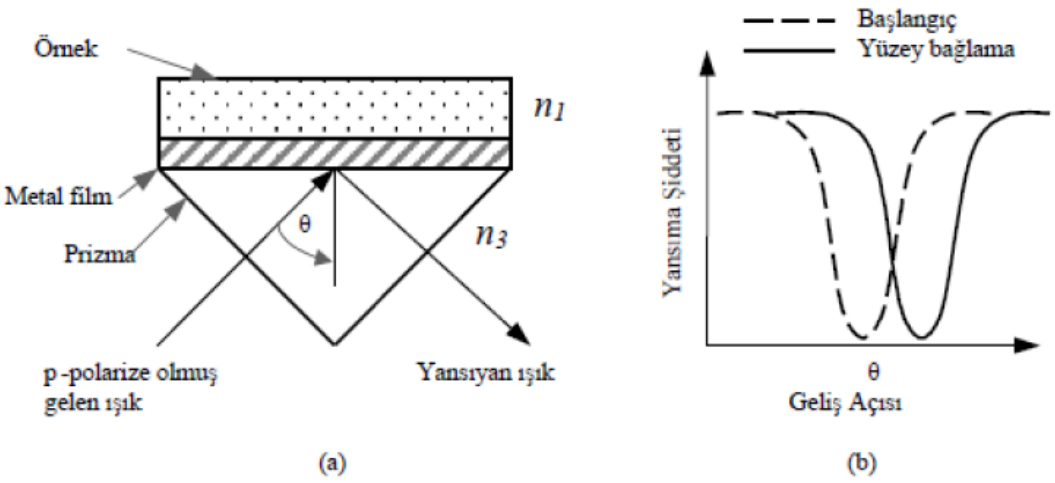
Son zamanlarda yapılan çalışmalardan örnekler verilecek olunursa, 2017 yılında yapılan bir çalışmada, çift sicimli DNA saptaması için CdTe kuantum ve karbon noktalarına dayanan ratiometrik floresan biyosensörü üzerinde çalışılmıştır [110]. Yine 2017 yılında yapılan başka bir araştırmada, nanopartikül toksisitesi üzerindeki çevresel faktörlerin etkisini tespit etmek için çift flüoresan hücre tabanlı biyosensör geliştirilmesi üzerine gözlemler yapılmıştır [111]. 2016 yılının sonlarına doğru yapılan bir çalışmada ise Cu(II) bağımlı DNAzimine dayalı alkalin fosfataz aktivitesi için hassas bir floresans biyosensörü geliştirilmiştir [112]. 2016 yılında yapılan başka bir araştırmada ise inorganik pirofosfataz aktivitesi için floresan biyosensör kullanılmıştır [113]. 2017 yılında yapılan çalışmada ise protein kinaz aktivite tespiti ve inhibitör taraması için Aptamer esaslı floresan biyosensör üzerine çalışmalar yapılmıştır [114].

1.2.2.2.4. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

Polarize ışık, yüzeyi altın kaplı bir prizmaya gönderildiğinde ışığın bir kısmı absorblanmakta, bir kısmı da yansımaktadır. Geliş açısı değiştirilip yansıyan ışığın

şiddeti izlendiğinde yansıyan ışık şiddetinde azalma görülür. Yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kaybın gerçekleştiği açıya rezonans açısı ya da SPR açısı adı verilir.

Bu geliş açısında ışık, yüzey plazmonlarını (elektron paketçikleri) harekete geçirecek, yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşecektir. Yüzey plazmon rezonansı iki optik ortamın ara yüzeyine ince iletken bir film yerleştirildiğinde meydana gelir. Spesifik bir geliş açısında metal yüzeyindeki elektron frekanslarının eşleşmeleri nedeniyle gelen ışık ile rezonans durumuna gelecektir. Bu rezonans durumunda enerji absorblanacağı için yansıyan ışının yoğunluğunda bir azalma meydana gelmektedir (Şekil 1.7.). Rezonans açısı, kırılma indeksindeki (RI) ve gerçek metal yüzeyden 800 nm'ye kadar olan bir mesafede arayüzeydeki dielektrik sabitindeki değişikliklere karşı hassastır. Yüzey ile olan mesafe arttıkça, hassasiyet katlanarak azalır, bu da SPR tabanlı biyosensörün küçük partiküller üzerinde daha iyi çalışmasını sağlar [115].



Şekil 1.7. SPR Biyosensörü Prensipleri. (A) Uyarılmış Yüzey Plazmonları İçin Üç Katmanlı Geometri. Bir Yüzey Plazmon Dalgası, Metal Arayüzde Uyarılır. (B) SPR Reaksiyonu [99].

2016 yılında yapılan bir araştırmada, klinik örneklerden prostat spesifik antijeni (PSA) gerçek zamanlı ve aşırı hassas bir şekilde algılamak için yüzey plazmon rezonansı (SPR) biyosensörü kullanılmıştır [116]. 2017 yılında yapılan bir çalışmada ise bir fiber optik SPR biyosensör kullanarak mandıra sütündeki progesteronun tespiti için tahliller yapılmıştır [117]. Son olarak 2016 yılında yapılan bir araştırmada birden fazla tümör markırlarının nicel tayin edilebilmesi için antikor-QD konjügatlarını kullanan sinyal amplifikasyonuna dayalı bir SPR biyosensörü üzerinde araştırmalar yapılmıştır [118].

1.2.2.2.5. Optik Fiber Biyosensörler

Optik fiber, örneği uzaktan kontrol ederken, ışığın yönünü değiştirmek için kullanılır. Bununla ilgili yapılan çalışmalar aşağıda bahsedilmiştir. İlk olarak yakın zamanlarda yapılan bir çalışmadan örnek verilecek olursa, 2017 yılında yapılan araştırmada kayıplı mod rezonans tabanlı optik fiber cihazlarla yüksek hassasiyetli ve seçici C-reaktif protein saptama üzerine çalışılmıştır [119]. 2016 yılında yapılan bir araştırma incelenecek olursa, mikro yapılandırılmış optik fiber tabanlı biyosensörler ile çinko iyonlarının geri dönüşlü ve nanoliter ölçekli ölçümü üzerine araştırmalar yapılmıştır [120]. 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada ise immobilize edilmiş optik fiber mikro probunu kullanarak yüksek duyarlılıkla ve seçicilikle Escherichia coli tespiti üzerine çalışılmıştır [121]. Yine 2017 yılında yapılan bir araştırmada, Nükleik asit tespiti için U-bükülmüş plastik optik fiber tabanlı plazmonik biyosensör geliştirilmiştir [122].

1.2.2.3. Kantilever Biyosensör

Kantilever çok hassas bir kütle ölçüm sensörüdür. Yüzeyindeki birkaç molekülün ağırlığını bile ölçebilecek hassasiyettedir. Kantilever biyosensörün yüzeyinde bulunan biyoreseptör ile analitin reaksiyona girmesi sonucunda ortaya çıkan kütle artışına bağlı olarak, dinamik modda kantilever biyosensörün rezonans frekansında meydana gelen değişim ölçülürken statik modda ise kantilever biyosensör yüzeyleri arasında meydana gelen bükülme ölçülür. Kantilever biyosensörler, taşınabilir, ucuz, tümleşik ve güvenilirliği fazla olan bir platformdur.

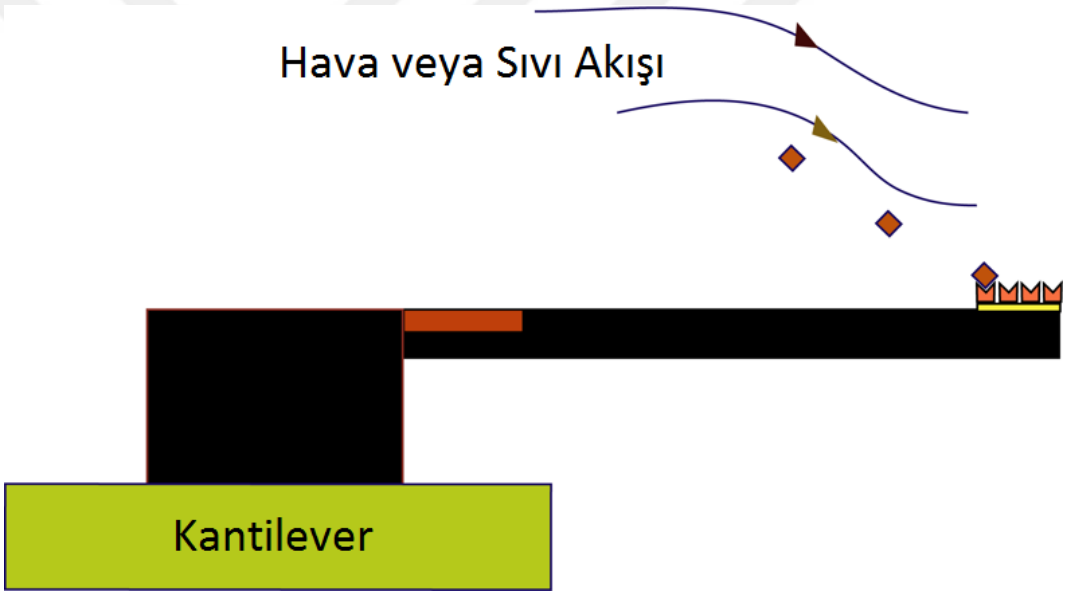
Kantilever biyosensörlerin cevabı kapasitif, piezorezistif, optik, piezoelektrik, elektron tüneli gibi çeşitli tekniklerle tespit edilebilmektedir. Nano teknolojinin gelişmesiyle birlikte, kantilever biyosensörlerin analit yakaladığı zaman, rezonans frekansındaki değişimin artırılması amacıyla tasarım çalışmaları yapılmaktadır. Bir ucu sabit diğer ucu serbest olan bu yapıların mikro veya nano boyutlarda olduğu gözden kaçırılmamalıdır [123]. Şekil 1.8. de kantilever biyosensör yapısı görülmektedir.

Optik yöntemlerde düşük güçte çalışan bir lazer ışını kullanılır. Kullanılan lazer ışını sensör yüzeyine çarpar ve pozisyon algılayıcı dedektörde yansıması görülür. Bu yansıma açısına göre, algılanan analitin ağırlığı hesaplanmış olur. Maliyetinin yüksek

olması olumsuz özelliklerindendir. Bir diğer olumsuz özelliği ise kullanılan sinyalin bir elektrik sinyali olmaması sebebiyle, sinyali işlemekte ortaya zorluklar çıkmasıdır [124].

Piezoelektrik yöntem ilerde anlatılacağı için kısaca özetlemiş olalım. Piezoelektrik özellikli maddeler üzerlerinde mekanik baskı (kütle artışı) hissettiği zaman rezonans frekanslarında değişim söz konusu olur. Bu değişimi algılayarak kütle hakkında yorumlar yapılabilir.

Piezorezistif yöntemde ise piezorezistif malzemeler gerildiği zaman iletkenlikleri ve dirençleri değişen malzemelerdir. Burada ise dirençteki değişim çeşitli tekniklerle ölçülerek, algılanan analitin kütlesi hakkında yorum yapılır [125].



Şekil 1.8. Kantilever Biyosensör Yapısı

Jürgen Fritz 2008 yılında yaptığı bir araştırmada bu sensörlerin, pH ve ısı değişikliklerini algılayabildiğini ve DNA hibridizasyonu dahil olmak üzere antikor-antijen etkileşimlerini ayrıca bakteri absorbasyonunu bile tespit edebildiğini açıklamıştır [126].

Chan, B. D. ve ark. (2014) seçmek ve bireysel kuru biyolojik partikülleri tartmak için basit ve çok yönlü bir sistem raporlamışlardır. Sistemin, bir kırmızı kan hücresinden 10-11 g'a kadar değişen varlıkları kütlesini ölçebildiğini ifade etmişlerdir [127].

Icoz, K. ve ark. (2008) kantilever tabanlı immün manyetik biyosensörlerde gürültü ve saptama kısıtlamaları üzerine yaptıkları araştırmada, uyarma frekansının arttırılmasının, 1/f gürültüsünü 100 kat daha bastırdığını ve havada 0.065Â sapma çözünürlüğüne neden olduğunu bulmuşlardır [128].

Icoz, K. ve Savran, C. (2010) immün manyetik ayırma ve nanomekanik tespiti bir araya getiren biyo-algılama yöntemini planlamıştır. Bu yöntemde manyetik boncuklar kullanılmıştır. Streptavidin yüklü manyetik boncuklar algılama kolu biotin ile işlevselleştirilen diferansiyel konsol sistemine maruz bırakılmıştır. Streptavidin boncuklarına uygulanan manyetik kuvvetin, havada 0.26 Ârms'a kadar farkedilebilen diferansiyel konsol sapmalarıyla sonuçlandığını tespit etmişlerdir [129].

1.2.3. Piezoelektrik Biyosensörler

1.2.3.1. Piezoelektrik Tarihçesi

"Piezoelektrik" Yunancada basınç anlamına gelen "piezo" kelimesinden türetilmiştir ve "basınç-elektriği" anlamına gelir. Piezoelektrik kristale uygulanan basınç, gerilmenin büyüklük ve şekliyle orantılı olarak elektriksel kutuplaşmaya neden olur ve bu olay düz piezoelektrik etki olarak adlandırılır. Ters piezoelektrik etki ise kutuplaştırıcı elektrik alana maruz kalan malzemede meydana gelen elastik gerilme ile açıklanmaktadır [130].

Gerçekte, insanoğlu piezoelektrik malzemeleri çağlar boyunca kullandı. İyi bilinir ki, ilkel insanlar ateş yakmak için kuvarsın bir çeşidi olan çakmak taşının mekanik çarpışma etkisine başvurmuşlardı. Aslında çakmak taşı, yapı inşalarında ve silah olarak kullanılabilecek kesici özelliğe sahip olması nedeniyle taş devrinin ana malzemesiydi. Bu malzemenin çakmak olarak kullanımı alet yapımı sırasında kaza sonucu ortaya çıkmıştır. Daha sonra, kibritin icadından önce bu malzeme ile demir çarpıştırılarak kullanımına devam edildi. Ancak, çakmak taşının bu özel ve kullanışlı özelliği ile sadece tutuşturucu olarak kullanılmaması yönünde kesin görüşler ortaya çıkmıştır [131]. Piezoelektriklik üzerindeki ilk ciddi deneysel çalışmalar Pierre ve Jacques Curie tarafından 1880 yılında gerçekleştirildi [132]. Bu etkinin ilk kanıtları kuvars gibi tek kristallerde keşfedilmiştir. Bu deneyler (turmalin, kuvars, topaz, şeker kamışı ve Rochelle tuzu ile) özel olarak hazırlanan malzemelerle mekanik basınca bağlı yüzey şarj oluşumunun kesin olarak ölçülmesi sonucu oluşmuştur. Düz piezoelektrik ve ters

piezoelektrik özelliğin, matematiksel anlamı Lippmann tarafından temel termodinamik ilkelerine dayandırılarak 1881 yılında ortaya çıkarıldı. Curie kardeşler hemen ters piezoelektrikliğin varoluşunu Lippmann'ın bu çıkarımları ile doğruladı ve piezoelektrik kristallerdeki elektro-elasto-mekanik deformasyonun tamamının tersine çevrilmesinin mümkün olduğunu nicel kanıtlarla ortaya koyarak bu yönde çalışmalarına devam etti.

Piezoelektrik cihaz uygulamalarındaki önemli ilk sayılabilecek uygulamalar I. Dünya Savaşı esnasında görülmüştür. 1917 yılında, P. Langevin ve Fransız meslektaşları eksiksiz bir ultrasonik denizaltı detektörü yapımına başladılar. Bu güç çevirici sistem, iki çelik plaka arasına yapıştırılmış ince kuvars kristallerinin mozaiği şeklinde tasarlanmış ve dalış için uygun bir yere montajı yapılmıştır. Zaten birçok mucitliğin sebebi savaşlar olmuştur. Bunu Dünya tarihine bakarak rahatlıkça kavrayabiliriz. İnsanlar savaş esnasında vatanlarını korumak amacıyla düşmanlarından bir adım önde olmanın vereceği avantajın farkında olduklarından dolayı her zaman farklı buluşların peşinden gitmişlerdir. Savaş sona erdikten sonraki yıllarda, amaçları olan yüksek frekanslı sualtı yapımını başardıklarını ifade ettiler ve derinlik ölçümü, yankının geri dönüş süresinden yararlanılarak yapılmıştı.

Sonar sistemlerdeki başarı, çeşitli piezoelektrik cihazların geliştirilmesinde itici güç olmuştur. Birçok klasik piezoelektrik uygulama bugün mikrofonlar, akselerometerler, ultrasonik dönüştürücüler, gramofonlar, sinyal filtreleri gibi yaygın bir şekilde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Ancak şuanda bu malzemelerin kullanılabilirliği genellikle sınırlı cihaz performansı ve kesinlikle sınırlı ticari kullanım ile kısıtlıdır. II. Dünya Savaşı sırasında, ABD, Japonya ve Sovyetler Birliğinde araştırma grupları yaygın olarak kullanılan klişe kristallerden 100 kat daha büyük dielektrik sabitine sahip baryum titanat gibi malzemeleri metal oksit tozu sinterleme yöntemi ile üretmek için anizotropik yapay polikristal yapılardan keşfedilen kondansatör malzemelerini geliştirmek üzere çalışmıştır. Gelişi güzel dağılmış ve makro boyutta binlerce küçük tek kristalin ortalama dağılımından dolayı malzemeler makro boyutta piezoelektrik etki gösterememiştir.

Ancak, 1946'dan önce bilim adamları bu tip polikristal malzemelerin ki bu malzemeler genellikle ferroelektrik seramikler olarak bilinir polarizasyon olarak adlandırılan elektrik alan uygulaması ile piezoelektrik özellik kazandırılabileceği keşfetmişlerdir. Bu kolay üretilmiş şaşırtıcı performans karakteristiklerine sahip piezoelektrik malzemenin

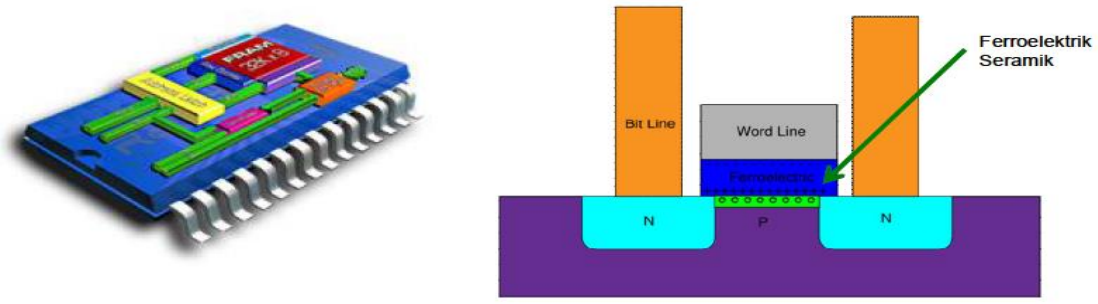
keşfi çarpıcı araştırmaların yeniden canlanmasını ve piezoelektrik cihazların gelişmesini ateşleyen faktördür.

Genellikle PZT sistemine yeni bileşenler eklenerek farklı kompozisyonlar oluşturulmuş ve PZT'nin özelliklerini geliştirmek için yapılan bu işlemin sonuçları rapor edilmektedir.

1969 yılında tek bir eksende yorulmuş ve uygun bir elektrik alanda kutuplanmış polyvinylidene florid (PVDF)'in güçlü piezoelektrikliği ve piroelektrikliği keşfedilmiştir. Ayrıca, naylon veya PVC gibi diğer plastiklerinde, piezoelektrik etki gösterdiği bilinmektedir fakat bu plastikler PVDF'den daha az yoğunluğa sahiptir.

80'lerin başından itibaren farklı yeni malzemelerin piezoelektrik özellikleri incelenmiştir. İçinde seramik, polimer ve yönlendirilmiş taneli cam-seramik bulunan kompozit malzemelerin (tek camsı faz ve bir ya da daha fazla kristal fazın kompoziti) parlak bir geleceğe sahip olduğu öngörülmüştür [131].

Piezoelektrik seramiklerin bir alt gurubu olarak ferroelektrik seramikler olarak adlandırılan malzemeler güçlü bir elektriksel alana (~20,000 Volt/metre) maruz bırakıldığında sahip olduğu dipollerin yönlenmesiyle kutuplanma (polarizasyon) gösterir. Uygulanan elektriksel alanın polaritesi değiştikçe (alternatif akım uygulaması) malzemedeki bu çift kutuplu yükler (dipoller) sürekli yön değiştirir ki bu ferroelektrik seramiklerde polarizasyon-elektrik alanı (P-E) ve elektriksel gerinim-elektrik alanı (SE) histeresiz döngülerinin oluşumunun temel nedenidir. Bu tür davranış gösteren malzemeler elektriksel alan kaldırılsa bile kutuplanma özelliklerini yitirmediğinden yeni tür "uçucu olmayan rasgele erişimli belleklerin" (Non-volatile Ferroelectric Random Access Memory: NVRAM) geliştirilmesinde değerlendirilmektedir. Şekil 1.9. da bir NVRAM görülmektedir.



Şekil 1.9. Ferroelektrik Bellek (Feram) (Ramtron Co.)

Bu tür RAM'lerde kullanılan aktif bileşen olan seramik malzemede tekrarlanan alternatif akım (a.c.) çevrimleri zamanla P-E grafiğinin değişimine ve cihazın veri depolama kapasitesinin bir ölçüsü olan *E=0* konumundaki polarizasyon değerinin, *P=Pr*, düşmesine yol açmaktadır. Bazen bu cihazın çalışma voltajını belirleyen kritik elektrik alanın (EC) da yükselmesine neden olur ki bu da değişken ve daha fazla güç tüketimi demektir. Bu elektronik aygıtlarda çalışma koşullarının değişkenliği demektir ki bu malzemede gerçekleşen elektriksel yorulmaya bağlı olarak gelişen ve istenmeyen bir güvenilirlik (reliability) sorunudur. Bu sorunun özellikle kurşun esaslı piezo/ferroelektrik seramiklerde çözümüne dönük önemli stratejiler geliştirilmiştir [133,134].

1.2.3.2. Piezoelektrik Hakkında Teorik Bilgi

1.2.3.2.1. Ferroelektrik Özellik Ve Polarizasyon

"Ferroelektrik özellik" 1921 yılında Valasek tarafından ilk kez Rochelle tuzunda keşfedilen ve bazı kristallerin bir kritik sıcaklığın (TC; Curie sıcaklığı) altına soğutulduğunda kendiliğinden polarizasyon (PS) göstermesi olarak tanımlanır. Ferroelektrik kristallerde oluşan polarizasyon dışarıdan bir elektrik alan uygulandığında yön değiştirebilir [135]. Tablo 1.2. de bazı ferroelektrik kristaller bu özelliğin rapor edildiği kronolojik sırayla verilmiştir.

1.2.3.2.2. Piezoelektrik Özellik

Tüm ferroelektrik malzemeler potansiyel olarak aynı zamanda piezoelektrik özellik de gösterirler. Piezoelektriklik bazı malzemelerde bir mekanik gerilime maruz kaldığında bu gerilmeyle orantılı olarak elektrik yükü (şarj) üretmesidir [130]. Bu davranış düz piezoelektrik etki olarak da adlandırılır. Piezoelektrik malzemeler aynı zamanda tersinir bir etki de gösterir ki bir elektriksel gerilim altında malzemenin geometrik olarak şekil değiştirmesidir. Düz ve tersinir piezoelektrik etki tensörel gösterimle aşağıdaki gibi ifade edilir,

Tablo 1.2. İlk Keşfedilen Bazı Ferroelektrik Kristaller [136,137,138]

Adı ve Kimyasal Formülü	T_c (°C)	P_s (μC/cm^2)	Yıl
Rochelle Tuzu $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	23	0.25	1921
Potasyum Dihidrojen Fosfat KH_2PO_4 (KDP)	-150	4	1935
Potasyum Dihidrojen Arsenat $KD_2A_5O_4$	-177	5	1938
Potasyum Dihidrojen Fosfat KH_2PO_4	-60	5.5	1942
Baryum Titanat, $BaTiO_3$	120	26	1945
Kurşun Titanat, $PbTiO_3$	490	>50	1950
Potasyum Niyobat, $KNbO_3$	415	30	1951
Kurşun Zirkonat Titanat* $Pb(Zr_xTi_{1-x})O_3$	~350	>40	1952

*polikritalin seramik

$$P_i = d_{ijk}\,\sigma_{jk} \qquad \text{(düz piezoelektrik etki)} \qquad (1.1.)$$

$$S_{ij} = d_{kij}\,E_k \qquad \text{(tersinir piezoelektrik etki)} \qquad (1.2.)$$

Burada P_i malzemeye uygulanan σ_{jk} gerilmesi sonucunda *i*-ekseninde oluşan polarizasyondur ve d_{kij} malzemenin piezoelektrik sabitidir. Tersinir etkiden dolayı ise *k*-ekseni doğrultusunda uygulanan elektrik alan E_k sonucu X_{ij} elektriksel gerinim yani boyutsal değişim gerçekleşir [139].

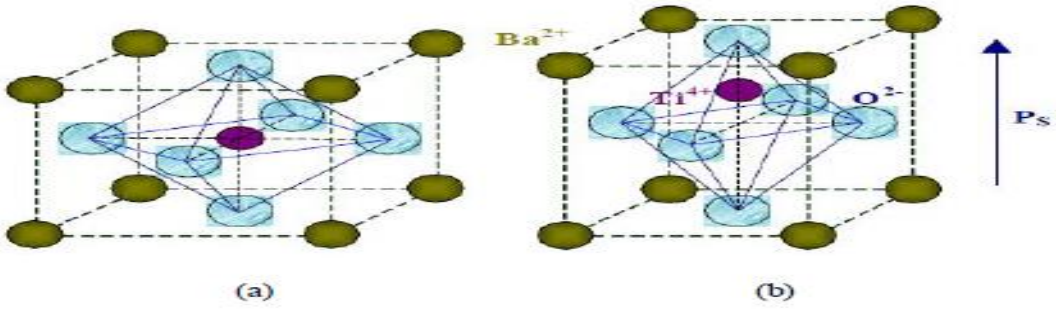
1.2.3.2.3. Piezo / Ferroelektrik Etki ve Polarizasyon

1.2.3.2.3.1. Polarizasyon (Kutuplanma)

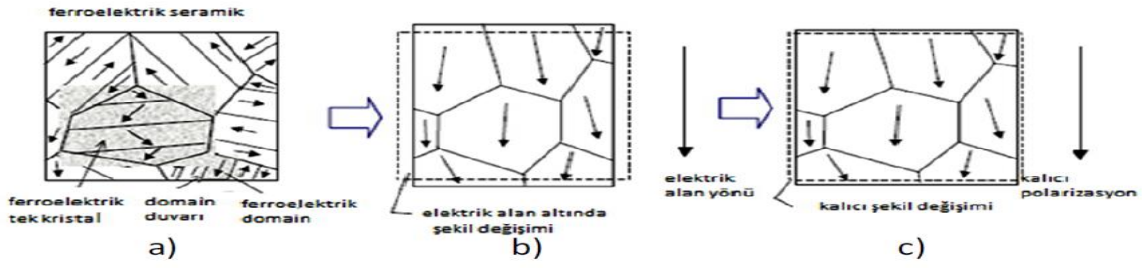
Şekil 1.10. da baryum titanatın kristal yapısı gösterilmektedir. 120°C'lik Cruie sıcaklığı denilen bir sıcaklığın üzerinde, Şekil 1.10. (a) da gösterildiği gibi küp köşelerinde Ba^{+2} iyonları, yan yüzlerin merkezinde O^{-2} iyonları ve yapının merkezinde de Ti^{+4} iyonlarıyla prototip kristal yapısı kübiktir. Curie sıcaklığı altında, yapı az miktarda deforme olur, Şekil 1.10. (b) de gösterildiği gibi Ba^{+2} ve Ti^{+4} iyonları miktarları değişmeyecek şekilde O^{-2} iyonlarıyla yer değiştirerek çift kutuplaşma (dipol) oluşturur. Bu sebeple, her bir pozitif ve negatif iyonuna ait elektriksel kutup çifti ve aynı yöne işaret eden bu çift kutup çiftlerinin birleşmesinden dolayı kendiliğinden oluşan kutuplaşma veya polarizasyon (birim hacimdeki dipol momenti) olarak gözümüzde canlandırabiliriz. Kendiliğinden oluşan kutuplaşmanın *Ps* değeri ısıya bağlıysa buna piroelektrik (ısıl

elektrik) etkisi denir. Ferroelektrik malzemelerde büyüklük ve *Ps* yönü dışarıdan verilen bir elektrik alanıyla tersine çevrilebilir (Şekil 1.11.).

Yukarıda bahsedilen kristallerin dışında, laboratuvarda geliştirilen önemli bir grup piezoelektrik malzeme ise ferroelektirik özelliği taşıyan PZT seramikleridir. Ferroelektirik malzemeler bir yığın küçük tek kristaller olarak düşünülebilir. Genel olarak, ferroelektrik bölgeciklerinin (domainlerin) kutuplaşmadan önce seramik bünyesinde rastgele yönlenmiş dipol içeriğine sahip olmasından dolayı ferroelektrik seramikler hiçbir piezoelektrik özelliğine sahip değildir (Şekil 1.11. (a)). Çünkü numune içerisinde var olan yük ayrışmaları sonucu oluşmuş dipollerin rastgele yönlenmesi vektörel toplamlarının yaklaşık olarak sıfır olması ve net bir polarizasyonun elde edilememesine neden olmaktadır.



Şekil 1.10. Perovskite Baryum Titanatın Kristal Yapısı. (a) Curie Sıcaklığının Üzerinde Birim Hücre Kübiktir; (b) Curie Sıcaklığının Altında $Ba^{+}2$ ve $Ti^{+}4$ İyonları O^{-2} İyonlarıyla Orantılı Sayıda Yer Değiştirmiş Olan Birim Hücre Yapısı Tetragonaldir [131].



Şekil 1.11. Kutuplaşma Sürecinin Şematik Çizimi A) Ferroelektrik Seramik-Ferroelektrik Tek Kristal / Bölgecik (Domain) Duvarı / Ferroelektrik Bölgecik B) Alanın Neden Olduğu Deformasyon (Uzama) / DC Elektrik Alanı C) Kalıcı Deformasyon / Kalıcı Kutuplaşma, P_r [131].

Malzemeye kuvvetli bir elektriksel alan (DC) uygulandığında her biri bir vektörel büyüklük olan tüm dipoller yine bir vektörel kuvvet olan elektrik alan yönüne yönlenmeye zorlanır. Eğer elektrik alan kuvveti yeterli gelir ise dipollerin rastgele yönlenmiş yapısı bozulur ve neredeyse hepsi aynı doğrultuda yönlenerek maksimum bir büyüklüğe ulaşırlar ki bu toplam etkiye yani malzeme hacmi içerisinde var olan tüm dipollerin momentleri toplamına polarizasyon denir. Polarizasyon bazen kutuplaşma olarak da ifade edilir. Polarizasyon sırasında, DC elektrik alanı ile benzer yönlenmiş dipollerin yönlendirilmesi çok farklı açıyla yönlenmiş olanlara kıyasla çok daha kolay olacaktır. Yönlendirilmesi en zor olan veya en yüksek elektrik alan kuvveti gerektiren dipol elektrik alanla yönlenmesi antiparalel olandır ki bu durumda aralarındaki açı 180º'dir. Bu durumdaki polarizasyon yönlenmesi hareketine 180º polarizasyon çevrimi denilir. Ferroelektrik seramiklere domainlerin (bölgeciklerin) yönlenmesini ya da kutuplaşmasını sağlamak için uygulanan elektrik alan tersinir piezoelektrik etki sonucu (bkz. Eşitlik 1.2.) bir şekil değişimine de yol açar (Şekil 1.11.b). Malzemenin dipol içeriğine bağlı olarak bu uzama veya kısalma şeklinde olur. Tüm dipoller yani net polarizasyon ile elektrik alan ters yönlü ise kısalma gerçekleşir. Elektrik alanın kaldırılması ile birlikte ideal yönlendirilmiş dipoller bir miktar yönlenmesini yitirir. Bu sapma polarizasyon gevşemesi olarak ifade edilir. Bu sapmaya rağmen önemli ölçüde belirli bir yönü koruyan dipoller bir miktar azalmayla beraber bir kalıntı polarizasyon, *Pr*, ve gerinim, *Sr*, oluşturur (Şekil 1.11.c). Eğer yeniden ters yönde (zıt polarite) güçlü bir elektrik alan uygulanırsa bir domaindeki polarizasyon vektörünün ters çevrilmesine neden olabilir (polarizasyon döngüsü) [131,140].

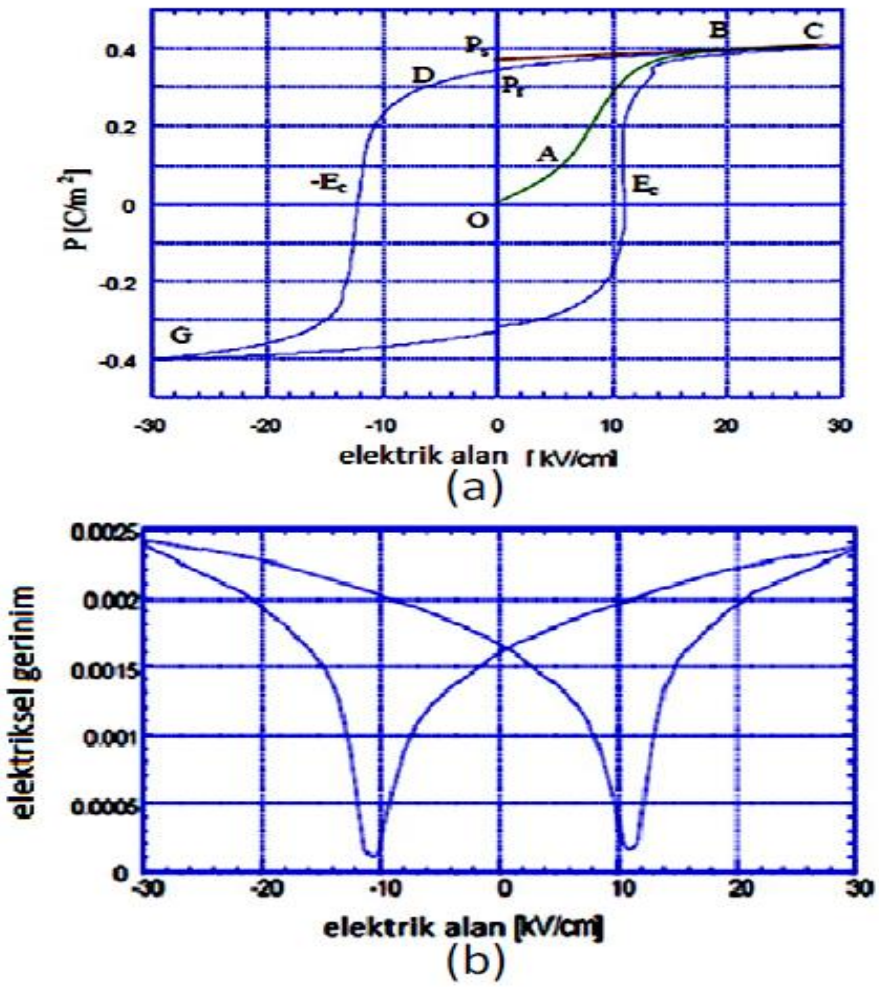
Polarizasyon (veya poling) işlemi sırasında malzemenin yüzeylerine yerleştirilen elektrotlar yardımıyla malzeme üzerine DC gerilim uygulanarak yüksek bir elektrik alan (~5kV/cm) oluşturulur ve dipollerin bu elektrik alana paralel olarak yönlenmesi sağlanır (Şekil 1.11. b). Polarizasyon esnasında bölgeler uygulanan elektrik alan doğrultusunda gerek ters çevrilme ile gerekse belirli bir açı kazanma yoluyla yeniden dizilerek anizotropik duruma gelirler. Polarizasyon sonrasında çok fazla gerilen bölgelerin bir kısmı yeniden eski durumlarına dönebilirler, fakat büyük bir çoğunluğunda kutuplama kalıcıdır (Şekil 1.11. c). Dolayısıyla polarizasyon öncesi malzeme, izotropiktir ve bu durumda piezoelektrik davranış göstermez. Polarizasyon sonunda ise uygulanan elektrik alanı ile dipoller bir eksene doğru yönlenirler ve polikristallerden oluşan tüm yapıda net

bir elektriksel dipol momenti oluşur. Bu yapıda aynı yöne yönlenmiş izole dipollerin oluşturduğu bölgeler vardır [141,142]. Ferromanyetik malzemeler gibi, kutuplanmış bir ferroelektrik malzeme de histersiz gösterir. Şekil 1.12. a da piezoelektrik seramik bir elemana uygulanan bir elektrik alan sonucunda oluşan tipik histersiz ve Şekil 1.12. b de elemanın boyut değişimi verilmiştir [143].

Genellikle *P* harfi ile gösterilen kutuplaşma, elektriksel yer değiştirme (ya da elektrik akış yoğunluğu) olan *D* ile doğrusal olarak değişir:

$$D_i = P_i + \varepsilon_0 E_i \qquad (1.3)$$

ifadesinde alt indis *i* üç apsisten herhangi birini, ε_0 boş uzayın elektriksel geçirgenliğini simgelemektedir.



Şekil 1.12. A) PZT'nin Dielektrik (P-E) Histeresiz Eğrisi; B) PZT'nin Kutuplaşma Yönündeki, S_3-E_3, Deformasyonu [131]

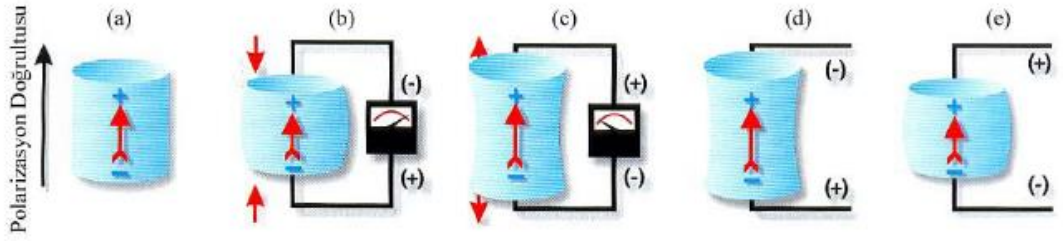
Ferroelektrik malzemelerin bölgecik değişimine gösterdiği direncin sonucu, kutuplaşmanın histeretik olduğudur ki buna bağlı olarak *D* ve *P, E*'nin doğrusal olmayan fonksiyonları olduğu söylenebilir. Fiziksel olarak kutuplaşma yani *P* uygulanan elektrik akımının yani *E*'nin çift yönlü yani x ekseninin hem pozitif hem negatif tarafında değer verebilen bir fonksiyonudur ve bu yüzden elektrik alanla tam olarak tersine çevrilemez. Şekil 1.12. a nın ticari bir ferroelektrik malzemesindeki *P* ve *E* arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu grafik polarizasyon (P-E) veya dielektrik (D-E) elektrik alan histeresiz eğrisi olarak bilinir.

Başlangıçta kutuplanmamış bir PZT örneği kendi Curie sıcaklığının hemen altında bir sıcaklıkta artan bir elektrik akımına maruz bırakılırsa, kutup çiftleri artan akıma göre sıralanırlar ve kutuplaşma Şekil 1.12. a da gösterilen eğriyi izler. Uygulanan elektrik akımı küçükse, *P* ve *E* arasında sadece doğrusal bir ilişki gözlenir çünkü akım hiçbir bölgeciğin yer değiştirmesine yetecek kadar büyük değildir ve kristal normal bir yalıtkan malzeme gibi davranır (paraelektrik). Bu durum Şekil 1.12. a nın OA bölümüne karşılık gelir. Elektrik gücü arttıkça, akımın zıt yönünde kutuplaşmaya sahip olan bir takım negatif bölgecikler akımın pozitif doğrultusunda ters çevrilirler ve bölgecik oryantasyonu gerçekleşmeye başlar. Bu da *P*'nin keskin bir şekilde artması ve *E* akımının azalmasıyla sonuçlanır ve tüm bölgecikler pozitif yönde sıralanana kadar (BC bölümü), kutuplaşma hızlıca artar (AB bölümü). Bu kristalin sadece tek bir bölgecikten oluştuğu satürasyon (doygunlaşma) noktası durumudur. Bu durumda malzemenin satürasyon kutuplaşmasına ulaştığı söylenir.

Akımın gücü azaldıkça, kutuplaşma genellikle azalır ancak sıfıra geri dönmez (Şekil 1.12. a nın D noktası). Akım sıfıra indirildiğinde, bölgeciklerin bazıları pozitif yönde sıralanmış şekilde kalır ve kristal kalıcı bir kutuplaşma P_r sergiler. Doğrusal BC bölümünün kutuplaşma eksinine geri kıvrımının extrapolasyonu (dışdeğerleme) kendiliğinden oluşan kutuplaşması P_s değerini gösterir. Uygulanan akım tam ters yönde belli bir değere (G noktasına) ulaşmadan, bir kristaldeki kalıcı kutuplaşma kaldırılamaz. Kutuplanmayı (*P*) sıfıra indirmek için gerekli olan akım gücüne E_c denir. Ayrıca akımı negatif yönde arttırarak kutup çiftlerinin bu yönde tam sıralanması sağlanır ve bu döngü akım yönü bir kez daha ters çevrilerek tamamlanabilir.

Şekil 1.12. a grafiğinde çizilen eğri histeresiz eğrisi olarak bilinir. Grafiğin şekli farklı PZT malzemelerine göre değişir (Şekil 1.12. PZT5 malzemesi için yapılan histeresiz eğrisidir), fakat kalıcı kutuplaşma tüm PZT malzemeleri için genellikle 0.3-0.35 C/m^2 civarındadır.

Şekil 1.12. b örneğin elektrik akımına göre gösterdiği deformasyon S_3 (kutuplaşma yönünde) değişimini göstermektedir ve ayrıca kutuplaşma için gözlenen etkiye tam olarak karşılık gelen gecikme etkisini de ortaya koyduğu [131].



Şekil 1.13. Piezoelektrik Elemanın Davranışı (a) Elemandaki Polarizasyon Doğrultusu (b-c) Üreteç Davranışı (d-e) Motor Davranışı [141].

Herhangi bir piezoelektrik seramik eleman üzerine uygulanan mekanik basma veya çekme gerilmesi, voltaj üreterek elemanın dipol momentini bozar, polarizasyon doğrultusunda basma veya polarizasyona dik yönde çekme, polarizasyon voltajıyla aynı polariteye sahip bir voltaj üretir (Şekil 1.13. b). Polarizasyon yönünde çekme veya polarizasyon doğrultusuna dik yönde basma uygulandığında ise piezoelektrik seramik eleman, polarizasyon voltajına zıt polariteye sahip bir voltaj üretir (Şekil 1.13. c). Seramik elemanın bu şekildeki basma ve çekme mekanik enerjilerini elektrik enerjisine çevirmesine üreteç davranışı denir. Bu davranış; ateşleme sistemlerinde, kuru pillerde, sensör cihazlarda vb. ürünlerde kullanılır [143].

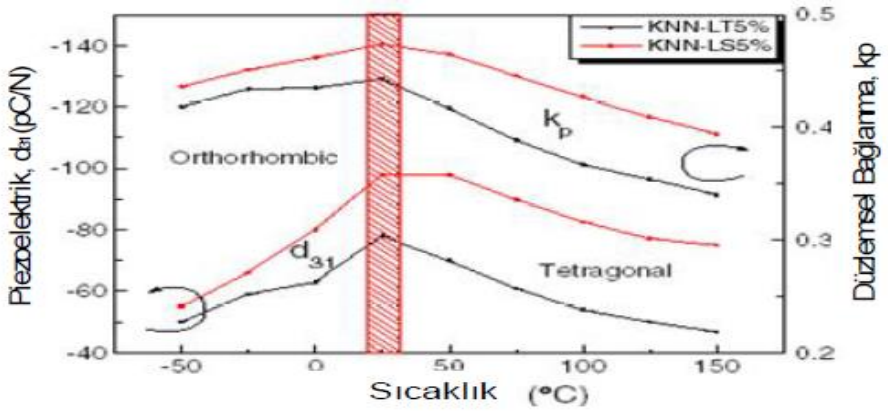
Eğer seramik elemana polarizasyon voltajı ile aynı polariteye sahip bir voltaj, polarizasyon doğrultusunda uygulandığı takdirde, seramik eleman uzayacak ve çapı küçülecektir (Şekil 1.13. d). Polarizasyon voltajı ile aynı polariteye sahip bir voltaj, polarizasyon doğrultusuna dik uygulandığında ise, seramik elemanın boyu kısalacak ve çaptan genişleyecektir (Şekil 1.13. e) [144].

Seramik eleman üzerine AC voltajı uygulanırsa, eleman uygulanan voltajın frekansında sinüzoidal bir şekilde sırayla uzayıp kısalacaktır. Seramik elemanın bu şekilde elektrik

enerjisini mekanik enerjiye çevirmesine motor davranışı denir ve piezoelektrik motorlarda, ses ve ultrasonik titreşim üreten cihazlarda vb. birçok üründe kullanılır. Uygulanan gerilmeler ve oluşan voltaj malzeme özelliklerine bağlıdır. Bu durum uygulanan voltaj ve elde edilen gerinim değerleri için de geçerlidir [144].

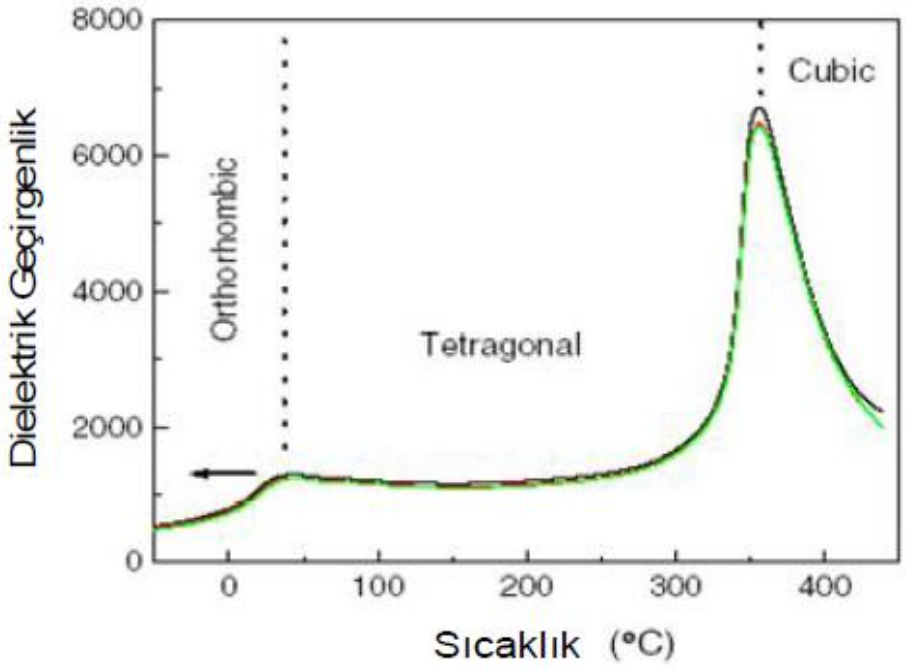
1.2.3.2.3.2. Piezoelektrik Sabiti

Piezoelektrik malzemeler anizotropik olabildiğinden beri, bu malzemelerin fiziksel sabitleri elastiklik, dielektrik sabiti ve piezoelektrik sabiti gibi vektörel büyüklüklerdir ve hepsi uygulanan gerilim, elektrik alan gibi büyüklüklere bağlıdır ve dikey yönlerle ifade edilir. Bu sebepten dolayı sabitler elastiklik için gerilme ve gerinim, dielektriklik için yer değiştirme ve elektrik alan gibi ilgili iki niceliğin yönlerine bağlı olarak sabitin altına konulan alt indislerle belirtilirler. Bir üst indis ise sürekli korunan bir niceliği göstermek için kullanılır.



Şekil 1.14. $LiTaO_3$ (LT) Ve $LiSbO_3$ (LS) Modifiye Edilmiş KNN Sistemleri İçin Bir Sıcaklık Fonksiyonu Olarak Piezoelektrik Katsayıları Ve Bağlanma Faktörleri [143,153].

Şekil 1.14. ve Şekil 1.15. de örnek olarak $KNaNbO_3$ (KNN) kompozisyonuna sahip malzemenin piezoelektrik, elektromekanik eşleşme (bağlanma) ve dielektrik sabiti gibi bazı özelliklerinin sıcaklıkla değişimleri verilmiştir. Elektriksel ve mekanik büyüklük olarak gösterilen piezoelektrik sabitlerinde, ilk alt indis yer değiştirme ve elektrik alan gibi elektriksel niceliklerin yönü olarak dikkate alınır. İkinci alt indis ise gerilme ve gerinim gibi mekaniksel niceliklerin yönü olarak dikkate alınır.



Şekil 1.15. %5 KNN-LS Malzemesi İçin Bir Sıcaklık Fonksiyonunun Dielektrik Geçirgenliği [143,153].

1.2.3.2.3.3. Dielektrik Katsayıları

Mutlak dielektrik katsayısı elektrik alandaki dielektrik yer değişimine göre tanımlanır. Katsayı iki alt indis ile ifade edilir: ilk alt indis dielektrik yer değişimin yönünü ifade eder; ikincisi ise elektrik alanının yönünü göstermektedir [131].

1.2.3.2.3.4. Elektromekanik Eşleme Faktörü

Piezoelektrik malzemeler elektrik ve mekanik alanları eşleştirirler. Böylece, elektrik enerjisiyle mekanik enerji ya da tam tersi elde edilmesinde bu tip malzemeler kullanmak mümkündür. Elektrik enerjisini mekanik enerjiye ya da tam tersine çevrilmesindeki verimi ölçmede bir katsayıya gerek vardır. Bu katsayı k_{eff} eşleşme faktörüdür ve piezoelektrik malzemenin rezonans frekansının altındaki frekanslarda tanımlanır:

$$k_{eff}^2 = çevrilen\ enerji/malzeme \text{ uygulanan enerji girdisi} \qquad (1.4)$$

Direk piezoelektrik etkide, *k* katsayısı şu şekilde tanımlanır:

$$k_{eff}^2 = elektriksel\ enerji/malzeme \text{ verilen mekanik enerji} \qquad (1.5)$$

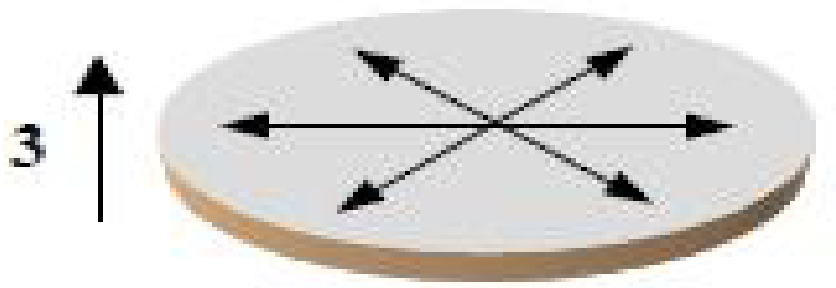
Ters piezoelektrik etkinin, *k* katsayısı şu şekilde tanımlanır:

$$k_{eff}^2 = \text{üretilen mekanik enerji/malzeme verilen elektrik enerji} \quad (1.6)$$

k_{eff} değerleri bir çalışmada modern piezoelektrik seramikler için depolanan enerjinin % 50 si kadarı düşük frekanslarda dönüştürülebilmektedir. k_{eff}^2 nin değerleri tablolar şeklinde verilmiştir, ancak genelde teorik değerlerdir, malzemenin ideal numunelerinde gerçekçi olmayan titreşim halleri de tanımlanmıştır. Kullanılan dönüştürücülerde, eşleşme faktörü genelde daha düşüktür.

k_{eff} eşleşme katsayısı tüm yönlerdeki dönüşümü tanımlamaktadır. Belirli yönlerde dönüşümler hesaba katıldığında sonuç eşleşme faktöründe alt indislerle gösterilir. Örneğin k_{33} boylamsal bir elektrik alan etkisi altında çok uzun ve ince (teoride sonsuz uzun, pratikte uzunluk/çap oranı >10 olan) çubuğun boylamsal titreşimleri için eşleşme faktörüdür. k_{31} enine elektrik alanın etkisi altındaki uzun çubuğun titreşimlerinin boylamsal titreşimlerinin eşleşme faktörüdür ve k_{15} de piezoelektrik gövdenin kayma hali titreşimlerini tanımlar.

Eşleşme faktörü için özel durumlar k_p düzlemsel eşleşme faktörü ve k_t kalınlık eşleşme faktörüdür. İnce bir diskin (Şekil 1.16.) k_p düzlemsel eşleşme faktörü 3 yönünde elektrik alan ile radyal titreşimle sonuçlanan 1 ve 2 yönlerindeki eşzamanlı mekanik etkiler arasındaki eşleşmeyi göstermektedir. Bu radyal eşleşme olarak bilinmektedir.



Şekil 1.16. Piezoelektrik Malzemenin İnce Diskinin Düzlemsel Salınımları [131]

k_t kalınlık eşleşme faktörü, 3 yönündeki elektrik alanla keyfi şekilli (örn. kalınlığına kıyasla yüzey boyutları geniş olan nesne) ince düzlemsel objenin 3 yönündeki mekanik titreşimleri arasındaki eşleşmeyi göstermektedir.

İnce düzlemsel bir nesnenin kalınlık modunun rezonans frekansı enine modundakinden çok daha yüksektir.

k_{eff} eşleşme faktörü enerji yoğunluklarının bölümü olarak tanımlanabilir

$$k_{eff}^2 = \frac{\frac{1}{2}\varepsilon^T E^2 - \frac{1}{2}\varepsilon^S E^2}{\frac{1}{2}\varepsilon^T E^2} \qquad (1.7)$$

1.7 eşitliğinde $\frac{1}{2}\varepsilon^T E^2$ terimi piezoelektrik gövdeyi serbest deforme edilmesi için saklanan toplam enerji yoğunluğunu gösterir (T=0). $\frac{1}{2}\varepsilon^S E^2$ terimi gövde zorlandığındaki elektrik enerji yoğunluğunu gösterir (S=0). Bu iki terim arası fark; saklanan, dönüşen, mekanik enerjiye eşittir.

Bu enerji sıklıkla çıkarılmış olabilir ve dönüştürülmemiş enerji tekrar elde edilebilir. Verimli dönüşüm için yüksek *k* gerekli olsa da k^2, dönüşmemiş enerji mutlaka kaybolmadığından (sıcaklığa dönüşür) ve çoğu durumda geri kazanılır olduğundan verimliğin bir ölçüsü değildir (bu işe yarar dönüşmüş gücün verilen güce oranı olarak tanımlanır).

Gerçek verimlilik işe yarar dönüşmüş enerjinin dönüştürücüden alınan enerjiye oranıdır ve gereği gibi düzenli ve iyi ayarlanmış kendi rezonans bölgesinde çalışan dönüştürücü %90 üzerinde verim elde eder. Kendi rezonans bölgesi dışında verimliliği çok düşük olabilir [131]

1.2.3.2.4. Piezoelektriklerde Sınırlamalar

Daha önce piezoelektriğin lineer teorisinin uygulamasını sınırlayan farklı yönler olduğu belirtilmiştir.

1.2.3.2.4.1. Elektrodaralma (Elektrostriksiyon)

Genelde piezoelektrik malzemelerin karşılığı doğrusal davranışta bulunan dikdörtgen bir komponente sahiptirler. Bu komponent elektrostriktif katsayı denilen bir katsayıya bağlıdır. Piezoelektrik malzemeler için bu katsayı genelde lineer piezoelektrik katsayıdan daha düşüktür ama elektrik alan yükseldiğinde oldukça belirgin olabilirler.

1.2.3.2.4.2. Depolarizasyon

Bir PZT seramik kutuplama işlemi uygulanınca sürekli polarize kalır, sonraki kullanımlarda, piezoelektrik özelliklerde kısmi hatta tamamen kayıplar oluşturabilecek olan seramiğin depolarize olmadığından emin olmak gerekir. Seramik elektriksel, mekaniksel ya da termal olarak depolarize olabilir.

a) Elektriksel Depolarizasyon: Kutuplama alanına zıt polaritenin güçlü elektrik alana malzemeyi maruz bırakmak onu depolarize eder. Başlangıç depolarizasyonu için gerekli alan gücü malzeme türüne, malzemenin depolarizasyona maruz kalma süresine ve kutuplama sıcaklığına bağlıdır.

b) Mekanik Depolarizasyon: Mekanik depolarizasyon bir piezoelektrik malzemedeki mekanik gerilim domainlerin oryantasyonunu değiştirecek ve dipollerin dizilmelerini bozacak kadar yüksek olduğunda gerçekleşir. Mekanik gerilim için güvenlik kısıtlamaları malzeme türüne göre değişir.

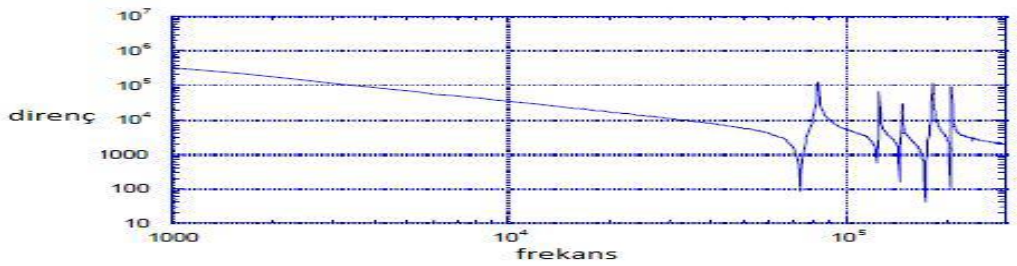
c) Termal Depolarizasyon: Eğer bir piezo elektrik malzeme Curie sıcaklığı noktasına ısıtılırsa, domainler düzensizleşir ve element tamamen depolarize olur. Bir piezoelektrik element ayrıca sadece Curie noktası altındaki sıcaklıklarda belirgin depolarizasyon olmadan uzun süre için çalışabilir. Güvenli bir çalışma sıcaklığı normal olarak 0°C ve Curie sıcaklığı noktası arasında bir yerdedir.

1.2.3.2.4.3. Frekans Sınırlamaları

Bütün fiziksel sistemler titreşimin doğasından benzer frekansa sahiptir. Sistem doğal frekans civarında frekanslı impulsların (örn. elektrik, mekanik, akustik) periyodik serisine maruz kaldığında, yüksek genlikle salınım yapar. Genelde mekanik olarak uyarılmış bir gövde mekanik rezonansla karşılık verir. Ancak malzeme piezoelektrik ise elektriksel rezonans, malzeme mekanik etkiye zorlandığında elde edilebilir. Diğer yandan yüksek mekanik deformasyon malzeme elektriksel alana maruz kaldığında oluşabilir. Bu nedenle, sistemin doğal mekanik frekansına çok yakın frekansta bir elektrik sinyali rezonans üretir.

Şekil 1.17. bir piezoelektrik diskin tipik frekans davranışını gösterir. Farklı rezonans piklerini göstermektedir. Genelde lineer davranış sistemin ilk rezonansının yarısına kadar hesaba katılır.

Rezonans frekansı piezoelektrik malzemenin karakteristiklerine ve ortamın elektriksel şartlarına bağlıdır [131].



Şekil 1.17. Frekansın Bir Fonksiyonu Olarak Bir PZT Diskin Özdirenci [131].

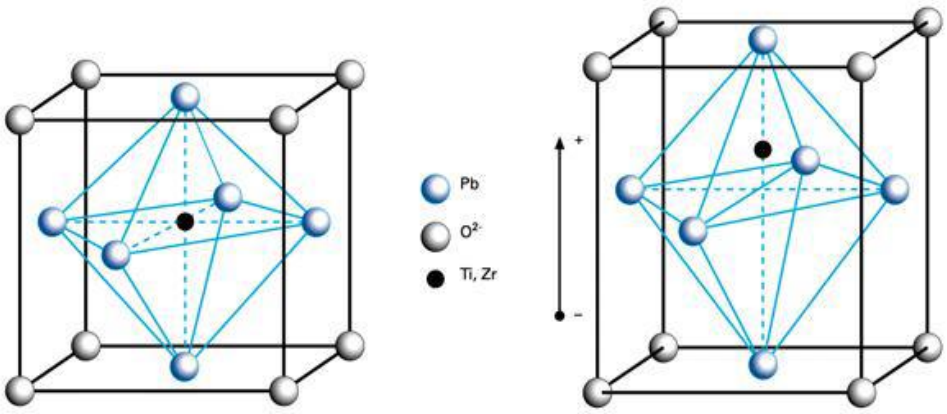
1.2.3.2.5. Piezoelektrik Seramik Malzemeler

Genel olarak piezoelektrik malzemeler; doğal piezoelektrik malzemeler (kuvars, rochelle tuzu vb.), piezoelektrik seramik malzemeler (kurşun-zirkonat-titanat, baryum titanat, kurşun titanat, vb.), polimer piezoelektrik malzemeler (naylon, vinilidin florür, trifloretilen, tetrafloretilen vb.) ve kompozit piezoelektrik malzemeler olarak sınıflandırılabilir. Bu çalışmada yalnızca seramik piezoelektrik malzemelere değinilecektir.

Endüstriyel olarak uygulama alanı bulmuş en önemli ve en eski piezoelektrik seramik malzemeler; baryum titanat ($BaTiO_3$; BT) ve kurşun zirkonat titanat ($PbZrTiO_3$;PZT) olarak ifade edilebilir. Her ikisi de perovskit tipi kristal yapıya sahip bu seramikler, günümüzde halen yaygın kullanıma sahiptir. Baryum titanata kıyasla daha üstün piezoelektrik özelliklere sahip olmasıyla PZT hem büyük boyutta (bulk) seramik hem de ince film seramik formunda elektronik endüstrisi için çok önemlidir.

Piezoelektrik malzemeler, doğal piezoelektrik malzemelere göre fiziksel, kimyasal, mekanik ve piezoelektrik özellikleri açısından daha kullanışlı oldukları gibi, kimyasal olarak da daha kararlıdırlar. Ayrıca neme ve atmosferik koşullara karşı da daha dayanıklıdırlar. Özel uygulamalara kolaylıkla adapte edilebilirler, karmaşık geometri veya büyük hacim gerektiren uygulamalar için kolay ve ucuz üretim olanağı sağlarlar [145].

Çoğu piezoelektrik seramik, genelde perovskit kristal yapısına sahiptir. Şekil 1.18. de olduğu gibi provskit kristalleri, genellikle geniş bir kafese dizilmiş kurşun veya baryum ve oksijen iyonları gibi divalent metal iyonları arasında, küçük titanyum veya zirkonyum gibi tetravalent metal iyonları içerirler. Kristallerde, tetragonal veya rombohedral simetriyi oluşturan şartlar altında her bir kristal dipol momente sahiptir [143].



Şekil 1.18. Provskit Kristalinin Şematik Görüntüsü [146].

APC International (2006) yılında, "Piezoelektrik seramik bir malzeme hazırlamak için, ince toz halindeki başlangıç metal oksit tozları belirli oranlarda karıştırıldıktan sonra homojen bir toz karışımı elde etmek için ısıtılırlar. Elde edilen toza organik bir bağlayıcı eklenerek disk, tel, bar, levha, vb. şekillerde yapısal elemanlara dönüştürülebileceği gibi toz olarak da saklanabilirler. Çeşitli formlar verilmiş seramik numuneler belirli süreler dahilinde pişirme programları uygulanarak fırınlanırlar. Bu fırınlama işlemi "sinterleme" olarak adlandırılır ve başlıca amacı toz parçacıklarını birbirine bağlayan yoğun kristal yapıya dönüştürmektir. Bu işlemlerden sonra numuneler soğumaya bırakılır ve gerekirse istenilen ölçülerde kesilir veya çapakları alınır" fabrikasyonu raporlamıştır [143].

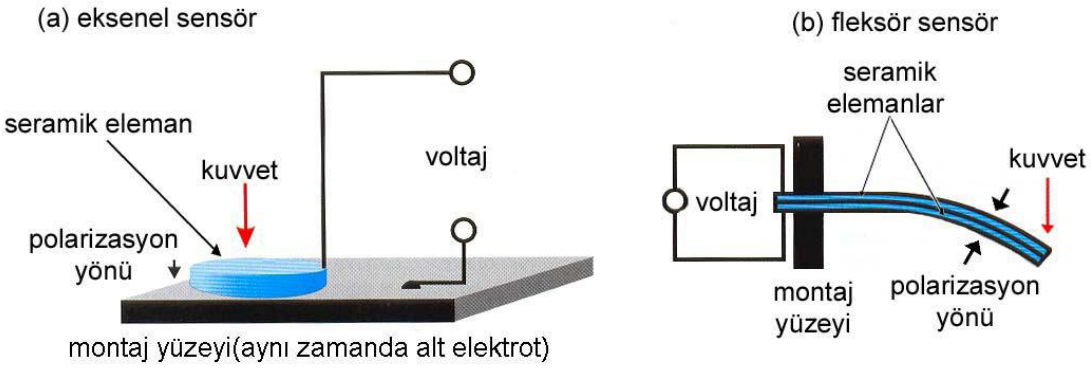
1.2.3.2.6. Piezoelektrik Malzemelerin Kullanıldığı Yerler / Uygulama Alanları

Piezoelektrik malzemelerin kullanıldığı cihazlar dört genel başlık altında toplanabilir. Bunlar: sensörler, üreteçler, aktuatörler (tahrikçiler) ve transdüserlerdir (dönüştürücüler).

1.2.3.2.6.1. Sensör

APC International (2006) sensörü, "Sensör, ivmelenme veya basınç gibi fiziksel bir parametreyi elektrik sinyaline çevirir. Bazı sensörlerde fiziksel parametre direk piezoelektrik elemanın üzerine etkir ve elektrik sinyalini oluşturur. Bazen de sensörde mevcut olan piezoelektrik elemana akustik sinyallerin etkimesi sonucu oluşan titreşimlerle elektrik sinyali oluşturulur. Genellikle kurulan sistemler, sensörden gelen sinyalleri işleyerek duyulabilir, görülebilir veya hissedilebilir cevaplara dönüştürürler" olarak tanımlamıştır [141].

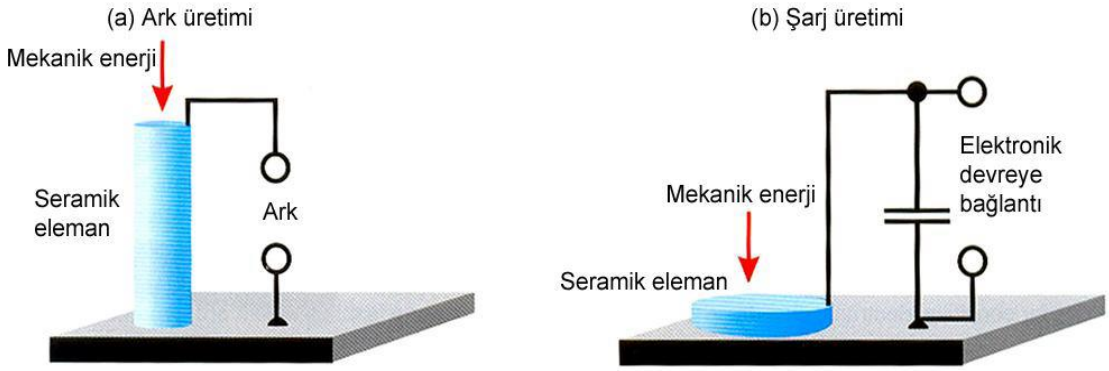
Piezoelektrik eleman kullanılarak yapılan sensörlerin eksenel ve fleksör olmak üzere iki temel çeşiti mevcuttur. Bu sensörlerin basitçe yapıları Şekil 1.19. da verilmiştir [141].



Şekil 1.19. Temel Piezoelektrik Sensör Çeşitleri, (a) Eksenel Sensör, (b) Fleksör Sensör [141].

1.2.3.2.6.2. Üreteçler

Üreteç olarak tasarlanan piezoelektrik malzemeler, gerilim (voltaj) üretirler. Bu özelliklerinden ötürü herhangi bir elektrot aralığında ark oluşturabildiklerinden (Şekil 1.20. a) yakıt ateşleyicilerinde, gaz sobaları, kombi gibi cihazlarda, kaynak ekipmanlarında ve daha birçok cihazda piezo-çakmak (ateşleme aparatı) olarak kullanılırlar.



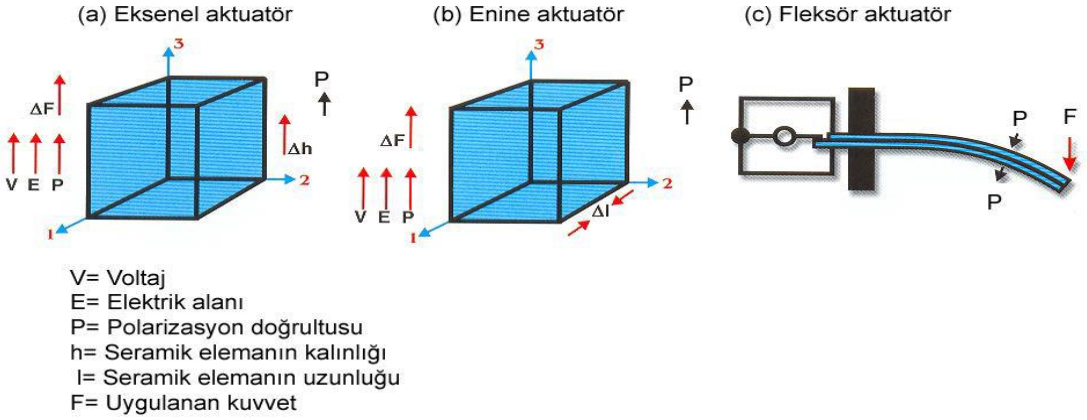
Şekil 1.20. Piezoelektrik Eleman Kullanılarak Oluşturulan Elektrik Enerjisi, (a) Ark Üretimi, (b) Şarj Üretimi [141].

APC International 2006 yılında ateşleme işlemini, "Piezoelektrik ateşleme sistemleri, küçük ve basittirler. Bu özellikleri bazı durumlarda, kalıcı mıknatıslar veya yüksek voltaj dönüştürücüleri ve kapasitörler gibi, alternatif sistemlere göre avantaj sağlar. Ayrıca piezoelektrik bir elmandan elde edilen elektrik enerjisini depolama imkânı da mevcuttur. Çok katlı kapasitörleri oluşturmada kullanılan teknikler çok katlı piezoelektrik üreteçlerinin yapımında da kullanılmıştır." şeklinde raporlamıştır. Bu şekilde üretilen üreteçler (Şekil 1.20.) elektronik devreleri beslemede kullanılan kuru pilleri oluşturmak için kullanılmaya çok elverişlidirler [141].

1.2.3.2.6.3. Aktuatörler

Tetikleyici veya tahrikçi olarak da adlandırılabilen aktuatörler, elektrik sinyalini yüksek çözünürlükte (hassas) ötelenmeye (yer değişimine) çevirirler. Aktuatörler, temel olarak eksenel, enine ve fleksör aktuatörler olarak gruplandırılırlar (Şekil 1.21.). Aktuatörlerin gösterdiği yüksek hassasiyetteki hareketten makinalarda kullanılan takımların hassas şekilde kalibrasyonundan, çeşitli sistemlerde kullanılan optik lens veya aynaların kalibrasyonuna kadar birçok yüksek duyarlılık gerektiren uygulamada yararlanılır.

Ayrıca piezoelektrik aktuatörler, uygulamasına göre hidrolik valfleri, küçük hacimdeki motorları veya özel amaçlı motorları kontrol etmede de kullanılabilirler. Aktuatörler, bir çeşit piezoelektrik motorlardır ve en büyük avantajları elektromanyetik gürültü oluşturmamalarıdır. Ayrıca eğer aktuatörün gerçekleştirdiği ötelenme engellenirse, aktuatör kullanılabilir bir kuvvet üretmiş olur [141].



Şekil 1.21. Temel Aktuatör Çeşitleri (a-c) [141].

1.2.3.2.6.4. Transdüserlar

APC International (2006) piezoelektrik transdüserleri, "Piezoelektrik trandüserler, elektrik enerjisini ses veya sesüstü titreşen mekanik enerjiye çevirebilirler. İşitilebilen ses meydana getiren transdüserlerin, aynı şekilde ses üreten elektromanyetik cihazlara göre; kompaklık, basitlik, güvenilirlik ve yüksek ses için gerekenden daha az enerji ihtiyacı gibi artıları vardır. Bu özelliklerinden dolayı pil ile çalışan ve ses üreten cihaz uygulamalarında idealdirler. Piezoelektrik etki iki yönlü olduğundan transdüserler, elektrik enerjisinden ultrasonik sinyaller üretebildiği gibi ses dalgasını da elektrik sinyaline dönüştürebilirler. Bu özelliğinden dolayı transdüserler kullanılarak mesafe, akış, sıvı seviyesi ölçen cihazlar geliştirilmiştir. Bu cihazlarda sinyal gönderme ve alma işlemleri tek bir piezoelektrik transdüserle yapılabildiği gibi her iki işlem için ayrı ayrı piezoelektrik transdüser kullanan cihazlar da mevcuttur.

Ayrıca piezoelektrik transdüserlerden temizlemede, sıvıların atomizasyonunda, seramik veya diğer gevrek malzemelerin işlenmesinde, plastik malzemelerin kaynak işlemlerinde, medikal uygulamalarda vb. ultrasonik titreşimler oluşturduğu için yararlanılır." şeklinde açıklamıştır [141].

1.3. Kuvars Kristal Mikrodenge

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan, gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçimliliği, kristal

yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır [147].

Kütledeki değişikleri takip ederek, birçok kimyasal ve fiziksel prosesi takip edebiliriz. Makromolekül özgül olarak liganda bağlandığı zaman, sinyal değiştirici bağlanma olayından dolayı, fiziksel bir değişikliği ölçebilir. Sinyal değiştirici genellikle direnç, pH, ısı, ışık ya da kütledeki değişikliği ortaya çıkarır ve daha sonra veriyi işlenebilecek elektriksel bir sinyale dönüştürür. Mikrobalans kullanımına olan ilginin artması, bilimsel enstrümantasyonda hızlı bir ilerlemenin gerçekleşmesi ile sonuçlanmıştır. Geleceği parlak olan bir dedektör tipi de Kuvars Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance) (QCM)'dır. QCM bir piezoelektrik kütle-algılama cihazıdır. Bir QCM cihazı altın kaplı bir kuartz kristalin içerisinden bazı resonant frekanslarında titreşime neden olan elektriksel bir sinyal yollayarak çalışmaktadır. QCM çalışmalarında en yaygın kullanılan elektrotlar altın elektrotlarıdır. Çünkü altın hava içerisinde okside olmaz. Bununla birlikte, Cu, Ni, Pt ve diğer metaller de kullanılmaktadır).



Şekil 1.22. QCM Sensörleri (Biolin Scientific)

Daha sonra QCM kristal içerisindeki salınımın frekansını ölçer. Biyosensör olarak kullanıldığında, QCM kristalin yüzeyindeki kütle değişimlerinden dolayı kristalin frekansındaki değişimleri ortaya çıkarmaktadır.

1.3.1. Kuartz

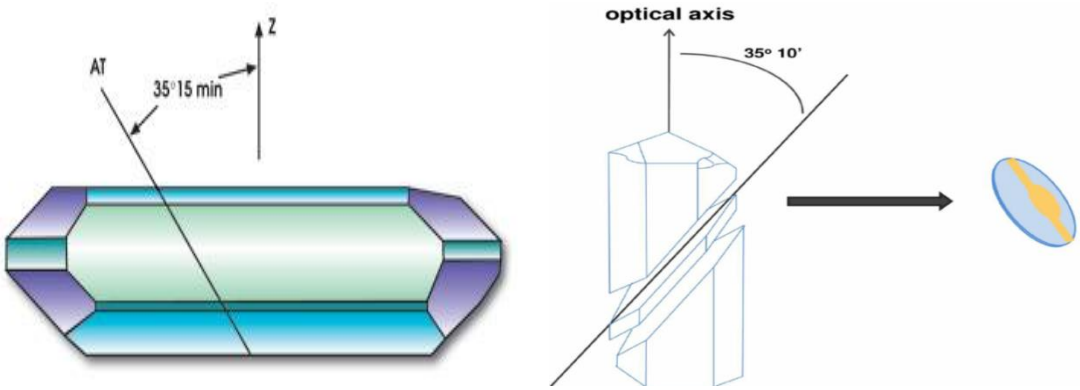
Kuartz silikanın ya da silikon dioksidin (SiO_2) en kararlı formudur. Saydam ve renksizdir ancak renk verici maddelerin bileşimine girmesi sonucunda çeşitli renklerde olabilirler. Mesela, mor renkli olanlarına ametist, siyah renkli olanlarına da dumanlı kuvars adı verilmektedir. Çoğu kimyasal çözücüden etkilenmediği gibi, kristal yapısını yüzlerce santigrad dereceye kadar koruyabilmektedir. Aynı zamanda piezoelektrik özelliğe sahiptir. Yani üzerine basınç uygulandığında, örneğin bir fiskeyle tıklatıldığında veya büküldüğünde, yüzeyinde elektik gerilimleri veya akımları oluşur. Bunun tersi de doğrudur: Yüzeyine gerilim uygulandığında, yani üzerine bir miktar elektrik yükü atıldığında, şeklini hafifçe değiştirir. Fakat bu şekil değişikliği, öyle donup kalmaz ve kristal yapı, orijinal şekli etrafında titreşmeye başlar.

Kuartz kristal kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütlesine bağlı olan doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Kristalin kırılmasının rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır [148]. Yüksek kaliteli mekaniksel ve piezoelektrik özelliğinden dolayı QCM uygulamalarında alfa-kuartz kristalleri kullanılmaktadır.



Şekil 1.23. Kuartz Kristali [149]

Kristal oryantasyonu ile birlikte kesik açı (the cut-angle) salınımın şeklini belirlemektedir. QCM uygulamalarında en yaygın kullanılan AT cut kristali kuartz çubuğunun 35°10’ açısı ile uzunluk yönünde olacak şekilde kesilmesi ile yapılmaktadır [149].



Şekil 1.24. Kuartz Kristalinin AT Kesimi [149]

1.3.1.1. Kuartzın Kullanım Alanları

Kumlarda bolca bulunan kuvarsın, saf olmayanları içinde demir vardır. Beyaz kum olarak bilinen oldukça saf kuvarslar camcılıkta kullanılır. Kuvars kristali mor-ötesi ve kızılaltı ışınımlara saydamdır; bu bakımdan morötesi lambaların hazırlanmasında kullanılır. Piezoelektrik olay göstermesi J. ve P. Curie tarafından ortaya kondu. Bu özelliğinden dolayı elektronik sanayiinde osilatör olarak kullanılır. Ergitilen kuvarstan, ısınınca genleşme oranı çok düşük olan bir cam elde edilir. Ani sıcaklık değişikliklerinden etkilenmesi istenmeyen malzemelerin yapımında kuvarstan yararlanılır [150].

1.3.1.2. QCM'in Avantajları

Moleküler etkileşimlere dayalı algılayıcı sistemlerin (QCM, FET, SPR gibi) önemi ve uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır. Klasik analitik tayin yöntemlerine nazaran biyosensölerin daha avantajlı olması bu uygulamalara ilgiyi arttırmaktadır. Cevap verme süresi, hassasiyet, düşük maliyeti, tasarım kolaylığı gibi beklentileri karşılayabilmek amacıyla tanıyıcı yüzey ve çevirici bütünlüğünün sağlandığı biyosensörler tasarlanmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi de QCM'dir [151]. QCM'de de bir çevirici (transducer) sistem ile bir biyolojik molekül beraberce kullanılmaktadır [152]. Bu amaçla sensörlerde çevirici sistem olarak piezoelektrik kristallerin kullanılması önem kazanmaktadır.

1.3.1.3. Piezoelektrik Etki Ve QCM'in Çalışma Prensibi

Piezoelektrik etki ilk defa 1880'de Jaques ve Pierre Curie tarafından Rochelle tuzunda keşfedilmiştir [152]. Temel olarak piezoelektrik etki, mekanik basınç altında bırakılan bazı yalıtkan kristallerin bir yüzünde pozitif, karşı yüzünde ise negatif elektrik yüklerinin ortaya çıkması şeklinde tanımlandırılır. Piezoelektrik bir kristalin yüzeyine fiziksel bir kuvvet uygulandığında yüzeyler arasında bir elektriksel potansiyel farkı oluştuğu gözlenmektedir. Oluşan elektriksel potansiyelin şiddetinin, uygulanan fiziksel kuvvet ile doğru orantılı olduğu bu etkiye "Piezoelektrik Etki" adı verilmektedir [153]. Bu durumun tersi de mümkündür, yani bir kristalin iki yüzüne bir potansiyel farkı uygulanması sonucunda kristalde mekanik biçim değişikliği görülmektedir.

Dolayısıyla, piezoelektrik kristalin yüzeyi üzerine yerleştirilen herhangi bir yabancı maddenin kütlesi ile rezonans frekansının değişmesi, piezoelektrik düzeneğinin çok yüksek bir hassasiyetle kütle ölçümünde kullanılabilmesi mümkün olmaktadır. Kristal yüzeyinin seçici bir kimyasal malzeme ile kaplanması durumunda piezoelektrik kristal düzeneği kimyasal sensör olarak kullanılabilmektedir. Bu amaçla, piezoelektrik kütle sensörlerinin geleceğe yönelik kullanımı için yapılan çalışmaların en çok yoğunlaştığı konu, seçici kimyasal sensörlerdir. Piezoelektrik kristal olarak genellikle kuvarsın kullanılması nedeniyle bu tür kimyasal sensörler "Kuvars Kristal Mikrodenge Sistemleri" (QCM) olarak anılmaktadır [154].

Bu prensipten yola çıkarak piezoelektrik özellik taşıyan malzemeler hem aktüatör olarak hem de sensör olarak kullanılabilmektedirler. En yaygın olarak kullanılanlar kuvars kristalleri, Rochelle tuzu ve kurşun-zirconattitanattır (Lead-zirconate-titanate; PZT) [155].

Bu sistemde kullanılan kristal iki tane elektrot arasında bulunmaktadır. Bu elektrotlar bir osilatöre bağlıdır. Ve sisteme verilen bir AC akımı kristalin titreşim yapmasına izin verir. Ve bu sistem geniş sıcaklık aralıklarında dayanıklı olduğu için stabil çalışmalara olanak sağlar

QCM sisteminde kullanılan elektrotlar genellikle 1,000 Å miktarında 99.99% saf altından (Au) yapılmaktadır.

QCM, partiküllerin ölçümünün uygulanması için üzerinde iki tane kristal barındırır. Bunlardan bir tanesi havaya (yukarı) doğru bulunur, diğeri ise partiküllerin bulunduğu ortamdan uzak bir yerde bulunur. Havaya doğru yer alan kristal ince bir yapışkan tabaka ile kaplıdır ve bu tabaka partiküllerin kristal üzerine yapışmasını sağlar. Bu iki kristal karakteristik rezonans frekanslarına göre karşılaştırılır. Quartz kristal microbalance, bu iki kristalin aralarındaki frekans değişimini ortaya çıkarmaktadır. Üzerinde partikül biriken kristalin zamanla rezonans frekansı düşecek, buna bağlı olarak ise iki kristal arasındaki frekans farkı artacaktır. Bu ölçüm sistemin bilgisayara aktarılmasıyla gerçekleşir. QCM kristalleri sıvı ve gaz fazda, vakumlu ve viskoelastik ortamlarda ölçüm yapabilme imkânı verirler. Quartz crystal microbalance (QCM) yüksek duyarlılıkla kütle ölçümlerini yapabilen akustik dalga mikrosensörlerinin bir çeşididir. Uygun koşullar altında, tipik bir QCM 0.1-1 ng/cm^2 'lik bir kütle değişimini ölçebilir. QCM yüksek frekanstaki AC elektrik alanının etkisi altında salınmaktadır.

Piezoelektrik kristallerin kimyasal sensörlerde kullanılması ilk kez 1959 yılında Sauerbrey tarafından ortaya çıkartılmıştır [156]. Quartz kristalleri karşıt piezoelekrik etkiyi ortaya koymaktadır. Uygulanan gerilim mekaniksel bir bozulma yaratır. Kuartzın bu özelliği QCM deki az miktardaki kütle değişimlerini ortaya çıkarmaktadır. Kuartzın yüzeyi üzerindeki küçük bir kütle yükü kuartzın salınım frekansını küçültecektir. Bu frekanstaki değişim ve frekanstaki değişim ile kütle yükü arasındaki ilişki Sauerbrey denklemi ile açıklanmış ve tanımlanmıştır.

QCM'de quartz sensörün yüzeyine materyalin tutunması ile meydana gelen kütle artışı, "f" ile gösterilen rezonant frekansının azalmasına yol açar.

Bu ilişki (1.8.) "Sauerbrey eşitliği" ile gösterilebilir:

Sauerbrey Denklemi:

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = \frac{-2f_0^2}{A\rho_q v_q}\Delta m \quad (1.8.)$$

Burada,

f_0 = kristalin resonant frekansı,

A = kristalin elektrotlar arasındaki hareketli alanı,

ρ_q = kuartzın yoğunluğu,

μ_q = kayma genliği(katsayısı), ve v_q kuartzdaki kayma dalga hızıdır.

Sauerbrey denklemi, havadaki salınım için geliştirilmiştir ve yalnızca kristale bağlanmış katı materyallere uygulanmaktadır. Aşağıdaki (1.9.) denkleminde ise QCM ölçümlerinin sıvılarda da yapılabileceği gösterilmektedir.

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\left(\eta_1 \rho_1 / \pi \rho_q \mu_q\right)} \qquad 1.9.$$

Burada da ρ_l sıvının yoğunluğu ve η_l sıvının viskozitesidir.

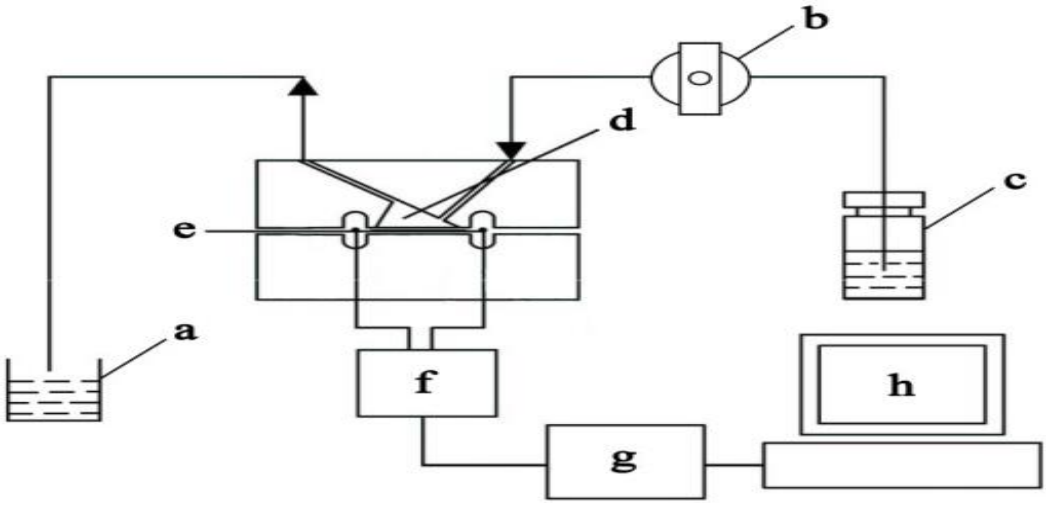
Frekans değişimini ölçerek kristal üzerinde bulunan materyalin kütlesini hesaplamak mümkün hale gelmiştir ve bu da Quartz Crystal Microbalance(QCM) ın bir ilkesidir [157].

QCM temel olarak üç ana kısımdan oluşmaktadır;

• quartz resonatörü,

• bir akış sistemi ve

• değişen frekansı kontrol eden osilatör.



Şekil 1.25. QCM Sisteminin Şematik Diyagramı [157]

Burada a, Çıkış Kısmındaki Kabı; b, Peristaltik Pompa; c, Numune Kabı; d, Hücre; e, QCM Cihazının Altın Yüzeyi; f, Osilasyon Devresi; g, Frekans Sayıcı; h, PC ve Arayüz Yazılımı.

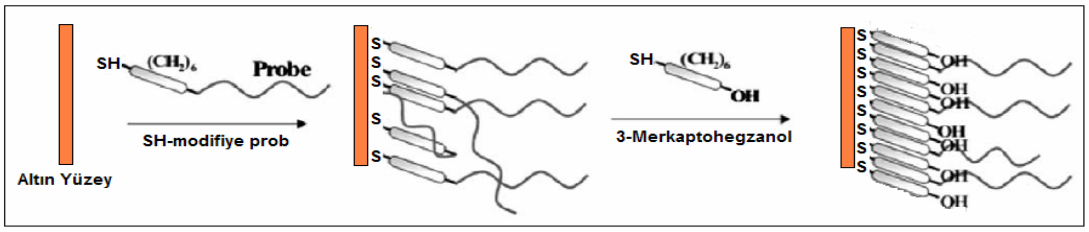
1.3.2. QCM İle Biyosensör Tasarımı

QCM ile iki farklı deney dizaynı kullanılabilir. Her iki yöntemin de ilk basamağında biyolojik ligand yüzeye tutturulur. Birinci yöntemde ligandın yüzeye tutturulma işlemi akışkan bir sistem içerisinde gerçekleştirilir. Bağlanma olayı eş zamanlı olarak izlenir ve analizin tamamı solüsyon fazında gerçekleşir. Bir pompa ve şırınga yardımıyla gönderilen solüsyon kristalin yüzeyi ile temas eder ve ilk basamak gerçekleştirilir. Yani tanıyıcı sistem yerleştirilmiş olur. Analit kristal yüzeye bağlandığı zaman kristalin titreşim frekansındaki düşüş ekrana yansır. Analit ile tepkimeye girecek olan hedef solüsyon yine akışkan sistemde gönderilir ve arayüzey viskoelastik özelliklerinde değişikliğe sebep olur ve bu da rezonans frekansta azalma olarak fark edilir (solution phase sensing method) [155].

Diğer yöntem ise dış ortamda yapılan bağlama yöntemidir. Yine ilk olarak analizlenecek madde ile tepkimeye girecek olan ligand dış ortamda kristal yüzeye verilir. Kristal kurutulduktan sonra sisteme yerleştirilir ve frekans ölçülür. Daha sonra analizlenecek maddeyi içeren solüsyon ister akışkan sistemde ister dış ortamda daldırılarak yüzeye gönderilir. Fiziksel ve kimyasal olarak bağlanmanın gerçekleşmesiyle kütle artışına bağlı olarak kristal frekansında tekrar bir düşüş olacaktır. Bu yöntemin bekleme ve kurutma işleminin uzun sürmesi ve zahmetli olması tercih edilmeme sebebidir. Ayrıca eş zamanlı bilgi alınamaması da başka bir dezavantaj sağlar (dip and dry method) [155,157].

QCM'e dayalı DNA hibridizasyon çalışmalarında bu deney dizaynlarıyla birlikte kullanabileceğimiz 2 farklı yol mevcuttur. Bunlardan biri altın yüzeye doğrudan tiyol grupları içeren probun tutturulmasıdır. Tiyol gruplarının altına olan duyarlılığı bilinmektedir. Bu şeklilde altın yüzeye prob tutturularak biyosensör oluşturabiliriz. Bir sonraki basamakta altın yüzey üzerinde kalan boşluklar tiyol gruplarını engelleyen bir solüsyon kullanılarak doldurulur (örneğin 6–merkapto 1–hekzanol). Bu şekilde hem tiyol grubu içeren probun yüzey üzerinde dik kalması sağlanır, hem de eğer altın yüzey

probla tam kaplanmamışsa, hedef solüsyon ile yüzey arasında oluşabilecek beklenmedik reaksiyonların gerçekleşmesine engel olunulur [158,159,160,161].



Şekil 1.26. SH-Modifiye Probun Altın Yüzeye Bağlanması [162]

Diğer yol ise yüzeyi, bir kaplama ajanıyla kaplayarak DNA tutturulmasının sağlanmasıdır. Bu yöntemin bir diğer adı; kendi kendine toplanan düzenli elektrot yüzeyi tabakaları (self-assemblymultilayers, SAM)'dir [162]. Bu tez çalışmasında, altın yüzey modifikasyonlarında sıkça kullanılan (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) ile çalışılmıştır. MPS altına olan ilgisi dolayısıyla, kendiliğinden altına bağlanma özelliğinden yararlanmak üzere seçilen bir tiyol bileşiğidir. Tiyol ile kristal yüzey modifikasyonu sağlandıktan sonra diğer bir kovalent bağlama ajanı olarak kullanılan 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt (Sulfo-SMCC) bileşiminin yüzeye tutturulması sağlanır ve böylelikle yüzey DNA'yı tutturmaya hazır hale getirilmiş olur.

1.3.3. QCM Uygulamaları

QCM sistemler yüksek hassasiyete sahip olması, kullanım kolaylığı, spesifikliği, ucuz olması, doğrudan cevap vermesi gibi avantajlara sahip olduğundan hastalık teşhisi, antijen/antikor etkileşimi, ilaç analizlerinde, gaz sensörü olarak ve spesifik molekül tayinlerinde kullanımı son zamanlarda oldukça artmıştır. Kristalin yüzeyinin analizlenecek analite göre spesifik olarak tasarımı hassasiyeti arttıran bir etkendir. Uygulamalar, biyomolekülleri (proteinler, DNA, antijen/antikor), lipidleri, nanopartikülleri, polimerleri, polimer filmleri ve hücreler/bakterileri içermektedir. QCM tekniği çok ince yüzey sınır tabakalarının kütlesini belirler ve viskoelastik özellikleri hakkında bilgi verir. QCM tekniği yüzeyde bulunan makromoleküllerle çalışmak için uygun bir tekniktir ve var olan teknikleri tamamlayıcı özelliğe sahiptir. Yüksek duyarlılığı ve eş zamanlı algılama özelliği ile QCM birçok uygulamada kullanılabilirlik açısından cazip duruma gelmiştir.

Aşağıda QCM'in uygulama alanlarının yalnızca bir kısmı gösterilmiştir.

1. Biyoteknolojideki Uygulamalar

• DNA ve RNA nın tamamlayıcı iplikleri arasındaki etkileşimler [163].

• Protein ligandlarının immobilize reseptörler tarafından özgül tanınması, immunolojik reaksiyonlar

• Virüs kapsitlerinin, bakterilerin, memeli hücrelerinin ortaya çıkartılması

• Hücrelerin, liposomların ve proteinlerin adezyonu

• Yüzeylerin biyouyumluluğu

• Biyofilmlerin oluşturulması ya da oluşumunun engellenmesi

2. Fonksiyonel yüzeyler

• Seçici yüzeylerin oluşturulması

• Lipid membranlar

• Polimer kılıflar

• Reaktif yüzeyler

• Gaz sensörleri

• İmmunosensörler

3. İnce film Oluşumu

• Langmuir and Langmuir-Blodgett filmleri

• Polielektrolit adsorpsiyonu

• Spin coating

• İki tabaka oluşumu

4. Yüzey Aktif Madde Araştırması

• Yüzeylerdeki yüzey aktif madde etkileşimleri

• Yüzey aktif maddelerin etkinlikleri

5. İlaç Araştırmaları

• Polimer kılıfların bozunumu

• İlaçların moleküler etkileşimi

• Farmakolojik maddelere karşı hücresel yanıt

6. Diğer Uygulama Alanları

• Nem analizörleri

• Kontaminasyon monitörleri

• Elektrovalans Ölçümleri

• Metal filmler üzerindeki Hidrojen adsorbsiyonu

• Kabarcık oluşumu

• Redoks ve iletken polimer araştırmaları

• Korozyon çalışmaları

• Yüzey oksidasyonu

• DNA ve RNA hibridizasyon çalışmaları

• Protein-Protein etkileşimleri

• MEMs nanomateryalleri

• Akıllı biyomateryaller

* İlk piezoelektrik imminosensörü 1972 yılında Shon ve arkadaşları tasarlamıştır. Bir polimer yardımıyla kaplanan kristal yüzeye albümin fiziksel yollarla tutturulmuş, ardından anti-albümin içeren solüsyonla etkileştirilip kompleks oluşumu izlenmiştir [164].

* Histamine duyarlı spesifik QCM tasarımı; S. Mutlu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarda plazma polimerizasyon tekniğini kullanarak QCM yüzeyini amin veya tiyol grupları içeren monomerler kullanarak modifiye etmişlerdir. Bu çalışmada QCM sensör yüzeyine, hedef analit olarak seçilen histamini tanımlayabilmek için anti-histamin tutturulması gerçekleştirilmiş bir biyosensör tasarlanmıştır [165].

* Streptococcus mutans biofilmlerinin QCM ile nicel analizi yapılmıştır. Biyofilm araştırma alanlarının çok hızlı bir şekilde gelişmesi ile total biyomas gibi başlıca parametreleri ölçmek için acil olarak aydınlatıcı tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. Yapılan

çalışmada farklı sükroz konsantrasyonları altında oluşan S.mutans biyofilmlerinin total biyomasını ölçmek için QCM tekniğinden yararlanılmıştır ve QCM'in biyofilm oluşum kinetiği çalışmalarında yararlı bir araç olduğu kanıtlanmıştır [166].

* Chih-Sheng Lin ve arkadaşları dönüşümlü akışkan sistemi kullanarak Escherichia coli'nin gerçek zamanlı tespiti için bir DNA piezoelektrik biyosensör geliştirmişlerdir [167].

* Escherichia coli yanında Salmonella daha birçok hastalığa sebep olan bakteri ve virüslerin tayini için QCM kullanılmıştır. Başlıcaları; Salmonella, Listeria monocytogenes, Streptococcus mutans, Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Campylobacter'dır. Bunlar gıdalarda kontaminantlara sebep olan bakterilerdir [168].

* Protein A ile Immünoglobulin (Ig) reaksiyonlarının piezoelektrik kristal ile izlendiği çalışmada 10 MHz kristaller protein A ile kaplanmış ve insan ya da tavşan IgG'i içeren solüsyonlar içine pleksiglas tutucuya yerleştirilen modifiye kristaller daldırılmıştır. Yüzeye bağlanan IgG ile anti-insan IgG ortamındaki etkileşim kristal frekansında 3 kat düşmeye neden olmuştur [169].

* Bir başka çalışmada; çevresel zararlı atıklar ya da denize dökülen kimyasallar açısından hava kirliliğinin uzaktan ve otomatik izlenmesi için uygun taşınabilir mikroişlemsel kontrollü piezoelektrik kuvars mikrobalans sisteminin kurulması anlatılmaktadır. Bu çalışma kullanılan spesifik kaplama materyaline sensitif adsorbe edilen maddelerin nanogram seviyesinde kütle değişimlerinin izlendiği bir sistem dizaynıdır [170].

* Kunwadee Noonong ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları araştırmada İnsan Serum Albümini QCM sensör ile tespit etmişlerdir ve farklı insan serum albümininin farklı konsantrasyonlarında QCM sensörün frekans bilgisinde, insan serum albümini ile lineer ilişkide frekans kayması gözlemlemişlerdir. Ve insan serum albüminini tespit etmek için QCM sensörlerinin üzerinde araştırmalar yapılmasının doğru bir iş olduğunu ifade etmişlerdir [171].

* Özlem Ertekin ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları TUBİTAK destekli bir projede pulbiberde nem kalması sonucu mantar üremesi ve bu mantardan türeyen

aflatoksinin QCM sensör kullanılarak tesbit edilmesi işlemleri anlatılmaktadır. Aflatoksine uzun dönem maruz kalınması durumunda karaciğer kanserine sebebiyet verdiği bilinmektedir. Aflatoksin tayini için AFB1 tespit edilmek istenmiştir. Bunun içinde Monoklonal IgA Antikoru tanıma elemanı olarak kullanılmıştır [172].

* Thomas Clausen ve arkadaşları Primer kanser doku örneklerine ligand bağlanma-kinetiğinin gerçek zamanlı ve etiketsiz olarak belirlemişlerdir. Biyolojik belirteç hedeflemesinin değerlendirilmesi için yeni bir araç geliştirme araştırmaları içerisinde bulunmuşlardır. Bu bağlamda meme ve prostat kanseri dokularını QCM sensör kullanarak incelemişlerdir [173].

* Hiroyuki Furosawa ve arkadaşları QCM yüzeyindeki DNA ipliği ile etkileşen küçük DNA bağlayıcı moleküllerin kinetik karakterizasyonunu araştırmışlardır. Bu çalışma ilaç dizaynı için vizyon göstermekle beraber hem antibiyotiklerin hem de anti-tümör ilaçların etkilerini göstermiştir. Endotoksin üzerinden yürüttükleri bu araştırmada LAL ajanı kullanılarak endotoksin tespit etmişlerdir [174].

2. BÖLÜM

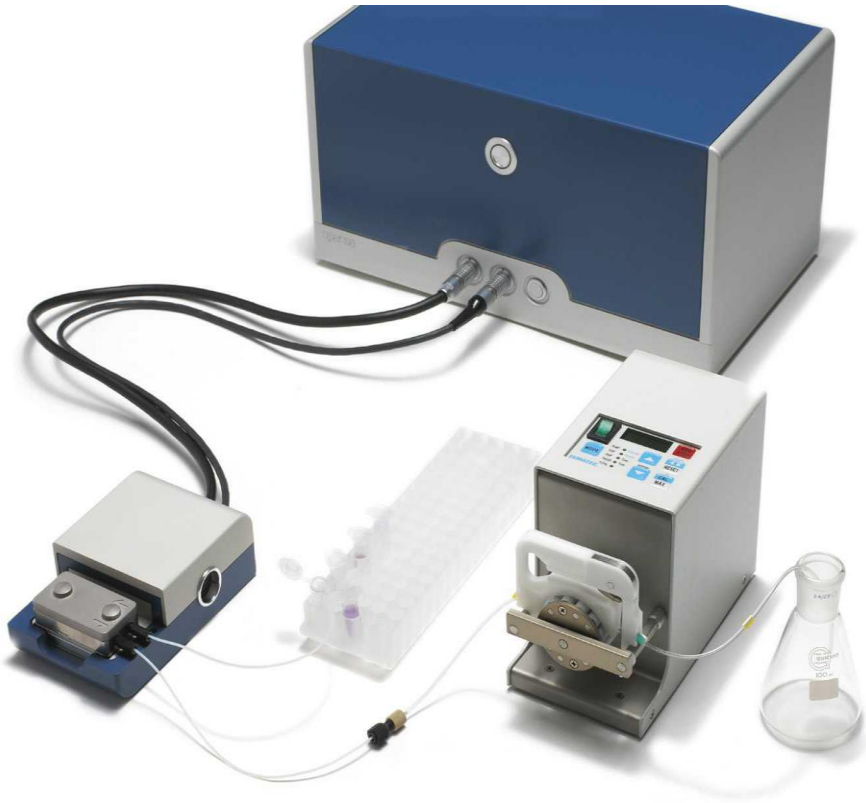
YÖNTEM VE METODLAR

2.1. Deney Malzemeleri ve Kimyasalları

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Yapılan deneyler ve ölçümler esnasında kullanılan cihazlar aşağıdadır.

1) Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) cihazı – Biolin Scientific - Qsense (QCM-D)



Şekil 2.1. QCM Cihazı (Biolin Scientific QCM-D)

QCM-D Cihazı 3 bileşenden oluşmaktadır. Bunlar elektronik ünite, hücre (oda) platformu ve flow (akış) modülüdür. Cihazda sensör olarak 5 MHz, 14 mm çaplı, parlatılmış, AT-kesimli, altın elektrotlar kullanılmaktadır.

Cihazın sıvıdaki maksimum kütle hassasiyeti 0.5 ng/cm^2 (5 pg/mm^2) olarak kataloğunda yer almaktadır.

2) Karıştırıcı (Vorteks) - Heidolph

3) Ultrasonik Yıkayıcı – Wisd Wiseclean

4) Hassas Tartı – Swissmade ES 225SM-DR

5) pH-metre – WTW – Inolab – pH7110

6) Isıtıcı – Heidolph

7) Peristaltik Pompa – Ismatec

8) IR Termometre – Fluke 62Max+

9) Altın Sensör - Qsense

10) UV Cihazı – Bioforce nanosciences – UV/Ozone ProCleaner

11) Qsoft 401 Yazılımı – Biolin Scientific

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

1) Etil Alkol (Erciyes Üniversitesi Nano Teknoloji Araştırma Merkezinden (ERNAM) temin edildi)

2) Saf Su (ERNAM'dan temin edildi)

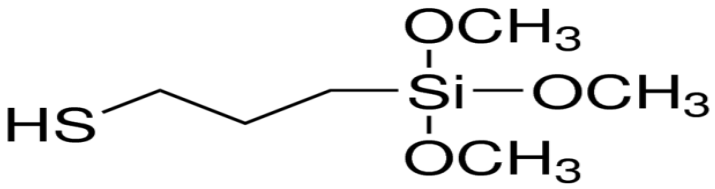
3) SDS (Deterjan) (ERNAM'dan temin edildi)

4) Amonyak (ERNAM'dan temin edildi)

5) Hidrojen Peroksit (ERNAM'dan temin edildi)

6) KOH (Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarından temin edildi)

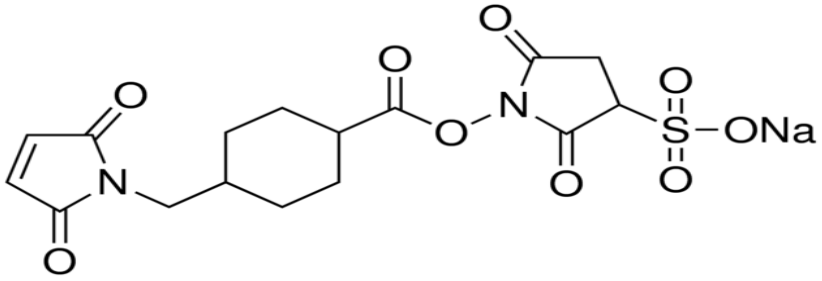
7) (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) (Sigma = 175617)



Şekil 2.2. MPS Yapısı

Kapalı Yapısı = $HS(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$

8) 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt (Sulfo-SMCC) (Sigma= M6035)



Şekil 2.3. Sulfo-SMCC Yapısı

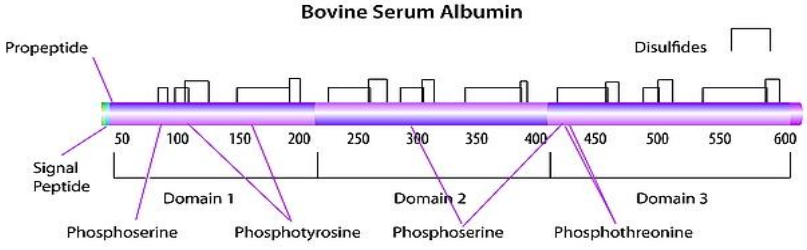
Kapalı Yapısı = $C_{16}H_{17}N_2NaO_9S$

9) Fosfat Tamponlu Serum (Phosphate Buffered Saline) (PBS)

İnsan tükürüğüne simüle ortam oluşturabilmek için fosfat tamponlu serum içerine ilave olarak kalsiyum ve magnezyum takviyesi ile pH özelliği 7.2 olacak şekilde temin edilmiştir.

10) Bovine Serum Albumin (Büyükbaş Serum Albümini) (BSA) (Sigma = A2153)

Adı = lyophilized powder, ≥96% (agarose gel electrophoresis)



Şekil 2.4. Bovine Serum Albumin Yapısı

2.1.3. Kullanılan Sentetik DNA'lar

Sentetik DNA'lar sigmaaldrich firmasından temin edilmiştir.

1) **Prob DNA (pDNA)**

AmC12-5'-ATGTCGTAATCGCATAGAAT-3' | 0.2 µmol | DST

2) **Target DNA (tDNA)**

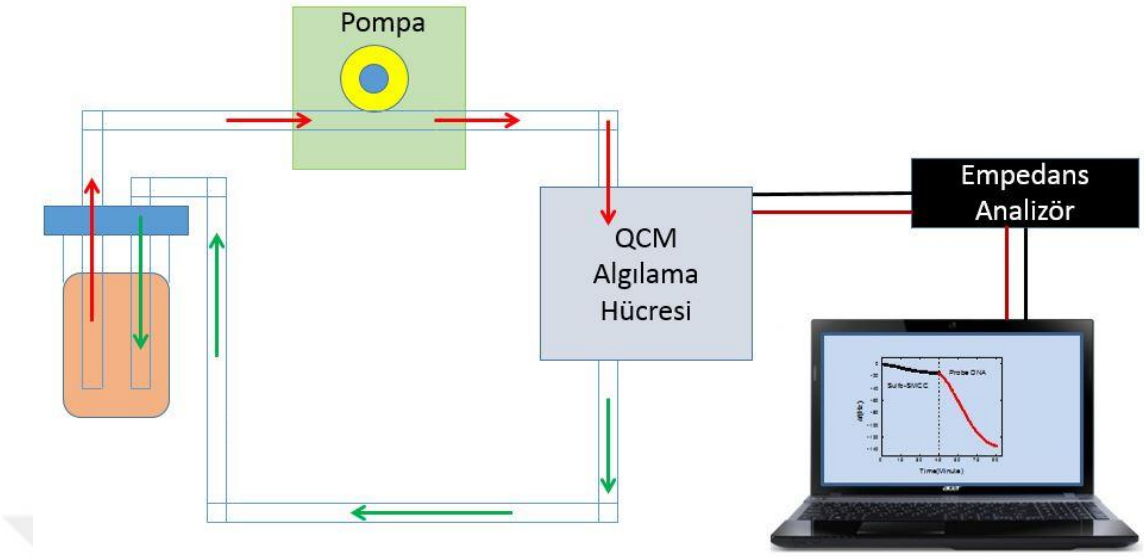
5'-ATTCTATGCGATTACGACAT-3' | 0.2 µmol | DST

Tablo 2.1. Sentetik DNA Özellikleri

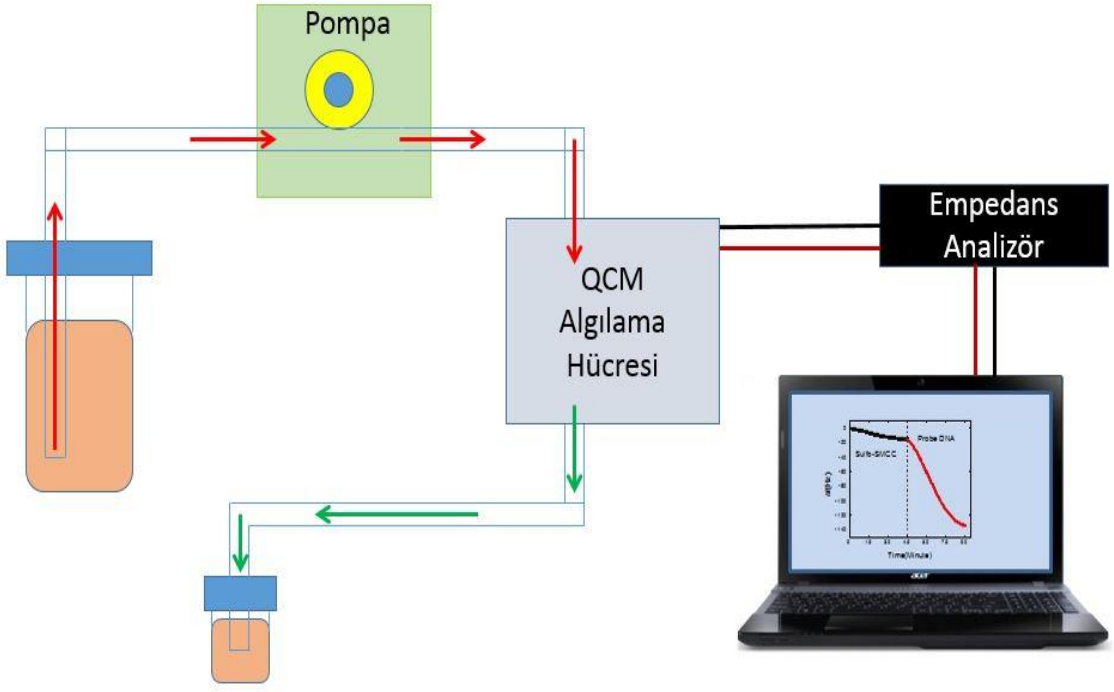
	pDNA	**tDNA**
Baz Sayısı	20	20
Baz Dizilimi	ATGTCGTAATCGCATAGAAT	ATTCTATGCGATTACGACAT
İkincil Yapı Oluşturması	Çok Düşük	Çok Düşük
Erime Sıcaklığı	56.2°C	56.2°C
Molekül Ağırlığı	6403.3	6090.9
Modifikasyon	5' - Amin C12	Yok

2.1.4. Kullanılan Deney Düzenekleri

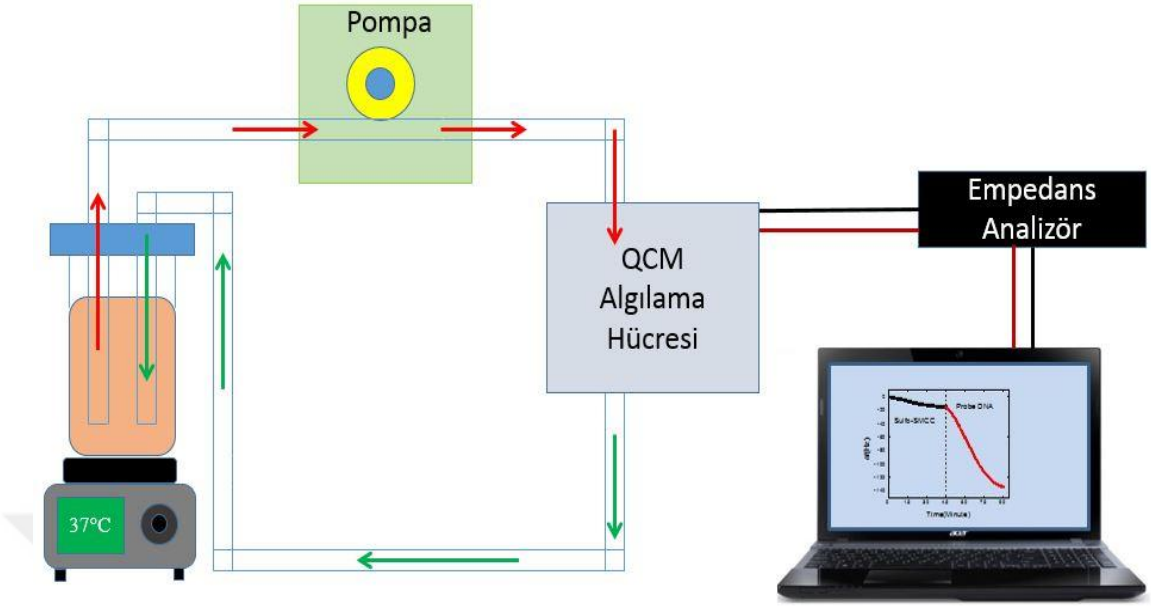
Yapılan deneylerin bazılarında peristaltik pompa ile hücreye aktarılan solüsyonlar, hücre sonrasında tekrar değerlendirilmek üzere solüsyonun verildiği kaba aktarılmıştır. Bazı deneylerde ise peristaltik pompa ile hücreye aktarılan solüsyonlar hücre ile veya hücre üzerindeki maddeler ile etkileşimi gireceğinden ötürü hücre sonrasında boş kaba aktarılarak bir daha kullanılmamıştır. Ayrıca birde sıcaklık deneyleri için bu sistemlerin ısıtılması amacıyla bir takım ısıtıcı tertibatı kullanılmıştır. Bu durumlar aşağıdaki görsellerde gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Oda Sıcaklığı Kapalı Döngü Sistem Düzeni



Şekil 2.6. Oda Sıcaklığı Açık Döngü Sistem



Şekil 2.7. 37°C Sıcaklıkta Kapalı Döngü Sistem

2.2. QCM Temizlik İşlemi

2.2.1. QCM Sensör Yuvası ve Bileşenlerinin Temizliği

QCM Sensör Yuvası parçalarına mekaniksel olarak ayırıldı. Ayırılan mekanik aksam (conta ve o-ring hariç) behere koyuldu. Malzemelerin çok kirli olmadığı durumlarda, DIW ile yıkandı, aksi durumlarda behere yeterince SDS (deterjan) karışımı hazırlandı ardından ultrasonik yıkama cihazında 60°C sıcaklıkta 10 dk bekletildi. Parçalar tek tek beherden alındıktan sonra itinalı bir şekilde alkol ile yıkandı. Her parçanın delik kısımlarına özen göstererek saf su ile durulandı. Son olarak her parça basınçlı hava ile delik kısımlarına itina göstererek kurulandı.

2.2.2. QCM Sensör Yuvasındaki Conta ve O-ring Parçalarının Temizliği

Conta ve o-ringler beherin içerisine alındı. Behere etanol eklendi. Ultrasonik yıkayıcıda 10 dk bekletildi daha sonra azot gazı ile kurutuldu.

2.2.3. QCM Sensörün Temizlenmesi

Sensör, hücre içerisinde uzun süredir bulunmuyor ise UV ışınının ardından pirhana solüsyonuna maruz bırakıldı. Aksi durumlarda QCM sensörü önce Etanol ile yıkandıktan sonra saf su ile yıkandı. Ardından QCM sensörü 20 dk UV ışınına maruz bırakıldı. Son olarak QCM sensör Pirhana Solüsyonuna maruz bırakıldı. Pirhana Solüsyonu için (30 ml Saf Su + 20 ml Amonyak + 20 ml Hidrojen Peroksit) hazırlandı. İşlem sonunda QCM sensör düşük basınçtaki azot gazı ile kurutuldu [175].

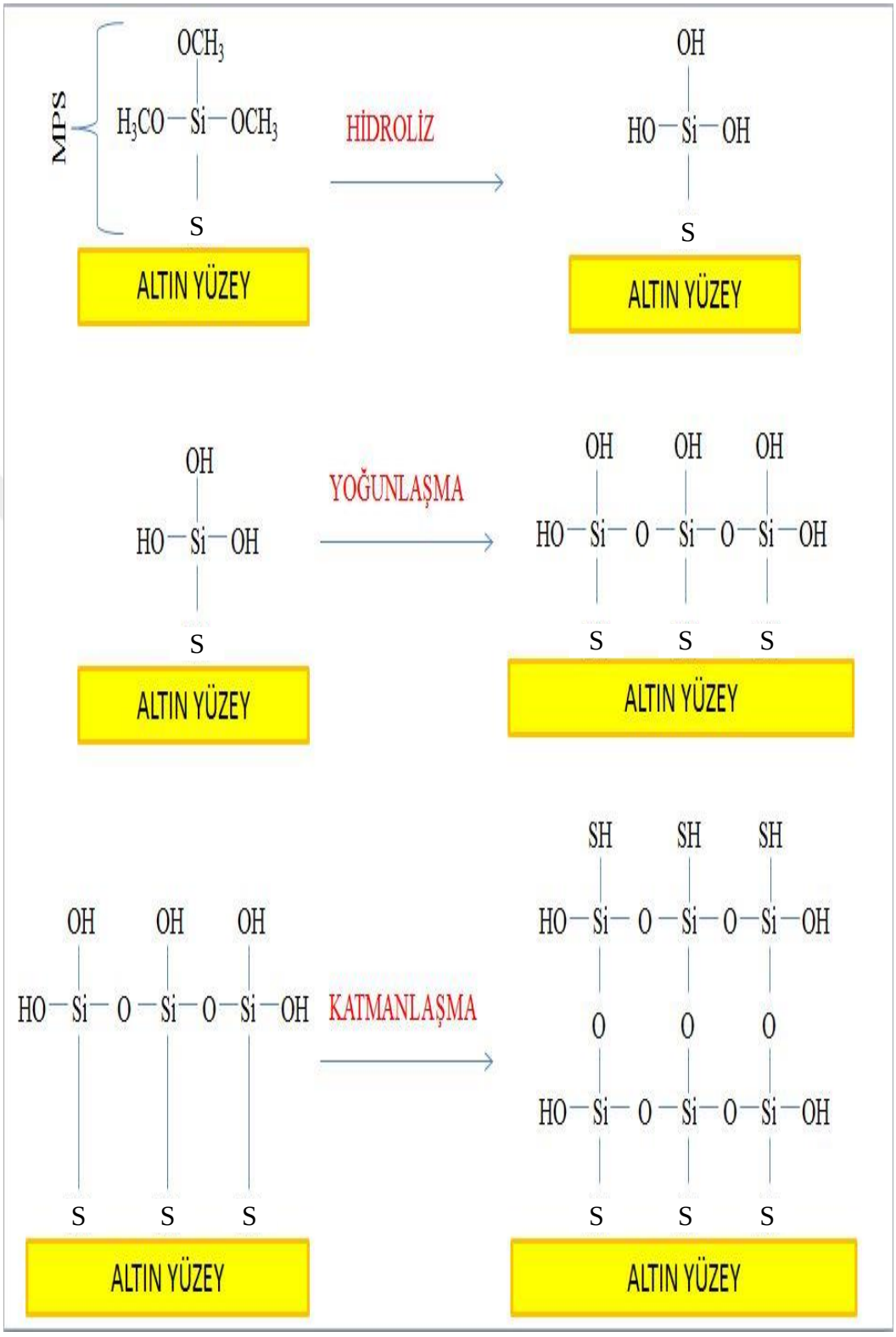
2.3. MPS Kaplama

Sensör yüzeyinin kimyasal ve morfolojik özellikleri tespitin kalitesi ve hassasiyeti ile doğrudan ilişki arz etmektedir. Sulfo-SMCC, Prob DNA (pDNA) ve Target DNA (tDNA) ‘nın sağlam bir şekilde immobilize olmasında önemli bir görev üstlenir. Yapısında bulunan tiyol grupları, kaplama işlemi sonrası altın sensör yüzeyinin üst katmanında bulunarak, bu bağlantıların yapılmasına olanak sağlar. Kimyasal kaplama ajanı olarak 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilane (MPS) kullanılmıştır.

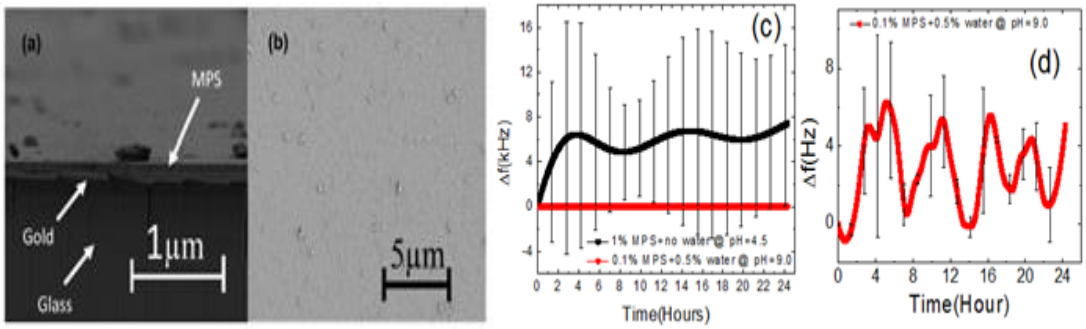
% 0.1 MPS + % 0.5 deiyonize su içeren pH=9.0 da bulunan etanol solüsyonunun altın sensör yüzeylerindeki en uygun MPS kaplama solüsyonu olduğu bilinmektedir [175].

MPS yalıtım tabakasının kaplanması hidroliz (bir silan grubunun bir silanol ile değiştirildiği bir işlem) ve yoğunlaşma (iki silidin reaksiyon ile bir Si-O-Si bağı oluşturduğu bir işlem) gibi reaksiyonlara dayanmaktadır. Temel koşullar altında silikon atomuna doğrudan anyonik hidroksiller saldırır. Hidrolizin meydana gelebileceği de bilinmektedir.

Hidroliz ve yoğunlaşma tepkimeleri, MPS konsantrasyonu, MPS solüsyonunun su içeriği ve MPS solüsyonunun pH'ı büyük ölçüde etkilenebilir. Öte yandan, su eklenmesinin ve daha yüksek bir pH değerinin hem hidrolizi hem de yoğunlaşma reaksiyonlarını hızlandırabileceği bilinmektedir [175].



Şekil 2.8. MPS Kaplamanın Yüzey ile Etkileşimi



Şekil 2.9. MPS Kaplama Sonrası Kaplamanın a) Kesit Alanı ve b) Üstten Görünüşü c) Optimum Koşullardaki Kaplamanın Sinyal Gürültüsü Üzerindeki Etkisi ve d) Gürültü Değişimi [175]

Şekil 2.9. da görüldüğü üzere, PMN-PT piezoelektrik sensörün insülasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, % 0.1 MPS + % 0.5 deiyonize su içeren pH=9.0 da bulunan etanol solüsyonunun, sensör immobilizasyonu ve tespit için uygun bir yüzey kimyası ve morfolojisi ortaya koyduğunu ve sinyal gürültüsünü 1000 kat oranında azalttığını ortaya koymuşlardır [175].

2.3.1. MPS Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması

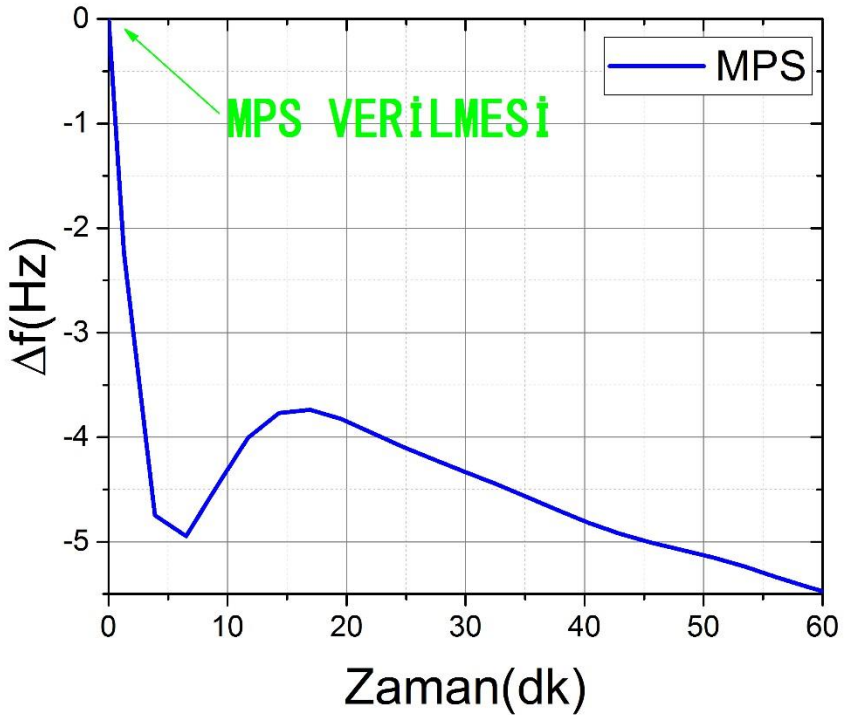
Büyük bir beherde 50 µl Saf Su + 2.34 mg KOH çözüldü. Üzerine 10 ml Etanol eklenerek ve pH bilgisi ölçüldü. Sonra üzerine 10 µl MPS eklendi ve pH tekrar ölçüldü. Solüsyonun pH bilgisi 9 olduğunda solüsyon kullanım için hazır duruma getirilmiş oldu. MPS muhafaza koşulları 2-8°C olduğu için solüsyon hazırlama işlemi sırasında oyalanmamaya dikkat edildi [175].

2.3.2. MPS Kaplama İşleminin Yapılması

Temizliği ve montajı yapılan sisteme, solüsyonun hortum bağlantıları yapıldı. Bilgisayarı ve gerekli yazılımı hazır hale getirdikten sonra sistemdeki pompa yardımıyla hortumlardaki hava alındı. Solüsyonun, sensör girişine vardığından emin olunca, pompanın hız ayarı 100 µl/sn olacak şekilde ayarlandı. QCM cihazı ile ölçüm işlemine başlanıldı. 60 dk boyunca sensör yüzeyinin modifikasyonu kapalı döngü ile sağlandı [175].

MPS Kaplama işleminin ardından sensör yüzeyine 10 dk Etanol yıkama yapıldıktan sonra yine sensör yüzeyine 10 dk deiyonize su (DIW) ile yıkama işlemi uygulandı [175].

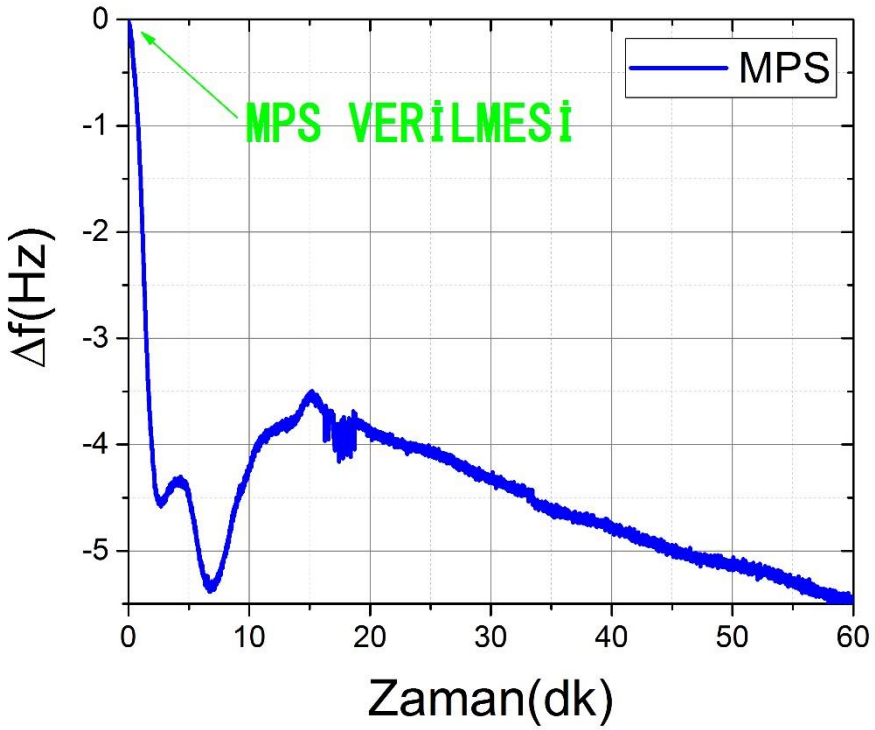
2.3.3. MPS Kaplama İşleminin QCM İle Takibi



Şekil 2.10. MPS Kaplama İşleminin QCM İle Takibi

Yukarıdaki grafikte görüldüğü üzere (0.0) noktasında sensör yüzeyi ilk modifikasyon işlemi olan MPS kimyasalına maruz bırakılmıştır. 60 dakikada 5.50 Hz'lik bir frekans kayması gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında sensör yüzeyinin MPS ile kaplama işleminin başarı ile gerçekleştiğini söyleyebilmek mümkün olmaktadır. Bu veriler, literatürde yapılan çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir [175].

Bu grafiğin bu şekilde gösterilebilmesi için ham verilerden oluşan veri setine data fitting (eğri uydurma) işlemi uygulanmıştır. Eğri uydurma işlemi uygulanmadan önceki grafik aşağıdadır.



Şekil 2.11. MPS Eğri Uydurma Uygulanmadan Önceki Grafik

Eğri uydurma işlemi için 9. dereceden polinom kullanılmıştır. Data fitting, eğri uydurma olarak türkçeleştirilmiştir. Ve verilen noktalardan en az hata ile geçebilecek eğrinin uydurulması işlemidir. Bu işlemler MATLAB programında yapılmıştır.

$z = (x - mu)/sigma$, mu = 28.896, sigma = 16.686,

p_1 = -0.067083 p_2 = 0.25551 p_3 = -0.011774 p_4 = -0.87848 p_5 = 0.67186

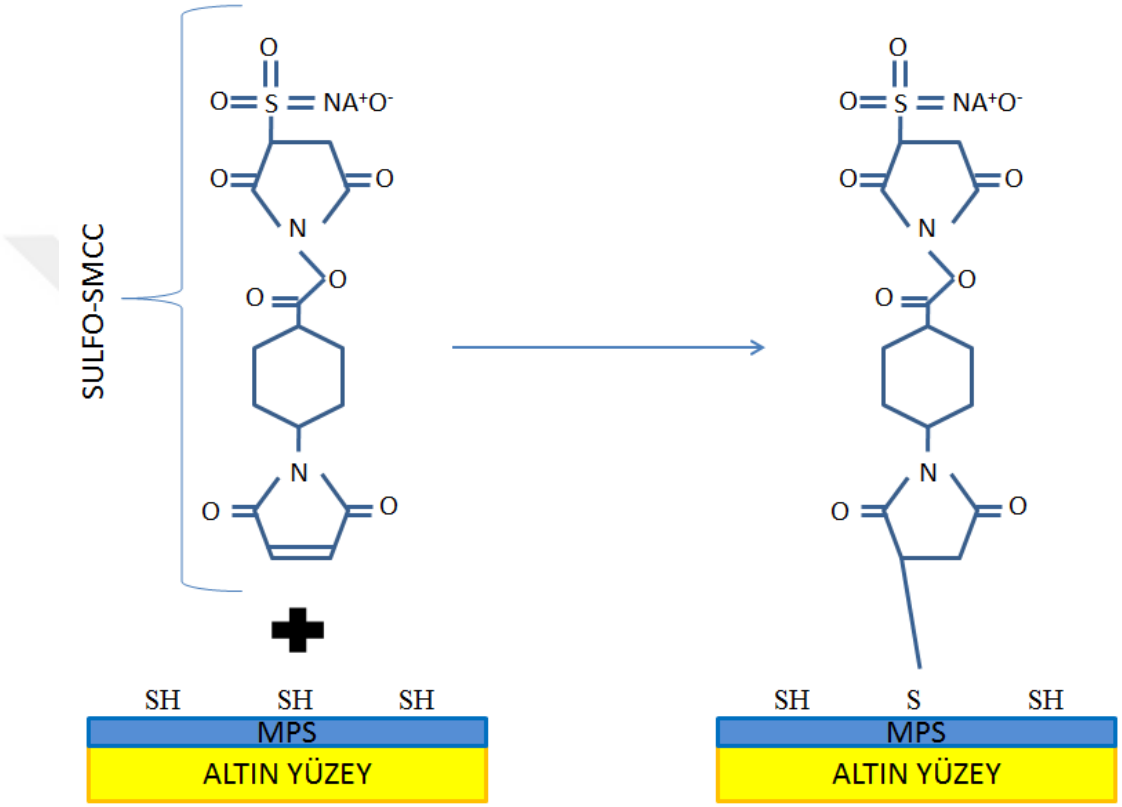
p_6 = 0.56698 p_7 = -0.41708 p_8 = -0.080284 p_9 = -0.76373 p_{10} = -463.19

$y = p_1z^9 + p_2z^8 + p_3z^7 + p_4z^6 + p_5z^5 + p_6z^4 + p_7z^3 + p_8z^2 + p_9z + p^{10}$, formülü uygulanmıştır.

Bu işlemler sonucunda grafikteki yani verilerdeki outlierlar (aykırı veri) ve istenmeyen verilerin (gürültü) bastırılması sonucu, gürültüsüz, aykırı veriler barındırmayan ve verileri en az hata ile kapsayan bir eğri uydurulmuştur.

2.4. SULFO-SMCC Kaplama İşlemi

Sulfo-SMCC'nin $H_2C_2(CO)_2NH$ grubunun sensör yüzeyindeki MPS kaynaklı tiyol grubu ile stabil bir C-S-CO-C kovalent bağı oluşturup sensör yüzeyine bağlanması amaçlanmıştır [175].



Şekil 2.12. Sulfo-SMCC'nin MPS ile Etkileşimi

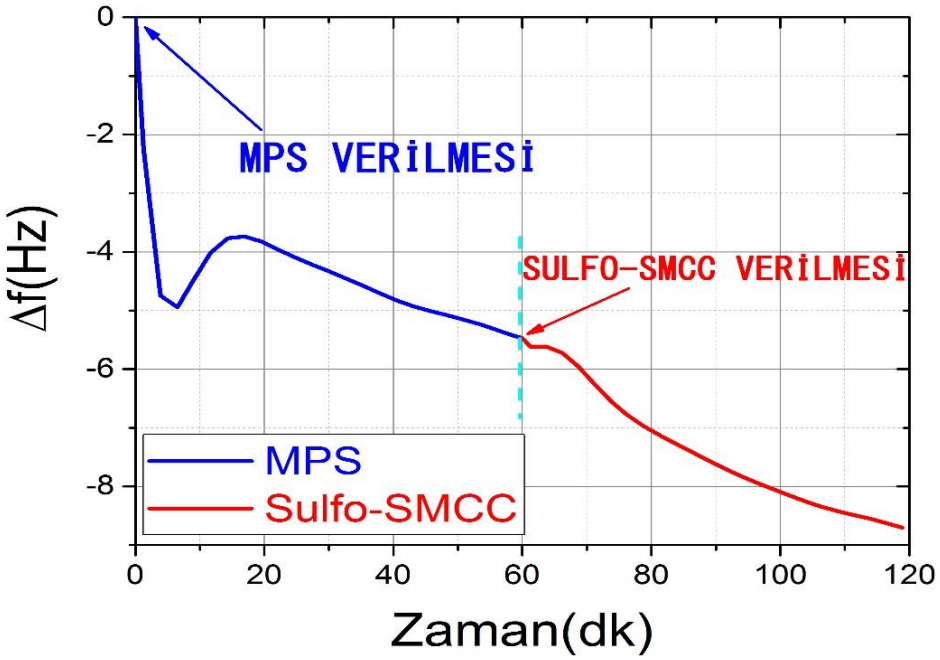
2.4.1. SULFO-SMCC Solüsyonunun Hazırlanması

Bunun için ilk olarak 1 ml DIW + 1 mg Sulfo-SMCC karışımı elde edildi. Bu karışım 30 sn boyunca vorteks edildikten sonra 5 dk ultrasonik yıkayıcıda çözüldü [175].

2.4.2. SULFO-SMCC Kaplama İşleminin Uygulanması

60 dk sürede sensör yüzeyine kapalı döngü ile hız ayarı 100 µl/sn olacak biçimde Sulfo-SMCC verildi [175].

2.4.3. SULFO-SMCC Kaplama İşleminin QCM İle Takibi



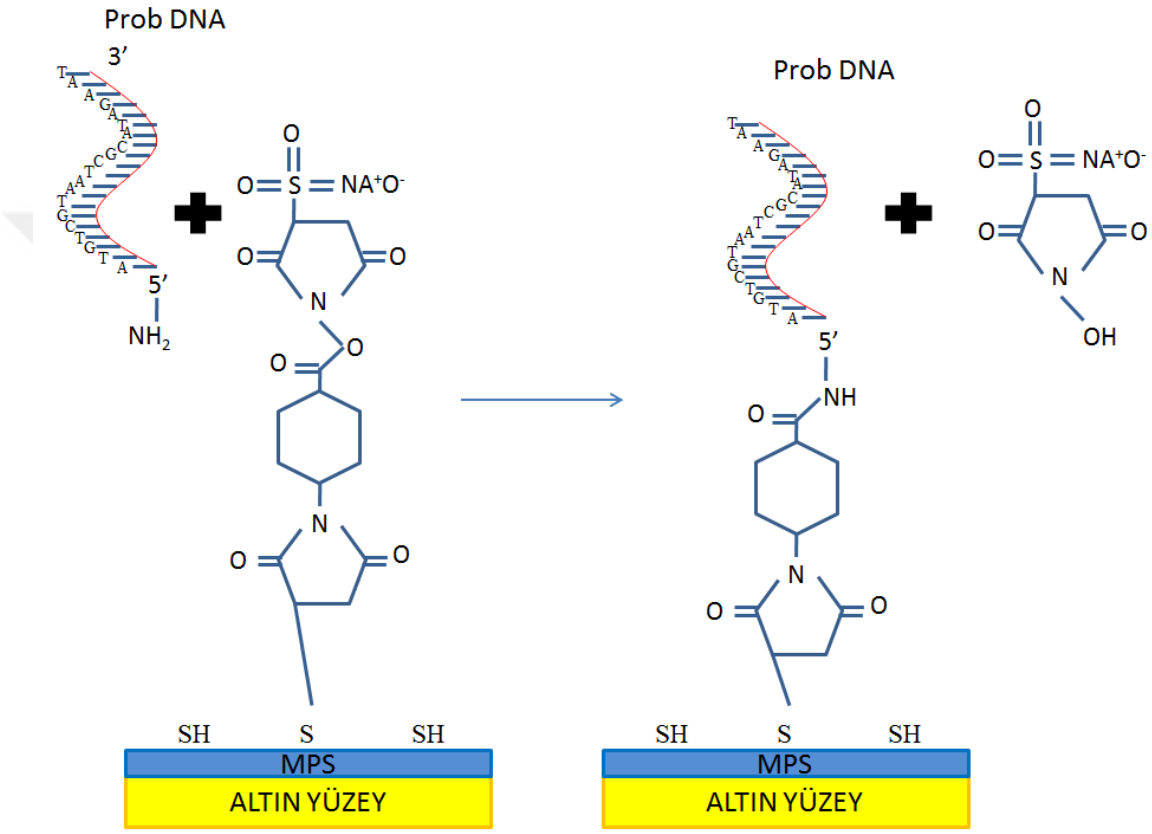
Şekil 2.13. Sulfo-SMCC Kaplama İşleminin QCM İle Takibi

Yukarıdaki grafikte işaretli kısımda sensör yüzeyine Sulfo-SMCC kimyasali verilmeye başlanmıştır. 60 dk'lık işlem süresi sonunda 3.20 Hz'lik bir frekans kayması görülmüştür. Sulfo-SMCC'nin kullanılma amacı Sulfo-SMCC'nin $H_2C_2(CO)_2NH$ grubunun sensör yüzeyindeki MPS kaynaklı tiyol grubu ile stabil bir C-S-CO-C kovalent bağı oluşturup sensör yüzeyine bağlanması olarak ifade edilmişti [175]. Bu grafiği yorumlayacak olursak ilk olarak istenilen bağlantıların gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Ayrıca MPS kaplama işleminin doğrulamasını da sağlamış oluyoruz. Çünkü MPS kaplama işinde sıkıntı olursa Sulfo-SMCC'nin yüzeyde tutunacağı bağlantı olmayacağından bu şekilde bir frekans kayması gözlenememesi yüksek olasılıkta beklenen bir durum olacaktır.

MPS kaplama işleminde bahsedildiği üzere Sulfo-SMCC kaplama işleminde de bu grafiğin elde edilebilmesi için 9. dereceden eğri uydurma işlemleri yapılmış olup, uygun değerler ile MPS kısmında izah edilen işlemler yapılınca veriler gürültüden ve aykırı noktalardan arındırılınca arzu edilen grafikler ortaya çıkarılmıştır.

2.5. pDNA İmmobilizasyonu

Amin (NH_2) ile 5' dan aktive edilmiş 20 nükleotid uzunluğundaki sentetik pDNA'nın, Sulfo-SMCC'nin NHS esteri ile tepkimeye girmesi ve ardından stabil amit bağı ile kovalent olarak bağlanması amaçlanmıştır [175].



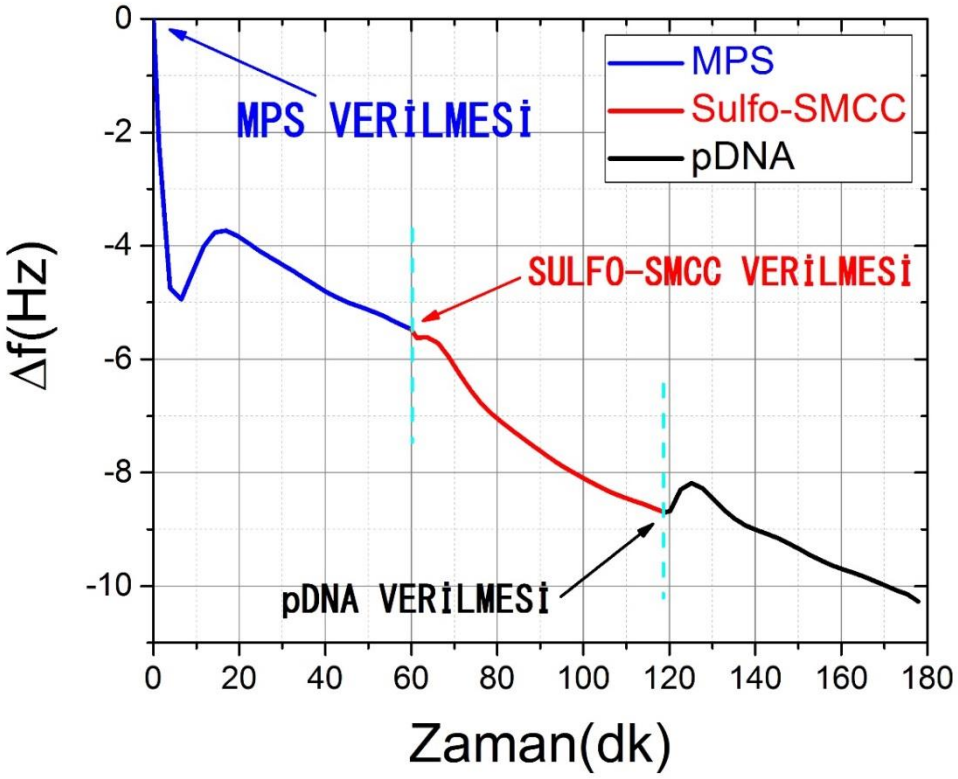
Şekil 2.14. pDNA'nın Sulfo-SMCC İle Etkileşimi

2.5.1. pDNA Solüsyonunun Hazırlanması

Stok olarak çalışılan yani 1.5 ml ile açılan pDNA tüpü vorteks edildi. pDNA tüpünden 37.5 µl çekildi ardından 1 ml PBS içerisine, çekilen pDNA ilave edildikten sonra karışım tekrar vorteks edildi. Bu şekilde planlanan pDNA yani 10^{12} kopya/ml miktarı elde edildi.

2.5.2. pDNA İmmobilizasyon İşleminin Uygulanması

Elde edilen solüsyonda homojenitenin bozulmaması için zaman kaybı yapmadan hızlı bir biçimde işleme başlandı. Solüsyon 60 dk süreyle sensör yüzeyine 100 µl/sn hız ayarında kapalı döngü ile uygulandı.



Şekil 2.15. pDNA İmmobilizasyon İşleminin QCM ile Takibi

2.5.3. pDNA İmmobilizasyonun İşleminin QCM İle Takibi

Yukarıdaki grafik analiz edildiğinde MPS kaplama ve Sulfo-SMCC kaplama işlemleri yüzeye uygulandıktan sonra 60 dakika süre boyunca pDNA verilmektedir. 60 dakika sonunda 1.60 Hz'lik bir frekans kayması olduğu görülmektedir.

Amin (NH_2) ile 5' dan aktive edilmiş 20 nükleotid uzunluğundaki sentetik pDNA'nın, Sulfo-SMCC'nin NHS esteri ile tepkimeye girdiği ve ardından stabil amit bağı ile kovalent olarak bağlandığı, veriler ışığında doğrulanmaktadır.

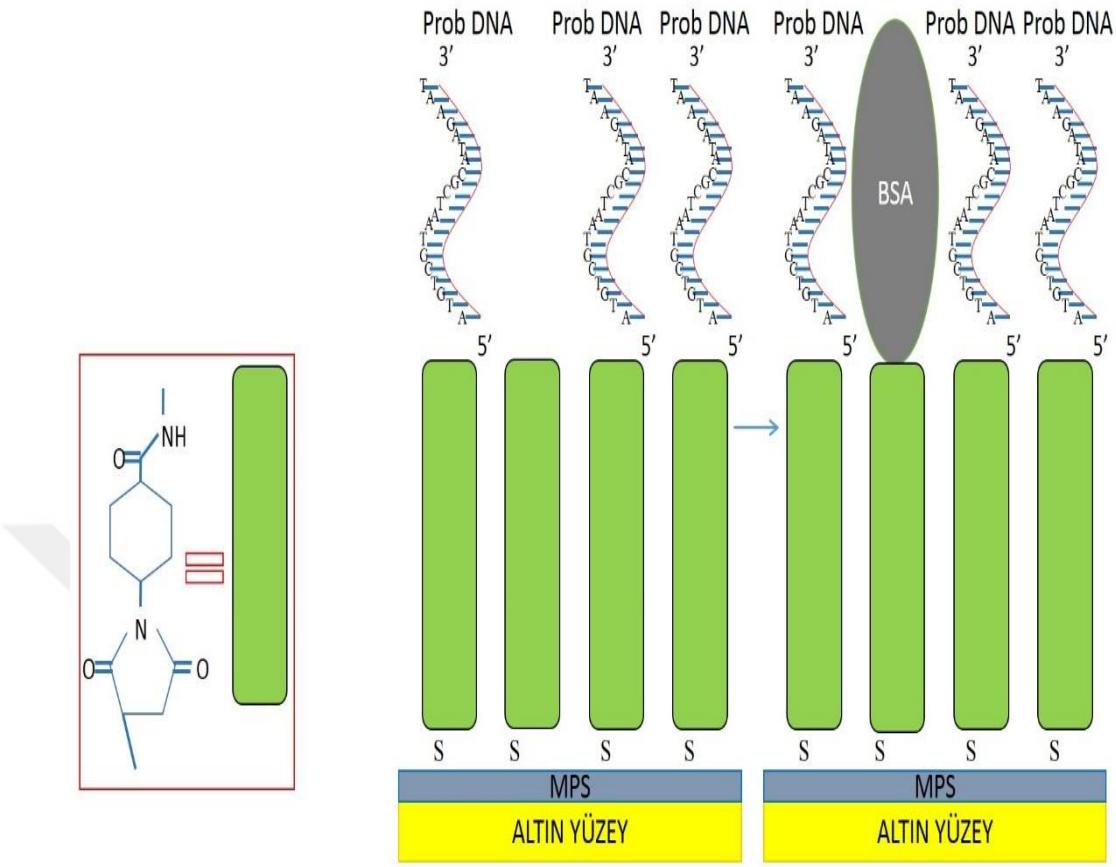
2.6. Model Tükürük

Simüle yani model tükürük kullanılmasında birkaç amaç hedeflenmiştir. Bunlardan birincisi simüle tükürük ortamında hedeflenen amaçlara ulaşıp ulaşılamayacağının tespit edilmesidir. İkincisi ise simüle olmayan ortamlarda çalışırken etik kurul izinlerinin alınması gibi bir işlem yükünün çalışmanın seyrini yavaşlatmamasıdır. Çalışmamızda model tükürüğünün, insan tükürüğüne benzerliğini artırabilmek adına ciddi işlemler yapılmıştır.

Bunlardan bazıları ifade edilecek olursa PBS olarak kullandığımız ve temelde insan tükürüğünü model alan bu iyonik kimyasalın temini esnasında insan tükürüğünde bulunan minerallerden magnezyum ve kalsiyum ilave olarak ekletilmiştir. Yine benzer amaca uygun olarak insan tükürüğünde bulunan proteinler çalışmadan göz ardı edilmeyip protein olarak %5 oranında büyükbaş serum albümini (BSA) kullanılmıştır [175]. Bütün bu yapılan işlemlerin etkileri incelenmiştir.

2.7. BSA Bloklama

İnsan tükürüğünde %0.02 ila %0.03 aralığında protein bulunmaktadır. Bu proteinlerin herhangi bir spesifik olmayan bağlantıya sebebiyet vermemesi amacıyla pDNA immobilizasyonu sonrasında sensör yüzeyi PBS içerisindeki %5 oranında büyükbaş serum albüminine (Bovine Serum Albümin (BSA)) maruz bırakılmıştır. Böylece yüzey %5 oranında proteine doyurulmuştur [175].



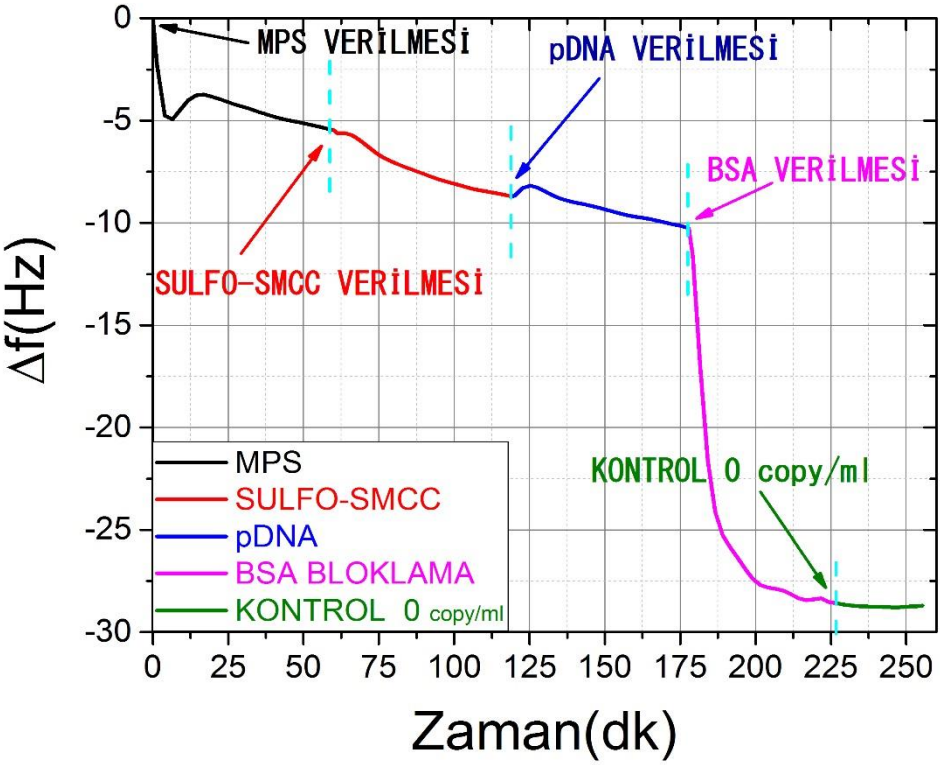
Şekil 2.16. BSA'nın Yüzey İle Etkileşimi

2.7.1. BSA Solüsyonunun Hazırlanması

PBS içerisinde %5'lik BSA olması için 10 ml PBS + 0.5 mg BSA solüsyonu hassas terazi kullanılarak hazırlandı.

2.7.2. BSA Bloklama İşleminin Uygulanması

10 ml PBS + 0.5 mg BSA solüsyonu 30 sn süreyle vorteks edildi. Homojenitesi sağlanan solüsyon 30 dk boyunca sensör yüzeyine 100 µl/sn hız ayarında açık döngü ile uygulandı.



Şekil 2.17. BSA Bloklama İşleminin QCM ile Takibi

2.7.3. BSA Bloklama İşleminin QCM İle Takibi

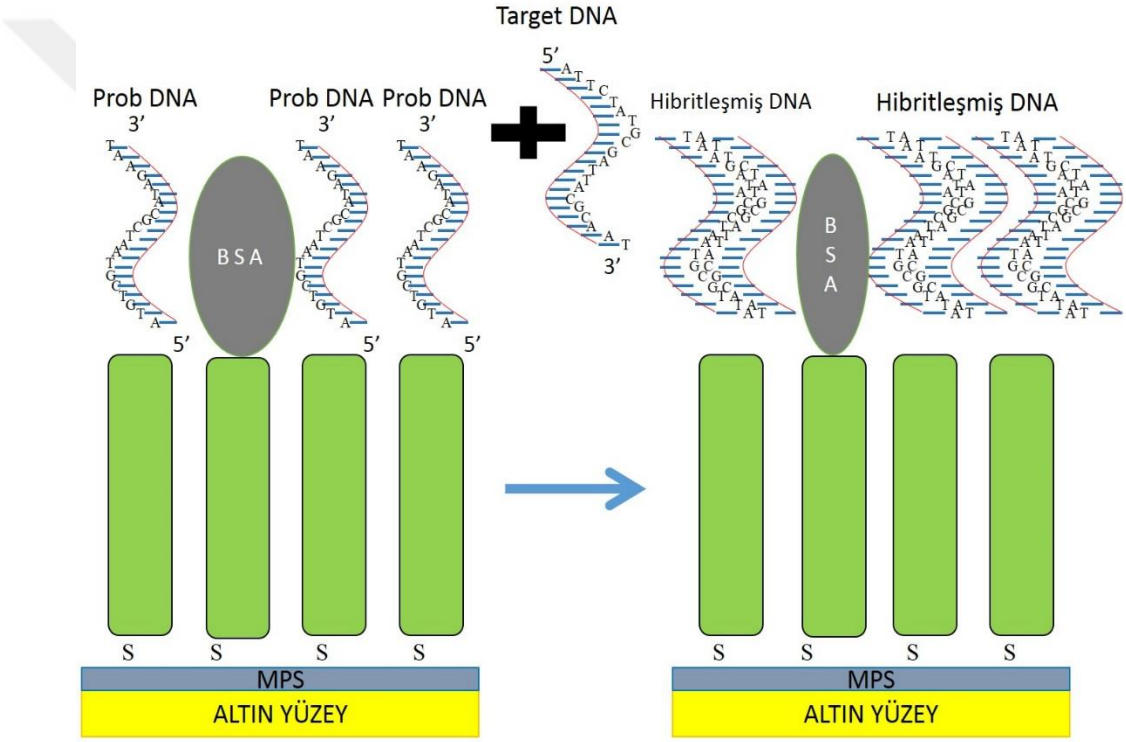
Yukarıdaki grafikte; insan tükürüğünde bulunan proteinlerin herhangi bir spesifik olmayan bağlantıya sebebiyet vermemesi amacıyla pDNA immobilizasyonu sonrasında sensör yüzeyi PBS içerisindeki %5 oranında büyükbaş serum albüminine (Bovine Serum Albümin (BSA)) maruz bırakılacak böylece yüzey %5 oranında proteine doyurulduğu durum gözlenmektedir. Büyükbaş serum albümini diğer kimyasallara nazaran daha ağır olduğundan ötürü frekans ekseninde ciddi etkilere sebebiyet vermektedir. 50 dakikalık işlem süresi sonucunda 18.5 Hz'lik bir frekans kayması izlenmiştir.

2.8. tDNA Tayini

tDNA'nın özellikleri 20 nükleotidlik olması ve pDNA ile tamamlayıcı niteliğe sahip olmasıdır. Bu özelliklerden dolayı sensör yüzeyine yukarıdaki bahsedilen işlemler ile immobolize edilen pDNA ile hibridizasyon yaptığını biz bilim insanlarına tayin edebilmek için 2 yöntem sunulabilmektedir. Bunlardan birincisi sensörümüzün sürekli

ölçüm yaptığı ağırlığın artması neticesinde frekans bilgisinde düşüş eğiliminin takip edilmesi, ikincisi ise MPS kaplama ile başladığımız bu mimarideki bu yerçekimine karşı yapılan düzensizliğin, kurulan hidrojen bağları gibi benzeri bağlar ile düzenlilik yönünde ölçümlerinin alınması. Bunu gökdelenlerin zirve noktasının rüzgar etkisi ile birkaç metre yatay eksende esnemesi durumuna benzetebiliriz. Ölçüm sistemimiz bu işleme dissipation (enerji kaybı) adını vermektedir.

Bu tezde ve yapılan deney çalışmasında ağırlık üzerinde frekans bilgisi ile hareket edilmiştir ve enerji kaybı faktörü doğrulama amaçlı kontrol edilmiştir.



Şekil 2.18. tDNA ile pDNA Arasındaki Etkileşim (Hibritleşme)

2.8.1. tDNA Solüsyonunun Hazırlanması

Deneyler için kontrol amaçlı olarak sıfır "0" (kopya/ml) ve 3 farklı konsantrasyonda sırası ile 10^8 (kopya/ml), 10^{10} (kopya/ml) ve 10^{13} (kopya/ml) olacak biçimde ve her konsantrasyon için en az 3 deney yaparak, aldığımız ölçümlerin güvenilirliğinden emin olmak kurgulanmıştır. Kurguya uygun hareket edebilmek adına sentetik olarak temin edilen tDNA'nın özellikleri ile yapacağımız deney sayısı ve tDNA gereksinimleri

matematiksel işlemler ile hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar ile optimum miktarda tDNA'lar ile çalışabilmek hedeflenmiştir.

Öncelikle tDNA'nın kopya sayısı $(1017.38x10)^{14}$ adet. Bunu 1.5 ml DIW ile açtığımız zaman stok solüsyonu elde edildi. Stok solüsyonunda $(678.25x10)^{14}$ kopya/ml var ve bu solüsyon 684337.3 ng ağırlığa sahip.

Bu stok solüsyonundan 10^8 kopya/ml konsantrasyonunu elde etmek için;

Sensöre, plana göre solüsyonlar 10 ml'lik tüpte verileceği için 10^9 kopya olacak şekilde hazırlandı. 10^9 kopya 0.01 ng ağırlığında olmalı. 684337.3 ng 1 ml'de var ise 0.01 ng 0.014 nl'de olacaktır. 10 ml PBS + 0.5 mg BSA + 0.014 nl tDNA solüsyonu hazırlandı.

Stok solüsyonundan 10^{10} kopya/ml konsantrasyonunu elde etmek için;

Sensöre, plana göre solüsyonlar 10 ml'lik tüpte verileceği için 10^{11} kopya olacak şekilde hazırlandı. 10^{11} kopya 1.009 ng ağırlığında olmalı. 684337.3 ng 1 ml'de var ise 1.008975 ng 1.474 nl'de olacaktır. 10 ml PBS + 0.5 mg BSA + 1.474 nl tDNA solüsyonu hazırlandı.

Stok solüsyonundan 10^{13} kopya/ml konsantrasyonunu elde etmek için;

Sensöre, yapılan plana göre 10 ml'lik tüpte verileceği için 10^{14} kopya olacak şekilde hazırlandı. 10^{14} kopya 1008.975 ng ağırlığında olmalı. 684337.3 ng 1 ml'de var ise 1008.975 ng 1.474 µl'de olacaktır. 10 ml PBS + 0.5 mg BSA + 1.474 µl tDNA solüsyonu hazırlandı.

2.8.2. tDNA Solüsyonlarının Uygulanması

Yukarıda nasıl elde edileceği anlatılan konsantrasyonlardan 10^8 kopya/ml özellikteki tDNA, sensör yüzeyine kapalı döngü ile hız ayarı 100 µl/sn olacak biçimde uygulandı.

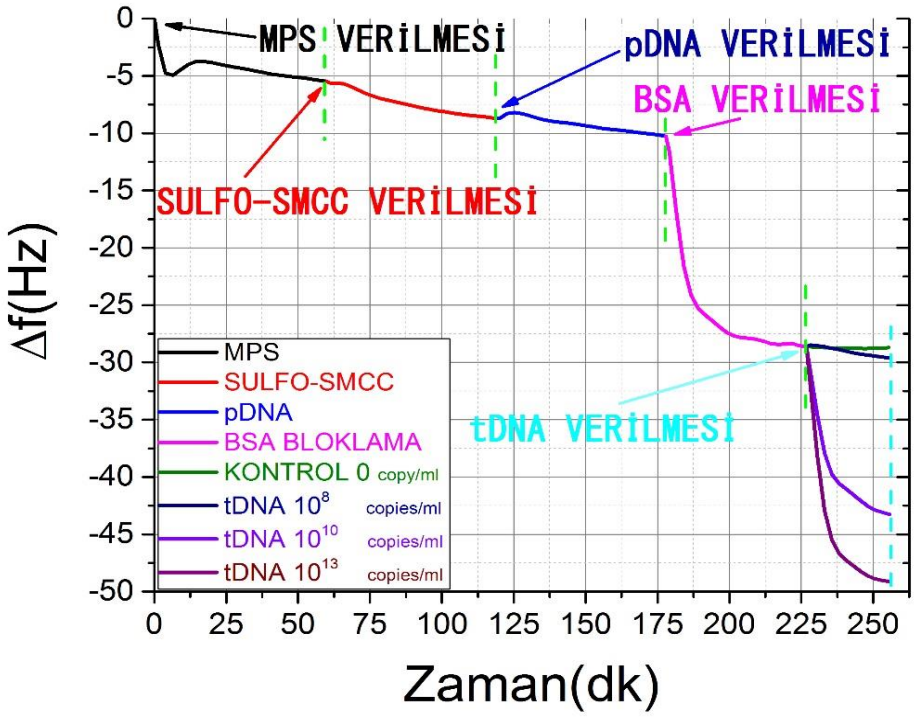
Yukarıda nasıl elde edileceği anlatılan konsantrasyonlardan 10^{10} kopya/ml özellikteki tDNA, sensör yüzeyine kapalı döngü ile hız ayarı 100 µl/sn olacak biçimde uygulandı.

Yukarıda nasıl elde edileceği anlatılan konsantrasyonlardan 10^{13} kopya/ml özellikteki tDNA, sensör yüzeyine kapalı döngü ile hız ayarı 100 µl/sn olacak biçimde uygulandı.

Farklı konsantrasyonlarda tDNA'lar uygulayabilmek için hibridize olan bağları eriterek kopmasını sağlamak gerekmektedir. Deneyde kullanılan sentetik DNA'ların teknik özelliklerinden yola çıkarak hücrenin sıcaklığını 60°C'ye çıkardığımızda dehibridize olacağını kurgulandı. Dolayısıyla aşağıdaki şekilde işlemler uygulandı.

Mevcut tDNA doyuruldu. Mevcut tDNA doyunca, Sıcaklık değeri 60°C olarak set edildi. Açık döngüde PBS verecek biçimde bağlantılar yapıldı ve 100ul/s hız ayarında sıcaklık değeri 60°C'ye kadar çıkarıldı. Sıcaklık 60°C olduğunda 10 dk beklenildi. Sonrasında sıcaklık değeri 20°C olacak şekilde set edildi. Sıcaklık değeri 20°C olduğunda grafiğin stabil olması beklendi. Sonrasında istenilen konsantrasyondaki tDNA 100 µl/sn hız ayarı ile verildi.

2.8.3. tDNA Hibridizasyon İşleminin QCM İle Takibi



Şekil 2.19. tDNA Hibridizasyonunun QCM İle Takibi

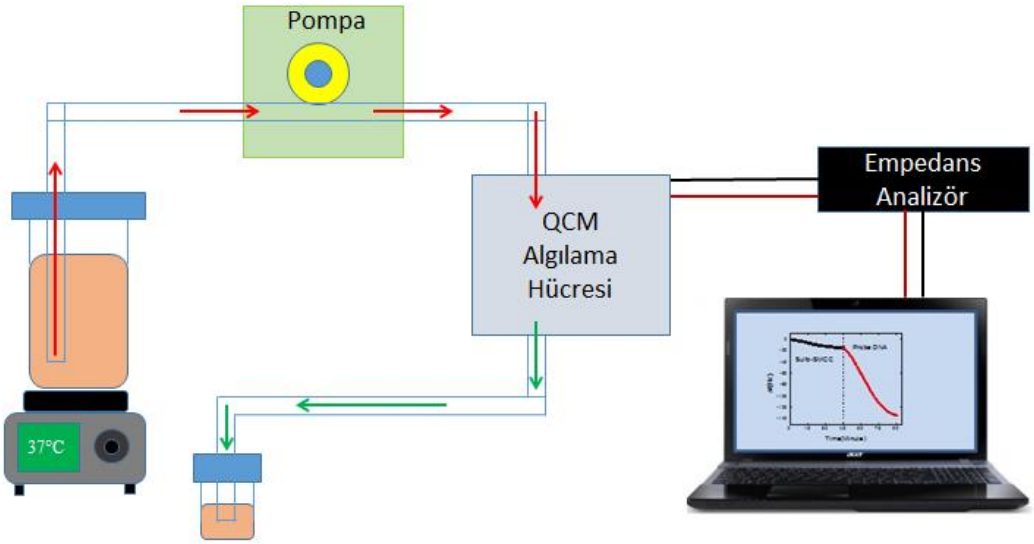
Şekil 2.15 de görüldüğü üzere prosesin 225. dakikasında tDNA verilmeye başlanmıştır. tDNA verilmeden önce sensörün yüzeyi BSA'ya doyurulmuştur. Kontrol amacıyla mililitrede 0 adet tDNA kopyası bulunan yani hiç tDNA bulunmayan solüsyonda

frekans kaymasının seyrinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Matematiksel verileri analiz edecek olursak 29 dakika işlem süresince 0.10 Hz'lik bir kayma görülmüştür. Sırasıyla yapılan bir takım işlemlerin ardından mililitrede 10^8 kopya bulunan tDNA verildiğinde kontrol grubuna nazaran önemli ölçüde bir frekans kayması tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla benzer sürede 1.05 Hz rezonans frekans kayması gözlenmiştir. Devam eden işlemlerde mililitrede 10^{10} adet tDNA kopyası uygulandığında 29 dakikada 14.70 Hz rezonans frekansta kayma izlenmiştir. Sonrasında mililitrede 10^{13} adet tDNA kopyası verildiğinde ise benzer sürede sensörün rezonans frekansında 20.50 Hz'lik frekans kayması görülmüştür. Buradaki uygulanan kopya sayısındaki artış ile frekans bilgisindeki değişim oranındaki artışın mantıklı olduğu bilinmektedir [175].

2.9. Sıcaklık tDNA Deneyi

İnsan vücudunun sıcaklığı 37°C'dir. Dolayısıyla DNA tespiti işlemlerinin insan vücudunda yapıldığında ne derece etkili olacağını deneyler yaparak araştırıldı.

Ölçümlerde kullandığımız QCM cihazımızın özelliklerinden birisi de hücreyi 60°C'ye kadar ısıtabiliyor olmasıdır. Bu özellikten faydalanarak hücre sabit 37°C'ye ayarlandı. Oda şartlarından gelen numunenin hücre içinde direk olarak 37°C ile karşılaşmaması için deney sistemi şartlara adapte edildi. Numune gönderim tüpü bir beher içerisine konuldu ve beherin içerisine DIW eklendi. Isıtıcı vasıtasıyla DIW ısıtıldı ve ısınan DIW'ın numuneyi 37°C'ye getirmesi sağlandı. Bu süreçte kontrol amaçlı IR termometre kullanılarak sistemin hassas sıcaklık ayarı sağlandı. Nihai olarak 37°C'de bulunan numune, peristaltik pompa aracılığı ile 37°C'de bulunan hücreye DNA tespiti amacıyla gönderildi. Nihai olarak 28-29 dakikalık işlem süresince 0.60 Hz'lik bir frekans kayması gözlenmiştir.

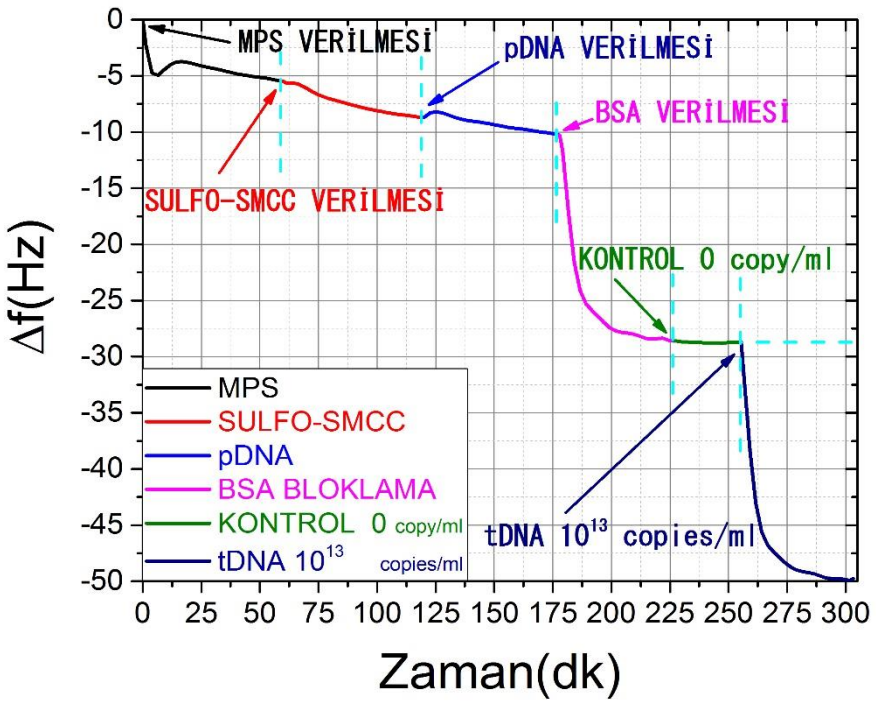


Şekil 2.20. Sıcaklık tDNA Deneyleri İçin Dizayn Edilen Açık Döngü Sistem Şematiği

3. BÖLÜM

BULGULAR VE SONUÇLAR

3.1. Deney Aşamalarının Frekans Analizi



Şekil 3.1. Deney Aşamalarının Frekans Değişimi

Deneyin birinci basamağı yüzeyin MPS ile kaplanması işlemidir. Bu işlemde literatürde daha önceki yapılan çalışmalara benzer sonuçlar görülmüştür. Bunlar sensör immobilizasyonu ve tespit için uygun bir yüzey kimyası ve morfolojisi ortaya koyduğunu ve sinyal gürültüsünü 1000 kat oranında azalttığını ortaya koymuşlardır [175].

Yapılan deneylerde 60 dakikalık MPS kaplama işlemi süresi sonucunda sensörün rezonans frekansında 5.50 Hz'lik bir kayma izlendi. Bu analiz verileri göz önüne alındığında sensör yüzeyinin MPS solüsyonu ile sıkıntısız bir biçimde tepkimeye girerek yüzeyin MPS solüsyonu ile kaplandığı ifade edilebilir.

İkinci işlem olarak, Sulfo-SMCC kaplama yapıldı. MPS kaplama işleminin süresi kadar süren Sulfo-SMCC kaplama işlemi sonucunda sistemin rezonans frekansında 3.20 Hz frekans kayması gözlemlendi. Bunu, Sulfo-SMCC'nin $H_2C_2(CO)_2NH$ grubunun sensör yüzeyindeki MPS kaynaklı tiyol grubu ile stabil bir C-S-CO-C kovalent bağı oluşturup sensör yüzeyine bağlanması olarak ifade edebiliriz. Dolayısıyla ikinci işlemin başarılı olup olmadığını sayısal değerlerden analiz edebiliyoruz. Ayrıca her yapılan işlem bir önceki işlem ile direk olarak ilişkili olduğundan dolayı yapılan her işlem bir önceki işlemin doğrulaması niteliğinde olmaktadır.

Üçüncü işlem olarak, pDNA immobilizasyonu yapıldı. pDNA immobilizasyonu önceki işlemler gibi 60 dakika süre ile yapıldı. Bu süre sonucunda sistemin rezonans frekansında 1.60 Hz'lik frekans kayması görüldü. Bu demek oluyor ki, özel olarak tedarik edilen Amin (NH_2) ile 5' dan aktive edilmiş 20 nükleotid uzunluğundaki sentetik pDNA'nın, Sulfo-SMCC'nin NHS esteri ile tepkimeye girdiği ve ardından stabil amit bağı ile kovalent bağ kuruldu. Yine benzer şekilde pDNA işlemi sonucunda olumlu veriler alınması Sulfo-SMCC kaplama işleminin başarı ile yapıldığını dolayısıyla yüzeyde NHS esterinin bulunduğunu doğruluyor.

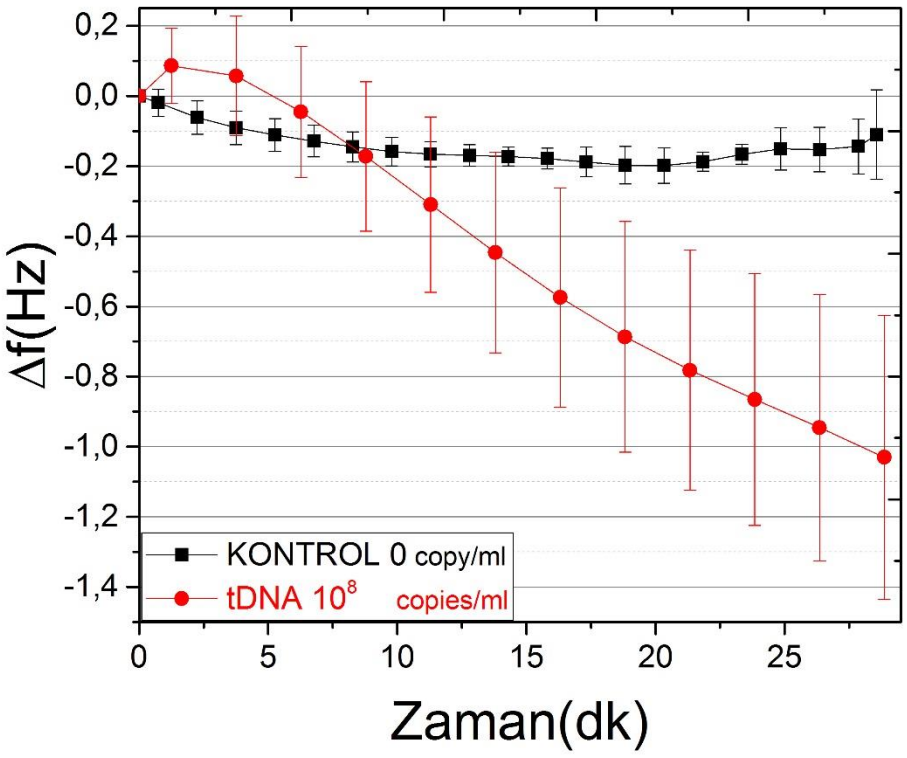
Dördüncü işlem olarak, BSA bloklama işlemi yapıldı. Sistem ortalama 50 dakika işlem süresi sonucunda doyumu ulaştığı için işlem süresi 50 dakika olarak uygulandı. Ve işlem sonucunda 18.5 Hz kadar sistemin rezonans frekansında frekans kayması görüldü. Bu işlemde sistemin rezonans frekansındaki değişimin önceki işlemlerden ve sonraki yapılacak işlemlerden daha fazla olması bir şeylerin hatalı yapıldığını akla getirebilir. Fakat işin aslı, BSA moleküllerinin deneylerde kullanılan diğer bütün moleküllerden çok daha fazla molekül ağırlığına sahip olmasıdır. BSA'nın kullanım amacı insan tükürüğünde bulunan proteinlerin herhangi bir spesifik olmayan bağlantıya sebebiyet vermemesidir. Yani simüle deney ortamı gerçek insan tükürüğü gibi gerçekçi yapılmaya çalışılmıştır. BSA bloklama işleminin başarılı olması bundan önceki adımların tamamının düzgün bir biçimde uygulandığını kanıtlar niteliktedir.

Beşinci işlem olarak, negatif kontrol amacıyla içerisinde tDNA bulunmayan solüsyon sisteme uygulandı. 29 dakikalık işlem süresi sonucunda sistemin rezonans frekansında 0.10 Hz bir frekans kayması görüldü. Burada elde edilen 0.10 Hz'lik frekans kaymasının kaynağı gürültü olmayıp PBS içerisindeki kalsiyum ve magnezyum gibi minerallerin sensör yüzeyi ile etkileşime girmesi sonucunda oluşmuştur.

Altıncı işlem olarak, içerisinde 10^{13} adet tDNA kopyası bulunan solüsyon sisteme uygulandı. Negatif kontrol ile benzer sürede sistemin rezonans frekansında 20.50 Hz'lik bir frekans kayması izlendi. Bu planlanan deneydeki en yüksek konsantrasyon olup deneyin amacına ulaştığını gösterir nitelikteki bir sonuç olmuştur.

3.2. Sistemin Hassasiyet Analizi

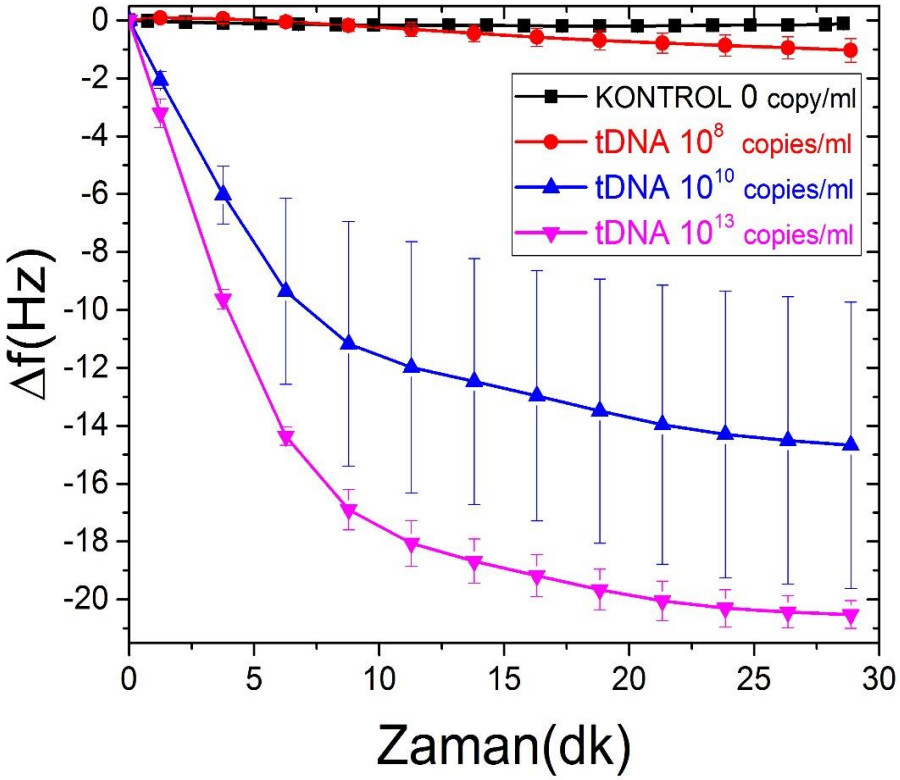
Bu tez çalışmasında sisteme uygulanan en düşük tDNA konsantrasyonu sonucu elde edilen frekans değişimi 1.05 Hz olmuştur. Sisteme tDNA bulunmayan solüsyon uygulanması sonucunda ise 0.10 Hz bir frekans değişimi görüldü.



Şekil 3.2. Sistemin Hassasiyet Analizi

Dolayısıyla sistemin SNR değeri 10.5 olarak hesaplanmaktadır. Literatürde bu değerin en az 3 olduğu çalışmalar başarılı olarak kabul görmektedir [176-178]. Bütün yapılan deneyler en az 3 tekrar ve standart sapmalar göz önünde tutularak yapılmıştır. Dolayısıyla başarı kriterinin 3 katından daha fazla bir başarı ile deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.3. tDNA Hibridizasyonlarının Mukayesesi



Şekil 3.3. Farklı tDNA Konsantrasyonlarının Frekans Analizi

Şekil 3.3. de sensöre farklı konsantrasyonlarda tDNA solüsyonlarının uygulanması sonucunda ortaya çıkan sistemin rezonans frekansındaki değişimler gösterilmektedir.

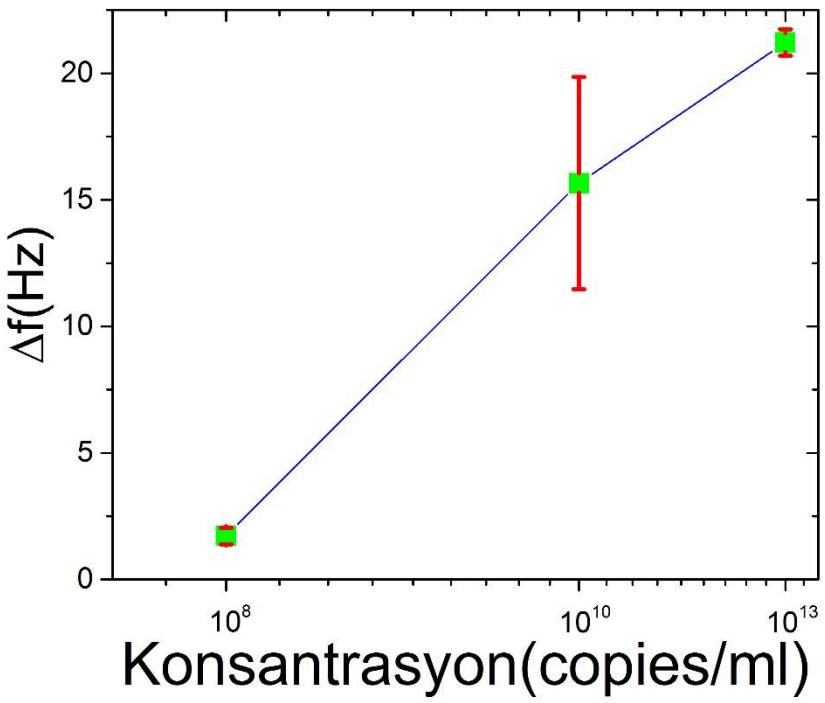
İçerisinde tDNA kopyası bulunmayan solüsyon ile yapılan negatif kontrol deneyinde 0.10 Hz'lik frekans değişimi görülmektedir. Buradaki değişim verilen solüsyonda bulunan kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) minerallerinin yüzeyde tutunmasından kaynaklanmaktadır.

Şekil 3.3. de kırmızı renk ile gösterilen kısımda, içerisinde mililitrede 10^8 adet tDNA kopyası bulunan solüsyon uygulandığında 1.05 Hz'lik frekans kayması tespit edildi. Bu

deneyde yapılan işlemlerin sonucu olarak ortaya çıkan değişimin, negatif kontrol deneyindeki değişimden daha büyük olması yapılan işin mantık çerçevesinde olduğunun kanıtı niteliğindedir.

Şekil 3.3. de mavi renk ile ifade edilen kısımda, mililitrede 10^{10} adet tDNA kopyası ihtiva eden solüsyon uygulandığında sistemin rezonans frekansında 14.70 Hz 'lik bir frekans değişimi gözlenmiştir. Bu değişimin muhteviyatında 10^{8} kopya/ml tDNA bulunan solüsyon uygulandığındaki frekans değişimine nazaran sayısal olarak daha büyük olması yapılan deneyleri doğrulamaktadır.

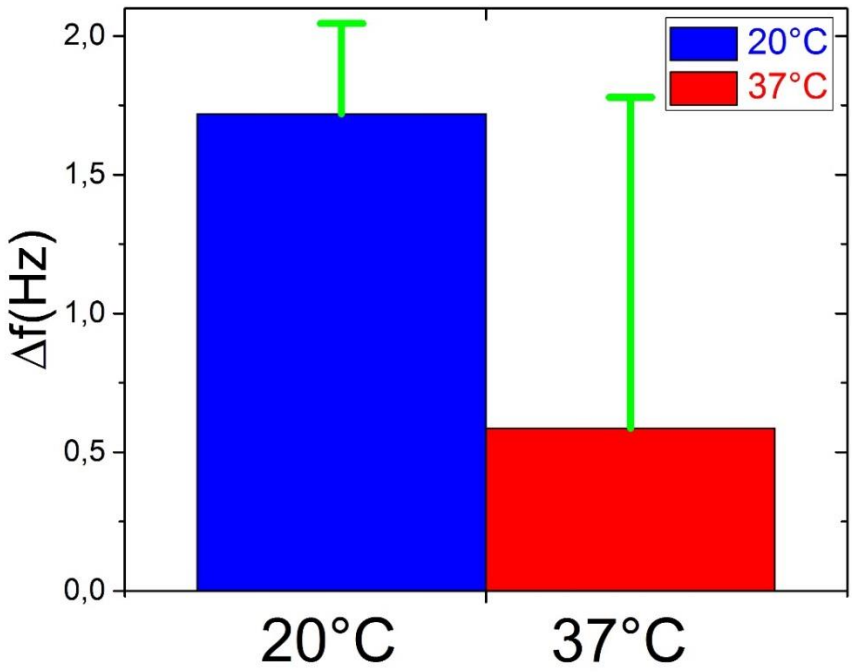
Şekil 3.3. de pembe renk ile gösterilen kısımda ise, deneyin en yüksek konsantrasyonu olan mililitrede 10^{13} tDNA kopyası barındıran solüsyon uygulandığında sistemin rezonans frekansında 20.50 Hz'lik frekans kayması izlendi. Buradan mantıksal çıkarım yapılacak olursa, uygulanan en yüksek konsantrasyon olduğu için diğer deneylerden daha fazla bir frekans kaymasının olması hesap edilmişti ve planlanana uygun bir grafik gözlemlendi.



Şekil 3.4. Logaritmik Eksende Doz Kıyaslama

Şekil 3.4. de 3 farklı konsantrasyonda yapılan deneylerde sistemin rezonans frekansının değişimi logaritmik eksenlerde kıyaslanmıştır. Burada uygulanan tDNA dozajına bağlı olarak bir artış izlenmekte. Bu artış miktarı uygulanan konsantrasyon ile ilişkilidir. Uygulanan solüsyon mililitresinde 10^8 adet tDNA ihtiva ettiğinde 1.05 Hz 'lik bir frekans kayması görülmüştür. tDNA miktarı 10^{10} kopya/ml olduğunda ise 14.70 Hz'lik bir frekans değişimi izlendi. tDNA miktarı, deneylerin en yüksek dozajı olan 10^{13} kopya/ml uygulandığında ise sistemin rezonans frekansında 20.50 Hz'lik frekans kayması tespit edildi.

3.4. Vücut İçi ve Vücut Dışı Sıcaklıklarda Yapılan Kıyaslama



Şekil 3.5. Vücut İçi ve Vücut Dışı Verimlilik Kıyaslaması

Şekil 3.5. de görüldüğü üzere vücut dışında yapılan ölçümler ile vücut içinde yapılan ölçümler arasında ne gibi farklılıklar olacağı araştırılmıştır. Vücut dışında yapılan ölçümlerde sistemin rezonans frekansındaki değişim, vücut içinde yapılan ölçümlerden elde edilen rezonans frekansındaki değişime göre daha yüksek olması sebebiyle yapılan deneyler vücut dışında daha verimli bir şekilde çalışmıştır. İlerleyen çalışmalarda gerek deney prosedürü gerek kullanılan sistemi ve teçhizatı geliştirerek, vücut içi

ölçümlerinden daha güzel sonuçlar çıkarılmasının mümkün olabileceği sonucu çıkarılmaktadır.

3.5. Sistemin T-Test Bilgisi

Yapılan tez çalışmasında sistemin t-test bilgisi Microsoft Excel programında hesaplandığında 0.00004 gibi oldukça küçük bir sonuç elde edilmiştir. Sisteme içerisinde tDNA bulunmayan solüsyon ile deneylerin en düşük tDNA konsantrasyonunu ihtiva eden solüsyonlar uygulandığı zaman elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Veriler arasında çift taraflı ve 2 değişken bağımsız t testi ayarları yapılmıştır. İstatistik sonucu 0.05 değerinden oldukça küçük olduğu için iki deney arasında ciddi manada anlamlılık arz eden bir farklılık gözlenmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında simüle insan sıvılarında sentetik DNA tayini yapılmaya çalışılmıştır. Birçok hastalığın insan vücut sıvılarından tespit edilebilmesi sebebiyle, oluşturulan simüle ortamlarda sentetik DNA tespit edilmesi amaçlanmıştır.

İlk olarak, QCM sisteminden alınan verilerden kullanmayı planladığımız verilerin seçim işlemi yapıldı. Ardından seçilen verilerden frekans bilgisi zaman ekseninde çizdirildi (Şekil 2.11). Bu grafik üzerinde aykırı veriler ve gürültü barındıran bir özelliğe sahipti. Bu grafik üzerinde eğri uydurma işlemi yapılarak sinyal üzerindeki gürültü ve aykırı veriler temizlendi (Şekil 2.10). Eğri uydurma işlemi için 9. dereceden polinom kullanılmıştır. Bu sayede sinyal daha anlaşılabilir bir hale getirildi.

İkinci olarak, sistemin asgari hassasiyetinin tespiti üzerine MPS solüsyonunun etkisinin araştırılmasıdır. MPS solüsyonunun, sensör immobilizasyonu ve tespit için uygun bir yüzey kimyası ve morfolojisi ortaya koyduğunu ve sinyal gürültüsünü 1000 kat oranında azalttığını ortaya koyan araştırmalar literatürde mevcuttur [175]. Deneyin minimum konsantrasyonu olan mililitrede 10^8 adet tDNA uygulandığında sistemin rezonans frekansındaki değişim başarılı bir şekilde fark edilmiştir. Bu minimum hassasiyet ilerleyen araştırmalarda daha da aşağı seviyelere indirilerek tahmini olarak mililitrede 10^7 adet tDNA kopyasını tespit edebilmek mümkün olacaktır.

Üçüncü olarak, yapılan deneylerde elde edilen DNA algılama hassasiyeti ile literatürdeki DNA algılama hassasiyetleri kıyaslanmıştır. 2013 yılında yapılan bir araştırmada benzer şartlarda altında 0.8 nM [179], farklı bir yöntem kullanarak 3 pM [180] ve 0.4 fM [181] hassasiyet ile DNA tayini yapılmıştır. Bu tez çalışmasında ise 0.2 pM (1.2 ng) hassasiyet ve yüksek güvenilirlik oranı ile tespitler yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında yapılan ölçümde yukarıdaki literatürden örnekler verilen

çalışmalardaki gibi ek izolasyon, pürifikasyon veya amplifikasyon yapılmadan, sensörün neredeyse minimum hassasiyetine (0.5 ng) kadar inilerek başarılı ölçümler alınmıştır.

Dördüncü olarak ise DNA tespit işlemi insan vücudu içerisinde veya dışarısında yapıldığı zaman ne gibi farklılıklar olabileceğinin araştırılmasıdır. Bununla ilgili Şekil 3.5. de veriler mevcuttur. Bu veriler yorumlandığında sıcaklık arttıkça afinitenin azaldığını ve DNA hibridizasyonun azaldığını söylemek mümkün. Bu sebepten dolayı vücut dışındaki tespitlerin, vücut içindeki tespitlere nazaran %63 daha verimli olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla vücut içi tespitlerin üzerinde daha fazla araştırma yapılması durumunda ilerleyen zamanlarda vücut içi tDNA tespitlerinin verimli bir şekilde yapılabilmesi muhtemeldir.

Bu tezde girişimsel hiçbir işlem yapılmaksızın simüle tükürükte sentetik DNA tespiti işini hassas bir biçimde yapılmıştır. Gelecekte bir kişinin tükürük sıvısını kullanarak QCM sensör aracılığı ile genetik bir rahatsızlığının olup olmadığının tespitine yardımcı olacak ve literatüre katkı sağlayacak sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKÇA

1. Marieb EN, Hoehn K. (2009). Human anatomy and physiology. 8th ed., San Francisco: Benjamin Cummings.
2. Aktaş, A., Giray, B., & Aktaş, G. (2009). Tükürük (Salya); Özellikleri ve Görevleri Tanı Açısından Değeri. **ADO Klinik Bilimler Dergisi, 3**(2), 361-367.
3. Kaya S.,Tükürük bezi hastalıkları, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 1997.
4. Diaz-Arnold AM., Marek CA., (2002). The impact of saliva on patient care: A literature review, **J. Prosthet. Dent., 88**, 337-343.
5. **http://www.tukuruk.gen.tr/tukuruk-bezlerinin-fazla-calismasi.html.**
6. Bökesoy T.A, Çakıcı İ, melli M. Farmakoloji Ders Kitabı 2000 S:3-7
7. Borçbakan C., Ağız Çene Hastalıkları, Ankara, 1971,1, S:15-21
8. **http://www.taringa.net/posts/info/18237677/La-Saliva-caracteristicas-fun cion-composicion.html.**
9. Schenkels, L. C., Veerman, E. C., & Nieuw Amerongen, A. V. (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Critical reviews in oral biology & medicine, 6**(2), 161-175.
10. Prof. Dr. Nurcan Buduneli Ege Üniv. Diş Hek. Fak. Tükürük Ders Notları 2003
11. Kılınç G. Çocuklarda tükürük akım oranı, pH'ı, inorganik elementleri (sodyum, potasyum, magnezyum, inorganik fosfat) ile çürük arasındaki ilişkinin karşılaştırılması.
12. Toygar N. (1982). Stenon kanalından alınan steril tükürüğün tersiyer dentin oluşumuna etkisi Ege Üniversitesi Doktora Tezi.
13. Gürlen V. (2005). Tükürüğün biyokimyası, işlevleri ve ağız sağlığı açısından önemi Ege Üniversitesi Bitirme Tezi, İzmir.
14. Mussabekova, S. (2017). Forensic Medical Capacities of Research of Saliva Stains on Physical Evidence after Washing. **World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Social, Behavioral, Educational, Economic, Business and Industrial Engineering, 11**(5), 909-913.

15. Dawett, B. (2017). DCPs and research in general dental practice. **British Dental Journal, 222**(4), 307-309.

16. Humphrey S.P., Williamson R.T., (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function, **J. Prosthet. Dent., 85**, 162-169.

17. Pedersen AM., Bardow A., Jensen BS.,Nauntofte B., Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion, **Oral Dis., 8**, 117-129, 2002.

18. Amerongen NAV, (2002). Veerman FC., Saliva the defender of the oral cavity, **Oral Dis., 8**, 12-22.

19. Tabak LA., (1990). Structure and function of human salivary mucins, **Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1**, 229-234.

20. Mandel ID., (1987). The function of saliva, **J. Dent. Res., 66**, 623-627.

21. Cowman RA, Schaefer SJ, Fitzgerald RJ., Specificity of utilization of human salivary proteins for growth by oral streptococci, **Caries. Res., 13**, 181-189, 1979.

22. Pollock JJ., Lotardo S., Gavai R., Groosbard BL., (1987). Lysozyme-protease-inorganic monovalent anion lysis of oral bacterial strains in buffers and stimulated whole saliva, **J. Dent. Res., 66**, 467-474.

23. Çizmeci Şenel F., Çizmeci Basmacı F., Özden N. (2006). Diyabet hastalarında tükürükte meydana gelen değişiklikler. **Türk Oral Maksillofas Cer Derg, 10**, 1-2.

24. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL et al. (2010). **McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. Biomark Med, 4**(1): 171-89.

25. Lee YH, Wong DT. (2009). Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **Am J Dent, 22**(4): 241-48.

26. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. (2006). Concomitant analysis of salivary tumor markers: a new diagnostic tool for oral cancer. **Clin Cancer Res, 12**(13): 3979–84.

27. Sidransky D. (1997). Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. **Sciences, 278**(5340): 1054–59.

28. Tavassoli M, Brunel N, Maher R, Johnson NW, Soussi, T. (1998). p53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Int J Cancer, 78**(3): 390–91.

29. Wagner P, Verma M, Srivastava S. (2004). Challenges for biomarkers in cancer detection. **Ann NY Acad Sci, 1022**: 9-16.

30. Wong LJ, Lueth M, Li XN, Lau CC, (2003). Vogel H. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. **Cancer Res, 63**(14): 3866–71.

31. Kocík M, Vymetalová Y, Málek I. (2007). Cell-free human DNA in body fluids-potential for clinical applications. **Cas Lek Cesk, 146**(2): 96–101.

32. Schrohl AS, Würtz S, Kohn E, Banks RE, Nielsen HJ, Sweep FC, Brünner N. (2008). Banking of biological fluids for studies of disease-associated protein biomarkers. **Mol Cell Proteomics, 7**(10): 2061–66.

33. Shannon, I. L., Feller, R. P., Eknoyan, G., & Suddick, R. P. (1977). Human parotid saliva urea in renal failure and during dialysis. **Archives of oral biology, 22**(2), 83-86..

34. Streckfus CF, Bigler LR, (2002). Saliva as a diagnostic fluid, **Oral Dis., 8**, 69-76.

35. Kaufman E, Lamster IB. (2002). The diagnostic applications of saliva--a review. **Crit Rev Oral Biol Med.13**(2):197-212

36. Blicharz TM, Rissin DM, Bowden M, Hayman RB, DiCesare C, Bhatia JS, et al. (2008). Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a prof of principle. **Clin Chem, 54**:1473– 80.

37. Meucci E, Littaru C, Deli G, Luciani G, Tazza L, Littarru GP. (1998). Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate le-vels. **Free Radic Res, 29**:367–76.

38. Lütfioğlu M., Sakallıoğlu EE., Özkaya O., Açıkgöz G. (2008). Kronik böbrek yetmezliği olan çocuklarda ağız sağlığı profilinin değerlendirimesi. **Gazi Ünv Dişhek Fak Derg 25**, 13-18.

39. Hu S, Wang J, Meijer J, Ieong S, Xie Y, et al. (2007). Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. **Arthritis Rheum. 56**(11):3588-600.

40. Sreebny LM, Zhu WX., (1996). The use of whole saliva in differential diagnosis of **Sjögren's syndrome, 10**, 17-24.

41. Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA., (1996). Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity, **Clin. Physiol., 16**, 433-448.

42. Qvarnstrom M, Janket S, Jones JA, Nuutinen P, et al. (2008). Salivary lysozyme and prevalent hypertension. **J Dent Res. 87**(5):480-4.

43. Whitehead DL, Strike P, Perkins-Porras L, Steptoe A. (2005). Frequency of distress and fear of dying during acute coronary syndromes and consequences for adaptation. **Am J Cardiol. 96**(11):1512-6.

44. Martinez PM, Torres AR, Ortis de Lejarazu R, Montoya A, et al. (1999). Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingival-crevicular transudate and urine samples, **J. Clin. Microbiol., 37**, 1100-1106.

45. Li C, Ha T, Ferguson DA Jr, Chi DS, Zhao R, Patel NR, et al. (1996). A newly developed PCR assay of H. pylori in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of H. pylori in saliva supports oral transmission. **Dig Dis Sci, 41**:2142-2149.

46. Hicks MJ, Carter AB, Rossmann SN, Demmler GJ, et al. (1998). Detection of fungal organisms in saliva from HIV-infec¬ted children: a preliminary cytologic analysis. **Pediatr Dent. 20**(3):162-8.

47. Parry JV, Perry KR, Panday S, Mortimer PP. (1989). Diagnosis of hepatitis A and B by testing saliva. **J Med Virol. 28**(4):255-60.

48. Chaita TM, Graham SM, Maxwell SM, Sirivasin W, et al. (1995). Salivary sampling for hepatitis B surface antigen carriage: a sensitive technique suitable for epidemiological studies. **Ann Trop Paediatr. 15**(2):135-9.

49. Thieme T, Piacentini S, Davidson S, Steingart K (1994). Determination of measles, mumps, and rubella immuni¬zation status using oral fluid samples. **J Am Med Assoc, 272**:219-221.

50. Drobitch RK, Svensson CK. (1992). Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. **Clin Pharmacokinet. 23**(5):365-79.

51. Siegel IA. (1993). The role of saliva in drug monitoring. **Ann N Y Acad Sci. 20**;694:86-90.

52. Vining RF, McGinley RA. (1986). Hormones in saliva. **Crit Rev Clin Lab Sci., 23**(2):95-146.

53. McVie R, Levine LS, New MI. (1979). The biologic significance of the aldosterone concentration in saliva. **Pediatr Res. 13**(6):755-9.

54. Fekete Z, Korec R, Feketeova E, Murty VL, et al. (1993). Salivary and plasma insulin levels in man**. Biochem Mol Biol Int. 30**(4):623-9.

55. Katakura A, Kamiyama I, Takano N, Shibahara T, et al. (2007). Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer pati¬ents and healthy subjects. **Bull Tokyo Dent Coll. 48**(4):199-203.

56. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M. (2000). Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. **J Pathol. 192**(1):52-7.

57. Tavassoli M, Brunel N, Maher R, Johnson NW, Soussi T. (1998). p53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Int J Cancer.** 29;78(3):390-1

58. Mittal T, Saralaya KM, Kuruvilla A, Achary C. (2008). Sex determination from buccal mucosa scrapes. **Int J Legal Med. 24**.

59. Virkler K, Lednev IK. (2009) .Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. **Forensic Sci Int.**

60. Bond JW, Hammond C. (2008). The value of DNA material recovered from crime scenes. **J Forensic Sci. 53**(4):797-801

61. Arda M: Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. Ankara. 1995.

62. Çevik AM: PCR ve İnfeksiyöz hastalıklarda kullanımı. Seminer. S.B. Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon hastalıkları bölümü. 1994.

63. Diallo IO, Mackenzie AM, Spradbrow PB, Robinson WF. (1998). Field isolates of fowl pox virüs comtamined with reticuloendetheliosis virüs. **Avian Dis. 27**:60-66.

64. Erlich, H. A., Gelfand, D., & Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science, 252**(5013), 1643-1651.

65. Jestin V, Jestin A. (1991). Detection of Newcastle disease virüs RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). **Arch Virol,** 118: 151-161.

66. Miva N, Nishina T, Kubo S, Honda H. (1997). Most probalbe number method combined with nested CPR for detection and enumerailon of enterotoxigenic Clostridium perfiringens intestinal contents of cattle, pig and chicken. **J Vet Med Sci. 59**: 557-560.

67. Persing HD. (1991). Polymerase chain Reaction: Trenches to benches. **J Clin Microbial. 29**: 1281-1285.

68. Vierstraete, A. (1999). Principle of the PCR. Εκδόσεις University of Ghent. **http://users. ugent. be/~ avierstr/principles/pcr.html.**

69. Schochetman G, Jones KW. (1998). Polymerase Chain Reaction. **J Inf DIs, 158**: 1154-1157.

70. Tindall RK, Kunkel At. (1998). Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA Polymerase. **Biochemistry, 27**: 6008-6013.

71. Tunchili LM, kodama H, Sharma RN, Takatori I, Pandey GS. (1996). Detection of Salmonella DNA in chicken embriyos and environmental samples by Polymerase Chain Reaction. **J Vet Med Sci, 58**: 881-884.

72. Walker J. Douan G. (1989). DNA probes: A new role in diagnostic microbiology, **j Appl microbiol, 67**: 229-230.

73. Wolcott JM: advances in nücleic asid – based detection methods. Clin Microbil Rev. 5 : 370-386, 1992.

74. Saiki, KR., Gelfand, HD., Stoffi, S., Scharf, JS., Higuchi, R., Horn, T. G. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase. **Science, 239**: 487-491.

75. Heinemann, W. R., C. W. Anderson, and H. B. Halsall. 1979. Immunoassay by differential pulse polarography. **Sci. Wash. 204**: 865-866.

76. Niculescu, M., C. Nistor, I. Frebort, P. Pec, B. Mattiasson, and E. Csoregi. 2000. Redox hidrogel-based amperometric bienzyme electrode for fish freshness monitoring. **Anal. Chem. 72:** 1591-1597.

77. Kitikul, J., Satienperakul, S., Preechaworapun, A., Pookmanee, P., & Tangkuaram, T. (2017). A Simple Flow Amperometric Electrochemical Biosensor Based on Chitosan Scaffolds and Gold Nanowires Modified on a Glassy Carbon Electrode for Detection of Glutamate in Food Products. **Electroanalysis, 29**(1), 264-271.

78. Rezvani, M., NAJAFPOUR, G., Mohammadi, M., & Zare, H. (2017). Amperometric biosensor for detection of triglyceride tributyrin based on zero point charge of activated carbon. **Turkish Journal of Biology, 41**(2), 268-277.

79. Braik, M., Barsan, M. M., Dridi, C., Ali, M. B., & Brett, C. M. (2016). Highly sensitive amperometric enzyme biosensor for detection of superoxide based on conducting polymer/CNT modified electrodes and superoxide dismutase. **Sensors and Actuators B: Chemical, 236**, 574-582.

80. Hall, E. A. H. 1991. Biosensors. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

81. Panfili, P. R., K. Dill, and J. D. Olson. 1994. Immunochemical detection using the light-addressable potentiometric sensor. **Curr. Opin. Biotechnol. 5:** 60-64.

82. Dill, K., J. H. Song, J. A. Blomdahl, and J. D. Olson. 1997. Rapid, sensitive and specific detection of whole cells and spores using the light-addressable potentiometric sensor. J. Biochem. Biophys. **Methods 34:** 161-166.

83. Tu, S., J. Uknalis, and P. L. Irwin. 2002. The capture of Escherichia coli O157:H7 for light addressable potentiometric sensor (LAPS) using two different types of magnetic beads. **J. Rapid Meths. Automat. Microbiol. 10**: 185-195.

84. Mourzina, G., E. Ermolenko, T. Yoshinobu, Y. Vlasov, H. Iwasaki, and M. J. Schöning. 2003. Anion-selective light-addressable potentiometric sensors (LAPS) for the determination of nitrate and suphate ions. **Sensors Actuators** B91:32.

85. Keusgen, M., J. P. Kloock, D. T. Knobbe, M. Jünger, I. Krest, M. Goldbach, W. Klein, and M. J. Schöning. 2004. Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. **Sensors Actuators** B103: 380-385.

86. Draghi, P. F., & Fernandes, J. C. B. (2017). Label-free potentiometric biosensor based on solid-contact for determination of total phenols in honey and propolis. **Talanta, 164**, 413-417.

87. Shaibani, P. M., Jiang, K., Haghighat, G., Hassanpourfard, M., (2016). The detection of Escherichia coli (E. coli) with the pH sensitive hydrogel nanofiber-light addressable potentiometric sensor (NF-LAPS). **Sensors and Actuators B: Chemical, 226**, 176-183.

88. Vieira, N. C., Avansi, W., Figueiredo, A., Mastelaro, V. R., & Zucolotto, V. (2016). Potentiometric detection of chemical species by spin-assisted assembly of vanadium pentoxide nanorods. **Sensors and Actuators B: Chemical, 229**, 461-465.

89. Watson, L. D., P. Maynard, D. C. Cullen, R. S. Sethi, J. Brettle, and C. R. Lowe. 1988. A microelectronic conductimetric biosensor. **Biosens. Bioelectron. 3:** 101-115.

90. Gómez, R., R. Bashir, A. Sarikaya, M. R. Ladisch, J. Sturgis, J. P. Robinson, T. Geng, A. K. Bhunia, H. L. Apple, and S. Wereley. 2001. Microfluidic biochip for impedance spectroscopy of biological species. **Biomed. Microdevices 3:** 201-209.

91. Radke, S., and E. C. Alocilja. 2005. A high density microelectrode array biosensor for detection of E. coli O157:H7. **Biosens. Bioelectron. 20**: 1662-1667.

92. Yang, L., Y. Li, and G. Erf. 2004. Interdigitated array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of Escherichia coli O157:H7. **Anal. Chem. 76**(4): 1107-1113.

93. Yang, L., and Y. Li. 2005a. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrodes and their capture of E. coli O157:H7. **Biosens. Bioelectron. 20**(7): 1407-1416.

94. Louie, A. S., I. G. Marenchic, and R. H. Whelan. 1998. A fieldable modular biosensor for use in detection of foodborne pathogens. **Field Anal. Chem. Tech. 2**: 371-377.

95. Ertürk, G., & Mattiasson, B. (2017). Capacitive Biosensors and Molecularly Imprinted Electrodes. **Sensors, 17**(2), 390.

96. Idil, N., Hedström, M., Denizli, A., & Mattiasson, B. (2017). Whole cell based microcontact imprinted capacitive biosensor for the detection of Escherichia coli. **Biosensors and Bioelectronics, 87**, 807-815.

97. Ertürk, G., Hedström, M., Tümer, M. A., Denizli, A., & Mattiasson, B. (2015). Real-time prostate-specific antigen detection with prostate-specific antigen imprinted capacitive biosensors. **Analytica chimica acta, 891**, 120-129.

98. Wang, L., Veselinovic, M., Yang, L., Geiss, B. J., Dandy, D. S., & Chen, T. (2017). A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics, 87**, 646-653.

99. Li, Y. Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKCİ.

100. Malekghasemi, S. (2015). Kağıt-Tabanlı Biyosensör Tasarımı ve Geliştirilmesi.

101. Delwiche, M., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere, and W. Sansen. 2000. A biosensor to detect penicillin residues in food. **Trans. ASAE 43**: 153-159.

102. Liu, Y., and Y. Li. 2002. Detection of Escherichia coli O157:H7 using immunomagnetic separation and absorbance measurement. **J. Microbiol. Methods 51**(3):369-377.

103. Capitan-Vallvey, L. F., E. Arroyo-Guerrero, M. D. Ferandez-Ramos, and F. Santoyo-Gonzalez. (2005). Disposable receptor-based optical sensor for nitrate. **Anal. Chem. 77**: 4459-4466.

104. Blum, L. J., S. M. Gautier, and P. R. Coulet. 1994. Chapter 5: Fiber-optic biosensors based on luminometric detection. Food Biosensor Analysis, 101-121. Wangner and Guibault, eds. New York, NY: Marcel Dekker.

105. Kozma, P., Kehl, F., Ehrentreich-Förster, E., Stamm, C., & Bier, F. F. (2014). Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review. **Biosensors and Bioelectronics, 58**, 287-307.

106. Kim, B. C., and M. B. Gu. 2003. A bioluminescent sensor for high throughout toxicity classification. **Biosens. Bioelectron. 18**: 1015-1021.

107. Liu, Y., J. Ye, and Y. Li. 2003. Rapid detection of E. coli O157:H7 in ground beef, chicken carcass and lettuce samples with an immunomagnetic chemiluminescence fiber-optic biosensor. **J. Food Prot. 66**(3): 512-517.

108. Tu, S., A. G. Gehring, and P. L. Irwin. 2005. Bioenergetic confirmation of viable pathogens in foods by atp-bioluminescence. **Luminescence 15**: 445-448.

109. Taitt, C. R., G. P. Anderson, and F. S. Ligler. 2005. Evanescent wave fluorescence biosensors. **Biosens. Bioelectron. 20**(12): 2470-2487.

110. Liang, S. S., Qi, L., Zhang, R. L., Jin, M., & Zhang, Z. Q. (2017). Ratiometric fluorescence biosensor based on CdTe quantum and carbon dots for double strand DNA detection. **Sensors and Actuators B: Chemical, 244**, 585-590.

111. Liang, J., Wang, X., Li, L., Xu, S., Jiang, J., Wu, L., ... & Chen, S. (2017). Development of dual-fluorescence cell-based biosensors for detecting the influence of environmental factors on nanoparticle toxicity. **Chemosphere, 171,** 177-184.

112. Zhao, M., Guo, Y., Wang, L., Luo, F., Lin, C., Lin, Z., & Chen, G. (2016). A sensitive fluorescence biosensor for alkaline phosphatase activity based on the Cu (II)-dependent DNAzyme. **Analytica chimica acta, 948**, 98-103.

113. Zhang, Y., Guo, Y., Zhao, M., Lin, C., Lin, Z., Luo, F., & Chen, G. (2017). Fluorescence biosensor for inorganic pyrophosphatase activity. **Analytical and bioanalytical chemistry, 409**(4), 999-1005.

114. Wang, L., Wang, M., Shi, F., Liu, Z., & Su, X. (2017). Aptamer based fluorescence biosensor for protein kinase activity detection and inhibitor screening. Sensors and Actuators B: Chemical.

115. Glaser, R. W. 2000. Surface plasmon resonance biosensors. Biosensors and Their Applications, 195-212. V. C. Yang, and T. T. Ngo, eds. New York, N.Y.: Kluwer Academic.

116. Ertürk, G., Özen, H., Tümer, M. A., Mattiasson, B., & Denizli, A. (2016). Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples. Sensors and Actuators B: Chemical, 224, 823-832.

117. Daems, D., Lu, J., Delport, F., Mariën, N., Orbie, L., Aernouts, B., ... & Lammertyn, J. (2017). Competitive inhibition assay for the detection of progesterone in dairy milk using a fiber optic SPR biosensor. **Analytica chimica acta, 950**, 1-6.

118. Wang, H., Wang, X., Wang, J., Fu, W., & Yao, C. (2016). A SPR biosensor based on signal amplification using antibody-QD conjugates for quantitative determination of multiple tumor markers. **Scientific reports, 6**, 33140.

119. Zubiate, P., Zamarreño, C. R., Sánchez, P., Matias, I. R., & Arregui, F. J. (2017). High sensitive and selective C-reactive protein detection by means of lossy mode resonance based optical fiber devices. **Biosensors and Bioelectronics, 93,** 176-181.

120. Heng, S., McDevitt, C. A., Kostecki, R., Morey, J. R., Eijkelkamp, B. A., Ebendorff-Heidepriem, H., ... & Abell, A. D. (2016). Microstructured optical fiber-based biosensors: reversible and nanoliter-scale measurement of zinc ions. **ACS applied materials & interfaces, 8**(20), 12727-12732.

121. Li, Y., Sun, Q., Luo, Y., Li, Y., Gong, A., Zhang, H., & Liu, D. (2017, April). High sensitive and selective Escherichia coli detection using immobilized optical fiber microprobe. In Optical Fiber Sensors Conference (OFS), 2017 25th (pp. 1-4). IEEE.

122. Gowri, A., & Sai, V. V. R. (2017, May). U-bent plastic optical fiber-based plasmonic biosensor for nucleic acid detection. In SPIE Optics+ Optoelectronics (pp. 1023113-1023113). International Society for Optics and Photonics.

123. Ziegler, C. (2004). Cantilever-based biosensors. **Analytical and bioanalytical chemistry, 379**(7-8), 946-959.

124. Arlett, J. L., Myers, E. B., & Roukes, M. L. (2011). Comparative advantages of mechanical biosensors. **Nature nanotechnology, 6**(4), 203-215.

125. Sacu, I. E., & Alci, M. Piezorezistif Tabanlı Mikrokiriş Kullanılarak Biyosensör Tasarımı.

126. Fritz, J. (2008). Cantilever biosensors. **Analyst, 133(**7), 855-863.

127. Chan, B. D., Icoz, K., Huang, W., Chang, C. L., & Savran, C. A. (2014). On-demand weighing of single dry biological particles over a 5-order-of-magnitude dynamic range. **Lab on a Chip, 14**(21), 4188-4196.

128. Icoz, K., Iverson, B. D., & Savran, C. (2008). Noise analysis and sensitivity enhancement in immunomagnetic nanomechanical biosensors. **Applied Physics Letters, 93**(10), 103902.

129. Icoz, K., & Savran, C. (2010). Nanomechanical biosensing with immunomagnetic separation. **Applied Physics Letters, 97**(12), 123701.

130. Jaffe, B.; Cook, W.R.; Jaffe, H. 1971, "Piezoelectric Ceramics".; R.A.N. Publishers: Marietta, OH, USA, 317.

131. Carazo A.V. 2000, " Novel Piezoelectric Transducers for High Voltage Measurements" Universitat Politecnica de Catalunya, Barcelona 29-48.

132. Curie, J., and Curie, P., 1880, "Development Par Compression De L"Electricite Polaire Dans Les Cristaux Hemiedres A Faces İnclinees", **Bulletin de la Societe Mineralogique de France, 3**, 90-93,.

133. Ozgul M., 1998, "Electrochemical Phenomena in Piezoelectric Ceramics Leading to Polarization Fatigue", M.Sc. thesis at Pennsylvania State University.

134. Ozgul M., 2003, "Polarization Switching and Fatigue Anisotropy in Relaxor-Lead Titanate Ferroelectric Single Crystals", Ph.D. thesis at Pennsylvania State University.

135. Valasek J. 1921, Phys. Rev.17,475.

136. Lines M.E. and Glass A.M. 1977, Principles and Applications of Ferroelectrics and Related Materials, Clarendon Press, Oxford .

137. Megaw H.D. 1957, "Ferroelectricity in Crystals", Methuen and Co., London.

138. Jona F. And Shirane G. 1962, "Ferroelectric Crystals", Pergamon Press, Oxford.

139. Nye J.F. 1957, "Physical Properties of Crystals", Oxford University Press, Oxford.

140. Xu Y., 1991,"Ferreoelctric Materials and Their Applications", North-Holland Elsevier Sci.Publ.,Amsterdam.

141. İnternet Kaynağı 4: **http://www.americanpiezo.com/piezo_theory/index. html**

142. İnternet Kaynağı 7: **http:// www. morganelectroceramics.com** (Morgan Electro Ceramics, Ocak 2007, Piezo Ceramics Tutorial, USA)

143. İnternet Kaynağı 3: **www.bdtic.com/Ramtron/FRAM/index.html**

144. Shrout T.R. ;Zhang S.J. 2007, "Lead-free piezoelectric ceramics: Alternatives for PZT?" , **Journal of Electroceramics 19,**113-126.

145. Tressler, J. F., Alkoy, S., Newham, R. E., 1995,"Piezoelectric Sensors and Sensor Materials", **Journal of Electroceramics 2**:4, 277-272.

146. İNTERNET KAYNAĞI 5 www.physikinstrumente.com (Physik Instrumente (PI) GmbH & Co.Germany, Aralık 2006, Piezo- Tutorial,Germany)

147. Biyosensörler; **http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/biyosensor.htm**

148. Heising, R.A. (1946). Quartz Cyristals for Electrical Cicuits Their Dizayn and Manufacture, Van Nostrand, New York

149. Vaughan,R.D., O'Sullivan,C.K., Guilbault,G.G. (1999). Sulfur based self assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric cyristals for immunosensor development, **Fresenius J. Anal. Chem., 364**: 54-57

150. **http://tr.wikipedia.org/wiki/Kuvars**

151. Updike,S.J. and Hicks,G.P. (1967). The enzyme electrode, **Nature, 214**: 986–988

152. Guilbault,G.G., Luong,JH. (1988). Gas phase biosensors, **Journal of Biotechnology, 9**:1-29

153. He, H., Xie, Q., Zhang, Y., Yao, S. (2005). A simultaneous electrochemical impedance and quartz crystal microbalance study on antihuman immunoglobulin G adsorption and human immunoglobulin G reaction, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 62**: 191–205

154. O'Sullivan, C.K. and Guilbault, G.G. (1999). Commercial Quartz Crystal Microbalances-Theory and Applications, **Biosensors and Bioelectronics, 14**: 663-670

155. Bunde, R.L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J. (1998). Piezoelectric Quartz cyrstal biyosensors, **Talanta, 46**: 1223-1236.

156. Sui, T., Ge, Y., Liu, W., Zhao, Z. K., Zhang, N., & Cao, X. (2013). An acetylcholinesterase antibody-based quartz crystal microbalance for the rapid identification of spinal ventral and dorsal roots. **PloS one, 8**(7), e69049..

157. Skadal, P. (2003). Piezoelectric quartz cyristal sensors applied for bioanalitical assays and characterization of affinity interactions, **J. Braz. Chem. Soc., 14**, 4: 491-502

158. Herne, T.M., Tarlov, M.J. (1997). characterization of DNA probes immobilized on gold surface. **Journal of American Chemical Society, 119**, 8916-8920.

159. Huang E., Satjapipat M., Han S., Zhou F. (2001) "Surface structure and coverage of an oligonucleotide probe tethered onto a gold substrate and its hybridization efficiency for a polynucleotide target" **Langmuir, 17**: 1215-1224.

160. Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Macsini, M. (2003b). Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection, **Biosensors and Bioelectronics 18**: 129-140.

161. Marie R., Jensenius H., Thaysen J., Christensen C.B., Boisen A. (2002) "Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNA-oligos on gold investigated by microcantilever sensors" **Ultramicroscopy, 91**: 29-36

162. Chow, E., Hibbert, D.B. and Gooding, J.J. (2005). Electrochemical detection of lead ions via the covalent attachment of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thioctic acid self-assembled monolayers, **Analytica Chimica Acta, 543**: 167-176

163. Storri, S., Santorini, T., Minunni, M., Mascini, M. (1998). Surface modification for development of piezoimmunosensors. **Biosensors Bioelectron. 13** (3-4): 347–357.

164. Shons, A., Dorman, F., Najarian, J. (1972). The piezoelectric Quartz immunosensor, **J.Biomed. Manter Res.,** 576-570

165. Mutlu, S., Çökeliler, D., Shard, A., Goktas, H., Ozansoy, B., Mutlu, M. (2008). Preparation and characterization of ethylenediamine and cysteamine plasma polymerized films on piezoelectric quartz crystal surfaces for a biosensor, **Thin Solid Films, 516**: 1249-1255

166. Gua., F., Luxa, R., Du-Thummb, L., Stokesb, I., Kretha, J., Andersonc, M.H., Wonga, D.T., Wolinskya, L., Sullivanb, R., Shi, W. (2005). In situ and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies, **Journal of Microbiological Method, 62**: 145-160.

167. Vivian C.H. Wu, Sz-Hau Chenb, Chih-Sheng Lin. (2007). Real-time detection of Escherichia coli O157:H7 sequences using a circulating-flow system of quartz crystal microbalance, **Biosensors and Bioelectronics, 22**: 2967-2975

168. Pastorino, L., Soumetz, C.F., Giacomini, M., Ruggiero, C. (2006). Development of a piezoelectric immunosensor for the measurement of paclitaxel, **Journal of immunological methods, 313**: 191-198

169. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). Analytical Chemistry, 2.Baskı, Academic press: 226- 239.

170. Wakamatsu, K. et. al. (1995) "Direct in-situ measurement of Phospholipid hydration in an aqueous environment using a quartz crystal microbalance", **Anal. Chem. 67**:3336.

171. Noonong, A., Poomcokrak, J., Promptmas, C., Neatpisanvanit, C.(2011). "Human Serum Albumin Detection Using QCM Immunosensor with Differential Frequency measurement". 978-1-4244-9658-7/11

172. Ertekin, Ö., Öztürk, S., Öztürk,Z.Z. (2016) " Label Free QCM Immunebiosensor for AFB1 Detection Using Monoclonal IgA Antibody as Recognition Element". **Sensors,16**, 1274

173. Clausen,M.T., Pereira,A.M., vd.(2016). "Real-time and label free determination of ligand binding-kinetics to primary cancer tissue specimens; a novel tool for the assessment of biomarker targeting". **Sensing and bio-sensing Research 9,** 23-30

174. Furusawa, H., Nakayama, H., Funasaki, M., & Okahata, Y. (2016). Kinetic characterization of small DNA-binding molecules interacting with a DNA strand on a quartz crystal microbalance. **Analytical biochemistry, 492**, 34-42.

175. Soylu, M. C., Shih, W. H., & Shih, W. Y. (2013). Insulation by solution 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (mps) coating: Effect of ph, water, and mps content. **Industrial & Engineering Chemistry Research, 52**(7), 2590-2597.

176. Jeon, S. J., Kim, J., Ji, M. G., Park, J. H., & Choia, Y. W. (2016). Analysis of minimum noise range for signal detection method using 2 c ω harmonic frequency in biosensor signal detection.

177. Ghodsevali, E., Landari, H., Boukadoum, M., Gosselin, B., & Miled, A. (2016, August). A wide range and high sensitivity four-channel compact electrochemical biosensor for neurotransmitter detection on a microfluidic platform. In *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2016 IEEE 38th Annual International Conference of the* (pp. 5753-5756). IEEE.

178. Kasper, M., Traxler, L., Salopek, J., Grabmayr, H., Ebner, A., & Kienberger, F. (2016). Broadband 120 MHz Impedance Quartz Crystal Microbalance (QCM) with Calibrated Resistance and Quantitative Dissipation for Biosensing Measurements at Higher Harmonic Frequencies. **Biosensors, 6**(2), 23.

179. Wang, D., Chen, G., Wang, H., Tang, W., Pan, W., Li, N., & Liu, F. (2013). A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. **Biosensors and Bioelectronics, 48**, 276-280.

180. Ngo, H. T., Gandra, N., Fales, A. M., Taylor, S. M., & Vo-Dinh, T. (2016). Sensitive DNA detection and SNP discrimination using ultrabright SERS nanorattles and magnetic beads for malaria diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics, 81**, 8-14.

181. Jia, L., Shi, S., Ma, R., Jia, W., & Wang, H. (2016). Highly sensitive electrochemical biosensor based on nonlinear hybridization chain reaction for DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics, 80**, 392-397.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı **:** Furkan SOYSALDI

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti (T.C.)

Doğum Tarihi ve Yeri **:** 14.06.1991 Nevşehir

İletişim Bilgileri **:** Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Meslek Yüksekokulu Merkez / Nevşehir

E-posta: **:** furkansoysaldi@nevsehir.edu.tr

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Derece	**Kurum**	**Yıl**
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	2014-2017
Lisans	Anadolu Üniversitesi, A.Ö.F. İşletme Bölümü	2013-2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	2009-2013
Lise	Nevşehir Anadolu Lisesi	2005-2009

İŞ DENEYİMLERİ

Görev	**Kurum**	**Yıl**
Öğretim Görevlisi	Nevşehir HBV Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Biyomedikal Cihaz Teknolojisi	2017-

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. B. Yılmaz, D. B. Arslan, F. Soysaldı ,etc. “Göz Hareketine Dayalı Hasta Yatağı Pozisyon Kontrolü İçin Arayüz Geliştirilmesi”, in the Proceedings of the Tıp Teknolojileri 2013 Conference, Antalya, Turkey, October 31-November 2, 2013.

2. F. Soysaldı, M. Ç. Soylu. “Genetic Detection in Simulated-Saliva using MPS coated QCM sensor without DNA Isolation and Amplication”, in the International Mediterranean Science and Engineering Congress, October 25-27, 2017.