



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YANAL AKIŞ TEST KİTLERİ İÇİN
ALTERNATİF TAYİN PEDİNİN ELDESİ

Ayşe BOYRAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Mayıs-2026
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşe BOYRAZ tarafından hazırlanan “Yanal Akış Test Kitleri İçin Alternatif Tayin Pedinin Eldesi” adlı tez çalışması 22/05/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

.....

Danışman

Prof. Dr. Erhan ZOR

.....

Üye

Prof. Dr. Haluk BİNGÖL

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 123Z712 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ayşe BOYRAZ

Tarih: 27.05.2026

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YANAL AKIŞ TEST KİTLERİ İÇİN ALTERNATİF TAYİN PEDİNİN ELDESİ

Ayşe BOYRAZ

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Erhan ZOR

2026, 75 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Erhan ZOR

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Prof. Dr. Haluk BİNGÖL

Yanal akış tanı teknolojisi, basit uygulama, yüksek algılama hızı, taşıma kolaylığı, hızlı sonuç alma gibi avantajları nedeniyle biyomedikal uygulama alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yanal akış test şeritleri numune pedi, konjugasyon pedi, tayin pedi (nitroselüloz membran) ve atık pedi olmak üzere 4 temel kısımdan oluşur. Nitroselüloz membran, yanal akış test sisteminde sinyalin üretildiği şeridin önemli bir bileşenidir. Nitroselüloz membranın performansı, bir test sonucunun doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini doğrudan etkilemektedir. Membranın temel özellikleri sıralandığında, homojen bir akışı kolaylaştırması, biyoreseptörü yakalamak için işlevselleştirilebilir bir katı yüzey sağlanması ve düşük spesifik olmayan etkileşim göstermesi ön plana çıkmaktadır. Çalışmanın amacı, hızlı tanı kitlerinin temel malzemesi olan nitroselüloz membranlara alternatif nitro-nanoselüloz membranın geliştirilmesidir. Nanoselüloz biyouyumluluk, optik şeffaflık, hidrofilitiklik, yüksek gözeneklilik, yüksek yüzey alanı ve yüksek mekanik dayanım gibi ayırt edici özellikler sergilemektedir. Çalışmada elde edilen nitro-nanoselüloz sahip olduğu bu özellikler ve nanoboyutta fiberler içermesi özelliği ile sağladığı geniş yüzey alanı sayesinde yüksek oranda test antikoru bağlama ve hem bu özelliği hem de optik şeffaflığı sayesinde hassasiyetin artırılması, spesifik olmayan etkileşimlerin engellenmesi, membran yüzeyinde akış için surfaktan ihtiyacının azalması gibi nitelikleri bir arada bulundurmaktadır. Çalışmada ilk olarak bakteriyel nanoselüloz elde edilmiş, nitrolanması ve karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Devamında altın nanopartikül sentezlenerek karakterize edilmiştir. Son olarak elde edilen nano-nitroselülozun hızlı test kitinde kantitatif analiz performansı incelenmiş olup ticari membran ile hazırlanan hızlı test kitinin performansı ile kıyaslanmıştır. Bu çalışmalarda model analit olarak insan immunoglobulin (HIgG) test edilmiştir. Kantitatif analiz sonucunda ticari membran ile hazırlanan test için teşhis sınırı (LOD) değeri 1,12 µg/mL ve tayin alt sınırı değeri (LOQ) 3,39 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen membran ile hazırlanan LFA için LOD ve LOQ sırasıyla 0,93 µg/mL ve 2,82 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen LFA'nın kısa ve uzun dönem kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve test cevabını 6 ay süresince eşit olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak ELISA yöntemiyle karşılaştırarak ve ticari yapay serum örneklerinde gerçekleştirilen LFA doğrulama testlerinde %90 - %107 aralığında elde edilen geri kazanım değerleri geliştirilen LFA'nın kantitatif analizlerde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Alternatif test membranı, İmmünosensör, Kağıt esaslı sensör, İnsan immunoglobulin, Yanal akış test.

ABSTRACT

MS THESIS

PREPARATION OF ALTERNATIVE DETECTION PAD FOR LATERAL FLOW ASSAYS

Ayşe BOYRAZ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER OF
SCIENCE IN DEPARTMENT OF NANOSCIENCE AND NANOENGINEERING**

Advisor: Prof. Dr. Erhan ZOR

2026, 75 Pages

Jury

Prof. Dr. Erhan ZOR

Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ

Prof. Dr. Haluk BİNGÖL

Lateral flow assay technology is widely used in the field of biomedical application due to its advantages such as simple application, fast detection speed, ease of transportation, and rapid results. Lateral flow test strips consist of 4 basic parts: sample pad, conjugation pad, determination pad (nitrocellulose membrane), and the absorption pad. The nitrocellulose membrane is an important component of the strip from which the signal is generated in the lateral flow assay. The performance of the nitrocellulose membrane directly affects the accuracy and repeatability of a test result. When the basic properties of the membrane are considered, facilitating a homogeneous flow, providing a functionalizable solid surface to capture the bioreceptor, and showing low non-specific interaction are important. The aim of this study is development of nano-nitrocellulose membrane, an alternative to nitrocellulose membranes, which is the basic material of rapid diagnostics. Nanocellulose exhibits distinctive properties such as biocompatibility, optical transparency, hydrophilicity, high porosity, high surface area and high mechanical strength. The nano-nitrocellulose obtained in this study will contribute to meeting the detection pad needs in rapid diagnosis kits due to these properties. In addition, its properties such as highest antibody binding thanks to its large surface area due to its large surface area, increasing sensitivity thanks to this feature and optical transparency, preventing non-specific interactions, and reducing the need for surfactant for flow on the membrane surface, compared to the nitrocellulose membranes available in the market, are the advantages of it. In this study, bacterial nanocellulose was first obtained, nitration and characterization were carried out, and then the drying process was performed. Subsequently, gold nanoparticles were synthesized and characterized. Finally, the qualitative and quantitative performance of nano-nitrocellulose in the kit was examined and compared to LFA consisting commercial nitrocellulose. As a result of quantitative analysis, the limit of detection (LOD) value for the test prepared with the commercial membrane was calculated as 1.12 µg/mL and the limit of quantification value (LOQ) as 3.39 µg/mL. For the LFA prepared with the membrane obtained in this study, LOD and LOQ were calculated as 0.93 µg/mL and 2.82 µg/mL, respectively. Short and long term stability studies of the developed LFI were carried out and it was found that the test response was equal even after 6 months. Comparing with the ELISA method, the LFA accuracy tests performed on commercial artificial serum samples, the recovery values obtained between 90% and 107% show that the developed LFA can be used for quantitative analysis.

Keywords: Lateral flow assay, alternative test membrane, Immunosensor, Paper-based sensor, human immunoglobulin G.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenim sürecinde danışmanlığımı yapan, tez çalışmamı belirleme, hazırlama ve yazma sürecinde yol gösteren, yüksek lisans hayatım ve tez yazma dönemim boyunca ilgi, sabır, anlayış ve çalışma azmi ile bana her zaman örnek olan, bilimsel çalışmalarında yol göstericim olan, başarılı bilim insanı kimliğinin yanında çok başarılı bir danışman olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Erhan ZOR'a bana sağladığı tüm imkan, kazanım ve hoşgörüsü için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bana her daim yardım eden, eksiklerimi gidermem hususunda beni aydınlatan, bana hem hoca hem de çalışma arkadaşı olan sabırlı, anlayışlı ve çok değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Eda GÜMÜŞ'E sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında bana destek olan işlerini azimle ve titizlikle yapan çalışma arkadaşım Gökberk ASLAN'a teşekkürlerimi sunar, hayatta başarılar dilerim.

Hayatım boyunca yanımda olan beni desteklerinden hiçbir zaman mahrum etmeyen, eğitim hayatımda her daim yardım eden, sevgilerini ve sabırlarını benden esirgemeyen sevgili aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Eğitim hayatımı koşulsuz destekleyen, çalışmalarında yanımda olup destek veren, yardımlarını esirgemeyen, anlayışıyla eğitim hayatımı kolaylaştıran ve beni hep cesaretlendiren sevgili eşim Hacı Ahmet BOYRAZ'a hayatımda olduğu için ve bu süreçte bana destek olduğu için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Araştırmamda bursiyer ve proje desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Ayşe BOYRAZ
KONYA-2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÇİZELGELER/TABLolar LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	11
2.1. İlgili Çalışmalar	11
2.2. Çalışma Konusu ile İlgili Ulusal ve Uluslararası Patent, Faydalı Model ve Tescil Taramaları.....	13
2.3. Çalışma Çıktısının Yenilikçi Yönü, Pazar ve Sektördeki Benzerlerine Göre Öngörülen Farklılık.....	16
2.4. Çalışma Çıktısının Ticari Önemi	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereçler.....	20
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	20
3.1.2. Kullanılan cihazlar	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Bakteriyel nanoselüloz eldesi	21
3.2.2. Bakteriyel nanoselülozün saflaştırılması	22
3.2.3. Bakteriyel nanoselülozün nitrolanması.....	23
3.2.4. Nitrolanmış bakteriyel nanoselülozün kurutulması	24
3.2.5. AuNPs'nin sentezi	25
3.2.6. AuNPs'nin yüzey fonksiyonlandırılması ve konjugasyon pedinin hazırlanması	26
3.2.7. LFA pedlerin hazırlanması	27
3.2.8. LFA kitinin oluşturulması.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Bakteriyel Nanoselülozün Karakterizasyonu.....	28
4.2. Nitrolanmış Bakteriyel Nanoselülozün Karakterizasyonu	29
4.3. AuNPs Karakterizasyonu.....	35
4.3.1. Topaklanma (agregasyon) testi	36
4.4. Elde Edilen Test Pedinin LFA Sisteminde Denenmesi	38
4.4.1. Yanal akış optimizasyonu	38
4.2.2. Test ve kontrol çizgilerinin oluşturulması	40
4.4.3. Kalitatif tayin çalışmaları.....	41
4.3.4. Kantitatif tayin çalışmaları.....	43

4.3.5. ELISA testi	51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
5.1 Sonuçlar	52
5.2 Öneriler	55
KAYNAKLAR	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. a) IDTechEx 2020 raporu POC sektörel hacmi değişimi b) TTGV Raporu	1
Şekil 1.2. Yanal akış tanı sistemi bileşenleri	4
Şekil 1.3. a) Selüloza ait molekül yapısı b) Nitroselüloza ait molekül yapısı	10
Şekil 2.1. Balmumu bariyerleri ile modifiye edilmiş LFA	11
Şekil 2.2. Elektrospin yöntemiyle nitroselüloz membran eldesi ve LFA geliştirilmesi	12
Şekil 2.3. Polikaprolakton kullanarak elektroegirme yöntemiyle tayin pedi geliştirilmiş LFA	13
Şekil 2.4. Nitroselüloz üretim maliyeti	18
Şekil 2.5. Ürün ve uygulama alanlarına göre selüloz türevlerine ait pazar paylarının gösterimi.	19
Şekil 3.1. Bakteriyel nanoselülozun eldesi	21
Şekil 3.2. Oluşan sarı-açık kahverengi renkli ıslak jelimsi bakteriyel nanoselüloz mat ve tartımına ait görselleri	22
Şekil 3.3. BNS'nin saflaştırılmasına ait görseller	22
Şekil 3.4. Ultra saf su ile yıkanmış ve saflaştırılmış BNS'e ait görseller	23
Şekil 3.5. BNS'nin parçalanması ait görseller	23
Şekil 3.6. BNS'nin nitrolanması	24
Şekil 3.7. nBNS'nin Dr. Blade sistemi ile yayılması	24
Şekil 3.8. Dr. Blade sistemi ile farklı kalınlıklarda nBNS dökme işlemine ait görseller	24
Şekil 3.9. Farklı sıcaklıkta (40,70 ve 90 °C) ve kalınlıklarda (ince-2 mm, orta kalınlıkta-3 mm, kalın- 5 mm) dökülen nBNS'lerin kurutma sonuçlarına ait görseller	25
Şekil 3.10. AuNPs sentezi	26
Şekil 3.11. AuNPs fonksiyonlandırması	26
Şekil 3.12. Pedlerin yıkanmasına ait görseller	27
Şekil 3.13 LFA test kitlerinin oluşturulması	27
Şekil 4.1. BNS'e ait FESEM ve EDS analiz görüntülerine ait görseller	28
Şekil 4.2. nBNS ait FESEM ve EDS analiz görüntülerine ait görseller	29
Şekil 4.3. BNS ve nBNS'e ait FT-IR spektrumları	30
Şekil 4.4. BET analizi sonuçları. Adsorpsiyon ve desorpsiyon izotermi	31
Şekil 4.5. Farklı kalınlıklarda (2 mm (a-a'), 3 mm(c-c'), 5 mm (e-e')) dökülen nBNS süspansiyonunun 40 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların farklı yaklaşma oranlarındaki yüzey ve yan kesit FESEM görüntüleri.	32
Şekil 4.6. Farklı kalınlıklarda (2 mm (a-a'), 3 mm(c-c'), 5 mm (e-e')) dökülen nBNS süspansiyonunun 70 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların farklı yaklaşma oranlarındaki yüzey ve yan kesit FESEM görüntüleri.	33
Şekil 4.7. Farklı kalınlıklarda (2 mm (a-a'), 3 mm(c-c'), 5 mm (e-e')) dökülen nBNS süspansiyonunun 90 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların farklı yaklaşma oranlarındaki yüzey ve yan kesit FESEM görüntüleri.	34
Şekil 4.8. AuNPs çözeltisi görseli ve UV-Vis spektrumuna ait grafik	35
Şekil 4.9. AuNPs FESEM görüntüsü ve partikül boyutu dağılımı grafiği	36
Şekil 4.10. Agregasyon testi	37
Şekil 4.11. Numune ve adsorben pedleri %0,01 PBST ile tayin pedinin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yapılan yıkama sonucu zamana göre yürüme miktarları	38
Şekil 4.12. Numune ve adsorben pedleri %0,05 PBST ile tayin pedinin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yapılan yıkama sonucu zamana göre yürüme miktarları	38
Şekil 4.13. Numune ve adsorben pedleri %0,1 PBST ile tayin pedinin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yapılan yıkama sonucu zamana göre yürüme miktarları	39

Şekil 4.14. Farklı Tween-20 oranlarında yıkanan numune pedi ile gerçekleştirilen denemelerde AuNPs'nin LFA kiti üzerinde yanal akışına ait görseller	40
Şekil 4.15. Ticari membran ve nBNS membran üzerine antikor ekilmiş test ve kontrol çizgilerine ait görseller.....	40
Şekil 4.16. HIgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan yalnızca test çizgilerini içeren ticari ve çalışmada üretilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel ve LFA'nın çalışma prensibini gösteren görsel.....	41
Şekil 4.17. HIgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan test ve kontrol çizgilerini içeren ticari ve çalışmada üretilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel ve LFA'nın çalışma prensibini gösteren görsel.	42
Şekil 4.18. HIgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan test ve kontrol çizgilerini içeren ticari ve çalışmada üretilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel (3 tekrar).	42
Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde HIgG yürütme denemelerine ait görsel.....	43
Şekil 4.20. Ticari membran ile hazırlanan LFA testleri ile 10 farklı HIgG konsantrasyonunda gerçekleştirilen kantitatif tayin çalışmasına ait görsel.	44
Şekil 4.21. nBNC membran ile hazırlanan LFA testleri ile 10 farklı HIgG konsantrasyonundagerçekleştirilen kantitatif tayin çalışmasına ait görsel	44
Şekil 4.22. Kolorimetrik okuyucu ve beklenen test/kontrol çizgi sinyalleri.	45
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyon değerlerinde ticari kan serumu (PBS-pH=7,4) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen ticari membran ile hazırlanmış LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde elde edilen sinyaller.....	47
Şekil 4.24. Test ve kontrol çizgilerinin sinyal şiddetlerinin grafik üzerinden okunması	47
Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlarda (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen ticari membranla ile hazırlanan LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı kullanılarak analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddeti oranlarındaki değişimi gösteren grafik.	48
Şekil 4.26. Farklı konsantrasyon (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (PBS-pH=7,4) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen nBNS membran ile hazırlanmış LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde elde edilen sinyaller.....	48
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyon (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen nBNS membran ile hazırlanmış LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddeti oranlarındaki değişimi gösteren grafik	49
Şekil 4.28. HIgG (25 µg/mL) tayini için kısa (2 saat (a) ve 24 saat (b)) ve uzun dönem (1 ay (c) ve 6 ay (d)) kararlılık çalışmaları (3 tekrar) için LFA yürütmelerinden elde edilen sonuçlara ait görsel.....	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışma süresince kullanılan cihaz ve kullanım amaçları	21
Tablo 4.1. Farklı HIgG konsantrasyonlarında ticari membran ve geliştirilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak elde edilen testlerin test ve kontrol çizgilerindeki sinyal şiddetlerinin LFA okuyucu ile elde edilen görseller	46
Tablo 4.2. HIgG tayinine yönelik geliştirilen LFA için kısa ve uzun dönem kararlılık sonuçları.....	51
Tablo 4.3. Yapay serum örneklerinde LFA ve ELISA yöntemleriyle HIgG analizi	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

SİMGELER

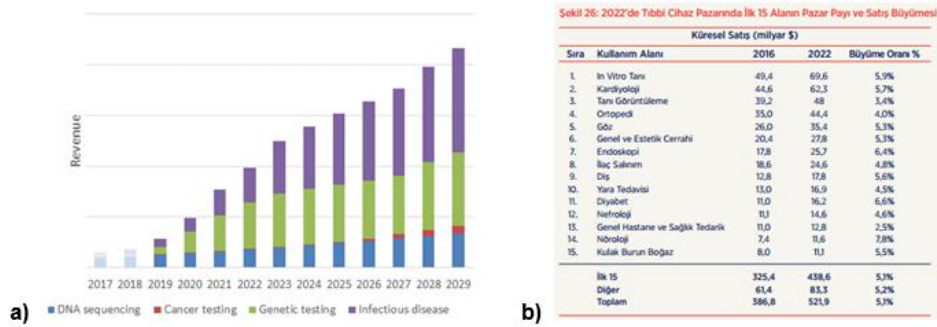
TS	Teşhis sınırı
TAS	Tayin alt sınırı
σ	Standart sapma
m	Lineer grafiğin (kalibrasyon eğrisinin) eğimi
μ	mikro
mM	Mili molar
γ	Gama
°C	Santigrat derece
mL	Mili litre

KISALTMALAR

AuNPs	Altın nanopartikül
BNS	Bakteriyel nanoselüloz
BET	Brunauer Emmett ve Teller
BSA	Sığır serum albümin
CL	Kontrol çizgisi
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
EDS	Enerji dağılımlı X-Işını spektroskopisi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FESEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GTİP	Gümrük tarife istatistik pozisyonu
HlgG	İnsan immünoglobulin G
LFA	Yanal akış test (Lateral flow assay)
nBNS	Nitrolanmış bakteriyel selüloz
NS	Nanoselüloz
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PBST	Fosfat tampon çözeltisi + Tween-20
PBST+BSA	İmmünotampon
POC	Yerinde tanı teknolojileri, (point-of-care)
SNK	Selüloz nanokristalleri
SNF	Selüloz nanofiber
SPR	Yüzey plazmon rezonans görüntüleme
TAS veya LOQ	Tayin alt sınırı
TL	Test çizgisi
TS veya LOD	Teşhis sınırı
TTGV	Türkiye teknoloji geliştirme vakfı
TÜBİTAK	Türkiye bilimsel ve teknolojik araştırma kurumu
UV-Vis	Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi
QCM	Kuartz kristal mikrobals

1. GİRİŞ

Amerika ve Almanya gibi gelişmiş ülkelerde sağlık alanındaki kararların yaklaşık %66'sı tanı işlemi süreçlerinin sonucunda alınmasına rağmen, ülkelerin toplam sağlık hizmeti harcamalarının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır (Rohr vd., 2016). Gelişmekte olan ülkelerde ise meydana gelen ölümlerin %95'i düşük maliyetli erken teşhis ve müdahalelerin gerçekleştirilememesinden kaynaklanmaktadır (Hu vd., 2014). Özellikle kliniklerdeki etkili tanı gerçekleştirme problemleri ve ileri aşama sağlık harcamalarının yüksek olması nedeniyle oluşan bu hasta kaybı, hastaların sağlık durumlarının uzaktan kontrollerine yönelik teknolojilerin hem akademik hem de endüstriyel olarak ilgi çekmesine sebep olmuştur. Dünya genelinde sektörel piyasa danışmanlığı sağlayan MarketsandMarkets ve ResearchandMarkets raporlarına göre 2019 yılında 19,2 milyar dolar hacme sahip olan hızlı tanı teknolojilerinin 2024 yılına kadar yaklaşık 1,5 kat artarak, en az 31,5 milyar dolar hacme yükseleceğini ve şirketlerin yıllık birleşik büyüme oranının %8,3 olacağını ifade etmiştir (Markets ve Markets, 2020). Bununla birlikte, yaklaşık 20 yıldır 80'den fazla ülkede pazar araştırması yapan IDTechEx (ABD) kuruluşu sadece yerinde tayin yapabilen teknolojileri kapsayan ürünler konusunda bile pazar payının 43 milyar \$'a çıkacağını vurgulamıştır (IDTechEx, 2019). Özellikle, yaşlanan dünya nüfusu, artan sağlık harcamaları ve yaşam tarzından kaynaklanan hastalıklardan (kanser, genetik vb.) dolayı artışın süreceği ifade edilmiş ve bu alandaki şirket gelirlerinin de hızla artacağı raporlanmıştır (Şekil 1.1-a)



Şekil 1.1. a) IDTechEx 2020 raporu POC sektörel hacmi değişimi b) TTGV Raporu (TTGV: 2030'a Doğru Sağlık, 2018)

Ülkemizde söz konusu durum, toplumsal ihtiyaç ve sağlık politikaları kapsamında farklı kurumlarımız (TTGV, ASO, TUBA vb.) tarafından değerlendirilmiş ve eylem planı üzerine raporlar yayınlanmıştır. Her ne kadar 2007 yılında Avrupa Birliği ile uyum çerçevesinde tıbbi cihaz tanım ve yönetmelikleri yeniden düzenlenmiş olsa da özellikle

özel sektörde olmak üzere Ar-Ge faaliyetlerinin yeterli seviyeye ulaşmadığı belirtilmiştir (Ankara Sanayi Odası, 2014). Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV, Ankara)’na göre 2016 yılı itibariyle yaklaşık 2 milyar dolara kadar ulaşan Türkiye Tıbbi Cihaz Pazarı’nda ulusal pazar payının büyük bir oranı (yaklaşık %85) ithalatla karşılanmaktadır (TTGV: 2030’a Doğru Sağlık, 2018) Ülke ekonomisinin olumsuz yönde etkilendiği de belirtilen bu raporda, 84. madde olarak belirtilen “Önümüzdeki dönemde tıbbi cihaz sektöründe hangi alanların öne çıkacağına bakarsak, ilk sırada in-vitro tanı olduğu görülmektedir” ifadesi kullanılmış olup 2022 yılına kadar %70’lik büyümeyle in-vitro tanı sistemlerinin ilk sırada olduğu vurgulanmıştır (Şekil 1.1-b). Ayrıca, bu raporda, 2018 yılında tek başına mobil sağlık pazarının 28 milyar ABD doları olduğu da vurgulanmıştır. Tıp ve toplum sağlığı açısından önemi vurgulanan bu raporların yanı sıra acil eylem planı gerektiren bu durumu öncelikli hedefleri içerisinde değerlendiren TÜBİTAK ise, 2 Kasım 2004 yılında yayımlanan Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi’nde yer vermiştir (Strateji Belgesi, 2004). Bu belgede, Yaşam Kalitesinin Yükseltilmesi başlığı altında “Hekimlerin, örnekleri laboratuvarlara yollamadan, hasta başında gerekli testleri yapmalarını ve süratle hastalarına müdahale etmelerini sağlayacak tanı kitleri geliştirebilmek” hedefini ortaya koymuştur. Bu noktada, özellikle nanoteknoloji alanındaki gelişmelerle bu durumun daha etkin olacağı da belirtilmiştir. Bu kapsamda yürütülen politikalarla, 2018 yılında TÜBİTAK – ARDEB kapsamında Tanıbilim (Diagnostics) Çağrı Programı (1003-SAB-TANI-2018-1 Yenilikçi Tanı Kitleri) ve 2018 yılında 1511-Öncelikli Alanlar Araştırma Teknoloji Geliştirme ve Yenilik Projeleri Destekleme Programı kapsamında da Sağlık-Tıbbi Tanı Cihazları (1511-SAB-TANI-2017-2) çağrılarını yayımlamıştır (ARDEB, 2018a, 2018b). Yine TÜBİTAK tarafından yapılan son çağrıda ise, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Mükemmeliyet Merkezi Destek Programı (1004 Programı) kapsamında, Yüksek Teknoloji Platformları 2021 Yılı Çağrısı, İmalat ve Hizmet Sektörlerinde Yüksek Teknoloji NACE Rev.2 Kodlarıyla belirtilen 21.2 eczacılığa ilişkin ilaçların imalatı alt başlığında da bu kitlelere olan önem bir kez daha vurgulanmıştır (TÜBİTAK, 2021). Dolayısıyla, bu çağrılardaki “Tanı veya tanıya yardımcı kitlerde sinyal arttırıcı malzemelerin geliştirilmesi, Tanı veya tanıya yardımcı immunoassay kitlerinin geliştirilmesi” maddelerine hizmet eden çalışma sonuçlarının ülkemizin öncelikli hedeflerine hem deneysel hem de bilim insanı yetişmesi noktasında katkı sağladığı kanaatindeyiz.

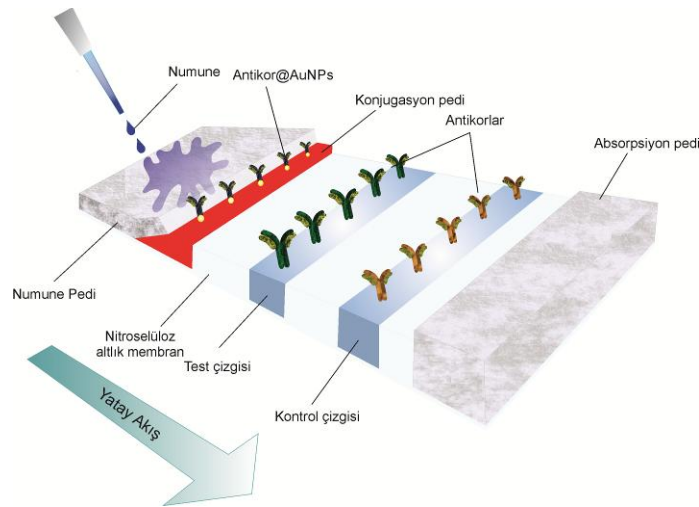
TÜBİTAK tarafından öncelikli alanlar içinde kabul edilen sağlık alanı, ulusal sağlık teknolojilerinin yenilikçi ve rekabetçi yönünün geliştirilmesi amacıyla T.C. Sağlık Bakanlığı ve TÜBİTAK arasında bir iş birliği protokolü imzalanarak, Eylül 2012 tarihinde TÜBİTAK tarafından 1003-Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında “Tanı, Tedavi ve Destek Amaçlı Yenilikçi Tıbbi Cihazlar (TC0101)” başlıklı önemli bir çağrı programı başlatılmıştır. Bu çağrı kapsamındaki çalışma önerilerinin hem katma değeri yüksek, yaratıcı ve yenilikçi olması, hem de sağlık alanında uygulama projelerine temel teşkil edecek veya uygulama projelerine girdi sağlayacak teknolojik ürün ve bilgi üretmeye yönelik olması hedeflenmiştir. Bu çerçevede yer alan alt konular ele alındığında, bunlardan bir tanesi olan ve bu çalışmanın da ana hedefiyle doğrudan ilgili olan "Hasta başı (point-of-care) (POC) tanı teknolojileri" kapsamında hızlı ve pratik tanı kitlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Hastalıklarda erken tanının ciddi önem taşıdığı bu dönemlerde hastalıkların teşhis ve takibinde kullanılan birçok sistem maliyet ve uzman personel gereksinimlerinden dolayı özellikle az gelişmiş bölgelerde insanlar için ulaşılması zor ve kısıtlı olarak görülmektedir (Lopez-Marzo ve Merkoci, 2016). POC sistemleri bu zorlukların aşılabilmesi, pek çok hastalıkta tanı ve takip aracı olarak kullanılmakta olup yenilerinin geliştirilmesi ve sağladığı avantajlar dolayısıyla güncel bir alan teşkil etmektedir (Qin vd. 2019; Yang vd., 2019). Sağlık alanında kesin sonuçların elde edilmesi hususunda POC tanı kitleri üzerine tartışmalar bulunsada, bu konuda gerçekleştirilen çalışmalarda genel olarak bu sistemlerin doğrudan kazanımlar (maliyet, zaman) sağladığı gibi dolaylı kazanımlar (uzman, cihaz maliyeti) da sunduğu ortaya konmuştur (El-Osta vd., 2017; Spaeth vd., 2018; Abbott 2015). POC sistemleri özellikle doğruluk, erişilebilirlik ve uygun fiyat gibi temel bünyesinde barındırmasıyla Dünya Sağlık Örgütü'nün ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, Userfriendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Deliverable) ve REASSURED (Real-time connectivity, Ease of specimen collection, Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free or simple, and Deliverable to end-users) kriterlerini birçoğunu (hızlı, ekipman gerektirmeyen, gerçek zamanlı bağlanabilirlik hassas, sağlam, numune toplama kolaylığına sahip, spesifik, kullanıcı dostu, çevre dostu ve teslim edilebilir) sağlamaktadır (Kettler vd., 2004; Land vd., 2019).

Hızla gelişen teknolojin faydalanılarak elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, akustik, termometrik gibi çok çeşitli fiziksel sinyallere dayalı olarak geliştirilen POC teknolojileri genel itibariyle yanal akış tanı (lateral-flow assay, LFA), yüzey plazmon

rezonans (SPR), kuartz kristal mikrobals (QCM), yonga üzeri laboratuvar (LOC) mikroakışkan ve mikrokanal sistemler ve elektrokimyasal sensör sistemleri olarak sınıflandırılabilir (Darwish vd., 2018). Son yıllarda giyilebilir sensör sistemlerine entegre edilebilen esnek polimer esaslı yapılar oldukça önemli araştırma konuları teşkil ederken (Wang vd., 2016), kağıt-esaslı platformlar kolay bulunabilmesi, ekonomik olması, pasif sıvı taşımaya izin veren yapısı, (biyo)kimyasallarla olan uyumluluğu ve (biyo)moleküller ile yazdırılabilmesi ve kaplanabilmesi nedeniyle hala tercih edilmektedir. İlk kâğıt esaslı biyotahlil platformu (glukoz testi), 1957 yılında kağıt üzerine kimyasalların emdirilmesi ve örnekleme gerçekleştirildiğinde ortaya çıkan renk değişikliğine dayanırken (Free vd., 1957), 1982 yılında ilk defa nitroselüloz membran üzerine antikor immobilize edilmesiyle immünosensör test çubukları elde edilmiştir (Hawkes vd., 1982). Kapiler etki ile yürütülen yanal akış sistemlerinin geleneksel test çubuğu teknolojisi ile ilk buluşması ise 1989 yılında gerçekleşmiştir (Rosenstein ve Bloomster, 1989; Gordon vd., 1990).

Kağıt-esaslı biyosensörler içerisinde yer alan ve genel yapısı Şekil 1.2’de sunulan LFA sistemleri, test çubuklarının kullanımında uygulanan inkübasyon ve yıkama adımları gibi standart prosedürleri ortadan kaldırarak kısa sürede düşük tanı sınırlarına ulaşma olanağı sunmuştur. Yanal akış sistemleri kullanılarak halihazırda kullanılan ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi ile uzun ve uğraş gerektiren prosedürlere pratik olarak ve özelleştirilmiş cihazlar gerektirmeyen avantajlar sağlayarak bu sistemlerin kağıt esaslı sensörlere başarılı bir şekilde aktarıldığı görülmektedir. Sonuç olarak, yaygın kullanım alanı bulmaya başlamışlardır (Fung vd., 2009; Zor vd., 2025).



Şekil 1.2. Yanal akış tanı sistemi bileşenleri (Zor vd., 2025)

Yanal akış tanı teknolojisi, basit uygulama, yüksek algılama hızı, taşıma kolaylığı, hızlı ve güvenilir sonuç alma ve benzeri avantajları nedeniyle biyomedikal uygulama alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın bilinen örneği gebelik testleri olmakla birlikte pestisit, ağır metal tayinleri, kötüye kullanımı olan ilaçlar için hızlı tanı kitlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Qin vd., 2012). Optik temelli LFA'lar test sonuçlarının çok çeşitli cihazlar (cep telefonu, ucuz kolorimetrik cihazlar vb) ölçülebilir olmasına rağmen kullanıcı gözü ile var/yok (veya pozitif/negatif) testi işlevini yerine getirmesi ve herhangi bir cihaza ihtiyaç duyulmaması yönüyle en çok tercih edilen sensörler içinde yer almaktadır. LFA 4 temel kısımdan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla numune pedi (I), konjugasyon pedi (II), tayin pedi (nitroselüloz membran) (III) ve atık pedi (IV) olarak adlandırılır.

Doğada en bol bulunan yenilenebilir biyopolimer olan selüloz, düşük maliyetli cihazlar tasarlamak için uygun bir malzeme çeşitlidir. Ayrıca, selüloz bazlı malzemeler esnektir, biyouyumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve seri üretimin yanı sıra doğrudan işlevselleştirmeye uygundur. Kağıt, tekstil/iplik ve nanoselüloz dahil olmak üzere selülozik substratların bu rakipsiz özellikleri ve büyüleyici üretim basitlikleri ve akıllı telefonlar gibi günümüz koşullarında her yerde ulaşılabilen teknolojilerle birleştirilebilmeleri, onları özel olarak hazırlanmış biyoalgılama platformları haline getirmektedir. Ayrıca, selüloz bazlı biyosensör yaklaşımları, Dünya Sağlık Örgütü'nün ideal tanı testleri/cihazları için REASSURED (gerçek zamanlı bağlantı, numune toplama kolaylığı, uygun fiyatlı, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipmansız ve son kullanıcılara ulaştırabilir) kriterlerini karşılayabilmektedir. Bu nedenle, selüloz, yenilikçi analitik cihazları tasarlamak için biyosensör araştırmacılarına mükemmel malzemeler sağlamaktadır.

Nitroselüloz membran, LFA sisteminde sinyalin üretildiği şeridin önemli bir bileşenidir. Nitroselüloz membranın performansı, bir test sonucunun doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini doğrudan etkiler (Quesada-González vd., 2019). Membranın temel özellikleri sıralandığında, homojen bir akışı kolaylaştırması, biyoreseptörü yakalamak için işlevselleştirilebilir bir katı yüzey sağlanması ve düşük spesifik olmayan bağlanma (etkileşim) göstermesi ön plana çıkmaktadır (Parolo vd., 2020). Nitroselüloz membranlar selüloz nitrat ve selüloz asetatın oluşurları ve selüloz asetat membranların tek başına sunduklarından daha yüksek protein bağlama etkililiği ortaya koyarlar (Hua vd., 2020). Proteinlerin bu bağlanma etkililiği termodinamik olarak adsorbe edilmeye yönlendirilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu çekime sebep olan karbon içeren nitroselüloz ile

proteinin hidrofobik kısmı arasındaki hidrofobik bir etkileşimdir. Proteinlerin adsorplanmasındaki diğer sebep ise esas olarak nitroselülozdaki nitrat gruplarının dipolları ile protein içindeki dipollar arasındaki elektrostatik bir etkileşim olarak tanımlanmaktadır. Her iki durumda da proteinlerin nitroselüloz yapıya adsorbe olacağı bilinmektedir. Bu niteliği göz önüne alındığında selüloz membran yerine nitrolanmış selüloz olan nitroselüloz membranların LFA sistemleri için daha avantajlı olduğu görülmektedir (Fridley vd., 2013).

Mevcut nitroselüloz membranlar normal substrat malzemeleri olarak çeşitli kağıt bazlı biyosensörler hazırlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Gözenekli nitroselüloz membranlar, sıvı numunede bir analitin varlığını veya yokluğunu belirlemek için immünokomplekslerin oluşturulduğu ve tayinin görselleştirildiği yanal akış sistemlerinde altlık tayin pedi olarak kullanılır (Tang vd., 2022). Nitroselüloz membranların optimum performansı, test reaktiflerinin nitroselüloz ile etkileşimlerinin ve reaktif konumunun test duyarlılığı üzerindeki etkilerinin anlaşılması büyük önem arz etmektedir (Choi vd., 2016). Malzemenin yüzey serbest enerjisi, hidrofilik-hidrofobik ve polar yüzeyin dengesi en düşük olduğunda, protein ve malzeme yüzeyi arasındaki etkileşim düzeyi oldukça yüksektir. Nitroselüloz yapıların farklı biyomoleküllerin adsorpsiyon özelliğini karşılaması arzu edilmektedir. Her bir fonksiyonel kağıt bazlı biyosensör için gelecekte farklı hidrofilik-hidrofobik özelliklere sahip nitroselüloz membran hazırlanması gerekliliği ortaya konulmuştur (Tang vd., 2022). Benzersiz bir şekilde, nano ölçekli selüloz (nanoselüloz olarak da bilinir), hidrofiliklik, geniş kimyasal modifikasyon kapasitesi ve çok yönlü yarı kristal fiber morfolojilerinin oluşumu gibi önemli selüloz özelliklerini nano ölçekli malzemelerin spesifik özellikleriyle birleştirir (Klemm vd., 2011). Nanoselülozun, çeşitli morfolojilerde (örneğin nanokristaller, nanolifler ve nanofilmler) ve esneklik, yüksek kristallik, biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliği mevcuttur. Ayrıca biyoyumumluluk, optik şeffaflık, hidrofiliklik, yüksek gözeneklilik (porozite), hidroksil içeren gruplarla yüksek yüzey alanı ve yüksek mekanik dayanım gibi ayırt edici özellikler sergiler (Morales-Narváez vd., 2015). Mevcut çalışmada bakteriyel yöntemle elde edilen ve nitro grubu bağlanan nitro-nanoselüloz sahip olduğu bu özellikler sebebi ile belirtilen bu ihtiyacın karşılanmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, mevcut piyasada bulunan nitroselüloz membranlara göre nanoboyutta fiberler içermesi özelliği ile nanoboyutun sağlayacağı geniş yüzey alanı sayesinde yüksek oranda test antikoru bağlama ve hassasiyetin artırılması, spesifik olmayan etkileşimlerin engellenmesi,

membran yüzeyinde salınım için deterjan (surfaktan) ihtiyacının azalması gibi nitelikleri bir arada bulundurmaktadır.

Araştırmanın amacı

Nitroselüloz membran biyolojik denemelerde en önemli sarf malzemelerden birisidir ve aslında hızlı test kitlerinin en önemli temel bileşenlerinin başında yer alır. Ülkemizde hızlı tanı kitleri üreten birkaç firma bulunurken bu test kitlerinin temel bileşenlerini üreten firma/kuruluş bulunmamaktadır. Bu hususta, yerli üretimin artması ve dışa bağımlılığın azaltılması konusunda öncü firmalar/kuruluşlar mevcut olsa da hala temel ihtiyaç olan nitroselüloz membranların üretimi konusunda eksiklikler vardır. Bu çalışma ile söz konusu yerli/yabancı üretim test kitlerinin en önemli temel bileşenlerinden olan tayin pedinin (membran) üretimi hem nano boyutta stabil selülozik fiberler sentezlenerek elde edilmiş olup hem de bakteriyel olarak elde edildiği için çevreye duyarlı çevre dostu ürün elde edilmiştir. Bu kapsamda çalışmanın önemi ve literatüre katkısı hususları olarak detaylı olarak analiz edilmiştir.

Selüloz üretiminin ihtiyacı ve dışa bağımlılığın azaltılması konusunda yapılan araştırmalarda 2020 yılında Kocaeli Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından yapılan Ön Fizibilite Raporu selüloz asetat üretimine yatırımın arttırılmasını konu aldığı görüşmüştür (Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, 2020). Bu çalışmada selüloz türlerinin üretiminin dünya ve Türkiye'deki durumu hakkında veriler gösterilmiştir. Sektörde öne çıkan ülkelerle birlikte dünyadaki toplam ithalat miktarı son 5 yıla ait verileri göz önüne alındığında 2019 yılında sektörde yapılan ithalat miktarlarına bakıldığında Türkiye'nin dünyaya yaptığı 37.726 tonluk ihracatla 10. sırada yer aldığı görülmüştür. 5 yılın ihracat verileri incelendiğinde en fazla ihracat değeri olan alt kırılımın 391239 GTİP kodlu hidroksipropil selüloz ve diğer selüloz eterleri grubunda olduğu görülmüştür. Bu grubu sırasıyla, selüloz esterleri ve diğer selüloz ve kimyasal türevleri, karboksimetil selüloz ve türevleri, selüloz asetatları ve selüloz nitratlar izlemiştir. Son 5 yılda Türkiye'de sektördeki ihracatın ithalatı karşılama oranına bakıldığında, 2015 yılında %34 seviyesinde olduğu, bu oranın 2016 ve 2017 yıllarında %29'a düştüğü, 2018 yılında %37 ve ardından 2019 yılında %50 seviyesine ulaştığı görülmüştür. Türkiye'nin selüloz ve türevleri sektöründe ihracat miktarı ithalattan fazla olmasına rağmen, ithalat değerinin ihracat değerinden fazla olduğu görülmüştür (Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, 2020). Bu durumun ihraç edilen ürünlerin katma değerinin ithal edilenlere göre daha az olduğu ya da ithal edilen ülkelere gelen ürünlerin maliyetinin fazla olduğu yönünde

yorumlanabilir. Çalışmanın çıktıları ile özellikle yüksek teknoloji sınıfında yer alan tanı kitlerinin hammadde üretiminin yerli olması ile maliyetin düşürülerek ithalattan çok ihracat yapılmasına olanak sağlayacak olması önemli etkenlerden biridir.

2021 yılında benzer bir fizibilite raporu Batman ilinde selüloz üretimi ile ilgili yapılmıştır (Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, 2021). Ülkemizde ticari olarak selüloz üretimi gerçekleştiren 24 işletme vardır fakat hammaddeye olan ihtiyacın çok olmasından dolayı talep ithalat yoluyla karşılanmaktadır. Selüloz ihtiyacı olan işletmeler talep miktarlarına göre ya imalatçı firmalardan temin etmekte ya da ithalatçı firmalardan yurt içinden almaktadırlar. Selülozun ithalat rakamlarına bakıldığında ithal selülozun ortalama kg fiyatının 3,9\$ seviyesinde, piyasada ise kg fiyatı 10\$ civarında olduğu rapor edilmiştir (Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, 2021). Raporların sonuçları doğrultusunda ham madde olarak üretim ihtiyacının olduğu selülozun oldukça geniş bir pazar payının olduğu ve bu pazar payında maliyetin düşük olarak elde edilmesi ile bu ihtiyaç karşılanabilir hale gelecektir. Gerçekleştirilen çalışmamızda bu üretim ihtiyaçları göz önüne alınarak düşük olan selüloz üretiminin ve bunun yanı sıra yine önemli bir husus olarak doğal bir proses ile nanolif esaslı nanoselüloz elde edilmiştir. Yukarıda verilen fizibilite raporları değerlendirildiğinde çalışma sonucu elde edilen ürün ile ülkemiz ekonomisi ve dışa bağımlılığı azaltacak ve ileriye dönük yeni üretim proseslerine öncü olacak etkilerinin olacağı düşünülmektedir.

T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığının Hamle Programı kapsamında Gümrük Tarife İstatistik Pozisyonu (GTİP) Kodlarına Göre Ürünler içerisinde yer alan 391239850000 GTİ kodlu selüloz eterleri ve 391290900000 kodlu selüloz, kimyasal türevleri (başka yerinde belirtilmeyen) (ilk şekilde) Kimya Sektörü Öncelikli Ürün Listesinde yer alan selüloz türevlerine olan öncelik belirtilmiştir (Web Sayfası-1). Çalışma konusu olan selüloz ve sonrasında katma değeri yüksek ve hızlı test kitlerinde temel bileşen olan nitroselüloz üretimine yönelik yenilikçi yöntem ile önemi vurgulanan selüloz ihtiyacının karşılanması ve yerli üretime katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

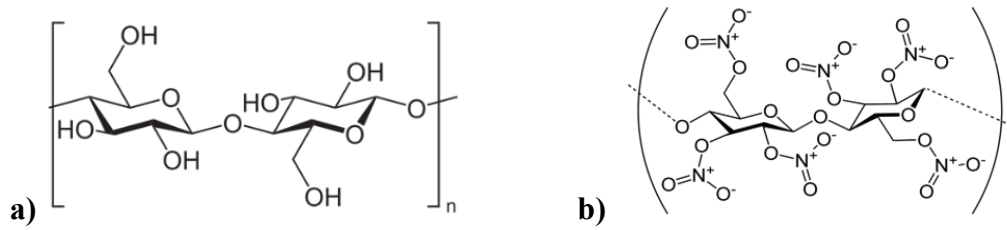
Literatürde nitroselülozun üretim proseslerine yönelik birbirine benzer yöntemler gerçekleştirilmiştir (Mattar vd., 2020). Ancak, üretiminin önemli olmasına rağmen hala ülkemiz tarafından ithal ediliyor olması ve son zamanlarda gelişen teknolojinin bu gibi temel materyallere olan ihtiyacı artmasına rağmen test kitleri için tayin pedi üretimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu boşluğu doldurmaya yardımcı olmak için çalışma sonucundaki çıktıların katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

LFA teknolojisi için nitratlanmış bakteriyel nanoselüloz üretiminin ülkeye kazandırılması gerekmektedir. Nanoselüloz (NS), selüloz nanokristalleri (SNK), selüloz nanofiber (SNF) ve bakteriyel nanoselüloz (BNS) olarak sınıflandırılabilir. Fosil türevli hammaddelerin yerini almak için çok sayıda endüstriyel kullanıma sahip yeni biyomalzemelerdir. Arzu edilen özellikler arasında geniş yüzey alanı, benzersiz morfoloji, mükemmel mekanik özellikler, spesifik yüksek mukavemet, iyi biyouyumluluk, yenilenebilirlik, uyarlanabilir yüzey kimyası ve iyi optik özellikleri bulunur. Çeşitli sürdürülebilir ve yenilenebilir malzemelerin geliştirilmesinde kullanımları son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Pazar, esas olarak, reçinelere, sentetik koyulaştırıcılara, güçlendiricilere ve plastik katkı maddelerine alternatif olarak SNF'lerden oluşmaktadır. SNF bazlı ürünler, başta Japonya olmak üzere, halihazırda piyasaya çıkmış olup ambalaj ve kompozit pazarlarında önemli gelişmiş biyomalzeme çözümleri olarak görülmektedir. Kişisel bakım ve kozmetik sektörlerinde SNK ve BNS ürünleri mevcut piyasada yer almaktadır. Japonya'daki pazar büyük bir hacme sahip iken, Asahi Kasei, Blue Biofuels, Inc., Bucha Bio, CelluComp Ltd., Chuetsu Pulp & Paper Co., Ltd., Daicel, Daio Paper Corporation, Inventwood LLC, Melodea, SAPPI, DKS Co. Ltd. gibi büyük oyuncuların yer aldığı 150'den fazla nanoselüloz (selüloz nanolifleri, selüloz nanokristalleri ve bakteriyel nanoselüloz üreticileri) üreten şirket profili bulunmaktadır (Web Sayfası-2). Ancak ülkemizde bu alanda üretim yapan bir kuruluş bulunmamaktadır. Önerilen bu çalışmanın temel amacı LFA teknolojisi için alternatif tayın pedi üretimi olmakla birlikte, çalışmada elde edilecek olan nanoselülozun da ayrı bir katma değere sahip olduğu düşünülmektedir.

Araştırmanın önemi

Çalışma kapsamında elde edilecek olan bakteriyel nanoselüloz, nitroselüloz haline getirilerek nitro ($-NO_2$) grubunun getirmiş olduğu özellikler ile LFA sistemine dahil edilmesi planlanmıştır. Selüloz düşük yoğunluğu ve farklı yüzey özellikleri elde etmek için kimyasal türlerin bağlanmasını kolaylaştıran $-OH$ yan gruplarının reaktif bir yüzeyine sahiptir (Moon vd., 2011) (Şekil 1.3-a.). Nitroselüloz, yaygın selülozun bir sülfürik/nitrik asit karışımı ile işlenmesiyle üretilen ve polimer yapısında hidroksil ($-OH$) gruplarının nitro grupları ile yer değiştirmesi ile sonuçlanan bir selülozik bileşiktir (Romanholo vd., 2020) (Şekil 1.3-b.). Nitroselüloz günlük yaşamda birçok kullanım alanı bulmuş bir üründür. Fiziksel formu, beyaz liflerden ince tabakalara ve kalın sıvıya kadar geniş ölçüde değişebilir. Diğer güncel kullanımlar arasında DNA, RNA veya proteini

hareketsiz hale getirmek (konumlandırmak) için kullanılan ve daha sonra etiketli bir dizi veya antikor (Western blot) tahlilleri yapmak, elektroteknikler, cilt koruyucular, mikrofiltreler ve problemlenmemen membranların yapımı yer almaktadır (Dennis J Naas vd., 2018). Nitroselüloz, düşük fiyatı, güçlü bağlayıcılığı nedeniyle LFA sistemlerinde en yaygın kullanılan membrandır (Parolo vd., 2020). Proteinlere güçlü bağlanma afinitesi sayesinde (en çok kullanılan antikorlar ve biyoreseptör tipi dahil) ve ayarlanabilir özellikleri ile farklı akış sürelerinin elde edilmesi ve yüzey aktif madde içeriğinin değiştirilmesi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Sartorius Stedim Biotech, 2018).



Şekil 1.3. a) Selüloza ait molekül yapısı b) Nitroselüloza ait molekül yapısı

Mevcut piyasada LFA sistemlerinde kullanılan tayin pedlerinin kullanımı oldukça yaygın halde iken üretimi tamamen yerli olarak yapılmamaktadır ve ayrıca LFA tayin pedlerinde kullanılmak üzere alternatif nitroselüloz ihtiyacının olduğu görülmektedir. Çalışmadan elde edilen nitro-nanoselüloz hazır halde ve farklı firmalarca üretilen LFA sistemlerinde kullanılan nitroselüloz membranlara kıyasla doğal ve çevre dostu bir yöntem olan bakteriyel sentez ile nano boyutta sentezlenmiştir. Çeşitli bakteriler (Achromobacter, Acanthamoeba ve Acetobacter gibi bakteriler) ve algler'den (Valonia, Chaetomorpha) de selüloz sentezlenmektedir (Klemm vd., 2005) (O'sullivan, 1997). Yapılacak olan sentezde selüloz polimeri bakteriyel bir yöntemle biyoteknolojik olarak elde edilecek olup biyoyumlu, stabil ve düşük maliyete sahip üretim prosesi gerçekleştirilecektir. Gelecekteki nano yapı ve nanoteknolojinin sunacağı farklı sistemlere uygulanabilecek olan bu temel malzemenin hazırlanması sağlanarak literatüre katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

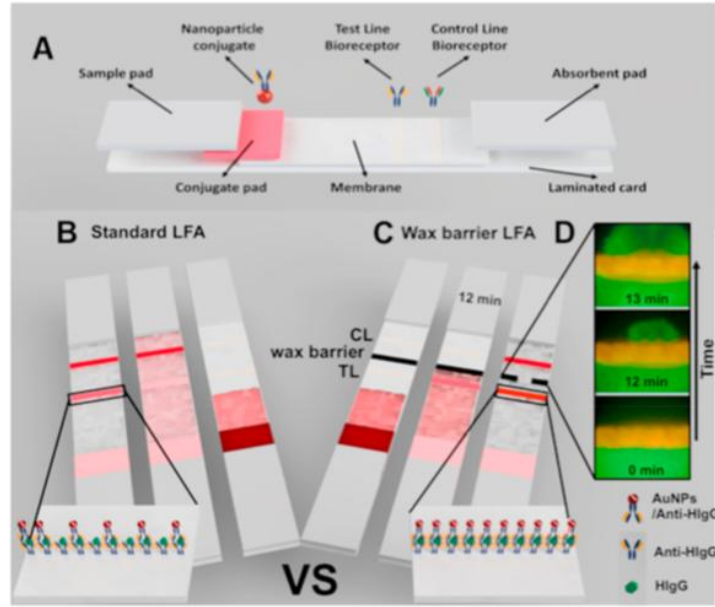
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Tezin bu bölümünde çalışma ile ilgili makaleler, patentler, faydalı modeller ve tescil taramaları aşağıda farklı başlıklar altında sunulmuştur.

2.1. İlgili Çalışmalar

LFA sistemlerinde hassasiyeti artıran bir strateji olarak en çok kullanılan antikor-analit etkileşim süresini uzatmak için numune akışını geçici olarak korumak veya azaltmak üzere tasarım mühendisliklerinden faydalanabilmektedir. Bu bağlamda, bazı yeni çalışmalar ile çeşitli ilginç yaklaşımlar bildirmiştir (Torn'e-Morat'o vd. 2025).

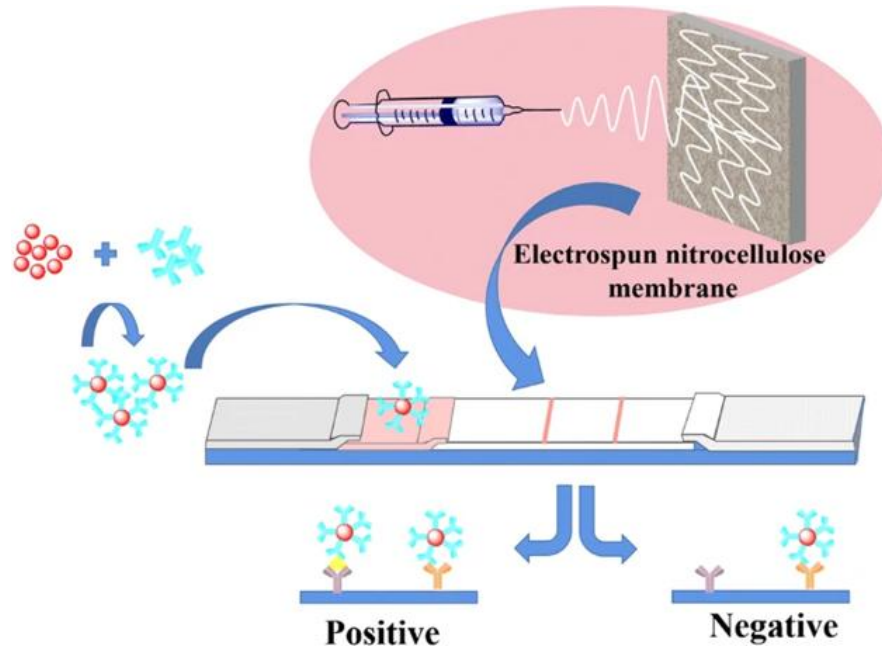
Sena-Torralba vd. (2020) LFA'da hedef ve etiket nanopartiküllerini test çizgisinin (TL) üstünde seçici ve geçici olarak biriktirmek amacı ile çözünür mum bariyerlerinin kullanılması ile ilgili bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Nitroselüloz membran üzerinde test çizgisinin hemen sonrasında balmumu ile hidrofobik bir bariyer oluşturulmuş ve bağlanma olayının gerçekleşmesi için gerekli süreyi arttırmışlardır. Uzattıkları inkübasyon süresi ile İnsan IgG (HIgG) tespiti için sinyal artışı ve hassasiyette 51,7 kat artış yakaladıklarının belirtmişlerdir. Araştırmanın grafiksel özeti Şekil 2.1'de gösterilmiştir



Şekil 2.1. Balmumu bariyerleri ile modifiye edilmiş LFA (Sena-Torralba vd., 2020)

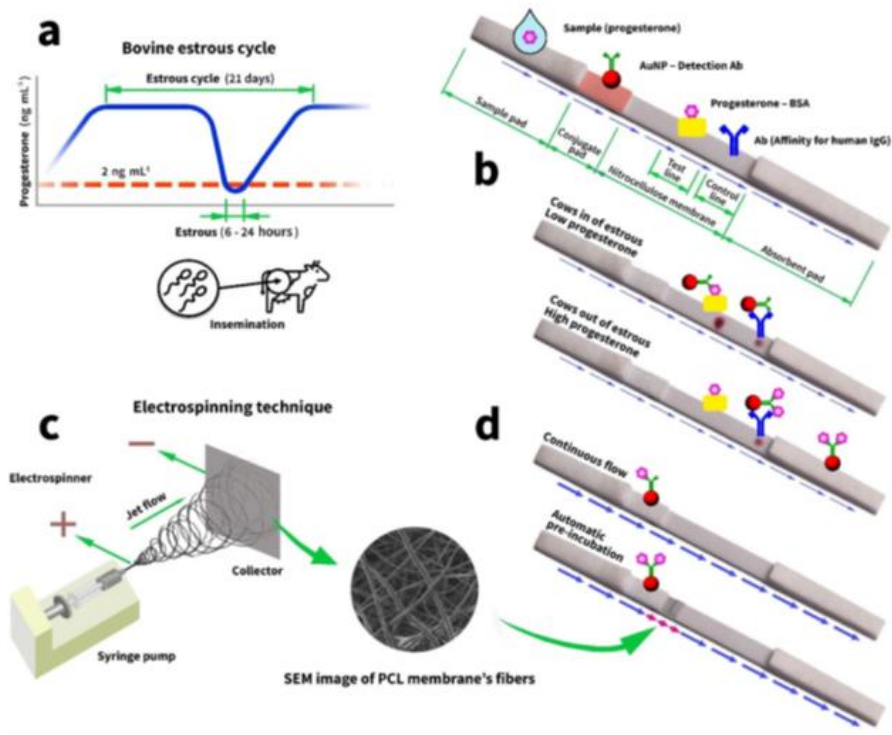
Wang vd. 2020 çalışmalarında virüsleri, bakterileri ve proteinleri tespit etmek için elektrospin yöntemiyle, görselleştirmeye dayalı ekonomik, taşınabilir, tek kullanımlık ve güvenilir bir LFA sensörü geliştirmeyi amaçlamışlardır. Nitroselüloz bazlı immünokromatografi test şeritlerinin hedef tespitine duyarlılığının sorun teşkil

etmesinden yola çıkarak, erken gebelik tespiti için geleneksel nitroselüloz fiber membran farklı olarak elektroğrilmiş nitroselüloz fiber membran kullanmışlardır. Gözenek boyutunu, gözenekliliği ve membranın morfolojisini ayarlamak için kullanılan bu membranlarda fiber çapının uygun şekilde seçilmesiyle, düşük akış hızına ve yüksek protein yüklemesine sahip şeritleri elde etmişlerdir. Testin sağladığı özelliklere dayanarak insan koryonik gonadotropinin kolorimetrik tayini için kullanışlı ve hassas bir yöntem geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmanın grafiksel özeti şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Elektrospin yöntemiyle nitroselüloz membran eldesi ve LFA geliştirilmesi (Wang vd., 2020)

Torn'e-Morat'o vd. (2025) yaptığı çalışmada rekabetçi LFA'ların duyarlılığını artırmak için tasarlanmış bir electroeğirme (elektrospin) yöntemiyle polikaprolakton istifleyerek tayin pedi geliştirmişlerdir. Sığır kanındaki progesterondan konsantrasyonlarının hayvanların kızgınlık dönemlerinin belirlenmesinin önemi belirten çalışmada polikaprolakton membranlarını üretmek için elektrospin düzeneği ile yeni bir membran geliştirmişlerdir. Nitroselüloz yapıdaki bu membran boyunca akışı etkilemeden otomatik bir ön inkübasyon adımı oluşturulması amaçlanmış ve tam sığır kanında yerinde çıplak gözle görülebilen sinyaller elde etmişlerdir. Araştırmanın grafiksel özeti Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Polikaprolakton kullanarak elektroğirme yöntemiyle tayin pedi geliştirmiş LFA (Torn'e-Morat'o vd., 2025)

2.2. Çalışma Konusu ile İlgili Ulusal ve Uluslararası Patent, Faydalı Model ve Tescil Taramaları

Çalışma konusu ile ilgili Ulusal ve Uluslararası Patent, Faydalı Model ve Tescil Taramaları “<http://www.tpe.gov.tr>”, “tr.espacenet.com”, “<http://www.epo.org>”, “Google patent search” web sayfaları üzerinden taranmıştır. Yapılan patent incelemelerinde çalışma konusuyla ilgili olan patent çalışmalarının genel içeriği aşağıda sunulmuştur.

US20030129673A1 (Test apparatus for the detection of pharmacologically active compounds from saliva)

Bu patent, aktif farmakolojik bileşikler tükürük veya idrarda test etmek amacıyla kullanılan, alt kısımda test şeridi tutucuları olan ve immünolojik test için bir nitroselüloz matrisi bulunan iki parçalı gövdeden oluşan sistem ile ilgilidir. Patentin temel prensibi; test tükürüğünün analitler içeren özütün bir toplama membranına geçmesi ve adsorpsiyon dolgusunda reaksiyon için bir fitil içinden geçmesinin ardından immünotanı sistemi için nitroselüloz matrisine aktarılmasına dayanmaktadır (Schwarz, 2003). Patent kiti hazır olarak alınan nitroselüloz matrisi ile gerçekleştirilmiştir.

CN 112834741(A) (Preparation method of ordered microstructure nitrocellulose membrane for lateral flow analysis)

İlgili patent yanal akış testi için mikro yapıya sahip bir nitroselüloz membranın hazırlanmasına yönelik bir yöntemle ilgilidir. Kolay elde edilen hammaddeler, basit kontrol koşulları avantajlarına sahip mikro yapılı nitroselüloz membranın hazırlanma yöntemini sağlamayı amaçlamaktadır (Zhao Xiangwei, 2021). Bu patentte mikro boyutta fiberlerden oluşan nitroselüloz membran elde edilmiştir.

JP 6845499 (B2) JP2018090694A (Nano Nitrocellulose and its manufacturing method)

Nano nitroselüloz sentezi ile ilgili geliştirilen yöntem kapsamındaki buluş konusu, nitroselüloz için hammadde olarak nanoselüloz jelinin (n-C jeli) kullanılması konusunu kapsamaktadır. Sülfürik asit ile önceden yapılan işlem, n-C jelinin şişmesini desteklediği ve nitrasyonun ilerlemesinde etkili olduğu görülmüş ve selülozun nitrasyon sırasında bile nanoyapılara sahip olması nedeniyle nitrasyon hızı artırılabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Nitro selüloz elde etmek için geleneksel bir çalışma olarak, nitroselülozün bir çözücü içinde çözünmesi ve 90 ila 150 - 400 ila 500 nm çapa sahip nanofiber benzeri nitroselüloz üretmek için elektro-eğirme yöntemi (elektro-eğirme yöntemi) kullanılmıştır (Ken Aida Okada, 2021).

CN101838332(A) (Method for preparing nanometer nitrocelluloses)

Bu buluşta nitro-nanoselüloz hazırlamak için bir yöntem geliştirilmiştir. Yayımlanan patentin temel prensibi pamuk selüloz tozu kullanılarak, buz banyosunda ultrasonik ön işlem ardından süzme ve daha sonra elde edilen selülozun belirli bir konsantrasyondaki bir sülfürik asit çözeltisine daldırılıp reaksiyon solüsyonunun hazırlanmasını kapsamaktadır. Reaksiyon solüsyonu 6-7 arasında bir pH değerine diyaliz edilmiş ve daha sonra stabil bir nanoselüloz süspansiyonu elde etmek için ultrasonik metotla ile dağıtılmış. Nihai ürün eldesi için uygun miktarda nitrik asit eklenmiş ve bir süre buz banyosunda reaksiyonu bekledikten sonra 50°C'de vakum altında kurutulmuş toz halde nitro-nanoselüloz tozu elde edilmiştir. Bu patent içeriğinde başlangıç maddesi olarak çalışmamızdan farklı bir başlangıç maddesi kullanılarak, farklı bir yöntemle nitroselüloz elde edildiği görülmüştür (Ziqiang, 2011).

RU2724764(C1) (Method Of Producing Nanosized Nitrocellulose or Composites Based Thereon)

Patent çalışma konusu nano-boyutlu nitroselüloz veya buna dayalı kompozitler üretmek için önerilen yöntemler ile ilgilidir. Bu yöntem aseton içindeki nitroselüloz çözeltisi; karbon nanotüpler, demir (III) oksit nanoparçacıklarının bir karışımının süperkritik karbondioksit ile belirli bir sıcaklıkta işlemden geçirilmesi temeline dayanılarak yapılmıştır. Nano boyuta sahip demir (III) oksit parçacıkları ile nitroselüloz nanokompozitin elde edilmesine yönelik deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu patent nano boyutta metal nanopartiküllerin nitroselüloz ile muamele edilmesi sonucu elde edilebildiğini göstermektedir (Zharkov Mihail Nikolayevich, 2020).

CN104358026(A) (Nitrocellulose diacetate nano-fiber membrane capable of adsorbing and desorbing protein)

İlgili patent proteini adsorbe ve desorbe edebilen bir nitroselüloz fiber yapımını kapsamaktadır. Diasetat nanofiber membranın ve değiştirilmiş nitroselüloz diasetat formülü ile yüksek boyut dağılımına sahip nitroselüloz diasetat nanofiber membran hazırlanması amaçlanmıştır. Selüloz diasetatın nitril grubu proteine özgü adsorpsiyon ve nitratlı selüloz diasetatta eklenmesi ile yeni iki parçalı solvent sistemi elde etmişlerdir. Statik eğirme ile film oluşturma yöntemi kullanarak membranın mikro yapısını optimize etmekle kalmayıp, aynı zamanda hammaddenin proteine emilimini iyileştirdiği tespit edilmiş. Elde edilen lif boyutlarının eşit olarak dağıtılmış ve protein adsorpsiyon miktarının yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca yıkanması kolay olduğu belirtilmiştir (Lan Tian, 2014). Bu patent çalışması sonucu elde edilen nitroselüloz esaslı membranın statik eğirme yöntemi kullanılarak elde edilmiştir

US2776965 (A) (Nitric acid esters of cellulose and method of preparation)

Bu patent selülozun yeni nitrik asit esterleri ve bunların hazırlanması ile ilgilidir. Patent de stabil olmayan ve kükürt bileşikler içermeyen selülozun yeni nitrik asit esterleri ile nitrat gruplarının hidrolizi olmadan nitratlama karışımlarının kullanılması için geliştirilen yöntem ile ilgilidir. Bu buluşa göre selülozun nitrik asit esterleri, selülozun nitrik asit, magnezyum nitrat ve su içeren bir nitratlama karışımı ile reaksiyon vermesi sağlanarak üretilmiştir. Harcanan nitratlama karışımının uzaklaştırılmasından sonra oluşan nitrik asit esterleri standart 134,5°C ısı testinde ve sonrasında yapılan stabilizasyon işlemine gerek kalmadan dakikalarca stabil kaldığı gözlenmiştir (Heilig, 1994). 2016

yılında yayınlanmış olan bir çalışmada termal bir yöntem kullanılarak düşük miktarda su oranına ait nitroselüloz çözeltilerinin hazırlanması amaçlanmıştır. Ham nitroselüloz çözeltisi kullanılmış ve damıtılmış buharlaştırma yöntemi ile kütlece %25 -%30 nitroselüloz elde edilmiştir. Elde edilen bu nitroselülozun kullanım alanı kaplama ve baskı mürekkebi endüstrisi tarafından talep edilen nitroselüloz ihtiyacını karşılamak olduğu belirtilmiştir (Driesen, 2016).

Gerçekleştirilen literatür araştırması ve yayımlanan patent çalışmalarında nitroselüloz üretimi ile ilgili çalışmalar mevcut olduğu görülmüştür ancak bakteriyel olarak sentezlenmiş nanoselüloz yapısı ile nitrolanmış nanoselüloz eldesine yönelik benzer bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmalarda elde edilen nitroselülozun nano boyutta olmamasının yanı sıra çalışmaların temeli bakteriyel selülozdan elde edilmemiş olduğu ve bu proseslerle elde edilen nitroselüloz türevinin LFA sisteminde kullanıldığı herhangi bir uygulamaya ulaşılamamıştır. Ayrıca, yukarıda verilen patentlerin yanı sıra nitroselülozun stabil olması ile ilgili patentler de (GB841738A (Ernst Thoenert, 1963), US2077455A (Baker ve I, 1937), US647420A(Heilig, 1994) yayımlanmıştır. Az su içeriğine sahip nitroselülozun hazırlanması ile ilgili patentler ise EP2144936B1 (Tepzz, 2016) EP08734894.2 (Driesen, 2008)'dir. LFA sistemi içinde nitroselüloz kullanımı olduğunu belirten US20180319657A1 (Joanne, 2018), CN102955036B (Lu Xiang Zhang, 2012), US4460411A (Griffin, 1984), EP0494607A1 (Syed Ahmed, 1984) patentler de bulunmaktadır. Bu patentlerde kullanılan LFA kitlerindeki test pedlerindeki nitroselüloz membranlar ticari olarak temin edilmiştir.

Özetle; gerçekleştirilen literatür ve patent araştırması LFA sistemlerinde kullanılmak üzere bakteriyel olarak sentezlenmiş nanoselülozden nitro-nanoselüloz elde etme yöntemi ile ilgili benzer bir çalışmaya/patente rastlanılmamıştır. Çalışma konusu ile ilgili ulusal veya uluslararası patent, faydalı model ve tescilin bulunmaması çalışmanın konusunun önemini ortaya koymaktadır.

2.3. Çalışma Çıktısının Yenilikçi Yönü, Pazar ve Sektördeki Benzerlerine Göre Öngörülen Farklılık

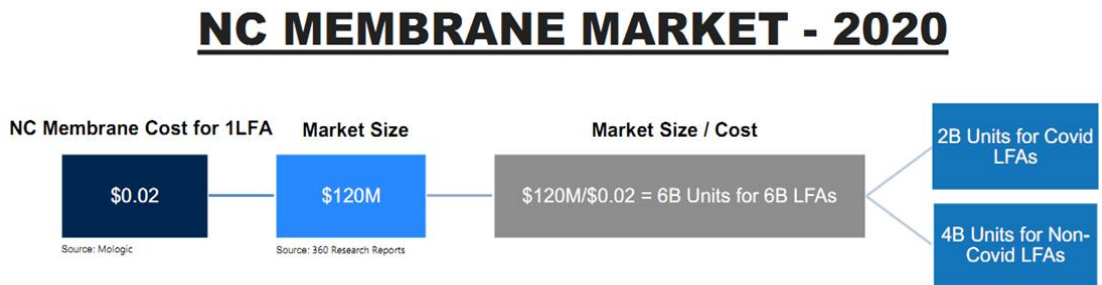
Çalışma çıktısı olan bakteriyel nitro-nanoselülozün test kitlerinde kullanılan nitroselüloz membran gibi temel materyallerin üretimine öncü olacağı ve bu alanda yerli üretim yapılması için yol gösterecek bir çalışma olacağı düşünülmektedir.

LFA sistemleri için nitroselüloz üreten ve sektörde önde gelen Sartorius, Cytiva, Merck Milipore, Mdi Membrane Technologies ve Pall Corporation isimli firmalar vardır. Bu firmaların yanı sıra Nupore, Shantou Ealon Membrane, Test ve Balya nitroselüloz üreten firmalar arasındadır. COVID sonrası sürekli talep vaadine bağlı olarak membran üretici firmalara bu talebin karşılanması ve üretimi artırma isteği oluşmuştur. Nitroselüloz Grubu (Tayland) mürekkep ve kaplama pazarında yaygın olarak kullanılan bir film oluşturuvcu reçine olan endüstriyel nitroselülozun dünyanın önde gelen üreticilerinden biridir. Reçine dışında doğal selülozun (doğranmış odun hamuru) veya pamuk linterlerinin sülfirik ve nitrik asitlerle işlenmesiyle üretim faaliyetlerini sürdürmektedirler (Web Sayfası-3). Bir Alman firması olan Sartorius biyofarmasötik endüstrisi alanında saflaştırma, filtrasyon yüzey protein testlerinde kullanılmak üzere nitroselüloz membran imalatı yapmaktadır (Web Sayfası-4). Cytiva önde gelen nitroselüloz üreticilerindendir. Biyolojik aşilar ve ilaçlar ve test kit malzemeleri üretmektedir (Web Sayfası-5). Avrupa’da yer alan Merck Millipore diğer nitroselüloz üreten firmalar arasındadır ve biyoteknoloji ve farmasötik ilaç tedavilerinin araştırılması, geliştirilmesi ve üretimi yapmaktadır (Web Sayfası-6). Mevcut piyasada var olan bu firmalarda üretimi gerçekleştirilen nitroselüloz membranlar genellikle ağaç ya da pamuk gibi hammaddeleri kullanarak selüloz elde etmektedir. Mevcut çalışma ile üretilmesi planlanan bakteriyel nitroselüloz ile dünyaca ünlü firmalara alternatif bir üretim yöntemi sağlayacak olması yenilikçi yönünü göstermektedir ve bu üretimin yerli yapılmasına katkıda bulunarak maliyet (Maliyet ile ilgili bilgiler Şekil 2.5’te detaylı olarak verilmiştir) konusunda dışa bağımlılığı azaltacaktır. Ayrıca, selüloz kullanımı gelişen teknoloji ile farklı boyutlarda elde edilip nano teknoloji çağına ayak uydurabilmesi açısından gelişmeye ihtiyacı olan bir materyaldir. Çalışma ile elde edilen bu hammaddenin nano boyuttaki fiberlerden oluşması pazar ve sektördeki benzerlerine göre olan diğer bir yenilikçi yönü ve farklılığıdır. Bunların yanı sıra, piyasada üretimi gerçekleştirilen nitroselüloz membranların yapımında kullanılan hammadde genel olarak ağaç ve pamuk gibi hammaddeler ile gerçekleştirildiğinden doğal kaynakların tüketilmesine sebep olmaktadır. Çalışmada bakteriyel bir yöntemin tercih edilmesinin en önemli sebebi zararsız çevre dostu olmasının yanı sıra herhangi başka bir kaynağı tüketmeden elde edilebilir olmasıdır. Bu yönüyle de çalışmanın kullanılan kaynak açısından sürdürülebilir bir nitelik sergilemektedir.

LFA sistemlerinde test pedi olarak kullanılan nitroselüloz membranının temelde iki önemli rolü bulunmaktadır. Test ile kontrol hatları üzerinden numune akışının sağlanması ve antikorların membran üzerinde sabitleştirilmesidir.

2.4. Çalışma Çıktısının Ticari Önemi

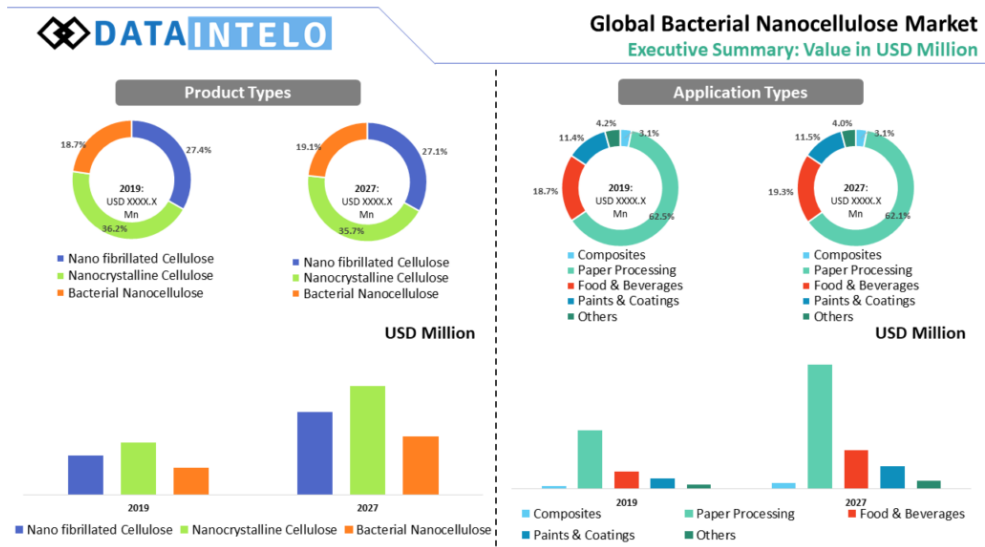
Ticarileşme potansiyeli olarak değerlendirildiğinde 2020 yılında Washington üniversitesi tarafından yapılan Covid-19 İçin Yanal Akış Testleri: Küresel. Nitroselüloz Peyzajı başlıklı LFA sistemlerine olan ihtiyaç hakkında hazırlanan sunumda; mevcut nitroselülozun alternatif membran fizibilitesi olabilecek malzemeler konu alınmıştır. Nitroselüloz membran gözenek yapısı performansını etkileyen unsurlardan birisi polimer çöktürme işlemi ile gözenek yapısını belirlemektir. Uygun olmayan solvent buharlaşması çok farklı gözenekler oluşturduğu vurgulanmıştır. Çoğu test geliştiricisi, nitroselülozun mevcut en iyi membran olduğu konusunda hemfikirdir ve alternatiflere olan önem belirtilmiştir. Bu konuda önde gelen alternatifler sentetik polimer membranlardır; PVDF, naylon, PES gibi nitroselüloza benzer hava veya ıslak döküm hatları gerektirir. Nitroselüloz membran kapasitesinin küresel artışı sınırlıdır, 2022'de önemli bir artış mümkün olduğu ve çoğu firma tarafından öngörülen talebe karşı hala ihtiyaç açığı olduğu belirtilmiştir. Üreticiler hala bazı ek özelliklere sahip olan membranlara ihtiyaç olduğunu ve yatırım yapılması için önemli bir pazar olduğu belirtilmiştir. Tercih edilen önemli selüloz türevi olan nitroselüloz pazarının maliyetinin yapılan değerlendirmeler sonucu 1 adet LFA için nitroselüloz membran maliyeti 0,02\$ iken market payının 120M\$ olduğu verilmiştir (Sheahan vd., 2020) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nitroselüloz üretim maliyeti (Sheahan vd., 2020) (en son 2020 verisi bulunmaktadır, yeni veri yayımlanmamıştır)

2018 yılında 219,5 milyar \$ değerinde olan selüloz ve türevlerini de kapsayan selüloz pazarının 2026 yılında %4,2 oranında büyüyerek 305,1 milyar \$'a ulaşması beklenmektedir. (Fortune Business Insights, 2018). Selüloz ve türevleri 2018 yılında dünyada en çok ticareti yapılan 456. ürün olarak kaydedilmiştir (The Observatory

Economic of Complexity, 2020). Yatırıma konu olan selüloz ve türevlerinin pazarı 2017 yılına göre 2022 yılında %5,07 oranında büyümesi beklenmektedir (Markets ve Market, 2018 - son veri). Selüloz ve türevleri sektöründe Kuzey Amerika ile Asya Pasifik ülkeleri (Çin, Hindistan ve Güneydoğu Asya) liderdir (Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, 2020). Bunun yanı sıra, farklı ürün ve uygulama alanlarına sahip olan ve çalışmayla doğrudan ilişkisi olan bakteriyel nanoselüloz pazarının 2019 yılında yaklaşık 95 Milyon ABD doları değerinde olduğu ve 2026 yılına kadar 3.5 Milyar ABD dolarını aşması ve 2020-2026 tahmin döneminde %21'lik bir yıllık bileşik büyüme oranında (CAGR) büyümesi beklenmektedir (Web Sayfası-7). (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Ürün ve uygulama alanlarına göre selüloz türevlerine ait pazar paylarının gösterimi (Web Sayfası-7).

Nitroselüloz membranlar, yüksek protein bağlama yeteneklerine sahip gözenekli kağıt benzeri substratlar olarak, POC immünojenik testler alanında çok popülerdir. Bununla birlikte, mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihazları (μ PAD'ler) imal etmek için nitroselüloz membranlarda sağlam hidrofobik yapılar oluşturmak büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. 2022 yılında yapılan bu çalışma ile serigrafi yoluyla nitroselüloz membranlarda μ PAD'leri imal etmek için hidrofobik bir malzeme olarak su bazlı poliüretan akrilatının kullanılmasını önerilmiştir (Lin vd., 2022). Maliyeti düşürerek daha etkin bir membran eldesinin yapılması literatürde büyük önem arz etmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın tüm aşamalarında kullanılan kimyasal malzeme, cihaz ve yöntemlere ait bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzeme ve cihazlar aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar yüksek saflıkta olup, uluslararası kimyasal ürün dağıtıcılarından (Sigma-Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Millipore) tedarik edilmiştir. Tüm kimyasallar herhangi ek bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. Bakteriyel nanoselülozun eldesi ve nitrolanması için *Acetobacter xylinum* kültürü, glikoz, yeast extract, H_2O_2 , H_2SO_4/HNO_3 sülfürik asit, nitrik asit, sodyum karbonat kimyasalları Merck markasından, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaOH kimyasalları Sigma-Aldrich markasından temin edilmiştir. Altın (III) klorür trihidrat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) Alfa Aesar'dan trisodyum sitrat çözeltisi ($Na_3C_6H_5O_7$), bovine serum albumin (BSA), human serum, 10mM pH 7.4 fosfat tamponlu salin tabletler borate buffer, sodyum klorür, Tween-20, sükroz Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Direct-Q3 (Millipore) cihazı ile elde edilmiş olan ultra saf su (direnci 18,2 M Ω cm) her deney öncesinde taze olarak temin edilmiştir.

Analit olarak Human IgG whole molecule (Sigma I2511), test çizgisi antikoru olarak Antibody anti-human IgG (produced in goat) (Sigma I1886), konjugasyon antikoru Antibody anti-human IgG γ -chain specific biotinylated (produced in goat) (Sigma B1140), ve kontrol çizgisi antikoru Antibody anti-goat IgG (Abcam ab86245) kullanılmıştır. Konjugasyon pedi olarak kullanılan cam elyaf (GF00080000), numune ve atık (adsorbent) ped olarak kullanılan selüloz elyaf (CFSP001700), ticari altlık olarak kullanılan nitroselüloz membran ve destek kartı (HF090MC100) Millipore'dan satın alınmıştır.

Hazırlanan nanomalzemeleri içeren çözeltiler ve tampon çözeltiler +4 °C'de buzdolabı içerisinde karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalışma süresince kullanılan cihaz ve kullanım amaçları aşağıda tablo olarak gösterilmiştir (Tablo 3.1.)

Tablo 3.1. Çalışma süresince kullanılan cihaz ve kullanım amaçları

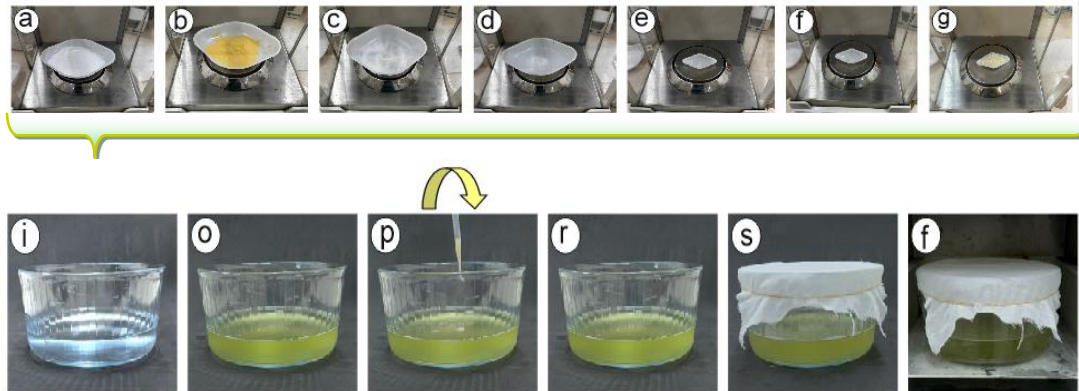
Adı / Marka	Kullanım Amacı
Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM-STEM dedektörü)/ ZEISS GeminiSEM 500 (ZEISS)*	Elde edilen altın nanopartiküllerin görüntülenmesi ve boyut karakterizasyonu ayrıca BNS ve nBNS morfolojik karakterizasyonunda kullanılmıştır.
Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometre (UV-Vis) / Shimadzu UV-160	Elde edilen altın nanopartiküllerin spektrofotometrik karakterizasyonu işleminde kullanılmıştır.
Linomat 5 / Camag	Test ve kontrol çizgilerinin düzgün ve homojen şekilde yazdırılması
Colorimetric Lateral Flow Reader / ESEQuant	Yanal akış immüsensörün cevabının (test ve kontrol çizgilerinin şiddetinin) ölçülmesi
Vakumlu etüv, Etüv vb laboratuvar cihaz ve ekipmanları	Numune, adsorbsiyon ve konjugasyon pedlerin kurutulması işleminde kullanılmıştır.
Soğutmalı termal çalkalayıcı (+4 °C) / Biosan TS-100C	AuNPs'nin antikor ile fonksiyonlandırılması işleminde kullanılmıştır.
Santrifüj cihazı / HETTICH	AuNPs'nin antikor ile fonksiyonlandırılması işleminde kullanılmıştır.
Laboratuvar tipi buzdolabı (+4/-20 °C) / LIEBHERR	Antikor, çözelti ve hazırlanan test kitlerinin soğukta muhafazası işleminde kullanılmıştır.
Brunauer–Emmett–Teller (BET) * Quantachrome – Quadrasorb Evo 4	nBNS'nin yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımlarını belirlemek için kullanılmıştır

*Karakterizasyon ve ELISA analizleri çalışma kapsamında hizmet alımları ile gerçekleştirilmiştir

3.2. Yöntem

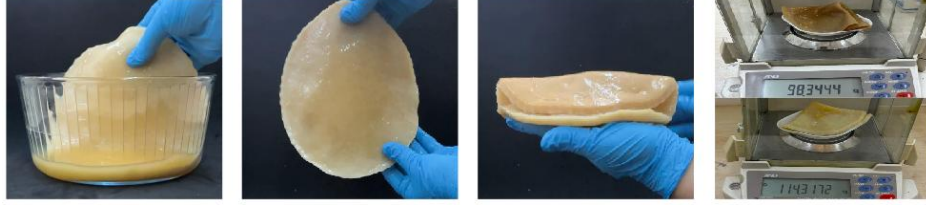
3.2.1. Bakteriye nanoselüloz eldesi

BNS literatürde bilinen (Golmohammadi vd., 2015) ve grubumuz tarafından farklı çalışmalar (Zor, 2018; Zor vd., 2018; Copur vd., 2019) için uygulanan çevre dostu bir yöntemle üretilmiştir. Bu basamak için; *Acetobacter xylinum* bakteri kültürü, D-glikoz (50 g), maya özü (yeast extract) (5 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g), KH_2PO_4 (4 g), sitrik asit (1,5 g), pepton (5 gr) ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g) içeren 1 litre suda 24 °C'de inkübe edilmiş olup iki hafta karanlık bir ortamda bekletilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bakteriye nanoselüloz eldesi. a) D-glikoz, b) maya özü, c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, d) KH_2PO_4 , e) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, f) sitrik asit, g) pepton, i) saf su o) a-g arası görseldeki bileşenlerin saf suya eklenmesi, p) *Acetobacter xylinum* bakteri kültürünün eklenmesi r-t) Temiz bir bez ile kapatılması ve karanlık ortama bekletilmesine ait görseller

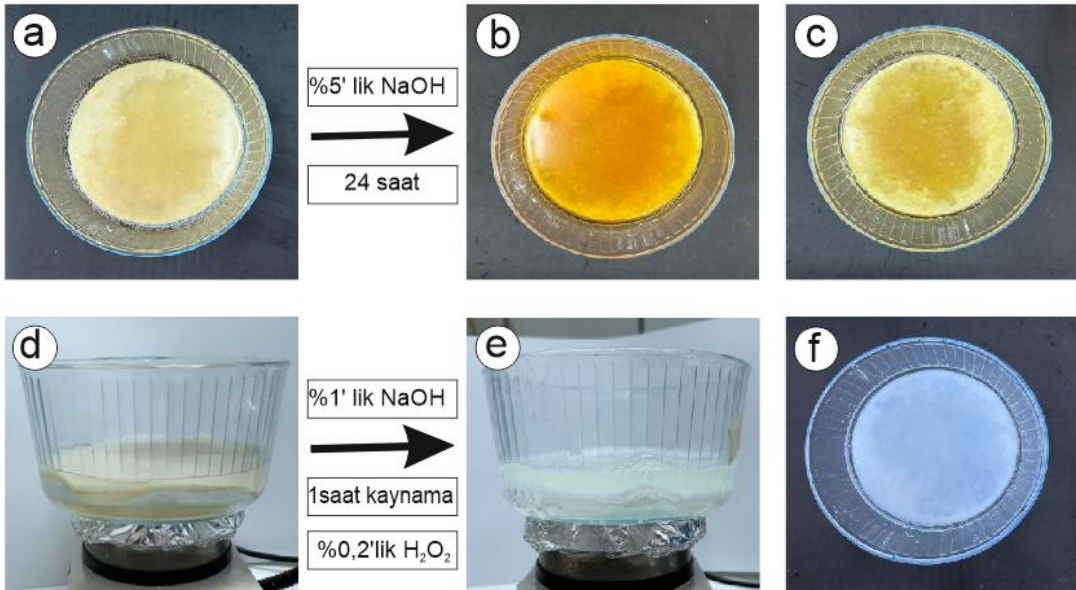
Hazırlanan çözelti iki hafta boyunca 24 °C sabit sıcaklıkta bir karanlık ortamda bekletildikten sonra, cam reaktör içerisinde yaklaşık 4 mm kalınlığında, selüloz nano liflerden oluşan, saflaştırılmamış sarı-açık kahverengi renkli ıslak jelimsi mat oluştuğu (BNS) gözlenmiştir. Oluşan BNS'ye ait görseller ve tartıma ait sonuçların görselleri Şekil 3.2'de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Oluşan sarı-açık kahverengi renkli ıslak jelimsi bakteriyel nanoselüloz mat ve tartımına ait görselleri

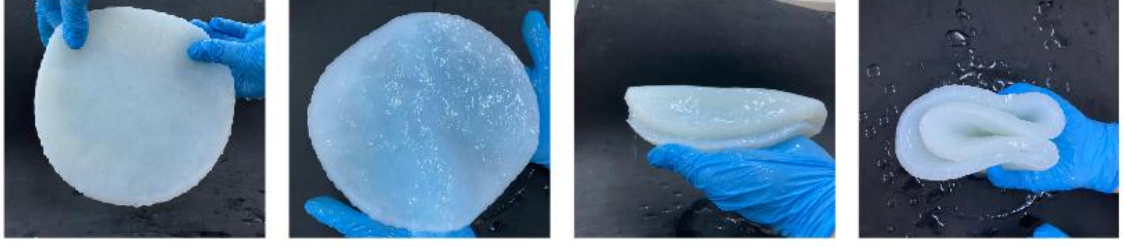
3.2.2. Bakteriyel nanoselülozün saflaştırılması

Elde edilen sarı-kahverengi renkli BNS matı (Şekil 3.3-a), bakteri ve diğer safsızlıklardan arındırmak için ilk olarak ağırlıkça %5'lik NaOH içerisinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir (Şekil 3.3-b). Bu işlemin ardından saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir ve Şekil 3.3c'de gösterildiği üzere daha açık renkli bir jelimsi mat elde edilmiştir. Ardından, elde edilen açık renkli jelimsi mat ağırlıkça %1'lik NaOH ve ağırlıkça %0,2'lik H_2O_2 ile muamele edilmiştir (Şekil 3.3-d) ve 80 °C'de 1 saat (Şekil 3.3-e) bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda beyaz renkli ve yarı-şeffaf karakter sergileyen BNS matı elde edilmiştir (Şekil 3.3-f).



Şekil 3.3. BNS'nin saflaştırılmasına ait görseller a) BNS'nin %5'lik NaOH'a eklenmesi, b) 24 saat sonra BNS c) BNS'nin temizlenmiş hali, d) BNS'nin %1'lik NaOH'a eklenmesi, e) 1 saat 80 °C'de bekletilip %0,2'lik H_2O_2 eklenmesi aşaması, f) Ön-saflaştırma işlemi son

İkinci saflaştırma adımı olarak, bakteriyel selüloz nanoliflerinden üretilen ıslak mat, kimyasalları uzaklaştırmak ve şeffaf bir BNS elde etmek için ultra saf su ile yıkamıştır. Elde edilen BNS'e ait görüntüler Şekil 3.4'te sunulmuştur.



Şekil 3.4. Ultra saf su ile yıkanmış ve saflaştırılmış BNS'e ait görseller

Elde edilen BNS yapısının morfolojik karakterizasyonu Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu-FESEM gerçekleştirilmiştir. FESEM görüntüleri bulgular kısmında verilmiştir.

3.2.3. Bakteriyel nanoselülozün nitrolanması

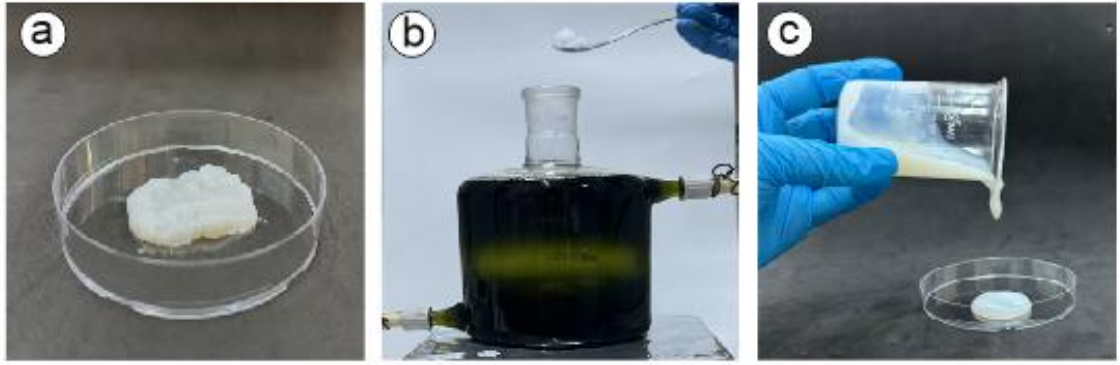
Bu basamakta, literatürde uygulanan (Budaeva vd., 2019; Sun vd., 2010) selülozik yapıların nitrolama yöntemine benzer bir yöntem gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen BNS parçalayıcı (blender) yardımı ile parçalanmış ve liflerin ayrılması sağlanmıştır. (Şekil 3.5). Daha sonra 9.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve çöktürülerek sudan ayrılmıştır.



Şekil 3.5. BNS'nin parçalanması ait görseller. a) Saflaştırılmış BNS, b) BNS'nin parçalayıcı (blender) yardımıyla homojen olarak parçalanması, c) Saklamak için uygun kapaklı bir malzeme içerisine alınmasına ait görseller

Çöken BNS nanofiber yapıları petri kabına alınmıştır (Şekil 3.6-a) ve ardından sülfürik asit-nitrik asit (1:50) karışımına eklenmiş ve sirkülatör yardımıyla ceketli balon içerisinde sıcaklık 25-30°C (kontrollü) ve reaksiyon süresi 40 dakika olacak şekilde karıştırılmıştır (Şekil 3.6-b). Bu süre sonunda ortamda kalan asitler uzaklaştırmak elde edilen nitrolanmış Bakteriyel Nanoselüloz (nBNS) 1 saat 85-95°C'de su ile karıştırma

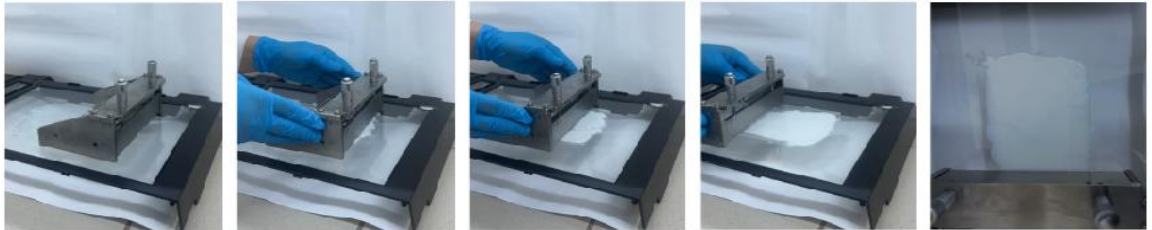
işlemine tabi tutulmuş ve ardından %0.03'lük sodyum karbonat çözeltisi ile 3 saat 85-95°C'de ve sonra tekrar su ile 85-95°C'de 1 saat muamele edilerek nötr pH değerine kadar yıkanmıştır. Şekil 3.6-c son aşamadaki elde edilen nBNS'nin jelimsi yapıdaki kıvamlı süspansiyonu göstermektedir.



Şekil 3.6. BNS'nin nitrolanması a) Saflaştırılmış BNS, b) BNS'nin nitrolanması için kullanılan ceketli balon ve reaksiyon ortamının hazırlanması, c) Jel kıvamında nBNS'e ait görseller

3.2.4. Nitrolanmış bakteriyel nanoselülozün kurutulması

Çalışmanın bu basamağında nBNS Dr. Blade sistemi kullanılarak ve homojen bir şekilde yayılarak düzgün bir yapı oluşturulmuştur. Kullanılan sistem Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



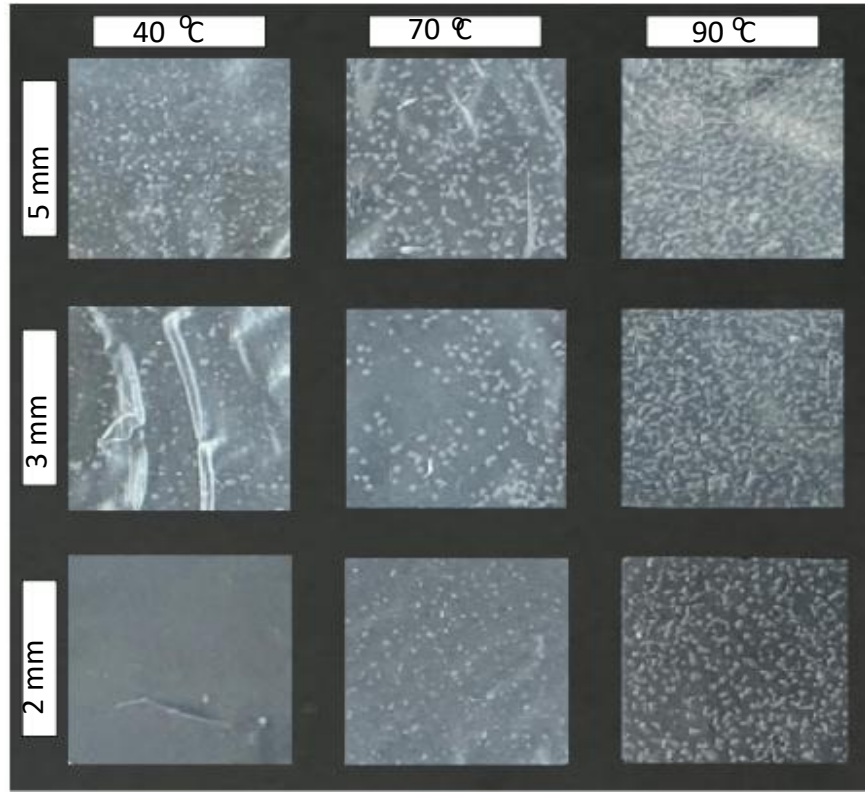
Şekil 3.7. nBNS'nin Dr. Blade sistemi ile yayılması

Elde edilen nBNS, uygun yanal akış elde etmek için Dr. Blade sisteminde 2-5 mm kalınlıklarında (thickness) homojen bir şekilde yayılmış ve kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sistem üzerinde yayılmış farklı kalınlıklardaki (sırasıyla 2,3 ve 5 mm) nBNS'ler Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Dr. Blade sistemi ile farklı kalınlıklarda nBNS dökme işlemine ait görseller. a) 2 mm, b) 3 mm kalınlık, c) 5 mm kalınlık

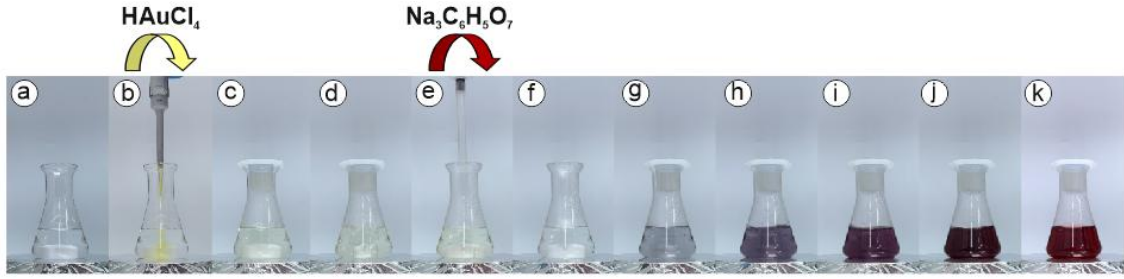
Uygun yanal akış ve homojen gözenek boyutu elde etmek için 40, 70 ve 100 °C sıcaklıklarında kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Farklı sıcaklıkta (40,70 ve 90 °C) ve kalınlıklarda (ince-2 mm, orta kalınlıkta-3 mm, kalın- 5 mm) dökülen nBNS'lerin kurutma sonuçlarına ait görseller

3.2.5. AuNPs'nin sentezi

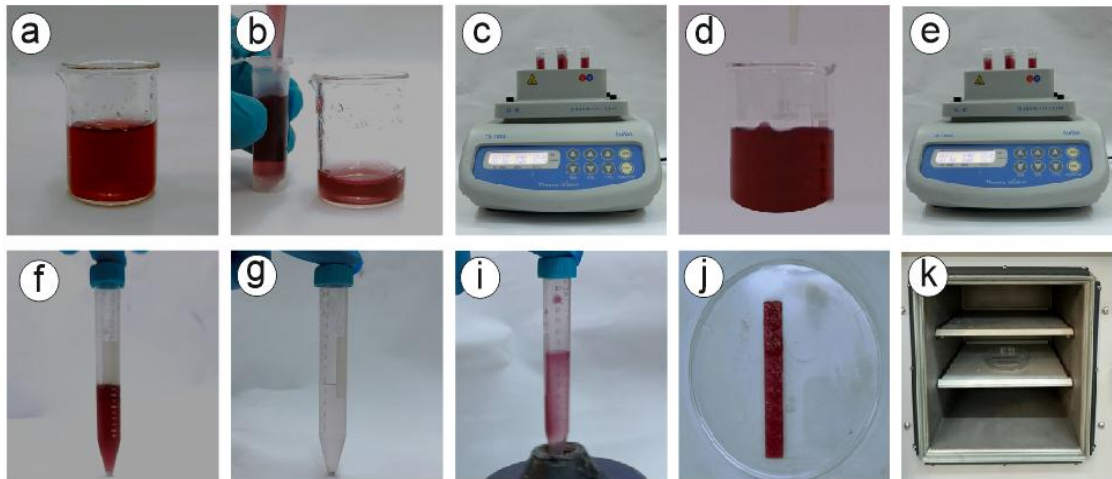
Altın nanopartikül (AuNPs) çözeltisi, kararlı ve homojen partikül dağılımı gösteren Turkevich metoduna göre sentezlenmiştir (Turkevich vd. 1951). Bu sentez işleminde öncelikle tanecik oluşumunu ve boyut dağılımını bozacak etki yaratabilen kontaminasyonu engellemek amacıyla kullanılan tüm cam malzemeler ve manyetik karıştırıcı balıklar kral suyu ($\text{HNO}_3/\text{HCl}=1:3$, v/v) ile temizlenip distile su ile durulandıktan sonra etüvde kurutulmuştur. Prosedüre göre 50 mL $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mM) çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti hızlıca karıştırılarak kaynatılmıştır. Hazırlanan trisodyum sitrat (TSC) çözeltisi ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ -%1, 1.25 mL), kaynayan çözeltiye hızlıca eklenmiş ve 10 dakika boyunca karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucu koyu mavi renkten karakteristik kırmızı renge doğru renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 3.10). Çözelti oda sıcaklığına soğuyana kadar karıştırma işlemine devam edilmiş ve daha sonra gün ışığından korumak için alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.10. AuNPs sentezi a) Saf su, b) $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ eklenmesi, c-d) Kaynama e) TSC eklenmesi, f-k) Renk değişimin gözlemlenmesi

3.2.6. AuNPs'nin yüzey fonksiyonlandırılması ve konjugasyon pedinin hazırlanması

Fonksiyonlandırma işlemi AuNPs ve B1140 kodlu antikorunun uygun oranlarda karıştırılmasıyla elektrostatik etkileşimler ve antikor yapısındaki sistein gruplarında bulunan kükürt atomu ile kuvvetli tiyol bağı oluşturabilen AuNPs sayesinde gerçekleştirmiştir (Chamorro-Garcia vd., 2016; Quesada-González vd., 2019). Bu aşamada AuNPs çözeltisi ile antikor soğutmalı çalkalayıcı yardımı ile $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika 600 rpm'de karıştırılmıştır. Karışım $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj yapılarak çöktürülmüş ve çöken antikor ile fonksiyonlandırılmış AuNPs (Antikor@AuNPs) borat tamponu (2 mM pH 7,4 + 10% 'luk sükroz) içinde dağıtılmıştır (Parolo vd., 2020). Daha sonra cam elyafa emdirilerek konjugasyon pedi hazırlanmıştır. AuNPs nin fonksiyonlandırma basamakları ile ilgili görseller Şekil 3.11'de verilmiştir.

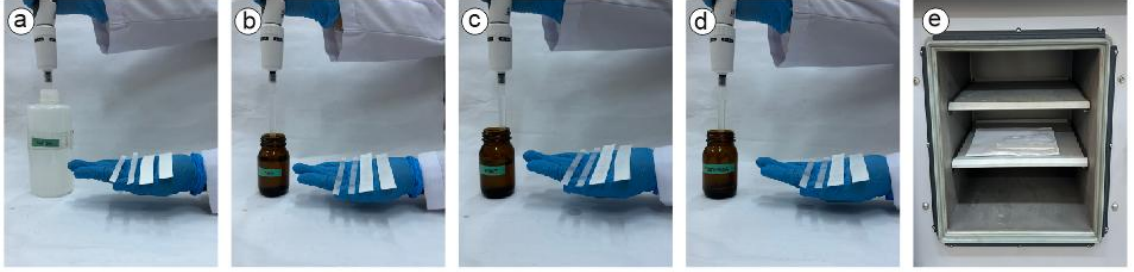


Şekil 3.11. AuNPs fonksiyonlandırması a) Borat tamponu içinde Antikor@AuNPs, b) Çözeltiyi eppendorflara bölünme, c) Soğutmalı çalkalayıcıda karışma ($+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika 600 rpm), d) BSA eklenmesi, e) Soğutmalı çalkalayıcıda karışma ($+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika 600 rpm), f) Santrifüj tüpüne alınma, g) Çöktürme, h) Borat tamponunda (2 mM pH 7,4 + 10% 'luk sükroz) dağıtma, i) Cam elyafa emdirme j) Vakum altında kurutmaya ait görseller

3.2.7. LFA pedlerin hazırlanması

LFA sistemleri temelde numune pedi, adsorben pedi, konjugasyon pedi ve tayin pedi (nitroselülöz) olmak üzere 4 bileşenden oluşmaktadır. Sistemde kullanılan numune pedi, adsorben pedi ve konjugasyon pedi çalışmadan temin edilmiştir. Tayin pedi olarak çalışma çıktısı olan nBNS tayin pedi olarak kullanılmıştır.

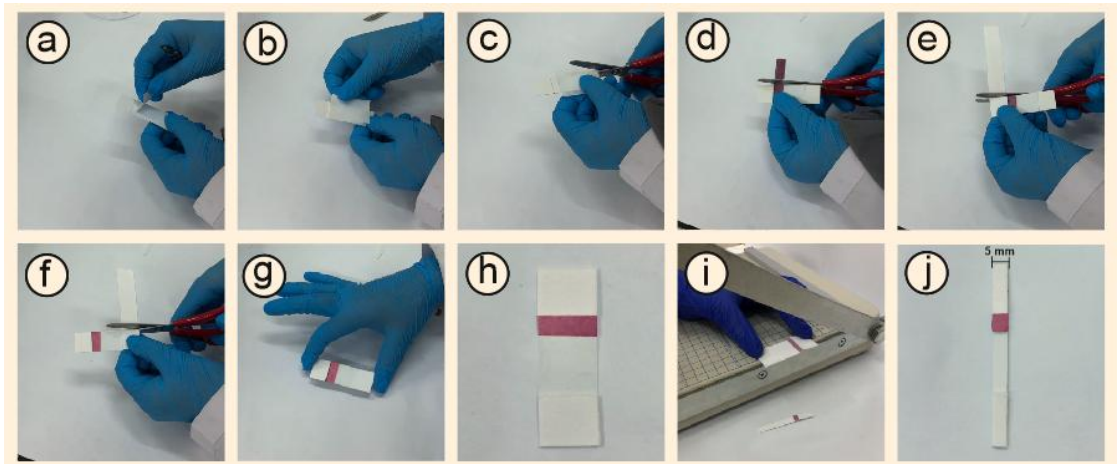
Numune ve atık pedi ve konjugasyon pedi Şekil 5.1'de gösterildiği gibi sırasıyla saf su, fosfat tampon çözelti (phosphate buffer solution -PBS, pH=7,4), surfaktan (Tween-20) içeren fosfat tampon çözelti (PBS+ Tween-20 - PBST) ve sığır serum albumin (bovine serum albumin – BSA) içeren immünotampon çözeltileri ile yıkanarak 37 °C'de 2 saat etüvde kurutulmuştur (Quesada-González vd., 2019) (şekil 3.12).



Şekil 3.12. Pedlerin yıkanmasına ait görseller a) Saf su yıkaması, b) PBS yıkaması, c) PBST yıkaması, d) PBST+BSA yıkaması, e) Kurutma basamaklarına ait görseller

3.2.8. LFA kitinin oluşturulması

Bu basamakta, yıkanarak kurutulan pedler ve daha önce hazırlanan konjugasyon ile tüm bileşenler çalışmadan temin edilen altlık üzerinde bir araya getirilerek uygun ebatlarda kesilmiş ve LFA test kitleri elde edilmiştir. Şekil 3.13'te LFA test kitlerinin birleştirilme aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.13 LFA test kitlerinin oluşturulması a-c) Altlık üzerine nBNS'in yapıştırılması, d) Konjugasyon pedinin yapıştırılması, e) Numune pedinin yapıştırılması, f) Adsorben pedinin yapıştırılması, g,h) Kitin uzun boyutu, i) İstenilen boyutta kesilmesi, j) 5 mm kalınlık

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma süresince elde edilen bulgular bu bölümde başlıklar halinde verilmiştir.

4.1. Bakteriyel nanoselülozun karakterizasyonu

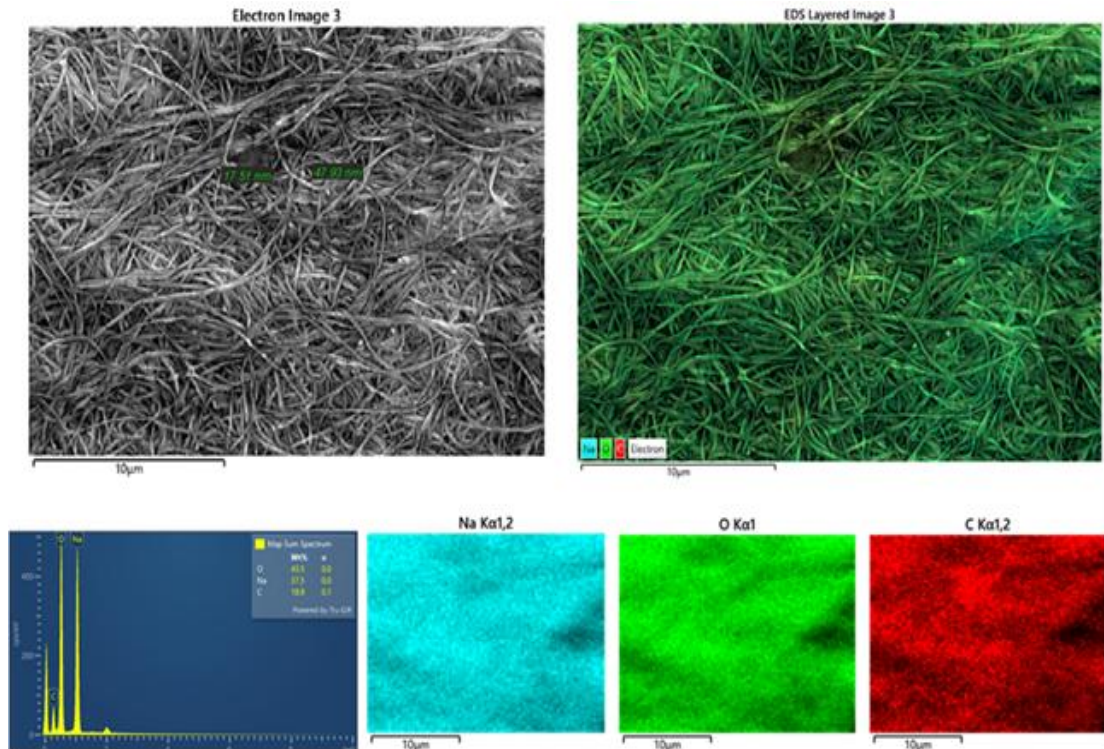
4.2. Nitrolanmış bakteriyel nanoselülozun karakterizasyonu

4.3. AuNPs'in karakterizasyonu

4.4. Elde edilen test pedinin LFA sisteminde denenmesi

4.1. Bakteriyel Nanoselülozün Karakterizasyonu

Elde edilen BNS yapısının morfolojik karakterizasyonu Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu-FESEM ile hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel nanoselüloza ait FESEM ve EDS analiz görüntülerine ait görseller Şekil 4,1'de sunulmuştur. FESEM görüntülerinden görüldüğü üzere, yaklaşık 50 nm çapında ve birkaç mikron uzunlukta fiberlerin oluştuğu gözlenmiştir. Yapılan EDS analizinde yapıda selüloz yapısının oluştuğuna dair karbon (C) ve oksijen (O) varlığı tespit edilmiş olup sodyum (Na) varlığı yıkama esnasında kullanılan NaOH'in tamamen uzaklaşmadığına atfedilmiştir.

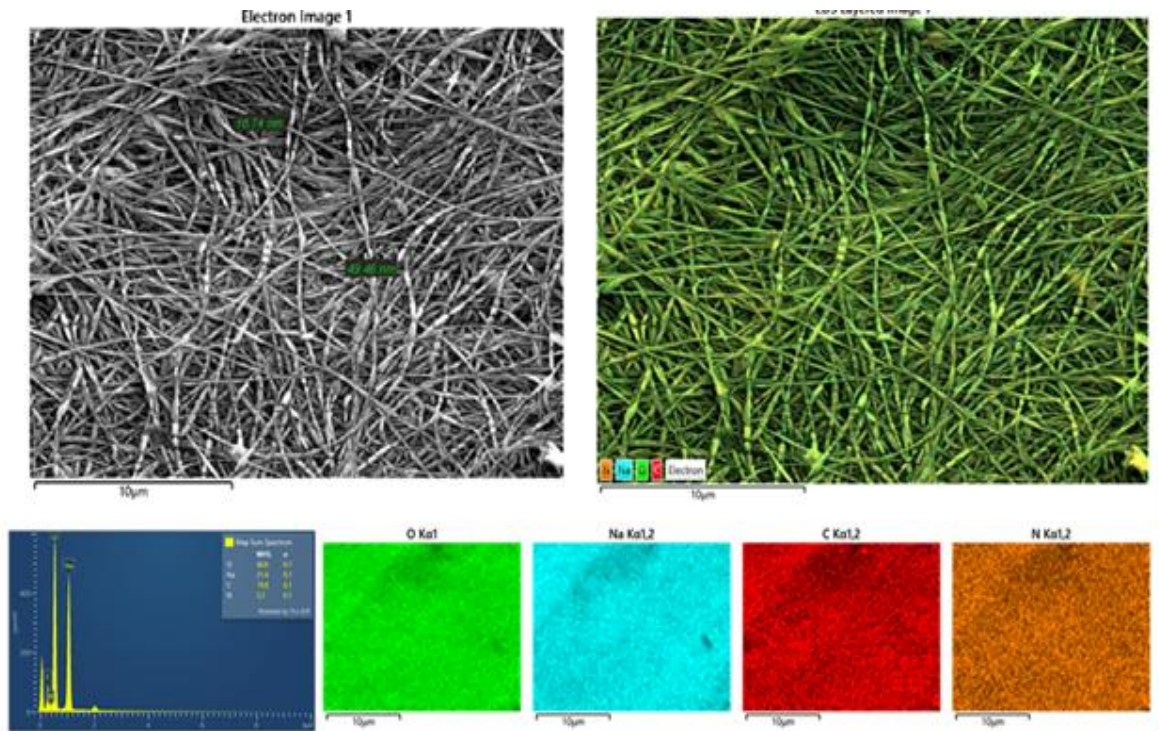


Şekil 4.1. BNS'e ait FESEM ve EDS analiz görüntülerine ait görseller

Sonuç olarak her sentez sonunda 50 g üzeri BNS elde edilmiştir. Elde edilen BNS'lerin FESEM görüntüleri alınmış ve nanofiberlerin 10-50 nm civarında fiber çapına sahip olduğu gözlenmiştir.

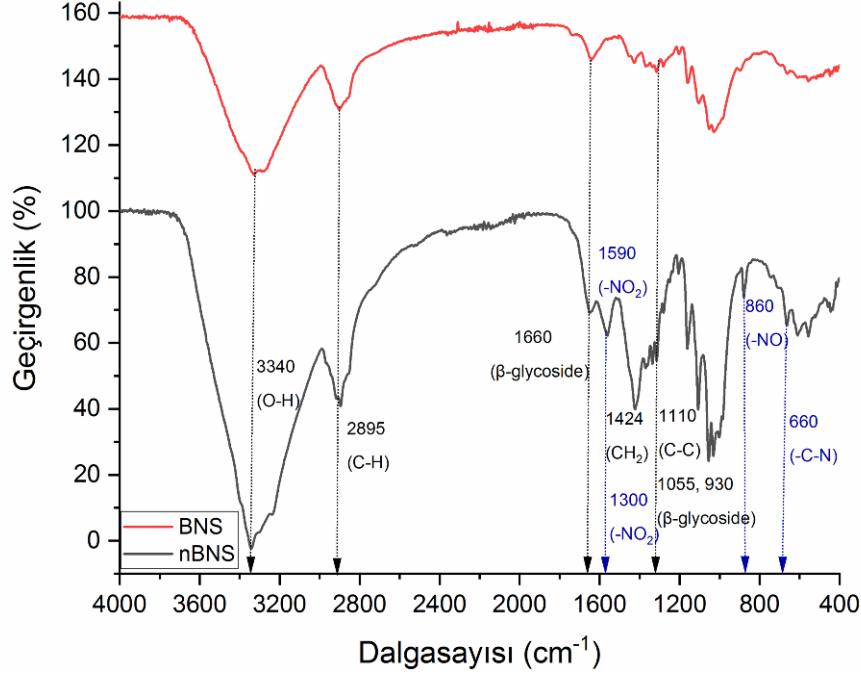
4.2. Nitrolanmış Bakteriye Nanoselülozün Karakterizasyonu

Elde edilen nBNS yapısının morfolojik karakterizasyonu FESEM ile gerçekleştirilmiş ve nBNS'nin FESEM ve EDS analiz görüntülerine ait görseller Şekil 4.2'de sunulmuştur. FESEM görüntülerinden görüldüğü üzere, yaklaşık 10-50 nm çapında ve birkaç mikron uzunlukta fiberlerin yapısını koruduğu gözlenmiştir. Yapılan EDS analizinde yapıda gözlemlenen karbon (C) ve oksijen (O) varlığı selüloz yapısının varlığını koruduğunu göstermiş olup azot (N) varlığı nitrolama işleminin gerçekleştiği ile ilgili fikir vermiştir. Ayrıca sodyum (Na) varlığı yıkama esnasında kullanılan sodyum karbonatın (Na_2CO_3) tamamen uzaklaşmadığına atfedilmiştir



Şekil 4.2. nBNS ait FESEM ve EDS analiz görüntülerine ait görseller

Elde edilen nBNS'nin yapısal karakterizasyonu ayrıca FT-IR ile gerçekleştirilmiştir ve BNS ile karşılaştırılması Şekil 4.3'te sunulmuştur

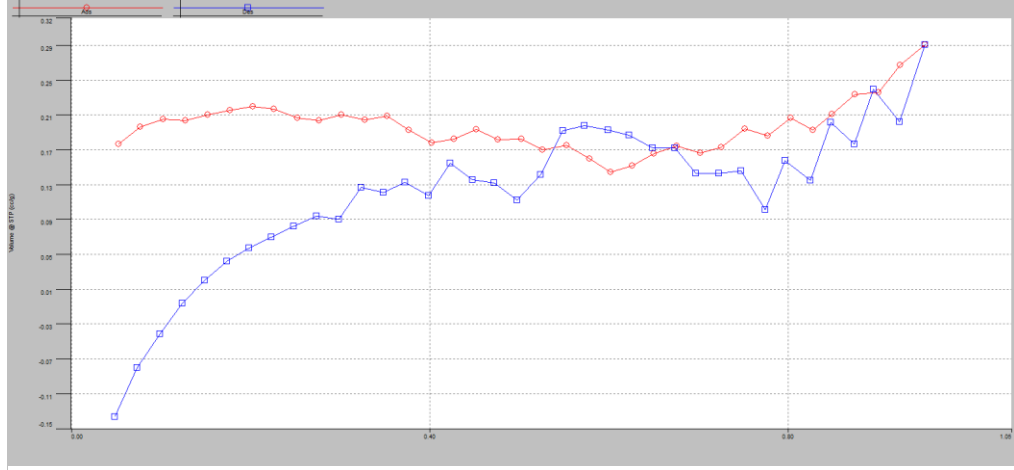


Şekil 4.3. BNS ve nBNS'e ait FT-IR spektrumları

BNS ve nBNS FT-IR spektrometresi ile karakterize edilmiştir. Her iki nanoselüloz yapısına ait FTIR spektrumlarında benzer karakteristik piklerin varlığı gözlenmiştir. Bunlar; 3340 cm^{-1} 'deki O-H gerilmesine ait absorpsiyon bandı, 2895 cm^{-1} 'deki C-H gerilmesine ait absorpsiyon bandı, 1424 cm^{-1} 'deki CH_2 bükülmesine ait absorpsiyon bandı (Mukwaya vd., 2016), 1660, 1055 ve 930 cm^{-1} 'deki β -glycoside yapısına ait absorpsiyon bantlarıdır (Helmiyati vd. 2021). nBNS yapısını BNS yapısından ayıran ve nitroloma işleminde yapıda gözlenen temel olarak iki spektrum arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında; 1300 cm^{-1} 'deki pikin $-\text{NO}_2$ simetrik gerilme ve 860 cm^{-1} 'deki pikin ise $-\text{NO}$ gerilme titreşimine ait olduğu belirlenmiştir (Sun vd., 2010). 1590 cm^{-1} 'deki band $-\text{NO}_2$ asimetrik gerilmesi ve 660 cm^{-1} 'deki pik C-N bağ frekansına uyan bantlardır (Budaeva vd., 2019).

Yüzey alan analizi, fiziksel adsorbsiyon yöntemiyle, gözenekli toz veya katı numunelerdeki gözenek boyut ve dağılımının yüksek ve düşük basınçlarda belirlenmesinde kullanılır. Hesaplama işlemleri yapılırken Brunauer Emmett ve Teller (BET) teorisi kullanıldığından bu teorinin ilk harfleri olan BET ismi analizi yapan cihazların yaygın bir diğer ismi olmuştur. Gözeneklilik toz veya tanecikte bulunan gözeneklerin toplam hacminin toz veya taneciğin görünen hacmine oranıdır. Genişliği 2 nm'den küçük olan gözeneklere mikrogözenek, 2-50 nm arasında olanlara mezogözenek, 50 nm'den büyük olanlara ise makrogözenek denir (Thomas vd., 2021).

Elde edilen nBNS'nin yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımlarını belirlemek için BET analizi gerçekleştirilmiştir (Ashrafi vd. 2019). Bu analiz en iyi sonuç veren 2 mm kalınlığa sahip olan ince bir şekilde dökülmüş ve düşük sıcaklıkta kurutulmuş (40 °C) membran hazırlanarak hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. BET analizine ait azot gazı (N₂) desorpsiyon ve adsorpsiyon sonuçları Şekil 4.4'te sunulmuştur.

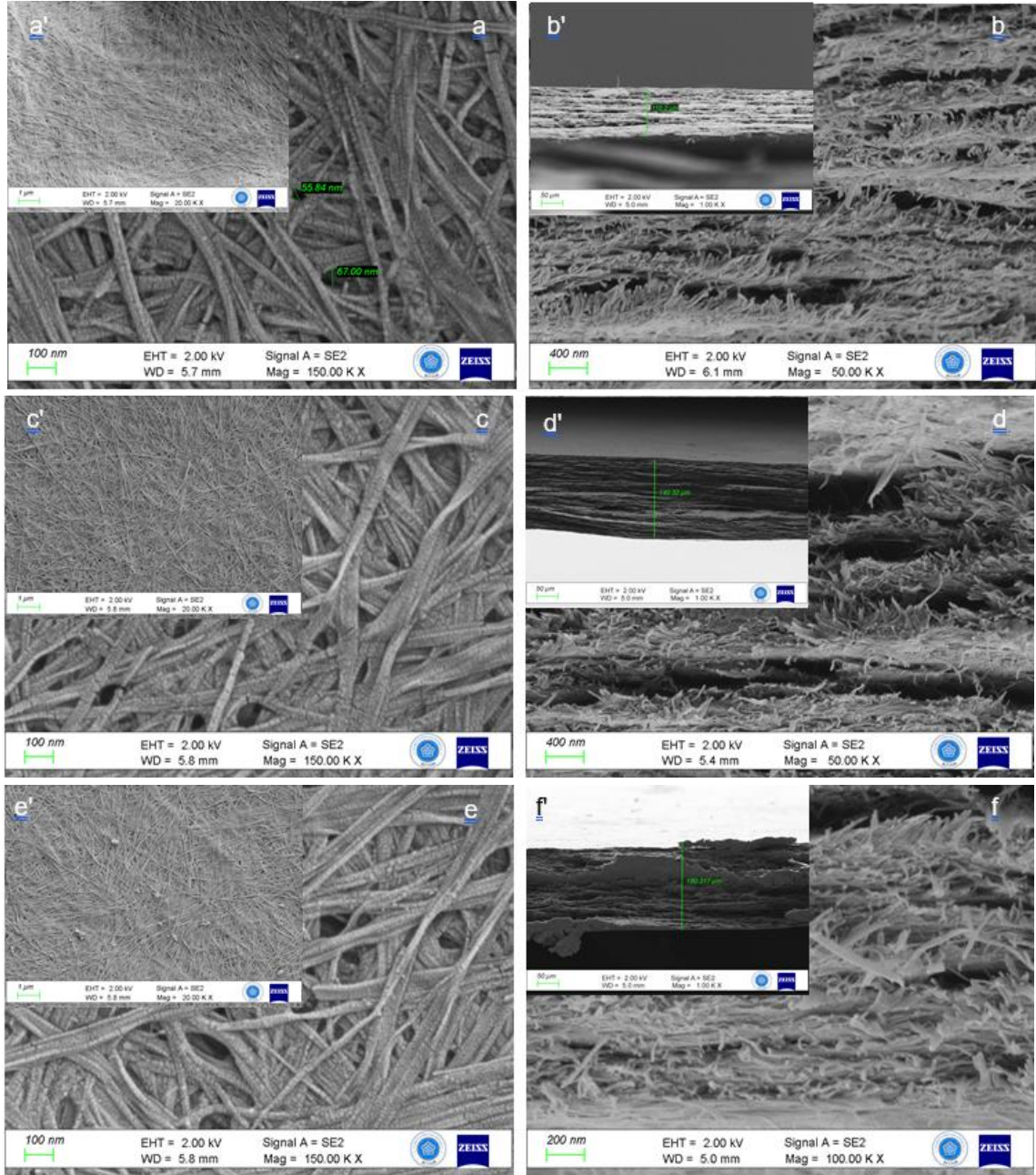


Şekil 4.4. BET analizi sonuçları. Adsorpsiyon (kırmızı) ve desorpsiyon (mavi) izotermi

Nispeten düşük basınçlarda ($P/P_0 < 0.1$) adsorpsiyon izotermelerinin eğimindeki keskin artış, malzemelerde bulunan mikroporların (<2 nm) varlığını gösterir. Daha yüksek basınçlarda adsorpsiyondaki sabit artış, mezo gözeneklerde (2–50 nm) azot molekülünün tek tabakalı/çok tabakalı adsorpsiyonunu göstermektedir (Thomas vd., 2021). Yapılan hesaplamalarda literatürle uyumlu olarak (Thomas vd., 2021) yüzey alanı $18,4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, ortalama gözenek çapı da 55 nm olarak bulunmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda nitrolama işlemi sonrasında nanofiber çaplarının 10-50 nm aralığında kaldığı görülmektedir (Bkz. Şekil 2.3). Gerçekleştirilen FESEM-EDS analizinde nitrolama işlemi sonunda yapıda azot (N) varlığı ve bunun yanı sıra FT-IR spektrumundaki nitro (-NO₂) gruplarına ait karakteristik pikler nitro (-NO₂) gruplarının varlığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 2.4).

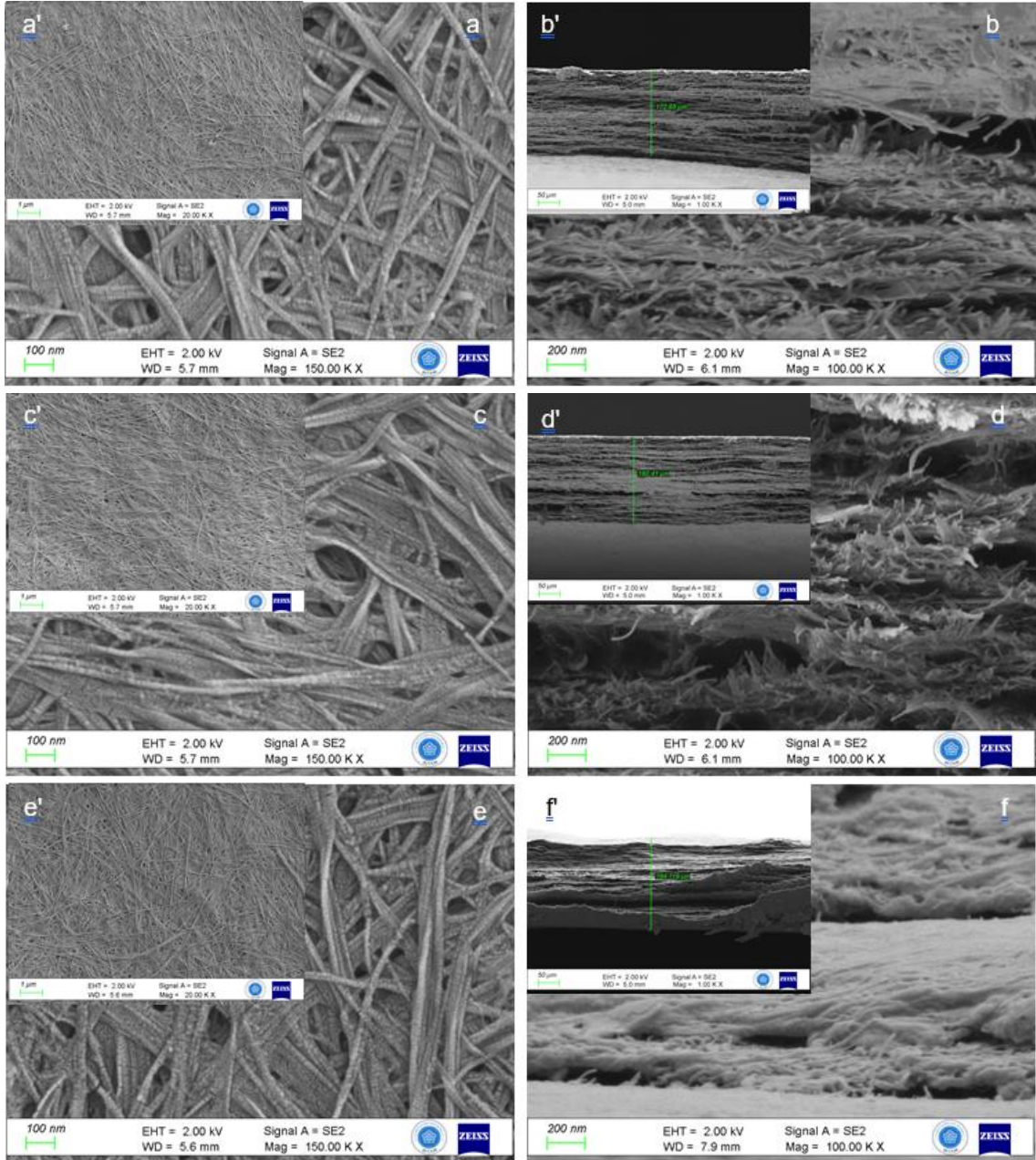
Şekil 3.9'da gösterildiği üzere, özellikle 70 ve 90 °C olmak üzere yüksek sıcaklıklardaki kurutma işlemi esnasında 2 mm kalınlıktaki 40 °C sıcaklıkta kurutulmuş membran hariç hemen hemen tüm membranlarda kuruma esnasında suyun hızlı buharlaşmasından dolayı baloncuklar oluştuğu gözlenmiştir. Elde edilen farklı kalınlıklardaki nBNS'nin farklı sıcaklıklarda kurutularak morfolojik karakterizasyonu FESEM ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5- Şekil 4.7 arasında elde edilen FESEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı kalınlıklarda (2 mm (a-a'), 3 mm (c-c'), 5 mm (e-e')) dökülen nBNS süspansiyonun 40 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların farklı yaklaşma oranlarındaki yüzey ve yan kesit FESEM görüntüleri

Yüzey görüntüleri incelendiğinde madde miktarı arttıkça 40 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yüzey yapılarında farklılık gözlenmemiştir. Ancak, kesit görüntüleri incelendiğinde madde miktarı arttıkça örgü yapının yerine nBNS tabakalarına bütünleşmiş yığın halde bir görünüme büründüğü tespit edilmiş olup plakalaşmış olan örgü yapısını madde miktarı arttıkça daha büyük parçalar halinde ortaya çıktığı görülmüştür. 2 mm (a-a'), 3 mm (c-c'), 5 mm (e-e') kalınlıkta dökülen nBNS için madde miktarı artırıldığında, 70 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yan kesit görüntülerden

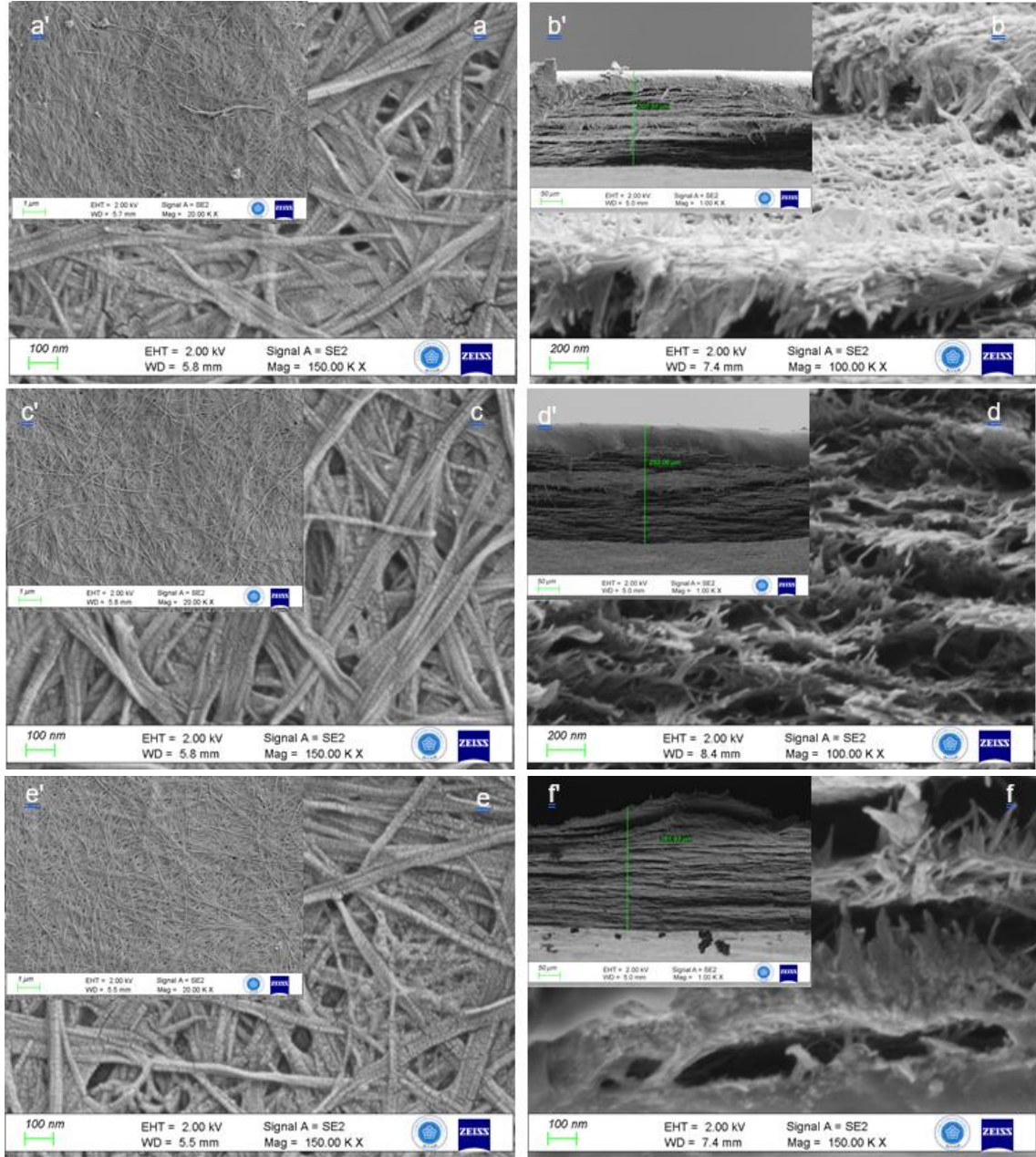
elde edilen membran kalınlıkları sırasıyla 110,2 μm , 140,32 μm ve 180,317 μm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6. Farklı kalınlıklarda (2 mm (a-a'), 3 mm (c-c'), 5 mm (e-e')) dökülen nBNS süspansiyonun 70 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların farklı yaklaşma oranlarındaki yüzey ve yan kesit FESEM görüntüleri

40 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yüzey görüntülerine benzer olarak, yüzey görüntüleri incelendiğinde madde miktarı arttıkça 70 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yüzey yapılarında da farklılık gözlenmemiştir. Ancak, kesit görüntüleri incelendiğinde madde miktarı arttıkça örgü yapının yerine nBNS tabakalarına bütünleşmiş yığın halde bir görünüme büründüğü tespit edilmiş olup plakalaşmış olan örgü yapısını madde miktarı arttıkça daha büyük parçalar halinde ortaya çıktığı görülmüştür. 2 mm (a-a'), 3 mm (c-c'), 5 mm (e-e') kalınlıkta dökülen nBNS için madde

miktarı artırıldığında, 70 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yan kesit görüntülerden elde edilen membran kalınlıkları sırasıyla 172,65 μm , 182,41 μm ve 194,11 μm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7. Farklı kalınlıklarda (2 mm (a-a'), 3 mm(b-b'), 5 mm (c-c')) dökülen nBNS süspansiyonun 90 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların farklı yaklaşma oranlarındaki yüzey ve yan kesit FESEM görüntüleri

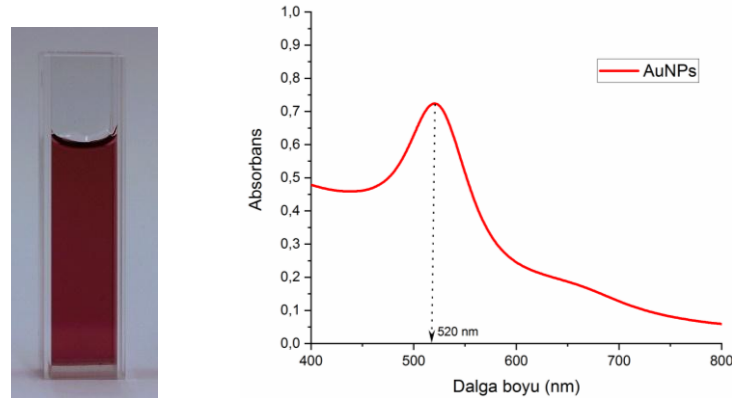
40 ve 70 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yüzey görüntülerine benzer olarak, 90 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yüzey görüntüleri incelendiğinde madde miktarı arttıkça yüzey yapılarında da farklılık gözlenmemiştir. Ancak, kesit görüntüleri incelendiğinde madde miktarı arttıkça örgü yapının yerine nBNS tabakalarına bütünlüşmüş yığın halde bir görünüme büründüğü tespit edilmiş olup

plakalaşmış olan örgü yapısını madde miktarı arttıkça daha büyük parçalar halinde ortaya çıktığı görülmüştür. 2 mm (a-a'), 3 mm (c-c'), 5 mm (e-e') kalınlıkta dökülen nBNS için madde miktarı artırıldığında, 90 °C sıcaklıkta kurutulmuş membranların yan kesit görüntülerden elde edilen membran kalınlıkları sırasıyla 207,51 μm , 253,06 μm ve 261,93 μm olarak bulunmuştur.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda nBNS'nin 2-5 mm kalınlığında homojen olarak yayılması sağlanmıştır (Bkz. Şekil 3.7-3.8). Farklı sıcaklıklarda (40 °C, 70 °C ve 90 °C) gerçekleştirilen kurutma sonrasında elde edilen nBNS FESEM ile kesit görüntülerine bakılarak, öngörülen 0,1-0,5 mm aralığına denk gelen 0,1-0,3 mm kalınlığında kuru nBNS elde edilmiştir (Bkz. Şekil 3.9). Kurutma basamağı ve karakterizasyon sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen 40°C sıcaklıkta 2 mm (kuru 110,2 μm) kalınlıktaki nBNS, LFA sistemi için test pedi olarak kullanılması karar kılınmıştır.

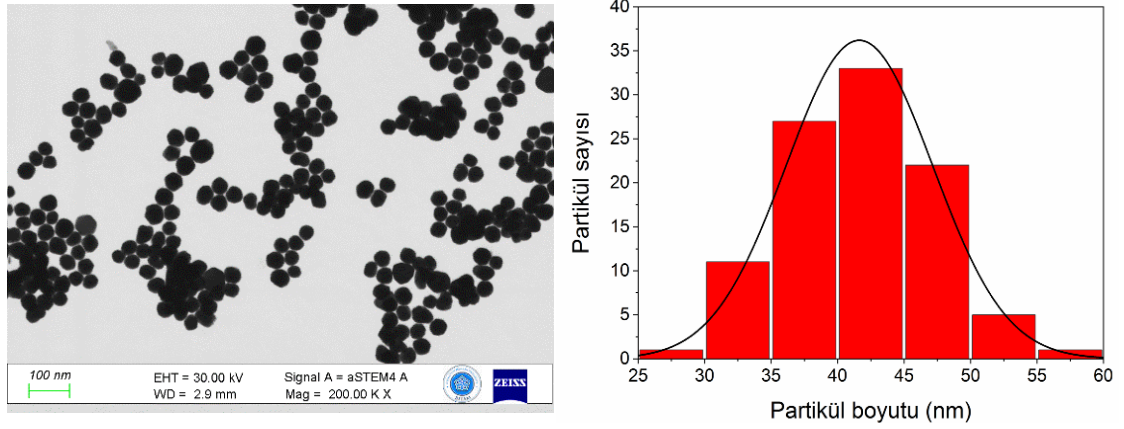
4.3. AuNPs Karakterizasyonu

Elde edilen AuNPs çözeltisine ait görsel Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu çözelti AuNPs için karakteristik kırmızı rengi göstermektedir. AuNPs'lerin spektroskopik karakterizasyonu mor ötesi-görünür bölge (UV-Vis) spektroskopisiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8 hazırlanan AuNPs çözeltisine ait UV-Vis spektrumunu göstermektedir. Bu spektrumda 520 nm dalga boyunda AuNPs'lerin yüzey plazmon absorpsiyonundan kaynaklanan karakteristik absorpsiyon maksimumu gözlenmiştir (Zor ve Bekar, 2017). Bu sonuç çalışma hedefleri doğrultusunda AuNPs'lerin başarılı bir şekilde elde edildiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.8. AuNPs çözeltisi görseli ve UV-Vis spektrumuna ait grafik

Elde edilen AuNPs taneciklerin morfolojik karakterizasyonu ise Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu-FESEM ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen FESEM analizine ait sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu görüntülerden elde edilen partikül boyutu dağılımı sonuçları her ne kadar AuNPs'lerin 25-60 nm aralığında partikül boyutu dağılımı gösterse de ağırlıklı olarak 30-50 nm partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu göstermektedir.

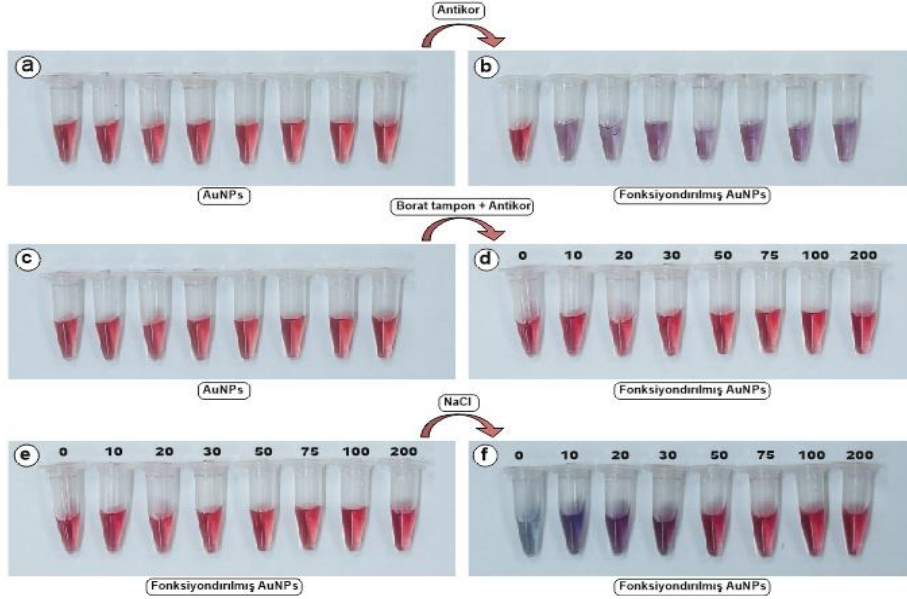


Şekil 4.9. Altın nanopartiküllerin (AuNPs) FESEM görüntüsü ve partikül boyutu dağılımı grafiği

4.3.1. Topaklanma (agregasyon) testi

Konjugasyon pedinin hazırlanması aşamasında öncelikli olarak çalışmada elde edilen AuNPs yüzeyleri antikorlar ile konjuge edilmiştir. AuNPs yüzeyinin antikor ile fonksiyonlandırılmasında en uygun oranın bulunması ve AuNPs yüzeyinin tamamen antikor ile fonksiyonlandırıldığını karakterize etmek için sodyum klorür (NaCl) testi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Chamorro-Garcia vd., 2016; Nunes Pauli vd., 2014). Bu testte, AuNPs ve belli oranlarda (0-200 µg/mL) antikor etkileşimi sağlandıktan sonra, ortama 20 µL NaCl (kütlece %10'luk) eklenerek AuNPs'in topaklanma (agregasyonu) takip edilmektedir; topaklanma gerçekleşiyorsa, bu durum AuNPs yüzeylerinin tamamen antikor ile kaplanmamış olduğunu göstermektedir. Bu durum eklenen NaCl ile yüzeyi kaplanmamış olan AuNPs yük dengesinin bozulması ve topaklanmaya sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Bu testte topaklanmanın olmadığı en düşük oran optimum miktar olarak değerlendirilir ve LFA tasarımında bu oran kullanılır. Bu amaçla, öncelikle AuNPs koloidal çözeltisi üzerine farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200 µg/mL olacak şekilde) anti-IgG poliklonal antikor çözeltileri 150 µL'lik AuNPs çözeltilerine ayrı ayrı ilave edilmiştir (Şekil 4.10-a). Bu işlem sonunda antikor ekler eklemeyen bu çözeltilerdeki nanopartiküllerin topaklandığı ve çözelti renginin kırmızıdan mavi-mor renge döndüğü gözlenmiştir (Şekil 4.10-b). Bu durum genellikle antikorların

içinde bulunduğu koruyucu tampondan kaynaklanmaktadır ve bu yüzden antikor varlığında gerçekleşen agregasyonu engellemek için AuNPs koloidal çözeltisi borat tamponu (10 mM, pH 9.2) ile pH 9'a ayarlanır (Parolo vd., 2020). AuNPs koloidal çözeltisi borat tamponu (10 mM, pH 9.2) ile pH 9'a ayarlandıktan sonra, Şekil 4.10-c'de gösterildiği üzere ependorf tüplere alınıp (150 μ L) üzerlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 200 μ g/mL olacak şekilde) anti-IgG poliklonal antikor çözeltileri ayrı ayrı ilave edilmiştir (Şekil 4.10-d). Bu çözeltiler 4 °C'de karıştırılarak (600 rpm) 30 dakika inkübasyondan sonra (Şekil 4.10-e), 20 μ L %10 NaCl çözeltisi ilave edilmiştir ve elde edilen çözeltiler aynı koşullar altında 15 dakika inkübe edilmiştir. Şekil 4.10-f'de görüldüğü gibi, yalın AuNPs çözeltisine NaCl çözeltisi eklendiğinde çözelti rengi lacivert-mavi renge, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL ve 30 μ g/mL antikor ihtiva eden çözeltilere eklendiğinde çözeltilerin rengi mor renge değişmektedir. 50-200 μ g/mL antikor ihtiva eden çözeltilerinin renginin değişmediği gözlenmiş olup nanopartikül yüzeylerinin bu konsantrasyon değerleri için tamamen kaplandığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda 50 μ g/mL antikor derişimi konjugasyon aşaması için optimum antikor miktarı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Agregasyon testi a) AuNPs, b) antikor+AuNPs, c) AuNPs, d) Borat tamponu+ antikor+ AuNPs, e) Antikor fonksiyonlandırılmış AuNPs, f) NaCl testi

Sentez sonucunda elde edilen AuNPs'nin ağırlıklı olarak 30-50 nm partikül boyutu dağılımı gösterdiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9). UV-Vis spektrumları incelendiğinde maksimum absorpsiyon pikinin 520 nm dalga boyunda olduğu bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.8). Ayrıca, gerçekleştirilen yüzey fonksiyonlandırması çalışmalarında da herhangi bir agregasyonun olmaması yüzey fonksiyonlandırmasının başarılı bir şekilde

gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bunun yanı sıra optimizasyon çalışmalarında optimum antikor miktarı 50 µg/mL olarak seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.10-f).

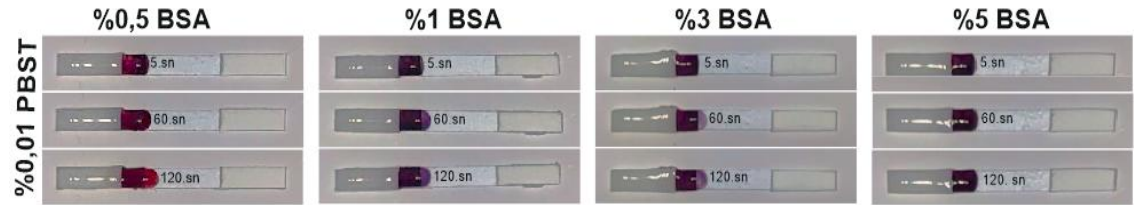
4.4. Elde Edilen Test Pedinin LFA Sisteminde Denenmesi

Çalışmanın bu kısmında yanak akış optimizasyonları test ve kontrol çizgilerinin oluşturulması, kalitatif ve kantitatif tayin çalışmaları ve ELİSA testi ile ilgili sonuçlar verilmiştir.

4.4.1. Yanak akış optimizasyonu

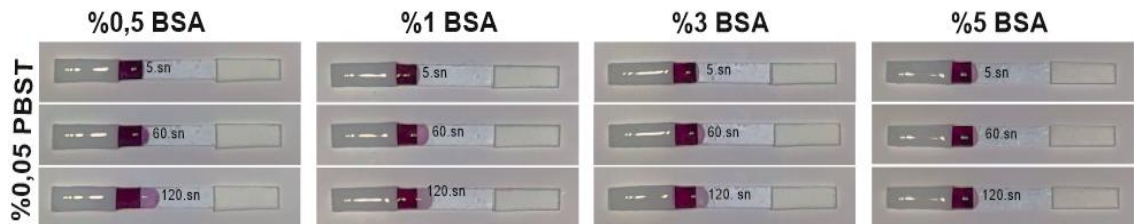
Numune ve adsorben pedlerin Tween-20, tayin pedinin ise BSA'lı optimizasyonları denenmiştir. Denemeler sırasında numune ve adsorben pedlerinde Tween-20 oranları %0,01, %0,05 ve %0,1 olarak, tayin pedlerinde BSA oranları %0,5, %1, %3 ve %5 olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.11'de numune ve adsorben pedleri %0,01'lik PBST çözeltisi ile yıkanmış ve tayin pedininin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yıkandığındaki konjugasyon materyalinin (antikor konjuge edilmiş AuNPs) yanak akış süreleri verilmiştir. Bu şartlar ile gerçekleştirilen yanak akış deneylerinde adsorben pede ulaşan numunenin olmadığı gözlenmiştir.



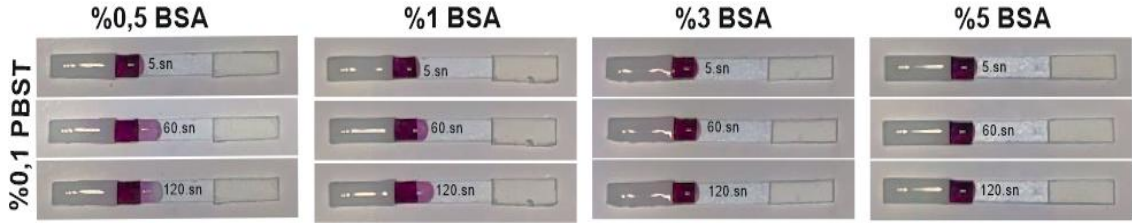
Şekil 4.11. Numune ve adsorben pedleri %0,01 PBST ile tayin pedinin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yapılan yıkama sonucu zamana göre yürüme miktarları

Şekil 4.12'de Numune ve adsorben pedleri %0,05'lik PBST çözeltisi ile yıkanmış ve tayin pedininin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yıkandığındaki konjugasyon materyalinin yanak akış süreleri verilmiştir. Bu şartlar ile gerçekleştirilen yanak akış deneylerinde adsorben pede ulaşan numunenin olmadığı gözlenmiştir.



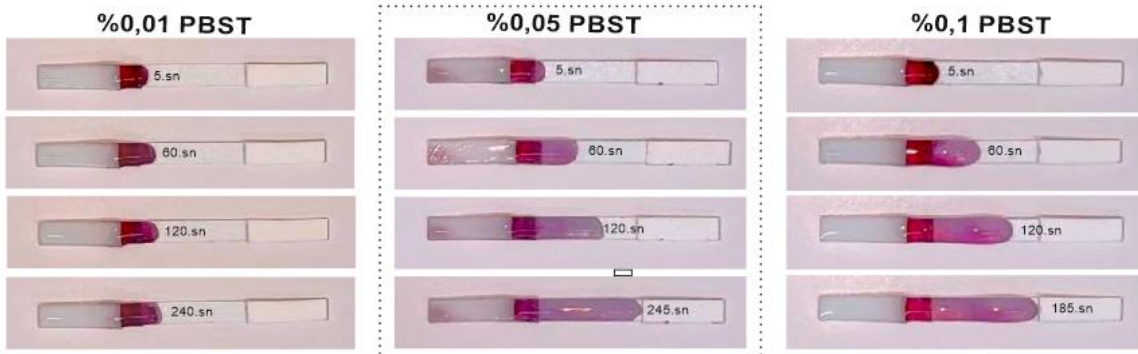
Şekil 4.12. Numune ve adsorben pedleri %0,05 PBST ile tayin pedinin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yapılan yıkama sonucu zamana göre yürüme miktarları

Şekil 4.13'te numune ve adsorben pedleri %0,1'lik PBST çözeltisi ile yıkanmış ve tayin pedininin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yıkandığındaki konjugasyon materyalinin yanıl akış süreleri verilmiştir. Bu şartlar ile gerçekleştirilen yanıl akış deneylerinde adsorben pede ulaşan numunenin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.13. Numune ve adsorben pedleri %0,1 PBST ile tayin pedinin %0,5, %1, %3 ve %5 BSA çözeltileri ile yapılan yıkama sonucu zamana göre yürüme miktarları

Belirlenen oranlara bağılı olarak analitin numune pedinden adsorben pede ulaşamaması sonucunda tayin pedinde kullanılan BSA'nın (aşırı; % 5) numune pedi, test ve kontrol çizgilerinin içine yerleştirilerek tayin pedinde BSA olmadan devam edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca, numune ped için farklı Tween-20 oranlarında (%0,01, %0,05 ve %0,1) optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14 yapılan optimizasyon çalışmalarında konjugasyon materyalinin (AuNPs) test membranı üzerinde yanıl akışı esansındaki yürüme sürelerini göstermektedir. Bu denemelerde düşük oran (%0,01) Tween-20 kullanıldığında 4 dakikada bile konjugasyon materyali test membranı üzerinde ilerleme göstermemiştir. Yüksek oranda (%0,1 ve %0,05) Tween-20 içeren durumlarda konjugasyon materyali test membranı üzerinde ilerleme göstererek adsorben pedine ulaşmıştır. Ancak, yüksek miktarda Tween-20 kullanılması yüzey ile antikor arasındaki etkileşimi engelleyebileceğinden ve aynı zamanda membran yüzeyinde çok hızlı ilerleme gerçekleşeceğinden antikor-analit etkileşimi için yeterli düzeyde gerçekleşemeyeceğinden test kitinin hassasiyet değerini düşürebilir. Bu sebeple, hem yüzey ile antikor arasındaki etkileşimi çok fazla engellemek hem de antikor-analit etkileşimi için yeterli süreyi sağlayabilmek adına %0,05'lik Tween-20 miktarının daha uygun olduğuna sonucuna ulaşılmış olup ve sonraki denemeler için optimum miktar olarak %0,05'lik Tween-20 ile devam edilmesi karar kılınmıştır.

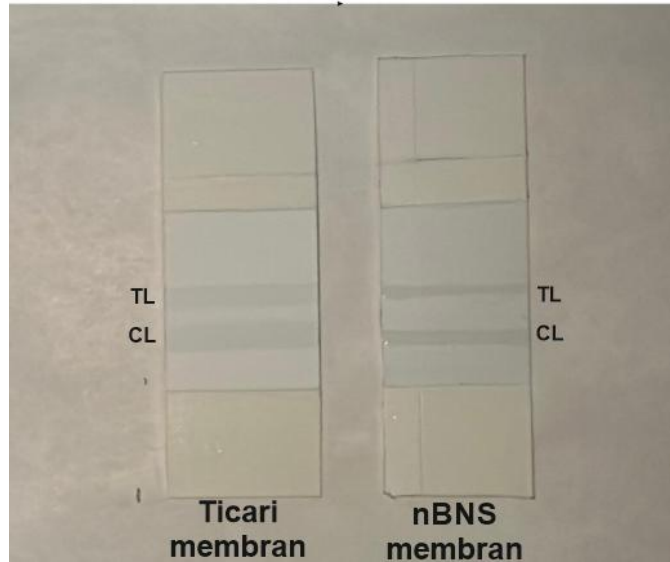


Şekil 4.14. Farklı Tween-20 oranlarında (%0,01, %0,05 ve %0,1) yıkanan numune pedi ile gerçekleştirilen denemelerde AuNPs'nin LFA kiti üzerinde yanıl akışına ait görseller

Gerçekleştirilen çalışmalarda, yanıl akış ile ilgili optimizasyonlar yapılmış ve BSA ile membran yıkaması yapıldığında yürümenin gerçekleşmediği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11-4.13). Sadece numune ve atık pedlerin farklı PBST oranları ile yıkanması sonucunda optimum miktar olarak %0,05 PBST olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Test ve kontrol çizgilerinin oluşturulması

Test ve kontrol çizgi bölgelerine konumlandırılan antikorlar daha önce elde edilen altlıklar üzerine laboratuvarımızda bulunan CAMAG/Linomat 5 cihazı ile püskürtülerek ekilmiştir. Aynı koşullar altında ticari membran ve nBNS membran üzerine ekilen test ve kontrol çizgi antikorlarına ait görseller Şekil 4.15'te sunulmuştur.



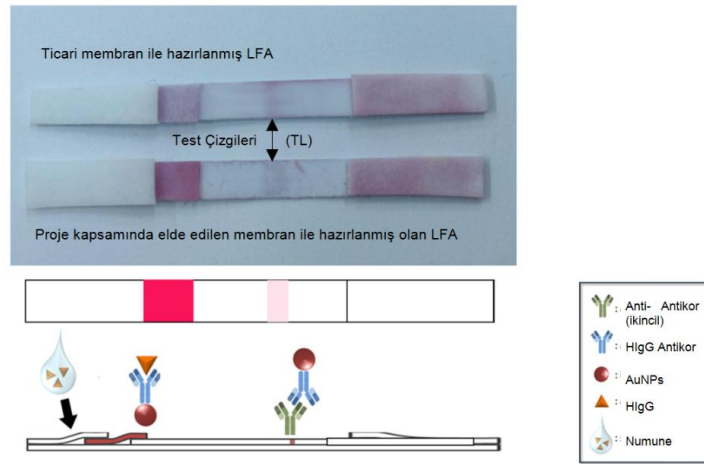
Şekil 4.15. Ticari membran ve nBNS membran üzerine antikor ekilmiş test ve kontrol çizgilerine ait görseller.

Test ve kontrol bölgelerine antikor ekim işleminde, test çizgisi (TL) için 10 cm uzunluğundaki membrana 10 μ L antikor çözeltisi/Ab1886 (25 μ g/mL), 7 μ L tampon çözelti, 2 μ L Etil alkol ve 1 μ L BSA çözeltisi eklenmiştir. Membranda ıslatıcı ajan/Tween-

20 ve türevleri kimyasallara yer verilmemesi adına bloklayıcı ajan olarak kullanılan BSA test çizgisi içine yerleştirilmiştir. Kontrol çizgisi (CL) için 10 cm uzunluğundaki membran üzerine 20 µL antikor çözeltisi/Ab86245 (25 µg/mL) 8 µL tampon çözelti, 2µL etil alkol eklenmiş ve yazdırma gerçekleştirilmiştir. Şekilde 4.15'te nBNS membran üzerindeki antikorun ticari membrana göre daha az dağılma/yayılma yaptığı görülmektedir. Elde edilen membranlar kullanılarak LFA testler hazırlanmış ve bir sonraki basamakta HIgG tayininde kullanılmıştır.

4.4.3. Kalitatif tayin çalışmaları

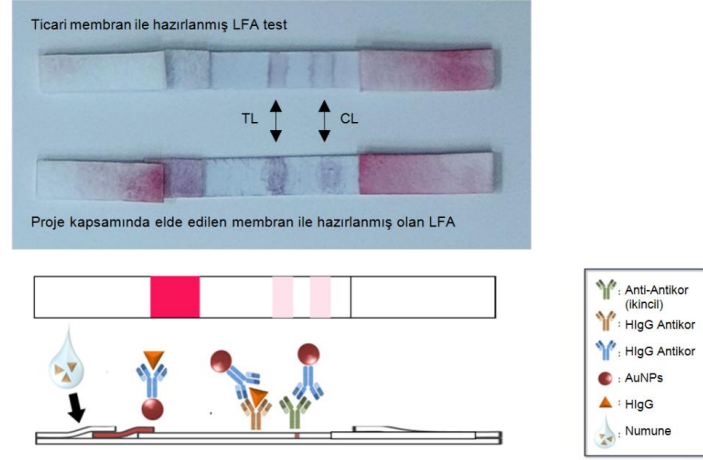
Bu aşamada öncelikli olarak, elde edilen nBNS membran ve ticari membran üzerine yalnızca test çizgilerinin eşit çizgi kalınlıklarda olacak şekilde antikor ekimi yapılmış olup hazırlanan LFA'lar kullanılarak kalitatif (var/yok testi) insan immunoglobulin G (HIgG) (10 µg/mL) tayini (pH:7.4, insan serumunda bulunma aralığı 5,6–18 mg/mL (Jazayeri vd., 2013)) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi her iki membran üzerine de eşit miktarlarda test antikoru ekildiği durumda sinyalin elde edilebilir olduğu görülmüş olup kalitatif olarak HIgG'nin tayin edilebildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.16. HIgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan yalnızca test çizgilerini içeren ticari ve çalışmada üretilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel ve LFA'nın çalışma prensibini gösteren görsel

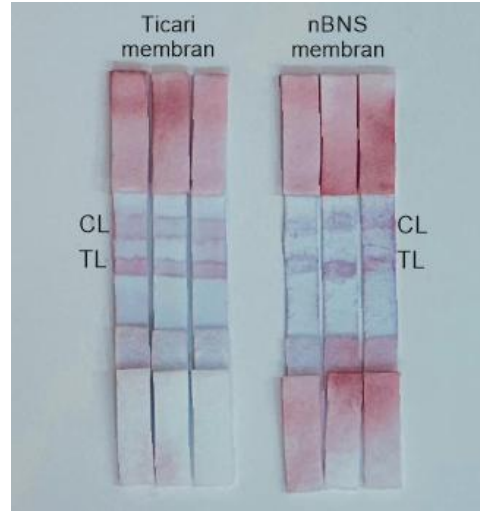
Sonraki aşamada, elde edilen nBNS membran ve ticari membran üzerine test ve kontrol antikor çizgilerinin her ikisinin de eşit çizgi kalınlıklarda olacak şekilde antikor ekimi yapılmış olup hazırlanan LFA'lar kullanılarak kalitatif (var/yok testi) insan immunoglobulin G (HIgG) (10 µg/mL) tayini (pH:7.4) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4,17'de görüldüğü gibi her ikisinin de eşit miktarlarda ve eşit çizgi kalınlıklarında ekildiği durumda çizgi kalınlıklarının ve sinyalin eşit olduğu görülmüş olup kalitatif olarak HIgG'nin tayin edilebildiği belirlenmiştir. Ticari membran ve nBNS membran ile

hazırlanmış LFA testlerinde gerçekleştirilen kalitatif tayine göre nBNS membranı ile hazırlanan LFA testinde test ve kontrol çizgileri daha kısa sürede oluşmaktadır.



Şekil 4.17. HlgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan test ve kontrol çizgilerini içeren ticari ve çalışmada üretilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel ve LFA'nın çalışma prensibini gösteren görsel

HlgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan test ve kontrol çizgilerini denemelerinde ticari ve çalışmada üretilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel Şekil 4,17'te de gösterildiği gibi 3 tekrar ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.18. HlgG (pH 7,4; 10 µg/mL) ile yapılan test ve kontrol çizgilerini içeren ticari ve nBNC membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak gerçekleştirilen kalitatif denemeye ait görsel (3 tekrar)

Bir sonraki aşamada optimum çalışma pH'sını bulmak için yürütülen çalışmalarda ise, belirlenen optimum hazırlama şartları ile LFA testleri hazırlanmıştır. Hazırlanan test kitlerinde farklı pH değerlerinde (pH= 6,0; 7,0; 7,4; 8,0 / PBS-phosphate buffer solution/fosfat tampon çözeltisi) hazırlanan HlgG çözeltisi yürütülmüştür. Farklı pH değerlerinde yürütülen LFA'lar için elde edilen test ve kontrol çizgilerini ait görseller

Şekil 4.19’da sunulmuştur. Şekilden görüldüğü gibi, çalışılan tüm pH değerlerinde hem kontrol hem de test çizgileri gözlenmiş ve elde edilen çizgilerin pH ile önemli ölçüde değişmediği görülmektedir. Bundan dolayı, ticari kan serumu denemeleri için pH=7,4 değerinde uygun sinyal elde edebilmek ve yapılan pH denemelerine göre pH=7,4 değerinde uygun sinyal elde edilebilmesinden dolayı sonraki denemeler için çalışma pH değeri 7,4 olarak seçilmiştir.



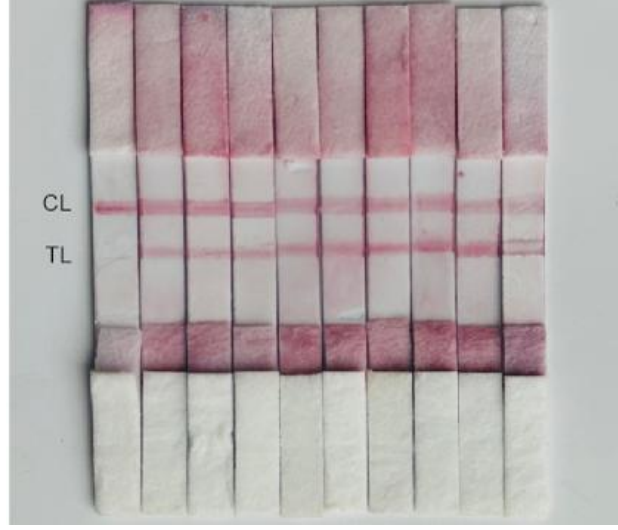
Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde (6.0, 7.0, 7.4, 8.0) HIgG (10 µg/mL) yürütme denemelerine ait görsel

4.3.4. Kantitatif tayin çalışmaları

Bu iş paketinin son basamağı olan kantitatif tayin çalışmaları kısmında, kalitatif analiz ve farklı pH çalışmalarında elde edilen sonuçlar doğrultusunda farklı konsantrasyonlarda (pH=7.4) ticari insan serumu içerisinde HIgG çözeltileri hazırlanarak ticari membran ve çalışmada elde edilen alternatif membran ile hazırlanan LFA testleri ile kantitatif HIgG tayini gerçekleştirilmiş olup sonuçlar hem birbirleriyle hem de ELISA testi ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar gerçekleştirilirken HIgG'nin insan serumunda bulunma aralığı (5,6–18 mg/mL (Jazayeri vd., 2013)) dikkate alınarak deneyler yürütülmüştür. Kalitatif tayin basamağında sunulduğu üzere 10 µg/mL HIgG konsantrasyon değerinde bile maksimuma yakın cevap alındığı ve ELISA test kitinin çalışma aralığı (1,57 ng/mL-100 ng/mL) da dikkate alınarak 10^3 kat seyreltme ile deneyler yürütülmüştür.

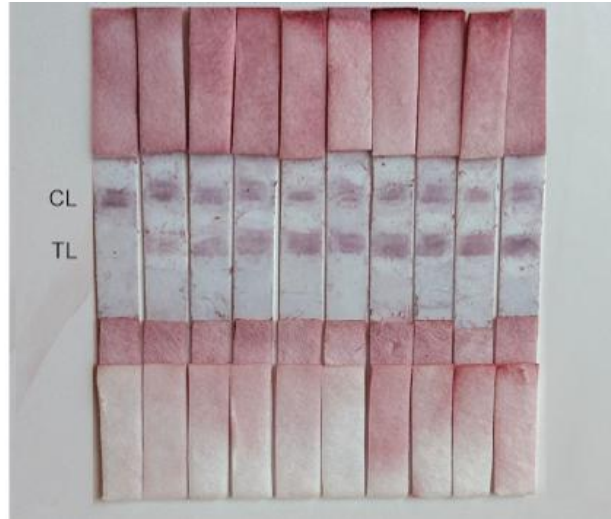
Şekil 4.20’de ticari membran ile hazırlanan LFA testleri için farklı konsantrasyon (negatif kontrol-NC, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen LFA'lara ait fotoğrafı göstermektedir.

Şekilde görüldüğü gibi, kontrol çizgilerinin renk şiddeti hemen hemen eşit iken HIgG konsantrasyonu artıkça (soldan sağa) test çizgisindeki renk şiddeti artmaktadır.



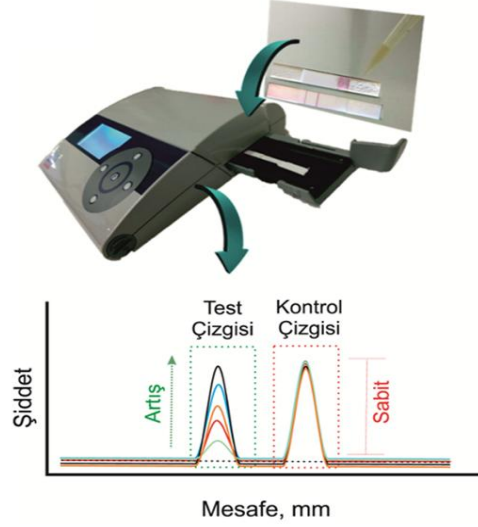
Şekil 4.20. Ticari membran ile hazırlanan LFA testleri ile 10 farklı HIgG konsantrasyonunda (soldan sağa; negatif kontrol-NC, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) (pH:7.4) gerçekleştirilen kantitatif tayin çalışmasına ait görsel

Çalışma kapsamında üretilen nBNS membranı ticari membran ile karşılaştırmak amacıyla nBNS kullanılarak LFA testi hazırlanmıştır. Şekil 4.21 nBNS membran kullanılarak hazırlanan LFA testleri için farklı konsantrasyon (negatif kontrol-NC, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen LFA'lara ait fotoğrafı göstermektedir. Şekilden görüldüğü gibi, kontrol çizgilerinin renk şiddeti hemen hemen eşit iken HIgG konsantrasyonu artıkça (soldan sağa) test çizgisindeki renk şiddeti artmaktadır.



Şekil 4.21. nBNC membran ile hazırlanan LFA testleri ile 10 farklı HIgG konsantrasyonunda (soldan sağa; negatif kontrol-NC, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) (pH:7.4) gerçekleştirilen kantitatif tayin çalışmasına ait görsel

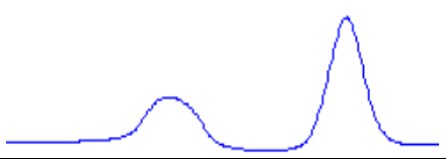
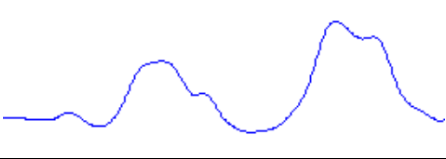
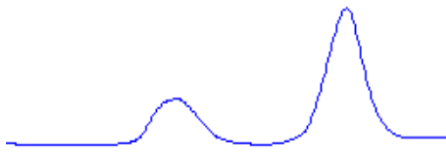
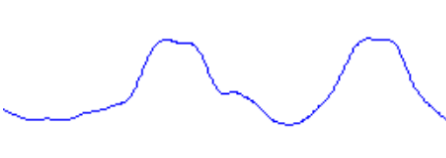
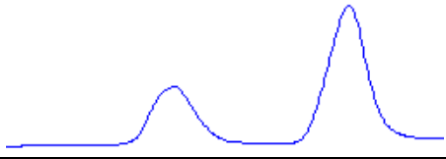
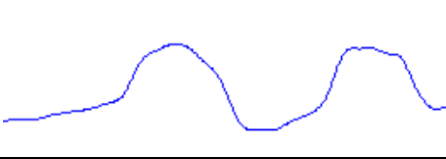
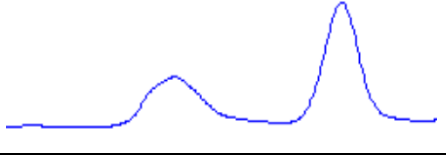
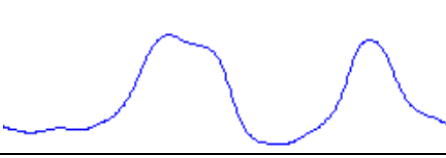
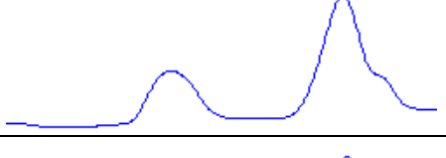
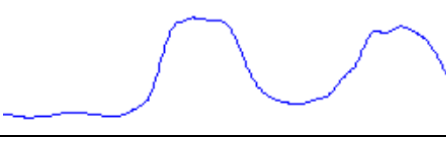
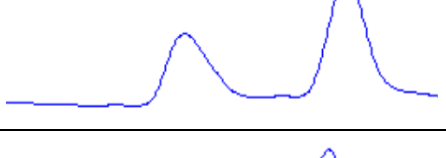
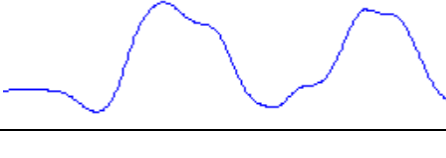
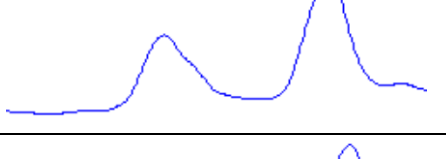
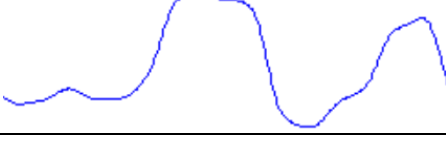
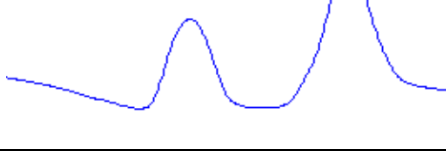
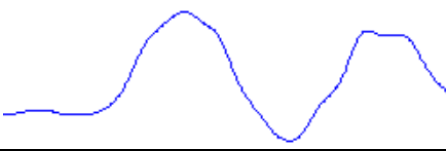
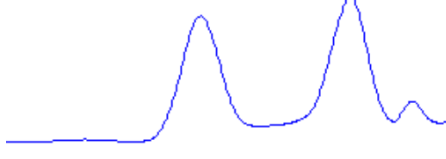
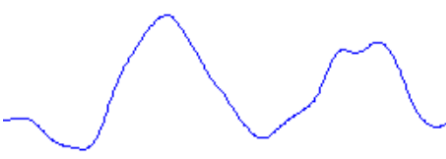
Bir sonraki aşamada, farklı HIgG miktarlarında gerçekleştirilen kantitatif çalışmalarla elde edilen kolorimetrik sonuçlardan teşhis sınırı, hassasiyet, kararlılık gibi analitik parametreler belirlenmesi amacıyla laboratuvarımızda bulunan Şekil 4.22'de gösterilen yanal akış okuyucu (lateral flow reader) cihazı kullanılmıştır. Bu cihazın genel çalışma prensibi, numune haznesine yerleştirilen örneklenmiş LFA'da beliren ve gözle görülen çizgileri oluşturan (sinyal) AuNPs'nin miktarına göre test çizgisinin sinyal şiddetindeki artışı okumasına dayanmaktadır.



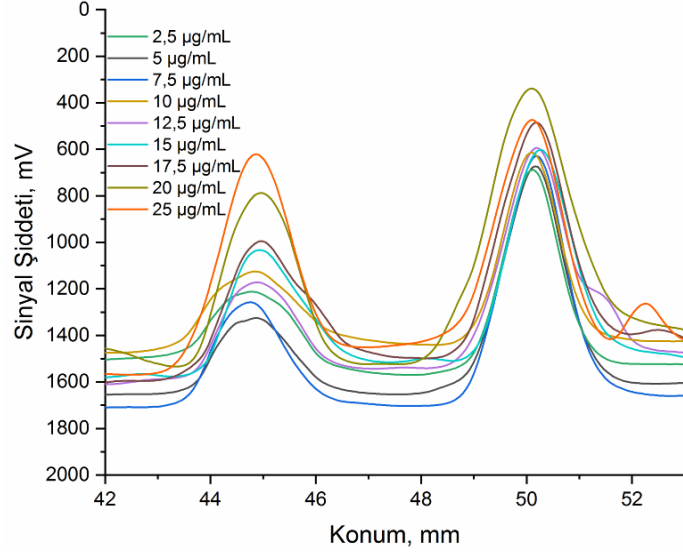
Şekil 4.22. Kolorimetrik okuyucu ve beklenen test/kontrol çizgi sinyalleri

Tablo 4.1 Farklı HIgG konsantrasyonlarında ticari membran ve geliştirilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak elde edilen testlerin test ve kontrol çizgilerindeki sinyal şiddetlerinin LFA okuyucu ile elde edilen görselleri göstermektedir. Elde edilen bu sinyaller bir sonraki aşamada Şekil 4.23 (ticari membran ile hazırlanan LFA için) ve Şekil 4.25'te (nBNS membran ile) aynı grafik içerisinde üst üste çakıştırılarak sunulmuştur.

Tablo 4.1.Farklı HIgG konsantrasyonlarında ticari membran ve geliştirilen membran ile hazırlanan LFA'lar kullanılarak elde edilen testlerin test ve kontrol çizgilerindeki sinyal şiddetlerinin LFA okuyucu ile elde edilen

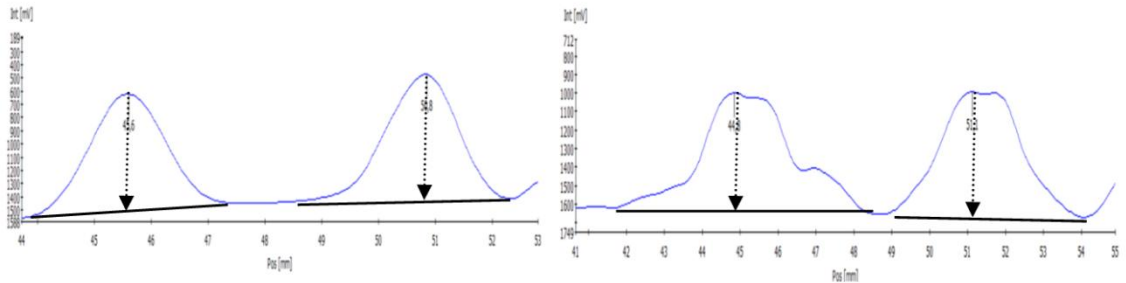
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	LFA Okuyucu Test Sonucu (LFA-Ticari Membran)	LFA Okuyucu Test Sonucu (LFA-Geliştirilen nBNS Membran)
2,5 $\mu\text{g/mL}$		
5,0 $\mu\text{g/mL}$		
7,5 $\mu\text{g/mL}$		
10 $\mu\text{g/mL}$		
12,5 $\mu\text{g/mL}$		
15,0 $\mu\text{g/mL}$		
17,5 $\mu\text{g/mL}$		
20,0 $\mu\text{g/mL}$		
25,0 $\mu\text{g/mL}$		

Şekil 4.23'te farklı konsantrasyon (2,5-25 $\mu\text{g/mL}$) değerlerinde ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen ve ticari membran ile hazırlanmış LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon ile sinyal şiddetindeki değişimi göstermektedir. Beklenildiği ve görüldüğü üzere, kontrol çizgisinin sinyal şiddeti hemen hemen sabit kalırken test çizgisinin sinyal şiddeti konsantrasyon ile artış göstermektedir



Şekil 4.23. Farklı konsantrasyon (2.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7.5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 17.5 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$) değerlerinde ticari kan serumu (PBS-pH=7,4) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen ticari membran ile hazırlanmış LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde elde edilen sinyaller

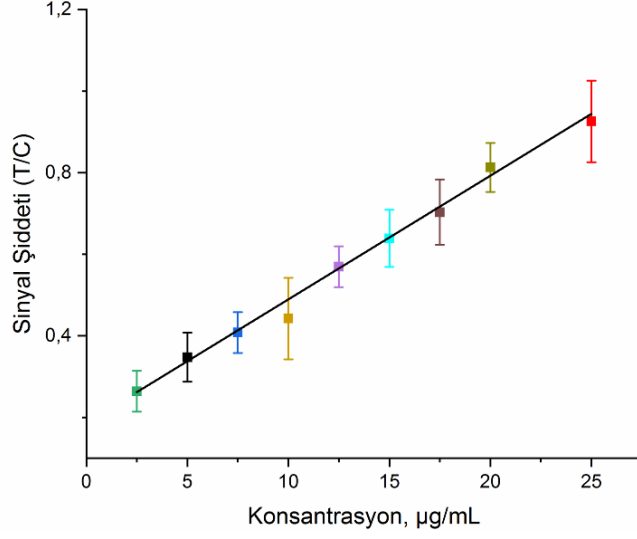
Cihazdan elde edilen sinyallerde, Şekil 4.23'te görüldüğü gibi, kontrol çizgisinin sinyal şiddeti sabit kalırken test çizgisinin şiddetinde konsantrasyon ile artış göstermesi beklenir. Bu veriler Şekil 4.24'te gösterildiği gibi sinyal şiddeti ölçülerek kantitatif analizde kullanılmıştır.



Şekil 4.24. Test ve kontrol çizgilerinin sinyal şiddetlerinin grafik üzerinden okunması

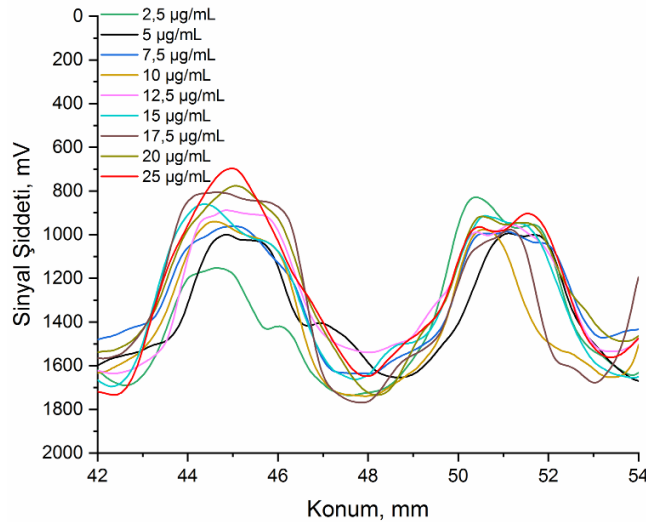
Konsantrasyon artışına karşı elde edilen grafik gözle görülebilir optik sinyalin kantitatif veriye çevrilebildiğini ortaya koymuştur. Şekil 4.23'teki test ve kontrol çizgileri

için konsantrasyona karşı elde edilen pik şiddetlerinin oranları grafik haline getirildiğinde Şekil 4.25'teki doğrusal grafik elde edilmiştir.



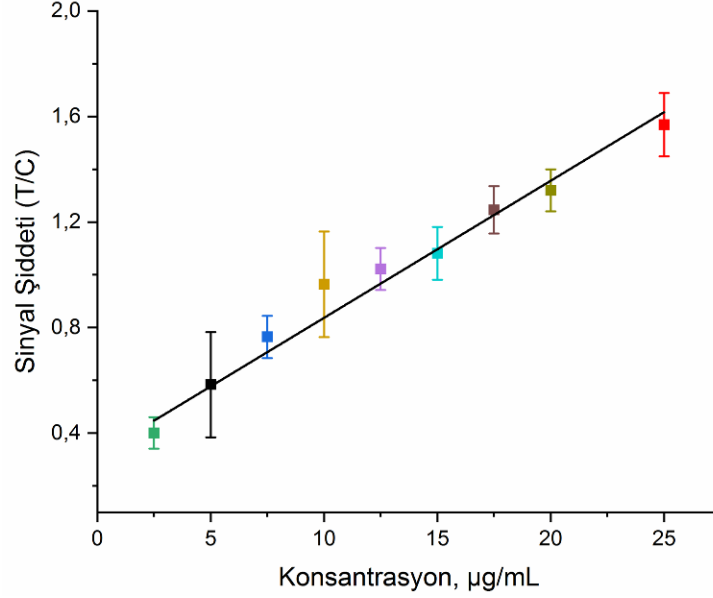
Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlarda (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen ticari membranla ile hazırlanan LFA'ların yanak akış okuyucu cihazı kullanılarak analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddeti oranlarındaki değişimi gösteren grafik

Şekil 4.26'da farklı konsantrasyon (2,5-25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen ve nBNS membran ile hazırlanmış LFA'ların yanak akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon ile sinyal şiddetindeki değişimi göstermektedir. Beklenildiği ve görüldüğü üzere, kontrol çizgisinin sinyal şiddeti hemen hemen sabit kalırken test çizgisinin sinyal şiddeti konsantrasyon ile artış göstermektedir.



Şekil 4.26. Farklı konsantrasyon (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (PBS-pH=7,4) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen nBNS membran ile hazırlanmış LFA'ların yanak akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde elde edilen sinyaller

Konsantrasyon artışına karşı elde edilen grafik gözle görülebilir optik sinyalin kantitatif veriye çevrilebildiğini ortaya koymuştur. Şekil 4.26'te test ve kontrol çizgileri için konsantrasyona karşı elde edilen pik şiddetlerinin oranları grafik haline getirildiğinde Şekil 4.27'deki doğrusal grafik elde edilmiştir.



Şekil 4.27. Farklı konsantrasyon (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde hazırlanan HIgG çözeltisi ile yürütülen nBNS membran ile hazırlanmış LFA'ların yanal akış okuyucu cihazı ile analiz edildiğinde konsantrasyon artışına karşı sinyal şiddeti oranlarındaki değişimi gösteren grafik

Şekil 4.25'teki doğrusal grafik kullanılarak ($y = 0,030x + 0,186$, $R^2=0,99$) ve 4.1 kullanılarak ticari membran için teşhis sınırı (TS veya LOD) değeri 1,12 µg/mL, ve 4.2 kullanılarak tayin alt sınırı değeri (TAS veya LOQ) 3,39 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Aynı eşitlikler kullanılarak ve Şekil 4.27'deki doğrusal grafik ($y = 0,052x + 0,317$, $R^2=0,98$) kullanılarak TS ve TAS elde edilen nBNS membran ile hazırlanan LFA için sırasıyla 0,93 µg/mL ve 2,82 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

$$TS (LOD) = 3,3 \times \sigma/m \quad (4.1)$$

$$TAS (LOQ) = 10 \times \sigma/m \quad (4.2)$$

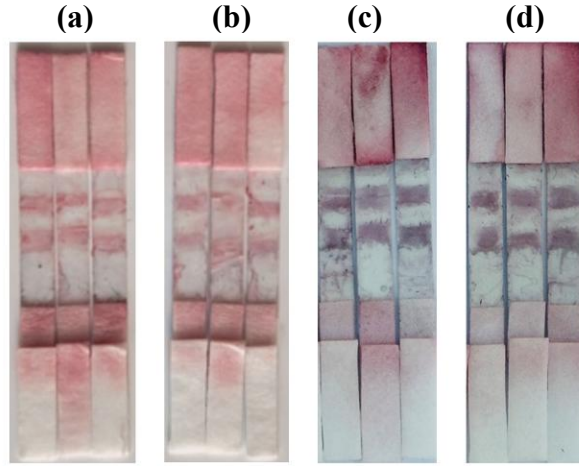
TS : Teşhis sınırı

TAS : Tayin alt sınırı

σ : Standart sapma kesişim değerinin (y-intercept) standart sapması kullanılarak hesaplanmıştır)

m : Lineer grafiğin (kalibrasyon eğrisinin) eğimi

Geliştirilen bir yöntem için kararlılık belirli bir ortam içinde amaçlanan saklama koşullarına veya diğer çevresel faktörlerin etkisindeki dayanıklılığının bir ölçüsüdür (Riley, 1996). LFA testleri için kararlılık önemi bir parametredir. HIgG tayinine yönelik geliştirilen LFA sisteminin kısa ve uzun dönem kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan LFA'ların alüminyum folyo içerisinde kapalı bir şekilde oda sıcaklığında saklanarak kısa dönem ve uzun dönem kararlılık çalışmaları için çalışma aralığındaki bir konsantrasyon değerinde (25 $\mu\text{g/mL}$) HIgG çözeltisi yürütülerek ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.28 kısa dönem kararlılık çalışmaları için 2 ve 24 saat ve uzun dönem kararlılık çalışmaları için 1 ay ve 6 ay sonra HIgG çözeltisi yürütülen LFA'ların cevabını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar yalın gözle karşılaştırıldığında, hazırlanan örneklerle alınan sonuçlardaki sinyallerde önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.28. HIgG (25 $\mu\text{g/mL}$) tayini için kısa (2 saat (a) ve 24 saat (b)) ve uzun dönem (1 ay (c) ve 6 ay (d)) kararlılık çalışmaları (3 tekrar) için LFA yürütmelerinden elde edilen sonuçlara ait görsel

Kalibrasyon grafiğine göre hesaplanan sonuçlar, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları Tablo 4.2’de sunulmuştur. Kısa dönem kararlık çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre, ilk 24 saat içerisinde yürütülen testlerde LFA'nın test cevabında önemli bir değişme gerçekleşmemiştir. Uzun dönem kararlık çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre, 6 aylık bir zaman dilimi içerisinde her ne kadar test cevabında az bir düşüş gözlenirse de eklenen miktara yakın cevaplar alındığı gözlenmiştir. Buradaki düşüşün sebebi, her ne kadar hazırlanan kitler alüminyum folyo içerisinde kapalı olarak muhafaza edilmeye çalışılsa da kullanılan materyal ve yürütülen işlem ticari ürünler için kullanılan bir paketleme süreci içermediğinden test kitlerinin az da olsa hava ile temasının olmasından kaynaklı olabileceğine atfedilmiştir. Buna ilaveten, uzun dönem çalışmalarında kit üzerindeki sinyali veren nanopartiküllerin sinyal renklerinde mor renge

kaymalar gözlenirse de tayin sonucunda bir değişiklik teşkil etmemiştir. Ayrıca, geliştirilen yöntemin kesinliği için hesaplanan yüzde bağıl standart sapma değeri biyolojik numunelerde % 10-15 oranında konsantrasyon düzeylerindeki değişim kabul edilebilir değer aralığında yer almaktadır (Engin vd., 2017).

Tablo 4.2. HIgG tayinine yönelik geliştirilen LFA için kısa ve uzun dönem kararlılık sonuçları

Kısa dönem kararlılık (n=3)					Uzun dönem kararlılık (n=3)				
Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)				Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)			
	2 s	%BSS*	24 s	%BSS*		1 ay	%BSS*	6 ay	%BSS*
25,0	27,4 ± 2,3	8,4	26,3 ± 2,7	10,3	25,0	22,7 ± 3,3	14,5	20,9 ± 2,8	13,4

*Bağıl standart sapma (Relative standard deviation-BSS)

4.3.5. ELISA testi

Çalışma kapsamında geliştirilen LFA test sonuçlarının doğruluklarını belirlemek için ticari olarak kabul görmüş referans bir metot ile kıyaslanması gerçekleştirilmiştir. Bunun için, belirlenen çalışma aralığında 4 farklı konsantrasyon değeri (n=3) ele alınarak hizmet alımıyla altın referans metotlardan olan ELISA testleri gerçekleştirilmiştir. ELISA test kitinin çalışma aralığı 1,57 ng/mL-100 ng/mL olduğundan LFA testinde kullanılan numuneler 10^3 kat seyreltilerek analize sunulmuştur. Alınan analiz sonuçları 10^3 ile çarpılarak ve µg/mL değerine çevrilmiştir. Tablo 4.3 geliştirilen LFA ve referans metot ELISA ile yürütülen yapay serum örneklerinde HIgG analizi sonuçlarını göstermektedir. ELISA testi ile geri kazanım değerleri verilen konsantrasyon değerleri için %96 - %107 arasında değişirken, geliştirilen yöntemde %90 - %107 arasında hesaplanmıştır. Elde edilen geri kazanım değerleri geliştirilen LFA'nın HIgG analizi için kullanılabileceğini göstermektedir (Engin vd., 2017).

Tablo 4.3. Yapay serum örneklerinde LFA ve ELISA yöntemleriyle HIgG analizi

HIgG LFA				HIgG ELISA		
Numune	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	Geri kazanım (%)	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	Geri kazanım (%)
1	3,0	3,2 ± 0,1	107	3,0	2,9 ± 0,1	96
2	6,0	5,9 ± 0,1	98	6,0	6,0 ± 0,2	100
3	12,0	11,3 ± 0,3	90	12,0	12,8 ± 0,3	107
4	24,0	23,0 ± 0,2	96	24,0	24,6 ± 0,3	103

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada LFA esaslı hızlı tanı kitlerinin temel malzemesi olan nitroselüloz membranlara alternatif nitro-nanoselüloz test membranı geliştirilmiştir. Nanoselüloz biyouyumluluk, optik şeffaflık, hidrofiliklik, yüksek gözeneklilik, yüksek yüzey alanı ve yüksek mekanik dayanım gibi ayırt edici özellikler sergilemektedir. Çalışmada elde edilen nitro-nanoselüloz sahip olduğu bu özellikler ve nanoboyutta fiberler içermesi özelliği ile sağladığı geniş yüzey alanı sayesinde yüksek oranda test antikoru bağlama ve hem bu özelliği hem de optik şeffaflığı sayesinde hassasiyetin artırılması, spesifik olmayan etkileşimlerin engellenmesi, membran yüzeyinde akış için surfaktan ihtiyacının azalması gibi nitelikleri bir arada bulundurmaktadır. Çalışmada bakteriyel nanoselülozun eldesi bakteriyel nanoselülozun nitrolanması ve karakterizasyonu, kurutulması, altın nanopartikül sentezi, karakterizasyonu ve antikor konjugasyonu, elde edilen nano-nitroselülozun hızlı test kitinde kantitatif analiz performansını incelenmesi ve ticari membran ile hazırlanan hızlı test kitinin performansı ile kıyaslanması olmak üzere beş aşamalı bir yöntem basamağı uygulanmıştır. Bu doğrultuda toplam 5 basamakta yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Birinci basamak kapsamında *Acetobacter xylinum*, D-glikoz, maya özü (yeast extract), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , sitrik asit, pepton ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren 1 litre suda 24 °C'de inkübe edilmiş olup iki hafta karanlık bir ortamda bekletildikten sonra yaklaşık 4 mm kalınlığında selüloz nano liflerden oluşan, saflaştırılmamış sarı-açık kahverengi renkli ıslak jelimsi mat oluşmuştur. Bu mat NaOH varlığında saflaştırılarak H_2O_2 ile ağartılmıştır.

İkinci basamak kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, birinci basamakta elde edilen ıslak mat parçalanarak sülfürik asit-nitrik asit varlığında ve uygun koşullar altında nitrolanmıştır ve nitro-nanoselüloz (nBNS) elde edilmiştir. Bu basamakta yapılan karakterizasyon sonuçları yapının nitrolandığını ve yaklaşık 50 nm çapında ve birkaç mikron uzunlukta fiberlerin oluştuğu gözlenmiştir.

Üçüncü basamakta gerçekleştirilen çalışmalarda ikinci basamakta elde edilen nBNS, uygun yanal akış elde etmek için Dr. Blade sisteminde 2-5 mm kalınlıklarında homojen bir şekilde yayılmış ve kurutma işlemi gerçekleştirilmiş, ardından 40, 70 ve 100 °C sıcaklıklarında kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kurutma basamağı sonrasında 40 °C sıcaklıkta 2 mm kalınlığında yayılan membranın en uygun olduğu belirlenmiştir.

Dördüncü basamak kapsamında altın nanopartiküller (AuNPs) elde edilmiş olup UV-Vis ve TEM teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda 30-50 nm partikül dağılımına sahip koyu kırmızı renkli AuNPs çözeltisi 520 nm’de absorpsiyon maksimumu gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmalarda yürütülen optimizasyon çalışmalarında yüzey modifikasyonu için 50 µg/mL antikor miktarının optimum miktar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, gerçekleştirilen yüzey fonksiyonlandırması çalışmalarında da herhangi bir agregasyonun olmaması yüzey fonksiyonlandırmasının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Bloklayıcı ajan olarak BSA ve surfaktan olarak kullanılan Tween-20 miktarları optimizasyonu çalışmalarında, belirlenen oranlara bağlı olarak analitin numune pedinden adsorben pede ulaşamaması sonucunda tayin pedinde kullanılan BSA'nın (aşırı; % 5) numune pedi, test ve kontrol çizgilerinin içine konumlandırılarak tayin pedinde BSA olmadan devam edilmesine karar verilmiştir. Ayrıca, numune ped için farklı Tween-20 oranlarında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde düşük oran (%0,01) Tween-20 kullanıldığında 4 dakikada bile konjugasyon materyali test membranı üzerinde ilerleme göstermemiştir. Yüksek oranda (%0,1 ve %0,05) Tween-20 içeren durumlarda konjugasyon materyali test membranı üzerinde ilerleme göstererek adsorben pedine ulaşmıştır. Ancak, yüksek miktarda Tween-20 kullanılması yüzey ile antikor arasındaki etkileşimi engelleyebileceğinden ve aynı zamanda membran yüzeyinde çok hızlı ilerleme gerçekleşeceğinden antikor-analit etkileşimi için yeterli düzeyde gerçekleşemeyeceğinden test kitinin hassasiyet değerini düşürebilir. Bu sebeple, hem yüzey ile antikor arasındaki etkileşimi çok fazla engellemek hem de antikor-analit etkileşimi için yeterli süreyi sağlayabilmek adına %0,05'lik Tween-20 miktarının daha uygun olduğuna sonucuna ulaşılmış olup ve sonraki denemeler için optimum miktar olarak %0,05'lik Tween-20 ile devam edilmesi karar kılınmıştır. Ayrıca, bu iş paketi kapsamında yürütülen çalışmalarda, test ve kontrol çizgilerinin her ikisinin de eşit miktarlarda olacak şekilde antikor ekimi yapılarak hazırlanan LFA'lar ile kalitatif (var/yok testi) HIgG tayini (10 µg/mL) başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklı pH değerlerinde yürütülen LFA'lar ile tüm pH değerlerinde hem kontrol hem de test çizgileri gözlenmiş ve elde edilen çizgilerin pH ile önemli ölçüde değişmediği görülmüştür. Bundan dolayı, ticari kan serumu denemeleri için pH=7,4 değerinde uygun sinyal elde edebilmek ve yapılan pH denemelerine göre pH=7,4 değerinde uygun sinyal elde edilebilmesinden dolayı sonraki denemeler için çalışma pH değeri 7,4 olarak seçilmiştir.

Farklı konsantrasyon (0, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10 µg/mL, 12.5 µg/mL, 15 µg/mL, 17.5 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL) değerlerinde HIgG çözeltisi ile yürütülen LFA'lar ile yarı kantitatif HIgG tayininin yapılabilirliği kontrol çizgilerinin renk şiddeti eşit iken HIgG konsantrasyonu artıkça test çizgisindeki renk şiddetindeki artışı ile gözle görülür bir sinyal verdiği görülmüştür. Böylece, farklı konsantrasyon (0-25 µg/mL) değerlerinde HIgG çözeltisi ile yürütülen LFA'lar ile ticari kan serumu (pH=7,4, PBS) içerisinde kantitatif HIgG tayini gerçekleştirilmiştir.

Kantitatif analiz sonucunda ticari membran ile hazırlanan test için teşhis sınırı (LOD) değeri 1,12 µg/mL ve tayin alt sınırı değeri (LOQ) 3,39 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen membran ile hazırlanan LFA için LOD ve LOQ sırasıyla 0,93 µg/mL ve 2,82 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç geliştirilen membran ile hazırlanan LFA'nın daha düşük teşhis ve tayin alt sınırı gösterdiğini ve daha iyi performans sergilediğini göstermiştir. Bu durum geliştirilen test membranının, ticari nitroselüloz membrana göre nanoboyutta fiberler içermesi özelliği ile sağladığı geniş yüzey alanı sayesinde yüksek oranda test antikoru bağlama ve hem bu özelliği hem de optik şeffaflığı sayesinde hassasiyetin artırılmasına atfedilmiştir.

Geliştirilen LFA'nın kısa ve uzun dönem kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve test cevabının 6 ay süresince eşit olduğu bulunmuştur. ELISA yöntemiyle karşılaştırarak ve ticari yapay serum örneklerinde gerçekleştirilen LFA doğrulama testlerinde %90 - %107 aralığında elde edilen geri kazanım değerleri geliştirilen LFA'nın kantitatif analizlerde kullanılabileceğini göstermiştir.

5.2 Öneriler

Çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda bazı önemli görülen öneriler aşağıda sunulmuştur.

- Bakteriyel nanoselüloz elde edilirken kullanılacak tüm ekipmanlar alkolle ve sonrasında ultraviyole ışık altında dezenfekte edilmelidir.
- Nitrolama basamağında asitlerin nanoselüloz ile karıştırılması soğuk ortamda gerçekleştirilmelidir, ısınma olması halinde soğuma sağlanana kadar işlem durdurulmalıdır.
- Nitrolanmış bakteriyel nanoselüloz taze olarak hazırlanmalıdır. Kullanılmadığında serin ve karanlık ortamda saklanmalıdır.
- Kurutma basamağında sıcaklık yüksek olmamalıdır.
- Kurutulmuş membranlar kullanılmadıklarında +4 °C de kapalı kaplarda muhafaza edilmelidir. Aksi taktirde aşırı kuruma olduğunda membranlar altlık üzerine yapıştırılırken kırılmalar gerçekleşebilmektedir.
- Test ve kontrol bölgelerinin ekildiği şırıngalar 3 kez saf su ve etil alkol ile yıkanmalı içinden hava geçirilerek tamamen kurutulmalıdır.
- Kesme işlemi öncesi veya sonrası giyotin saf su ve alkol bazlı temizleme solüsyonu ve aseton ile temizlenmelidir. Aksi taktirde önceden kalan kalıntılar membrana hasar vermektedir. Silinen giyotindeki aseton kurumadan kesme işlemi yapılmamalıdır.

KAYNAKLAR

- Abbott Inc. (2015, Aralık 14). *The economic benefits of point-of-care testing*. <https://www.globalpointofcare.abbott/us/en/knowledge-insights/viewpoints/the-economic-benefits-of-point-of-care-testing.html>
- Ankara Sanayi Odası. (2014, Mart 7). *Ankara biyoteknoloji ve medikal ihracatı geliştirilmesi*, UR-GE Projesi İhtiyaç Analizi. https://www.aso.org.tr/wp-content/uploads/2017/09/ASO_Medikal_URGE_ ihtiyac_Analiz_Raporu_13.04.2014-1.pdf
- ARDEB, T. (2018a, Mart 7). *TÜBİTAK-ARDEB*. <https://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/281/1003-sab-tani-2018-1.pdf>
- ARDEB, T., (2018b, Mart 7) ARDEB, TÜBİTAK. www.tubitak.gov.tr/1511
- Ashrafi, Z., Lucia, L., ve Krause, W., (2019). Bioengineering tunable porosity in bacterial nanocellulose matrices. *Soft Matter*, 15, 9359–9367 <https://doi.org/10.1039/C9SM01895F>
- Baker, L.S., I. E., (1937). Stabilization of cellulose nitrate US patent. US2077455A.
- Budaeva, V. V., Gismatulina, Y. A., Mironova, G.F., Skiba, E. A., Gladysheva, E.K., Kashcheyeva, E. I., Baibakova, O. V., Korchagina, A. A., Shavyrkina, N. A., Golubev, D.S., Bychin, N. V., Pavlov, I.N., ve Sakovich, G. V. (2019). Bacterial nanocellulose nitrates. *Nanomaterials*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3390/nano9121694>
- Chamorro-Garcia, A., de la Escosura-Muñiz, A., Espinoza-Castañeda, M., Rodriguez-Hernandez, C.J., de Torres, C., ve Merkoçi, A., (2016). Detection of parathyroid hormone-like hormone in cancer cell cultures by gold nanoparticle-based lateral flow immunoassays. *Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med.*, 12, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.012>
- Choi, J.R., Hu, J., Tang, R., Gong, Y., Feng, S., Ren, H., Wen, T., Li, X.J., Wan Abas, W.A.B., Pingguan-Murphy, B., ve Xu, F. (2016). An integrated paper-based sample-to-answer biosensor for nucleic acid testing at the point of care. *Lab Chip*, 16, 611–621. <https://doi.org/10.1039/c5lc01388g>
- Copur, F., Bekar, N., Zor, E., Alpaydin, S., ve Bingol, H. (2019). Nanopaper-based photoluminescent enantioselective sensing of L-Lysine by L-Cysteine modified carbon quantum dots. *Sensors Actuators B Chemical*, 279, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.026>
- Darwish, N. T., Sekaran, S. D., ve Khor, S. M. (2018). Point-of-care tests: A review of advances in the emerging diagnostic tools for dengue virus infection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 3316–3331.
- Dennis J Naas, C.W., Response, C.E., Act, L., Product, C., Commission, S., Safety, O., Ad-, H., Act, P.P. ve Sub-, T. (2018). Nitrocellulose. *Encyclopedia of Toxicology*, 238-240. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00688-8>

- Driesen, L. (2008). Process for the preparation of nitrocellulose solutions having a low water content. EP2144936B1
- Driesen, L. (2016). Process for the preparation of nitrocellulose solutions having a low water content. WO2008122379A1
- El-Osta A, Woringer M, Pizzo E., Verhoef, T., Dickie, C., Ni, M. Z., Huddy, J. R., Soljak, M., Hanna, G. B.ve Majeed, A. (2017). Does use of point-of-care testing improve cost-effectiveness of the NHS Health Check programme in the primary care setting? A cost-minimisation analysis. *BMJ Open*, 7(8), e015494. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015494>
- Engin, B., Gümüştas, M., Oktar, M., Kurbanoglu, S., ve Özkan, S.A. (2017). Analitik Yöntem Geçerliliği. *Türk Farmakope Dergisi*, 2, 74–92.
- Ernst Thoenert, (1963). New process for the preparation of stabilized nitrocellulose. <https://patents.google.com/patent/GB841738A/en>
- Free A. H., Adams E. C., Lou K. M., Free, H. M., & Cook, M. (1957). Simple specific test for urine glucose. *Clin Chem* 3:163–168.
- Fortune Business Insights, (2018, Ekim 20). Cellulose Market. Cellulose Acetate Market by Type (Fiber, Plastic), Application (Cigarette Filters, Textiles & Apparel, Photographic Films, Tapes & Labels), and Region (North America, Europe, APAC, MEA, & South America) Global Forecast to 2026". <https://www.fortunebusinessinsights.com/cellulose-market-102062>
- Fridley, G. E., Holstein, C. A., Oza, S. B., ve Yager, P. (2013). The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays. *MRS Bull.* 38, 326–330. <https://doi.org/10.1557/mrs.2013.60>
- Fung, K. K., Chan, C. P., ve Renneberg, R. (2009). Development of enzyme-based bar code-style lateral-flow assay for hydrogen peroxide determination. *Analitica Chimica Acta*, 634, 89-95.
- Golmohammadi, H., Naghdi, T., Yousefi, H., Kostiv, U., Morales-narva, E., ve Hora, D., (2015). Nanopaper as an Optical Sensing. *ACS nano*, 9 (7), 7296–7305.
- Griffin, R.W. (1984). Nitrocellulose composition and process for producing the same. US4460411A.
- Helmiyati, H., Budiman Y., Abbas G. H, Dini F. W., ve Khalil, Heliyon M., (2021). Highly efficient synthesis of biodiesel catalyzed by a cellulose@hematite-zirconia nanocomposite. *Heliyon* 7, e06622. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06622>
- Heilig, M.L., (1994). Nitric acid esters of cellulose and method of preparation. *ACM SIGGRAPH Comput. Graph.* <https://doi.org/10.1145/178951.178972>
- Hu, J., Wang, S.Q., Wang, L., Li, F., Pingguan-Murphy, B., Lu, T.J. ve Xu, F. (2014). Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* 54, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.075>

- Hua, R., Li, M.T., Liu, L.N., Zhang, S.F., Alam, N., You, M., Ni, Y.H. ve Li, Z.D. (2020). Chitosan-modified nitrocellulose membrane for paper-based point-of-care testing. *Cellulose*, 27, 3835–3846. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03031-x>
- IDTechEx, (2019, Mart, 15). *Biomedical Diagnostics at Point-of-Care 2019-2029: Technologies, Applications*. <https://www.idtechex.com/en/research-report/biomedical-diagnostics-at-point-of-care-2019-2029-technologies-applications-forecasts/622>
- Jazayeri, M.H., Amani, H., Pourfatollah, A.A., Pazoki-Toroudi, H. ve Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sens. Bio-Sensing Res.*, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
- Jazayeri, M.H., Pourfathollah, A.A., Rasaeib, M.J., Porpak, Z., ve Jafarid, M.E. (2013). The concentration of total serum IgG and IgM in sera of healthy individuals varies at different age intervals. *Biomedicine & Aging Pathology*, 3(4), 241-245. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.09.002>
- Joanne, M. (2018). Multiplex Lateral Flow device. US20180319657A1.
- Ken Aida Okada, M. A. (2021). Nanonitrocellulose and its manufacturing method. JP6845499B2
- Kettler, H., White, K., ve Hawkes, S. J. (2004). *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: key findings and recommendations* / Hannah Kettler, Karen White, Sarah Hawkes. TDR/STI/IDE/04.1, (pp. 36). World Health Organization <https://iris.who.int/handle/10665/68990>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., ve Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D. ve Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50, 5438–5466. <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>
- Kumar, S., Aaron, J., ve Sokolov, K. (2008). Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat. Protoc.*, 32 (3), 314–320. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.1>
- Lan Tian, G.M. (2014). Nitrocellulose diacetate nano-fiber membrane capable of adsorbing and desorbing protein. CN104358026A
- Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X. S., Ramsay, A. R., ve Peeling, R. W. (2019). REASSURED Diagnostics to Inform Disease Control Strategies, Strengthen Health Systems and Improve Patient Outcomes. *Nat. Microbiol*, 4, 46–54.
- Lin, D., Li, B., Fu, L., Qi, J., Xia, C., Zhang, Y., Chen, J., Choo, J., ve Chen, L. (2022). A novel polymer-based nitrocellulose platform for implementing a multiplexed

- microfluidic paper-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Microsystems Nanoeng.* 8(3), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41378-022-00385-z>
- Lu Xiang Zhang, (2012). Nano material test strip of a kind of hypersensitivity neutrophil leucocyte gelatinase relative carrier lipoprotein NGAL and preparation method thereof. CN102955036B
- Lopez-Marzo A. B., ve Merkoci A. (2016). Paper-based assays: a success of the engineering design and the convergence of knowledge areas. *Lab on a Chip* 16(17), 3150-3176.
- Markets ve Market, (2018). Cellulose Acetate Market Global Forecast 2022. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/cellulose-acetate-market-1193.html> [Erişim tarihi: 24 Mayıs 2025]
- Markets ve Markets, (2020). Biosensors Market by Type (Sensor patch and embedded device), Product (Wearable and nonwearable), Technology (Electrochemical and optical), Application (POC, Home Diagnostics, Research Lab, Food & Beverages), and Geography - Global Forecast to 2024. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosensors-market-798.html> [Erişim tarihi: 24 Mayıs 2025]
- Mattar, H., Baz, Z., Saleh, A., Shalaby, A.S., Elsayed Azzazy, A., Salah, H., ve Ismail, I. (2020). Nitrocellulose: Structure, synthesis, characterization, and applications. *Water, Energy, Food and Environment Journal*, 3, 1–15.
- Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., ve Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 7. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- Morales-Narváez, E., Golmohammadi, H., Naghdi, T., Yousefi, H., Kostiv, U., Horák, D., Pourreza, N. ve Merkoçi, A. (2015). Nanopaper as an Optical Sensing Platform. *ACS Nano* 9, 7296–7305. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03097>
- Mukwaya, V., Yu, W., Asad, R. A., ve Yagoub, H. (2016). An environmentally friendly method for the isolation of cellulose nano fibrils from banana rachis fibers. *Textile Research Journal*, 87(1), 81–90. <https://doi.org/10.1177/0040517515622155>
- O'sullivan, A.C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207.
- Parolo, C., Sena-Torralba, A., Bergua, J.F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E.P., Cinti, S., Quesada-González, D., ve Merkoçi, A. (2020). Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nat. Protoc.* 15, 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>
- Qin, Z., Chan, W.C.W., Boulware, D. R., Akkin, T., Butler, E. K., ve Bischof, J. C. (2012). Significantly improved analytical sensitivity of lateral flow immunoassays by using thermal contrast. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(18), 4358–4361. <https://doi.org/10.1002/anie.201200997>

- Qin, Q., Wang, K., Yang, J., Xu, H., Cao, B., Wo, Y., Jin, Q., ve Cui, D. (2019). Algorithms for immunochromatographic assay: review and impact on future application. *Analyst*, 144 (19), 5659–5676.
- Quesada-González, D., Stefani, C., González, I., de la Escosura-Muñiz, A., Domingo, N., Mutjé, P., ve Merkoçi, A. (2019). Signal enhancement on gold nanoparticle-based lateral flow tests using cellulose nanofibers. *Biosens. Bioelectron.* 141, 111407. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111407>
- Riley, C.M. (1996). Chapter 2 statistical parameters and analytical figures of merit. Riley, C.M., Rosanske, T.W. (Ed.), *Development and Validation of Analytical Methods*. pp.0 Oxford: Pergamon Press.
- Rohr, U.P., Binder, C., Dieterle, T., Giusti, F., Messina, C.G.M., Toerien, E., Moch, H., ve Hendrikschäfer, H. (2016). The value of in vitro diagnostic testing in medical practice: A status report. *PLoS One*, 11(3): e0149856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149856>
- Romanholo, P.V.V., Sgobbi, L.F., ve Carrilho, E. (2020). “Exploring paper as a substrate for electrochemical micro-devices”, 1st ed, *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. 89, 1-29. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2020.03.001>
- Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, (2021). Batman ili selüloz üretim tesisi ön fizibilite raporu. Batman.
- Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, (2020). Kocaeli ili selüloz asetat üretimi ön fizibilite Raporu”. Kocaeli.
- Sartorius Stedim Biotech. (2018). UniSart nitrocellulose membranes: the substrate of choice for protein assays. <https://www.sartorius.com/resource/blob/89574/dc103586e857d533c5901961867f5ed9/broch-unisart-nitro-sl-1536-e-1-data.pdf> [Erişim tarihi: 28 Temmuz 2022]
- Schroeder, H.W., ve Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 41–52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20176268/>
- Schwarz, U., vd. (2003). Testgerät Zum Nachweis Von Pharmakologisch Wirksamen Verbindungen Aus Speichel. DE10153925B4.
- Sena-Torralba, A., Ngo, D. B., Parolo, C., Hu, L., Álvarez- Diduk, R., Bergua, J. F., Rosati, G., Surareungchai, W., ve Merkoçi, A. (2020). Lateral flow assay modified with time-delay wax barriers as a sensitivity and signal enhancement strategy. *Biosens. Bioelectron.* 168, 112559.
- Sheahan, W., Bender, A., Chine, A., ve Drain, P. (2020 December). Start conducts a landscaping of nitrocellulose membrane production for lateral flow assay tests. *Lateral Flow Assays For Covid-19: Global Nitrocellulose Landscaping*. http://uwstartcenter.org/wp-content/uploads/2021/01/START-174_Final-Presentation_2020_12_8.pdf
- Strateji Belgesi, 2003-2023, (2004). Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi. TÜBİTAK, 44, 2–3.

- Sukumaran, A., Thomas, T., Thomas, R., Thomas, R. E., Paul, J. K., ve Vasudevan, D. M. (2021). Development and troubleshooting in lateral flow Immunoassay assays. *Indian J. Clin. Biochem.*, 36, 208–212. <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00887-5>
- Sun, D.P., Ma, B., Zhu, C.L., Liu, C.S., ve Yang, J.Z., 2010. Novel nitrocellulose made from bacterial cellulose. *Journal of Energetic Materials*, 28, 85–97. <https://doi.org/10.1080/07370650903222551>
- Spaeth, B. A., Kaambwa, B., Shephard, M. D. S., ve Omond, R. (2018). Economic evaluation of point-of-care testing in the remote primary health care setting of Australia's Northern Territory. *Clin Outcomes Res*, 10, 269–277. <https://doi.org/10.2147/CEOR.S160291>
- Syed Ahmed, S.M. (1984). Waterborne nitrocellulose/acrylic emulsion. <https://patentimages.storage.googleapis.com/73/94/0a/e79a31f99f03a6/EP0494607A1.pdf> [Erişim tarihi: 11 Mart 2011]
- Tang, R., Xie, M.Y., Li, M., Cao, L., Feng, S., Li, Z., ve Xu, F. (2022). Nitrocellulose membrane for paper-based biosensor. 26. cild *Applied Materials Today*. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101305>
- Tepzz, T. (2016). Process for the preparation of nitrocellulose solutions having a low water content". <https://patentimages.storage.googleapis.com/6c/23/5b/5592825e4121ac/WO2008122379A1.pdf> [Erişim tarihi: 10 Mart 2022]
- The Observatory Economic of Complexity, (2020). The observatory economic of complexity. Cellulose. <https://www.media.mit.edu/projects/oec-new/overview/> [Erişim tarihi: 15 Nisan 2022]
- Thomas, B., Geng, S., Sain, M., ve Oksman, K. (2021). Hetero-Porous, high-surface area green carbon aerogels for the next-generation energy storage applications. *Nanomaterials*, 11, 653. <https://doi.org/10.3390/nano11030653>
- Torn'e-Morato, H., Pesenti, L., Tripathy, V., ve Pompa P.P. (2025). "Sensitivity-enhanced competitive lateral flow immunoassays by polycaprolactone electrospun stacking pad: Estrous determination in whole blood". *Biosens Bioelectron*, 271, 117080. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.117080>
- TTGV:2030'a Doğru Sağlık Raporu, (2018). "2030'a doğru sağlık". <https://www.ttgov.org.tr/tur/images/publications/60046a4b843f1.pdf> [Erişim tarihi: 10 mart 2022].
- TÜBİTAK, (2021). Türkiye bilimsel ve teknolojik araştırma kurumu mükemmeliyet merkezi destek programı (1004 programı) 1004 programı usul ve esasları. https://tubitak.gov.tr/sites/default/files/1776/1004_cagri_metni_2021_0.pdf [Erişim tarihi: 11 Mart 2022]
- Turkevich J, Cooper P.H., ve Hillier J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 55, 55–75

- Yang, E., Karahan, H.E., Goh, K., Chuah, C.Y., Wang, R., ve Bae, T.-H. (2019). Scalable fabrication of graphene-based laminate membranes for liquid and gas separations by crosslinking-induced gelation and doctor-blade casting. *Carbon N. Y.* 155, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.08.058>
- Yang, H., ve Jiang, P. (2010). Large-scale colloidal self-assembly by doctor blade coating. *Langmuir*, 26, 13173–13182. <https://doi.org/10.1021/la101721v>
- Zhao Xiangwei, C.X. (2021). A kind of Preparation method of ordered microstructure nitrocellulose membrane for lateral flow analysis. CN112834741A.
- Zharkov Mihail Nikolayevich, Z.S.G. (2020). “Method of producing nanosized nitrocellulose or composites based thereon”. <https://doi.org/RU2724764C1>
- Ziqiang, S. (2011). Method for preparing nanometer nitro celluloses. <https://patents.google.com/patent/CN101838332A/en>
- Zor, E., 2018. “Silver nanoparticles-embedded nanopaper as a colorimetric chiral sensing platform”. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.096>
- Zor, E., Alpaydin, S., Arici, A., Saglam, M.E., ve Bingöl, H. (2018). Photoluminescent nanopaper-based microcuvette for iodide detection in seawater. *Sensors Actuators, B Chem.* 254, 1216–1224. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.208>
- Zor, E., Alpaydin, S., ve Bingöl, H., 2025. Quantitative determination of leptin hormone using gold nanoparticle based lateral flow assay. *Microchim Acta*, 192(2), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00604-024-06945-6>
- Zor, E., ve Bekar, N. (2017). Lab-in-a-syringe using gold nanoparticles for rapid colorimetric chiral discrimination of enantiomers. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.031>
- Wang, X., Yang, D., Jia S. T., Zhao, L. L., Jia, T. T., ve Xue, C.H. (2020). Electrospun nitrocellulose membrane for immunochromatographic test strip with high sensitivity. *Microchimica Acta*, 187, 644. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04626-8>
- Wang, S., Chinnasamy, T., Lifson, M. A., Inci, F., ve Demirci, U. 2016. "Flexible Substrate-Based Devices for Point-of-Care Diagnostics. *Trends in Biotechnology*, 34 (11), 909–921.
- Web Sayfası-1. “Türkiye Cumhuriyeti Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı. Kimya sektörü öncelikli ürün listesi. Teknoloji odaklı sanayi hamlesi.” <https://www.hamle.gov.tr/Home/UrunListesi> [Erişim tarihi: 25 Mayıs 2025]
- Web Sayfası-2. Future Market 2022, The Nanocellulose Market, Production and Pricing Report 2022. <https://www.futuremarketsinc.com/the-nanocellulose-market-production-and-pricing-report-2022/> [Erişim Tarihi: 24 Mayıs 2025]
- Web Sayfası-3. <https://www.nitrocellulose.com/industrial-nitrocellulose.php> [Erişim tarihi: 24 Mayıs 2025]

- Web Sayfası-4. Sartorius. <https://www.sartorius.com/en/company/about-sartorius-ag> [Erişim tarihi: 25 Mayıs 2025]
- Web Sayfası-5. Cytiva. <https://www.cytivalifesciences.com/en/us> [Erişim tarihi: 25 Mayıs 2025]
- Web Sayfası-6. Merck Millipore. <https://www.merckmillipore.com/TR/tr> [Erişim tarihi: 25 Mayıs 2025]
- Web Sayfası-7. <https://dataintel.com/report/bacterial-nanocellulose-market-report/> [Erişim tarihi: 25 Mayıs 2025]