

**BEYİN HASTALIKLARININ TANI VE
TEDAVİSİ İÇİN MİKROELEKTROT
FABRİKASYONU**

Merve ACAR

Yüksek Lisans Tezi

Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Anabilim Dalı

Elektronik Bilim Dalı

Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BEYİN HASTALIKLARININ TANI VE TEDAVİSİ İÇİN
MİKROELEKTROT FABRİKASYONU**

Merve ACAR

**ELEKTRİK ve ELEKTRONİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
Elektronik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

BEYİN HASTALIKLARININ TANI VE TEDAVİSİ İÇİN MİKROELEKTROT TASARIMI

Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL danışmanlığında, Merve ACAR tarafından hazırlanan bu çalışma 10/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Elektrik-Elektronik Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (3/0)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAVUŞOĞLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin EROĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 10.07.2014 tarih ve 28.881 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:113S504

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BEYİN HASTALIKLARININ TANI VE TEDAVİSİ İÇİN MİKROELEKTROT FABRİKASYONU

Merve ACAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Elektrik-Elektronik Mühendisliği Anabilim Dalı
Elektronik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

Parkinson, bilişsel rahatsızlıklar, epilepsi, şizofreni, hiperaktivite ve ilaç bağımlılığı gibi birçok beyin hastalığı ile ilişkisi bulunan L-glutamate memelilerin merkezi sinir sistemin (MMS)'de bulunan en önemli nörotransmitterlerdendir. Mikro diyaliz yöntemi yıllardır L-glutamatın dakika temelli ölçümlerini almak için oldukça yaygın kullanılan metottur. Fakat MMS'de bulunan L-glutamat ve diğer nörotransmitterlerin hızlı dinamikleri, saniye temelinde ölçüm yapan bir tekniğe ihtiyaç doğurmuştur. Bu çalışmadaki asıl amacımız L-glutamat ve diğer nörotransmitterlerin saniye temelli ölçümleri için kayıt teknolojisi üretmektir. Çalışma kapsamında silikon tabanlı mikroelettrot fabrikasyonu yapılmıştır. Mikroelettrodun kayıt bölgeleri, bağlantı alanları ve yolları litografi teknikleri kullanılarak oluşturulmuştur. Araştırma sonunda litografi yöntemi ile üretilmiş silikon tabanlı mikroelettrot elde edilmiştir ve mikroelettrodun voltametri yöntemi ile saniye temelli ölçümleri alınmıştır. Hidrojen peroksiti yüksek lineerlikte algıladığı gözlemlenmiştir.

2014, 46 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mikroelettrot, Biyosensör, MMS, Voltametri

ABSTRACT

Master Thesis

MICROELECTROD FABRICATION FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF BRAIN DISORDERS

Merve ACAR

Atatürk University
Faculty of Engineering
Department of Electric and Electronic Engineering
Department of Electronic

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

L-Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS) and associated with a number of brain disorders including Parkinson's disease (PD), cognitive disturbances, epilepsy, schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and drug abuse, to name a few. Microdialysis methods have been extensively used to minute-by-minute measures of L-glutamate. But the rapid dynamics of L-glutamate and other neurotransmitters requires a technique for second-by second basis. Our main goal in this study is to produce second-based recording technology for the measurement L-glutamate and other neurotransmitters. A Silicon-based microelectrode was developed and fabricated during the study. Recording sites of the microelectrode, the connection areas and paths were created using lithography techniques. During this study, a silicone-based microelectrode is produced by lithography technique and microelectrodes measurements were recorded on seconds -by-second based by utilizing the voltammetry method. High linearity was observed in detecting the hydrogen peroxide by the produced microelectrode.

2014, 46 pages

Keywords: Microelectrod, Biosensör, CNS, Voltammetry

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma; Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü Nanoteknoloji Laboratuvarında ve Bilkent Üniversitesi İleri Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Tez danışmanlığımı yürüten Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a, proje ve tez çalışması süresince vermiş oldukları desteklerden dolayı, Sayın Yrd. Doç. Dr. İ. Yücel ÖZBEK, Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ÇAVUŞOĞLU ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Bu tez 113S504 numaralı TUBİTAK Projesi ile desteklenmektedir

Eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve beni bu günlere getiren aileme teşekkür ederim.

Merve ACAR

Temmuz, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Biyosensörler.....	5
2.1.1. Biyosensörün sahip olması gereken özellikler	5
2.1.1.a. Seçicilik	5
2.1.1.b. Duyarlılık.....	6
2.1.1.c. Küçültülebilirlik.....	6
2.1.1.d. Kalibrasyon gereksinimi.....	7
2.1.1.e. Kararlılık.....	7
2.1.1.f. Tekrarlanabilirlik	7
2.1.1.g. Cevap süresi	7
2.1.1.h. Ömür.....	8
2.2. İn Vivo Elektrokimyanın Temel Prensipleri	8
2.3. Referans Elektrotlar.....	12
2.3.1. Referans elektrot çeşitleri	12
2.3.1.a. Standart hidrojen elektrot (SHE)	12
2.3.1.b. Kalomel referans elektrot	12
2.3.1.c. Gümüş-gümüş klorür (AgCl) referans elektrot	13
2.4. Elektro Kimyasal Ölçüm Yöntemleri.....	13
2.4.1. Amperometrik (DC-devamlı potansiyel).....	14
2.4.2. Voltametri.....	14
2.5. Mikroelektrot Hazırlık Aşamaları	14
2.6. Kalibrasyon Kriterleri.....	15

2.7. Sinyal Analizi	16
2.8. Üretim Aşamasında Kullanılan Teknikler.....	17
2.8.1. Sputtering tekniği (saçtırma tekniği).....	17
2.8.1.a. DC saçtırma	19
2.8.1.b. RF saçtırma.....	20
2.8.1.c. Magnetron saçtırma	21
2.8.2. Litografi tekniği.....	22
2.8.2.a. Fotolitografi	23
2.8.3. Lift-off tekniği	25
2.8.4. Termal buharlaştırma	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. Enzime Dayalı Çok Bölümlü (Multisite) Mikroelektrot Fabrikasyonu	27
3.2. Çok Kanallı Mikroelektrot Tasarımı	28
3.3. Fabrikasyon	30
3.3.1. Temizleme	31
3.3.2. SiO ₂ kaplama	32
3.3.3. HMDS (Hexamethyldisilazan) ve fotorezist kaplama.....	32
3.3.4. Ön ısıtma	33
3.3.5. Litografi.....	34
3.3.6. Developer	34
3.3.7. Metal kaplama	35
3.3.8. Lift-off	35
3.4. Paketleme	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Kayıt Sistemi	38
4.2. Ag/AgCl Referans Elektrot	39
4.3. Test	40
5. SONUÇ	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	47

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler

AgCl	Gümüş Klorür
Ar	Argon
Au	Altın
Cr	Krom
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
Pt	Platin
SiO ₂	Silisyum Oksit

Kısaltmalar

5-HIAA	5-Hidroksiindol Asetik Asit
5-HT	5-Hidroksitriptamin
AA	Askorbik Asit
CNS	Central Nervous System
DA	Dopamin
DC	Doğru Akım
DOPAC	Di Hidroksifenil Asetik Asit
HMDS	Hexamethyldisilazan
HVA	Homovanilik Asit
LOD	Limit of Dedection
MMS	Merkezi Sinir Sistemi
NE	Norepinefrin
NO	Nitrik Oksit
PCB	Printed Circuit Board
RF	Radyo Frekans

UA	Ürik asit
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikroelektrot üzerine L-glutamat seçiciliği için kaplamalar.	11
Şekil 2.2. L-Glutamat sinyalinin şematik diyagramını göstermektedir. L-glutamat ve diğer nörotransmitterlerin zamana karşı konsantrasyon eğrisi olarak çizilmiştir.	16
Şekil 2.3. Saçtırma işleminin basit şematik gösterimi	18
Şekil 2.4. Saçtırma sistemi.....	19
Şekil 2.5. DC saçtırma tekniğinin şematik gösterimi	20
Şekil 2.6. RF saçtırma tekniğinin şematik gösterimi	21
Şekil 2.7. Magnetron saçtırma tekniğinin şematik gösterimi	22
Şekil 2.8. Fotolitografi tekniğinin şematik gösterimi	24
Şekil 2.9. Pozitif ve negatif fotorezist ile maske aktarımı	25
Şekil 2.10. Mask-Aligner Cihazı	26
Şekil 3.1. (a) Büyültülmüş konik elektrodun, (b) dikdörtgen elektrodun şematik resmi	28
Şekil 3.2. Silikon tabanlı mikroelektrotların mikroskop görüntüleri	29
Şekil 3.3. Silikon tabanlı çoklu mikroelektrot dizaynlarının L-EDİT programındaki ekran görüntüsü	29
Şekil 3.4. Silikon tabanlı mikroelektrot fabrikasyonunu gösteren şematik diyagram	30
Şekil 3.5. Silikon alttaşın fabrikasyona hazırlanması	31
Şekil 3.6. Alttaşın temizlenmesi	31
Şekil 3.7. Dehidrasyon işlemi	32
Şekil 3.8. HMDS ve fotorezist kaplama ünitesi.....	33
Şekil 3.9. Kullanılan pozitif rezist	33
Şekil 3.10. Mask aligner cihazı.....	34
Şekil 3.11. Sputter cihazında önce titanyum daha sonrada altın kaplandıktan sonra silikon alttaş.....	35
Şekil 3.12. Lift-off işleminden sonra silikon alttaş.....	36
Şekil 3.13. Ucu konik olarak kesildikten sonra mikroelektrotlar	36

Şekil 3.14. (a) PCB'nin maskesi, (b) üretilmiş olan PCB, (c) wire bonding için altın ile kaplanmış PCB.....	37
Şekil 3.15. (a) PCB (b) PCB ile yapıştırılıp wire bond yapılmış elektrot (c) bağlantı yerini yalıtımak ve sağlamlaştırmak için epoxy damlatılmış elektrot.....	37
Şekil 4.1. FAST-16 sisteminin ön ve arka panel görüntüleri.....	39
Şekil 4.2. (a) Silikon tabanlı mikroeletrot, (b) büyültölmüş kayıt bölgeleri.....	40
Şekil 4.3. Zamana karşı elektrot cevabı	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Her kayıt bölgesinin doğrusallığı (R^2).....	42
---	----

1. GİRİŞ

Birçok araştırma grupları 30 yıldan fazla süredir çoklu mikroeletrotları geliştirmektedirler. Bu elektrotlar başta tıp ve askeri alanda olmak üzere kimya, farmakoloji, psikoloji, nörobilim ve hücre biyolojisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Geçmiş yıllarda mikroeletrotlarla ilgili yapılan çalışmalarda alttaş değiştirilerek sinyal kalitesi incelenmiş, mikroeletrotun mukavemeti için farklı fabrikasyon teknikleri kullanılmıştır.

Bu çalışmada seramik tabanlı elektrotların elektrokimyasal kayıt almak için biyolojik sistemlerde kullanımı hedeflenmiştir. Literatürde, seramik tabanlı elektrotların silikon tabanlı elektrotlara göre *in vivo* deneyler için daha uygun olduğu belirtilmiştir. Mikroeletrotlar kullanılarak dopamin ve hidrojen peroksitin elektrokimyasal ölçümleri yapılmıştır. Seramik tabanlı mikroeletrotların hassaslık, seçicilik ve cevap süreleri karakteristiklerinin silikon tabanlı elektrotlara göre daha iyi olduğu gösterilmiştir (Burmeister *et al.* 2000).

Silikon tabanlı çoklu mikroeletrotların performans karakteristiklerinde artan bir gelişme söz konusudur. Silikon tabanlı mikroeletrotlar düşük dopamin seçiciliğine, yüksek gürültü akımlarına ve düşük tespit limitlerine sahiptir. Karbon fiber elektrotlarla karşılaştırıldığında yüksek gürültü akımları ve düşük sinyal gürültü oranı elektrotun metalizasyon tabakasında ve silikon alttaş arasında oluşan kapasitanstan dolayı meydana gelmektedir. Bir diğer etken de kayıt bölgeleri arasında oluşan etkileşimdir. Silikon alttaşın iyi bir iletken olmasından dolayı metalizasyon adımından önce silikon nitrit ile yalıtılmalıdır. Hatlar arasında ki etkileşim silikon nitritin düşük nitelikte izole etmesinden dolayı oluşmaktadır. Bu nedenle silikon nitritin fabrikasyon için optimal materyal olmadığına karar verilmiştir (Burmeister *et al.* 2000).

Elektrotlarda alttaş olarak seramik, silika ve cam kullanılmaktadır. Özellikle seramik materyaller ince alttaş olarak çoklu mikroeletrot fabrikasyonuna en uygun olanıdır.

Seramik tabanlı elektrotların daha dayanıklı olması, inert seramik kullanıldığında cross talk'un azalması ve seramik alttaşın lazer kesim için kolaylık sağlamasından dolayı silikon tabanlı alttaş yerine seramik tabanlı alttaş tercih edilmektedir (Burmeister *et al.* 2000).

Birçok beyin hastalığı ile bağlantısı bulunan glutamat, memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunur. Glutamat ve MMS'de bulunan diğer aminoasitlerin ölçümü için mikro diyaliz yöntemi sıkça kullanılan bir yöntemdir. HPLC gibi modern diyaliz tekniklerinde diyaliz örneğinde bulunan ilgili kimyasalın algılanmasında sorunlar yaşanmaktadır. Mikrodiyaliz yöntemi ile glutamat'ın salınımı ve alımı ile ilgili yapılan ölçümlerdeki problemler ortadan kalkmıştır ve glutamat'ın her birkaç saniyede ölçülmesi mümkün olmuştur. 2002 yılında yapılan çalışmada önceki yıllarda yapılan seramik tabanlı elektrottan daha hızlı ve güvenilir ölçümler yapılabileceği ileri sürülmüştür (Burmeister *et al.* 2002). Mikroelektrotun hassasiyeti Pt kayıt bölgelerinin büyüklüğü 50x150 µm yapılarak artırılmıştır.

Burmeister and Gerhardt'ın 2001 yılında yaptığı çalışmada, beyin içinde bulunan L-Glutamatın ölçümünde kullanılan mikroelektrotun self referans yöntemi ile testleri yapılmıştır. Seramik tabanlı mikroelektrodun kayıt bölgeleri farklı malzeme ile kaplanmıştır. Bu gürültülerin algılanması ve incelenen sinyalden uzaklaştırılmasına imkân sağlamıştır. Çoklu mikroelektrodun diğer oksidaz enzimleri ile uyumluluğunu kontrol etmek için glukozun ölçümünü yapan glukoz sensörü yapılmıştır. 50x50 µm büyüklüğünde Pt kayıt bölgelerine sahip 150 nm kalınlığında seramik alttaş üzerine mikroelektrot üretilmiştir (Burmeister and Gerhardt 2001).

Diğer bir çalışmada ise seramik tabanlı mikroelektrot asetilkolin ölçümü için yapılmıştır. Bu çalışmada 125 µm kalınlığında seramik alttaş kullanılmıştır. 50x100 µm boyutlarında kayıt alanları oluşturulmuştur. Sensörün uç genişliği 5-10 µm arasında bir genişlikte yapılmıştır. Asetilkolin mikroelektrotu hızlı cevap süresi, düşük LOD (Limit of Dedection) değeri, bozucu etkileri belirleyip uzaklaştırması açısından başarılı olmuştur (Burmeister *et al.* 2003).

Yoon *et al.* (2000) plazma ve ıslak aşındırma yöntemi kullanarak, elektrot kalınlığı ortalama 5 ile 90 μm arasında kontrol edilebilmişlerdir. 15 μm , 22,5 μm ve 30 μm kalınlığında yapılan elektrodun mekanik sağlamlığını test etmişlerdir. 530 μm kalınlığında p-tipi silikon alttaş kullanmışlardır. İnce elektrodun dokuda daha az yer kapladığı için daha az doku zararı verdiği görülmüştür.

Norlin *et al.* (2002) yılında yaptığı bir çalışmada, 32 kayıt bölgesi bulunan sinirsel elektrot kuru silikon aşındırma yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada, alttaş olarak yalıtılmış silikon kullanmışlardır. Sonuç olarak keskin hatları olan elektrot elde etmişlerdir.

Yalıtılmış silikonun kullanılmış olduğu diğer bir çalışmada ıslak aşındırma olmadan elektrot kalınlığı üzerinde mükemmel kontrol sağlanmıştır. 20x20 μm boyutlarında kayıt alanları oluşturulmuştur. Bu elektrot kedinin birincil görsel korteksinde test edilmiştir (Cheung *et al.* 2003).

Musallam *et al.* (2009) sinirsel kayıt uygulamalarına uygun kuru aşındırma yöntemi ile elektrot üretmişlerdir. Elektrot 10 mm uzunluğunda, 50 μm kalınlığında ve ortalama 100 μm genişliktedir. Bu fabrikasyon prosesi oldukça basit ve seri üretime uygundur.

Frey *et al.* (2010) 6,5 mm uzunluğunda 50x150 μm Pt kayıt bölgelerine sahip elektrotu silikon alttaş üzerine kuru aşındırma yöntemi ile üretilmiştir. Bu çalışmada aynı bölgedeki farklı analitlerin ölçümü aralarında cross talk olmadan yapılmıştır.

2009 yılında yapılan diğer bir çalışmada silikon tabanlı sinir problemleri için yeni bir fabrikasyon teknolojisi sunulmuştur. 2 boyutlu mikroprobların yanı sıra 3 boyutlu mikroproblar sinirsel kayıtlar için dizayn edilmiştir. Sağlam çift taraflı derin reaktif iyon ekilmiş silikon alttaş üzerine fabrikasyon yapılmıştır bu da elektrot geometrisinde 3 boyutlu kontrole izin vermiştir. 8mm uzunluğunda elektrotta 4 tane anakol vardır ve her anakol üzerinde 9 kayıt noktası bulunmaktadır. Metalizasyon tabakası buharlaştırma

yöntemi ile oluşturulmuş, yolların ve kayıt noktalarının oluşması için lift-off yapılmıştır (Herwik *et al.* 2009).

Marton *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada oldukça uzun mikroelettrot dizisi sunulmuştur. Derin reaktif iyon aşındırma yöntemi ile 15-70 mm uzunluğunda farklı elektrotlar yapılmıştır ve çeşitli konfigürasyonlarda platin elektrotlarla donatılmıştır. Fare üzerindeki in vivo ölçümlerde iyi mekanik stabilite, beyin bölgesine istenilen bölgeye tam olarak yerleşebilme imkânı sağlanmıştır. Kemirgen beyninin farklı bölgelerinde yüksek kalitede sinyal elde edilmiştir. Silikon tabanlı beyin elektrotlarının mekanik özelliklerini etkileyen faktörler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada esneklikten ziyade sağlam elektrot amaçlanmıştır. 206 μm ve 400 μm kalınlığında 4 farklı uzunlukta dizayn edilmiştir (15 μm , 30 μm , 50 μm , 70 μm).

2013 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise çalışmada ise düşük fiyatlı nikel elektro-kaplama yöntemi ile nikel tabanlı multielektrot kullanılmıştır. Mekanik olarak silikon tabanlıdan daha sert olduğu görülmüştür. Bağlantı içinde parylene kablo kullanılmıştır. Parylene kablonun biyouyumluluğu kanıtlanmıştır. 422 mm uzunluğundaki parylene kablo elektriksel bağlantıyı kolaylaştırmıştır ve paketleme problemlerini azaltmıştır (Yu *et al.* 2013).

Bu tezde, silikon alttaş üzerine ince film teknolojisi kullanılarak mikroelettrot üretilmiştir. Birinci kısımda, mikroelettrotların gelişimi, alttaş olarak kullanılan materyaller ve üretim teknolojileri ile alakalı literatür taraması verilmiştir. İkinci kısımda, biyosensörler ve in vivo elektrokimyanın temelleri hakkında bilgi verilip referans ve çalışma elektrotunda olması gereken özellikler anlatılmıştır. Elektrokimyasal ölçüm yöntemleri kısaca anlatılıp bu tezde kullanılan voltametri yöntemi hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Üçüncü kısımda, silikon alttaş üzerine ince film teknolojisi yöntemi ile üretilen mikroelettrodun fabrikasyon ve paketleme adımları verilmiştir. Dördüncü kısımda ise fabrikasyonu yapılan mikroelettrodun in vivo testleri yapılmıştır ve sonuçlar incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik impulsları elektriksel cevaplara çeviren analitik aletlerdir. Biyosensörler bir elektrokimyasal sensörün yapısına enzim, hücre, nükleik asit gibi biyolojik maddelerin katılmasıyla elde edilir. Günümüzde biyosensörler; gıda endüstrisi, tıp, çevresel analizler, tarım vb. gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Biri elektrokimyasal diğeri biyokimyasal iki çevirici sistemden oluşurlar. Biyokimyasal çevirici kısmı, incelenecek maddeyle etkileşerek onu tanıırken, etkileşimi sayısal değere elektrokimyasal kısım çevirir (Yalçın 2007).

Elektronların bir yerden başka bir yere geçişiyle, çözelti içinde elektrokimyasal tepkimeler gerçekleşir. Elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için; analizi yapılacak analiti içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi, elektrotları birbirine bağlayan çevirim sistemi gereklidir.

2.1.1. Biyosensörün sahip olması gereken özellikler

Biyosensörlerin sahip olması gereken özellikler incelenirken Yalçın 2007'den yararlanılmıştır.

2.1.1.a. Seçicilik

Ölçümü yapılmak istenen analit dışında ortamda bulunan diğer elektro aktif maddeler biyosensörün yanıtını etkilememelidir. Kullanılan biyolojik tanı materyali, çalışılan potansiyelde sadece analizlenmesi istenilen türe duyarlılık göstermelidir. Bu nedenle ortamda bozucu etki yapabilecek maddeler belirlenmeli ve etkileri engelleyecek önlemler alınmalıdır.

Yapılan çalışmalarda elektrotlarda yaşanan en büyük problemler arasında seçicilik görülmüştür. Askorbik asit ve nörotransmitter metabolitleri gibi beyinde karışan türler alınan bilgilerin doğru bir şekilde değerlendirmesini engellemiştir (Gonon *et al.* 1984) . Elektrotlara uygulanan ön iyileştirmeler ve elektrokimyasal teknikler ile seçicilik artırılmıştır. Gonon'un yaptığı çalışmada, elektrot yüzeyinin özellikleri değiştirilerek elektrodun seçiciliğini artırıldı. Böylece askorbik asit ve katekoller farklı potansiyellerde oksitlendi. Fakat bu iyileştirmenin başka problemlere sebep olduğu görüldü. Seçicilik ve hassasiyet artırılırken elektrodun analite karşı cevap süresini uzadı. Elektrokimyasal ön iyileştirmelerin bir alternatifi olan Nafyon ile elektrod kaplandı. Bu kaplama elektrostatik olarak katyonik katekollerin geçişine izin verirken askorbik asitin geçişini engellemiştir (Gerhardt *et al.* 1984) .

2.1.1.b. Duyarlık

Hedef analitin yoğunluğuna bağlı olarak biyosensör cevabındaki değişimin gözlenmesi ile duyarlılık belirlenir. İdeal bir biyosensörün analizi yapılacak maddeye karşı yüksek duyarlılık göstermesi beklenir.

2.1.1.c. Küçültülebilirlik

Elektrotlarının boyutlarının küçültülmesi biyosensörün dokuya zarar vermemesi açısından önemlidir. Literatürde genellikle elektrodun arka kısmının genişliği 1 mm, uzunluğu 1 cm olan elektrotlar üretilmiştir (Burmeister *et al.* 2000, 2001, 2002, 2003). Norlin *et al.* (2002) DRIE yöntemi ile 5 mm x 25 μ m x 20 μ m boyutlarında az doku hasarını sağlayacak oldukça dar bölgelerde kullanımı mümkün kılan elektrot üretmişlerdir.

2.1.1.d. Kalibrasyon gereksinimi

İdeal bir biyosensöründen en az kalibrasyona gerek duyması istenir. Fakat pratik uygulamalarda bu pek mümkün değildir. Kullandıkları süre boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

2.1.1.e. Kararlılık

Biyosensörlerin performansını değiştirmeden devam ettirmesine biyosensör kararlılığı denir. İdeal bir biyosensörün analiz maliyetlerini azaltmak ve kullanım süresini artırmak için uzun süre performansını koruması istenir. Biyosensörün kararlılığı, önemli ölçüde kullanılan alttaşın fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Biyosensörün kararlılığı ortamın pH'ı, ısısı, nemi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

2.1.1.f. Tekrarlanabilirlik

Analiz edilecek maddeye karşı aynı elektrot ile art arda alınan ölçümlerden elde edilen yanıtların aynı ya da yakın olması o biyosensörün tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Cevapların birbirine yakın değerlerde olması hazırlanan biyosensör ile yapılan analizlerin güvenilirliğinin ve doğruluğunun anlaşılması için önemlidir.

2.1.1.g. Cevap süresi

Yalçın (2007) sensörün cevap süresi konusundaki görüşlerini “Hedef analitin hücreye eklendiği andan itibaren kararlı hal akımları elde edilen ana kadar geçen süreye cevap süresi denir. Bir biyosensör elektrodun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrisinden anlaşılır. Elde edilen eğride basamakların şekli geniş ise cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)’dır. İdeal bir biyosensörün analizlenecek maddeye karşı hızlı cevap vermesi istenir şeklinde ifade etmiştir.

2.1.1.h. Ömür

Bir biyosensörün ömrü, analizi yapılan enzime karşı olan duyarlılığının zaman karşı grafiğe geçirilmesi ile bulunur. Bu grafik incelendiğinde biyosensörün duyarlılığını koruduğu süre biyosensörün ömrü olarak belirlenir. Maliyeti azaltmak için ideal bir biyosensörden uzun ömürlü olması beklenir.

2.2. İn Vivo Elektrokimyanın Temel Prensipleri

Mikroelektrotların çeşitli voltametrik tekniklerle birlikte kullanımını içeren elektrokimyasal metotlar; sinaptik keseleri, hücreleri, dokuları, anestezi altında olan ve olmayan beyinleri içeren değişik ortamları görüntüleme ve ölçme için kullanılırlar.

İn vivo elektrokimya memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunan nöronlardan gelen kimyasal sinyali kayıt eden mikroelektrotları kullanır. Elektrokimyasal işlemler elektrot yüzeyinde meydana gelir. Bu işlemler analitten elektron transferi (oksidasyon) ve analite elektron eklenmesi (redüksiyon) şeklindedir. Bilgisayar kontrolünde referans elektroda karşı potansiyel uygulanır. Uygulanan potansiyel yeterince büyüklükte ise elektrot yüzeyinde oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri meydana gelir. Okside moleküller, kayıt bölgesine okside molekül verirken, redükte moleküller kayıt bölgesinden elektron alırlar. Bu Faradaik reaksiyonlardan oluşan akımlar, mikroelektrot çevresindeki dokulardaki elektro aktif moleküllerin yoğunluklarıyla birebir orantılıdır. Bu temel prensip, in vitro ve in vivo ölçümleri mümkün kılar. Akım (i), analitten elektroda doğru olan elektron alışverişinin oranını göstermektedir:

$$i = \frac{\partial Q}{\partial t} = \frac{nF\partial N}{\partial t} \quad (2.1)$$

Burada Q yük, n elektronların sayısı, F Faraday sabiti, N analitin molünü göstermektedir. Bu denklemden akımın elektrot yüzeyindeki analit yoğunluğuna bağlı olduğu görülür. Analitin hareketi kendi ortamından elektrot yüzeyine difüzyon ya da

rastgele molekülerin hareketi tarafından belirlenir. Analitin elektroliz oranı yada akısı (J), analitin difüzyon katsayısına (D) ve elektrot yüzeyindeki konsantrasyon gradyanına (dC/dx) bağlıdır. Bu ilişki, Fick'in ilk yasasında şöyle geçer:

$$J = \frac{-D\partial C}{\partial x} \quad (2.2)$$

Mevcut cevabın büyüklüğü analitden elektrot yüzeyine doğru olan akım olarak belirlenir. Elektrot yüzeyindeki bu akım; solüsyonun kendisinden gelen şarj akımı ya da analitin oksidasyon ve redüksiyonundan gelen Faradaik akımdır. Şarj akımı elektrot yüzeyinde oluşan başka elektrokimyasal süreçlerden de meydana gelir. Özellikle solüsyon ve elektrotun potansiyel birikiminin farklılığından şarj akımı oluşur. Bu durumda elektrot bir kondansatör gibi davrandığı söylenir. Yük akımı ya da kapasite akımı elektrodun yüzeyi ile orantılıdır. Bütün akımlar (Faradaik ve yük akımı) elektroda uygulanan potansiyele bağlıdır. Bu da elektron transfer oranında ve elektrotun sonraki elektrolizinde büyük rol oynar (Borland 2005).

Nörobilim uygulamalarında kullanılan kayıt tekniklerinde Cottrell denkleminde belirtildiği gibi belirli bir akım-zaman cevabı üretilir:

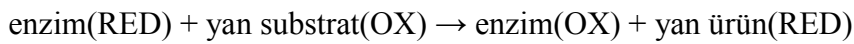
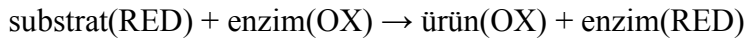
$$i(t) = \frac{nFA\sqrt{D_0C_0}}{\sqrt{\pi t}} \quad (2.3)$$

Elektrod yüzey alanı (A) , analit için difüzyon katsayısı (D_0) , analit konsantrasyonu (C_0), zaman (t) ile gösterilmiştir.

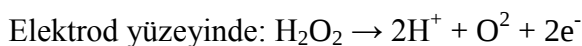
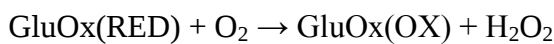
MSS (Merkezi Sinir Sistemi)'de bulunan kendiliğinden elektro aktif maddeler arasında askorbik asit (AA), Dopamin (DA), norepinefrin (NE), 5-hidroksitriptamin (5-HT), Homovanilik Asit (HVA), Nitrik Oksit (NO), Ürik Asit (UA), Dihidroksifenil Asetik Asit (DOPAC), 5-Hidroksiindol Asetik Asit (5-HIAA) vardır (Hacımüftüoğlu 2008).

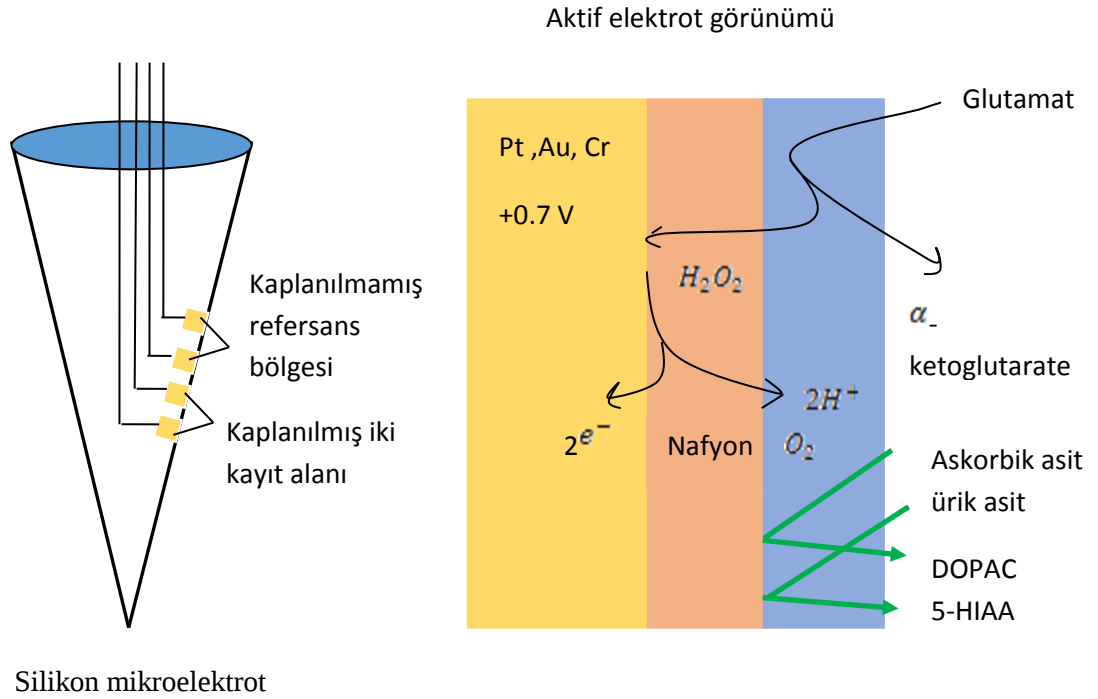
Peroksit ve askorbik asit gibi bir elektro-aktif bileşikler için, elektrot seçiciliği elektrot kaplamalar ve katkı maddelerinin eklenmesi ile geliştirilebilir. Elektrot kaplamalar elektro birikimli polimerleri (1,2 diaminobenzen), elektronik iletken polimerler (polipirol) ve polielektrolitler (Nafyon) içerir. Elektrotu Nafyon gibi polielektrolitler ile kaplamak elektrot seçiciliğini belirli bir analit için artırmanın en kolay yoludur. Enzim tabanlı elektrokimyasal mikrosensörler hidrojen peroksit ve AA gibi elektroaktif bileşenlere artan seçicilik sağlarken; glikoz, glutamat, kolin ve laktat gibi elektroaktif olmayan bileşenlere seçicilik kazandırır (Kulagina *et al.* 1999; Cui *et al.* 2001; Kulagina and Michael 2003).

Glukoz, glutamat, laktat ve kolin gibi birçok elektroaktif olmayan türler, elektrokimya kullanılarak incelenmiştir. Elektroaktif olmayan türleri ölçmek için, elektrotlar elektrokimyasal olarak özel kaplama ve katkı maddeleri ile kaplanır. Oksidaz enzimleri, özellikle glikoz, glutamat, kolin ve laktat saptanmasında elektrokimyasal sensör kullanımında en yaygın olarak kullanılan hareketsiz enzimlerdir. Belirli bir türe duyarlılığın oluşması için elektrot yüzeyinde sırasıyla aşağıda ki tepkimeler gerçekleşir:



Şekil 2.1’de görüldüğü gibi enzimler elektro aktif olmayan bu sebeple ölçülemeyen maddeleri kayıt bölgesinde kolayca algılanabilen peroksit gibi haberci moleküllere dönüştürülmesini sağlarlar. Oksidaz enzimleri elektrot yüzeyini elektrokimyasal olarak okside eden H_2O_2 oluşturmak için O_2 ’yi kullanırlar. H_2O_2 üretim hızı, doğrudan elektrotta enzimler tarafından tespit edilen analit konsantrasyonu ile ilgilidir. Glutamatın oksitlenmesi ve H_2O_2 oksidasyon tepkimeleri aşağıda ki gibidir:





Şekil 2.1. Mikroelektrot üzerine L-glutamat seçiciliği için kaplamalar.

*Nafyon, AA ve DOPAC gibi algılanması istenmeyen maddeleri uzaklaştırılır. Son olarak oksidaz enzimi ile Glutamat'ı algılaması sağlanır (Day 2005).

Bu tip elektrokimyasal sensörlerde, H_2O_2 'nin okside olması için elektrot yüzeyine ulaşması için katedeceği mesafeyi azaltmak için redoks enzimleri ince filmlerde tutulmaktadır. İnce filmler, düşük duyarlılığa sebep olacak peroksit difüzyonunu veya H_2O_2 'nin gereksiz reaksiyonunu sınırlamada yardımcı olurlar. Substratın filme olan uzaklığı azaldığından elektrotun cevap süresi de azalan film kalınlığı ile azalır (Heller 1992).

Mikroelektrotların kayıt bölgesi, sıçan ile farenin beyin ve omuriliği gibi küçük dokuların çevresinde analiz yapılabilir. Bu durum küçük ve katmanlı yapıların incelenmesinde avantaj sağlar. Ayrıca mikroelektrotlar, amperometrik tekniklerle birleştirilince, ilgilenilen maddenin ölçümünü hızlı zaman dilimlerinde yapılabilir. Bu durumda nörotransmitter alımının/gerialımının veya salınımının değişken dinamikleri ölçülebilir.

2.3. Referans Elektrotlar

Referans elektrotlar ve çeşitleri ağırlıklı olarak Yalçın (2007)'nin tezinden referans alınarak açıklanmıştır. Elektrokimyasal analizler sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen ve analiz süresince sabit kalan elektrotlardır. Referans elektrotlar çalışılan maddelere karşı duyarsızdırlar. İdeal bir referans elektrotta aranan özellikler aşağıdaki gibidir;

- Kolay hazırlanabilmelidir
- Tersinirdir ve nernst eşitliğine uyar
- Potansiyeli zamanla sabit kalır
- Çok küçük akımlara maruz bırakıldıklarında eski orijinal potansiyellerine geri dönerler
- Referans elektrotlar, sıcaklık değişimlerine karşı ufak değişimler gösterir.

2.3.1. Referans elektrot çeşitleri

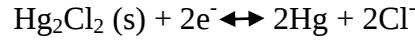
2.3.1.a. Standart hidrojen elektrot (SHE)

Elektrokimyada ilk olarak standart hidrojen elektrotlar kullanılmıştır. Hazırlanması güç olduğundan pratik çalışmalarda diğer referans elektrotlar daha çok tercih edilir.

2.3.1.b. Kalomel referans elektrot

Doygun kalomel elektrotun hazırlanması oldukça kolay olduğu için çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak kalomel referans elektrotun kullanımı tüm sistemler için elverişli değildir. Büyük sıcaklık katsayılarına sahip olmaları en büyük eksiklikleridir. Doygun kalomel elektrotun elektrot potansiyeli 25°C'de standart hidrojen elektrotuna göre +0,244 V'dur.

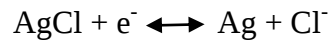
Oluşan elektrot tepkimesi şu şekildedir;



2.3.1.c. Gümüş-gümüş klorür (AgCl) referans elektrot

Bu tezde kullanılan Gümüş-gümüş klorür referans elektrotları da doymuş kalomel elektrotlar gibi oldukça yaygın kullanılırlar. Gümüş-gümüş klorür elektrotu doymuş kalomel elektrotta göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilirler. Referans elektrotun kullanımı çeşitli sebeplerden dolayı önemlidir. İlk olarak çalışma elektrotuna potansiyel uygulandığında bir referans nokta gerekir bu da referans elektrot tarafından sağlanır. İkinci olarak ta çalışma elektrotunda meydana gelen elektrokimyasal olayların ölçümünde elektron akışı için fiziksel yol oluşturur.

Ag/AgCl referans elektrodu, gümüş telin teflon kaplanması ile hazırlanır. Ucu FAST-16 ile ilişkilendirilir. Diğer ucu NaCl ile doyurulmuş 1 M HCl içine yerleştirilir. Bir platin kablo zıt elektrot olarak solüsyona sokulur. 9 volt DC adaptör kullanılır. Uygulanan potansiyel, kloru kabloya hareketlendirir ve AgCl oluşur. Elektrik potansiyeli yaklaşık 10-15 dakika uygulanır. Tam iletim sağlandığında, platin zıt elektrodu çevresinde kabarcıklar görülür. Bu minyatür Ag/AgCl referans elektrotları in vivo kullanım öncesi 3 M NaCl içine sokulur (Hacımuftuoğlu 2008). Oluşan tepkime şu şekildedir;



2.4. Elektro Kimyasal Ölçüm Yöntemleri

- Amperometrik (DC-Devamlı potansiyel)
- Siklik voltametri (CV-üçgen dalgalar)
- Kronoamperometri (kare dalgalar)
- Farklı puls voltametrisi (DPV, Kare dalgalar+üçgen dalgalar)

2.4.1. Amperometrik (DC-devamlı potansiyel)

Amperometri, devamlı sabit bir potansiyelde ölçüm yapılabilen en basit elektrokimyasal tekniklerdendir. Çalışma elektroduna devamlı voltaj uygulanmasından itibaren, mikroelettrot tarafından kaydedilen diğer non-Faradaik akımlar azdır. Bu teknik elektrokimyasal olarak aktif moleküllerin duyarlı ölçümlerine imkân sağlar.

2.4.2. Voltametri

Voltametri çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan elektro analitik bir yöntemdir. Voltametrik analizde uygulanacak potansiyel aralığı; kullanılan çalışma elektrodu, çözelti ve elektrolit türlerine bağlıdır. Voltametrde, çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilen potansiyelde uyarma sinyalleri uygulanır. Bu uyarma sinyallerinin çeşidine göre farklı akım cevapları oluşur. En çok kullanılan uyarma sinyalleri; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır (Yalçın 2007).

2.5. Mikroelettrot Hazırlık Aşamaları

Mikroelettrotun üretim aşamasından sonra in vivo ve in vitro testlerde kullanılması için bazı prosedürlerden geçmesi gerekmektedir. Bunlar temizleme, bariyer kaplama, enzim kaplama ve kalibrasyon prosedürleridir.

Elektrotun temizliği yapılırken elektrotların uçları, citrisolv solüsyonunda 5 dk ekletilip, 5 dk da iyonize H₂O (ddH₂O) ile yıkanır. Sonra 15 dk. 105–115°C’de fırında kurutulur.

Başarılı bir temizleme prosedüründen sonra elektroda glutamat seçiciliği için iki farklı kaplama yapılır. İlk olarak merkezi sinir sisteminde bulunan Askorbik asit (AA) ve DOPAC gibi ölçümü istenmeyen maddeleri bloklamak için Nafyon kaplanır (Gerhardt *et al.* 1984). Böylece elektrot analit için daha seçici olur.

Daha sonra ölçülmek istenen enzim glutamat ise glutamat oksidaz enzimi ile kaplanır. Eğer farklı bir elektrokimyasal olarak aktif olmayan enzimin ölçümü yapılmak isteniyorsa o enzimin oksidaz enzimi ile kaplama yapıp elektrotta istenilen analite karşı seçicilik kazandırılır.

Mikroelektrotun kayıt bölgeleri peroksida ve L-glutamata farklı cevaplar verebilir. Elektrodun standart eğimlerin tespit edilebilmesi için deneyden önce in vitro olarak kalibre edilmesi gerekir. Bu yüzden kalibrasyonlar, L-glutamatın oluşturduğu peroksitten oluşan analit konsantrasyonundaki değişimi, peroksidin oksidasyonu ile oluşan akım değişimine eşitlemek için kullanılır. Yoğunluğu bilinen analit, 37°'de 40 mililitrelik 0.05 M PBS solüsyonuna eklenir ve FAST-16 sisteminde ölçülebilen pikoamper seviyelerinde bir akım oluşturur.

FAST-16 sistem yazılımı, her bir analit ilavesiyle akımları kaydeder. Her bir kayıt bölgesi için kalibrasyon eğimi oluşturur ve bu kalibrasyon eğimlerini depolar. Aynı zamanda AA gibi bilinen bozucular, kalibrasyon esnasında teste ilave edilir ve istenen analitin bozuculara göre seçiciliği test edilir. İn vivo deney esnasında kalibrasyon dataları geri çağırılır ve analitin konsantrasyonunun tespit edilebilmesi için kullanılır.

2.6. Kalibrasyon Kriterleri

Kalibrasyon esnasında FAST-16 kayıt sistemi, L-glutamatın AA'ya göre seçiciliğini, eğrinin eğimini (analit için mikroelektrodun duyarlılığını), tespit limitini (LOD) ve çizgiselliğini (R^2) otomatik olarak hesaplar.

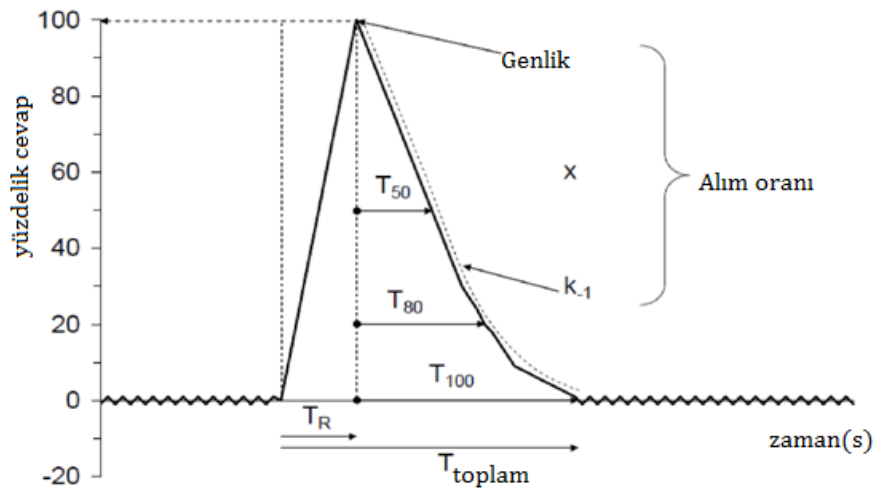
L-glutamata karşı cevabın $R^2 \geq 0.99$ olması gerekir. Mikroelektrodun eğimi veya duyarlılığı, L-glutamattaki değişimin hangi iyilikte ölçülebileceğini gösterir. Eğim, aynı zamanda mikroelektrodun kullanımı için en güvenilir ölçüt olan LOD'un hesaplanmasında da kullanılır.

Mikroelektrot seçiminde LOD kullanılır. LOD mikroelektrot için tespit limitidir. Analit yoğunluğu, kayıt sisteminin arka plan gürültüsünün üç katına eşit elektrot cevabıdır. Kullanıcı, görmek istediği cevaptan daha düşük LOD'lu mikroelektrotları seçmek zorundadır.

Seçicilik; L-glutamatın AA gibi interferentlere göre duyarlılık oranını gösterir. L-glutamat eğiminin AA eğimine bölümüyle hesaplanır. 100/1 selektif mikroelektrot demek, 100 mikromolarlık AA konsantrasyon artışının L-glutamatta yalnızca 1 mikromolar konsantrasyon artışına yol açacağını gösterir. 100/1 seçicilikte kullanıcı mikroelektrodun AA'yı %99 etkinlikle blokladığını bilir. 100/1 ve üstü seçicilik iyi ve idealdir. Fakat 20/1 seçicilik oranlarında da mikroelektrotlar kullanılabilir (Hacımüftüoğlu, 2008).

2.7. Sinyal Analizi

Üretilen çoklu mikroelektrot dizisini kullanarak beyin içinde bulunan L –Glutamatın ölçümünü yapıp L-glutamat sinyalini ölçmek ve analiz edilmek önem arz etmektedir. Şekil 2.2'de analiz parametreleri ile birlikte tipik bir L-glutamat sinyali görülmektedir.



Şekil 2.2. L-Glutamat sinyalinin şematik diyagramını göstermektedir. L-glutamat ve diğer nörotransmitterlerin zamana karşı konsantrasyon eğrisi olarak çizilmiştir

Baseline ile karşılaştırıldığında konsantrasyondaki maksimum değişim, maksimum genlik ya da L-glutamat sinyalinin genliği olarak belirtilir. Bu değer genel olarak μM olarak ölçülür. Sinyalin baselinedan maksimum genliğe ulaşması için geçen zaman kaydedilir ve yükselme zamanı olarak (T_r) olarak ifade edilir. Maksimum genlikten sonra baseline'a doğru sinyal azalması gerçekleşir. L-glutamatın klirensi L-glutamatın nöronal taşıyıcılarla hızlı alımının sonucudur. L-glutamat sinyalinin azalması verinin doğal logaritmik dönüştürülmesinin çizgisel azalmasının eğimidir. Bu da k_{-1} adını alır ve sinyalin maksimum genlikle çarpıldığında alım-gerialım oranı veya saniyede ekstraselüler boşluktan uzaklaştırılan L-glutamatın mikromoları elde edilir. Sonuçta sinyal azalması, azalmanın farklı persantillerinde değerlendirilebilir. Sinyal düşüşü maksimum genlikten baseline'a düşüş süresidir. Son olarak sinyalin düşüşü, düşüşün farklı yüzdelerinde incelenebilir. Genel olarak T_{50} , T_{80} ve T_{100} zaman yüzdeleri kullanılır (Hascup *et al.* 2007).

2.8. Üretim Aşamasında Kullanılan Teknikler

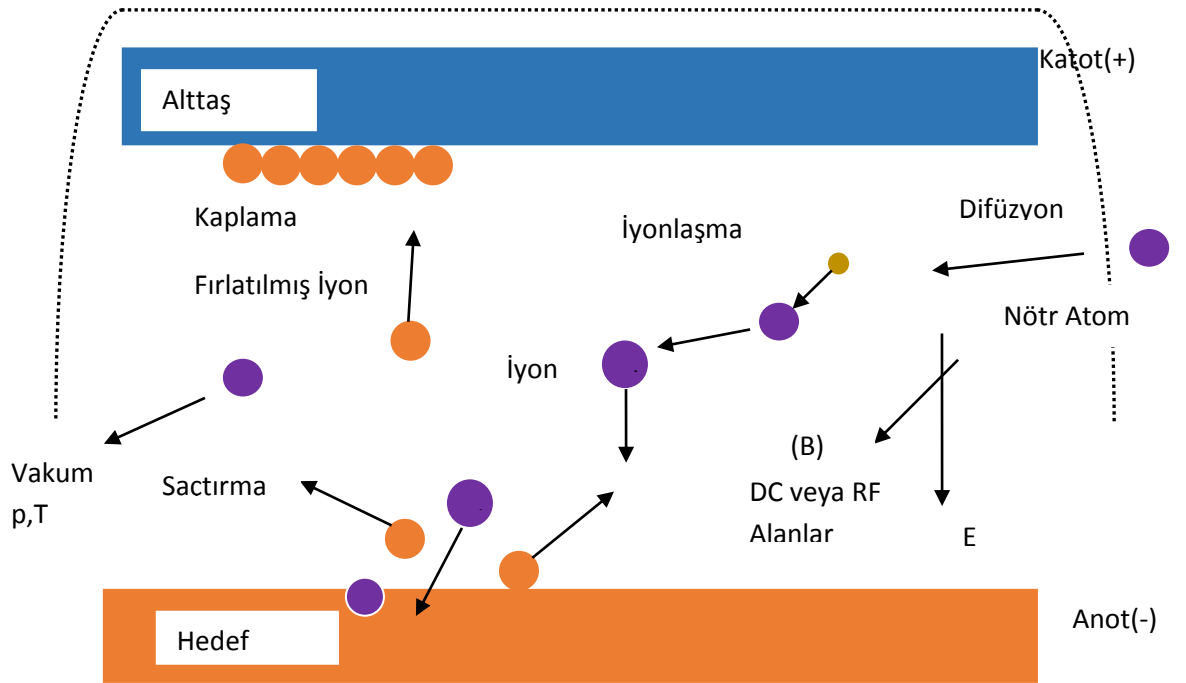
Mikroelektrot üretim aşamasında fotorezist kaplandıktan sonra maskeleme yapılmış, saçtırma tekniği ile titanyum kaplanmış, buharlaştırma yöntemi ile altın kaplanmış. Son olarakta lift-off tekniği uygulanmıştır. Aşağıda bu teknikler anlatılmaktadır.

2.8.1. Sputtering tekniği (saçtırma tekniği)

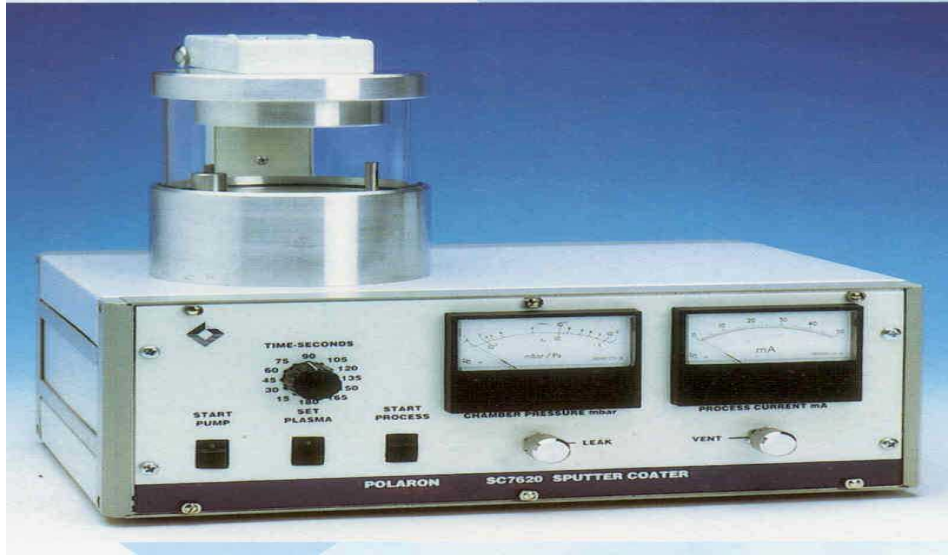
Saçtırma tekniği, Hedef malzemedeki atomların fiziksel olarak atom boyutlu ve enerjili parçacıklar tarafından bombardıman edilerek momentum transferi sonucu koparılması ve taban malzeme üzerine büyütülmesidir (Şekil 2.3). Oldukça kolay ve kullanılabilir olması, büyük alanlara uygulanabilir olması, kalınlığın kaplama süresi ile kontrol edilebilir olması bu sistemin avantajları arasındadır.

Sputter işleminde biriktirme yapılacak alttaş ile kaynak malzeme vakum seviyesi 10^{-7} Torr'a kadar inebilen bir sistem içerisinde yer alır. Saçtırma işleminde kullanılan enerjili parçacıklar genellikle elektrik alanda hızlandırılan gaz iyonlarıdır. Sistemde iyonize

edilmiş reaktif olmayan (inert) bir gaz olan Argon kullanılır. Ortam vakuma alındıktan sonra ortama argon gönderildiğinde iki elektrot arasında plazma oluşur. Kaplama hızı iyonun enerjisine, kütlesine, hedef malzemesine, iyonların yönüne, hedef sıcaklığına ve basınca bağlıdır.



Şekil 2.3. Saçtırma işleminin basit şematik gösterimi



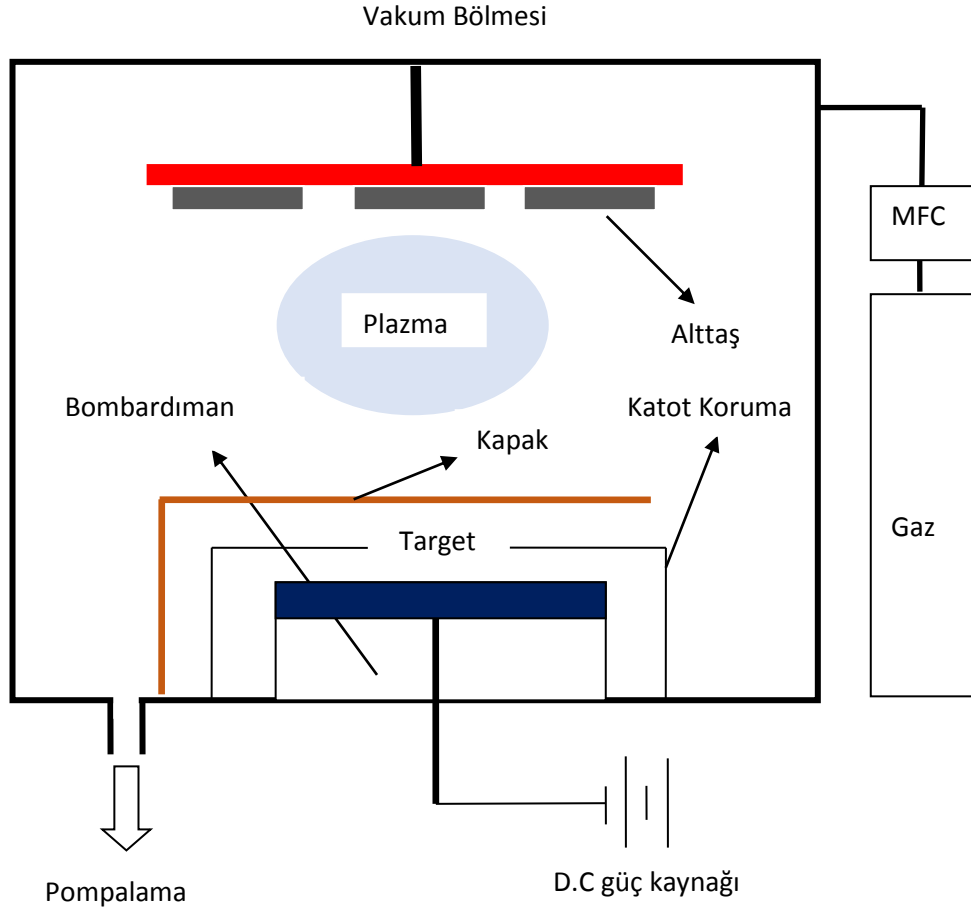
Şekil 2.4. Saçırma sistemi

* Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Nanoelektronik Laboratuvarı

Genellikle kullanılan güç kaynaklarının özelliklerine göre değişik saçırma teknikleri literatürde görülmektedir. Bunlar doğru akım (DC) saçırma, radyo frekansı (RF) saçırma ve magnetron saçırmasıdır.

2.8.1.a. DC saçırma

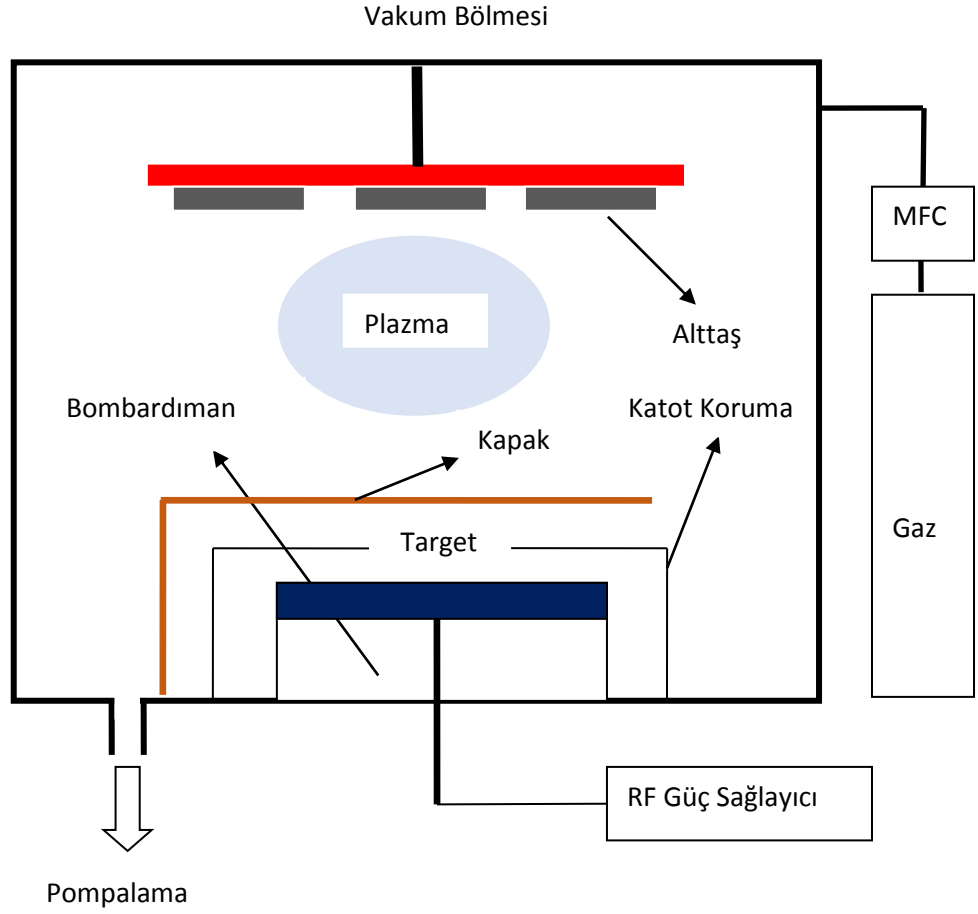
Hedef ve alttaş vakum odası içinde bulunan iki paralel elektroda yerleştirilir. İstenilen basınç değerine gelindiğinde ortam oluşturmak amacıyla inert gaz sistem içerisine birkaç mTorr basınçta gönderilir ve elektrotlara DC voltaj uygulanır. Serbest kalan elektronlar elektrik alan tarafından hızlandırılır ve Ar atomlarını uyarmak için enerji kazanırlar. Uyarılmış Ar atomları iyonlaşarak plazma oluşturur ve hedefe doğru yönelerek hedeften nötral atomları ve ikincil elektronları koparır. Koparılan atomlar saçılarak alttaş üzerine birikir ve ince film oluştururlar (Şekil 2.5). İkincil elektronlar ise Ar atomları ile çarpışarak onları iyonize eder ve bu şekilde devam eder (Chenn 2004). DC saçırma yönteminde f-hedef ve alttaş malzemesi yalıtkan olmamalıdır. Yalıtkan olması durumunda katotta biriken yük Ar iyonlarının çarpmasını engelleyip saçırma olayının durmasına neden olmaktadır.



Şekil 2.5. DC saçırma tekniğinin şematik gösterimi

2.8.1.b. RF saçırma

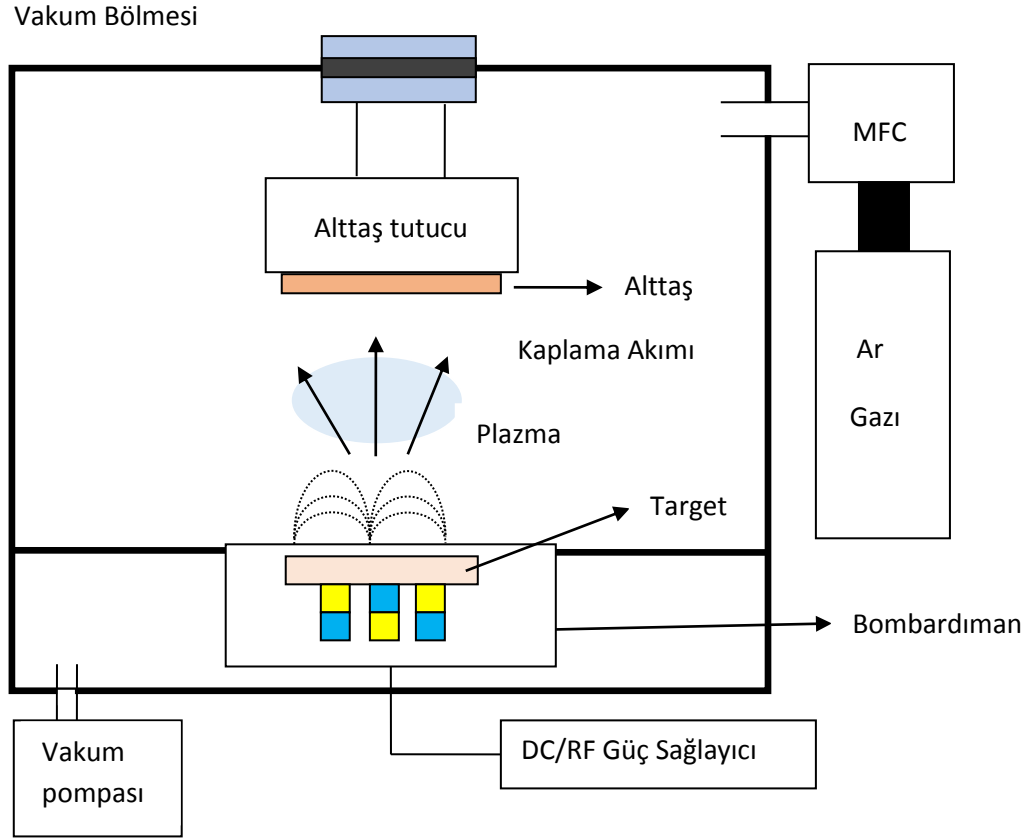
Değişken elektrik alan elektrotlar arasında plazma oluşturmak için uygulanır. RF saçırma tekniği iletken, yarıiletken ve yalıtkan malzemelerin kaplanmasında kullanılır (Şekil 2.6). RF güç kaynağının saçırma tekniği ile birleştirilmesiyle hedefin iletken olma mecburiyetini ortadan kaldırmıştır. 5-30 MHz frekanslı RF kullanılır. RF saçırma tekniğinde kaplama hızı DC saçtırmaya oranla daha düşük olmasına rağmen yalıtkanların RF saçırma tekniğiyle daha iyi bir şekilde kaplanabilmesi bu tekniğin geniş bir alanda kullanılabilmesine neden olmuştur.



Şekil 2.6. RF saçtırma tekniğinin şematik gösterimi

2.8.1.c. Magnetron saçtırma

Bu teknikte iyonlaşma oranını artırmak için hedefin yüzey normali doğrultusunda manyetik alan uygulanır. Manyetik alanlar elektronları helikonik hareketlere sokarlar. Elektronların yolları uzadığı için hareketleri boyunca daha çok sayıda çarpışma yaparak hedef üzerinde iyon yoğunluğunu artırırılar böylece daha düşük basınçta daha yoğun plazma elde edilebilir. Bu sayede hedeften atom koparma işlemi daha yoğun bir şekilde gerçekleşir. İyonlaşma oranının artması daha düşük basınçlarda plazma oluşturulabilir ve daha yüksek kaplama hızı sağlanır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Magnetron saçırma tekniğinin şematik gösterimi

2.8.2. Litografi tekniği

Litografi, maske üzerinde bulunan devre diyagramının alttaş üzerine transfer edilmesini sağlayan işlemlerin bütününe verilen addır. Tümüleşik devre tasarımının gelişimiyle beraber litografi aşamalarının kullanımlarında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Işıkla yapılan litografinin yanı sıra elektron demetini yönlendirerek, maskesiz ya da başka yöntemlerle de litografi yapılabilir. Başlıca litografi teknikleri aşağıdaki gibidir;

- Fotolitografi (Optik, UV, EUV)
- E-demet/ İyon demeti/ Nötr atomik demet litografi
- X- ışını litografi
- Girişim litografi
- Taramalı sonda litografi

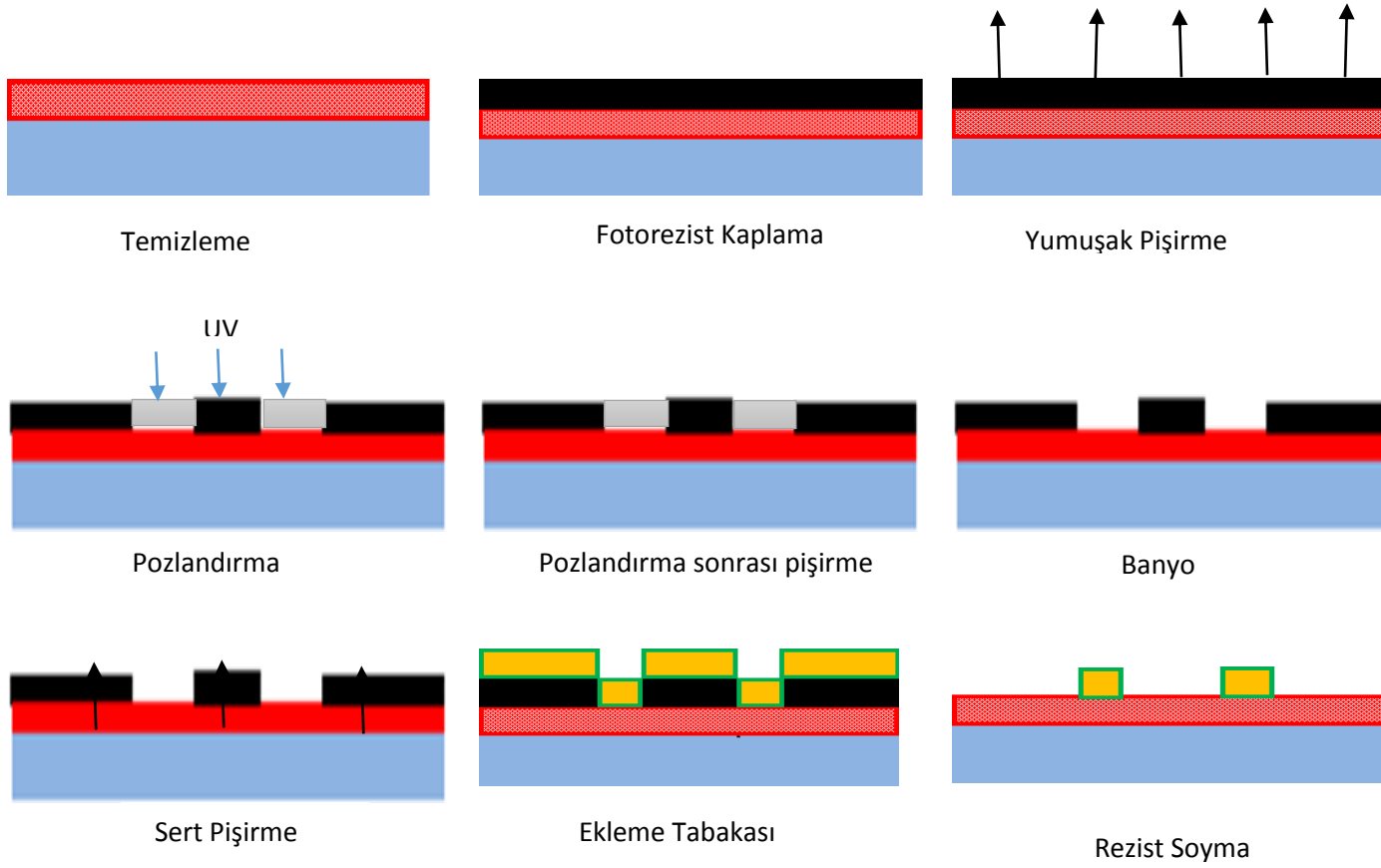
- ✓ Gerilim darbesi
- ✓ CVD
- ✓ Yerel elektro kaplama
- ✓ Dip-pen

Bu tezde mikroeletrot üretilirken UV-fotolitografi tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ayrıntısıyla anlatılmıştır.

2.8.2.a. Fotolitografi

Fotolitografi ışığa duyarlı fotorezistin kontrollü ışık ile pozlandırması ile görüntülerin oluşturulmasına denir. Bir fotolitografi işlemini oluşturan basamaklar sıralanmıştır (Şekil 2.8).

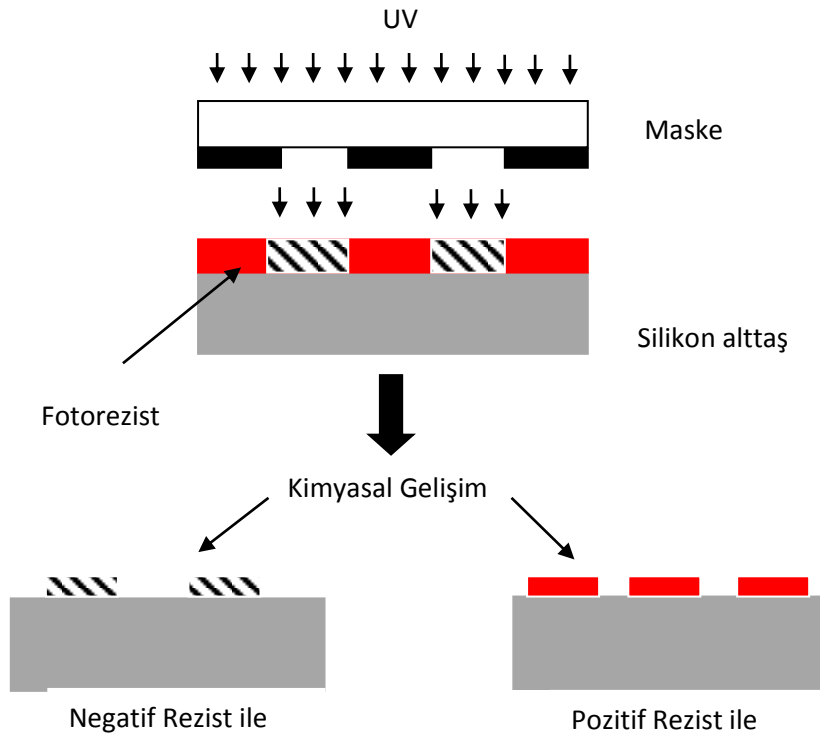
- Temizlik ve yüzeyin hazırlanması
- Fotorezist uygulanması
- Yumuşak pişirme
- Hizalama ve pozlama
- Banyo
- Sert pişirme
- Aşındırma veya ekleme tabakası
- Rezist kaldırma



Şekil 2.8. Fotolitografi tekniğinin şematik gösterimi

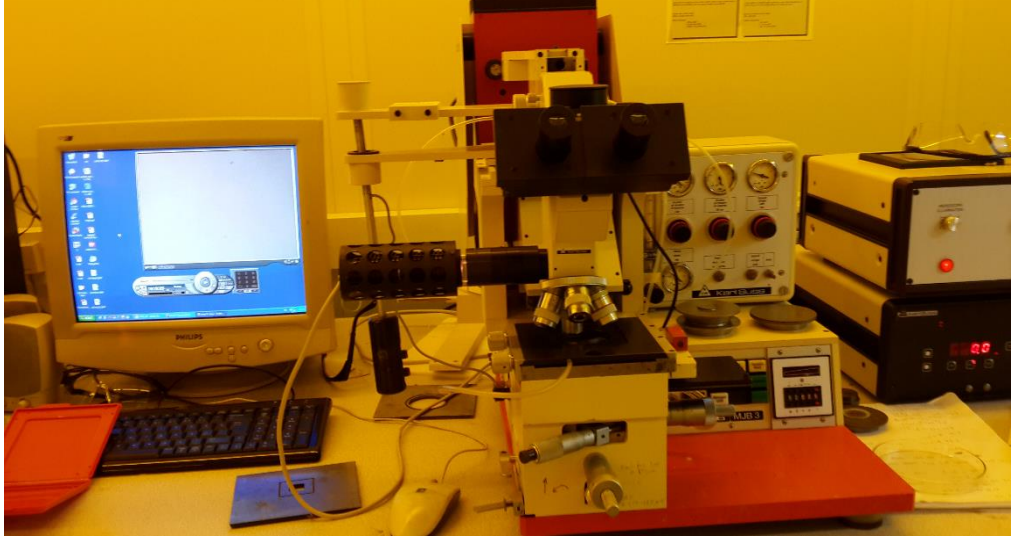
2.8.3. Lift-off tekniği

Malzemelerin desenlendirilmesinde yaygın ve kolay bir yöntem olarak Lift-off yöntemi kullanılmaktadır. Yüzey üzerine film kaplanmadan önce genel olarak kaplanacak yüzeyin temizliği yapıp, daha sonra da fotorezist kaplanarak geçici yüzey oluşturulur. Zaman, hız, kalınlık, homojenlik, tozlar ve kusurlar kaplanan fotorezistin kalitesini belirler. Daha sonra ön pişirme yapılır. Ön pişirme; fotorezist düşük sıcaklık ve kısa zaman aralığında ısıtılmasına tabi tutulmasıdır. Ön pişirmedeki amaç fotorezistin çözücüsünün buharlaştırılmasını sağlamak, yapışmanın iyileşmesini sağlamak, homojenliği artırmak ve aşındırmaya karşı direncin iyileşmesini sağlamaktır. Negatif ve pozitif fotorezist olmak üzere iki çeşit fotorezist bulunmaktadır. Negatif fotorezist maske üzerinde ki desenin tersinin basılmasını sağlarken, pozitif fotorezist maske üzerine ki desenin aynısının basılmasını sağlar. Kullanılan fotorezisti de uygulayacağımız desen ve tekniğe göre seçebilir. Negatif fotorezistler ışık gördüğünde polimer zinciri oluştururken, pozitif fotorezistte ise polimer zincirleri ışık gördüklerinde kırılırlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Pozitif ve negatif fotorezist ile maske aktarımı

Lift-off sürecinde film altındaki geçici tabaka çözücü yardımıyla kaldırılır ve süreç başında yüzeye biriktirilen film kalır.



Şekil 2.10. Mask-Aligner Cihazı

* Bilkent Üniversitesi İleri Araştırma Laboratuvarı

2.8.4. Termal buharlaştırma

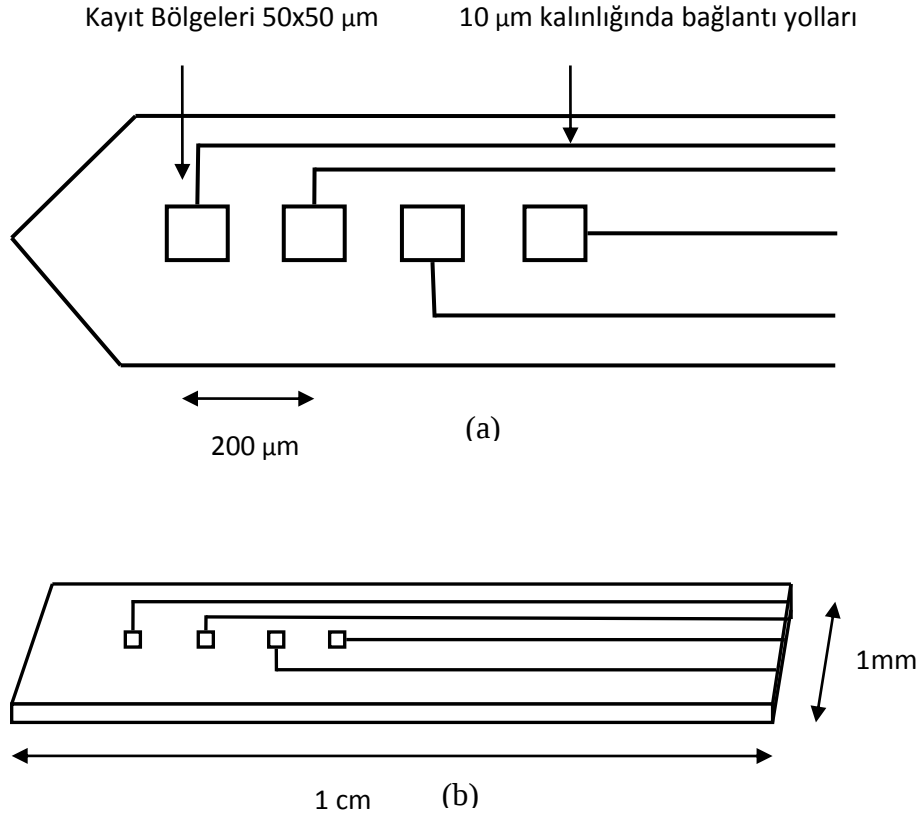
Buharlaştırılacak malzeme doğrudan ergime sıcaklığı yüksek olan bir potaya direnç olarak bağlanır. Potanın bulunduğu flamandan yüksek akım geçirilerek potanın ısınması sağlanır böylece potadaki malzeme yüksek ısıyla erime sıcaklığına ulaştığında buharlaşır ve hedef malzemeye kaplanmış olur. İşlem 10^{-5} – 10^{-6} Torr basınçlı vakum ortamında yapılır. Termal buharlaştırma işleminde ortamın kirli olması kaplama kalitesini büyük oranda etkiler. Termal buhar kaplama işleminde buharlaşan atomların kinetik enerjileri düşük olduğu için, kaplamaların ana malzemeye yapışma yetenekleri düşüktür. Sistemin oldukça basit olması ve buhar veriminin yüksek olması, kaplama malzemesi seçiminde geniş olanaklar sunması, termal buharlaşma tekniğinin avantajlarıdır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Enzime Dayalı Çok Bölümlü (Multisite) Mikroelektrot Fabrikasyonu

Enzim temelli çok kanallı mikroelektrotlar fotolitografik metotla üretilmektedirler. Bu metot 5-10 μm (mikrometre-mikron)'lık kayıt yüzeylerinin fabrikasyonuna imkân sağlamaktadır. Ayrıca bu metotla birçok çeşitte multikanallı mikroelektrot tek bir alttaş üzerinde aynı fabrikasyon anında yapılabilir. Böylece zaman ve maliyet açısından avantaj sağlanmış olur.

Mikroelektrot fabrikasyonunu ince film teknolojisinden yararlanılarak üretildi. İlk olarak fabrikasyonu yapılacak olan mikroelektrot tasarımı L-Edit programında çizildi. 4 adet kayıt bölgesi ve PCB ile bağlantının yapılabilmesi bağlantı bölgeleri oluşturuldu. Mikroelektrotun toplam boyu 1 cm, genişliği 1 mm olacak şekilde bağlantı bölgeleri ile kayıt bölgeleri arasına 10 μm kalınlığında yollar çizildi. Bağlantı bölgeleri farklı büyüklükte olana sensörler tasarlandı. (Şekil 3.1). L-Edit programı ile oluşturulan mikroelektrotlar maske üzerini aktarıldı. Alttaş olarak 4 inç büyüklüğünde 500 μm kalınlığında yüksek yalıtkanlıkta silikon kullanıldı. Temizlik aşamasından sonra silikon alttaşın yalıtkanlığını artırmak için SiO_2 ile kaplandı. Ardından fotorezist silikon alttaş üzerine uygulandı. Hızalandırılmış UV ışık altında çizilen maske üzerindeki mikroelektrot şekilleri fotorezist kaplı silikon alttaşına aktarıldı. Negatif maske kullanıldığı için kayıt bölgeleri, bağlantı yolları ve bağlantı noktalarının olduğu fotorezist bölgeleri ışığa maruz kaldı. Developer ile bu bölgelerin kalkması sağlandı. Daha sonra, adhezyonu artırmak için 500 Å kalınlığında titanyum ile silikon alttaş kaplandı. Adhezyon tabakasından sonrada 1500 Å kalınlığında altın ile kaplanarak aktif metal tabakası oluşturuldu. Aseton kullanarak kayıt bölgeleri, bağlantı yolları ve bağlantı bölgeleri hariç diğer bölgelerde ki fotorezist ve istenmeyen metaller kaldırıldı. En son olarak ta beyin içinde kullanışlı kullanım için konik şekilde kesimi yapıldı.



Şekil 3.1. (a) Büyültülmüş konik elektrodun, (b) dikdörtgen elektrodun şematik resmi

3.2. Çok Kanallı Mikroelektrot Tasarımı

Kullanışlı fabrikasyon sürecinden dolayı mikroelektrotlar çeşitli geometrik konfigürasyonlarda üretilebilmektedir. 8 kayıt bölgesine ve 16 kayıt bölgesine sahip mikroelektrot yapılabilir. R1 (Şekil 3.2a) elektrotları, geniş beyin bölgeleri için veya tabakalı yapılar için kullanışlı olan daha geniş bir kayıt mesafesi sağlarken, S2 (Şekil 3.2b) daha küçük beyin yapılarında algılama imkânı sunar. Bu tezde üretimini yapılan mikroelektrot 4 kayıt bölgesine sahiptir (Şekil 3.3).

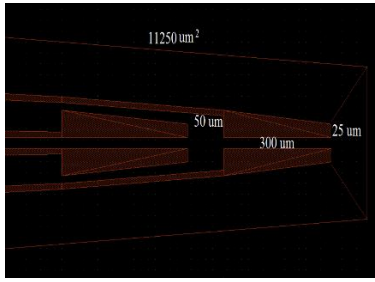


(a)

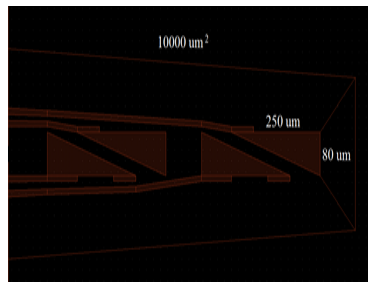
(b)

Şekil 3.2. Silikon tabanlı mikroeletrotların mikroskop görüntüleri

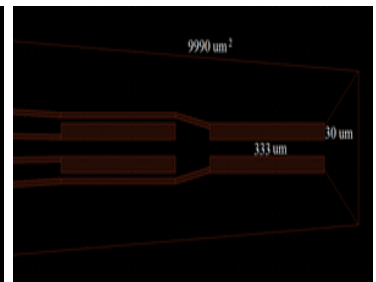
*Herbiri farklı geometrilerde Au kayıt bölgelerine sahiptir. a) 4 kayıt bölgesine sahip R1 tipi mikroeletrodun mikroskop görüntüsü görülmektedir. Kayıt bölgeleri 50x150 μm boyutlarına sahiptir. Kayıt alanları arasında 50 μm boşluk vardır. b) 2 çift altın kayıt bölgesine sahip S2 tipli mikroeletrodun mikroskop görüntüsü görülmektedir. Her kayıt bölgesi 15x333 μm boyutlarına sahiptir ve çiftler arasında 100 μm boşluk bulunmaktadır.



(a)



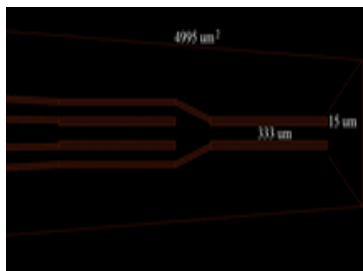
(b)



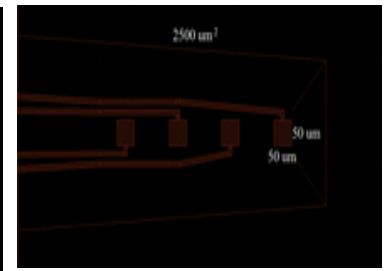
(c)



(d)



(e)



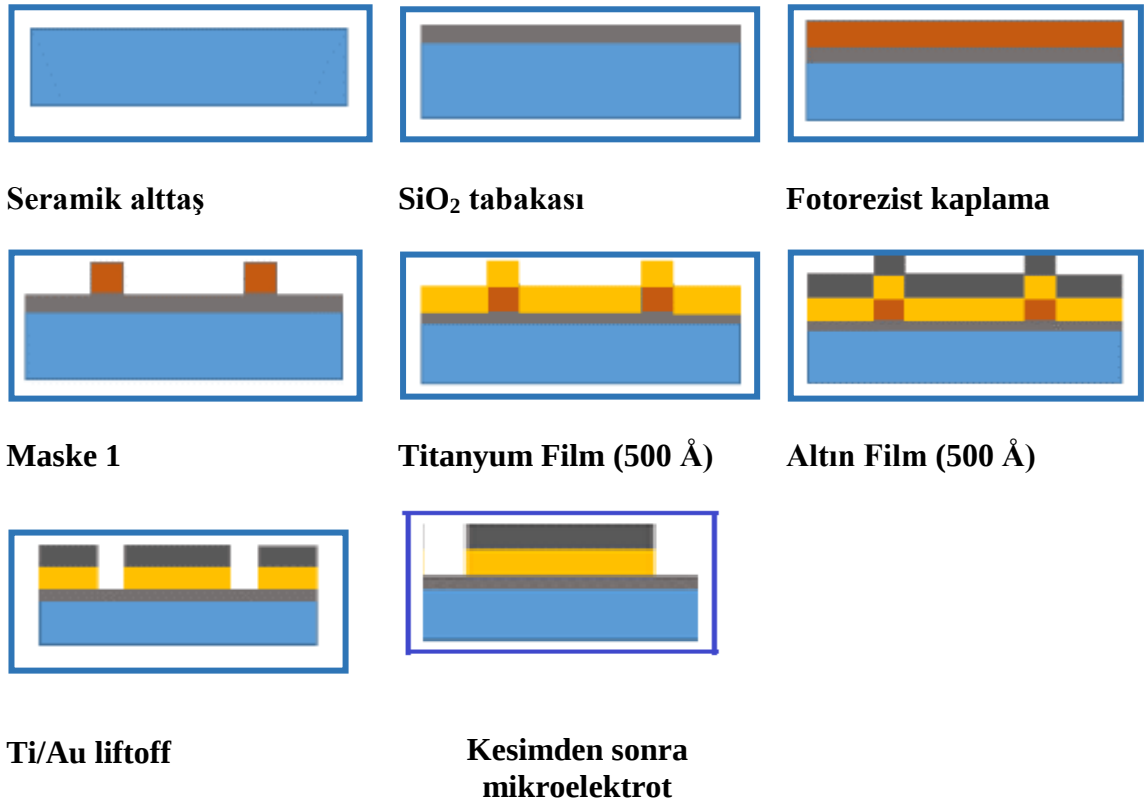
(f)

Şekil 3.3. Silikon tabanlı çoklu mikroeletrot dizaynlarının L-EDİT programındaki ekran görüntüsü

*Her biri farklı geometrik dizaynlarında altın kayıt bölgelerine sahiptir. 25x300 μm boyutlarında S2 mikroeletrot (a) 20x250 μm boyutlarında S2 mikroeletrot (b) 30x333 μm boyutlarında S2 mikroeletrot (c) 50x150 μm boyutlarında R1 elektrot (d) 15x333 μm boyutlarında S2 mikroeletrot (e) 50x50 μm boyutlarında R1 mikroeletrot (f)

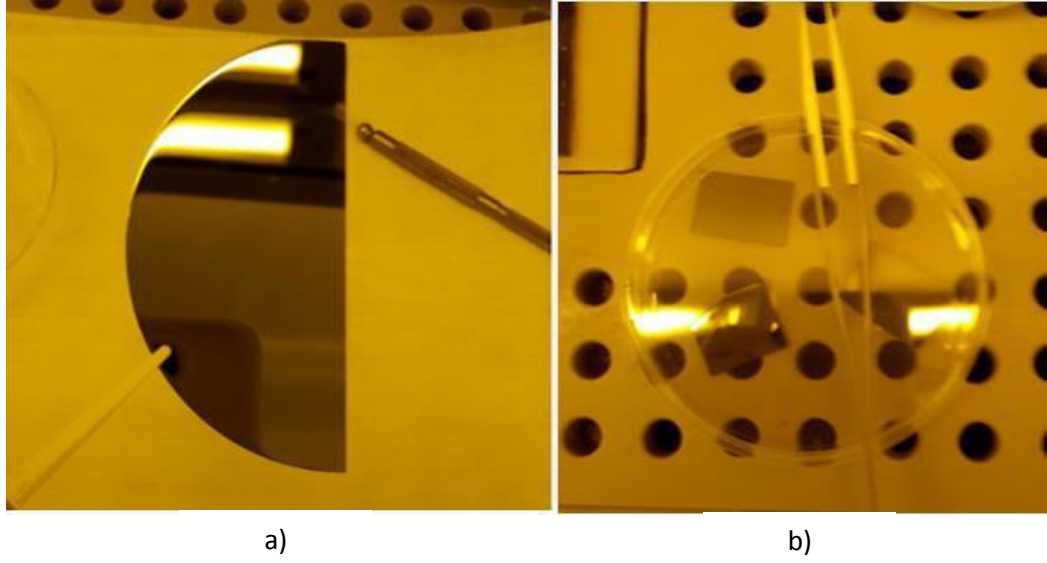
3.3. Fabrikasyon

Fotolitografik yöntem ile üretilen mikrosensörün üretim aşamaları şematik olarak aşağıda anlatılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Silikon tabanlı mikroeletrot fabrikasyonunu gösteren şematik diyagram

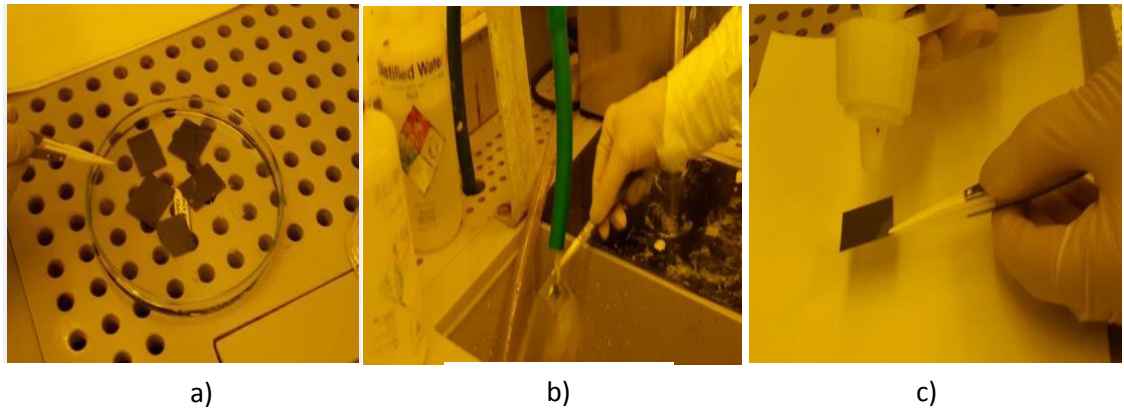
4 inç çapında 500 µm kalınlığında oldukça yalıtkan silikon alttaş 1x1,5 cm boyutlarında kristal düzleminden dilimlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Silikon alttaşın fabrikasyona hazırlanması
 *(a) Silikon alttaş (b) 1x1,5 cm boyutunda kesilmiş silikon alttaş

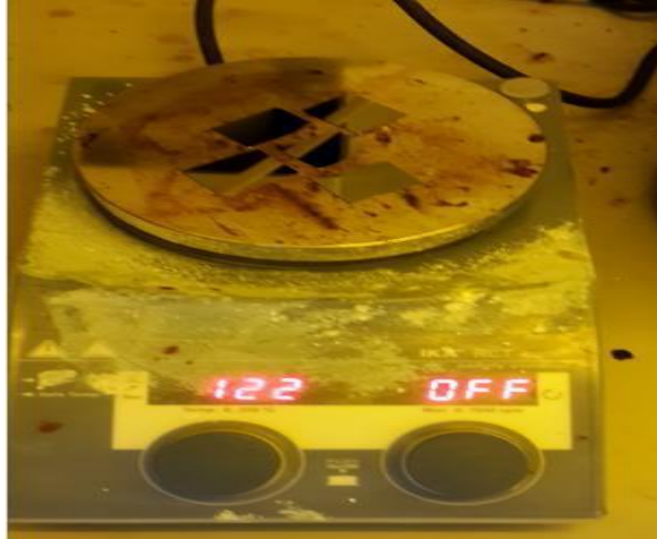
3.3.1. Temizleme

Silikon alttaş üzerinde bulunan kalıntılardan temizlemek için Piranha çözeltisi (30 ml H_2SO_4 , 10 ml H_2O_2) hazırlanıp alttaş çözelti içinde 2 dk bekletildi (Şekil 3.6 (a)). Bol de iyonize su ile durulanıp (Şekil 3.6 (b)) azot tabancası ile tamamen kurutuldu (Şekil 3.6 (c)). Fotorezist kaplama işleminden önce adhezyonu artırmak için dehidrasyon işlemi yapıldı (Şekil 3.7). Isıtıcıda 120° 'de 5 dk alttaş üzerindeki su buharlaştırıldı.



Şekil 3.6. Alttaşın temizlenmesi

* (a) Silikon alttaşın piranha ile temizlenmesi (b) deiyonize su ile durulanması (c) azot tabancasıyla kurutulması



Şekil 3.7. Dehidrasyon işlemi

3.3.2. SiO₂ kaplama

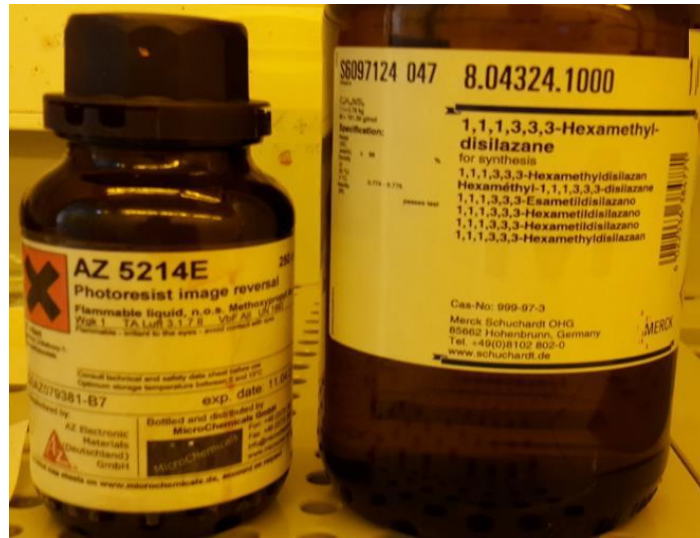
Silikon alttaşın yalıtkanlığını artırmak için sputter yöntemi kullanılarak 1000 Å kalınlığında SiO₂ kaplanmıştır. Kaplama kalınlığı: 0,8 Å/s, Güç: 100 W olarak seçilmiştir.

3.3.3. HMDS (Hexamethyldisilazan) ve fotorezist kaplama

Alttaş yüzeyi fotorezist kaplama işleminden önce Hekzametildisilazen primer adında bir kimyasal bileşik ile kaplandı. Hekzametildisilazen primer yüzeydeki oksit grupları ile bağ yaptığından örnek ile fotorezist arasındaki adhezyonu artırır. Hekzametildisilazen kaplanırken miktar ışığa duyarlılığı etkilediği için dikkat edildi. Kaplama prosedürü homojenliği sağlamak için 2 aşamada gerçekleştirildi. 1. Aşama 500 dev/dk'da 5 s, 2. Aşama 5000 dev/dk'da 55 s olarak ayarlandı. Daha sonra, aynı dev/dk ve saniyede fotorezist kaplandı (Şekil 3.8). Fotorezist olarak AZ5214 pozitif rezist seçilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. HMDS ve fotorezist kaplama ünitesi



Şekil 3.9. Kullanılan pozitif rezist

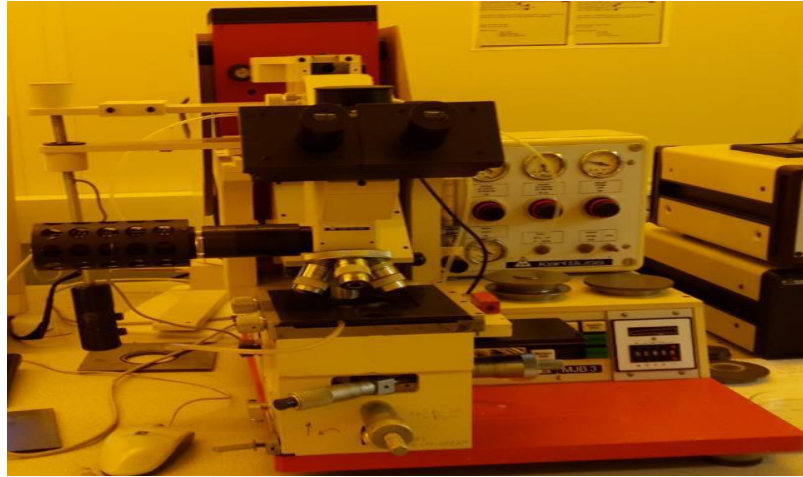
3.3.4. Ön ısıtma

Ön ısıtma, fotorezistin yapışmasının iyileşmesi, homojenliğin iyileşmesi, aşındırmaya direncin iyileştirilmesi ve fotorezistin solventini buharlaştırarak fotorezisti UV ışığına daha hassas hale getirilmesi açısından önem arz etmektedir. Ön ısıtmanın sıcaklığı ve ne kadar süre uygulanacağı önemlidir. Kısa ön ısıtma UV ışığının foto aktif bileşene

ulaşmasına engel olacak geliştirme sonrası istenmeyen bölgelerde rezist kalmasına neden olacaktır. Uzun ön ısıtma ise foto aktif bileşene zarar vereceğinden developer içerisinde çözünürlüğünü azaltacaktır. 110°'de 45 s ön ısıtma yapıldı.

3.3.5. Litografi

Fotorezist kaplı alttaşa maske görüntüsünün transferi yapıldı. Bu aşamada maske ile alttaşın uzaklığı maskedeki sensörlerin boyutlarının birebir çıkması için oldukça yakın ayarlandı. Mask aligner cihazının gücü 300 Watt'a ayarlanıp alttaş 90 s 365 nm dalga boyunda UV ışığa maruz bırakıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Mask aligner cihazı

3.3.6. Developer

Alltaş üzerinde UV ışığına maruz kalan bölge asidik özellik gösterir, bazik yapıda olan developer ile bu bölgede ki fotorezist kaldırdı. 10 ml developer, 40 ml su kullanılarak hazırlanan çözelti kullanıldı.

3.3.7. Metal kaplama

Bağlantı yollarının, kayıt ve bağlantı bölgelerinin oluşması için ilk olarak titanyum daha sonrada altın kaplandı. 1500 Å kalınlığında Titanyum kaplama işlemi altınin alttaşa daha iyi yapışması için yapıldı. Titanyum kaplama işlemi sputter yöntemi ile gerçekleştirildi. Daha sonrada aynı cihazda buharlaştırma yöntemi ile 500 Å kalınlığında altın kaplandı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Sputter cihazında önce titanyum daha sonrada altın kaplandıktan sonra silikon alttaşı

3.3.8. Lift-off

Metal kaplama aşamasından sonra aseton içine atarak istenmeyen bölgelerde altının kalkması sağlanır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Lift-off işleminden sonra silikon alttaş

3.4. Paketleme

Mikroelektrodun fabrikasyonu bittikten sonra in vitro ve in vivo deneylerde kullanılabilmesi için paketlenmesi gerekmektedir. Paketleme aşaması aşağıdaki adımlardan oluşmaktadır:

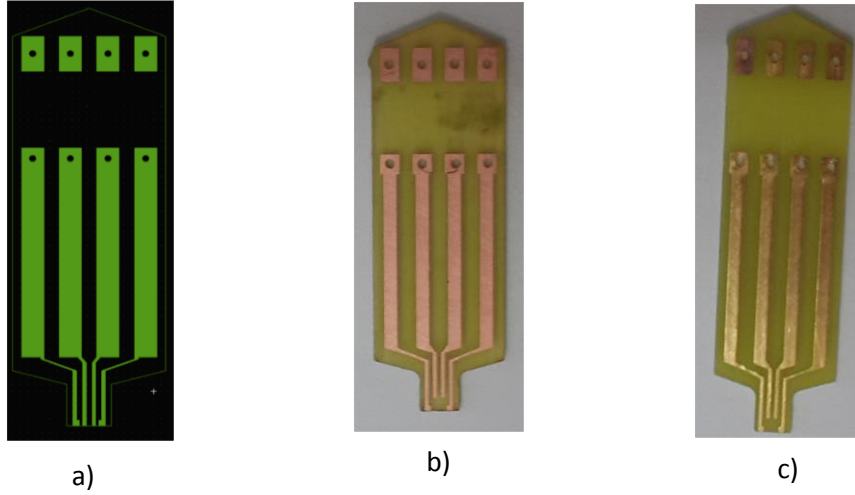
1. Kesilme: Paralel üretimle üretilen 30 adet mikroelektrot dilimleme cihazı ile ucu konik olacak şekilde kesildi (Şekil 3.13). Konik kesimin avantajı oldukça düzgün elektrot kenarları sağlamasından dolayı in vitro deneylerde beyin bölgesine daha az zarar vermesidir.



Şekil 3.13. Ucu konik olarak kesildikten sonra mikroelektrotlar

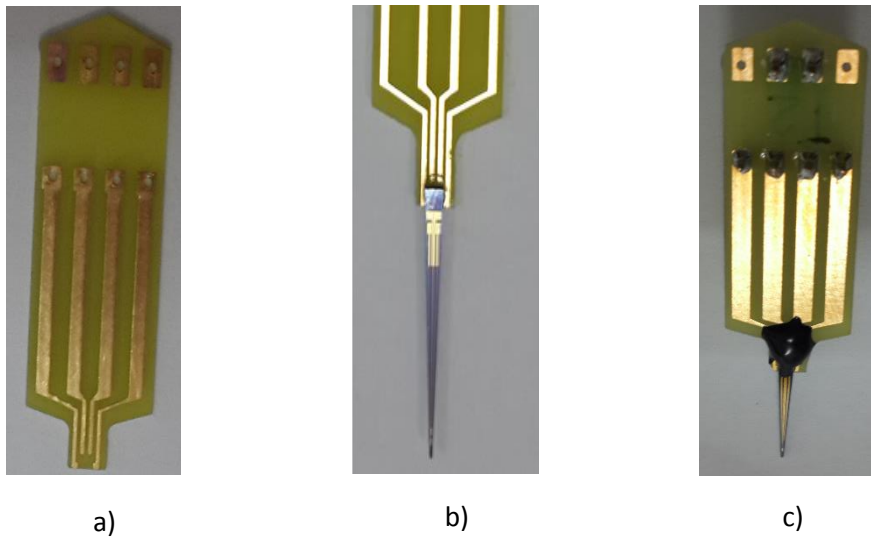
2. PCB'nin Üretilmesi: Üretilen elektrodun elle tutulabilmesi ve deney sistemine bağlanabilmesi için PCB ile birleştirildi. Silikon alttaş ile bağlantının yapılabilmesi için alttaş üzerinde bulunana bağlantı bölgelerinin karşısında karşısında PCB üzerinde

bulunan yollar ile wire bonding yapıldı. Yollar altın olduğu için wire bonding yapılırken altın tel kullanıldı.



Şekil 3.14. (a) PCB'nin maskesi, (b) üretilmiş olan PCB, (c) wire bonding için altın ile kaplanmış PCB

3. Epoxy: PCB ile mikroeletrod wire bonding ile birleştirildikten sonra bağlantı yerinin sağlamlaştırılması ve altın tellerin izole edilmesi için epoxy damlatıldı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. (a) PCB (b) PCB ile yapıştırılıp wire bond yapılmış elektrot (c) bağlantı yerini yalıtım ve sağlamlaştırmak için epoxy damlatılmış elektrot

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu kısımda fabrikasyon adımları anlatılan mikroelettrotun kalibrasyonu yapılıp hidrojen peroksite cevabı incelenmiştir.

4.1. Kayıt Sistemi

Sistem potansiyostat, mikroelettrot ve referans elettrot arasında elektrokimyasal kayıtların taşınabilmesi için potansiyel fark yaratır. Fast-16 sisteminin bir parçası elektrokimyasal sinyali yükseltir. FAST-16 sistemi (Şekil 4.1), kontrol kutusu ve bir A/D (Analogdan Dijitale Dönüştürücü) bilgisayar kartı elemanları yardımıyla, oksidasyon veya indirgenme reaksiyonlarının ürettiği elektrik akımını yükseltir ve bu akımı sayısallaştırır. Windows tabanlı FAST-16 sistem yazılımı, saniyede 1 kayıt veya daha hızlı şekilde veri dosyalarını kaydedebilir. Yazılım, yeni nesil mikroelettrotların artan kayıt noktalarının sayısına göre artırılabilen sekiz eş zamanlı kanal kaydına uygun yazılmıştır. FAST-16 göstergeleri, akım ve renk akım kayıtları, 40 Hz'e kadar olan kayıtları gösterebilir. Kaydedilen dosyalar diğer Windows tabanlı (Excel gibi) uygulamalarla da veri işlemeye imkan sağlar veya doğrudan veri işleme analiz programına aktarılabilir.



Şekil 4.1. FAST-16 sisteminin ön ve arka panel görüntüleri

*FAST-16 sistemi elektrokimyasal reaksiyon oluşturmak için referans elektrot ve çalışma elektrotu arasında potansiyel fark yaratır. A/D dönüştürücü saniyede 1.25 milyon örnekleme hızına sahiptir. Bu değer dijital çeviricinin giriş değerlerini dijital değerlere çevirme hızını göstermektedir (Day 2005).

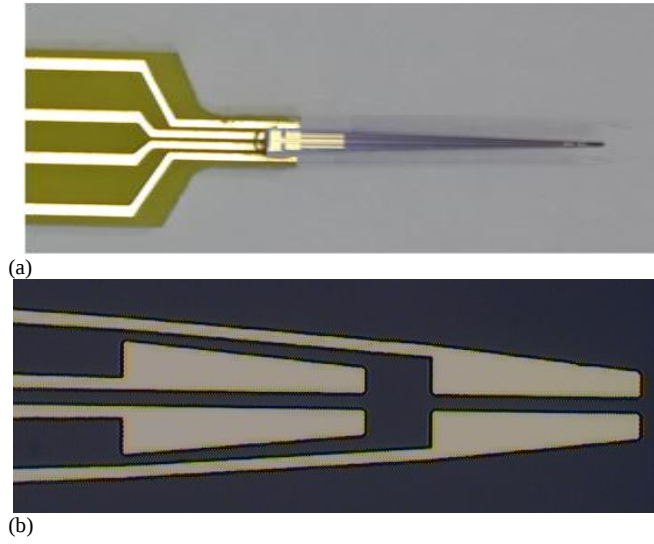
4.2. Ag/AgCl Referans Elektrot

Büyük cam Ag/AgCl referans elektrodu, m-fenil diamin elektropolimerizasyonu ve mikroeletrot kalibrasyonu için uygun olmasına rağmen birçok biyolojik uygulama için çok büyüktür. Bu yüzden daha küçük tel yapıda Ag/AgCl referans elektrodu her deneye başlarken hazırlanmalıdır. Minyatür Ag/AgCl referans elektrodu, gümüş telden teflon kaplamayla hazırlanır. Ucu FAST-16 ile ilişkilendirilir. Diğer ucu NaCl ile doyurulmuş 1 M HCl içine yerleştirilir. Bir platin kablo zıt elektrot olarak solüsyona sokulur. 9 volt adaptör kullanılır. Uygulanan potansiyel, kloru kabloya hareketlendirir ve AgCl oluşur. Elektrik potansiyeli yaklaşık 10–15 dakika uygulanır. Tam iletim sağlandığında, platin

zıt elektrodu çevresinde kabarcıklar görülür. Bu minyatür Ag/AgCl referans elektrotları in vivo kullanım öncesi 3 M NaCl içine sokulur.

4.3. Test

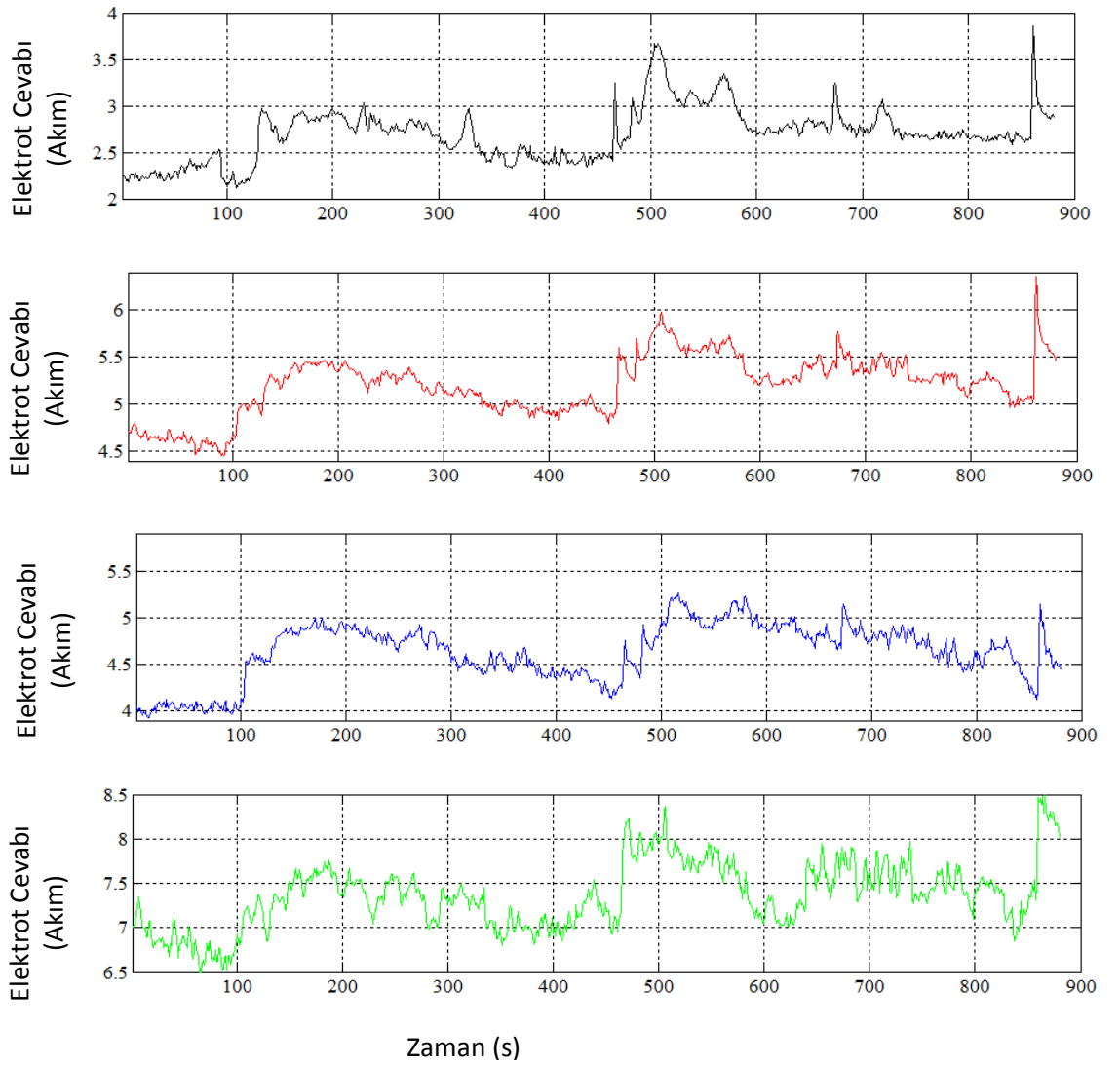
Testi yapılan mikroelettrot ve kayıt alanlarının mikroskop görüntüsü Şekil 4.2’de gözükmemektedir.



Şekil 4.2. (a) Silikon tabanlı mikroelettrot, (b) büyütölmüş kayıt bölgeleri

Teste başlamadan önce 200 cc damıtılmış su ve fosfat tamponlu tuz (PBS) ile çözelti hazırlanır. Daha sonra FAST-16 başlangıç bilgileri girilir ve mikroelettrot kayıt bölgesine +0.7 Volt akım uygulanır. Kalibrasyona başladıktan sonra akımın sabit bir taban seviyeye ulaşması beklenir (10–15 dakika ya da daha uzun). Sabit baseline oluştuğundan sonra bilgisayarda baseline tuşuna basılır. İn vitro test için 8.8 μmol peroksit 100 ve 450 s zaman aralıklarında çözeltiye ilave edilip peroksite karşı cevabı incelenmiştir. Kalibrasyon esnasında FAST-16 kayıt sistemi, eğrinin eğimini (analit için mikroelettrodun duyarlılığını), tespit limitini (TL) ve çizgiselliğini (R^2) otomatik olarak hesaplar.

Şekil 4.3'de peroksit için elektrot tepkisi gösterilmiştir. Her kayıt bölgesinin doğrusallığı (R^2) Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Sensörün 4 kayıt bölgesi solüsyona peroksit eklendiğinde basamak şeklinde tepki vermiştir. Bu sonuç sensörün uyarılara karşı hızlı ve doğru tepki verdiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Zamana karşı elektrot cevabı

Mikroelektrodun beyin içindeki enzimleri algılamasında kullanılabilmesi için doğrusallığın (R^2) yaklaşık olarak 1 değerinde olması istenmektedir.

Çizelge 4.1. Her kayıt bölgesinin doğrusallığı (R^2)

	Kayıt alanı-1	Kayıt alanı-2	Kayıt alanı-3	Kayıt alanı-4
R^2	0.93±0.05	0.94±0.04	0.85±0.1	0.95±0.01

5. SONUÇ

Günümüzde beynin fonksiyonlarını anlamak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır ve günümüzde yapılan bilimsel çalışmaların en popüler olanlarından biridir. Beyin ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan araçlardan birisi biyosensörlerdir. Bu alanda yapılan çalışmalar henüz bilimsel sürecin tamamlanmayıp teknolojiye aktarılmadığını ve bu alanda yeni çalışmalar yapılarak kaliteli mikroelektrot üretilmesi gerektiğini göstermektedir.

Ülkemizde mikroelektrot fabrikasyonu konusunda bilgimize göre şu ana kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu tezde ülkemizde ilk kez mikroelektrot fabrikasyonu yapılarak bu mikroelektrotların tıbbi uygulamalar için kullanılabilmesi durumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 4 kanallı mikroelektrotların fabrikasyonu tasarlanmış, mikroelektrot fabrikasyonu, paketlenmesi ve mikroelektrotların fonksiyonelliği test edilmiştir. Beyin içindeki hastalıkların etkin maddesi olarak bulunan çeşitli enzimlerin algılanmasında kullanılan mikroelektrodun fabrikasyonu için ince film teknolojisi kullanılmıştır. Yalıtkan alttaş olarak silisyum kullanılmıştır. Laboratuvarımızda bulunan silisyumun öz direnci iletkenlik bölgesinde olduğu için silisyum üzerine silisyum oksit tabakası oluşturularak yüzeyin yalıtkanlığı sağlanmıştır. Daha sonra bu alttaş üzerine iletken metal ince film tabakası kaplanmıştır. L-edit programı yardımıyla tasarımı yapılan maske tez metninde anlatılan litografi yöntemiyle mikroelektrotlar gerçekleştirilmiştir. Mikroelektrotların kullanılır hale getirilmesi için paketlenme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada önce mikroelektrotlar tasarımı yine L-edit programında yapılan PCB üzerine iletken yollar yapılmış ve PCB ile mikroelektrotlar üzerindeki akım taşıma yolları wire bonding ile altın tellerle birbirine bağlanmıştır. Hazırlanan elektrotlar için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesinde bulunan Farmakoloji Araştırma Laboratuvarında test edilmiştir. Testler sonucunda hazırlanan mikroelektrotların önemli bir çoğunluğunun fonksiyonel olduğu ancak bazı elektrotların hedeflenen değerleri yakalayamadığı gözlenmiştir. Örneğin silisyum alttaştan yapılan mikroelektrotların cevap süresinin beklenen süreden daha uzun olduğu görülmüştür. Silisyum alttaşlar tamamen yalıtkan olmadığından alttaşı yalıtkan hale

getirmek için yüzey oksitlenmiştir. Silisyum oksit tabakası yüzeyde oluşmakta derine inmemektedir. Silisyum oksit tabakası üzerine metal yollara kaplanarak mikro elektrot elde edildiğinde yapı silisyum/silisyum oksit/metal (iletken/yalıtkan/iletken) şeklinde olmaktadır ve bu bir kondansatör yapısına benzemektedir Dolayısıyla bu yapılarda oluşan mikroeletrotların kapasite etki göstermesi beklenmektedir. Cevap süresinin beklenenden daha uzun olması bu yapının kapasitif etki göstermesine bağlanmaktadır. Mikroeletrotlarda önemli sorunlardan biri elektrot yollarının çevre ve birbirleriyle etkileşerek gürültü oluşturmalarıdır. Bu etkiyi azaltarak minimuma indirmek için elektrot yollarının yüzeyi yalıtkan ince bir tabakayla kaplanmaktadır. Böylece yalıtkan/iletken/yalıtkan yapılar elde edilmektedir. Bu çalışmada ise bu amaçla kullanılan polyimide temin edilemediğinden alttaş üzerindeki iletken yollar uygun yalıtkan malzeme ile kaplanamamıştır.

Testler sonucunda elde edilen zamana karşı elektrot cevabını göstere grafiklerden (Şekil 4.3) görüleceği üzere üretilen 4 kanallı elektrotların her bir kanalı H_2O_2 değişimine anında tepki vermiş ve H_2O_2 konsantrasyonu ile cevap değerlerinde değişimler olmuştur. Ayrıca üretilen elektrotların doğrusallık değerleri de 1 e yakındır. Bu sonuçlar üretilen elektrotların tıbbi uygulamalar ve araştırma çalışmaları için kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan üretilen elektrotların iyileştirilme potansiyeli vardır. Bundan sonraki çalışmalarımızda duyarlılığı, seçiciliği, cevap süresi, LOD değeri gibi parametreleri daha iyi elektrotlar elde etmek için nanaoyapıların da kullanıldığı yeni elektrot tasarımları yapılacaktır. Ülkemizde bu alanda ilk olan bu tezin sonuçlarının yeni tez, proje ve araştırtmalara katkı sunacağı beklenmektedir

KAYNAKLAR

- Borland, L., 2005. Improving the accuracy of chemical measurements in the brain: new insights into dopaminergic mechanisms by fast-scan cyclic voltammetry and microdialysis. Retrieved from <http://core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/12209250.pdf>
- Burmeister, J. J., Gerhardt, G. A., 2001. Self-referencing ceramic-based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes. *Analytical Chemistry*, 73, 1037–1042. doi:10.1021/ac0010429
- Burmeister, J. J., Moxon, K., Gerhardt, G. A., 2000. Ceramic-based multisite microelectrodes for electrochemical recordings. *Analytical Chemistry*, 72, 187–192. doi:10.1021/ac9907991
- Burmeister, J. J., Palmer, M., Gerhardt, G. A., 2003. Ceramic-based multisite microelectrode array for rapid choline measures in brain tissue. *Analytica Chimica Acta*, 481(1), 65–74. doi:10.1016/S0003-2670(03)00067-9
- Burmeister, J. J., Pomerleau, F., Palmer, M., Day, B. K., Huettl, P., Gerhardt, G. A., 2002. Improved ceramic-based multisite microelectrode for rapid measurements of l-glutamate in the CNS. *Journal of Neuroscience Methods*, 119(2), 163–171. doi:10.1016/S0165-0270(02)00172-3
- Cheung, K. C., Djupsund, K., Dan, Y., Lee, L. P., 2003. Implantable multichannel electrode array based on SOI technology. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 12, 179–184. doi:10.1109/JMEMS.2003.809962
- Cui, J., Kulagina, N. V, Michael, A. C., 2001. Pharmacological evidence for the selectivity of in vivo signals obtained with enzyme-based electrochemical sensors. *Journal of Neuroscience Methods*, 104(2), 183–189. doi:10.1016/S0165-0270(00)00343-5
- Day, B., 2005. Microelectrode Array Studies of Normal and Disease-Altered L-Glutamate Regulation in The Mammalian Central Nervous System, University of Kentucky Doctoral Dissertations. Retrieved from http://uknowledge.uky.edu/gradschool_diss/235
- Frey, O., Holtzman, T., Mcnamara, R. M., Theobald, D. E. H., van der Wal, P. D., de Rooij, N. F., Koudelka-Hep, M., 2010. Enzyme-based choline and l-glutamate biosensor electrodes on silicon microprobe arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 477–484. doi:10.1016/j.bios.2010.07.073
- Gerhardt, G. A., Oke, A. F., Nagy, G., Moghaddam, B., Adams, R. N., 1984. Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Research*, 290(2), 390–395. doi:10.1016/0006-8993(84)90963-6
- Gonon, F. G., Navarre, F., Buda, M. J., 1984. In vivo monitoring of dopamine release in the rat brain with differential normal pulse voltammetry. *Analytical Chemistry*, 56(3), 573–575. doi:10.1021/ac00267a060

- Hascup, K.N., Rutherford, E.C., Quintero, J.E., Day, B.K., Nickell, J.R., Pomerleau, F., Huettl, P., Burmeister, J.J., Gerhardt, G.A., 2007. Second-by-Second Measures of L-Glutamate and Other Neurotransmitters Using Enzyme-Based Microelectrode Arrays. CRC Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2567/>
- Hacımuftuoğlu, A., 2008. Nörofarmakolojide in Vivo Voltametri ile L-glutamat ve Diğer Nörotransmitterlerin Ölçüm Teknikleri. 15. Farmakoloji Eğitim Semineri, Erzurum.
- Heller, A., 1992. Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(9), 3579–3587. doi:10.1021/j100188a007
- Herwik, S., Kisban, S., Aarts, A. A. A., Seidl, K., Girardeau, G., Benchenane, K., Ruther, P. 2009. Fabrication technology for silicon-based microprobe arrays used in acute and sub-chronic neural recording. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19(7), 074008. doi:10.1088/0960-1317/19/7/074008
- Kulagina, N. V., Michael, A. C., 2003. Monitoring Hydrogen Peroxide in the Extracellular Space of the Brain with Amperometric Microsensors. *Analytical Chemistry*, 75(18), 4875–4881. doi:10.1021/ac034573g
- Kulagina, N. V., Shankar, L., Michael, A. C., 1999. Monitoring Glutamate and Ascorbate in the Extracellular Space of Brain Tissue with Electrochemical Microsensors. *Analytical Chemistry*, 71(22), 5093–5100. doi:10.1021/ac990636c
- Marton, G., Fekete, Z., Fiath, R., Baracskey, P., Ulbert, I., Juhasz, G., Pongracz, A., 2013. In Vivo Measurements With Robust Silicon-Based Multielectrode Arrays With Extreme Shaft Lengths. *IEEE Sensors Journal*, 13(9), 3263–3269. doi:10.1109/JSEN.2013.2260325
- Musallam, S., Hajj-Hassan, M., Chodavarapu, V. P., 2009. Microfabrication of ultra-long reinforced silicon neural electrodes. *Micro & Nano Letters*, 4(1), 53–58. doi:10.1049/mnl:20090007
- Norlin, P., Kindlundh, M., Mouroux, A., Yoshida, K., & Hofmann, U. G. 2002. A 32-site neural recording probe fabricated by DRIE of SOI substrates. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 12(4), 414–419. doi:10.1088/0960-1317/12/4/312
- Yoon, T.H., Hwang, E.J., Shin, D.Y., Park, S.I., Oh, S.J., Jung, S.C., Kim, S.J., 2000. A micromachined silicon depth probe for multichannel neural recording. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 47, 1082–1087. doi:10.1109/10.855936
- Yu, H., Zheng, N., Wang, W., Wang, S., Zheng, X., Li, Z., 2013. Electroplated Nickel Multielectrode Microprobes With Flexible Parylene Cable for Neural Recording and Stimulation. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 22(5), 1199–1206. doi:10.1109/JMEMS.2013.2262591

ÖZGEÇMİŞ

Merve ACAR 1990 yılında Erzurum’da doğdu. İlk ve Orta öğretimini Özel Güneş İlköğretim okulunda okudu. Erzurum Anadolu Lisesi'nde lise eğitimini tamamladı. 2008-2012 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Elektrik&Elektronik Mühendisliği ve Makine Mühendisliği bölümünde lisans derecesini aldı. Mezuniyetinin ardından 2012 yılında Atatürk Üniversitesinde yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği araştırma görevlisi olarak göreve başladı ve halen bu görevi sürdürmektedir.