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

BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN NİTİNOL MALZEMENİN YÜZEY İŞLEVSELLEŞTİRME KARAKTERİZASYONU VE OPTİMİZASYONU

Hazırlayan
Fevziye Zeynep YAKUTSOY

Danışman
Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2024
KAYSERİ

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

BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN NİTİNOL MALZEMENİN YÜZEY İŞLEVSELLEŞTİRME KARAKTERİZASYONU VE OPTİMİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Fevziye Zeynep YAKUTSOY

Danışman
Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Ağustos 2024
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.

Fevziye Zeynep YAKUTSOY

İmza

“Biyosensör Uygulamaları İçin Nitinol Malzemenin Yüzey İşlevselleştirme Karakterizasyonu ve Optimizasyonu” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan	**Danışman**
Fevziye Zeynep YAKUTSOY	Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

Biyomedikal Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Semra İÇER İmza

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli rehberliği ve desteği ile bana yol gösteren, bilimsel katkıları ve farklı bakış açıları ile ufkumu genişleten, her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, yakın ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın danışmanım Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu, uzun süreçte maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, emeklerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her daim cesaret ve güç veren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sizlerin desteği ve sevgisi olmadan bu noktaya gelmem mümkün olmazdı. Her an yanımda olduğunuz ve bana inandığınız için minnettarım.

Fevziye Zeynep YAKUTSOY

Ağustos 2024, KAYSERİ

BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN NİTİNOL MALZEMENİN YÜZEY İŞLEVSELLEŞTİRME KARAKTERİZASYONU VE OPTİMİZASYONU

Fevziye Zeynep YAKUTSOY

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2024
Danışman: Doç. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ÖZET

Bu tez, Nitinol malzemesinin biyosensör uygulamaları için yüzey işlevselleştirme yöntemlerinin karakterizasyonu ve optimizasyonunu incelemektedir. Biyouyumlu ve mekanik olarak dayanıklı olması ile dikkat çeken Nitinol, bu çalışmada ilk kez biyosensör platformu olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın amacı, iki farklı yüzey işlevselleştirme yöntemini değerlendirerek en etkili yöntemi belirlemektir. Birinci yöntemde, Nitinol yüzeyi 11-merkaptoundekanoik asit ile kaplanmış ve 1-ethyl3 [3dimethylaminopropyl]carbodiimidehydrochloride/Nhydroxysulfosuccinimide sodium salt kimyasalları ile işlevselleştirilmiştir.

İkinci yöntemde ise, 3Merkaptopropiltrimetoksisilan ve N-Maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-Nhydroxysuccinimide ester sodium salt kullanılmıştır. Her iki yöntem, Bovine Serum Albumin tespiti için elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri ile değerlendirilmiştir ve atomik kuvvet mikroskobu ile karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuçlar 11-merkaptoundekanoik asit içeren birinci yöntemin daha yüksek duyarlılık ve doğruluk sağladığını göstermiştir. Bu yöntemle yapılan daha ileri deneylerde, yüzey antijenine özgü *Escherichia coli* antikorları amin reaktif duruma getirilmiş Nitinol yüzeyine başarıyla bağlanmış ve 10^1 ile 10^6 CFU/mL arasındaki *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu konsantrasyonlarının tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler, Nitinol tabanlı biyosensörün hedef analitleri 7,96 CFU/mL hassasiyetinde tespit edebilme potansiyelini ortaya koymuştur. Bu çalışma, Nitinol malzemesinin biyosensör uygulamalarında yüzey işlevselleştirmenin etkinliğini ve önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Yüzey İşlevselleştirme, Şekil Hafızalı Alaşım

SURFACE FUNCTIONALIZATION CHARACTERIZATION AND OPTIMIZATION OF NİTİNOL MATERIAL FOR BIOSENSOR APPLICATIONS

Fevziye Zeynep YAKUTSOY

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Thesis, August 2024
Supervisor: Assoc. Prof. Mehmet Çağrı SOYLU

ABSTRACT

This thesis examines the characterization and optimization of surface functionalization methods of Nitinol material for biosensor applications. Nitinol, which stands out for being biocompatible and mechanically durable, is used as a biosensor platform for the first time in this study. The aim of the study is to evaluate two different surface functionalization methods and determine the most effective method. In the first method, the Nitinol surface was coated with 11-mercaptoundecanoic acid and functionalized with 1-ethyl3[3dimethylaminopropyl]carbodiimidehydrochloride/Nhydroxysulfosuccinimide sodium salt chemicals. In the second method, 3-Merkaptopropiltrimetoksisilan and N-Maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-Nhydroxysuccinimide ester sodium salt were used. Both methods were evaluated by electrochemical impedance spectroscopy measurements for the detection of Bovine Serum Albumin and characterized by atomic force microscopy. The results showed that the first method containing 11-mercaptoundecanoic acid provided higher sensitivity and accuracy. In further experiments conducted with this method, surface antigen-specific Escherichia coli antibodies were successfully bound to the amine-reactive Nitinol surface and Escherichia coli ATCC 25922 strain concentrations between 10^1 and 10^6 CFU/mL were detected. These experiments demonstrate the potential of the Nitinol-based biosensor to detect target assays with a sensitivity of 7.96 CFU/mL. This study highlights the effectiveness and importance of surface functionalization of Nitinol material in biosensor applications.

Keywords: Biosensor, Surface Functionalization, Shape Memory Alloy

İÇİNDEKİLER

BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN NİTİNOL MALZEMENİN YÜZEY İŞLEVSELLEŞTİRME KARAKTERİZASYONU VE OPTİMİZASYONU

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK iii
KABUL VE ONAY iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR xi
TABLOLAR LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiv
GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu 3
1.2. Araştırmanın Amacı 8
1.3. Araştırmanın Önemi 9
1.4. Metal Yüzeyli/Transdüserli Biyosensörler 11
1.4.1. Optik Temelli Biyosensörler 16
1.4.1.1. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler (SPR) 16
1.4.1.2. Optik Fiber Biyosensörler 18
1.4.2. Kütle Temelli Biyosensörler 18
1.4.2.1. Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) 19

1.4.2.2. Mikrokantilever **21**

1.4.2.3. Yüzey akustik dalga (SAW) **22**

1.4.3. Elektrokimyasal Biyosensörler **22**

1.4.3.1. Yüzey İşlevselleştime **25**

1.4.3.1.1. Yüzey İşlevselleştimenin Gerekliliği **25**

1.4.3.1.2. Spesifik ve Spesifik Olmayan Bağlanma **25**

1.4.3.1.3 Yüzey İşlevselleştirme Yöntemleri **27**

1.4.4. Empedans kavramı **34**

1.4.4.1. Empedans spektroskopisinin temel ilkeleri **34**

1.4.4.2. Eşdeğer devre modeli ve elemanları **35**

1.4.5. Nitinol (NiTi) **38**

1.4.5.1. Şekil Hafıza ve Süperelastiklik Mekanizması **39**

1.4.5.2. Nitinol ve Biyomedikal Uygulamaları **43**

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal **48**

2.1.1. Kimyasal Materyaller **48**

2.1.2. Biyolojik Materyaller **51**

2.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar **51**

2.1.4. Kullanılan Deney Düzeneği **51**

2.2. Metot **54**

2.2.1. Nitinol Tellerinin Hazırlanması ve Temizlenmesi **55**

2.2.2. Nitinol Yüzeyinde Hidroksil Grupların Oluşturulması **56**

2.2.3. MUA ve MPS Kaplama **57**

2.2.3.1. Çözeltilerin Hazırlığı ve Uygulaması **60**

2.2.4. EDC / Sulfo-NHS ve Sulfo-SMCC Kaplama **61**

2.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlığı ve Uygulaması 63

2.2.5. BSA ile En Uygun Yüzey İşlevselleştirme Metodunun Belirlenmesi 64

2.2.6. *E.coli* Antikorunun İmmobilizasyonu 67

2.2.7. BSA Bloklama 68

2.2.8. *E. coli* Tespit ve Konsantrasyon Deneyleri 70

2.2.8.1. *E. coli* Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması 71

2.2.9. Seçicilik Deneyleri 72

2.2.10. İstatistiki Analiz 74

2.2.11. AFM Karakterizasyonu 75

2.2.12. %ΔRct Hesabı 75

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. BSA EIS Analizi 75

3.1.1. Metot 1 EIS Analizi 75

3.1.2. Metot 2 EIS Analizi 78

3.1.3. Metotların Kıyaslanması ve İstatistiksel Analiz 80

3.1.4. AFM Karakterizasyonu Sonuçları 81

3.2. E. coli Tespit ve Konsantrasyon Deneyleri EIS Analizi 84

3.2.1. Konsantrasyon Grafiği 91

3.2.2. Seçicilik Deneyleri ve Tekrarlanabilirlik 93

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma 95

4.2. Sonuç ve Öneriler 98

KAYNAKÇA 99

ÖZGEÇMİŞ 112

KISALTMALAR

NiTi : Nitinol

DIW : Deiyonize Su

BSA : Bovine Serum Albumin

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

MUA : 11-Mercaptoundecanoic Asit

MPS : (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane

Sulfo-NHS :N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt

EDC : N-3-Dimethylaminopropyl-N′ethylcarbodiimide hydrochloride

Sulfo-SMCC : N-Maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-Nhydroxysuccinimide ester sodium salt

SAM : Kendiliğinden Düzenlenen Tabakalar (Self Assembled Monolayer)

SH : Tiyol Grubu

COOH : Karboksil Asit

OH : Hidroksil Grubu

CFU : Coloni Forming Units

E. coli : Esherichia coli

Klebsiella pneumoniae : *K. pneumoniae*

Proteus mirabilis : *P. mirabilis*

Bacillus clausii : B. clausii

Hz : Hertz

MHz : Megahertz

I : Akım

R : Direnç

Z : Empedans

V : Gerilim

F : Frekans

Dk : Dakika

ml : Mililitre

µL : Mikrolitre

mg : Miligram

Rct : Şarj transfer direnci

% Rct: Şarj transfer direncinin yüzdesel değişimi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Yüzey işlevselleştirme metotları 54
Tablo 4.1. İmpedimetrik mikroorganizma tahlili ile ilgili son beş yılda yapılan çalışmalar tespit süresi ve analitik performanslarının karşılaştırılması 97

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Biyosensör Sınıflandırma....13
Şekil 1.2. SPR'ın çalışma prensibi....17
Şekil 1.3. QCM sensör....20
Şekil 1.4. Mikrokantilever....21
Şekil 1.5. Elektrokimyasal sensörün çalışma prensibi....24
Şekil 1.6. (A) Altın üzerinde oluşan SAM ve (B) SAM üzerinde hareket....31
Şekil 1.7. Empedans grafiği....34
Şekil 1.8. Empedans eğrisinin grafiksel ifadesi....35
Şekil 1.9. Elektrokimyasal sistemlerde en sık kullanılan eşdeğer devre modelleri....36
Şekil 1.10. EIS ölçümlerinde emoedans yanıtlarının gösterimi a) Nyquist grafiği b)Bode grafiği……..……...38
Şekil 1.11. Nitinolün sıcaklık geçişleri ve histerisiz eğrisi....40
Şekil 1.12. Şekil hafıza özelliğinin kristal boyuta etkisi....40
Şekil 1.13. a) Tek yönlü b) Çift yönlü şekil hafıza davranışı....41
Şekil 1.14. Süperelastiklikte faz dönüşümü....42
Şekil 1.15. Damar içi stent uygulaması....44
Şekil 1.16. Cerrahide kullanılan endoskopik aletler....44
Şekil 1.17.Ortodonti tedavisinde kullanılan NiTi diş teli uygulaması....45
Şekil 1.18. a) Damak açıcı ve b) Ortodontik distrakter....46
Şekil 1.19. Nitinol ortopedik zımba....46
Şekil 1.20. a) Fiksatör b) kemik içi çivi uygulaması....47
Şekil 1.21. Omurga Bileziği....47
Şekil 2.1. MPS yapısı……..…...48
Şekil 2.2. MUA yapısı....49
Şekil 2.3. Sulfo-SMCC Yapısı....49
Şekil 2.4. EDC yapısı....50
Şekil 2.5. Sulfo-NHS yapısı....50
Şekil 2.6. Deney düzeneği....53
Şekil 2.7. Nitinol ile KOH etkileşimi....57
Şekil 2.8. MUA kaplamanın yüzey ile etkileşimi....59

Şekil 2.9. MPS kaplamanın yüzey ile etkileşimi.....60
Şekil 2.10. MUA ile EDC/Sulfo-NHS Etkileşimi.....62
Şekil 2.11. MPS ile Sulfo-SMCC Etkileşimi.....63
Şekil 2.12. Metot 1 için BSA ile EDC/Sulfo-NHS Etkileşimi.....65
Şekil 2.13. Metot 1 için BSA tutulumunu gösteren model.....65
Şekil 2.14. Metot 2 için BSA ile Sulfo-SMCC Etkileşimi.....66
Şekil 2.15. Metot 2 için BSA tutulumunu gösteren model.....66
Şekil 2.16. Antikor ile EDC/ Sulfo-NHS Etkileşimi.....67
Şekil 2.17. Antikor immobilizasyonunu gösteren model.....68
Şekil 2.18. BSA bloklama.....69
Şekil 2.19. *E.coli* Tespiti.....70
Şekil 3.1.Metot 1 için 3 tekrarlı EIS sonuç grafikleri…… …...77
Şekil 3.2.Metot 1 için 3 tekrarlı EIS sonuç grafikleri.....79
Şekil 3.3. Metotların kıyaslanmasını gösteren bar grafiği.....80
Şekil 3.4. Saf Nitinolün AFM görüntüsü.....81
Şekil 3.5. Metot 1 (MUA) sonrası BSA tutulumunu gösteren AFM görüntüsü.....82
Şekil 3.6. Metot 2 (MPS) sonrası BSA tutulumunu gösteren AFM görüntüsü.....83
Şekil 3.7. 10^1 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği.....85
Şekil 3.8. (a) 10^2 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği.....86
Şekil 3.9. (a) 10^3 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği.....87
Şekil 3.10. (a) 10^4 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği.....88
Şekil 3.11. (a) 10^5 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği.....89
Şekil 3.12. (a) 10^6 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği.....90
Şekil 3.14. Seçicilik Grafiği.....93

GİRİŞ

Biyosensörler, biyolojik elementlerin algılanması ve ölçülmesi için kullanılan önemli araçlardır ve özellikle tıp, çevre bilimleri ve gıda güvenliği gibi alanlarda geniş uygulama alanı bulmaktadır. Bununla birlikte, biyosensörlerin etkinliği büyük ölçüde yüzey modifikasyonu, hassasiyet ve maliyet gibi faktörlere bağlıdır. Bu tez, biyosensörlerdeki yüzey modifikasyonu ile ilgili hassasiyet ve maliyet problemlerini ele alarak bu alandaki boşlukları doldurmayı amaçlamaktadır.

Biyosensörlerin hassasiyeti, biyolojik elementlerin yüzeye bağlanma kapasitesi ve bu yüzeydeki bağlanma etkinliği ile doğrudan ilişkilidir. Ancak, yüksek hassasiyeti elde etmek genellikle karmaşık ve maliyetli yüzey modifikasyon teknikleri gerektirir. Bu durum, biyosensörlerin geniş ölçekli üretim ve uygulama potansiyelini sınırlamaktadır. Mevcut yüzey modifikasyon teknikleri genellikle maliyetli kimyasallar ve karmaşık prosedürler içerir, bu da pratik kullanım için verimli ve uygun maliyetli çözümler bulma ihtiyacını doğurur.

İmpedimetrik elektrokimyasal sensörler, biyosensör teknolojisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu sensörlerin performansı, elektrot veya transdüserlerin elektriksel özelliklerine bağlıdır. Daha yüksek hassasiyet ve doğruluk elde etmek için, elektrot malzemelerinin yüzey işlevselleştirilmesi ve iyileştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, elektrot malzemelerinin elektriksel özelliklerini artırmak için çeşitli yüzey işlevselleştirme teknikleri geliştirilmiştir. Ancak çoğu zaman kullanılan elektrot malzemesi maaliyet açısından dezavantajlıdır.

Bu bağlamda, mevcut yüzey modifikasyonu ve işlevselleştirme tekniklerinin, biyosensörlerin hassasiyetini artırmak için yeterli olmadığı görülmektedir. Çözülmemiş bu problemler ışığında, tezimizin amacı, Nitinol malzemesinin yüzey işlevselleştirilmesi yoluyla biyosensörlerin hassasiyetini artırmak ve maliyet etkin çözümler sunmaktır.

Nitinol, biyouyumluluğu ve mekanik dayanıklılığı ile dikkat çeken bir alaşım olup, bu çalışmada ilk kez biyosensör platformu olarak kullanılmaktadır. Nitinol'ün katı halde gösterdiği atomik boyuttaki faz değişimleri ve buna bağlı olarak gelişen empedans değişimleri biyoalgılama için son derece kritik özelliklerdir. Aynı zamanda maaliyet açısından birçok elektrot materyaline göre avantajlıdır. Bu özellikleri, biyosensörlerle ilgili bahsedilen problemlerin aşılmasını sağlamaktadır.

Nitinol yüzeyine uygulanan iki farklı yüzey işlevselleştirme metodu karşılaştırarak en uygun yöntem belirlenmiştir. İlk yöntemde, Nitinol yüzeyi MUA ile kaplanmış ve ardından EDC/Sulfo-NHS kimyasalları ile işlevselleştirilmiştir. İkinci yöntemde MPS ve SulfoSMCC kullanılmıştır. Her iki yöntemin etkinliği, elektrokimyasal impedans ve atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirme, biyosensörlerin performansını artırmak ve spesifik biyolojik hedeflerin daha hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, birinci yöntemin daha yüksek duyarlılık ve doğruluk sağladığını göstermiştir. Metot 1 kullanılarak yapılan ileri deneylerde, *Escherichia coli* antikorlarının Nitinol yüzeyine başarıyla bağlandığı ve 10^1 ile 10^6 CFU/mL arasındaki *Escherichia coli ATCC 25922 suşunun* konsantrasyonlarının etkin bir şekilde tespit edilebildiği belirlenmiştir.

Bu tez, Nitinol malzemesinin yüzey işlevselleştirme tekniklerinin biyosensörlerdeki uygulamalarını araştırarak, hem hassasiyeti artırmayı hem de maliyeti düşürmeyi amaçlamaktadır. Sonuçlar, biyosensör teknolojisinde önemli bir ilerleme sağlayabilir ve gelecekteki araştırmalara temel oluşturabilir. Bu çalışma, biyosensörlerin daha geniş uygulama alanlarında kullanım potansiyelini artırarak, pratik ve ekonomik çözümler sunmayı hedeflemektedir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu

Biyosensörler, biyolojik elemanlar ile fiziksel veya kimyasal transdüserler arasında etkileşim sağlayarak spesifik analizler yapan cihazlardır. Biyomoleküller (enzimler, antikorlar, DNA parçaları vb.) veya biyolojik sistemler (hücreler, dokular) gibi biyolojik tanıyıcı elementler kullanır ve bu elementlerin hedef analitlerle olan etkileşimlerini algılar. Transdüserler ise bu biyolojik etkileşimleri elektriksel, optik, termal veya piezoelektrik sinyallere dönüştürür. Biyosensörlerin bu yapısı, onları spesifik, hassas ve hızlı ölçümler yapabilen cihazlar haline getirir. Biyosensörler, geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılır. Tıp, çevresel izleme, gıda güvenliği ve biyoteknoloji gibi birçok alanda kritik öneme sahiptir. Tıbbi teşhislerde, kan glikoz seviyelerinin izlenmesinden enfeksiyon hastalıklarının tespitine kadar çeşitli alanlarda hayati önem taşır. Çevresel izleme uygulamalarında, su ve hava kalitesinin izlenmesi için kullanılırken, gıda güvenliği alanında ise patojenlerin ve toksinlerin tespitinde rol oynar. Ayrıca, biyoteknoloji ve ilaç geliştirme süreçlerinde de kritik bir araç olarak kullanılmaktadır. Biyosensörlerin bu çok yönlü kullanımları, onları modern bilim ve teknoloji için vazgeçilmez kılmaktadır. Bu alandaki başlıca zorluklardan biri, biyomoleküler probların katı bir substrat malzemesinin üzerinde yeterli stabilite, depolama ömrü ve tekrarlanabilirlik ile immobilizasyonudur. Biyosensörlerde reseptör immobilizasyonu ve oryantasyonunun belirli bir hedefin varlığını belirleme ve bir sinyal oluşumunu etkinleştirme yeteneği, biyoalgılamanın kritik bileşenidir ve hassasiyet üzerinde direkt olarak etkilidir. Duyarlılık bakımından analit ile reaksiyona giren reseptörlerin oryantasyonu ve dağılımı en uygun şekilde düzenlenmelidir. Bu yüzey işlevselleştirme yöntemleri ile sağlanabilir. Biyosensörlerde yüzey işlevselleştirme, biyomoleküllerin sensör yüzeyine daha etkin bir şekilde bağlanmasını sağlar. Bu işlem sinyal-gürültü

oranını artırarak sensörün düşük konsantrasyonlardaki analitleri bile tespit edebilmesini mümkün kılar [1]. Metal yüzeylerin işlevselleştirilmesi, biyosensörlerin performansını artırmak amacıyla yüzeyin kimyasal veya fiziksel özelliklerinin değiştirilmesini ifade eder. Bu süreç, metal yüzeylerin biyomoleküllerle daha etkin etkileşimde bulunmasını sağlamak için yüzey modifikasyon tekniklerinin kullanılmasını içerir. İşlevselleştirme yöntemleri arasında kimyasal kaplama, elektrokimyasal yöntemler, plazma işleme ve kendiliğinden düzenlenen tabakalar (self-assembled monolayers, SAM) oluşturma gibi teknikler yer alır. Bu teknikler, yüzey enerjisini, yüzey pürüzlülüğünü ve biyouyumluluğu artırarak biyosensörlerin hassasiyetini ve özgüllüğünü optimize eder [2]. Metal yüzeylerin işlevselleştirilmesi, biyosensörlerin performansını doğrudan etkileyen kritik bir faktördür. İşlevselleştirilmiş yüzeyler, biyomoleküllerin yüzeye bağlanmasını ve hedef moleküllerle etkileşimini iyileştirir, bu da biyosensörlerin duyarlılığını ve doğruluğunu artırır. Ayrıca, işlevselleştirme, metal yüzeylerin korozyon direncini ve biyouyumluluğunu artırarak biyosensörlerin dayanıklılığını ve kullanım ömrünü uzatır. Böylece, biyosensörlerin güvenilirliği ve verimliliği artırılarak, özellikle tıbbi teşhis ve çevresel izleme gibi kritik uygulamalarda daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi sağlanır. Bu nedenle, biyosensörlerde metal yüzeylerin işlevselleştirilmesi, hem tıbbi hem de endüstriyel uygulamalar için büyük önem taşır.

Metal yüzeylerin işlevselleştirilmesi, biyosensörlerin performansını artırmak için kritik bir süreçtir, ancak literatürde bu metodolojilerle ilgili çeşitli problemler bulunmaktadır. İlk olarak tekniklerin karmaşıklığı büyük bir zorluk oluşturur. İşlevselleştirme yöntemleri çoklu adımlardan oluşur ve her aşamanın dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekir [3]. Örneğin, elektrokimyasal kaplama sırasında uygulanan voltaj, çözeltinin bileşimi ve işlem süresi gibi parametreler kaplama kalitesini doğrudan etkiler. Bu parametrelerin optimize edilmesi zaman alıcıdır ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek zor olabilir. Ayrıca, yüzey modifikasyon tekniklerinde kullanılan bazı kimyasal maddeler ve kaplama malzemeleri, biyomoleküllerle veya hücresel bileşenlerle istenmeyen etkileşimlere girebilir, bu da biyouyumluluk sorunlarına yol açabilir. Özellikle tıbbi uygulamalarda biyouyumluluğun sağlanması kritik öneme sahiptir. Metal yüzeylerin işlevselleştirilmesinde diğer bir problem ise uzun vadeli stabilite ve dayanıklılık sorunlarıdır. Zamanla, çevresel koşullar, pH değişiklikleri, sıcaklık dalgalanmaları ve mekanik stresler gibi faktörler, yüzey kaplamalarının bozulmasına

veya işlevselliklerini kaybetmesine neden olabilir. Bu durum, biyosensörlerin duyarlılığını ve doğruluğunu olumsuz etkiler. Ayrıca, metal yüzeylerde korozyon ve oksidasyon gibi sorunlar da kaplamaların etkinliğini azaltabilir. İşlevselleştirilmiş yüzeylerin uzun vadeli performansını ve dayanıklılığını artırmak için daha güvenilir ve dayanıklı kaplama yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle, literatürdeki mevcut metodolojilerin optimize edilmesi ve yeni tekniklerin geliştirilmesi, biyosensörlerin daha etkin ve uzun ömürlü kullanılabilmesi açısından büyük önem taşır.

Nitinol, nikel ve titanyum alaşımından oluşan bir malzemedir ve adını bileşenlerinden (Nickel-Titanium Naval Ordnance Laboratory) alır. Bu alaşım, benzersiz şekil hafızası ve süperelastik özellikleri ile bilinir. Şekil hafızası, belirli bir sıcaklık aralığında deformasyona uğramış Nitinolün orijinal şekline geri dönebilme yeteneğidir. Süperelastik özellik ise, büyük mekanik gerilimler altında bile kalıcı deformasyon göstermeden esneyebilmesini sağlar [4].

Bu özellikler, Nitinolu özellikle biyomedikal, uzay ve robotik uygulamalarda tercih edilen bir malzeme haline getirir. Nitinol, özellikle tıbbi cihazlarda yaygın olarak kullanılır. Stentler, kateterler, diş telleri ve ortopedik implantlar gibi medikal cihazlar, Nitinolun biyouyumluluğu ve mekanik özellikleri sayesinde daha etkin ve güvenilir hale gelir. Nitinol'ün termomekanik özellikleri, bu malzemenin kritik öneme sahip uygulamalarda kullanımını mümkün kılar. Nitinol ince filmler, termal, stres, manyetik veya elektrik alanları gibi çevresel değişikliklere karşı hassastır, bu nedenle mikrosensörlerdeki uygulamalar için ideal olabilir [5]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, Nitinol'ün güçlü elektrot özellikleri sergilediğini ve biyosensörler için uygun bir malzeme olabileceğini göstermektedir. Bu doğrultuda elde edilen bulgular, Nitinol'ün biyosensörlerde başarılı bir şekilde kullanılma potansiyeline dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Günümüze kadar Nitinol malzeme üzerindeki yapılan yüzey işlevselleştirme çalışmaları daha önce bahsedilen yüzey işlevselleştirme yöntemleriyle benzerdir. Bunlardan kimyasal kaplama için genellikle titanyum dioksit (TiO_2) kaplamaları, biyouyumluluğu artırmak için yaygın olarak denenmiştir [6,7]. Başka bir çalışmada Nitinol'ün kalp stentleri ve ortopedik implantlarda kullanımına yönelik daha iyi malzeme-hücre etkileşimleri, biyomineralizasyon ve antibakteriyel aktivite gibi biyolojik özelliklerin

iyileştirilmesi için kimyasal biriktirme yöntemleri denenmiştir. Nitinol'ün biyolojik özellikleri üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Araştırmacılar Ar-Ge faaliyetlerinin verimli olduğunu ancak kaplamalı Nitinol'ün klinik kullanımından önce yapılması gereken daha fazla çalışmaya ihtiyacı olduğunu belirtmişlerdir [8]. Bu konuda yapılan bir başka çalışma ise endodontide kullanılmak üzere Nitinol aletler için ısıl işlemle yüzey işlevselleştirmeyi içerir [9]. Nitinol gibi malzemelerde ısıl işlemle yüzey işlevselleştirmesi yaparken, yüksek sıcaklıkların malzeme stabilitesini etkileyebileceği ve istenmeyen faz dönüşümlerinin meydana gelebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, işlem sırasında kontrol edilemeyen özelliklerin yanı sıra yüzey pürüzlülüğü ve kimyasal kirlenme gibi sorunlar da dikkate alınmalıdır. Kaplama oluşturmak için plazma işleme tekniğini kullanan bazı çalışmalarda mevcut olmakla birlikte bu yöntem malzeme yüzeylerini iyileştirmekte etkilidir ancak optimize edilmiş parametreler gerektirir ve homojen işleme zorluklarıyla karşılaşabilir. Ayrıca, istenmeyen termal etkiler, kimyasal reaksiyonlar ve yüksek işlem maliyeti gibi sorunlar, işlem verimliliğini olumsuz yönde etkiler [10]. Nitinol üzerinde kendiliğinden birleşen tek tabakaların oluşumunun incelenmesi yani SAM üzerine yapılmış çalışmalardan elde edilen bulgulara göre yüzeydeki kimyasal fonksiyonel gruplar belirlenerek spesifik biyomoleküllerin bağlanması sağlanmıştır. Bu yöntem, yüzeyin kimyasal özelliklerini hassas bir şekilde kontrol etmeye olanak tanımıştır [11,12].

Yöntemlerin her biri metal yüzeylerin biyosensör uygulamaları için işlevselleştirilmesinde farklı avantajlar ve zorluklar sunmakla birlikte. Nitinol malzemenin yapısı düşünüldüğünde bu çalışmada kullanılan SAM yöntemi Nitinol'ün işlevselleştirilmesinde en uygun yöntemdir. Çünkü yüzeyin kimyasal özelliklerini hassas bir şekilde kontrol etmeye olanak vermesi ile istenilen fonksiyonel grupların düzenli ve homojen bir şekilde bağlanmasını sağlar. Ayrıca kaplama sürecinin basitliği, düşük maliyeti, yüksek çözünürlüklü ve ölçeklenebilir uygulanabilirliği ile de öne çıkar. Bunların yanı sıra bu yöntem yüzeyin biyolojik uyumluluğunu ve mekanik dayanıklılığını artırarak kaplamanın uzun vadeli stabilitesini korumasını sağlar ve Nitinol'ün biyosensör performansını iyileştirmeye yardımcı olur.

Metal yüzeylerin kaplanmasında (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPS) ve 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) yaygın olarak kullanılan kimyasal bileşiklerdendir [13,14]. MUA, bir ucunda tiyol (-SH) grubu ve diğer ucunda karboksil (-COOH) grubu içeren 11 karbonlu bir zincirden oluşur. MUA'nın tiyol grubu, metallerin yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır. Karboksil grubu yüzeyin üstünde serbest kalır ve bu gruba ara bağlama ajanı EDC/Sulfo-NHS kullanılarak biyomoleküller bağlanabilir [40]. Böylece metal yüzeyi amin reaktif olarak işlevselleştirilmiş olur. MPS(3-mercaptopropyltrimethoxysilane), bir ucunda tiyol (-SH) grubu ve diğer ucunda trimetoksisilan ($-Si(OCH_3)_3$) grubu içeren bir moleküldür. Tiyol grubu, metallerle güçlü kovalent bağlar oluşturabilir. MPS ve Sulfo-SMCC (Sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), yüzey işlevselleştirme ve biyomolekül immobilizasyonu için birlikte kullanıldığında güçlü bir kombinasyon oluşturur. Bu iki bileşik, farklı yüzeylerin biyomoleküllerle (proteinler, antikorlar, vb.) kaplanması için kullanılır. MPS kaplanmış yüzeydeki tiyol grupları Sulfo-SMCC ile aktive edilir [15]. İşlevselleştirilmiş metal yüzey, biyosensörler, biyomedikal cihazlar gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilir.

Bu çalışmada Nitinol'ün MUA ve MPS kaplama ajanları ile yüzeyinin işlevselleştirilmesi, biyosensör uygulamalarında istenilen özellikleri sağlamak ve bahsedilen problemlere çözüm için kullanılmıştır. Yüzey işlevselleştirme çalışmalarının yürütüldüğü Nitinol malzemenin benzersiz süperelastiklik ve biyomoleküler adsorbsiyon özelliklerinden yararlanılarak empedans değişimlerine olan frekans yanıtları ölçümlenmiştir. Metallerin yüzey işlevselleştirmesinde kullanılan MPS ve MUA kaplama ajanlarından hangisinin Nitinol için daha iyi sonuç verdiği araştırılmıştır. Böylece biyosensör uygulamaları için en uygun yüzey işlevselleştirme metodu karakterizasyon ile tespit edilmiştir. En verimli metot belirlenirken reseptör olarak bir mikroorganizmaya ait antikor, kaplama sonrasında yüzeye sabitlenerek oryantasyonu ve dağılımı düzenlenmiştir. Kaplama yapılmış Nitinol sensörlerin etkinliği mikroorganizma içeren farklı dilüsyonlarda hazırlanmış seyreltik çözeltiler içerisinde sınanmıştır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Biyosensör uygulamaları için Nitinol malzemenin yüzey işlevselleştirme karakterizasyonu ve optimizasyonu üzerine yapılan bu tez çalışmasının amacı, Nitinol yüzeyini biyosensör uygulamaları için uygun hale getirmek aynı zamanda biyosensörlerde etkin ve uzun ömürlü kullanımını sağlamak için gerekli yüzey modifikasyon tekniklerini ve parametrelerini belirlemektir. Bu bağlamda belirlenen parametreleri optimize ederek en iyi performans gösteren yüzey modifikasyon protokolünü saptamakta hedefler arasında yer almaktadır. Biyosensörler, özellikle tıbbi teşhis, çevresel izleme ve biyoteknoloji gibi alanlarda büyük önem taşımaktadır. Bu cihazlar, biyolojik bileşenlerin algılanması ve ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır ve duyarlılıkları, yüzey işlevselleştirme teknikleri ile doğrudan ilişkilidir. Nitinol, şekil hafızası ve süperelastik özellikleri nedeniyle biyosensör uygulamaları için potansiyel bir malzeme olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Nitinol tel üzerine yapılan MPS (3-mercaptopropyltrimethoxysilane) ve MUA (11-mercaptoundecanoic acid) kaplamalarının karakterizasyonu ve bu kaplamaların *E. coli* tespitinde biyosensör performansına olan etkilerini araştırmaktır.

Ayrıca bu parametrelerin optimize edilmesiyle, biyosensörlerin duyarlılığını, doğruluğunu ve uzun vadeli stabilitesini artıran bir tespit platformunun oluşturulması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda yüzey işlevselleştirilmesi ile biyosensörlerin performansı artırılarak, sinyal-gürültü oranının iyileştirilmesi, daha düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tespiti ve genel sensör hassasiyetinin artırılmasıyla biyomoleküllerin hızlı tespiti sağlanmıştır. Böylece farklı yüzey işlevselleştirme tekniklerinin Nitinol üzerindeki etkileri analiz edilirken, biyosensörler için aranılan özellikler olan düşük tespit limiti, geniş doğrusal aralık, tekrarlanabilirlik ve kararlılık sağlanması amaçlanmıştır.

Nitinol, yüksek esneklik, süperelastik özellikler ve biyouyumluluk gibi benzersiz özellikleri nedeniyle tıbbi cihazlar ve implantlar için ideal bir malzemedir. Bu özellikler, biyosensörler gibi hassas ölçüm cihazlarında kritik önem taşır. Yüzey işlevselleştirme ile Nitinol'ün bu üstün özellikleri korunarak aynı zamanda biyosensörlerin performansını ve güvenilirliğini artırmak hedeflenmiştir.

Özellikle tıbbi uygulamalar için biyouyumluluğun artırılması, hücresel bileşenler ve biyomoleküllerle istenmeyen etkileşimlerin en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, Nitinol yüzeyinin çevresel koşullara, pH değişikliklerine, sıcaklık dalgalanmalarına ve mekanik strese karşı dayanıklılığını artıracak olan ideal kaplama yönteminin belirlenmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır.

1.3. Araştırmanın Önemi

Bu tez çalışması, biyosensör teknolojilerinin gelişimine katkı sağlayacak ve Nitinol gibi biyomedikal alanda önemli bir malzemenin daha etkin bir şekilde kullanılmasını mümkün kılacaktır. Nitinol'ün biyosensör olarak ilk kez kullanılması çalışmaya alanında öncü niteliği katmaktadır. Nitinol yüzeyinin işlevselleştirme teknikleri ile nasıl optimize edilebileceğini ve bu optimizasyonun biyosensör performansı üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. SAM tekniği kullanılarak MPS ve MUA kaplamalarının detaylı analizi yapılmış ve Nitinol yüzeyinin biyouyumluluğunu aynı zamanda dayanıklılığını artırma yolları belirlenmiştir. Böylece biyosensörlerin duyarlılık ve doğruluk düzeylerini önemli ölçüde iyileştirerek, daha düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tespit edilmesini mümkün kılmıştır. Ayrıca, yüzey modifikasyon tekniklerinin optimize edilmesi, sensörün uzun vadeli stabilitesini ve dayanıklılığını artırarak, biyosensörlerin geniş bir yelpazede daha güvenilir bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bu nedenle araştırma, biyosensör teknolojilerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynamakta ve sağlık alanında önemli ilerlemeler için temel oluşturmaktadır. Geliştirilen sistem biyomoleküllerin tespitini hızlı ve duyarlı bir şekilde yapabilmeye olanak sağlamaktadır.

Biyosensör uygulamaları için Nitinol malzemenin yüzey işlevselleştirme karakterizasyonu ve optimizasyonu, biyoteknoloji ve tıp alanlarında büyük bir yenilik potansiyeli taşımaktadır. Tez kapsamında üretilen biyosensör canlılarda patojen varlığı ve seyrinde kullanılacak hassas, gerçek zamanlı, hızlı ve kararlı bir tanı platformudur. Ayrıca Nitinol'ün temini kolay ve düşük maliyetli bir alaşım olması sistemin ekonomik olmasını sağlamıştır. Bu durum ileride çalışmanın geliştirilmesiyle kapsamlı sağlık kuruluşlarının bulunmadığı bölgelerde ve hatta yerinde bakım (Point Of Care, POC) testi şeklinde hasta başında, kişinin kendi kendini testinde kullanılabileceği tanı kitleri geliştirmek için önemli bir alt yapı sağlayacağı ve klinik kullanıma çevrilebileceği ön

görülmektedir. Böylece, medikal teşhisler ve sürekli sağlık izleme gibi uygulamalarda daha güvenilir sonuçlar elde edilecektir.

Üretilen platform canlılarda hastalık yapıcı patojenlerin ve mikrooragnizmaların tespitinde kullanılabilecek bir biyosensörün de temelidir. Yüzey işlevselleştirmenin etkinliğinin sınamada kullanılan patojen olan *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli),* Dünya toplumunda hala oldukça sık görülen bir sağlık sorunu olan üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) gibi hastalıklarda, en sık görülen üropatojendir. *E.coli* tipleri içinde bulundukları hayvan için zararsız olmalarına rağmen insana geçtiklerinde hastalık yapabilirler. Bu hastalıklar arasında başlıca ishalli hastalıklar olmakla beraber üriner sistem enfeksiyonları ayrıca menenjit, peritonit, pnömoni, septisemi ve mastit vardır [16]. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 7 milyon doktor ziyareti ve 1 milyar dolardan fazla sağlık maliyetine neden olan üriner sistem enfeksiyonlarının insidansı, kişi başına yılda 0.5 - 0.7 olarak rapor edilmektedir. Bu enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan bakteri, *Enterobacteriaceae* ailesinden *E. coli* olup, bu grup enfeksiyonların %70-95'inden sorumludur [17]. Ülkemizde yılda yaklaşık olarak 5 milyon kişi sistit diğer adıyla mesane iltihabı atakları geçirmektedir. Bu enfeksiyonlardan en sık (%50-90) izole edilen bakteri *E.coli*'dir. ÜSE çocuklarda en sık görülen enfeksiyon hastalıklarından birisidir [18]. Çocuk acil servislerine gelen hastaların %5-14'ünü ÜSE oluşturur [19]. ÜSE yenidoğan dönemden başlayıp geriatrik dönem de dâhil olmak üzere her yaş grubunda görülen, hastane ya da toplum kaynaklı enfeksiyonların içerisinde klinikte en sık karşılaşılan hastalıklardandır [20]. Tüm dünyada hayatı tehdit edebilecek ciddi enfeksiyonlarında dâhil olduğu geniş bir yelpazede görülebilmektedir. Önemli bir morbidite sebebi olarak ortaya çıkmaktadır [21, 22].

Dünyada yaygın bir sağlık sorunu olan ve oldukça sık görülen üropatojenin *E. coli* olması, hastalığın tanı ve tedavisi için *E. coli* suşlarının hızlı ve doğru şekilde tespit edilmesinin önemini vurgulamaktadır. Tespitin yapılmasını sağlayacak tanı kitlerinin geliştirilmesi için bu çalışmada üretilen biyosensör önemli bir alt yapı sağlayabilir. Buna bağlı olarak, morbiditesi bu denli yüksek olan hastalık etkeni ve diğer hastalık yapıcı mikroorganizmalar ile mücadelenin temel gereksinimi olan pozitif kişilerin doğru saptanması ihtiyacı karşılanarak, toplumda yayılım hızının ve neden olduğu yıkıcı etkilerin önemli ölçüde sınırlandırılmasının önü açılmış olacaktır.

E. coli'nin belirlenmesinde kullanılan birçok yöntem arasında, konvansiyonel yaklaşımlar hâlâ yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu yaklaşımlar arasında mikroskobik tanı, biyokimyasal analizler ve serolojik testler bulunmaktadır. Ancak, bu geleneksel yöntemler genellikle zaman alıcıdır, birkaç gün sürebilir ve çoğu zaman yeterli hassasiyet sağlamaz. Son yıllarda, moleküler teknikler bu sınırlamaları aşmak için ön plana çıkmıştır. Özellikle PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve real-time PCR, hızlı, duyarlı ve spesifik teknikler olarak öne çıkmaktadır. Buna rağmen, bu yöntemler genellikle karmaşıktır, pahalı ekipman gerektirir ve deneyimli uzmanlar tarafından uygulanması gerekir. Ayrıca, PCR sürecinde kullanılan Taq DNA polimeraz enzimi, biyolojik örneklerde bulunan inhibitörler nedeniyle inaktive olabilir. Biyosensör teknolojisi, diğer tekniklere kıyasla son derece hassas, hızlı ve kullanıcı dostu bir algılama yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Günümüzde biyosensörler, bakterilerin hassasiyetle tespit edilmesinde ve patojenlerin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüksek hassasiyet, özellikle nanomalzemelerin biyosensörlerde ve algılama prensiplerinde oynadığı kritik rolden kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal sensörlerin bir diğer önemli avantajı ise, mikrolitre düzeyinde hacimlerin çok kısa sürelerde analiz edilebilmesidir [23,24].

Elektrokimyasal biyosensörler, patojenik bakterilerin tespitinde etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu biyosensörler, biyolojik algılama işlemlerinde hızlı ve güvenilir sonuçlar sunar ve bu nedenle mikrobiyal patojenlerin tespitinde güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir [25].

Literatürde, biyosensörlerin mikrobiyal kontaminasyonun erken tespitinde güçlü bir araç olduğunu belirtiyor. Ayrıca, geleneksel tespit yöntemlerinin zaman alıcı ve karmaşık olabileceğini, ancak biyosensörlerin bu süreçleri hızlandırarak, daha güvenilir ve pratik çözümler sunduğunu ifade ediliyor. Bu sensörlerin, özellikle çevresel ve gıda kaynaklı E. coli kontaminasyonlarını hızlı bir şekilde belirlemede kritik bir öneme sahip olabileceği belirtiliyor [26, 27].

1.4. Metal Yüzeyli/Transdüserli Biyosensörler

Doğada var olan canlılar, bulundukları çevrede meydana gelen değişimleri algılarlar ve bu değişimlere uyum sağlayarak yaşam alanlarına adapte olurlar. Bu davranışları

sayesinde, dış tehlikelere karşı koruyucu bir kalkan oluşturmak amacıyla genellikle saf enzimler, dokular ve mikroorganizmalar gibi doğal sensörleri kullanırlar [28]. Araştırmacılar, canlılardaki doğal algılama mekanizmalarını (kulak, deri, göz, burun, dil) model alarak laboratuvar ortamında simüle etmeye çalışırlar. Bu biyolojik olayların elektriksel sinyale dönüştürülmesiyle biyosensörler geliştirilir. Canlılar, yaşam süreçlerinde gerçekleşen uyarıları algılamak için biyolojik veya kimyasal maddeleri en temel bileşenlerine ayırır ve bileşenler dâhil aralarındaki ilişkiler, bir bütün şekilde incelenir. Bu araştırmalar neticesinde elde edilen sistemler, biyosensör yapıların oluşmasına olanak sağlar [29].

Biyosensörler; daha çok biyolojik tahliller için kullanılan özel sensörlerdir ve International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren sistemler" olarak betimlenmektedir.

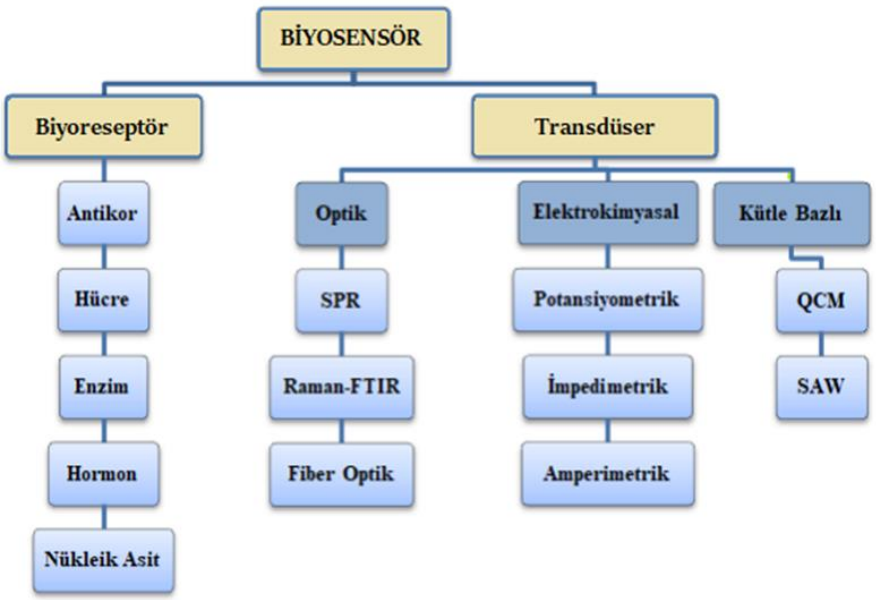
Biyosensörler, kimya, biyoloji, mühendislik, fizik ve biyokimya gibi birçok bilim dalından edinilen bilgi birikimlerinin kullanılmasıyla geliştirilmiş, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özelliklerinden yararlanılarak, elektronik işlem yeteneklerini bir araya getiren biyoanalitik cihazlardır. Bu cihazlar, çoklu disiplin çalışmaların sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Son yıllarda mikro ve nano elektronik alanında artan araştırmalar, biyolojik moleküllerin olağanüstü duyarlılıkla tepki verebilme yeteneklerinin keşfedilmesiyle biyosensör teknolojilerinin hızla ilerlemesine yol açmıştır. Bu gelişmeler sayesinde; tıp, eczacılık, gıda güvenliği, çevre kirliliği ve askeri uygulamalar gibi birçok alanda kullanılmak üzere çeşitli biyosensör türleri geliştirilmeye başlanmıştır [30].

Biyosensör uygulamalarında, incelenecek veya analiz edilecek madde ve yapılar analit olarak adlandırılır. Diğer bir değişle analit, analitik prosedürde hedef alınan ve tespiti amaçlanan kimyasal içeriktir. Biyosensörler, analitlerin konsantrasyonuna orantılı olarak ölçülebilir sinyaller üreten, biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü ile entegre edilmiş cihazlardır. Biyolojik materyal, analiz edilecek bileşenle etkileşime girer. Çeşitli dönüştürücülerin kullanımıyla anlamlı sinyaller elde edilir ve analitin miktarı belirlenir [31]. Bu süreç, biyokimyasal yanıtın okunup fiziksel, kimyasal veya elektriksel sinyallere dönüştürülmesiyle gerçekleşir. Biyosensörleri oluşturan iki temel bileşen

biyoreseptör ve dönüştürücüdür. Biyoreseptörler, analiti tanıyan biyomoleküllerdir. Bunlar enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve hormonlar gibi yapılar olabilir. Dönüştürücüler ise biyoreseptörlerin analiti tanıması sonucu ürettiği fiziksel veya kimyasal sinyali elektrik sinyallere çeviren yapılardır [32]. Biyosensörlerin işleyişinde anahtar rol oynayan biyoreseptörler, analit ile seçici olarak etkileşime girerler.

Biyosensörlerde, birlikte çalışan biyokimyasal ve elektrokimyasal özellikteki iki temel yapı bulunur. Biyokimyasal kısım, analiz edilecek maddeyle etkileşime girerek onun tanınmasını sağlar ve bu süreçte biyokimyasal ürünler oluşabilir. Biyosensörlerin elektrokimyasal kısmındaysa tanıma işlemiyle elde edilen veri okunabilir veya ölçülebilir sayısal değere dönüştürülür [33]. Biyosensörler, biyoreseptör veya dönüştürücü türlerine göre çeşitli kategorilere ayrılabilir Şekil 1.1. de görüldüğü gibi sınıflandırılabilir.



Şekil 1.1. Biyosensör Sınıflandırma

Biyosensörler, maddeye seçici, hızlı ve devamlı bir şekilde tepki vererek işlevlerini gerçekleştirirler. Bu yapılar, uzun süreli depo kararlılığı, kısa tespit süresi ve seçicilik gibi birçok üstün özelliklere sahiptir. Yüksek tekrarlanabilirlikleri sayesinde,

laboratuvar ortamlarında kolaylıkla uygulanabilirler. Bu yöntemin uygulanması fazla zaman almaz ve ölçüm işlemleri sırasında adım sayısı az olduğu için yüksek maliyetli cihazlara ve çeşitli kimyasal materyallere ihtiyaç duyulmaz.

İdeal bir biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken çeşitli statik ve dinamik özellikler vardır. Bu özellikler, biyosensörün performansını ve etkinliğini belirlemekte kritik rol oynar. İdeal bir biyosensör tasarımında göz önünde bulundurulması gereken ana özellikler şunlardır:

Seçicilik: Biyoreseptörün karışım içindeki belirli bir analiti tanıyabilme yeteneğidir. Seçicilik, biyoreseptör seçiminde en önemli kriterdir, çünkü doğru analiti seçebilme kabiliyeti biyosensörün doğruluğunu ve güvenilirliğini direkt olarak etkiler.

Tekrarlanabilirlik: Biyoreseptör ile analit arasındaki biyo-tanıma işleminin sürekli ve güvenilir bir şekilde tekrarlanabilmesidir. Biyosensörün çevirici ve sinyal işleyici bileşenlerinin hassasiyeti ile doğrudan ilişkilidir.

Hassasiyet: Biyosensörün, biyo-tanıma işlemi sonucunda elde edilen sonuçları, tekrarlanan ölçümlerde tutarlı bir şekilde üretebilme yeteneğidir.

Kararlılık: Biyo-tanıma işleminin sistem içindeki ve çevredeki değişimlere ne kadar duyarlı olduğunu ifade eder. Kararlılık, ölçülen sinyalin doğruluğu ile ilişkilidir ve biyosensörün uzun vadeli performansını etkiler.

Duyarlılık: Biyosensörün algılayabildiği en düşük analit konsantrasyonudur (LOD). Duyarlılık, biyosensörün ne kadar küçük miktarları tespit edebileceğini belirler.

Doğrusallık: Ölçülen sinyalin doğruluğunun matematiksel olarak ifade edilmesidir. Doğrusallık, biyosensörün ölçüm sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlar.

Bu özellikler, biyosensörlerin tasarımında dikkate alınarak, etkin ve güvenilir ölçümler yapabilen sistemlerin geliştirilmesine yardımcı olur.

Metal yüzeyli biyosensörler, biyomoleküllerin tespiti için kullanılan ve metal yüzeylerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanan sensörlerdir. Bu biyosensörler, yüksek iletkenlik, yüzey plazmon rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR) ve katalitik

aktivite gibi özellikleri nedeniyle çeşitli biyomedikal ve çevresel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır.

Metal yüzeyli biyosensörler arasında optik, kütle hassas ve elektrokimyasal sensörler bulunmaktadır. Kütle hassas sensörler, genellikle altın tabanlı Kuartz Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance, QCM) sensörlerdir ve bu yüzeyler kovalent bağlanma metodolojileri kullanılarak işlevselleştirilebilirler. QCM sensörler, nanogram düzeyinde kütle değişikliklerini tespit edebilme avantajına sahipken, sıvı fazda çalışma zorlukları ve viskoelastik değişimlerin ölçüm hassasiyetini etkilemesi gibi eksik yönleri vardır.

Elektrokimyasal sensörler, platin ve bakır tabanlı yüzeyler üzerine inşa edilebilir. Platin yüzeyler yüksek katalitik aktiviteye sahip olup, yüzeyleri nanopartiküllerle işlevselleştirerek biyomolekül bağlanmasını artırırlar. Bakır tabanlı sensörler ise elektrostatik etkileşimler ve van der waals kuvvetleri ile işlevselleştirilir. Elektrokimyasal sensörler hızlı tepki süresi sunar, ancak bakır yüzeylerin oksidasyona yatkınlığı ve platin yüzeylerin biyolojik kirlenmeye karşı duyarlılığı gibi dezavantajları vardır.

Literatürde kullanılmış olan diğer metallerden farklı olarak Nitinol'ün kullanımı biyosensör uygulamalarında birçok avantaj sunar. En dikkat çekici özelliği süperelastik yapısıdır; bu özellik, Nitinol'ü yüksek deformasyonlara maruz kaldığında bile orijinal şekline geri dönebilir hale getirir, bu da esnek ve dayanıklı biyosensörlerin geliştirilmesini sağlar. Termal hafıza yeteneği, belirli sıcaklıklarda orijinal şekline dönmesini mümkün kılar, bu da sıcaklık değişimlerine duyarlı sensörlerde avantaj sağlar. Nitinol ayrıca biyouyumlu olup, insan vücudu ile uyumlu olduğundan implantlarda yaygın olarak kullanılır, bu da biyosensörlerin vücut içinde uzun süreli kullanımına olanak tanır. Korozyon direnci sayesinde paslanmaz ve biyolojik ortamda kararlıdır, bu da sensörün uzun süre güvenilir şekilde çalışmasını sağlar. Nitinol yüzeyi çeşitli biyomoleküllerle kaplanabilir ve fonksiyonelleştirilebilir, bu da spesifik biyolojik hedeflerin algılanmasında etkili olmasını sağlar. Yüksek mekanik mukavemeti ile zorlu koşullarda bile güvenilir performans sunar. Tüm bu özellikler, Nitinol’ü biyosensör uygulamalarında diğer metallerden daha üstün kılabilir, özellikle de esneklik, dayanıklılık ve biyouyumluluk gerektiren uygulamalarda.

1.4.1. Optik Temelli Biyosensörler

Optik tabanlı biyosensörler, gönderilen ışığın yansıması, saçılması veya kırılması gibi dalga boyu değişimlerine dayanan bir çalışma prensibine sahiptir. Bu sensörlerde kullanılan ışığın dalga boyu, enerjisi ve kırınımları, kullanılan tanıma yöntemlerine göre değişiklik gösterebilir. Bir ışık demeti oluşturulduktan sonra, bu ışık bir fotodetektör tarafından algılanır. Işığın fotodedektöre ulaşmasıyla birlikte optik bileşenlerde bir akım oluşur ve bu akım genellikle bir gerilim sinyaline dönüştürülerek ölçüm yapılır. Optik biyosensörlerin temel bileşenleri arasında ışık kaynağı, optik yönlendirme elemanları, algılayıcılar ve fotodedektörler bulunur.

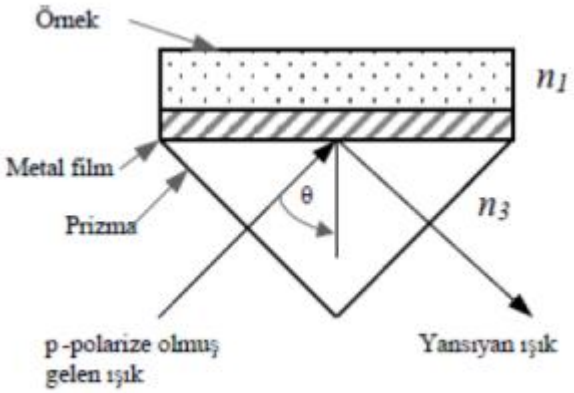
Optik biyosensörlerin çoğu yüzeyindeki reseptör analit arasındaki etkileşimlerin sonucu yüzey özelliklerinin değişimindeki ölçümleri esas almaktadır. Yüzey plazmon rezonans, adsorpsiyon, floresans gibi çeşitli fiziko/kimyasal olaylar kullanılmaktadır. Makro ölçekli analitik kimyada en anlaşılır teknik görünür bölge UV adsorpsiyon spektrofotometresidir. Bu yöntemde, analitin tespiti için kalorimetrik uygulamalar kullanılır. Tespit için renkte veya optik yoğunlukta meydana gelen değişiklikler yeterlidir. Floresan tespit, optik temelli tespit yöntemlerinden yaygın olarak kullanılan biridir. Diğer tekniklere göre yüksek seçicilik sağlar ve ayırt edici işaretleme teknikleri kullanılabilir. Ayrıca, birçok farklı florofor seçeneği mevcuttur, bu da çeşitli uygulamalarda kullanım esnekliği sağlar. Ancak, floresan boyaların maliyeti diğer tekniklere göre genellikle daha yüksektir. Ayrıca, kimyasal stabilite ve sınırlı raf ömrü gibi faktörler de bazı dezavantajlar olarak gösterilebilir [34].

1.4.1.1. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler (SPR)

Yüzey plazmon rezonansı (SPR), ilk olarak 1902 yılında gözlemlenmiş olup, yüzey plazmon fiziğini anlamak için uzun yıllar boyunca çalışılmış bir fenomendir. Biyomoleküler etkileşimleri tespit etmek amacıyla ilk kez 1983 yılında SPR temelli bir sensör olarak kullanılmıştır [35]. Bu yöntem, patojen tespiti için yaygın olarak kullanılan yansıtma spektroskopisiyle çalışır ve metal yüzeyin yakınındaki kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçümler yapar.

SPR yönteminde, genellikle altın veya gümüş gibi bir metal film kullanılarak, geçirgenlik ve farklı kırılma indisine sahip iki ortam arasında düzlem polarize ışık ile

çalışılır. Işık, belirli bir açıyla daha yüksek kırılma indisine sahip ortama girdiğinde iç yansıma oluşur. Bu durumda, metal filmin içine nüfuz eden ışık, belirli bir açıda metal yüzeyinde serbest elektronların yüzey plazmonlarını oluşturmasına neden olur. Bu plazmonlar, yansıyan ışığın yoğunluğunu azaltır. Bu olaya yüzey plazmon rezonansı denir ve etiketsiz olarak doğrudan tespit yapmak için kullanılabilir bir yöntemdir.



Şekil 1. 2. SPR'ın çalışma prensibi

Günümüze kadar yapılmış çalışmalar incelendiğinde SPR biyosensörlerde yüzey işlevselleştirme sırasında karşılaşılan başlıca sorunlar arasında, yüzey kaplamasının homojenliği ve stabilitesi yer alır. Bir araştırma grubu tarafından vurgulanan problem, biyomoleküllerin yüzeye spesifik ve seçici bir şekilde bağlanmasının sağlanmasıdır. Bu bağlanma süreçleri, biyolojik kirlenme gibi sorunlara yol açabilir ve istenmeyen protein adsorpsiyonu, sensör yüzeyinde kirlenmeye neden olarak yanlış pozitif veya negatif sonuçlara yol açabilir [36]. SPR sensörlerde özellikle altın ve gümüş yüzeyler kullanıldığı görülür. Bu sensörler, yüzeylerinde SAM kullanılarak kimyasal olarak işlevselleştirilebilirler, bu da biyomoleküllerin spesifik bağlanmasını sağlar. Ancak, gümüş yüzeyler oksidasyona karşı hassas olup stabilite sorunları yaşayabilirken, altın yüzeyler çevresel değişimlere duyarlıdır. 2009 da yapılan bir çalışmanın araştırmacıları yüzey işlevselleştirme sırasında kullanılan kimyasalların saflığının ve substratın temizliğinin kritik önemde olduğunu, aksi takdirde yüzeydeki kusurların ve

kontaminasyonun sensör performansını ciddi şekilde azaltabileceğini belirtmektedir [37]. Tüm bu sorunlar, SPR biyosensörlerin etkinliğini sınırlayan önemli zorluklardır.

1.4.1.2. Optik Fiber Biyosensörler

Optik fiber biyosensörler, biyolojik analitlerin tespiti ve ölçümü için optik fiber teknolojisini kullananırlar. Bu sensörler, ışığın fiber içindeki iletimi prensibine dayanarak çalışır ve biyolojik bir tanıma elemanının (örneğin enzim, antikor veya DNA probu) optik fiberin uç veya yüzeyine immobilize edilmesiyle oluşturulur. Biyoreseptör ile hedef analit arasındaki etkileşim, ışığın özelliklerinde (örneğin yoğunluk, faz, polarizasyon veya dalga boyu) bir değişikliğe neden olur ve bu değişiklik, optik fiber boyunca taşınarak algılanır [38]. Optik fiber biyosensörlerin, yüksek duyarlılık, hızlı tepki süresi ve küçük boyut avantajları olmasına karşın çevresel gürültü ve parazitlerden etkilenebilir, bu da ölçümlerin hassasiyetini düşürebilir. Aynı zamanda optik fiberler oldukça kırılgandır ve fiziksel darbelere karşı dayanıklı değildir ve genellikle dar bir dinamik aralıkta çalışır, bu da geniş konsantrasyon aralıklarını ölçmeyi zorlaştırabilir. Optik fiber biyosensörlerde yüzey işlevselleştirmenin yapıldığı bir çalışma, yüzeyin DNA probu ile işlevselleştirmesini ele alır. Bu çalışmada, optik fiber yüzeyi, belirli bir DNA dizilimi ile uyumlu olan kısa tek sarmallı DNA prob molekülleriyle kaplanmıştır [39]. Bu tür bir yüzey işlevselleştirme tekniği, yüksek duyarlılık ve seçicilik sağlar, çünkü sadece belirli DNA dizilimleriyle uyumlu olan hedefler tespit edilir.

Bu konuda yapılan başka bir çalışmada, zearalenon (ZEN) adlı bir mikotoksinin hızlı tespiti için evanesan dalga temelli optik fiber aptasensör geliştirilmesidir. Bu sensörde, ZEN-spesifik aptamer, fiber üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Ayrıca, Tween 80 kaplaması kullanılarak sensörün hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği artırılmıştır [40].

1.4.2. Kütle Temelli Biyosensörler

Kütle bazlı biyosensörler, bir biyomolekülün kütlesindeki değişiklikleri algılayarak analiz yapan sensörlerdir. Bu tür sensörler, biyomolekül etkileşimlerinin neden olduğu kütle değişikliklerini ölçer ve bu değişiklikleri elektriksel veya mekanik sinyallere dönüştürür**.** Bu biyosensörler, sistemdeki kütle değişikliklerini rezonans frekansındaki

değişimlerle ölçer. Bu sensörlerde, piezoelektrik malzemeler kullanılır ve bu malzemelere uygulanan mekanik basınç, elektriksel potansiyelin değişmesine neden olur. Kütlenin artmasıyla hareket kabiliyetinde azalma meydana gelir ve rezonans frekansında azalma söz konusu olur. Kütle azaldığındaysa frekansta artış meydana gelir. Kütle temelli biyosensörler içerisinde QCM ve kuartz ayar çatalları yer alır. QCM, biyosensörlerle çalışılmasının avantajlı durumları olmasına rağmen çoğunlukla altın yüzey ile kaplı olduğundan maaliyet açısından dezavantajlıdır. Kuartz ayar çatal sensörlerinde bakır elektrot mevcuttur bu yüzden özellikle kan vb. biyolojik sıvı ortamlarda kullanılması sakıncalı olabilir. Çoğu zaman modifiye edilmesi gerekmektedir.

1.4.2.1. Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM)

Kuarz kristal üzerinde altın kaplamalı olarak çalışan QCM (Quartz Crystal Microbalance), piezoelektrik özellik gösterir. Bu cihaz, belirli bir elektriksel sinyal uygulayarak kristalde rezonans frekanslarında titreşim oluşturur. Bu titreşimler, kristalin kütlesindeki çok küçük değişiklikleri hassas bir şekilde ölçmeye yarar. Bu özellikleriyle QCM, kütle algılama ve yüzey etkileşimlerinin izlenmesi gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır. QCM (Quartz Crystal Microbalance) sensörleri, genellikle altın kaplı kuvars disklerden oluşur. Kuvars kristali, piezoelektrik özellik gösterdiği için, üzerine uygulanan bir voltajla kristal içinde bir yer değiştirme oluşur ve rezonans frekansında titreşim başlatılır. Bu sensörler, her iki tarafında elektrot bulunan ince kuvars disklerdir.

Sensörün çalışma prensibi şu şekildedir:

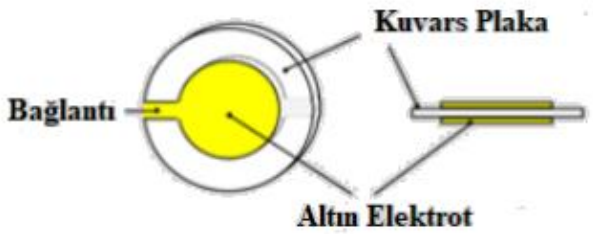
1. **Voltaj Uygulama:** Kuvars disk üzerindeki elektrotlara bir voltaj uygulanır. Bu voltaj, kristalin içinde piezoelektrik etkiyi tetikler ve kristalde yer değiştirme meydana getirir.

2. **Rezonans Salınımı:** Elektrotlara uygulanan voltajla birlikte, kristalde rezonans frekansında salınım başlar. Bu salınım, sensörün doğru çalışması için kritik öneme sahiptir.

3. **Kütle Algılama:** Sensörün yüzeyine bağlanan analitler (örneğin, hava veya sıvı fazında bulunan moleküller) kütle olarak arttıkça, bu eklenen kütle rezonans frekansını değiştirir.

4. **Frekans Değişimi Ölçümü:** Sensördeki bu rezonans frekansındaki (Δf) değişim, yüzeyde meydana gelen kütle değişikliklerinin bir ölçüsüdür. Bu değişim, sensörün analitlere verdiği yanıtı gösterir.

QCM sensörleri, bu özellikleri sayesinde çok hassas kütle algılama ve yüzey etkileşimlerinin izlenmesi için kullanılır [41].



Şekil 1.3. QCM sensör [42]

QCM sensörlerde yüzey işlevselleştirme ile ilgili akademik çalışmalar incelendiğinde güncel bir araştırmada lipit çift katmanlar aracılığıyla trombinin saptanması için aptamer tabanlı biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışma, hedef moleküllerin sensör yüzeyine bağlanması için fizyolojik olarak uygun bir ortam oluşturmayı amaçlamaktadır. Yüzey, streptavidin ve biotinle işlevselleştirilmiş bir lipid ile kaplanarak trombinin tespiti yapılmıştır [43]. Bir diğer önemli yayın ise morfin gibi küçük moleküllerin tespiti için nanoMIP ile işlevselleştirilmiş QCM sensörlerini ele almakta ve bu sensörleri Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) sensörleri ile fonksiyonelleştirme, duyarlılık ve özgüllük açısından karşılaştırmaktadır [44]. QCM sensörlerde yüzey işlevselleştirmenin zorlukları arasında, üniform ve stabil bir işlevsel tabaka elde etmek, tekrarlanabilirliği sağlamak ve sensör duyarlılığını ve özgüllüğünü korumak bulunmaktadır. Farklı immobilizasyon teknikleri, örneğin damla kaplama, spin kaplama ve daldırma kaplama, sensör performansını ve yanıtların tekrarlanabilirliğini

önemli ölçüde etkileyebilir. Ayrıca QCM sensörlerinin üretiminde kullanılan malzemeler, özellikle altın kaplama yüzeyler, maliyeti artırır. Bu da QCM sensörlerinin geniş çapta ekonomik olarak kullanılması önünde bir engel oluşturabilir.

1.4.2.2. Mikrokantilever

Mikrokantilever biyosensörler, biyolojik ve kimyasal analizlerde kullanılan son derece hassas araçlardır. Bu sensörler, genellikle mikro veya nanometre ölçeğinde, çıkıntı şeklindeki kirişler (kantileverler) kullanarak kütle, kuvvet, yüzey gerilimi ve diğer fiziksel değişiklikleri algılar. Mikrokantilever biyosensörler, genellikle iki ana modda çalışır: Statik modda, kantileverin yüzeyine bağlanan biyomoleküller veya kimyasal maddeler, kantileverin bükülmesine neden olur. Bu bükülme, kantileverin üzerine yerleştirilen algılama sistemi (genellikle lazer veya piezoelektrik dedektörler) ile ölçülür. Bükülme miktarı, kantileverin yüzeyine bağlanan kütlenin miktarı ile orantılıdır. Dinamik modda, kantilever belirli bir frekansta titreşir. Yüzeye bağlanan biyomoleküller, kantileverin rezonans frekansını değiştirir. Rezonans frekansındaki değişim, kantileverin üzerine bağlanan kütlenin miktarı hakkında bilgi verir.



Şekil 1.4. Mikrokantilever [45]

Mikro konsolların birincil avantajları, konsol sapmasını nanometre altı hassasiyetle tespit etme yeteneğine dayalı hassasiyetleridir ayrıca çok elemanlı bir sensör dizisi halinde üretilebilirler ve havada, vakumda veya sıvıda çalışabilme yetenekleri söz konusudur. Ana dezavantajı ise özgüllük eksikliğidir [46]. Ayrıca üretimleri genellikle mikro-elektro-mekanik sistemler (MEMS) teknolojilerini gerektirir, bu da karmaşık ve maliyetli olabilir. Mikrokantiliver biyosensörlerin yüzey işlevselleştirilmesi üzerine bir yapılan bir araştırma biyosensörlerin yüzeyine ZnO nanotel kaplaması yaparak

bağlanma kapasitesini artırmayı amaçlamaktadır. Çalışma, ZnO nanotellerin biyomoleküllerin immobilizasyonu için kimyasal uyumluluğunu değerlendirir ve nanoyapılı yüzeydeki biyomoleküllerin uygun şekilde immobilize edilmesini garanti eden yenilikçi bir işlevselleştirme yöntemi tanımlar. Çalışmada karşılaşılan zorluklar arasında, ZnO nanotellerin homojen ve kararlı bir şekilde yüzeye immobilize edilmesi yer almaktadır. Ayrıca, yüzey işlevselleştirmenin tekrarlanabilirliği ve biyomoleküllerin spesifik bağlanma kapasitesinin korunması gibi teknik zorluklar da belirtilmiştir [47].

1.4.2.3. Yüzey akustik dalga (SAW)

Yüzey akustik dalga (Surface Acoustic Wave-SAW) biyosensörleri, akustik dalgaların yayılması ile biyomoleküler etkileşimleri tespit eden hassas cihazlardır. Bu sensörler, piezoelektrik malzemeden yapılmış bir yüzeye yerleştirilen elektrotlar aracılığıyla çalışır. Elektrotlara uygulanan elektrik sinyalleri, yüzeyde akustik dalgalar oluşturur. Yüzeye biyomoleküller bağlandığında, dalgaların yayılma özellikleri değişir ve bu değişiklikler ölçülerek tespit yapılır. SAW biyosensörlerde yüzey işlevselleştirmenin yapıldığı önemli akademik çalışmalardan birinde altın filmlerin yüzey işlevselleştirilmesi sürecinin SAW teknolojisi ile nasıl iyileştirilebileceği araştırılmıştır. SAW kullanımı, biyotin-tiyol moleküllerinin altın yüzeylere yapışma verimliliğini önemli ölçüde artırmıştır [48]. Bu tür çalışmaların karşılaştığı zorluklar arasında, yüzeydeki fonksiyonel grupların homojen dağılımını sağlamak ve yüzeydeki biyomoleküllerin stabilitesini korumak yer almaktadır. Ayrıca, SAW biyosensörlerin sıvı ortamlarda çalışma yeteneğini artırmak için yüzey işlevselleştirmenin optimize edilmesi gerekmektedir.

1.4.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler, biyomolekül ve analit arasında gerçekleşen reaksiyonların elektrot yüzeyinde kimyasal değişiklikler oluşturduğu ve bu değişikliklerin elektrik sinyalleri ürettiği cihazlardır. Bu sensörler, çeşitli alanlarda geniş uygulama yelpazesiyle dikkat çeker. Tıbbi tanı, çevresel izleme, gıda güvenliği ve biyoteknoloji gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu biyosensörler, farklı ölçüm tekniklerine göre sınıflandırılır. Başlıca teknikler arasında amperometrik, potansiyometrik, voltametrik ve impedimetrik yöntemler yer alır. Amperometrik

elektrokimyasal biyosensörler, sabit bir potansiyel altında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonda elektroaktif türlerin yükseltgenme veya indirgenmesi sonucu oluşan akımı sürekli olarak ölçen sensörlerdir [49]. Potansiyometrik biyosensörler, hücredeki akımın sıfır olduğu durumda iki elektrot arasındaki elektriksel potansiyel farkının ölçümüne dayanır. Voltametrik biyosensörler, potansiyelin değiştirildiği ve oluşan akımın ölçüldüğü yöntemlerle analitin miktarı ve varlığı hakkında bilgi sağlar. İmpedimetrik biyosensörler, elektrot yüzeyinde meydana gelen biyokimyasal etkileşimlerin elektriksel empedans (direnç ve kapasitans) değişikliklerini ölçer. Bu ölçümler, biyosensörün aktif yüzeyine bağlı olan biyolojik elemanların analitlerle etkileşimi sonucu oluşan değişiklikleri tespit eder.

Elektrokimyasal algılama, elektronik ve reaksiyon kimyasının karıştırılmasını içerir. Prensip, elektrot ile temas halindeki analitin aktivitesine bağlı olarak elektrotun yüzey yükündeki değişimin ölçülmesine dayanmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler, günümüzde yaygın olarak kullanılan biyosensör türleri arasında öne çıkmaktadır. Bu sensörler, taşınabilirlikleri, maliyet etkinlikleri, küçük boyutları ve kullanım kolaylıkları gibi avantajlarıyla dikkat çekerler. İşte bu özelliklerin bazıları:

1. **Taşınabilirlik:** Elektrokimyasal biyosensörler genellikle kompakt yapıdadır ve taşınabilir cihazlarda kullanım için uygundur. Bu özellikleri, saha çalışmaları ve hızlı analizler için ideal hale getirir.

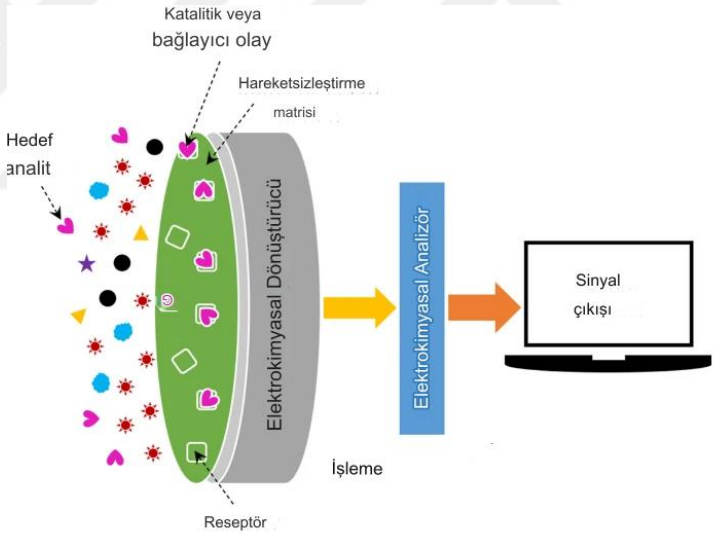
2. **Maliyet Etkinliği:** Üretim süreçleri ve kullanılan malzemeler nedeniyle elektrokimyasal biyosensörler genellikle maliyet etkin bir seçenektir. Bu durum, büyük ölçekli uygulamalar için ekonomik bir avantaj sağlar.

3. **Küçük Boyutlar:** Birçok elektrokimyasal biyosensör, mikro veya nano boyutlarda olabilir. Bu özellikleri, düşük hacimdeki numunelerin analiz edilmesi veya entegrasyon gerektiren cihazlarda kullanılmasını kolaylaştırır.

4. **Kullanım Kolaylığı:** Elektrokimyasal biyosensörler genellikle basit bir kullanım protokolüne sahiptir. Bu özellikleri, operatörlerin eğitim süresini kısaltır ve geniş kullanıcı kitlesine hitap eder.

Bu nedenlerden dolayı, elektrokimyasal biyosensörler çeşitli alanlarda (sağlık, çevre, gıda güvenliği vb.) yaygın olarak tercih edilen analitik araçlar haline gelmiştir.

Yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahiptir ve diğer biyosensör türlerine nispeten kısa sürede sonuç verirler. Elektrokimyasal impedimetrik biyosensörler, yüksek hassasiyet ve doğruluk gerektiren uygulamalar için ideal olup, özellikle tıbbi teşhis alanında önemli bir rol oynamaktadır. İmpedimetrik biyosensörlerin bir diğer olumlu özelliği, amperometrik veya potansiyometrik cihazlardan farklı olarak, ölçümleri gerçekleştirmek için genellikle büyük bir referans elektroduna ihtiyaç duymamasıdır, bu da deneysel prosedürünü basitleştirir ve sensörün ve tüm sistemin minyatürleştirilmesine izin verir.



Şekil 1.5. Elektrokimyasal sensörün çalışma prensibi [50]

Empedans temelli elektrokimyasal biyosensörler şüphesiz hastalık biyobelirteçlerine yönelik analitik analizlerde önemli kilometre taşlarına ulaştı. Literatürde bildirilen birçok çalışma, empedans(biyosensörlerin, karmaşık ve zaman alıcı numune ön işlemi olmaksızın, idrar, tükürük ve serum gibi insan biyolojik sıvılarında biyobelirteçlerin tespitini doğrudan gerçekleştirerek karmaşık matrislerde çalışabilme potansiyelini ortaya koymuştur. Yine de impedimetrik cihazların biyomedikal alanda fizibilitesini göstermek, klinik uygulamalarını genişletmek ve yeni nesil EIS biyosensörlerinin

gelişimini hızlandırmak için bazı iyileştirmelere ihtiyaç vardır. Bu iyileştirmelerin sağlanması amacıyla Nitinol'ün şekil hafıza, süperelastiklik ve biyouyumluluk özelliklerinden faydalanarak yüzey işlevselleştirme çalışmaları yapılmıştır.

1.4.3.1. Yüzey İşlevselleştime

1.4.3.1.1. Yüzey İşlevselleştimenin Gerekliliği

Elektrokimyasal biyosensörler, elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyolojik etkileşimlerin tespit edilmesine dayanır. Sensörün hassasiyeti, kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği, özgüllüğü ve maliyeti, biyolojik tanıma unsuruna ve bu unsurun erişilebilirliğine/reaktivitesine bağlıdır. Elektrokimyasal biyosensörlerin işleyiş mekanizması dikkate alındığında, elektrot yüzeyinin uygun şekilde modifikasyonu performans açısından kritik öneme sahiptir. Yüzey modifikasyonları sadece biyoreseptörlerin uygun şekilde hareketsizleştirilmesine yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda gürültü kontrolünde ve duyarlılığın arttırılmasında da merkezi bir rol oynar. Daha da önemlisi, yüzeyin işlevselleştirilmesi, analitin veya diğer bileşenlerin yüzey üzerindeki istenmeyen spesifik olmayan bağlanmasını azaltmaya yardımcı olur. Ayrıca, biyomoleküllerin yüzeydeki konformasyonu, biyosensörün duyarlılığını ve seçiciliğini tanımlamada önemli bir rol oynar. Başka bir deyişle, biyosensör performansı, yüzeylerin modifikasyonu için kullanılan malzemelere ve biyoreseptörlerin immobilizasyonunda kullanılan işlevselleştirme yöntemine bağlı olarak belirgin bir şekilde değişir. Biyomoleküllerin elektrokimyasal biyosensörlerde immobilizasyonu için kullanılan çeşitli elektrot yüzeyleri arasında silikon, cam, altın, karbon nanotüp (CNT), iletken polimerler ve grafen bulunur. Literatürde mevcut olan çeşitli yüzey modifikasyon stratejileri, farklı biyosensör performansları sağlar. Bir immobilizasyon yönteminin seçimi, uygulandığı alt tabakaya bağlıdır. Bu bölümde, hassas biyosensör yapımında biyomoleküllerin immobilizasyonu için kullanılan çeşitli malzemeler ve işlevselleştirme yöntemleri anlatılmaktadır.

1.4.3.1.2. Spesifik ve Spesifik Olmayan Bağlanma

Biyomedikal sensörlerdeki önemli parametrelerden biri, sensörün analite özgüllüğüdür. Spesifik bağlanma, reseptör-analit etkileşimleri ile gerçekleşirken, spesifik olmayan bağlanma, diğer bölgeler veya moleküllerle oluşan bağlanmalardır [51]. Örneğin, afinite

immünosensörlerinde antijen-antikor bağlanması veya nükleik asit sensörlerinde tamamlayıcı iplikçik bağlanması gibi bire bir etkileşimler, spesifik etkileşimlerdir.

Analitin yönelimi, reseptör yüzeyindeki tamamlayıcı fiziksel özelliklere uyduğu zaman spesifik bir etkileşim meydana gelir. Çoğu zaman biyolojik numuneler, proteinler, biyolojik sıvılar ve bazı müdahaleci moleküller gibi karmaşık bileşiklerin karışımlarını içerir, bu da elektrot yüzeyinde spesifik olmayan bir şekilde istenmeyen adsorpsiyona yol açar ve yanlış sinyaller üretir. Spesifik olmayan etkileşimler, biyolojik moleküllerin herhangi bir spesifik reseptör olmaksızın yüzeye kovalent olmayan şekilde bağlanmasıdır. Bunun temel nedeni hidrofobik etkileşim ve biyomolekülün yüzeyle elektrostatik etkileşimidir. Polar olmayan her molekül ve malzeme hidrofobiktir ve dolayısıyla hidrofobik etkileşimin belirli bir grup olması gerekmez. Bu yüzeyde spesifik olmayan bağlanmaya yol açar. Benzer şekilde elektrostatik etkileşim, analit üzerindeki elektrik yüküne ve ortamın iyonik gücüne dayanır. Etkileşim, yük işaretlerine göre çekici veya itici olabilir ve iyonik türden bağımsızdır. Dolayısıyla bu, spesifik olmayan adsorpsiyona (NSA) yol açar. Yapay bir yüzey üzerindeki proteinlerin NSA'sına genellikle biyolojik kirlilik denir. NSA, bir tanıma elemanının yokluğunda bağlanmanın bir sonucu olarak arka plan sinyallerini artırarak biyosensörlerin performansını sınırlayabilir. Dolayısıyla biyomoleküllerin NSA'sı, özellikle etiketsiz sensörler olmak üzere biyosensör araştırmalarında her zaman dikkat edilmesi gereken zorlu bir karşılaşmadır [52]. Hareketsiz bir elektrot yüzeyi NSA'yı azaltabilir ve dolayısıyla sensörün arka plan sinyalini azaltabilir. Spesifik olmayan bağlanmayı hafifletmek için sığır serum albümini gibi uygun bloke edici maddeler kullanılmıştır. Bu, değiştirilmiş elektrotun bu bloke edici ajanın bir çözeltisine bir süre daldırılması ve ardından tamponla yıkanması yoluyla yapılır. Elektrotların Tween-20 gibi deterjanlarla kademeli olarak yıkanması da spesifik olmayan etkileşimin en aza indirilmesine yardımcı olur. NSA'nın biyosensör performansı üzerindeki etkisi, sensör yüzeylerindeki NSA mekanizmasının anlaşılmasına ve yüzey kirlenmesini azaltmak için etkili yüzey modifikasyon stratejilerinin geliştirilmesine yönelik biyosensör araştırmalarına ilham kaynağı olmuştur. Biyosensör araştırmalarındaki en zorlu yönlerden biri, sensör yüzeylerinin, biyomolekülleri orijinal konformasyonlarını ve biyokimyasal aktivitelerini değiştirmeden güçlü bir şekilde hareketsiz kılacak şekilde değiştirilmesidir. Aşağıdaki

bölümlerde, biyoreseptörler için yaygın olarak kullanılan immobilizasyon tekniklerinin ardından birkaç yüzey modifikasyon stratejisi tartışılacaktır.

1.4.3.1.3. Yüzey İşlevselleştirme Yöntemleri

Bir elektrot yüzeyinin işlevselleştirilmesi, biyouyumluluğu ve elektron iletkenliğini arttırmanın ve ayrıca yüzey kirlenmesini azaltmanın yolunu açtığından, biyosensör araştırmalarında hayati öneme sahiptir. Sıklıkla kullanılan yöntemler elektrot yüzeyinin kendiliğinden birleşen tek katmanlarla (SAM) işlevselleştirilmesi, polimerlerin/nanomalzemelerin elektrodepozisyonunu, iletken polimerleri, çeşitli nanomalzemeleri ve metalorganik çerçeveleri (Metal organic framework, MOF) ile Kimyasal Buhar Biriktirmeyi içerir.

Performansı arttırılmış elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi, tıbbi teşhis ve sağlık hizmetleri, çevresel izleme, endüstriyel üretim ve savunma gibi çeşitli alanlarda artan bir öneme sahiptir. Bu biyosensörlerin geliştirilmesinde karşılaşılan en büyük zorluklar arasında yüksek hassasiyet, seçicilik, tekrarlanabilirlik ve stabilitenin sağlanması bulunur. Ayrıca, sensör yüzeyinin uzun süre stabil kalması ve diğer analitlerden kaynaklanan etkileşimlerin minimum düzeyde olması gereklidir. Tüm bu faktörler, immobilize edilen biyotanıma elemanının mevcudiyetine ve reaktivitesine bağlı olup, elektrot yüzeyinin uygun şekilde modifiye edilmesi kritik bir öneme sahiptir. Yüzey modifikasyonları, biyotanıma elemanlarının uygun şekilde immobilize edilmesine, sinyal-gürültü oranının iyileştirilmesine, duyarlılığın artırılmasına ve spesifik olmayan adsorpsiyonun önlenmesine katkıda bulunur.

Elektrokimyasal immünosensör, elektrotun (dönüştürücü) yüzeyinde meydana gelen bir antikor ile antijen arasındaki etkileşimlere dayanan bir biyosensör sınıfıdır. Sensör konfigürasyonunda, antikor veya antijen, bir tanıma elemanı olarak görev yapan dönüştürücü yüzeyine sabitlenen türler olabilir. Antikorlar ve antijenler güçlü bağlanma kuvvetlerine sahip olduğundan, immünosensörler yüksek seçicilik ve hassasiyet sunar ve bu da onları çeşitli sağlık uygulamalarında, özellikle de POCT olarak kullanım açısından çekici kılar [50]. Mevcut altın standart yöntemlerine yönelik tespit platformları olarak ümit verici alternatiflerdir.

Elektrokimyasal immünosensörler, COVID-19'a, çeşitli kanserlere veya Alzheimer hastalığına vb. özel hedef biyobelirteçlerin hassas, seçici bir şekilde tespit edilmesi konusundaki yeteneklerini zaten kanıtlamıştır. Elektrokimyasal teknikler arasında elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), bir elektrokimyasal hücrenin empedansını çeşitli frekanslarda inceleyen oldukça hassas bir tekniktir. Başarılı impedimetrik immünosensörün yapımı için birkaç önemli kritik gereksinim vardır. Uygulanan yüzey kimyası ve immobilizasyon protokolünün, geliştirilen immünsensörlerin elektroanalitik performansı üzerinde etkisi vardır.

Elektrodeposizyon: Elektrodepozisyon, köklü bir yüzey modifikasyon tekniğidir ve genellikle ince filmlerin bir yüzey üzerinde büyütülmesi için kullanılır. Bu yöntemde, elektrotun elektrokimyasal potansiyeli harici bir elektrik alanla değiştirilir, bu da elektrot yüzeyinde birikmeye veya çözünmeye neden olur. Elektrodepozisyon süreci, çözeltiden yüklü türlerin elektroda difüzyonu ve elektrot yüzeyinde yüklü türlerin indirgenmesi ve parçacıkların veya filmin büyümesi adımlarını içerir.

Bu reaksiyonlar, çözünen iyonların çözücü ile etkileşimi, çözeltinin özellikleri (örneğin iyonik kuvvet, viskozite), elektron transfer hızı ve difüzyon katsayısı gibi parametrelerle şekillenir. Son zamanlarda, bu teknik nanomalzemelerin biriktirilmesinde yaygın olarak kullanılmış ve elektrokimyasal sensörlerde elektrot yüzeyinin modifikasyonunda önemli sayılmıştır. Elektrodepozisyonun avantajları arasında uygun maliyetli ekipman ve malzemeler, endüstriyel ölçekte kolay ölçeklendirme, biriktirilen malzemelerin yüksek saflığı ve alt tabakalar üzerinde düzgün birikim bulunmaktadır.

Polimer Kaplama: Polimer kaplama, yüzeyde ince polimer film oluşturmak için kullanılan bir tekniktir. Bu işlem, biyosensörlerin yüzey özelliklerini iyileştirerek biyomoleküllerin bağlanma etkinliğini artırır. Polimer kaplamalar, biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan ve biyouyumluluğu yüksek malzemelerdir. Polimerik kaplamalar, elektropolimerizasyon veya önceden oluşturulmuş polimerlerin çözelti dökümü yoluyla gerçekleştirilirler. Elektropolimerizasyon, bir monomer ve biyomolekülün sulu bir çözeltisine daldırılan çalışma elektroduna uygun bir potansiyelin uygulanmasıyla yapılır. Bu işlem sırasında biyomoleküller polimer matrisine homojen bir şekilde entegre olur ve yüzeyde biriktirilir. İki aşamalı işlemde, polimer önce yüzeyde elektropolimerize edilir, ardından biyoreseptör hareketsiz hale

getirilir [53]. Polimer kaplama yöntemlerinin biyosensörler üzerindeki uygulamaları çeşitli avantajlar sunsa da, bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Birçok polimer, özellikle iletken olmayan polimerler, elektronik cihazlar ve sensörler için gerekli olan yüksek elektriksel iletkenliği sağlayamaz. Polimerler, bazı kimyasal maddelere karşı dirençsiz olabilir. Örneğin, asidik veya bazik çözeltiler polimerlerin kimyasal yapısını bozabilir, bu da biyosensörlerin performansını ve ömrünü olumsuz etkileyebilir

Nanomalzemeler: Elektrokimyasal biyosensörlerin yapımında metal nanopartiküller, metal oksitler, yarı iletkenler ve nanotüpler gibi çeşitli nanoyapılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoyapılı malzemeler, biyomoleküller için immobilizasyon platformları, elektrokimyasal reaksiyonların katalizörleri ve farklı algılama sistemlerinde biyoreseptör ve elektrotlar arasında verimli elektron transferine izin veren iletken merkezler gibi önemli roller oynar [54]. Altın nanoparçacıklarının, biyomoleküllerin immobilizasyonu için sağlam bir yüzey sağlama yetenekleri ve biyoreseptör ile metal elektrot yüzeyi arasında elektron iletiminin iyi olmasından dolayı, altın nanoparçacıkları, biyomoleküllerin immobilizasyonunun arttırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [55]. Ayrıca, altın nanopartiküllerin biyouyumlu doğası, biyoreseptör aktivitesini korur ve yüksek yüzey alanı, çok sayıda biyomolekülün elektrot yüzeyinde immobilizasyonunun yolunu açar. Grafen ve grafen oksit (GO), indirgenmiş grafen türevleri, elektronik, mekanik ve termal özelliklerinden dolayı elektrot modifikasyon malzemeleri olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Diğer karbon nanomalzemelerle karşılaştırıldığında grafen, biyouyumluluk, yüksek yüzey alanı ve zengin bağlantı bölgeleri gibi avantajlara sahiptir [56].

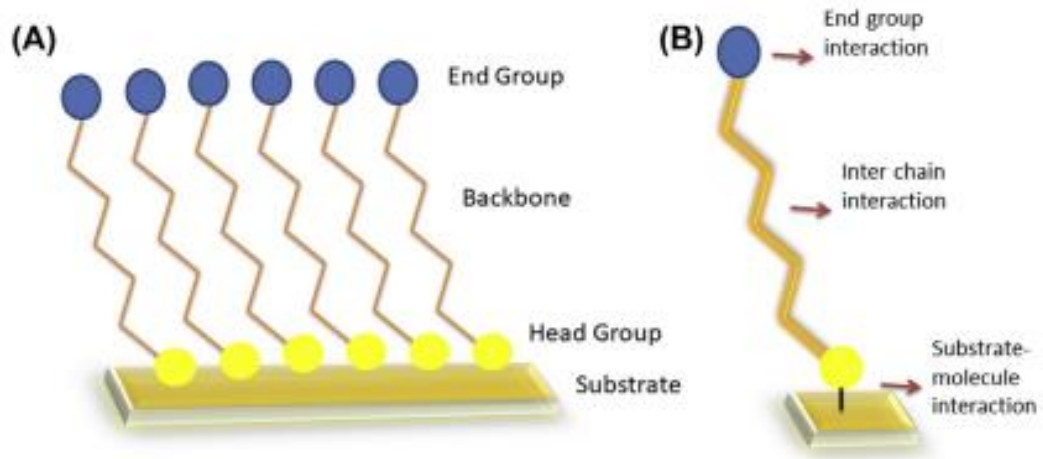
Metal-Organik Çerçeveler (MOF): MOF'lar, inorganik iyonlar ve koordinat bağlarıyla bağlı organik moleküllerden oluşan, yüksek yüzey alanına sahip gözenekli kristal katılardır. Bu özellikleri, MOF' ları biyosensörlerde biyomoleküller için ideal immobilizasyon matrisi yapar. MOF 'ların ayarlanabilir gözenek boyutu, hacmi, şekli ve hidrofilik/hidrofobik dengesi, biyomolekülleri immobilize etmede etkilidir. MOF' lar, adsorpsiyon, kovalent bağlanma, kavite dâhil etme veya yerinde sentez yoluyla enzim immobilizasyonunda kullanılır. Yüksek yüzey alanı ve yapısal çeşitlilikleri sayesinde umut verici biyoelektrotlar haline gelirler. Örneğin, bir araştırma grubu 1,3 nM tespit limiti ve iyi seçicilik ile çift sarmallı DNA'yı (dsDNA) tespit etmek için MOF'ları floresan algılama platformu olarak başarıyla kullanmıştır [57]. Başka bir çalışmada ise

Au nanoparçacık kapsüllü Cu bazlı MOF, lipopolisakaritin tespiti için etkili bir şekilde kullanıldı [58]. Bir diğer araştırmada ise Ce^{3+} iyonları ve amino-işlevselleştirilmiş ligand kullanarak üç boyutlu bir seryum-MOF geliştirilmiş ve ATP tanısının tespiti için uygulanmıştır. Bu biyosensör yapısında, ilk olarak Au elektrot, elektrostatik etkileşimler ve zayıf kovalent bağlanma yoluyla Ce-MOF ile kaplanmıştır. Ardından, ATP aptameri, MOF üzerine immobilize edilmiştir. ATP ile aptamer arasındaki spesifik bağlanma, elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılarak izlenen empedans değişikliğiyle sonuçlanmıştır. Bu yöntem, nanomolar konsantrasyondaki ATP'yi tespit etmekte başarılı olmuş ve kanser hastalarının serumunda ATP tespiti için uygulanmıştır [59]. MOF'lar çoğu zaman karmaşık ve zaman alıcı bir sentez süreci gerektirir. Kristal yapıların oluşması ve stabilize edilmesi için özel şartlar gerekebilir. Ayrıca SAM lere göre daha kompleks yapılar olduğundan yüzey üzerinde homojen bir kaplama sağlamak zor olabilir. Çünkü gözenekli yapılarının kontrolü daha zordur.

Kimyasal Buhar Biriktirme (CVD): CVD, gaz fazındaki reaktif maddelerin katı bir yüzey üzerine ince bir film oluşturmak üzere biriktirilmesi sürecidir. Bu teknik, biyosensörlerin yüzey özelliklerini iyileştirmek için kullanılmaktadır. CVD, yüksek saflıkta ve homojen kaplamalar üretme yeteneği nedeniyle tercih edilmektedir. Literatürde, CVD'nin çeşitli biyosensör uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir. Örneğin son yıllarda yapılmış bir çalışmada geliştirilen biyosensör, kimyasal buhar biriktirme (CVD) yöntemiyle üretilen monolayer grafen kullanılarak üretilmiştir. Çalışma, nükleik asitlerin yüksek hassasiyetle tespit edilmesi için elektriksel ve optik tespit modlarını entegre eden çift modlu bir sensör sunmaktadır [60]. CVD yöntemi yavaş ve yüksek maliyetlidir ayrıca yüksek sıcaklık, vakum veya reaktif gazların kullanımı söz konusu olduğundan güvenlik riskleri mevcuttur.

Kendiliğinden Birleşen Tek Katmanlar (Self-Assembled Monolayers-SAM): SAM'ler katı yüzeyler üzerinde istenen özelliklere sahip, kontrollü kalınlıkta ultra ince organik filmler oluşturmak için etkili bir yöntemdir. Bu moleküler düzenekler, bir molekülün baş grubunun güçlü bir şekilde katı yüzeyde kemisorpsiyonu ile oluşturulurlar. SAM'lerin geliştirilmiş elektrokataliz yetenekleri, yüzey kirliliği olmaması, kolay oluşum prosedürü ve uzun stabilite gibi özellikleri, biyosensör gelişimi için onları son derece kullanışlı kılmaktadır [61].

SAM'ler genellikle substratın oda sıcaklığında adsorbatın seyreltik bir çözeltisine daldırılmasıyla elde edilir. Farklı tipte SAM'ler bulunmaktadır, bunlar arasında oksit yüzeylerde karboksilat SAM'ler, cam veya silikon yüzeylerde silan SAM'ler ve soy metaller üzerinde alkan tiyol SAM'ler bulunmaktadır. Özellikle altın üzerindeki alkan tiyol SAM'leri, biyosensörlerde kullanılan önemli düzeneklerden biridir. Bu SAM'ler, bir biyomolekülün elektroaktif bölgesi ile elektrot yüzeyi arasında bir elektrik iletisi olarak işlev görebilen düzenekler oluşturabilir. Altının SAM oluşturma yeteneği, kolay erişilebilir olması, nispeten inert ve biyouyumlu doğası, onu biyosensör geliştirme için umut verici bir platform haline getirmektedir. Şekil 1.6. da alkan tiyol SAM'inin şematik diyagramı gösterilmektedir, bu düzenekler altın veya Nitinol gibi metal elektrotların üzerine organize olabilir ve biyolojik algılayıcıların geliştirilmesinde kullanılabilirler.



Şekil 1.6. (A) Altın üzerinde oluşan SAM ve (B) SAM üzerinde hareket [62]

Biyomoleküller, uygun biyokonjugasyon teknikleri kullanılarak SAM'lerin fonksiyonel grubuna kolayca konjuge edilebilir [62]. Daha önce yapılan bir çalışmada altın SAM prosedürü kullanılarak yüzey modifikasyonlarında sıkça MPS ile yüzey modifikasyonu yapılmış ardından kovalent bağlama ajanı olarak kullanılan Sulfo-SMCC bileşiminin yüzeye tutturulmasıyla DNA tespiti gerçekleştirilmiştir [63]. Başka bir çalışmada ise MUA kaplama ajanı ile EDC/NHS çapraz bağlayıcıları kullanılarak sensör yüzeyi işlevselleştirilmiş ve *E. coli* bakterisinin genetik tespiti başarıyla yapılmıştır [64].

Bu çalışmada elektrot materyali olarak kullanılan Nitinol gibi özel bir malzeme için yüzey işlevselleştirme metodolojisi olarak olarak SAM yöntemi seçilmiştir. Çünkü SAM'lerin diğer yüzey işlevselleştirme yöntemlerine göre bazı avantajları bulunmaktadır. Hazırlıkları basit ve maliyet açısından uygundur. Genellikle substratın fonksiyonel molekül içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla yapılır. Bu işlem basittir ve minimal ekipman gerektirir. Çok çeşitli fonksiyonel gruplar içeren moleküller kullanılabilir ve bu gruplar yüzey özelliklerini istenilen şekilde ayarlamak için kolayca değiştirilebilir. Çoğu zaman kimyasal olarak stabildir ve belirli koşullar altında uzun süre dayanıklılık gösterir. SAM yönteminin seçilmesinin diğer nedenleri şunlardır:

1. **Kontrollü Kalınlık ve Düzen**: SAM'ler, moleküllerin substrat üzerinde düzenli bir şekilde sıralanmasını sağlar. Bu düzen, özellikle biyosensör uygulamalarında, hassas ve ölçülebilir bir reaksiyon yüzeyi oluşturulmasına yardımcı olur. Ayrıca sensor performansını ve hassasiyetini artırabilir.

2. **Kimyasal Seçicilik**: SAM'ler, substrat yüzeyine özgü kimyasal gruplar veya fonksiyonel gruplar ekleyerek spesifik kimyasal etkileşimler oluşturabilir. Bu özellik, biyolojik moleküllerin (örneğin, proteinler veya bu çalışmada kullanılan *E.coli*) tanınmasını ve yakalanmasını sağlayabilir, bu da sensörün seçiciliğini artırır.

3. **Yüzey Temizliği ve İnertliği**: SAM'ler, substratın yüzey kirliliğini ve reaktivitesini azaltabilir. Özellikle Nitinol gibi malzemelerde, yüzeyin biyouyumlu ve düşük reaktiviteye sahip olması önemlidir. SAM'ler bu özellikleri koruyarak malzemenin biyolojik uyumluluğunu artırabilir.

4. **Uygulama Kolaylığı**: SAM'ler genellikle substrat üzerinde oluşturulması kolay olan tek adımlı veya basit işlemlerdir. Bu, üretim süreçlerini basitleştirir ve maliyetleri düşürebilir.

Özellikle Nitinol, biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan bir malzemedir ve SAM'ler, bu tür malzemeler üzerinde istenen biyoaktif yüzeylerin oluşturulmasında önemli bir rol oynar. Bu şekilde, Nitinol yüzeyler SAM'lerle işlenerek biyolojik algılayıcıların performansını artırmak mümkündür.

Bu nedenle, Nitinol gibi malzemelerin yüzey işlevselleştirme süreçlerinde yüksek frekanslarda yapılan EIS ölçümleri, yüzeydeki değişimlerin daha hassas bir şekilde izlenmesine olanak tanır. Bu, biyosensör performansının optimize edilmesi ve *E. coli* tespiti gibi uygulamalarda oldukça yararlıdır.

Tüm elektrokimyasal biyosensörlerde olduğu gibi, impedimetrik biyosensörler de biyomoleküllerin iletken veya yarı iletken bir transdüser yüzeyi ile etkileşimini kullanarak çalışır. Bu biyoelektronik cihazlar, reseptör biyomolekül ile analit arasındaki etkileşimlerin algılama yüzeyinde oluşturduğu değişimlerin elektronik transdüserin elektriksel özelliklerini etkilemesi prensibine dayanır. Elektriksel özelliklerdeki bu değişimler, doğrudan veya dolaylı olarak ölçüm sürecinde kullanılır. Antijen-antikor veya DNA-DNA etkileşimleri gibi sınırlı katalitik aktiviteye sahip bileşiklerin analizine yönelik olarak geliştirilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli biyosensörlerin sayısı, literatürde artan bir şekilde yer almaktadır.

EIS son zamanlarda pek çok kimyasal sürecin takibi ve fiziksel sürecin incelenmesinde etkili bir yöntem haline gelmiştir. EIS, çeşitli süreçlerin analitik bir biçimde çözümlerini sunmanın yanında, membranların kimyasal özelliklerinin belirlenmesi, biyosensörlerin karakterizasyonu ve üretimi gibi bilimsel araştırmalarda da önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bu teknik, metallerin korozyon durumlarının incelenmesinde, membran yük transferi, membran ile çözelti arasındaki yüzeylerin karakterizasyonu ve optimizasyonu için oldukça sık tercih edilmektedir [65-68].

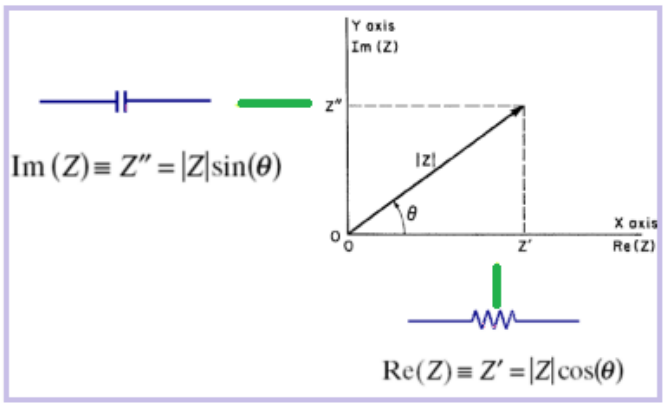
EIS biyosensörlerin hazırlanma süreçlerinin yanı sıra biyomoleküllerin spesifik yani analite özgü etkileşimlerinin izlenmesi ve nicel analizlerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Enzim-substrat etkileşimlerinin aksine, antijen-antikor veya DNA-DNA gibi bağlanma sonrası reaksiyon meydana gelmeyen yüksek afiniteli etkileşimlerde, sarj transfer değişimleri oluşur ve bu değişimler EIS kullanılarak takip edilebilir.

Elektrokimyasal biyosensörlerde spesifik ve hassas ölçümler, çeşitli faktörlere bağlı olarak sınıflandırılabilir. Bu faktörler arasında kullanılan elektrot materyali (örneğin metaller, metal oksitler, camsı karbonlar, yarı iletkenler), elektrot geometrisi (klasik

elektrot düzenlemeleri veya birbirine geçmiş elektrotlar), hedef analitler (proteinler, antikorlar, nükleik asitler vb.) ve kullanılan amplifikasyon protokolü (bunlar etiketsiz, enzim etiketli, iletken polimer filmler, nanoparçacıklar olabilmektedir) yer almaktadır [69,70].

1.4.4. Empedans kavramı

Özdirenç, bir maddenin kimyasal yapısına bağlı olarak direncinin değişmesini belirleyen, o maddeye özgü bir karakteristiktir. İki farklı malzemenin impedansları aynı olabilir, ancak özdirençleri farklılık gösterir. Bu nedenle özdirenç, impedansla karıştırılmamalıdır ve ikisi aynı terimle ifade edilmez. Direnç formülü R = Lρ/A şeklindedir ve alternatif akıma karşı koyma yeteneğini ifade eder. Zamanla değişen değerlere sahip elemanlar (kondansatörler ve endüktanslar) içeren devrelerde direnç yerine özdirenç kullanılır. Özdirenç, gerilim ve akımın sadece genliğini değil fazı da açıklar. Doğru akım devrelerinde özdirenç ve direnç arasında farkın olmaması durumu söz konusudur. Yani direnç, sıfır faz açısına sahip özdirenç şeklinde düşünülebilir [71].



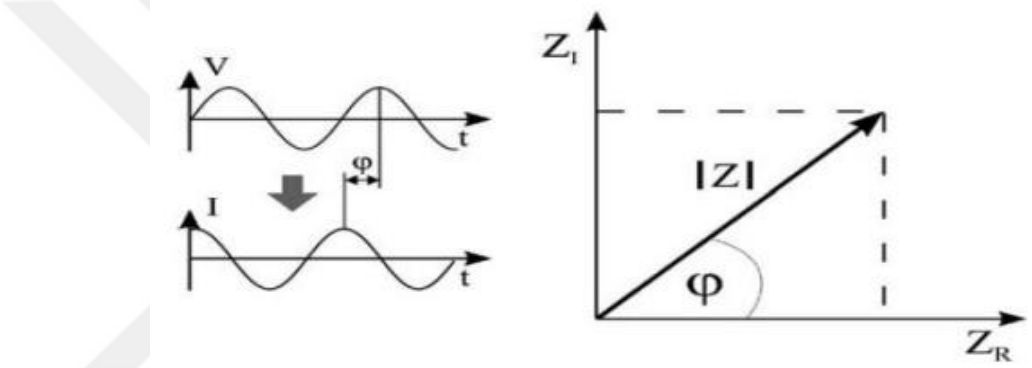
Şekil 1.7. Empedans grafiği [71]

1.4.4.1. Empedans spektroskopisinin temel ilkeleri

Bir sistemin empedansı, genellikle küçük genlikli bir potansiyel uygulanarak ve buna karşılık gelen akım tepkisi ölçülerek belirlenir. Empedans, potansiyel-zaman fonksiyonu V(t) ile akım-zaman fonksiyonu I(t) oranı olarak ifade edilir. V0 ve I0 maksimum potansiyel ve akım değerleridir, t zaman, f frekans ve φ ise potansiyel ve

akım arasında meydana gelen faz kaymasını temsil eder. Y kompleks iletkenliktir. Empedans, kompleks bir büyüklüktür çünkü akım sadece genlik açısından değil, aynı zamanda potansiyel-zaman fonksiyonuna göre faz kayması açısından da farklılık gösterir. Bu nedenle empedans, |Z| ve faz kayması φ ile veya reel bileşen ZR (Re(Z)) ve imgesel bileşen ZI (Im(Z)) olarak ifade edilebilir.

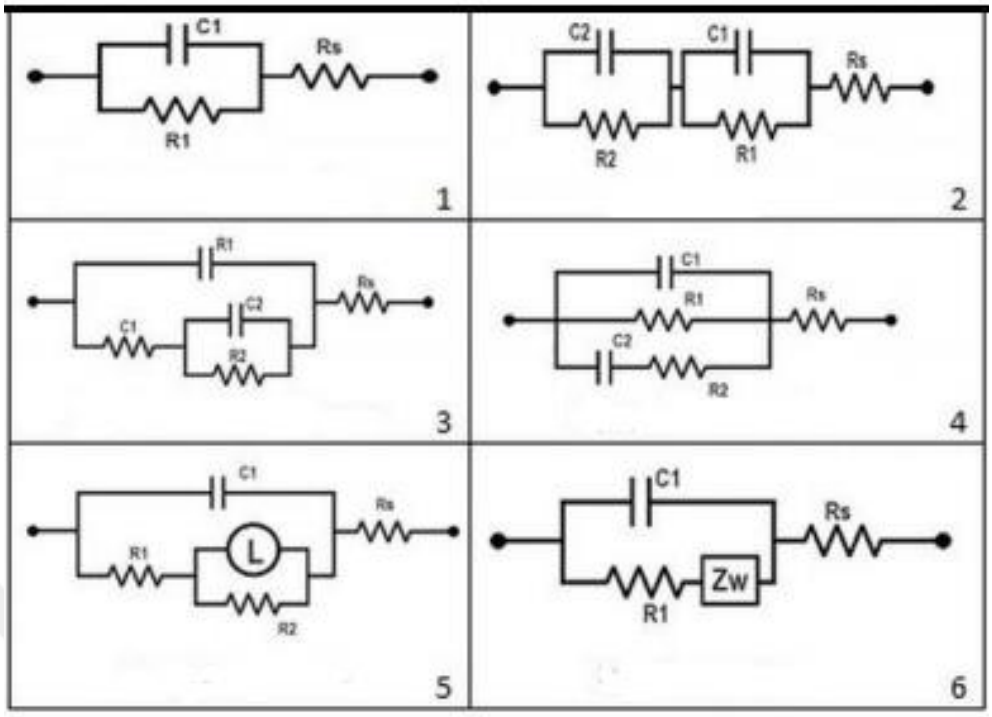
İmpedans ölçümlerinin sonuçları Şekil 1.8. de verildiği üzere Bode grafiği veya Z_R ile Z_I içeren nyquist grafiği şeklinde belirtilebilir.



Şekil 1.8. Empedans eğrisinin grafiksel ifadesi [72]

1.4.4.2. Eşdeğer devre modeli ve elemanları

Empedans "spektroskopisi" terimi, empedansın farklı frekanslarda ölçülebilmesi gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Bu yöntem sayesinde, bir empedans spektrumu aracılığıyla yüzeylerin veya tabakaların değişim aynı zamanda difüzyon aşamaları ile karakterizasyonu bilgisi elde edilebilir. Empedans spektrumu eşdeğer devre modelleriyle kullanılır. Bu devreler, çoğunlukla direnç ve kapasitans elemanlarından oluşur. Empedans ölçümleri, incelenen sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini açıklamaya yardımcı olur. Sistem, ayrıca elektrokinetik, difüzyon ve partisyon gibi temel prensiplerden türetilen transfer fonksiyonları kullanılarak da tanımlanabilir. Bu yaklaşımla, empedans elemanlarının direnç veya kapasitans değişimleri, çözeltinin bileşimine bağlı olarak değerlendirilir.



Şekil 1.9. Elektrokimyasal sistemlerde en sık kullanılan eşdeğer devre modelleri [73]

Şekil 1.9. da farklı elektrokimyasal sistemlerde en çok kullanılan eşdeğer devre modelleri görülmektedir. Bu tez çalışmasında uygulanan yöntem için uygun eşdeğer devre modelinin 1. model olduğu belirlenmiştir.

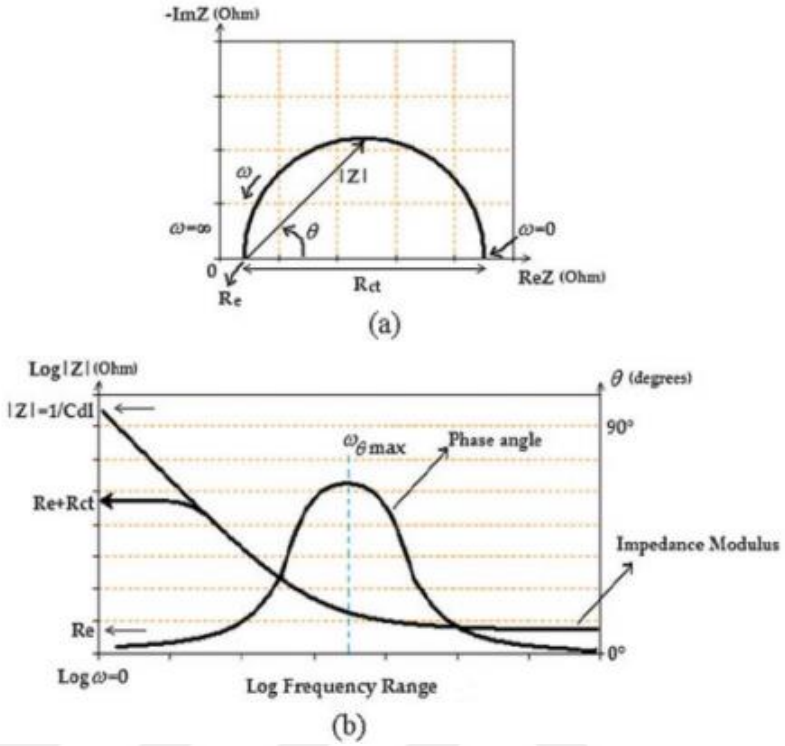
Elektrolit direnci: Elektrolit direnci (Re veya Rs), diğer bir deyişle ohmik direnç, bir elektrolit çözeltisinde iyonların transferi sırasında elektron akışını engellemesi sonucu ortaya çıkan dirençtir. Elektrolit direnci, referans elektrot tarafından analiz sonucunda kaydedilen voltaj ile giriş ve çıkış voltajlarının karşılaştırılmasıyla belirlenir. Başka bir ifadeyle, Re, elektrot ile elektrolit çözeltisi arasında meydana gelen temas direncini ifade eder. Re değeri, Nyquist diyagramının yüksek frekans bölgesinde x eksenini (Zreal) kestiği noktadan hesaplanır [74].

Şarj transfer direnci: Elektrot ile elektrolit ara yüzeyinde meydana gelen yük aktarımı genellikle elektrokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanır. Bu ara yüzeydeki elektrokimyasal reaksiyonlar, yük transfer reaksiyonları olarak adlandırılır. Başka bir deyişle, elektrot ile elektrolit ara yüzeyindeki şarj transfer direncinin (Rct) sebebi şarj transfer reaksiyonlarıdır. Elektrokimyasal sensörler açısından, yük transfer direnci, immobilizasyon işlemi sırasında elektrotlar üzerindeki yüzey katmanlarının

tanımlanmasını sağlar. Şarj transfer direnci, elektrolitteki iyonların elektrota hareket etmesiyle elde edilir. Şarj transferi sonucunda, yani yük aktarımının bir sonucu olarak meydana gelen akım akışı, aktarılan iyonların derişimine, elektrokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan potansiyele ve reaksiyon ürünlerine bağlıdır. EIS analizi sonucu elde edilen Nyquist diyagramında, şarj transfer direnci yüksek frekanslı bölgedeki yarım çemberin çapına eşittir [75].

Çift tabaka kapasitansı: Elektrot ve onu çevreleyen elektrolit arasındaki ara yüzde elektriksel bir çift katman bulunmaktadır. Bu çift tabaka, elektrot üzerindeki iyonlar ve elektrottaki elektronlar nedeniyle oluşur. Bu iki yük katmanı birbirinden ince bir dielektrik ile ayrıldığından bir kapasitör oluşturur ve bu yapı çift katmanlı kapasitans olarak adlandırılır. Çift katmanlı kapasitansın değeri birçok değişkene bağlıdır. Bu değişkenler arasında elektrotun potansiyeli, sıcaklık, iyonik konsantrasyonlar, iyon türleri, oksit katmanları ve elektrotun pürüzlülüğü gibi faktörler bulunmaktadır.

Warburg: Warburg empedansı, elektrokimyasal sistemlerde, özellikle difüzyon süreçlerinin analizi için kullanılan bir empedans bileşenidir. Warburg empedansı, elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonlarda, iyonların veya moleküllerin difüzyonuyla ilgili bilgi sağlar. Bu empedans, düşük frekanslarda belirgin hale gelir ve genellikle Nyquist diyagramında 45 derecelik bir eğimle görülen bir doğru olarak temsil edilir. Bu çalışmada ölçümler yüksek frekanslarda yapıldığından, Warburg empedansı düşük frekans bölgesinde ortaya çıktığı için bu etki tezin sonuç grafiklerinde gözlenmemiştir.



Şekil 1.10. EIS ölçümlerinde empedans yanıtlarının gösterimi
a) Nyquist grafiği ve b) Bode grafiği [76]

Şekil 1.10. da empedans cevaplarının Nyquist ve Bode grafiklerinin gösterimi yer almaktadır. Şekil 1.10. (a) da Nyquist grafiğinde, x ekseni empedansın gerçek kısmını (Z_r) ve y ekseni ise empedansın sanal kısmını (Z_i) temsil eder. X ekseninin ilk kestiği nokta, yani yüksek frekans limiti, elektrolit direncini (Re) gösterir ve oluşan yarım çemberin çapı ise şarj transfer direncini (R_{ct}) ifade eder. Şekil 1.10. (b) de ise Bode grafiği yer almaktadır. Bode grafiğinde, y ekseninde faz açısı (y) ve empedans modülü (|Z|) bağımsız değişkenler olarak gösterilirken, z ekseninde frekans değerleri bulunur.

1.4.5. Nitinol (NiTi)

Şekil hafızalı alaşımlar (SMA), akıllı metaller kategorisinde yer alır ve üstün mekanik ve fiziksel özellikleri sayesinde yaygın kullanımları söz konusudur. Bu alaşımlar, düşük yoğunluk, yüksek mukavemet, düşük yorulma direnci, korozyon direnci, biyouyumluluk ve birim şekil değiştirme gibi özelliklere sahiptir. Nitinol, nikel ve titanyumun eşit oranda birleşiminden oluşan bir şekil hafızalı alaşımdır. 1960'lı yıllarda Buchler ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. İsmi, nikel (Ni), titanyum (Ti) ve Naval Ordnance Laboratory (NOL) kelimelerinin birleşiminden gelmektedir. Nitinol, ısıl işlem

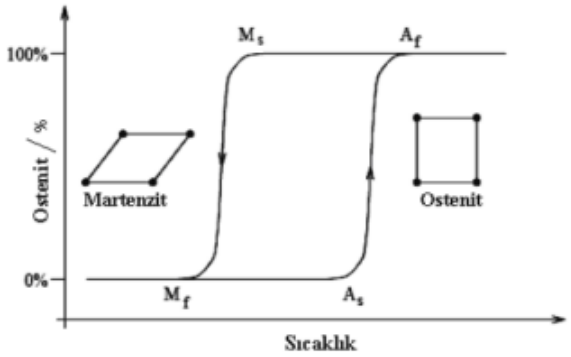
veya mekanik deformasyon sonrası orijinal şekline dönebilir. Süperelastikiyet, yüksek deformasyon sonrası formunu geri kazanabilme, şekil hafıza etkisi ise ısıtma ile eski haline gelebilme özelliklerini içerir. Bu özellikler, malzeme içerisindeki katı faz değişimleri sayesinde mümkündür. Süperelastikiyet için gerekli olan güç kuvvet, şekil hafıza için ise itici güç sıcaklıktır. Bu durum, malzemenin deformasyona uğradıktan sonra bile eski haline dönebilmesini sağlar. Bu iki özelliğin dışında Nitinolün biyomedikal cihazlar başta olmak üzere geniş uygulama alanlarının olmasını sağlayan özellikleri şunlardır [77] .

Düşük Yoğunluk: Hafif yapısı, medikal ve endüstriyel uygulamalarda tercih edilmesini sağlar.
Yüksek Mukavemet: Dayanıklı yapısı, zorlu koşullarda bile güvenilir performans sunar.
Düşük Yorulma Direnci: Uzun süreli kullanımda bile performansını korur.
Korozyon Direnci: Biyouyumlu yapısı, tıbbi implantlar için idealdir.
Tribolojik Özellikler: Aşınma ve sürtünme direnci yüksektir.

Biyomedikal uygulamalarda biyouyumluluk en önemli özelliklerden biridir. Nitinolün biyomedikal uygulamalarda kullanımında en önemli nokta Ni elementinin toksik ve kanserojen olmasıdır [78]. Nitinol alaşımının yüzeyinde, doğal olarak oluşan ince bir titanyumdioksit tabakası bulunmaktadır. Bu tabaka, nikel elementinin salınımını ihmal edilebilir düzeyde tutar ve Nitinolün canlı hücrelerle reaksiyona girmesini önleyerek korozyon hızını azaltır [74].

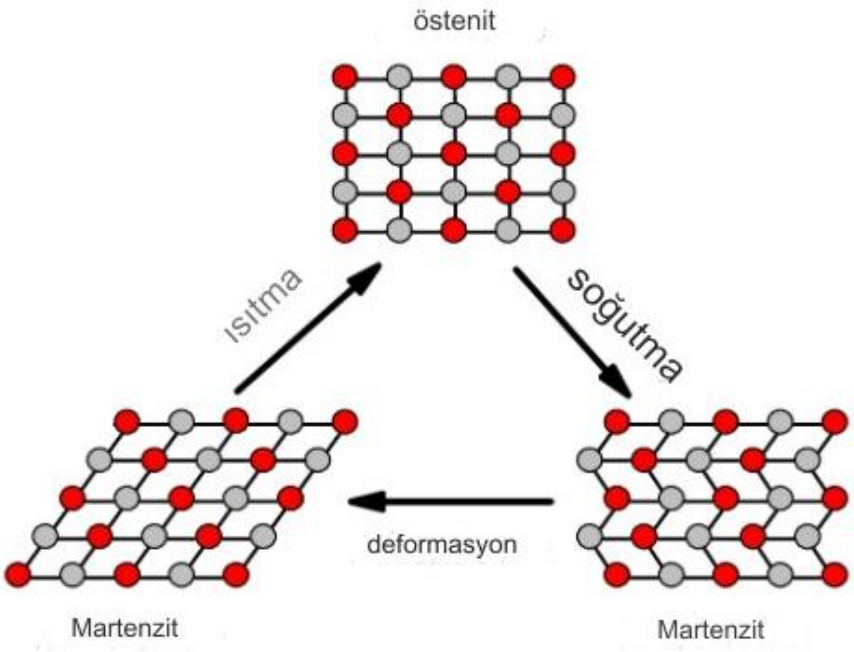
1.4.5.1. Şekil Hafıza ve Süperelastiklik Mekanizması

Nitinol gibi şekil hafızalı alaşımların östenit ve martenzit olmak üzere iki fazlı bir yapısı vardır. Düşük sıcaklıklarda martenzit faz gözlenirken, yüksek sıcaklıklarda östenit faz gözlenmektedir. Bu iki faz arasındaki temel fark kristal yapıdır. Atomlarının dizilişlerinin farklı olması, aralarında katı faz dönüşümünün olmasına olanak sağlamaktadır. Fazın tersinir olması halindeyse eski durumuna geri dönen şekil hafızalı alaşımlar oluşmaktadır [80].



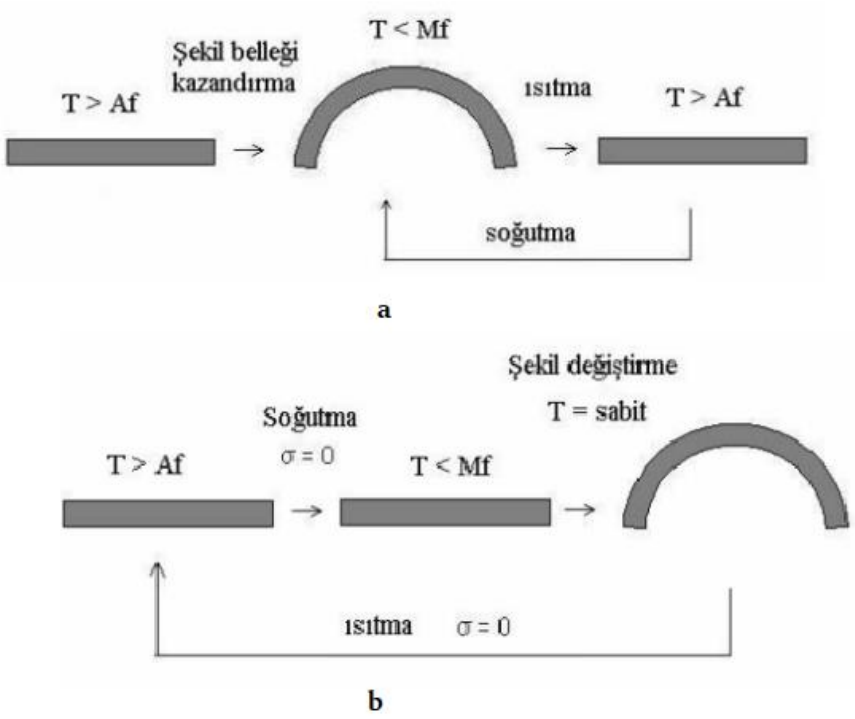
Şekil 1.11. Nitinolün sıcaklık geçişleri ve histerisiz eğrisi [81]

Östenitik fazdan martenzitik faza dönüşüm, sıcaklık ve gerilim histerezisi sergiler. Bu dönüşüm ısıtma sırasında Ms ve Mf, soğutma sırasında As ve Af olmak üzere dört farklı sıcaklıkla tanımlanır. Ms, martenzite dönüşümün başladığı, Mf ise bittiği sıcaklıkları ifade eder. As, ters dönüşümün başladığı, Af ise bittiği sıcaklıklardır. Dönüşüm histerezisi 10 ila 50°C arasında değişir ve alaşım türüne bağlı olarak farklılık gösterir. Isıtma ve soğutma sıcaklıkları örtüşmez.



Şekil 1.12. Şekil hafıza özelliğinin kristal boyuta etkisi

Martenzitik dönüşüm, difüzyonsuz bir faz dönüşümüdür. Bu dönüşümler genellikle alaşımların yüksek sıcaklıklarda sıcaklık, basınç veya her ikisinin etkisiyle düşük sıcaklıklarda farklı kristal yapıdaki fazlara dönüşmesidir. Difüzyonsuz dönüşüm olduğu için de alaşımın kristal yapısı değişir ancak kimyasal yapı aynı kalmaktadır.

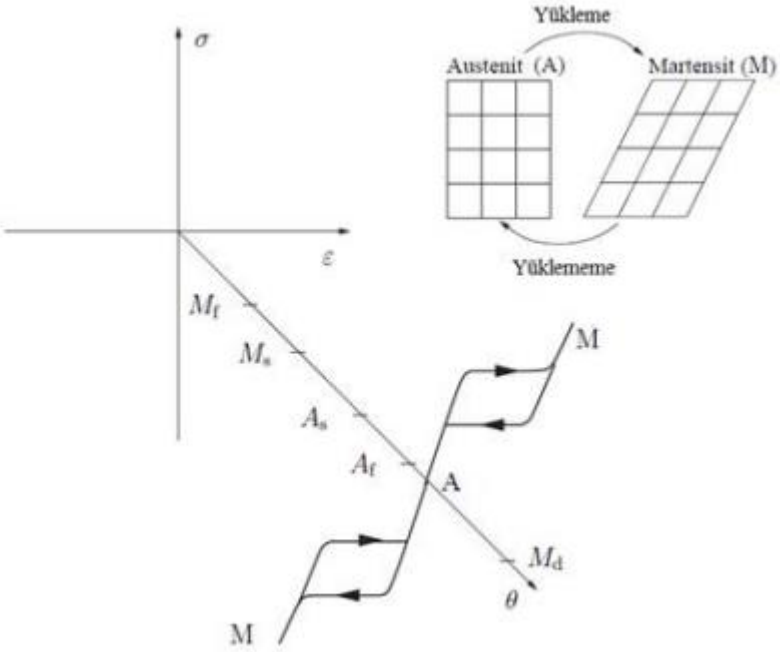


Şekil 1.13. a) Tek yönlü b) Çift yönlü şekil hafıza davranışı [82]

Şekil 1.13. a da gösterildiği gibi, M_f sıcaklığının altında deforme olan bir alaşım, uygulanan kuvvet kaldırıldığında eski haline geri dönemez. Ancak, alaşım Östenit bitiş sıcaklığı (A_f) sıcaklığının üzerinde ısıtıldığında, başlangıçtaki şeklini geri kazanabilir. M_f sıcaklığının altına yeniden düşürüldüğünde ise alaşım, deforme olmuş şeklini korur. Bu özellik, tek yönlü şekil hafıza olarak adlandırılır. Şekil 1.13. b de görüldüğü gibi martenzit bitiş sıcaklığının altında kalan sıcaklıklarda yani $T<M_f$ durumunda tek yönlü şekil hafıza olayında olduğu gibi martenzit fazdaki alaşım deformasyona uğratıldıktan sonra uygulanan kuvvetin kaldırılması ile alaşım deforme edilmiş şeklini korur. Sıcaklık değerinin östenit bitiş sıcaklığı üzerine ($T>A_f$) çıkması ile östenit fazda alaşım deforme olmamış haline döner. Geri dönüşümünden sonra tekrar martenzit bitiş sıcaklığının

altındaki sıcaklık değerine yani $T<M_f$ durumuna soğutulduğunda deformasyona uğramış halini geri kazanması çift yönlü şekil hafıza olayıdır.

Süperelastiklik, alaşımın dış kuvvet etkisiyle şekil değiştirmesi ve kuvvet ortadan kalktığında orijinal şekline geri dönmesidir [83]. Süperelastiklik, şekil hafızası etkisinden değişik olarak sıcaklıktan farklı diğer bir deyişle bağımsız şekilde gerçekleşir. Östenit bitiş sıcaklığının üzerinde, izotermal olarak uygulanan saf bir mekanik yük ile faz dönüşümü gerçekleşebilir. Bu yükleme, tamamen ikizlenmemiş martenzit martensit oluşturur ve büyük zorlanmalara neden olur. Bu şekilde oluşan martenzit, stres kaynaklı martenzit olarak bilinir ve yalnızca stres uygulaması altında kararlıdır. Yük kaldırıldığında, dönüşüm sırasında oluşan stres ve çevresindeki elastik kuvvetlerin azalması nedeniyle martenzit, orijinal östenit fazına geri döner.



Şekil 1.14. Süperelastiklikte faz dönüşümü

1.4.5.2. Nitinol ve Biyomedikal Uygulamaları

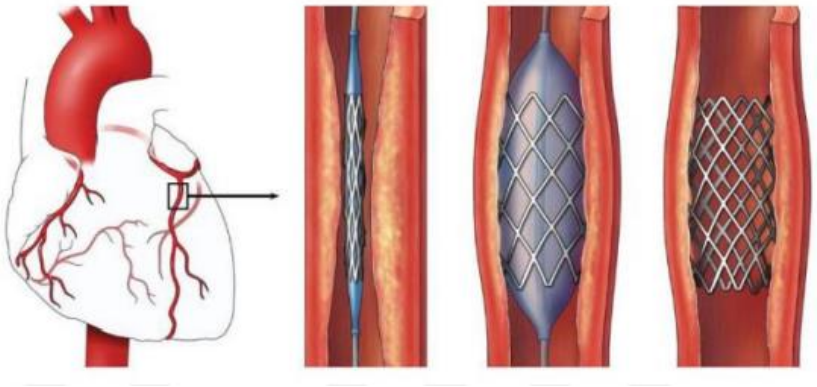
Geleneksel olarak biyomedikal stent için kullanılan Nitinol [84], paslanmaz çeliğin yaklaşık on katı olan yüksek bir elastikiyet, yüksek stres altında geri kazanılabilir deformasyon ile karakterize edilir. Bunun nedeni önceki bölümde bahsedilen malzemenin mekanik histeretik doğası nedeniyle gerinimin yüklemeden daha düşük bir stres koşulunda tersine çevrilebilmesidir [85].

Nitinol kullanılan farklı biyomedikal materyallere nazaran daha düşük yoğunluk ve elastik modül özelliği gösterir. Nitinol ince filmler, termal, stres, manyetik veya elektrik alanları gibi çevresel değişikliklere karşı hassastır, bu nedenle mikrosensörlerdeki uygulamalar için ideal olabilir [86].

Nitinol, impedimetrik sensör konfigürasyonunda elektrot malzemesi olarak biri süperelastik ve diğeri şekil hafızalı olmak üzere iki formda benimsenebilir. Bu sensörlerin rezonans frekansları, malzemenin mikro yapısını ve modülünü değiştiren Nitinol sıcaklığındaki değişikliklerle ayarlanabilir. Nitinolün mikro yapısı, uygulanan stresteki değişikliklerle de kontrol edilebilir. Nitinol kullanmanın bir avantajı, çok küçük üretilebilmesidir, dolayısıyla bir faz dönüşümü oluşturmak için minimum termal enerji ve kuvvet yeterli olacaktır [87]. Nitinol, 100 nm boyutunda dahi ölçülebilir şekil hafıza özelliği göstermeye devam etmektedir [88]. Ayrıca ucuz ve temini de kolaydır.

NiTi alaşımlarının biyomedikal ve cerrahi alanlardaki önemi, korozyona karşı yüksek dirençleri, biyouyumlulukları, süperelastik özellikleri ve paslanmaz çeliklere göre daha yüksek mukavemetlerinden kaynaklanmaktadır. Bu özellikler, tıpta metallerin ve alaşımların uygulanmasındaki sınırlamaları ortadan kaldırmıştır. Kardiyoloji başta olmak üzere, birçok biyomedikal uygulamada kullanılan bu alaşımlar, özellikle kendi kendine genişleyen stentlerin yapımında yaygın olarak tercih edilmektedir.

Nitinolün başarılı uygulamalarında biri kendiliğinden genişleyebilen damar stentleridir [80]. Kroner veya arter farketmeksizin tıkanıklık olan damar bölgesine balon yardımıyla büzülmüş şekilde martenzit fazında ulaştırılan stent, vücut ısısının etkisiyle östenit fazına geçerek orijinal şeklini alır ve genişler, böylece damar açılır. Damarın tekrar tıkanmasını engellemek için yavaş yavaş ilaç salan stentler de kullanılabilir. Şekil 1.15. SMA ile imal edilmiş bir damar stentinin uygulamasını göstermektedir.



Şekil 1.15. Damar içi stent uygulaması [80]

Şekil hafızalı alaşımların biyomedikal alanda kullanıldığı bir diğer önemli alan da genel cerrahidir. Bu alaşımlar, endoskopi gibi dar alanlarda çalışmaya imkân tanıyan mini cihazlarda sıklıkla tercih edilir. Endoskopik aletlerin esnek, bükülmeye dayanıklı ve belirli bir kuvveti uygulayabilir olması gerekmektedir. NiTi gibi şekil hafızalı alaşımlar, bu özellikleri sağladıkları için diğer malzemelere göre çok daha yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır. Şekil 1.16. da görülen şekil hafızalı alaşımlardan yapılmış endoskopik cihazlar, elastikiyet yetenekleriyle öne çıkar. Bu cihazlar, vücut içindeki dar ve sınırlı hareket alanlarında kullanılmak üzere tasarlanmıştır, bu nedenle kıvrılma yeteneğine sahip olmaları gerekir. Aynı zamanda, ince yapıları operasyon sırasında uygulanan darbelere ve kuvvetlere karşı dayanıklı olmalıdır. Nitinolün Östenit ve martenzit fazlarından faydalanan bu cihazlar, böbrek taşlarının çıkarılmasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır.



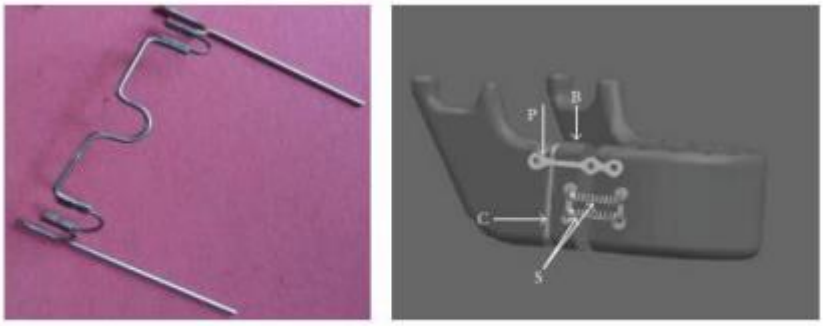
Şekil 1.16. Cerrahide kullanılan endoskopik aletler [80]

Nitinol, ortodontik diş telleri ve endodontik döner kök kanal aletlerinde yaygın olarak kullanılan şekil hafızalı alaşımlardır. Şekil 1.17. de, ortodonti tedavisinde kullanılan şekil hafızalı alaşımdan bir diş teli gösterilmiştir. Tedavide amaç, çarpık dişlere dışarıdan kuvvet uygulayarak bunları düzgün hizaya getirmektir. Tedavi süresince diş telleri de bu harekete uyum sağlamalıdır. Nitinol, yüksek yorulma dayanımı ve paslanmaz çeliğe kıyasla daha yüksek kuvvet uygulama kapasitesi nedeniyle tercih edilmektedir, bu da diş tellerinin değiştirilme sıklığını azaltır [89].



Şekil 1.17. Ortodonti tedavisinde kullanılan NiTi diş teli uygulaması [89]

Nitinol, diş hekimliğinde çene cerrahisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 1.18. de damak genişletici ve ortodontik distrakter cihazlar gösterilmektedir. Damak genişletme tedavilerinde bu malzemeler kullanılarak, süperelastiklik özelliklerinden yararlanılır. Tedavilerde, dişlere ve damağa sabit bir yük uygulanması önemlidir. Nitinol alaşımlar, düşük seviyede bir yükün uzun süre boyunca sabit kalmasına olanak tanır. Çene kemiğinin uzatılmasında ise ortodontik distrakterler kullanılarak tedavi sağlanır.



a) b)

Şekil 1.18. a) Damak açıcı ve b) Ortodontik distrakter [90].

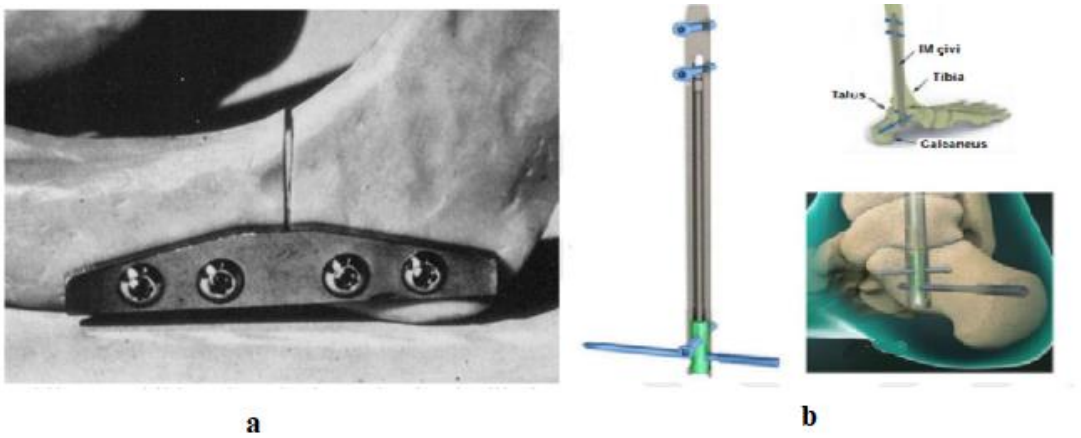
Nitinol alaşımların kullanıldığı bir diğer yer ortopedi uygulamalarıdır. Kemik parçalarının birleşmesinde etkili sonuçlar elde etmek için sabit fiksasyon ve uygun sıkıştırma hareketi gereklidir. Bu nedenle, kırık kemikler, iyileşme sırasında düzgün hizalamayı gerçekleştiren ve dengeyi koruyan bir sabitleyici cihaz kullanımıyla tedavi edilir. Sabitleme cihazı, invaziv olmalı ve biyolojik olarak uygun kompresyon sağlamalıdır. Şekil hatırlamalı alaşımlar, bu gereksinimleri etkin bir şekilde karşılar. Şekil 1.19. da, bu alaşımlardan yapılmış ortopedik bir zımba görülmektedir.



Şekil 1.19. Nitinol ortopedik zımba [91]

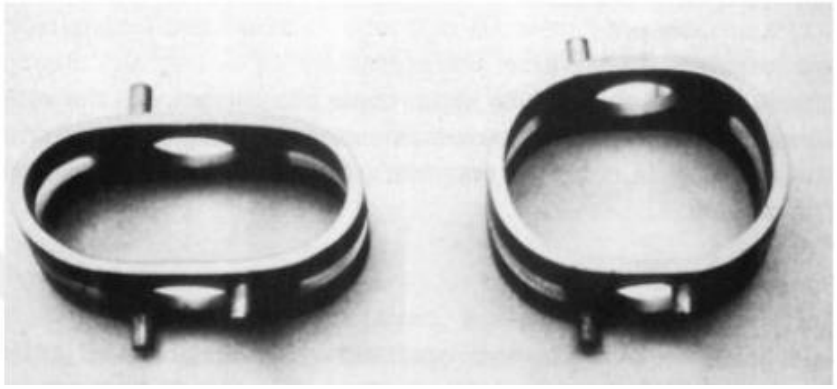
Nitinolün kullanıldığı ortopedik uygulamalarda fiksatör ve kemik içi çivi kullanımıda varır. Fiksatör kemik kırıklarının düzeltilmesi için üretilen bir malzemedir ve eksenel bir sıkıştırma gerilimi uygulayarak iyileşmeye yardımcı olur. Kırık kemiklerin düz bir şekilde tutulması için vida aracılığıyla kemiklere sabitlenir ve özellikle yüzde bulunan burun çene uzuvları gibi alçılamanın zor sağlanacağı bölgelerde kullanılmaktadır. Kemik içine kullanılan çiviler ise uzun kemiklerde oluşmuş kırıkların tedavisi için

tasarlanmış metal çubuk çividir [92]. Bu uygulamada, Nitinol çivi olarak kullanılır ve martenzit fazdayken kemiğe konumlandırılır. Vücut sıcaklığında östenik faza geçer ve orijinal şeklini alarak sıkılaşma sağlanır. Bu özellik, Nitinol'un şekil hafızası etkisinden kaynaklanır ve cerrahi implantlarda kullanımı yaygındır.



Şekil 1.20. a) Fiksatör b) kemik içi çivi uygulaması [92]

Nitinol omurilik yaralanmalarında omurga bileziği olarak kullanılmaktadır. Omurga dengesizliğinde normalinden fazla eğilme olabilmektedir. Bu malzeme omurga içerisinden geçen spinal kanalı sıkıştırarak tedaviyi sağlar. Şekil hafızalı alaşımlı omurga bilezikleri, geleneksel vida yöntemine göre çok daha pratik ve güvenilir bulunduğu için tercih edilmektedir.



Şekil 1.21. Omurga Bileziği [91]

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Materyaller

1) Deiyonize Su (Deionized Water, DIW) (Erciyes Üniversitesi Çevre Mühendisliği laboratuvarından temin edildi.)

2) Etil Alkol (Merck: 1117272500)

3) Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (Merck(% 35): 10860001000)

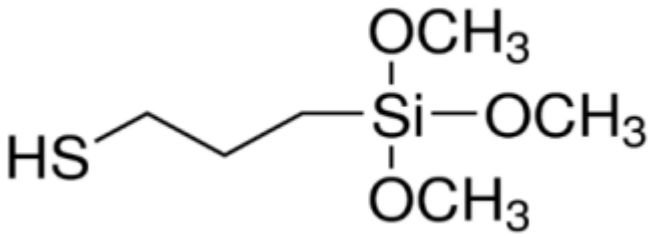
4) Sülfürik Asit (H_2SO_4) (Sigma Aldrich: 30743)

5) Potasyum Hidroksit (KOH) (Merck: 1050331000)

6) Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline (PBS)) (Chembio)

7) 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (MPS) (Sigma = 175617)

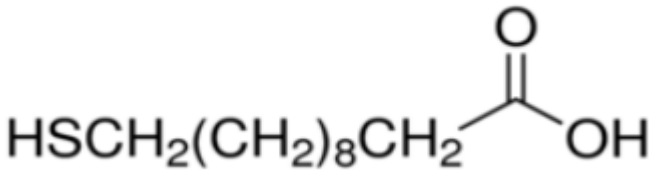
Kimyasal Formülü = $HS(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$



Şekil 2.1. MPS yapısı

8) 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) (Sigma Aldrich: 450561-5G)

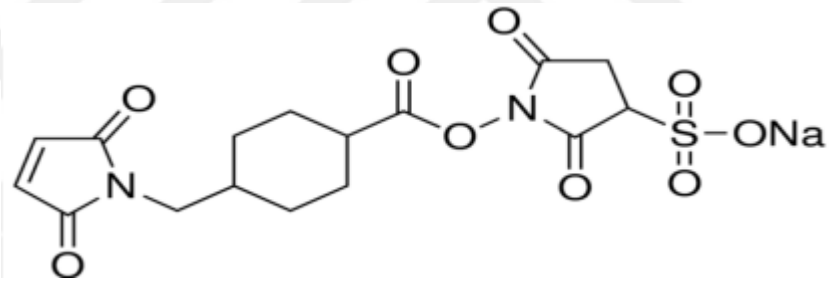
Kimyasal Formülü = $HS(CH_2)_{10}CO_2H$



*Şekil 2.2.*MUA yapısı

9) N-Maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-Nhydroxysuccinimide ester sodium salt (Sulfo-SMCC) (Sigma Aldrich: M6035)

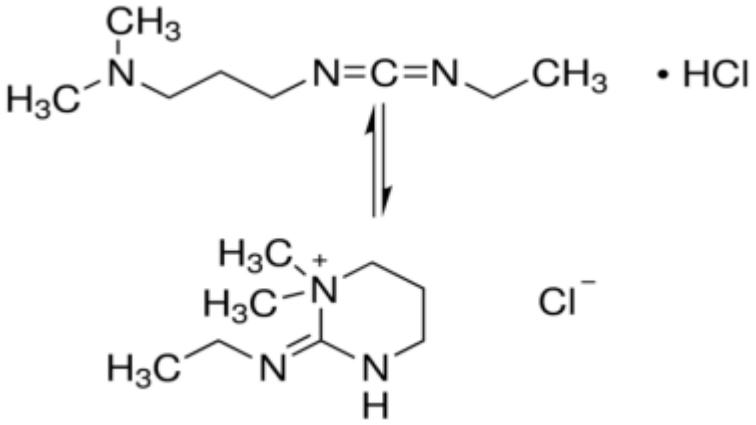
Kimyasal Formülü = $C_{16}H_{17}N_2NaO_9S$



Şekil 2.3. Sulfo-SMCC Yapısı

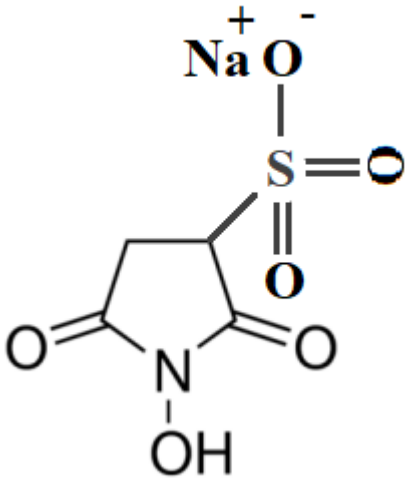
10) N-3-Dimethylaminopropyl-N′ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma Aldrich: 03450-5G)

Kimyasal Fomülü = $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$



Şekil 2.4. EDC yapısı

11) N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (Sulfo-NHS) (Sigma Aldrich: 56485-1G)
Kimyasal Fomülü = $C_4H_4NNaO_5S$



Şekil 2.5. Sulfo-NHS yapısı

2.1.2. Biyolojik Materyaller

1) Bovine Serum Albumin- Büyükbaş Serum Albümini (BSA) (Sigma Aldrich:A2153)

2) *Escherichia coli (E. coli)* Antikoru (Abcam Cambridge'den satın alındı.)

3) *Escherichia coli* ATCC 25922 Suşu *(E. coli*) (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarından temin edildi

4) *Klebsiella pneumoniae* Bakterisi (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarından temin edildi

5) *Proteus mirabilis* Bakterisi (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarından temin edildi)

6) *Bacillus clausii* Bakterisi (Enterogermina markalı probiyotik)

2.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar

1) Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) (ARRAY SOLUTIONS-AIM 4300)

Büyüklük, faz, SWR ve daha fazlasını içeren tüm RF parametrelerini hesaplamak ve sonuçların okunmasını kolaylaştıran bir grafik çizmek için bilgisayar kullanır. Sayısallaştırılmış verileri USB portu üzerinden bilgisayara gönderir. Analizör için güç, küçük bir DC güç kaynağından veya bir pilden elde edilebilir. Bir dizüstü bilgisayarla, ünite oldukça taşınabilirdir.

2) Karıştırıcı -Vorteks (Stuart)

3) Hassas Terazi (Radwag)

4) Ph Metre (MilWaukee)

5) Nitinol Tel (Aksöz Arge)

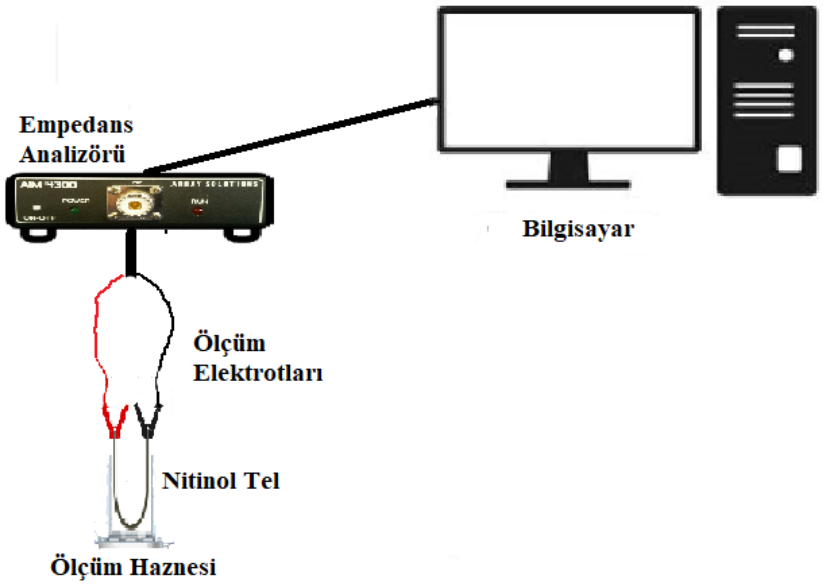
6) Pasteur Pipeti

7) Pipet ve pipet uçları (Eppendorf)

8) Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope, AFM) (VEECO MULTIMODE 8)

2.1.4. Kullanılan Deney Düzeneği

Deneyde, AIM 4300 iki elektrotlu elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) cihazı kullanılmıştır. Cihazın başlangıç ve bitiş frekansları 0.01-10 MHz olarak belirlenmiştir. MHz seviyelerinde başlangıç ve bitiş frekansı seçilmesinin sebebi bölüm 1 de belirtildiği üzere Nitinolün biyosensör performansının *E.coli* gibi antijenlerin tespiti için yüksek frekanslarda daha iyi sonuç vermesindendir [73]. Ayrıca elektrokimyasal yöntemlerin yüksek frekanslarda, ölçümleri genellikle çift katman kapasitansı ve yüzey özelliklerine daha duyarlıdır. Yüksek frekanslar, daha hızlı elektrokimyasal süreçleri ve yüzey olaylarını izlemek için kullanışlıdır. Bu frekanslar, biyosensör yüzeyindeki hızlı bağlanma ve ayrılma olaylarını tespit etmek için idealdir. Tez kapsamında yapılan öncül denemelerde yüksek frekans aralığında, yüzey kaplamalarının ve işlevselleştirmelerin etkisi daha belirgin olmuştur. Bu nedenle deneylerin tüm adımlarında MHz seviyelerinde frekanslarla çalışılmıştır. 4 cm uzunluğundaki U formu verilmiş Nitinol tel, yüzey işlevselleştirme işlemlerine tabi tutulmuştur. Deney adımları boyunca daldırma işlemini kolaylaştırmak ve EIS cihazının elektrot bağlantılarının yapılacağı yerlerde yüzey modifikasyonu olmaması için Nitinol teller ependorf hücreler içerisine U formda yerleştirilmiş ve telin iki ucu ependorf haznenin dışında kalacak şekilde konumlandırılmıştır. Bu düzenek, biyosensör performansını ve *E. coli* tespiti için biyosensörün etkinliğini değerlendirmek üzere optimize edilmiştir.



Şekil 2.6. Deney düzeneği

EIS elektrokimyasal hücreye sinüzoidal bir sinyal uygulanmasını ve üretilen akımın ölçülmesini temel alır. Empedans, değişen akıma karşı hücrenin direncini temsil eder ve elektrokimyasal hücredeki akım ile voltaj arasındaki ilişkiyi tanımlar. Empedans ölçümlerinin sonucunda, Empedansın gerçek ve sanal bileşenleri elde edilir ve bu bileşenler elektrot-elektrolit ara yüzeyindeki karakteristik kapasitans ve direnç elementlerini tanımlar.

Nitinol elektrot yüzeyinde antijen-antikor komplekslerinin oluşumu, yüzey tabakasının direncinde ve elektriksel çift katmandaki yük dağılımında değişikliklere yol açar. Bu nedenle, empedans ölçümleri, antikor kompleks bileşeniyle işlevselleştirilmiş elektrot yüzeyindeki biyolojik komplekslerin bağlanma olayını ve kompleksin oluşumunun kinetiği hakkında bilgi sağlar. Bu ölçüm türü, yüzeyde gerçekleşen biyolojik olayları ve etkileşimleri izlemek için önemli bir araçtır.

2.2. Metot

Bu tez çalışmasında, *E. coli* tespiti için Nitinol üzerinde iki farklı yüzey işlevselleştirme metodu denenmiştir. Her iki metot için üçer örnek üzerinden deneyler yürütülmüştür. Her metodun sonuçları kendi içinde ortalama hesaplanarak oluşturulmuştur.

Tablo 2.1. Yüzey işlevselleştirme metotları

	Kaplama Ajanı	**Bağlayıcı**
Metot 1	MUA	EDC/Sulfo-NHS
Metot 2	MPS	Sulfo-SMCC

Öncelikle, telin yüzeyi MPS ve MUA kullanılarak modifiye edilmiştir. Ardından, Sulfo-SMCC ve EDC-Sulfo-NHS reaktifleri ile aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Yüzeye *E. coli* bakterisinin yüzey antijenine özgü *E. coli* antikorunun immobilizasyonun sağlanması ve *E. coli* tespitinin gerçekleştirilmesinden hemen önce kullanılan yüzey işlevselleştirme metotlarından hangisinin daha uygun olduğunun belirlenmesi için Bovine Serum Albumin (BSA) tespiti yapılmıştır. BSA tespiti öncesi ve sonrasında alınan EIS ölçümlerinde MUA kaplama ajanının kullanıldığı metot 1 de metot 2 ye göre daha yüksek empedans değişimleri gözlenmiştir. MUA kullanılarak yapılan yüzey işlevselleştirmenin, MPS kullanılarak yapılan yüzey işlevselleştirmeye göre tespit için daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sebeple *E. coli* bakterisinin tespiti ve konsantrasyon deneyleri, metot 1 prosedürüyle gerçekleştirilmiştir.

Yüzeydeki karboksil gruplarına *E. coli* bakterisinin yüzey antijenine özgü *E. coli* antikorları immobilize edilerek spesifik bağlanma sağlanmıştır. BSA ile bloklama işlemi yapıldıktan sonra, Nitinol teller ependorf hücreler içerisine yerleştirilerek yüzey *E. coli* bakterisi ile inkübe edilmiştir. Ölçümler, Nitinol telin uçlarına bağlanan EIS cihazının timsah uçlu elektrotları aracılığıyla alınmış, elektrokimyasal tepkiler kaydedilmiştir. Bu düzenek, biyosensörün performansını ve *E. coli* tespiti için etkinliğini değerlendirmek üzere optimize edilmiştir.

Metot 1 için Nitinol sensör yüzeyi ilk olarak KOH çözeltisine ardından MUA çözeltisine maruz bırakılmıştır. Bu sayede bağlayıcıların tutunacağı fonksiyonel gruplar yani karboksilik asit (COOH) yüzeyde oluşturulmuştur. SH (tiyol) grupları ile Nitinol yüzeyindeki nikellerin kimyasal tutulumu gerçekleştikten sonra ara bağlama ajanı olarak EDC/Sulfo-NHS kullanılmış ve sensör yüzeyi, amin reaktif olarak işlevselleştirilmiştir. Böylece *E.coli* antikorunun immobilizasyonu için yüzey uygun duruma getirilmiştir [13].

Metot 2 için ise sensör yüzeyi ilk olarak KOH çözeltisine maruz bırakılmıştır. Böylece yüzeyde MPS'in metoksi gruplarının bağlanacağı OH grupları oluşturulmuştur. MPS uygulanmasının ardından Sulfo-SMCC kullanılmıştır. Sulfo-SMCC ye ait **N**-hydroxysuccinimide (NHS) grubu sensör yüzeyinde bulunan MPS muamelesi sonrası oluşan SH (tiyol) grubuyla stabil kovalent bağı oluşturması amaçlanmıştır [13]. Böylece sensör yüzeyi, amin reaktif hale getirilerek BSA tespiti için uygun bir ortam oluşturulmuştur.

Metot 1 le devam edilmesinin kararının ardından *E.coli* antijeninin tespiti için sensör yüzeyine antikorların immobilize edilmesinden sonra spesifik olmayan bağlantıların önlenmesi için BSA solüsyonu uygulanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Nitinol yüzeye *E. coli* antikorunun immobilizasyonundan sonra yüzey işlevselleştirme tamamlanmış olup sistem *E. coli* tespitine hazır hale getirilmiştir.

E. coli stok çözeltisinden PBS ile seyreltme işlemi yapılarak 10^1-10^6 CFU/mL dilüsyonları hazırlanmıştır. En düşük konsantrasyondan başlanarak sistem beslenmiştir ve tespit işlemi tamamlanmıştır.

2.2.1. Nitinol Tellerinin Hazırlanması ve Temizlenmesi

Bu tez çalışmasında temini kolay ve maliyeti düşük olduğu için Nitinolün tel formu kullanılmıştır. 0.25 mm kalınlığında Nitinol telden 4 cm uzunluğunda 6 örnek hazırlanmıştır.

Nitinol teller, yüzeydeki organik ve inorganik kirlerden arındırmak için sırasıyla piranha, etanol ve saf su içerisinde temizlenmiştir. Piranha solüsyonu, özellikle laboratuvar ortamlarında yüzeylerin temizlenmesi ve organik maddelerin tamamen ortadan kaldırılması için kullanılır. Bu güçlü karışım, yüzeylerdeki organik kalıntıları

uzaklaştırarak son derece temiz hale getirir. Ayrıca, malzemelerin yüzeylerini hidrofilik (su çekici) yapmak için de kullanılır [93].

Sensör temizliği için her deneyden önce piranha solüsyonu DIW, Sülfürik Asit, Hidrojen Peroksit kullanılarak hazırlandı (% 33 DIW, % 33 H_2SO_4 + % 33 H_2O_2). Elde edilen 1 ml hacminde piranha solüsyonu her bir Nitinol tele 2 dakika boyunca uygulandı. Organik kalıntılardan arındırılan Nitinol sensör, 2 dakika boyunca önce saf su daha sonra %95 etanole maruz bırakılarak temizliği sağlandı.

2.2.2. Nitinol Yüzeyinde Hidroksil Grupların Oluşturulması

Nitinol yüzeyinde hidroksil grupları oluşturmak, yüzeyin daha reaktif hale gelmesini ve işlevsel grupların veya biyomoleküllerin bağlanmasını sağlamak için önemlidir.

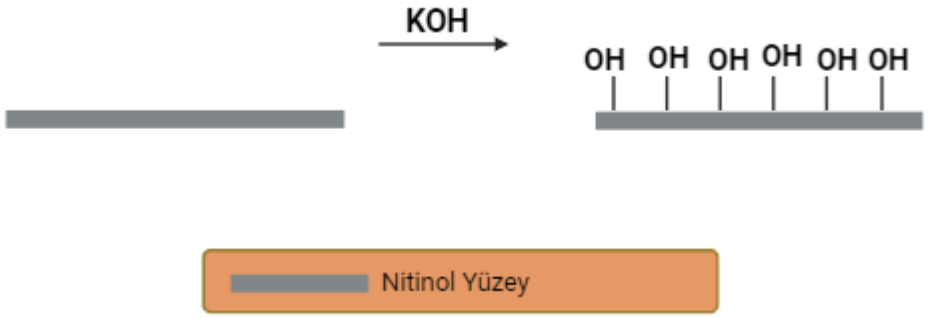
KOH uygulanması gibi kimyasal işlemlerle yüzeyde hidroksil (OH) grupları oluşturulabilir, bu da yüzeyin daha reaktif hale gelmesini sağlar ve diğer kimyasal modifikasyonlar için uygun bir temel oluşturur.

Nitinol üzerine hidroksil (-OH) gruplarının bağlandığı bir yüzey elde edebilmek için NaOH veya KOH ile işlenen Nitinol numunenin yüzeyinde daha fazla -OH grubunun olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [94-96].

Çalışmada Potasyum hidroksit (KOH) yüzeyde hidroksil grupları oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Böylece işlem sonrası Nitinol üzerinde düzenli ve kontrollü bir hidroksil tabakası meydana gelmiştir.

Nitinol ile KOH etkileşiminin kimyasal reaksiyon denklemi şu şekildedir;

$$NiTi+2KOH+2H_2O \rightarrow Ni(OH)_2+Ti(OH)_4+2K^+ +2OH^-$$



Şekil 2.7. Nitinol ile KOH etkileşimi

KOH çözeltisi 0.1 M olacak şekilde DIW ile hazırlanmıştır. Nitinol teller 1 gece süreyle oda sıcaklığında tel uçları ependorf haznenin dışında kalacak şekilde u formda çözelti içerisine daldırılmıştır. Ardından DIW ile yıkama yapılmıştır.

2.2.3. MUA ve MPS Kaplama

Bölüm 1 de bahsedildiği üzere spesifik olan etkileşimlerin dışında ki diğer etkileşimlerin oluşmaması ya da ihmal edilebilir düzeyde oluşması, *E. coli* tespitinin hassas ve doğru şekilde yapılabilmesi için önemlidir. Nitinol yüzeyin kendiliğinden düzenlenen tabakalar ile diğer bir deyişle SAM'ler ile doğru şekilde işlevselleştirilmesi biyosensör için kritik noktadır.

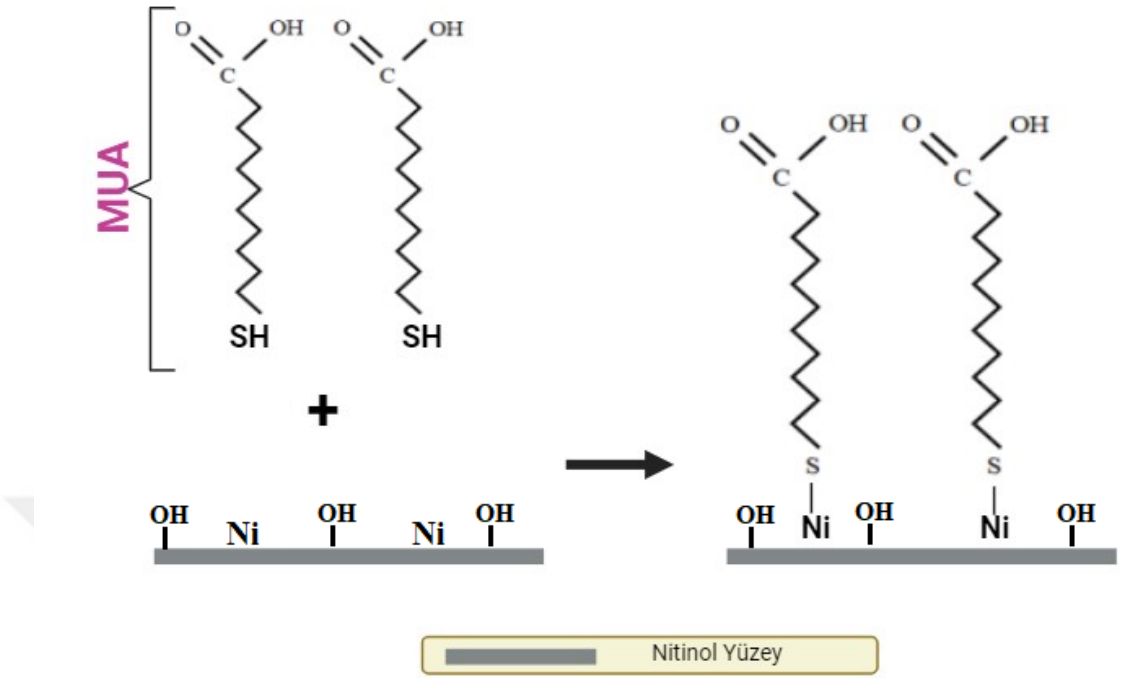
SH grupları (Tiyol), metallere yüksek ilgi gösteren bileşiklerdir. SAM'ler yüzey ile güçlü bir kovalent bağ oluşumu sağlayan bir uç grup içerirler. Ayrıca stabilitesini van der waals bağları etkileşimleriyle sağlayan hidrokarbon zinciri (-CR) ve COOH, OH ve NH_2 gibi fonksiyonel son grup içeren bileşiklerdir.

Metot 1 kapsamında 11-Merkaptoundekanoik asit (MUA) kaplama ajanı kullanılmıştır. MUA, bir ucunda tiyol (-SH) grubu ve diğer ucunda karboksil (-COOH) grubu içeren 11 karbonlu bir zincirden oluşur. MUA'nın tiyol grubu, metallerin yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır. Karboksil grubu yüzeyin üstünde serbest kalır ve bu gruba ara bağlama ajanı EDC/sulfo-NHS kullanılarak biyomoleküller bağlanabilir.

Bu metotta MUA bileşiğinin SH grupları (tiyol) Nitinol sensörde bulunan Nikel (Ni) elementleri ile etkileşime girerek sensör yüzeyinde karboksille işlevselleştirilmiş SAM oluşturur. MUA işleminden önce KOH maruziyeti ile yüzey OH gruplarınca zenginleştirilmişti. Tiyol gruplarının OH grupları yerine Ni elementine bağlanma sebebi Ni atomlarının, tiyol gruplarına karşı yüksek afinitesi dolaylıdır. Bu yüksek afinite, SH gruplarının nikel atomları ile bağlanma olasılığını artırır. Kimyasal afinite, atomlar veya moleküller arasındaki bağlanma eğilimini ifade eder ve nikel atomları, tiyol gruplarına karşı güçlü bir çekim gösterir. Nitinol, nikel ve titanyum alaşımıdır ve yüzeyde her iki element de bulunabilir. Ancak, tiyol gruplarının (SH) Nitinol yüzeyinde hangi elementle daha güçlü bir şekilde bağlandığına bakacak olursak, tiyol grupları genellikle nikel (Ni) ile daha güçlü bir bağ oluşturur. Bunun sebebi, nikelin tiyol grupları ile kovalent bağ oluşturma eğiliminde olmasıdır.

Dolayısıyla, MUA'nın SH gruplarının Nitinol yüzeyinde büyük ölçüde nikel (Ni) atomları ile bağlanması beklenir. Titanyum (Ti) atomları da yüzeylerde bulunabilir, ancak SH grupları nikel atomları ile daha yüksek afiniteye sahip olduğu için esas olarak nikel ile reaksiyona girerler.

Şekil 2.8.'de illüstre edildiği gibi öncelikle S-H bağlarının kopması, ardından Ni-S bağının oluşması söz konusudur. MUA'da bulunan SH grupları daha reaktif olduğu için Nikele bağlanır. Nikel atomları ile tiyol grupları arasında oluşan kovalent bağlar, MUA'nın yüzeye güçlü bir şekilde tutunmasını sağlar. MUA da bulunan karboksil grubu yüzeyin üstünde serbest kalır ve bu gruba EDC/Sulfo-NHS aracılığıyla biyomoleküller bağlanabilir.

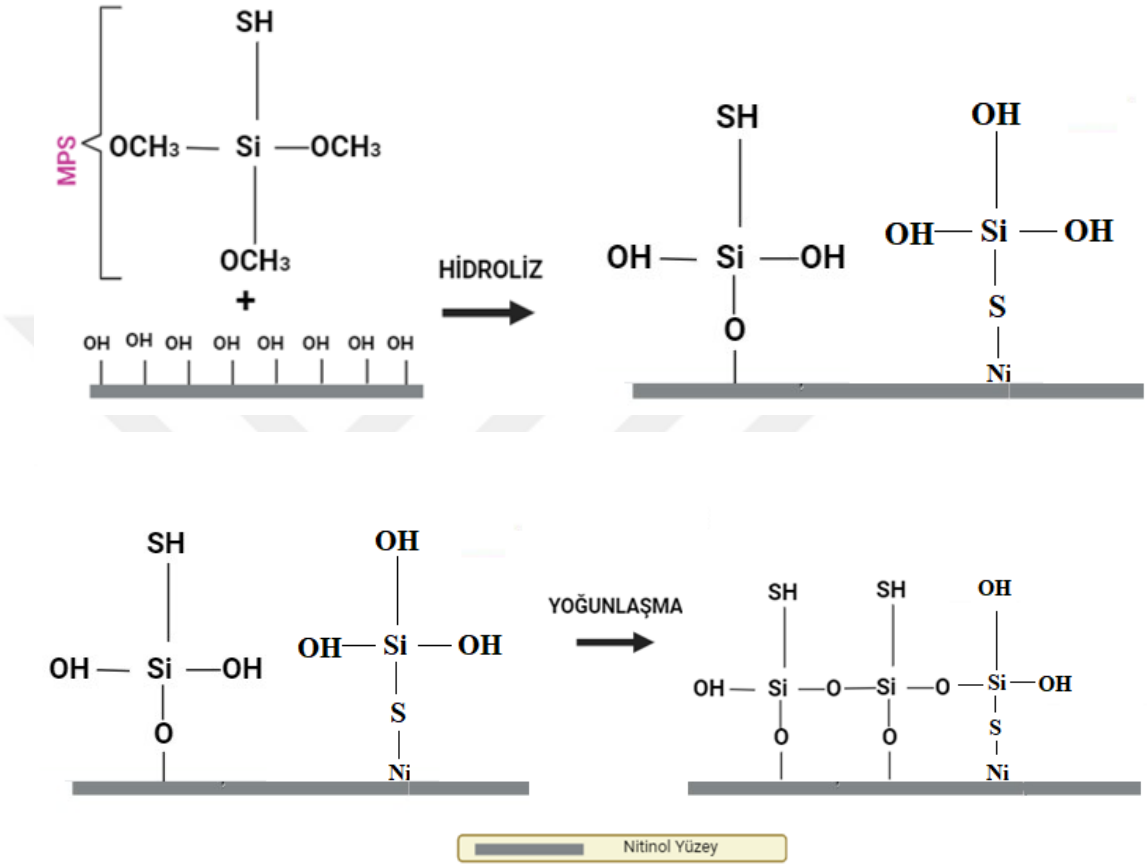


Şekil 2.8. MUA kaplamanın yüzey ile etkileşimi

Metot 2 kapsamında 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilane (MPS) kimyasal kaplama ajanı kullanılmıştır. MPS kaplaması, Nitinol yüzeyindeki hidroksil grupları ile MPS'in metoksi grupları arasındaki yoğunlaşma reaksiyonları ile gerçekleşir. MPS'in metoksi grupları (Si-OCH3) hidrolize olur ve silanol (Si-OH) grupları oluşturur. Bu silanol grupları, Nitinol yüzeyindeki hidroksil grupları ile kondenzasyon reaksiyonları yaparak kovalent bağlar oluşturur. Bu reaksiyon sonucunda Nitinol yüzeyi, MPS molekülleri ile kaplanmış ve yüzeyde -SH (sülfhidril) grupları içeren işlevsel bir tabaka oluşturulmuştur. Diğer yandan yüzeyde bulunan Ni ile MPS in SH grupları da kovalent bağ oluşturabilir. Dolayısıyla, MPS'in Nitinol yüzeyinde hem hidroksil grupları ile hem de nikel atomları ile etkileşime girebildiği ancak SH grubunun özellikle nikel ile kovalent bağlar oluşturabileceği anlaşılmalıdır.
Bu durumda kaplama sonrasında üst kısımda hem SH hem de OH gruplarının oluşmuştur.

MPS ajanının, Nitinol yüzeye tutunmasında hidroliz ve yoğunlaşma şeklinde iki aşama bulunur. Öncelikle hidroliz reaksiyonu gerçekleşir, bu aşamada MPS de var olan Trimetoksisilan **(**$Si(OCH_3)_3$) grubundaki silan silanol olarak yer değiştirmektedir. İkinci

adımda ise yoğunlaşma reaksiyonu görülür. Buradaysa iki silanol'ün bir Si--O--Si bağı oluşturması söz konusudur [13].



Şekil 2.9. MPS kaplamanın yüzey ile etkileşimi

2.2.3.1. Çözeltilerin Hazırlığı ve Uygulaması

Gerek MUA gerek MPS kimyasalları için saklama koşulları 2 ila 8 °C' dir. Bu sebeple deneyde kullanılacağı ana kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kimyasallar, solüsyon hazırlanmadan önce oda sıcaklığına gelmeleri için birkaç dakika bekletilmiştir.

Metot 1 için 0,7 mg kadar MUA hassas terazide ölçümlenmiş ve 1 ml etil alkol ile yaklaşık 5 dakika vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Nitinol sensörler daha önce bahsedilen u form daldırma yöntemiyle 1 gece boyunca oda sıcaklığında MUA solüsyonu içinde bekletilmiştir. Her sensör için 300 µl solüsyon kullanılmıştır.

Nitinolün yüzeyine bağlanmayan MUA bileşiklerinin uzaklaştırılması için etil alkol ile yıkama yapılmıştır.

Metot 2 içinse 2.34 mg KOH hassas terazide ölçülmüştür. 50 µl DIW ile eklenmesinin devamında 10 ml ilave edilerek vorteks yardımıyla homojen bir solüsyon elde edene kadar karıştırılmıştır. Son olarak 10 µl MPS eklenerek ve pH metre ile pH ölçümlenmiştir. Çözeltinin pH bilisinin 9 olarak ölçümlenmesi kullanıma hazır duruma geldiğini göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar pH' ın 9.0 olmasının yüzey morfolojisinin, bağlayıcı immobilizasyonu için uygun olduğunu ortaya koymuştur [13]. Nitinol teller MUA uygulanmasına benzer şekilde u formda bu solüsyon içinde 60 dakika süreyle bekletildi. Nitinolün yüzeyine bağlanmayan MPS bileşiklerinin uzaklaştırılması için etil alkol ve saf su ile yıkama yapıldı. Bu işlemlerin ardından, COOH ve SH grupları ile işlevselleştirilmiş Nitinoller elde edilmiştir.

2.2.4. EDC / Sulfo-NHS ve Sulfo-SMCC Kaplama

Metot 1 kapsamında MUA kaplamasının ardından yüzeye EDC/Sulfo-NHS uygulanmıştır. Özellikle, katı substrat ile biyo-tanıma elemanları arasındaki SAM'ler ve EDC/NHS aracılığıyla kovalent bağlantı, biyosensörlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmıştır [97,98]. Katı bir yüzey üzerinde biyo-tanıma elemanlarının kovalent immobilizasyonu tipik olarak aşağıdaki üç adımdan oluşur:

(1) SAM'lerin inert bir yüzeye sabitlenmesi,

(2) aktif bir tabaka oluşturmak için EDC/NHS tarafından daha sonra yüzeyin aktive edilmesi ve

(3) biyomoleküllerin kovalent bağlanması.

Sulfo-NHS'nin yapısal formülü, N-hidroksisüksinimid halkasına bağlı sülfonat grubunu içerir. Sulfo-NHS (N-Hidroksisulfosüksinimid), NHS'ye benzer bir reaktiviteye sahip olup, su çözeltisinde daha yüksek çözünürlüğe sahip olan bir bileşiktir.

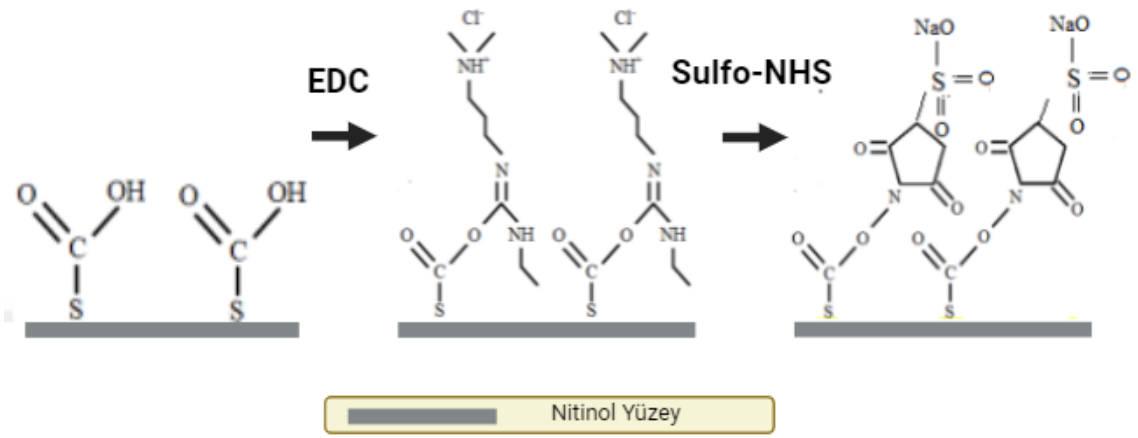
EDC/Sulfo-NHS kimyası, karboksil gruplarının amin grupları ile kovalent bağlar oluşturmak üzere aktivasyonu için yaygın olarak kullanılır.

Sulfo-NHS, özellikle su bazlı sistemlerde kullanılan uygulamalar için tercih edilir, çünkü bu ortamda NHS'den daha iyi çözünürlük gösterir.

EDC, birincil aminleri aktif bir ester ara maddesi olan O-asilisourea'ya dönüştürerek karboksilik asit ve hidroksil grupları ile birleştirir. Ardından bu aktif ester ara maddesi, aminlerle doğrudan reaksiyona girerek COOH ve OH grupları arasında amid bağı oluştururken, yan ürün olarak bir üre türevi meydana gelir [99].

Sulfo-NHS, EDC tarafından sağlanan aktivasyon ile birincil aminlerin ve karboksilatların çapraz bağlama reaksiyonlarının verimliliğini artırır ve kararlı (aminle reaktif) ara ürünler oluşturur. EDC, karboksilik asit ve hidroksil gruplarını birincil aminlerle birleştirirken, Sulfo-NHS bu işlemi daha verimli hale getirir ve daha kararlı ara ürünler oluşturur.

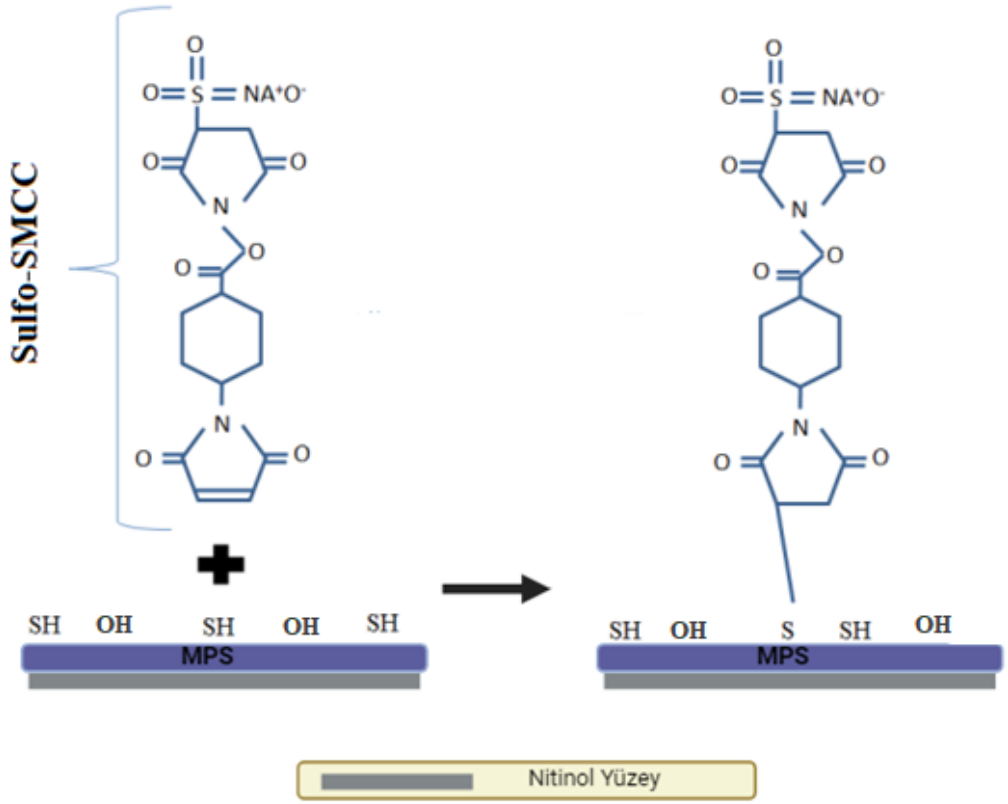
Böylece yüzey işlevselleştirme için MUA kimyasal kaplama ajanının uygulanmasının ardından EDC/Sulfo-NHS çapraz bağlama ajanları kullanılmış ve bu sayede biyosensör yüzeyine *E. coli* antikoru veya BSA bağlanabilmesi için uygun ortam oluşturulmuştur.



Şekil 2.10. MUA ile EDC/Sulfo-NHS Etkileşimi

Metot 2 kapsamında Sulfo-SMCC'nin $H_2C_2(CO)_2NH$ (maleimid) grubunun sensör yüzeyinde bulunan MPS dolayısıyla oluşmuş SH grubu ile sabit bir kovalent bağ oluşturarak tutunması hedeflenmiştir [13]. Sulfo-SMCC, sulu çözeltilerde yüksek çözünürlüğe sahip bir heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıdır ve tiyol gruplarını maleimid grupları ile kovalent olarak bağlamak için kullanılır. Bu reaktivite, sensör yüzeyine spesifik biyomoleküllerin veya diğer fonksiyonel grupların bağlanmasını

sağlar, böylece sensörün işlevselliği ve özgüllüğü artırılmış olur. Kovalent çapraz bağlama ajanı SulfoSMCC uygulanmasının ardından yüzey amin reaktif hale getirilmiş olur.



Şekil 2.11. MPS ile Sulfo-SMCC Etkileşimi

2.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlığı ve Uygulaması

Metot 1 için 5 mg EDC, 5 mg Sulfo-NHS ve 1 ml PBS homojen bir karışım elde edilene kadar vorteks yardımıyla karıştırıldı. Önceki aşamalarda uygulanan u form daldırma yöntemiyle Nitinoller oda ısısında 60 dakika süreyle hazırlanan solüsyonda bekletildi. Bağlanmayan moleküllerin yüzeyden uzaklaşması için PBS ile yıkama işlemi yapıldı.

Metot 2 için 1 ml DIW ve 1 mg Sulfo-SMCC homojen bir karışım elde edilene kadar vorteks yardımıyla karıştırıldı. u form daldırma yöntemiyle Nitinoller oda ısısında 60

dakika süreyle hazırlanan solüsyonda bekletildi. Bağlanmamış reaktifleri gidermek için DIW ile yıkama işlemi yapıldı.

2.2.5. BSA ile En Uygun Yüzey İşlevselleştirme Metodunun Belirlenmesi

Önceki aşamaların takibinde yapılan bu işlem her iki metot için aynı deney prosedürüyle devam ettirilmiştir.

Yüzeye *E.coli* bakterisinin yüzey antijenine özgü *E. coli* antikorunun immobilizasyonun sağlanması ve *E. coli* tespitinin gerçekleştirilmesinden hemen önce kullanılan yüzey işlevselleştirme metotlarından hangisinin daha uygun olduğunun belirlenmesi için Bovine Serum Albumin (BSA) tespiti yapılmıştır.

BSA, sığır kanından elde edilen ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir protein türüdür. Albumin ailesine ait olan bu protein, düşük maliyeti, yüksek saflığı ve biyolojik uyumluluğu nedeniyle pek çok biyokimyasal ve biyoteknolojik uygulamada tercih edilmektedir. Yapısal olarak, çeşitli bağlanma bölgeleri içerir ve bu nedenle farklı biyomoleküllerle etkileşime girebilir. Yaklaşık olarak 583 aminoasit içeren, karbonhidrat bulundurmayan polipeptit zincirine sahip olan BSA, biyolojik reaksiyonlarda stabilitesi nedeniyle tercih edilmektedir [100,101].

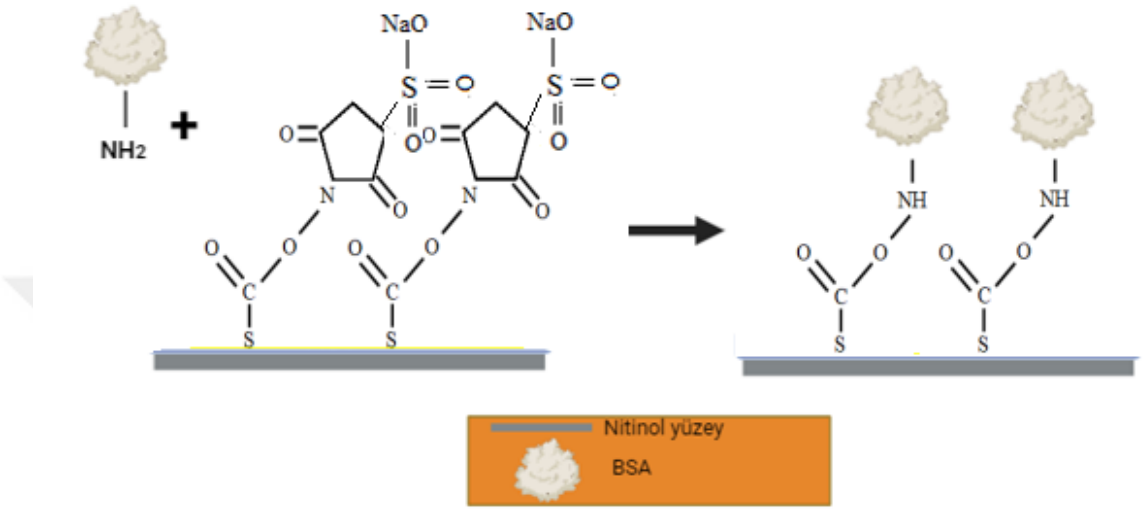
.

BSA solüsyonu hazırlanırken 0.5 mg BSA ve 10 ml PBS kullanıldı. (%5 BSA içerir). 60 dakika boyunca Nitinol sensörlere uygulandı. Spesifik olmayan bağlantıların temizlenmesi için PBS ile yıkama işlemi yapıldı.

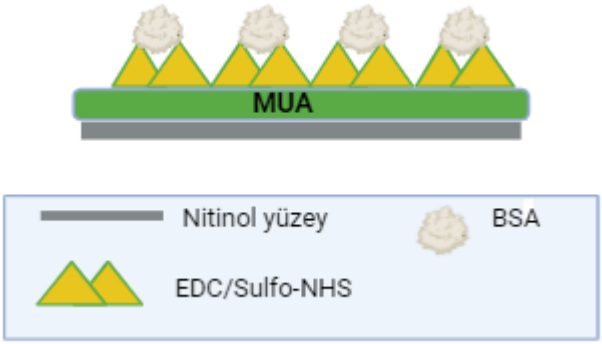
MPS ve MUA prosedürlerinden sonra amin reaktif hale getirilmiş olan yüzey BSA moleküllerinin tutunması için uygun yüzey ortamı sağlar.

Metot 1 kapsamnda son aşamada EDC/Sulfo-NHS uygulanmıştı bu sayede yüzey amin reaktif duruma getirilmişti. Antikorlar gibi peptitlerin ve proteinlerin immobilizasyon için oldukça yaygın ve basit yöntemlerden biri, NH_2 grubuyla yani birincil amin ile tepkime oluşturan kimyasal bileşiklerişn kullanılmasıdır. Bu amaçla kullanılabilecek gruplardan bazıları NHS esterleri, sülfonilklorürler, aldhitler, glikokalslar, oksiranlar, karbonatlar, imidoesterler, karbodiimitler, ve florofenil esterlerdir. Bahsedilen gruplar arasında, protein çapraz bağlama ve etiketleme için en popüler olanlar NHS esterleri ve imidoesterlerdir. NHS esterleri ile aktive edilmiş çapraz bağlayıcılar, hafif bazik

koşullarda birincil aminler ile reaksiyona girerek kararlı amid bağları oluşturur ve bu reaksiyon sonucunda N-hidroksisüksinimid (NHS) serbest kalır.

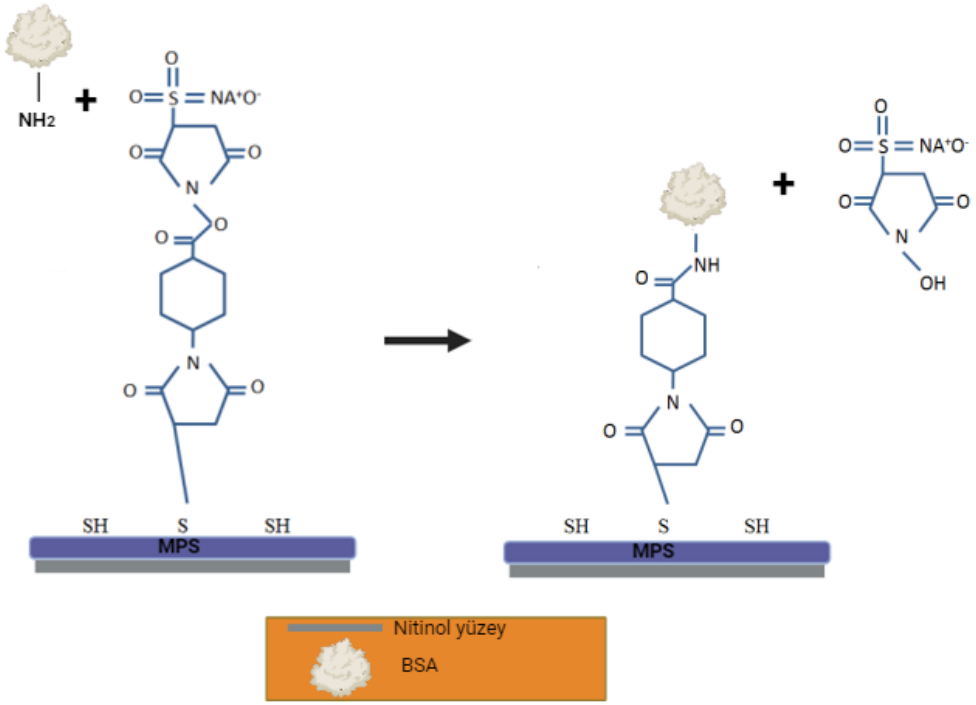


Şekil 2.12. Metot 1 için BSA ile EDC/Sulfo-NHS Etkileşimi

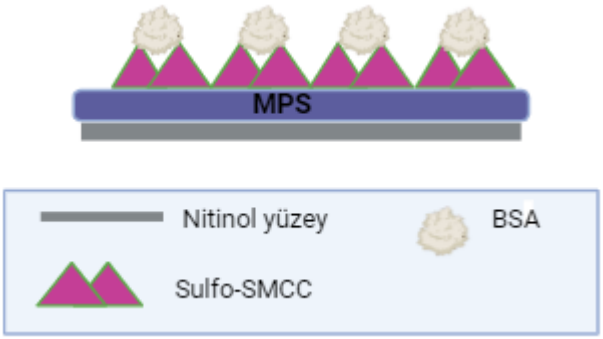


Şekil 2.13. Metot 1 için BSA tutulumunu gösteren model

Metot 2 kapsamında son aşamada Sulfo-SMCC uygulanmıştı bu sayede yüzey amin reaktif duruma getirilmişti. Sulfo-SMCC'nin maleimidi, sensör yüzeyine dikey olarak yerleştirilen sülfidril (-SH) ile reaksiyona girerek çapraz bağ oluştururken Sulfo-SMCC'deki NHS-ester, BSA aminiyle reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucu, amin grubu NHS esterine saldırarak bir amit bağı oluşturur. Böylece BSA, yüzeye bağlanarak kaplanır.



Şekil 2.14. Metot 2 için BSA ile Sulfo-SMCC Etkileşimi



Şekil 2.15. Metot 2 için BSA tutulumunu gösteren model

BSA'nın büyük ve yalıtkan protein molekülleri olması ve yüzeye bağlanması nedeniyle belirgin empedans artışı olmaktadır. BSA tespiti öncesi ve sonrasında alınan EIS ölçümlerinde MUA kaplama ajanının kullanıldığı metot 1 de metot 2 ye göre daha yüksek empedans değişimleri gözlenmiştir. AFM ile yapılan karakterizasyon sonrasında bu durum bir kez daha ispatlanmıştır.

MUA prosedürüyle (metot 1) gerçekleştirilen yüzey işlevselleştirme çalışmalarının, MPS prosedürüyle (metot 2) gerçekleştirilen yüzey işlevselleştirmeye çalışmalarına kıyasla *E. coli* tespiti için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

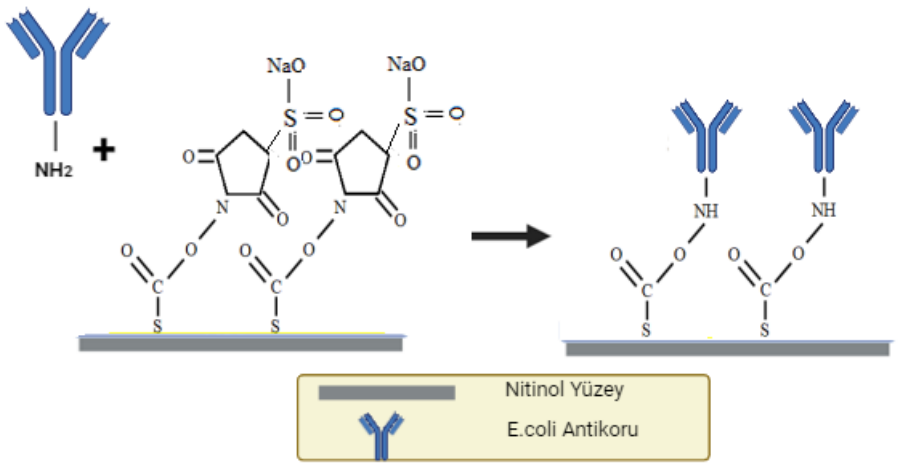
Bunun sebebinin MPS kaplama sonrası hem Ni-S-R tepkimesinin hem de Ni-O-Si-R tepkimesinin gerçekleşmesi sonucu olarak yüzeyin üst kısmında SH ve OH gruplarının kalması olduğu anlaşılmıştır.

MUA kaplama sonrasında ise yüzeyde sadece O=C-OH grupları kaldığı için yüzey işlevselleştirme daha başarılı olmuştur. Bu nedenle E. coli konsantrasyon deneyleri, metot 1 ile gerçekleştirilmiştir.

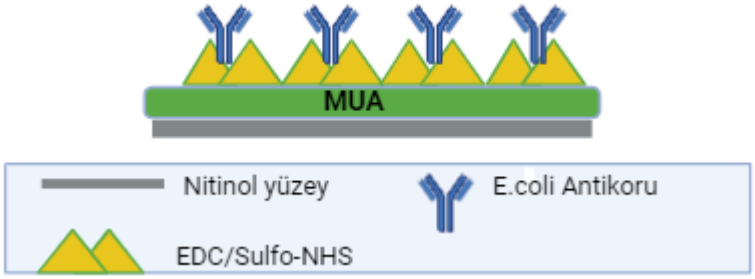
2.2.6. *E.coli* Antikorunun İmmobilizasyonu

Yeni bir grup Nitinol sensör *E.coli* Antikorunun immobilizasyonu için metot 1 e göre hazırlandı. Aşamalar daha önce bahsedildiği gibi sırayla uygulandı. Son olarak EDC/Sulfo-NHS işlemi sonrası yüzeyde oluşan amin reaktif gruplar, *E. coli* antikorlarının immobilizasyonu için yüzeyi hazır hale getirdi.

Bir önceki başlıkta anlatılan BSA bağlanmasına benzer şekilde bu kez antikorların yüzeye immobilizasyonu söz konusudur. Şöyle ki aktif Sulfo-NHS esteri, antikorların lizin (K) kalıntılarının yan zincirindeki birincil aminlerle değiştirilir ve böylece antikor amid bağı yoluyla immobilize edilir. Son olarak, hedef bakterilerin tespitinde, immobilize edilmiş antikorlar ve hücre yüzeyindeki antijenler arasında spesifik bir bağlanma olayı meydana gelir.



Şekil 2.16. Antikor ile EDC/ Sulfo-NHS Etkileşimi



Şekil 2.17. Antikor immobilizasyonunu gösteren model

E. coli bakterisinin yüzey antijenine özgü *E. coli* antikorunun stok çözeltisinden PBS ile seyreltilerek 10^{12} CFU/mL dilüsyonunda çözelti hazırlandı. Stok olarak kullanılan *E. coli* antikor tüpü her kullanımdan önce vorteks yardımıyla homojen hale getirildi. 900 µl PBS ile 10^{13} CFU/mL stok çözeltisinin 100 µl miktarı vorteks yardımıyla 5 dakika süreyle karıştırılarak hazırlanmıştır. *E.coli* konsantrasyon deneylerinin hepsinde *E. coli* antikorunun dilüsyonu 10^{12} CFU/mL olarak kullanıldı. Hazır duruma getirilen çözelti 40 dakika sensör yüzeyine u form daldırma yöntemiyle uygulandı. Bağlanmayan esterler PBS ile uzaklaştırıldı.

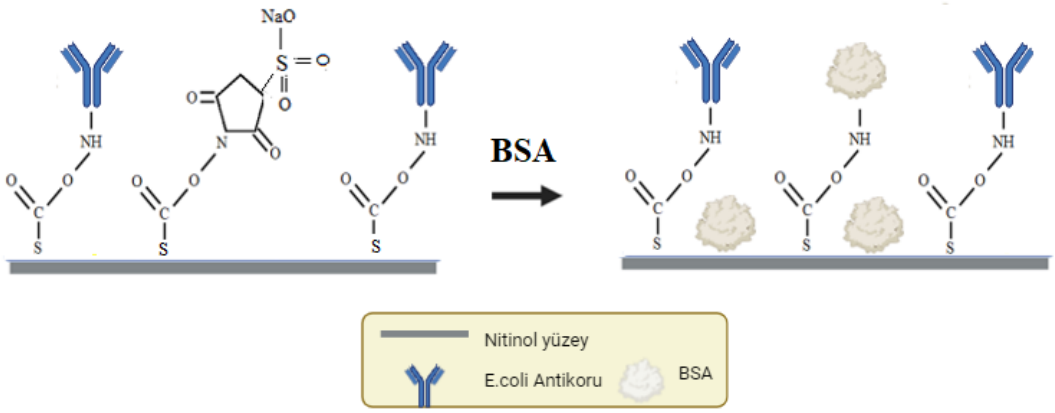
Antikor bağlanmasından önce ve sonrasında EIS ölçümleri alınmıştır.
Aktif ester grupları, *E. coli* antikorlarının amin grupları ile reaksiyona girer ve kovalent bağlar oluşturur. Antikorların immobilizasyonu ile yüzeyde büyük ve kompleks biyomoleküller bağlanır. Bu durum empedansın artmasına sebebiyet verir.
Bu adımda EIS ile ölçüldüğünde, empedansın belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi. Bu artış, yüzeyin daha kompleks hale gelmesi ve iyonik akışın engellenmesi nedeniyle olmaktadır. Bu durum yüzeye antikor immobolizasyonun başarıyla gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

2.2.7. BSA Bloklama

Bloklama ajanı olarak kullanılan BSA'nın bakteri ve bakteri antikorlarının spesifik olmayan bağlantılarını engellemek için yaygın bir şekilde kullanımı söz konusudur.
BSA bloklama işlemi, biyosensör yüzeylerinde veya diğer biyomoleküler deneylerde nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla yapılır. Bloklama işlemi, yüzeydeki boş veya reaktif bölgelerin BSA molekülleri ile kaplanmasını sağlar, böylece spesifik olmayan

proteinlerin veya biyomoleküllerin bu alanlara bağlanmasını engeller. Bu özellikle biyosensörlerde sinyal gürültüsünü azaltarak, spesifik hedef moleküllerin daha hassas ve doğru bir şekilde tespit edilmesine olanak tanır. Ayrıca, BSA bloklama, biyomoleküllerin daha homojen bir dağılımını sağlayarak, deney sonuçlarının tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini artırır. Bu nedenle antikor immobilizasyonundan sonra BSA bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bu adım ve öncül olarak yapılan tespit deneyleri için seçilen maddenin BSA olmasına daha önce yapılan çalışmalar sonucu karar verilmiştir [102-104].

BSA da amin, tiyol ve karboksilik asit fonksiyonel grupları bulunmaktadır. MUA kimyasal kaplama ajanıyla SAM oluşumunda yoğunlaşma tepkimesi meydana gelir. Bu sırada moleküllerin aralarında boşluk oluşur. Böylece BSA, hem bulundurduğu tiyol gruplarıyla Ni ile arasında oluşan bağ sebebiyle zemine tutunur. Hem de bulundurduğu amin gruplarıyla *E. coli* bağlanmamış amin reaktif uçlara tutunur.



Şekil 2.18. BSA bloklama

BSA solüsyonu hazırlanırken 0.5 mg BSA ve 10 ml PBS kullanıldı (%5 BSA içerir). BSA ölçümü için hassas terazi kullanıldı. Molekül ağırlığı büyük olan BSA'nın, PBS çözeltisi içerisinde homojen bir şekilde dağıldığından emin olana kadar karıştırıldı.

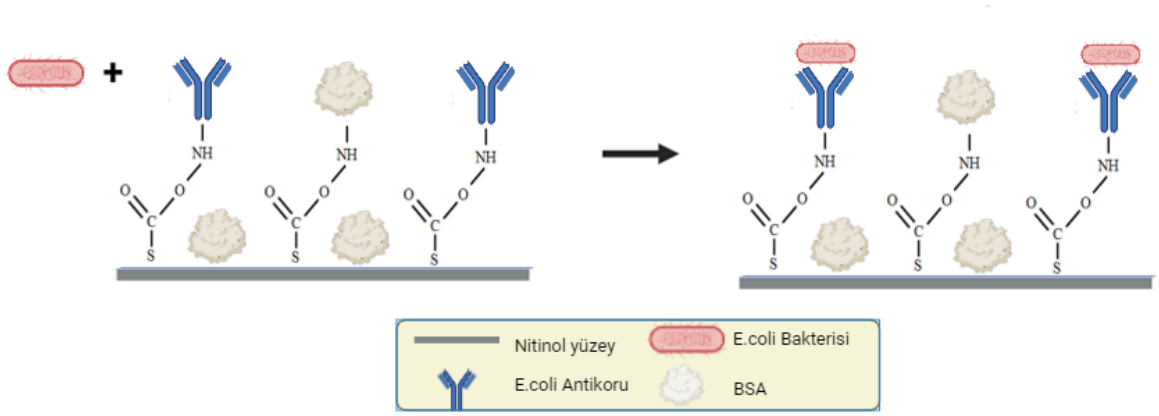
30 dakika boyunca Nitinol sensörlere uygulandı. Spesifik olmayan bağlantıların temizlenmesi için PBS ile yıkama işlemi yapıldı.

BSA bloklama işleminin sonunda EIS ile empedans değişimleri ölçümlendi. Bu aşamaların sonunda elde edilen sonuç grafiğine bakıldığında nyquist grafiğinin çapının

büyüdüğünü diğer deyişle empedansın arttığı gözlemlendi. Bu durum bize BSA bloklama aşamasının başarı ile gerçekleştiğini ve sensör yüzeyinin *E. coli* tespiti için hazır olduğu göstermektedir.

2.2.8. *E. coli* Tespit ve Konsantrasyon Deneyleri

Nitinol yüzeyine sırasıyla MUA, EDC/sulfo-NHS, *E. coli* antikoru ve BSA bloklama işlemlerini gerçekleştirdikten sonra *E. coli* tespiti aşamasına geçildi. Bu aşamalardan sonra yüzeyin işlevselleştirilmesi gerçekleştirilmiş ve *E.coli* tespiti için uygun ortam oluşturulmuştur. *E. coli* satın alınan antikorlar ile tamamlayıcı özelliktedir. *E. coli* antikoru, iki Fab bölgesi ve bir Fc bölgesinden oluşur. Fab bölgeleri, *E. coli*'nin yüzeyindeki spesifik antijenlere bağlanır. Bu bağlanma, zayıf non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, van der waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler) ve yüksek afiniteli bağlanmalarla gerçekleşir. Fab bölgeleri, antijenlerle spesifik ve yüksek afiniteli etkileşimlere girer, bu da *E. coli*'nin yüzey antijenlerine bağlanmasını sağlar.



Şekil 2.19. E.coli Tespiti

2.2.8.1. *E. coli* Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması

E. coli genellikle insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan gram-negatif bir bakteridir. Bazı *E. coli* suşları, bölüm 1 de bahsedildiği üzere son derece toksik etkilere neden olabilir. Bu sebeple yüzey işlevselleştirmenin etkinliğinin sınanması için patojen mikroorganizmalar içerisinden *E.coli* tercih edilmiştir.

Analitin konsantrasyonunun, tespite etkisini araştırmak için *E.coli* stok çözeltisinden %5 BSA ve PBS içeren solüsyon ile seyreltme işlemi yapılarak 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 CFU/ml dilüsyonları hazırlanmıştır. En düşük konsantrasyondan başlanarak sistem beslenmiştir ve tespit işlemi tamamlanmıştır.
E.coli stok çözeltisi 10 un katları şeklinde kademeli olarak seyreltildi. Böylece istenilen konsantrasyonlar hazır hale getirildi.

***E. coli* Antikorlarının Bağlanma Mekanizması:**

1. Antijen-Antikor Etkileşimi: *E. coli* antijenleri, bakterinin yüzeyinde bulunan spesifik proteinler, lipopolisakkaritler (LPS) veya diğer moleküller olabilir. Antikorlar, bu antijenlere yüksek özgüllükle bağlanır.
2. Epitop Tanıma: Antikorların antijen üzerindeki belirli bölgeleri (epitoplar) tanıması ve bağlanmasıyla gerçekleşir. Her antikorun spesifik bir epitopa bağlanma bölgesi vardır.
3. Spesifik Bağlanma: Antikorlar, epitoplara bağlandığında, spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için bloklama ajanları (tez kapsamında, BSA) kullanılarak yüzeydeki diğer alanlar bloke edilir.
4. Bağlanma Gücü: Antikor-antijen etkileşimleri, güçlü kovalent olmayan bağlarla (hidrojen bağları, van der waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler) stabilize edilir.

Yüzey işlevselleştirme yöntemleri, biyosensörün *E. coli* tespiti için yüksek hassasiyet ve spesifiklik sağlamasına yardımcı olur. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler önceki uygulamalara benzer şekilde u form Nitinolün hazne içindeki tespit ortamına daldırılmasıyla gerçekleşti. 40 dakikalık oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından spesifik olmayan bağlantıların uzaklaşması için PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Antikor-antijen etkileşimlerinin yüzeydeki değişiklikleri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak ölçüldü ve değerlendirildi. 40 dakika boyunca her 5

dakikada ölçüm alınarak empedans değişimi gözlendi. *E. coli* bakterileri, antikorlarla spesifik olarak bağlandığında yüzeyde büyük biyomoleküllerin varlığı nedeniyle empedans artar. Bu artış, Nyquist grafiğinde daha büyük bir yarım daire oluşumu olarak kendini gösterir. Bakteri sayısının ve bağlanma yoğunluğunun artmasıyla birlikte empedans değerlerinde belirgin bir artış gözlendi. Her 5 dakikada bir yapılan ölçümlerde yarım dairenin çapının kademeli olarak büyüdüğü gözlemlendi. Başlangıçta küçük olan yarım daire, zamanla *E. coli*'nin bağlanmasıyla birlikte genişler ve empedansın artmasıyla daha büyük yarım daireler oluşturur. 40 dakika sonunda, yarım dairenin çapı maksimum seviyeye ulaşır ve empedans değerleri stabil hale gelir.

2.2.9. Seçicilik Deneyleri

Bu tezde yapılan yüzey işlevselleştirme çalışmalarının etkinliğini sınamak için *E. coli*'nin tespiti yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, geliştirilmiş sensörün seçiciliği de değerlendirilmiştir. Seçicilik deneyleri kapsamında, sensörün yalnızca *E. coli*'yi tespit etme kabiliyetini değil, aynı zamanda diğer bakterilerle etkileşime girmeme özelliğini de değerlendirmek için çeşitli testler yapılmıştır. Deneylerde, *Bacillus clausii, Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* bakterileri kullanılmıştır. Her bir bakteri türü ayrı ayrı sensör ile test edilmiştir. *Bacillus clausii*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis*, *E. coli*'ye benzer morfolojik özelliklere sahip olsalar da, genetik ve biyokimyasal yapıları farklıdır. Bu deneyler sayesinde sensörün, farklı bakteri türlerine karşı spesifik olup olmadığı ve sadece *E. coli*'yi tanıyıp tanımadığı belirlenmiştir. Sonuçlar, sensörün yüksek bir seçiciliğe sahip olduğunu ve yalnızca *E. coli*'ye özgü bir yanıt verdiğini göstermiştir. *Bacillus clausii*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* ile yapılan testlerde, sensörün bu bakterilere karşı belirgin bir yanıt vermediği gözlemlenmiştir. Bu durum, sensörün *E. coli*'yi diğer benzer bakterilerden ayırt etme yeteneğine sahip olduğunu ve bu bakterilerin varlığında bile doğru sonuçlar verebildiğini doğrulamaktadır. Bu bulgular, sensörün potansiyel kullanım alanlarını genişletmekte ve güvenilir bir biyosensör olarak *E. coli* tespitinde kullanılabileceğini göstermektedir.

2.2.10. İstatistiki Analiz

BSA tespiti için metot 1 ve metot 2 arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının anlaşılması için t-Test (Unpaired two-tail) analizi yapılmıştır. Bu analizle 3'er tekrarlı alınan ölçümlerin %ΔRct 'lerinin iki grup arasındaki ortalama farkının birbirinden anlamlı derecede farklı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır

Dört farklı bakteriyel grup arasında gerçekleştirilen seçicilik deneylerinin %ΔRct 'lerinin ortalama farklarının birbirinden anlamlı derecede farklı olup olmadığının belirlenmesi için Tek Yönlü Varyans Analizi (Analysis of Variance, ANOVA) uygulanmıştır. ANOVA, istatistikte kullanılan bir yöntemdir ve çeşitli gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için kullanılır. Özellikle, birden fazla grup ortalaması arasındaki farkları test eder ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirler.

2.2.11. AFM Karakterizasyonu

Nitinol yüzeylerinin işlevselleştirilmesi için iki farklı metot kullanılmıştır: Metot 1 ve metot 2. Her iki metotun etkinliğini değerlendirmek amacıyla, Nitinol yüzeyleri işlevselleştirildikten sonra BSA tespiti gerçekleştirilmiştir. BSA tespitinin ardından, işlevselleştirilen yüzeylerin topografik ve mekanik özelliklerini incelemek için diğer bir ifadeyle karakterizasyonu için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılmıştır. AFM analizleri, yüzeylerin pürüzlülüğünü, biyomolekül bağlanma yoğunluğunu ve genel yüzey morfolojisini detaylandırmak için gerçekleştirilmiştir. Amacımız ise her iki metotun yüzey işlevselleştirme etkinliğini ve BSA bağlama kapasitesini karşılaştırarak, hangi metodun daha uygun olduğunu belirlemektir. Bu analizlerde, her iki metotla işlevselleştirilen numuneler ve Nitinolün saf durumda bulunduğu numune kullanılmıştır. Elde edilen AFM görüntüleri üzerinden karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucunda, yüzeylerin morfolojik ve mekanik özelliklerinin yanı sıra biyomolekül bağlama kapasiteleri hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. AFM analizleri, işlevselleştirme yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmek ve en uygun metodu belirlemek için kritik bir rol oynamıştır.

2.2.12. %ΔRct Hesabı

Çalışmada hesaplanan tüm sarj transfer direncinin yüzdesel değişimi (%ΔRct) sayısal değerleri 2.1. de verilen denkleme göre hesaplanmıştır [105]. Denklemdeki Rct_0, analit tespitinden bir önceki adımın Rct değerini gösterirken, Rct_1 değeri analit tespitinden sonraki Rct değerini gösterir.

$$\%\Delta R_{ct} = \frac{R_{ct1} - R_{ct0}}{R_{ct0}} \times 100 \qquad (2.1)$$

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. BSA EIS Analizi

En uygun yüzey işlevselleştirme yöntemini belirlemek amacıyla yapılan BSA deneyleri, Tablo 2.1.'de verildiği üzere metot 1 ve metot 2 olarak ayrıştırılmıştır. Bu iki metodun temel farkı, yüzey modifikasyon aşamasının metot 1'de MUA kimyasal kaplama ajanı prosedürü ile metot 2'de ise MPS kimyasal kaplama ajanı prosedürü ile yürütülmesidir.

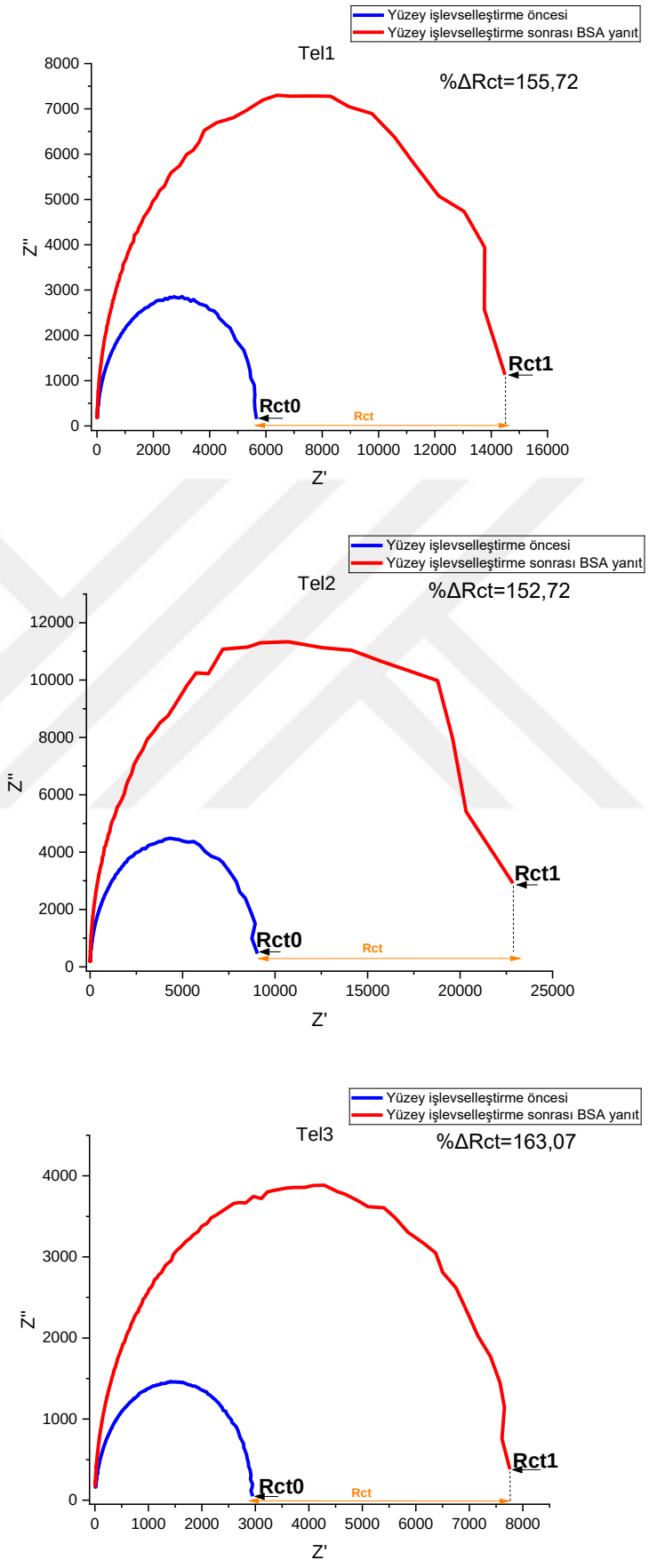
Her iki yöntemde BSA'nın büyük ve yalıtkan protein molekülleri olması ve yüzeye bağlanması nedeniyle yüzey işlevselleştirme yapılmadan ve yapıldıktan sonra BSA tespiti arasında yapılan empedans analizi sonucu belirgin empedans artışı gözlemlenmektedir. Bu durum yüzey işlevselleştirmenin başarıyla gerçekleştiğini ispatlar niteliktedir. Deneyler her iki metot için 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hesaplanan tüm sarj transfer direncinin yüzdesel değişimi (%ΔRct) sayısal değerleri bölüm 2 de verilen denkleme göre hesaplanmıştır.

BSA'nın yüzeye başarılı bir şekilde bağlanması, her iki metot için de empedans spektrumunda belirgin bir değişiklikle kendini göstermektedir. Özellikle MUA ve MPS kaplama ajanlarının kullanıldığı bu yöntemlerde, empedans artışı, yüzeydeki biyomolekül bağlanmasının etkili olduğunu ve yüzeyin yalıtkanlık özelliğinin güçlendiğini işaret eder. Bu empedans değişiklikleri, yüzeyin protein moleküllerine karşı duyarlılığını artırmakta ve böylece biyosensör performansının optimize edilmesine katkı sağlamaktadır. Ayrıca, her iki yöntemde de elde edilen tekrarlanabilir sonuçlar, metodolojinin güvenilirliğini ve tutarlılığını ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, MUA ve MPS ajanlarının yüzey işlevselleştirmesindeki etkinlikleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin de spesifik avantajlar sunduğu gözlemlenmiştir. MUA yöntemi, daha güçlü bir yüzey modifikasyonu sağlamıştır. Bu farklılıklar, farklı uygulama alanlarına yönelik spesifik yüzey modifikasyon ihtiyaçlarına cevap verebilir. Bu nedenle, sensörün kullanımı ve hedef molekül türüne bağlı olarak, hangi modifikasyon ajanının tercih edileceği belirlenebilir. Sonuç olarak, her iki metodun da BSA tespiti üzerindeki etkileri, yüzey işlevselleştirmenin biyosensör performansını nasıl optimize edebileceğine dair önemli bilgiler sunmaktadır.

3.1.1. Metot 1 EIS Analizi

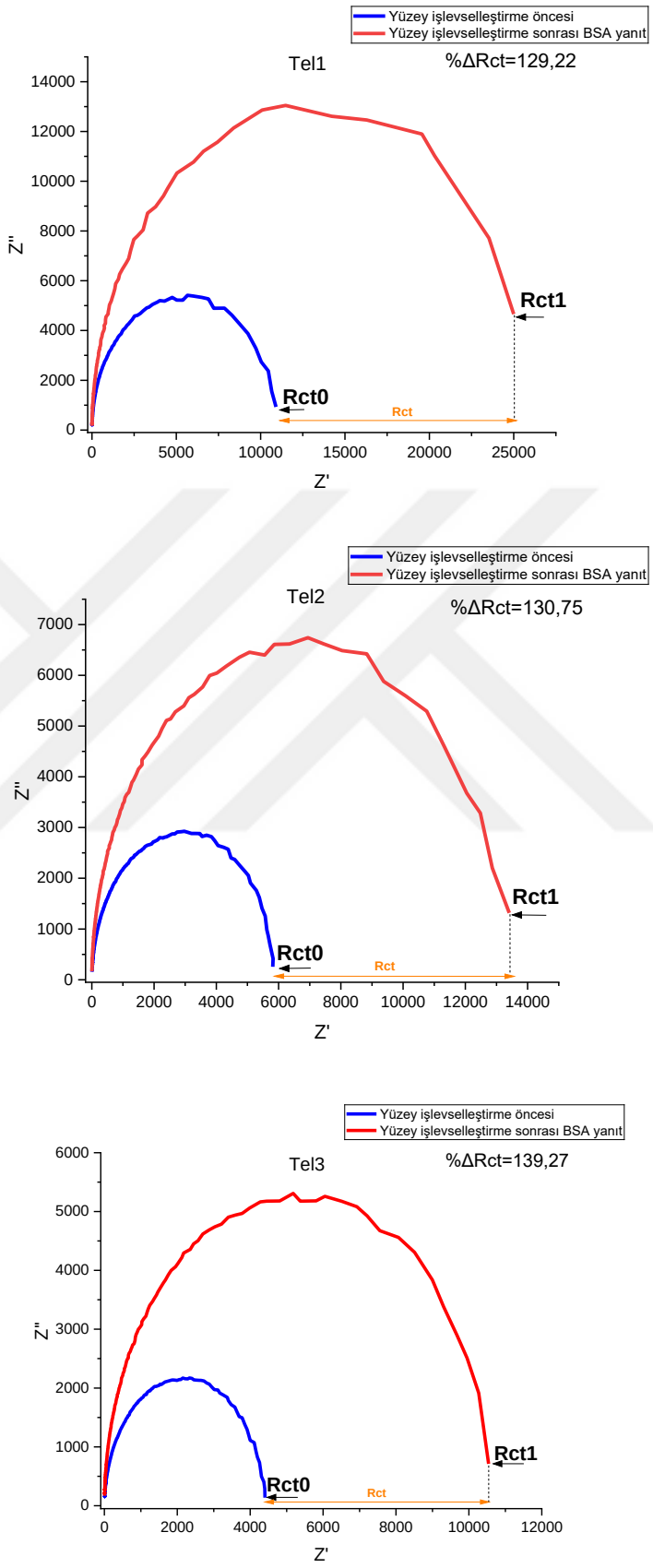
Şekil 3. 1 de verilen nyquist grafiğinde görüleceği üzere modifiye edilmiş yüzey için şarj transfer direnci (R_{ct}) 3 tekrarlı deneylerin birincisi (Tel1) için yaklaşık 14489 ohm olarak ölçülürken, saf Nitinol yüzeyin R_{ct} si 5666 ohm olarak izlenmiştir. İkincisi (Tel2) için bu değerler yaklaşık 22861 ohm ve 9046 ohm iken üçüncüsü (Tel3) için 7758 ohm ve 2945 ohm olarak izlenmiştir. Saf Nitinol yüzey ile modifiye edilmiş yüzey arasındaki R_{ct} de artış olduğunu ortaya koyan EIS deneysel sonuçları, sensör yüzeyinde modifikasyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır. 3 tekrarlı deney sonuçlarında şarj transfer direncinin yüzdesel değişimi (ΔRct(%)) hesaplandığında sırasıyla birinci, ikinci ve üçüncü sensör için 155.72 152.72 ve 163.07 bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, yüzey modifikasyonunun etkinliğini ve güvenilirliğini bir kez daha teyit etmektedir. Şarj transfer direncindeki yüzdesel değişimlerin (ΔRct(%)) her üç sensörde de yüksek ve tutarlı değerler göstermesi, modifiye edilmiş yüzeylerin biyosensör performansını önemli ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır. Özellikle, her bir sensörde gözlemlenen artış oranlarının birbirine yakın olması, yüzey modifikasyon sürecinin tekrarlanabilirliğini ve stabilitesini kanıtlar niteliktedir. Bu durum, sensörün güvenilirliğini ve hassasiyetini artırarak, modifikasyonun biyosensör uygulamaları için ne kadar kritik bir rol oynadığını vurgulamaktadır. Bu bulgular, biyosensörlerin farklı biyomoleküllerle olan etkileşimlerini optimize etmek amacıyla MUA kaplama ajanının etkili bir araç olduğunu gösterir ve bu tür modifikasyonların biyosensör tasarımında nasıl kullanılabileceğine dair önemli ipuçları sunar.



Şekil 3.1. Metot 1 için 3 tekrarlı EIS sonuç grafikleri

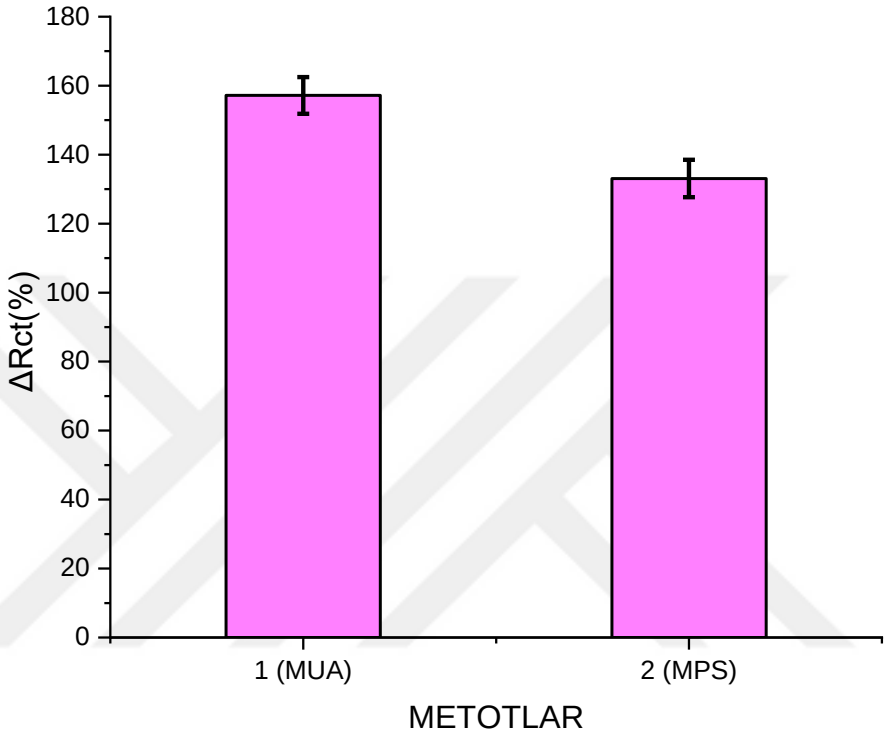
3.1.2. Metot 2 EIS Analizi

Şekil 3. 2 de verilen nyquist grafiğinde görüleceği üzere modifiye edilmiş yüzey için şarj transfer direnci (R_{ct}) 3 tekrarlı deneylerin birincisi (Tel1) için yaklaşık 25003 ohm olarak ölçülürken, saf Nitinol yüzeyin R_{ct} si 10908 ohm olarak izlenmiştir. İkincisi (Tel2) için bu değerler yaklaşık 13409 ohm ve 5811 ohm iken üçüncüsü (Tel3) için 10540 ohm ve 4405 ohm olarak izlenmiştir. Saf Nitinol yüzey ile modifiye edilmiş yüzey arasındaki R_{ct} de artış olduğunu ortaya koyan EIS deneysel sonuçları, sensör yüzeyinde modifikasyonun gerçekleştiğini bir kez daha doğrulamaktadır. 3 tekrarlı deney sonuçlarında şarj transfer direncinin yüzdesel değişimi (ΔRct(%)) hesaplandığında sırasıyla birinci, ikinci ve üçüncü sensör için 129.22 130.75 ve 139.27 bulunmuştur. Bu veriler, MPS ile modifiye edilmiş yüzeyin, saf Nitinol yüzeyine kıyasla şarj transfer direncinde (Rct) önemli bir artış sağladığını net bir şekilde göstermektedir. Şarj transfer direncindeki bu artış, yüzey modifikasyonunun etkin bir şekilde gerçekleştiğini ve biyosensörün hedef moleküllerle etkileşime girme kapasitesinin arttığını işaret eder. İlk sensör (Tel1) için %129.22, ikinci sensör (Tel2) için %130.75 ve üçüncü sensör (Tel3) için %139.27 oranında bir artış gözlemlenmesi, modifikasyonun tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği açısından önemli bulgular sunmaktadır. Bu artış oranlarının birbirine yakın olması, yöntemin tutarlı bir şekilde sonuç verdiğini ve farklı deneme koşullarında bile benzer etkilerin elde edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca, her üç sensör için elde edilen şarj transfer direncinin yüzdesel değişim değerleri, MPS ile yapılan modifikasyonun sensör performansını optimize etme potansiyelini ortaya koymaktadır. Yüksek yüzdesel değişim, biyosensörün hassasiyetinin artırıldığını ve modifiye edilmiş yüzeyin, hedef molekül olan BSA ile daha güçlü ve spesifik etkileşimler sağladığını göstermektedir. Bu bulgular, MPS modifikasyonunun biyosensörlerde kullanılmasının, tespit doğruluğunu ve güvenilirliğini artırmada etkili bir strateji olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Bu sonuçlar, gelecekteki biyosensör geliştirme çalışmaları için de önemli bir referans niteliği taşımaktadır ve sensörlerin farklı biyomoleküllerle olan etkileşimlerini optimize etme potansiyelini gözler önüne sermektedir.



Şekil 3.2. Metot 1 için 3 tekrarlı EIS sonuç grafikleri

3.1.3. Metotların Kıyaslanması ve İstatistiksel Analiz



Şekil 3.3. Metotların kıyaslanmasını gösteren bar grafiği

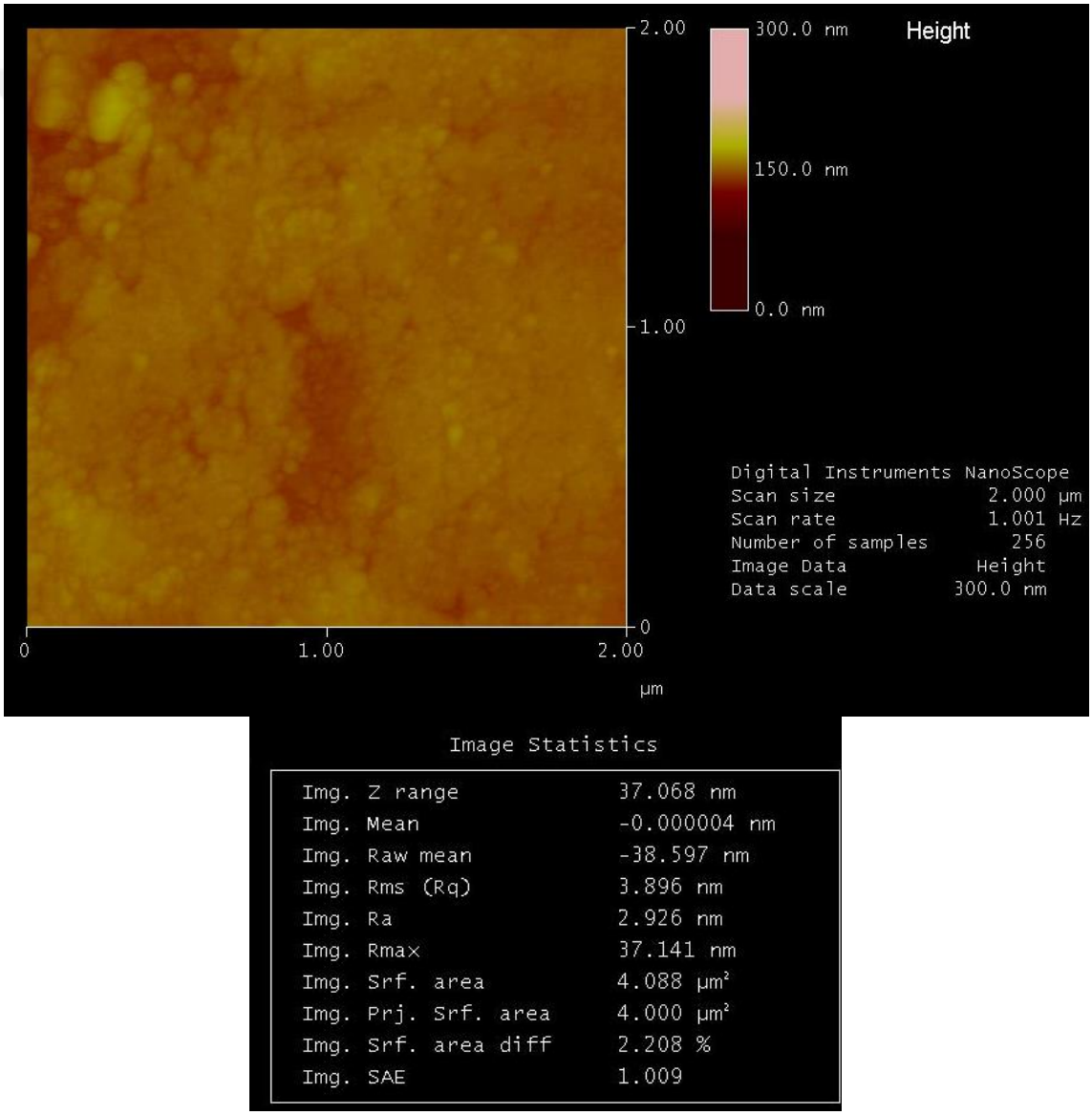
Deneyler her iki metot için 3 kez tekrar edildi ve ortalama değerler ile standart sapmalar hesaplandı. Elde edilen sonuçlar sarj transfer direncinin yüzdesel değişimi açısından (ΔRct(%)) incelendiğinde; MPS yönteminin uygulandığı yüzey modifikasyonu sonucu oluşan değişim 133,08 (±5,42) çıktı. MUA yönteminin uygulandığı işlemdeyse değişim 157,17 (±5,33) olarak belirlendi. Bu sonuçlardan MUA yöntemi MPS yöntemine göre Nitinol sensörde yüzey modifikasyonu sonrası BSA tespitinde daha yüksek direnç değişimleri göstererek daha hassas bir biyoalgılama yapılabileceğini ortaya koymaktadır.

İki yöntem arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının anlaşılması için yapılan t-Test (Unpaired two-tail) sonucunda t = 5,4940 ve P= 0,0053 bulundu. P=

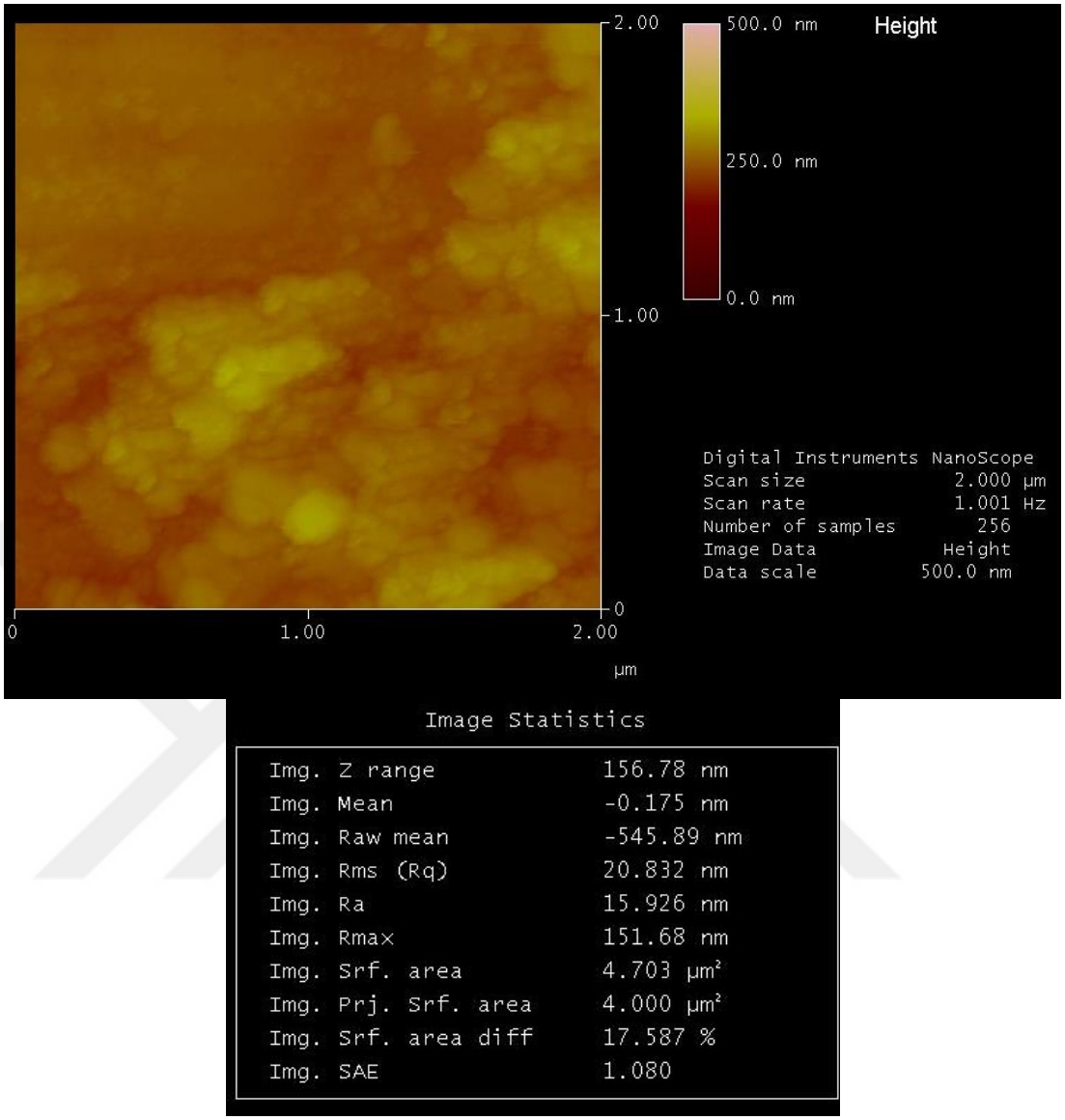
0,0053<0.05 (%95 güven aralığında yapıldığından) olduğundan iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu sonucuna varıldı.

3.1.4. AFM Karakterizasyonu Sonuçları

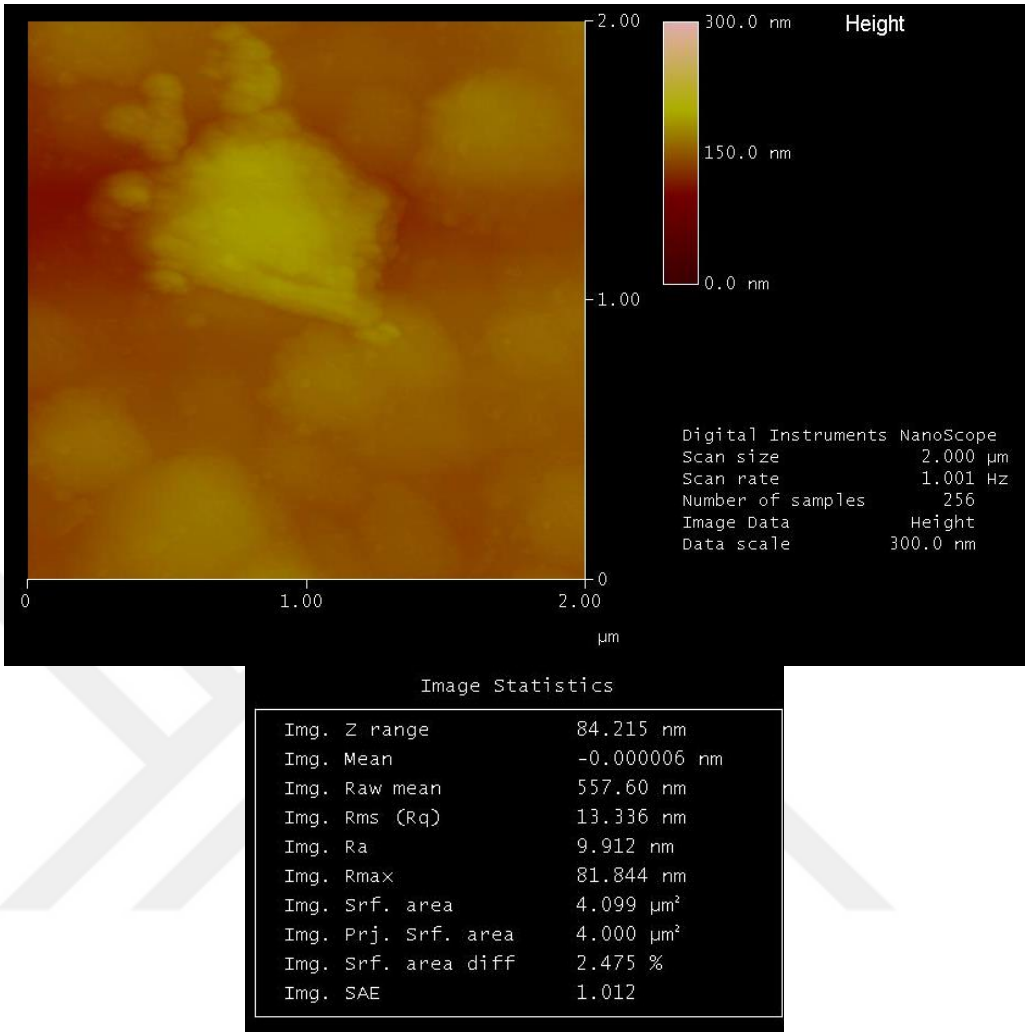
Nitinol biyosensörlerin yüzey morfolojisini görselleştirmek için atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak karakterizasyon yapıldı. Görüntüler için tarama boyutu 2 µm × 2 µm idi.



Şekil 3.4. Saf Nitinolün AFM görüntüsü



Şekil 3.5. Metot 1 (MUA) sonrası BSA tutulumunu gösteren AFM görüntüsü



Şekil 3.6. Metot 2 (MPS) sonrası BSA tutulumunu gösteren AFM görüntüsü

AFM üç farklı Nitinol biyosensör örneğinin incelenmesi sırasında, işlem yapılmamış biyosensör ile BSA bağlanmış biyosensörlerin sonuçlarını yüzey pürüzlülüğü ve morfolojisi açısından diğer bir deyişle Rq (kök ortalama kare pürüzlülüğü) ve Ra (ortalama pürüzlülük) gibi pürüzlülük parametreleri kriterlerine göre değerlendirildi. İşlem yapılmamış saf Nitinolde daha az pürüzlü ve daha homojen bir yüzey gözlemlendi.

Yüzey işlevselleştirme sonrası BSA uygulanmış örneklerde ise BSA'nın yüzeye bağlanması ile yüzey pürüzlülüğünde bir artış gözlemlendi. Protein moleküllerinin yüzeyde oluşturduğu yapılar, yüzeyin genel pürüzlülüğünü arttırmıştır. Bu durum yüzey işlevselleştirme işlemlerinin başarıyla gerçekleştirildiğini ve BSA tutulumunun sağlandığını göstermektedir.

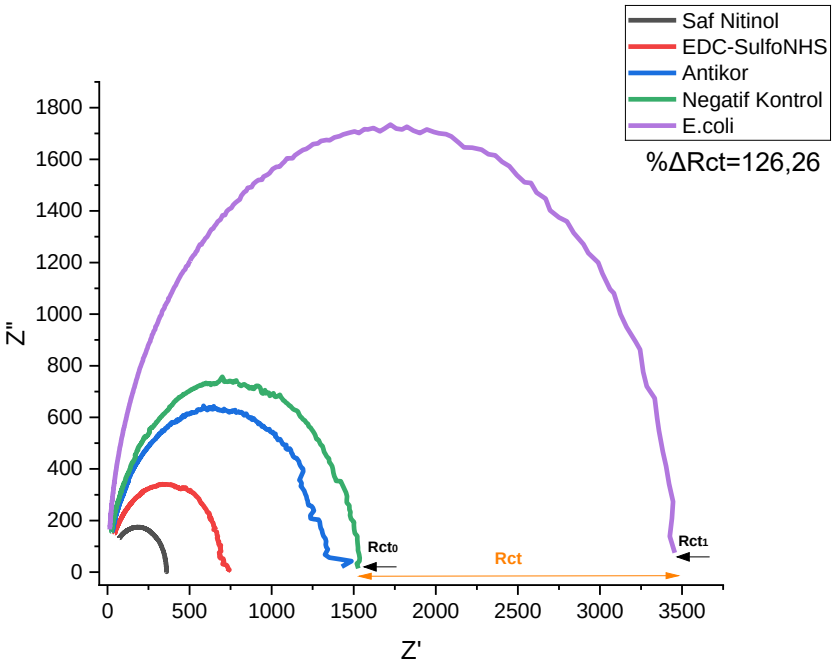
3.2. *E. coli* Tespit ve Konsantrasyon Deneyleri EIS Analizi

E.coli stok çözeltisinden %5 BSA ve PBS içeren solüsyon ile seyreltme işlemi yapılarak 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 CFU/ml dilüsyonları hazırlandıktan sonra. En düşük konsantrasyondan başlanarak sistem beslenmiştir ve tespit işlemi tamamlanmıştır. Her konsantrasyon için 3 tekrarlı deneyler gerçekleştirilmiş ve sırasıyla şu aşamalardan sonra EIS ölçümü alınmıştır.

1. Yüzey işlevselleştirme öncesi saf Nitinol,
2. MUA ve EDC/Sulfo-NHS prosedürüyle yüzey amin reaktif duruma getirildikten sonra,
3. *E.coli* Antikorunun immobilizasyonunun ardından,
4. Negatif Kontrol (İçerisinde analitin bulunmadığı tampon çözelti ölçümleri),
5. *E. coli* tespiti

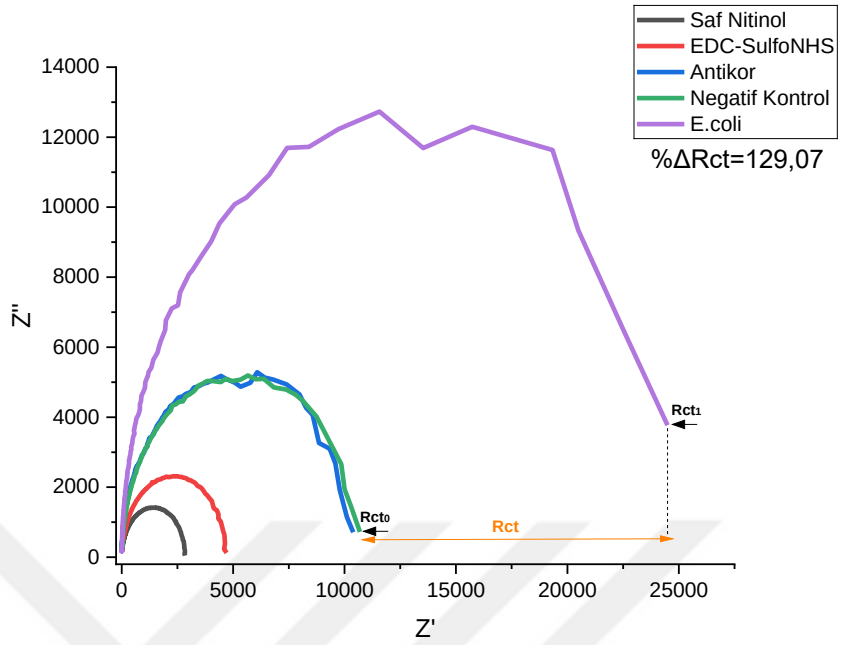
Her konsantrasyon için oluşturulan nyquist grafikleri en küçük konsantrasyondan başlanarak sırasıyla şekillerde verilmiştir. *E.coli* tespiti 40 dakika boyunca sürdü her 5 dakika da bir alınan EIS ölçümleri grafiğe aktarıldı. Grafikler en küçük konsantrasyondan başlanarak sırasıyla şekillerde verilmiştir. 40 dakikalık ölçüm grafiklerine bakıldığında biyosensörün yaklaşık olarak 10 ila 15 dakika arasında analiti tespit edebildiği görülmektedir. Empedans artışı ilk dakikalarda hızlı bir şekilde gerçekleşirken, ölçüm süresinin sonuna doğru yüzeyin analite doyması ile çok küçük değişimler meydana geldiği gözlemlenmiştir. Nyquist grafiğindeki eğrilerin analizi, biyosensörün yüzey modifikasyonu sonrası gösterdiği performansı net bir şekilde ortaya koymaktadır. Saf Nitinol yüzeyi ile başlayarak, yüzeyin EDC/Sulfo-NHS ve antikorlarla modifiye edilmesi sonrası empedans değerlerinde belirgin artışlar gözlemlenmiştir. Bu artışlar, yüzeydeki biyomolekül immobilizasyonunun etkinliğini ve biyosensörün hedef analit olan *E. coli*'ye olan duyarlılığını göstermektedir. Özellikle *E. coli* tespiti aşamasında empedansın önemli ölçüde artması, biyosensörün başarılı bir şekilde analiti bağladığını ve tespit edebildiğini kanıtlamaktadır. Grafiklerde görülen empedansın artış hızı ve bu artışın zamanla yavaşlaması, biyosensör yüzeyinin analite doyduğunu ve maksimum kapasitesine ulaştığını göstermektedir. Bu bulgu, biyosensörün tespit dinamiklerini ve yüzey modifikasyonlarının etkinliğini anlamak için önemli bir veri sunmaktadır. Ayrıca, her konsantrasyondan elde edilen bu sonuçlar, biyosensörün düşük konsantrasyonlarda bile yüksek hassasiyetle çalıştığını ve bu sayede geniş bir dinamik

aralıkta güvenilir sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, biyosensörün potansiyel uygulama alanları için güvenilir ve hassas bir araç olduğunu vurgulamaktadır. Grafiklerin analizi, aynı zamanda biyosensörün tekrarlanabilirlik ve güvenilirlik özelliklerini de ortaya koymaktadır. Her bir konsantrasyon için üç tekrarlı ölçümlerin tutarlılığı, biyosensörün performansının istikrarlı olduğunu ve her denemede benzer sonuçlar verdiğini göstermektedir. Bu tutarlılık, biyosensörün farklı konsantrasyon seviyelerinde bile güvenilir bir şekilde çalışabildiğini ve sonuçların rastlantısal olmadığını kanıtlar niteliktedir. Ayrıca, negatif kontrol ölçümleri, analitin bulunmadığı koşullarda empedans değerlerinin düşük kaldığını ve spesifik olmayan bağlanmaların minimum düzeyde olduğunu göstererek, biyosensörün yüksek özgüllüğünü ortaya koymaktadır. Bu durum, biyosensörün sadece hedef analit olan *E. coli*'ye duyarlı olduğunu ve diğer olası interferanlara karşı dirençli olduğunu vurgular. Sonuç olarak, biyosensörün hem hassasiyet hem de spesifiklik açısından üstün bir performans sergilediği bu çalışmada, sensörün biyomedikal ve çevresel izleme gibi çeşitli uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılabileceği gösterilmektedir.

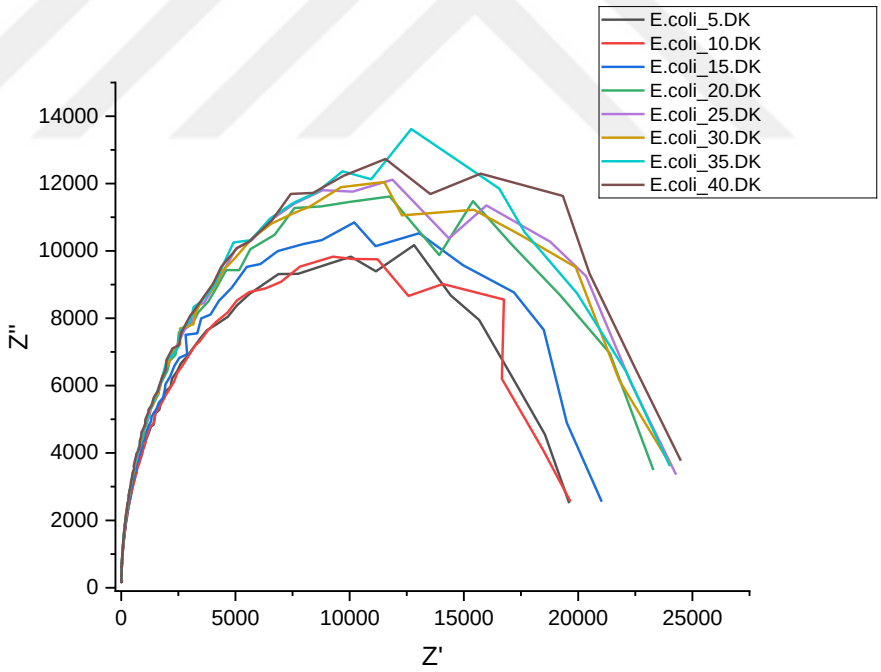


(a)

Şekil 3.7. 10^1 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği

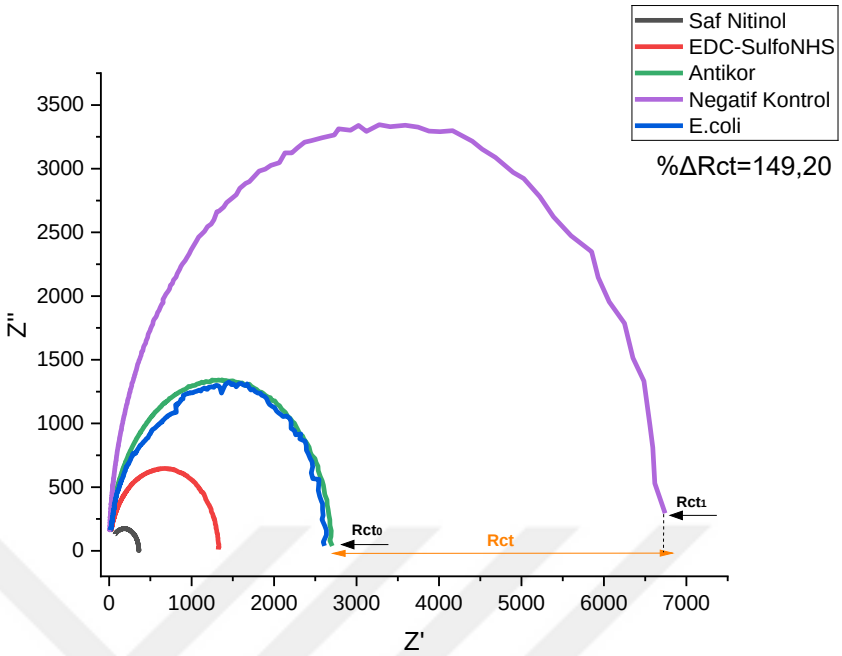


(a)

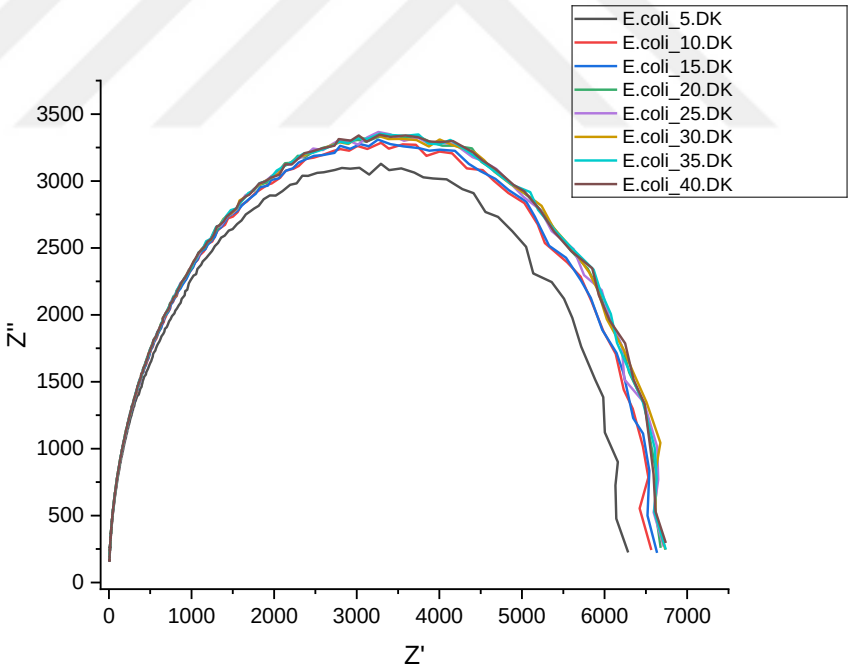


(b)

Şekil 3.8. (a) 10^2 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği
(b) 40 dakikalık ölçüm grafiği

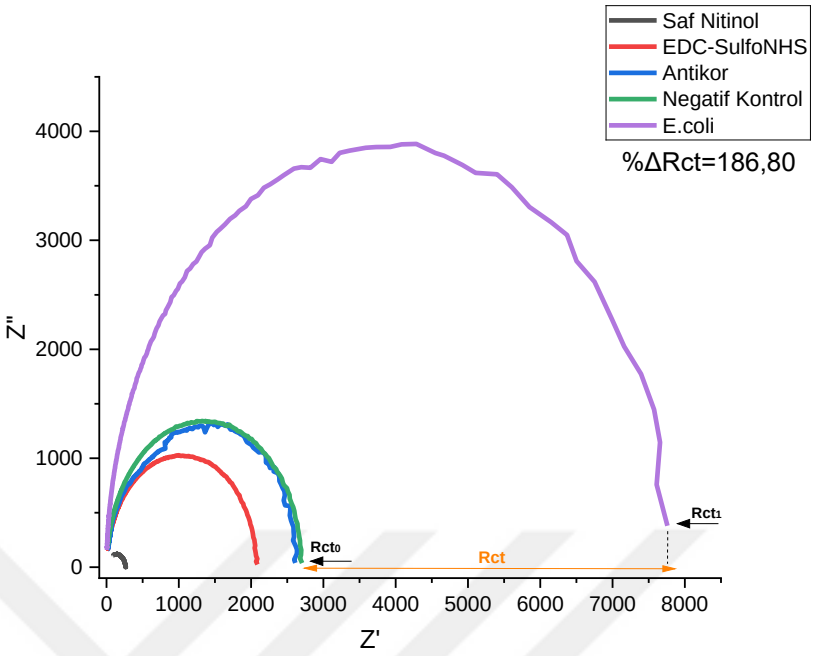


(a)

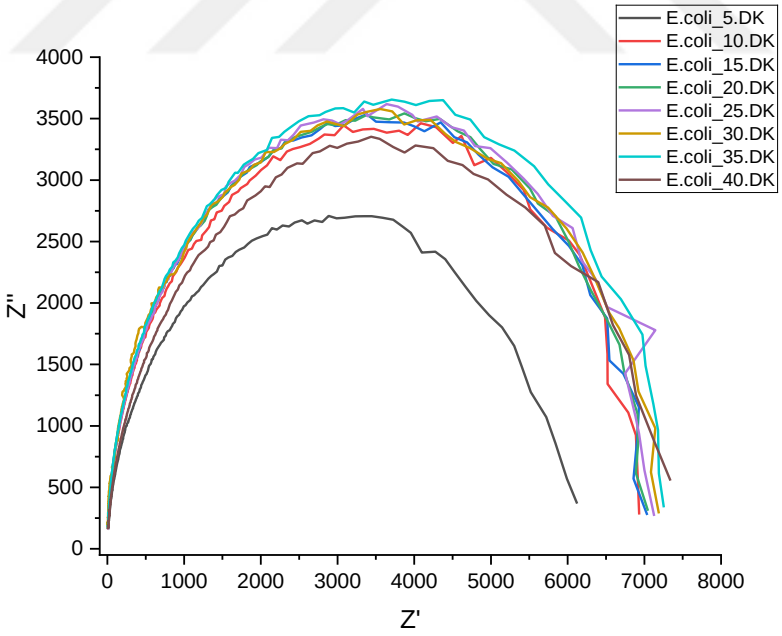


(b)

Şekil 3.9. (a) 10^3 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği
(b) 40 dakikalık ölçüm grafiği



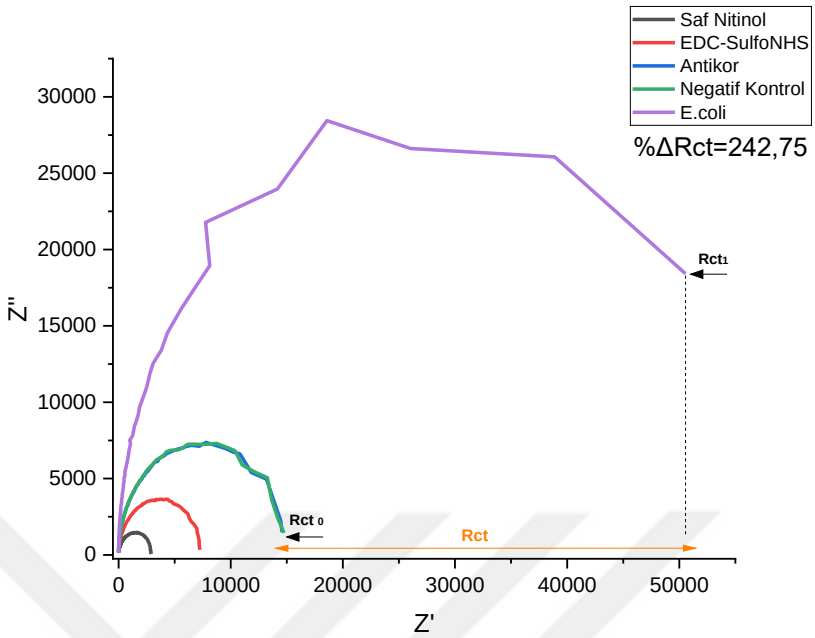
(a)



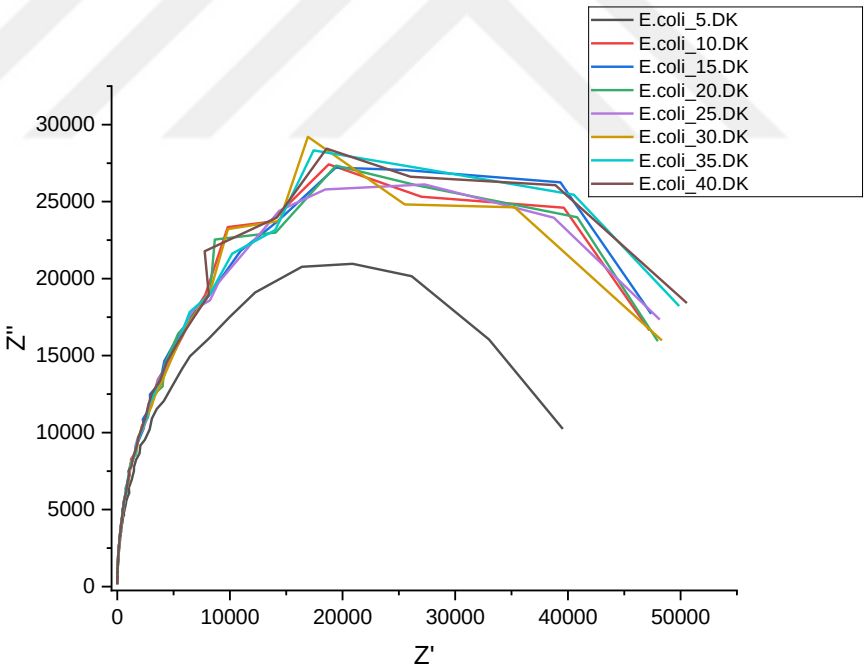
(b)

Şekil 3.10. (a) 10^4 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği

(b) 40 dakikalık ölçüm grafiği

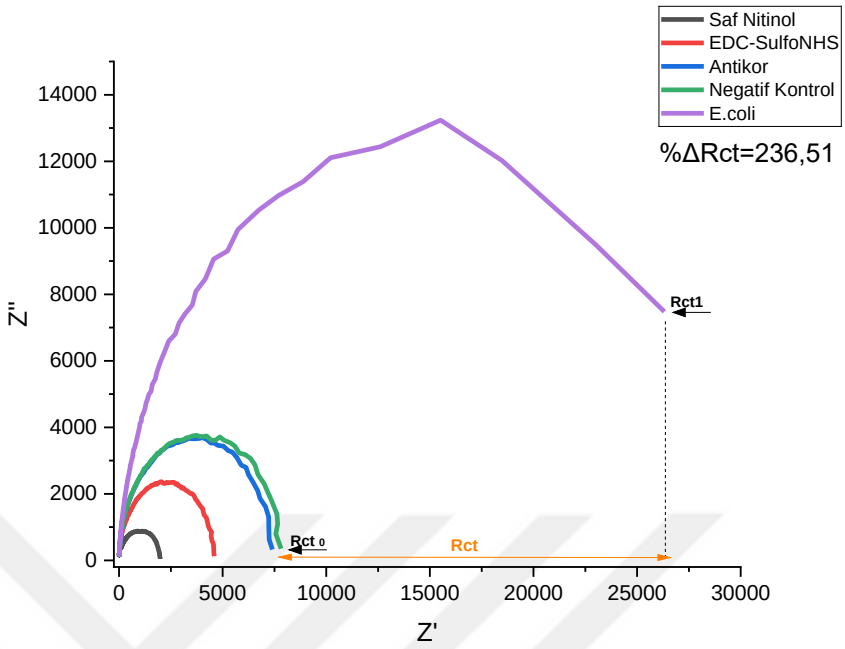


(a)

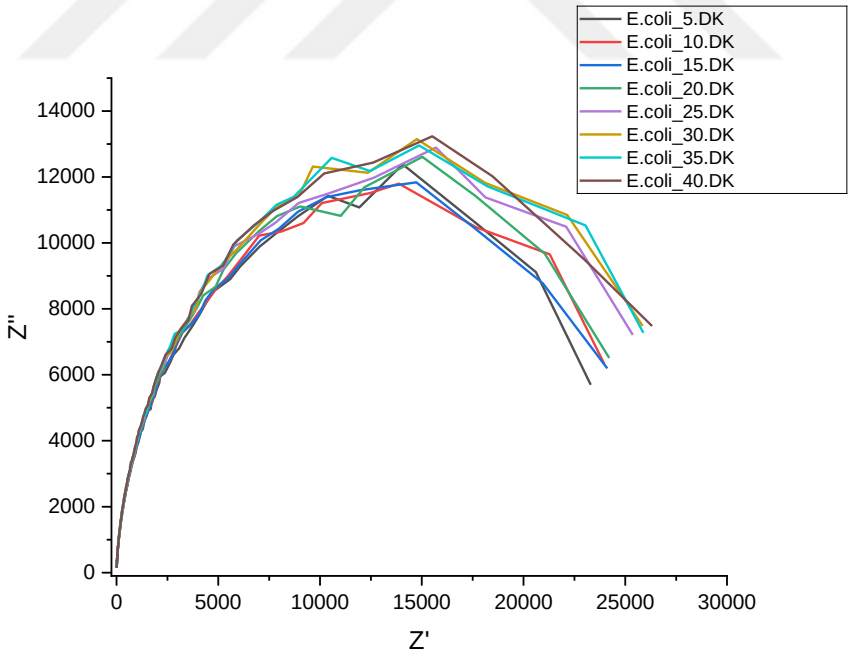


(b)

Şekil 3.11. (a) 10^5 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği
(b) 40 dakikalık ölçüm grafiği



(a)

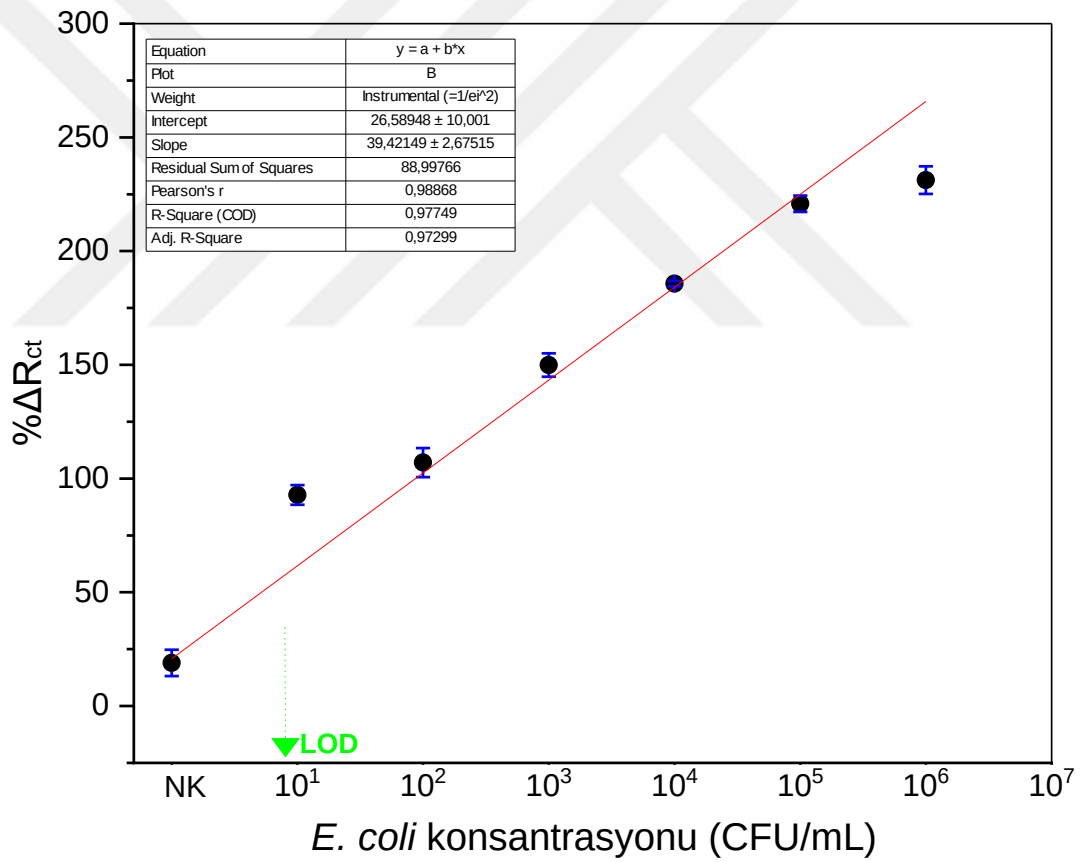


(b)

Şekil 3.12. (a) 10^6 CFU/mL *E. coli* için EIS sonuç grafiği
(b) 40 dakikalık ölçüm grafiği

3.2.1. Konsantrasyon Grafiği

Şekil 3.13. *E. coli* konsantrasyonunun şarj transfer direncinin yüzdesel değişimine etkisini gösteren kalibrasyon grafiğini sunmaktadır. Grafikte, x ekseni *E. coli* konsantrasyonunu (CFU/mL), y ekseni ise şarj transfer direncinin yüzdesel değişimini (%ΔRct) göstermektedir. Bu kalibrasyon eğrisi, Nitinol biyosensörün farklı konsantrasyonlardaki *E. coli*'yi algılayabilme yeteneğini ve duyarlılığını değerlendirmek amacıyla oluşturulmuştur.

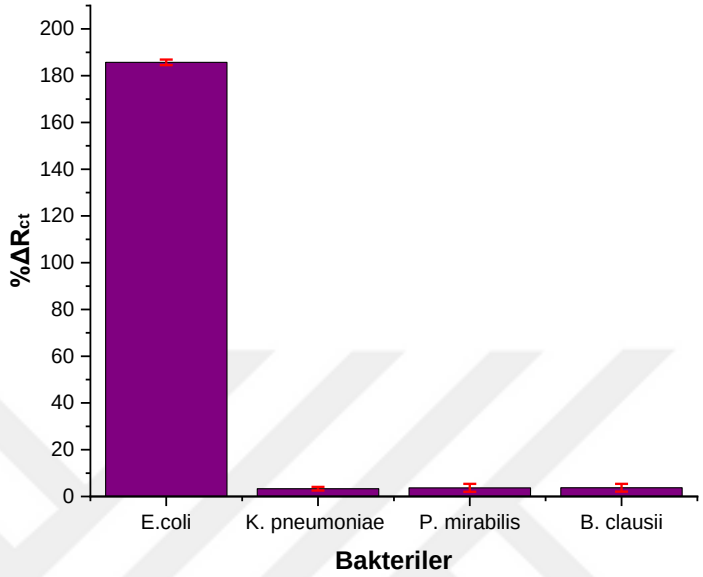


Şekil 3.13. Konsantrasyon Grafiği

Tespit Limiti (Limit of Detection, LOD) değeri, biyosensörün en düşük algılama kapasitesini belirlemek için hesaplanmıştır. Grafikte negatif kontrol NK şeklinde gösterilmiştir ve tespit ortamında hiç analitin olmadığı yani *E. coli* bulunmayan durumu ifade eder. Negatif kontrol için yapılan 3 tekrarlı deneyler sonucu elde edilen standart

sapmanın 3 ile çarpılıp ortalama %ΔRct ile toplanması LOD değerinin %ΔRct ekseninde bulunan değerini vermektedir. Grafikte oturtulan eğri Origin programının analiz bölümünde Fitting algoritması ile yerleştirilmiştir. %ΔRct ekseninde bulunan değerin grafikteki kalibrasyon doğrusuna yansıtılması ve bu doğrunun x eksenindeki iz düşüm noktası, LOD değerini vermektedir. Biyosensörün kalibrasyon grafiğinde bu değer 7,96 CFU/mL olarak bulunmuş ve grafikte işaretlenmiştir. Bu yöntem, biyosensörün gürültü seviyesini ve düşük konsantrasyonlardaki analit tespit hassasiyetini değerlendirmek için kullanılmıştır. Elde edilen LOD değeri, biyosensörün *E. coli* tespiti için optimize edildiğini ve diğer bakteriyel kontaminantların etkisinin minimum olduğunu göstermektedir. Bu yaklaşım, biyosensörün performansını artırma ve spesifik tespit kapasitesini optimize etme çalışmalarında önemli bir rehber niteliğindedir. Grafikteki doğrusal aralık, *E. coli* konsantrasyonunun belirli bir aralıkta biyosensör tarafından doğrusal olarak algılanabildiği konsantrasyon aralığını ifade eder. Bu çalışmada doğrusal aralık, yaklaşık 100 CFU/ml'den 100000 CFU/ml'ye kadar uzanmaktadır. Bu aralık, Nitinol biyosensörün geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek doğruluk ve duyarlılıkla çalıştığını göstermektedir. Bu sonuçlar, Nitinol malzemenin biyosensör uygulamalarında kullanılabilirliğini ve etkinliğini ortaya koymaktadır. Kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi ve LOD (Tespit Limiti) değerinin hesaplanması, biyosensörün performansını anlamak için kritik bir adımdır. Bu grafikte gözlemlenen yüksek R^2 değeri (0,97) biyosensörün E. coli konsantrasyonuna duyarlılığının ne kadar doğrusal ve tutarlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, biyosensörün farklı E. coli konsantrasyonlarını güvenilir bir şekilde ayırt edebileceğini ve analitik performansının yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, LOD değerinin düşük olması, biyosensörün düşük konsantrasyonlardaki E. coli varlığını bile tespit edebilme yeteneğini kanıtlamaktadır. Bu da biyosensörün çevresel izleme, gıda güvenliği ve biyomedikal uygulamalar gibi alanlarda kullanım potansiyelini artırmaktadır. Sonuç olarak, Nitinol biyosensörün bu çalışma kapsamında gösterdiği performans, onun geniş bir uygulama yelpazesinde etkin bir tespit aracı olarak kullanılabileceğini ve gelecekteki biyosensör geliştirme çalışmalarında referans alınabilecek bir model sunduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, biyosensör teknolojisinin hassasiyetini artırmaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine de katkı sağlayabilir.

3.2.2. Seçicilik Deneyleri ve Tekrarlanabilirlik



Şekil 3.14. Seçicilik Grafiği

Bu çalışmada, bölüm 2 de bahsedilen dört farklı bakteriyel grup arasında şarj transfer direncinin yüzdesel değişimini karşılaştırmak amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Bu gruplardan biri *E. coli*, diğer üç grup ise farklı bakteriyel türlerdir. Analiz sonucunda elde edilen F-istatistiği 7.6708 ve p-değeri 0.001328 olarak bulunmuştur. P-değerinin 0.05'ten küçük olması, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, dört farklı bakteriyel grubun şarj transfer direncinin yüzdesel değişimi üzerinde farklı etkiler yarattığını ve bu etkilerin tesadüfi olmadığını ortaya koymaktadır. Özellikle *E. coli* grubu ile diğer bakteriyel gruplar arasında belirgin bir farklılık olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgu, biyosensörümüzün *E. coli* tespitinde oldukça seçici olduğunu göstermektedir. Yani, biyosensör uygulamalarında Nitinol malzemenin yüzey işlevselleştirmesinin, *E. coli*'yi diğer bakteriyel türlerden ayırt edebilme kapasitesi yüksek düzeydedir. Bu bulgu, biyosensörün sadece *E. coli*'yi etkin bir şekilde tespit etmekle kalmayıp, aynı zamanda diğer bakteriyel kontaminantlara karşı da yüksek bir seçicilik gösterdiğini kanıtlamaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, biyosensörün *E. coli* tespiti için optimize edildiğini ve diğer bakteriyel kontaminantların etkisinin minimum olduğunu

göstermekte olup, biyosensörün hassasiyet ve seçiciliğini artırma çalışmalarında önemli bir rehber niteliğindedir.

Biyosensörün tekrarlanabilirlik performansı, laboratuvar ve saha koşullarında defalarca test edilmiştir. Her seferinde, sensör aynı hassasiyet ve doğruluk ile çalışmış, dış faktörlerden etkilenmeden tutarlı sonuçlar vermiştir. Geliştirilen biyosensörün üstün tekrarlanabilirlik performansı, yapısında kullanılan nitinolun (nikel-titanyum alaşımı) eşsiz süperelastik ve şekil hafıza özelliklerine dayanmaktadır. Nitinolun bu özellikleri sayesinde, biyosensör defalarca kullanıldıktan sonra bile orijinal formunu ve işlevselliğini koruyarak hassasiyetini kaybetmemektedir. Yapılan testlerde, sensörün her defasında yüksek doğrulukta sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Nitinolun süperelastik yapısı, biyosensörün deformasyonlardan sonra bile hızla eski şekline dönmesini sağlar, bu da sensörün tekrar tekrar güvenilir sonuçlar sunmasına olanak tanır. Nitinolun şekil hafıza özelliği, biyosensörün zorlu çevresel koşullarda dahi performansını korumasını sağlar. Bu özellik, sensörün çeşitli sıcaklık ve basınç değişimlerine maruz kaldığında bile aynı hassasiyetle çalışmasını mümkün kılar. Biyosensörümüz, nitinolun bu eşsiz özellikleri sayesinde, her kullanımdan sonra orijinal formuna geri döner ve hassasiyet kaybı yaşamaz. Bu durum, biyosensörün uzun ömürlü ve sürdürülebilir bir çözüm olduğunu kanıtlar, özellikle de tekrarlı ölçümler gerektiren uygulamalarda büyük bir avantaj sağlar. Biyosensörümüzün tekrarlanabilirlik performansı, nitinolun bu olağanüstü mekanik özelliklerine dayanarak, endüstriyel ve tıbbi uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Süperelastik ve şekil hafıza yetenekleri, biyosensörün her kullanımda aynı güvenilir sonuçları sunmasına olanak tanır, bu da onu kalite kontrol, çevresel izleme ve tıbbi tanı gibi hassas uygulamalar için ideal bir seçenek haline getirir. Nitinolun bu benzersiz özellikleri, biyosensörümüzü diğerlerinden ayıran ve uzun süreli, tekrarlanabilir kullanımlarda üstün performans sunan bir çözüm haline getirmektedir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Bu çalışma, Nitinol malzemesinin biyosensör uygulamaları için yüzey işlevselleştirme yöntemlerinin karşılaştırılması ve optimizasyonunu incelemektedir. Metot 1'de MUA kaplaması ve EDC/Sulfo-NHS kimyasalları kullanılmışken, metot 2'de MPS kaplaması ve Sulfo-SMCC kimyasalları tercih edilmiştir. Her iki yöntem de BSA tespiti için kullanılmış ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri yapılmıştır.

Bu çalışmanın temel bulgularından biri, metot 1'in (MUA kaplaması ve EDC/Sulfo-NHS kullanımı) metot 2'ye (MPS kaplaması ve Sulfo-SMCC kullanımı) göre daha iyi performans gösterdiği yönündedir. Metot 1 kullanılarak elde edilen kaplamaların, BSA tespitinde daha yüksek duyarlılık ve daha düşük tespit sınırı sağladığı belirlenmiştir. EIS ölçümleri ve AFM sonuçları da bu sonucu desteklemiş ve metot 1'in daha istikrarlı aynı zamanda tekrarlanabilir sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir.

Metot 1'in biyoaktivite üzerindeki olumlu etkileri üzerine yapılan değerlendirmeler, bu yöntemin Nitinol yüzeyinin biyoanalitlere özgü bağlanma yeteneğini artırdığını göstermiştir. Bu nedenle, metot 1 kullanılarak Nitinol yüzeyine önce *E. coli* antikorlarının başarıyla bağlandı ardından farklı *E. coli* konsantrasyonları ile tespit deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler, Nitinol tabanlı biyosensörlerin hedef analitleri hassas bir şekilde tespit etme potansiyelini göstermiştir.

Bu çalışma, Nitinol malzemesinin biyosensör uygulamalarında etkili bir şekilde kullanılabilmesi için kritik öneme sahip yüzey işlevselleştirme yöntemlerinin değerlendirilmesini sağlamaktadır. Metot 1'in diğer alternatiflere göre üstünlüğü, biyoanalit tespiti ve duyarlılığı açısından önemli bir bulgu olarak öne çıkmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, farklı biyoanalitler için optimizasyonun derinleştirilmesini ve Nitinol yüzeyinin biyosensör teknolojilerindeki genişletilmiş kullanım potansiyelini araştırmayı içermelidir.
Bu çalışma, biyoteknoloji ve tıbbi cihaz geliştirme alanında Nitinol malzemesinin ileri düzeydeki uygulamaları için temel teşkil etmektedir. Elde edilen bulgular, Nitinol yüzey işlevselleştirmesinin biyosensör teknolojilerindeki rolünü anlamamıza yardımcı olacak ve gelecekteki araştırmalar için önemli bir referans noktası sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip, taşınabilir, kullanımı kolay, düşük maliyetli, yüksek minyatürleştirme yetenekleri olan, biyouyumlu impedimetrik elektrokimyasal sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu sensör sistemi, E. coli bakterisinin 7,96 CFU/mL seviyede hassas ve erken tespitini gerçekleştirebilmektedir. Geliştirilen sensör, gerçek zamanlı olarak düşük algılama limitlerinde (LOD) ölçüm yapabilmekte ve biyosensör teknolojilerinde önemli bir yenilik sunmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan nitinol bazlı transdüser malzeme, üstün şekil hafızası ve süperelastik özellikleri ile biyosensörlerin performansını artırmaktadır. Diğer yandan, mevcut *E. coli* tespit yöntemleri gibi son teknoloji yöntemlerle rekabet edebilen bu sensör, doğrusal aralık ve tespit limiti açısından da üstün performans göstermektedir.

Geniş bir yelpazede çeşitlilik sunan impedimetrik mikroorganizma tahlili ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. (Tablo 4.1.)
Literatürdeki bazı çalışmalarda, nanoparçacıkların kullanıldığı karmaşık yüzey modifikasyon prosedürleri ile yüksek hassasiyet sağlanırken, bu çalışmada basit ve düşük maliyetli bir prosedürle, 7,96 CFU/mL bir LOD elde edilmiştir. Nitinol tabanlı sensörün hızlı, kolay ve düşük maliyetli olması, E. coli tespitinde yüksek hassasiyet sunması bu çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması, biyosensörlerde nitinol malzemesinin kullanımının biyouyumluluk, dayanıklılık ve maliyet etkinliği açısından sağladığı avantajları ortaya koymaktadır. Geliştirilen sensör sistemi, daha geniş uygulama alanlarında kullanılabilecek pratik ve yenilikçi bir çözüm sunmaktadır.

Tablo 4.1. İmpedimetrik mikroorganizma tahlili ile ilgili son beş yılda yapılan çalışmalar tespit süresi ve analitik performanslarının karşılaştırılması

Tespit Süresi	**LOD (CFU/mL)**	**Linear Range (CFU/mL)**	**Avantaj**	**Dezavantaj**	**Kaynak**
30 dakika	10	10^1- 10^4	İşlevselleştirme yöntemi hızlı, düşük maliyetli Kolay uygulama	Düşük sensör performansı	[106]
~1 saat	10^4	10^4 -10^6	Seçici Hızlı	Yüksek maaliyet Düşük hassasiyet	[107]
1-2 saat	10^7	-	Çok yönlü Hızlı Kolay uygulama	Düşük hassasiyet Lineer ölçüm aralığı belirlenmemiş	[108]
2saat	10^3	10^3-10^5	Yoğun emek istemiyor Hassas	Kısa raf ömrü Geniş olmayan lineer ölçüm aralığı Düşük hassasiyet	[109]
~1 saat	500	10^3-10^7	Basit ve düşük maliyetli işlevselleştirme tekniği Özgül	Düşük hassasiyet	[110]
10 dakika	20	2×10^1–10^5	invaziv olmayan bakteri tespiti için yüksek hassasiyet, Düşük tespit limiti Hızlı	Bakteriler yakalandığında, artan sterik engel ve azaltılmış etkin yüzey alanı	[111]
Bilinmiyor	1	10^0 - 10^4	İmmünolojik tespit olmaksızın bakterileri hassas algılama	E. coli suşları arasında ayrım yapamaz Belirsiz tespit süresi Yüksek maliyet	[112]
~30 dakika	12	10^2–10^7	E.coliye özgü tespit Hassas	E. coli suşları arasında ayrım yapamaz Yüksek maaliyet	[113]
40 dakika	48	10^4-10^7	Geniş dinamik aralık, yüksek hassasiyet	Karmaşık yüzey modifikasyonları Yüksek maaliyet	[114]

4.2. Sonuç ve Öneriler

Nitinol tabanlı biyosensörlerin sadece *E. coli* değil, diğer patojenler ve biyomoleküller için de test edilmesi, sensörün geniş bir uygulama yelpazesi için uygunluğunu değerlendirmek açısından önemlidir. Ayrıca tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan yüzey işlevselleştirme yöntemlerinin dışınd farklı metotlar da kullanılabilir. Bu tür çalışmalar, biyosensörün genel kullanım potansiyelini genişletebilir.

Laboratuvar ortamındaki sonuçların yanı sıra, Nitinol tabanlı biyosensörlerin gerçek dünya koşullarında saha testlerine tabi tutulması önerilmektedir. Bu, sensörlerin pratikteki performansını ve dayanıklılığını değerlendirmek için kritik bir adımdır.

Nitinol tabanlı biyosensörlerin mikroakışkan sistemler ve taşınabilir algılama cihazları gibi entegre sistemlere dahil edilmesi, kullanıcı dostu ve hızlı tespit yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Bu entegrasyon, biyosensörlerin ticari olarak kullanılabilirliğini artırabilir.

Bu çalışma, Nitinol malzemesinin biyosensör uygulamalarında yüzey işlevselleştirmenin etkinliğini ve önemini vurgulamaktadır. Gelecekteki araştırmalar, farklı kaplama malzemelerinin ve işlem parametrelerinin test edilmesiyle Nitinolün biyosensör teknolojilerindeki potansiyel kullanımını daha da genişletebilir. Bu bağlamda, yapılan çalışmaların biyosensör teknolojilerinde yenilikçi çözümler sunacağına inanılmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Ricci, F., Palleschi, G., 2005. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics, 21**(3), 389-407.

2. Zhu, H., Snyder, M., 2003. Protein chip technology. **Current opinion in chemical biology, 7**(1), 55-63.

3. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M., 2005. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical reviews, 105**(4), 1103-1170.

4. Otsuka, K., Ren, X., 2005. Physical metallurgy of Ti–Ni-based shape memory alloys. **Progress in materials science, 50**(5), 511-678.

5. Fu, Y., Du, H., Huang, W., Zhang, S., Hu, M., 2004. TiNi-based thin films in MEMS applications: a review. **Sensors and Actuators A: Physical, 112**(2-3), 395-408.

6. Abbas, A., Hung, H. Y., Lin, P. C., Yang, K. C., Chen, M. C., Lin, H. C., Han, Y. Y., 2021. Atomic layer deposited TiO2 films on an equiatomic NiTi shape memory alloy for biomedical applications. **Journal of Alloys and Compounds**, **886**, 161282.

7. Saeed, E. M., Dawood, N. M., Hasan, S. F., 2021. Improvement corrosion resistance of Ni-Ti alloy by TiO2 coating and hydroxyaptite/TiO2 composite coating using micro arc oxidation process. **Materials Today: Proceedings, 42**, 2789-2796.

8. Safavi, M. S., Bordbar-Khiabani, A., Walsh, F. C., Mozafari, M., Khalil-Allafi, J., 2023. Surface modified NiTi smart biomaterials: Surface engineering and biological compatibility. **Current Opinion in Biomedical Engineering, 25,** 100429.

9. Chan, W. S., Gulati, K., Peters, O. A., 2023. Advancing Nitinol: From heat treatment to surface functionalization for nickel–titanium (NiTi) instruments in endodontics. **Bioactive Materials, 22**, 91-111.

10. Siu, H. T., Man, H. C., 2013. Fabrication of bioactive titania coating on Nitinol by plasma electrolytic oxidation. **Applied surface science, 274**, 181-187.

11. Quinones, R., Gawalt, E. S., 2007. Study of the formation of self-assembled monolayers on Nitinol. **Langmuir, 23**(20), 10123-10130.

12. Petrović, Ž., Katić, J., Metikoš-Huković, M., Dadafarin, H., Omanovic, S., 2011. Modification of a Nitinol surface by phosphonate self-assembled monolayers. **Journal of The Electrochemical Society, 158**(10), F159.

13. 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.

14. Dijksma, M., Boukamp, B. A., Kamp, B., Van Bennekom, W. P., 2002. Effect of hexacyanoferrate (II/III) on self-assembled monolayers of thioctic acid and 11-mercaptoundecanoic acid on gold. **Langmuir, 18**(8), 3105-3112

15. Soysaldı, F., Soylu, M. Ç., 2021. The Effect of (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPS) Coating on the Genetic Detection Performance of Quartz Crystal Microbalance-Dissipation (QCM-D) Biosensor: Novel Intact Double-Layered Surface Modification on QCM-D. **ChemistrySelect, 6(**24), 6056-6062.

16. Hergünvarım, S., 2013. Ultrasound Ortamında Esherichia Coli Dezenfeksiyonuna Sistem Parametrelerinin Etkisi. Anadolu University, Yüksek Lisans Tezi Türkiye.

17. Nielubowicz, G. R., Mobley, H. L., 2010. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. **Nature Reviews Urology, 7**(8), 430-441

18. Salduz, Z. İ. Y., Yigit, Ö. (2010). Idrar Yolu Enfeksiyonlu Çocuklardan Izole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Duyarliliklari/Antibiotic Susceptibility of

Bacteria Isolated From Children with Urinary Tract Infection. **Çocuk Enfeksiyon Dergisi, 4**(4), 138.

19. Balighian, E., Burke, M., 2018. Urinary tract infections in children. **Pediatrics in review, 39(1**), 3-12.

20. Karamanlıoğlu, D., Aysert-Yıldız, P., Kaya, M., Sarı, N., 2019. İdrar kültürlerinden izole edilen enterik bakterilerde genişlemiş spektrumlu β-laktamaz oluşturma sıklığı ve antibiyotik duyarlılıkları. **Klimik Derg, 32**(3), 233-9.

21. Temoçin, F., Köse, H., 2018. Poliklinik hastalarının idrar kültürlerinden izole edilen escherıchıa colı ve klebsıella pneumonıae suşlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretim oranları ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. **Ankem Derg, 32**(3), 79-86.

22. Alpay, Y., Yavuz, M. T., Aslan, T., Büyükzengin, B., 2017. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif escherichia coli ile oluşan komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde oral antibiyotikler karbapenemlere alternatif olabilir mi?

23. Altintas Z, Akgun M, Kokturk G, Uludag Y., 2018. A fully automated microfluidic-based electrochemical sensor for real-time bacteria detection. **Biosensor and Bioelectronics 100:**541-548

24. Tüylek, Z. 2017. Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 6(2), 71-80.

25. Fernández Blanco, A., Moreno, Y., García-Hernández, J., Hernández, M., 2024. A Photonic Immunosensor Detection Method for Viable and Non-Viable E. coli in Water Samples. **Microorganisms, 12**(7), 1328.

26. Huang, Y., Su, Z., Li, W., Ren, J., 2022. Recent progresses on biosensors for Escherichia coli detection. **Food Analytical Methods, 1**-29.

27. Mi, F., Hu, C., Wang, Y., Wang, L., Peng, F., Geng, P., Guan, M., 2022. Recent advancements in microfluidic chip biosensor detection of foodborne pathogenic

bacteria: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry, 414**(9), 2883-2902.

28. Aykut, U., Temiz, H., 2006. Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3**(51): p. 51-52.

29. Y, B. Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış. in 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11). 2011. Elazığ, Türkiye.

30. Zourob, M., S. Elwary, and A.P. Turner, Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems. 2008: Springer Science & Business Media.

31. Kissinger, P.T., 2005 Biosensors—a perspective. **Biosensors and Bioelectronics. 20(**12): p. 2512-2516.

32. Massobrio, G., Bioelectronics handbook: MOSFETs, biosensors, and neurons. 1998: McGraw-Hill Companies.

33. Nikhil, B., et al., Introduction to biosensors. Essays Biochem, 2016. 60(1): p. 1-8.

34. Pilolli, R., Monaci L., Visconti A., Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. **TrAC Trends in Analytical Chemistry, 47**: p. 12-26. 37.

35. Damborský, P., Švitel, J., Katrlík, J., 2016. Optical biosensors. **Essays in biochemistry, 60** (1): 91–100

36. Zeng, S., Baillargeat, D., Ho, H. P., Yong, K. T., 2014. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. **Chemical Society Reviews, 43**(10), 3426-3452.

37. Gopinath, S. C., Awazu, K., Fujimaki, M., 2012. Waveguide-mode sensors as aptasensors. **Sensors, 12**(2), 2136-2151.

38. Yin, M., Gu, B., Zhao, S., Qian, J., Zhang, A., 2011. Highly sensitive and fast responsive fiber-optic modal interferometric pH sensor based on polyelectrolyte

complex and polyelectrolyte self-assembled nanocoating. Analytical and **Bioanalytical Chemistry, 399:** 3, 623 – 3631.

39. Leung, A., Shankar, P. M., Mutharasan, R., 2008. Label-free detection of DNA hybridization using gold-coated tapered fiber optic biosensors (TFOBS) in a flow cell at 1310 nm and 1550 nm. **Sensors and Actuators B: Chemical, 131**(2), 640-645.

40. Zhao, H., Ren, S., Wei, Z., Lou, X., 2022. Evanescent wave optical-fiber aptasensor for rapid detection of zearalenone in corn with unprecedented sensitivity. **Biosensors, 12**(7), 438.

41. Swann, M.J., 2019. The Principles of QCM-I. QCM sensors SCIENTIFIC PUBLICATIONS.

42. Scarano, S., Stefano, M., Minunni, M., 2016. Label free Affinity sensing: application to food analysis. Acta Imeko. 5.

43. Görner, A., Franz, L., Çanak-Ipek, T., Avci-Adali, M., Marel, A. K., 2024. Development of an Aptamer-Based QCM-D Biosensor for the Detection of Thrombin Using Supported Lipid Bilayers as Surface Functionalization. **Biosensors, 14**(6), 270.

44. D'Aurelio, R., Tothill, I. E., Salbini, M., Calò, F., Mazzotta, E., Malitesta, C., Chianella, I., 2021. A comparison of EIS and QCM NanoMIP-based sensors for morphine. **Nanomaterials, 11**(12), 3360.

45. Febriansyah, A., Nuryadi, R., Hartanto, D., 2012. Measurement and Simulation Techniques for Piezoresistive Microcantilever Biosensor Applications. **TELKOMNIKA (Telecommunication Computing Electronics and Control), 10**(4), 725-732.

46. Hansen, K. M., Thundat, T., 2005. Microcantilever biosensors. **Methods, 37**(1), 57-64.

47. Stassi, S., Chiadò, A., Cauda, V., Palmara, G., Canavese, G., Laurenti, M., Ricciardi, C., 2017. Functionalized ZnO nanowires for microcantilever

biosensors with enhanced binding capability. **Analytical and bioanalytical chemistry, 409**, 2615-2625.

48. Greco, G., Agostini, M., Shilton, R., Travagliati, M., Signore, G., Cecchini, M., 2017. Surface acoustic wave (SAW)-enhanced chemical functionalization of gold films. **Sensors, 17**(11), 2452.

49. Eggins, B. R., 2002. Chemical Sensors and Biosensors. John Wiley & Sons, New York, 292.

50. Saputra, H. A., 2023. Electrochemical sensors: Basic principles, engineering, and state of the art. Monatshefte für **Chemie-Chemical Monthly, 154**(10), 1083-1100.

51. Bongrand, P., 1998. Specific and nonspecific interactions in cell biology. **Journal of Dispersion Science and Technology 19** (6e7), 963e978.

52. Sadana, A., Chen, Z., 1996. Influence of non-specific binding on antigen-antibody binding kinetics for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics 11** (1e2), 17e33

53. Teles, F.R.R., Fonseca, L.P., 2008. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Materials Science and Engineering: C 28** (8), 1530e1543

54. Chen, A., Chatterjee, S., 2013. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. **Chemical Society Reviews 42** (12), 5425e5438.

55. Daniel, M.C., Astruc, D., 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews 104** (1), 293e346.

56. Xu, J., Wang, Y., Hu, S., 2017. Nanocomposites of graphene and graphene oxides: synthesis, molecular functionalization and application in electrochemical sensors and biosensors. A review. **Microchimica Acta 184** (1), 1e44.

57. Chen, L., Zheng, H., Zhu, X., Lin, Z., Guo, L., Qiu, B., Chen, G., Chen, Z.N., 2013. Metale organic frameworks-based biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA. **Analyst 138** (12), 3490e3493.

58. Shen, W.J., Zhuo, Y., Chai, Y.Q., Yuan, R., 2015. Cu-based metaleorganic frameworks as a catalyst to construct a ratiometric electrochemical aptasensor for sensitive lipopolysaccharide detection. **Analytical Chemistry 87** (22), 11345e11352

59. Shi, P., Zhang, Y., Yu, Z., Zhang, S., 2017. Label-free electrochemical detection of ATP based on amino-functionalized metal-organic framework. **Scientific Reports 7** (1), 6500.

60. Kim, H. E., Schuck, A., Park, H., Chung, D. R., Kang, M., Kim, Y. S., 2024. Dual-Mode Graphene Field-Effect Transistor Biosensor with Isothermal Nucleic Acid Amplification. **Biosensors, 14**(2), 91.

61. Chaki, N.K., Vijayamohanan, K., 2002. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. Biosensors and Bioelectronics 17 (1e2), 1e12

62. Sandhyarani, N., 2019. Surface Modification Methods For Electrochemical Biosensors. In Electrochemical biosensors (pp. 45-75). Elsevier.

63. Soysaldı, F., 2017. Model Tükürükte Qcm Sensör İle Sentetik Genetik Materyal Tespiti. Erciyes University, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 128.

64. Eroğlu, K., 2020. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Kullanılarak Yapay Tükürükte Escherıchıa Colı Atcc 25922 Bakterisinin Sentetik Dna İle Genetik Tespiti. Erciyes University, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 114.

65. Varshney, M., Li, Y., 2009. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. **Biosensors and bioelectronics, 24**(10), 2951-2960.

66. Brosel-Oliu, S., Abramova, N., Uria, N., Bratov, A., 2019. Impedimetric transducers based on interdigitated electrode arrays for bacterial detection–A review. **Analytica chimica acta, 1088,** 1-19.

67. Yang, L., Bashir, R., 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. **Biotechnology advances, 26**(2), 135-150.

68. Miura, T., Uno, S., 2019. Computer simulation for electrochemical impedance of a living cell adhered on the inter-digitated electrode sensors. **Japanese Journal of Applied Physics, 58**(SB), SBBG15.

69. Katz, E., Willner, I., 2003. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 15**(11), 913-947.

70. Daniels, J. S., Pourmand, N., 2007. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. Electroanalysis: **An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 19**(12), 1239-1257.

71. Altuğ, Ç., 2015. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi İle Afinite Temelli İnsülin Ve İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi. Ege Üniversitesi, Doktora Tezi, İzmir,200.

72. Liedberg, B., Nylander, C., Lunström, I., 1983. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensors and actuators, 4,** 299-304.

73. Hernández, H. H., Reynoso, A. R., González, J. T., Morán, C. G., Hernández, J. M., Ruiz, A. M., Cruz, R. O., 2020. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): A review study of basic aspects of the corrosion mechanism applied to steels. **Electrochemical impedance spectroscopy, 137**-144.

74. Orazem, M. E., Tribollet, B., 2008. Electrochemical impedance spectroscopy. New Jersey, 1, 383-389.

75. Koç, Y., 2021 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi Kullanarak Biyosensör Geliştirilmesinin İncelenmesi. Osmangazi Üniversitesi,Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 89.

76. D . ominguez-Benetton, X., Sevda, S., Vanbroekhoven, K., Pant, D., 2012. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. **Chemical Society Reviews, 41(**21), 7228-7246.

77. Machado, L. G., Savi, M. A., 2003. Medical applications of shape memory alloys. ***Brazilian journal of medical and biological research, 36,*** 683-691

78. Wever, D. J., Veldhuizen, A. G., Sanders, M. M., Schakenraad, J. M., Van Horn, J. R., 1997. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. **Biomaterials, 18(**16), 1115-1120.

79. Es-Souni, M., Es-Souni, M., Fischer-Brandies, H., 2005. Assessing the biocompatibility of NiTi shape memory alloys used for medical applications. **Analytical and bioanalytical chemistry, 381**, 557-567.

80. Acar, E., 2018. Şekil hafızalı alaşımların biyomedikal uygulamaları. **Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, (14)**, 134-144.

81. Toptas, E., Akkus, N., 2007. Sekil Hafizali Alasimlar ve Endüstriyel Uygulamalari. **J. Mach. Electr. Technol, 4**, 15-22.

82. Dilibal, S., 2005. Nikel-titanyum şekil bellekli alaşım üretimi ve şekil bellek eğitimi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İstanbul.

83. H.H. Mohd Zaki,. 2011 Solid state synthesis of NiTi, M.Sc. Thesis, Engineerig Science(Materials) of the University of Western Australia.

84. Stoeckel, D., 2000. Nitinol medical devices and implants. **Minimally invasive therapy & allied technologies, 9**(2), 81-88.

85. Stöckel, D., 1998. Nitinol-A material with unusual properties. **Endovascular Update, 1**(1), 1-8.

86. Fu, Y., Du, H., Huang, W., Zhang, S., Hu, M., 2004. TiNi-based thin films in MEMS applications: a review. **Sensors and Actuators A: Physical, 112**(2-3), 395-408.

87. Feeney, A., 2014. Nitinol cymbal transducers for tuneable ultrasonic devices, Doctoral dissertation, University of Glasgow.

88. Fu, Y. Q., Zhang, S., Wu, M. J., Huang, W. M., Du, H. J., Luo, J. K., Milne, W. I., 2006. On the lower thickness boundary of sputtered TiNi films for shape memory application. **Thin Solid Films, 515**(1), 80-86.

89. Petrini L, Francesco M, 2011. Biomedical applications of shape memory alloys, Journal of Metallurgy, 501483.

90. Kujala, S., Ryhänen, J., Jämsä, T., Danilov, A., Saaranen, J., Pramila, A., Tuukkanen, J., 2002. Bone modeling controlled by a nickel–titanium shape memory alloy intramedullary nail. **Biomaterials, 23**(12), 2535-2543.

91. Duerig, W. T., Melton, N. K., Stockel, D., Wayman, C. M, 1990. Engineering aspects of shape memory alloys Butterworth.

92. Auricchio, F., Boatti, E., Conti, M., Marconi, S., 2021. SMA biomedical applications. In Shape memory alloy engineering (pp. 627-658). Butterworth-Heinemann.

93. Liu, M., Yue, X., Dai, Z., Xing, L., Ma, F., Ren, N., 2007. Stabilized hemocompatible coating of Nitinol devices based on photo-cross-linked alginate/heparin multilayer. **Langmuir, 23**(18), 9378-9385.

94. Chu, C. L., Tao, H. U., Jun, Z. H. O. U., Pu, Y. P., Li-Hong, Y., Dong, Y. S., Chu, P. K., 2006. Effects of H2O2 pretreatment on surface characteristics and bioactivity of NaOH-treated NiTi shape memory alloy. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 16**(6), 1295-1300.

95. Tao, Y., Chang, Q., Liu, Q., Guan, H., Yang, G., Lang, R., Dong, C., 2019. In situ fabrication of Ni (OH) 2 nanoflakes/K-Ti-O nanowires on NiTi foil for high

performance non-enzymatic hydrogen peroxide sensing. **Journal of Electroanalytical Chemistry, 842**, 107-114.

96. Shabalovskaya, S., Rondelli, G., Rettenmayr, M., 2009. Nitinol surfaces for implantation. **Journal of materials engineering and performance, 18,** 470-474.

97. Chen, Y., Yang, Y., Tu, Y., 2013. An electrochemical impedimetric immunosensor for ultrasensitive determination of ketamine hydrochloride. **Sensors and Actuators B: Chemical, 183,** 150-156.

98. Sharma, R., Deacon, S. E., Nowak, D., George, S. E., Szymonik, M. P., Tang, A. A. S., Wälti, C., 2016. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics, 80**, 607-613.

99. Wickramathilaka, M. P., Tao, B. Y., 2019. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. Journal of Biological Engineering, 13: 63.

100. Grdadolnik, J., Maréchal, Y., 2001. Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation, and water uptake. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 62**(1), 40-53.

101. Hou, X., Chen, X., Li, T., Li, Y., Tian, Z., Wang, M., 2021. Highly sensitive terahertz metamaterial biosensor for bovine serum albumin (BSA) detection. **Optical Materials Express, 11**(7), 2268-2277.

102. Han, S., Soylu, M. C., Kirimli, C. E., Wu, W., Sen, B., Joshi, S. G., ... Shih, W. Y. (2019). Rapid, label-free genetic detection of enteropathogens in stool without genetic isolation or amplification. **Biosensors and Bioelectronics, 130**, 73-80.

103. Icoz, K., Soylu, M. C., Canikara, Z., Unal, E. (2018). Quartz-crystal microbalance measurements of CD19 antibody immobilization on gold surface and capturing B lymphoblast cells: effect of surface functionalization. **Electroanalysis, 30**(5), 834-841.

104. Soylu, M. Ç., Köşker, F. B., Keskin, M., Keser, K., Ceran, K. (2018, November). Investigation of 3-Mercaptopropylmethoxysilane Based Coating Methods for Biosensor Applications. In 2018 Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO) (pp. 1-4). IEEE.

105. Keser, K., Soylu, M. Ç., 2022. Detection of phenylarsine oxide in drinking water using an ımpedimetric electrochemical sensor with gelatin-based solid electrolyte enriched with mercaptoethanol: a novel prospective green biosensor methodology. ACS Omega, 7 (47): 43111–43121.

106. Jijie, R., Kahlouche, K., Barras, A., Yamakawa, N., Bouckaert, J., Gharbi, T., Boukherroub, R., 2018. Reduced graphene oxide/polyethylenimine based immunosensor for the selective and sensitive electrochemical detection of uropathogenic Escherichia coli. **Sensors and Actuators B: Chemical, 260**, 255-263.

107. Butler, D., Goel, N., Goodnight, L., Tadigadapa, S., Ebrahimi, A., 2019. Detection of bacterial metabolism in lag-phase using impedance spectroscopy of agar-integrated 3D microelectrodes. **Biosensors and Bioelectronics, 129,** 269-276.

108. Brosel-Oliu, S., Mergel, O., Uria, N., Abramova, N., van Rijn, P., Bratov, A., 2019. 3D impedimetric sensors as a tool for monitoring bacterial response to antibiotics. **Lab on a Chip, 19**(8), 1436-1447.

109. Sadani, K., Muthuraj, L., Nag, P., Fernandes, M., Kondabagil, K., Mukhopadhyay, C., Mukherji, S., 2020. A point of use sensor assay for detecting purely viral versus viral-bacterial samples. **Sensors and Actuators B: Chemical, 322**, 128562.

110. Elgiddawy, N., Ren, S., Yassar, A., Louis-Joseph, A., Sauriat-Dorizon, H., El Rouby, W. M., ... Korri-Youssoufi, H., 2020. Dispersible conjugated polymer nanoparticles as biointerface materials for label-free bacteria detection. **ACS Applied Materials & Interfaces, 12**(36), 39979-39990.

111. Siavash Moakhar, R., AbdelFatah, T., Sanati, A., Jalali, M., Flynn, S. E., Mahshid, S. S., Mahshid, S. (2020). A nanostructured gold/graphene microfluidic device for direct and plasmonic-assisted impedimetric detection of bacteria. **ACS applied materials & interfaces, 12**(20), 23298-23310.

112. Jafari, H., Amiri, M., Abdi, E., Navid, S. L., Bouckaert, J., Jijie, R., Szunerits, S., 2019. Entrapment of uropathogenic E. coli cells into ultra-thin sol-gel matrices on gold thin films: A low cost alternative for impedimetric bacteria sensing. **Biosensors and Bioelectronics, 124,** 161-166.

113. Zarei, S. S., Soleimanian-Zad, S., Ensafi, A. A., 2018. An impedimetric aptasensor for Shigella dysenteriae using a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode. **Microchimica Acta, 185**, 1-9..

114. Lin, D., Pillai, R. G., Lee, W. E., Jemere, A. B., 2019. An impedimetric biosensor for E. coli O157: H7 based on the use of self-assembled gold nanoparticles and protein G. **Microchimica Acta, 186**, 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Fevziye Zeynep YAKUTSOY
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri: 23.01.1998 - Kayseri

EĞİTİM

Derece	**Kurum**	**Mezuniyet Tarihi**
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	2024
Lisans	Erciyes Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği	2020
Lisans	Anadolu Üniversitesi A.Ö.F Sağlık Yönetimi	2023
Lise	Necdet Taş Anadolu Lisesi, Kayseri	2016

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Yakutsoy, F. Z., Soylu, M. Ç., 2024. Comparison of electrochemical responses of shape memory alloys with different surface functionalizations, 46. *5th International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, June 26-28, 2024,* Türkiye, 1577.