



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HASTALIK TANISI İÇİN POLİMER TABANLI
MİKROÇİPLERDE PROTEİN TAYİNİ**

Ecem SAYGILI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 10.01.2018

Bornova-İZMİR

2018

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

HASTALIK TANISI İÇİN POLİMER TABANLI
MİKROÇİPLERDE PROTEİN TAYİNİ

Ecem SAYGILI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 10.01.2018

Bornova-İZMİR

2018



Ecem SAYGILI tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Hastalık Tanısı İçin Polimer Tabanlı Mikroçiplerde Protein Tayini**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10.01.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

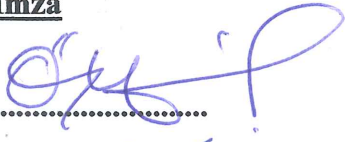
Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Raportör Üye: Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Üye : Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR

İmza


.....

.....

.....



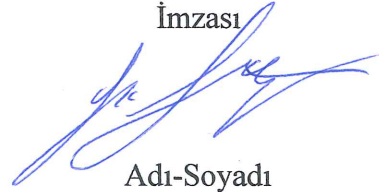
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Hastalık Tanısı İçin Polimer Tabanlı Mikroçiplerde Protein Tayini**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10. / 01. / 2018

İmzası



Adı-Soyadı

Ecem SAYGILI



ÖZET**HASTALIK TANISI İÇİN POLİMER TABANLI
MİKROÇİPLERDE PROTEİN TAYİNİ**

SAYGILI, Ecem

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Ocak 2018, 57 sayfa

Protein yapılı olan enzimler tüm organizmaların biyolojik sistemlerinde önemli bir yere sahiptirler. Biyolojik mekanizmalarla ilişkili protein aktivitesini daha iyi anlayabilmek için yapılan proteomik araştırmalar, proteinlerin karakteristik özelliklerine odaklanmıştır. Çeşitli hastalıklar bazı proteinlerin kanda yüksek miktarda bulunması veya hiç bulunmamasına neden olabilmektedir. Bu durum, proteinlerin belirli patolojik rahatsızlıkların erken teşhisinde kullanılabilirliklerinin de bir göstergesidir. Bu nedenle çalışmalar yoğun olarak proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri ve analizlerine dayanmaktadır. Mikroakışkan teknolojilerinden biri olan çip üstü laboratuvar (çip-üstü-lab) sistemler, minyatürize edilmiş ve paralelleştirilmiş eş zamanlı reaksiyonların önünü açmaktadır. Bu sistemlerin duyarlılığı yüksek ve reaktif tüketimi oldukça kısıtlıdır. Mikroakışkan cihazlar hem kimyasal hem de biyolojik prosesler için oldukça önemli bir teknolojidir. Çip-üstü-lab sistemleri, konvansiyonel platformlara kıyasla hızlı ısı ve kütle transferi, daha yüksek reaksiyon verimleri ve reaksiyon hızları sağlamaktadır. Bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda, çip-üstü-lab sistemlerinin hem serbest hem de immobilize enzimlerle biyokatalitik alanda da uygulamalarına yönelik çalışmalar artmaktadır. Bir hastalığın tanısı için tek bir enzim yerine çoklu enzim tayininin yapılması önem kazanmaktadır.

Bu proje kapsamında çeşitli hastalıklar için belirteç olarak kullanılan karaciğer enzimlerinin mikrosistemlere adaptasyonları hedeflenmiştir. Karaciğer enzimlerinin daha pratik ve ucuz yollarla test edilebilmesi için çoklu tayin gerçekleştirebilecek bir mikrosistem tasarımı yapılmış ve simüle vücut sıvısında

ki karaciğer enzimlerinin bu sistemde ki reaksiyon ortamları optimize edilmiştir. Bu çalışmanın sonunda tasarımı yapılan mikrosistemde elde edilecek verilerin karaciğer enzimlerinin tayini için bir hasta başı tanı kiti oluşturulmasında ilk adımı tamamlaması hedeflenmiştir

.

Anahtar Sözcükler: Mikroakışkan sistem, çip-üstü-lab, protein, enzim, karaciğer.



ABSTRACT**PROTEIN ANALYSIS IN POLYMER BASED MICROFLUIDIC
CHIPS FOR DIAGNOSTIC PURPOSES**

SAYGILI, Ecem

MSc in Bioengineering.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ozlem YESIL CELIKTAS

Jan 2018, 57 pages

Enzymes are mainly globular proteins, having significant roles in the biological systems of all living organisms. The high concentration or absence of proteins in blood can further be used in diagnosis of a particular pathology at an early stage. Current studies are intensely based on the analysis of interaction and detection of proteins. Lab-on-a-chip (LOC) systems with high sensitivity and limited reagent consumption allow miniaturized and parallelized reactions simultaneously. In comparison to the conventional platforms, higher reaction yields and rates, rapid heat exchange as well as mass transfer can be obtained in microfluidic systems due to their micro-dimensions. As a result of these advantages, the use of LOC is increasing in the field of biocatalysis by using both free and immobilized enzymes. Incorporation of multiple enzymes on a microfluidic platform instead of a single enzyme is getting more important for diagnosis of a diseases. Thus, the aim of this study was to adapt liver enzymes to the LOC systems to enhance more practical and affordable enzyme tests. Therefore, polymer, glass and paper based microplatforms were designed, developed, and compared to find out the best platform to detect enzyme levels in body fluid samples. Spectroscopic analysis, electrical measurement and qualitative color analysis were used as detection methods. The most significant results were obtained through the spectroscopic analysis. The latter method was qualitative color detection and it was observed that with the descending concentration of enzyme, the color shade was changing as well. In regards to the electrical sensing model, it is concluded that

the designed electrode system which requires more complex structure and optimization parameters, was not applicable for this study.

Keywords : Microfluidic system, lab-on-a-chip, protein, enzyme, liver



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerinden çokça faydalandığım kıymetli hocam Doç Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ' a,

Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Biomimetics Microtechnologies Laboratuvarı çalışanlarına,

Bu çalışmayı “Hastalık Tanısı İçin Polimer Tabanlı Mikroçiplerde Protein Tayini” projesi kapsamında maddi olarak destekleyen Ege Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)' e,

Her zaman yanımda olan ve benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1 Mikroakışkan Sistemler	2
2.1.1. Mikroakışkan Sistemlerin Genel Özellikleri.....	3
2.1.2 Mikrosistem üretim yöntemleri.....	4
2.1.3 Mikroakışkan sistemlerin reolojisi.....	6
2.1.4 Malzeme seçimi.....	6
2.2 Aminotransferaz Enzimlerinin Tanı Kitlerinde Kullanımları.....	8
2.2.1 Aspartat Aminotransferaz Enzimi.....	9

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.2 Alanin Aminotransferaz Enzimi.....	9
2.3 Literatürde Yer Alan Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1 Mikroplatform Tasarımı.....	15
3.2 Mikrofabrikasyon.....	15
3.2.1 Lazer kesici ile kağıt tabanlı mikroçiplerin oluşturulması	15
3.2.2. Üç boyutlu yazıcı ile polimer tabanlı mikroçip kalıp basımı.....	17
3.2.2.1 PDMS hazırlık aşaması.....	18
3.3 Polimer Tabanlı Mikroçiplerde Reaksiyon Analizi.....	19
3.3.1 Spektrofotometre ölçümü.....	20
3.3.2 Mikroplaka okuyucu ölçümü.....	20
3.3.3 Nanodrop ölçümü.....	21
3.4 Kağıt Tabanlı Mikroçiplerde Reaksiyon Analizi.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	24
4.1 Tasarım.....	24
4.2 Mikrofabrikasyon Ürünleri.....	27
4.2.1 Lazer kesimi sonucu elde edilen çipler.....	27

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.2.2 Üç boyutlu yazıcı ile elde edilen kalıplar.....	28
4.3 Polimer Tabanlı Mikroçiplerin Analiz Sonuçları.....	30
4.4 Kağıt Tabanlı Mikroçiplerin Analiz Sonuçları.....	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 MEMs teknolojisi ile üretilen mikroçip örneği.....	2
2.2. PDMS tabanlı üretilen mikroçip örneği	3
3.2.1. Kağıt tabanlı mikroçiplerin eldesi için kullanılan lazer kesici (VLS2.30 system Universal Laser).....	16
3.2.2 Çalışmada kullanılan üç boyutlu yazıcılar	18
3.2.3 3 Boyutlu üretimden PDMS mikroçip oluşumuna kadar olan süreç	19
3.3.4 Spektrofotometrik ve nanodrop ölçümleri için kullanılan Nanodrop 200c.....	22
4.1.1 Autocad ile çizilen iskelet görüntüsü	25
4.1.2 Spiral şekilli çipin basım öncesi üç boyutlu görüntüsü.....	25
4.1.3 Solidworks kullanılarak çizilen çift giriş ve tek çıkışa sahip girintili “S” şekilli kanal dizaynı	26
4.1.4 Solidworks programı ile çizilen alternatif girintili “S” şekilli kanal dizaynı.....	27
4.2.1. Kağıt tabanlı çift hazneli mikroçip.....	27
4.2.2. PLA tabanlı üretilen (a) tabanlı spiral kalıp; (b) tabansız spiral kalıp	30
4.2.3 ABS polimeri ile üretilen kalın PDMS içerisinde eritilmesi süreci	30
4.3.1 ALT enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.3.2 AST enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri	33
4.3.3 ALT enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri	35
4.3.4 AST enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri	36
4.3.5 ALT enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri	38
4.3.6 AST enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri	39
4.4.1 Kağıt tabanlı mikroçipin ilk dairesel kanalına ait spektrometrik analiz	41
4.4.2 Kağıt tabanlı mikroçipin ikinci dairesel kanalına ait spektrometrik analiz	41
4.4.3 Farklı konsantrasyonlardaki PBS'lere ait empedans değişimleri	42
4.4.7 Farklı aktivite değerlerindeki ALT ve AST enzimlerin verdikleri reaksiyon sonuçlarının kalitatif analizleri.	47
4.4.8 ALT ve AST enzimlerinin farklı aktivite değerlerine bağlı olarak elde edilen renk değişim skalası	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

2.1. Karaciğer enzimlerinin klinik biyokimya analizlerinde indikatör olarak kullanıldıkları hastalık örnekleri.....	13
3.1. Optimum sonuç alınan süre ve akış hızları.....	21
4.1. Spektrofotometre ölçümlenen ALT enziminin çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri.....	32
4.2 Spektrofotometre ölçümlenen AST enziminin çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri.....	34
1.3. Mikroplaka okuyucu ile ölçümlenen ALT enzime çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri.....	35
4.4. Mikroplaka okuyucu ile ölçümlenen AST enzime çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri.....	36
4.5. Nanodrop ile ölçümlenen ALT enzime çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri.....	38
4.6. Nanodrop ile ölçümlenen AST enzime çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
3B	3 Boyutlu





1. GİRİŞ

Günümüzde proteomik araştırmalar, vücut sıvılarındaki miktarlarına göre hastalık belirteci olma özelliği gösteren proteinlerin aktivite ve karakteristik özelliklerini daha iyi anlayabilmek üzerine yoğunlaşmaktadır. Proteinlerin vücut sıvılarındaki mevcudiyetlerinin normal değerlerin üzerinde veya altında olması, patolojik bir rahatsızlık veya enfeksiyon varlığının göstergesi olarak kabul edilmekte olup erken teşhisleri tedavi sürecinin başlamasını ve daha etkin olmasını sağlamaktadır.

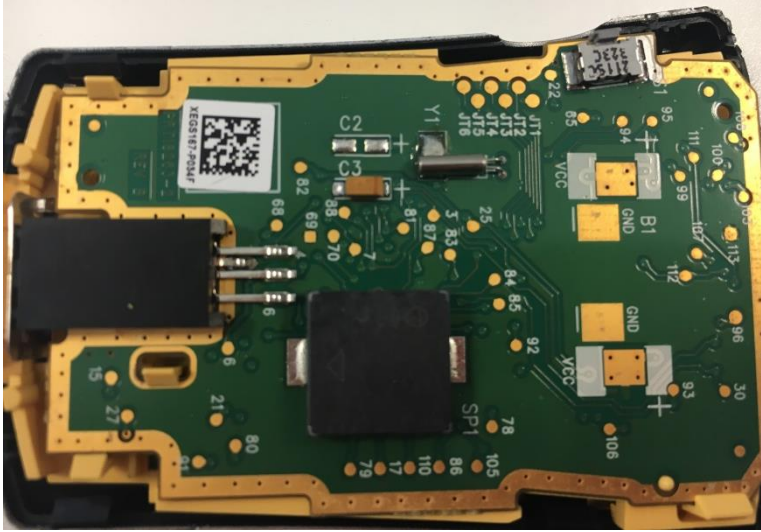
Son yıllarda mikroakışkan cihazların hızla makroskopik muadilleri yerine geçtiği görülmektedir. Özellikle maliyeti yüksek olan reaktif ve analit miktarlarına olan ihtiyacı düşürmesi, bu tarz sistemlerin biyomedikal araştırma ve klinik uygulamalarda kullanımlarının önünü açmaktadır. Mikroakışkan sistemler, güncel olarak PCR uygulamaları, ELISA benzeri sistemlerle hastalık tanılarında biyolojik belirteç deneyleri, gaz kromatografi sistemleri ve biyomedikal analizler sırasında genellikle tek kullanımlık olarak üretilen sistemler olup, yüksek güvenlik önlemleri gerektiren cihazların üretim maliyetlerini düşürebilecek alternatif sistemler olarak görülmektedir.

Bu çalışma ile karaciğer enzimlerinin klinikteki uygulamalara paralel olarak hastaların kendilerine uygulayabilecekleri, merkez laboratuvarlardan bağımsız, pratik ve ekonomik testler geliştirmek amaçlanmıştır. Bu nedenle kan serum örneklerindeki seviyelerini tespit etmek için en uygun platformu bulmak hedeflenmiş, polimer, cam ve kağıt bazlı mikroplatformlar tasarlanmış, geliştirilmiş ve farklı ölçüm metodları kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mikroakışkan Sistemler

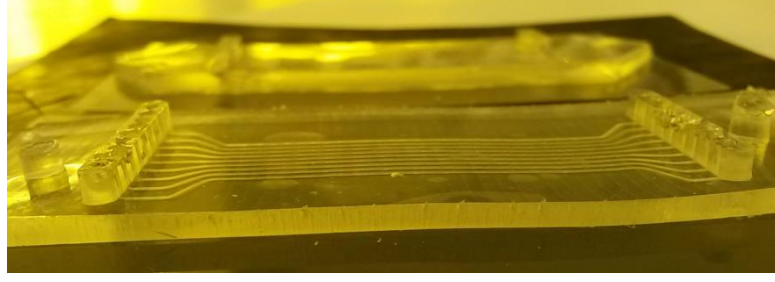
Başlangıç noktası 1950'lere dayanan mikroakışkan sistemler, temelini kartuşlu yazıcılardan almaktadır. Günümüzde yaygın kullanıma sahip olan mürekkep kartuşlu yazıcılarla, mikroakışkan prensiplere dayalı olarak küçük test tüpleri içerisindeki mürekkeplerin kağıt taban üzerine milimetrik düzen içerisinde aktarılmasını hedeflemiştir. Dolayısıyla 'inkjet' mürekkepli yazıcıların ilk mikroakışkan sistemler oldukları kabul edilmektedir. 1950 ve 1960'lı yıllar arasında bilgisayar tabanlı işlemciler ve yarı iletken transistörlerin yanı sıra fotolitografinin de keşfi ile silikon tabanlı mikroişlemciler geliştirilmeye başlanmıştır. Benzer şekilde 1970'lerde gaz kromotografi sistemleri silikon plakalar üzerinde denenmeye başlanmış ve ilk mikroakışkan temelli çipler tasarlanmaya başlanmıştır. Bu gelişmeyi takiben, 1980'ler MEMS (mikro-elektro mekanik sistemler) teknolojilerinin geliştirilmeye başlandığı tarihler olarak bilinmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1 MEMs teknolojisi ile üretilen mikroçip örneği

80'li yılların sonunda ise mikrokanallar içerisindeki akışkan kontrollerinin sağlanabilmesi için silikon tabanlı mikrosistem elemanlarından mikrovana ve mikropompalar geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda mikro-karıştırıcılar, mikro-ayrıştırıcılar ve mikro-analizörler mikrosistem elemanları kategorisindeki yerlerini almıştır. 2000'li yıllar itibari ile polidimetilsiloksan (PDMS) ve

polimetilmetakrilat (PMMA) polimer tabanlı mikroçiplerin üretimleri ile MEMS teknolojilerinin geliştirilmeleri paralel olarak devam ettirilmektedir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. PDMS tabanlı üretilen mikroçip örneği

2.1.1. Mikroakışkan Sistemlerin Genel Özellikleri

Sürekli gelişme gösteren bir teknoloji olan mikroakışkan sistemler fizik, kimya, biyoloji gibi temel bilimlerin yanı sıra ilaç salınım teknolojileri, biyomedikal araştırmalar, doku mühendisliği ve gelinen son noktada çip-üstü-organ sistemleri üzerine yoğunlaşmıştır. Düşük miktardaki sıvı ihtiyaçları, yüksek yüzey alanı/hacim oranları, mikrokanallardaki akışkanların reolojileri ve kanalların fiziksel özellikleri göz önünde bulundurulduğunda çip-üstü sistemlerin oluşturulmasında en iyi alternatif sistemler olarak bilinmektedirler.

Mikroakışkan sistemler genellikle mikrovana, mikropompa, mikroseperatör ve mikrokarıştırmacı gibi pek çok sistem elemanının bir araya getirilmesiyle oluşturulmaktadır. Sahip oldukları mikrokanallar içerisine akışkanların bir şırınga pompa (Şekil 2.2.1.) yardımıyla verildiği bu sistemler küçük boyutları sayesinde temel özellikler taşımaktadırlar;

- Yüksek ısı transfer özellikleri
- Düşük difüzyon süresi (Yüksek difüzyon kapasitesi)
- Düşük madde miktarına karşılık düşük maliyet
- Yüksek ölçek büyütme kapasitesi



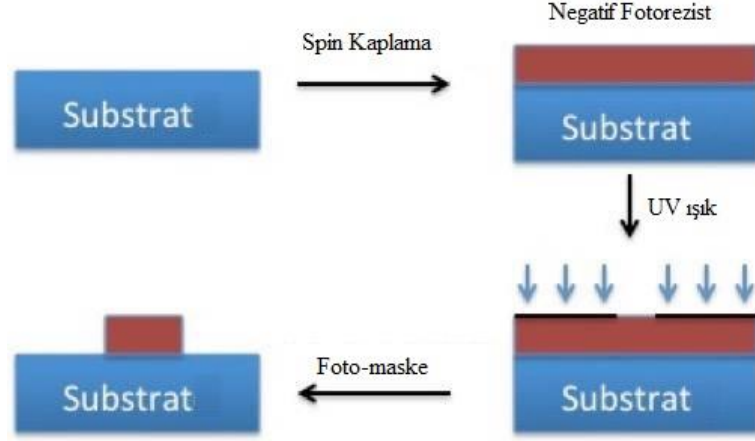
Şekil 2.1.1. Akışkanların sisteme yüklenmesinde kullanılan şırınga pompa

2.1.2 Mikrosistem üretim yöntemleri

Mikroakışkan sistemlerin uygulama alanları ve malzeme seçimlerine dayalı olarak farklı üretim teknikleri bulunmaktadır. Fotolitografi, yumuşak litografi, ısıyla şekillendirme ve gravür teknikleri örnek üretim yöntemleri arasındadır. Üretim yöntemini belirleyebilmek için malzeme seçimi, mevcut ekipman, maliyeti ve operasyon süresi dikkate alınan unsurlardandır.

- **Fotolitografi**

İstenilen mikrodeseenin, ışığa duyarlı özel kimyasal polimerler olan istenilen kalınlıktaki fotorezist malzemeler üzerine uygulanan UV ışık yardımıyla aktarıldığı üretim basamağıdır (Şekil 2.2.2.). Kalıplama tekniği gerektiren PDMS türevli mikroakışkan sistemlerin veya kimyasal aşındırma yöntemlerinin ön basamağı olarak kullanılan fotolitografi uygulaması temiz oda şartları gerektiren ve maliyeti yüksek olan üretim yöntemleri arasındadır (Bhatia ve Ingber, 2014; Xiao ve ark., 2014.)



Şekil 2.2.2. Fotolitografik üretim basamakları

- **Aşındırma tekniği**

Kuru ve ıslak aşındırma çeşitleri bulunan aşındırma tekniği, ilk basamağı fotolitografiden oluşan ve temiz oda gerektiren bir mikro-üretim tekniğidir. Aşındırma teknikleri ile, fotolitografi uygulaması ardından plazma veya sıvı kimyasallar kullanılarak silikon, cam, kuartz vb. malzemeler üzerinde yanal ve dikey boşluklar açılmaktadır (). Daha sonra yüzeyin pürüzsüz hale gelebilmesi için farklı kimyasallarla optimizasyon sağlanarak aşındırılan yüzeylerin üzerleri yine cam, silikon veya PDMS benzeri polimerlerle kapatılarak mikrokanallar oluşturulur. Bu üretim yöntemi, temiz oda ve fotolitografi gibi maliyeti yüksek olan cihaz kullanımları gerektirmektedir (Quero ve ark., 2014).

- **Üç boyutlu (3B) yazıcı kullanımı**

Bir mikoreaktör sistemini kütle spektrometresine benzeten Helsinki Üniversitesi Eczacılık Fakültesi araştırmacılarından Dr. Gianmario Scotti, kütle spektrometre cihazının ucundaki iğneyi 3B yazıcılarda kullanılan nozzle, ve örnek haznelerini de mikoreaktör kanallarına benzeterek tüm bir mikoreaktörün bu tarz bir sistemle üretilebileceğini öne sürmüştür. İlk denemelerini metal alaşımlarla gerçekleştiren çalışma grubu, 3B üretim metodunu maliyeti düşürmek amacıyla plastik malzemelerle kullanmaya başlamıştır. Literatürde 3B yazıcıların mikroakışkan sistemlerin üretiminde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu üretim yönteminde kullanılacak olan kalıbın veya tüm bir sistemin malzemesi filament

halinde nozzle uçlarına yerleştirilip, nozzle ve cihaz tablasının sıcaklıkları ayarlanarak uygun software ile basımları sağlanmaktadır (Capel ve ark., 2013; Saggiomo ve ark., 2013; Iseri ve ark., 2014). Bu yöntem, herhangi bir temiz oda veya fotolitografi uygulaması gerektirmemesi ve pratik olması nedeniyle tercih edilebilir üretim metodları arasında yer almaktadır.

2.1.3 Mikroakışkan sistemlerin reolojisi

Mikroakışkan sistemlerin sahip oldukları akış proflinin laminar düzene sahip olması, düşük Reynold değerine sahip olmalarıyla açıklanmaktadır. Kanal içerisindeki karışmada negatif rol oynayan bu özellik, mikrokanallar içerisindeki akışkanların kontrol edilebilirlikleri açısından oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Viskoz bir sıvının Naver-Stokes denklemi ile açıklandığında aşağıdaki denklem karşımıza çıkmaktadır ;

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right) = \mathbf{f}_{\text{ext}} - \nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{v},$$

Yukarıda belirtilen denklemden hareketle, ρ akışkan yoğunluğu, $\mathbf{v}$ akışkan hızı, $\mathbf{f}_{\text{ext}}$ akışkan üzerindeki dış güç, P akışkan basıncı ve μ kinematik viskozite olarak bilinmektedir. Birimi olmayan Reynold sayısına ait denklem ise;

$$Re \equiv \frac{\vartheta L}{\mu}$$

Reynold'a ait formülde yer alan $\mathbf{v}$ akışkanın karakteristik hızı, L ise kanalın karakteristik geometrisini yansıtmaktadır.

Mikro ölçekteki akışkan, makro ölçekteki akışkana göre avantajlı olduğu bilinmektedir. Düşük miktardaki akışkanın sahip olduğu akış profili, akışkanın içerisinde bulunduğu mikroçevre ile bağıntılı olup, sahip olduğu Reynold değeri $<10^2$ olarak kabul edilmektedir (Hessel ve ark., 2004).

2.1.4 Malzeme seçimi

Mikroakışkan tabanlı cihazların ilk örneklerinde temel malzemeler olarak silikon ve cam materyallerin kullanılmasına karşılık, 90'lı yılların sonlarına doğru mikroakışkanların üretim yöntemlerinde çeşitliğe gidilmiş ve kullanılan

malzemeler uygulama alanlarına göre çeşitlendirilmiştir. Malzeme seçimlerini 3 ana grup altında toplamak mümkündür;

a. İnorganik Malzemeler

Silikon ve cam malzemeler bu grup altında tanımlanmaktadır. Yüksek ısı iletkenliğine sahip olan ve organik solventlere karşı dirençli yapısı nedeniyle tercih edilen silikonun opak bir renge sahip olması kanal içerisinde kontrol edilmesini güçleştirmektedir (. Silikon malzemelere benzer olarak yüksek ısı iletkenliği sağlayan cam malzemeler, gaz geçirgenliği göstermemeleri nedeniyle hücre temelli mikroakışkan uygulamalarında tercih edilmemektedir.

b. Polimer Tabanlı Malzemeler

Basit kullanımları ve düşük maliyetleri ile özellikle tanı tabanlı sistemlerde tek kullanımlık uygulama gerektiren biyomedikal cihazların üretimleri için silikon ve cam malzemeler yerine polimerler tercih edilmeye başlanmıştır. Düşük mekanik dayanımları ve erime noktalarına sahip olan polimerlerin elektriksel dirençleri yüksek olup, üretimleri için kimyasal veya iyonik aşındırma gerektirmemektedir. Akademik ve endüstriyel uygulamalarda laboratuvar koşullarında üretilebilmeleri ve üretimleri için pahalı ekipmanlara gerek duymadan düşük maliyetli üretim kapasitelerine sahip olmaları günümüzde mikroakışkan sistemler için vazgeçilmez bir kaynak olmalarını sağlamıştır.

Mikroakışkan sistemlerin fabrikasyonunda tercih edilen polimerler genellikle PDMS (polidimetilsiloksan) ve PMMA (polimetilmetakrilat) olup, SU-8 ve poliimid (PI) polimerlerinin de literatürde yaygın kullanımları olduğu görülmektedir. İnert ve saydam bir form sağlayarak kanal içerisinde görülebilir kılınmaları, biyouyumlu olmaları ve istenilen tasarım kriterlerine göre şekillendirilip sentezlenebilmeleri nedeniyle mikroakışkan sistemlerin hücre kültürü uygulamalarında da kullanımları yaygındır.

c. Kağıt Tabanlı Malzemeler

Kağıt, son zamanlarda mikroakışkan uygulamalar içerisinde yaygın kullanım alanı kazanmış olan esnek, selüloz esaslı bir malzemedir. Biyouyumluluk esasına dayalı reaksiyonlar için farklı formülasyon ve kimyasal uygulamalar yoluyla kolayca modifiye edilebilen ucuz malzemelerdir. Düşük mekanik dayanımına sahip olan kağıt malzemeler biyokimyasal analiz ve tanı-teşhis uygulamalarında kullanılmaktadır. Pasif kapiler etki mekanizmasına dayanan kağıt tabanlı mikroakışkan sistemlerin kolorimetrik, elektriksel ve elektrokimyasal, kemilüminesans yöntemlerle entegre olarak çalışması sağlanmaktadır.

2.2 Aminotransferaz Enzimlerinin Tanı Kitlerinde Kullanımları

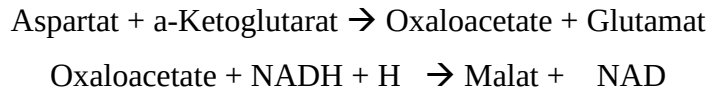
Karaciğerin takibi amacıyla yapılan kan tahlilleri, karaciğer hastalığına yakalanan veya hepatotoksisiteye neden olabilecek ilaçlar kullanan hastalar için tıbbi bakımın kaçınılmaz bir parçasıdır. Örnek olarak, tüberküloz tedavisi sırasında takip edilmesi gereken ve serumda bulunan trasaminaz enzimlerinden aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferazın (ALT) birlikte izlenmesini gerekmektedir. Tedavisinde klinik olarak ilgili hepatotoksisite insidansı (tipik olarak izoniazid, rifampin ve pirazinamid ilaçlarından dolayı) % 2 ila 33 aralığındadır. Risk faktörleri önceden var olan karaciğer hastalığı (örneğin hepatit B ve / veya C), alkol kullanımı ve ilerleyen yaş durumuna göre gruplandırılmaktadır. Bununla birlikte, pratikte hangi hastaların tedavide gerçekten hepatotoksisite geliştireceğini doğru olarak tahmin etmek zordur (Alam ve ark., 2011; Matsuura ve ark., 2011) .

Hepatotoksisitenin izlenmesi, en yüksek risk grubundaki hastalar için bile, nispi gider, lojistik ve pratik kaygılarla sınırlıdır. Testler genellikle merkezi veya bölgesel laboratuvarlarda yapılır ve bu durum, sonuçların alınmasını ve sonuca dayalı tedavi uygulanmasını geciktirebilir. Birçok hasta, damardan kan alımına karşı güçlü negatif duygulara sahiptir ve bu durum bakıma engel olabilir. Klinik olarak faydalı fakat karmaşık testleri yapma kabiliyetinden ödün vermeden uygun bakım noktası taramasını, yani hasta başı tanı ve tedavi sistemlerini geliştirebilmek için mikroakışkan sistemlere dayalı platformlar tasarlanmaktadır.

Birden fazla reaksiyonun eş zamanlı gerçekleşebildiği mikroakışkan kanallar içerisinde akış değiştirme ve yönlendirme yeteneği ile mikroakışkan cihazlar, düşük hacimli (<40 µl) numuneleri çoklu olarak veya ayrı parçalara bölerek paralel deneylere tabi tutma kapasitesine sahiptirler. Ayrı tahlil koşulları ile bağımsız olarak optimize edilmiş kanallarda, tahliller arasındaki çapraz aktivite ile ilgili endişeleri ortadan kaldırabilen mikroakışkan sistemler klinik tanı uygulamalarında potansiyel bir teknoloji olarak görülmektedir.

2.2.1 Aspartat Aminotransferaz Enzimi

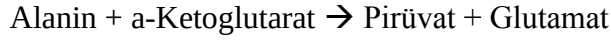
Glutamat oksaloasetat transaminaz (GOT) olarak da bilinen aspartat aminotransferaz enzimi (AST) klinik vakalarda hastalık tanısının konmasında önemli rol oynayan transaminaz grubu enzimlerindendir. Kan serumunda bulunan ve α -ketoglutarik asit varlığında aspartik asidin amino grubunu α -ketoglutarik aside transfer edilmesini sağlayan AST enzimi, kan serumunda glutamat ve oksaloasetik asit oluşumunu meydana getirmektedir. Piridoksal fosfat ise bu enzimin koenzimi olarak bilinmektedir. Yetişkin bireyler için serumundaki normal oranları 7-56 U L⁻¹ olarak bilinen AST enziminin kan serumundaki artışları öncelikli olarak kalp rahatsızlıklarını ifade ederken kas, böbrek ve karaciğer rahatsızlıklarının tanılmasında ise ALT enzimi ile birlikte artışları belirleyici olmaktadır (Giannini ve ark., 2005).



2.2.2 Alanin Aminotransferaz Enzimi

Bir diğer adı glutamat pirüvat transaminaz (GPT) olan alanin aminotransferaz enzimi, spesifik olarak karaciğere özgü bir enzim olup, kalp, iskelet kası ve böbreklerde de yüksek oranda gözlenmektedir. Kan serumundaki artışları karaciğer hasarını işaret eden bu enzime ait koenzim ise piridoksal fosfat olarak bilinmektedir. Yetişkin bireyler için serumundaki normal oranları 7-56 U L⁻¹ olarak bilinen bu enzim, siroz, toksik karaciğer nekrozu, viral hepatit ve

dolaşım yetmezliğinde artış göstermektedir. Genellikle AST enzimi ile birlikte ölçümlenerek klinik tanılamada kullanılırlar (Prati ve ark., 2002).



2.3 Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Mikroakışkan teknolojisi, kimyasal ve biyolojik analizlerin yanı sıra tıbbi teşhiste ve terapötik cihazlarda farklı uygulamalar geliştirmek için yüksek potansiyele sahiptir. Minyatür boyutlarından dolayı az miktardaki reaktif hacmi ile daha kısa işlem süresi ve çip üstü laboratuvar teknolojisi ile paralel kullanımlara da açıktırlar (Hong ve ark., 2009; Mark ve ark., 2010). Mikroakışkan sistemlere immobilize enzimlerin entegrasyonu, biyokatalitik reaksiyonları kullanan yeni teknolojilerin çoğunda önemli bir etkiye sahiptir. Literatürde mikroakışkan sistemlerin enzim reaksiyonları için ideal bir platform olabileceğini gösteren pek çok rapor bulunmaktadır (Kazan ve ark., 2017; Akay ve ark., 2017; Yesil-Celiktas ve ark., 2013; Hickey ve ark., 2007, 2009; Ngamsom ve ark., 2010). Hızlı tarama, immobilize enzimlerin çoklu kullanım kapasitesi ile gerçekleştirilmektedir (Forsberg ve ark., 2004; Matosevic ve ark., 2011a). Buna ek olarak, enzimlerin, sıcaklık, pH ve organik çözücülerin sert çevre koşulları altında uygulanmalarını kolaylaştırarak daha yüksek kararlılık özellikleri de ispatlanmıştır (Sakai-Kato ve diğerleri, 2002; Nomura ve ark., 2004; Berne ve ark., 2006). Immobilize enzimin substratla reaksiyon verebilmesi için optimum pH'da veya afinite değişikliğe neden olabildiği mikroplatformlar tasarlanırken göz önüne alınmalıdır (Krenková ve ark., 2004; Ladero ve ark., 2006).

Mikroakışkan teknolojilerinin hem tanı hem de tedavi uygulamalarında protein, DNA veya hücre araştırması için yapılandırılabilir olmaları biyomedikal ve tıbbi araştırma alanlarında güçlü avantajlar sağlamaktadır. Hayvan testlerine alternatif olarak toksisite değerlendirmesi için gelişmiş *in vitro* sistemlerin ortaya çıkışı, önemli bilimsel, etik ve ekonomik kaygılarla tetiklenmektedir (Soldatow ve ark., 2013). Bu sistemler, örneğin, üç boyutlu hücresel mimari ile fiziko-kimyasal

ve *in vivo* ortamı benzersiz bir şekilde taklit ederler (Bhatia ve Ingber., 2014). Bir ilacın veya kimyasal maddenin etkilerini daha iyi anlama imkanı sunmanın yanı sıra iki boyutlu (2D) hücre kültürü modellerinden farklı olarak, toksik hasarlara karşı immün cevabı daha iyi taklit edebilmektedirler. Yaygın kullanımdan önce, bu sistemlerin spesifik tasarımıyla ilgili çeşitli zorlukların giderilmesi gerekmektedir. Bunlardan bir tanesi, sınırlı bir alanda kültüre alınan küçük hücreli popülasyonda test edilen bir bileşiğin neden olabileceği potansiyel zararları doğru bir şekilde saptamaktaki güçlükle ilişkilidir. Analiz edilecek sınırlı miktarda süpernatant ve hücrelerin kültürlendiği mikroakışkan ortam, genellikle yüksek içerikli görüntülemeyi zorlaştırmaktadır (Torisawa ve ark., 2006). Bu bağlamda, bu gelişmiş *in vitro* sistemlere entegre edilebilen elektrokimyasal mikrosensörler geleneksel mikroskopi deneylerinde tamamlayıcı ve önemli bir role sahiptir (Generelli ve ark., 2008; Qin ve ark., 2014; Torisawa ve ark., 2006). Standart hücresel testlerin aksine elektrokimyasal mikrosensörler, belirli zaman noktalarında sorgulanabilmekte veya uzun süreler boyunca hücre sekresyonlarının dinamikleri hakkında eş zamanlı bilgi sağlayabilmektedirler. Gerek polimer gerekse kağıt tabanlı pek çok üretim formatına sahip olan mikroakışkan platform sistemleri ekonomik alım gücüne uygun, yüksek hassasiyete sahip, kullanıcı uyumlu, genellikle ek bir sistem gerektirmeyen ve kullanım amacına spesifik olarak üretilebilen cihazlar olmaları nedeniyle uzun süren ve genellikle hastane veya merkez laboratuvar gerektiren klasik tanı ve teşhis yöntemlerine alternatif bir çözüm olarak kullanılmaktadır.

Literatürde mikrosistem tabanlı hastalık tanı kitlerinin gittikçe arttığı ve kullanım alanlarının gelişmekte olduğu dikkat çekmektedir. Mikroakışkan tabanlı tanı sistemlerinin 2000'li yıllara ait ilk örneklerinden olan ve özellikle hamilelik sırasında rastlanan diyabet ve kronik diyabetin tanı ve kontrolleri için geliştirilen kan şekeri ölçüm cihazı, günümüzde eczanelerden temin edilebilen ve herhangi bir merkez laboratuvar gerektirmeden, hastaların kendi kendilerine uygulayabilecekleri pratik cihazlardandır (Kiechle ve Main, 2000). Bu tarz sistemlere bir örnek olarak, Hepatit B (HBV) virüsünün tespitinde kullanılan nükleik asit testlerinin (NAT) taşınabilir bir tıbbi cihaz boyutuna küçültülmesi için kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda hızlı ve gerçek zamanlı tayini sağlayan mikroçip tabanlı PCR sistemi geliştirilmiştir (Cho ve ark., 2006). Geniş çaplı bir

araştırma ve uygulama alanına sahip olan mikroakışkan tabanlı hasta başı tanı ve tedavi kitleri, Siemens, Abbott ve Roche gibi teknoloji devi olan büyük ve önemli şirketlerin de isimlerinin yer aldığı geniş bir platforma sahiptir. Bu şirketlerin yanı sıra özellikle çip üstü laboratuvar ve çip üstü organ sistemleri Micronit Microfluidics, Mimetas, Ectica Technologies, Sun Bioscience, Emulate Biotechnology ve Fluigent gibi mikroakışkan temelli üretici firmalar tarafından pazara sunulmaktadır.

Mikroakışkan temelli hasta başı tanı teknolojileri, çip üstü laboratuvar sistemleri kullanımı ile bu sistemlere optik veya elektrokimyasal tabanlı mikrosensörlerin entegrasyonu sonucu vücut sıvısındaki yoğunluğu veya azlığı çeşitli hastalıklara neden olan protein, nükleik asit, lipid veya hormon gibi analit miktarlarının hızlı dedeksiyonlarını sağlamaktadır. Bununla birlikte vücut sıvılarında patojen tayininde kullanılan mikroakışkan cihazlar da mevcuttur. Çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavi süreçlerinde belirteç olarak kullanıldıkları bilinen karaciğer enzimlerinin gerek polimer gerekse kağıt tabanlı mikrosistemlerde dedeksiyon amaçlı kullanımlarına yönelik çalışmalara son dönemlerde rastlanmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların, karaciğer enzimlerinin merkez laboratuvarlardan bağımsız olarak hastanın kendi başına kullanarak sonucu görebileceği bir tanı kiti geliştirilmesinde önemli bir rol oynaması beklenmektedir.

Fonksiyonları ve sahip olduğu anatomik yapı ile vücudumuzdaki en önemli metabolik organ olan karaciğer, hepatositlerde sentezlenen ALT (alanin aminotransferaz, eski terminoloji de SGPT) ve AST (aspartat aminotransferaz, eski terminoloji de SGOT) ile safra kanalı epitel hücrelerinde sentezlenen karaciğer ve safra yollarına özgü olmayan GGT (gama-glu- taml transpeptidaz) ve ALP (alkalen fosfataz) enzimlerini içermektedir. Bununla birlikte özellikle AST, iskelet kası ve kalp kasında, GGT böbreklerde, ALP kemikler ve bağırsak epitel hücrelerinde de sentezlenmektedir (Prats ve ark., 2000). Karaciğer hastalıkları genellikle transaminaz grubundan olan alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalın fosfataz (ALP) gibi artmış hepatik enzim düzeyleri ile teşhis edilmektedir. Artan ALP değeri kolestatik bir hasarı işaret ederken artan ALT ve AST konsantrasyonları, hepatoselüler hasar için tipik

bir belirteçtir (Giannini ve ark., 2005). AST'ye kıyasla, ALT karaciğere özgüdür, bu nedenle hepatotoksik etkilerin laboratuvar göstergelerine ALT en sık bakılan enzimdir. Hepatositlerden ALT salımı, toksin veya ilaç maruziyetinden sonra meydana gelen enfeksiyonlar veya yaralanmalara bağlı olabilmektedir.(Ozer ve ark., 2008; Amacher, 1998). Serumda bulunan transaminazların tayini, karaciğer hastalıklarının veya miyokard enfarktüsünün seyrinin izlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. AST serum aktivitesinin yükselmesi, kalp ya da karaciğer hücrelerinde ciddi hasar olduğunu göstermekte ve özellikle miyokard enfarktüsünün erken teşhisinde, ilk 24 saat boyunca AST izlenmesi, enfarktüsün ciddiyetine anlamaya yardımcı olmaktadır. Klinik tanılamada hepatosellüler ve kolestatik hasarın yanı sıra karaciğerin atılım ve sentez fonksiyonları değerlendiren karaciğer testleri de yapılmaktadır (Ersoy, 2012).

Klinik tanıda kullanılan enzimlerin çoğu çeşitli dokularda bulunan enzimlerdir ve bu nedenle genellikle tek bir enzimin ölçümü bir hastalığın kesin tanısı için yeterli olmamaktadır. Genellikle birçok enzimin ölçümü istenerek bir test modeli oluşturulur, buradan da ayırıcı tanıya gidilir. Örneğin alkali fosfataz hem kolestazis hem de kemik hastalıklarında yükselir ama kolestaziste, kemik hastalıklarında normal olan, bilirubin, transaminaz ve GGT aktiviteleri de yükselir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.2. Karaciğer enzimlerinin klinik biyokimya analizlerinde indikatör olarak kullanıldıkları hastalık örnekleri

Serum İçeriği	Olası Hastalık Tanısı
ALT ↑	Karaciğer hasarı (yağlanma, siroz vb.)
AST ↑	İskelet kası ve miyokard hastalığı
GGT ↑	Safra yolları hastalıkları
ALP ↑	Kemik kökenli hastalıklar
ALT $\cong$ AST	Hepatit,siroz ve kronik hastalıklar
ALT > AST	Akut karaciğer nekrozu
ALT < AST	Akut myokard enfarktüsü
ALT $\cong$ GGT	Karaciğerde patolojik rahatsızlık
GGT $\cong$ ALP	Alkol, ilaç ve zehirlenme kökeni

Alanin aminotransferaz (ALT)
 Aspartat aminotransferaz (AST)
 Gama-glutamil transferaz (GGT)
 Alkalen fosfataz (ALP)

Klinik biyokimya da moleküllerin miktar tayini için geliştirilen biyolojik tanı yöntemlerinden antikor-antijen etkileşimini temel alan immünolojik test yöntemi, kullanımı en yaygın tekniktir. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), antikor-antijen etkileşimine dayalı kantitatif immünolojik test yöntemi olup her moleküler biyoloji ve klinik laboratuvar da yapılabilecek basit ve hassasiyeti yüksek bir tekniktir. Diğer ölçüm prensiplerini ise reaksiyon hızı ölçümü, kalorimetrik ölçüm ve enzim kütle tayini olarak sıralanabilmektedir.

Transaminaz etkinliği, tahlillerde geleneksel spektrofotometrik tekniklerle karşılaştırıldığında mikrosistem tabanlı analitik cihazlar ciddi avantajlar sunmaktadır. En önemli avantaj ise reaksiyon süresinin kısalması ve elde edilen ürün değerini okumanın birkaç dakika içinde gerçekleştirilebilmesidir. Bununla birlikte reaksiyon için gereken örnek hacim gereksinimi de azaltılır. Kinetik reaksiyon testleri optik olarak dönüştürülmediğinden, tam kan örneklerinin kullanımı bile gerçekçi sonuç verebilmektedir (Moser ve ark., 1997). Karaciğer enzimlerinden olan ALT'ye ait mikrosensörlerinin *in vitro* hepatoselüler ölüm miktarını belirlemesi için yapılan çalışmada sensör sisteminin bir işaretleyici olarak başarıyla kullanıldığı ve bu durumun toksisite değerlendirmelerinde kullanılan ve karaciğer hücrelerini içermekte olan mikroplatformların üzerine entegrasyonlarının yolunu açtığı bildirilmiştir (J.B. la Cour ve ark., 2016). Kandaki transaminaz aktivitesini tayin etmek amacıyla minyatürize olarak üretilen ve mikroakışkan temelli çalışan baskılı devre kartı (PCB) şeklindeki mikroplatform üzerinde, serum içerisindeki AST ve ALT aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, merkez laboratuvar da yapılan testlerle paralel sonuç verdiği gözlenmiş ve bu çalışmanın bir hasta başı tanı kiti geliştirilmesinde örnek bir çalışma olduğu vurgulanmıştır (Moser ve ark., 1997). Benzer mantıkla kağıt tabanlı mikroçiplerle AST ve ALT testleri yapılarak dakikalar içinde göz tarafından okunabilen basit ve ucuz tahlil yöntemi geliştirilmiş, tam kanda ve serumdaki transaminazları doğru bir şekilde ölçebildiği ortaya konulmuştur (Pollock ve ark., 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Mikroplatform Tasarımı

Masaüstü üç boyutlu yazıcı kullanılarak üretilecek olan mikro kanalların tasarımı, CorelDraw, SolidWorks 2013 Education Edition ve AutoCAD 2017 tasarım programlarıyla oluşturulmuştur.

Çalışma sırasında kullanılması planlanan spiral şekilli çipin, dönüş sayısı 5 ve en, boy, yükseklik değerleri sırasıyla 0,4 mm, 0,92 mm, 270 mm ve hacmi yaklaşık olarak 100 mikrolitre olacak şekilde tasarlanmıştır.

3.2 Mikrofabrikasyon

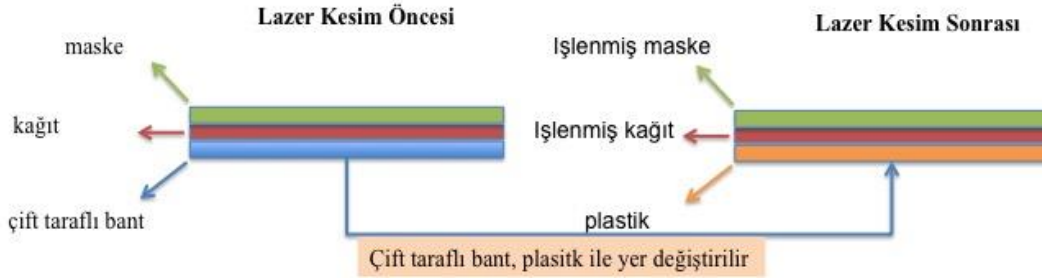
Bu çalışma bünyesinde hem polimer tabanlı hem de kağıt tabanlı mikroçiplerin üretimleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Lazer kesici ile kağıt tabanlı mikroçiplerin oluşturulması

CorelDraw tasarım uygulaması kullanılarak her biri 4 µl hacminde ikim dairesel iki kanala sahip kağıt tabanlı çiplerin çizimi sağlanmıştır. CorelDraw programından lazer kesicinin (VLS2.30 system Universal Laser) (Şekil 3.2.1) uygulama programına aktarılan çizim, lazer kesicinin hız (10 mm/saniye) ve güç (80%) dengesinin sağlanmasıyla kesilmiştir. Kesme işleminin ardından kanal dışında istenmeyen bölgeler ayrılarak elektrod yerleştirilmesine hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2.2).

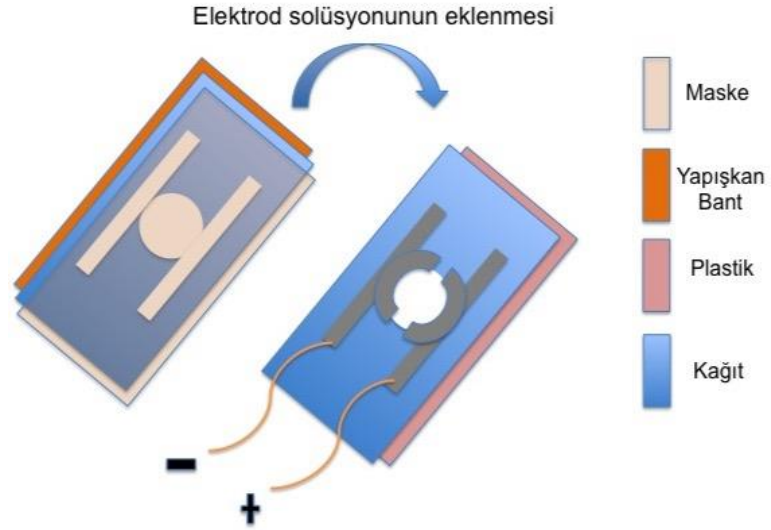


Şekil 3.2.1. Kağıt tabanlı mikroçiplerin eldesi için kullanılan lazer kesici (VLS2.30 system Universal Laser)



Şekil 3.2.2. Lazer kesim öncesi ve sonrası şeması

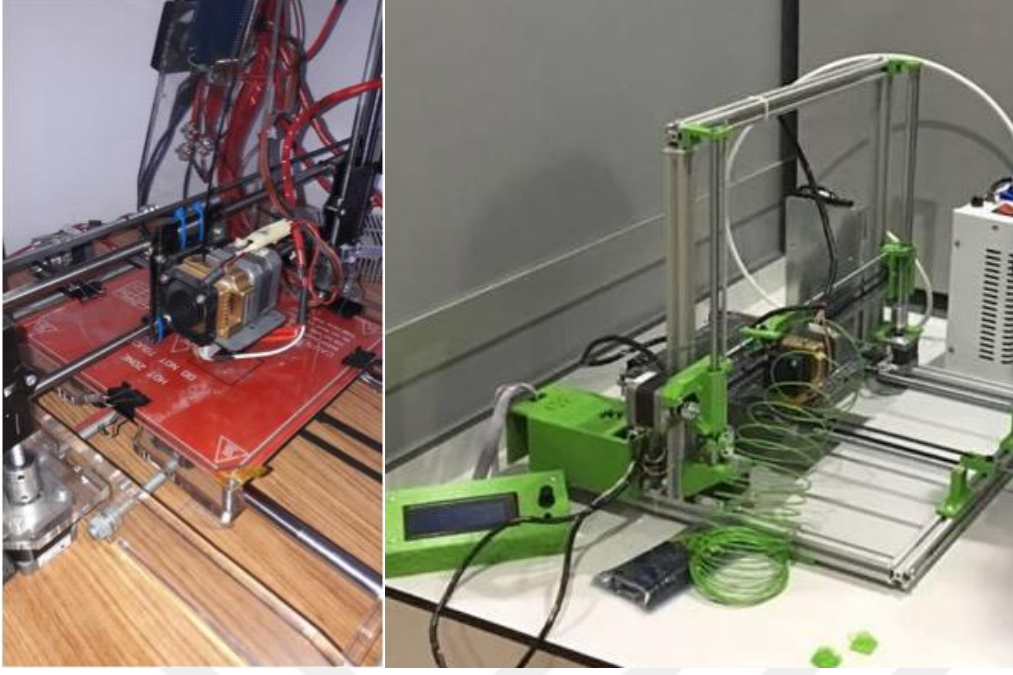
Kağıt tabanlı mikroçipler, whatman kromatografi kağıdı üzerinde dairesel (6.5 x 1.8 mm) kanallar oluşturulacak şekilde oluşturulmuştur. Bu amaçla çift taraflı bant (DSA; 3M; 8213), transparan plastik tabaka (3M, St. Paul, Minnesota) ve maskeleme kağıdı (Mask-ease, Blick Art Materials; 44908-1003) kullanılmış, elektrodların yerleştirilmesi amacıyla gümüş (80%)- grafen (20%) karışımı elektrod solüsyonu hazırlanmıştır. Elektrod karışımının hazırlanmasının ardından, bir jilet yardımıyla viskoz haldeki elektrod sıvısı dairesel kanallar etrafına sürülmüştür. Elektrodlar dairesel kanal etrafına sürüldükten sonra kağıt plaka üzerindeki maske ayrılarak elektrodların kurutulması amacıyla çipler 60 °C altına 1.5 saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır (Şekil 3.2.3).



Şekil 3.2.3. Üretilen kağıt tabanlı mikroçipin içerdiği katmanlar

3.2.2 Üç boyutlu yazıcı ile polimer tabanlı mikroçiplerin kalıp basımı

Bu çalışmada kullanılması planlanan mikroçiplere ait kalıpların üç boyutlu yazıcı kullanılarak üretimleri hedeflenmiştir. Bu amaçla, çalışmada Prusa i3 3D Printer kullanılmıştır (Şekil 3.2.4). Mikrofabrikasyon aşamasının ilk kısmını üç boyutlu yazıcı ile kanal kalıbının çıkarımı oluştururken; ikinci kısım ise kalıbın üzerindeki şeklin esas polimer olan PDMS üzerine aktarılması olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2.4 Çalışmada kullanılan üç boyutlu yazıcılar

Kalıp basımı amacıyla filament olarak polilaktik asit (PLA) ve akrilonitril bütadien stiren (ABS) kullanmıştır. Maksimum baskı çözünürlüğü, nozzle çapı (0,4 mm) nedeniyle 100 μ m ile sınırlıdır. Yazıcının baskı kapasitesi 200 mm x 200 mm x 200 mm olarak bilinmektedir. Tasarımı gerçekleştirilen mikrokanaalların basım simülasyonu Simplify3D 2.2.2 yazılımı kullanılarak bir baskı desenine dönüştürülmüştür. Baskılama işlemi, 50 mm/saniye hızında, 50 °C tabla ve 215 °C nozzle ucu sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 PDMS hazırlık aşaması

Bir örnek kabı içerisinde 10:1 (w/w) oranında karıştırılan SYLGARD™ 184 SILICONE ELASTOMER ve çapraz bağlayıcısı SYLGARD 184 CURING AGENT, bir karıştırıcı yardımıyla homojenize edilmiştir. Kalıp üzerindeki şekil üzerine PDMS karışımı dökülerek ve yüzey ile kalıp arasında mikrokanaalların oluşturulması sağlanmıştır.

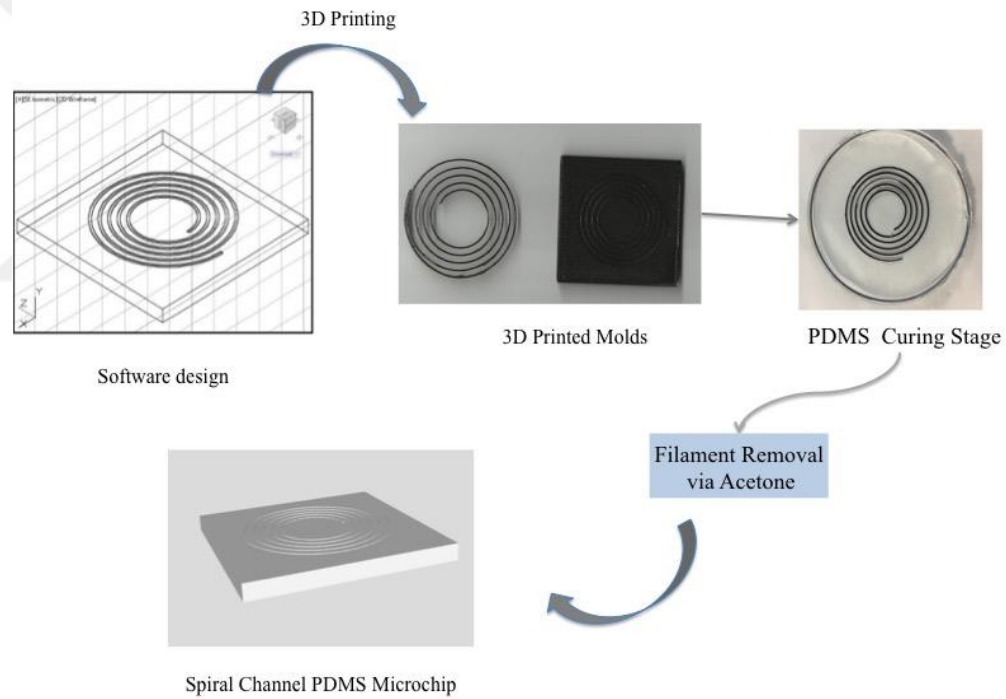
3.2.2.2 PDMS içerisine kalıbın yerleştirilmesi

Homojenize halde elde edilen PDMS karışımı, üç boyutlu yazıcı ile elde edilen kalıp üzerine alınarak, baloncukların giderilmesi amacıyla desikatör

içerisine yerleştirilerek ve vakum uygulanmış ve baloncukların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra 80 °C içerisinde 1 saat bekletilerek kalıptaki şeklin PDMS polimer üzerinde oluşturulması sağlanmıştır.

3.2.2.3 Kalıbın eritilerek kanal oluşturulması

ABS ve PLA filamentleri ile üretilen üç boyutlu yazıcı ürünleri olan spiral şekilli kalıp, soft litografi uygulamasının ardından PDMS içerisine hapsedilerek, PDMS içerisindeki kanal yüzeyini oluşturmuştur. PDMS'in 1 saatlik inkübasyonu sonucunda giriş ve çıkış kısımları (1 mm) açıkta bırakılmış ve 48 saat boyunca asetonla muamele edilerek, PDMS içerisindeki filamentlerin eritilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2.5.).



Şekil 3.2.5. 3 Boyutlu üretimden PDMS mikroçip oluşumuna kadar olan süreç

3.3 Polimer Tabanlı Mikroçiplerde Reaksiyon Analizi

ALT enzimine ait substrat solüsyonunu oluşturan L-Alanin (500 mmol/l), 2-ketoglutarat (15 mmol/l), pyridoxal-5'-fosfat (0.1 mmol/l), NADH (0.18 mmol/l), laktat dehidrogenaz (1700 U/l), sodyum azid (8 mmol/l), tris (100 mmol/l) ve AST enzimine ait substrat solüsyonunu oluşturan L-Aspartat (240

mmol/l), 2-ketoglutarat (12 mmol/l), pyridoxal-5'-fosfat (0.1 mmol/l), NADH (0.18 mmol/l), laktat dehidrogenaz (900 U/l), malat dehidrogenaz (600 U/l), distile su içerisinde hazırlanmıştır.

3.3.1 Spektrofotometre ölçümü

340 nm dalga boyu kullanılarak spektrofotometrik ölçüme tabi tutulmuşlardır. Reaksiyonlar, hem çipli hem de çipsiz olarak 3 tekrarlı ölçümlenmiş ve ortalama Δ absorbans değerleri kullanılarak enzim aktivite formülünde yerine konulmuştur (Şekil 3.3.). Hesaplama sırasında sönüm katsayısı (ϵ_{NADH}) 6220 L /mol.cm, ışık yolu (l) 1 cm ve ortalama süre (Δt) 60 saniye olarak alınmıştır.

$$\Delta c / \Delta t = \Delta A / (\epsilon * l * \Delta t)$$

Çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon ortamı, 1 ml substrat ve 200 μ l enzim solüsyonu, eppendorf içerisine alınmış ve 1 dakika boyunca vortex karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra spektrofotometre kuvetine alınan substrat-enzim karışımı, 340 nm dalga boyu kullanılarak 5 dakika boyunca spektrofotometrik ölçüme tabi tutulmuşlardır. ALT ve AST enzim denemeleri, 6 farklı enzim konsantrasyonu (98 U L⁻¹, 83 U L⁻¹ , 49 U L⁻¹, 25 U L⁻¹, 15 U L⁻¹) için tekrar edilmiştir.

Çip içerisinde difüzyon ilkesine dayalı karışımı hedefleyen denemelerde ise şırınga pompalar kullanılarak substrat solüsyonu ile enzim solüsyonu, bir T boru yardımıyla iki zıt uçtan sisteme yüklenmiştir. Denemeler sırasında substrat debisi 200 μ l/dk olarak belirlenirken enzim debisi 40 μ l/dk olarak sabitlenmiştir. Çip içerisinde 5 dakikalık inkübasyonları tamamlanan reaksiyon ortamları spektrofotometre kuvetlerine alınarak Δ absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.3.2 Mikroplaka okuyucu ölçümü

Kullanılan substrat ve enzim miktarını azaltmak amacıyla oluşturulan bu deneme setinde, çip içerisinde ve çip dışarısında karıştırma olmak üzere iki farklı yaklaşım uygulanmıştır. Çip dışarısında gerçekleştirilen denemede 96 kuyucuklu

plaka içerisine aktarılmadan önce toplam reaksiyon hacmi 120 µl olacak şekilde (30 µl enzim ve 90 µl substrat) eppendorf içerisinde karıştırılmış ve daha sonra kuyucuklara eklenmiştir. Çipli denemeler içinse toplamda 5 farklı akış hızı ve kombinasyonu denenmiş ve optimum sonuç alınan süre ve akış hızları tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Optimum sonuç alınan süre ve akış hızları

Uygulama Süresi	Enzim (µl/dk)	Substrat (µl/dk)	Toplam Hacim (µl)
3 dakika	5	25	90
3 dakika	7	30	111
3 dakika	10	30	120
1 dakika	15	75	90
1 dakika	20	100	120

Enzim aktivitesinin hesaplanması sırasında sönüm katsayısı (ϵ_{NADH}) 6220 L /mol.cm, ışık yolu (l) 0.5 cm ve ortalama süre (Δt) 60 saniye olarak alınmıştır.

3.3.3 Nanodrop ölçümü

Nanodrop ile yapılan denemede, dakika başı ölçüm alınabilmesi adına mikroçip, 1 dakika içerisinde enzim (20 µl/dk) ve substrat (100 µl/dk) ile doldurulmuş ve hemen sonrasında ilk dalga boyu alınarak bu döngü 5 dakika boyunca tekrarlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3.3 Spektrofotometrik ve nanodrop ölçümleri için kullanılan Nanodrop 200c.

Elde edilen absorbans değerleri ile enzim aktivesinin hesaplanması için sönüm katsayısı (ϵ_{NADH}) 6220 L /mol.cm, ışık yolu (l) 0.1 cm ve ortalama süre (Δt) 60 saniye olarak alınmıştır.

3.4 Kağıt Tabanlı Mikroçiplerde Reaksiyon Analizi

3.4.1 LCR spektrometre ölçümü

Birer indirgenme-yükseltgenme tepkimesi veren ALT ve AST enzim reaksiyonları sonucu ortaya çıkan iyonik yükün ölçümlenmesi hedef alınmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda (0.01%, 0.1%, 1%, 10%, 100% (w/w)) PBS solüsyonları ile üzerindeki empedans değerinin, giderek artan iyonik yüke bağlı olarak değişimini gözlemlenecek olan kağıt taban, spektrometrik analize tabi tutulmuştur. Bu analiz için frekans aralığı 0-20 KHz olarak belirlenmiş ve artan PBS konsantrasyonuna bağlı spektrometrik diyagram oluşturulmuştur. Bu amaçla LCR (LCR 8110G, GWInstek, CA) cihazı kullanılmıştır.

3.4.2 Sensitivite testi

Hem ALT hem de AST enzimine ait 6 farklı konsantrasyon belirlenmiş (98 U L⁻¹, 83 U L⁻¹ , 49 U L⁻¹, 25 U L⁻¹, 15 U L⁻¹) ve birbirine paralel 3 tekrarlı denemeler gerçekleştirilerek, reaksiyonlar çip dışında gerçekleştirilmiştir. Artan

konsantrasyona bağı olarak oluşan ürünlerin iyonik yükünün de farklılık göstermesi beklendiğinden, kağıt yüzeye reaksiyon ürünü yüklenerek empedans değerinde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir.

3.4.3 Spesifite testi

Tasarlanan kağıt tabanlı mikroçiplerin ve AST ve ALT enzimlerine ait olan substrat solüsyonlarının bir başka enzimle temaslarında AST ve ALT enzimiyle alınan sonuçlara paralel sonuçların elde edilip edilmeyeceği test edilmiştir. Bu amaçla ALT ve AST'ye ait substrat solüsyonları benzer şekilde indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonu gösteren glukonaz enzimi (100 U L^{-1}) ile karıştırılmış ve reaksiyon ürünü, kağıt tabana yüklenerek elde edilen empedans değişimleri not edilmiştir.

3.4.4 Renk değişim testi

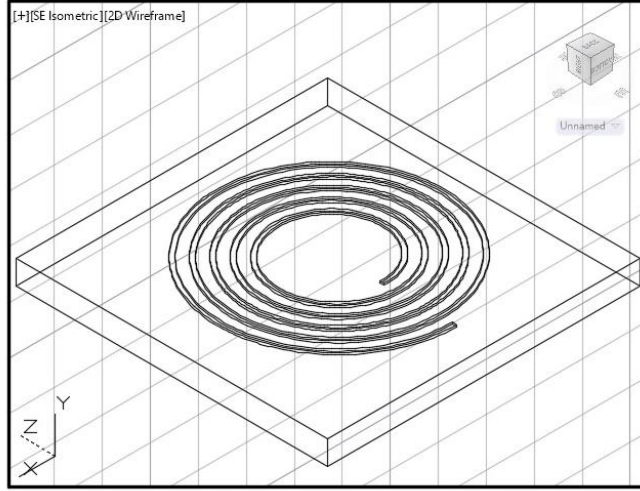
ALT ve AST renk değişimi ile kalitatif dedekiyonu için farklı konsanstrasyonlarda enzim solüsyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. 0.01%(w/v) Ninhidrin solüsyonu (60% aseton -40 % etil asetat) hazırlanmıştır. 20 µl enzim ve 80 µl substrat karışımı kağıt tabanlı çip dışında karıştırılıp, karışımdan 4 ul kağıt plaka üzerine damlatılmıştır. Ninhidrin solüsyonu ise 10 µl damlatılarak hot plate üzerinde renk değişimleri gözlemlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Tasarım

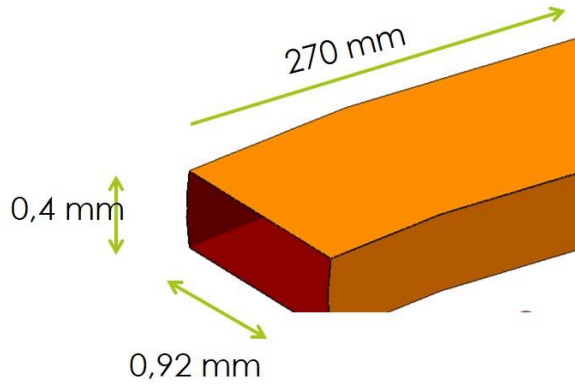
Mikroakışkan sistemlerin en önemli özelliklerin biri olarak bilinen laminar akış, bu tarz sistemlerde birden fazla maddenin birbiri ile karışmasına engel teşkil etmektedir. Bu engeli avantaja çevirmek amacıyla tasarlanan spiral kanallarla akışkanların kanal içerisinde eş anlı olarak birlikte aldıkları yolu uzatmak hedeflenmiştir (Şekil 4.1.1). Tasarımı gerçekleştirilen spiral şekilli çiplerde, kanal boyunca birlikte ilerleyen akışkanların birbiri içerisine difüze olarak karışması sağlanmıştır (Şekil 4.1.2.). Mikroakışkan sistemlerde türbilant-benzeri akışı sağlamak amacıyla kullanılan mikro-karıştırıcı yapıları, genellikle maliyeti yüksek olan ve temiz oda şartları gerektiren fotolitografi cihazları ile oluşturulmaktadır. Düşük miktarda ($<100\ \mu\text{l}$) reaktiflerin kullanıldığı mikroakışkan sistemlerde akışkanların aldıkları yol ve hacimleri kısıtlama yoluna gidilerek kanal yüzeylerinde nanometrik ölçülerde engeller oluşturulmakta ve böylece akışkanların bu engeller üzerinde gerek birbirleri üzerinden geçerek gerekse mikro-karıştırıcı geometrileri sayesinde birbirlerine çarparak kanalı tamamlamaları sağlanmaktadır. $100\ \mu\text{l}$ ve üzeri hacimlerin kullanıldığı mikroakışkan sistemlerde ise, gerek immobilize gerekse serbest haldeki enzim, serum veya değerli reaktif içeren sıvı solüsyonların, kanallar içerisinde aldıkları yolların uzatılarak hedef moleküllerle temas süreleri arttırılmakta, böylece reaksiyonların gerçekleşme oranları arttırmakta ve elde edilen ürün yüzdeleri arttırılmaktadır.

Bu çalışma süresince spiral kanal tasarımının yanı sıra, birbirine girintili olarak tasarlanan “S” şekilli kanalların da tasarımlarının solidworks programı ile çizimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.3. ve Şekil 4.1.4.).

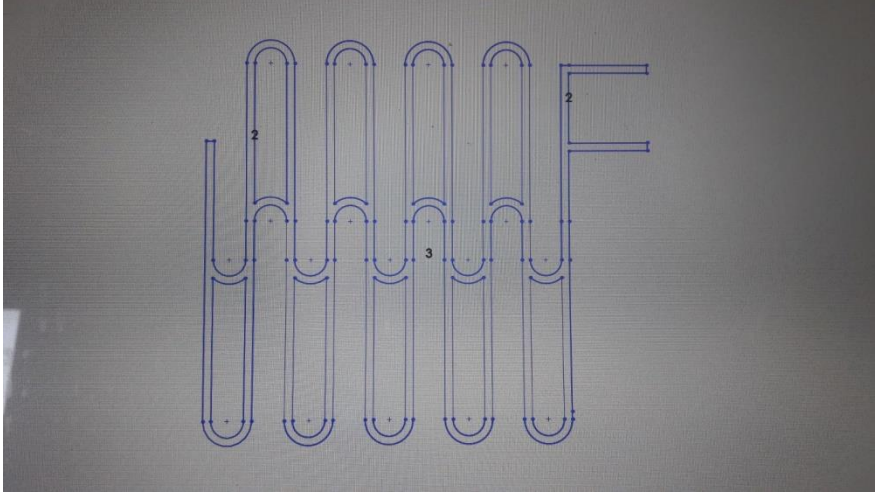


Şekil 4.1.1 Autocad ile çizilen iskelet görüntüsü

Iseri ve ark. (2014), SolidWorks programı ile tasarladıkları ve üç boyutlu yazıcı ile ürettikleri “Y” şekilli mikroçiplerin yüzey özelliklerinin laminar akış düzeni üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Farklı akış hızlarıyla iki farklı boyanın kanal içerisindeki ilerleyişini mikroskop yardımıyla izledikleri çalışmada hem basınç düşüşlerini hem de laminar akış düzenini teorik ve deneysel olarak hesaplamış ve karşılaştırmışlardır.



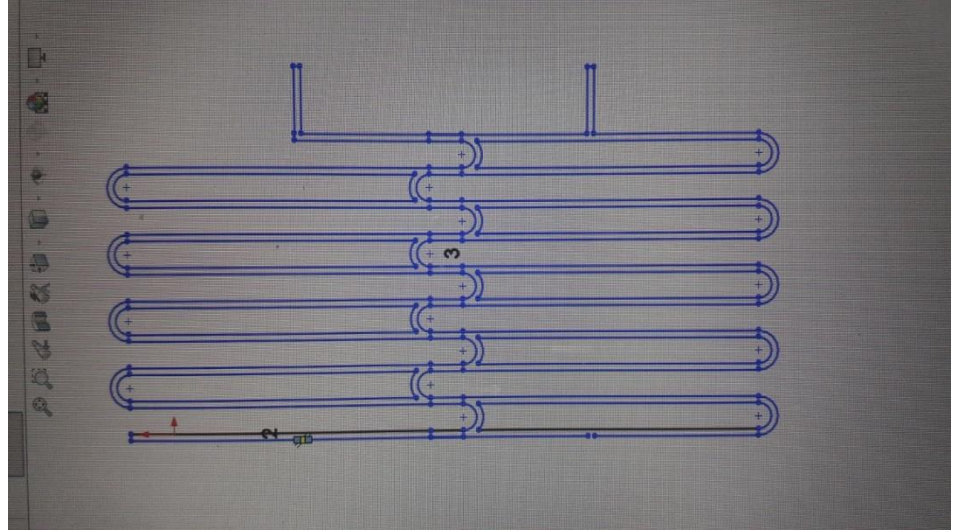
Şekil 4.1.2 Spiral şekilli çipin basım öncesi üç boyutlu görüntüsü



Şekil 4.1.3 Solidworks kullanılarak çizilen çift giriş ve tek çıkışa sahip girintili “S” şekilli kanal dizaynı

Literatürde yer alan ve hem kanal içeriisine eş anlı olarak verilen akışkanların aldıkları yolu uzatmayı hem de zigzag şeklindeki geometrisiyle akışkanların birbiriyle olan temas alanını arttırmayı ve pasif karıştırma yoluyla difüzyonu arttırmayı hedefleyen çalışmalar yer almaktadır. Xia ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada zigzag şeklinde ilerleyen ve ‘S’ şeklinde ilerleyen kanal geometrilerinde karışmayı ve dolayısıyla difüzyon derecesini görebilmek amacıyla birbiri içerisinde düşük çözünürlüğe sahip olan, gliserol eklentili kırmızı ve mavi renkteki boyaları kullanmışlardır. Elde ettikleri simülasyon sonuçları, kanal geometrisinin, akışkanların düşük Reynold değerlerine karşılık türbülant-benzeri akışı sağlayabildiğini göstermektedir.

Benzer çalışmalar da göstermektedir ki, kanal geometrisi, akışkanların birbirlerine karşı gösterdikleri difüzyon eğilimleri üzerinde büyük rol oynamaktadır. Bu çalışmada tasarımı gerçekleştirilmiş olan mikrokanalların, gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon verimi üzerinde pozitif yönde etki sağladığı görülmüştür.



Şekil 4.1.4 Solidworks programı ile çizilen alternatif girintili “S” şekilli kanal dizaynı

4.2 Mikrofabrikasyon Ürünleri

4.2.1 Lazer kesimi sonucu elde edilen çipler

Lazer kesim işlemi, gümüş-grafen elektrod solüsyonunun dairesel elektrodlar etrafına sürülerek kurultulması ardından çipler kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.2.1.). Her bir kanal hacmi 4 μ l olup, karşılıklı elektrodların birbirlerine temas etmemesi açısından her iki kanal yarım daire şeklinde tasarlanmış ve aralarında yaklaşık 1mm’lik mesafe olacak şekilde kesilmiştir.



Şekil 4.2.1. Kağıt tabanlı çift hazneli mikroçip

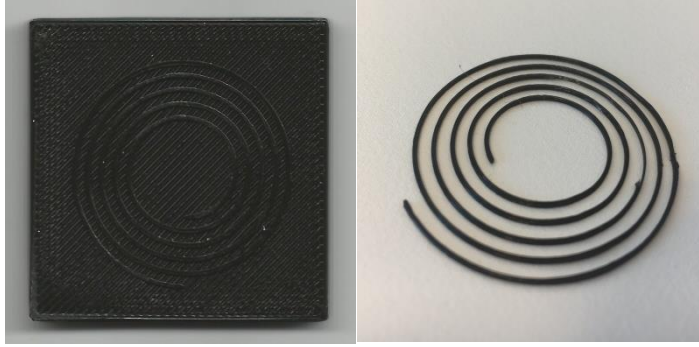
Benzer bir çalışmada kanser belirteci olarak kullanılan insan prostat spesifik antijeni (PSA) antikorunun dedeksiyonu amacıyla elektrokimyasal biyosensör olarak kağıt tabanlı mikroçiplerin üretimi sağlanmış ve bu çalışmada kağıt tabanlı mikroçip üretimi için lazer kesimi yerine wax kullanılarak mikrokanaal sınırları belirlenmiştir (Tang ve ark., 2014). Termal press yöntemi ile altın ve gümüş-gümüş klorür tabanlı elektrodların, kağıt taban üzerine

aktarımların gerçekleştirilmiştir. Elektrodların bir jilet yardımıyla lazerle kesimleri gerçekleştirilen kanallar etrafına yerleştirilmesi işlemi ile termal press uygulaması ve wax basımı için ekstra ekipman gerektiren bu çalışma karşılaştırıldığında lazer kesimin daha pratik ve avantajlı olduğu görülmektedir. Kurdekar ve ark. (2016), whatman filtre kağıdını kullanarak HIV virüsüne karşı geliştirikleri immunoassay için wax ile kaplama yöntemini kullanmış ve virüse ait antikor-antijen reaksiyonunu gerçekleştirdikleri dairesel kanalların sınırlarını hidrofobik forma getirebilmek amacıyla wax ile çevrelemişlerdir. Benzer şekilde HIV virüs dedeksiyonunu ortamdaki elektriksel yük dengesini değiştirerek numerik analizini hedefleyen bir diğer çalışmada, whatmann kağıdı yerine transparan özellikteki plastik tabakalar, bir lazer kesim cihazı yardımıyla kesilerek reaksiyon çemberi oluşturulmuş ve gümüş-grafen karışımı viskoz özellikteki elektrod solüsyonu, karşılıklı kanallar etrafına sürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Shafiee ve ark., 2015). Bu yönden bakıldığında, herhangi bir elektrokimyasal analiz gerektirmeyen, renk dönüşümüne dayalı reaksiyonların gerçekleştirileceği sistemlerde wax ile sınırlandırma tercih edilirken, sistemin elektriksel-elektrokimyasal dengesinin değiştirildiği ve indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarının taban alındığı çalışmalarda ise termal press ve wax uygulamalarının kompleks birleşimi yerine lazer kesimin kullanılması ve elektrodların sıvı formda kanal etraflarında çevrilmesi daha pratik ve uygulanabilir bir yöntemdir.

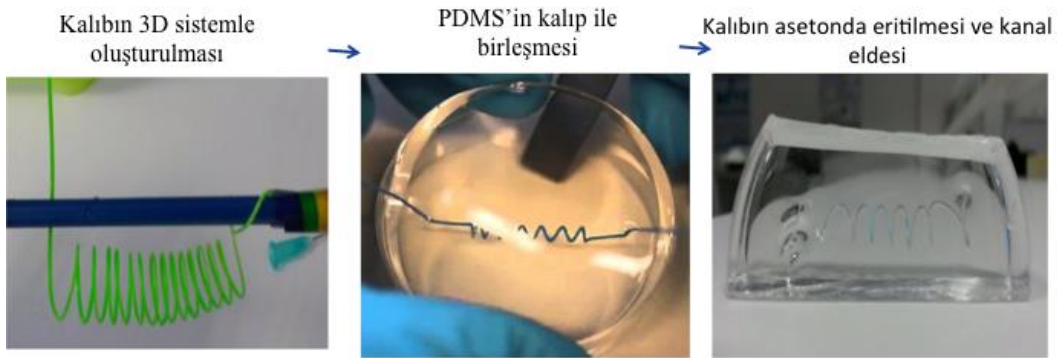
4.2.2 Üç boyutlu yazıcı ile elde edilen kalıplar

ABS ve PLA filamentleri kullanılarak 3 boyutlu yazıcı ile üretimleri gerçekleştirilen kalıpların aseton içerisinde 48 saatlik bekletilmeleri ardından, ABS filament 48 saat içerisinde eridiği, PLA filament ise mukavemet özelliğini kaybederek esnediği fakat aseton içerisinde erimeyeceği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.2.). ABS filament ile uzun spiral kanalların oluşturulması ve ardından PDMS'in şekillendirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda ise yine asetonla temas eden ABS filamentinin PDMS içerisindeki çözünürlüğü 72 saate çıkmıştır. ABS filament kurlaşan PDMS polimeri içerisinde süpürülmesi işlemi ise şırınga yardımıyla yapılmış, 5 ml'lik şırıngalar içerisinde çekilen aseton, çipin giriş borularından kanal içerisine basınçla uygulanarak, çipin çıkış bölgesinden aseton

ile birlikte çıkması sağlanmıştır (Şekil 4.2.3.). Saggiomo ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada ABS filamentini ile oluşturdıkları üç boyutlu olarak yazdırdıkları kalıpları kürleşmemiş PDMS ile karıştırdıklarında, kürleşme sonucu PDMS'in kalıbın şeklini aldığını ve aseton uygulaması sonucu ABS filamentinin kanallardan uzaklaştırılarak kullanıma hazır mikroçipler geliştirdiklerini göstermiştir. ABS filamentinin mikroçip uygulamalarında kullanıldığı bir diğer çalışmada ise kalıp oluşumu yerine mikroçipin tamamının üç boyutlu yazıcı yardımıyla basılması ve katmanlar halinde basılan kanalların sıvı geçiriminin test edilmesi hedeflenmiştir (Capel ve ark., 2013). Aynı zamanda katmanlardan kaynaklanan girintili yüzey alanının bir “sıvı vorteksi” olarak kullanımının da test edildiği çalışmada 20 bar üzerindeki basınçlarda, mikroçipi oluşturan ve üç boyutlu basım nedeniyle oluşan katmanlar arası boşluklardan akışkanların sızdığı gözlemlenmiştir. Mikroçipin tamamının üç boyutlu yazıcılar yardımıyla üretildiği diğer bir çalışmada, “Y” şekilli mikroçipin iki farklı giriş portundan verilen akışkanların, kanal içerisindeki davranışlarını gözlemlemek amacıyla üç boyutlu üretilen çipin üzeri çift taraflı bant yardımıyla cam plaka ile kapatılmış fakat hem üretilen çipin katmanlı yüzeyi hem de adhesiv bandın yüzeyle temasından kaynaklanan pürüzler nedeniyle kanal içerisinde hava kabarcıklarının giderilemediği not edilmiştir (Iseri ve ark., 2014). Literatürde yer alan benzer çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, üç boyutlu yazıcı kullanımının pratik, ucuz ve temiz oda gerektirmeyen üretim koşulları oluşturması ve kolay ulaşılabilirliği nedeniyle mikroakışkan sistemlerin üretimlerinde potansiyel bir üretim metodu olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Yapılan çalışma ile literatür karşılaştırması göstermektedir ki, gerek biyolojik gerekse kimyasal reaksiyonların gerçekleştirilebileceği, mikroakışkan sistemlerin kullanım alanları göz önünde bulundurulduğunda ise reaksiyon ortamının biyoyumlu ve görülebilir olması gerekçeleriyle üç boyutlu yazıcıların tam bir mikroçip üretimi yerine kalıp olarak kullanılarak PDMS vb. biyoyumlu polimerlerle birlikte kullanımları, uygulama alanlarını genişletmektedir (Au ve ark., 2016).



Şekil 4.2.2. PLA tabanlı üretilen (a) tabanlı spiral kalıp; (b) tabansız spiral kalıp



Şekil 4.2.2 ABS polimeri ile üretilen kalın PDMS içerisinde eritilmesi süreci

4.3 Polimer Tabanlı Mikroçiplerin Analiz Sonuçları

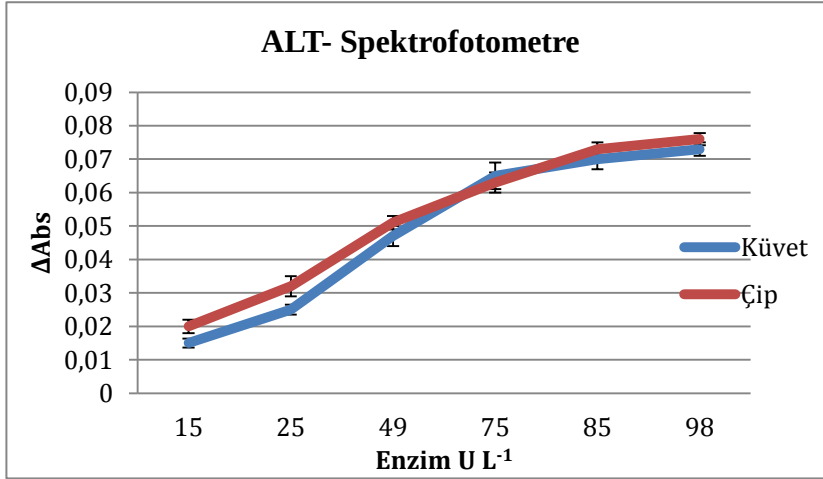
Bu çalışma bünyesinde spektrofotometre, mikrolaka okuyucu ve nanodrop cihazları ile enzim aktivite denemeleri yapılmıştır. Mikroçip içerisinde, düşük reaktif hacmine karşılık yüksek yüzey alanı/ hacim oranlarından kaynaklanan difüzyona bağlı karışmanın sağlandığı denemeler ile klasik yöntemlerle tüp içerisinde gerçekleştirilen, yüksek reaktif girdisi gerektiren ve homojenitenin sağlanabilmesi için vorteks temelli bir karıştırıcıya ihtiyaç duyulan denemeler karşılaştırıldığında, mikroçip içerisinde gerçekleştirilen denemelerin klasik yöntemlere göre daha etkili sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Polimer tabanlı mikroçiplerde karıştırma ve difüzyona dayalı bir diğer çalışma örneğinde ise Xia ve ark. (2005), serpantin tipi mikrokarıştırıcıların akış reolojisi üzerine denemeler kurmuş, mikrokanal içerisinde laminar özellik gösteren akışkanların birbiri içerisinde homojen bir şekilde karışmalarını sağlamak amacıyla serpantin tipi mikrokarıştırıcıları kanal yüzeyine ekleyerek türbilant-benzeri akış elde etmeyi hedeflemişlerdir. Khan ve ark. (2016), tasarladıkları 14 kanaldan oluşan düz ve

silindirik mikoreaktörlerde butanol gazının dehidrasyon reaksiyonunu mikrokanalları kapladıkları $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ kataliz molekülü ile difüzyon profilini çıkararak simüle etmişlerdir. Dehidrasyon reaksiyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla toplam hacmi 50 μl , çapı 500 μm , derinliği 250 μm ve uzunluğu 25 mm olan mikoreaktör kanallarını butanolün katalizini gerçekleştirecek olan $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ katalizi ile kaplamış ve daha sonra butanol gazını $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ kaplı kanallar içerisinden geçirerek gaz-kataliz arasındaki difüzyona bağlı dehidrasyon mekanizmasının COMSOL Multiphysics® programı yardımıyla simülasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışma süresince kütle transfer kısıtlamalarını engelleyebilmek adına kataliz kaplama kalınlığı ince tutulan çalışmada, daha etkili reaksiyon sonuçlarının alınması için düz kanallar yerine gazın kanal duvarlarıyla daha fazla etkileşebileceği yüzey modifikasyonların kullanılması ve kataliz kaplamanın 25 μm 'den daha kalın olması gerektiği vurgulanmıştır. Bu çalışmada ise mikrokanallar herhangi bir substrat veya kataliz malzemesiyle kaplanmamış, reaksiyonu gerçekleştirecek olan her iki reaktif de sıvı solüsyonlar halinde kanallar içerisine eş anlı olarak sunulmuştur. Kanal uzunluğunun artırıldığı, kanal kalınlığının ise azaltılarak düşük hacme karşılık uzun kanal büyüklüğüne sahip mikrokanallarda difüzyon etkisi gözlemlenmiştir. Düşük akış hızına karşılık, mikron büyüklükteki kanal içerisinde akışı sağlanan iki farklı solüsyonun gerek aldıkları yol, gerekse yüzey alanı/hacim oranına bağlı olarak yüksek difüzyon özelliği gösterdiği bilinmektedir (Nguyen ve Wereley, 2006).

4.3.1 Spektrofotometre sonuçları

Substrat/Enzim oranı 4:1 olan ve klasik uygulamalarda olduğu gibi bir tüp içerisine hem substrat hem de enzim örneğinin konularak vortex karıştırıcı üzerinde karıştırılması sağlanan örnekler ile bu çalışma bünyesinde tasarlanmış olan mikroçip içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonun karşılaştırmalı spektrofotometrik analizleri tamamlanmıştır (Şekil 4.3.1 ve Şekil 4.3.2). Sonuçlar incelendiğinde, mikroakışkan sistemlerin en belirgin özelliklerinden biri olan, yüksek difüzivite kabiliyetleri sayesinde, herhangi bir mikrokarıştırıcıya gerek duymadan spiral kanal içerisinde gerçekleştirilen karıştırmanın, çip dışında vorteks karıştırıcı ile yapılan karıştırmaya denk bir karıştırma gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.

Enzim aktivite değerleri hesaplandığında, mikroçip içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonların, mikroçip dışında, tp içerisinde ve yüksek substrat/enzim miktarı gerektiren geleneksel yollarla gerçekleştirilen reaksiyonlara karşılık daha hassas bir sonuç verdiği gözlemlenmiştir (izelge 4.1).

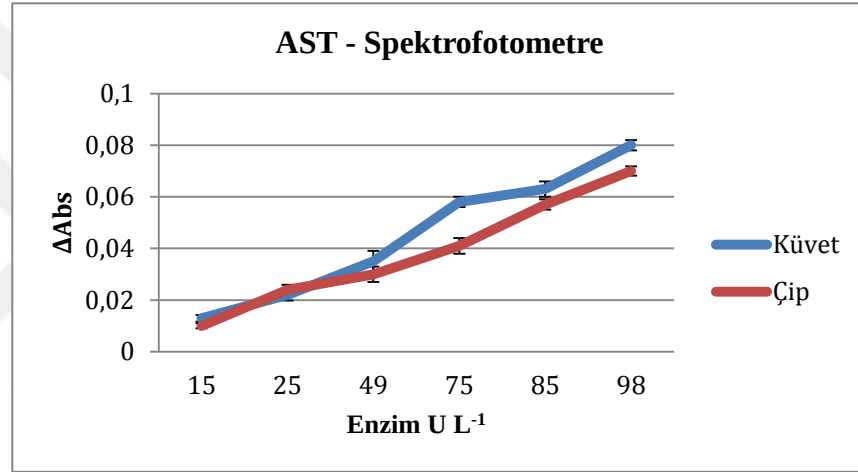


şekil 4.3.1 ALT enzimine ait hem ip içerisinde hem de ip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri

Çizelge 4.1. Spektrofotometre ile lmlenen ALT enziminin ip ve ip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri

Bilinen ALT Aktivitesi	Δ Abs	Elde Edilen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs	Elde Edilen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)
(IU L ⁻¹)	Küvet		ip	
15	0.015	15.43	0.020	20.26
25	0.025	25.72	0.032	32.41
49	0.047	48.36	0.051	51.66
75	0.065	66.88	0.063	63.81
85	0.070	72.03	0.073	73.94
98	0.073	75.11	0.076	76.98

Deneme sırasında aktivite değerleri bilinen (15 U L^{-1} , 25 U L^{-1} , 49 U L^{-1} , 85 U L^{-1} , 98 U L^{-1}) ALT ve AST enzimleri kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, toplamda 1 ml substrat ve 200 μl enzim solüsyonu gerektiren spektrofotometrik ölçülerin her iki enzim için de ne mikroçip uygulamasında ne de manuel uygulamasında bilinen aktivite değerlerine ulaşamadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, enzimlerin temin edildiği şirket ile görüşüldüğünde, spektrofotometrik ölçümdeki hatanın, spektrofotometrenin kalibre olmamasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Bu bilgi üzerine sonuçlar yeniden incelendiğinde, her iki enzim için hem mikroçip içeren hem de mikroçip dışında gerçekleştiren denemelerin birbirine paralel değerler verdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3.2 AST enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri

Çizelge 4.2 Spektrofotometre ile ölçümlenen AST enzimine çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri

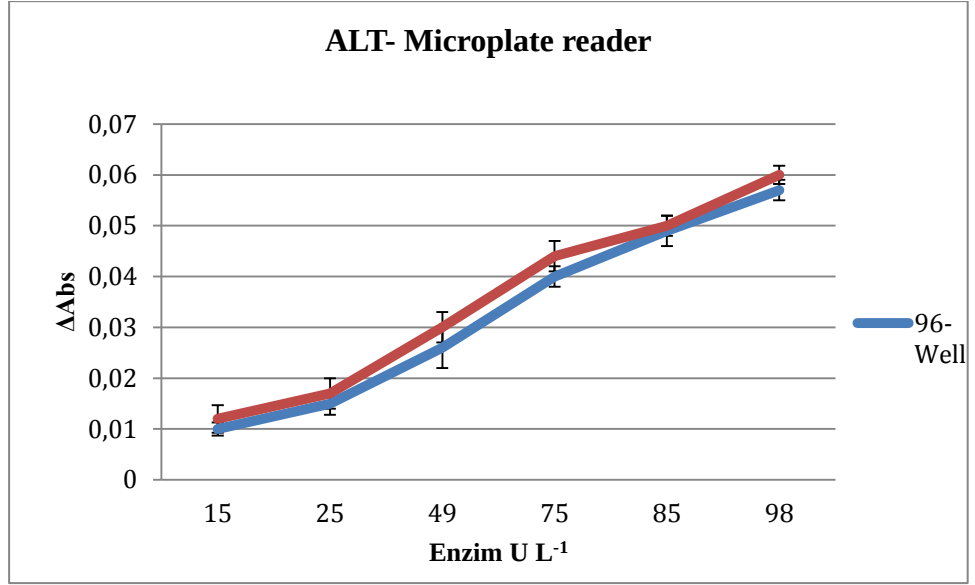
Bilinen AST Aktivitesi	Δ Abs	Elde Edilen AST Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs	Elde Edilen AST Aktivitesi (IU L ⁻¹)
(IU L ⁻¹)	Küvet		Çip	
15	0.013	13.38	0.010	10.13
25	0.022	22.64	0.024	24.31
49	0.035	36.01	0.030	30.39

75	0.058	59.68	0.041	41.53
85	0.063	64.82	0.057	57.73
98	0.080	82.32	0.070	70.90

4.3.2 Mikroplaka okuyucu sonuçları

Optimum süre ve miktarların 3 dakika ve 10 µl/dakika enzim, 30 µl/dakika substrat solüsyonu olarak belirlendiği reaksiyon denemeler (toplam 120 µl reaksiyon ortamı) , T boru yardımıyla substrat ve enzim solüsyonlarının kanala yüklenmesi ile başlatılmıştır. Mikroplate okuyucu cihazında kullanılmak üzere 96 kuyucuklu plaka içerisine aktarılan farklı konsantrasyonlardaki reaksiyon ürünleri ise analize tabi tutulmuştur (Şekil 4.3.3. ve Şekil 4.3.4.). Elde edilen sonuçlar gözlemlendiğinde, mikroçip içerisinde gerçekleştirilen reaksiyonların enzim aktivite değerlerin, mikroçip dışında manuel olarak gerçekleştirilen reaksiyonlardaki değerlere paralel fakat daha yüksek olduğu testpit edilmiştir.

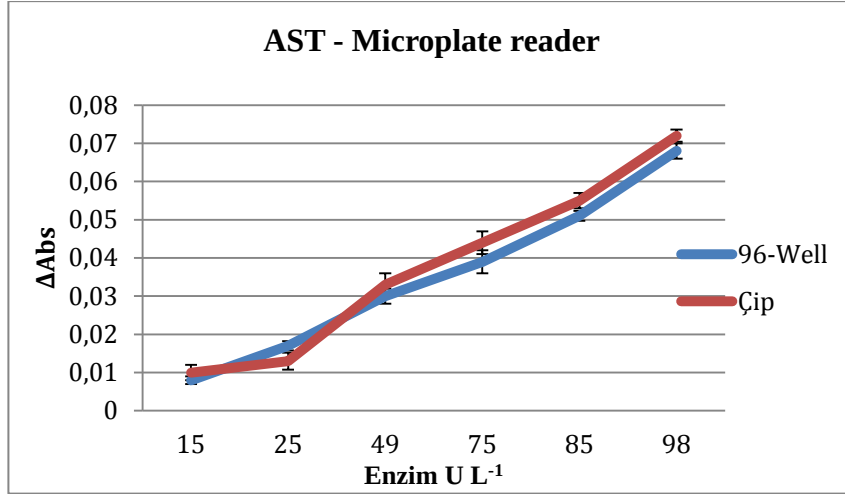
Deneme sırasında aktivite değerleri bilinen (15 U L^{-1} , 25 U L^{-1} , 49 U L^{-1} , 85 U L^{-1} , 98 U L^{-1}) ALT ve AST enzimleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda gözlenen bir diğer husus ise, kan serumundaki normal aktivite değeri $7-56 \text{ U L}^{-1}$ olan ALT enziminin, mikroçip denemelerinde 49 U L^{-1} aktivite değerinden itibaren bilinen aktivite değerine yüksek hassasiyet gösterdiği ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlara göre daha doğru sonuç vermesidir. Bu durum, kan serumundaki normal aralığı $5-40 \text{ U L}^{-1}$ olan AST enziminde de benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.3.3 ALT enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri

Çizelge 2.3. Mikroplaka okuyucu ile ölçümlenen ALT enzimine çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri

Bilinen ALT Aktivitesi	Δ Abs	Elde Edilen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs	Elde Edilen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)
(IU L ⁻¹)	96 - Well		Çip	
15	0.010	16.08	0.012	19.29
25	0.015	24.12	0.017	27.33
49	0.026	41.80	0.030	48.23
75	0.040	64.31	0.044	70.74
85	0.049	78.78	0.050	80.39
98	0.057	91.64	0.060	96.46



Şekil 4.3.4 AST enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri

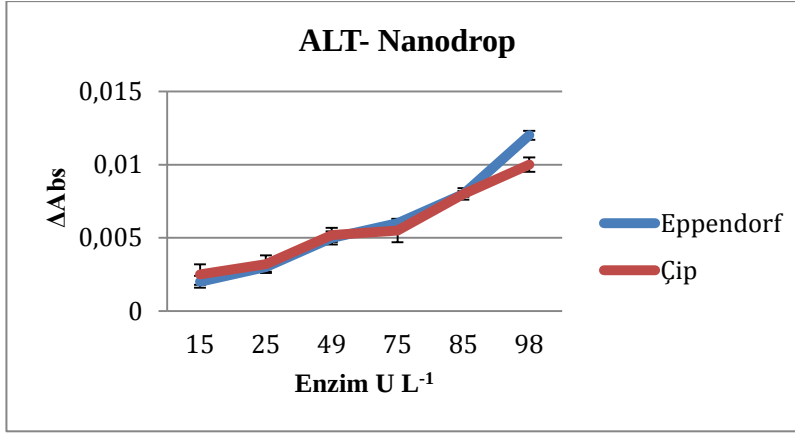
Çizelge 4.4. Mikroplaka okuyucu ile ölçümlenen AST enzimine çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri

Bilinen AST Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs 96 - Well	Elde Edilen AST Aktivitesi (IU L-1)	Δ Abs Çip	Elde Edilen AST Aktivitesi (IU L-1)
15	0,008	12.86	0,010	16.08
25	0,017	27.33	0,013	20.90
49	0,030	48.23	0,033	53.05
75	0,039	62.70	0,044	70.74
85	0,051	81.99	0,055	88.42
98	0,068	109.32	0,072	115.76

4.3.3 Nanodrop sonuçları

Spektrofotometre ve mikrolaka okuyucu ölçümleme ve uygulama metodlarıyla benzer basamaklar izlenen nanodrop analizleri için seçilen toplam süre 5 dakika olup, çip içerisine doldurulan reaksiyon ortam hacmi ise mikrolaka okuyucu denemelerine paralel olarak 120 µl olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ürünlerinin test edilmesi ve absorbans değerlerinin alınması açısından nanodrop üzerine 1,5 µl'lik örnekler damlatılarak değerler elde edilmiştir.

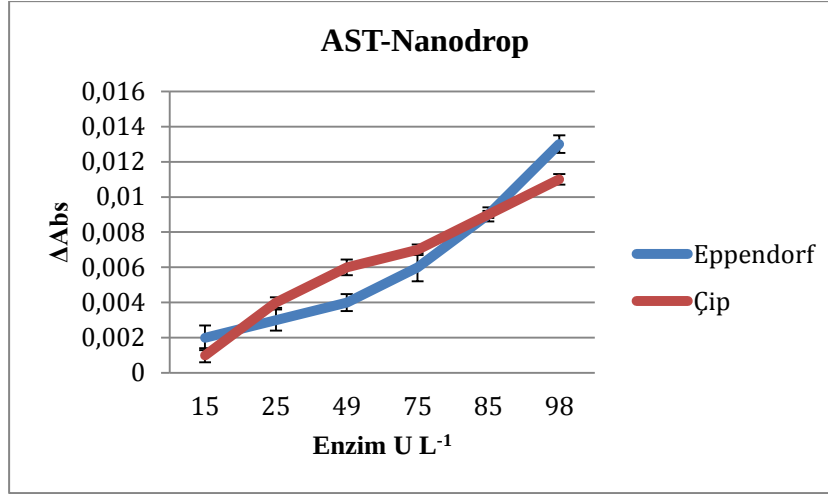
Nanodrop sonuçları, spektrofotometre ve mikrolaka okuyucu ölçümleri ile karşılaştırıldığında, 98 U L⁻¹ aktivite değerine sahip enzim örneklerinde hem mikroçip içerisinde hem de eppendorf içerisinde gerçekleştirilen deneme sonuçlarında normal değerinin üzerinde olduğu görülmüştür. Bu farklılığı anlamlandırmak için hata oranları hesaplandığında mikroçipte gerçekleştirilen reaksiyonların hata oranları 13 % ve eppendorf içerisinde gerçekleştirilen denemelerin hata oranları 25% olarak belirlenmiştir. Hata oranları sadece nanodrop ölçümlerinde yüksek çıkmış ve bu durum nanodrop ölçümlerinin enzim aktivitesindeki artışı doğru göstermesine karşılık elde edilen sayısal verilerin mikrolaka okuyucu ve spektrofotometre okumalarına karşılık daha az gerçeği yansıttığını göstermektedir. Bu farklılığın sebebi olaraksa klinik tanılarda kullanılan AST ve ALT enzim aktivitelerinin 24 saat içerisinde aktivite değerlerinde farklılıkların meydana gelmesi ve bu nedenle farklı aktivite değerlerinin gözlenmesine neden olması olarak yorumlanmaktadır. Farklı cihazlarda okunan ve elde edilen aktivite değerlerinin birbirine paralel fakat farklı sonuçlar göstermesi ise cihazların enzimlere spesifik olarak kalibre edilmemesinden kaynaklanmaktadır. Klinik olarak gerçekleştirilen spektrofotometrik okumalarda, cihazların enzim spesifik sentetik serumlarla kalibrasyonları gerçekleştirilerek hasta örneklerinin okumaları gerçekleştirilmektedir (Vroon ve Israili, 1990).



Şekil 4.3.5 ALT enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri

Çizelge 4.5. Nanodrop ile ölçümlenen ALT enzimine çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri

Bilinen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs Eppendorf	Elde Edilen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs Çip	Elde Edilen ALT Aktivitesi (IU L ⁻¹)
15	0.002	20.58	0.003	25.32
25	0.003	30.87	0.003	32.41
49	0.005	51.45	0.005	52.67
75	0.006	61.74	0.006	55.71
85	0.008	81.03	0.008	82.32
98	0.012	123.47	0.010	101.29



Şekil 4.3.6 AST enzimine ait hem çip içerisinde hem de çip dışında gerçekleştirilen reaksiyon denemeleri

Çizelge 4.6. . Nanodrop ile ölçümlenen AST enzimine çip ve çip dışında gerçekleştirilen reaksiyonlarda belirlenen enzim aktivite değerleri

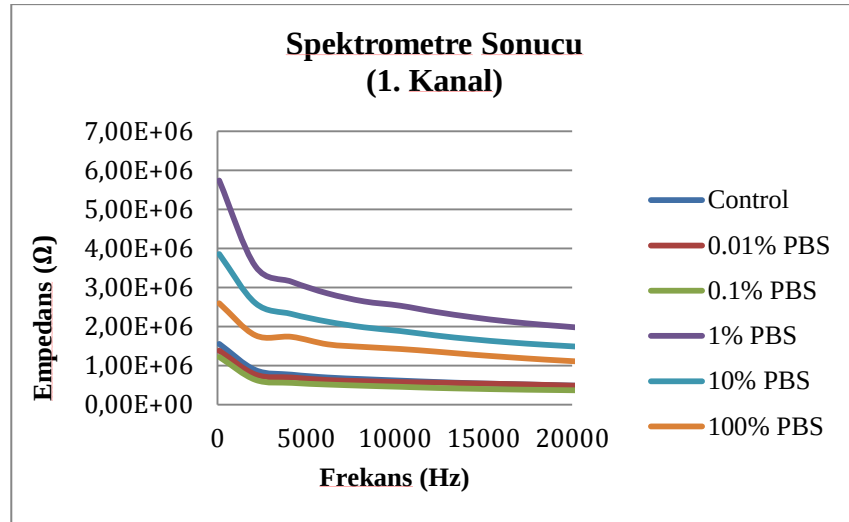
Bilinen AST Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs Eppendorf	Elde Edilen AST Aktivitesi (IU L ⁻¹)	Δ Abs Çip	Elde Edilen AST Aktivitesi (IU L ⁻¹)
15	0.002	20.58	0.001	10.13
25	0.003	30.87	0.004	40.51
49	0.004	41.16	0.006	60.77
75	0.006	61.74	0.007	70.90
85	0.009	92.60	0.009	91.16
98	0.013	133.76	0.011	111.41

4.4 Kağıt Tabanlı Mikroçiplerin Analiz Sonuçları

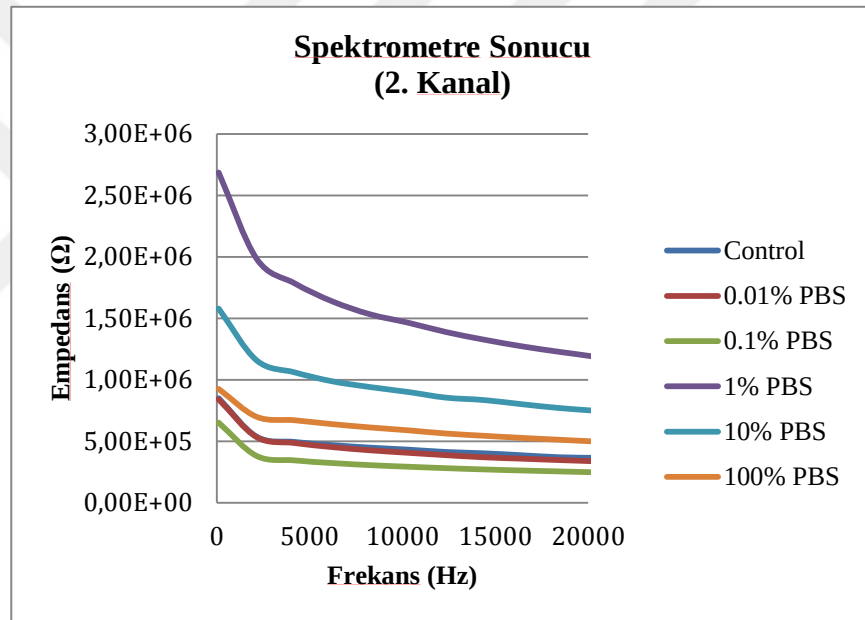
4.4.1 LCR Spektrometre sonuçları

0-20 KHz arası uygulanan frekans aralığı sonucu elde edilen spektrometrik grafik incelendiğinde, hem birinci kanala ait hem de ikinci kanala ait empedans değişimlerdeki dağılımın en belirgin olarak 10 KHz değerinde alındığı görülmektedir. Frekans değerleri arasındaki bu dağılım, her bir konsantrasyona ait parabolik doğrunun birbirlerinden ayırt edilebilir mesafede olduğu ve doğru üzerindeki dalgalanmaların sona erdiği noktalardan itibaren seçilmektedir. Şekil 4.4.1 incelendiğinde 5 KHz değerinden itibaren doğruların birbirlerine paralel şekilde ilerlediği ve dalgalanmaları sona erdiği gözlenmektedir. Parabolik doğruların birbirlerine göre optimum uzaklıkta konumlandıkları değer olarak 10 KHz frekans değeri belirlenmiş ve bu frekans değerinde 2. kanala eklenen solüsyonların da benzer dağılım gösterdikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle sensitivite ve spesifite testleri için uygulanacak olan frekans değeri olarak 10 KHz belirlenmiştir.

Literatürde yer alan ve esnek plastik yüzey üzerine gümüş-grafen elektrodların eklenerek elektriksel iletimin ölçüldüğü bir mikroçip platformu geliştirilen çalışmada, iletkenliği konsantrasyondaki artışa bağlı olarak artış gösteren PBS solüsyonları hazırlanarak 1-10 KHz arası frekans aralıklarına karşılık empedans değişimleri incelenmiştir (Shafiee ve ark., 2015). Safavieh ve ark. (2017), nitroselüloz temelli kağıt kullanarak ürettikleri mikroçiplerde optimum frekans aralığını 1 KHz olarak belirlerken, Meisser ve ark. (2012), farklı bir yaklaşımla PDMS reaktörler içerisine titanyum ve platinyum elektrodları ekledikleri çalışmada ise yine artan PBS konsantrasyonuna karşılık frekans-empedans grafiğinden yararlanarak parabolik dağılımların optimum seviyede olduğu frekans değerini elde etmişlerdir.



Şekil 4.4.1 Kağıt tabanlı mikroçipin ilk dairesel kanalına ait spektrometrik analiz

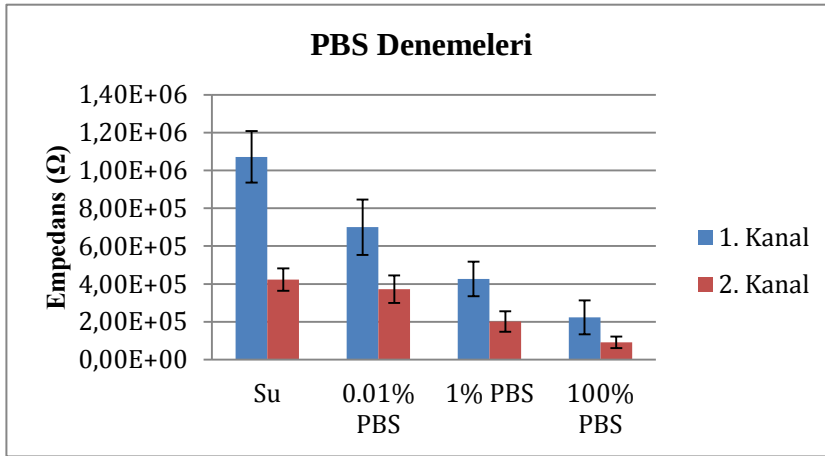


Şekil 4.4.2 Kağıt tabanlı mikroçipin ikinci dairesel kanalına ait spektrometrik analiz

4.4.2 Sensitivite sonuçları

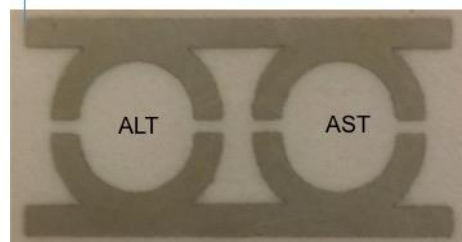
Öncelikli olarak, artan iyonik yüke karşı düşmesi beklenen empedans değeri, iletken özellik gösteren PBS solüsyonunun 0.01% (w/w) 'lık değerden 100% (w/w)'e doğru artış gösteren konsantrasyonlarında ölçümlenmiştir (Şekil 4.4.3.). Sonuçlar incelendiğinde, her iki mikrokanalda da artan PBS konsantrasyonuna karşılık azalan empedans değerleri gözlemlenmiştir. Bu deneme sonucunda, kullanılan elektrod tipinin ve tercih edilen çalışma hacminin empedans denemelerine uygun olduğu sonucuna varılmıştır. LCR metre cihazı

kullanılarak yapılan bir diğer literatür çalışmasında ise bu çalışmaya paralel tek bir platform üzerinde çoklu dedeksiyon hedeflenen çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki PBS solüsyonları (0.125 X, 0.25 X, 0.5 X, 1 X, 2 X) hazırlanmış ve üzeri elektrodlarla kaplı olan PDMS mikroçip kanallar içerisine yüklenmiştir. Tüm kanallardaki empedans değişimleri zamana bağlı olarak frekans grafiğine dökülmüş ve artan PBS konsantrasyonuna bağlı olarak düşük empedans değeri elde edildiği gözlemlenmiştir (Meisser ve ark., 2012).



Şekil 4.4.3 Farklı konsantrasyonlardaki PBS'lere ait empedans değişimleri

PBS denemelerinin ardından, çalışabilirliği tescillenen kağıt tabanlı mikroçip, farklı aktivite değerlerindeki ALT ve AST enzimlerinin ölçülmesi için kullanılmış ve bu amaçla, polimer tabanlı mikroçiplerdeki çalışma hacmine paralel olarak reaksiyon gerçekleştirilmiş ve reaksiyon ürünlerinin empedans değerleri not edilmiştir. Çoklu enzim dedeksiyonunun hedeflendiği bu çalışmada, kullanılan kağıt tabanlı mikroçipin 1. kanalına ALT ve 2. kanalına ise AST enzimine ait substratlar eklenerek, reaksiyon tabanları hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.4.4.).

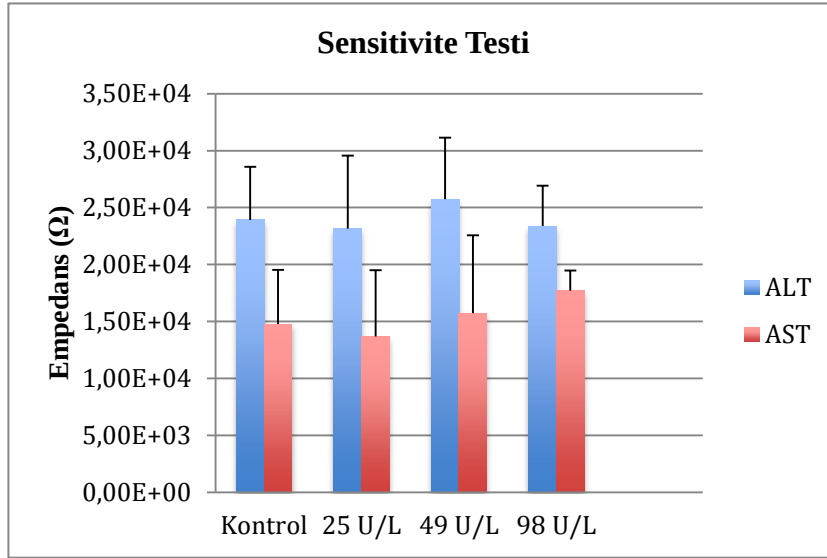


Şekil 4.4.4. ALT ve AST enzimine ait substratların eklendiği kağıt tabanlı mikroçipler.

Çalışma sonucunda, tüm aktivite değerleri bir grafik haline dökülerek (Şekil 4.4.5.) aktivite değerine bağlı olarak empedans değerlerinde artma veya azalma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, artan ALT ve AST aktivite değerine karşılık, empedans değişimlerinde tutarlı bir değişim olmadığını göstermiştir. Literatürde yer alan ve indirgenme-yükseltgenme tabanlı enzimatik reaksiyonlara spesifik elektrokimyasal elektrodların üretildiği ve cyclic voltammetry yöntemi ile reaksiyon sonucu oluşan elektronların dedeksiyonunun sağlandığı çalışmalarda farklı tipteki birden fazla elektrod komplekslerinin oluşturulduğu görülmektedir. Bu çalışmada ise gümüş-grafen karışımı elektrodların kullanılarak, üretimi kolay ve pratik olan kağıt tabanlı mikroçiplerin boş empedans değerlerinin, reaksiyon sonucu oluşan elektron çiftlerinden kaynaklanan elektriksel yükün miktarına bağlı olarak anlamlı bir farklılık oluşturması beklenmiştir. Bu yönüyle, mevcut çalışmanın literatürdeki karşılığının genellikle antikor-antijen ilişkisine dayalı olan reaksiyonlarda veya hücre endeksli polimer tabanlı mikroçiplerde, hücredeki tokisiste, abnormal değişim, farklılaşma vb. durumlarda konsantrasyondaki değişime bağlı empedans değişimlerinin anlamlı değişimleri olduğu görülmektedir (Kiilerich-Pedersen ve ark., 2012; Migita ve ark., 2010 ; Khalil ve ark., 2014). Örneğin, kanda bakteriyel enfeksiyonun hızlı tespiti amacı güden bir literatü çalışmasında *E.coli* ve metisilin direnci kazanmış olan *S. aureus* bakterilerine ait antijen-antikor çiftleri kullanılarak bu bakterilerin farklı tipte ve konsantrasyondaki antibiyotiklere karşı gösterdiği tepki, empedans değişimlerine dayalı olarak tespit edilmistir (Shavieh ve ark., 2017). Benzer şekilde hücre tabanlı biyosensörlerin kullanıldığı ve tümör metastaz modellerinin hücredeki empedans değişimine bağlı olarak tespit edilmesi üzerine yoğunlaşılın çalışmalar mevcuttur (Yun ve ark., 2009).

AST ve ALT enzim reaksiyonlarının neden oldukları empedans değişimlerinden Anlamlı bir sonuç elde edilememe sebebi, gerçekleştirilen reaksiyon ürünü olarak oluşan elektron sayısının, kağıt taban içerisinde difüzyon engeline takılara iletiminin homojen bir şekilde karşılıklı elektrodla iletilememesi ve buna bağlı olarak farklı aktivite değerlerindeki enzimlerin kullanına karşılık anlamlı değişimlerin elde edilememesi olarak yorumlanmıştır. Benzer kısıtlamaların önüne geçebilmek amacıyla literatürde yer alan çalışmalarda, kağıt tabanlı mikroçip yüzeyinin iletkenliğinin arttırılarak elektron

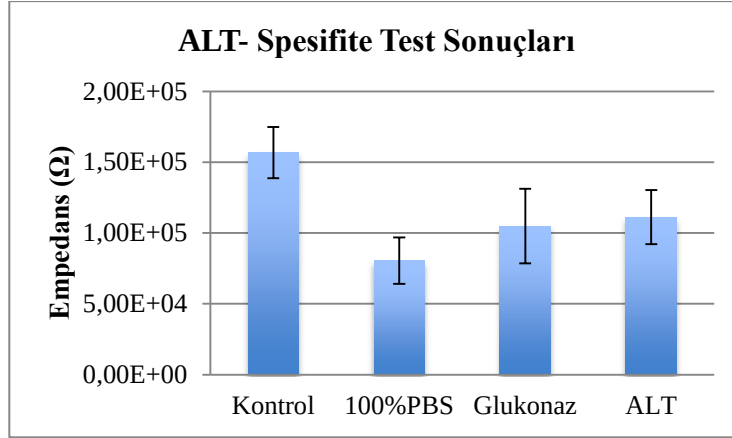
akışının daha etkili bir şekilde sağlandığı görülmektedir (Shafiee ve ark., 2014; Shavieh ve ark., 2017). Elektrokimyasal elektrotlarda genellikle platinyum ve gümüş-gümüş klorür kaplamaların kullanıldığı görülmektedir. Buradan hareketle sistemin iletkenliğinin platinyum nanopartiküllerin eklentisi sonucu arttırılarak reaksiyonların tekrar edilmesi halinde, etkili değişimlerin gözlemlenmesi beklenmektedir.



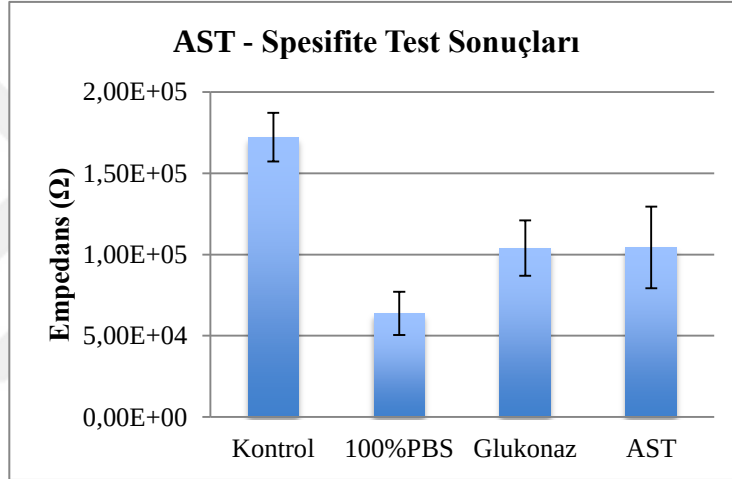
Şekil 4.4.5 Farklı aktivite değerlerindeki AST ve ALT enzimlerine ait empedans değişimleri

4.4.3 Spesifite sonuçları

ALT ve AST enzimlerine ait sensitivite testlerinin ardından, sistemin her iki enzime de spesifiklik gösterip göstermediği gözlemlenmiştir. Bu amaçla her iki enzime ait substrat solüsyonları, 100 U L^{-1} aktivite değeri gösteren glukonaz enzimi ile karıştırılmış ve reaksiyon sonuçları grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.4.6. ve Şekil 4.4.7.).



Şekil 4.4.6 ALT enzimine ait spesifite sonuçları



Şekil 4.4.7 AST enzimine ait spesifite testi

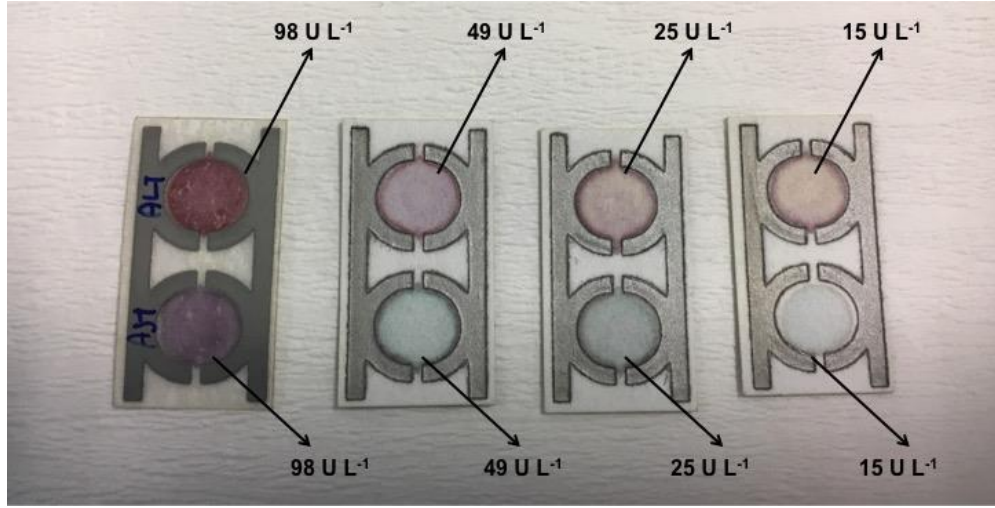
Spesifite testi sonuçları ile gösterilmek istenen, glukonaz enziminin ALT ve AST spesifik substrat solüsyonları ile reaksiyon vermemesi ve ortamda herhangi bir elektron açığa çıkarılamaması nedeni ile gerek ALT gerekse AST enziminin verdiği empedans değerinden daha yüksek bir değer göstermesidir. Fakat sonuçlar incelendiğinde, hem ALT hem de AST enzimine ait spesifite testlerinde glukonaz enziminin reaksiyon sonucu verdiği empedans değerinin hem AST hem de ALT enzimine benzer değerde olduğu gözlemlenmektedir. Her üç enzimin de benzer empedans değerinde sonuç verme sebebi incelenirken bazı alınması gereken veri, PBS ve kontrol (distile su) empedans değerleridir. Temelde iyonik ortam koşulları sağlandığında, iletkenliğin artışıyla birlikte empedans değerinde azalış beklenmektedir. Kontrol olarak kullanılan distile suyun 100% (w/w) PBS solüsyonuna göre iletkenliğinin düşük olduğu bilinmektedir.

Dolayısıyla grafik incelendiğinde PBS solüsyonuna ait empedans değerinin kontrol grubuna ait empedans değerinden oldukça yüksek olduğu görülmekte, bu durum ise sistemin çalışabilir durumda olduğunu ve iletkenliğe karşı duyarlı olduğunu kanıtlamaktadır. Öte yandan enzimatik reaksiyonlar incelendiğinde, AST ve ALT enzimlerinin, kendilerine spesifik olan substratlarla farklı kanallarda verdikleri reaksiyon sonucu oluşan elektron çiftlerinin karşılıklı elektrodlar arasındaki kağıt taban içerisindeki difüzyon kısıtına takılarak anlamlı bir sonuç vermediği, değişen empedans değerinin ise kağıt yüzey üzerindeki direncin farklı bir solüsyon eklenmesi nedeniyle değişmesine dayalı olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde glukonaz enziminin, ne ALT ne de AST enzimine ait substratlar ile reaksiyon vermediği halde empedans değişiminin her iki enzime paralel şekilde değişmesi ise yine kağıt zemin üzerindeki direncin değişmesine dayalı olduğu şeklinde yorumlanmaktadır.

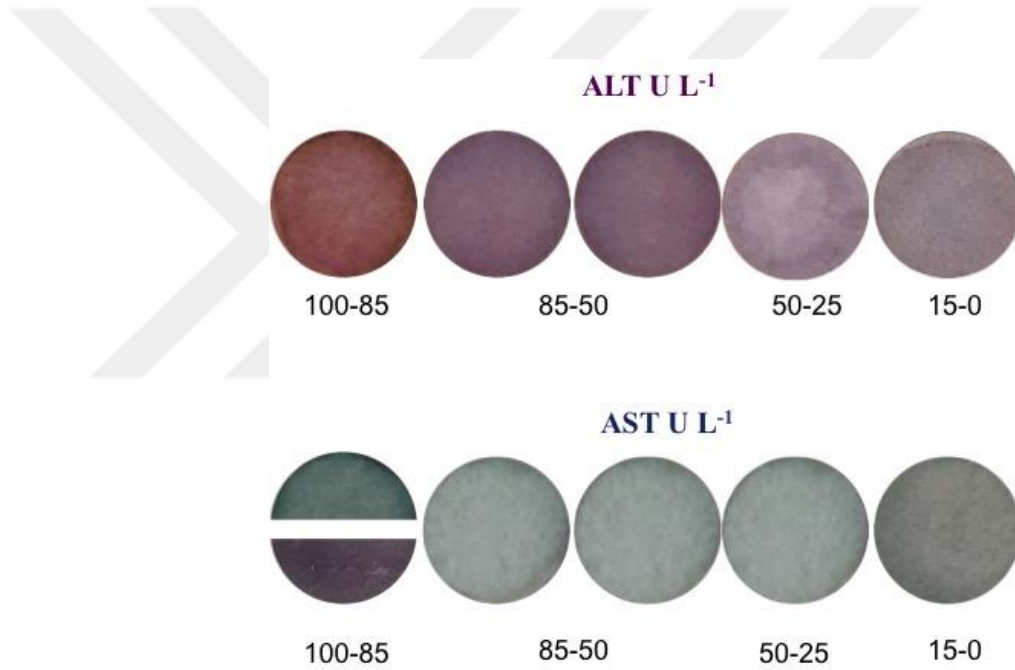
4.4.4 Renk değişim sonuçları

Kalitatif analiz için gerçekleştirilen renk değişim testi hem ALT ve AST enzim reaksiyonları için uygulanmıştır. Farklı aktivite değerleri gösteren enzimlerin sabit substrat konsantrasyonu ile verdikleri reaksiyon sonucu oluşan ürün, kağıt tabanlı mikroçip üzerine emdirilmiştir. Daha sonra renk değişimini sağlaması için emdirilen hacmin (4 µl) 2.5 katı hacimde (10 µl) 0.01%(w/v) ninhidrin solüsyonu kağıt üzerine emdirilmiş ve hot plate ısıtıcı üzerinde (50 °C) 1 dakika boyunca ısıtılmıştır. Farklı aktivite değerlerine karşılık gelen renk değişimleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4.7).

ALT enzimi için sonuçlar incelendiğinde, 98 U L⁻¹ aktivite değerine karşılık gelen enzimin verdiği reaksiyon sonucunun mor-kırmızı arası bir renk verdiği gözlemlenirken düşük aktivite değerlerinde bu rengin açık pembe rengine döndüğü görülmüştür. AST enzimi için ise 98 U L⁻¹ aktivite değerine karşılık gelen enzimin verdiği reaksiyon ürünü mor renge sahipken düşük aktivite değerlerine sahip enzimlerin verdiği renk değişimi açık maviye dönmüştür (Şekil 4.4.8).



Şekil 4.4.4 Farklı aktivite değerlerindeki ALT ve AST enzimlerin verdikleri reaksiyon sonuçlarının kalitatif analizleri.



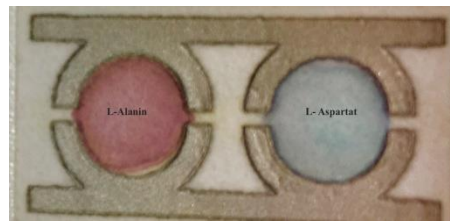
Şekil 4.4.5 ALT ve AST enzimlerinin farklı aktivite değerlerine bağlı olarak elde edilen renk değişim skalası

Ninhidrin boyası, aminoasitlerle reaksiyona girip ısıtıldıklarında çoğu aminoasidin mor-menekşe rengini almasında rol oynamaktadır. Bu durum, tüm aminoasitlerin ayırt edilebilirliğini engellediği için ninhidrin solüsyonunun sülfosalisilik asit ile karıştırılarak aminoasitlerle farklı renk elde etmeyi amaçlayan çalışmalar olduğu görülmektedir. Basak ve ark. (1993), 22 farklı aminoasit ile yaptıkları çalışmada ninhidrin-sülfosalisilik asit boya karışımı kullanarak sıcaklık uygulaması öncesi ve sonrası renk değişimlerini gözlemlemiştir. Benzer şekilde Elgubbi ve Mlitan (2015), aynı boya karışımını

deneyerek TLC (ince tabaka kromatografisi) sistemi üzerinde farklı aminoasitlerin spesifik renk dağılımlarını test etmiştir.

AST ve ALT enzimlerine ait substratların ve ürünlerin aminoasitler olması nedeniyle, ninhidrin ile boyamanın gerçekleştirildiği çalışma sonucu meydana gelen renkler literatürde yer alan ve ninhidrin ile renk değişimleri raporlanmış olan referans aminoasitlerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışma bünyesinde ALT enzim reaksiyonuna ait substrat olan L-Alanin aminoasidinin tek başına ninhidrin ile verdiği reaksiyon sonucu açık pembe renk elde edilmiştir. Daha sonra enzimatik reaksiyon gerçekleştirilmiş ve oluşturulan ürün olan L-Glutamatın renk analizi gerçekleştirildiğinde, enzim enzim aktivitesindeki artışa bağlı olarak mor rengin elde edildiği, düşük aktiviteye sahip enzimlerde ise mor rengin açılarak menekşe rengine döndüğü görüşmüştür. L-Alanin aminoasidinin, ninhidrin ile muamelesi sonucu elde edilen rengin grimsi-pembe ve L-Glutamatın ninhidrin ile muamelesi sonucu koyu pembe renk verdiği literatürde yer almaktadır (Basak ve ark., 1993).

Literatürdeki verilere paralel olarak AST enzimine ait substrat olan L-Aspartatın ninhidrin ile grimsi-menekşe rengi verdiği ve reaksiyon sonucu bu renk değişiminin düşük aktivite değerlerinde grimsi, yüksek aktivite değerlerinde ise mor ve mavimsi bir renk oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.9).



Şekil 4.4.9. L-Alanin (1. Kanal) ve L-Aspartat (2. Kanal) aminoasitlerinin ninhidrin ile verdikleri renk değişim sonuçları

ALT ve AST enzim aktivitelerinin kolorimetrik yöntemlerle tayinini hedefleyen bir başka çalışmada ise Pollock ve ark. (2012), reaksiyon ürünlerinin renk analizlerini gerçekleştirmek amacıyla ninhidrin yerine her iki reaksiyon için de farklı boya sistemleri kullanmışlardır. Örneğin, ALT enzim reaksiyonlarındaki renk değişimi için kullandıkları dimetilaminobenzoik asit (DABA) solüsyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pirüvatın, pirüvat oksidaz ile oksitlenmesi sonucu oluşan

hidrojen peroksidin konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan kırmızıya doğru bir skala oluşturmuşlardır. alışmalarında 0-119 U L⁻¹ değerleri arasında elde edilen renk dağılımının belirgin bir farklılık göstermediği, 201-400+ U L⁻¹ değerleri arasında ise kırmızı rene dönüşümün görüldüğü belirtilmiştir. Benzer şekilde AST enzimi ile yapılan çalışmada ise boya solüsyonu olarak Metil Yeşil Pironin (methyl green), Rhodamin B, Thriton X ve polivinil alkol (PVA) karışımı kullanılmış ve reaksiyon sonuçları bir renk sklası içerisinde sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar, bu tez çalışması sırasında ninhidrin boyamasıyla elde edilen verilere benzer şekilde 0-100 U L⁻¹ değerleri arasında bir değişiklik göstermezken 120 U L⁻¹ ve üzeri enzim aktivite değerlerinde mor renkten pembe rene dönüşümün gerçekleştiğini göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer enzimlerinin tasarlanan polimer, cam ve kağıt bazlı mikroplatformlar içerisinde gerçekleştirdikleri reaksiyon sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Tespit yöntemleri olarak ise spektroskopik analiz, elektriksel ölçüm ve kalitatif renk analizi kullanılan çalışmada en iyi sonuçların spektroskopik analizlerle elde edildiği gözlemlenmiştir. Spektrofotometrik analizleri takiben renk analiz sonuçları ile değişen enzim aktivitelerine paralel olarak anlamlı renk değişimleri elde edilmiştir. Elektriksel algılama modelinde ise daha karmaşık yapı ve optimizasyon parametrelerini ile tasarlanmış olan elektrod sistemlerinin bu çalışma için anlamlı sonuç vermediği gözlemlenmiştir. Üç ayrı ölçüm metodunun uygulandığı bu tez çalışmasının, ileriki çalışmalar için bir temel oluşturması beklenmektedir.

İlerleyen mikroakışkan teknolojisinin günümüzdeki uygulamaları göz önünde bulundurulduğunda, pratik ve ekonomik tanılama sistemlerinin kağıt tabanlı mikroçiplerle sağlanmaya başlandığı görülmektedir. Bu nedenle elektriksel ölçüm metodunun optimize edilerek ALT ve AST enzimlerine spesifik elektrodların kağıt tabanlı mikroçiplerle entegre sistemler halinde üretilmelerinin gerek akademik çalışmalarda gerekse ticari uygulamalarda kullanılabilecek sistemler haline gelebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alam, M.N.H.Z., Pinelo, M., Samanta, K., Jonsson, G., Meyer, A., Gernaey, K.V.,** 2011, “A continuous membrane microbioreactor system for development of integrated pectin modification and separation processes”, *Chem. Eng. J.* 167, 418–426.
- Amacher, D.E.,**1998, “Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs”, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 27, 119–130, 367–379.
- Bhatia, S.N., Ingber, D.E.,** 2014, “Microfluidic organs-on-chips”, *Nat. Biotechnol* 32,760–772.
- Cho, Y.K., Kim, J., Lee, Y., Kim, Y.A., Namkoong, K., Lim, H.,** 2006, “Clinical evaluation of micro-scale chip- based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus” *Biosens Bioelectron* 21:2161–9
- Ersoy, O.,** 2012, “Evaluation of elevated liver enzymes” *Ankara Medical Journal* 12: 129–135
- Forsberg, E.M., Green, J.R.A., Brennan, J.D.,** 2004, “Continuous flow immobilized enzyme reactor-tandem mass spectrometry for screening of AChE inhibitors in complex mixtures” *Anal. Chem.* 83, 5230–5236.
- Generelli, S., Jacquemart, R., De Rooij, N.F., Jolicoeur, M., Koudelka-Hep, M., Guenat O.,** 2008, “Potentiometric platform for the quantification of cellular potassium efflux”, *Lab. Chip* 8, 1210–1215.
- Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V.,** 2005, “Liver enzyme alteration: a guide for clinicians,” *Can. Med. Assoc. Licens.* 172

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hessel V, Hardt S, Löwe H (2004), Chemical micro process engineering. Weinheim: Wiley-VCH.

Hickey, A.M., Marle, L., McCreedy, T., Watts, P., Greenway, G.M., Littlechild, J.A., 2007, “Immobilization of thermophilic enzymes in miniaturized flow reactors” *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1621–1623.

Hickey, A.M., Ngamsom, B., Wiles, C., Greenway, G.M., Watts, P., Littlechild, J.A., 2009, “A microreactor for the study of biotransformations by a cross-linked - lactamase enzyme” *Biotechnol. J.* 4, 510–516.

Hong, J., Edel, J.B., DeMello, A.J., 2009. “Micro- and nanofluidic systems for high- throughput biological screening”, *Drug Discov. Today* 14, 134–146.

Karataş, A., Sonakın, Ö., 2007, “Mikrofabrikasyon Teknolojisi ve İlaç Taşıyıcı Sistemler üzerinde Uygulamaları,” *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 36(1), 47-74.

Khalil, S. F., Mohktar, M. S., Ibrahim F., 2014, “The Theory and Fundamentals of Bioimpedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases, *Sensors*, 14, 10895-10928

Kiechle, F. L., Main, R. I., 2000, “Blood Glucose: Measurement in the Point-of-Care Setting”, *Laboratory Medicine* Volume 31, 5

Krenková, J., Foret, F., 2004, “Immobilized microfluidic enzymatic reactors”, *Electrophoresis* 25, 3550–3563.

Kiilerich-Pedersen, K., Rozlosnik, N., 2012, “Cell-Based Biosensors: Electrical Sensing in Microfluidic Devices”, *Diagnostics*, 2, 83-96

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B., Vian, A., Santos, A., Garciachoa, F.,** 2006, “Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable - galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: comparison to the free enzyme”, *Biochem. Eng. J.* 31, 14–24.
- La Cour, J. B., Generellia, S., Barbea, L., Guenatb, O. T.,** 2016, “Low-cost disposable ALT electrochemical microsensors for in-vitro hepatotoxic assessment”, *Sensors and Actuators B* 228, 360–365
- Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., Von Stetten, F., Zengerle, R.,** 2010, “Microfluidic lab- on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications” *Chem. Soc. Rev.* 39, 1153–1182.
- Matsuura, S., Ishii, R., Itoh, T., Hamakawa, S., Tsunoda, T., Hanaoka, T., Mizukami, F.,** 2011, “Immobilization of enzyme-encapsulated nanoporous material in a microreactor and reaction analysis” *Chem. Eng. J.* 167, 744–749.
- Matosevic, S., Szita, N., Baganz, F.,** 2011a, “Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors” *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 325–334.
- Migita, S., Wada, K.I., Taniguchi, A.,** 2010, “Reproducible fashion of the HSP70B’ promoter-induced cytotoxic response on a live cell-based biosensor by cell cycle synchronization”, *Biotechnol. Bioeng.* 107, 561–565.
- Ngamsom, B., Hickey, A.M., Greenway, G.M., Littlechild, J.A., Watts, P., Wiles, C.,** 2010, “Development of a high throughput screening tool for biotransformations utilising a thermophilic l-aminoacylase enzyme” *J. Mol. Catal. B: Enzymes* 63, 81–86.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nomura, A., Shin, S., Mehdi, O.O., Kauffmann, J.-M.,** 2004, “Preparation, characterization, and application of an enzyme-immobilized magnetic microreactor for flow injection analysis”, *Anal. Chem.* 76, 5498–5502.
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S.,** 2008, “The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity”, *Toxicology* 245,194–205.
- Pollock, N. R., Rolland, J. P., Kumar, S., Beattie, P. D., Jain, S., Noubary, F., Wong, V. L., Pohlmann R. A., Ryan, U. S., Whitesides, G. M.,** 2012, “A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing, *Sci Transl Med*, 19; 4(152): 152ra129
- Prati D, Taioli E, Zanella A, Torre ED, Butelli S, Vecchio ED.,** 2002, Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med.* 137:1-9.
- Pratt, D.S., Kaplan, M.M.,** 2000, “Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients”, *N Engl J Med*, 342:1266–71.
- Sakai-Kato, K., Kato, M., Toyo’oka, T.,** 2002, “On-line trypsin-encapsulated enzyme reactor by the sol–gel method integrated into capillary electrophoresis”, *Anal. Chem.* 74, 2943–2949.
- Soldatow, V.Y., LeCluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I.,** 2013, “In vitro models for liver toxicity testing”, *Toxicol. Res. (Camb.)* 2, 23–39.
- Torisawa, Y.S., Ohara, N., Nagamine, K., Kasai, S., Yasukawa, T., Shiku, H., Matsue, T.,** 2006, “Electrochemical monitoring of cellular signal transduction with a secreted alkaline phosphatase reporter system”, *Anal. Chem.* 78, 7625–7631.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qin, H., Liu, J., Zhang, Z., Li, J., Gao, G., Yang, Y., Yuan, X., Wu, D., 2014,**
“In situ electrochemical assessment of cytotoxicity of chlorophenols in
MCF-7 and HeLa cells”, *Anal. Biochem.* 462
- Yesil-Celiktas, O., Cumana, S. and Smirnova, I., 2013,** Silica-based monoliths
for enzyme catalyzed reactions in microfluidic systems with an emphasis
on glucose 6-phosphate dehydrogenase and cellulase, *Chem. Eng. J.*,234,
166–172 pp.
- Yun, Y.H.; Eteshola, E.; Bhattacharya, A.; Dong, Z.; Shim, J.S.; Conforti, L.;
Kim, D.; Schulz, M.J.; Ahn, C.H.; Watts, N., 2009,** Tiny medicine:
Nanomaterial-based biosensors. *Sensors* 9, 9275–9299.
- Xiao Y, Zhang B, Liu H, Miklas JW, Gagliardi M, Pahnke A, Thavandiran
N, Sun Y, Simmons C, Keller G, Radisic M., 2014,** Microfabricated
perfusable cardiac biowire: a platform that mimics native cardiac bundle.
Lab Chip, 14, 869-882.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Ecem Saygılı
Adres: Bornova-Izmir
Türkiye

Telefon: +90 535 084 04 92
E-Mail: ecem.sygl@gmail.com
Doğum Yeri: Mersin, Turkey
Medeni Hal: Bekar
Uyruk : T.C

EĞİTİM

- **Harvard Medical School**, Boston, MA, USA
Danışman: PhD. Mohamed Shehata Draz
- *Konuk araştırmacı*, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School
Temmuz 2017 – Eylül 2017
- **KTH Royal Institute of Technology**, Stockholm, İsveç
Danışman : PhD. Xiamo Zhou
- *Konuk araştırmacı* , School of Electrical Technology, Department of Micro and Nanosystems,
Temmuz 2016- Eylül 2016
- **Hamburg University of Technology**, Hamburg, Almanya
Danışman; PhD. Lilia Zenker
- *Stajyer*, Institute of Thermal Separation Processes,
Temmuz 2015- Eylül 2015
- **Ege Üniversitesi**, Izmir, Türkiye
-**Biyomühendislik** ,
GPA 3.24 /4.00
Eylül 2012 - Haziran 2016

SUNUMLAR/BİLDİRİLER

- **Natural antimicrobial agent properties of lignin aerogels in topical cream formulations**, 1. Uluslararası Katılımlı Kozmetik Kongresi, 26-28 Ekim 2017, Antalya/Türkiye
- **Immobilisation of β -glucuronidase in silica-polymer based monolithic carriers**, Basel Life Science Week, 19-23 Eylül 2016, Basel, İsviçre
- **Functionalization of the surface of a microfluidic device with lignin sol-gel**, Lab-on-a-Chip and Microfluidics Conference, 15-16 Mart 2016, Madrid/İspanya

