

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BİYOALGILAMA İÇİN MİKROAKIŞKAN
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Fatma Betül KÖŞKER**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYDIN**

Doktora Tezi

**Kasım 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BİYOALGILAMA İÇİN MİKROAKIŞKAN
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan
Fatma Betül KÖŞKER**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYDIN**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FDK-2022-11974 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Kasım 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Fatma Betül KÖŞKER

İmza

“Biyoalgılama için Mikroakışkan Sistemlerin Geliştirilmesi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Fatma Betül KÖŞKER

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYDIN

İmza

Biyomedikal Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mahmut TOKMAKÇI

İmza

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYDIN ve Doç. Dr. Kutay İÇÖZ’e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca büyük sabır göstererek maddi ve manevi her daim yanımda olan aileme en içten şükranlarımı sunarım. Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarıma ve tezimin ortaya çıkmasında katkısı bulunan herkese teşekkür ederim.

Tez çalışmama FDK-2022-11974 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

Fatma Betül KÖŞKER

Kasım 2022, KAYSERİ

BİYOALGILAMA İÇİN MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Fatma Betül KÖŞKER

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora Tezi, Kasım 2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYDIN

ÖZET

Hücrelerin basit boyanması, temel tıbbi teşhis, eğitim ve araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Boyalar düşük maliyetlidir, ancak yoğun tüketim aşırı toksik atık oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle, hücre boyama prosedüründen kaynaklanan toksik atık miktarını azaltmak bir ihtiyaçtır. Bu çalışmada, insan ökaryotik hücrelerinin, K562 hücrelerinin ve hastalardan elde edilen lenfosit hücrelerinin basit boyamasını gerçekleştirmek için manyetik tabanlı ve kompartımanlara ayrılmış pasif bir mikroakışkan çip geliştirilmiştir. Yüksek, orta ve düşük hücre yoğunlukları için tripan mavisi, metilen mavisi, kristal viyole ve safranin ile hücreler üzerinde basit boyama gösterilmiştir. Odak düzlemindeki hücreleri saymak için boyalı hücreler, aydınlık alan optik mikroskobu ve cep telefonu kullanılarak görüntülenmiştir. Boyama işlemi, mikroskobik görüntüler için hücrenin renk sinyalini 25-135 piksel yoğunluk farkı oluşturmuştur. Protokolün geçerliliği, Jurkat ve MDA-MB-231 hücre hatları negatif kontrol olarak kullanılarak belirlenmiştir. Sistemin uygulanabilirliğini göstermek için insan kan örneklerinden elde edilen lenfosit hücreleri tripan mavisi ile boyanmıştır. Çipin performansını değerlendirmek için ise ilk ve son kompartımanlardaki renk yoğunluğu değişiklikleri analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntem ultra düşük maliyetlidir, üretilen atığı önemli ölçüde azaltır ve taşınabilirlik açısından mobil görüntüleme cihazları ile entegre edilebilir. Mikrofabrikasyon teknolojisini hücre boyama ile birleştiren bu çalışma, mikroakışkan biyosensörler alanına yeni bir katkı sunmaktadır. Gelecekte, bu yöntemi kullanarak patojenlerin tespitini göstermek amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hücre boyama, pasif mikroakışkan sistemler, immunomanyetik boncuk, renk sinyali, insan ökaryotik hücreleri

DEVELOPMENT OF MICROFLUIDICS SYSTEMS FOR BIOSENSING APPLICATIONS

Fatma Betül KÖŞKER

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, November 2022

Supervisor: Asst. Prof. Ömer AYDIN

ABSTRACT

Simple staining of cells is a widely used method in basic medical diagnostics, education, and research laboratories. The stains are low-cost, but the extensive consumption results in excessive toxic waste generation. Thus, to decrease the amount of toxic waste resulting from cell staining procedure is a need. In this study we developed a magnetically driven and compartmentalized passive microfluidic chip to perform simple staining of human eukaryotic cells, K562 cells, and lymphocyte cells derived from patients. We demonstrated simple staining on cells with trypan blue, methylene blue, crystal violet, and safranin for high, medium, and low cell densities. The stained cells were imaged using a bright field optical microscope and a cell phone to count cells on the focal plane. The staining improved the colour signal of the cell by 25–135-pixel intensity changes for the microscopic images. Validity of the protocol was determined using Jurkat and MDA-MB-231 cell lines as negative controls. To demonstrate the practicality of the system, lymphocyte cells derived from human blood samples were stained with trypan blue. The colour intensity changes in first and last compartments were analysed to evaluate performance of the chip. The developed method is ultra-low cost, significantly reduce the waste generated and can be integrated with mobile imaging devices in terms of portability. Combining microfabrication technology with cell staining, this study reports a novel contribution to the field of microfluidic biosensors. In future, we expect to demonstrate the detection of pathogens using this method.

Keywords: Cell staining, passive microfluidics, immunomagnetic beads, colour signal, human eukaryotic cells

İÇİNDEKİLER

BİYOALGILAMA İÇİN MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Tezin Konusu ve Amacı.....	4
1.2. Mikrobiyolojik Dünya	6
1.2.1. Boyama Teorisi.....	6
1.2.2. Hücre Boyama	9
1.2.2.1. Pozitif Boyama	12
1.2.2.2. Negatif Boyama.....	13
1.2.2.3. Diferansiyel Boyama.....	14
1.2.2.4. Histopatolojik Boyama.....	15
1.2.2.5. Fluoresan Boyama	16
1.3. Mikroakışkan ve mikro tümleşik analiz sistemleri.....	17
1.3.1. Mikrofabrikasyon.....	20
1.3.2. Mikroakışkan sistemlerde akış.....	22
1.3.2.1. Laminer akış ve Reynolds sayısı.....	22
1.3.3. Aktif Mikroakışkan Sistemler	24
1.3.4. Pasif Mikroakışkan Sistemler	25
1.4. Manyetoforezis	26
1.5. Mikro/Nano Manyetik Parçacıklar	27

1.6. Mikroakışkan Sistemde Parçacığa Etkiyen Kuvvetler	29
1.7. Literatür Araştırması	30

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Reaktifler ve Materyaller	33
2.2. Deneysel Çalışmalar	34
2.2.1. Hücre Kültürü	34
2.2.2. Hasta Örnekleri	34
2.2.3. Hücre-Manyetik Boncuk Kompleksinin Hazırlanması	35
2.2.4. Çip Üretimi	35
2.2.5. Çipin Yüzey Modifikasyonu	37
2.2.6. Hücre Boyama Prosedürü	37
2.2.7. Hücre-Manyetik Boncuk Kompleksine Etkiyen Manyetik Kuvvet.....	38
2.3. Boyanan Hücrelerin İncelenmesi ve Analizi.....	40

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Tripan Mavisi Konsantrasyon Deneyleri.....	41
3.2. Farklı Basit Boyalar ile Boyama	43
3.3. Jurkat ve MDA-MB-231 Hücre Hatları ile Kontrol Deneyleri.....	45
3.4. Cep Telefonu Görüntü Analizleri	47
3.5. Çipin Performans Analizi.....	49
3.6. Hasta Örnekleri Deneyleri	51
3.7. Hassasiyet Analizi	53
3.8. İstatistiksel Analiz	53

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Sonuçlar ve Tartışma	56
4.2. Öneriler	58
KAYNAKÇA	59
ÖZGEÇMİŞ.....	70

KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Collection
BSA	: Bovine Serum Albumin
CVT	: Chloroform Vapor Treatment
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate Isomer I
KV	: Kristal Viyole
LAD	: Lökosit Adezyon Defekti
MM	: Metilen Mavisi
PBMCs	: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PF	: Paraformaldehyde
PMMA	: Polymethylmethacrylate
TM	: Tripan Mavisi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Manyetik boncuk, boyanmamış hücre ve temel boyalar ile boyanmış hücrelerin arka plandan fark değerleri.	44
Tablo 2.	Varyansların homojenliği testi sonuçları	54
Tablo 3.	ANOVA testi sonuçları.	54
Tablo 4.	Kırmızı renk bandı için Pos-Hoc test sonuçları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM, 2: %0.05 TM, 3: %0.01 TM).....	54
Tablo 5.	Yeşil renk bandı için Pos-Hoc test sonuçları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM, 2: %0.05 TM, 3: %0.01 TM).....	55
Tablo 6.	Mavi renk bandı için Pos-Hoc test sonuçları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM, 2: %0.05 TM, 3: %0.01 TM).....	55
Tablo 7.	Geliştirilen yöntemin literatürdeki ilgili boyama yöntemleri ile karşılaştırılması.	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Bazik boyaların kimyası	12
Şekil 1.2.	Mikroakışkan sistemlerin zamana bağlı değişimi.....	18
Şekil 1.3.	Bir manyetik alan altında farklı tipteki manyetik malzemelerin manyetik davranışı.....	28
Şekil 2.1.	Farklı perspektiflerden mikroakışkan çipin görünüşü: (a) çipin alt ve üst parçalarının izometrik görünüşü, (b) çipin üst parçasının üstten görünüşü, (c) çipin alt parçasının yan ve üstten görünüşü.....	35
Şekil 2.2.	Çip üretim prosedürü (a), altı kompartmanlı çipin üstten görünüşü (b). Cep telefonu ile çekilen çipte hücre-manyetik boncuk kompleksinin boyama prosedürü görüntüleri (c:C.1-C.6). Sarı oklar, hücre-manyetik boncuk kompleksinin pozisyonunu göstermektedir.	36
Şekil 2.3.	Çipte akış dağılımının doğrulanması	37
Şekil 2.4.	Çipte ve çip dışında fiksasyon konfigürasyonları için sırasıyla sekiz (a) ve altı (b) kompartmanlı çipin şematik çizimleri ve kompartmanlardaki solüsyonlar ile boyama sürecinin gösterilmesi.	38
Şekil 2.5.	Çip üzerindeki boyama prosedürünün şematik diyagramı.	38
Şekil 2.6.	Farklı sayı ve uzaklıktaki mıknatısların manyetik alana etkileri. Hücre-manyetik boncuk kompleksinin üzerine etkiyen manyetik alan mıknatısların sayısına ve çip yüzeyinden uzaklığına bağlıdır.	39
Şekil 2.7.	Bir kübik mıknatısın manyetik akı yoğunluğunun COMSOL Multiphysics programındaki simülasyon sonuçları.	40
Şekil 3.1.	Çipte ve çip dışı fiksasyon konfigürasyonunda tripan mavisi konsantrasyonunun hücre boyaması üzerinde etkisi. %0.4 stok solüsyonundan %0.1, %0.05 ve %0.01 TM dilüsyonları yüksek sayıda hücre üzerinde kullanılmıştır.	42
Şekil 3.2.	Mikroskopik görüntüler sırasıyla, immunomanyetik boncuk (a) and boyanmamış hücre (b) and temel boyalar ile boyanmış hücre: tripan mavisi (c), safranin (d), metilen mavisi (e) ve kristal viyole (f). Grafikler ilgili mikroskopik görüntünün piksel yoğunluk analiz sonuçlarını göstermektedir. Görüntüler 50x objektif ile alınmıştır.	44

Şekil 3.3.	Jurkat ve MDA-MB-231 hücre hatlarının son kompartımandaki mikroskopik görüntüleri (10x). Ekli küçük görüntüler ise orijinal görüntülerin yakın görünüşünü göstermektedir.	46
Şekil 3.4.	MDA-MB-231 hücre hattına ait FC analiz sonuçları.	46
Şekil 3.5.	Jurkat hücre hattına ait FC analiz sonuçları.	47
Şekil 3.6.	Cep telefonu görüntü analizi. Görüntülere ait piksel yoğunluk analiz sonuçları (a). Görüntü işleme aşaması (b).	48
Şekil 3.7.	Mikroskopik ve cep telefonu görüntüleri odak düzlemi analiz sonuçları. a) Yüksek, orta, düşük, ultra düşük hücre yoğunlukları ve kontrol için mikroskopik görüntü analizi sonuçları. Standart sapma çubukları 15'ten küçüktür. Ölçek artış değeri 1000 olduğu için standart sapma çubukları görülmemektedir. b) Yüksek, orta ve düşük hücre yoğunlukları için cep telefonu görüntü analizi sonuçları.	49
Şekil 3.8.	Hücre yoğunluğuna bağlı kompleks taşınım verimi ve kompleks kayıpları değer grafiği.	50
Şekil 3.9.	Hasta örnekleri analiz sonuçları (a) ve örneklerin 50x objektif ile alınmış mikroskopik görüntüleri (b).	51
Şekil 3.10.	%0.1 TM ile boyanan bir K562 ve lenfosit hücresinin 50x objektif ile alınan mikroskopik görüntüsü.	52
Şekil 3.11.	Hassasiyet analizi sonuçları.	53

GİRİŞ

Manuel hücre boyama, hücreleri ışık mikroskobu altında görselleştirmek ve araştırmak için kullanılan geleneksel, altın standart bir yöntemdir. Basit boya, bir renklendirici molekül (genellikle bir benzen türevi) olan bir kromojen ve bir çözücünden (genellikle su veya etanol) oluşan bir çözeltidir. Kromofor, kromojene rengini veren kısımdır. Oksokromlar ise iyonlaştırmacı gruplar aracılığıyla boyaları hücrelere yapıştırma görevi gören yüklü kromojen parçalarıdır. Memeli ve bakteri hücreleri de dahil olmak üzere çoğu hücrenin zarında, iyon alışverişi yoluyla pozitif yüklü bazik boyalar tarafından çekilen negatif yükler vardır. Bu etkileşim sonucunda hücre boyanır. Sık kullanılan bazik boyalar tripan mavisi (TM), metilen mavisi (MM), kristal viyole (KV) ve safranindir [1, 2] .

Bir boyama işlemi, hücrelerin bir mikroskop lamı üzerinde sabitlenmesi, bir boyanın mililitrelerce miktarı ve laboratuvar ortamındaki yıkama adımlarını içerir. Basit boyama prosedürü, patoloji, hücre biyolojisi ve mikrobiyoloji laboratuvarları gibi çeşitli laboratuvarlarda kullanılan önemli bir araçtır ve kişinin hedef hücreleri diğerlerinden ayırt etmesine, hücrelerin miktarını belirlemesine ve morfoloji ve hücre yapısını incelemesine olanak tanır. Geleneksel hücre boyama yöntemleri, bir mikroskop lamı üzerine ortamından (kültür veya numune) izole edilmiş hücrelerin ısı ile sabitlenmesi yani hücreleri cam yüzey üzerine yapıştırılması işlemini içerir. Tek bir boyanın kullanıldığı basit boyama işlemi nispeten ucuz ve kolay olsa bile, süreç boyunca yüksek hacimlerde reaktiflerin kullanımı atık miktarını artırmakta, kontaminasyon riski bulunmakta ve boyanan hücreler ileri analizler için transfer edilememektedir. İki veya daha fazla boyama adımı içeren boyama işlemlerinde yukarıda belirtilen dezavantajlar da artmaktadır [3–5].

Kan kültürü örneklerinde otomatik boyama sistemleri ile manuel boyamayı karşılaştıran bir çalışmada, otomatik boyama sisteminin manuel yöntemin yerini alabileceği bildirilmiştir [6]. Ancak, bu cihazların ana dezavantajı, standart laboratuvarların çoğunun karşılayamayacağı yüksek maliyetleridir. Bu nedenle, nispeten uygun maliyetli olan

manuel boyama, operatör hatalarına eğilimli olmasına ve yüksek hacimli toksik kimyasal tüketimine rağmen hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem araştırma hem de merkezi sağlık laboratuvarları için geleneksel boyama yöntemine göre uygulaması basit, zaman kazandıran ve daha az atık oluşturan alternatif yöntemlerin geliştirilmesi esastır [7, 8].

Mikrofabrikasyon teknolojisindeki gelişmelerin bir sonucu olarak, mikroakışkan sistemler ortaya çıkmış [9] ve kimyasal ve biyolojik alanlarda çeşitli uygulamalar gösterilmiştir [10–12]. Mikroakışkan sistemlerin standart laboratuvar tekniklerine göre temel avantajlarından biri, reaktif tüketimini ve dolayısıyla üretilen atığı azaltmaktır. Boyama teknikleri, hücrelerin canlılığını gözlemlemek ve hareketlerini izlemek için mikroakışkan sistemlerle entegre edilmiştir. Çip üzerindeki ayırma işleminin başarısı için hücreler floresan boyalarla boyanmış ve çip üzerinde anlık olarak izlenmiştir [13, 14]. Bakteri ve virüslerin tespiti için kullanılan mikroçiplerde, tespit başarısını belirlemek için Fluorescein izotiyosiyanat izomer I (FITC) ve SYBR Green II gibi floresan boyalar kullanılarak çip dışında boyama yapılmıştır [15, 16]. Hücreler üzerindeki ilaç toksisitesini izlemek için geliştirilen mikroakışkan çiplerde canlı hücrelerin varlığı, hücrelerin bulunduğu kompartımanlarda veya kanallarda immünofloresan boyama ile de tespit edilmiştir [17, 18]. DAPI gibi DNA boyaları, mikroakışkan çipler üzerinde fiksasyondan sonra hücre parçalanmasını izlemek için kullanılmıştır [19]. Bununla birlikte, floresan boyalar pahalıdır ve bir floresan mikroskobu gerektirir.

Pasif mikroakışkan sistemler, geleneksel mikroakışkan sistemlerin aksine harici bağlantı boruları, elemanları ve pompaları kullanmaz [20, 21]. Bu harici bileşenlerin olmaması, daha kolay kullanım ve hareket kabiliyeti sağlar. Pasif mikroakışkan sistemlerde kanallardaki akışkanların ilerlemesi sistemin iç dinamikleri sayesinde elde edilir yani sistem belirli bir eğimde veya basınç altında tutulur [21, 22]. Bazı pasif çiplerde, sıvılar pipetleme yoluyla erişim delikleri aracılığıyla sisteme aktarılır ve sıvılar sistemde sabit kalırken manyetik parçacıklarla yüklü hedef hücreler harici bir manyetik alan kullanılarak hareket ettirilir [23–25].

Bu tez çalışmasında, hücrelerin basit boyama prosedürlerini gerçekleştirmek için pasif bir mikroakışkan çip yaklaşımı önerilmiştir. Hedef hücreleri karmaşık bir ortamdan ayırmak ve ardından harici bir manyetik alan uygulayarak hücreleri mikroakışkanlar içinde hareket ettirmek için manyetik boncuklar kullanılmıştır. Mikro kanallar ile birbirine bağlı

altı (çip dışı fiksasyon) veya sekiz (çipte fiksasyon) ardışık kompartımandan oluşan mikroakışkan çip Şekil 2.4’de gösterilmiştir. Her bölmede numuneleri veya reaktifleri yüklemek için bir giriş portu ve havalandırma için bir çıkış portu bulunmaktadır. Mikrokanallar kompartımanları birbirine bağlamaktadır. Kanallar kompartımanın tabanından daha yükseğe yerleştirilmiş ve böylece bir kılcal (kapiler) durdurma düğümü oluşturulmuştur. Tüm solüsyonlar, numuneler ve reaktifler ardışık olarak çip kompartımanlarına pipetlenmiştir. Pipetlendikten sonra, çözeltiler mikro kanaldan aşağı akmakta ve kılcal durdurma düğümünde sabitlenmektedir. Öncelikle çip üretimi optimize edilmiş ve çip immunomanyetik boncuklarla yakalanmış K562 lenfoblast hücrelerinin tripan mavisi, kristal viyole, metilen mavisi ve safranin gibi farklı basit boyalar ile boyanması ile test edilmiştir. İkinci aşamada, insan kan örneklerinden elde edilen bağışıklık hücreleri manyetik olarak ayrılmış ve sistemin hasta örnekleri için uygulanabilirliğini göstermek için tripan mavisi ile boyanmak üzere mikroakışkan çipe yüklenmiştir. Hücre-manyetik boncuk komplekslerine uygulanan manyetik alan, yedi kübik kalıcı mıknatısın direkt olarak çip yüzeyinden uygulandığında optimum seviyede bulunmuştur. Boyanmış hücreler, son kompartımanda aydınlık alan optik mikroskobu ve cep telefonu ile görüntülenmiştir. Mikroskoplardan ve cep telefonundan elde edilen görüntüler, geliştirilen bir görüntü işleme algoritması kullanılarak analiz edilmiştir. Yöntem ayrıca hastalıkların genetik araştırmaları için yüksek öneme sahip olan daha ileri analizler için boyanmış hücrelerin çipten çıkarılmasını sağlar. Önerilen yöntem ile basit, düşük maliyetli ve kullanımı kolay bir hücre boyama sistemi elde edilmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Tezin Konusu ve Amacı

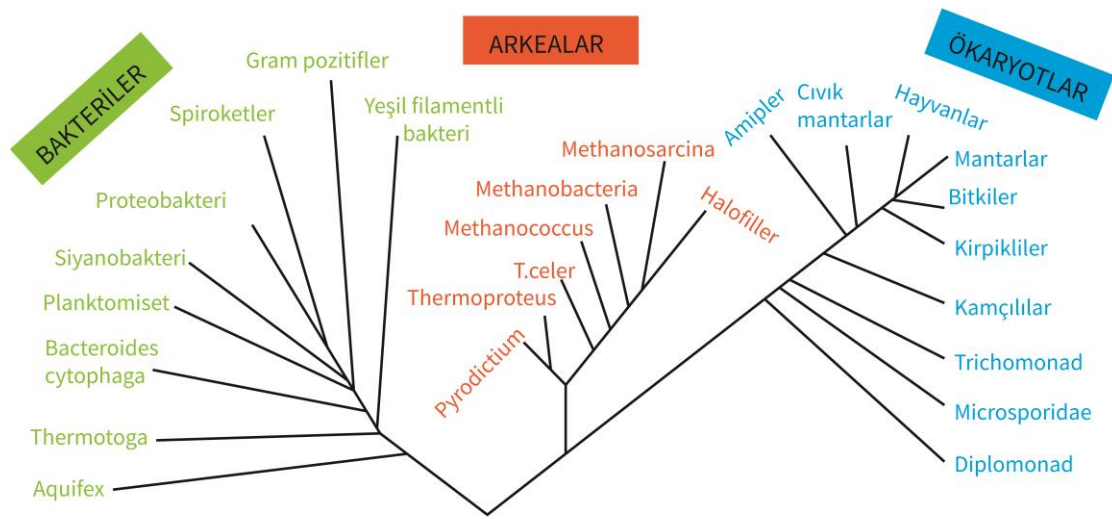
Mikrobiyolojide bir mikroskopik varlığı tanılamak için başvurulmuş ilk yöntem, görünürlüğünü artıracak (Standart ışık mikroskopu altında incelendiğinde mikroorganizmalar genellikle renksizdir.) veya onu diğerlerinden ayırt edecek bir boyama işleminin uygulanması ve daha sonra detaylı görüntüleme ve sayı hakkında bilgi edinme amaçlı mikroskop altında incelemektir. Dolayısıyla, merkez laboratuvarların ve mikrobiyoloji araştırma laboratuvarlarının iş yükünün büyük bir kısmını boyama işlemi kaplamaktadır. Zaman alıcı ve uzman personel gerektiren klasik hücre boyama yöntemleri ile maliyetli olan otomatize sistemlerin yerine ucuz, uzman personel ve ön işlem gerektirmeyen sistemlerin geliştirilmesi elzemdir.

Bu tez çalışmasında, hücrelerin basit boyama prosedürlerini gerçekleştirmek için pasif bir mikroakışkan çip yaklaşımı önerilmiştir. Hedef hücreleri karmaşık bir ortamdan ayırmak ve ardından harici bir manyetik alan uygulayarak hücreleri mikroakışkanlar içinde hareket ettirmek için manyetik boncuklar kullanılmıştır. Mikro kanallar ile birbirine bağlı altı (çip dışı fiksasyon) veya sekiz (çipte fiksasyon) ardışık kompartımandan oluşan mikroakışkan çip Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Her bölmede numuneleri veya reaktifleri yüklemek için bir giriş portu ve havalandırma için bir çıkış portu bulunmaktadır. Mikrokanallar kompartımanları birbirine bağlamaktadır. Kanallar kompartımanın tabanından daha yükseğe yerleştirilmiş ve böylece bir kılcal (kapiler) durdurma düğümü oluşturulmuştur. Tüm solüsyonlar, numuneler ve reaktifler ardışık olarak çip kompartımanlarına pipetlenmiştir. Pipetlendikten sonra, çözeltiler mikro kanaldan aşağı akmakta ve kılcal durdurma düğümünde sabitlenmektedir. Öncelikle çip üretimi optimize edilmiş ve çip immunomanyetik boncuklarla yakalanmış K562 lenfoblast hücrelerinin

1.2. Mikrobiyolojik Dünya

Mikrobiyolojik dünya, göz ile görülemeyecek kadar küçük olan canlıların dünyasıdır. Bu Carl Woese'nin 1970'lerin sonunda ortak bir atadan ribozomal RNA bilgisine dayanarak oluşturmuş olduğu filogenetik yaşam ağacı ile üç ana canlı grubuna ayrılmıştır [26]. Bunlar, bakteriler, arkealar ve ökaryotlardır. Filogenetik yaşam ağacı *Şekil 1.2*'de verilmiştir. En büyüğü mikro düzeyde olan bu canlılar ancak mikroskop altında incelenebilmektedir.

En temel haliyle mikrobiyoloji, hücreler arasındaki farklarla ilgilenir. Mikroskobik inceleme, bir hücrenin büyüklüğünü ve şeklini ve ayrıca belirli bir türün hücrelerinin çoğalırken aldıkları genellikle karakteristik düzenlemeyi belirlemek için kullanılır. Bir izolatin ilk sınıflandırması kesinlikle hücrelerin şekline, düzenine ve boyama özelliklerine bağlıdır, ancak tam tanımlama tek başına bu yönlerden mümkün değildir. Mikroskop altında inceleme ile ilgili detaylar aşağıdaki başlıklarda verilmiştir.

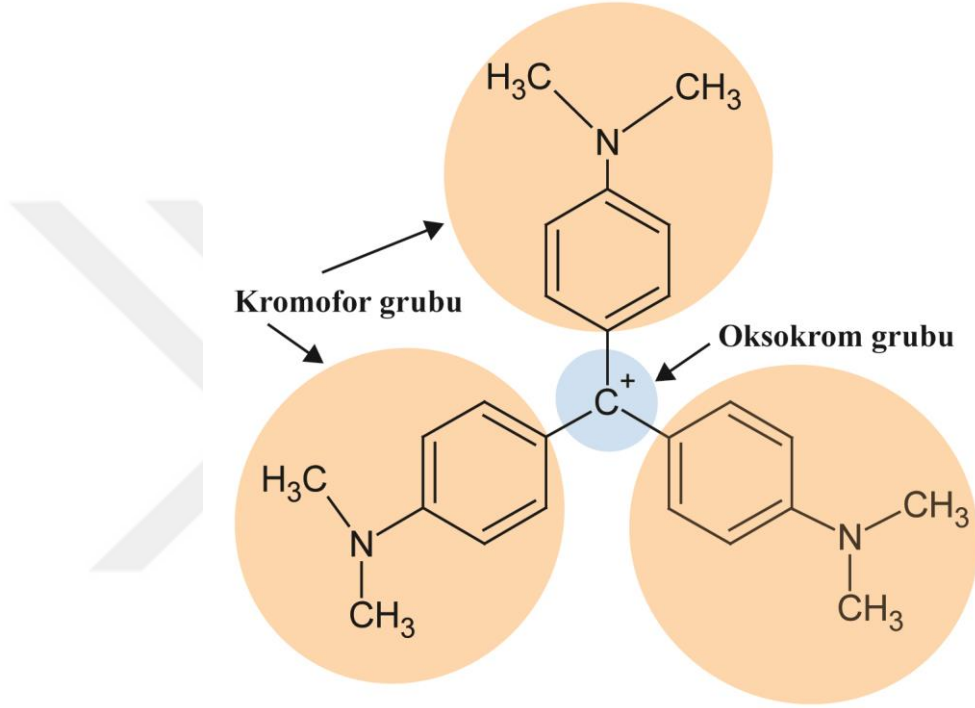


Şekil 1.2. Filogenetik yaşam ağacı (Görsel: Eric Gaba, Wikimedia Commons' dan düzenlenmiştir.) [26].

1.2.1. Boyama Teorisi

Boyalar, bir çözücü (genellikle su veya etanol) ve renkli bir molekül (genellikle bir benzen türevi), yani kromojenden oluşan çözeltilerdir. Kromojenin ona rengini veren kısmı kromofordur. Bir kromojen, her biri renge yoğunluk katan birden fazla kromofora sahip olabilir. Oksokrom, bir kromojenin yüklü kısmıdır ve kromojen ile hücre arasındaki

iyonik veya kovalent bağlar yoluyla bir boya görevi görmesini sağlar. Bazı boyalar (bir hidrojen iyonunun alınması veya bir hidroksit iyonunun kaybedilmesi sonucunda oksokromun pozitif olarak yüklendiği) çoğu bakteri hücresinin yüzeyindeki negatif yüklere doğru çekilir. Böylece hücre boyanmış olur. Yaygın temel boyalar arasında tripan mavisi, metilen mavisi, kristal viyole ve safranin bulunur.



Şekil 1.3. Kristal viyole boyasının kimyasal yapısında kromofor ve oksokrom gruplarının gösterimi [27]

Oksokrom grubuna yani taşıdıkları elektriksel yüke göre boyalar dört gruba ayrılmaktadırlar:

- a. **Asidik (anyonik) boya:** Bu boyalar negatif yük (renkli anyonlar) taşırlar ve elektrik alanında anoda doğru hareket ederler. OH^- , $COOH^-$ gibi oksokrom gruplarını içermektedirler. Çoğunlukla düşük molekül ağırlıklıdır ve suda çözünürler. Boyaların çoğu, suda çözünmelerini sağlayan iki veya daha fazla anyonik gruba sahiptir. Bu asit boyalar, asidofilik de denilen sitoplazmik proteinler ve kolajen gibi pozitif yük taşıyan doku bileşenleri ile birleşir. Mikrobiyolojik boyamada ise arka plan boyamanın yapıldığı negatif boyamada kullanılırlar. Eosin, nigrosin, asit fuksin ve pikrik asit bu boyalara örnek olarak verilebilir.

- b. Bazik (katyonik) boya:** Katyonik boya, pozitif yük (renkli katyon) taşır ve bir elektrik alanında katoda doğru hareket eder. NH_2^- veya $(CH_3)_2^+$ gibi oksokrom gruplarını içermektedirler. Katyonik boyalar çoğunlukla su ve etanolde çözünür. Nükleik asit veya epitel musin gibi negatif yük taşıyan “bazofilik” dokularla birleşirler. Mikrobiyolojik boyamada ise mikrobiyolojik varlığın kendisinin boyandığı pozitif boyamada kullanılırlar. Örnek olarak tripan mavisi, bazik fuksin, metilen mavisi ve kristal viyole verilebilir.
- c. Nötr boya:** Bunlar hem asit hem de bazik boyaları belirli bir oranda içeren bileşik boyalardır. Sulu çözeltide, asit boya ve bazik boya elektronları değiştirir ve dokuda çökmek için bir araya gelir. Romanowsky-Giemsa boyaması, elektron transfer işleminden geçen bileşik boyanın en iyi örneğidir. Romanowsky-Giemsa, azure B ve eozin Y içerir. Burada azure B boyası elektron alıcıdır ve eozin Y elektron donörüdür. Wright ve Leishman boyaları da örnek olarak verilebilir.
- d. Ligand boya:** Ligand boyası, boya ve bir metal iyonundan oluşan kompleks bileşiktir. Metalokrom olarak da bilinirler. Genellikle zayıf asitlerdir. Hematein oksitlenmiş hematoksilen olup, alüminyum (Al) iyonlarının veya demir (Fe) iyonlarının bir kombinasyonu olarak kullanılır. Metal-iyon kompleksi, sudaki çözünürlüğü artıran ve boyayı alkolde çözünmez hale getiren fazla yüke sahiptir ve bu nedenle boyama sırasında etanol nedeniyle dehidrasyon meydana gelmez. Harris hematoksilen ve Mayer’s hematoksilen örnek olarak verilebilir.

Kloroform grubuna göre boyalar ise temel olarak aşağıdaki gibi gruplanmaktadır:

- a. Azo boyalar:** Bu boyalar $-N=N-$ kromofor grubu içerir. Azo boyaların çoğunluğu asidik (anyonik) boyalardır. Örnek olarak metil oranj, metil kırmızısı ve Kongo kırmızısı verilebilir.
- b. Nitro boyalar:** $-NO_2$ kromofor grubu içerir. Pikrik asit, martius sarısı örnek olarak verilebilir.
- c. Tiyazin/Kuinonimin boyalar:** $-C=N=C-$ veya $-C=S=C$ kromofor gruplarını içerirler. Metilen mavisi, nötral kırmızı, nigrosin ve toluidin mavisi-O örnek olarak verilebilir.

- d. Fenilmetan boyaları:** $=N-$ veya $-NH$ kromofor grubunu içerirler. Asit fuksin, bazik fuksin, kristal viyole, metil mavisi ve malaşit yeşili örneklerindendir.
- e. Ksanten boyalar:** İki aromatik halka arasında oksijen bulunan aromatik siklik bir eterden oluşan ksanten molekül yapısını içeren boyalardır. Genellikle floresandırlar. Eosin, eritrosin, fluorescein örnek olarak verilebilir.
- f. Antrakinon boyalar:** Antrakinondan elde edilen boyalardır. Purpurin, karminik asit örneklerindendir.
- g. Azin boyaları:** $C=O$ veya $C=N$ kromofor gruplarını içerirler. Selestin mavisi ve nil mavisi sülfat örnek olarak verilebilir [5, 28–30].

1.2.2. Hücre Boyama

Bakteriyel hücreler esasen şeffaftır ve bunların dikkatli bir şekilde incelenmesi gereklidir. Hücreler ve arka planları iyi bir kontrast oluşturmadığından görselleştirmeleri zordur, su içerisindeki buz parçaları gibi. Renkli boyalar, bakteri hücreleri ve arka planları arasındaki kontrastı artırmak için kullanılır ve bu boyalar birçok yönden farklılık gösterse de hücrelerle etkileşime girmelerine izin veren temel bir kimyayı paylaşırlar. Mikrobiyoloji laboratuvarındaki boyama teknikleri, bakteri hücreleri ile bunların arka planı arasındaki kontrastı iki yoldan biriyle artırmak üzere tasarlanmıştır. Negatif boyamada, arka plan boyanır ve şeffaf hücreler koyu bir arka plana karşı görünür kalırken basit boyamada hücreler boyanır ve açık bir arka plana karşı koyu nesneler olarak görünür kalırlar.

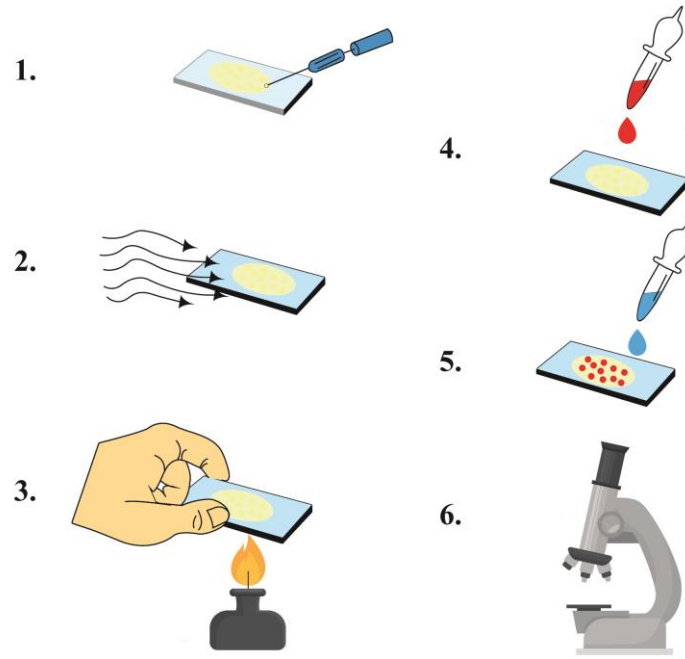
Negatif boyama, her ikisi de bakteri hücresinin negatif yükü tarafından itilen ancak cam slayt tarafından çekilen nigrosin veya Hindistan mürekkebi gibi negatif yüklü boyalar kullanır. Basit boyamada, negatif yüklü bakteri hücrelerini boyamak için herhangi bir pozitif yüklü veya bazik boya kullanılır. Mikrobiyoloji laboratuvarındaki yaygın temel boyalar arasında metilen mavisi, kristal viyole, malaşit yeşili ve safranin (pembe olan) bulunur. Basit ve negatif boyama, bir hücre ile arka planı arasındaki kontrastı artırarak belirli bir bakterinin boyutunu, şeklini ve düzenini belirlemeyi kolaylaştırır.

a. Standart hücre boyama teknikleri

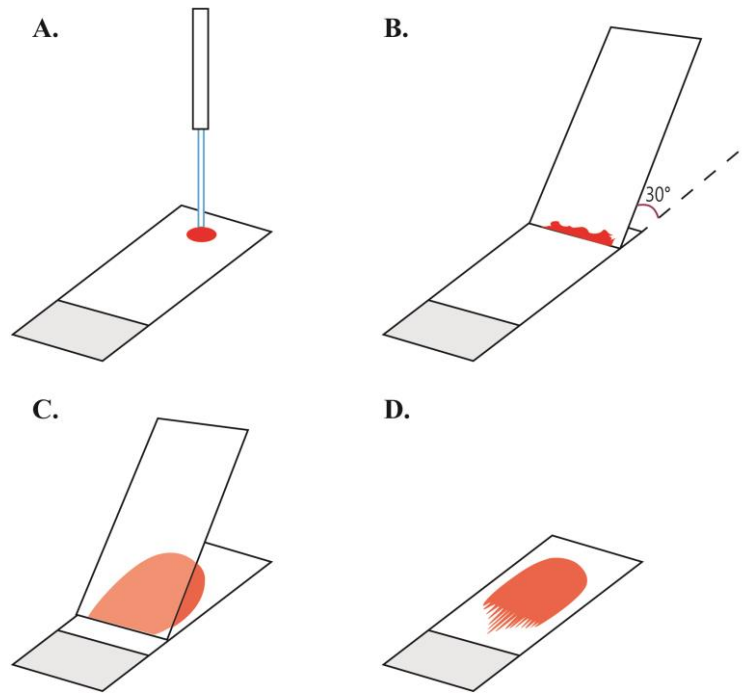
Klasik hücre boyama yöntemleri, ortamından (kültür veya örnek) izole edilen hücrelerin mikroskop slaydı üzerine fikse edilmesi ve mikroskop altında incelenmesi yöntemine dayanmaktadır. Klasik bir mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilen tek boya kullanarak hücre boyama aşamaları şöyledir:

- I. Lam üzerine bir öze miktarı deiyonize su damlatılır.
- II. Ortamından izole edilen hücreden bir dolu öze miktarı eklenir ve lam üzerine dairesel şekilde yayılır. Kurumaya bırakılır.
- III. Lama fiksasyon işlemi için Bunsen alevinden 3 defa geçirilir.
- IV. Tüm yaymanın üzerini kaplayacak şekilde boya damlatılır. 1 dk beklendikten sonra fazla boya deiyonize su ile yıkanır. Fazla su tozsuz kağıt peçete veya bibulous kağıdı ile alınır.
- V. İmmersiyon yağı damlatılarak mikroskopta en yüksek objektifte görüntüleme yapılır [2].

Yukarıda aşamaları belirtilen basit boyama işlemi bile zaman alıcı, uzman personel gerektiren ve kontaminasyonlara açıktır [31]. Ayrıca yüksek hacimde reaktif kullanımını gerektirir, bu durum da maliyeti artırmaktadır. İki veya daha fazla boya aşaması olan boyama işlemlerinde ise bahsedilen olumsuzluklar artmaktadır. Böylece günlük laboratuvarında incelenen örnek sayısı azalmakta ve bu da alınan örneklerin saklanması açısından da ayrıca bir sorun teşkil etmektedir.



Şekil 1.4. Standart boyama aşamalarının şematik gösterimi: 1. Besi yerinden lama hücre aktarımı, 2. Havada kurutma, 3. Bunzen alevinden geçirme, 4. Boyama, 5. Yıkama ve 6. Mikroskopta inceleme.



Şekil 1.5. Kan yayması aşamaları: a. Kan damlasının yerleştirilmesi, b. İkinci lamın 30-45° ile kan damlasının hemen önüne yerleştirilmesi, c. Kanın ikinci lam yardımıyla üzerinde bulunduğu lama yayılması, d. Kurutma.

b. Otomatik hücre boyama teknikleri

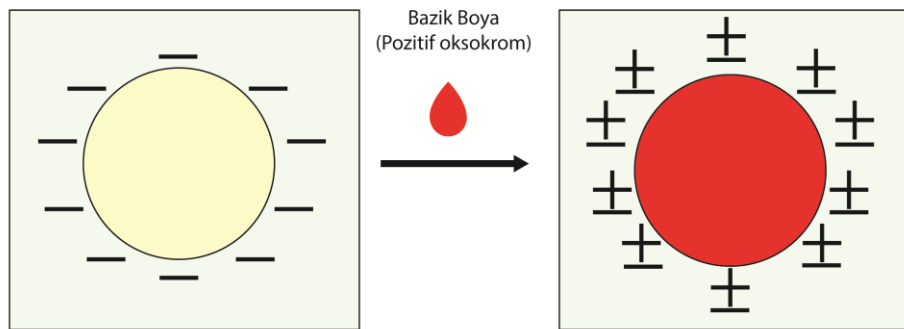
Deneyimli laborantlara olan gereksinimin ve laboratuvarlarda iş yükünün azaltılması adına yapılan çalışmalardan birisi de otomatik hücre boyama cihazlarının geliştirilmesidir. Bu cihazlar, tam otomatik ve yarı otomatik olmak üzere temel iki gruba ayrılmaktadırlar. Tam otomatik grupta olan cihazlar, cihaz içerisinde mikroskop lamı üzerine hücre yaymasının da yapılabildiği cihazlardır. Yarı otomatik cihazlar ise yayma işleminin laborant tarafından manuel olarak yapılıp cihaza yerleştirildiği cihazlardır. Bu cihazlarda kullanılan temel boyama teknikleri: küvet/banyo sistemi ve spreyci boyamadır.

Küvet/banyo sistemine dayalı cihazlar boyama ve yıkama aşamalarında birden fazla mikroskop slaydı tamamen küvetin içerisine daldırıldığı için normalden fazla reaktif kullanımını gerektirmektedir. Ayrıca iyi fikse olmayan örneklerin reaktif aracılığıyla birbirine bulaşma ve böylece sonucu etkileme ihtimali vardır [31,32].

Spreyci boyama yönteminde ise lamın tüm yüzeyinin eşit şekilde boyanması için birden fazla kez spreyci ucunun önünden geçmesi ve biriken fazla boyanın da akıtılması gerekmektedir. Her lamı boyayabilmesi için de lamaların arasında belirli bir mesafenin olması gerekmektedir (Dik boyama tabanlı sistemler için). Dolayısıyla küvet/banyo sistemlerine göre daha az lam hacmine sahiptirler.

Bu sistemler pahalı olmalarından dolayı her laboratuvarlarda bulunmamaktadır. Ayrıca çoğu otomatize cihazın çalıştırılması için örneklerin biriktirilmesi gerekmektedir. Bu da örneklerin özelliklerini kaybetmeden uygun ortamda saklanması gerektirir. Bu da ekstra maliyet getirmekte ve analiz süresini uzatmaktadır. Dolayısıyla manuel boyama teknikleri temel tüm laboratuvarlarda rutinde kullanılmaktadır.

1.2.2.1. Pozitif (Basit) Boyama



Şekil 1.6. Pozitif boyamanın şematik gösterimi

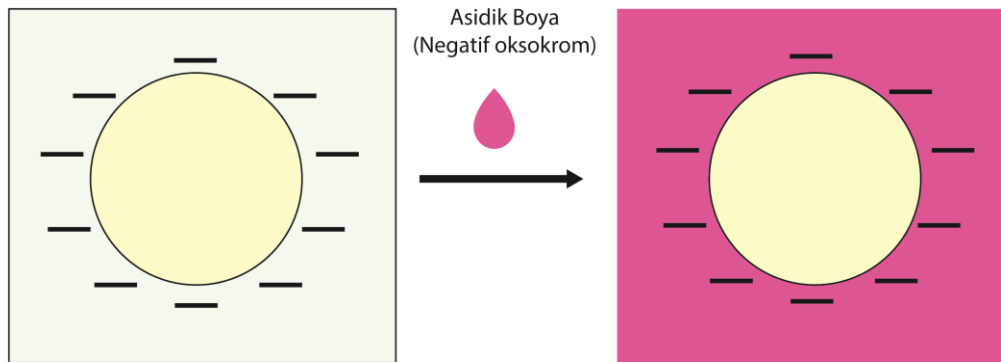
Isı ile fikse edilmiş bakteri yaymalarına temel boyalar uygulanır. Isı sabitleme bakterileri öldürür, slayda yapışmalarını sağlar ve sitoplazmik proteinleri daha görünür hale getirmek için pıhtılaştırır. Ayrıca hücreleri bir dereceye kadar bozar.

Sitoplazma saydam olduğundan, hücrelerin mikroskop altında daha görünür olmaları için genellikle renkli bir boya ile boyanır. Daha sonra hücre morfolojisi, boyutu ve düzeni belirlenebilir. Tıbbi bir laboratuvarında bunlar genellikle bir Gram boyama ile belirlenir [1, 33].

1.2.2.2. Negatif Boyama

Negatif boyama tekniği, kromojenin asidik olduğu ve negatif bir yük taşıdığı bir boya çözeltisi kullanır (Asidik bir kromojen, bir hidrojen iyonundan vererek negatif duruma geçer). Bakteri yüzeyindeki negatif yük, negatif yüklü kromojeni iter. Böylece arka plan renklenirken, hücre boyanmadan kalır. Nigrosin, asidik boyalara bir örnektir.

Negatif boyama tekniği, ısıyla fiksasyona dayanamayacak kadar hassas olan hücrelerdeki morfolojiyi ve hücresel düzenlemeyi belirlemek için kullanılır. Birincil örnek, diğer boyama tekniklerinin ısıyla sabitlenmesiyle bozulan spiroket *Treponema*'dır. Ayrıca, doğru boyutun belirlenmesinin çok önemli olduğu durumlarda, minimum hücre büzülmesine yol açtığı için negatif boyama kullanılmaktadır [1, 34].



Şekil 1.7. Negatif boyamanın şematik gösterimi.

Negatif boyama ile görülen bir avantaj, bir bakteri hücresinin boyutunun daha doğru bir şekilde belirlenmesidir. Basit boyama için bir hücre hazırlanırken hem hücreleri öldürmek hem de onları cam slayta yapıştırmak için bakteri örneğine ısı uygulanır.

Isıtmanın istenmeyen bir sonucu, hücrelerin genellikle küçülmesidir. Negatif boyama ısı kullanmadığından, hücre büzülmesi en aza indirilir veya ortadan kaldırılır

1.2.2.3. Diferansiyel Boyama

Adından da anlaşılacağı gibi diferansiyel boyama, diferansiyel boyama özelliklerine bağlı olarak bir hücrenin diğerinden ayırt edilmesini sağlar. Bu boyalar sadece boyut, şekil ve diziliş gibi morfolojik bilgiler sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bakteri grupları arasında var olan yapısal farklılıkları vurgulayarak hücrenin biyolojisi hakkında ipucu verir. Birkaç farklı boya türü olmasına rağmen, en yaygın kullanılan ve aslında tüm mikrobiyolojide en önemli boya, 1884 yılında doktor Hans Christian Gram tarafından geliştirilen Gram boyamadır. Bu teknik, hücre duvarının yapısındaki farklılıklara bağlı olarak bakterileri Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki gruba ayırır. Gram boyama temel olarak aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır.

1. Hücreler birincil boya olan kristal viyole ile boyanır. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif hücreler bu noktada koyu mor renk almaktadır.
2. İyot, boyama işleminde boyayı hücre içerisinde sabitleyerek alkolde çözünmemesini sağlayan bir kimyasal olan mordant olarak eklenir. Bu durumda iyot, kristal viyoleye bağlanarak Gram-pozitif hücrelerin kalın peptidoglikan tabakası içinde çözünmeyen bir kompleks oluşturur.
3. Hücrelere etil alkol ile muamele edilir. Alkol, gram-negatif hücrelerin dış zarında bulunan lipitleri çözerek kristal viyole-iyot kompleksinin hücre dışına çıkmasına neden olur. Bu durumda gram-negatif hücreler renksiz kalırken gram-pozitif hücreler hala koyu mor renkte olmaktadır.
4. Renksiz gram-negatif hücrelerin kontrastını artırmak ve onları farklı bir renkte boyamak için kırmızı/pembe alt tonlu bir karşı boya olan safranin eklenir. Gram-negatif hücreler ile birlikte gram-pozitif hücreler de pembeye boyanır, ancak kristal viyolenin koyu rengi safraninin açık rengini maskeler.

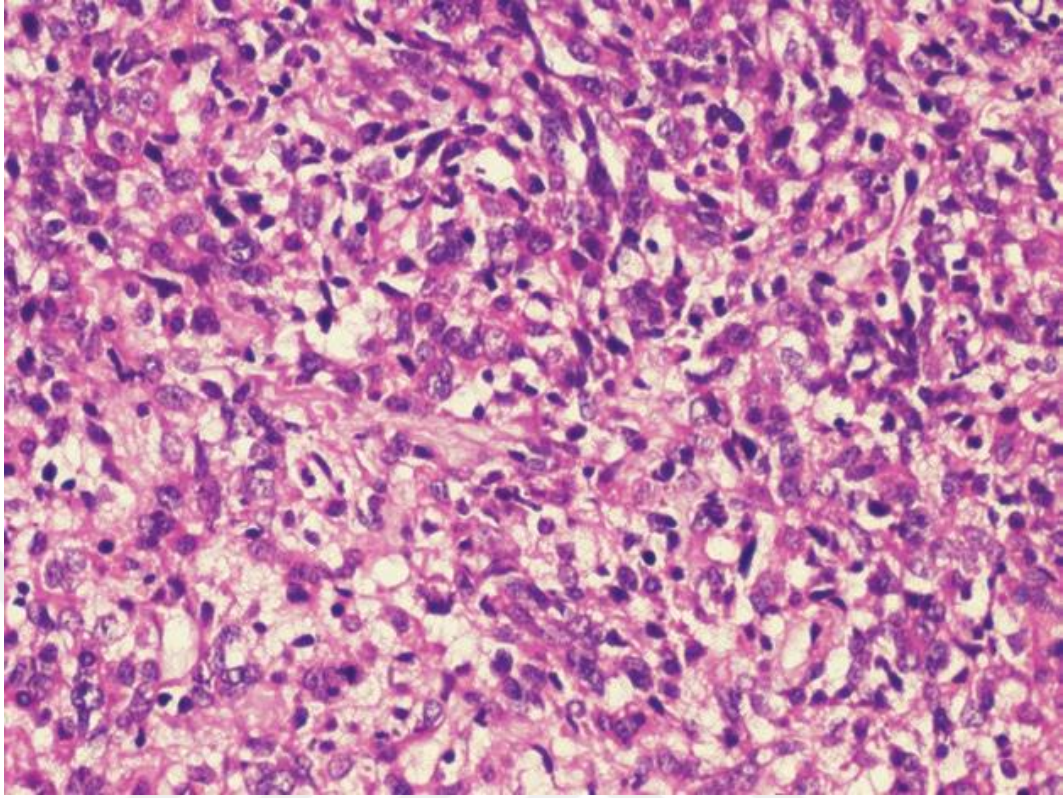
Sonunda, mor boyanan hücreler gram-pozitif, pembe boyanan hücreler ise gram-negatif kabul edilir. Güvenilir bir şekilde gram boyama yeteneği, bir bakteri türünün doğru bir

şekilde tanımlanması için kesinlikle gereklidir ve güvenilirlik yalnızca çok fazla pratikle elde edilir.

1.2.2.4. Histopatolojik Boyama

Histoloji, hayvan ve bitki hücre ve dokularının boyanarak, kesitlere ayrılarak ve mikroskop altında (elektron veya ışık mikroskobu) incelenerek mikroskobik olarak incelenmesidir. Hücrelerin doku özelliklerini ve mikroskobik yapılarını incelemek için kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Histolojik çalışmalar adli incelemelerde, otopsilerde, teşhislerde ve eğitimde kullanılmaktadır. Ek olarak, histoloji tıpta, özellikle tedaviye yardımcı olmak için hastalıklı dokuların incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [28, 35].

Histolojik boyama, mikroskop çalışmasına yardımcı olmak için histolojik boyalar kullanılarak boyanarak örnek dokuların hazırlanmasında gerçekleştirilen bir dizi teknik işlemdir. Histoloji/sitoloji laboratuvarının iş akışı beş temel aşamadan oluşmaktadır: sabitleme, işleme, gömme, kesit alma ve boyama. Toplu olarak kimyasal, moleküler biyoloji testleri ve immünolojik teknikler yoluyla histolojik boyama için kullanılan tekniklerde büyük değişiklikler yapılmış ve organ ve dokuların incelenmesinde büyük kolaylık sağlanmıştır. Histolojik boyamada kullanılan boyalara, hematoxilen-eozin, Romanowsky boyaları, Periyodik asit Schiff (PAS), Best Carmin , Alcian blue-PAS, Van Gieson, Masson un trikrom, Mallori Azan örnek olarak verilebilir [28, 35, 36]. Hematoxilen-eozin boyaması yapılmış bir dokuya ait mikroskobik görüntü *Şekil 1.8*'de verilmiştir [28].

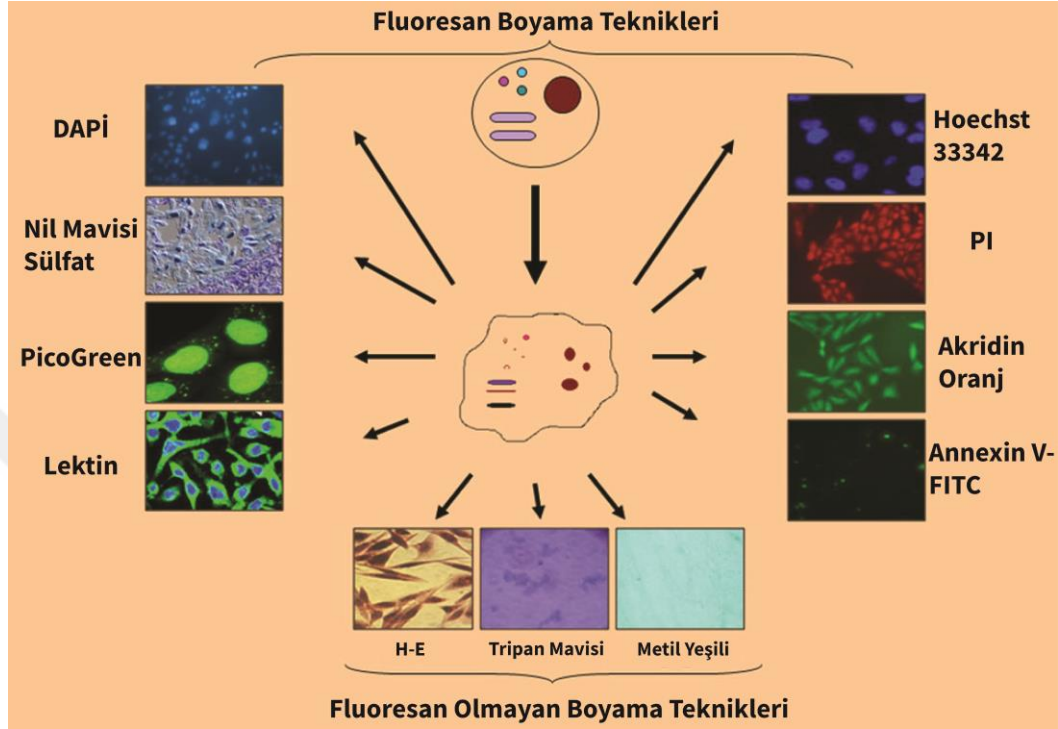


Şekil 1.8. Hematoksilen-eozin ile boyanmış doku parçası (Büyütme oranı: 200x) [28]

1.2.2.5. Floresan Boyama

Floresan probalar, yüksek duyarlılıkları, özgüllükleri, hızlı tepkileri ve teknik basitlikleri nedeniyle hem analitik algılama hem de optik görüntüleme için güçlü moleküler araçlardır. İlgilenilen biyomoleküllerin lokalizasyonu ve miktarı ile ilgili doğrudan görselleştirme ve dinamik bilgi sağlayabilirler. Artan optik çözünürlüğe sahip konfokal mikroskopi, canlı hücrelerde bölmeye özgü floresan problemlerin biyogörüntüleme uygulamalarını önemli ölçüde kolaylaştırmıştır. Bugüne kadar, çeşitli organel boyama floresan problemleri ticari olarak temin edilebilir ve diğerlerinin yanı sıra solunum, mitoz, substrat bozulması ve detoksifikasyon ve hücre içi taşımının biyolojik araştırmalarında kullanılabilir. Bununla birlikte, sitotoksikite, fotostabilite, kısa uyarım ve emisyon dalga boyları ve hızlı floresan bozunması sorunları, hücresel olayların uzun vadeli floresan takibi, derin penetrasyon ve düşük otofloresans ile doku ve vücut görüntüleme ve zaman çözümü görüntüleme uygulamalarını sınırlar. Şekil 1.9' te floresan ve floresan olmayan boyalara örnekler şematik olarak gösterilmiştir. Hoechst 33342 (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1Hbenzimidazole trihydrochloride trihydrate),

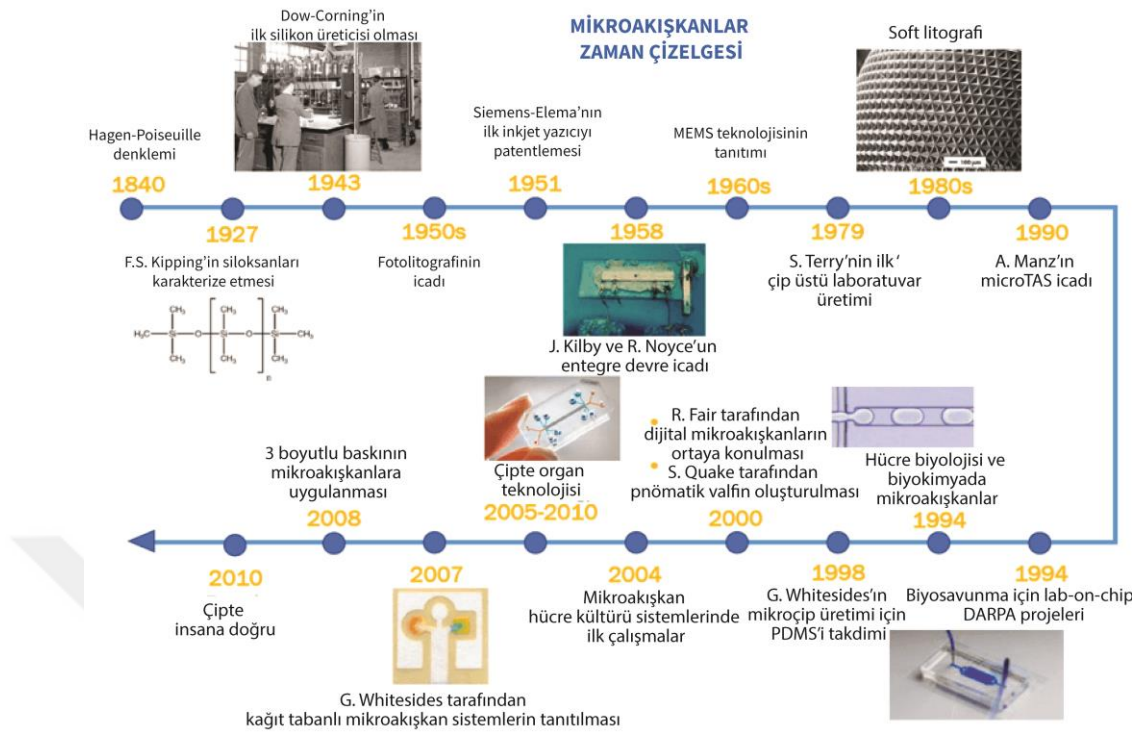
Propidium iodide (PI), 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) hücre boyamada çeşitli amaçlarla kullanılan floresan boyalara örnektir [37–40].



Şekil 1.9. Floresan ve floresan olmayan boyama teknikleri [41]

1.3. Mikroakışkan ve mikro tümleşik analiz sistemleri

Mikroakışkanlar, tipik olarak onlarca ila yüzlerce mikron boyutundaki kanallar veya yapılarla sınırlı küçük sıvı hacimlerinin çalışmasının ve yönetilmesinin arkasındaki teknolojidir [42, 43]. 1990 yılında Manz vd. sıvı kromatografisi için, cihazdaki uzunluk ölçeklerinin azaltılmasının teorik olarak kromatografik ayrımları iyileştirebileceği, elektroforetik ayrımı hızlandırabileceği ve reaktiflerin taşıma sürelerini kısaltabileceği bir cihaz önermiştir [44]. Numune hazırlama, taşıma, algılama ve sinyal değerlendirmesinin dahil edilmesi, Manz'ın böyle bir cihaz için mikro tümleşik analiz sistemi (μ TAS/microTAS) terimini türetmesine yol açmıştır. Birçok bileşen entegre edilebilen μ TAS cihazları, mevcut işlemlerin çoğu için daha büyük, daha geleneksel tezgâh tabanlı sistemlerin yerini alabilmektedir.



Şekil 1.10. Mikroişkan sistemlerin zamana bağlı değişimi [45]

Ortaya atılan bu fikir, mikroişkan teknolojilerinin doğuşuna ve “çip üzerinde laboratuvar” teriminin ortaya çıkmasına yol açmıştır [46]. Günümüzde çip üzerinde laboratuvar teknolojileri birçok araştırma alanında kullanılmaktadır. Moleküler analiz, mikroelektronik [47–50], kimyasal ve biyolojik deneyler [51–53], hücresel çalışmalar [54–57] ve çevresel izleme [58], geniş ve çeşitli mikroişkan uygulamalarındandır. Mikroişkan sistemlerin geleneksel daha büyük ölçekli yöntemlere göre kullanılmasının önemli avantajları vardır. Geleneksel sistemlerde çok daha büyük hacimler gerektiren işlemlerin küçük hacimli sıvılar ile işlenmesine izin verir. Nanolitre ve altındaki ölçekte küçük hacimlerin kullanılması, reaktiflerin maliyetini düşürmenin yanı sıra potansiyel olarak tehlikeli malzemelerin kullanım riskini azaltmada avantajlı olmaktadır [59]. Reaksiyonun gerçekleşeceği alandaki daralma, bu tür mikroişkan sistemlerin avantajlarından bir diğeridir. Reaktifler, boyutların genellikle onlarca ila yüzlerce mikron mertebesinde olduğu kanallar ile sınırlandırıldığında daha kısa mesafelere yayılmak zorunda olduklarından reaksiyon olasılığı artmaktadır [60]. Mikro kanallar reaksiyonun tek bir yüzeyde gerçekleşeceği zaman daha etkili olmaktadır. Çünkü, reaktanlar yüzey ile karşılaşmadan önce daha kısa mesafe katetmektedirler. Ayrıca sistemi daha önce kullanılmayan reaktanlardan temizlerken aynı anda hızlı bir şekilde tekrar doldurma

imkanı da sağlamaktadır. Yüksek yüzey alanı-hacim oranları, reaksiyon veya prosten veya prosese hızlı ısı transferini mümkün kıldığından, sınırlı geometrilerdeki ısı transferini de artırmaktadır [60].

Mikroakışkan sistemlerde sıvı akışının davranışı da istenen deneysel parametrelere katkıda bulunmaktadır. Akış türbülansın yoksun, laminardır ve akışkan, aralarında çok az kesintiye uğrayacak şekilde belirlenmiş paralel katmanlar halinde akar [61]. Bu da mevcut geometride akışın hassasiyetle kontrolüne ve tahmin edilebilir davranışına yol açmaktadır [62]. Laminer akış rejiminde reaktiflerin birbirleri ile çok az karışırlar, bu da ilgili reaksiyonlara bağlı olarak bir sorun oluşturabilir. Ancak reaktiflerin mikroakışkan cihaz boyunca belirlenmiş bir yörüngede bulunması analit tespiti için avantajlı olmaktadır. Bunun bir örneği, damlacık veya parçacık ayırma/sınıflandırmadır. Burada deney başladığında kurulumda hiçbir değişiklik yapılmadığı halde kanaldan aşağı akan damlacıkların veya parçacıkların tek bir sıra halinde [63] bir lazer ışınıyla karşılaşmaktadır.

Birçok farklı bileşen, daha büyük ekipmana ihtiyaç duymadan karmaşık prosedürlerin gerçekleştirilmesine olanak tanıyan tek bir cihaza entegre edilebilmektedir. Karıştırıcılar, ayırıcılar, parçacık tuzakları [56, 64], pompalar [65, 66], filtreler [67] ve damlacık üreteçleri [68, 69] gibi bazı bileşenler geometrik yollarla entegre edilmektedir. Elektrotlar, manyetik bileşenler veya kimyasal sensörler gibi özellikler atomik katman biriktirme, kimyasal ıslak aşındırma veya hatta geleneksel yapışma teknikleri (tutkal veya bant) gibi teknikler aracılığıyla eklenebilmektedir [70–73]. Birçok bileşenin tek bir cihaza entegrasyonu, taşınabilirliği artırarak daha hızlı test için sahaya veya hastanın başucuna kolay taşınmasına olanak tanımaktadır. İlgili prosedüre bağlı olarak, cihazlar pasif olabilmekte yani, önceden cihaz içerisine yerleştirilmiş bazı reaktiflerle kapiler etki ile etkileşime girmek için bir numune damlacığının uygulanmasını gerektirebilmektedir [74–76]. Bu minyatürleştirme, kullanım kolaylığı ve hızlı sonuç alma açısından mikroakışkan sistemlerin sürekli gelişimi için bir motivasyon sağlamaktadır.

İlk altyapı hazır olduğunda mikroakışkan cihazların imalatı oldukça düşük maliyetli olmakta, bu da tasarım tamamlandıktan sonra cihazların hızlı bir şekilde kopyalanmasına yol açmaktadır. Tek bir fotomaskeye eklenen veya lazer ile çizilen birden fazla tasarımın paralel olarak üretilmesi ile cihazların hızlı prototiplenmesi kayda değer bir avantaj

sağlamaktadır. Bu, kanal boyutu veya damlacık nozzle genişliği gibi birçok değişkenin değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Nihai tasarım tamamlandığında, seri üretim nispeten daha basit olabilmektedir. Ticarileştirme açısından, belirli bir çözümün üretimini ölçek büyütme konusunda genellikle sorunlar vardır ve bu da daha fazla sorun ile başa çıkma durumuna yol açabilmektedir. Mikroakışkan cihazlarla, verimi artırmak için paralel bağlantılar yoluyla cihazları çoğullamak oldukça basit hale gelmektedir [77].

1.3.1. Mikrofabrikasyon

Bir mikroakışkan çip için malzeme seçimi, bir cihazın istenen özelliklerine ve işlevine bağlıdır. Mikroakışkan çip için kullanılan malzemeler aşağıda dört başlık halinde toplanmıştır:

- a. **Cam ve Silikon:** Mikroakışkan sistemlerin erken dönemdeki gelişiminde, substrat olarak silikon ve yarı iletken imalatında kullanılabenzer teknikleri kullanılmıştır [78]. Bu cihazlar, tehlikeli kimyasal işlemler gerektirir ve silikonun kırılkan yapısı nedeniyle genellikle ele alınması zordur. Cam, optik şeffaflığı ve kimyasallara karşı direnci nedeniyle popüler bir malzemedir [70]. Cam yongalarının imalatında ardından kanal derinliği vermek için camın kazındığı fotolitografi tekniklerini kullanılmaktadır [79, 80].
- b. **Termoplastikler ve termosetler:** PMMA (Polimetil metakrilat), polikarbonat (PC), polistiren, polietilen tereftalat (PET) ve polivinil klorür (PVC) gibi termoplastikler, çeşitli dezavantajlar olmasına rağmen, kalıplama yoluyla cihazlar oluşturmak için kullanılmaktadır. Gerekli olan kalıplar genellikle metal veya silikondur, yani prototipleme sırasında cihaz tasarımında birden fazla değişiklik yapmak zorlaşmaktadır (seri üretim daha kolay olmasına rağmen). Bu plastikler çoğu organik çözücü ile uyumsuzdur ve gaz geçirgen değildir. Bu da onları gaz değişiminin gerekli olduğu uzun süreli hücre kültürü gibi uygulamalar için uygunsuz hale getirmektedir. Termoplastiklerin yapıştırılması zordur, ancak tutkal destekli birleştirme veya kanalların bir kalıpta mekanik kenetlenmesi yoluyla elde edilir [81].
- c. **Silikon elastomerler:** Yumuşak polimer elastomerler, mekanik strese maruz bırakıldıklarında elastik özellikler sergileyen çapraz bağlı polimer zincirlerinden

oluşur [36]. Bunların en popülerleri polidimetilsiloksilandır (PDMS) [70, 77, 79]. PDMS düşük maliyetlidir ve üretilmesi kolaydır, bu da onu birçok mikroakışkan laboratuvarında temel bir malzeme haline getirmektedir. Sıvı polimer 40-70 °C arasında kürlenir ve nanometre çözünürlükteki şablonlarını kopyalayabilen ölçü kalıplama kullanılarak dökülür [70]. Dökümden sonra (esnek/soft litografi) cihaz, sırasıyla basit temas veya oksijen plazmasına maruz bırakma yoluyla bir altlığa (genellikle cam) tersinir veya geri döndürülemez şekilde bağlanabilir. Çok katmanlı kanallar, farklı katmanları birbirine bağlamak için PDMS yığınlarını silindirik konektörlerle üst üste istifleyerek oluşturulabilmektedir [82]. Çoklu katmanlar arasındaki zar yeterince inceyse, PDMS' in yüksek esnekliği, bir kanala basınç verilmesi yoluyla harekete geçen valf yapıları oluşturmak için kullanılabilir [83]. Bu valfler küçük ölü hacimlere sahiptir ve bir çip üzerine çok yoğun bir şekilde paketlenir [84, 85].

d. Kâğıt: Kâğıt tabanlı mikroakışkan sistemler sağlık, biyokimya ve analitik kimya gibi alanlarda hızla büyüyen bir kullanım alanına sahiptir. Kâğıt,

- I. İnce, hafif olması ve çeşitli kalınlıklarda üretilebilmesi,
- II. Saklanması, stoklanması ve taşınmasının kolay olması,
- III. Genellikle selüloz veya selüloz-polimer karışımından elde edilmesi, böylelikle biyolojik numuneler ile uyumlu olması,
- IV. Biyolojik yapılar (protein, DNA vb.) ile ilgili işlemlerde kimyasal olarak modifiye edilebilmesi

gibi özellikleri ile öne çıkmaktadır [86]. Kâğıt, selüloz fiberlerin bir arada baskılanması ile elde edilmektedir [87]. Tanı ve tespit amaçlı sistemlerde genellikle filtre veya kromatografi kağıdı gibi saf selülozdan yapılmış veya nitroselüloz membran gibi nitrik asit ile muamele edilmiş malzemeler kullanılmaktadır [88].

1.3.2. Mikroakışkan sistemlerde akış

1.3.2.1. Laminer akış ve Reynolds sayısı

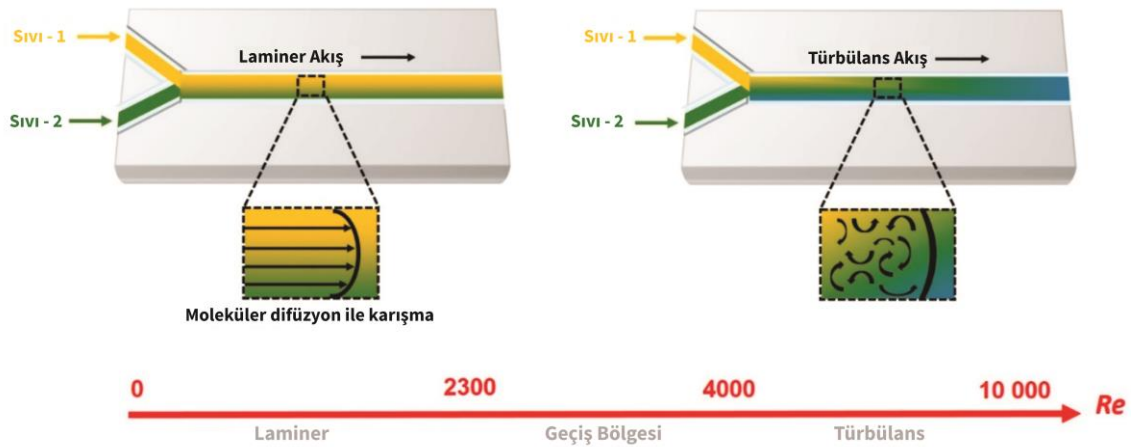
Mikroakışkan cihazlarda sıvı akışı laminer iken hacimli sistemlerde akış ağırlıklı olarak türbülans akış görülmektedir [61]. Bu türbülans, sıvıların dış etki olmaksızın birbirine karışmasını sağlar. Laminer akışta karıştırma, yalnızca birbiriyle temas halindeki sıvı akışları arasındaki difüzyon nedeniyle oluşur. Laminer akış, bir sistemdeki eylemsizlik kuvvetlerine viskoz kuvvetler hâkim olduğunda meydana gelmektedir [60, 89]. Bir akışın akış rejimini belirlemek için, bir akıştaki eylemsizlik kuvvetlerinin viskoz kuvvetlere oranı olan Reynolds sayısı hesaplanabilir:

$$Re = \frac{\rho u D_H}{\mu} \quad (1.1)$$

Burada, ρ = yoğunluk (kg m^{-3}), u = ortalama sıvı hızı (m s^{-1}), D_H = kanalın hidrolik çapı (m) and μ = sıvı viskozite ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) değerini göstermektedir. Bir kanalın hidrolik çapı, kanalın alanına ve Eşitlik 1.2'de gösterilen ıslak çevresine bağlıdır [90]:

$$D_H = \frac{4A}{P} \quad (1.2)$$

2300'den küçük Reynolds sayısında akışın laminerdir ve genellikle mikroakışkan cihazlar 1'den küçük Reynolds sayılarında çalışmaktadırlar [61, 91].



Şekil 1.11. Mikroakışkan sistemlerde akış rejimi [92].

Akışkan içindeki tek bir molekülün rastgele statik hareketi Einstein-Smoluchowski ilişkisi ile karakterize edilmektedir:

$$x = \sqrt{2Dt} \quad (1.3)$$

Burada t = molekül çarpışmaları arasında geçen süre (s), x = t süre sonundaki ortalama hareket uzaklığı (m), D = difüzyon katsayısını (m^2s^{-1}) göstermektedir. Difüzyon, bir sistem içindeki moleküllerin konsantrasyon değişimleri nedeniyle ortaya çıkar. Bu ilişkinin mikroakışkan sistemler açısından önemi örnek olarak hemoglobinin sudaki difüzyonunda görülebilir. Hemoglobinin bir difüzyon katsayısı $D = 7 \times 10^{-7} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 'dir, bu nedenle 1 cm'yi kat etmesi 10^6 s, $10 \mu\text{m}$ 'ye yayılması ise sadece 1 saniye sürmektedir [60]. Bir mikroakışkan kanalında, çevreleyen malzemeye kıyasla yüksek sıvı konsantrasyonu, bu malzemeye difüzyona neden olur ve mikroakışkan cihazlarda karakteristik olan küçük uzunluk ölçekleri nedeniyle önemli bir etki oluşturabilir [61].

Bir mikroakışkan kanalın direnci, elektronik devrelere benzer bir şekilde gösterilebilir [93]. Ohm yasası, direnç, voltaj ve akım için $R = V/I$ olduğunu belirtir ve bu, mikroakışkan akışına benzerdir:

$$Q = \frac{\Delta P}{R} \quad (1.4)$$

Burada, Q = hacimsel akış hızı (m^3s^{-1}), ΔP kanalın başından sonuna kadar olan basınç düşüşü (Pa) ve R = kanalın hidrolik direnci ($\text{Pa m}^{-3}\text{s}$) göstermektedir. Mikroakışkan tasarımları analiz ederken, bu analogiler seri ve paralel kurallar hala geçerli olduğundan kullanışlı olmaktadır. Seri kanal dirençleri toplanırken paralel kanalların direnci şu şekilde hesaplanır:

$$\frac{1}{R_T} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \dots \quad (1.5)$$

Kanalın hidrolik direnci, kanalın geometrisine bağlıdır ve Navier-Stokes denkleminin analitik çözümlerinden elde edilir [61]. Dairesel kanalın direnci is aşağıdaki eşitlikte verilmiştir. Burada μ is sıvı viskozitesini ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$), L kanalın uzunluğunu (m), ve r ise yarıçapı (m) göstermektedir. Genel olarak, mikroakışkan cihazlar üretilirken ortaya çıkan kanallar dikdörtgen şeklindedir. Dikdörtgen bir kanalın direnci Eşitlik 1.6 [89] ile

hesaplanır, burada h kanal yüksekliği ve w genişliğidir (Bu denklem $w \gg h$ olan kanallar için geçerlidir).

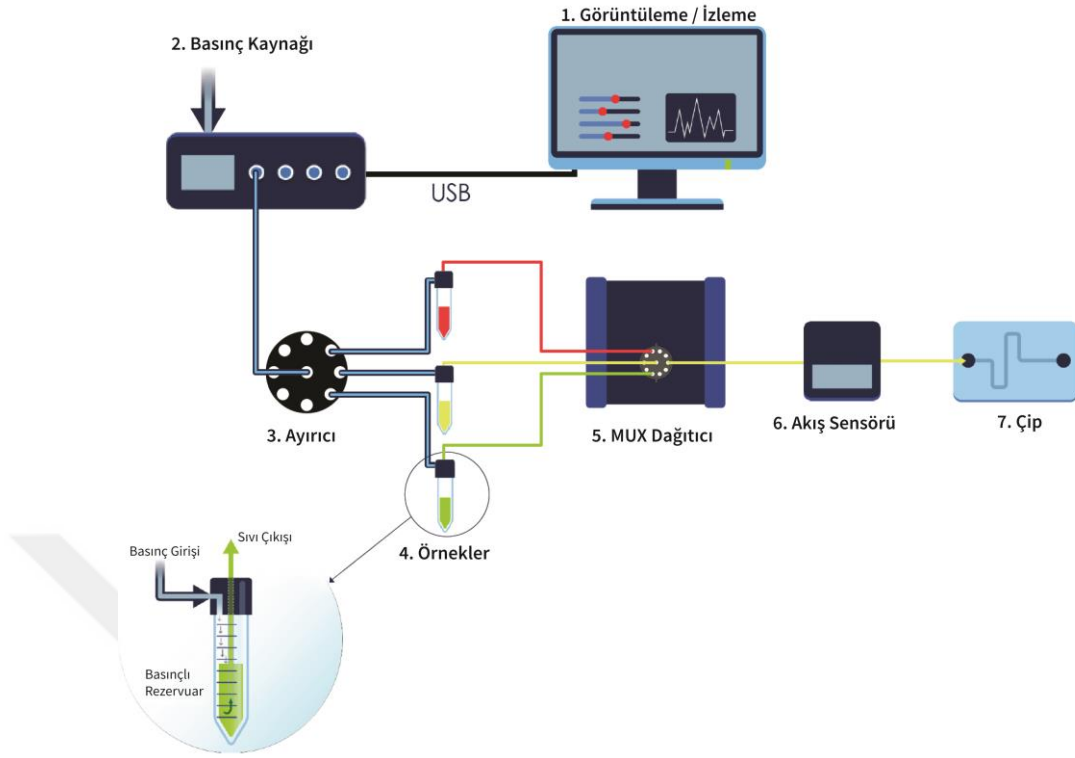
$$R = \frac{8\mu L}{\pi r^4} \quad (1.6)$$

$$R = \frac{12\mu L}{\omega h^3(1 - 0.63h/\omega)} \quad (1.7)$$

Sıvı akışının eşlik ettiği mikroakışkan sistemler aktif ve pasif mikroakışkan sistemler olarak ikiye ayrılmaktadırlar [59, 84]. Aşağıdaki başlıklar altında bu sistemler detayları ile birlikte açıklanmıştır.

1.3.3. Aktif Mikroakışkan Sistemler

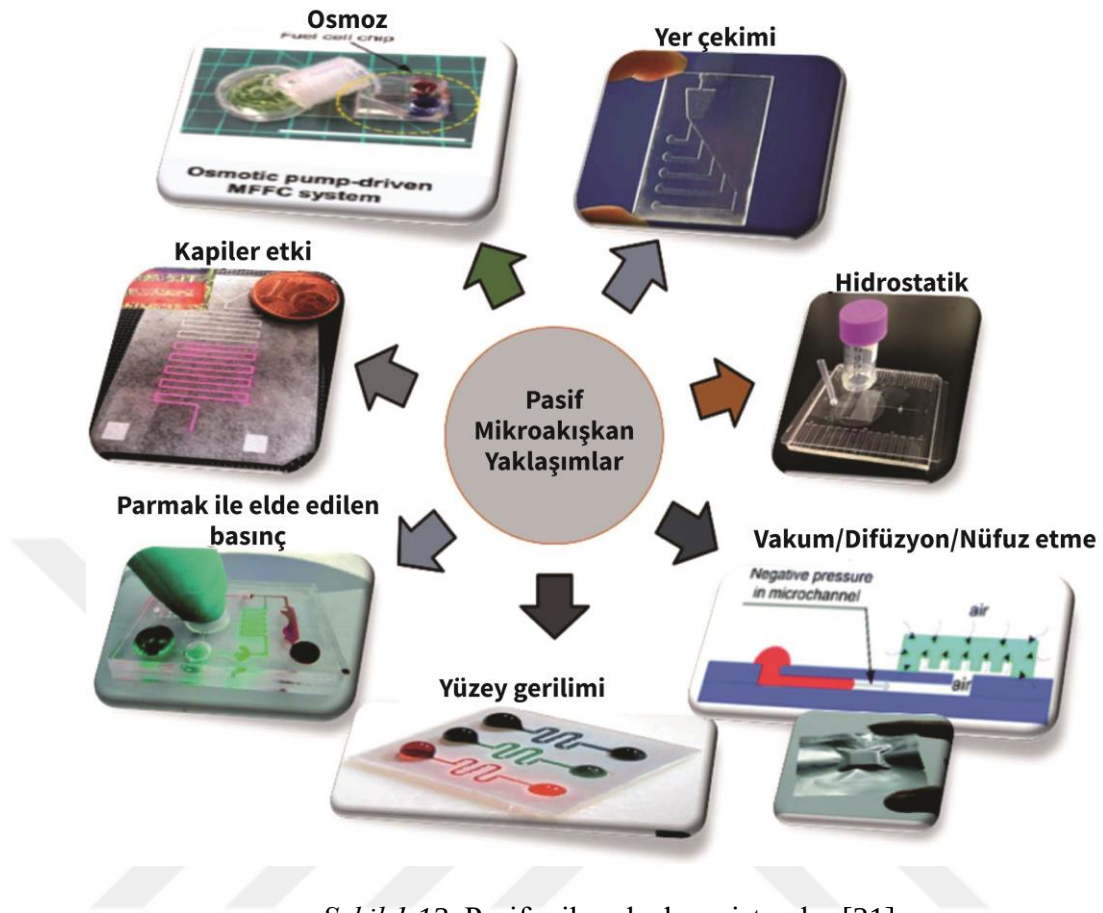
Aktif mikroakışkan sistemler, sıvı akışının dışarıdan donanımlar ile sağlandığı mikroakışkan sistemlerdir. Bu donanımlar peristaltik [94], elektro-kinetik [95], elektro-ozmotik [96], santrifüj ve manyetik pompalar [97] gibi dış güç kaynağı/alani ve aktüatörlerden oluşmaktadır. Ek olarak, bu donanımların çalışmasını sağlayan güç kaynakları da gerekmektedir. Bu durum sistemi daha karmaşık bir hale getirmekte, boyutunu büyütmemekte ve ekstra insan kaynağı gerektirmektedir. Böylelikle taşınabilirlik kısıtlanmakta ve dolayısıyla hasta başı analiz ve çip üstü analiz uygulamalarına entegre edilmesi zorlaşmaktadır. Ayrıca, bu durum maliyeti de artırmaktadır. Pasif mikroakışkan sistemlere göre daha yüksek verime sahip olmalarına rağmen, bazılarının biyolojik örneklerle zarar vermesi daha az tercih edilmelerine sebep olmaktadır [98].



Şekil 1.12. Aktif mikroakışkan sistem örneği [99]

1.3.4. Pasif Mikroakışkan Sistemler

Dış kaynaklar gerektirmeden sıvının özelliklerini, kanal geometrisini ve fiziksel pasif mekanizmaları kullanan sistemlerdir. Basit ve üretimi kolaydırlar; aktüatör veya dış güç kaynağı gerektirmezler. Yüzey gerilimi, basınç, osmoz, kapilerlik, yer çekimi, hidrostatik basınç veya vakum gibi metotları kullanmaktadırlar. Dış kaynak yerine basit laboratuvar enstrümanları, yani mikropipet, şırınga gibi elemanlar kullanmaktadırlar. Maliyet etkin ve taşınabilir olmaları hasta başı analiz sistemlerine entegre edilmelerini kolaylaştırmaktadır. Seri üretimleri de daha kolaydır. Kâğıt tabanlı mikroakışkan sistemler, ör. gebelik testi, sıvı taşınımı kapilerlik etkisine dayandığından pasif mikroakışkan cihazlar kategorisine girmektedir. Verimi artıracak yönde gelişmeler ile birlikte endüstriyel çözümler için doğru seçim olacaktır [21, 98, 100].



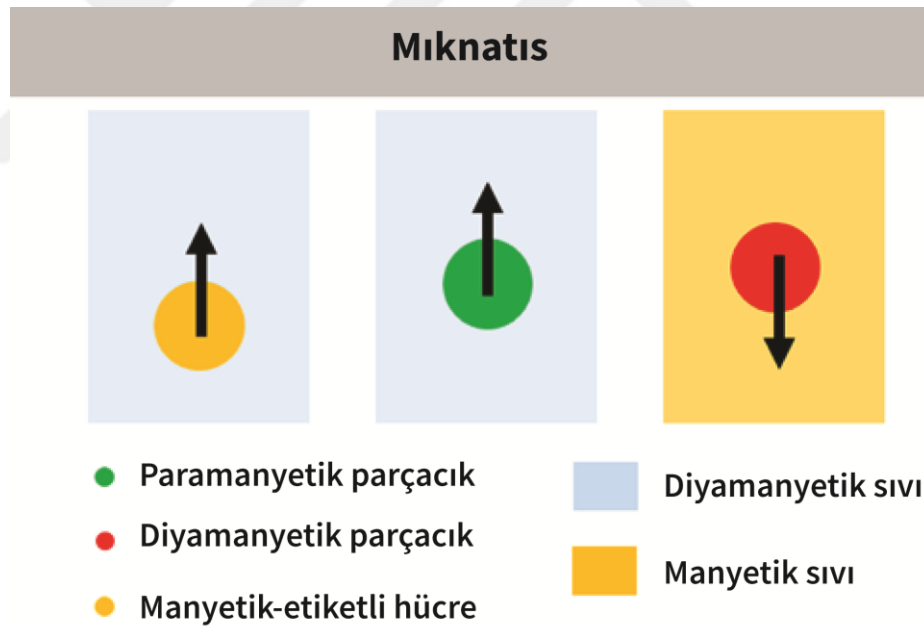
Şekil 1.13. Pasif mikroakışkan sistemler [21]

1.4. Manyetoforezis

Manyetoforezis, manyetik kuvvetler kullanılarak parçacıkların ayrılmasını içeren bir işlemdir. Biyomedikal sensörlerde bu işlem, farklı türdeki biyolojik materyalleri nano veya mikro düzeyde ayırmak için kullanılır. Pozitif ve negatif manyetoforezis olmak üzere iki tip manyetoforezis vardır. Pozitif manyetoforeziste, manyetik parçacıklar diyamanyetik bir ortamda hareket ettirilirken, negatif manyetoforeziste diyamanyetik parçacıklar manyetik bir ortamda hareket ettirilir. Manyetoforezisi gerçekleştirmek için manyetik alanda bir gradyan, ortamın kendisinin manyetizasyonunda bir gradyan veya her ikisinin birleşimi olabilir [101].

Manyetoforezisin farklı uygulamaları vardır; Huang ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada Dolaşan Tümör Hücreleri, manyetik kuvvetin etkisini artırmak için özel yapılara sahip özel bir manyetoforetik mikrokana kullanılarak ayrılmıştır [102]. Osman ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, immünomanyetik hücreler, yüksek miktarda hücre hapsine yol açan desenli manyetizasyonlu bir mikroakışkan kanal kullanılarak ayrılmıştır

[103]. Darabi ve Guo, insan kanından yalnızca monositleri elde etmek için manyetoforezis gerçekleştiren bir mikroakışkan çip geliştirmişlerdir. Bu çip, sadece monositlerin çipten dışarı akmasına izin verilirken, diğer tüm hücrelerin çip içinde tutulduğu bir negatif seçim yöntemi kullanıyordu [104]. Xia ve arkadaşları, canlı hücrelerin sürekli ayrılmasını gerçekleştirebilen bir mikroakışkan manyetoforetik cihaz geliştirmişlerdir. Özel bir mikrofabrik tarak benzeri yapı kullanılarak elde edilen bir manyetik alan gradyanı ile yüksek bir manyetik kuvvetin yaratıldığı bu deney için laminar akış ve manyetik ayırma uygulanmıştır [105]. Manyetoforezis; Pivetal ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada uygulandığı üzere bir silikon plaka yüzeyinde manyetize ve ters manyetize bölgelere sahip bir model oluşturularak bakterileri ayırmak için de kullanılabilir. Ters manyetizasyonlara sahip model, yüksek manyetik alan gradyanlı bölgelerin oluşmasına neden olmuş ve bu da parçacıklar üzerine yüksek manyetik kuvvet uygulanmasına yol açmıştır [106].



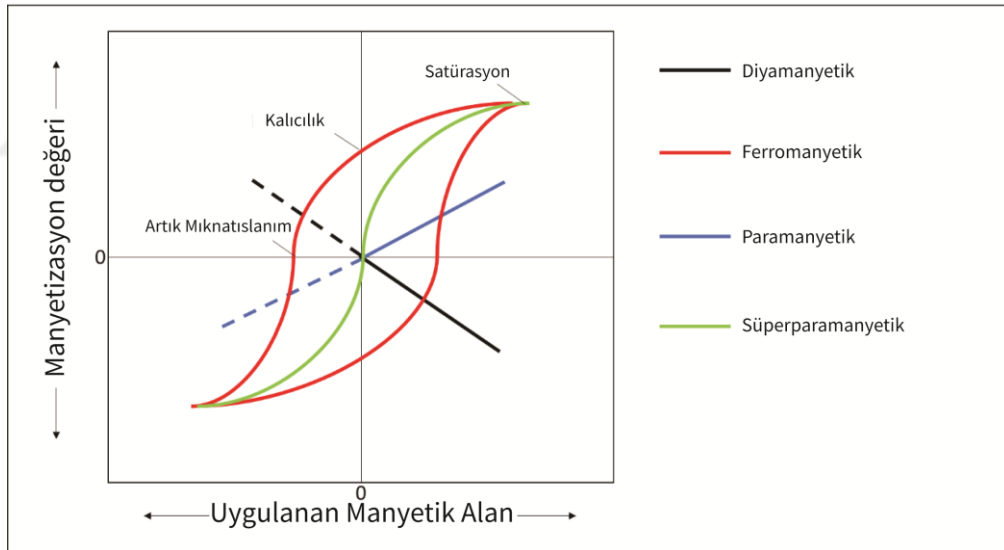
Şekil 1. 14. Pozitif ve negatif manyetoforezisin şematik gösterimi [107]

1.5. Mikro/Nano Manyetik Parçacıklar

Manyetoforetik uygulamalar için mikro boyutlu veya nano boyutlu manyetik parçacıklar kullanılır. Bu parçacıklar genellikle süperparamanyetik parçacıklardır. Yaygın olarak kullanılan süperparamanyetik parçacıklardan biri de demir oksit bazlıdır, örneğin maghemit gibi [108]. Diğer tür parçacıklar ise ferromanyetik parçacıklardır.

Ferromanyetik parçacıkların, daha önce uygulanan bir manyetik alan kaldırıldıktan sonra bile, net manyetik dipol momentleri vardır. Paramanyetik parçacıklar ise dipolleri yalnızca bir harici manyetik alan uygulandığında hizalarlar. Şekil 1.15

Bir manyetik alan altında farklı tipteki manyetik malzemelerin manyetik davranışı [113]., bir manyetik uygulama alanı altında farklı türdeki manyetik malzemelerin manyetik davranışını göstermektedir. Manyetik davranışın türü manyetoforezide önemlidir çünkü parçacıkların etkileşim şeklini etkiler. Parçacıklar ferromanyetik ise, ideal olmayan bir şekilde birbirlerine yapışıp topaklaşırlar. Süperparamanyetik parçacıklar ise bir araya toplanıp küme oluşturmazlar. Bu nedenle sadece manyetik kuvveti deneyimlerler, bu da onları manyetoforezis için ideal hale getirmektedir [109]. Manyetik parçacıklar ayrıca hassasiyet arttırımı [110] ve sinyal amplifikasyonu [111, 112] için de kullanılmaktadır. Sinyal amplifikasyonu için, manyetize edilmiş manyetik parçacıklar bir mıknatıs gibi davranır ve yakındaki diğer manyetik parçacıkları çeker.



Şekil 1.15. Bir manyetik alan altında farklı tipteki manyetik malzemelerin manyetik davranışı [113].

İmmünomanyetik boncuklar (IMB), belirli antikorlar tarafından işlevselleştirilmiş yüzeylere sahip bir tür manyetik parçacıktır. Bu antikorlar, bir hücrenin zarında bulunabilecek spesifik proteinlere veya moleküllere bağlanmak için kullanılır. İmmünomanyetik boncuklar oldukça spesifiktir ve bu nedenle çoğu hücre tipini etiketlemek için kullanılamazlar [114]. Bu yüzden, sadece belirli hücreler bu tür bir yaklaşım kullanılarak etiketlenebilir ve ayrılabilir. İçöz ve ark. tarafından yapılan araştırmada da uygulandığı üzere, spesifik bir antikora sahip immünomanyetik boncuklar,

spesifik bir antijen veya yüzey proteini eksprese eden hücreleri etiketlemek için kullanılabilir [115].

1.6. Mikroakışkan Sistemde Parçacığa Etkiyen Kuvvetler

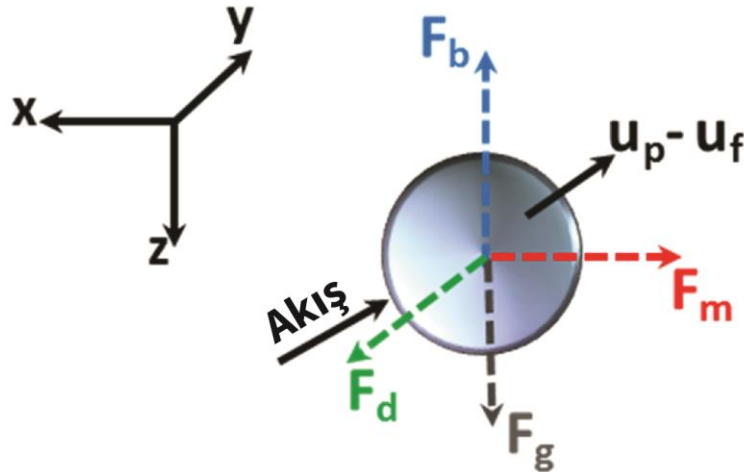
Bir mikroakışkan sistemde, hareketli bir parçacık üzerindeki kuvvet dengesi Eşitlik 1.8 ile gösterilebilir.

$$m_p \frac{du_p}{dt} = F_m + F_g + F_d + F_B + F_L \quad (1.8)$$

Parçacığın kütesinin m_p ile verildiği yerde, u_p parçacığın hızıdır. F_m , F_g , F_d , F_B ve F_L sırasıyla manyetik kuvvet, yerçekimi kuvveti, sürüklenme kuvveti, Brown kuvveti ve kaldırma kuvvetidir. Mikron boyutundaki parçacıklar için en baskın kuvvet manyetik kuvvettir [116]. Parçacık üzerindeki manyetik kuvvet, 1.9 numaralı eşitlik ile temsil edilebilir.

$$F_m = \frac{V_p \Delta \chi}{2\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (1.9)$$

V_p parçacığın hacmidir, $\Delta \chi$ parçacığın malzemesinin manyetik duyarlılıkları ile parçacığın içinde bulunduğu ortam arasındaki farktır. B manyetik alan, μ_0 manyetik geçirgenliktir [117].

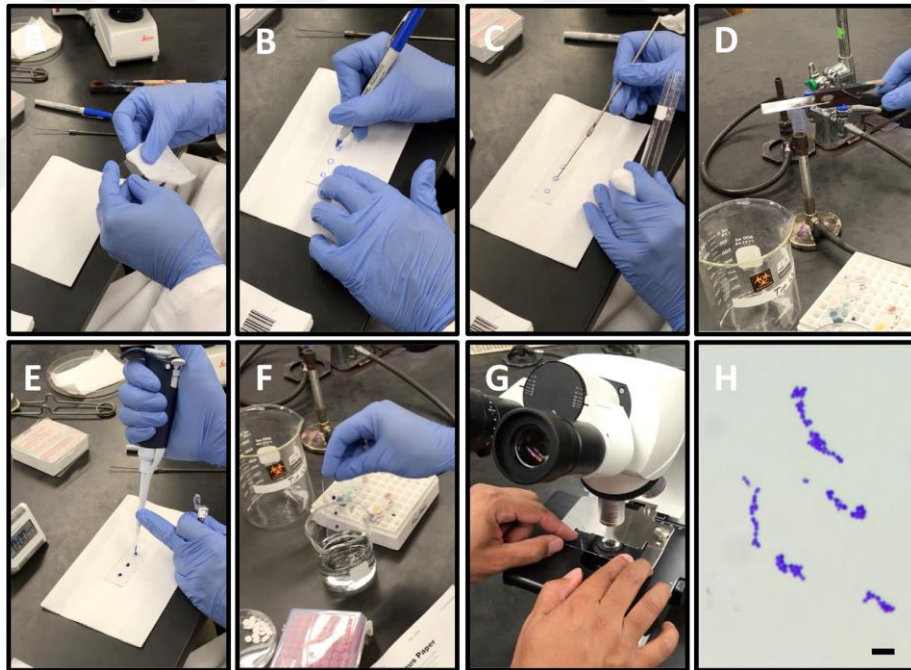


Şekil 1.16. Manyetik alan içerisindeki hareketli parçacığa etki eden kuvvetler [107]

1.9. Literatür Araştırması

Standart hücre boyama tekniklerinin iyileştirilmesine yönelik literatürde gerçekleştirilen güncel çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

- Siguenza ve arkadaşları (ark.) tarafından boyama işlemlerinde harcanan reaktiflerin miktarının azaltılmasına yönelik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada lam üzerinde dairesel işaretlenen minimum üç adet bölgede standart boyama prosedürü kullanılarak boyama yapılmıştır (Şekil 1.17). Kullanılan reaktiflerin miktarı mikrolitre seviyelerine kadar azaltılmıştır. Dolayısıyla çıkan atık miktarı ve maliyet de düşürülmüştür. Ancak bu yöntemde de standart boyamanın eksi yönlerinden ısı ile sabitleme ve küvette yıkama yapıldığından optimum bir yöntem geliştirilememiştir [8].



Şekil 1.17. Siguenza ve ark. tarafından standart boyama işlemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışma [8]

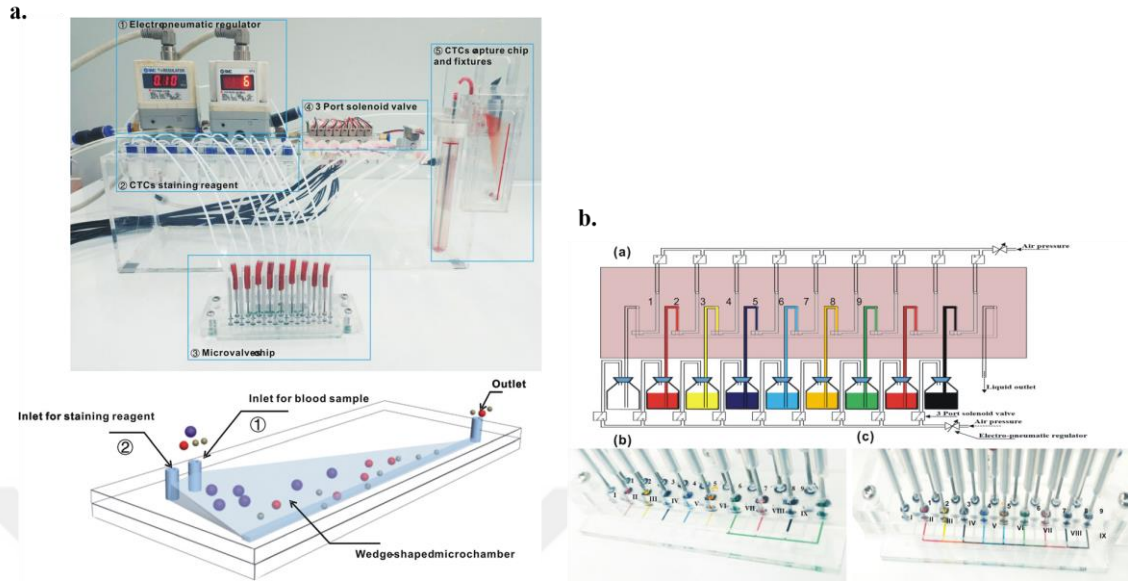
- Hu ve ark. maliyetinden dolayı rutinde hücre boyama işleminin yapıldığı her laboratuvarında bulunmayan sitosantrifüj cihazının yerine basit bir alternatif yöntem önermişlerdir (Şekil 1.18.). Sitosantrifüj cihazında örneklerin konulduğu huni ile boyamanın üzerinde yapılacağı lam arasındaki bağlantıyı sağlayan sitoklips adı verilen metal bir kısım bulunmaktadır. Bu kısımda nispeten

maliyetlidir. Çalışmada kültürden toplanan hücreler normal santrifüj prosedürüne tabi tutulduktan sonra 0.5 mL besi yerinde açılmış ve cam hücre yayıcı kullanılarak tek tabaka halinde lamın üzerine yayılmıştır. Kimyasal fiksatif ile fikse edilerek havada kurutulmuş ve boyama işlemlerine devam edilmiştir [7]. Burada, her ne kadar boyama işlemi basitleştirilse de boyamada kullanılan reaktif miktarları azaltılamamıştır. Ayrıca sistem kontaminasyona da açıktır.



Şekil 1.18. Hu ve ark. tarafından sitosantrifüj yerine önerilen sistem [7]

- Hong ve ark. 1 yüksek performanslı bir multipleks mikrovalf geliştirmişler ve bunu tümör hücrelerinin boyanması amacıyla kullanmışlardır. Çalışmada hava basıncı ile PDMS katmanının deforme olması özelliğinden faydalanılarak valflerin çalıştırılması sağlanmıştır. Ancak bu çalışmada Şekil 1.19. a'da da görüldüğü üzere hava basıncı sağlamak amacıyla elektropnömatik düzenleyici, 3 port solenoid valf gibi ekstra aktif elemanlar gerekmektedir. Bu da sistemi karmaşık hale getirmekte, maliyeti artırmakta ve deneyimli eleman ihtiyacı doğurmaktadır. Dolayısıyla geliştirilen sistemin hücre boyama işlemlerinin yapıldığı standart bir laboratuvarın rutin işleyişine girmesi oldukça zordur [83].



Şekil 1.19. Hong ve ark. 1 tarafından geliştirilen multipleks mikrovalf sistemi: a. Genel sistem ve çip, b. Boyama işlem adımları [83]

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

Bu çalışmada, insan ökaryotik hücrelerinin, K562 hücrelerinin ve hastalardan elde edilen lenfosit hücrelerinin basit boyamasını gerçekleştirmek için manyetik tabanlı çalıştırılan ve kompartımanlara ayrılmış pasif bir mikroakışkan çip geliştirilmiştir. Bu bölümde hücrelerin kültürü ve manyetik boncuklar ile konjugasyonu, çipin üretimi ve yüzey modifikasyonları, hücre boyama prosedürü ve boyanan hücrelerin incelenmesi ve analizi konuları verilmiştir.

2.1. Reaktifler ve Materyaller

Tüm çözeltiler, Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS, pH 7.4, Biological Industries, İsrail) ile hazırlanmıştır. MACS tamponu, %1 w/v Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, ABD) ve 2 mM Etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Sigma-Aldrich) ile hazırlanmıştır. CD45 antikoru ile konjuge edilmiş süperparamanyetik boncuklar (Dynabeads® CD45, 4.5 µm çaplı) Invitrogen'den (ABD) satın alınmıştır. Fiksasyon solüsyonu 0.4 g paraformaldehit tozunun (Sigma-Aldrich, ABD) önceden 50°C'ye ısıtılmış 10 mL PBS içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. PBS içinde %0.5' lik BSA ile BSA bloklama yapıldıktan sonra çip, ultra saf su (25°C'de 18.2 MΩ CM) ile yıkanmıştır.

25 cm × 25 cm × 1,5 mm Polymethylmethacrylate (PMMA) plakaları McMaster Carr' dan (ABD) ve 3 mm × 3 mm × 3 mm Neodymium N42 kalıcı kübik mıknatıslar (Hefei Super Electronics, Çin) yerel hobi mağazasından satın alınmıştır. Çip parçaları lazer sistemi (Epilog Laser, ABD) kullanılarak üretilmiştir. Çip parçalarını yapıştırmak amacıyla kloroform (ZAG Kimya, Türkiye) buhar uygulaması kullanılmıştır. Üretilen çipler, hidrofilikliğini artırmak amacıyla plazma temizleyici ile 1 dakika (dk.) boyunca atmosferik plazma uygulamasına tabi tutulmuştur.

Boyama için, %0.4 TM Sigma-Aldrich' den (ABD) temin edilmiş ve %0.1, %0.05 ve %0.01 konsantrasyonlarda kullanılmıştır. KV, MM ve safranin boyaları Norateks Kimya' dan (Türkiye) temin edilmiştir. KV ve MM 1:10 oranında seyreltilmiş ve safranin seyreltilme yapılmadan direkt olarak kullanılmıştır.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Hücre Kültürü

K562 akut miyeloid lösemi hücre hattı ATCC 'den (American Type Culture Collection) temin edilmiştir. Hücreler, %10 FBS ilave edilmiş RPMI 1640 besi yerinde %5 CO₂ sabit akışı altında 37°C' de inkübatörde kültüre edilmiştir. Kültüre edilmiş hücreler 500g' de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve daha sonra PBS ile üç defa yıkanmıştır. Canlı hücrelerin sayısını belirlemek için, hücreler 1:1 oranında TB ile boyanmış ve manuel olarak Neubauer sayım lamında (Sigma-Aldrich, ABD) sayılmıştır.

2.2.2. Hasta Örnekleri

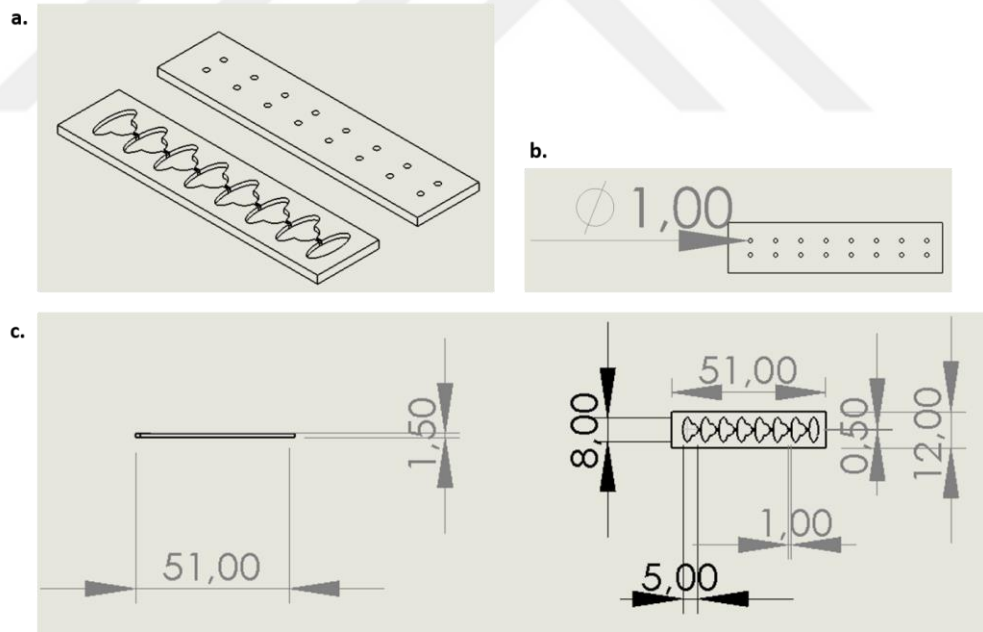
İnsan lenfosit hücre örnekleri Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi' nden (GENKÖK) alınmıştır. Erciyes Üniversitesi etik kurul komitesi çalışma protokolünü (#2021/178) kabul etmiş ve tüm hastalardan gönüllü onam formu alınmıştır. Örnekler, lökosit adezyon defekti (LAD) tanısı konulmuş olan hastalardan alınmıştır. Deneylerde kullanılan örnekler CD4⁺ T lenfosit hücreleri haricindeki lenfosit hücrelerinden oluşmuştur, yani kullanılan hücreler negatif olarak seçilmiştir. MojoSort™ izolasyon kitindeki (Biolegend, ABD) protokol uygulanarak, T hücreleri izole edilmiştir. Beyaz kan hücreleri olan çevresel kandaki tek çekirdekli hücreler (PBMCs), kan örneklerinden toplanmıştır. Daha sonra PBMCs MojoSort™ tamponunda tekrar açılmış, hücre sayısı hesaplanmış ve mililitrede 1 x 10⁸ hücre olacak şekilde optimize edilmiştir. Sonrasında, 10 mL biotin-antikor kokteyli ve hücre süspansiyonunun 100:1 lik kısmı (10⁷ hücre) ikinci bir tüpe alınmıştır. Boncukların 10:1 oranındaki miktarı karışıma aktarılacak şekilde vortekslenmiştir ve buzda 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ayırma tamponu eklendikten sonra, örnekler ayırma işleminden önce mıknatısın içerisine 5 dakika süre ile konulmuştur. Ayırma tamponu tekrardan etiketlenmemiş kısma eklenerek başka CD4⁺ T hücre alt gruplarından ayrı olarak CD4⁺ T hücrelerini izole etmek için eklenmiştir.

2.2.3. Hücre-Manyetik Boncuk Kompleksinin Hazırlanması

Santrifüj işlemi sonrasındaki yaklaşık 3×10^6 hücreye denk gelen hücre peleti, 980 μ L MACS tamponu içerisinde açılmış ve süspansiyona 20 μ L CD45 antikör konjuge süperparamanyetik boncuklar eklenmiştir. Karışım, 4°C’ de rotatör (MACSmix Tube Rotator Sample Mixing, Miltenyi Biotec, Almanya) ile nazıkçe inkübe edilmiştir. Hücre-süperparamanyetik boncuk kompleksi manyetik ayırım tüplüğünde steril PBS ile 3 defa yıkanmış ve üzerine 1 mL PBS tamponu eklenmiştir. Bu karışımın 20 μ L si hızlıca çipin ilk kompartımanına aktarılmıştır.

2.2.4. Çip Üretimi

Çip tasarımında 23. referanstan esinlenilmiştir. Çip şablonları CorelDraw X7 kullanılarak dizayn edilmiştir. Mikroakışkan çipin geometrik tasarımı ve ölçüm detayları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

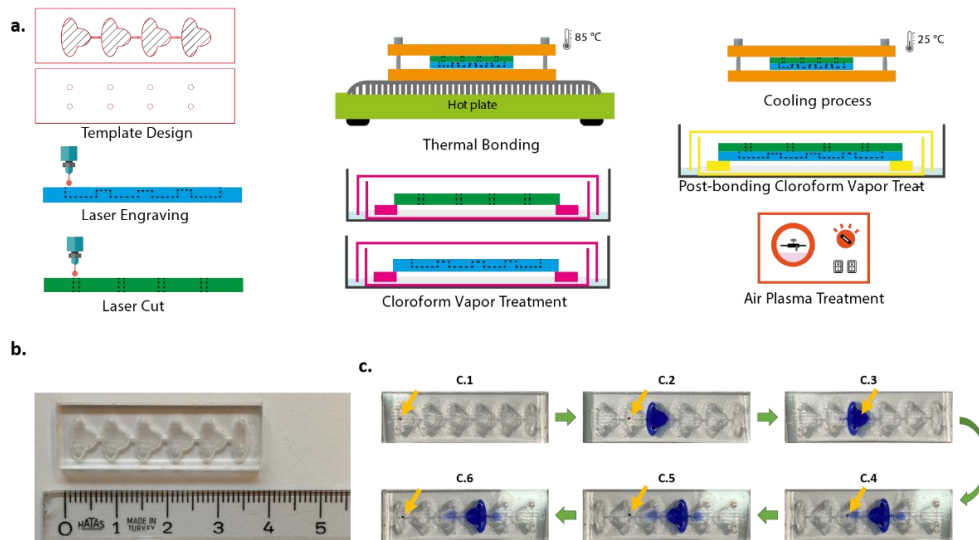


Şekil 2.1. Farklı perspektiflerden mikroakışkan çipin görünüşü: (a) çipin alt ve üst parçalarının izometrik görünüşü, (b) çipin üst parçasının üstten görünüşü, (c) çipin alt parçasının yan ve üstten görünüşü.

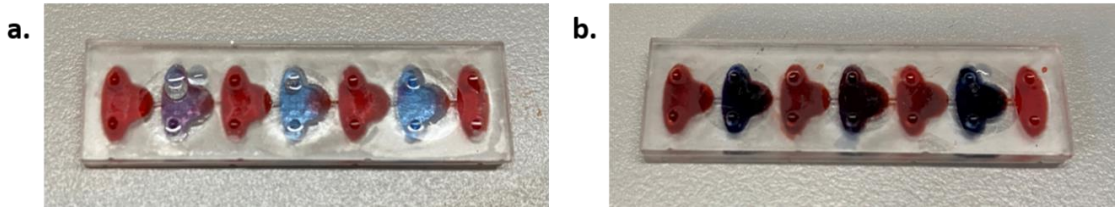
Altlık olarak kullanılan PMMA plakaların kalınlığı 1.5 mm’ dir. Üretim için lazer kesicinin taramalı kazıma ve vektör kesim özellikleri kullanılmıştır. Tüm işlemler boyunca çözünürlük 500 dpi olarak ayarlanmıştır. Çipin alt parçası için, PMMA plaka kompartıman ve kanalların oluşturulması için şablon baz alınarak kazınmıştır. 1 mm

çapındaki erişim delikleri başka bir düz plaka üzerinde vektör kesim ile kesilerek çipin üst parçası oluşturulmuştur. Üretim sonucunda her bir kompartımanın hacmi yaklaşık 20 μ L olarak hesaplanmıştır.

Yapıştırma öncesinde, çip parçaları 3 dk. boyunca kloroform buhar uygulamasına (CVT) tabi tutulmuştur. Kloroform, PMMA için çözücü bir maddedir. Çipte kazıma işleminden kaynaklanan yüzey sertliği ve matlık, kloroform buharına maruz bırakılarak azaltılmıştır. CVT' nin hemen sonrasında çip parçaları hizalanmış ve yapıştırılmıştır. Bu işlem yalnızca zayıf bağlantı sağlamaktadır. Yapıştırma gücünü artırmak ve sızıntıları önlemek için çip iki alüminyum plaka arasına sıkıştırılmıştır (Thor Labs BA2/M Mounting Base, 2" $\times$ 3" $\times$ 3/8" (50 mm $\times$ 75 mm $\times$ 10 mm)). Alüminyum plakalar arasındaki çip kompleksi daha önceden 85°C'de ısıtılmış ısıtıcı üzerine yerleştirilerek 10 dk. beklenmiştir. Termal yapıştırma işlemi sonrasında, kompleks oda sıcaklığında, 25°C, 10 dk. soğumaya bırakılmıştır. 10 dk. sonrasında soğuyan komplesten çip ayrılmıştır. Isıtma işlemi çipte matlığa sebep olmuştur. Isıtmadan kaynaklı bu matlığı gidermek için çip yeniden 2 dk. süre ile CVT' ye tabi tutulmuştur. Çip üretim süreci Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Hücre deneylerine geçmeden önce, çiplerde gıda boyaları ile renklendirilmiş deiyonize su ile akış dağılımı doğrulanmıştır. Doğrulan çiplere ait görüntüler Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.2. a. Çip üretim prosedürü, b. Altı kompartmanlı çipin üstten görünüşü, c. Cep telefonu ile çekilen çipte hücre-manyetik boncuk kompleksinin boyama prosedürü görüntüleri (c:C.1-C.6). Sarı oklar, hücre-manyetik boncuk kompleksinin pozisyonunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Çipte akış dağılımının doğrulanması

2.2.5. Çipin Yüzey Modifikasyonu

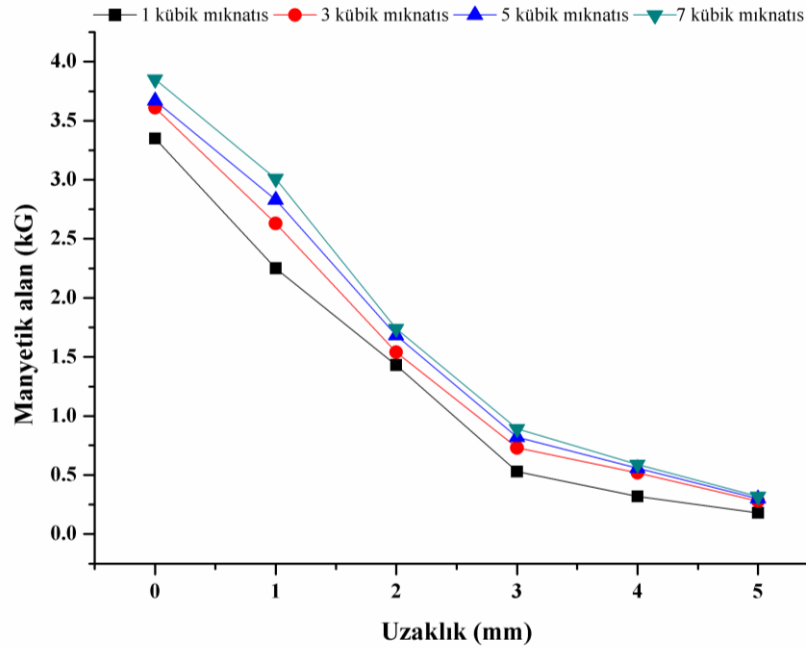
PMMA yüzeyleri doğal olarak hidrofobiktir. Hidrofiliklik elde etmek ve böylece sıvıları kompartımanlara ve kanallara kolayca yaymak için çipe, plazma temizleyici kullanarak 1 dakika boyunca termal olmayan atmosferik basınçlı plazma uygulanmıştır.

Deneyler sırasında hücrelerin çip yüzeyine yapışması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmıştır. Hücrelerin yapışmasını önlemek için blokaj ajanı olarak BSA solüsyonu uygulanmıştır. Çipin iç yüzeyleri %0.5'lik BSA solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücre deneylerinden önce, fazla BSA molekülleri, steril PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

2.2.6. Hücre Boyama Prosedürü

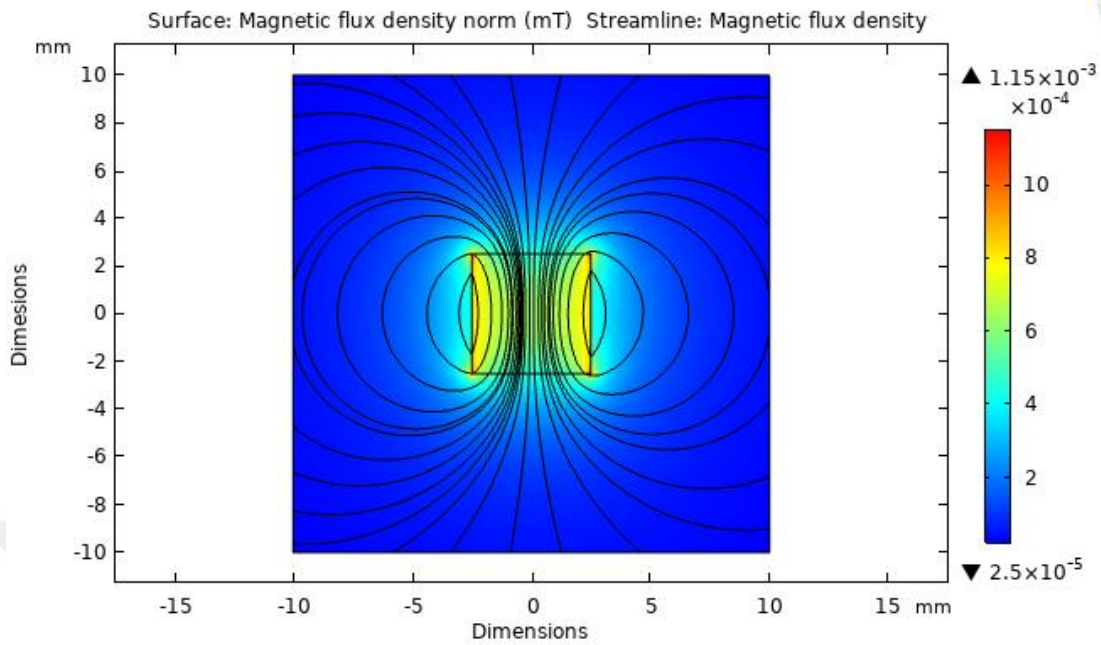
Hücreler, ilk olarak %0.4 lük stoktan seyreltilen %0.1, %0.05 veya %0.01 TM konsantrasyonları ile boyanmıştır. Daha sonra KV ve MM stok çözeltilerinden de 1:10 oranında seyreltilen konsantrasyonları ile boyama yapılmıştır. Safranin ise boyamada seyreltilmeden stoktan direkt kullanılmıştır. PBS tamponu, boya kalıntılarını elimine etmek için seyreltme amaçlı kullanılmıştır. Bazı boyalar, örneğin tripan mavisi, doğaları gereği koyu pigmentlere sahiplerdir. Boyalı hücreler ile manyetik boncukların arasındaki farkın belirginleşmesi için, boya seyreltilmiş ve daha açık bir renk elde edilmiştir. Seyreltme işlemi aynı zamanda boyaların hücrelerin üzerindeki toksik etkilerinin azaltılmasına da yardımcı olmuştur. Tüm boya solüsyonları kullanmadan önce vortekslenerek iyice karışması sağlanmıştır. Çip üzerinde fiksasyon işlemi için, PF solüsyonunun sıcaklığı optimize edilmiş ve yaklaşık 37°C'de kullanılmıştır. Bu sıcaklığın altındaki solüsyonlar daha düşük sayıda hücrenin fikse olmasına sebep olmuştur. Yıkama ve görüntüleme aşamalarında, steril PBS tamponu (pH 7.4) kullanılmıştır. Tüm solüsyonlar giriş portları kullanılarak çip kompartımanlarına ardışık olarak, biri tamamlanınca diğeri şeklinde pipet ile doldurulmuştur. Yedi kübik neodyum mıknatıs

alanı oluşturmak için $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ neodyum N42 kalıcı kübik mıknatıslar (Hefei Super Electronics, Çin) kullanılmıştır. Farklı sayıda mıknatısların çip yüzeyinden farklı mesafelerde oluşturduğu manyetik alan ölçülmüştür (Şekil 2.6). Şekilden de görüleceği üzere manyetik alan, mıknatıs sayısı azaldıkça ve çip yüzeyinden uzaklaştıkça zayıflamaktadır. Komplekslerin üzerine yeterli manyetik kuvvet sağlamak için, deneyler boyunca yedi kübik mıknatıs direkt olarak çip yüzeyinde olacak şekilde kullanılmıştır. Mıknatıslar ve çip arasındaki mesafe 0 mm 'nin üzerinde olduğu zaman, komplekslerin toplanma zamanı uzamakta ve toplanan kompleks sayısı azalmaktadır. Optimizasyon çalışmaları, Şekil 2.6 'de verilen manyetik alan-uzaklık grafiği ile tutarlı şekilde mıknatıs sayısının artırılmasının gerekli olmadığını göstermiştir. Fakat daha kalın PMMA plaka kullanılarak hazırlanan çiplerde, yeterli manyetik alan oluşturmak için daha yüksek sayıda mıknatıs kullanılmalıdır.



Şekil 2.6. Farklı sayı ve uzaklıktaki mıknatısların manyetik alana etkileri. Hücre-manyetik boncuk kompleksinin üzerine etkileyen manyetik alan mıknatısların sayısına ve çip yüzeyinden uzaklığına bağlıdır.

Ayrıca, bir kübik mıknatısın manyetik akı yoğunluğu COMSOL Multiphysics programında simüle edilmiş ve Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Simülasyon sonuçları, mıknatısın kenarlarının en yüksek manyetik alanı oluşturduğunu göstermiştir. Bu bilgi ile, mıknatıslar dikey olarak üst üste konularak çipe dik olacak şekilde konumlandırılmış ve boyama sürecinde çip boyunca ileri doğru hareket ettirilmiştir.



Şekil 2.7. Bir kübik mıknatısın manyetik akı yoğunluğunun COMSOL Multiphysics programındaki simülasyon sonuçları.

2.3. Boyanan Hücrelerin İncelenmesi ve Analizi

Çipte boyanan hücre-manyetik boncuk kompleksleri, görüntüleme kompartımanında Nikon DS-Ri1 model CCD renk kameraya sahip 4x, 10x, 20x objektifleri kullanılan Nikon Eclipse Ni ve ToupCam XCAM1080PHA model CMOS kameraya sahip 50x objektifleri kullanılan Nikon Eclipse Ci (Nikon Instruments, ABD) aydınlık alan mikroskobu ile incelenmiştir. Mikroskopik incelemeden sonra, hücre-manyetik boncuk kompleksleri çıkış portundan pipet ile alınmış ve manuel olarak sayının belirlenmesi için Neubauer sayım lamına aktarılmıştır. Mikroskopik incelemenin haricinde, cep telefonu görüntülemesi de ayrıca gerçekleştirilmiştir. Görüntüler, 1.0x, 1.5x ve 2.5x büyütme oranlarında 12 MP cep telefonu kamerası (iPhone 11, Apple, ABD) ile başka bir cep telefonunun (Galaxy Note 4, Samsung, Güney Kore) flaş ışığı altında yaklaşık çipten 10 cm yukarıdaki mesafeden alınmıştır.

Aydınlık alan mikroskobu ve cep telefonu ile alınan görüntüler, MATLAB programlama dilinde (R2021b, The MathWorks Inc., ABD) geliştirilen algoritma ile analiz edilmiştir. Boyanan hücrelerin sayısı ve Kırmızı Yeşil Mavi (KYM) (Red Green Blue (RGB)) ve Ton Doygunluk Yoğunluk (TDY) (Hue Saturation Intensity (HSI)) renk uzaylarında renk yoğunlukları incelenmiştir.

3. BÖLÜM

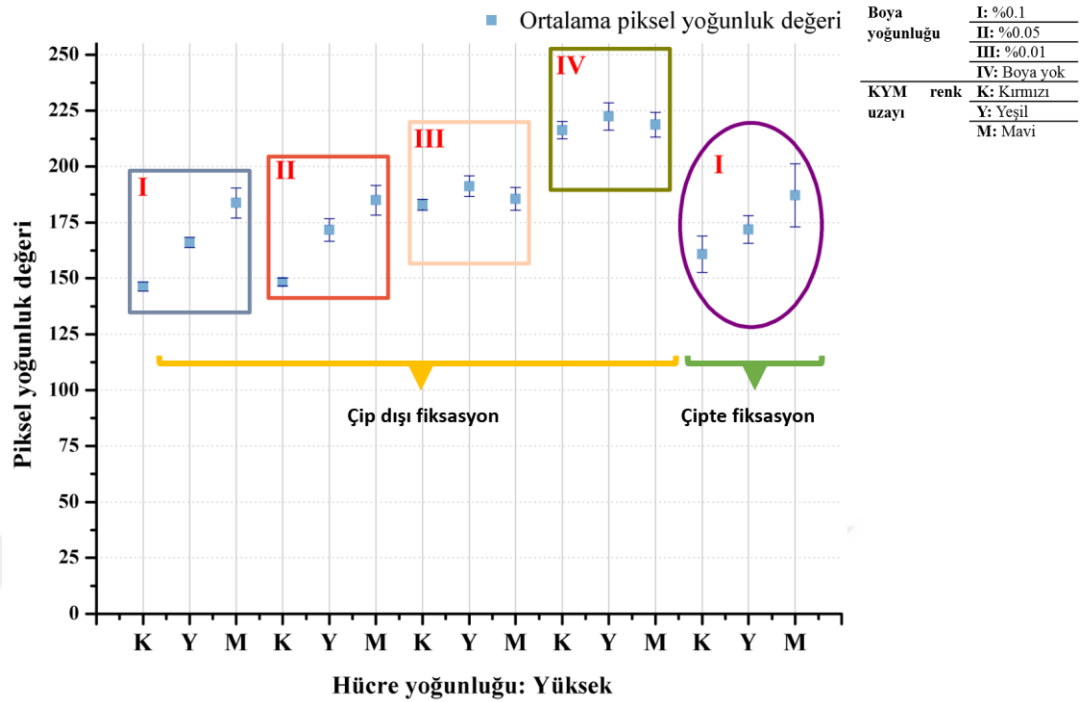
BULGULAR

3.1. Tripan Mavisi Konsantrasyon Deneyleri

Deneyler için belirlenen hücre yoğunlukları şöyledir: (i) yüksek: hücre sayısı > 50.000 , (ii) orta: $30.000 < \text{hücre sayısı} < 50.000$, (iii) düşük: hücre sayısı < 30.000 . Tüm süreçler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Sayılan ve süperparamanyetik boncuklar ile konjuge edilmiş hücreler, sekiz kompartımanlı chipin ilk kompartımanına transfer edilmiştir. Şekil 2.4’de gösterildiği üzere fiksasyon (PF), yıkama (PBS) ve boyama (TM) için gerekli reaktifler kompartımanlara ardışık olarak doldurulmuştur. Tüm kompartımanlar, ilgili reaktifler ile doldurulduktan sonra, ilk kompartımanda bulunan hücre-süperparamanyetik boncuk kompleksleri yan kompartımana, yani ilk olarak fiksasyon kompartımanına kalıcı mıknatıs yardımıyla taşınmıştır. Kompleksler burada 5 dk. süre ile bekletilmiştir. 5 dk sonrasında fikse olan kompleksler, yıkama kompartımanlarına alınmış ve bu kompartımanlarda 0.5 dk. bekletilmiştir. Daha sonra kompleksler sıradaki kompartımana yani boyama kompartımanına geçirilmiş ve burada %0.1’lik TM solüsyonu ile 5 dk boyamaya bırakılmıştır. Boyama aşamasından sonra kompleksler sıradaki yıkama kompartımanlarında 0.5 dk. süreler ile iki defa yıkanmış ve görüntüleme için son kompartımana geçirilmiştir.

Çipte hücreleri boyamak için %0.4’lük TM stok solüsyonundan seyreltilen %0.1, %0.05 ve %0.01 TM konsantrasyonları kullanılmıştır. Çipte son kompartımanda bulunan boyanmış hücreler aydınlık alan mikroskobu (Objektifler: 4x, 10x, 20x ve 50x) ile görüntülenmiş ve alınan görüntüler MATLAB programında analiz edilmiştir.



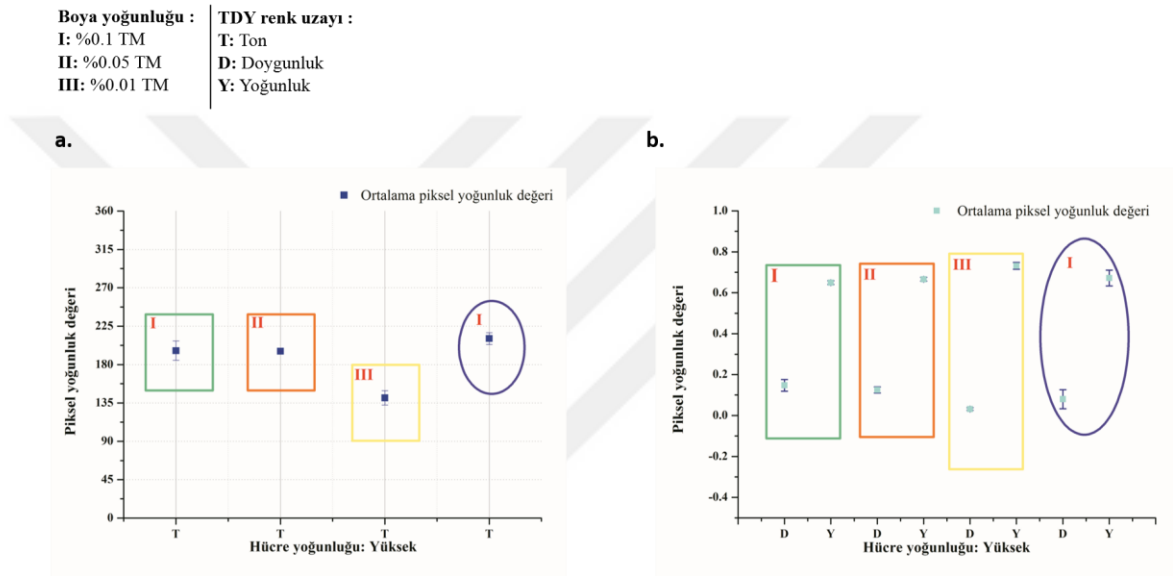
Şekil 3.1. Çipte ve çip dışı fiksasyon konfigürasyonunda tripan mavisi konsantrasyonunun hücre boyaması üzerindeki etkisi (KYM renk uzayı). %0.4 stok solüsyonundan %0.1, %0.05 ve %0.01 TM dilüsyonları yüksek sayıda hücre üzerinde kullanılmıştır.

İlk olarak, ilgili alan tüm görüntüden kırılmış ve hücrelerin olduğu kısım seçilmiştir. KYM renk uzayında kırmızı, yeşil ve mavi renk yoğunluk değerleri elde edilmiştir. Değerler normalize edilmeden standart 0-255 değer aralığında hesaplanmıştır. Farklı bölgelerden en az 20 hücre seçilip analiz edilmiştir ve ortalamalar hesaplanmıştır.

Şekil 3.1’de görüldüğü üzere, renk yoğunluk değerleri TM dilüsyon faktörü %0.1’den %0.01’e artarken artmıştır. Bu durum, renk konsantrasyonunun düşmesiyle hücrelerin renk alımının düşmesi ve sonuç olarak piksel yoğunluk değerinin artmasından kaynaklanmaktadır. Mavi banttaki değişim küçük olmasına rağmen, konsantrasyon azaldıkça artmaya devam etmiştir. Analiz sonuçlarına göre, en yüksek değişime sahip bant kırmızı renk bandı olmuştur. Mavi ve yeşil bantlardaki değişim birlikte düşünüldüğünde, boya konsantrasyonu düştükçe rengin yeşil tonlarına doğru kaydığı gözlemlenmiştir.

İkinci olarak, ilk aşamada incelenen görüntüler TDY renk uzayında incelenmiştir. İlgili alanda ton, doygunluk ve yoğunluk değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Değer aralıkları ton için 0-360, doygunluk ve yoğunluk için normalize edilerek için 0-1

alınmıştır. Sonuçlar Şekil 3.2’de verilmiştir. Ton değerleri, boya yoğunluğu I ve II için ton çemberinde mavi renk aralığına denk gelmektedir [118]. Ancak III için değer yeşil renge kaymıştır. Bu da boyanın seyreltikçe yeşil tonlarına yaklaştığını göstermektedir. KYM uzayında elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir. Doygunluk değerlerinin düşük gelmesinin nedeninin hücre-manyetik boncuk komplekslerinin çip yüzeyinden görüntülerinin alınmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Yoğunluk değerleri de bir trendi izleyerek boya konsantrasyonu düştükçe artış göstermiştir.



Şekil 3.2. Çipte ve çip dışı fiksasyon konfigürasyonunda tripan mavisi konsantrasyonunun hücre boyaması üzerinde etkisi (TDY renk uzayı): a. Ton değerleri analiz sonuçları, b. Doygunluk ve yoğunluk değerleri analiz sonuçları. %0.4 stok solüsyonundan %0.1, %0.05 ve %0.01 TM dilüsyonları yüksek sayıda hücre üzerinde kullanılmıştır.

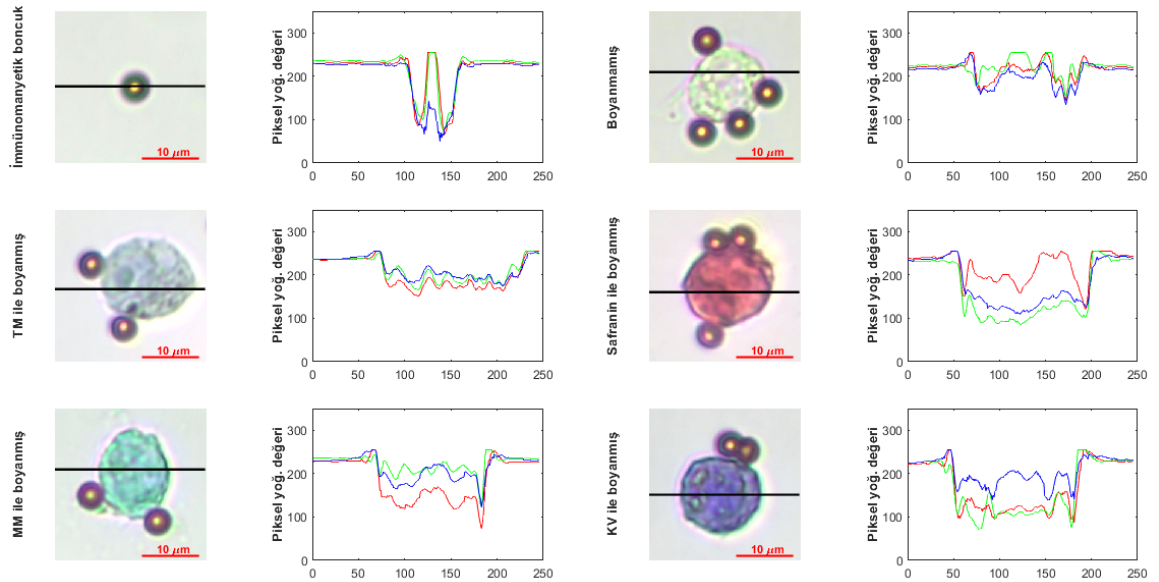
3.2. Farklı Basit Boyalar ile Boyama

Geliştirilen biyoçipin farklı boyalar ile hücreleri boyayabildiğini göstermek için safranin, metilen mavisi ve kristal viyole boyama kompartımanına doldurulmuş ve boyanan hücreler mikroskop altında incelenmiştir. Hücre boyama farklılıklarını, yani manyetik boncuk ile boyalı hücre veya boyanmamış hücre ile boyanmış hücre, göstermek için piksel yoğunluk değişimleri incelenmiştir. Arka plandan ortalama farklılıklar Tablo 1.’de verilmiştir. Arka plan için ortalama piksel yoğunluğu 225 olarak hesaplanmıştır. Arka plana en yakın olan boyanmamış hücrede bile her renk bandında en az 15 piksel yoğunluk değer farkı gözlemlenmiştir. Renk bantları arasında, boyanın baskın rengi diğer renk

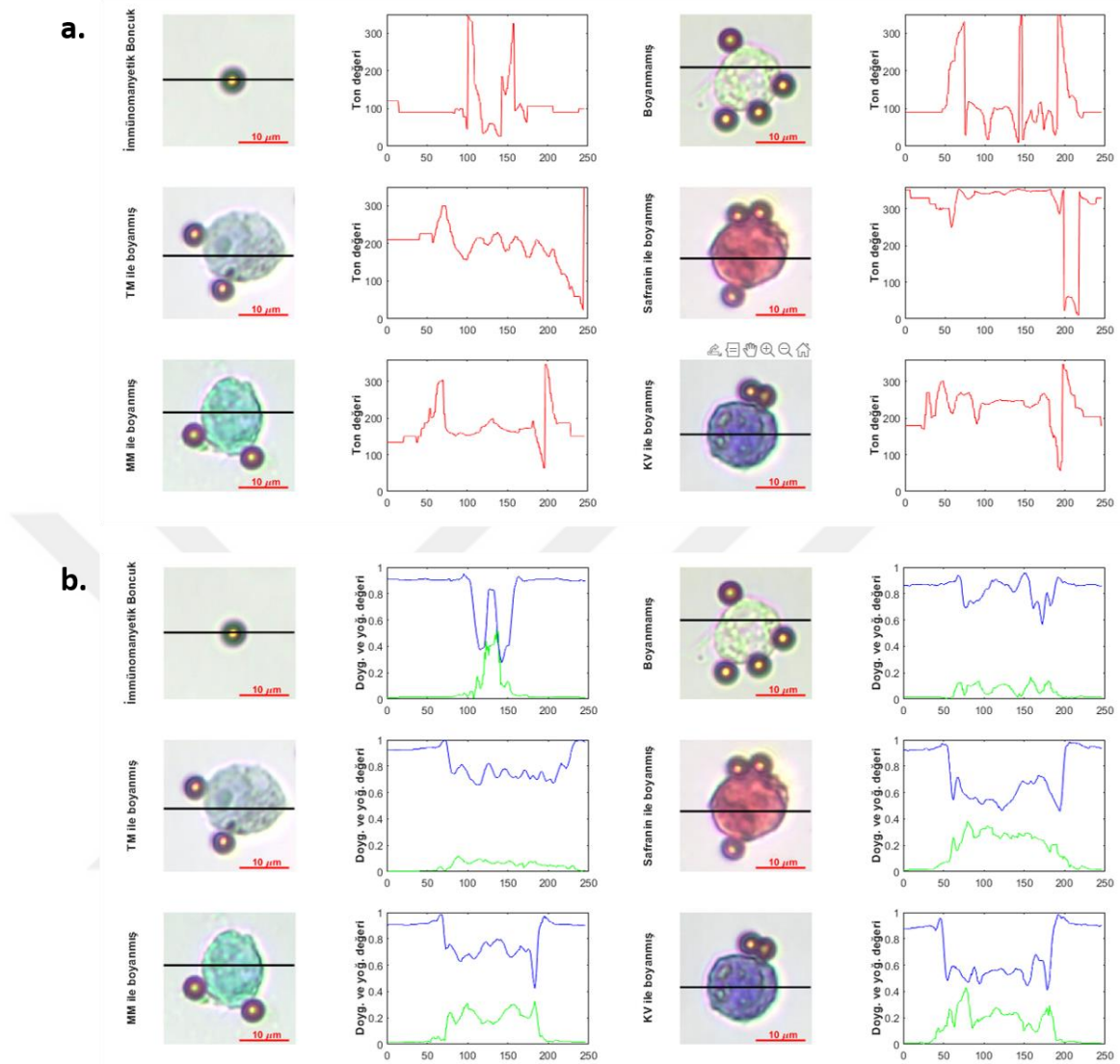
bantlarından daha yüksek olmuştur. Yani, safranin boyama için kırmızı baskın renktir ve kırmızı renk bandı daha yüksek piksel değerine sahiptir. Dolayısıyla, ayırt edici renk bantları, baskın renk bandı dışında kalan bantlardır. Bu çalışmada, bir veya iki aşamalı eşik değeri boyalı hücreleri diğerlerinden, manyetik boncuk veya arka plan, ayırt etmek için kullanılmıştır. Şekil 3.3’de görüldüğü üzere boyama görüntü işleme algoritmaları ile tespit edilen her bir renk bandı için 25-135 piksel yoğunluk değişimi ile sonuçlanmıştır.

Tablo 1. Manyetik boncuk, boyanmamış hücre ve temel boyalar ile boyanmış hücrelerin arka plandan fark değerleri.

Arka plandan fark değerleri:	Renk bantları		
	R	G	B
Manyetik boncuk	125	120	140
Boyanmamış hücre	15	15	30
TM ile boyanmış hücre	50	40	40
Safranin ile boyanmış hücre	25	135	100
MM ile boyanmış hücre	100	100	45
KV ile boyanmış hücre	100	115	30



Şekil 3.3. Mikroskopik görüntüler sırasıyla, a. immunomanyetik boncuk, b. boyanmamış hücre ve temel boyalar ile boyanmış hücreler: c. tripan mavisi, d. safranin, e. metilen mavisi ve f. kristal viyole. Görüntülerin yanındaki grafikler ilgili mikroskopik görüntünün KYM renk uzayında piksel yoğunluk analiz sonuçlarını göstermektedir. Görüntüler 50x objektif ile alınmıştır.

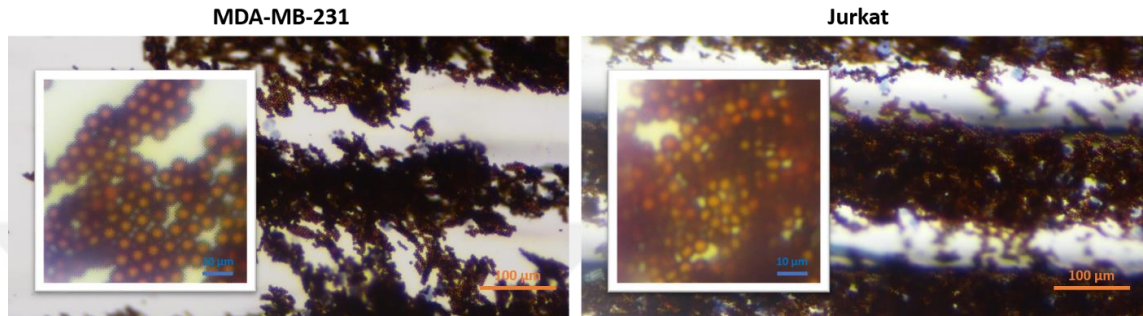


Şekil 3. 4. Mikroskopik görüntüler sırasıyla, a. immunomanyetik boncuk, b. boyanmamış hücre ve temel boyalar ile boyanmış hücreler: c. tripan mavisi, d. safranin, e. metilen mavisi ve f. kristal viyole. Görüntülerin yanındaki grafikler ilgili mikroskopik görüntünün TDY renk uzayında piksel yoğunluk analiz sonuçlarını göstermektedir: a. Ton değerleri analiz sonuçları, b. Doygunluk ve yoğunluk değerleri analiz sonuçları. Görüntüler 50x objektif ile alınmıştır.

3.3. Jurkat ve MDA-MB-231 Hücre Hatları ile Kontrol Deneyleri

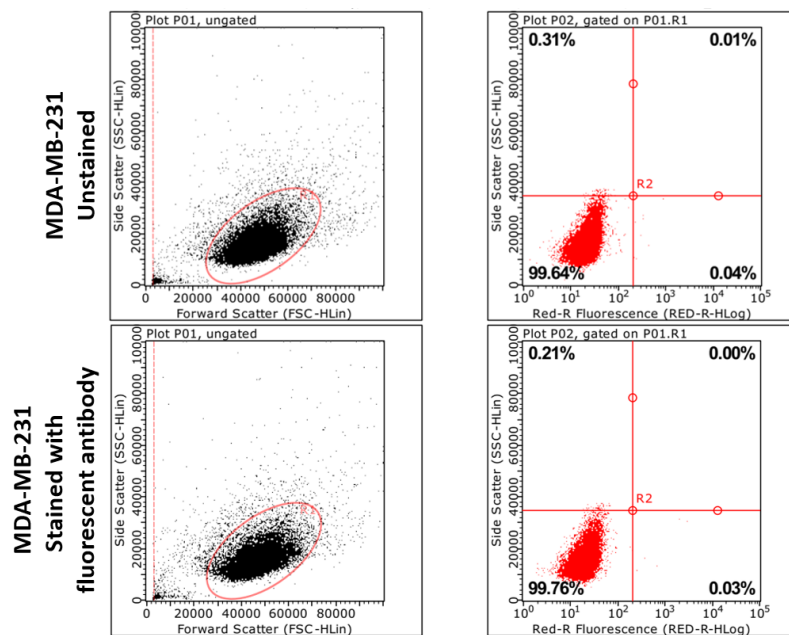
Uygulanan protokolün doğruluğunun belirlenmesi için, CD45 negatif (CD45-) olan Jurkat lösemi T hücresi ve MDA-MB-231 göğüs kanseri hücre hatları (ATCC den temin edilmiş) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücreler K562 hücreleri ile aynı protokole tabi tutulmuştur. İlk kompartımda herhangi bir hücre gözlemlenmemiştir. Sadece manyetik boncuk kümelenmesi görülmüştür. Bazı deneylerde ise, manyetik boncukların

arasında çok az sayıda, 1-10, hücre kalmıştır. Bu da spesifik olmayan bağlanmaya işaret etmektedir. Manyetik boncuklar, normal prosedürde olduğu üzere boyama kompartımanına geçirilmiştir. Hiçbir hücre bağlanması olmadığı için, son kompartımanda manyetik boncuk kümesi içerisinde boyanma gözlemlenmemiştir. Her iki hücre hattına ait son kompartıman görüntüleri Şekil 3.5’de verilmiştir.

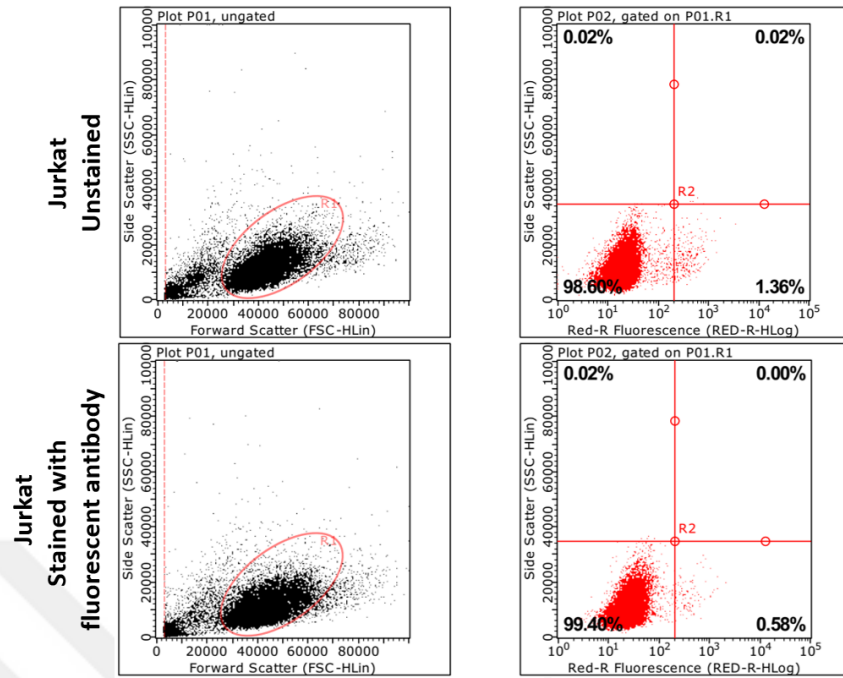


Şekil 3.5. Jurkat ve MDA-MB-231 hücre hatlarının son kompartımandaki mikroskopik görüntüleri (10x). Ekli küçük görüntüler ise orijinal görüntülerin yakın görünüşünü göstermektedir.

Hücreler, CD45- olduklarının doğrulanması adına akış sitometrisinde (Flow cytometry - FC) incelenmiştir (Guava easyCyte). Her iki hücre hattı da Invitrogen’den (ABD) temin edilen Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit ikincil antikoru ile boyanmıştır. FC sonuçları, hücre hatlarının CD45 hücre reseptör antijenini ekspres etmediğini göstermiştir. FC analizine ait sonuçlar Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de verilmiştir.



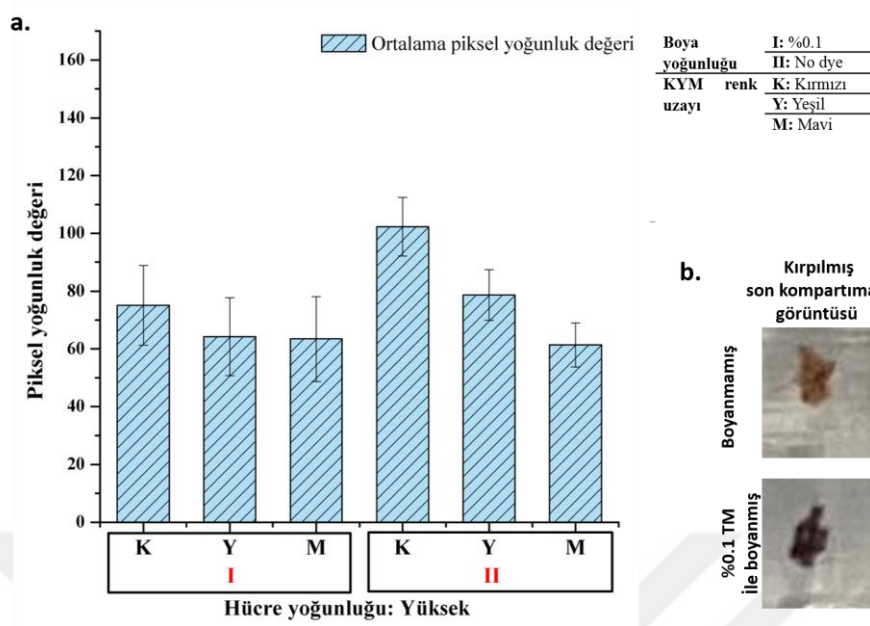
Şekil 3.6. MDA-MB-231 hücre hattına ait FC analiz sonuçları.



Şekil 3.7. Jurkat hücre hattına ait FC analiz sonuçları.

3.4. Cep Telefonu Görüntü Analizleri

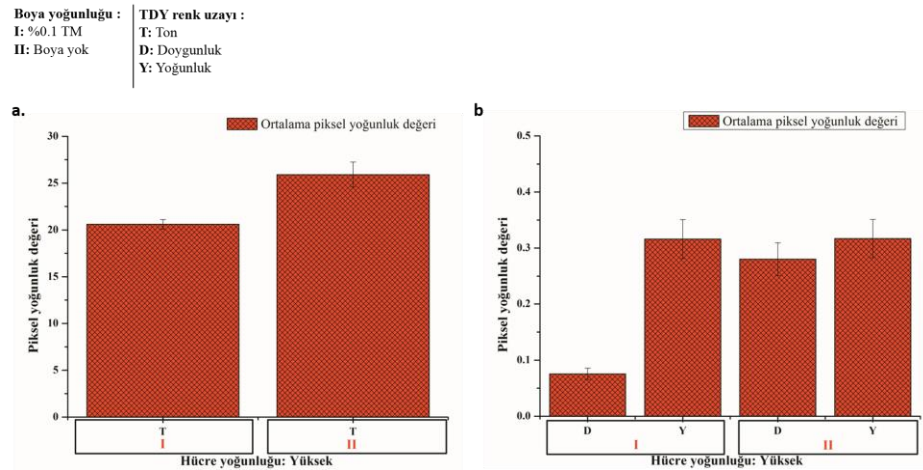
Üretilen biyoçipin daha basit görüntüleme sistemi ile entegre edilip edilmeyeceğini belirlemek için cep telefonu görüntülemesi gerçekleştirilmiştir. Görüntüler 1.0x büyütme oranında 12 MP cep telefonu kamerası (iPhone 11, Apple, ABD) ile başka bir cep telefonunun (Galaxy Note 4, Samsung, Güney Kore) flaş ışığı altında yaklaşık çipten 10 cm yukarıdaki mesafeden alınmıştır. Görüntüler bilgisayara aktarılmış ve MATLAB programlama dilinde işlenmiştir. Öncelikle, hücre-manyetik boncuk komplekslerinin alanı belirlenmiş ve geri kalan görüntüden ayrılmıştır. Alanın boyutları belirlenmiş ve ortalama piksel yoğunluk değerleri her bir renk bandı için bulunmuştur. 1.0x büyütme oranında %0.1 TM ve boya olmaksızın yapılan deneylere ait analiz sonuçları Şekil 3.8.'da verilmiştir.



Şekil 3.8. KYM renk uzayında cep telefonu görüntü analizi: a. Görüntülere ait piksel yoğunluk analiz sonuçları, b. Görüntü işleme aşamasında ilgilenilen bölgenin seçimi.

Şekil 3.1’de verilen mikroskobik analiz sonuçlarına benzer şekilde, cep telefonu analizinde de en yüksek fark, en az %20’lik değişim, kırmızı renk bandında görülmüştür. Analizler mavi renk bandında kayda değer bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Ancak buna rağmen kırmızı ve yeşil renk bantlarındaki değişim, boyalı hücreleri boyanmamış hücrelerden ayırt etmek için yeterlidir. Dolayısıyla, tasarlanan KYM renk uzayında sistem temel hücre boyama farkını göstermek için kullanılabilir.

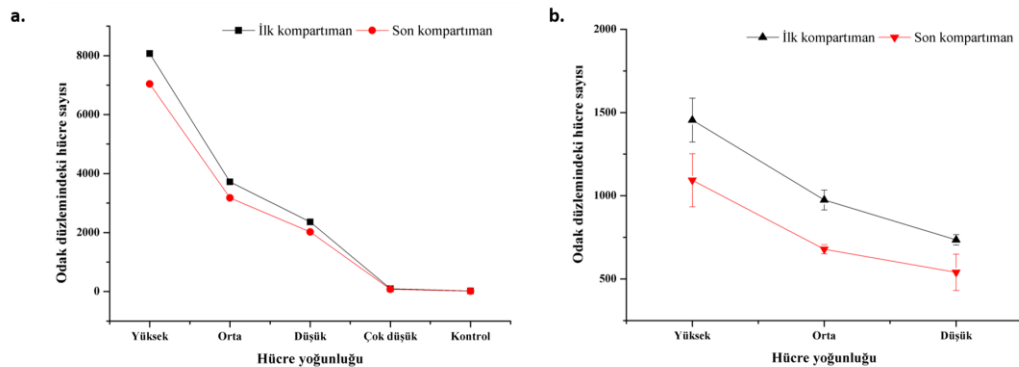
Cep telefonu görüntüleri ayrıca TDY renk uzayında da aynı prosedür takip edilerek incelenmiştir. Analiz sonuçları Şekil 3.9’de verilmiştir. Ton değerleri incelendiğinde her ne kadar iki değer arasında fark olsa bile her iki değer de ton çemberinde kırmızı-turuncu tonlarına denk geldiği görülmüştür. Doygunluk değerlerinin arasında %50’den fazla fark olmasına rağmen değerler 0.5’in altında olmasından dolayı grileşmenin etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Yoğunluk değerlerine bakıldığında ise yoğunluk değerlerinin birbirine çok yakın elde edildiği görülmüştür. Bu sonuçlar, düşük çözünürlükte alınan cep telefonu görüntülerinde TDY renk uzayının ayırt edici olmadığını göstermiştir.



Şekil 3.9. TDY renk uzayında cep telefonu görüntü analizi: a. Ton değerleri analiz sonuçları, b. Doygunluk ve yoğunluk değerleri analiz sonuçları.

3.5. Çipin Performans Analizi

Hem mikroskopik hem de cep telefonu görüntüleri üzerinde hücre-manyetik boncuk kompleksinin kapladığı alanlara dayalı olarak farklı hücre yoğunlukları analiz edilmiştir. Mikroskopik görüntüler için, analiz 4x objektif ile alınan mikroskop görüntülerinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, görüntüden komplekslerin kapladığı alan ve ortalama hücre sayısı belirlenmiştir. Her bir hücre yoğunluğu için komplekslerin kapladığı alanın bir hücre alanına oranı ile bir değer elde edilmiştir. Bu değer hem ilk kompartıman (İK) hem de son kompartıman (SK) için hesaplanmıştır. Analize ait grafik Şekil 3.10.a'da verilmiştir.

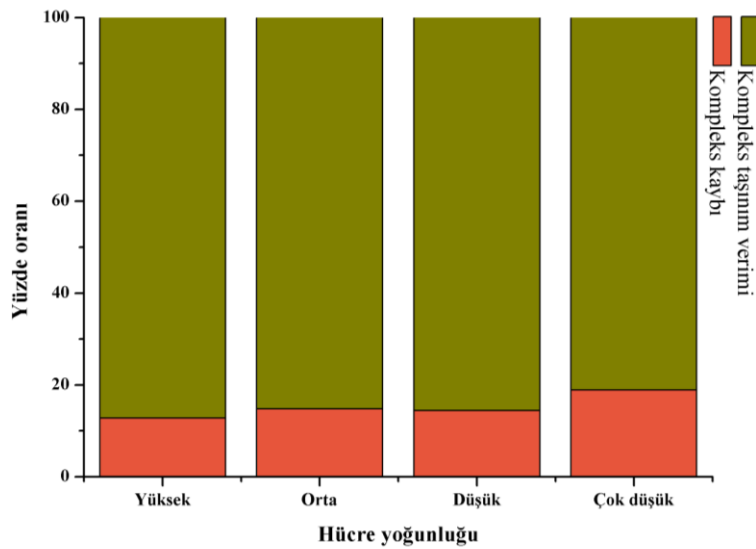


Şekil 3.10. Mikroskopik ve cep telefonu görüntüleri odak düzlemi analiz sonuçları. a) Yüksek, orta, düşük, ultra düşük hücre yoğunlukları ve kontrol için mikroskopik görüntü analizi sonuçları. Standart sapma çubukları 15'ten küçüktür. Ölçek artış değeri 1000 olduğu için standart sapma çubukları görülmemektedir. b) Yüksek, orta ve düşük hücre yoğunlukları için cep telefonu görüntü analizi sonuçları.

Yüksekten en düşük hücre yoğunluğuna kadar ilk ve son kompartıman değer aralıkları sırasıyla 8070-95 ve 7036-77'dir. Sonuçlar, aşağı yönlü veya tam tersi olarak tutarlı bir eğilim izlemektedir. Kompleks taşınım verimi ve kompleks kaybı Eşitlik 3.1 ve 3.2 'de verildiği üzere ayrıca hesaplanmıştır. Değerler, hücre yoğunluğuna bağlı olarak Şekil 3.11' de gösterilmiştir. Şekil 3.11'den de görüldüğü üzere, hücre yoğunluğu arttıkça, kompleks taşınım verimi de bir eğilimi takip ederek artmıştır. Kompleks taşınım verimi her bir hücre yoğunluğu için %80'den fazla elde edilmiştir. Bu da en fazla %20 kompleks kaybına denk gelmektedir.

$$\text{Kompleks taşınım verimi} = \frac{SK \text{ değeri}}{İK \text{ değeri}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Kompleks kaybı} = \frac{İK \text{ değeri} - SK \text{ değeri}}{İK \text{ değeri}} \times 100 \quad (3.2)$$



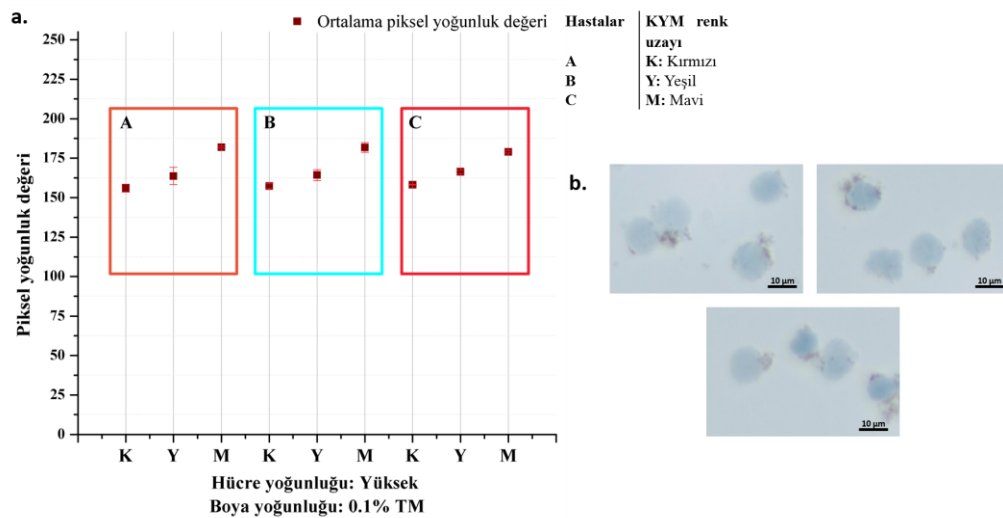
Şekil 3.11. Hücre yoğunluğuna bağlı kompleks taşınım verimi ve kompleks kayıpları değer grafiği.

Cep telefonu görüntüleri için, analizler 1.0x büyütme oranında yüksek, orta ve düşük hücre yoğunlukları için alınan görüntülerde gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik görüntü analizindeki aynı prosedür takip edilmiştir. Yüksekten düşük hücre yoğunluğuna kadar ilk ve son kompartıman değerleri sırasıyla 1455-735 ve 1093-540 aralığında değişmektedir. Analiz sonuçları Şekil 3.10.b'de gösterilmiştir. Cihaz çözünürlüğünün bir sonucu olarak standart sapma değeri mikroskopik görüntü değerlerine nispeten yüksek çıkmıştır.

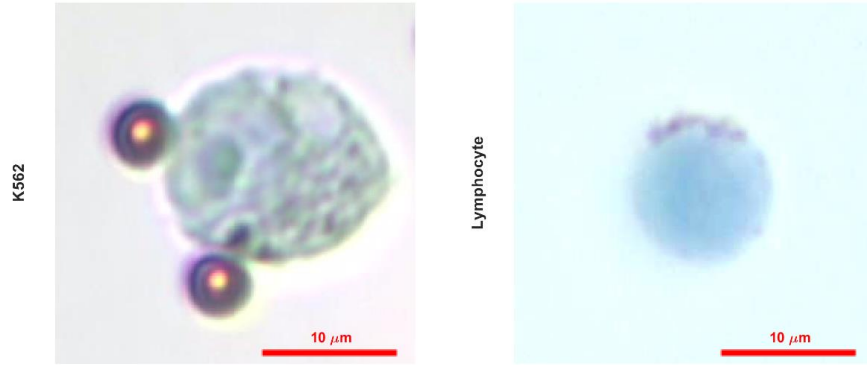
3.6. Hasta Örnekleri Deneyleri

Hücre analizleri, örneğin genetik analizler, hastalıkların araştırılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu yüzden, bir canlıdan alınan örneklerin onlardan maksimum verimde yararlanmak için saklanması ve işlenmesi elzemdir. Bu çalışmada, insan lenfosit hücreleri %0.1'lik TM ile boyanmıştır. İlerleyen çalışmalarda, çipin son kompartımanından boyanmış hücrelerin alınması ve hücre analizlerinin gerçekleştirilmesi mümkündür.

Hücreler temin edildikten sonra, fikse edilerek standart prosedür devam ettirilmiştir. Hücreler K562 hücrelerinden daha küçük olduklarından, deneyde kullanılacak hücre yoğunluğu yüksek skalada olacak şekilde belirlenmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen görüntüler ve verilerin analizi ile oluşturulan grafik Şekil 3.12'de verilmiştir. Görüntüler KYM ve TDY renk uzaylarında incelenmiştir. KYM renk uzayı için üç örneğin renk analizi sonuçları her bir renk bandı için tutarlı olarak gözlemlenmiş ve standart sapması da oldukça düşük çıkmıştır. Hücrelerin K562 hücrelerinden küçük olması (yaklaşık 2.5 kat) ve manyetik boncukların nano-boyutlu olması tutarlı sonuçların ana sebebini oluşturmaktadır. Şekil 3.13.'da da mikro boyutta manyetik boncuk bağlı K562 hücresi ile nano boyutta manyetik boncuk bağlı lenfosit hücresi karşılaştırma amaçlı verilmiştir. Hücreler analiz edilirken herhangi bir hücre kültürü yapılmadan direkt olarak vücuttan alınan hücrelerin boyama yüzdeleri ve bu yüzdelerin renk değerleri üzerindeki etkilerinde farklılıklar olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

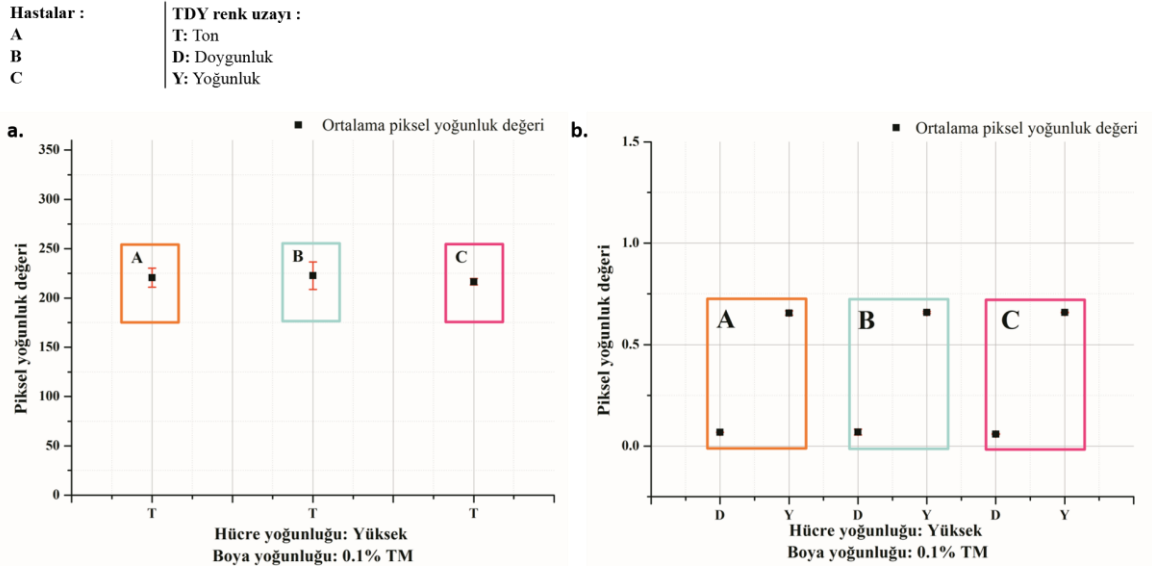


Şekil 3.12. a. KYM renk uzayında hasta örnekleri analiz sonuçları ve b. İncelenen hasta örneklerin 50x objektif ile alınmış mikroskopik görüntüleri.



Şekil 3.13. %0.1 TM ile boyanan bir K562 ve lenfosit hücresinin 50x objektif ile alınan mikroskopik görüntüsü.

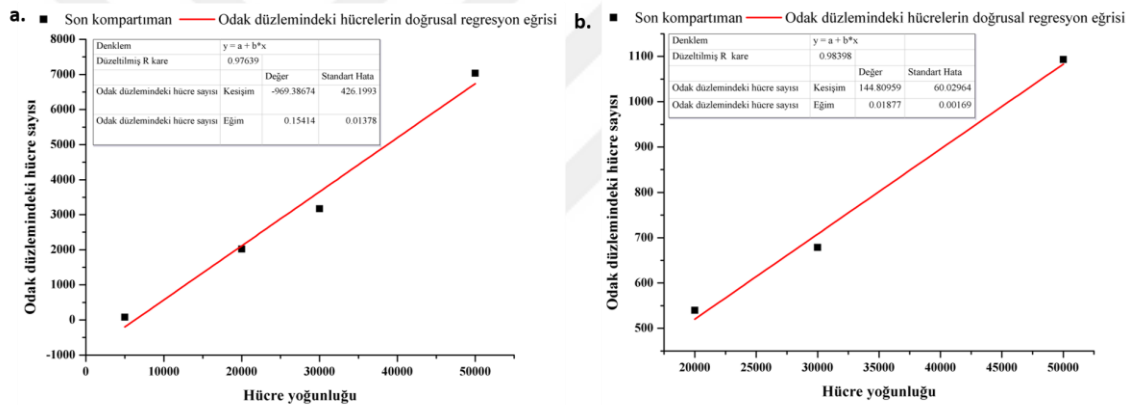
Hasta örneklerinin TDY renk uzayındaki analiz sonuçları Şekil 3.14’de verilmiştir. KYM renk uzayında elde edilen tutarlı sonuçlar bu renk uzayında da elde edilmiştir. Ortalama değerler ton için 220, doygunluk için 0.065 ve yoğunluk için de 0.65 değerleri civarında elde edilmiştir. Ton değeri, ton çemberinde beklendiği üzere mavi renk aralığına denk gelmiştir. Doygunluk değerinin düşük gelmesinin nedeninin hücre-manyetik boncuk komplekslerinin çip yüzeyinden görüntülerinin alınmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.14. TDY renk uzayında hasta örnekleri analiz sonuçları: a. Ton değeri sonuçları, b. Doygunluk ve Yoğunluk değerleri sonuçları.

3.7. Hassasiyet Analizi

Hassasiyet analizi yapabilmek için hücre yoğunluklarına karşılık yaklaşık/ortalama sayılar atanmıştır. Hem mikroskopik hem de cep telefonu görüntüleri üzerinde elde edilen grafikler Şekil 3.15'te verilmiştir. Analizlere göre mikroskopik görüntüler için odak düzleminde en az 77 hücre tespit edilebilmiş ve çok düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona da 0.98 düzeltilmiş R^2 değeri elde edilmiştir. Cep telefonu görüntüleri için ise odak düzleminde en az 540 hücre tespit edilebilmiş ve yine 0.98 düzeltilmiş R^2 değeri elde edilmiştir. Tasarım iyileştirilerek, tüm boyanmış hücrelerin tek bir odak düzlemine dağıtılması ve ardından boyama çipinin hedef hücrelerin miktarını belirlemek için kullanılması hedeflenmektedir.



Şekil 3.15. Hassasiyet analizi sonuçları: a. Mikroskopik görüntüler için, b. Cep telefonu görüntüleri için.

3.8. İstatistiksel Analiz

KYM renk uzayında elde edilen piksel yoğunluk değerleri üzerinde istatistiksel testler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak varyansların homojenliği testi gerçekleştirilmiş (Tablo 2) ve verilerin ANOVA testi yapılmasına uygun olduğu görülmüştür. Yapılan ANOVA testi sonucunda 0,1,2 ve 3 grupları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM ile boyanmış, 2: %0.05 TM ile boyanmış, 3: %0.01 TM ile boyanmış) arasında en az bir grubun anlamlı bir fark içerdiği görülmüştür. Literatürde sık kullanılan Scheffe ve Tukey Pos-Hoc testleri ile anlamlı farkların kırmızı ve yeşil renk bandı için 1 ve 2 arasında bulunmadığı, mavi renk bandı için ise 1,2 ve 3'te bulunmadığı görülmüştür. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Tablo 2. Varyansların homojenliği testi sonuçları

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kırmızı	27,906	3	190	,000
Yeşil	17,029	3	190	,000
Mavi	13,617	3	189	,000

Tablo 3. ANOVA testi sonuçları.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kırmızı	Between Groups	100278,282	3	33426,094	47,460	,000
	Within Groups	133816,491	190	704,297		
	Total	234094,773	193			
Yeşil	Between Groups	56216,147	3	18738,716	27,589	,000
	Within Groups	129050,075	190	679,211		
	Total	185266,222	193			
Mavi	Between Groups	17651,965	3	5883,988	15,177	,000
	Within Groups	73273,118	189	387,688		
	Total	90925,083	192			

Tablo 4. Kırmızı renk bandı için Pos-Hoc test sonuçları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM, 2: %0.05 TM, 3: %0.01 TM).

Grup	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey B ^{a,b}	1	146,327669		
	2	148,248745		
	3		183,558991	
	0			215,752465
Scheffe ^{a,b}	1	146,327669		
	2	148,248745		
	3		183,558991	
	0			215,752465
	Sig.	,993	1,000	1,000

Tablo 5. Yeşil renk bandı için Pos-Hoc test sonuçları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM, 2: %0.05 TM, 3: %0.01 TM).

Grup	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey B ^{a,b}	1	166,145828		
	2	171,536362		
	3		192,421722	
	0			221,669947
Scheffe ^{a,b}	1	166,145828		
	2	171,536362		
	3		192,421722	
	0			221,669947
Sig.		,864	1,000	1,000

Tablo 6. Mavi renk bandı için Pos-Hoc test sonuçları (0: Boyasız, 1: %0.1 TM, 2: %0.05 TM, 3: %0.01 TM).

Grup	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey B ^{a,b}	1	183,399488	
	2	184,723098	
	3	186,850926	
	0		218,014935
Scheffe ^{a,b}	1	183,399488	
	2	184,723098	
	3	186,850926	
	0		218,014935
Sig.		,912	1,000

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada, hızlı, doğru ve uygun maliyetli hücre boyama prosedürü için pasif bir mikroakışkan cihaz gösterilmiştir. Geliştirilen çip ile insan ökaryotik hücreleri, K562 hücreleri ve hastalardan alınan lenfositler boyanmıştır. Boyanmış hücreler, aydınlık alan optik mikroskobu ve bir cep telefonu ile görüntülenmiştir. Boyama işlemi, mikroskobik görüntüler için geliştirilen algoritma ile tespit edilen her bir renk kanalı için 25-135 piksel yoğunluk değişiklikleri ile sonuçlanmıştır. Cep telefonu görüntüleri de analiz edilerek kırmızı ve yeşil renk kanallarındaki değişimin, boyanmış hücrelerin boyanmamış hücrelerden ayırt edildiği sonucuna ulaşılmıştır.

Manyetik parçacıkların avantajları daha önce farklı çalışmalarda gösterilmiştir [119, 111]. Bu çalışmada, manyetik parçacıklar manyetik ayırım ve hücrelerin mikroakışkan çip içerisinde hareket etmesi için kullanılmıştır. Manyetik boncuk boyutu göz önüne alındığında, nano boyutlu manyetik boncukların daha tutarlı sonuçlar sağladığı, nano boyutlu manyetik boncuk bağlı hücre görüntülerinin gayet açık olduğu ve boncuk kümelenmesinin önüne geçildiği açıkça görülmektedir.

Çipin performansını analiz etmek için, hücre yoğunluğu başına odak düzlemindeki hücre sayısı hesaplanmış ve sonuçların bir eğilimi takip ettiği gösterilmiştir. Hücre-manyetik boncuk kompleksi taşıma verimi, hücre yoğunluğu başına %80'den fazla elde edilmiş ve bu da en fazla %20 kompleks kaybına denk gelmiştir.

Şekil 3.11.'de verilen sistemin mevcut hassasiyeti, 5000 ila 50000 giriş hücresi arasında doğrusal bir aralık göstermektedir. Sistem, odak düzleminde minimum 77 hücreyi algılayabilmektedir. Tasarımı iyileştirdikten sonra, tüm boyanmış hücreler tek bir odak

düzlemine dağıtılabılır ve ardından boyama çipi, hedef hücrelerin miktarını belirlemek için kullanılabilir.

Çalışmada, boyanmış hücreleri çıkış portlarından almak ve ileri analizler için incelemek mümkün olmaktadır. Ayrıca, çipin giriş ve çıkış portlarının hava ile teması kesildiğinde, yani çip parafilm ile kaplandığı takdirde, boyanmış hücreler 3 aya kadar +4°C’de nemli ve kapalı ortamda kalabilmektedirler.

Geliştirilen mikroakışkan çipin üretimi, birçok mikro sistemin gerektirdiği gibi pahalı bir temiz oda prosedürü veya ekipmanı gerektirmemiştir [110, 120]. Geliştirilen yöntemin temel öne çıkan yönleri basitlik ve taşınabilirliktir. Böylece sistem, pompalar gibi çip dışında kalan hantal ekipmanlara ihtiyaç duymaz. Yöntem, daha ileri analizler için pahalı floresan boyalar gerektirmez. Ek olarak, deney boyunca ihtiyaç duyulan kimyasalların miktarı ve numune hacmi önemli ölçüde azaltılmıştır. Hücreleri boyamak için sadece 5 µL boya kullanılmıştır. Minimum atık üretimi çipin bir diğer önemli avantajıdır, bu nedenle bu sistem çevre dostu bir hücre boyama sistemi sunmaktadır.

Yüksek hacimde reaktiflerin kullanımı, maliyeti artıran ve toksijenik boyalardan kaynaklı toksik atık oluşturan standart hücre boyama süreçlerinin dezavantajlarından bir tanesidir. Bizim düşük maliyetli mikroakışkan çipimiz, reaktiflerin hacmini, özellikle boyaları kompartıman başına 5 µL’ye kadar düşürerek bu sorunları ele almakta, dolayısıyla düşük toksik atık üretmektedir. Geliştirilen yöntemin literatürdeki ilgili yöntemlerle karşılaştırılması Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Geliştirilen yöntemin literatürdeki ilgili boyama yöntemleri ile karşılaştırılması.

Metot	Hacim	Maliyet	Taşınabilirlik	Boyalı hücrelerin eldesi	Referans
Standart boyama	mililitre	> \$5	Hayır	Hayır	[1-5]
Mikro boyama	mikrolitre	< \$1	Hayır	Hayır	[8]
Mikroakışkan çip	mikrolitre	10 cents	Evet	Evet	Bu çalışma

Mikro/nano teknoloji tabanlı tasarımlar, taşınabilir sistemler aracılığıyla kan, tükürük veya idrar gibi insan numunelerinin küçük hacimlerini, yani bir damlayı analiz etmeyi

amaçlarlar. Bu nedenle küçük numune hacimlerinin hiçbir bilgiyi kaybetmeden derinlemesine analiz edilmesi önemlidir. Bu şekilde, sunulan yöntem, daha fazla analiz için 3 ay sonra bile boyanmış hücrelerin alınmasını sağlar.

4.2. Öneriler

Gelecekteki çalışmalarda taşınabilir bir sistem tasarımı için basit bir el mikroskobu kullanılması planlanmaktadır. Çalışmada tasarlanan sistemin avantajları, yani basitlik, düşük maliyetli ve düşük atık üretimi, taşınabilir sistemle birleştiğinde, yerinde inceleme mümkün olacaktır.

Taşınabilir bir algılama sistemi tasarımı için boyamanın fizibilitesini araştırmak amacıyla cep telefonu görüntülemesi gösterilmiştir. Önerilen yöntem, kapaklı ve kapalı yapısı nedeniyle patojenik ve toksijenik hücrelerin boyanması ve görüntülenmesi için de uygundur ve bu sayede olası kontaminasyonların önüne geçilmiş olacaktır. Hücre ve patojenlerin tespiti için çipin, taşınabilir bir görüntüleme sistemi ile entegre edilerek daha da geliştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Leboffe, M. J. and Burton, E. P., 2019. Microbiology: Laboratory Theory and Application, Essentials. Englewood, CO, USA, Morton Publishing Company.
2. Dey, P., 2018. Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Singapore, Springer.
3. Cappuccino, J. and Welsh, C., 2019. Microbiology: A Laboratory Manual, Pearson.
4. Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C. L., 2018. Microbiology: an introduction, Pearson.
5. Temiz, A., 2010. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri, Hatiboğlu Yayınevi.
6. Wong, R. C. W., Heung, S. S. Y., Ho, Y. C., Yip, K. T. and Que, T. L., 2011. Evaluation of PREVI Color Gram Automated Staining System on Positive Blood Culture Samples. **Laboratory Medicine**, **42**(7): p. 414–418.
7. Hu, X., Laguerre, V., Packert, D., Nakasone, A. and Moscinski, L., 2015. A Simple and Efficient Method for Preparing Cell Slides and Staining without Using Cytocentrifuge and Cytoclips. **International Journal of Cell Biology**, 2015: p. 813216.
8. Siguenza, N., Jangid, A., Strong, E. B., Merriam, J., Martinez, A. W. and Martinez, N. W., 2019. Micro-staining microbes: An alternative to traditional staining of microbiological specimens using microliter volumes of reagents. **Journal of microbiological methods**, **164**: p. 105654.
9. Castillo-León, J. and Svendsen, W. E., 2015. Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems. Cham, Springer International Publishing.
10. İçöz, K. and Mzava, O., 2016. Detection of Proteins Using Nano Magnetic Particle Accumulation-Based Signal Amplification. **Applied Sciences**, **6**(12): p. 394.
11. İçöz, K., Akar, Ü. and Ünal, E., 2020. Microfluidic Chip based direct triple antibody immunoassay for monitoring patient comparative response to leukemia treatment. **Biomedical Microdevices**, **22**(3): p. 48.
12. Alapan, Y., Kim, C., Adhikari, A., Gray, K. E., Gurkan-Cavusoglu, E., Little, J. A. and Gurkan, U. A., 2016. Sick cell disease biochip: a functional red blood cell

- adhesion assay for monitoring sickle cell disease. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, **173**: 74-91.e8.
13. Zhou, J., Tu, C., Liang, Y., Huang, B., Fang, Y., Liang, X. and Ye, X., 2020. The label-free separation and culture of tumor cells in a microfluidic biochip. **Analyst**, **145**(5): p. 1706–1715.
 14. Wickramaratne, B. and Pappas, D., 2020. Tandem microfluidic chip isolation of prostate and breast cancer cells from simulated liquid biopsies using CD71 as an affinity ligand. **RSC Advances**, **10**(54): p. 32628–32637.
 15. Yeh, Y.-T., Gulino, K., Zhang, Y., Sabestien, A., Chou, T.-W., Zhou, B., Lin, Z., Albert, I., Lu, H., Swaminathan, V., Ghedin, E. and Terrones, M., 2020. A rapid and label-free platform for virus capture and identification from clinical samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **117**(2): p. 895–901.
 16. Sakamoto, C., Yamaguchi, N. and Nasu, M., 2005. Rapid and simple quantification of bacterial cells by using a microfluidic device. **Applied and environmental microbiology**, **71**(2): p. 1117–1121.
 17. Tang, Q., Li, X., Lai, C., Li, L., Wu, H., Wang, Y. and Shi, X., 2021. Fabrication of a hydroxyapatite-PDMS microfluidic chip for bone-related cell culture and drug screening. **Bioactive materials**, **6**(1): p. 169–178.
 18. Ye, N., Qin, J., Shi, W., Liu, X. and Lin, B., 2007. Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. **Lab on a chip**, **7**(12): p. 1696–1704.
 19. Wang, Y., Gao, W., Wu, M., Zhang, X., Liu, W., Zhou, Y., Jia, C., Cong, H., Chen, X. and Zhao, J., 2021. EGFR mutation detection of lung circulating tumor cells using a multifunctional microfluidic chip. **Talanta**, **225**: p. 122057.
 20. Phurimsak, C., Tarn, M. D., Peyman, S. A., Greenman, J. and Pamme, N., 2014. On-chip determination of C-reactive protein using magnetic particles in continuous flow. **Analytical Chemistry**, **86**(21): p. 10552–10559.
 21. Narayanamurthy, V., Jeroish, Z. E., Bhuvaneshwari, K. S., Bayat, P., Premkumar, R., Samsuri, F. and Yusoff, M. M., 2020. Advances in passively driven microfluidics and lab-on-chip devices: a comprehensive literature review and patent analysis. **RSC Advances**, **10**(20): p. 11652–11680.

22. Phurimsak, C., Yildirim, E., Tarn, M. D., Trietsch, S. J., Hankemeier, T., Pamme, N. and Vulto, P., 2014. Phaseguide assisted liquid lamination for magnetic particle-based assays. **Lab on a chip**, **14**(13): p. 2334–2343.
23. Gjergjizi, B., Çoğun, F., Yıldırım, E., Eryılmaz, M., Selbes, Y., Sağlam, N. and Tamer, U., 2018. SERS-based ultrafast and sensitive detection of luteinizing hormone in human serum using a passive microchip. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **269**: p. 314–321.
24. Dogan, Ü., Kasap, E. N., Sucularlı, F., Yildirim, E., Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I. H. and Ertas, N., 2020. Multiplex enumeration of Escherichia coli and Salmonella enteritidis in a passive capillary microfluidic chip. **Analytical methods: advancing methods and applications**, **12**(30): p. 3788–3796.
25. Kasap, E. N., Doğan, Ü., Çoğun, F., Yıldırım, E., Boyacı, İ. H., Çetin, D., Suludere, Z., Tamer, U. and Ertaş, N., 2019. Fast fluorometric enumeration of E. coli using passive chip. **Journal of microbiological methods**, **164**: p. 105680.
26. Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J. and Fox, G. E., 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and applied microbiology**, **6**: p. 143–151.
27. Oladipo, A. A. and Gazi, M., 2014. Enhanced removal of crystal violet by low cost alginate/acid activated bentonite composite beads: Optimization and modelling using non-linear regression technique. **Journal of Water Process Engineering**, **2**: p. 43–52.
28. Dey, P., 2018. Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Singapore, Springer.
29. Benkhaya, S., M'rabet, S. and El Harfi, A., 2020. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. **Inorganic Chemistry Communications**, **115**: p. 107891.
30. Xu, X., 2007. Synthesis and Evaluation of Derivatives and Analogs of Xanthene Dyes. LSU Doctoral Dissertations.
31. Platt, E., Sommer, P., McDonald, L., Bennett, A. and Hunt, J., 2009. Tissue floaters and contaminants in the histology laboratory. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, **133**(6): p. 973–978.

32. Cahill, A. and Pearson, J., 2012. Measurement of stainer bath contamination and evaluation of common mitigation strategies. **Journal of Histotechnology**, **35**(3): p. 130–139.
33. Chapin, K. C. and Patrick R. Murray (eds.), 2003. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC, American Society for Microbiology.
34. 1989. Understanding microbes: a laboratory textbook for microbiology.
35. Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M. and Mohammedsaleh, Z. M., 2015. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. **Global Journal of Health Science**, **8**(3): p. 72–79.
36. Ovalle, W. K. and Nahirney, P. C., 2020. Netter's Essential Histology E-Book. With Correlated Histopathology / William K. Ovalle, Patrick C. Nahirney.
37. Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L. and Urano, Y., 2010. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. **Chemical Reviews**, **110**(5): p. 2620–2640.
38. Zhu, H., Fan, J., Du, J. and Peng, X., 2016. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. **Accounts of chemical research**, **49**(10): p. 2115–2126.
39. Ueno, T. and Nagano, T., 2011. Fluorescent probes for sensing and imaging. **Nature Methods**, **8**(8): p. 642–645.
40. Wiederschain, G. Y., 2011. The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. **Biochemistry (Moscow)**, **76**(11): p. 1276.
41. Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S. and Rani, V., 2014. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. **Journal of microscopy**, **255**(1): p. 7–19.
42. Hessel, V., 2005. From Microreactor Design to Microreactor Process Design. **Chemical Engineering & Technology**, **28**(3): p. 243.
43. Whitesides, G. M., 2006. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, **442**(7101): p. 368–373.
44. Manz, A., Graber, N. and Widmer, H. M., 1990. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **1**(1-6): p. 244–248.

45. Alessandra Delaquilla, 2021. History of Microfluidics. Elveflow.
46. Abgrall, P. and Gué, A.-M., 2007. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 17(5): R15-R49.
47. Nguyen, N.-T., Hejazian, M., Ooi, C. and Kashaninejad, N., 2017. Recent Advances and Future Perspectives on Microfluidic Liquid Handling. **Micromachines**, 8(6): p. 186.
48. Elveflow Team, 2021. Microreactors & Microfluidics in Chemistry – a Review. Elveflow.
49. Burdallo, I., Jimenez-Jorquera, C., Fernández-Sánchez, C. and Baldi, A., 2012. Integration of microelectronic chips in microfluidic systems on printed circuit board. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, 22(10): p. 105022.
50. Sochol, R. D., Sweet, E., Glick, C. C., Wu, S.-Y., Yang, C., Restaino, M. and Lin, L., 2018. 3D printed microfluidics and microelectronics. **Microelectronic Engineering**, 189: p. 52–68.
51. Basu, A. S., 2017. Digital Assays Part II: Digital Protein and Cell Assays. **SLAS Technology**, 22(4): p. 387–405.
52. Nichols, E. R. and Craig, D. B., 2008. Single molecule assays reveal differences between in vitro and in vivo synthesized beta-galactosidase. **The Protein Journal**, 27(6): p. 376–383.
53. Mou, L. and Jiang, X., 2017. Materials for Microfluidic Immunoassays: **A Review. Advanced Healthcare Materials**, 6(15): p. 1601403.
54. Kim, H. S., Devarenne, T. P. and Han, A., 2015. A high-throughput microfluidic single-cell screening platform capable of selective cell extraction. **Lab on a Chip**, 15(11): p. 2467–2475.
55. Bai, Y., Weibull, E., Joensson, H. N. and Andersson-Svahn, H., (2014). Interfacing picoliter droplet microfluidics with addressable microliter compartments using fluorescence activated cell sorting. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 194: p. 249–254.

56. Nilsson, J., Evander, M., Hammarström, B. and Laurell, T., 2009. Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. **Analytica Chimica Acta**, **649**(2): p. 141–157.
57. Weaver, W. M., Tseng, P., Kunze, A., Masaeli, M., Chung, A. J., Dudani, J. S., Kittur, H., Kulkarni, R. P. and Di Carlo, D., 2014. Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. **Current Opinion in Biotechnology**, **25**: p. 114–123.
58. Tarn, M. D., Sikora, S. N. F., Porter, G. C. E., O'Sullivan, D., Adams, M., Whale, T. F., Harrison, A. D., Vergara-Temprado, J., Wilson, T. W., Shim, J. and Murray, B. J., 2018. The study of atmospheric ice-nucleating particles via microfluidically generated droplets. **Microfluidics and Nanofluidics**, **22**(5): p. 52.
59. (2006). Solvent-resistant elastomeric microfluidic devices and applications.
60. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology.
61. (2007). Theoretical microfluidics.
62. Kamholz, A. E. and Yager, P., 2001. Theoretical Analysis of Molecular Diffusion in Pressure-Driven Laminar Flow in Microfluidic Channels. **Biophysical Journal**, **80**(1): p. 155–160.
63. Sciambi, A. and Abate, A. R., 2015. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz. **Lab on a Chip**, **15**(1): p. 47–51.
64. Mi, L., Huang, L., Li, J., Xu, G., Wu, Q. and Wang, W., 2016. A fluidic circuit based, high-efficiency and large-scale single cell trap. **Lab on a Chip**, **16**(23): p. 4507–4511.
65. Liu, B., Li, M., Tian, B., Yang, X. and Yang, J., 2018. A positive pressure-driven PDMS pump for fluid handling in microfluidic chips. **Microfluidics and Nanofluidics**, **22**(9): p. 1–10.
66. Zhang, W., Lin, S., Wang, C., Hu, J., Li, C., Zhuang, Z., Zhou, Y., Mathies, R. A. and Yang, C. J., 2009. PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics. **Lab on a chip**, **9**(21): p. 3088–3094.
67. Shim, J., Ranasinghe, R. T., Smith, C. A., Ibrahim, S. M., Hollfelder, F., Huck, W. T. S., Klenerman, D. and Abell, C., 2013. Ultrarapid generation of femtoliter

- microfluidic droplets for single-molecule-counting immunoassays. **ACS nano**, 7(7): p. 5955–5964.
68. Baroud, C. N., Gallaire, F. and Dangla, R., 2010. Dynamics of microfluidic droplets. **Lab on a chip**, 10(16): p. 2032–2045.
69. Anna, S. L. and Mayer, H. C., 2006. Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device. **Physics of Fluids**, 18(12): p. 121512.
70. Xia, Y. and Whitesides, G. M., 1998. Soft Lithography. **Angewandte Chemie International Edition**, 37(5): p. 550–575.
71. Wang, Z., 2018. Detection and Automation Technologies for the Mass Production of Droplet Biomechanics. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, 11: p. 260–274.
72. Mohammed, M.-I. and Desmulliez, M. P. Y., 2011. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: A review. **Lab on a Chip**, 11(4): p. 569–595.
73. Cohen, N., Sabhachandani, P., Sarkar, S., Kahanovitz, L., Lautsch, N., Russell, S. J. and Konry, T., 2017. Microsphere based continuous-flow immunoassay in a microfluidic device for determination of clinically relevant insulin levels. **Microchimica Acta**, 184(3): p. 835–841.
74. Zhu, X., Xiong, S., Zhang, J., Zhang, X., Tong, X. and Kong, S., 2018. Improving paper-based ELISA performance through covalent immobilization of antibodies. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 255: p. 598–604.
75. Skiving stacked sheets of paper into test paper for rapid and multiplexed assay. *Science Advances*.
76. Verma, M. S., Tsaloglou, M.-N., Sisley, T., Christodouleas, D., Chen, A., Milette, J. and Whitesides, G. M., 2018. Sliding-strip microfluidic device enables ELISA on paper. **Biosensors & bioelectronics**, 99: p. 77–84.
77. Watts, P. and Wiles, C., 2007. Micro reactors: a new tool for the synthetic chemist. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 5(5): p. 727–732.
78. Ren, K., Zhou, J. and Wu, H., 2013. Materials for microfluidic chip fabrication. **Accounts of chemical research**, 46(11): p. 2396–2406.

79. McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J. A. and Whitesides, G. M., 2000. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Electrophoresis**, **21**(1): p. 27–40.
80. Lima, R. S., Leão, Paulo A. G. C., Piazzetta, M. H. O., Monteiro, A. M., Shiroma, L. Y., Gobbi, A. L. and Carrilho, E., 2015. Sacrificial adhesive bonding: a powerful method for fabrication of glass microchips. **Scientific Reports**, **5**(1): p. 13276.
81. Peyman, S. A., Abou-Saleh, R. H., McLaughlan, J. R., Ingram, N., Johnson, B. R. G., Critchley, K., Freear, S., Evans, J. A., Markham, A. F., Coletta, P. L. and Evans, S. D., 2012. Expanding 3D geometry for enhanced on-chip microbubble production and single step formation of liposome modified microbubbles. **Lab on a Chip**, **12**(21): p. 4544–4552.
82. Hwang, Y. and Candler, R. N., 2017. Non-planar PDMS microfluidic channels and actuators: a review. **Lab on a Chip**, **17**(23): p. 3948–3959.
83. Hong, S.-L., Tang, M., Chen, Z., Ai, Z., Liu, F., Wang, S., Zhang, N. and Liu, K., 2019. High-performance multiplex microvalves fabrication and using for tumor cells staining on a microfluidic chip. **Biomedical Microdevices**, **21**(4): p. 87.
84. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. Science.
85. Microfluidic Large-Scale Integration. Science.
86. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M. and Carrilho, E., 2010. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, **82**(1): p. 3–10.
87. Altundemir, S., Uguz, A. K. and Ulgen, K., 2017. A review on wax printed microfluidic paper-based devices for international health. **Biomicrofluidics**, **11**(4): p. 41501.
88. Bhattacharya, S., Kumar, S. and Agarwal, A. K. (eds.), 2019. Paper microfluidics. Theory and applications / Shantanu Bhattacharya, Sanjay Kumar, Avinash K Agarwal, editors. Singapore, Springer.
89. Stone, H. A., 2007. Introduction to Fluid Dynamics for Microfluidic Flows. In: H. Lee, D. Ham, R. M. Westervelt (eds.) CMOS Biotechnology. New York, London, Springer: p. 5–30.

90. Ong, S.-E., Zhang, S., Du, H. and Fu, Y., 2008. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. **Frontiers in Bioscience**, **13**(13): p. 2757–2773.
91. Amini, H., Lee, W. and Di Carlo, D., 2014. Inertial microfluidic physics. **Lab on a Chip**, **14**(15): p. 2739–2761.
92. Saliba, J., Daou, A., Damiati, S., Saliba, J., El-Sabban, M. and Mhanna, R., 2018. Development of Microplatforms to Mimic the In Vivo Architecture of CNS and **PNS Physiology and Their Diseases**. **Genes**, **9**(6): p. 285.
93. Oh, K. W., Lee, K., Ahn, B. and Furlani, E. P., 2012. Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy. **Lab on a Chip**, **12**(3): p. 515–545.
94. Chou, H.-P., Unger, M. A. and Quake, S. R., (2001). A Microfabricated Rotary Pump. **Biomedical Microdevices**, **3**(4): p. 323–330.
95. Studer, V., Pepin, A., Chen, Y. and Ajdari, A., 2004. An integrated AC electrokinetic pump in a microfluidic loop for fast and tunable flow control. **Analyst**, **129**(10): p. 944–949.
96. Wang, X., Wang, S., Gendhar, B., Cheng, C., Byun, C. K., Li, G., Zhao, M. and Liu, S., 2009. Electroosmotic pumps for microflow analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, **28**(1): p. 64–74.
97. Shen, M., Dovat, L. and Gijs, M., 2011. Magnetic active-valve micropump actuated by a rotating magnetic assembly. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **154**(1): p. 52–58.
98. 2017. Single cell Enrichment with High Throughput Microfluidic Devices.
99. The Elveflow Team, 2021. Microfluidic Perfusion medium switch using IBIDI© chips. Elveflow.
100. Hosokawa, K., Sato, K., Ichikawa, N. and Maeda, M., 2004. Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis. **Lab on a chip**, **4**(3): p. 181–185.
101. Munaz, A., Shiddiky, M. J. A. and Nguyen, N.-T., 2018. Recent advances and current challenges in magnetophoresis based micro magnetofluidics. **Biomicrofluidics**, **12**(3): p. 31501.

102. Huang, Y.-Y., Chen, P., Wu, C.-H., Hoshino, K., Sokolov, K., Lane, N., Liu, H., Huebschman, M., Frenkel, E. and Zhang, J. X. J., 2015. Screening and Molecular Analysis of Single Circulating Tumor Cells Using Micromagnet Array. **Scientific Reports**, 5(1): p. 16047.
103. Osman, O., Toru, S., Dumas-Bouchiat, F., Dempsey, N. M., Haddour, N., Zanini, L.-F., Buret, F., Reyne, G. and Frénéa-Robin, M., 2013. Microfluidic immunomagnetic cell separation using integrated permanent micromagnets. **Biomicrofluidics**, 7(5): p. 54115.
104. Darabi, J. and Guo, C., 2016. Continuous isolation of monocytes using a magnetophoretic-based microfluidic Chip. **Biomedical Microdevices**, 18(5): p. 77.
105. Xia, N., Hunt, T. P., Mayers, B. T., Alsberg, E., Whitesides, G. M., Westervelt, R. M. and Ingber, D. E., 2006. Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow. **Biomedical Microdevices**, 8(4): p. 299–308.
106. Pivetal, J., Royet, D., Ciuta, G., Frenea-Robin, M., Haddour, N., Dempsey, N. M., Dumas-Bouchiat, F. and Simonet, P., 2015. Micro-magnet arrays for specific single bacterial cell positioning. **Journal of magnetism and magnetic materials**, 380: p. 72–77.
107. Alnaimat, F., Dagher, S., Mathew, B., Hilal-Alnqbi, A. and Khashan, S., 2018. Microfluidics Based Magnetophoresis: A Review. **Chemical record (New York, N.Y.)**, 18(11): p. 1596–1612.
108. Hsing, I.-M., Xu, Y. and Zhao, W., 2007. Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing. **Electroanalysis**, 19(7-8): p. 755–768.
109. Kolhatkar, A. G., Jamison, A. C., Litvinov, D., Willson, R. C. and Lee, T. R., 2013. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, 14(8): p. 15977–16009.
110. Icoz, K., Iverson, B. D. and Savran, C., 2008. Noise analysis and sensitivity enhancement in immunomagnetic nanomechanical biosensors. **Applied Physics Letters**, 93(10): p. 103902.

111. Mzava, O., Taş, Z. and İçöz, K., 2016. Magnetic micro/nanoparticle flocculation-based signal amplification for biosensing. **International Journal of Nanomedicine**, **11**: p. 2619–2631.
112. İçöz, K. and Mzava, O., 2016. Detection of Proteins Using Nano Magnetic Particle Accumulation-Based Signal Amplification. **Applied Sciences**, **6**(12): p. 394.
113. Nelson, N., Port, J. and Pandey, M., 2020. Use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) via Multiple Imaging Modalities and Modifications to Reduce Cytotoxicity: An Educational Review. **Journal of Nanotheranostics**, **1**(1): p. 105–135.
114. Magnetic Micro/Nano Structures for Biological Manipulation. SPIN.
115. İçöz, K., Gerçek, T., Murat, A., Özcan, S. and Ünal, E., 2019. Capturing B type acute lymphoblastic leukemia cells using two types of antibodies. **Biotechnology Progress**, **35**(1): e2737.
116. Hejazian, M., Li, W. and Nguyen, N.-T., 2015. Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. **Lab on a Chip**, **15**(4): p. 959–970.
117. Nguyen, N.-T., 2012. Micro-magnetofluidics: interactions between magnetism and fluid flow on the microscale. **Microfluidics and Nanofluidics**, **12**(1-4): p. 1–16.
118. Zhe-Yuan Gao, Tsu-Rong Chiang, Chi-Fu Lin, Yun-Che Tsai and Chiou-Shann Fuh, 2014. Realtime Pedestrian Detection System Using Combinations Of Multiple Features And Object Tracking Method, Unpublished.
119. Icoz, K., Soylu, M. C., Canikara, Z. and Unal, E., 2018. Quartz-crystal Microbalance Measurements of CD19 Antibody Immobilization on Gold Surface and Capturing B Lymphoblast Cells: Effect of Surface Functionalization. **Electroanalysis**, **30**(5): p. 834–841.
120. Chan, B.-D., Mateen, F., Chang, C.-L., Icoz, K. and Savran, C. A., 2012. A Compact Manually Actuated Micromanipulator. **Journal of Microelectromechanical Systems**, **21**(1): p. 7–9.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Fatma Betül KÖŞKER
Uyruğu: Türkiye (T.C)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	2014
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü	2011
Lise	Nuh Mehmet Baldöktü Anadolu Lisesi	2007

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2020-Halen	Pamukkale Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	Araştırma Görevlisi
2011-2020	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Araştırma Makaleleri

- Köşker, F.B., Gümüş, K.Z., Tokmakçı, M., Acer, N., Şenol, S., Bilgen, M., 2022. Track density imaging using diffusion tensor imaging data from 1.5 T MRI scanner. **Turkish Journal of Electrical Engineering and Computer Sciences**, 30 (6): 2044-2053.
- Kosker, F.B., Aydın, O., Icoz, K., 2022. Simple Staining of Cells on a Chip. **Biosensors**, 12(11):1013.

Konferans Bildirileri

1. K. Ceran, F. B. Köşker, A. Al-Tairi & M. Ç. Soylu, Evaluation of Surface Modifications with Quartz Crystal Microbalance Sensor for Genetic Detection, Abstract, International 5th European Conference on Science, Art & Culture (ECSAC'2019), Ankara, 28 -29 September 2019.
2. A. Al-Tairi, F. B. Köşker, K. Ceran & M. Ç. Soylu, The direct detection of Escherichia Coli bacteria in simulated saliva based on quartz crystal microbalance (QCM) sensor, Abstract, International 5th European Conference on Science, Art & Culture (ECSAC'2019), Ankara, 28-29 September 2019.
3. M. Ç. Soylu, M. Keskin, K. Keser, K. Ceran, M. Akyol, A. S. Akar, H. Şahin & F. B. Köşker, Basit bir biyosensör tasarımı: piezo disk element, Abstract, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, 22-23 November 2018.
4. M. Ç. Soylu, M. Keskin, K. Keser, K. Ceran & F. B. Köşker, Kuvvars kristal mikroterazi ile genetik tespitte yüzey kaplama etkisi, Abstract, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, 22-23 November 2018.
5. M. Ç. Soylu, F. B. Köşker, M. Keskin, K. Keser & K. Ceran, Biyosensör Uygulamaları için 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane Tabanlı Kaplama Yöntemlerinin İncelenmesi, Short Paper, Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi 2018, 08-10 November 2018.
6. M. Ç. Soylu, Z. Kesmen, F. B. Köşker, E. Özbekar, F. Ersoy & R. Şimşek, Escherichia coli'nin Gümüş ve Bakır Yüzeylerde Tutunumunun İncelenmesi, Short Paper, Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi 2016 (TıpTekno'16), 27-29 October 2016.
7. M. Ç. Soylu, F. B. Köşker & K. Canıkara, Detection of Escherichia coli using Quartz Crystal Microbalance Sensor - A Study Design, Poster Presentation, 3rd International Congress on Biosensors, 05-07 October 2016.

8. F. B. Köşker, K. Gümüş & M. Tokmakçı, Yüksek Çözünürlükte Beyin Trak Yoğunluk Görüntülerinin Elde Edilmesi, Poster Presentation, 12. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28-31 May 2014.
9. F. B. Köşker, K. Gümüş, M. Tokmakçı & M. Bilgen, Difüzyon Tensor Görüntüleme Tabanlı Yeni Bir Traktografi Algoritmasının Geliştirilmesi Ve Uygulanması, Abstract, 25. Ulusal Biyofizik Kongresi, 24-27 September 2013.
10. F. B. Köşker, K. Gümüş & M. Tokmakçı Difüzyon Tensör Görüntüleri Ile Trak Yoğunluk Görüntü Eldesi, Short Paper, Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi 2013 (TıpTekno'13), 31 October – 02 November 2013.
11. F. B. Köşker, S. İçer & M. Tokmakçı, Temel Bileşen Analizi, Yoğunluk-Renk-Doyum Dönüşümü ve Klasik Yöntem Kullanılarak Tıbbi Görüntü Birleştirme, Short Paper, Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi 2012 (TıpTekno'12), 01-03 November 2012.