



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

**[MİKROAKIŞKAN TABAKA ARACILIĞIYLA KORTİZOL
HORMONU DÜZEYİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK
GİYİLEBİLİR CİHAZ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR]**

[Ebru CİNGÖZ]

[Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı]

[Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı]

**DANIŞMAN
[Prof. Dr.] [Ercan ARICAN]**

[Aralık, 2022]

İSTANBUL

Bu çalışma, [28.12.2022] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı], [Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı]nda [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Ercan ARICAN] (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
[Fen Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Neslihan TURGUT KARA]
İstanbul Üniversitesi
[Fen Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Ece KÖK YETİMOĞLU]
[Marmara Üniversitesi]
[Fen Fakültesi]

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

[Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 38254 FYL-2022-38254 numaralı projesi ile desteklenmiştir.]

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

[]

ÖNSÖZ

[Lisans eğitimimden itibaren çalışmalarına destek veren, öğrenci odaklı pozitif tutumuna saygı duyduğum, tez çalışma sürecinde de yol gösterici olup olumlu tutumları ile cesaretlendiren ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Ercan Arıcan'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreç içerisinde her koşulda yanımda olarak bana farklı bakış açıları kazandıran sevgili Muhammed Ertuğrul Çapan'a, her zaman destekleyici olan ve bilgi birikimini, deneyimlerini paylaşmaktan asla çekinmeyen değerli hocam Prof. Dr. Neslihan Turgut Kara'ya ve tecrübeleri ile bizlere yol gösteren değerli hocam Araştırmacı Levent Dalyan'a ayrıca teşekkür ederim]

Aralık 2022

[Ebru CİNGÖZ]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. HORMONLAR	5
2.1.1. Hormonların Aktiviteleri	5
2.1.2. Adrenal Bezler ve Üretilen Hormonlar	9
2.1.3. Kortizol Hormonu	9
2.1.3.1. Kortizol Hormonunun İlgili Sistemleri ve İşlevi	10
2.1.3.2. Kortizol Hormonu Düzensizliğinin Neden Olduğu Hastalıklar	11
2.1.3.3. Kortizol Hormonu Tespit Yöntemleri	13
2.1.3.4. Kortizol Hormonunun Kolorimetrik Tespiti	20
2.2. MİKROAKIŞKANLAR	23
2.2.1. Kortizol Hormonunun Mikroakışkanlar ile Tespit ve Analiz Çalışmaları	32
2.3. MİKRODENETLEYİCİLER	38
2.3.1. Açık Kaynak Geliştirme Kartları	41
2.3.1.1. Arduino Geliştirme Kartı	42
2.3.1.2. Raspberry Pi Geliştirme Kartı	43
2.3.1.3. ESP 32 Geliştirme Kartı	45
2.3.2. Geliştirme Kartlarının Kullanım Alanları	46
2.3.2.1. Sağlık Analizlerinde Geliştirme Kartlarının Kullanımı	46
3. MALZEME VE YÖNTEM	53
3.1. KORTİZOL STANDARTLARININ HAZIRLANMASI	53
3.2. MAVİ TETRAZOLYUM YÖNTEMİ	53
3.3. MİKROAKIŞKAN TABAKA DESENLEMESİ	53

3.3.1.	<i>Parafin Yöntemi</i>	53
3.3.2.	<i>Agar Temelli Termoplastik ile Hidrofobikleştirme</i>	53
3.3.3.	<i>HMDS ile Hidrofobik Desenleme</i>	54
3.3.3.1.	<i>Isıtma Yöntemi</i>	54
3.3.3.2.	<i>Mikrodalga Işınlama Yöntemi</i>	54
3.4.	SU TEMAS AÇISI KARŞILAŞTIRMA	38
3.5.	TER EMİCİ BÖLGE ÇALIŞMALARI	55
3.6.	YAPAY TER ÖRNEKLERİ İLE ÇALIŞMALAR	56
3.7.	MİKRODENETLEYİCİ ÇALIŞMALARI.....	57
3.7.1.	<i>Esp 32 Cam Geliştirme Kartının Bağlanması ve Programlanması</i>	57
3.7.2.	<i>Sonuç Ekranının Tasarlanması</i>	59
3.7.3.	<i>Görüntü Alım Kutusunun Tasarımı</i>	59
4.	BULGULAR	61
4.1.	MAVİ TETRAZOLYUM ÇALIŞMALARI.....	61
4.2.	MİKROAKIŞKAN TABAKA DESENLEMESİ ÇALIŞMALARI	61
4.2.1.	<i>Parafin Yöntemi Çalışmaları</i>	61
4.2.2.	<i>Agar Temelli Termoplastik ile Hidrofobikleştirme Çalışmaları</i>	63
4.2.3.	<i>HMDS ile Hidrofobik Desenleme Çalışmaları</i>	63
4.3.	KAĞIT ÇALIŞMALARI	65
4.4.	TER EMİCİ BÖLGE OLUŞTURULMASI.....	66
4.5.	MİKROAKIŞKAN DÜZENLENMESİ ÇALIŞMALARI	67
4.6.	MİKRODENETLEYİCİ KURULUMU VE PROGRAMLANMASI.....	69
4.7.	YAPAY TER ÖRNEKLERİNİN MİKROAKIŞKAN ÜZERİNDE DENENMESİ.....	74
4.8.	VALİDASYON ÇALIŞMALARI	74
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	79
	KAYNAKLAR	84
	EKLER	93
	ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: İnsan modeli üzerinde endokrin bezleri ve lokasyonları [1].....	1
Şekil 2.1: Geri besleme-feedback mekanizmasının gösterimi. (+ = uyarma,- = engelleme) [1].....	5
Şekil 2.2: Adrenal bezlerin gösterimi [14].....	9
Şekil 2.3: Cushing sendromik klinik göstergeleri [26,27].....	12
Şekil 2.4: (a) Şekildeki hormonlar sırasıyla ön hipofiz bezinden ACTH salgılanmasını ve adrenal korteksten glukokortikoid salgılanmasını uyarır. (b) Otomatik kan örnekleme, insanlarda (B) 24 saatlik bir süre boyunca ACTH ve kortizolün sirkadiyen ve ultradian profillerinin ve sıçanlarda (C) kortikosteronun yüksek çözünürlüklü ölçümlerinden elde edilir [29].....	13
Şekil 2.5: Kortizol içeren numune mikropalakaya eklenir. Kit ile birlikte gelen enzim konjugatı eklenir ve kaşırım çalkalanıp oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sırasında enzim konjugatları ve kortizol molekülleri arasında bağlanma rekabeti meydana gelir. Mikroplaka bağlanmamış materyallerden arındırılmak üzere yıkanır. 30 dakika sonra renk oluşturuca substrat mikropalakaya eklenir ve renk değişimi meydana gelir. Sonuçlar satın alınmış kite bağlı olarak 600-650 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu ile okunur. Renk ve renk değişimi korelasyonu satın alınan ve çalışılan kite bağlı olarak farklılık gösterebilir. Şekilde gösterilen örnekte kortizol varlığında parlak ve yoğun bir renk ortaya çıkmaktadır [40].....	16
Şekil 2.6: LS-MS/MS çalışma prensibini gösteren şema (a) Numune örneği, (b) Alınan numuneden istenilen molekülün ayrılması için gerçekleştirilmiş SDS-PAGE işlemi (c) İmmünoafinite saflaştırma basamağı (d) Örneklerin parçalanması (e) veri analizi; bu basamakta alınan ölçüm kantitatif tayin yapılmaksızın veri tabanında bulunan veriler ile karşılaştırılır. (f) Hedeflenen moleküller tekrarlı olarak parçalanır. (g) Seçilen parçalardan niceleme gerçekleştirilir [42].....	18
Şekil 2.7: MS/MS çalışma prensibi. Numuneler (EI, ESI, MALDI vb. ile) iyonize edilir. Belirli bir kütle/yük oranındaki iyonlar seçilir. Seçilen iyonlar parçalara ayrılır ve algılama için istenilen numunenin iyonları oluşturulur. İstenilen iyona ulaşmak için parçalama aşaması çoğaltılabilir. Son ürünler molekülün kütle/yük oranına göre tanımlanır [43].....	18
Şekil 2.8: Shima Dalirirad ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı tükürükten kortizol tespiti için oluşturulmuş lateral akış sistemi çalışma görseli. Altın nanopartiküllerinin yüzeyine bağlanmış kortizol probu ile tükürükte bulunan kortizol bağlanıp renk değişimi oluşturmaktadır. Oluşturdukları sistemin 0,5-15 ng/ml kortizol hormonunun tespitini sağlayabileceğini belirtmişlerdir [46].....	19
Şekil 2.9: Antikor ile işlevselleştirilmiş elektrokimyasal sistem örneği [47].....	20
Şekil 2.10: Kolorimetrik kortizol hormonu tespiti için farklı yöntemlerden alınan renklerin gösterimi. (a) Sülfürik asit yöntemi (b) Altın nanopartiküle bağlı Silber-Porter yöntemi (c) Prusya mavisi yöntemi (d) Mavi tetrazolyum yöntemi [51].....	22
Şekil 2.11: Whatman filtre kağıdı üzerinde TiO ₂ kaplanmış ve kaplanmamış bölgelerin gösterimi [54].	25

Şekil 2.12: TiO ₂ kalemi ile oluşturulmuş bölgelerin bariyer oluşturma durumları. Her bölgede 30 uL'lik (a) Mürekkep ile renklendirilmiş su, (b) Mürekkep ile renklendirilmiş DMSO, (c) Aseton, (d) %40 Etanol, (e) DMF, (f) Asetonitril, (g) Mürekkep ile renklendirilmiş PBS, (h) Mürekkep ile renklendirilmiş 1N HCL, (i) Gliserol, (j) Tween 20 [54].	26
Şekil 2.13: AKD mürekkebin üretim ve uygulama süreci şeması [55].	27
Şekil 2.14: AKD ile desenlenmiş kağıtlar üzerinde denemelerin gösterimi. (A) Gıda boyası ile renklendirilmiş sulu çözeltiler, (B-D) AKD ile sınırlandırılmış alanlar içerisine uygulanmış sulu çözeltiler, (C-E) Sınırlandırılmamış alanlar içerisine uygulanmış sulu çözeltiler [55].	27
Şekil 2.15: (a)Triklorosilan ile mikroakışkan tabaka desenlemesi çalışma şeması, (b-c-d) örnekler [56].	28
Şekil 2.16: Tekrar kullanılabilir mikroakışkan üretim şeması [58].	29
Şekil 2.17: Baskı tekniği ile oluşturulmuş mikroakışkan tabaka gösterimi. Analiz bölgeleri NaOH algılama için fenoltalein-etanol çözeltisi kullanılarak baskılama tekniği ile oluşturulmuştur [59].	30
Şekil 2.18: (a)Mikroakışkan tabaka desenlemesinde kabartma tekniğinin şeması, (b) Kağıdın üst ve alttan görünüşü, (c) Parafin uygulanmadan önce kabartma kağıdın bariyer sınırının SEM görüntüsü, (d) Parafin uygulamasından sonra mavi mürekkep ile renklendirilmiş mikroakışkan tabaka [60].	30
Şekil 2.19: Lazer ışık kullanım yöntemi şeması [61].	31
Şekil 2.20: Fotolitografi ile mikroakışkan hazırlama şeması [62].	31
Şekil 2.21: Hazırlanmış olan altın nanopartiküllerin çalışma prensibinde, aptamerlere bağlanmış sitratlı negatif yüklü altın nanopartiküller, kortizol hormonu varlığında konformasyonel değişiklik ile aptamer ile altın nanopartikülün ayrılmasını sağlar. Eklenen NaCl çözeltisi ile altın nanopartiküllerin yükleri azalır ve agregasyon oluşturur. Bu durum, örneklerin kırmızı renkten gri/mavi renge dönüşmesine neden olmaktadır [65].	32
Şekil 2.22: Yapay ter ile altın nanopartiküller üzerinde yapılmış renk değişim testi için görsel. (a) NaCl solüsyonu eklenmeden önce altın nanopartiküller, altın nanopartiküller üzerine NaCl eklendikten sonra (b) 0, (c) 1, (d) 5, (e) 10, (f) 50, (g) 100 ng/mL kortizol hormonu varlığında renk değişim modelleri [65].	33
Şekil 2.23: (a) Hazırlanmış cihaz prototipi. (b) Poliamid membran içerisinde MoS ₂ nano tabakalar. (c) Kortizol hormonunun algılanmasına yönelik şematik gösterim [66].	34
Şekil 2.24: (a) Vücut sensörü (b) giyilebilir cihaz görüntüsü, (c) mikroakışkan sisteme entegre giyilebilir kortizol sensör üretimi [67].	35
Şekil 2.25: * LBG: Lazerle yakılan grafen Kortizol analiz sistemi şeması [67].	35
Şekil 2.26: Elektrot ve mikroakışkan üretim tasarımı. (a) Mikroakışkan cihaz üretim şeması (b) glikoz sensörü (c) kortizol sensörü (d-e-f) bükülme gösterimi [68].	37
Şekil 2.27: Sırası ile grafen- Ag/AgCl elektrodu üzerine altın nanopartiküllerin ve antikorların sabitlenmesi ve bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için etanolamin uygulanması [68].	37
Şekil 2.28: Sıvıların ıslatma durumlarını açısal olarak gösteren şekil [73].	39

Şekil 2.29 Mikrodenetleyici birim içerik görseli [75].....	40
Şekil 2.30 Mikrodenetleyicilerin sınıflandırılması [79].....	41
Şekil 2.31: Arduino Varyantları. (a) Arduino Uno, (b) Arduino Due, (c) Arduino Mega (d) Arduino Nano [91].....	43
Şekil 2.32: Raspberry Pi Varyantları. (a) Raspberry Pi 3A+, (b) Arduino Due, (c) Arduino Mega (d) Arduino Nano.....	44
Şekil 2.33: ESP 32- CAM Geliştirme kartı (a) Arka Yüz, (b) Ön Yüz, (c) Kamera Modülü.....	46
Şekil 2.34: Aksha y Sugathan ve ekibinin oluşturduğu mikrodenetleyici temelli giyilebilir cihaz prototipi [103].....	47
Şekil 2.35: Sagahyroom, A ve ekibinin geliştirmiş olduğu sıcaklık ve kalp atışını izleyen mikrodenetleyici temelli giyilebilir cihaz (a.), parametrelerin yüksek olması durumunda SMS ile bilgilendirme sistemi (b.) ve verilerin izlenebildiği web arayüzü (c) [105].....	48
Şekil 2.36: Düşme tespitine bağlı giyilebilir sensör [106]	49
Şekil 2.37: EKG izleme sisteminin temel çalışma mantığını gösteren şablon [107].....	49
Şekil 2.38: Kağıt esaslı LAMP çipinin tasarımı. (a) Bir girişe ve altı aralık odası sahip çip sensörünün şeması. (b) Cam mikrofiber (üst panel) ve PES membranının (alt panel) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü. (c) Altı numune odası ve bir giriş deliğinden oluşan monte edilmiş LAMP sensörlü kaseti. Her numune odası, bir kağıt çeşitleri pedi ve giriş içerir. Reaksiyon hazneleri ve giriş, kağıt bazlı bir akış kanalıyla birbirine bağlanmıştır [108].....	50
Şekil 2.39: IoT tabanlı LAMP dedektörü. (a) Muhafazayı, sıcaklık yönetimi bileşenini, mikrodenetleyiciyi ve flüoresan algılama optiklerini gösteren şematik tasarım. (b) Kurulumun ve takılı optik ve elektronik bileşenlerin fotoğrafı. Boyut 1,2”×1,2”×3” şeklindedir. Toplam ağırlık 300 gr'dan azdır [108].....	50
Şekil 2.40: (d)Profil sayfası, Cihazın arayüzü yapılırken Arduino-C programlama dili kullanılmıştır. LCD, verilerinizi nereye kaydetmek istediğinizi seçebileceğiniz cihazın profil sayfasını göstermektedir. Cihaz aynı anda en fazla üç (3) profili kaydedebilir. (e) Test sayfası, LCD, cihazın Test Sayfası gösterilen analize başlama arayüzü göstermektedir. (f) Grafik sayfası, Sonuç sayfasında hormon düzeyi, hormon düzeyini test edilen gün sayısını içeren bir çubuk grafikte göstermektedir. (e) Sonuç sayfası, bu sayfada, hormonal dengesizlik, hormon seviyesinin günlük ölçümü ile tespit edilmektedir. Ölçümlerden kaydedilen veri sayısı hormon dengesizliği olup olmadığını söylemek için yeterli değilse “Pozitif” veya “Negatif” ve “Yetersiz Veri” yazmaktadır [82].....	51
Şekil 3.1: Tez kapsamında kullanılan kütüphaneleri gösteren şekil.....	57
Şekil 3.2: ESP 32 Cam geliştirme kartının bağlantısı için gerekli parçaları ve bağlanma şemasını gösteren şekil.....	58
Şekil 3.3: Esp 32-FTDI-Breadboard bağlantısını gösteren resim.....	58
Şekil 3.4: Çekim kutusu, (a) Görüntü alım kutusunun dışardan görünümü, (b) Kutu içerisinde mikrodenetleyici/geliştirme kartının yerleşimi, (c) Mikrodenetleyici/geliştirme kartının çalışır durumdaki halini gösteren şekil.....	60

Şekil 4.1: Sırasıyla 60 ,50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8, 0,4,0,2 uL/mL kortizon içeren stokların uygun oranlarda renk reaktifi ile reaksiyonu sonrasında ortaya çıkan renk skalası.....	61
Şekil 4.2: Parafin ile desenleme gerçekleştirilen No. 4 Whatmann Kağıtlarının gıda boyası ile renklendirilmiş su ile denenmesi çalışmasını gösteren şekil.....	62
Şekil 4.3: Termoplastik yöntemi ile hidrofobikleştirme sonuçlarını gösteren şekil.....	63
Şekil 4.4: Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8, ve 0,4 ug/mL konsantrasyonda kortizol ile renk reaktif bölgelerinin renk değişimini gösteren şekil.....	66
Şekil 4.5: Hidrofobikleştirilerek kanallanmış mikroakışkan tabakaların ter emici bölge ve reaktif bölgeler ile birleştirilerek Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8, 0,4 ve 0,2 ug/mL'lik konsantrasyonlarda kortizol ile reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan renk ve mikroakışkan sistemi gösteren şekil.....	67
Şekil 4.6: Yeni tasarlanan sistemin doğruluğunu göstermek amacıyla gerçekleştirilen çalışmada sırasıyla 2-5-10-20-30-40-50 ug/ml'lik konsantrasyona sahip kortizol örnekleri renk analiz çalışmalarını gösteren şekil.....	68
Şekil 4.7: Mikroakışkan sistem tasarımını gösteren şekil.....	69
Şekil 4.8: Tasarlanan sistemin, sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8 ve 0,4 ug/mL konsantrasyona sahip kortizol ile renk reaksiyonunu gösteren şekil.....	69
Şekil 4.9: ESP 32 geliştirme kartının web sunucusuna bağlanması, Arduino IDE seri port ekranından bağlantının gözlemlenmesi.....	70
Şekil 4.10: Web Sunucu üzerinden Esp 32 geliştirme kartını kontrol etmeyi sağlayan arayüz ve alınan görüntü.....	71
Şekil 4.11: Arayüzde gerçekleştirilen işlemlerin geçici depolama alanında tutulduğunu ve firebase platformuna gönderiminin seri port ekranı üzerinde gösterimi.....	71
Şekil 4.12: Firebase platformuna kaydedilen görüntü ve görüntüye ait bilgiler.....	72
Şekil 4.13: Analiz edilecek bölgenin (Roi1) görüntüsü.....	73
Şekil 4.14: Spyder konsol ekranındaki Roi1 ortalama RBG değeri ve Z-skor değerini gösteren şekil.	73
Şekil 4.15: Validasyon çalışmaları sonucunda ortaya çıkan Z-skor katsayıları ile kortizol konsantrasyonları arasındaki bağlantıyı gösteren grafik.....	74
Şekil 4.16: Kortizol konsantrasyonu ve etiket aralıklarını gösteren standart grafik.....	75

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bazı endokrin bezlerin ürettiği hormonlar ve hormon fonksiyonları. [1].....	7
Tablo 2.1(devamı): Bazı endokrin bezlerin ürettiği hormonlar ve hormon fonksiyonları. [1].....	8
Tablo 2.2: Kortizol hormonunun farklı biyolojik örneklerde bulunma aralığı [34].....	16
Tablo 2.3: Kortizol kolorimetrik reaksiyonlarının değerlendirilmesi [51].....	22
Tablo 2.4: Gerçek ter örneklerinde kortizol tespiti [67].....	36
Tablo 2.5: Mikroakışkan kanallama / hidrofobikleştirme için kullanılan yöntemler.....	38
Tablo 3.1: Isıtma yöntemi çalışma prosedürleri.....	53
Tablo 3.2: Mikrodalga ısınlama yöntemi çalışma prosedürleri.....	54
Tablo 3.3: Ter emici bölge seçiminde gerçekleştirilen çalışmaları ve parametreleri gösteren tablo....	56
Tablo 4.1: Mikroakışkan tabaka üretiminde kullanılacak kağıt seçiminin gerçekleştirilmesi için gerçekleştirilen çalışma sonuçları.....	63
Tablo 4.2: Isıtma yöntemi ile HMDS-HCl ve HMDS-NH ₃ ile muamele edilmiş kağıtların hidrofobikleştirme çalışma sonuçlarını gösteren tablo.....	64
Tablo 4.3: Mikrodalga yöntemi ile HMDS-HCl ve HMDS-NH ₃ ile muamele edilmiş kağıtların hidrofobikleştirme çalışma sonuçlarını gösteren tablo.....	65
Tablo 4.4: Kullanılan kağıtların sıvı emme kapasitesini gösteren tablo.....	66
Tablo 4.5: Kortizol RGB değerlerinin validasyon sonuç değerlerini gösteren tablo.....	75
Tablo 4.6: Oluşturulan sistem ile belirlenebilen konsantrasyon değerlerini gösteren tablo.....	76
Tablo 4.7: Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1 ve 0,8 ug/mL, n=10 için gerçekleştirilen validasyon sonuçları.....	76
Tablo 4.7(devamı): Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.8 ug/mL, n=10 için gerçekleştirilen validasyon sonuçları.....	77
Tablo 4.7(devamı): Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.8 ug/mL, n=10 için gerçekleştirilen validasyon sonuçları.....	78

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
ng	: Nanogram (0,000 001 Miligram [mg])
mg	: Miligram
ml	: Mililitre (0,001 litre)
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
mM	: Milimol
mA	: Miliamper
°C	: Derece santigrat
pH	: Potansiyel Hidrojen
HCl	: Hidrojen klorür
NaCl	: Sodyum klorür
MoS ₂	: Molibden sülfür
MXene	: Karbür/ nitrür/karbonitrürleri
pH	: Potansiyel Hidrojen
Ag	: Gümüş
Ag/Cl	: Gümüş klorür
FeS	: Demir sülfür
σ/s	: Standart Sapma
RSD	: Bağlı Standart Sapma
Xi	: Regresyon doğrusu eğimi

Kısaltmalar	Açıklama
RGB	: Red-Green-Blue
ELISA	: Enzime bağlı bir immünosorbent tahlili
GH	: Büyüme hormonu
LH	: Luteinize edici hormon
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
GHRH	: Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
TRH	: Tirotropin salgılatıcı hormon

GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
PTH	: Paratiroid hormonu
RBC	: Kırmızı kan hücresi
CBG	: Kortikosteroid bağlayıcı globulin
11-beta-HSD1	: 11-beta-hidroksisteroid dehidrojenaz
MR	: Mineralokortikoid reseptörü
NLRP3	: Nod-like receptor pyrin domain-containing 3
NF-KB	: NF-kappa B (NF-κB, Nuclear Factor kappa B)
STAT5	: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon 5 aktivatörü
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
LDL	: Low-density lipoprotein
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
MS/MS	: Ardışık kütle spektrometrisi/ Tandem kütle spektrometrisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez
EI	: Elektron iyonizasyonu (Electron ionization)
ESI	: Elektrosprey iyonizasyonunu (electrospray ionization)
MALDI	: Matris-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (matrix-assisted laser desorption/ionization)
AuNP	: Altın nanopartikül
LOD	: Tespit limiti
TS, LOQ	: Algılama sınırı
dk	: Dakika
PDMS	: Poli dimetil siloksan
TiO2	: Titanyum Dioksit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMF	: Dimetilformamid
PBS	: Phosphate Buffer Saline
TCS	: Triklorosilan
AKD	: Alkil keten dimer
3D	: 3 boyutlu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu(Scanning electron microscope)

UV	: Ultraviyole
RIA	: Radyo-immunoassay
PI	: Poliamid
PSA	: Basınca karşı duyarlı yapıştırıcı (pressure sensitive adhesive)
PET	: Polietilen tereftalat
DTSP	: Dithiobis(süksinimidil propiyonat
OTS	: Oktadesiltriklorosilan
PMMA	: Polimetilmetakrilat
OTS	: Oktadesiltriklorosilan
HMDS	: Hexamethyldisilazane
TMSCL	: Klorotrimetisilan
CPU	: Mantık birimi
RAM	: Rastgele erişim belleği
ROM	: Salt okunur bellek
ADC	: Analogdan dijitale dönüştürücü
ICSP	: Devre içi seri programlayıcı
GPU	: Grafik işlem birimi
IDE	: Integrated Development Environment
SoC	: Çip Üzerinde Sistem Teknolojisi (System on a chip)
RF	: Radyo Frekans
HTML	: Hiper Metin İşaretleme Dili (Hypertext Markup Language)
SPIFFS	: Serial peripheral interface (spi) flash file system
PPG	: Fotopletismogram
PRV	: Nabız hızı değişkenliği
USB	: Evrensel Seri VeriyoluUniversal Serial Bus
GPIO	: Genel amaçlı giriş ve çıkış (General-Purpose input/output)
RCA	: Radio Corporation of America,RCA connector
]	

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[MİKROAKIŞKAN TABAKA ARACILIĞIYLA KORTİZOL HORMONU DÜZEYİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK GİYİLEBİLİR CİHAZ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR]

[Ebru CİNGÖZ]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı]

Danışman : [Prof. Dr.] [Ercan ARICAN]

Kortizol hormonu vücudun stres hormonu olarak bilinmektedir ve metabolizmayı düzenleme, inflamatuvar yanıt ve bağışıklık sistemine destek gibi görevleri vardır. Ayrıca kortizol sinir, bağışıklık, kardiyovasküler, solunum, üreme ve kas-iskelet sistemlerini etkileyebilir. Normal kortizol seviyeleri terde 8 ila 142 ng/ml arasında değişmektedir. Kadınlarda 200 ng/ml erkeklerde ise 500 ng/ml kortizol seviyesi stres durumunu ifade etmektedir.

Tez kapsamında mikroakışkan tabaka aracılığıyla ter örnekleri toplanarak, oluşturulmuş renk reaktifi ile birleştirilerek kortizol hormonunun kolorimetrik analizi gerçekleştirilmiş ve mikroakışkanın ESP 32 modülü aracılığı ile alınan fotoğrafı üzerinden RGB kanal yoğunluğu değerlerine bağlı olarak etiketleme yöntemi ile kantitatif analizi sağlanmıştır. Bu çalışmada amacımız belirli hastalık tanılarında önemli rolü olan kortizol hormonunun düzey tespitini giyilebilir teknolojinin sağladığı avantajlardan yararlanarak sağlamaktır.

Oluşturulan sistem ile gün içerisinde kullanıcının giyeceği cihazdan alınacak kortizol düzeyi ölçümlerinin bilgisayar aracılığı ile görüntülenmesi ve kaydedilerek kortizol hormonundaki olası değişikliklerin takibini kolaylaştırması hedeflenmiştir. |

Aralık 2022, [111] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Kortizol Hormonu, Mikroakışkan Sistem, Giyilebilir Teknoloji, Sağlıkta Akıllı Dönüşüm]

SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

[STUDIES ON A WEARABLE DEVICE FOR DETERMINING CORTISOL HORMONE LEVEL THROUGH MICROFLUIDIC LAYER]

[Ebru CİNGÖZ]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Molecular Biology and Genetics]

Supervisor : [Prof. Dr.] [Ercan ARICAN]

[The hormone cortisol is known as the body's stress hormone and has functions such as regulating metabolism, inflammatory response and supporting the immune system. In addition, cortisol can affect the nerves, immune, cardiovascular, respiratory, reproductive and musculoskeletal systems. Normal cortisol levels range from 8 to 142 ng/ml in sweat. Cortisol level of 200 ng/ml in women and 500 ng/ml in men indicates stress.

Within the scope of the thesis, the colorimetric analysis of the cortisol hormone was performed by collecting sweat samples through the microfluidic layer, combining them with the created color reagent, and quantitative analysis of the microfluidic was provided by labeling method depending on the RGB channel density values on the photograph taken by the ESP 32 module. In this study, our aim is to determine the level of the hormone cortisol, which has an important role in the diagnosis of certain diseases, by taking advantage of the advantages of wearable technology.

With the system created, it is aimed to monitor and record the cortisol level measurements to be taken from the device that the user will wear during the day, via a computer, to facilitate the follow-up of possible changes in the cortisol hormone. |

December 2022, [111] pages.

Keywords: [Cortisol Hormone, Microfluidic System, Wearable Technology, Smart Transformation in Health]

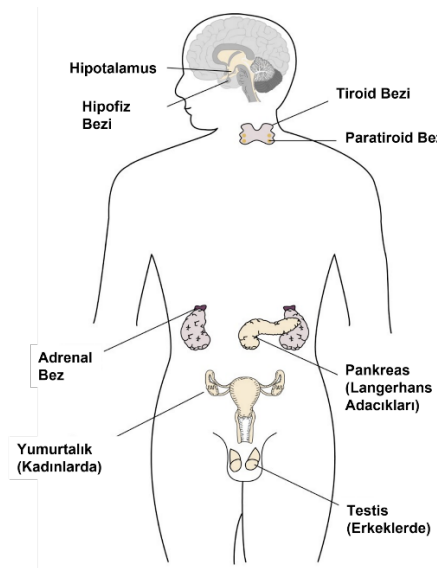


1. GİRİŞ

Organizmanın hayati faaliyetlerini yerine getirebilmesi ve iç veya dış değişikliklere gerekli olan yanıtları verebilmesi için sistemlerin sürekli bir iletişim halinde olması gerekmektedir. Bu iletişim sinir sistemi ve hormonal sistem olmak üzere iki yol ile sağlanmaktadır. Sinir sistemi hızlı bilgi aktarımını sağlarken hormonal değişimler, hormon üretilmesi, salınması, taşınması gibi aşamalar ile ilerleyen daha yavaş bir süreci kapsamaktadır.

Hipofiz bezi, tiroid bezi, paratiroid bezler, adrenal bezler, gonadlar (yumurtalıklar ve testisler), pankreas ve hipotalamus gibi endokrin bezler tarafından üretilen moleküller, hormonlar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1). Hormonlar, metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi, vücut sıvılarının bileşimlerini ve üreme sistemlerini kontrol etmektedir.

Endokrin, çeşitli bezlerin ürünlerin belirli uyarıcılara cevap olarak kan dolaşımına salınmasını ifade etmektedir. Kan dolaşımına giren hormonlar bu yol ile hedef hücrelere taşınır. Hormonlar, spesifik hedef hücreleri etkileyebileceği gibi birden farklı hücre tipini de etkileyebilir. Bu etki hedef hücre yüzeyinde ya da içerisinde bulunan moleküller ile tanımlanır ve tanımlayıcı moleküller ile etkileşim biyokimyasal süreçleri tetikler. Bu süreçler hedef hücrenin aktivitesini veya işlevini değiştirebilir niteliktedir [1].



Şekil 1.1: İnsan modeli üzerinde endokrin bezleri ve lokasyonlarını [1]

Hormonların analizlerinin, özellikle biyoloji ve tıp bilimlerinde oldukça önemli bir yeri bulunmaktadır. Sendromları, hastalıkları ve ortaya çıkan anomalileri tespit etme noktasında sıklıkla hormon analizlerine başvurulmaktadır. Gelişen teknoloji ile hormon analizleri için çeşitli yöntemler de ortaya çıkmıştır her yöntemin kendi içerisinde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Her hormon aynı şekilde tespit edilemez, hormonların farklılığı farklı tespit yöntemlerini de ortaya çıkartmıştır [2].

Kortizol hormonu, adrenal korteksten salgılanan ana glukokortikoiddir ve vücudun farklı sistemlerinde farklı fonksiyonları etkilemektedir. Salınımı hipotalamus-hipofiz ve adrenal ekseninde düzenlenmektedir ve olası düzenlenme kaybı Cushing Sendromuna veya Addison Hastalığına neden olmaktadır. Aynı zamanda kortizol organizmalar için stres hormonu olarak kabul edilmektedir bunun yanında metabolizma düzenlenmesi, inflamatuvar yanıt, bağışıklık, solunum, üreme sistemi gibi sistemler üzerinde de etkisi bulunmaktadır.

Bu sebeplerle kortizol ölçümü ve takibi oldukça önemlidir. Kortizol seviyelerinin ölçümü kan, tükürük ve ter gibi vücut sıvılarından gerçekleştirileceği gibi saç ve tırnaktan da ölçüm gerçekleştirilebilir. İnsan ter ve tükürük sıvıları karşılaştırılabilir kortizol seviyelerine sahiptir. Enzime bağlı bir immünosorbent tahlili (ELISA) testi kortizol analizinde altın standart durumundadır ancak kortizol hormonu ölçümü için literatürde çeşitli başarılı yöntemler de tanımlanmıştır.

Kortizol hormonu miktarı, kromatografi, immünoanaliz, elektrokimyasal immüno-algılama yöntemleri ile tayin edilebilmektedir [3]. Yaygın olarak kullanılan bu yöntemler ile yüksek doğrulukta analiz gerçekleştirilebilmektedir ancak büyük numune hacimleri, uzun süreli test aşamaları, bu teknikler için özel olarak geliştirilmiş çeşitli aletlere ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeplerden ötürü tanımlanmış birçok analiz genel kullanıma uygunluk göstermemektedir.

Mikroakışkanlar, selüloz tabanlı kağıtlardan oluşturulmuş, ekstra sıvı pompalarına ihtiyaç duymayan ve emici özellikle kağıtlar / membranlardan oluşan analitik cihazlardır. Bu tabakalar üzerinde antijen-antikor saptamaları, kolorimetrik analizler gibi özellikle sıvılar üzerinde analizler gerçekleştirilmektedir. Mikroakışkanlar uygun maliyetli, taşınabilir, esnek, hafif, farklı sistemlere entegre edilebilir cihazlardır. Temel çalışma mantığı emici özelliği olan

tabakaya analiz reaktiflerinin emdirilmesi, sıvının aktarımı-taşınımı için kanalların oluşturulması şeklindedir.

Giyilebilir cihazlar; aksesuar olarak giyilebilen, giysilere gömülebilen, kullanıcının vücuduna implante edilebilen ve hatta cilde dövme yapılabilen bir elektronik cihaz kategorisidir. Cihazların, mikroişlemciler tarafından desteklenen ve İnternet üzerinden veri gönderme, alma özelliği ile geliştirilmiş, pratik kullanımları vardır [4]. Bu cihazlar önleyici müdahale için zaman içinde anlamlı sağlık durumu değişikliklerini tespit etmek amacıyla insan vücudundan sürekli olarak veri toplayabildikleri için kişiselleştirilmiş tıbbın gerçekleştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Esnek bir elektronik cihaz tipik olarak alt tabaka, aktif katman ve arayüz katmanı dahil olmak üzere birkaç anahtar bileşen içerir. Bu kapsamda yüksek mobiliteye sahip tespit yöntemleri, yüksek esneklik ve uygunluk gibi benzersiz özelliklerinden dolayı, elektronik ile insan vücudu arasında doğal bir etkileşim sağlar [5].

Mikrodenetleyiciler, bir cihazdayken o cihazın eylemlerini ve özelliklerini kontrol eden gömülü sistemlerdir [6,7]. Çoğu zaman, cihazın tüm işlevlerini değil, cihazdaki özel bir görevi kontrol ederler hem yazılım hem de donanım bileşenleri vardır [8]. Mikrodenetleyiciler, günümüzde popüler olarak tek kartlı bilgisayarlar olarak bilinen mikrobilgisayarlardır [9,10]. Ancak mikrodenetleyiciler, genel amaçlı bilgi işlem için kullanılan mikroişlemciler ile karıştırılmamalıdır, mikrodenetleyiciler belirli bir amaç için tasarlanmıştır [11].

Bu çalışmada amacımız kortizol hormonunun pratik, giyilebilir bir cihaz ile anlık tespitinin sağlanmasıyla biyoteknoloji temelli çalışmalara katkıda bulunmaktadır. Kolorimetrik tespit yöntemleri özellikle biyoteknolojik yaklaşımlarda, giyilebilir teknolojide pratik kullanımlarıyla ön plana çıkmaktadır. Bunun temel sebebi kısa sürede sonuç alınması, doğruluk paylarının yüksek olması ve düşük maliyet ile üretilebilir/ kullanılabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Literatür çalışmaları incelendiğinde giyilebilir teknoloji ile kolorimetrik yöntemler sıklıkla bir arada kullanılmıştır ancak renk değişimlerinin analizleri için taşımanın mümkün olmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada öncelikli amacımız taşınabilir cihazların oluşturulmasıdır. Ayrıca önceki çalışmalarda tasarlanan sistemlerin tekrar kullanılabilir olmaması ve sürekli, sensörler dahil olmak üzere toplu olarak değişim gerektirmesi de bir dezavantajdır. Çalışmamızda ortaya çıkacak olan giyilebilir cihazın tekrar kullanılabilir olması sistemin kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

Oluşturulan sistem; giyilebilir cihaz ve okuma alanı ile web aracılığı ile bağlantı oluşturularak ölçümlerin web üzerinden alınmasını sağlanmasını esas almaktadır. Aynı zamanda kullanım süresi boyunca giyilebilir cihazdan alınmış olan ölçümlerin yine web içerisinde depolanması yolu ile kullanıcının kortizol hormonu değişimlerinin takip edilebilirliğine, bu şekilde; tekrar kullanılabilir, düşük maliyetli, hızlı tespit sağlayan, test edilen parametrelerin sürekli takibi ve ileri aşamalarda elde edilen verilerin analiz edilerek sonuçların yorumlanmasını sağlayan sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

Tez kapsamındaki çalışmalarda; kortizol hormonunun analizi mikrokışkan tabaka üzerinde, kolorimetrik renk değişimi gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen renk değişimleri yorumlama ve kantitatif tayin için kamera içeren bir donanım aracılığı ile giyilebilir cihaza entegre bir sistem oluşturumuştur. |

2. GENEL KISIMLAR

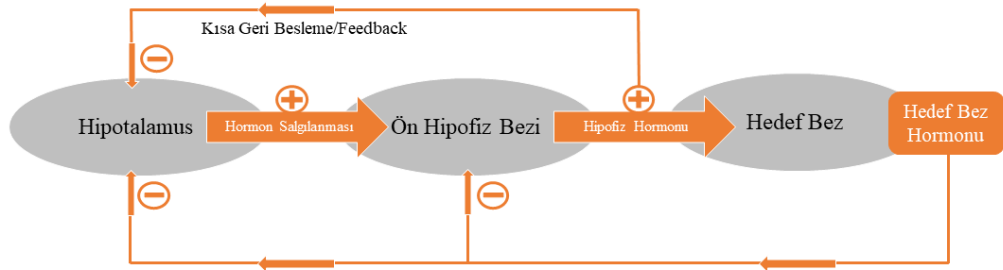
2.1. HORMONLAR

Hormonlar; hipofiz, adrenal, tiroid, paratiroid ve gonadlar gibi kanalsız endokrin bezlerinde sentezlenen ve yaygın olarak endokrin organlar olarak adlandırılan ve kan dolaşımı doku hücreleri aracılığıyla taşınan belirli hedefler üzerinde hareket eden organik bileşiklerdir (Tablo 2.1).

2.1.1. Hormonların Aktiviteleri

Organizmanın iç veya dış kaynakları uyaranlara uygun yanıtı vermek ve denge/homeostazını korumak için hormonların üretimi ve salgılanması sürekli kontrol altındadır. Bu kontrol mekanizması yalnızca tek bir hormon yerine birden çok hormonun etkileşimi ile doku, hormon ilişkileri ve dokuların fonksiyonlarını değiştirip düzenlenmektedir. (Şekil 2) Örneğin, İnsülin hormonu kas ve karaciğer dokularında glikoz alımını arttırmaktadır.

Bunun yanında hipofiz hormonunun salgı kontrolleri hipofiz tarafından iletilen hipotalamik geri besleme uyaranları tarafından kontrol edilmektedir. Bu uyaranlar, kortizol, östrojen, testosteron gibi hormonları ve insülin gibi metabolik uyaranları kapsamaktadır. Bilinen geri besleme uyaranlarının yolak bilgileri genellikle hayvan fizyolojisi çalışmalarından edinilmiştir. İnsandaki durum ise hastalar üzerinde yapılmış çalışmalar ile anlaşılmaya çalışılmaktadır [12].



Şekil 2.1: Geri besleme-feedback mekanizmasının gösterimi. (+ = uyarma, - = engelleme) [1]

İlgili hormonların istenilen sınırlar içerisinde kalması için hedef bezlerden hipotalamus ve hipofiz bezine devamlı bir geri besleme mevcuttur. Hipotalamus ve/veya hipofiz bezi, ilgili

hormon kan dolaşımında belirli bir seviyeye ulaştığında hormonun salınımı durdurmaktadır. Bahsedilen geri besleme-feedback mekanizmasında belirtilen hormon salınımı sınır değerleri genel olarak cinsiyet, yaş ve diğer hormonlar gibi birçok faktörden etkilenmektedir.

Hormon sistemlerinde genel olarak negatif geri besleme-feedback görülse bile bazı hedef bezleri uyaran hormonların üretimini ve salınımı arttırmak üzere pozitif geri besleme-feedback mekanizmaları da mevcuttur. Örneğin kadınların menstrual döngülerinde yumurtlama için, östrojen hormonu baskılanmak yerine üretimi pozitif geri besleme yolu ile arttırılmaktadır.



Tablo 2.1: Bazı endokrin bezlerin ürettiği hormonlar ve hormon fonksiyonları. [1]

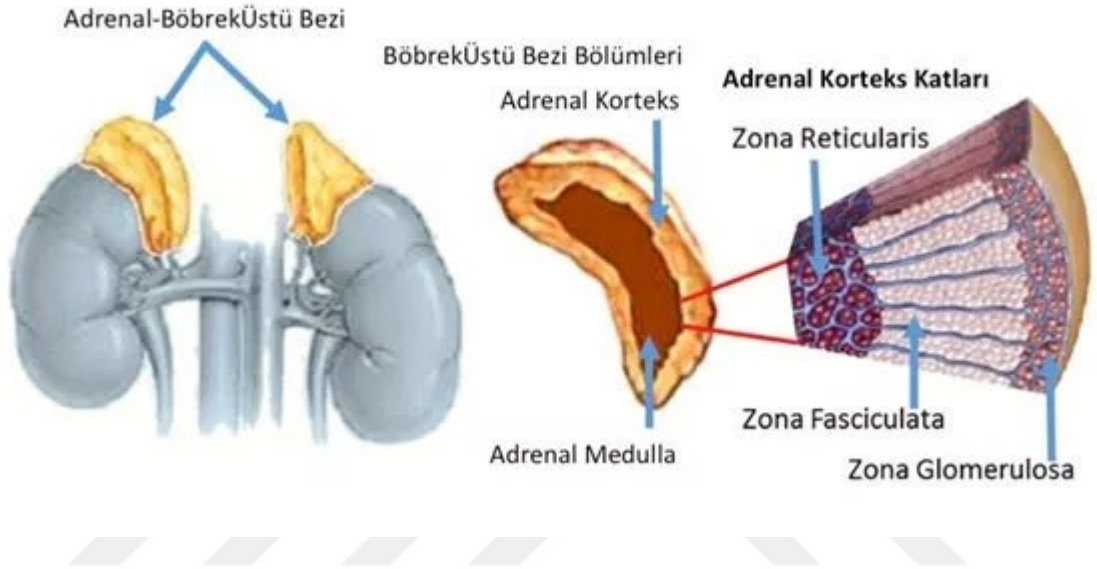
Hormonun üretildiği yer	Salgılanan hormon(lar)	Hormon fonksiyonu
Adrenal bezler	Aldosteron	Tuz, su dengesi ve kan basıncını düzenler
	Kortikosteroid	Vücuttaki temel işlevleri kontrol eder; bir anti-inflamatuar olarak işlev görür; kan şekeri seviyelerini, kan basıncını ve kas gücünü korur; tuz ve su dengesini düzenler
	Epinefrin	Kalp atış hızını, oksijen alımını ve kan akışını artırır
	Norepinefrin	Kan basıncını korur
Hipofiz bezi	Antidiüretik hormon (vazopressin)	Böbreklerde su tutulmasını etkiler; kan basıncını kontrol eder
	Adrenokortikotropik hormon (ACTH)	Cinsiyet hormonlarının (kadınlarda östrojen ve erkeklerde testosteron) üretimini ve kadınlarda yumurta ve erkeklerde sperm üretimini kontrol eder.
	Büyüme hormonu (GH)	Büyüme ve gelişmeyi etkiler; protein üretimini uyarır; yağ dağılımını etkiler
	Luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH)	Cinsiyet hormonlarının (kadınlarda östrojen ve erkeklerde testosteron) üretimini ve kadınlarda yumurta ve erkeklerde sperm üretimini kontrol eder.
	Oksitosin	Memede rahim ve süt kanallarının kasılmasını uyarır
	Prolaktin	Göğüslerde süt üretimini başlatır ve sürdürür; seks hormonu seviyelerini etkiler
	Tiroid uyarıcı hormon (TSH)	Tiroid hormonlarının üretimini ve salgılanmasını uyarır

Tablo 2.1(devamı): Bazı endokrin bezlerin ürettiği hormonlar ve hormon fonksiyonları. [1]

Hipotalamus	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH)	Hipofiz bezinde büyüme hormonu salınımını düzenler
	Tirotropin salgılatıcı hormon (TRH)	Hipofiz bezinde tiroid uyarıcı hormon salınımını düzenler
	Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)	Hipofiz bezinde LH/FSH üretimini düzenler
	Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH)	Hipofiz bezinde adrenokortikotropin salınımını düzenler
Timus	Humoral faktörler	Lenfoid sistemin gelişmesine yardımcı olur
Tiroid bezi	Tiroid hormonu	Metabolizmayı kontrol eder; büyümeyi, olgunlaşmayı, sinir sistemi aktivitesini ve metabolizmayı da etkiler.
Paratiroid bezleri	Paratiroid hormonu (PTH)	Kan kalsiyum düzeylerinin en önemli düzenleyicisi
Böbrekler	Renin ve anjiyotensin	Hem doğrudan hem de adrenal bezlerden aldosteron üretimini düzenleyerek kan basıncını kontrol eder.
	Eritropoietin	Kırmızı kan hücresi (RBC) üretimini etkiler
Epifiz bezi	Melatonin	Uykuya yardımcı olmak için gece saatlerinde melatonin salgılar
Pankreas	Glukagon	Kan şekeri seviyelerini yükseltir
	İnsülin	Kan şekeri seviyelerini düşürür; glikoz, protein ve yağ metabolizmasını uyarır

2.1.2. Adrenal Bezler ve Üretilen Hormonlar

Adrenal bezler böbreklerin üzerinde bulunan, bir dış (korteks) ve bir iç (medulla) katmandan oluşan yapılardır (Şekil 2.2). İnsan fetal adrenal bezi, gelişimin ilk 3 ayında önemli derecede büyüme gösterir. 12-18 haftalık bir insanda fetal adrenal bezler ağırlığının 7 katına erişmiş durumdadır [13].



Şekil 2.2: Adrenal bezlerin gösterimi [14].

Adrenal kortekste üretilen başlıca hormonlar kortikosteroidler (glukokortikoidler ve mineralokortikoidler)'dir. Aynı zamanda adrenal bezlerin korteksinden cinsiyet hormonları da salgılanmaktadır ancak salgılanan bu cinsiyet hormonları yumurtalık ve testislerden üretilen ve salgılanan hormonlara göre daha az miktarda ve daha az etkilidirler. Adrenal bezlerin medulla kısmında ise adrenalın ve noradrenalin hormonları üretilmektedir. Bu hormonlar stres uyaranlarına karşı etkilidir. Salgılanan hormonlar, Cushing Sendromu, Addison Hastalığı ve feokromositoma gibi hastalıklar üzerinde etkilidir [15].

2.1.3. Kortizol Hormonu

Kortizol hormonu, adrenal korteksin zona fasciculata katmanından salgılanmakta olan ana glukokortikoiddir. Yaygın olarak stres hormonu olarak bilinmektedir ancak vücutta farklı fonksiyonlar ve işlevler üzerinde etkilidir. Kortizol hormonunun üretimi ve salgılanması Hipotalamus-hipofiz ve adrenal eksen tarafından düzenlenmektedir. Birçok glukokortikoid, inaktif formda dolaşmaktadır. İnaktif formları ya albumine ya da kortikosteroid bağlayıcı globuline (CBG)'e bağlı durumdadır. Çoğu dokuda inaktif durumdaki glukokortikoidler 11-

beta-hidroksisteroid dehidrojenaz 1 (11-beta-HSD1) tarafından aktif formuna dönüştürülmektedir. Ters yönde ise böbrek ve pankreastaki 11-beta-HSD2 kortizolu inaktif duruma dönüştürmektedir [16].

2.1.3.1. Kortizol Hormonunun İlgili Sistemleri ve İşlevi

Vücuttaki birçok dokuda glukokortikoid reseptörleri bulunmaktadır bu nedenle kortizol hormonu ilgili reseptörlerin bulunduğu birçok organ sisteminde etki göstermektedir. Bu organ sistemleri; Solunum, üreme, bağışıklık, kardiyovasküler ve sinir sistemleri olarak sayılabilir.

Solunum Sistemi; Joe W. Ramsdell ve arkadaşlarının çalışmasında obstrüktif solunum yolu hastalığı bulunan hastalarda uzun süreli kortikosteroid uygulamasının semptom iyileşmesinde etkili olduğu bildirilmiştir [17].

Üreme Sistemi; Spor yapmanın sağlığa yadsınamayacak şekilde pozitif etkisi olduğu bilinmesine rağmen uzun süreli egzersizin ve yoğun temponun, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)'u arttırdığı ve hipotalamus-hipofiz ve yumurtalık döngüsünde problemlere neden olarak özellikle kadınlarda üreme sorunlarına ve osteoporoza neden olabileceği bildirilmiştir [18].

Bağışıklık Sistemi; Glukokortikoidler, dentritik hücre göçleri ve apoptozu kontrol etmektedir bazı durumlarda dentritik hücrelerin olgunlaşmasını inhibe etmektedir [19]. Bunun yanında makrofajlarda bulunan NLRP3'ü artırarak proinflatuar yanıtı arttırdığı gösterilmiştir [20]. Glukokortikoidler T hücrelerinin apoptozunu indükleyemekte ve T hücrelerinin hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Bazı otoimmün hastalıklarda B hücrelerinin antikor üretimi baskılamak üzere immünomodülatör olarak etki göstermektedirler [21].

Kardiyovasküler Sistem; Dolaşımda aşırı düzeyde kortikosteroid olan bireylerde kardiyovasküler hastalıkların gelişim riski daha yüksektir fakat mevcut durumda glukokortikoidlerin bu sistemde direkt mi yoksa dolaylı yoldan mı etkili oldukları bilinmemektedir. Bununla birlikte kardiyomiyositler glukokortikoidleri bağlayan mineralokortikoid reseptörünü (MR) eksprese edebilmektedir ancak glukokortikoidlerin rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

Glukokortikoidler, vaskülatürde, kan basıncı dengesini sürdürmek üzere prostasiklin ve nitrik oksit gibi vazodilatörlerin üretimini inhibe etmektedir [22]. Kardiyomiyositlerde, GR'lerin anti-

apoptotik (örn., sitokin kaynaklı pro-apoptotik sinyalleri zayıflatır) ve anti-inflamatuar eylemler (örn., NF-KB'nin inhibisyonu ve anneksinlerin yukarı regülasyonu) uyguladığı gösterilmiştir [23].

Sinir Sistemi; Beyinde eksprese edilen glukokortikoid reseptörleri, stresin oluşturduğu uyaranlara aracılık etmektedir. Şizofreni, travma sonrası stres bozukluğu gibi psikiyatrik durumlarda ve anksiyete de glukokortikoidler yüksek oranlarda saptanmıştır bunun yanında bağımlılıklar (alkol, kokain) anormal glukokortikoid aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir [24].

Glikoz ve Karaciğer Metabolizması; Stres durumunda glukokortikoid uyaranları karaciğerde glikozu düzenlemek için glikojenoliz (glikojen yıkımı) ve glukoneogenez yollarını uyarmaktadır. Glukokortikoidlerin sinyal bozuklukları ile metabolik anomaliler ortaya çıkabilmektedir. Büyüme hormonu (GH) uyarılarında önemli bir molekül olan STAT5 glukokortikoidler tarafından bağlanmakta ve ekspresyonunu düşürmektedir. Bunun yanında kortizol hormonu dengesizliklerine bağlı olarak ortaya çıkan Cushing Sendromu ve Addison Hastalığının etkilerinden olan obezite, hipoglisemi, hiperkolesterolemi, karaciğer yağlanması, cilt renginde bozulma gibi sonuçların glukokortikoidlerin karaciğer ile bilinmeyen birçok etkileşimi olduğunu düşündürmektedir [24].

2.1.3.2. Kortizol Hormonu Düzensizliğinin Neden Olduğu Hastalıklar

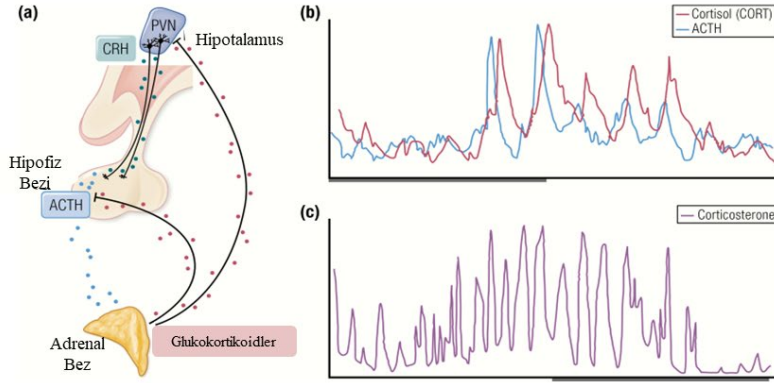
Kortizol hormonunun düzenlenmesinde meydana gelen bozukluklar ile kortizol hormonunun fazlalığı Cushing Sendromuna veya kortikal yetmezliğe yol açarak Addison Hastalığına sebep olur. Cushing Sendromunun en yaygın etkisi kilo artışıdır ve bu etkiyle beraber hipertansiyon, dikkat ve konsantrasyon bozukluklarına ve hafıza problemleri de görülebilmektedir. Kortizol hormonun artışı protein kaybına neden olduğundan dolayı kaslarda zayıflama ve yağ birikimi meydana gelir. Vücutta meydana yağ birikiminin yüzde birikimi ile aydede yüzü, omuzlarda birikmesi sonucunda ise Şekil 2.3' te gösterildiği gibi bufalo kamburu ortaya çıkar. Bununla birlikte Cushing Sendromunun diğer belirtileri arasında huzursuzluk hali, depresif ruh hali, akne artışı, kemik erimesi, aşırı susama ve idrara çıkma, kan şekeri yüksekliği, kronik enfeksiyonlar, cilt inflamasyonları ve çocuklarda büyümede yavaşlama görülebilmektedir. Cushing Sendromu tanısı 24 saatlik idrarda serbest kortizol düzeyi, Deksmetazon baskılama testi, bu testte hasta gece saat 23.00'da deksametazon içeren bir hap alır ve sabah idrarında kortizol düzeyi ölçülür, Gece yarısı tükürük kortizol seviye ölçümü ile konulabilir. Hastalığın tedavisinde temel amaç vücuttaki kortizol seviyesini düşürmektir [25].



Şekil 2.3: Cushing sendromik klinik göstergeleri [26, 27].

Addison Hastalığı ise üretilen kortizol hormonunun yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır. Bu hastalığa primer adrenal yetmezlik veya sekonder adrenal yetmezlik neden olur. Primer adrenal yetmezlik, adrenal bezlerin korteks bölümünün hasar görmesi ve yeterli hormon üretmemesi anlamına gelmektedir. Bu duruma genel olarak otoimmün hastalıklar sebep olmaktadır. Sekonder adrenal yetmezlik ise hipofiz bezinden salgılanan adrenokortikotropik hormonun (ACTH)'ın yeterli üretilmemesi ve dolayısı ile glukokortikoid hormonların yetersiz üretimidir. Addison hastalığında cilt inflamasyonları, enfeksiyonlar veya stres sonucunda Addison krizleri meydana gelmektedir. Bu kriz, tansiyonun düşmesi, düşük kan seviyesi, kanda yüksek potasyum seviyeleri ile hayatı tehdit eden krizlerdir [28].

Çeşitli hastalıklara ve sendromlara sebep olan kortizol hormonu steroid bir hormondur ve kolesterolden sentezlenmektedir. Ön hipofiz bezinden salgılanan ACTH hormonu, Düşük yoğunluklu lipoprotein- low-density lipoprotein (LDL) reseptörlerinde artış meydana getirir ve kolesterolün progesteron'a dönüştüren ve kortizol sentezinin ara basamağı olan kolesterol desmolaz'ın aktivitesini artırır (Şekil 2.4) [29].



Şekil 2.4: (a) Şekildeki hormonlar sırasıyla ön hipofiz bezinden ACTH salgılanmasını ve adrenal korteksten glukokortikoid salgılanmasını uyarır. (b) Otomatik kan örnekleme, insanlarda (B) 24 saatlik bir süre boyunca ACTH ve kortizolün sirkadiyen ve ultradian profillerinin ve sıçanlarda (C) kortikosteronun yüksek çözünürlüklü ölçümlerinden elde edilir [29].

2.1.3.3. Kortizol Hormonu Tespit Yöntemleri

Biyolojik Örneklerde Kortizol Tespiti; Günümüzde saç, ter, kan, tükürük, idrar gibi biyolojik örneklerden kortizol hormonu tespit edilebilmektedir ve analiz için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Biyoaktif olarak dolaşımda bulunan kortizol bağlanmamış kortizol olarak adlandırılır ve biyoaktif- serbest kortizol miktarının saptanması total kortizol hormonunun tespitinden daha zorlayıcıdır.

Saç Örneklerinden Kortizol Tespiti; Saçın biyolojik numune olarak kullanımı son 20 yıl içerisinde artmıştır. Özellikle adli bilimlerde, toksikoloji alanında, sporcularda doping kontrollerinde saç örneklerinden sıklıkla faydalanılmaktadır. Kortizol hormonu, saç gövdesinde birikebilmektedir bu nedenle özellikle sürekli kortizol kontrollerinde saç üzerinde analiz gerçekleştirilebilir. Aylık kortizol analizi yapılmak istendiğinde saçın saç derisine en yakın kısmından ilk santimetresi alınarak çalışma anından itibaren bir ay önceki dönemden çalışma anına kadar olan döneme kadar ki kortizol tespit edilebilir [30].

Kortizol hormonu test edilebilmek amacıyla metanol kullanılarak saç gövdesinden ayrılır. Ayrılan kortizol hormonunu tespit edebilmek için ELISA (enzim immünolojik) testleri gibi yöntemler kullanılabilir [31].

İdrar Örneklerinden Kortizol Tespiti; İdrardaki kortizol seviyesi 24 saatlik idrardan ölçülür bu test 24 saatlik kortizol testi olarak adlandırılmaktadır. İdrardaki kortizol hormonu miktarı ile kandaki serbest kortizol miktarı doğrusal korelasyon içerisindedir. İdrardan kortizol hormonunun tespiti protein bağlayıcı radyoanaliz yoluyla ilk olarak 1968 yılında Murphy ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [32].

Günümüzde idrardan kortizol hormonu tespiti ince tabaka kromatografisi (TLC), MS/MS, florimetri gibi yöntemler ile gerçekleştirilebilmektedir.

Serum ve Plazma Örneklerinden Kortizol Tespiti; Serum ve plazma örneklerinden kortizol hormonu tespiti diğer örnekler göre daha zorlayıcıdır. Bunun sebebi dolaşımdaki diğer steroidlerin ve moleküllerin bir arada bulunmasıdır. Bu nedenle serum veya plazmada gerçekleştirilecek testlerde öncelikle kortizol hormonunun diğer moleküller ile girişiminin engellenmesi gerekmektedir. Bu numunelerde kortizol hormonu seviyeleri genel olarak kemilüminesans immünoanalizleri ile gerçekleştirilmektedir.

Kan Örneklerinden Kortizol Tespiti; Kan içerisinde bulunan kortizol hormonu kan alımından itibaren yaklaşık 80 dakikalık bir yarılanma ömrü ile serbest haldedir [33].

Bu numunelerde de serum ve plazma numunelerindeki zorlukla karşılaşmaktadır. Kan içerisindeki diğer moleküller ile etkileşim kan örneklerinden kortizol hormonu analizinin temel sınırlayıcısı durumundadır. Bu nedenle kan örnekleri öncelikle ultrafiltrasyon, diyaliz, jel filtrasyonu gibi aşamalardan geçmelidir. Bu zorunluluk ise kandan kortizol hormonu analizinin karmaşık, maliyetli ve zaman alıcı olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle kan numunelerinden kortizol hormonu ölçülmek istendiğinde genel olarak serumdan immünolojik testler yoluyla analiz gerçekleştirilir [34].

Tükürük Örneklerinden Kortizol Tespiti; Kandan pasif difüzyon yolu ile tükürüğe steroid olan aldosteron ve kortizol karışmaktadır ve tükürükteki steroid seviyeleri plazma ile karşılaştırılabilir bir korelasyon halindedir. Tükürükten steroid analizi 1970'li yıllarda

kullanılmıştır. Bu yıllarda tükürükten testosteron ve kortizol ölçümü gerçekleştirilmiştir. Günümüzde tükürük örnekleri yumurtalık fonksiyonları, Cushing sendromu, konjenital adrenal hiperplazinin teşhisi için kullanılmaktadır [35].

Ancak tükürükteki kortizol miktarı kandan yaklaşık 100 kat daha düşüktür bu nedenle tükürükten kortizol hormonunun tespiti için düşük gözlenebilme sınırına sahip testler kullanılmaktadır [34].

Ter Örneklerinden Kortizol Tespiti; Ter numunelerinin barındırdığı kortizol serbest-bağlanmamış kortizol hormonudur [36].

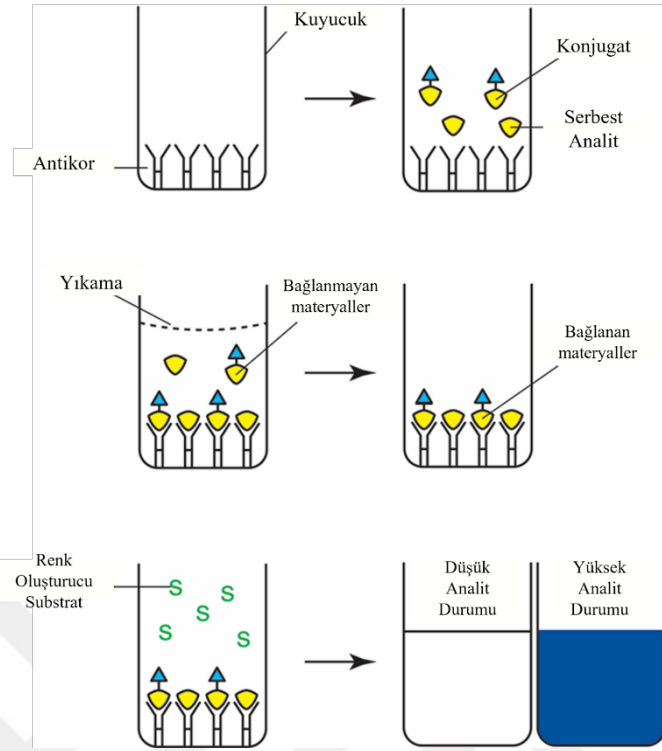
Ter kortizol düzeyi, tükürük kortizol düzeyi ile korelasyon içerisindedir. Ter örneklerinden kortizol hormonu teşhisi ilk kez ELISA testi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kağıt kromatografisi ve immünosensörler ile kortizol analizi bildirilmiştir [37].

Kortizol hormonu çeşitli biyolojik sıvılarda Tablo 2.2.'de gösterildiği gibi farklı miktarlarda bulunabilir.

Tablo 2.2: Kortizol hormonunun farklı biyolojik örneklerde bulunma aralığı [34].

Örnek	Kortizol Hormonunun Normal Aralığı
Kan	25 µg/mL (sabah), 2 µg/mL (gece yarısı)
Serum	45–227 ng/mL (sabah), 17–141 ng/mL (akşam)
İdrar	21.458–149.696 ng/24 saat
	44.000–140.000 ng/24 saat
Tükürük	1–12 ng/mL (sabah), 0.1–3 ng/mL (akşam)
	1–10 ng/mL (sabah), 0,5–2 (akşam)
Ter	8–142 ng/MI
Saç	18–153 tel/mg
	40–128 tel/mg
İnterstisyel sıvı	12–34 ng/mL (sabah), 9–13 ng/mL (akşam)

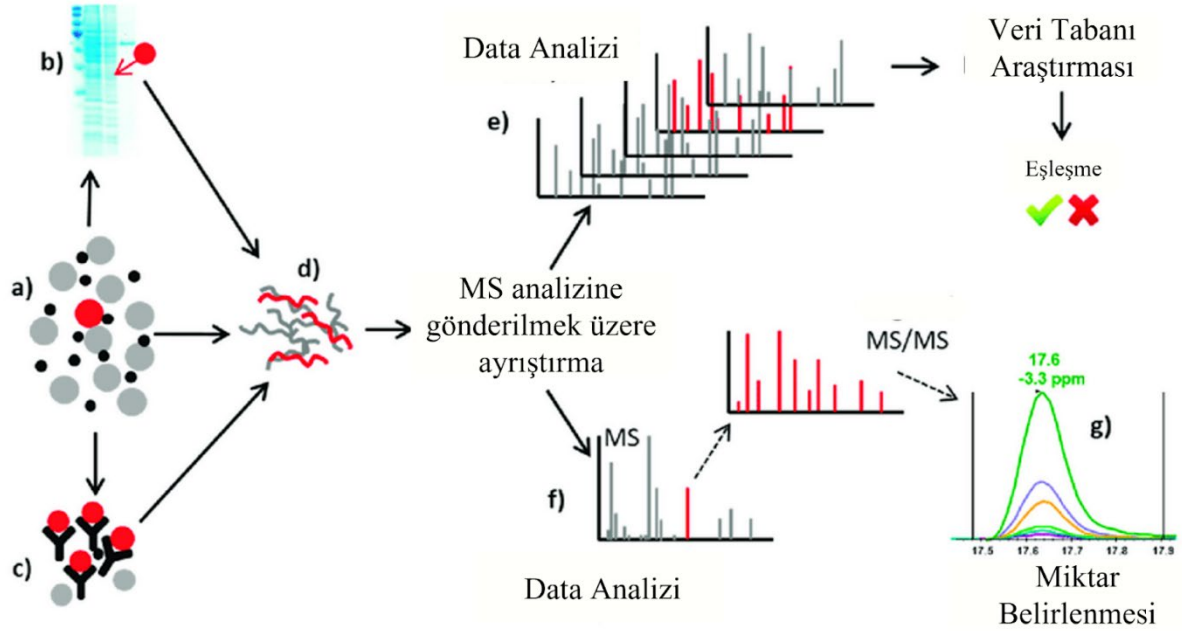
Kortizol hormonunun tespiti için çeşitli reseptörler, immünolojik testler, immünoensing yöntemleri son zamanlarda sıklıkla çalışılan konular arasında yer almaktadır [38,39]. Kortizol hormonunun tespiti için özellikle immünolojik testler kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan test ise enzime bağlı immüno-sorbent (ELISA) testidir. ELISA testlerinde antikorlar kullanılarak, hormonun tespit edilmek istenildiği sıvı içerisinde kortizol moleküllerinin varlığı antikor-antijen ilişkisinin kurulması ve ilişki sırasında renk değişimi meydana gelir (Şekil 2.5).



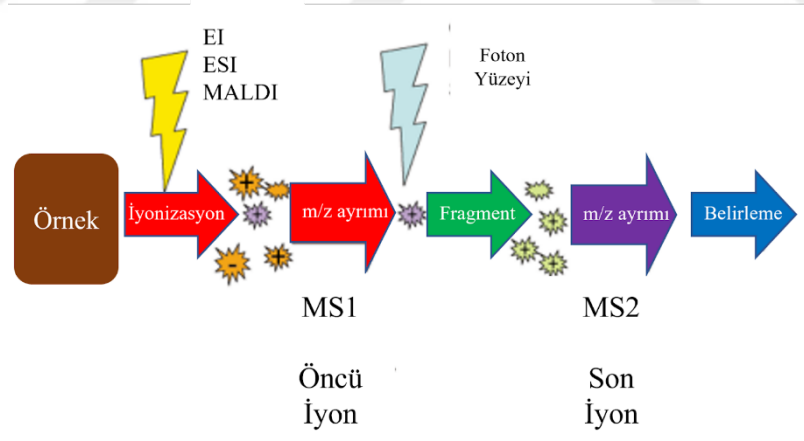
Şekil 2.5: Kortizol içeren numune mikrolakaya eklenir. Kit ile birlikte gelen enzim konjugatı eklenir ve karışım çalkalanıp oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sırasında enzim konjugatları ve kortizol molekülleri arasında bağlanma rekabeti meydana gelir. Mikrolaka bağlanmamış materyallerden arındırılmak üzere yıkanır. 30 dakika sonra renk oluşturuca substrat mikrolakaya eklenir ve renk değişimi meydana gelir. Sonuçlar satın alınmış kite bağlı olarak 600-650 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu ile okunur. Renk ve renk değişimi korelasyonu satın alınan ve çalışılan kite bağlı olarak farklılık gösterebilir. Şekilde gösterilen örnekte kortizol varlığında parlak ve yoğun bir renk ortaya çıkmaktadır [40].

2014 yılında Russell, Evan ve arkadaşlarının çalışmasında ELISA yöntemi ile tükürük ve ter örneklerindeki kortizol hormonu analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Yoğun bir egzersizden sonra gönüllülerden ter, tükürük ve saç örnekleri alınmıştır. Çalışma sonucunda ter kortizol miktarı 8,16-147,7 ng/ml olarak bulunmuştur. Ter örnekleri ile tükürük örnekleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğu bildirilmiştir [41].

Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) (Şekil 2.6) ve Tandem kütle spektrometresi (MS/MS) (Şekil 2.7) ile de kortizol ölçümü gerçekleştirilebilir. Bu sistemde farklı spektrumlarla iyonlaştırılmış materyalin kütle-yük oranı değerlendirilmektedir. Bu teknik yüksek özgüllük ve duyarlılık ile çalışmaktadır. Bu nedenle tercih edilen bir yöntemdir. Ancak MS/MS yönteminde özel ekipmanlara, tecrübeli personele ihtiyaç duyulmaktadır ve taşınabilir bir sistem olmaması bu sistemin dezavantajlarından [42].



Şekil 2.6: LS-MS/MS çalışma prensibini gösteren şema (a) Numune örneği, (b) Alınan numuneden istenilen molekülün ayrılması için gerçekleştirilmiş SDS-PAGE işlemi (c) İmmünoafinite saflaştırma basamağı (d) Örneklerin parçalanması (e) veri analizi; bu basamakta alınan ölçüm kantitatif tayin yapılmaksızın veri tabanında bulunan veriler ile karşılaştırılır. (f) Hedeflenen moleküller tekrarlı olarak parçalanır. (g) Seçilen parçalardan niceleme gerçekleştirilir [42].



Şekil 2.7: MS/MS çalışma prensibi. Numuneler (EI, ESI, MALDI vb. ile) iyonize edilir. Belirli bir kütle/yük oranındaki iyonlar seçilir. Seçilen iyonlar parçalara ayrılır ve algılama için istenilen numunenin iyonları oluşturulur. İstenilen iyonla ulaşmak için parçalama aşaması çoğaltılabilir. Son ürünler molekülün kütle/yük oranına göre tanımlanır [43].

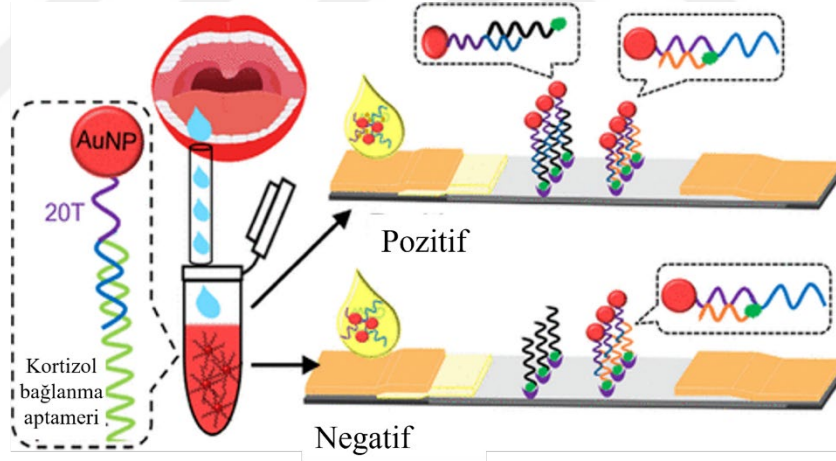
Bunların yanında lateral akış immünolojik test sistemleri kortizol hormonu tespiti için geliştirilmiş ilk taşınabilir sistemlerdir [44].

Lateral(yanal) akış sistemleri ilk olarak 1970'lerde ortaya çıkmıştır ve günümüzde hala kullanılmaktadır. Lateral akış sistemlerinde kolorimetrik ya da floresans okuma yoluyla

biyolojik bir molekülün bağlamak ve tespit etmek için antikorlar kullanılmaktadır. Lateral akış sistemlerinde analiz edilmek istenilen numune nitroselüloz membranlardan kılcallık yolu ile analiz bölgesine taşınır ve test sonunda bant oluşumu yolu ile okuma gerçekleştirilir.

Lateral akış sistemlerinin en başarılı örneklerinden biri diyabet hastalarının kullanımı için oluşturulmuş kan şekeri montörüdür. Şekil 2.8 da gösterildiği gibi bu analitik cihazda tek kullanımlık bir şerit üzerinde immobilize edilmiş enzimler (glukoz oksidaz veya dehidrojenaz) bulunmaktadır. Şerite küçük bir miktarda kan eklenir ve şeritteki enzim glikozun oksidasyonunu tetikler, monitör sayacı ise bu reaksiyon sırasında üretilen akımı ölçerek kantitatif bir sonuç verir. Bu monitörlerin günümüz teknolojisi ile birleştirilerek hala kullanımı devam etmektedir.

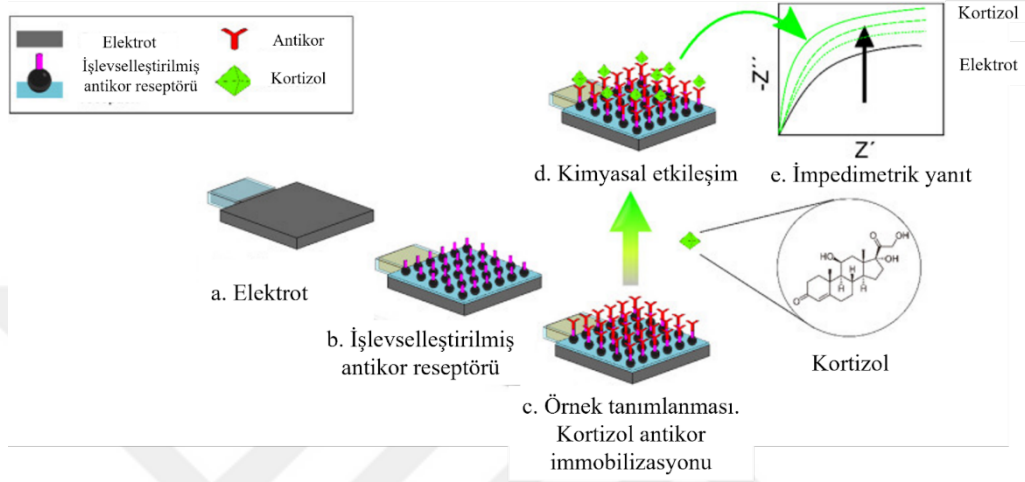
Lateral akış sistemleri ile mikroakışkan tabakalar arasındaki en önemli fark ise mikroakışkanların selüloz tabanlı malzemelerden üretiliyor olması ve sıvının akış yönü tabaka üzerinde belirlenmiş desenlemeler ile belirleniyor olmasıdır [45].



Şekil 2.8: Shima Dalirirad ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı tükürükten kortizol tespiti için oluşturulmuş lateral akış sistemi çalışma görseli. Altın nanopartiküllerinin yüzeyine bağlanmış kortizol probu ile tükürükte bulunan kortizol bağlanıp renk değişimi oluşturmaktadır. Oluşturdukları sistemin 0,5-15 ng/ml kortizol hormonunun tespitini sağlayabileceğini belirtmişlerdir [46].

Kortizol hormonu son zamanlarda sinyal üretimine bağlı yollar (elektrokimyasal ve optik yöntemler) ile de tespit edilebilmektedir. Elektrokimyasal sensörler ile hormon analiz yöntemlerin çalışma prensibinin temelinde ilişkili elektriksel sinyallerin üretilmesi bulunmaktadır. Temelde bir dönüştürücü eleman bulunmaktadır burada hormon tanıma

kompleksi yer alır numunedeki hedef molekül tanıma kompleksi ile etkileşime geçtiğinde sistem içerisinde yer alan elektrokimyasal dönüştürücü, analit değişimi ve konsantrasyonunu ilişkili hale getiren elektrik sinyali oluşturur (Şekil 2.9). Bu alandaki çalışmalarda tanımlayıcı eleman olarak sıklıkla antikorlar kullanılmaktadır [47].



Şekil 2.9: Antikor ile işlevselleştirilmiş elektrokimyasal sistem örneği [47].

Elektrokimyasal sensörler taşınabilir diğer cihazlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek doğrulukta ve daha düşük aralıklarda ölçüm sağlar. Elektrokimyasal ölçüm cihazları günümüzde glukometre, pH ölçer, ürik asit ölçer gibi cihazlar ile çeşitlendirilmiştir bu cihazların düşük enerji ile çalışması en büyük avantajlarından biridir.

2.1.3.4. Kortizol Hormonunun Kolorimetrik Tespiti

Kortizol hormonunun tespitinde çeşitli kolorimetrik yöntemler mevcuttur (Tablo 2.3) İlk kolorimetrik reaksiyon çalışmaları arasında konsantre sülfürik asit testleridir. Sülfürik asit çeşitli steroidler ile tepkime verse bile her steroid-asit karışımın absorbans değerleri birbirinden farklı olduğundan ayırt edilebilir yapıdadır. Günümüzde çeşitli nanopartiküller ile sülfürik asit bileşenleri kortizol hormonu tespitinde kullanılması literatürde yer bulmuştur.

Kortikosteroidlere özgü kolorimetrik testler 1950'li yıllarda bildirilmiştir. Bildirilerden en çok dikkat çeken reaktif Porter-Silber reaktifidir. Burada seyreltik sülfürik asit, metanol ve fenilhidrazin içeren solüsyon içerisine kortizol eklenmesi ile soluk sarı renk açığa çıkmaktadır. Ancak reaksiyon yaklaşık 90 dakika sürmektedir [48]

Bu yöntemde kortizol içeren numuneler kuvars küvetler içerisinde direkt olarak sülfirik asit üzerine eklenir ve karıştırılır. Karıştırmadan 5 dakika sonra ölçümleme gerçekleştirilir.

Altın nanopartiküller aracılığı ile Porter- Silber reaktif yönteminde ise hazırlanan reaktif altın nanopartiküller ile birleştirildikten sonra kortizol numuneleri eklenerek 15 dakikada bir ölçüm alınır.

Singh ve Verma, hızlı ve duyarlı Prusya mavisi testini bildirmiştir. Bu testte kortizol hormonu indirgeyerek analiz sağlanmaktadır [49].

Prusya mavisi elde etmek için 20 ml etanol içerisine 10 mg demir (III) klorür eklenir. Potasyum hekzasiyanoferrat(III) çözeltisi 20 ml etanol içerisinde 13.5 mg potasyum hekzasiyanoferrat(III) çözündürülür. Kortizol standartları kortikosteroidi oksitlemek için öncelikle sülfirik asit ve demir (III) solüsyonları ile karıştırılır ve üzerine 0,5 mL potasyum hekzasiyanoferrat(III) çözeltisi eklenir. Hazırlanan çözelti renk değişimi meydana gelebilmesi için 70 °C'de inkübe edilir. Ölçümler 10 dakikada bir alınır. Devam çalışmalarında mavi tetrazolyum reaktifi ile 10 dakikalık reaksiyon süresi içerisinde kortizol hormonu tespiti sağlanmıştır [50].

Mavi tetrazolyum yönteminde 5ml %5 h/h tetrametilamonyum hidroksit çözeltisi 45 ml metanol içerisinde seyreltilir. Çözelti içerisinde kortizol standartları eklenir. Kortizol hormonu varlığında macenta rengi gözlemlenir (Şekil 2.10) ve 10 dakika aralıkla ölçümler alınır. LOD değeri 97 ng/mL- 146ng/mL aralığındadır [51].



Şekil 2.10: Kolorimetrik kortizol hormonu tespiti için farklı yöntemlerden alınan renklerin gösterimi. (a) Sülfürik asit yöntemi (b) Altın nanopartiküle bağlı Silber-Porter yöntemi (c) Prusya mavisi yöntemi (d) Mavi tetrazolyum yöntemi [51].

Tablo 2.3: Kortizol kolorimetrik reaksiyonlarının değerlendirilmesi [51].

Kolorimetrik Yöntem	Saf konsantre sülfürik asit yöntemi	Altın nanopartiküle bağlı Porter-Silber yöntemi	Potasyum hekzasiyanoferrat(III) ve demir(III) yöntemi	Mavi tetrazolyum yöntemi
Absorbsiyon (nm)	290-394-480	410	300 - 669	510
Analitik LOD(uL/mL)	3.00	0.145	0.731	0.097
DeneySEL LOD (uL/mL)	1.03	0.401	0.320	0.214
Dinamik Aralık	0-100	0-70	belirsiz	0-1.5
Renk Geliştirme Süresi(dk)	1	60	45	5-10
Renk Değişimi	şeffaftan sarıya	şeffaftan sarıya	soluk sarıdan mavi-yeşile	soluk sarıdan macentaya
Renk Stabilitesi	Dengesiz	24 saate kadar kararlı	En az 1 hafta stabil	En az 1 hafta stabil

Tez kapsamında kullanılan kolorimetrik yöntem olarak mavi tetrazolyum yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem diğer kolorimetrik tespit yöntemlerine göre daha hızlı ve daha stabildir. Ayrıca meydana gelen renk değişimi mikrodenetleyiciler ile tespit edilebilir değişimler göstermektedir.

2.2. MİKROAKIŞKANLAR

Mikroakışkan cihazlar nispeten yeni ortaya çıkmış ve on yıllarda kullanımı artmış bir analiz alanıdır. Mikroakışkanların çalışma mantığı akışkanlar dinamiği, malzeme bilimi, fizik, kimya, biyoloji birçok temel bilimin bileşik ilkelerine dayalıdır. Mikroakışkanların en büyük avantajı istenilen şekil ve geometriye göre tasarlanabilir olmalarıdır.

Mikroakışkanların ilk örnekleri sıvıları belirli kanallar üzerinde hedef bölgelere iletimi ile 1980’li yıllarda çalışılmaya ve patentlenmeye başlanmıştır [52].

Zaman içerisinde bu cihazlar farklı bilimlere uygulanarak kullanılmaya başlanmış ve farklı sistemlere entegre edilmiştir.

Mikroakışkanlar, çok fazla numune gerektirmemeleri, isteğe göre işlevselleştirilebilir alanlar içermeleri, taşıma zorluğu olmaması ve saha kullanılabilirliğe uygunluğu, düşük maliyetleri ve tek kullanımlık olmaları nedeniyle özellikle biyomedikal alanlarda sıklıkla tercih edilmektedir.

Mikroakışkanlar, selüloz ve türevlerinden, cam, silikon, metal, seramikler gibi çeşitli malzemeler ile üretilmektedir.

Silikon mikroakışkanlar, kimyasal dayanımı, ısıya bağlı değişim göstermemesi sebepleri ile sıklıkla kullanılan malzemeler arasındadır. Silikon mikroakışkanların üretiminde yüzey modifikasyonları gibi çeşitli modifikasyonların yapılabilmesi en büyük avantajları arasında olmasına rağmen aynı özelliği optik çalışmalarda opaklığı nedeni ile bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır. Tabaka üzerinde gerçekleştirilen testin yerinde analizi gerektiğinde optik algılama uyumsuzluğu göstermektedir. Ekstra olarak oluşturulmak istenilen kanallara isteğe bağlı olarak entegre edilebilecek valfler ve pompaların eklenmesi silikon malzemenin elastikiyeti ve kırılabilirliği sebebi ile kırılğan bir özellik gösterir. Ayrıca kağıt gibi diğer malzemelere göre nispeten daha maliyetlidir.

Metal malzemeler, mikroçip üretiminde oldukça avantajlıdır. Asit, ısı, basınç dayanıklılığı kullanım için kolaylık sağlamaktadır. Mikroakışkan cihazlarda en çok tercih edilen metaller alüminyum, bakır ve demirdir.

Cam malzemeler, ısıya dayanıklı, yalıtkan, sert, biyolojik olarak uyumludur ve yüzey işlevselleştirilmesi kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Ayrıca cam malzemeler optik uyumluluk

sergileyerek yerinde görüntüleme gerekliliğinde kullanılabilir malzemeler olarak göze çarpmaktadır.

Polimer malzemelerden en çok tercih edilen malzeme Poli dimetil siloksan (PDMS)'dir. PDMS düşük maliyetli, rahatlıkla desenlenebilir, optik uygunluk gösteren, hidrofobik ve biyolojik uygunluk gösteren bir malzemedir. Ancak PDMS gözenekli bir yapıya sahip olduğundan adsorptif bir malzemedir ve çeşitli çözücüler kullanıldığında (kloroform, hekzan, toluen) şişme meydana gelebilir.

Mikroakışkan üretiminde epoksi reçineler ve hidrojel de kullanılabilir. Ancak bu malzemeler yüksek maliyetlidir. Bu nedenle özellikle 2007'den itibaren kağıt tabanlı mikroakışkanların kullanımı araştırılmakta ve çalışılmaktadır.

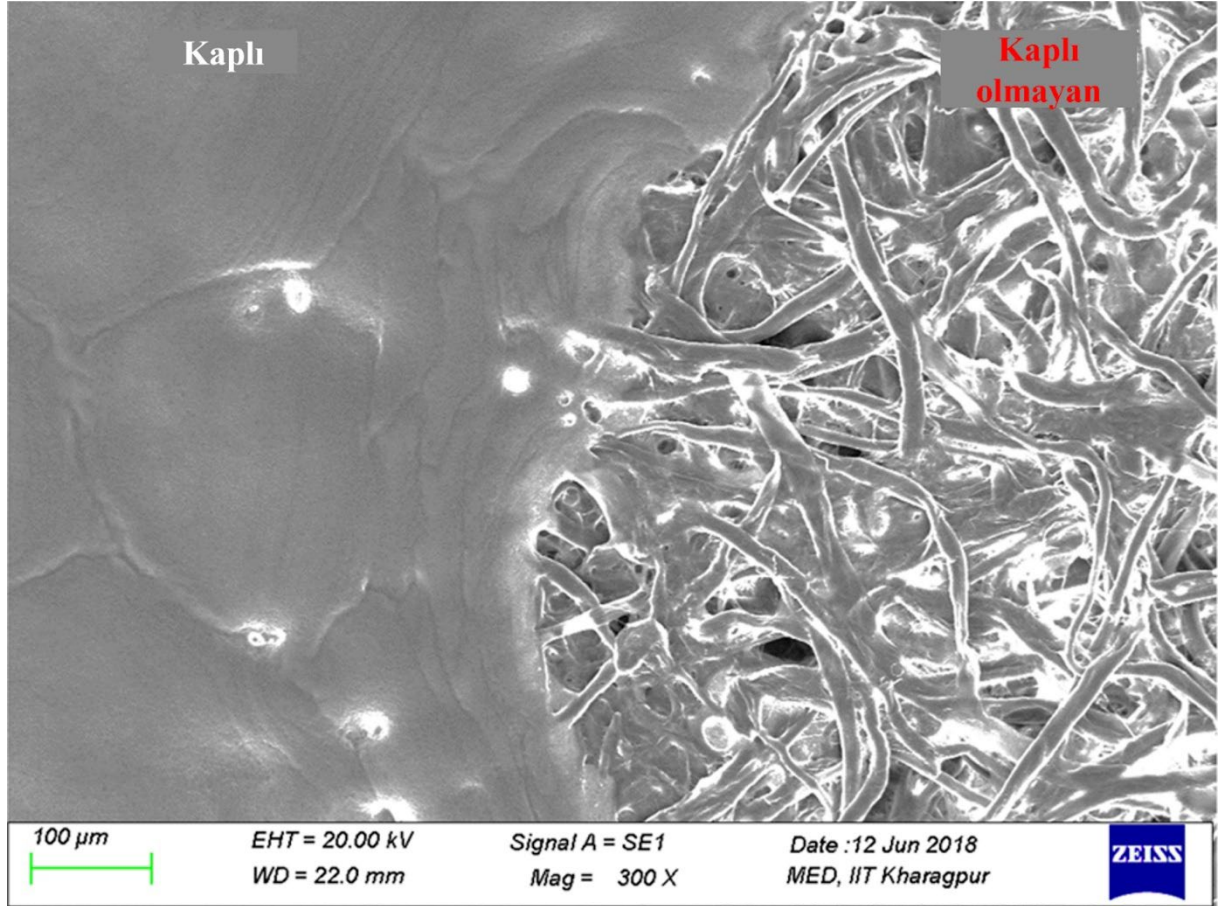
Kağıt tabanlı mikroakışkanlar, düşük maliyetli, hafif, kolay erişilebilir, gözenekli yapıda, yüksek oranda absorpsiyon, kolay sterile edilebilir yapıdadır. Kağıt malzemeler kolaylıkla manipüle edilebilir ve yüzeyleri kolaylıkla işlevselleştirilebilir. Özellikle selüloz ve türevli mikroakışkan cihazlarda, sıvı aktarımları harici pompalara ihtiyaç duyulmadan kılcallık yolu ile sağlanmaktadır. Kılcallık özelliği, numunenin aktarılacak istenildiği bölgeye doğru oluşturulmuş hidrofobik bölgeler oluşturularak desenlenmiş kanallar aracılığı ile kontrol edilmektedir. Kağıt tabanlı mikroakışkan sistemlerin avantajları nedeniyle hızlı tanı testleri ve tıbbi tarama testleri için ilgi çekici konumdadır [53].

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlarda filtre kağıtları, kromatografi kağıdı, nitroselüloz lif ağları kullanılabilir. Oluşturulmuş tabakalardaki sıvı akışı sıvının yüzey gerilimi ve kullanılan malzemenin yüzey özellikleri ve gözenekli yapısının özelliklerine bağlıdır. Kullanılan malzeme üzerinde hidrofobik alanların desenlenmesi kullanılacak sıvının akış yolunun ve hızının belirlenmesi için temel adımdır. Bu aşamada çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En basit yöntemlerden biri parafin ile kaplamadır. Parafin, uygun maliyetli ve kolay erişilebilir bir malzemedir ve erimiş parafin kağıt üzerinde hidrofobik kısımların oluşturulmasında kullanılabilir.

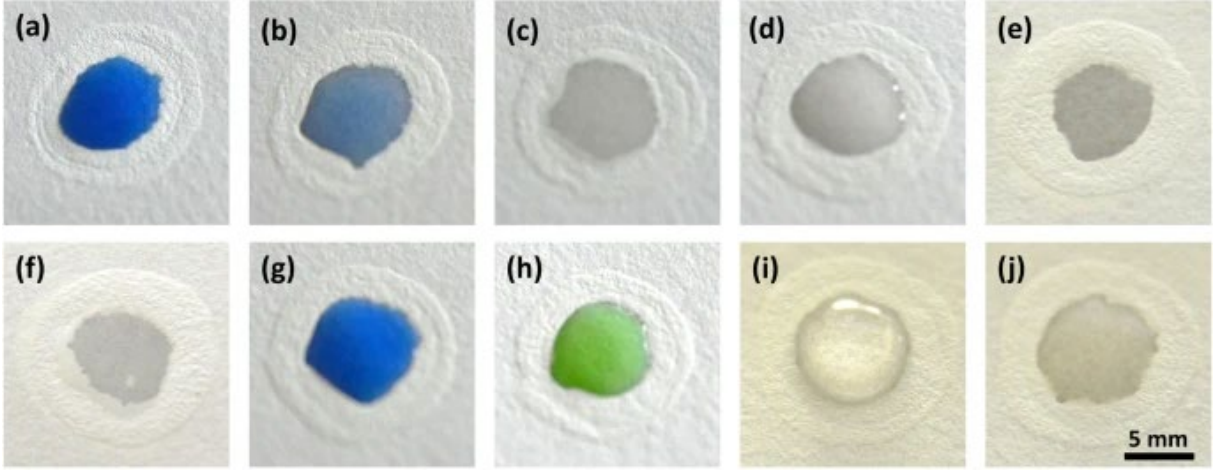
Bu işlem, yazıcı kullanılarak kağıt üzerine parafin basılması ve 100 °C'ye ısıtılması yolu ile ya da direkt olarak kağıdın eritilmiş parafine batırılması ile gerçekleştirilebilir. Ancak parafin kullanımındaki temel sınırlama, oluşan parafin katmanının tabaka esnetme, bükme durumlarında kırılabilir olmasıdır.

Parafin ya da balmumunun bir diğer kullanımı kağıt üzerinde biriktirilmesi ve sıcak laminasyon ile eritilerek kağıt içerisine emdirilmesi yöntemidir.

Mikroakışkan tabaka olarak seçilmiş selüloz tabanlı malzemenin kanal desenlenmesi için Titanyum Dioksit (TiO_2) kullanımı bildirilmiştir. TiO_2 kağıt üzerindeki porları kapatmak üzere hidrofofik ajanlar olarak kullanılabilir. 2019 yılında Naresh Kumar Mani ve ekibinin yaptığı çalışmada TiO_2 sıvı mürekkep olarak formüle edilmiş (Şekil 2.11) ve bir düzeltme kalemi ile doğrudan el yazısı şeklinde kullanılabilen bir kanal mimarisi oluşturmuşlardır (Şekil 2.12) [54].



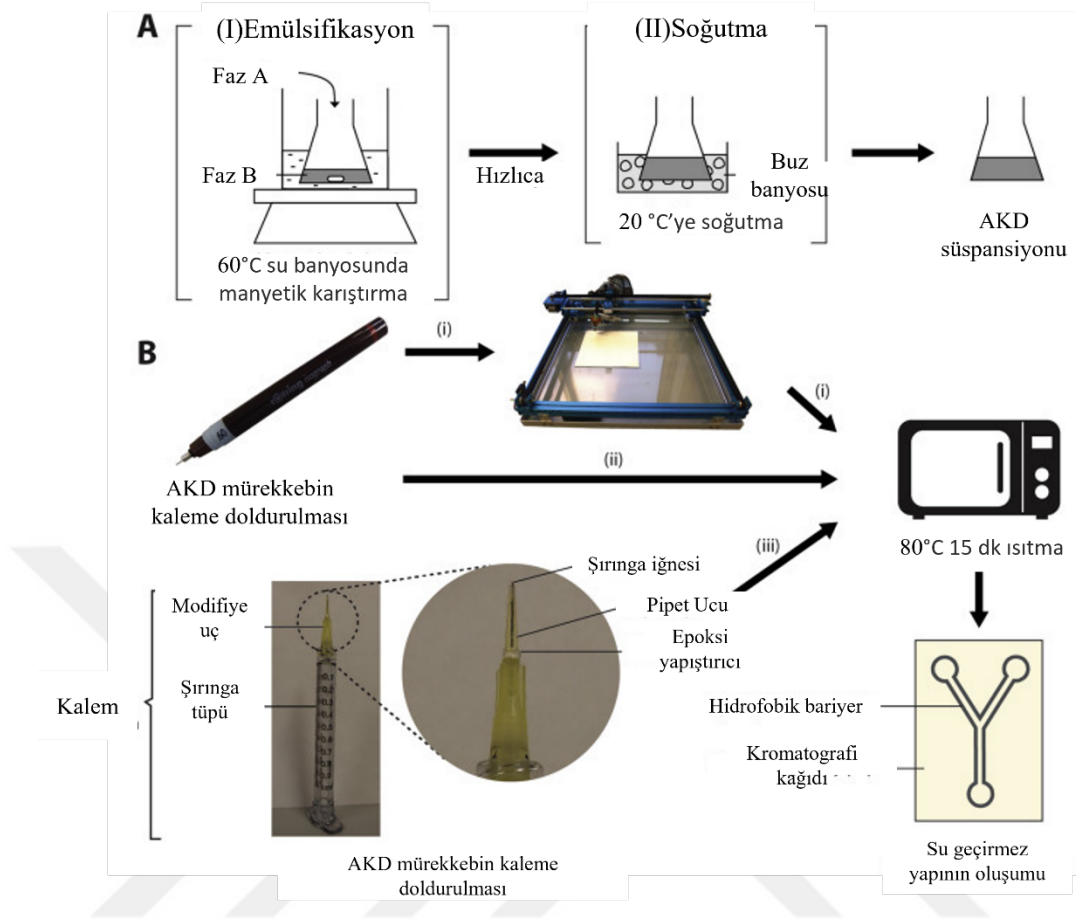
Şekil 2.11: Whatman filtre kağıdı üzerinde TiO_2 kaplanmış ve kaplanmamış bölgelerin gösterimi [54].



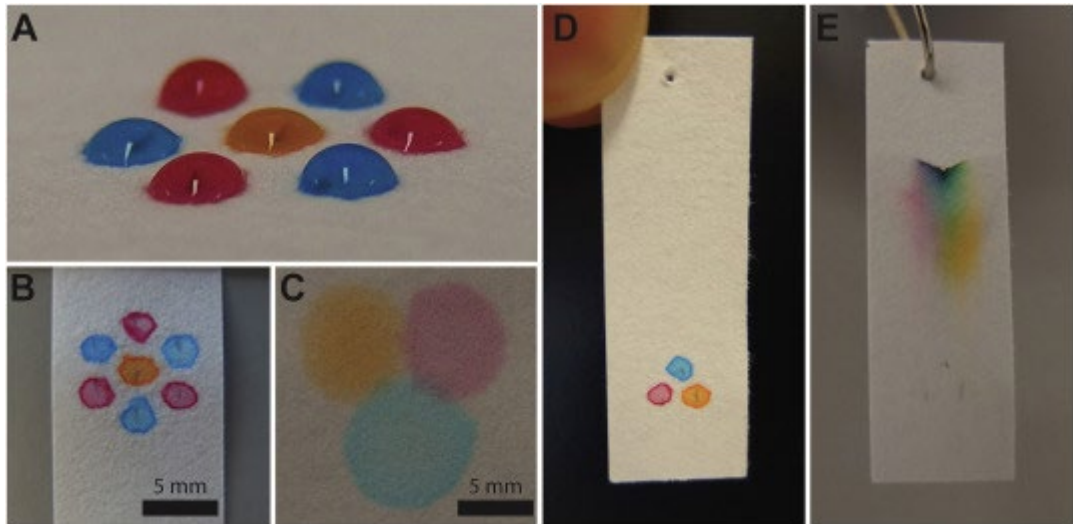
Şekil 2.12: TiO₂ kalem ile oluşturulmuş bölgelerin bariyer oluşturma durumları. Her bölgede 30 uL'lik (a) Mürekkep ile renklendirilmiş su, (b) Mürekkep ile renklendirilmiş DMSO, (c) Aseton, (d) %40 Etanol, (e) DMF, (f) Asetonitril, (g) Mürekkep ile renklendirilmiş PBS, (h) Mürekkep ile renklendirilmiş 1N HCL, (i) Gliserol, (j) Tween 20 [54].

Mikroakışkan desenleme çalışmalarından bir diğeri 2018 yılında Nurul Nadiah Hamidon ve ekibinin bildirdiği alkil keten dimer (AKD) uygulamasıdır. TiO₂ kalemine benzer bir şekilde, kloroform içinde çözülmüş AKD'nin su içinde emülsiyon hale getirilerek mürekkep yapısı kazandırılarak kalem içerisinden seçili kağıt tabanlı tabaka üzerine uygulanması yoludur.

Bu yöntemde Şekil 2.13'te gösterildiği gibi AKD ve kloroform içeren çözelti 60°C 'lik su banyosunda manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu aşamada çözelti içerisindeki kloroform kısmi olarak uzaklaştırılmıştır. Devamında çözelti hızlı bir şekilde buz banyosuna alınarak 20°C 'ye düşürülmüştür. Sonuç olarak sulu AKD süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen süspansiyon farklı kalemlerle kağıda uygulandıktan sonra fırın içerisinde 80°C 'de 15 dakika ısıtılmıştır (Şekil 2.14) [55].

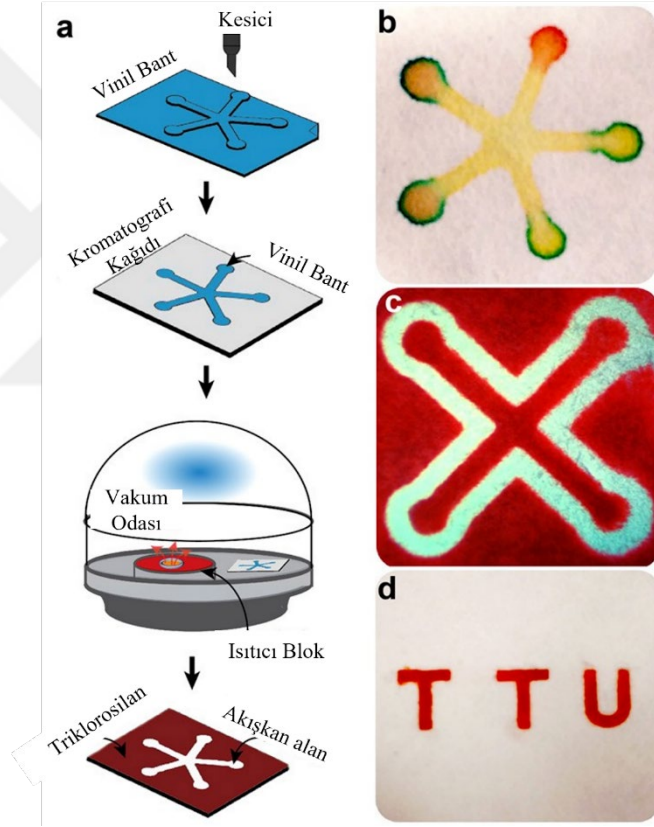


Şekil 2.13: AKD mürekkebin üretim ve uygulama süreci şeması [55].



Şekil 2.14: AKD ile desenlenmiş kağıtlar üzerinde denemelerin gösterimi. (A) Gıda boyası ile renklendirilmiş sulu çözeltiler, (B-D) AKD ile sınırlandırılmış alanlar içerisine uygulanmış sulu çözeltiler, (C-E) Sınırlandırılmamış alanlar içerisine uygulanmış sulu çözeltiler [55].

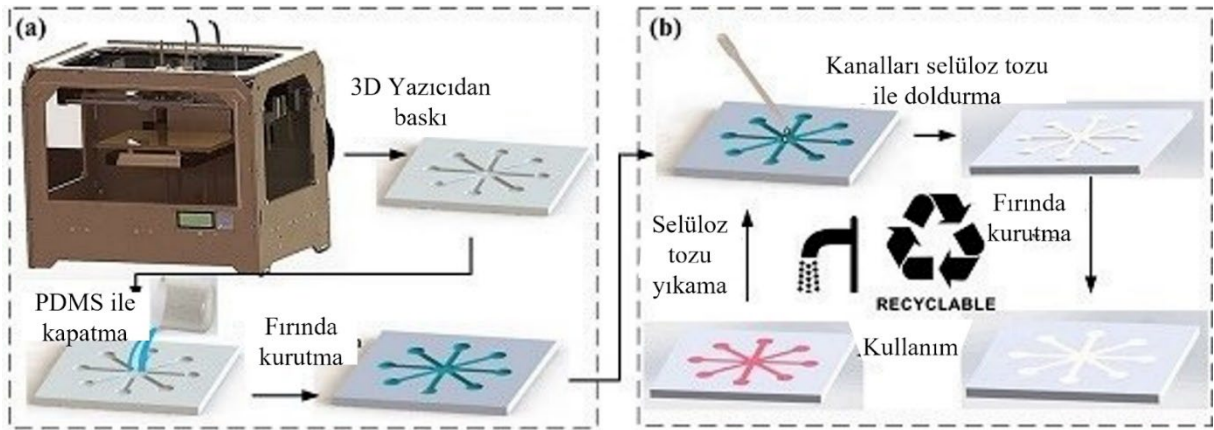
2017 yılında Trinh Lam ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada kromatografi kağıdı üzerinde 25°C’de buharlaşan triklorosilan (TCS) uygulanması ile mikroakışkan tabaka desenlemesi bildirilmiştir. Çalışma kapsamında Şekil 2.15’te gösterildiği gibi kimyasal buhar biriktirme yöntemi geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu teknikte vakum odası içerisinde buharlaştırılmış TSC moleküllerin kromatografi kağıdı üzerine birikimi işlemi gerçekleştirilmiştir. Vinil bant tabaka üzerine işlenmek istenilen desen şekilde kesilmiş ve kalıp oluşturulmuştur ve kalıp kromatografi kağıdı üzerine yerleştirilmiştir. Kağıt 53 °C’lik ısı bloğunun üzerine yerleştirilmiş 100 uL TCS solüsyonunun içinde bulunduğu vakum odasına yerleştirilmiştir. Vakumlama işleminden istenilen desende hidrofobik kanallar oluşturulmuştur [56].



Şekil 2.15: (a)Triklorosilan ile mikroakışkan tabaka desenlemesi çalışma şeması, (b-c-d) örnekler [56].

Mikroakışkan tabakaların hidrofilik desenlemesinde kullanılan bir diğer yöntem ise kabartma yöntemidir. Bu yöntem yukarıda bahsedilen diğer yöntemlere nispeten daha yeni bir yöntemdir. Burada sistem kullanılacak kağıt tabakanın yüksek basınç ile belirli bir desende sıkıştırılmasını kapsar. Bu kanalların çevrelerindeki alanı eritilmiş parafin gibi malzemeler ile hidrofobik bariyerler oluşturmak gerekmektedir [57].

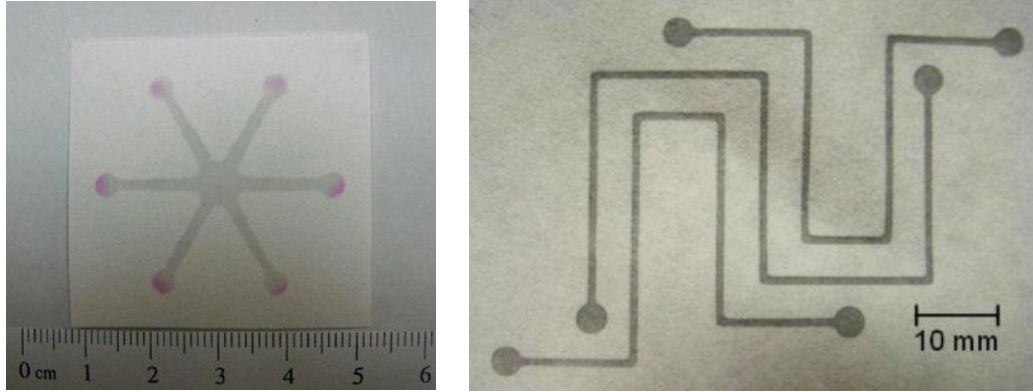
2016 yılında Yong He ve ekibinin çalışması ile tekrar kullanılabilir mikroakışkan tabaka oluşturulmuştur. Bu çalışmada 3D yazıcıdan yazdırılan desen modeli öncelikle PDMS ile ince bir katman halinde doldurulmuştur. PDMS fırında kurutulduktan sonra PDMS üzerine selüloz tozu uygulanmış ve baskılanmıştır. Uygulama sonrasında model tekrar fırında kurutulmuştur. Mikroakışkan olarak işlevselleştirilip kullandıktan sonra su altında yıkama ile model üzerindeki selüloz tozu tabakası uzaklaştırılabilir ve tekrar kullanılabilir hale dönmektedir (Şekil 2.16) [58].



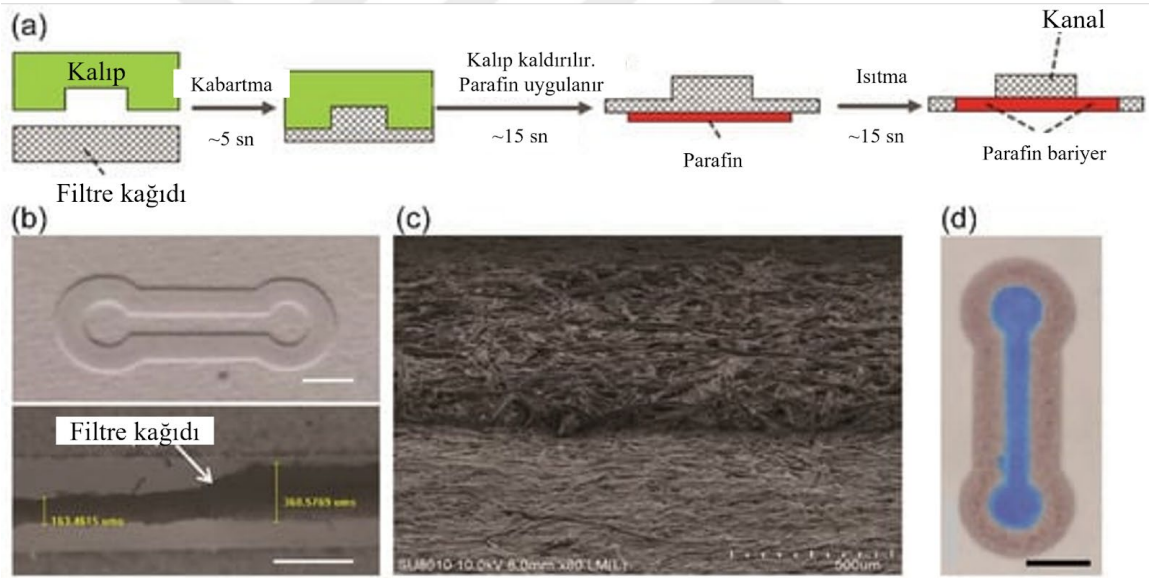
Şekil 2.16: Tekrar kullanılabilir mikroakışkan üretim şeması [58].

2019 yılında Xu Li ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada baskı ile mikroakışkan sensör imalatı bildirilmiştir. Bu çalışmada dijital mürekkep püskürtmeli baskı tekniği kullanılmıştır. Baskı için kullanılacak mürekkepler analiz edilmek istenilen özelliğe sahip bir şekilde işlevselleştirilebilir direkt olarak kağıt üzerine baskı yöntemi ile aktarılabilir.

Çalışmada alkenil keten dimer- heptan çözeltisi hidrofobikleştirici ajan olarak kullanılmıştır. Yeniden yapılandırılmış ticari bir yazıcının mürekkep bölgesine eklenen solüsyon Whatman 4 numaralı filtre kağıdı üzerine basılmıştır. Baskı sonrası filtre kağıtları fırında 100°C' de 8 saat inkübe edilmiştir. Devamında algılama reaktifleri ile oluşturulmuş solüsyonlar mürekkep olarak kullanılarak analiz bölgesi de baskı yöntemi ile oluşturulmuştur (Şekil 2.17, Şekil 2.18) [59].

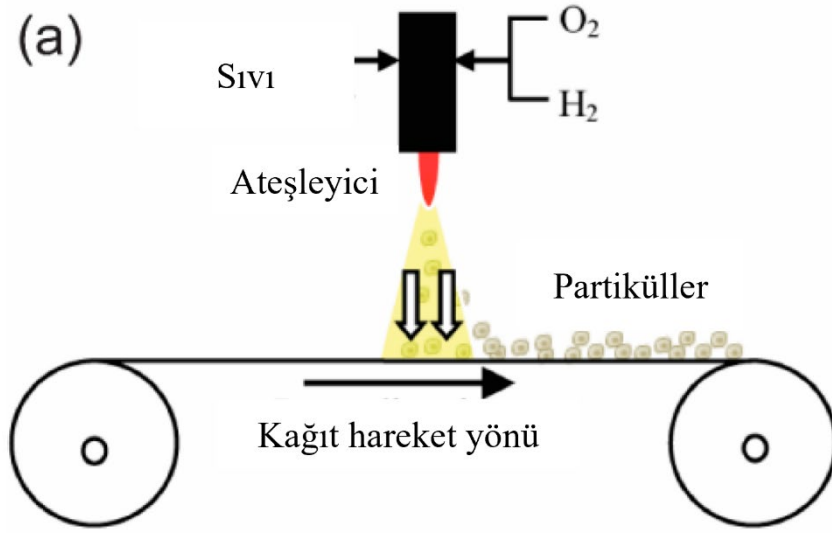


Şekil 2.17: Baskı tekniği ile oluşturulmuş mikroakışkan tabaka gösterimi. Analiz bölgeleri NaOH algılama için fenolftalein-etanol çözeltisi kullanılarak baskılama tekniği ile oluşturulmuştur [59].



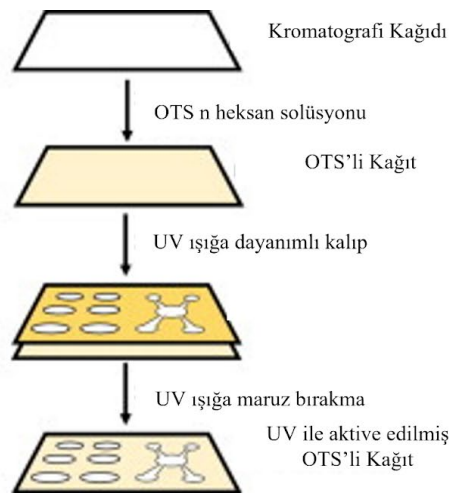
Şekil 2.18: (a) Mikroakışkan tabaka desenlemesinde kabartma tekniğinin şeması, (b) Kağıdın üst ve alttan görünüşü, (c) Parafin uygulanmadan önce kabartma kağıdın bariyer sınırının SEM görüntüsü, (d) Parafin uygulamasından sonra mavi mürekkep ile renklendirilmiş mikroakışkan tabaka [60].

Konu ile ilgili bir diğer yöntem ise ışın kullanımıdır. Lazer ışını kullanımında işlenmemiş kağıt tabaka ısı ve/veya lazer ışını ile aktive olabilecek TiO_2 , fotopolimer gibi maddeler ile kaplanmalıdır. Kaplama işleminden sonra tabaka lazer ışınına maruz bırakılır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19: Lazer ışık kullanım yöntemi şeması [61].

Işın teknolojisinin kullanım çalışmalarına 2015 yılında Hitoshi Asano ve Yukihide Shiraishi tarafından yayınlanmış makaleleri örnek verilebilir. Bu çalışmada Şekil 2.20’de gösterildiği gibi mikroakışkan cihazlar fotolitografi ile hazırlanmıştır. Öncelikle 3D yazıcıdan kalıplar basılmıştır. Kromatografi kağıdı kalıba uygun şekilde kesilmiştir ve oktadesiltri-klorosilan n-heksan çözeltisine batırılmış 5 dk beklenmiş ve nitrojen gazı ile kurutulmuştur. Hidrofobikleştirme için kağıt 253 nm UV ışığa maruz bırakılmıştır [62].



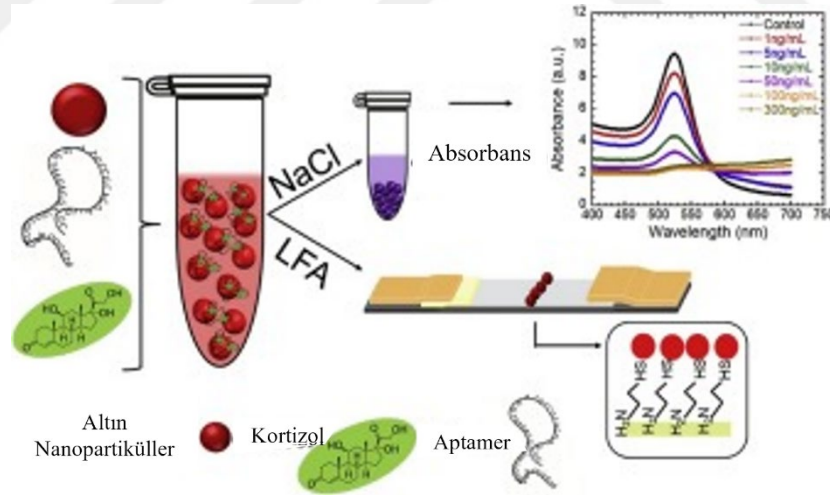
Şekil 2.20: Fotolitografi ile mikroakışkan hazırlama şeması [62].

2.2.1. Kortizol Hormonunun Mikroakışkanlar ile Tespit ve Analiz Çalışmaları

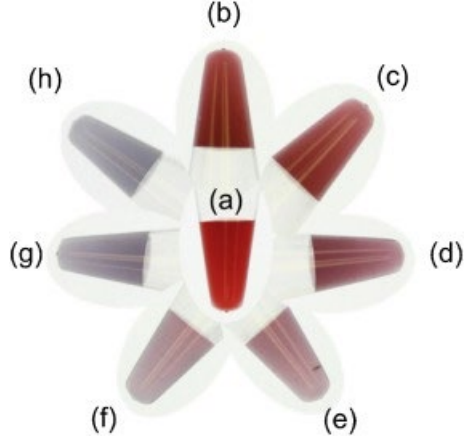
Faresjö T ve ekibi saç örneklerinden kortizol analizi gerçekleştirmiş ve değerlendirmiştir. Çalışmada saç örnekleri izopropanol ile yıkanmış, kurutulmuş ve saçın uygun bölümleri kesilmiştir. Kesilen örnekler cerrahi makas yardımı ile kesilip 2 dakika boyunca nitrojen içerisinde dondurulmuştur devamında toz haline getirildikten sonra steroid ekstraksiyonu için metanol içerisinde 1 gece inkübe edilip liyofilize edildikten sonra Radyo-immunoassay (RIA) testi gerçekleştirilmiştir. Saç örnekleri tekrarlı olarak kütle spektrometresinde analiz edilmiştir (LC-MS/MS). Bu iki yöntem arasında yüksek bir uygunluk bildirilmiştir [63].

Yamada J ve ekibi ELISA testi ile, yenidoğan bebeklerde altında kortizol analizi gerçekleştirmiştir. Yenidoğan sağlıklı bebekler ile hastanede yatan yenidoğan bebekler arasında anlamlı bir kortizol hormonu farklı tespit edilmiştir. Bebeklerin ventilasyonda geçirdiği gün sayısı arttıkça saç kortizol seviyeler 0,2 nmol/g arttığını bildirmişlerdir [64].

2019 yılında Shima Dalirirad ve Andrew J. Steckl'nin çalışmasında insan terinde kortizol hormonu tespiti için aptamer bazlı lateral akış testi geliştirilmiştir (Şekil 2.21, Şekil 2.22) [65].



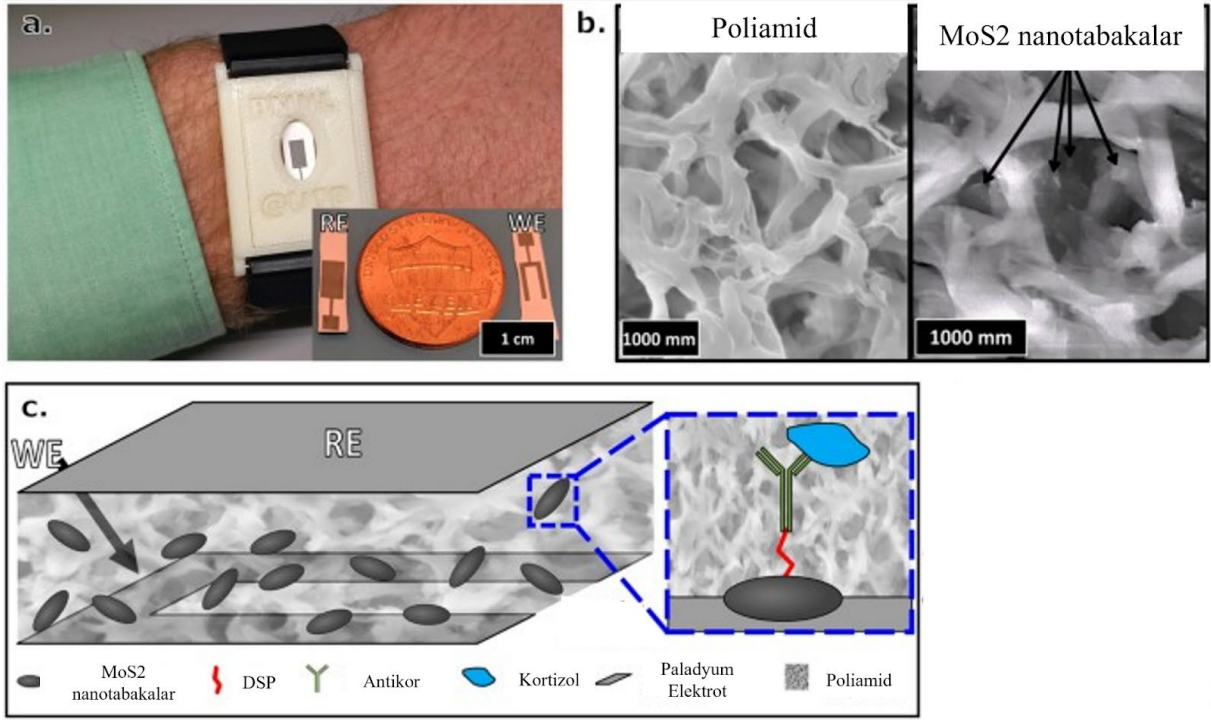
Şekil 2.21: Hazırlanmış olan altın nanopartiküllerin çalışma prensibinde, aptamerlere bağlanmış sitratlı negatif yüklü altın nanopartiküller, kortizol hormonu varlığında konformasyonel değişiklik ile aptamer ile altın nanopartikülün ayrılmasını sağlar. Eklenen NaCl çözeltisi ile altın nanopartiküllerin yükleri azalır ve agregasyon oluşturur. Bu durum, örneklerin kırmızı renkten gri/mavi renge dönüşmesine neden olmaktadır [65].



Şekil 2.22: Yapay ter ile altın nanopartiküller üzerinde yapılmış renk değişim testi için görsel. (a) NaCl solüsyonu eklenmeden önce altın nanopartiküller, altın nanopartiküller üzerine NaCl eklendikten sonra (b) 0, (c) 1, (d) 5, (e) 10, (f) 50, (g) 100 ng/mL kortizol hormonu varlığında renk değişim modelleri [65].

Burada altın nanopartiküller renk probu görevi görmektedir. Ortaya çıkan renk değişimi ile analiz sağlanır. Oluşan kırmızı rengin yoğunluğu ile kortizol varlığı doğru orantılı şekilde artmaktadır. Hazırlanmış test şeridinin LOD değerinin 5 ng/mL olduğu bildirilmiştir [65].

2017 yılında David Kinnamon ve arkadaşları insan terindeki kortizol hormonunu izlemek üzere taşınabilir biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışmada Şekil 2.23'te görüldüğü gibi kortizol hormon antikorumları ile işlevselleştirilmiş MoS₂ nano tabakaları kullanılmıştır. Bu nano tabakalar gözenekli bir poliamid zarın içerisinde dağıtılmış ve bir platform oluşturulmuştur. Platform üzerine yerleştirilmiş elektrod ile elektrokimyasal okuma gerçekleştirilmiştir [66].

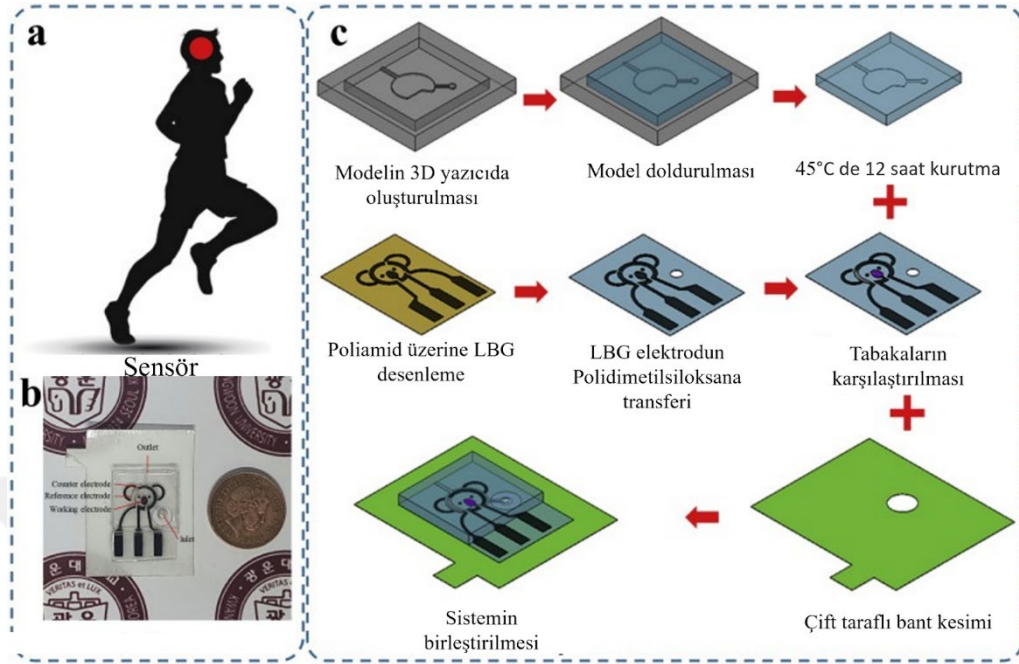


Şekil 2.23: (a) Hazırlanmış cihaz prototipi. (b) Poliamid membran içerisinde MoS₂ nano tabakalar. (c) Kortizol hormonunun algılanmasına yönelik şematik gösterim [66].

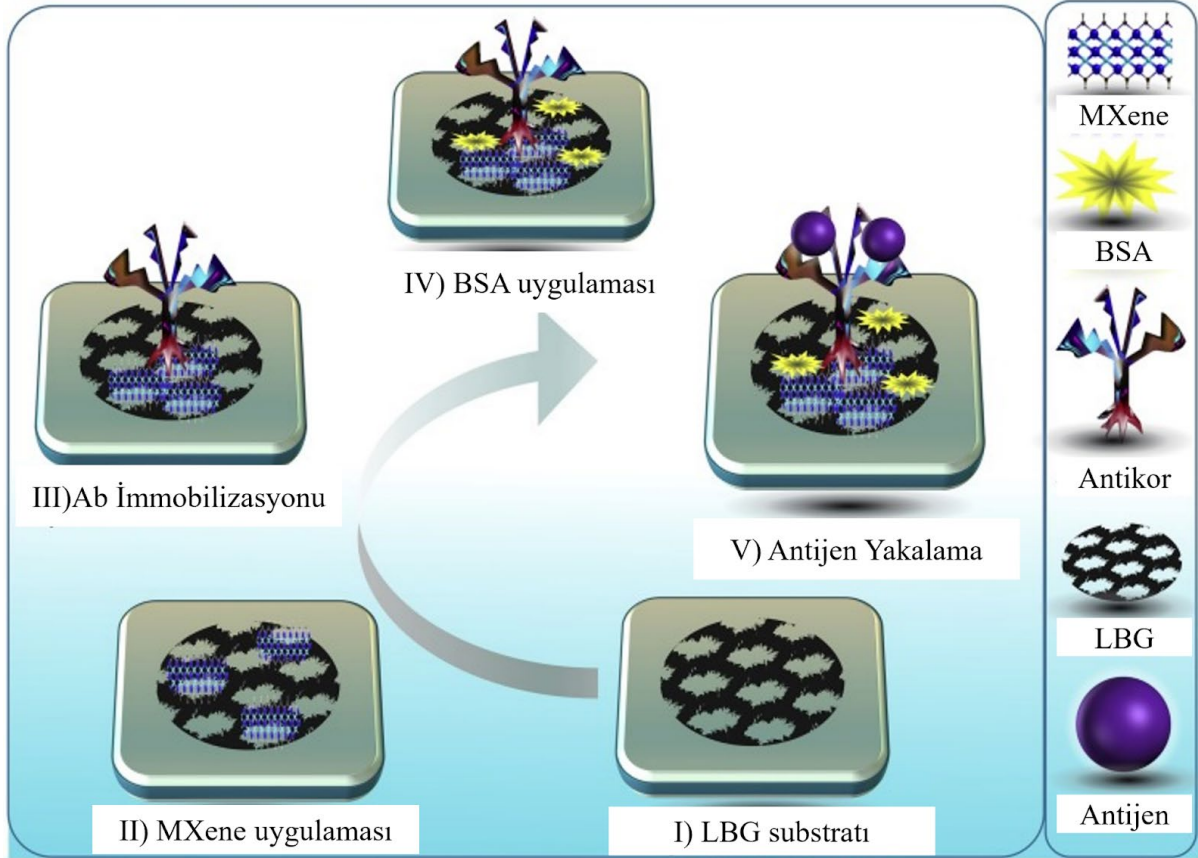
Sistemin LOD değerinin 1 ng/mL olduğu bildirilmiştir.

Ter örneklerinden kortizol ölçümü son yıllarda literatürde kendine giyilebilir cihazlar, akışkan tabakalar ve elektrokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi yöntemleri ile sıklıkla çalışılmıştır.

2021 yılında Joong San Nah ve ekibi tarafından gerçekleştirilen çalışmada grafen esaslı mikroakışkan entegreli immünosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan elektrokimyasal performansı sebebiyle lazerle yakılmış grafen tercih edilmiştir ve elektrot matrisi olarak geliştirilmiştir. Çalışmada ayrıca son dönemlerde popüler hale gelen MXene kullanılmıştır. MXene, iki boyutlu, iletkenliği yüksek geçiş metali karbür/nitrür/karbonitrür olarak tanımlanmıştır. Yapısında -O,-OH,-F gibi fonksiyonlar mevcuttur. Yapılarında bulunan fonksiyonel gruplar MXenelere hidrofilik bir özellik kazandırmıştır. Bu nedenle su içinde dağılabilmektedirler ancak bu özellikleri MXenelerin iletkenlik durumlarında herhangi bir değişikliğe yol açmamaktadır. Bu nedenle “iletken killer” olarak anılırlar. Çalışmada MXene elektrodlar LBG üzerine uygulanmış ve MXene üzerine antikorlar immobilize edilmiştir. Sistem esnek özellik gösteren polidimetilsiloksan (PDMS) ile giyilebilir cihaz olarak tasarlanmıştır (Şekil 2.24, Şekil 2.25) [67].



Şekil 2.24: (a) Vücut sensörü (b) giyilebilir cihaz görüntüsü, (c) mikroakışkan sisteme entegre giyilebilir kortizol sensör üretimi [67].



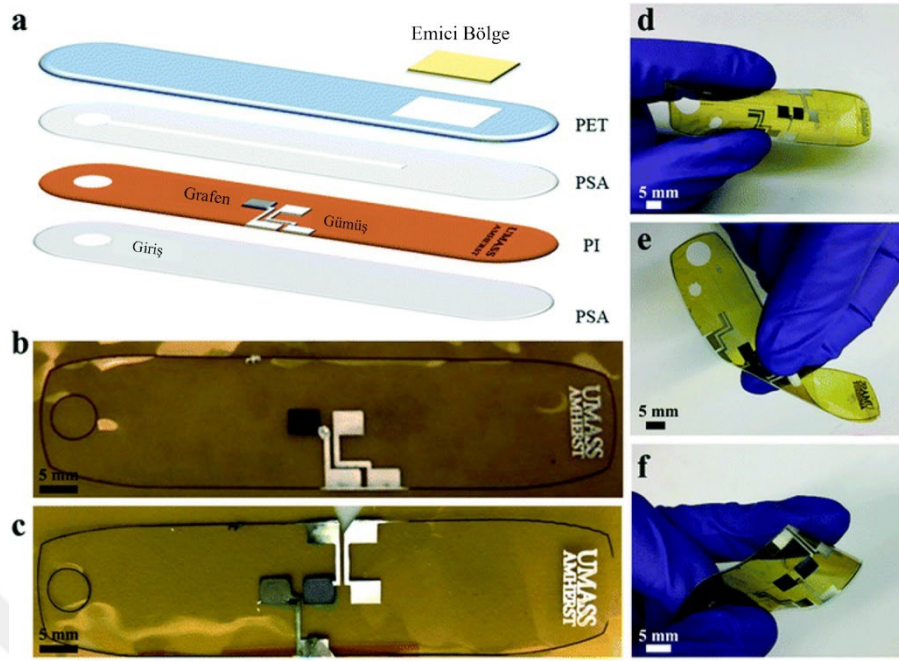
Şekil 2.25: * LBG: Lazerle yakılan grafen Kortizol analiz sistemi şeması [67].

Tablo 2.4’ te gösterildiği gibi hazırlanmış sistemde standart sapma değeri %2,80’ dir.

Tablo 2.4: Gerçek ter örneklerinde kortizol tespiti [67].

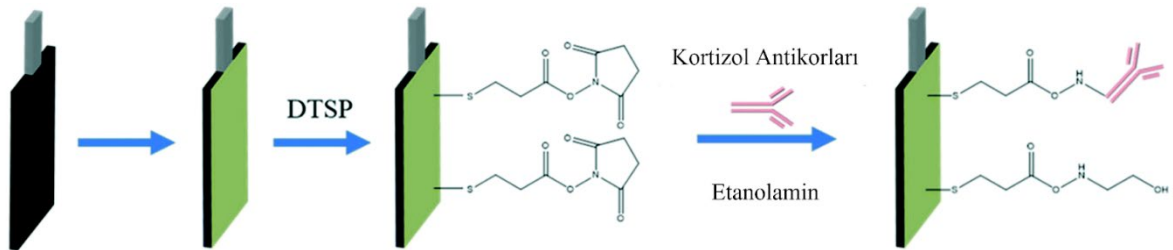
Taze örnekleri	ter	Eklenen kortizol (μM)	Bulunan kortizol (μM)	Geliştirilen yöntemin başarısı (%)	Bağlı standart sapma (RSD) (%)
1		0.05	$0,049 \pm 0,007$	99.1	2.80
2		5	$4,92 \pm 0,005$	98.4	
3		10	$9,46 \pm 0,008$	94.6	
4		25	23.42 ± 0.010	93.68	

Aditi R. Naik ve ekibinin 2022 yılında yaptığı “Kortizol ve glikoz tespiti için baskılı mikroakışkan ter algılama platformu” adlı çalışmada grafen ve gümüş moleküllerinden oluşan cilt uyumlu mikro kanallar ve reaktifler ile muamele edilmiş elektrokimyasal sensörden oluşan bir cihaz tasarımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.26). Oluşturulmuş sistemi 10pM’lik algılama sınırı bulunmaktadır. Ekip poliamid (PI) üzerine grafen ve gümüş molekülleri desenlemiştir. Basınca duyarlı bir yapışkan (PSA) üzerinde kanal oluşturulmuş ve terin kılcallık ile yürümesi sağlanmıştır. Ter örneğinin sürekli kanal içine akımı sağlamak için emici bir bölge SiO_2 esaslı hidrofilik kaplamalı polietilen tereftalat (PET) üzerine yerleştirilmiştir. Kortizol sensörü için Ag/AgCl elektrodu kullanılmıştır. Elektrod üzerine antikorlar immobilize edilmiştir. Burada değişen kimyasal yapının oluşturduğu voltaj değişikliği izlenerek kortizol miktarı belirlenmiştir [68].



Şekil 2.26: Elektrot ve mikroakışkan üretim tasarımı. (a) Mikroakışkan cihaz üretim şeması (b) glukoz sensörü (c) kortizol sensörü (d-e-f) bükülme gösterimi [68].

Kortizol sensörü üretiminde grafen ve Ag/AgCl elektrotlar üzerine antikor bağlı altın nanopartiküller Şekil 2.27'deki gibi sabitlenmiştir. Kortizol antikorları ile altın nanopartikülleri arasındaki bağlantı için Dithiobis (süksinimidil propiyonat/ DTSP) kullanılmıştır. İşlemden sonra altın nanopartiküllerinin üzerine bağlanmamış olan antikorları ayırmak için etanolamin çözeltisi uygulanmış ve inkübe edilmiştir [68].



Şekil 2.27: Sırası ile grafen- Ag/AgCl elektrodu üzerine altın nanopartiküllerin ve antikorların sabitlenmesi ve bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için etanolamin uygulanması [68].

Mikroakışkan sistemler için birden çok kanallama/hidrofobikleştirme yöntemi tanımlanmıştır (Tablo 2.5.).

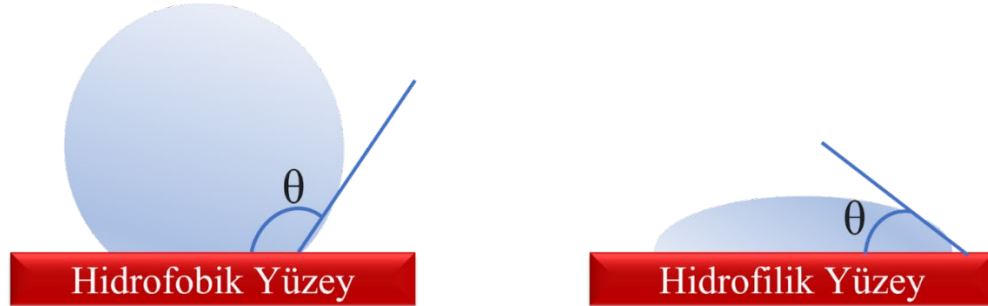
Tablo 2.5: Mikroakışkan kanallama / hidrofobikleştirme için kullanılan yöntemler.

Yöntem	Malzemeler	Avantajlar	Dezavantajları	[Referanslar]
El Yazısı Yöntemi	Titanyum oksit (TiO ₂) Alkil Keten Dimer (AKD)	Hızlı ve düşük maliyetli	Büyük ölçüde yazarların becerisine bağlıdır; seri üretimi zor	[54]
Kimyasal Buhar Biriktirme (CVD)	Triklorosilan (TCS)	Hızlı ve basit süreç	Vakum pompası ve maske gerektirir	[56]
Kabartma	Balmumu; parafin filmi,	3D kanal oluşturabilir; basit ve düşük maliyetli	Yüksek basınç ve kalıplama gerektirir	[57]
Kalıplama	Selüloz tozu	Hidrofobik ajan gerekmez	Kalıplama gerektirir	[58]
Mürekkep Püskürtmeli Baskı	Alkil keten dimer (AKD); ticari kalıcı keçeli kalem mürekkebi	Özelleştirilebilir tasarım; programlanabilir baskı	Düşük viskoziteli mürekkep gerektirir; meme tıkanması	[59]
Lazer Uygulama	Oktadesiltriklorosilan (OTS); TiO ₂ ; _ fotopolimer	Kağıt kanalının yüzey enerjisini kontrol edebilir	Kağıt üzerinde geniş bir hidrofobik kaplama alanı gerektirir	[57]
Sıcak Laminasyon	Parafin filmi	Basit ve düşük maliyetli	Bir kesici ve sıcak laminasyon cihazı gerektirir	[69]
Balmumu Baskı	Balmumu	Hızlı ve düşük maliyetli; maske gerekmez; programlanabilir baskı; seri üretim	Yüksek sıcaklıkta kurlenme gerektirir	[70]
Serigrafi	Polidimetilsiloksan (PDMS); polimetilmetakrilat (PMMA)	Hızlı ve düşük maliyetli; yüksek viskoziteli mürekkeple yazdırabilir	Yüksek sıcaklıkta kurlenme ve ekran maskesi gerektirir	[71]
Fotolitografi	oktadesiltriklorosilan (OTS)	Yüksek çözünürlük; seri üretim	Temiz oda tesisleri gerektirir	[62]
Çizim	PDMS; ticari kalıcı keçeli kalem mürekkebi	Basit operasyon; düşük maliyetli	Özelleştirilmiş bir dağıtıcı gerektirir	[72]

2.3. SU TEMAS AÇISI KARŞILAŞTIRMA

Su temas açısı tekniği, yüzeyin hidrofobikliğini veya hidrofilikliğini belirlemek için kullanılır. Su damlacıklarının hidrofilik yüzeylere yayılma eğilimi bulunur ancak hidrofobik yüzeylerde damlacıklar yayılmak ve emilmek yerine küresel şekil alma eğilimi gösterir. Suyu ıslanan bir yüzeye (temas açısı 90 dereceden küçükse) hidrofilik yüzey, suyla ıslatılmayan bir yüzeye

(temas açısı 90 dereceden büyükse) hidrofobik yüzey denir (Şekil 2.28). Suyla ıslanmayan yüzeylere süperhidrofobik yüzeyler denir ve temas açısı 150 derece veya daha fazladır [73].



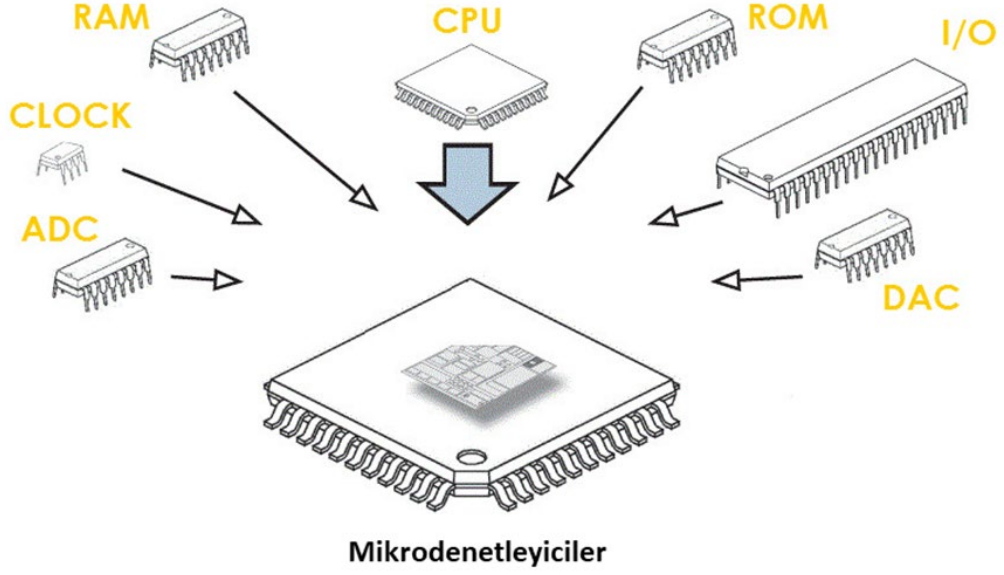
Şekil 2.28: Sıvıların ıslatma durumlarını açısal olarak gösteren şekil [73].

Gerçekleştirilen denemelerden sonra çeşitli hidrofobikleştirme yöntemleri kullanılan filtre kağıtları üzerine gıda boyası ile renklendirilmiş sıvılar 20 uL uygulanarak sıvının filtre kağıtları üzerinde oluşturduğu su temas açıları kullanılarak hidrofiliklik yönünden karşılaştırılmıştır.

2.4. MİKRODENETLEYİCİLER

Mikrodenetleyiciler; çip üzerindeki bilgisayarlar veya tek çipli bilgisayarlar olarak da bilinirler ve μC veya uC sembolü ile gösterilirler. Mikrodenetleyiciler vücuda yerleştirilebilir tıbbi cihazlar, proses kontrol sistemleri, otomotiv motor kontrol sistemleri, uzaktan kumanda sistemleri, endüstriyel enstrümantasyon ekipmanları, voltmetreler, ofis ekipmanları, elektronik cihazlar, elektrikli aletler ve oyuncaklar gibi farklı sistem ve çalışma alanlarında kullanılmaktadır [74].

Mikrodenetleyiciler temel olarak elektronik bilgi işlem ve mantık birimi (CPU), rasgele erişim belleği (RAM), salt okunur bellek (ROM), bağlantı noktası (Giriş/Çıkış Bağlantı Noktaları), analogdan dijitale dönüştürücü (ADC), zaman modülü (SAAT) içerir (Şekil 2.29). Büyük ölçekli bir entegrasyon (VLSI) devresidir. Mikroişlemcilerden, tek bir çipe entegre edilmiş birden çok birim içermeleri ve yeniden programlanabilir olmaları bakımından farklılık gösterirler [74].

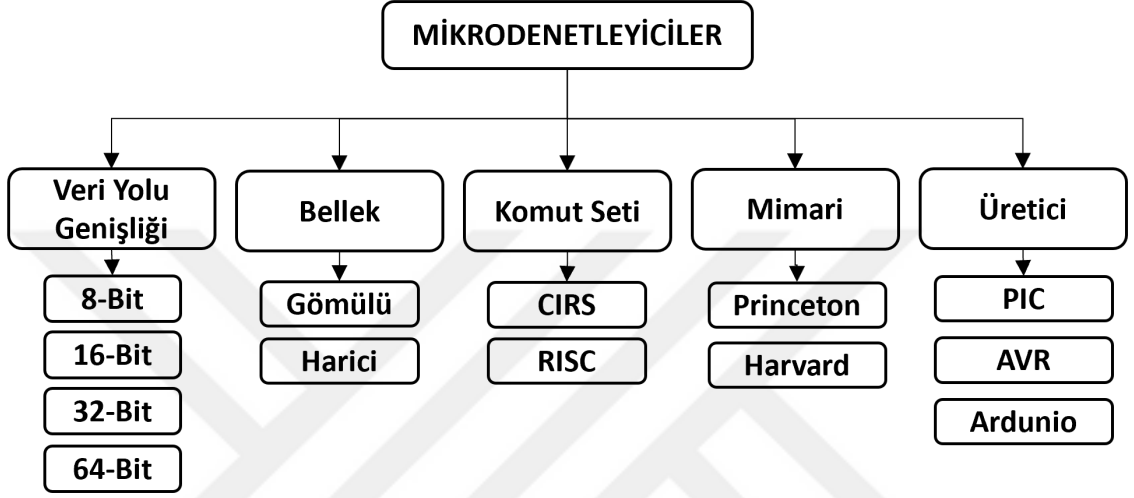


Şekil 2.29: Mikrodenetleyici birim içerik görseli [75]

Mikrodenetleyicilerin en büyük avantajı düşük güç tüketimidir. Ek olarak, yeniden kullanılabilirlikleri, uygun maliyetli olmaları, güvenlikleri ve programlanabilirlikleri, onları elektronik üretim endüstrisindeki çoğu uygulama için tercih edilen gömülü bilgisayar sistemleri haline getirir [76].

Geçmişte, mikrodenetleyiciler, hedef cihazın montaj dili kullanılarak programlanmaktaydı. Farklı şirketlerin mikrodenetleyicileri tamamen farklı montaj dillerine sahipti ve kullanıcıların yeni cihaz türlerini programlamak için yeni bir dil öğrenmesini gerektirmekteydi. Ek olarak, mikrodenetleyiciler BASIC, PASCAL veya C gibi üst düzey diller kullanılarak programlanmaktaydı [77]. Ancak günümüzde C++, Python, R, Arduino gibi farklı programlama dilleri kullanılarak mikrodenetleyiciler geliştirilebilmektedir. Mikrodenetleyiciler Integrated Development Environment (IDE) programlama adı verilen bir derleyici yardımıyla geliştirilmektedir. IDE, kodun hatalarını ayıklar ve ardından mikrodenetleyicinin yürüttüğü ikili kod (1'ler ve 0'lar) şeklinde derler. Kod, bilgisayardan mikrodenetleyiciye donanım aracılığıyla aktarılır. MPLAB, MikroC, Keil, mikrodenetleyiciler için IDE örnekleridir. En yaygın programlayıcı Devre İçi Seri Programlayıcıdır (ICSP) [78].

Mikrodenetleyicilerin kullanım alanlarındaki çeşitlilik türlerinin farklılaşmasına yol açmıştır. Bu sebepten oldukça farklı türler bulunmaktadır. Mikrodenetleyicileri veri yolu genişliği, bellek, kurulum seti, mimari ve üreticiye göre sınıflandırmak mümkündür (Şekil 2.30) [79].



Şekil 2.30: Mikrodenetleyicilerin sınıflandırılması [79].

2.4.1. Açık Kaynak Geliştirme Kartları

Bilgi iletişim teknolojilerinin kullanımı ve geliştirilmesinde önemli ekollerden biri de açık kaynaklardır. Bilgi ve yeniliklere özgürce, kısıtlama olmadan ulaşılmasına olanak tanıyan açık kaynaklı donanım ve yazılımlar her geçen gün kullanıcılar arasında daha fazla yaygınlaşmaktadır. Bu durum donanım ve yazılımsal sistemlerin serbestçe çalışmasına, uygulanmasına, değiştirilmesine ve yeniden dağıtılmasına izin verir [80].

İlk olarak eğitim amacıyla üretilmeye başlanmış günümüzde onlarca farklı alanda, farklı boyut, sistemlerle farklı amaçlar için geliştirilen devre kartları açık kaynak sistemlerin en güzel örneklerindendir. Günümüzde Adafruit, Sparkfun ve Seeed Studio gibi birçok şirket elektronik alanında açık kaynaklı donanımların geliştirilmesini desteklemektedir. Üreticiler tarafından eksiksiz, açık ve erişilebilir belgelerle kullanıcılara sunulan bu kartlar hem uzmanlar hem de amatörler için önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca Elektronik, Otomasyon, Bilgisayar Bilimi, İletişim vb. öğrenciler için dijital devre tasarımı, mikrodenetleyiciler, gömülü sistemler, Nesnelerin İnterneti ve daha fazlası ile ilgili birçok derste uygulanmaya uygundur [81].

Şu an piyasada bulunan açık kaynak geliştirme kartlarına Arduino, Raspberry Pi, Sharks Cove, Waspote, Esp örnek olarak gösterilebilir. Ayrıca Akino ve Dene Yap geliştirme kartları Türkiye’de üretilmektedir ve kullanıcıların açık kaynaklı geliştirme kartlarına taleplerinin karşılanmasında önemli rol üstlenmektedir [82].

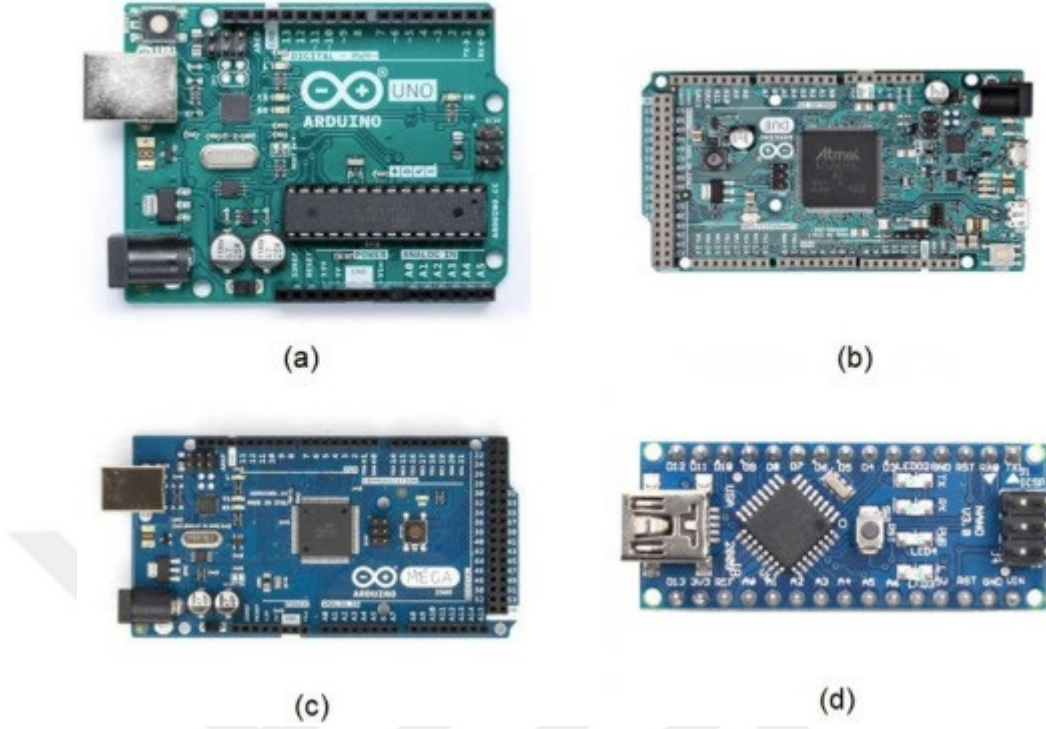
2.4.1.1.Arduino Geliştirme Kartı

Açık kaynaklı bir donanım ve yazılım kuruluşu ve kullanıcı etkileşimi topluluğu olan Arduino, 2005'ten beri mikrodenetleyici tabanlı Arduino kartları üretmektedir ve piyasada en çok kullanılan açık kaynaklı geliştirme kartıdır [83]. Arduino Modülleri olarak da bilinen bu geliştirme kartları, mikrodenetleyici ve kristal, yerleşik güç kaynağı pimleri, önyükleyici gibi diğer gerekli parçaların bir araya gelmesidir. Arduino kartının EEPROM'una bir komut dosyası yükleme imkanı vardır ve pano bilgisayarlarla veya Arduino sistemi dışındaki bazı yazılımlarla arabirim oluşturmadan yürütülür. Bu, bağımsız olarak ve yüksek derecede doğruluk ve taşınabilirlik ile çalışabilmesini sağlar [84].

Arduino kartlarında ayrıca, gerçek hayattaki nesneleri yalnızca algılamakla kalmayıp kontrol eden dijital cihazlar ve etkileşimli varlıklar oluşturmak için yararlı olan bir mikrodenetleyici tabanlı kit aksesuarı mevcuttur [85]. Şekil 2.31’de gösterilen Arduino, Arduino Uno, Arduino Due, Arduino Mega ve Arduino Leonardo dahil birçok varyantta mevcuttur [86].

Şekil 3.30 ‘de bu varyantlar gösterilmiştir. Arduino modelleri Atmel ATmega328p veya ATmega168 gibi bir mikro denetleyici içerir ve prototiplerin ve projelerin geliştirilmesinde bu mikro denetleyiciyi esas alır [88,89].

Arduino'nun basit, anlaşılması kolay, kullanımı kolay bir sözdizimi vardır ve bu onu doğal olarak C, basitleştirilmiş C++ seven bireyler, hobiciler, öğrenciler ve amatör yenilikçiler için mükemmel kılar [90].



Şekil 2.31: Arduino Varyantları. (a) Arduino Uno, (b) Arduino Due, (c) Arduino Mega (d) Arduino Nano [91].

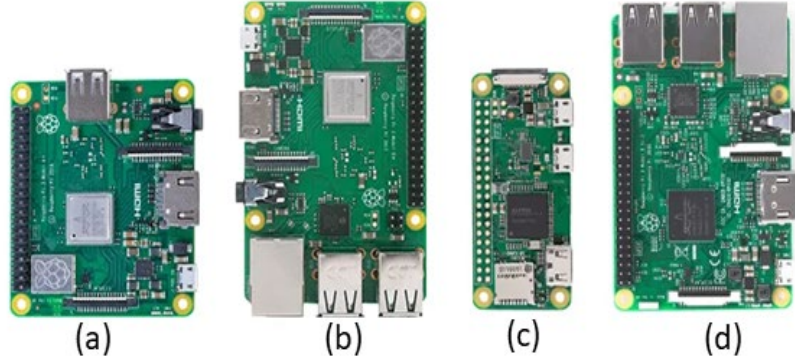
Arduino kartındaki kontrolör, Arduino IDE ile programlanabilir. Gerçekte, Arduino ile programlama, bu mikrodeneleyiciyi yeniden programlamak anlamına gelir. Kart üzerinde dahili LED'ler ve ayrıca USB gibi harici modüllerin takılabileceği uzatılabilir pinler bulunmaktadır. Karta pinleri ile bağlı olan LED'lerin ve sensörlerin fonksiyonlarını kontrol eden dahili mikrodeneleyicidir. Arduino, benzer sistemlerle karşılaştırıldığında öğretmenlere, öğrencilere ve hobi sahiplerine büyük faydalar sunarken, mikrodeneleyicilerle çalışma prosedürünü kolaylaştırır [91].

2.4.1.2. Raspberry Pi Geliştirme Kartı

Raspberry Pi, İngiltere merkezli bir hayır kurumu olan Raspberry Pi Foundation tarafından eğitim amaçlı kullanım için tasarlanmış küçük ve ucuz bir bilgisayar ailesidir. Raspberry Pi Vakfı, 24 Şubat 2012 tarihinde kullanıma sunduğu ilk modelinden sonra zaman içinde her biri biraz farklı özelliklere sahip birden fazla Raspberry Pi modelini yayınlamıştır. Her Raspberry Pi modeli, bir bilgisayar sisteminin tüm temel bileşenlerini içeren tek bir mikroçip olan System on Chip (SoC) teknolojisini kullanır [92].

Tek bir kart üzerine tasarlanmış, CPU, portlar ve kurulu bilgisayar çipleri ile entegre bir bilgisayar gibi görünen bu kart ayrıca karta bağlamak istediğiniz cihazlar için gerekli olan tüm bağlantı bileşenlerine sahiptir. Bu portları kullanarak cihaza monitör, klavye, fare gibi donanımlar eklenebilir [93]. Raspberry Pi'nin piyasada iki farklı versiyonu bulunmaktadır. Bunlar Model A ve Model B olarak tanımlanmıştır. İki versiyon arasındaki temel fark, Model B'ye eklenen bir Ethernet ve ekstra USB bağlantı noktasıdır. Diğer özellikler ve bileşenler aynıdır. Bu özellikler de Model B'nin fiyatını yükseltmektedir. Her iki modelde de Arm CPU/GPU, GPIO, RCA, ses çıkışı, LED'ler, USB, HDMI, güç ve SD kart yuvası bulunmaktadır. Kart üzerinde bulunan USB portları kullanılarak cihaza Wi-Fi ve ses girişi gibi özellikler eklenebilir. Ayrıca işletim sistemi ve veri depolama için SD kart ve güç kaynağı ihtiyacı bulunmaktadır [93].

Şekil 2.32'te iki modelin farklı varyasyonları gösterilmektedir.



Şekil 2.32: Raspberry Pi Varyantları. (a) Raspberry Pi 3A+, (b) Raspberry Pi 3B+, (c) Raspberry Pi Zero W (d) Raspberry Pi 3B [94]

Raspbian (Debian Wheezy tabanlı), Pidora (Fedora tabanlı), Snappy Ubuntu Core veya desteklenen diğer işletim sistemleri, Raspberry Pi'nin resmi web sitesinden indirilebilir. Ayrıca cihaz Pardus ARM, Arch Linux ARM ve Windows 10 IoT Core işletim sistemlerini de desteklemektedir. Cihaz Python programlama dili ile programlanabildiği gibi BBC Basic, C ve Perl programlama dilleri ile de programlanabilmektedir [95].

2.4.1.3.ESP 32 Geliştirme Kartı

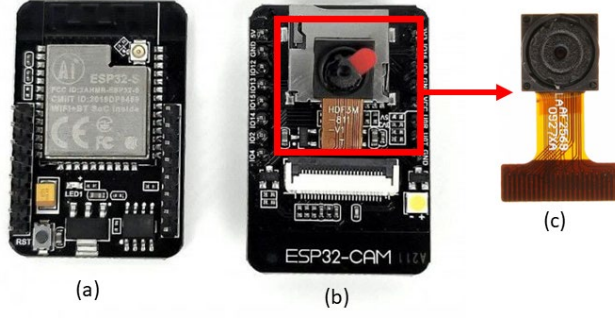
ESP32 Tensilica Xtensa LX serisi 32 bit RISC işlemciyi bir TCP/IP yığınıyla bütünleştiren hibrit bir Wi-Fi ve Bluetooth SoC'dir. 2016 yılında piyasaya sürülmüştür. ESP32 serisi SoC'ler, çift çekirdekli işlemciye, daha hızlı Wi-Fi desteğine sahiptir [96].

Normal (etkin) modda, ESP32 SoC, 3,3 V DC besleme geriliminde çalışmak için 160-260 mA akım gerektirir. Wi-Fi ve Bluetooth işlevleri açıkken, çekilen akım 790 mA'ya kadar çıkabilir. ESP32 muadillerine göre elektrik kullanımı daha fazladır fakat uyku modlarından biri kullanılarak (modem uykusu, hafif uyku, derin uyku ve hazırda bekletme) çekilen akım azaltılabilir [97].

Temel ESP32'nin (ESP32-D0WD-V3, ESP32-D0WDQ6-V3, ESP32-D0WD, ESP32) bir dizi çeşidi vardır. -D0WDQ6, ESP32-D2WD, ESP32-S0WD ve ESP32-U4WDH) gömülü sistem geliştiricilerinin farklı ihtiyaçlarını karşılamak için kullanıma sunulmuştur [98].

Esp 32-Cam;

ESP32-CAM, çok az yer kaplayan (27*40,5*4,5 mm) minimum bir sistem olarak bağımsız çalışabilen, açık kaynak devre geliştirme kartları içerisinde rekabetçi küçük boyutlu bir kamera modülüne sahiptir (Şekil 2.33). ESP-32 CAM, 6 mA'ya kadar derin uyku akımı ile çalışabilir bu durum düşük enerji seviyesinde çalıştığını göstermektedir. IoT uygulamaları için oldukça uygun olan bu geliştirme kartı akıllı ev cihazları, endüstriyel kablosuz kontrol, kablosuz izleme, QR kablosuz tanımlama, kablosuz konumlandırma sistemleri için uygundur. Ayrıca bu kart çeşitli IoT donanım terminallerinde uygulama için kullanıcılara yüksek güvenli bağlantı modu sağlar [99]. ESP 32 CAM modülünde bilgisayar bağlantı portu bulunmamaktadır. Bu nedenle bilgisayar bağlantısını sağlamak ve kartı programlamak için FTDI kartı veya Arduinio geliştirme kartı kullanılabilir.



Şekil 2.33: ESP 32- CAM Geliştirme kartı (a) Arka Yüz, (b) Ön Yüz, (c) Kamera Modülü

2.4.2. Geliştirme Kartlarının Kullanım Alanları

Farklı alanlardaki sorunlara çözüm geliştirmek için hobi sahipleri, geliştiriciler ve yenilikçiler tarafından farklı geliştirme kartları programlanır. Bu alanlar çeşitlidir ve prototip geliştirmeye yönelik uygulamalar sonsuzdur.

Mikrodenetleyiciler, entegre edilebilir tıbbi cihazlarda, proses kontrol sistemlerinde, otomobil motor kontrol sistemlerinde, uzaktan kumanda sistemlerinde, endüstriyel enstrümantasyon cihazlarında, voltmetrede, ofis ekipmanlarında, elektronik cihazlarda, elektrikli aletlerde ve oyuncaklarda bulunabilir. Bu cihazların ve ürünlerin çoğu otomatik olarak kontrol edilir, özel giriş cihazlarına ve küçük LED/LCD ekran çıkışlarına sahiptir [100].

Sistem tasarımı alanında Sheikh Ferdoush ve Xinrong Li çalışmalarında raspberry pi ve arduino kullanarak çevresel izleme uygulamaları için düşük maliyetli ve yüksek oranda ölçeklenebilir kablosuz sensör ağı sistem tasarımı gerçekleştirmişlerdir [101].

Donanım iletişimi alanında Hisham E.Gad Gneş enerjisi uygulamaları için yeni bir sıcaklık veri toplama sisteminin geliştirilmesi anında çalışmalar yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında, sensörden alınan veriler doğrudan bir CSV dosyasına kaydeder ve ara bellekte saklamaz. Bu durum sistemin hali hazırda kullanılan yüksek maliyetli ve depolama sorununun yaşandığı sistemlerden ana farkını oluşturmaktadır [102].

2.4.2.1. Sağlık Analizlerinde Geliştirme Kartlarının Kullanımı

Sağlık alanında ise Akshay Sugathan ve ekibi, sensörlerle kalp atış hızı, elektro dermal aktivite ve cilt sıcaklığının ölçülmesini sağlayan giyilebilir bir cihaz geliştirmiş ve bu cihazın sürekli izleme sistemi için arduino tabanlı bir platform oluşturmuşlardır. Çalışma kapsamında Arduino

Lilypad modülü kullanılmıştır. Modüle ilgili sensörlerin yerleştirilmesinden sonra sistemi Şekil 2.34’te görüldüğü gibi bir gömlek içerisine yerleştirerek prototip oluşturmuşlardır [103].



Şekil 2.34: Akshay Sugathan ve ekibinin oluşturduğu mikrodnetleyici temelli giyilebilir cihaz prototipi [103].

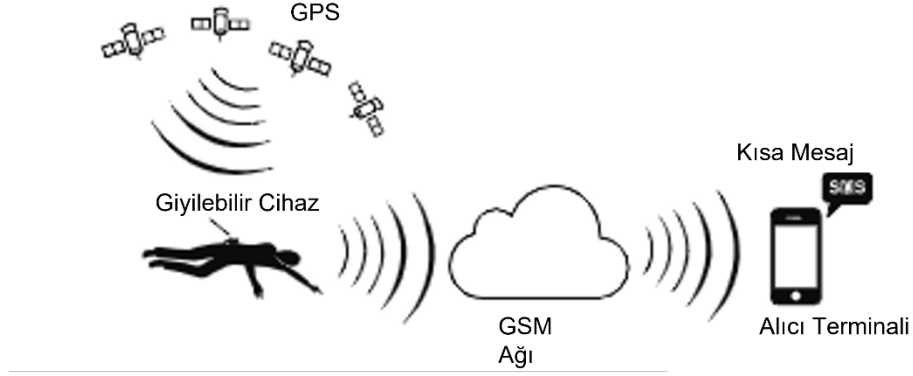
Li Xuemei ve ekibi yaşlı nüfusun biyofiziksel sinyallerinin sürekli izlenmesi ve radyofrekans ile baz istasyonlarına gönderim sağlayan ve GSM operatörü aracılığı ile geri bildirim yapan mikrodnetleyici temelli bir sistem geliştirmişlerdir. Sistem içerisinde kandaki oksijen konsantrasyonunu ölçümleyen sensör, MSP430 mikrodnetleyici ve TinyOS işletim sistemi kullanılmıştır. İlgili sistemin avantajı farklı sensörlere entegre edilebilir olmasıdır [104].

Xuemei ve ekibinin çalışmasına benzer bir çalışmayı Assim Sagahyroon ve arkadaşları gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada da oluşturulan sistem bir mikrodnetleyiciye entegre edilmiş ve hastanın vücuduna bağlı, sıcaklık ve kalp atışını okuyan ve bu okumaları bir Bluetooth bağlantısı aracılığıyla hastanın cep telefonuna ileten çeşitli sensörlerden oluşmaktadır. Kısa Mesaj Servisi (SMS), acil durumlarda bir hekimi uyarmak için tasarıma dahil edilmiştir (Şekil 3.35). Ek olarak, cep telefonunda çalışan bir uygulama programı, bir hastane veri tabanındaki hasta kayıtlarını en son okumalarla (düzenli aralıklarla) güncellemek için interneti kullanmaktadır [105].



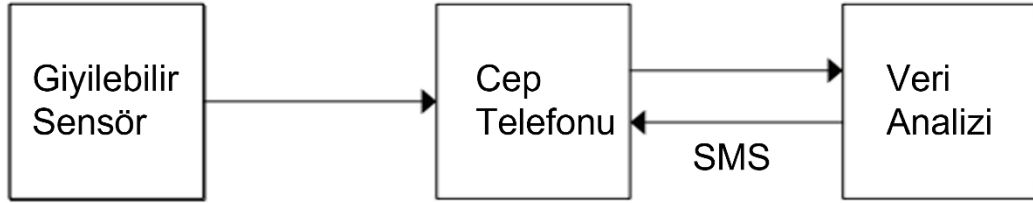
Şekil 2.35: Sagahyroom, A ve ekibinin geliştirmiş olduğu sıcaklık ve kalp atışını izleyen mikrodnetleyici temelli giyilebilir cihaz (a.), parametrelerin yüksek olması durumunda SMS ile bilgilendirme sistemi (b.) ve verilerin izlenebildiği web arayüzü (c) [105].

2014 yılında yaşlı bireylerin yaşam kalitesini artırma adına Falin Wu ve ekibi düşme tespiti için bireyin beline yerleştirilen giyilebilir cihaz tasarlamışlardır. Şekil 2.36’te gösterilen şablondaki gibi sistem temel olarak, düşme tespiti için ivme analizi esas alır. Sensörler mikrodnetleyici yardımı ile coğrafi konumunu alır ve düşme alarmı için belirli numaraya kısa mesaj gönderir [106].



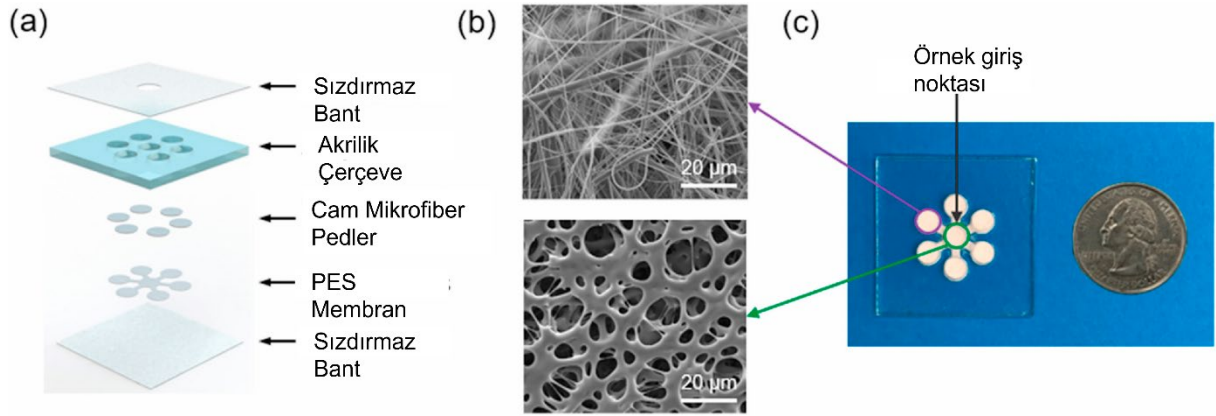
Şekil 2.36: Düşme tespitine bağlı giyilebilir sensör [106].

2016 yılında kalp aritmisinin tespit ve takip edilmesine yönelik Android tabanlı bir elektrokardiyogram (EKG) izleme sistemi geliştirilmiştir (Şekil 2.37). Çalışma kapsamında kalp atış hızı ve kan oksijen seviyesinin güvenli aralıkların dışında olduğu durumları izlemek ve erken tespit etmek için tasarlanmış bir mikrodenetleyici ARM7 tabanlı sağlık izleme oluşturulmuştur [107].

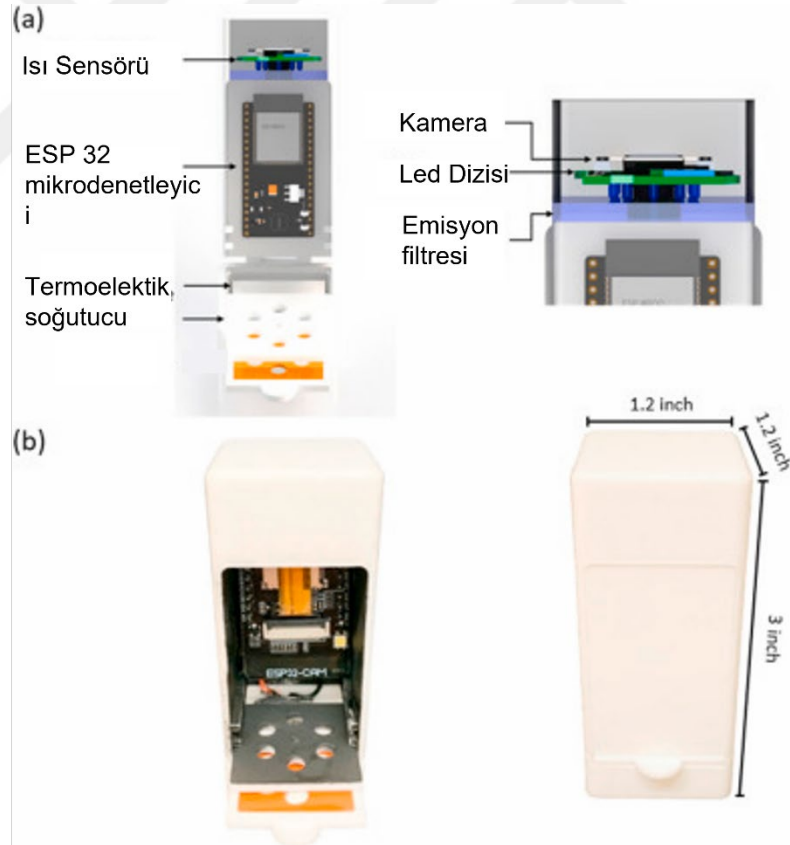


Şekil 2.37: EKG izleme sisteminin temel çalışma mantığını gösteren şablon [107].

2020 yılında Mingdian Liu ve ekibi izotermal nükleik asit amplifikasyonu testi için bir kağıt tabanlı sensör ve ilgili testlerin gerçek zamanlı izlenmesini sağlayan Nesnelerin interneti (IoT) temelli sistem geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Sistem içerisindeki kağıt temelli, sensör, reaktif saklama, numune taşıma ve nükleik asit amplifikasyonu işlevlerini sağlarken (Şekil 2.38) IoT temelli cihaz ise sıcaklığı kontrol etmek, floresan görüntüleri toplamak ve verileri bulut depolamada depolamak için wifi ağı içeren bir Arduino mikrodenetleyici kullanır (Şekil 2.39) [108].



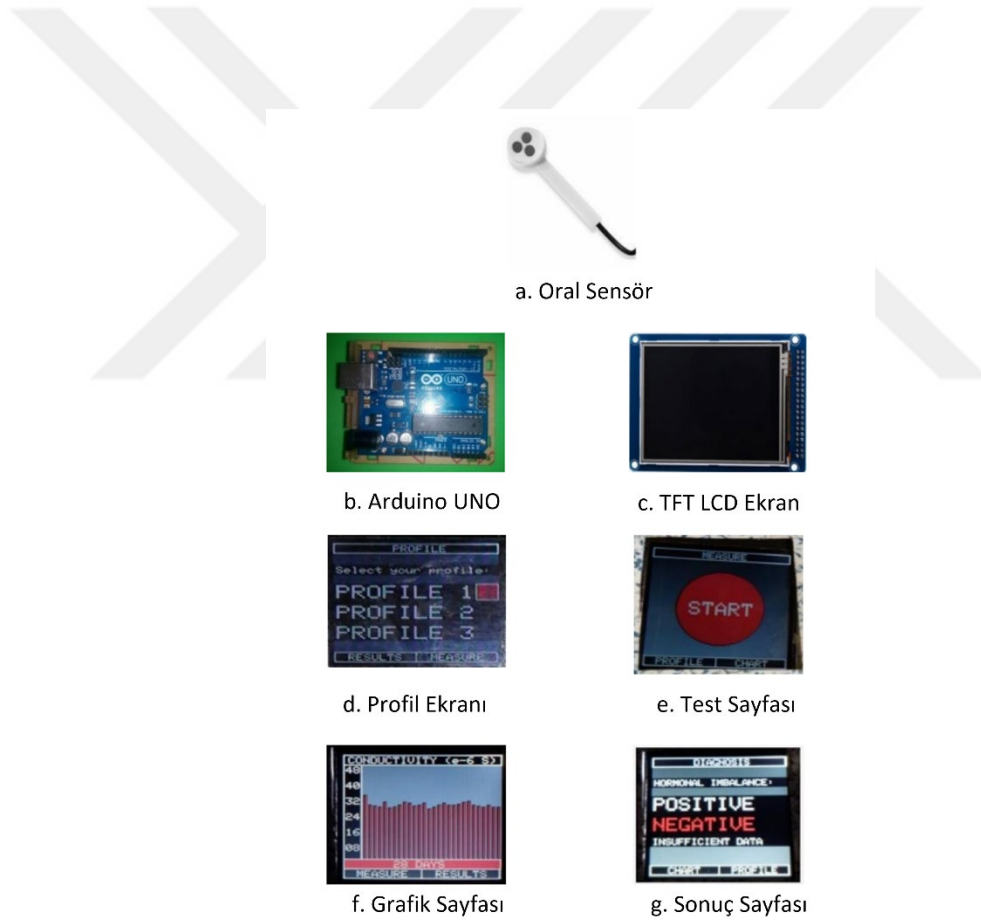
Şekil 2.38: Kağıt esaslı LAMP çipinin tasarımı. (a) Bir girişe ve altı aralık odası sahip çip sensörünün şeması. (b) Cam mikrofiber (üst panel) ve PES membranının (alt panel) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü. (c) Altı numune odası ve bir giriş deliğinden oluşan monte edilmiş LAMP sensörlü kaseti. Her numune odası, bir kağıt çeşitleri pedi ve giriş içerir. Reaksiyon hazneleri ve giriş, kağıt bazlı bir akış kanalıyla birbirine bağlanmıştır [108].



Şekil 2.39: IoT tabanlı LAMP dedektörü. (a) Muhafazayı, sıcaklık yönetimi bileşenini, mikrodnetleyiciyi ve flüoresan algılama optiklerini gösteren şematik tasarım. (b) Kurulumun ve takılı optik ve elektronik bileşenlerin fotoğrafı. Boyut 1,2''×1,2''×3'' şeklindedir. Toplam ağırlık 300 gr'dan azdır [108].

Abu Sadat Sabbir ve ekibi ise diyabet hastalarına yönelik olarak çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışma kapsamında glikoz seviyesini ölçmek için Bluetooth bağlantılı bir şeker ölçüm cihazı oluşturmuşlardır ve oluşturdukları uygulamayı, tıbbi hizmetlere veya uzman danışmanlığına erişimi kolaylaştıran merkezi bir sunucuya bağlamışlardır [109].

Romeo Jr. Jorda ve ekibinin gerçekleştirdiği “Yumurtlama hormonal dengesizliği tanıma sistemi kullanılarak potansiyometrik yönteme dayalı tükürüğün iletkenlik analizi” çalışmasında ise tükürükten iletkenliğin tespiti oral sensör ile sağladıktan sonra ilgili verilerin analiz edilmesi için Arduino UNO ve sonuçların görüntülenmesi için TFT LCD ekran (Şekil 2.40) kullanmışlardır [110].



Şekil 2.40: (d)Profil sayfası, cihazın arayüzü yapılıırken Arduino-C programlama dili kullanılmıştır. LCD, verilerinizi nereye kaydetmek istediğinizi seçebileceğiniz cihazın profil sayfasını göstermektedir. Cihaz aynı anda en fazla üç (3) profili kaydedebilir. (e) Test sayfası, LCD, cihazın Test Sayfası gösterilen analize başlama arayüzü göstermektedir. (f) Grafik sayfası, Sonuç sayfasında hormon düzeyi, hormon düzeyini test edilen gün sayısını içeren bir çubuk grafikle göstermektedir. (e) Sonuç sayfası, bu sayfada, hormonal dengesizlik, hormon seviyesinin günlük ölçümü ile tespit edilmektedir. Ölçümlerden kaydedilen veri sayısı hormon dengesizliği olup olmadığını söylemek için yeterli değilse ‘Pozitif’ veya ‘Negatif’ ve ‘Yetersiz Veri’ yazmaktadır [110].

Dewa Gede Hari Wisana Triwiyanto ve Endro Yulianto Sumber'ın gerçekleştirdiği çalışmanın amacı, piyasada ucuz ve kolay bulunan elektronik bileşenleri kullanarak bir üroflowmetri cihazı geliştirmektir. Ana yapı taşı, HTML dosyaları içeren SPIFFS dosya sistemi kullanılarak ESP32 yerleşik Wi-Fi mikrodenetleyici tarafından işlenen idrar emisyonunun saniye başına hacmini algılamak için HX711 modülüne sahip bir Loadcell tarzı sensörden oluşur. Bu şekilde sensör ile algılanan veriler ESP 32 kullanılarak analiz edilmektedir [111].

Napat Chaowadee ve ekibi çocuklarda öğrenmeyi kesintiye uğratan ana faktörlerden biri olan stres seviyesini tahmin etmek için, fotopletismogram (PPG) sinyallerinden çıkarılan nabız hızı değişkenliğini (PRV) işledikleri giyilebilir bir cihaz geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bilek bölgesindeki PPG sinyallerini elde etmek için optik yansıma sensörlerini ve PPG sinyallerini almak ve işlemek için ESP32 mikro denetleyicisini kullanmışlardır [112].

Çalışma kapsamında, cihazımızı takarken bilişsel stres dönemlerinin (bir aritmetik test) ve bir gevşeme döneminin gerçekleştirildiği standart trier sosyal stres testini gerçekleştirmişlerdir. Sonrasında 10 sağlıklı katılımcının belirli bir döneminde gerçekleştirilen frekans hesabı ile stres seviyesine göre katılımcıları 4 gruba ayırmışlardır. Oran (%): (i) stres yok %0- 25, (ii) düşük stres veya %25 - 50, (iii) orta stres veya %50 - 75 ve (iv) yüksek stres veya %75 – 100 [112].

Rinky Sha ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmalarda bitkiyi biyotik ve abiyotik streslere karşı korunmasında rol oynayan metil jasmonat için bir elektrosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında, yüksek hassasiyet ve 0,2 mM'lik bir tespit limiti ile MeJa'nın tespiti için ilk ultra düşük maliyetli pirit FeS tabanlı esnek kağıt-substrat akıllı sensörü oluşturulmuştur. Oluşturulan sensörden alınan verilerin uzaktan kontrolünü için verilerin bluetooth aracılığıyla akıllı telefona taşınmasını sağlayan mikrodenetleyici entegrasyonu geliştirmişlerdir. Çalışma kapsamında FeS 2 tabanlı kimyasal dirençli sensör ilk olarak jumper kablolar kullanılarak Arduino Uno kartına bağlanmış ve buradan elde edilen bilgiler Bluetooth modülü yardımıyla android tabanlı bir akıllı telefona aktarılmıştır [113].

]

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. [KORTİZOL STANDARTLARININ HAZIRLANMASI]

Kortizol standart çözeltiler her hafta taze olarak hazırlanmıştır. Stok çözeltiler etanol (99% ACS grade) içinde çözündürülmüş 0.4, 0.8, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ul/mL'lik konsantrasyonlarda kortizol içerecek şekilde çözündürülmüş hidroksikortizon asetat (Sigma 5003-3) içermektedir.

3.2. MAVİ TETRAZOLYUM YÖNTEMİ

%5 (h/h) tetrametilamonyum hidroksit (Sigma 7559-2) çözeltisi, 5 mL sulu çözeltinin 45 mL metanol içinde seyreltilmesi ile hazırlandı. 50 mL metanol (99% ACS grade) içinde çözülmüş 100 mg mavi tetrazolyum (Sigma 1871223) içeren ikinci bir çözelti yapılmıştır. Her iki çözelti eşit miktarlarda karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.3. MİKROAKIŞKAN TABAKA DESENLEMESİ

Tez çalışması kapsamında, kalın filtre kağıdı, No 3 Whatman kağıdı ve No 4 Whatman kağıdı ile CHR 1 Whatman kromatografi kağıdı kullanılmıştır. Tezde hidrofilik bölgeler oluşturmak üzere parafin kaplama, hexamethyldisilazane (HMDS) reaktifi kullanımı ile ısıtma ve mikrodalga ışınlama yolları kullanılmıştır.

3.3.1. Parafin Yöntemi

Filtre kağıtları 3 x 1 cm boyutlarında kesildikten sonra eritilmiş parafine batırılmıştır. Parafinin uygulandığı bölgelerde hidrofobik bölgeler oluşmuştur.

3.3.2. Agar Temelli Termoplastik ile Hidrofobikleştirme

Bu yöntemde literatürde termoplastik olarak tanımlanan agar temelli viskoz sıvının kağıt üzerinde dondurularak hidrofobikleştirme etkisi incelenmiştir. Bunun için 0,25 g Agar agar 10 ml su ve 1,5 ml gliserin (Pharma Grade) ile kaynayana kadar karıştırılmıştır. Oda sıcaklığına ulaşmadan önce 1 ml Tween 20 (Chem Pure) eklenmiş ve kesilmiş olan filtre kağıtlarının üzerine daldır çıkart yöntemi ile uygulanmıştır.

3.3.3. HMDS ile Hidrofobik Desenleme

Çalışmanın bu kısmında HMDS reaktifinin katalizörü olarak HCl ve NH₃ kullanılmıştır.

İlk yöntemde HDMS ile %30'luk HCl 9:1 (v:v) ve NH₃ 5:1 (v:v) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Hexamethyldisilazane ile hidroklorik asit tepkimesinden klorotrimetisilan (TMSCL) ürünü ortaya çıkmaktadır. TMSCL ajanı selülozun yapısındaki hidroksil gruplar ile etkileşim göstermektedir. Bu etkileşim sonrasında kullanılan selüloz yapısındaki mikroakışkan tabakaya hidrofobik karakter kazandırmaktadır.

HMDS ile selüloz tabanlı kağıdın hidrofobikleştirilmesi için ısıtma ve mikrodalga ışınlama yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. Isıtma Yöntemi

Kağıt üzerine uygulanmış HMDS- HCl ve HMDS- NH₃ çözeltileri 80°C'de çalkalamalı su banyosunda ve etüvde 2-4-6-8 saat inkübe edilmiştir. Isıtma yöntemi çalışma prosedürleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Isıtma yöntemi çalışma prosedürleri.

Prosedür	Kullanılan Solüsyon	Yöntem	Süre (saat)
Isıtma	HMDS- HCL	Çalkalamalı Su Banyosu Etüv	2-4-6-8
	HMDS-NH ₃	Çalkalamalı Su Banyosu Etüv	2-4-6-8

3.3.3.2. Mikrodalga Işınlama Yöntemi

Mikrodalga ışınlama yönteminde CHR kromatografi kağıdı hariç No:3 No:4 Whatman kağıdı ve kalın filtre kağıtları üzerine HMDS-HCl ve HMDS- NH₃ solüsyonları uygulandıktan sonra farklı dalga güçleri uygulanmıştır. Uygulama süreleri aşağıdaki Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Mikrodalga ısınlama yöntemi çalışma prosedürleri.

Prosedür	Kullanılan Filtre Kağıdı	Kullanılan Solüsyon	Elektromanyetik Dalga Gücü (W)	Süre (dakika)
Mikrodalga Işınlama	No:3 Whatman Kağıdı No:4 Whatman Kağıdı Kalın Filtre Kağıdı	HMDS- HCl	270	1
				5
				10
			450	1
				5
				10
			600	1
				5
				10
		HMDS- NH ₃	900	1
				5
				10
			270	1
				5
				10
			450	1
				5
				10
			600	1
				5
				10
			900	1
				5
				10

3.4.TER EMİCİ BÖLGE ÇALIŞMALARI

Ter emici bölgenin amacı geniş bir yüzey oluşturarak deri üzerinde oluşan ter sıvısını toplamak ve mikroakışkan tabakanın numune uygulama alanına aktarmaktadır. Bu nedenle sıvı tutuşu yüksek olmalıdır. Ancak mikroakışkan içerisinde oluşturulmuş kanallarda meydana gelecek kılcallık ile iletme engel olmamalıdır. Bu nedenle aşağıdaki Tablo 3.3'te gösterilen denemeler gerçekleştirilmiş ve öncelikle gıda boyası ile renklendirilmiş sıvı ile denenmiştir.

Tablo 3.3: Ter emici bölge seçiminde gerçekleştirilen çalışmaları ve parametreleri gösteren tablo.

Mikroakışkan Olarak Kullanılan Filtre Kağıdı	Ter Emici Bölge Olarak Kullanılan Kağıt	Boyut ve Yerleşim Mikroakışkan boyutu ile:	Verilen Kod
No.3 Whatman	No.3 Whatman	Aynı	MT1
		Küçük	MT2
	No.4 Whatman	Aynı	MT3
		Küçük	MT4
	Kalın Filtre Kağıdı	Aynı	MT5
		Küçük	MT6
	Sıkıştırılmış Selüloz Tabaka	Aynı	MT7
		Küçük	MT8
No.4 Whatman	No.3 Whatman	Aynı	MT9
		Küçük	MT10
	No.4 Whatman	Aynı	MT11
		Küçük	MT12
	Kalın Filtre Kağıdı	Aynı	MT13
		Küçük	MT14
	Sıkıştırılmış Selüloz Tabaka	Aynı	MT15
		Küçük	MT16
Kalın Filtre Kağıdı	No.3 Whatman	Aynı	MT17
		Küçük	MT18
	No.4 Whatman	Aynı	MT19
		Küçük	MT20
	Kalın Filtre Kağıdı	Aynı	MT21
		Küçük	MT22
	Sıkıştırılmış Selüloz Tabaka	Aynı	MT23
		Küçük	MT24

3.5. YAPAY TER ÖRNEKLERİ İLE ÇALIŞMALAR

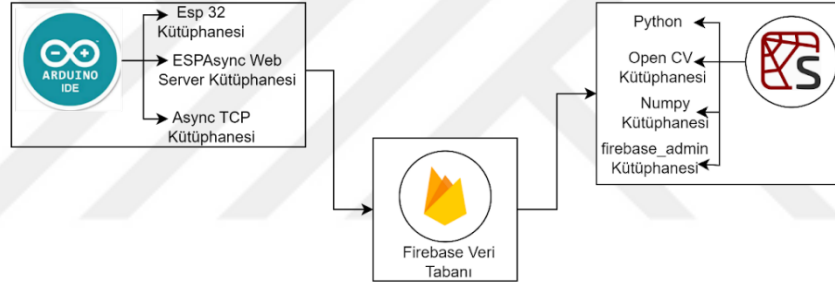
Yapay ter çözeltileri alkali ve asidik olacak şekilde hazırlanmıştır. Alkali yapay ter solüsyonu için 0,05 g L- Histidinmonohidroklörür, 0,5 g Disodyumhidrojenfosfat 100 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. pH NaOH kullanılarak 8'e ayarlanmıştır.

Asidik yapay ter çözeltisi, 0,05 g L- Histidinmonohidroklörür, 0,5 g NaCl ve 0,22 g Sodyumdihidrojenfosfat'ın 100 ml saf su içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır. pH NaOH kullanılarak 5.5'e ayarlanmıştır.

Hazırlanmış ter örneklerinden ayrı eppendorf tüplerine 200 uL aktarılmıştır. Her tüp içerisine sırasıyla 60, 40, 10, 5, 2, 1 ug/mL konsantrasyon olacak şekilde hidroksi kortizon çözeltisi (h:h) eklenmiştir.

3.6. MİKRODENETLEYİCİ ÇALIŞMALARI

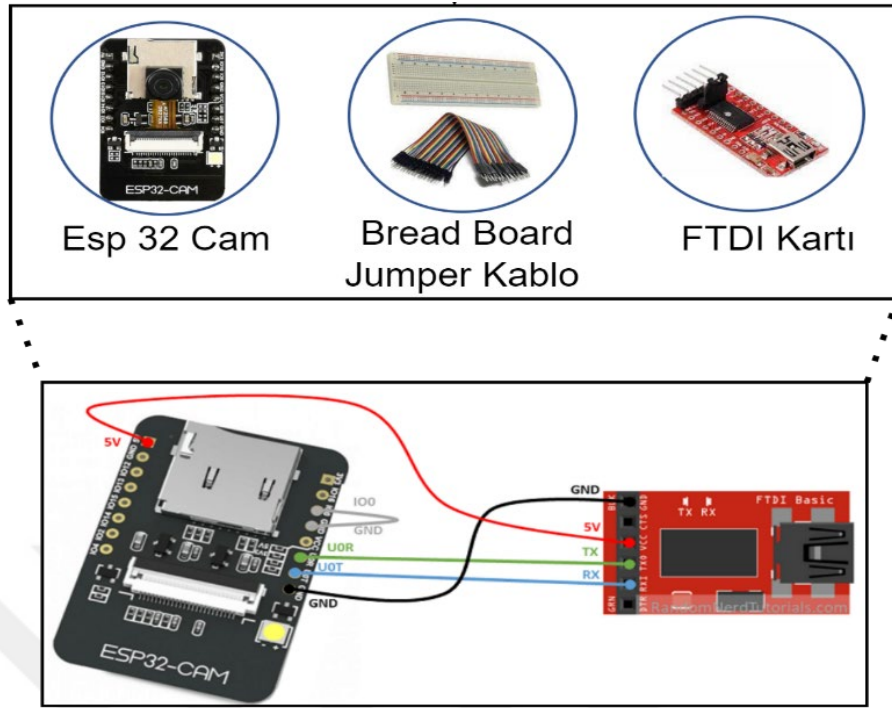
Çalışmada teknoloji kaynaklı bileşenlerin kurulumu ve programlanmasını 2 aşamaya ayırmak mümkündür. İlk olarak Esp 32 Cam geliştirme kartının FTDI programlama kartı ile bağlantısı gerçekleştirilmiş ve Arduino IDE’de Esp 32, ESPAsync Web, Async TCP kütüphaneleri kullanılarak C diliyle programlanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar sonunda web server üzerinden kartın kontrolü sağlanmıştır. Bu sayede web arayüz’de bulunan butonlar yardımıyla görüntü alınarak gerçek zamanlı veritabanı hizmeti olan Firebase platformuna aktarılmıştır. 2. aşamada ise Python programlama dili, Open Cv ve NumPy kütüphaneleri, Python-Firebase platformlarının bağlanmasını sağlayan firebase-admin paketi kullanılmıştır. Firebase’den alınan görüntüde sayısal işlemler gerçekleştirilerek sonuç ekranına yazdırılmıştır. Çalışma şablonu Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



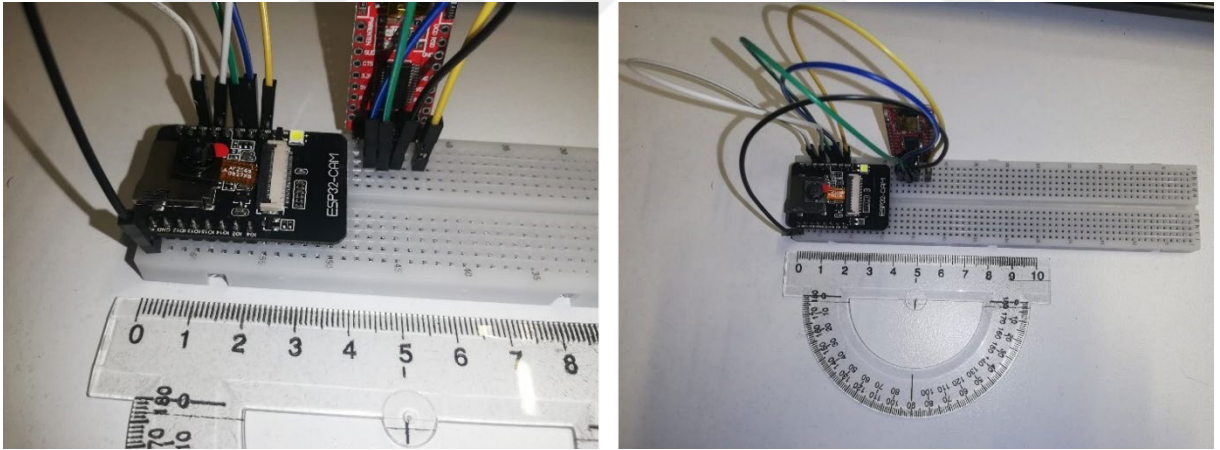
Şekil 3.1: Tez kapsamında kullanılan kütüphaneleri gösteren şekil.

3.6.1. Esp 32 Cam Geliştirme Kartının Bağlanması ve Programlanması

Tez çalışmasındaki bütün programlama süreçleri için Monster Abra A.5 V18.2(Windows 10) model bilgisayar kullanılmıştır. Geliştirme kartının bilgisayarla bağlantısı Şekil 3.2. de görüldüğü gibi FTDI kartı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlki kart arasında bağlantı için breadbord ve erkek-erkek jumper kablolar kullanılmıştır. FTDI kartına takılan Mini Usb B kablosu bilgisayara bağlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2: ESP 32 Cam geliştirme kartının bağlantısı için gerekli parçaları ve bağlanma şemasını gösteren şekil.



Şekil 3.3: Esp 32-FTDI-Breadboard bağlantısını gösteren resim.

Arduino İDE'si "<https://www.arduino.cc/en/software>" web sitesinden "version 2.0.2" olarak indirilmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra, Esp 32 kütüphanesinin kurulumu için Arduino IDE'si sol üstte bulunan "Dosya" menüsünden "Tercihler" açılarak "Ek Devre Kartları Yöneticisi URL'leri" kısmına "https://dl.espressif.com/dl/package_esp32_index.json" bağlantısı eklenmiş ve sağ altta bulunan "Tamam" butonuna basılmıştır. Kartın kurulumu bittikten sonra tekrar "Araçlar" menüsüne gelip "Kart" kısmından "AI Thinker ESP32 CAM" kartı seçilmiştir. Kütüphanenin kurulumu tamamlanmıştır.

Programlama aşamasında hazır kodlar kullanılmıştır. İlk olarak ESP 32 ile fotoğraf çekimi işlemi için programlama gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında Rui Santos tarafından <https://randomnerdtutorials.com/> sitesinde paylaşılmış olan kod kaynaklarından yararlanılmıştır [114].

ESP 32 Cam geliştirme kartı ile çekilen fotoğrafın Fire Base veri tabanı platformuna aktarımı için ise Sara Santos tarafından <https://randomnerdtutorials.com/> sitesinde paylaşılmış kod kaynaklarından faydalanılmıştır [115].

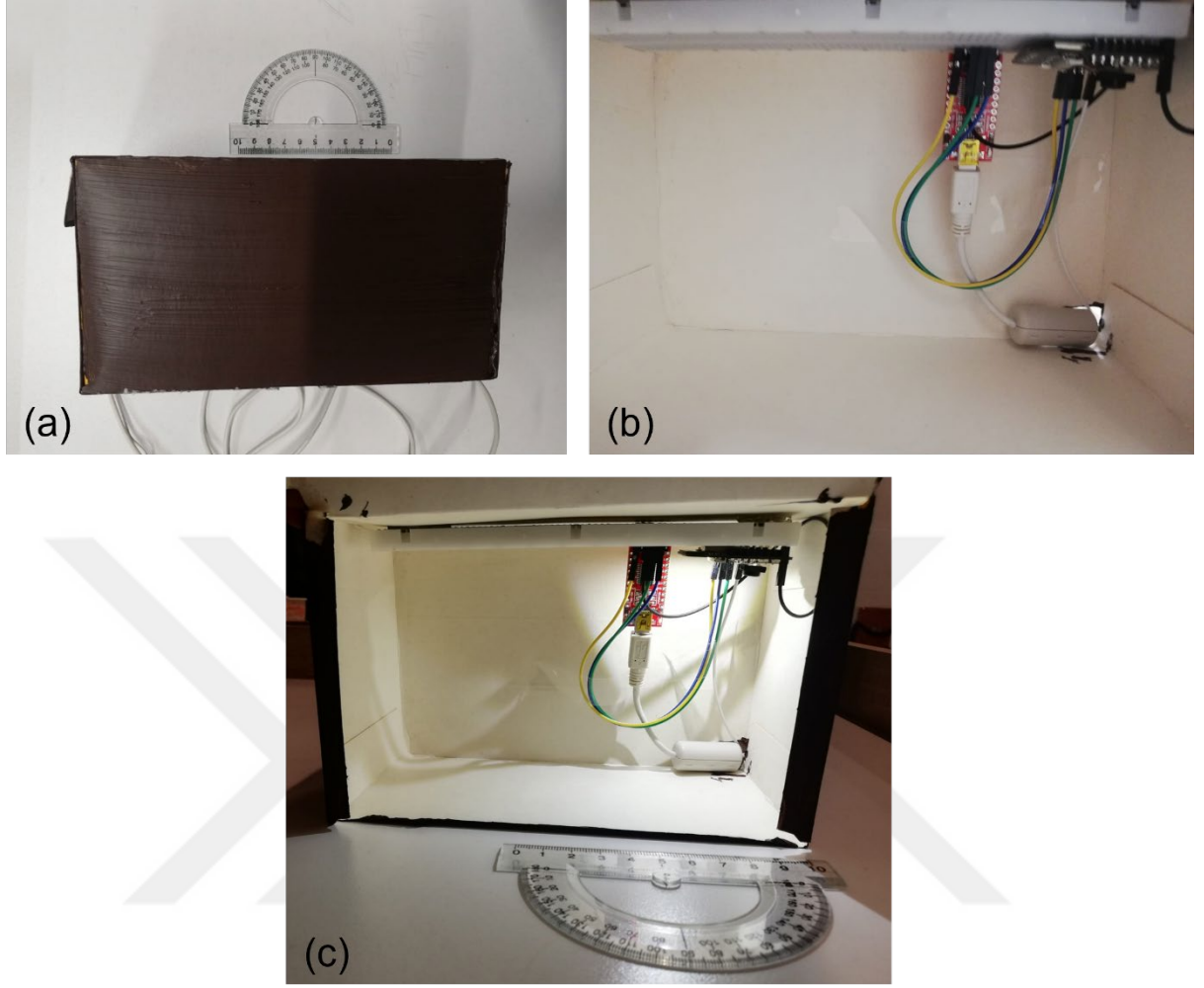
3.6.2. Sonuç Ekranının Tasarlanması

Çalışmanın bu aşamasında Firebase platformundan görüntünün alınması ve işlemlerin gerçekleştirilmesi ve kullanıcıya sonuç değerinin iletilmesi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle Bilimsel Python Geliştirme Ortamı Spyder(5.1.5) IDE'sinin bilgisayara yüklenerek çalışmalara başlanmıştır. Python versiyon 3.11.0 kullanılmıştır.

Python programlama için Spyder IDE'si kullanılmıştır. Python programında, uygulamanın Firebase veritabanı ile bağlantısı kurulmuştur. Alınan görüntüde analiz yapılacak bölge kırılarak, kırılan bölgenin ortalama R, G, B kanal yoğunlukları ve bu değerlerden Z-Skor değeri hesaplanmıştır. Etiket değer aralıkları oluşturmak için her konsantrasyondan 10 tekrarla alınan sonuçlar sonuç değerine göre sınıflandırılmıştır. En son kontrol denemeleri gerçekleştirilerek çalışma tamamlanmıştır.

3.6.3. Görüntü Alım Kutusunun Tasarımı

Alınacak fotoğrafta stabilite oluşturmak için sabit ışık yoğunluğu ve sabit mesafe oluşturulması için bir çekim kutusu kullanılmıştır (Şekil 3.4). Programlanan geliştirme kartının en iyi netlikte 10 cm'lik mesafeden fotoğrafı aldığı belirlenmiştir. Bu nedenle kart ile mikroakışkan arasında 10 cm'lik mesafe olacak şekilde bir kutu tasarımı gerçekleştirilmiştir. Görüntü alım kutusunun boyutları; 18x10x8 cm'dir.



Şekil 3.4: Çekim kutusu, (a) Görüntü alım kutusunun dışardan görünümü, (b) Kutu içerisinde mikrodnetleyici/geliştirme kartının yerleşimi, (c) Mikrodnetleyici/geliştirme kartının çalışır durumu.

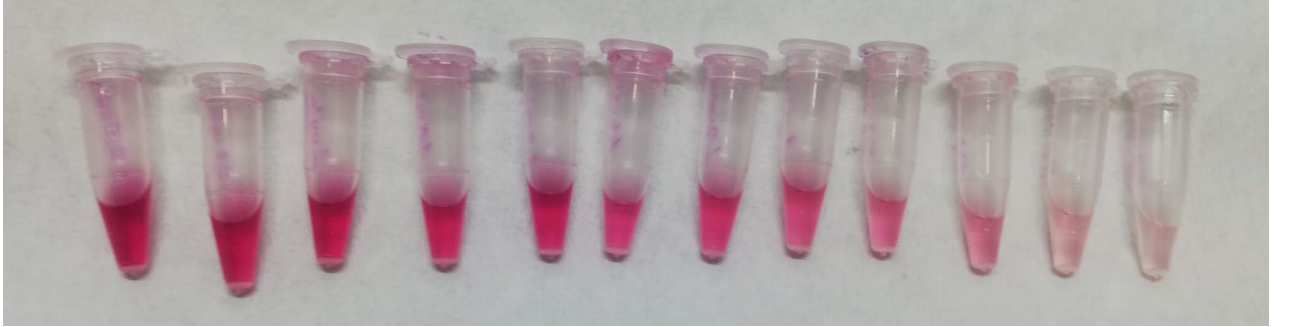
]

4. BULGULAR

Tez çalışmasında yapılan deneyler sonucunda, No. 3 Whatman kağıdı ve kalın filtre kağıdı sıvı iletimini uzun sürelidir ve yüksek oranlarda numune hacmi gerektirmiştir bu nedenle 3 cm yol uzunluğu ve 0,2 cm yol genişliği olarak şekilde No. 4 Whatman kağıdı mikroakışkan tabaka üretimi için uygun görülmüştür.

4.1. MAVİ TETRAZOLYUM ÇALIŞMALARI

İlgili yöntem öncelikle eppendorf tüpleri içerisinde değerlendirilmiştir. Bu aşamada tüp içerisine 100 uL tetrametilamonyum hidroksit ve 100 uL mavi tetrazolyum çözeltisi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra uygun konsantrasyonlarda kortizol stoğu eklenmiş ve tekrar vortekslenmiştir. Reaksiyon 10 dakika sonra dengeye ulaşmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen renkler Şekil 4.1' de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.1: Sırasıyla 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.8, 0.4, 0.2 uL/mL kortizon içeren stokların uygun oranlarda renk reaktifi ile reaksiyonu sonrasında ortaya çıkan renk skalası.

4.2. MİKROAKIŞKAN TABAKA DESENLEMESİ ÇALIŞMALARI

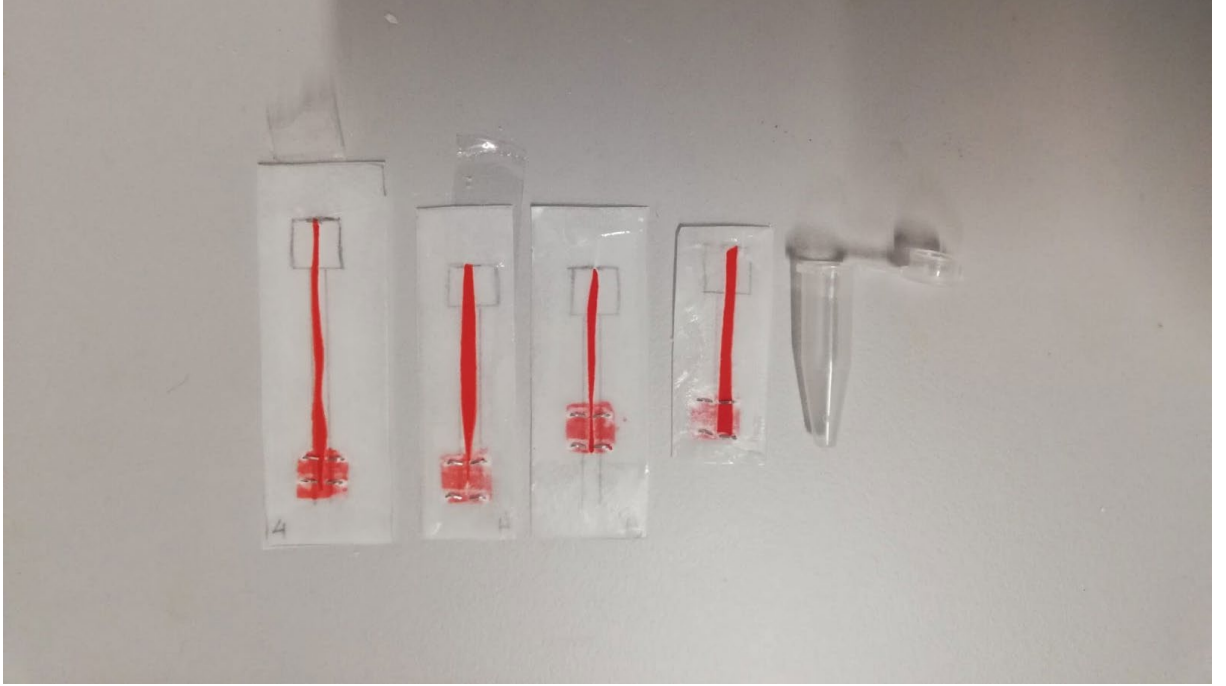
Mikroakışkan desenlemesinde uygun süre ve miktarı belirlemek amacıyla No. 3 ve No. 4 Whatmann kağıtları ve kalın filtre kağıtlarında desenlemeler gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Parafin Yöntemi Çalışmaları

Mikroakışkan tabaka üzerinde 5-4-3 cm'lik yol uzunlukları ve 0.2-0.3 cm'lik yol genişlikleri oluşacak şekilde desenlemeler gerçekleştirilmiştir ve gıda boyası ile renklendirilmiş su ile akış süreleri belirlenmiştir. Ter emici bölgeler ise 1 cm² 'lik mikroakışkan tabaka üretiminde kullanılan kağıtlar ile özdeş şekilde düzenlenmiştir. Ter emici bölgeler akışkanın başlangıç

noktasına sabitlenmiş ve ter emici bölge haricinde herhangi bir bölgeden sıvı girişini engellemek adına mikroakışkan tabakanın arka yüzeyi maskeleme bandı ile kapatılmıştır. Bu yöntem öncelikle parafin ile hidrofobikleştirme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve farklı numune hacimleri uygulanarak kağıt seçimi gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışma prosedürleri Tablo 4.1 'de verilmiştir.

10 mikroakışkan üretimi için 3 gr parafin cam petri içerisinde 42°C de eritildikten sonra daldı-çıkart yöntemi ile parafin desenleme gerçekleştirilmiştir. Parafin desenlemesinin sonuçları Şekil 4.2'de gösterildiği gibidir.



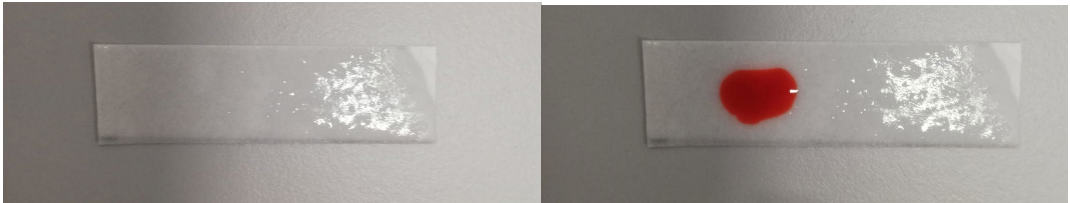
Şekil 4.2: Parafin ile desenleme gerçekleştirilen No. 4 Whatmann Kağıtlarının gıda boyası ile renklendirilmiş su ile denenmesi çalışmasını gösteren şekil.

Tablo 4.1: Mikroakışkan tabaka üretiminde kullanılacak kağıt seçiminin gerçekleştirilmesi için gerçekleştirilen çalışma sonuçları.

Uygulanan Numune Hacmi (uL)	Kullanılan Filtre Kağıdı	Yol Uzunluğu(cm)	Yol Genişliği (cm)	Reaktif Bölgesine Varış Süresi (sn)	Ter Emici Bölge Boyutu (cm ²)
35	No: 4 Whatmann Kağıdı	5	0,2	135	1
35	No: 4 Whatmann Kağıdı	4	0,3	94	1
35	No: 4 Whatmann Kağıdı	3	0,2	39	1
35	No: 4 Whatmann Kağıdı	3	0,3	28	1
70	No: 3 Whatmann Kağıdı	5	0,2	170	1
35	No: 3 Whatmann Kağıdı	4	0,2	98	1
35	No: 3 Whatmann Kağıdı	3	0,2	72	1
70	No: 3 Whatmann Kağıdı	3	0,3	85	1
35	Kalın Filtre Kağıdı	5	0,2	45	1
35	Kalın Filtre Kağıdı	4	0,2	28	1
70	Kalın Filtre Kağıdı	3	0,3	39	1
70	Kalın Filtre Kağıdı	3	0,2	30	1

4.2.2. Agar Temelli Termoplastik ile Hidrofobikleştirme Çalışmaları

Kesilmiş olan filtre kağıtlarının üzerine daldır çıkart yöntemi ile uygulanan agar temelli termoplastikte hızlı bir şekilde donma gerçekleşmiştir. Agar uygulanmış kağıt üzerine gıda boyası ile renklendirilmiş su uygulanmıştır (Şekil 4.3). Bu yöntem ile hidrofobikleştirme gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3: Termoplastik yöntemi ile hidrofobikleştirme sonuçlarını gösteren şekil.

4.2.3. HMDS ile Hidrofobik Desenleme Çalışmaları

HMDS-HCl ve HMDS-NH₃ ile muamele edilmiş whatman kağıtlarının ısıtma yöntemi ile hidrofobikleştirme çalışmalarının sonuçları aşağıdaki Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te verilmiştir.

HMDS-HCl solüsyonu ile muamele edilen kağıtlar çalkalamalı su banyosunda 8 saat inkübe edilmesinde hidrofobikleşme görülmüştür. HMDS- NH₃ solüsyonu ile muamele edilen kağıtlar çalkalamalı su banyosunda ve etüvde 8 saat inkübe edilmesinde hidrofobikleşme görülmüştür.

Tablo 4.2: Isıtma yöntemi ile HMDS-HCl ve HMDS-NH₃ ile muamele edilmiş kağıtların hidrofobikleştirme çalışma sonuçlarını gösteren tablo.

Prosedür	Kullanılan Solüsyon	Yöntem	Süre(saat)	Hidrofobikleşme	Sıvı Temas Açısı
Isıtma	HMDS- HCl	Çalkalamalı Su Banyosu	2	Yok	-
		Çalkalamalı Su Banyosu	4	Yok	-
		Çalkalamalı Su Banyosu	6	Yok	-
		Çalkalamalı Su Banyosu	8	Var	92±4°
	HMDS- HCl	Etüv	2	Yok	-
		Etüv	4	Yok	-
		Etüv	6	Yok	-
		Etüv	8	Yok	-
	HMDS- NH ₃	Çalkalamalı Su Banyosu	2	Yok	-
		Çalkalamalı Su Banyosu	4	Yok	-
		Çalkalamalı Su Banyosu	6	Yok	-
		Çalkalamalı Su Banyosu	8	Var	98±4°
	HMDS- NH ₃	Etüv	2	Yok	-
		Etüv	4	Yok	-
		Etüv	6	Yok	-
		Etüv	8	Var	105±1°

Tablo 4.3: Mikrodalga yöntemi ile HMDS-HCl ve HMDS-NH₃ ile muamele edilmiş kağıtların hidrofobikleştirme çalışma sonuçlarını gösteren tablo.

Prosedür	Kullanılan Filtre Kağıdı	Kullanılan Solüsyon	Elektromanyetik Dalga Gücü (W)	Süre (dakika)	Hidrofobikleşme	Sıvı Temas Açısı
Mikrodalga Işınlama	No:3 Whatman Kağıdı No:4 Whatman Kağıdı Kalın Filtre Kağıdı	HMDS- HCl	270	1	-	-
				5	-	-
				10	-	-
			450	1	+	96±4°
				5	-	-
				10	-	-
			600	1	-	-
				5	-	-
				10	+	99±4°
			900	1	-	-
				5	+	108±4°
				10	+	112±4°
	No:3 Whatman Kağıdı No:4 Whatman Kağıdı Kalın Filtre Kağıdı	HMDS-NH ₃	270	1	-	-
				5	-	-
				10	-	-
			450	1	-	-
				5	-	-
				10	-	-
			600	1	-	-
				5	-	-
				10	-	-
			900	1	-	-
				5	+	102±4°
				10	+	109±4°

4.3. KAĞIT ÇALIŞMALARI

No 4. Whatmann kağıdı ve marketten alınmış pamuk esaslı ter emici ped, No 1. Whatmann Kromatografi kağıdı, İnce Tabaka Kromatografisi (Thin-layer chromatography) kağıdı, nitroselüloz membran ve Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıtları 1cm2 'lik kareler halinde kesilmiştir. Kağıtların üzerine 50 uL tetrametilamonyum hidroksit çözeltisi ve 50 uL mavi tetrazolyum, ter emici pedlerden kesilmiş olan karelerin üzerine ise 100 uL tetrametilamonyum hidroksit çözeltisi ve 100 uL mavi tetrazolyum emdirilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Kağıtlar kuruduktan sonra farklı konsantrasyonlarda kortizol çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika beklenmiştir. Diğer kağıtlar üzerinde alınan renk oldukça düşüktür ancak pamuk esaslı pedler ve Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıtları üzerinden alınan renkler analiz için yeterli yoğunluğa sahiptir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8, ve 0,4 ug/mL konsantrasyonda kortizol ile renk reaktif bölgelerinin renk değişimini gösteren şekil.

4.4. TER EMİCİ BÖLGE OLUŞTURULMASI

Çalışma kapsamında reaksiyon bölgesi olarak seçilmiş kağıtların emicilik kapasitelerine göre kullanıcıdan toplanması gereken numune miktarı hesaba katılarak ter emici bölge seçimi yapılması gerekmektedir. Çalışma kapsamında seçilmiş kağıtların sıvı emme kapasiteleri hesaplanmıştır. Çalışma ile ilgili sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Kullanılan kağıtların sıvı emme kapasitesini gösteren tablo.

	Sıvı Emme Kapasitesi(uL)
No 4. Whatmann kağıdı	40
No 1. Whatmann Kromatografi kağıdı	42
İnce Tabaka Kromatografisi kağıdı	38
Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıdı	35
Kalın Filtre Kağıdı	30
Pamuk Esaslı Ter Emici Ped	50

4.5. MİKROAKIŞKAN DÜZENLENMESİ ÇALIŞMALARI

Renk reaktifleri 30 uL olacak şekilde kağıtlara sırası ile uygulanmıştır. Ter emici bölge ve kanallanmış mikroakışkana kanal sonlarına ve ters yüzeylere bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Terin yalnızca tek bir noktadan mikroakışkan tabakaya girişi için mikroakışkan kanallarından; ter emici bölgenin yerleştirildiği yüzeydeki kanal maskeleme bandı yardımıyla kapatılmıştır. Kortizol uygulandıktan sonraki renk değişimi Şekil 4.5’ te gösterilmiştir.

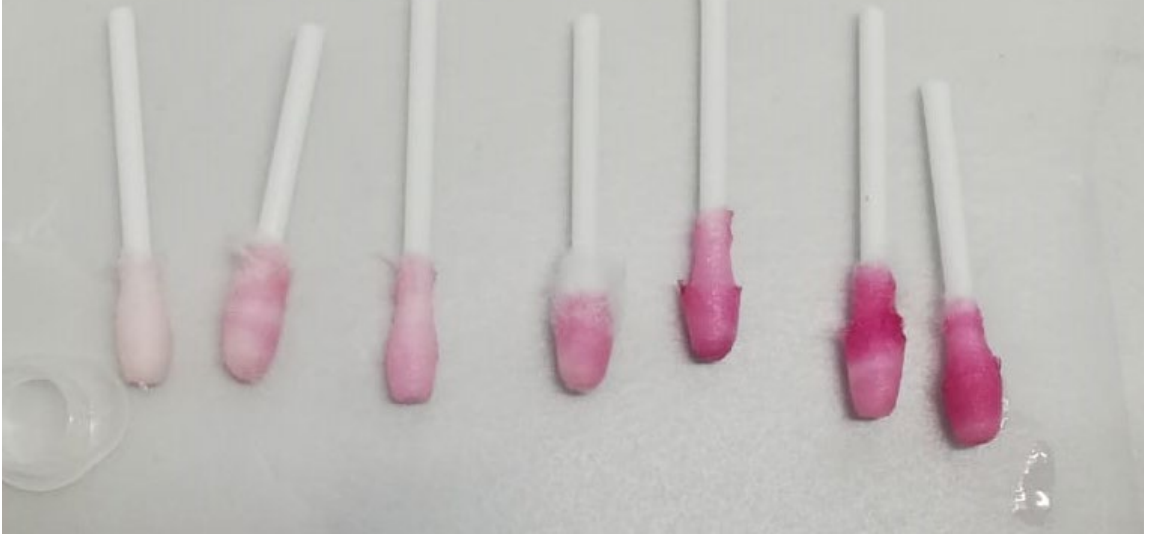


Şekil 4.5: Hidrofobikleştirilerek kanallanmış mikroakışkan tabakaların ter emici bölge ve reaktif bölgeler ile birleştirilerek Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8, 0,4 ve 0,2 ug/mL’lik konsantrasyonlarda kortizol ile reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan renk ve mikroakışkan sistemi gösteren şekil.

Tasarlanan sistem içerisinde kullanılan reaktif bölgelerinde uzun zamanlı stabilite yakalanmamıştır. Reaktif bölgeleri olarak kullanılan çeşitli özelliklerdeki emici bölgeler kortizol ile reaksiyona girmeden önce, 1 gün içerisinde hava ile temas ve selüloz ile reaksiyon meydana gelmesi sebebiyle şeffahtan mora doğru renklenmektedir. Bu nedenle kullanılan sistem efektif olarak kullanıcı kullanımına uygun değildir. Bu nedenle tasarımda değişiklik oluşturulmuştur. Yeni tasarlanan sistem ile giyilebilir mikroakışkan tabaka aracılığı ile kullanıcıdan toplanacak ter örnekleri toplanacak ve mikroakışkan tabaka çıkartılarak, oluşturulacak kit içerisinde bulunan reaktif solüsyonuna batırılacak ve 10 dakika süreyle bekletilecektir. Bekleme sonrasında mikroakışkan içerisinde ter örneklerinin toplandığı bölgede

renklenme meydana gelmektedir ve bu renklenme ile R(kırmızı), G(yeşil), B(mavi) kanal yoğunluk değerleri mikrodnetleyiciler ile analiz edilecek ve oluşturulacak bilgisayar uygulaması üzerinden veriler kullanıcı ile paylaşılacaktır.

Yeni tasarım üzerinde yapılan çalışmalarda tasarımın doğruluğunu test etmek amacıyla öncelikle eküvyon çubuğu ile denenmiştir (Şekil 4.6).



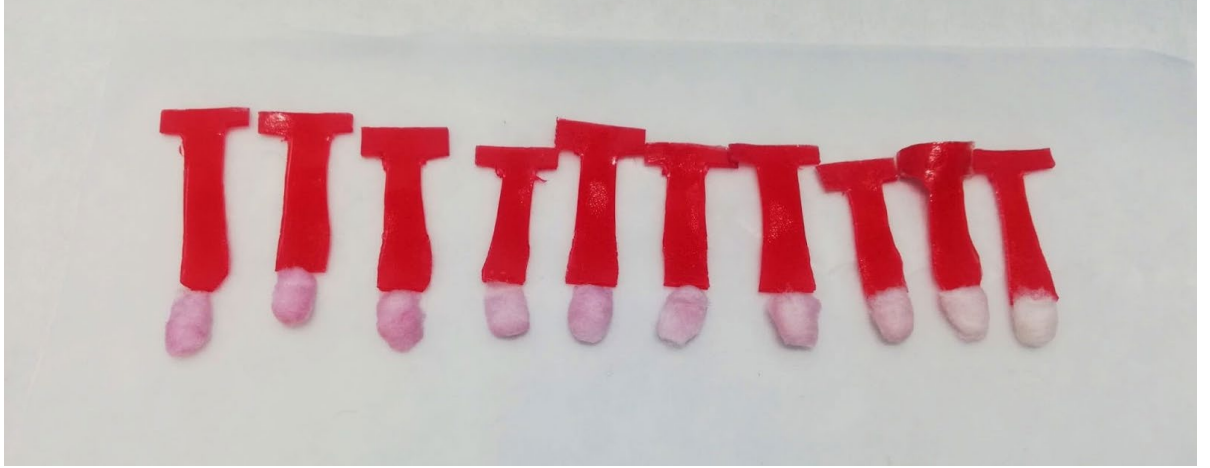
Şekil 4.6: Yeni tasarlanan sistemin doğruluğunu göstermek amacıyla gerçekleştirilen çalışmada sırasıyla 2-5-10-20-30-40-50 ug/ml’lik konsantrasyona sahip kortizol örnekleri renk analiz çalışmalarını gösteren şekil.

Ön denemeler ile sistemin ilgili mantıkta başarı ile çalıştığı gözlemlenmiştir. Sistemi mikroakışkan temelli tasarımında, çift katlı maskeleme bandı içerisinde 2,5 cm lik yol uzunluğuna sahip No 4. Whatman kağıdı ter örneğinin toplanarak numune bölgesine aktarımını sağlamak için kullanılmıştır. Ter emici bölge olarak kalın filtre kağıdı, numune toplanma bölgesi olarak ise pamuk esaslı ter emici ped kullanılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Mikroakışkan sistem tasarımını gösteren şekil.

Oluşturulan mikroakışkanların ter toplama alanlarına saf su ile oluşturulmuş farklı kortizol konsantrasyonlarına sahip solüsyonlardan 60 uL uygulanmış ve numune toplama bölgesine aktarımın sağlanması için 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakika sonra mikroakışkanlar eppendorf tüpleri içerisinde hazırlanmış olan sıvı reaktife batırılmış ve 10 dakika sonra çıkartılarak fotoğraflanmıştır. Renk değişimini Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8: Tasarlanan sistemin, sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,8 ve 0,4 ug/mL konsantrasyona sahip kortizol ile renk reaksiyonunu gösteren şekil.

4.6.MİKRODENETLEYİCİ KURULUMU VE PROGRAMLANMASI

Esp 32 geliştirme kartının FTDI üzerinden USB kablosu ile bilgisayara bağlantısı gerçekleştirilmiş ve Arduino IDE’si seri port ekranından Esp 32 geliştirme kartının sorunsuz çalıştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



```

Çıkış Seri Port Ekranı X
Mesaj ('AI Thinker ESP32-CAM' - 'COM5'a mesaj göndermek için Enter'a basın)
.....
load:0x40080400,len:6388
entry 0x400806b4
Connecting to WiFi...
Connecting to WiFi...
Connecting to WiFi...
SPIFFS mounted successfully
IP Address: http://192.168.1.8
Token info: type = id token (GITKit token), status = on request
Token info: type = id token (GITKit token), status = ready

```

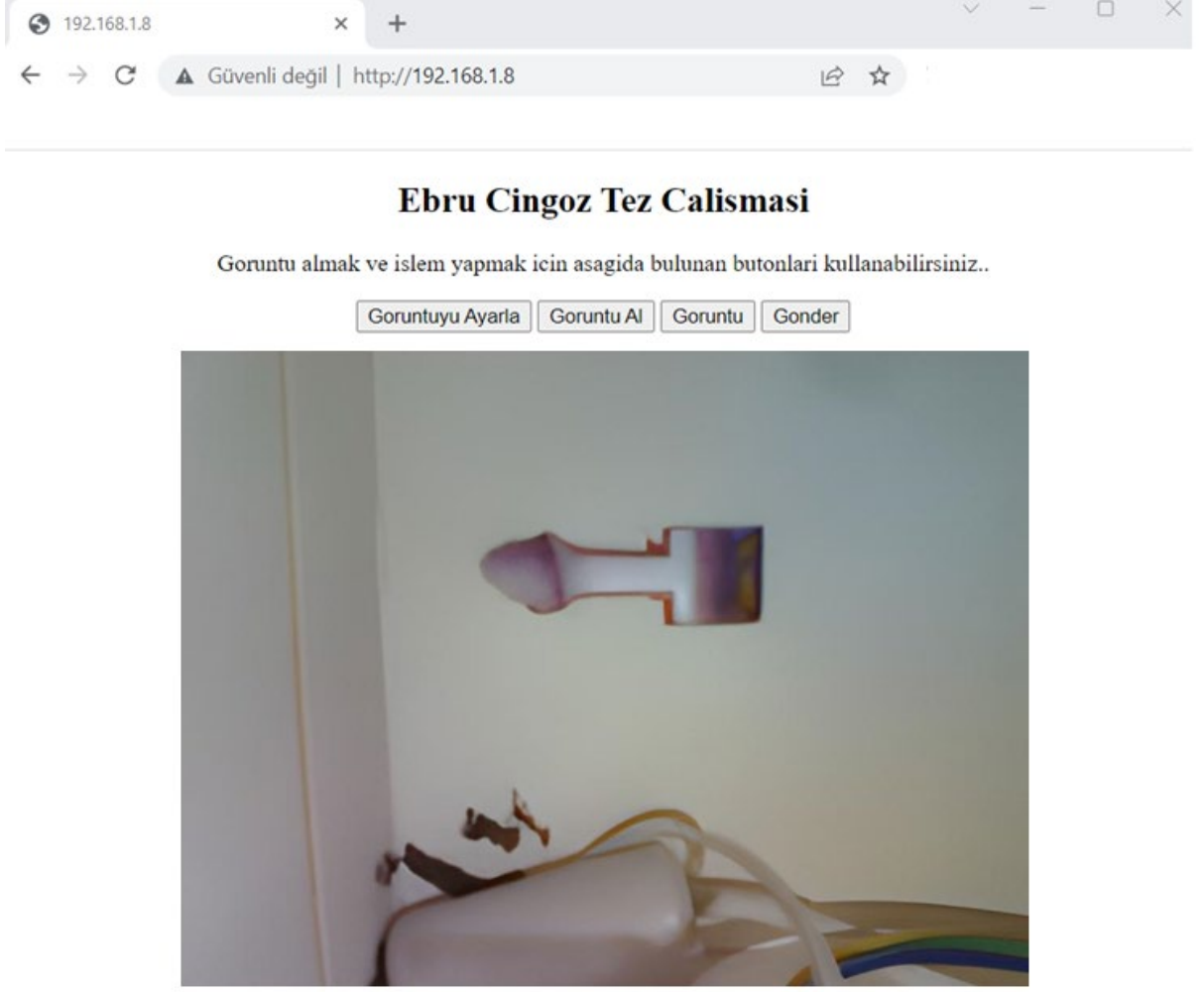
Esp 32 kartı Wifi ile Web sunucusuna bağlanıyor

Bağlantı başarılı şekilde gerçekleşti

Erişim adresi

Şekil 4.9: ESP 32 geliştirme kartının web sunucusuna bağlanması, Arduino IDE seri port ekranından bağlantının gözlemlenmesi.

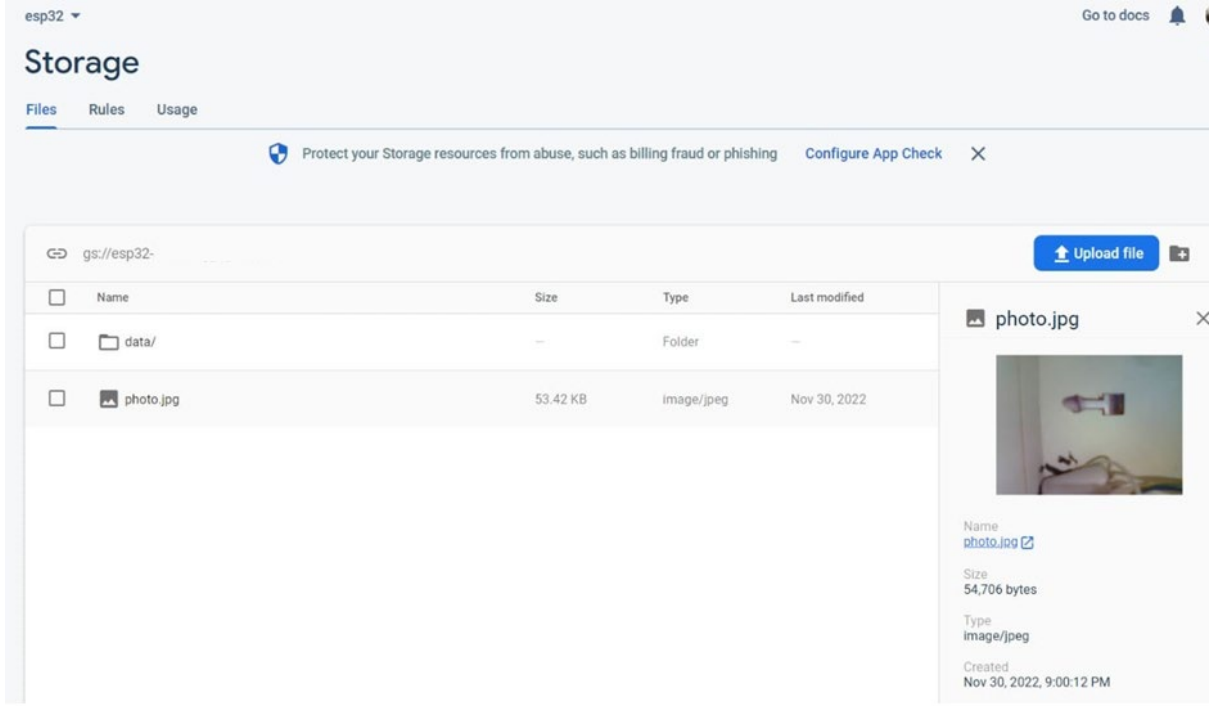
Programın kurulumu esnasında Seri Port Ekranında oluşturulan erişim adresi, Web tarayıcıya yazılarak çalıştırılmıştır. Şekil 4.10’da bu bağlantı tamamlandıktan sonra açılan arayüz gösterilmektedir. Arayüz üzerinde bulunan butonlardan “Görüntü Al” seçilince, kutu içerisinde bulunan Esp 32 geliştirme kartı görüntüyü alır ayrıca görüntünün çekilme tarihi, ismi, dosya formatı, büyüklüğü de geçici bellekte depolanır. Eğer bu aşamada herhangi bir işlem gerçekleştirilmez, çalışma sayfası kapatılır veya yeni görüntü alınırsa kaydedilen görüntü silinir. “Görüntüyü Göster” butonu seçilirse geçici olarak depolanan görüntü kullanıcıya gösterilir. Eğer kullanıcı alınan görüntüyü kullanım için uygun bulursa “Gönder” butonunu seçer ve geçici bellekte bulunan verilerin Firebase platformuna yönlendirilmesi sağlanır (Şekil 4.11). Firebase platformuna gönderilen görüntü ve görüntüye ait bilgiler Şekil 4.12’de olduğu gibi tutulmaktadır.



Şekil 4.10: Web Sunucu üzerinden Esp 32 geliştirme kartını kontrol etmeyi sağlayan arayüz ve alınan görüntü.

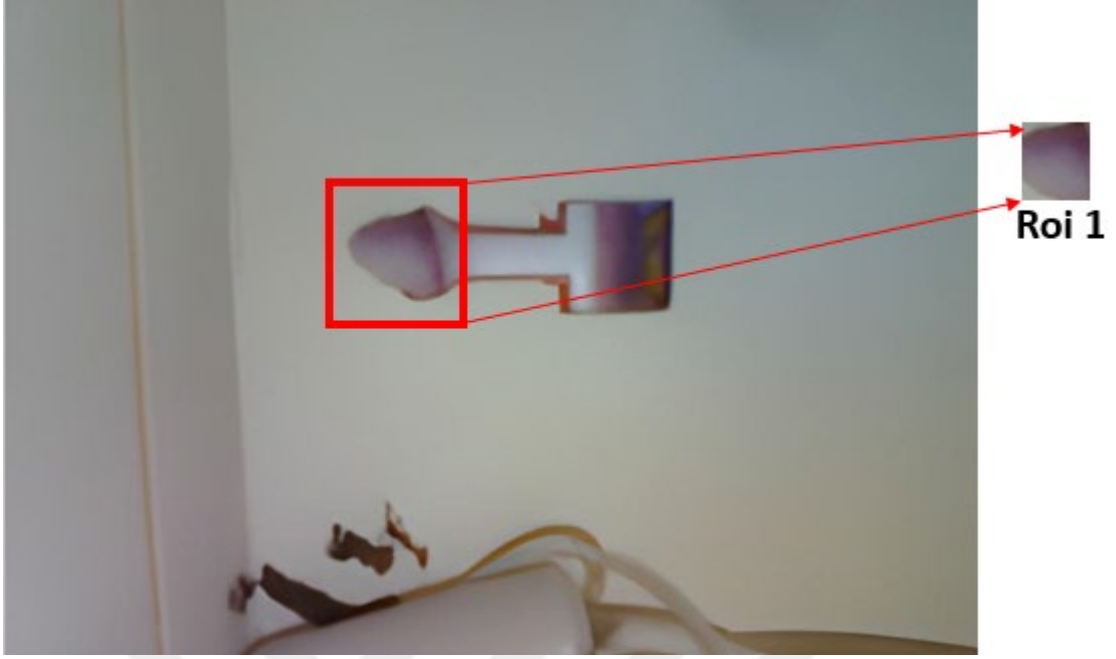
```
Taking a photo...
Picture file name: /photo.jpg
The picture has been saved in /photo.jpg - Size: 93440 bytes
Uploading picture...
Download URL: https://firebasestorage.googleapis.com/v0/b/esp32-4141e.appspot.com/o/photo.jpg?alt=media&token=2bf1c357-c576-4a9f-bc23-5360913db0ad
```

Şekil 4.11: Arayüzde gerçekleştirilen işlemlerin geçici depolama alanında tutulduğunu ve firebase platformuna gönderiminin seri port ekranı üzerinde gösterimi.



Şekil 4.12: Firebase platformuna kaydedilen görüntü ve görüntüye ait bilgiler.

Esp 32 geliştirme kartından alınan görüntüler doğrudan bilgisayarda bulunan depolama birimlerine kaydedilemez ya sd kart üzerinden ayrı bir depolama birimine ya da wifi bağlantı portu üzerinden web sunucuya aktarımı yapılabilir. Bu sebepten bu çalışmada alınan görüntüyü bilgisayarda depolamak, analiz edilecek bölgeleri seçmek ve r,g,b kanal yoğunluklarının belirlenerek Z-skor değerlerinin belirlenmesi için Python programı kullanılmıştır. Firabase platformundan alınan ham görüntüden analiz yapılacak bölgeler Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Roi1 deki kanal yoğunluklarının ortalaması ve z-skor değeri Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13: Analiz edilecek bölgenin (Roi1) görüntüsü.

R:167
G:99
B:130
79.97955

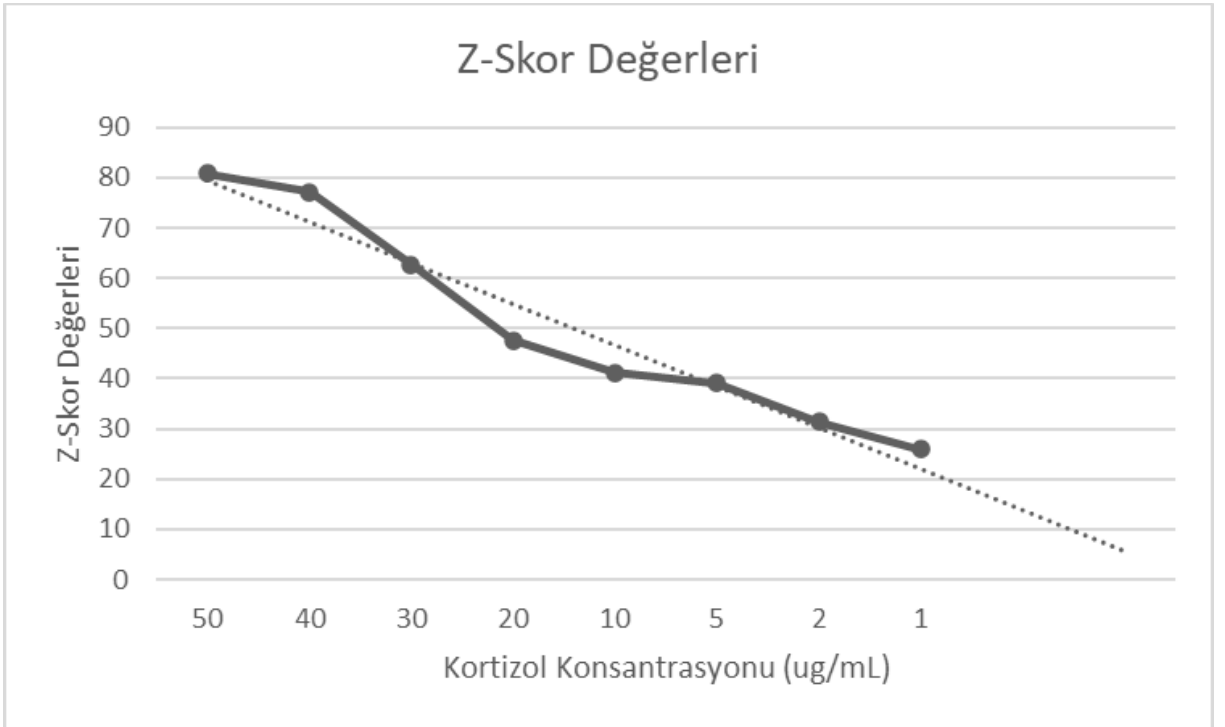
Şekil 4.14: Spyder konsol ekranındaki Roi1 ortalama RGB değeri ve Z-skor değerini gösteren şekil.

4.7.YAPAY TER ÖRNEKLERİNİN MİKROAKIŞKAN ÜZERİNDE DENENMESİ

Kortizol içeren yapay ter örnekleri mikroakışkan üzerine uygulanarak pH değişiminden kaynaklı renk kaybı olup olmadığı değerlendirilmiştir. pH değişikliklerinde herhangi bir şekilde renk yoğunluğunda bir değişim saptanmamıştır.

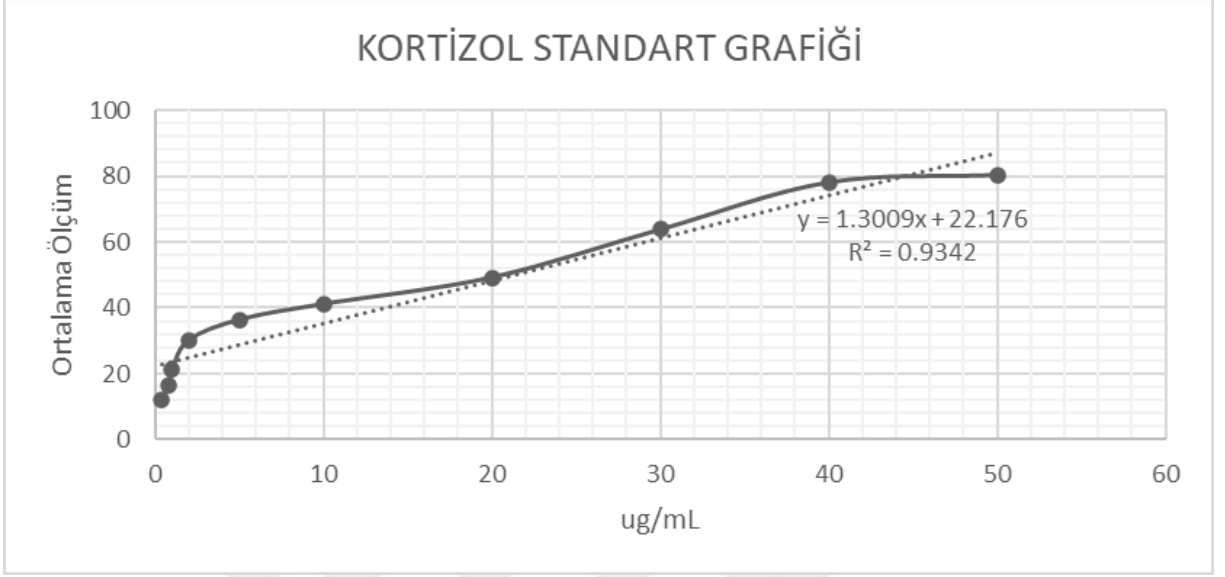
4.8.VALİDASYON ÇALIŞMALARI

İlgili sistem, 10 tekrarlı olarak denenmiş ve reaksiyon bölgelerinin RGB değerleri oluşturulmuş olan kapalı sistem ve sabit ışık ortamında oluşturulmuş mikrodenetleyici temelli sistem ile fotoğraflanmış ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RGB değerlerinin yorumlanması aşamasında Z-skor (Standartlaştırma) kullanılmıştır. Z-skor değeri; $z = \frac{X - \mu}{\sigma}$ formülü ile hesaplanır. Z-skor, bir değer ile bir dizi değerlerin ortalaması arasındaki ilişkiyi açıklayan sayısal bir ölçüdür [116]. Kısaca Z-Skor değeri bir veri noktasının ortalamadan kaç standart sapma uzağında olduğunu bir ölçüsü olduğu söylenebilir. Z-skorları, ortalamadan standart sapmalar olarak ölçülür. 0 Z puanı, veri noktasının ortalama puanla aynı puana sahip olduğu anlamına gelir. Bu yöntem ile her konsantrasyon için oluşan renk için farklı bir katsayı elde edilmiştir ve elde edilen katsayı değerlerine göre konsantrasyon ayrımları sağlanmıştır. Z- Skor Değerlerinin konsantrasyona göre değişimi Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15: Validasyon çalışmaları sonucunda ortaya çıkan Z-skor katsayıları ile kortizol konsantrasyonları arasındaki bağlantıyı gösteren grafik.

Validasyon çalışmalarında her örnek 10 tekrarlı olarak çalışılmıştır ve kortizol standart grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Kortizol konsantrasyonu ve etiket aralıklarını gösteren standart grafik.

Çalışma kapsamında eğim, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: Kortizol RGB değerlerinin validasyon sonuç değerlerini gösteren tablo.

Kortizol Validasyon Sonuç Raporu	
Birleşik Standart Sapma	2,765629067
Eğim	212.332.384.424.498
Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD)	0,390749966
Tayin Sınırı (TS, LOQ)	1,172249898
Standart Grafik Denklemini	$y = 21.233x + 3.3922$
R2 değeri	$R^2 = 0.9439$

Belirlenebilir etiket aralık değerleri ise Tablo 4.6'deki gibidir.

Tablo 4.6: Oluşturulan sistem ile belirlenebilen konsantrasyon değerlerini gösteren tablo.

Belirlenebilir Etiket Aralıkları	
50	ng/mL
40	ng/mL
30	ng/mL
20	ng/mL
10	ng/mL
5	ng/mL
2	ng/mL
1	ng/mL
0,8	ng/mL

Her ug/mL için çalışılan örneklerin kendi aralarındaki korelasyonu için standart sapma, varyasyon, bağıl standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri incelenmiştir.

Tablo 4.7: Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.8 ug/mL, n=10 için gerçekleştirilen validasyon sonuçları.

50 ug/mL	
Standart Sapma (s)	0,662748834
Varyans (s ²)	0,439236017
Bağıl Standart Sapma (RSD)	1,508867234
Varyasyon Katsayısı	150,8867234
Etiket Aralığı	79.45733-81.64688

40 ug/mL	
Standart Sapma (s)	1,287411716
Varyans (s ²)	1,657428926
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,776752291
Varyasyon Katsayısı	77,67522912
Etiket Aralığı	74.996944-79.847878

Tablo 4.7(devamı): Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.8 ug/mL, n=10 için gerçekleştirilen validasyon sonuçları.

30 ug/mL	
Standart Sapma (s)	2,058650398
Varyans (s2)	4,238041462
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,485755134
Varyasyon Katsayısı	20,8182106
Etiket Aralığı	54.623752-70.617808

20 ug/mL	
Standart Sapma (s)	2,799559391
Varyans (s2)	7,837532784
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,357199066
Varyasyon Katsayısı	35,71990661
Etiket Aralığı	43.147088- 52.271786

10 ug/mL	
Standart Sapma (s)	1,203181454
Varyans (s2)	1,447645611
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,831129832
Varyasyon Katsayısı	83,11298323
Etiket Aralığı	38.410248-42.870638

5 ug/mL	
Standart Sapma (s)	2,24180767
Varyans (s2)	5,02570163
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,446068596
Varyasyon Katsayısı	44,6068596
Etiket Aralığı	32.907808-39.867084

Tablo 4.7(devamı): Sırasıyla 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.8 ug/mL, n=10 için gerçekleştirilen validasyon sonuçları.

2 ug/mL	
Standart Sapma (s)	1,752836372
Varyans (s ²)	3,072435346
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,570503908
Varyasyon Katsayısı	57,0503908
Etiket Aralığı	26.93363-33.44529

1 ug/mL	
Standart Sapma (s)	2,826891729
Varyans (s ²)	7,991316845
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,353745419
Varyasyon Katsayısı	35,37454194
Etiket Aralığı	17.394198-25.924386

0.8 ug/mL	
Standart Sapma (s)	2,007717889
Varyans (s ²)	4,030931121
Bağıl Standart Sapma (RSD)	0,498077945
Varyasyon Katsayısı	49,80779449
Etiket Aralığı	13.186178-20.536012

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

[Tez kapsamında yürütülen çalışmalar 4 temel aşamada incelenecek olursa; İlk aşama olan mavi tetrazolyum yöntemi ile kolorimetrik reaksiyonun gerçekleştirilmesi ve optimize edilmesi aşaması başarıyla tamamlanmıştır. Renk yoğunluğu şeffaftan macentaya doğru olup konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir şekilde artmaktadır. 0,8 ng/ml’lik konsantrasyonda renk değişimi gözlemlenmiştir. Ethan Tu ve ekibinin bildirdiği gibi insan ter örneklerinde (8/142 ng/mL) çalışmaya uygun bulunmuştur [51]. Eppendorf tüpleri içerisinde hava teması olmaması durumunda renk yoğunluğu 1 haftaya kadar stabildir. Mavi tetrazolyum yöntemi 10 tekrarlı olarak çalışılmış ve belirli kortizol konsantrasyonlarında alınan renkler RGB değer okuması yolu ile valide edilmiştir.

İkinci aşama olan mikroakışkan tabaka tasarımıyla kullanılacak kağıt ve mikroakışkan tasarımı No 4. Whatmann kağıdı ve marketten alınmış pamuk esaslı ter emici ped, No 1. Whatmann Kromatografi kağıdı, İnce Tabaka Kromatografisi (Thin-layer chromatography) kağıdı, nitroselüloz membran ve Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıtları ve kalın filtre kağıdı kullanılmıştır. Kağıtlar ile ter emici bölge, hidrofobikleştirme ve reaksiyon alanı oluşturma çalışmaları yürütülmüştür. Bu aşamada; reaksiyon alanı her kağıdın emicilik düzeyinin birbirinden farklı olması sebebiyle, tüm kağıtlar üzerinde farklı miktarlarda reaktif emdirilerek çalışılmıştır. Reaktif bölge olarak denenmiş pamuk esaslı pedler ve Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıtları renk yoğunluğunu daha yüksek oranda yansıtması sebebiyle başarılı olarak kabul edilmiştir. Seçilmiş olan iki reaktif bölgesinin sıvı tutuş miktarının birbirinden farklı olması, mikroakışkan tasarımıyla kullanıcıdan toplanması ve reaktif bölgesine iletilmesi gereken ter numunesi miktarını değiştirmektedir. Bu bağlamda; emici pamuk esaslı pedler üzerinde gözlemlenebilir renk değişiminin meydana gelmesi için minimum 50 uL’lik örnek gerekirken Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıdı için gerekli olan numune miktarı 35 uL olarak belirlenmiştir. Belirlenmiş olan bu miktarlar ter emici bölgede kullanılacak kağıdın seçilmesi ve mikroakışkan içerisinde numunenin alacağı yolun belirlenmesinde kullanılmıştır. İlgili miktarlara göre; No 4. Whatmann kağıdı ve marketten alınmış pamuk esaslı ter emici ped, No 1. Whatmann Kromatografi kağıdı, İnce Tabaka Kromatografisi (Thin-layer chromatography) kağıdı ve Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıdı ve kalın filtre kağıdının 1*1 cm karelik boyutlarında sıvı emicilik kapasiteleri belirlenmiştir. Buna göre; kalın filtre kağıdı 30 uL ile en düşük, pamuk esaslı ter emici ped ise

50 uL ile en yüksek sıvı emme kapasitesine sahiptir. Kullanıcıdan daha yüksek oranda numune toplanması ve reaksiyon bölgesine iletilmesi için ter emici bölgenin, en yüksek sıvı emme kapasitesine sahip olan pamuk esaslı ter emici ped olarak kullanılmasının verimli olacağı belirlenmiştir.

Üçüncü aşama olan mikroakışkanın hidrofobikleştirilmesi çalışmalarında parafin yöntemi, HMDS-HCl ve HMDS-NH₃ yöntemi ve termoplastik olarak bildirilen ve literatürde mikroakışkan hidrofobikleştirilmesi için kullanılmamış olan agar agar yöntemi denenmiştir. HMDS yönteminde; HMDS-HCl ile mikrodalga yoluyla 900 GHz ile 10 dakika işlenmesi ile $112 \pm 4^\circ$ su temas açısı ile en yüksek hidrofobikleştirmeyi göstermiştir. Elde edilen sonuçlar Soheil Malekghasemi'nin çalışmasını desteklemektedir [117]. Ancak literatürde ısıtma metodunda HMDS ile yapılan deneyler, 150° 'den büyük temas açısıyla $80-500^\circ\text{C}$ 'de silika filmler ve alüminyum oksit yüzeylere yapılmıştır [68,81]. Selüloz tabanlı Whatman kağıdı üzerinde alüminyum oksit ve silika yüzeylerdeki kadar yüksek bir oranda temas açısı oluşturulamamıştır [118,119].

Termoplastik yöntemi ile gerçekleştirilen hidrofobikleştirmede su temas açısı $90 \pm 4^\circ$ olarak, parafin yönteminde ise $150 \pm 4^\circ$ olarak belirlenmiştir. Ancak parafin ile hidrofobikleştirilmiş kağıtların esneme oranları çok düşüktür. Giyilebilir cihaz olarak tasarımı durumunda çeşitli çatlamlar meydana gelmektedir. Bu nedenle parafin yönteminin kullanımı uygun değildir. HMDS yönteminde ise direkt olarak cilde temas olması ve Simon L. Cassidy ve ekibinde yaptığı çalışma ile gösterdiği gibi HMDS'nin toksisitesinin bulunması sebebiyle kullanımı tercih edilmemiştir [120].

Bu nedenle termoplastik yöntemi ile hidrofobikleştirme yönteminin kullanılması mikroakışkan tabakanın en yüksek verim ile kullanılmasında avantajlı olarak kabul edilmiştir. Literatürde termoplastikler ilaç kaplama ve ambalaj, yenilebilir gıda paketleri [121] olarak kullanılsada mikroakışkan tabaka hidrofobikleştirme konusunda bir çalışma bulunmamaktadır.

Dördüncü aşamada reaktif bölgelerinin oluşturulması bulunmaktadır. Mavi tetrazolyumun nanopartiküller olmaksızın direkt olarak mikroakışkanlara immobilize edilmesi konusunda literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Reaktif bölgelerinin oluşturulmasında pamuk esaslı pedler ve Whatmann Glass Microfiber Filtre kağıtları kullanılmıştır. Ancak reaktif

bölgeleri üzerinde bir stabilite yakalanmamıştır. Oksitlenme ve selüloz ile reaksiyon sebebi ile kortizol uygulanmadan renk değişimi meydana gelmektedir.

Reaktif bölgeleri oluşturulduktan sonra 1 gün sonrasında hava teması ve selüloz ile reaksiyon nedeni ile renklenme meydana gelmektedir. Bu nedenle kullanılan reaktif bölgeleri için herhangi bir raf ömrü belirtmek mümkün olmamaktadır. Stabilite sorunu nedeni ile geliştirilen yeni model, ter numunelerinin toplanması ve reaktif solüsyonuna batırıldıktan sonra renk oluşumunun fotoğraflanarak RGB değer okumasının sağlanmasıdır. Bu modelde reaktif bölgelerine farklı oranlarda kortizol konsantrasyonlarına sahip çözeltiler ile muamele edildiğinde renk oranı konsantrasyon ile doğru orantılı bir şekilde artış göstermektedir. Oluşturulmuş alkali ve asidik yapay ter örnekleri ile gerçekleştirilen çalışmada ise oluşabilecek pH farklılıklarının (5.5- 8 arasında) renk gelişim düzeyini etkilemediği belirlenmiştir. Çalışma 10 tekrarlı olarak denenmiş ve oluşturulmuş sabit ışık altında ESP 32 CAM geliştirme kartı ile fotoğraflanarak RGB yoğunlukları belirlenmiş ve validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Açık kaynaklı yazılım ve donanımlar bilimsel ve ticari prototipleştirme aşamalarında oldukça önemlidir. Maliyetleri düşük ve kapsamı geniştir. Bu tür kaynaklar akademik ve endüstriyel gelişim için büyük rol üstlenmektedir. Tez kapsamında kullanılan ve açık kaynaklı geliştirme kartlarından olan ESP 32 Cam modülünün görüntüye dayalı işlemlerde kullanımı muadillerine göre oldukça yenidir fakat taşıdığı potansiyel itibarıyla ilerleyen dönemlerde kullanımının artacağı düşünülmektedir. 2020 yılında Mingdian Liu ve ekibinin gerçekleştirdiği çalışmada, literatürde bulunan diğer çalışmalardan farklı olarak ESP 32 Cam modülünün yalnızca wifi, bluetooth ile veri aktarım özelliğinin dışında kamera modülü aktif olarak kullanılmıştır [108]. Ancak bu tez çalışmasında da kullanılan ESP 32 Cam modülünün en büyük dezavantajı içerdiği kamera donanımının yüksek çözünürlükte olmamasıdır. Bunun yanında kart üzerinde yerleşik wifi modülünün internet bağlantı noktalarından uzaklaştıkça bağlantı kalitesinin düşmesinden dolayı bu durumun üstesinden gelmek için ekstra modül gereklilikleri doğmaktadır. Bu teknik sorunların aşılması için ekstra çalışmalar gerekmektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilmiş çalışmalarda daha düşük konsantrasyonlarda ve ara değerlerde kolorimetrik belirleme mümkün olmasına rağmen ESP 32 Cam modülünün kamera özelliklerinden dolayı kolorimetrik algılamada sınırlamalar meydana gelmiştir.

Esp 32 Cam modülü ile fotoğraflanarak mikroakışkan üzerinden alınan RGB değerleri standart skor/ Z-skoru ile değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler ile popülasyon aritmetik ortalaması

arasındaki farkın popülasyon standart sapmasına bölünmesiyle Z-Skor elde edilmiştir ve etiket aralıkları belirlenmiştir. Z-Skor değerleri grafiğine (Şekil 4.15) göre kortizol konsantrasyonu ile Z-Skor değerleri arasında doğru orantı bulunmaktadır. Aynı şekilde kortizol konsantrasyon artışının, her konsantrasyon için hesaplanan Z-Skor değerlerinin ortalamaları ile orantılı olduğu kortizol standart grafiği (Şekil 4. 16) 'nde gösterilmiştir.

Validasyon için değerlendirilen kriterler; Harris'in Quantitative Chemical Analysis talimatlarındaki gibi gerçekleştirilmiştir [122]. Popülasyon standart sapmasının (σ) tahmini değeri olan birleşik standart sapma (s birleşik) hesaplanır. Bu değer, tekil s değerlerinin ağırlıklı ortalamasıdır. s'nin güvenilirliğini artırmak için birleşik standart sapma kullanılmıştır. Bu değer, tekil s değerlerinin ağırlıklı ortalamasıdır. Gözlenebilme Sınırı (GS, LOD) Bir analitik yöntemin performansı genellikle gözlenebilme sınırı ile ölçülür. Analitik ölçümdeki konsantrasyon çok düşükse, yanıt tanıkla aynıdır. Pratikte tespit limiti, en az on tanık çözümü için ölçülen sinyalin standart sapmasının üç katı alınarak hesaplanmıştır. Tespit sınırını belirlemek için bu değer 3 katı alınarak önerilen standart grafiğin eğimine bölünerek standart sapma değeri hesaplanmıştır. Algılama sınırı (TS, LOQ) Algılama sınırının tekrarlanabilirliği çok düşük olduğundan, gerçek algılama sınırı bazen LOD değerinin 5 katı, bazen 9 katı veya 10 katıdır ve buna algılama sınırıdır. Bu limit için önemli bir kriter, kabul edilebilir nispi standart sapma değeridir. Sağlıklı testler için, saptama sınırının en az 3 katı konsantrasyonlar gereklidir. Bu nedenle tespit limiti tespit limitinin 3 katı olarak hesaplanmıştır [119]. Birleşik standart sapma %0,028 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık açısından yüksek bir benzerlik oranı taşımaktadır. Regresyon doğrusunun eğimi yani X_i değişkeni bir birim değiştiği takdirde Y_i 'nin ne kadar değişeceğini gösteren değerdir. Eğim 21,23 olarak hesaplanmıştır. 50,40,30,20,10,5,2,1,0.8 ug/mL değerlerinde etiket aralıkları arasındaki fark ile eğim değerinin ve sistem içinde belirlenmiş etiket aralıklarının birimsel değişimleri arasındaki anlamlılık bulunmuştur. Bunların yanında konsantrasyon ve Z-Skor aralıkları kendi içerisinde değerlendirilmiştir. En düşük standart sapma ve varyans sırası ile 50ug/mL de 0.66- 0.44, 1 ug/mL' de ise 2,83- 7,99 olarak hesaplanmıştır, buna göre güven aralık değeri en düşük konsantrasyon 50 ug/mL en yüksek konsantrasyon ise 5 ug/mL'dir. Etiket aralıkları yani Z-Skor değerleri incelendiğinde ise 5 ug/mL ve 10 ug/mL arasında 1,73, 40 ug/mL ve 50 ug/mL arasında ise 0,39'luk bir çakışma ortaya çıkmaktadır.

Mikroakışkan tabakaların biyoteknoloji çalışmalarla geliştirilmesi, sağlık uygulamalarında kullanılması son yıllarda oldukça popülerdir bunun temel sebeplerinden biri gittikçe zenginleşen teknoloji uygulamalarının günümüzde büyük ve yüksek maliyetleri cihazların yerini doldurabilecek minimal ve daha uygun maliyetli sistemleri destekler olma niteliğinden kaynaklanmaktadır. Tez çalışmamızda bu gerekçeyi güçlendirecek bir sistem oluşturduk. Sistem ELISA gibi yüksek maliyetli ve uzun çalışma süreleri gerektiren, tecrübeli personel ihtiyacı bulunduran sistemlerden farklı olarak uygun maliyetli, yüksek hassasiyette ve pratiktir. |



KAYNAKLAR

- [1] Hiller-Sturmhöfel, S., & Bartke, A. (1998). The endocrine system: an overview. *Alcohol health and research world*, 22(3), 153.
- [2] Muda, N. E., Bakar, M. A. A., & Majlis, B. Y. (1999). The Use of Electronic Sensor in Hormone Analysis. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 6(2), 12.)
- [3] Dalirirad, S., & Steckl, A. J. (2019). Aptamer-based lateral flow assay for point of care cortisol detection in sweat. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283, 79-86.)
- [4] Lu, L., Zhang, J., Xie, Y., Gao, F., Xu, S., Wu, X., & Ye, Z. (2020). Wearable health devices in health care: Narrative systematic review. *JMIR mHealth and uHealth*, 8(11), e18907.
- [5] Royea, R., Buckman, K. J., Benardis, M., Holmes, J., Fletcher, R. L., Ng, E. Y. K., ... & Ellenhorn, J. D. (2020). An introduction to the Cyncadia Breast Monitor: A wearable breast health monitoring device. *Computer methods and programs in biomedicine*, 197, 105758.
- [6] Rafiquzzaman, M. (2018). *Microcontroller Theory and Applications with the PIC18F*. John Wiley & Sons.
- [7] Stapleton, W. A. (2011). Development Of A Library For Teaching And Implementing Resource-Limited Embedded Systems. In *Proceedings of the International Conference on Embedded Systems, Cyber-physical Systems, and Applications (ESCS)* (p. 1). The Steering Committee of The World Congress in Computer Science, Computer Engineering and Applied Computing (WorldComp).
- [8] Gridling, G., & Weiss, B. (2007). Introduction to microcontrollers. *Vienna University of Technology Institute of Computer Engineering Embedded Computing Systems Group*.
- [9] Güven, Y., Coşgun, E., Kocaoğlu, S., Gezici, H., & Yılmazlar, E. (2017). Understanding the concept of microcontroller based systems to choose the best hardware for applications.
- [10] Hintz, K., & Tabak, D. (1992). *Microcontrollers: architecture, implementation, and programming*. McGraw-Hill, Inc..
- [11] Kondaveeti, H. K., Kumaravelu, N. K., Vanambathina, S. D., Mathe, S. E., & Vappangi, S. (2021). *Computer Science Review*.
- [12] Vis, D. J., Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C., Roelfsema, F., Van der Greef, J., Hendriks, M. M., & Smilde, A. K. (2014). Network identification of hormonal regulation. *PLoS One*, 9(5), e96284.
- [13] Hiller-Sturmhöfel, S., & Bartke, A. (1998). The endocrine system: an overview. *Alcohol health and research world*, 22(3), 153.
- [14] Collins J. 2000, *ADRENAL GLANDS*, <https://www.yourhormones.com/adrenal-glands/>, [Ziyaret tarihi: 8 Mayıs 2022]

- [15] Kargi, A. Y., & Iacobellis, G. (2014). Adipose tissue and adrenal glands: novel pathophysiological mechanisms and clinical applications. *International Journal of Endocrinology*, 2014.
- [16] Thau, L., Gandhi, J., & Sharma, S. (2022). Physiology, Cortisol.[Updated 2021 Sep 6]. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*.
- [17] Ramsdell, J. W., Berry, C. C., & Clausen, J. L. (1983). The immediate effects of cortisol on pulmonary function in normals and asthmatics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 72(1), 69-74.
- [18] Mosavat, M., Ooi, F. K., & Mohamed, M. (2014). Stress hormone and reproductive system in response to honey supplementation combined with different jumping exercise intensities in female rats. *BioMed Research International*, 2014.
- [19] Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans. *Cao Y, Bender IK, Konstantinidis AK, Shin SC, Jewell CM, Cidlowski JA, Schleimer RP, Lu NZBlood*. 2013 Feb 28; 121(9):1553-62.
- [20] Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *Busillo JM, Azzam KM, Cidlowski JAJ Biol Chem*. 2011 Nov 4; 286(44):38703-38713)
- [21] Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Franchimont D Ann N Y Acad Sci*. 2004 Jun; 1024():124-37.)
- [22] Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, Seo DY, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J Pflugers Arch*. 2012 Dec; 464(6):549-59
- [23] Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art. *Nussinovitch U, de Carvalho JF, Pereira RM, Shoenfeld Y Curr Pharm Des*. 2010; 16(32):3574-85.)
- [24] Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 34(9), 518-530.
- [25] Karakaş E. 2000 *Cushing sendromu nedir? Belirtileri ve tedavileri nelerdir?* , <https://www.medicalpark.com.tr/cushing-sendromu/hg-1720>, [Ziyaret tarihi: 9 Mayıs 2022]
- [26] Altmeyer P. 2022, *Cushing's syndrome (overview)*, www.altmeyers.org, [Ziyaret tarihi: 10 Mayıs 2022]
- [27] Borsoi, L., Ludvik, B., Prager, G., Luger, A., & Riedl, M. (2014). Cushing's syndrome in a morbidly obese patient undergoing evaluation before bariatric surgery. *Obesity Facts*, 7(3), 191-196.
- [28] Nieman, L. K., & Turner, M. L. C. (2006). Addison's disease. *Clinics in Dermatology*, 24(4), 276-280.

- [29] Lightman, S. L., Birnie, M. T., & Conway-Campbell, B. L. (2020). Dynamics of ACTH and cortisol secretion and implications for disease. *Endocrine reviews*, 41(3), bnaa002.
- [30] Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), 589-601.
- [31] Torrente-Rodríguez, R. M., Tu, J., Yang, Y., Min, J., Wang, M., Song, Y., ... & Gao, W. (2020). Investigation of cortisol dynamics in human sweat using a graphene-based wireless mHealth system. *Matter*, 2(4), 921-937.
- [32] Murphy, B. E., & Jachan, C. (1968). Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein-binding radioassay. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 343-348.
- [33] Levine, A., Zagoory-Sharon, O., Feldman, R., Lewis, J. G., & Weller, A. (2007). Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiology & behavior*, 90(1), 43-53.
- [34] Zea, M., Bellagambi, F. G., Halima, H. B., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Villa, R., ... & Errachid, A. (2020). Electrochemical sensors for cortisol detections: Almost there. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116058.
- [35] Bellagambi, F. G., Lomonaco, T., Salvo, P., Vivaldi, F., Hangouët, M., Ghimenti, S., ... & Errachid, A. (2020). Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115781.
- [36] Jessop, D. S., & Turner-Cobb, J. M. (2008). Measurement and meaning of salivary cortisol: a focus on health and disease in children. *Stress*, 11(1), 1-14.
- [37] Jia, M., Chew, W. M., Feinstein, Y., Skeath, P., & Sternberg, E. M. (2016). Quantification of cortisol in human eccrine sweat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analyst*, 141(6), 2053-2060.
- [38] Baraket, A., Lee, M., Zine, N., Yaakoubi, N., Trivella, M. G., Zabala, M., ... & Errachid, A. (2012). Cytokine detection using diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates with integrated Ag/AgCl reference electrode. *Procedia Engineering*, 47, 1181-1184.
- [39] Stefan, R. I., Van Staden, J. F., & Aboul Enein, H. Y. (2000). Design and use of electrochemical sensors in enantioselective high throughput screening of drugs. A minireview. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 3(6), 445-454.
- [40] Neogen, *Cortisol ELISA Kit, Item No. 402710*, www.neogen.com, [Ziyaret tarihi:12 Haziran 2022]
- [41] Russell, E., Koren, G., Rieder, M., & Van Uum, S. H. (2014). The detection of cortisol in human sweat: implications for measurement of cortisol in hair. *Therapeutic drug monitoring*, 36(1), 30-34.
- [42] Duracova, M., Klimentova, J., Fucikova, A., & Dresler, J. (2018). Proteomic methods of detection and quantification of protein toxins. *Toxins*, 10(3), 99.

- [43] McKenna A. 2021, *Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)*, nationalmaglab.org, [Ziyaret tarihi:18 Haziran 2022]
- [44] Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(2), 569-582.
- [45] Carrell, C., Kava, A., Nguyen, M., Menger, R., Munshi, Z., Call, Z., ... & Henry, C. (2019). Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics. *Microelectronic Engineering*, 206, 45-54.
- [46] Dalirirad, S., Han, D., & Steckl, A. J. (2020). Aptamer-based lateral flow biosensor for rapid detection of salivary cortisol. *ACS omega*, 5(51), 32890-32898.
- [47] Zea, M., Bellagambi, F. G., Halima, H. B., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Villa, R., ... & Errachid, A. (2020). Electrochemical sensors for cortisol detections: Almost there. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116058.
- [48] Porter, C. C., & Silber, R. H. (1950). A quantitative color reaction for cortisone and related 17, 21-dihydroxy-20-ketosteroids. *Journal of Biological Chemistry*, 185(1), 201-207.
- [49] Singh, D. K., & Verma, R. (2008). Spectrophotometric determination of corticosteroids and its application in pharmaceutical formulation.
- [50] Guttman, D. E. (1966). Analysis of steroids in mixtures using the kinetics of blue tetrazolium reduction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(9), 919-922.
- [51] Tu, E., Pearlmutter, P., Tiangco, M., Derosé, G., Begdache, L., & Koh, A. (2020). Comparison of colorimetric analyses to determine cortisol in human sweat. *ACS omega*, 5(14), 8211-8218.
- [52] Olanrewaju, A., Beaugrand, M., Yafia, M., & Juncker, D. (2018). Capillary microfluidics in microchannels: from microfluidic networks to capillary circuits. *Lab on a Chip*, 18(16), 2323-2347.
- [53] Niculescu, A. G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2011.
- [54] Mani, N. K., Prabhu, A., Biswas, S. K., & Chakraborty, S. (2019). Fabricating paper based devices using correction pens. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- [55] Hamidon, N. N., Hong, Y., Salentijn, G. I., & Verpoorte, E. (2018). Water-based alkyl ketene dimer ink for user-friendly patterning in paper microfluidics. *Analytica chimica acta*, 1000, 180-190.
- [56] Lam, T., Devadhasan, J. P., Howse, R., & Kim, J. (2017). A chemically patterned microfluidic paper-based analytical device (C-μPAD) for point-of-care diagnostics. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

- [57] Soum, V., Park, S., Brilian, A. I., Kwon, O. S., & Shin, K. (2019). Programmable paper-based microfluidic devices for biomarker detections. *Micromachines*, 10(8), 516.
- [58] He, Y., Gao, Q., Wu, W. B., Nie, J., & Fu, J. Z. (2016). 3D printed paper-based microfluidic analytical devices. *Micromachines*, 7(7), 108.
- [59] Li, X., Tian, J., Garnier, G., & Shen, W. (2010). Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 76(2), 564-570.
- [60] Juang, Y. J., Chen, P. S., & Wang, Y. (2019). Rapid fabrication of microfluidic paper-based analytical devices by microembossing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283, 87-92.
- [61] Songok, J.; Tuominen, M.; Teisala, H.; Haapanen, J.; Mäkelä, J.; Kuusipalo, J.; Toivakka, M. Paper-Based Microfluidics: Fabrication Technique and Dynamics of Capillary-Driven Surface Flow. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 20060–20066.
- [62] Asano, H., & Shiraishi, Y. (2015). Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography. *Analytica Chimica Acta*, 883, 55-60.
- [63] Faresjö, T., Strömberg, S., Jones, M., Stomby, A., Karlsson, J. E., Östgren, C. J., ... & Theodorsson, E. (2020). Elevated levels of cortisol in hair precede acute myocardial infarction. *Scientific Reports*, 10(1), 1-8.
- [64] Yamada, J., Stevens, B., de Silva, N., Gibbins, S., Beyene, J., Taddio, A., ... & Koren, G. (2007). Hair cortisol as a potential biologic marker of chronic stress in hospitalized neonates. *Neonatology*, 92(1), 42-49.
- [65] Dalirirad, S., & Steckl, A. J. (2019). Aptamer-based lateral flow assay for point of care cortisol detection in sweat. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283, 79-86.
- [66] Kinnamon, D., Ghanta, R., Lin, K. C., Muthukumar, S., & Prasad, S. (2017). Portable biosensor for monitoring cortisol in low-volume perspired human sweat. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- [67] San Nah, J., Barman, S. C., Zahed, M. A., Sharifuzzaman, M., Yoon, H., Park, C., ... & Park, J. Y. (2021). A wearable microfluidics-integrated impedimetric immunosensor based on Ti3C2Tx MXene incorporated laser-burned graphene for noninvasive sweat cortisol detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 329, 129206.
- [68] Naik, A. R., Zhou, Y., Dey, A. A., Arellano, D. L. G., Okoroanyanwu, U., Secor, E. B., ... & Watkins, J. J. (2022). Printed microfluidic sweat sensing platform for cortisol and glucose detection. *Lab on a Chip*, 22(1), 156-169.
- [69] Koesdjojo, M. T., Pengpumkiat, S., Wu, Y., Boonloed, A., Huynh, D., Remcho, T. P., & Remcho, V. T. (2015). Cost effective paper-based colorimetric microfluidic devices and mobile phone camera readers for the classroom. *Journal of Chemical Education*, 92(4), 737-741.
- [70] Strong, E. B., Schultz, S. A., Martinez, A. W., & Martinez, N. W. (2019). Fabrication of miniaturized paper-based microfluidic devices (MicroPADs). *Scientific reports*, 9(1), 1-9.

- [71] Juang, Y. J., Li, W. S., & Chen, P. S. (2017). Fabrication of microfluidic paper-based analytical devices by filtration-assisted screen printing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 80, 71-75.
- [72] Bruzewicz, D. A., Reches, M., & Whitesides, G. M. (2008). Low-cost printing of poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical chemistry*, 80(9), 3387-3392.
- [73] Aydar, A. Y., & BAĞDATLIOĞLU, N. (2014). Yemeklik Yağların Yüzey Gerilimi ve Temas Açılarının Belirlenmesinde Uygulanan Yöntemler. *Akademik Gıda*, 12(1), 108-114.
- [74] Güven, Y., Coşgun, E., Kocaoğlu, S., Gezici, H., & Yılmazlar, E. (2017). Understanding the concept of microcontroller based systems to choose the best hardware for applications.
- [75] Anonim, 2017, Basics of Microcontrollers – History, Structure and Applications <https://www.electronicshub.org/>, [23.09.2022]
- [76] Gridling, G., & Weiss, B. (2007). Introduction to microcontrollers. Vienna University of Technology Institute of Computer Engineering Embedded Computing Systems Group.
- [77] Ibrahim, D. 2006, Microcontroller Based Applied Digital Control, Wiley, J. , 1, ISBN: 9780470863350, 1-25.
- [78] Anonim, 2022, Physical Computing, <https://guides.temple.edu/>, [23.09.2022]
- [79] Aqeel, A., 2018, What is a Microcontroller? Programming, Definition, Types & Examples, <https://www.theengineeringprojects.com/>, [24.09.2022]
- [80] Rankovska, V. V. (2021, September). Review of Open-source Microcontroller and Programmable Logic Development Boards. In 2021 XXX International Scientific Conference Electronics (ET) (pp. 1-4). IEEE.
- [81] Ivanova E, Iliev T and Stoyanov I 2020 Modelling and simulation of big data networks, 7th International Conference on Energy Efficiency and Agricultural Engineering (EE&AE), Ruse, pp 1-4, doi: 10.1109/EEAE49144.2020.9278783
- [82] Balabanova, I. S., Kostadinova, S. S., Markova, V. I., Sadinov, S. M., & Georgiev, G. I. (2021). Voice control and management in smart home system by artificial intelligence. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 1032, No. 1, p. 012007). IOP Publishing.
- [83] McRoberts M., Beginning Arduino, (second ed.), Apress, USA (2013)
- [84] D'Ausilio Alessandro, Arduino: A low-cost multipurpose lab equipment, Behav. Res. Methods, 44 (2012), pp. 305-313, 10.3758/s13428-011-0163-z
- [85] What Is Arduino? Available online: <https://www.arduino.cc/en/Guide/Introduction> (10.2022).

- [86] A Comparison of Popular Arduino Boards. <https://maker.pro/arduino/tutorial/a-comparison-of-popular-arduino-boards> (10.2022).
- [88] Yusuf. Badamasi, The working principle of an Arduino, 2014, pp. 1-4, 10.1109/ICECCO.2014.6997578.
- [89] Leo Louis, Working principle of arduino and u sing it, Int. J. Control. Autom., Commun. Syst. (IJCACS), 1 (2) (2016), pp. 21-29
- [90] Ruiyan Cai, Principle and application of Arduino, Electron. Des. Eng., 16 (047) (2012), 2012.s
- [91] Kondaveeti, H. K., Kumaravelu, N. K., Vanambathina, S. D., Mathe, S. E., & Vappangi, S. (2021). A systematic literature review on prototyping with Arduino: Applications, challenges, advantages, and limitations. *Computer Science Review*, 40, 100364.
- [92] Gay, W. (2017). Custom Raspberry Pi Interfaces: Design and build hardware interfaces for the Raspberry Pi. Apress.
- [93] Rivas-Sánchez, Y. A., Moreno-Pérez, M. F., & Roldán-Cañas, J. (2019). Environment control with low-cost microcontrollers and microprocessors: Application for green walls. *Sustainability*, 11(3), 782
- [94] Sarath Kumar, 2019, Different Types of Raspberry Pi Models Comparison, <https://www.factoryforward.com/>, [04.09.2022]
- [95] KOCER, S., DUNDAR, O., & BUTUNER, R. (2021). Programmable Smart Microcontroller Cards.
- [96] Kurniawan, A. (2019). Internet of Things Projects with ESP32. Packt Publishing.
- [97] Kolban, N. (2018). Kolban's book on ESP32. <https://leanpub.com/kolban-ESP32>
- [98] Espressif Systems. (2021d). ESP32-S2 Family Datasheet v1.3. https://www.espressif.com/sites/default/files/documentation/esp32-s2_datasheet_en.pdf
- [99] Ai-Thinker Technology, 2017, ESP32-CAM Module, <https://loboris.eu/>, [07.09.2022]
- [100] Kondaveeti, H. K., Kumaravelu, N. K., Vanambathina, S. D., Mathe, S. E., & Vappangi, S. (2021). A systematic literature review on prototyping with Arduino: Applications, challenges, advantages, and limitations. *Computer Science Review*, 40, 100364.
- [101] Ferdoush, S., & Li, X. (2014). Wireless sensor network system design using Raspberry Pi and Arduino for environmental monitoring applications. *Procedia Computer Science*, 34, 103-110.
- [102] Gad, H. E., & Gad, H. E. (2015). Development of a new temperature data acquisition system for solar energy applications. *Renewable energy*, 74, 337-343.

- [103] Sugathan, A., Roy, G. G., Kirthyvijay, G. J., & Thomson, J. (2013, December). Application of Arduino based platform for wearable health monitoring system. In 2013 IEEE 1st International Conference on Condition Assessment Techniques in Electrical Systems (CATCON) (pp. 1-5). IEEE.
- [104] Xuemei, L., Liangzhong, J., & Jincheng, L. (2008, May). Home healthcare platform based on wireless sensor networks. In 2008 International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine (pp. 263-266). IEEE.
- [105] Sagahyroon, A., Raddy, H., Ghazy, A., & Suleman, U. (2009). Design and implementation of a wearable healthcare monitoring system. *International journal of electronic healthcare*, 5(1), 68.
- [106] Wu, F., Zhao, H., Zhao, Y., & Zhong, H. (2015). Development of a wearable-sensor-based fall detection system. *International journal of telemedicine and applications*, 2015.
- [107] Wahane, V., & Ingole, P. V. (2016, November). An android based wireless ecg monitoring system for cardiac arrhythmia. In 2016 IEEE Healthcare Innovation Point-Of-Care Technologies Conference (HI-POCT) (pp. 183-187). IEEE.
- [108] Liu, M., Zhao, Y., Monshat, H., Tang, Z., Wu, Z., Zhang, Q., & Lu, M. (2020). An IoT-enabled paper sensor platform for real-time analysis of isothermal nucleic acid amplification tests. *Biosensors and Bioelectronics*, 169, 112651.
- [109] Sabbir, A. S., Bodroddoza, K. M., Hye, A., Ahmed, M. F., Saha, S., & Ahmed, K. I. (2016, December). Prototyping Arduino and Android based m-health solution for diabetes mellitus patient. In 2016 International Conference on Medical Engineering, Health Informatics and Technology (MediTec) (pp. 1-4). IEEE.
- [110] Romeo Jr Jorda, K. E. B., Buban, C., De Los Reyes, M. A., Maingat, A., Oledan, M. J., & Tolentino, L. K. (2019). Ovulation hormonal imbalance recognition system using saliva's conductivity analysis based on potentiometric method. *Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science*, 16(1), 176-183.
- [111] Triwiyanto, I. D. G. H. W., & Sumber, E. Y. (2021, September). Embedded Web server of Uroflow Meter Based on IoT Technology. In 2021 International Seminar on Application for Technology of Information and Communication (iSemantic) (pp. 161-166). IEEE.
- [112] Chaowadee, N., Lertsiriyothin, P., Phuangkhemkhao, T., & Chanwimalueang, T. (2021, May). Reinforced Learning in Children through a Stress Warning Unit. In 2021 2nd Information Communication Technologies Conference (ICTC) (pp. 386-389). IEEE.
- [113] Sha, R., Kadu, A., Matsumoto, K., Uno, S., & Badhulika, S. (2020). Ultra-low cost, smart sensor based on pyrite FeS₂ on cellulose paper for the determination of vital plant hormone methyl jasmonate. *Engineering Research Express*, 2(2), 025020.
- [114] Rui Santos, 2019, ESP32-CAM Take Photo and Display in Web Server, <https://randomnerdtutorials.com/>, [01.07.2022].

- [115] Sara Santos, 2022, ESP32-CAM Save Picture in Firebase Storage, <https://randomnerdtutorials.com/>, [18.07.2022].
- [116] Dr. Saul McLeod , 2019, Z-Score: Definition, Calculation and Interpretation, www.simplypsychology.org, [10.05.2021]
- [117] Malekghasemi, S. (2015). Kağıt-Tabanlı Biyosensör Tasarımı ve Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Nanoteknoloji-Nanotıp Ana Bilim Dalı.
- [118] N. Tasaltin, D. Sanli, A. Jonáš, A. Kiraz, and C. Erkey, "Preparation and characterization of superhydrophobic surfaces based on hexamethyldisilazane-modified nanoporous alumina.," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, p. 487, 2011.
- [119] J. T. Luo, W. F. Wu, H. C. Wen, B. Z. Wan, Y. M. Chang, C. P. Chou, J. M. Chen, and W. N. Chen, "The roles of hydrophobic group on the surface of ultra low dielectric constant porous silica film during thermal treatment," *Thin Solid Films*, vol. 515, pp. 7275–7280, 2007.
- [120] Cassidy, S. L., Dotti, A., Kolesar, G. B., Dochterman, L. W., Meeks, R. G., & Chevalier, H. J. (2001). Hexamethyldisiloxane: A 13-week subchronic whole-body vapor inhalation toxicity study in Fischer 344 rats. *International journal of toxicology*, 20(6), 391-399.
- [121] Bandyopadhyay, S., Saha, T., Sanétrník, D., Saha, N., & Saha, P. (2021). Thermo Compression of Thermoplastic Agar-Xanthan Gum-Carboxymethyl Cellulose Blend. *Polymers*, 13(20), 3472.
- [122] Harris, D. C., 1995. Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman, New York, 750 s.

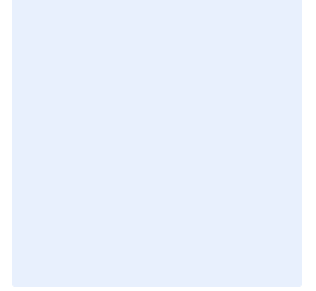
EKLER

|



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ebru Cingöz
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	19.06.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	