

**Kanser ve Çoklu İlaç Dirençliliği Tespiti için MEMS Tabanlı
Dielektroforetik Hücre Ayrıştırma Sistemi Geliştirilmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 111E194

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Haluk KÜLAH

Araştırmacı:

Doç. Dr. Ebru Özgür

Danışman:

Prof. Dr. Ufuk Gündüz

Bursiyerler:

Garsha Bahrieh

Gürhan Özkayar

Rui Colaço

Murat Erdem

Özgen Sümer Laçın

ÖNSÖZ

Bu proje kapsamında, kanser ve kanserde çoklu ilaç dirençliliğinin gelişimini hızlı ve hassas bir şekilde tespit edebilecek MEMS tabanlı bir biyosensörün geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çalışma, ODTÜ Elektrik Elektronik Mühendisliği, ODTÜ MEMS Merkezi ve ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü'nün ortak çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları birçok uluslararası konferansta sunulmuş ve bilimsel dergilerde yayınlanarak literatüre önemli katkılar sağlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarının, kanserde erken teşhise yönelik çip-üstü-laboratuvar sistemlerinin geliştirilmesine bir temel oluşturmasını amaçlıyoruz.

Bu proje, 111E194 numarası ile 1001 araştırma projeleri programı çerçevesinde TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	13
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	15
2.1 Kanser ve Çoklu İlaç Dirençliliği.....	15
2.2 Dielektroforez	20
2.3 Elektrotasyon.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1 Elektrotasyon ile Dielektrik Karakterizasyonlar	29
3.1.1 Birinci Nesil ER Çiplerinin Tasarım ve Üretimleri	29
3.1.2 İkinci Nesil ER Çiplerinin Tasarım ve Üretimleri.....	30
3.1.3 Üçüncü Nesil ER Çiplerinin Tasarım ve Üretimleri	30
3.1.4 ER Çipleri Yüzeyinde Döngüsel Tork (ROT-T) Dağılımının Karakterizasyonu	34
3.1.5 Test Düzeneği	42
3.2 Hücre Modelleme	44
3.3 COMSOL Simülasyonları.....	46
3.4 Birinci Nesil DEF Çipleri.....	47
3.4.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması	47
3.4.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması	54
3.5 İkinci Nesil DEF Çipleri	60
3.5.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması	60
3.5.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması	66
3.6 Üçüncü Nesil DEF Çipleri	70
3.6.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması	70
3.6.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması	81
3.7 Entegre Sistemin Tasarım, Üretim ve Testleri.....	83
3.8 Hücre Hatlarında Dirençliliğin Geliştirilmesi	87
3.8.1 Hücre Kültür Ortamı.....	87
3.8.2 Dirençli Hücre Hatlarının Geliştirilmesi.....	87
3.9 Dirençli Hatlarda P-gp İfadesinin Belirlenmesi	88
3.10 Parilen mikrokanalların heparin ile kaplanarak biyo-uyumluluğunun sağlanması	91
4. BULGULAR.....	93
4.1 Hücrelerin Elektrotasyon ile Dielektrik Karakterizasyonları	93
4.1.1 Dirençli ve Hassas K562 Hücrelerinin Dielektrik Karakterizasyonu	93
4.1.2 Dirençli ve Hassas MCF-7 Hücrelerinin Dielektrik Karakterizasyonu	97
4.2 Hücre Modelleme	98
4.3 Birinci Nesil DEF Çipleri.....	100

4.3.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması	100
4.3.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması	100
4.4 İkinci Nesil DEF Çipleri	102
4.4.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması	102
4.4.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması	105
4.5 Üçüncü Nesil DEF Çipleri	112
4.5.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması	112
4.5.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması	115
4.6 Entegre Sistem ile ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerinin tespiti	116
4.7 Hücre Hatlarında Dirençliliğin Geliştirilmesi	118
4.8 Dirençli Hatlarda P-gp İfadesinin Belirlenmesi	119
4.9 Parilen mikrokanalların heparin ile kaplanarak biyo-uyumluluğunun sağlanması	121
5. TARTIŞMA/SONUÇ	123
6. EKLER	125
7. KAYNAKLAR	126
8. PROJE ÇIKTILARI	130

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Farklı 3D elektrorotasyon çiplerinin elektrotlar arası uzaklığı, ayrılan segment ve rotasyonu ölçülen hücre sayısı.	37
Tablo 2. Farklı elektrot geometrileri için x-y ekseninde EEF'in sabitliğinin kıyaslaması. Karşılaştırmalar toplam dairesel ölçüm alanına göre EEF'in merkezi değerinin %5, %10 ve %20 değiştiği dairesel alanlar göz önünde bulundurularak yapılmıştır.	41
Tablo 3. FEM modellemeleri ve deneysel olarak elde edilen sonuçların farklı elektrot geometrileri için dikey eksende kıyaslaması. *Simülasyonlar için değişim değeri $z=5 \mu\text{m}$ 'deki EEF değeri baz alınarak hesaplanmıştır. Deneysel sonuçlar için değişim miktarı $z<30 \mu\text{m}$ 'deki değer baz alınarak hesaplanmıştır.	41
Tablo 4. Hücre ve akışkan dielektrik özellikleri bilgileri.	45
Tablo 5. Kan ve kanser hücrelerinin ayrıştırılması için tasarlanan birinci nesil çipin 1. DEF alanını oluşturan kanal ve elektrotların boyutları.	48
Tablo 6. Dirençli ve duyarlı kanser hücrelerinin ayrıştırılması için tasarlanan birinci nesil DEF çiplerinin kanal ve elektrotlarının boyutları.	56
Tablo 7. ÇİD geliştirmiş ve dirençsiz kanser hücrelerinin ayrışmasının sağlanacağı 4 farklı DEF çipi dizaynı için belirlenmiş basınç ve hız değerleri.	57
Tablo 8. İkinci Nesil DEF Alanı Parametreleri.	61
Tablo 9. Eritrosit ve K562 Kanser Hücrelerinin Akış Formülüne Eklenen Değerleri.	62
Tablo 10. Üçüncü Nesil DEF Çipleri İçin Parametreler– Tasarım1.	72
Tablo 11. Üçüncü nesil DEF çipleri için parametreler– Tasarım 2.	75
Tablo 12. İkinci alternatif tasarım için kanallar arası filtre parametreleri.	76
Tablo 13. Üçüncü nesil DEF çipi için tasarlanan 4 çeşide ait tasarım parametreleri.	82
Tablo 14. Entegre sistemde 1. ve 2. DEF alanlarına ait parametreler.	85
Tablo 15. K562 hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları (NanoDrop ölçüm sonuçları).	89
Tablo 16. qPCR'de kullanılan primer çiftleri.	90
Tablo 17. qRT-PCR reaksiyon koşulları.	91
Tablo 18. K562 hücrelerinin hassas ve ilaç (Doxorubicin ve Imatinib) dirençliliği geliştirmiş hatlarının ER yöntemi le belirlenmiş dielektrik özellikleri.	95
Tablo 19. MCF-7 hücrelerinin hassas ve ilaç (Doxorubicin) dirençliliği geliştirmiş hatlarının ER yöntemi le belirlenmiş dielektrik özellikleri.	97
Tablo 20. Eritrosit ve K562 hücrelerinin farklı akış hızlarındaki nDEF veya pDEF kuvvetinden etkilenme durumları.	105
Tablo 21. İkinci nesil çiplerinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı akış hızlarında hücre yakalama performansı analiz sonuçları ($f=48.64 \text{ MHz}$, $\text{voltaj}=15 V_{pp}$).	107
Tablo 22. İkinci nesil DEF çiplerinin, MCF7/dox1000 hücrelerinin hapsedilemediğini göstermektedir. Akış hızı performans testlerinde voltaj ($20 V_{pp}$), voltaj performans testlerinde akış hızı ($5 \mu\text{l}/\text{dk}$) sabittir.	109
Tablo 23. Doxorubicin dirençliliği geliştiren K562 ve MCF-7 hücrelerinin IC_{50} değerleri.	119

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Homojen olmayan elektrik alan etkisindeki bir dielektrik parçacık üzerinde oluşan dielektroforetik kuvvet. (a) pozitif DEF, (b) negatif DEF.	21
Şekil 2. Farklı boyut ve/veya dielektrik özelliklere sahip parçacıkların DEF ile ayrıştırılması. (a) elektrik alan uygulanmadığı durumda parçacıklar üzerinde dielektroforetik kuvvet oluşmamaktadır. (b) elektrik alan altında parçacıkların maruz kaldığı kuvvetlerin yönü (üçgen ve yuvarlak parçacıklar) ya da şiddeti (yuvarlak ve yıldız parçacıklar) farklı olabilir.	21
Şekil 3. İki farklı hücrenin CM faktör dağılımı ve DEF kullanılarak ayrılabilirlikleri frekans aralığı.	22
Şekil 4. Farklı tümör hücresi ve bazı memeli hücrelerinin CM faktör-frekans analizleri sonucu ile belirlenmiş $Re(f_{cm})$ değerlerini sınırlayan frekans (geçiş frekansı) değerleri (Gascoyne ve Vykoukal, 2004).....	23
Şekil 5. Canlı ve ölü maya hücrelerinin $8 V_{pp}$ sinüzoidal voltaj altındaki DEF tepkileri. Parlak renkteki bölgeler elektrotları, koyu renktekiler camı göstermektedir. (a) 10 kHz'de canlı maya hücreleri, (b) 5 MHz'de canlı maya hücreleri, (c) 10 KHz'de ölü maya hücreleri, (d) 5 MHz'de ölü maya hücreleri (Doh ve Cho, 2005).	24
Şekil 6. Maksimum rotasyon frekansının akışkan iletkenliğine bağlı değişimini gösteren lineer bağıntı grafiği. Farklı iletkenlikteki akışkanlar içinde yapılan ER testleri sonucu elde edilen bu bağıntı ile hücre zarı kapasitansını ve total efektif hücre zarı iletkenliği hesaplanabilir.....	26
Şekil 7. Elektrotasyon testlerinde kullanılan üçgen, dörtlü elektrot yapısı ve sinüs voltaj uygulandığında oluşan döngüsel elektrik alan.	27
Şekil 8. Birinci nesil ER çipi üretim şeması.	29
Şekil 9. Birinci ve ikinci nesil ER çipleri (a), K562/IMA hücreleri ile yapılan testler (b).	30
Şekil 10. 2D ve 3D elektrotlarda elektrik alan dağılımını gösteren şematik. 3D elektrot yapısındaki ER çiplerinde, hücreler z-ekseninde homojen bir elektrik alan dağılımı etkisinde kalmaktadır.....	30
Şekil 11. Üç boyutlu elektrot yapısı içeren, üçüncü nesil ER çipi üretim şeması.	31
Şekil 12. Tasarlanan 3. nesil ER çiplerinin maske çizimleri (a), elektrik alan değişim şiddeti simülasyonları (b) ve elektrik alan norm dağılımları (c).	32
Şekil 13. Üçüncü nesil ER çiplerinin 4 inçlik pul üzerindeki maske çizimi.....	33
Şekil 14. Üçüncü Nesil ER çipleri (a) polinomik, (b) piramid, (c) yassı, (d) yuvarlak, (e) yayvan elektrot yapısına sahip ER çipi.	33
Şekil 15. 3D ER çiplerinin SEM fotoğrafları.....	34
Şekil 16. ER çiplerinin çalışma prensibi. Elektrotlara 90° faz farkı ile elektriksel sinyal uygulandığında, frekansa bağlı olarak dielektrik parçacık elektrik alan yönünde veya tersi yönde döner.	34
Şekil 17. Z-ekseninde EEF dağılımının belirlenmesi için yapılan FEM simülasyonları.	36
Şekil 18. Dikey eksenindeki EEF dağılımının. (a) Yayvan, (b) yassı, (c) yuvarlak, (d) polinomik, (e) piramit elektrotlar. Simülasyon sonuçlarına göre, maksimum EEF komşu elektrotlar arasındaki bölgelerde oluşmaktadır.	36
Şekil 19. Üçgen (polimomial) elektrot yapısındaki ER çiplerinin EEF karakterizasyonu için elektrotlar arası bölgenin segmentlere ayrılması ve deneysel verilerin değerlendirilmesinde kullanılan algoritma.	38
Şekil 20. Test sırasında hücrelerin (a) $z < 30 \mu m$ ve (b) $z > 30 \mu m$ 'deki görüntüleri.	38
Şekil 21. Deneysel olarak ölçülen hücre dönüş hızlarının çip yüzeyine <i>MATLAB Surface Fitting Toolbox</i> kullanılarak haritalandırılması. (1a-e) Yayvan, (2a-e) yassı, (3a-e) yuvarlak, (4a-e) polinomik ve (5a-e) piramit elektrot yapısı. (1-5a) Elektrotların SEM görüntüleri. Elektrotların pozisyonları ile haritalandırma görüntüleri birebirdir. (1-5 b) ve (1-5 c) hücrelerin $z < 30 \mu m$ 'deki dönüşü, (1-5 d) ve (1-5 e) hücrelerin $z = 100 \mu m$ 'deki dönüşü.	40
Şekil 22. ER çipleri test düzeneği.	42
Şekil 23. Hücre dielektrik özelliklerinin hesaplanması için geliştirilen MATLAB algoritması..	43

Şekil 24. MATLAB algoritması ile hesaplanan hücre dielektrik özelliklerini gösteren ara yüz görüntüsü.	44
Şekil 25. Çekirdekli bir memeli hücrenin tekli tabaka hücre modellemesi yöntemi ile modellenmesi.	44
Şekil 26. Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılması için tasarlanan birinci nesil DEF çipi şematiği.	48
Şekil 27. DEF alanında parçacığın maruz kalacağı elektrik alanın karesinin alansal değişiminin 3 boyutlu FEM (COMSOL Multiphysics) simülasyonu.	49
Şekil 28. Birinci nesil DEF alanından geçişte kan ve kanser hücrelerinin izleyeceği yolu gösteren simülasyonlar.	50
Şekil 29. Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılmasında kullanılan birinci nesil DEF çipine ait maske serimi.	51
Şekil 30. Birinci nesil DEF çiplerinin üretim akışı.	52
Şekil 31. Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılmasında kullanılan birinci nesil DEF çipi.	53
Şekil 32. Elektrokaplama litografisi sırasında fotorezistte oluşan kırılmalar.	54
Şekil 33. ÇİD geliştirmiş ve dirençsiz kanser hücrelerinin ayrışmasının gerçekleştirilmesi amacı ile tasarlanan birinci nesil DEF çipinin yapısı.	55
Şekil 34. ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerini ilaca duyarlı olanlardan ayırmak için tasarlanan 4 farklı çip için 2 boyutta parçacığın maruz kaldığı elektrik alanın karesinin alansal değişiminin simülasyonu.	57
Şekil 35. ÇİD geliştirmiş ve duyarlı K562 lösemi kanser hücrelerinin ayrışmasının sağlanacağı 4 farklı DEF çipi dizaynı için ayrışmanın gerçekleştiğini gösteren hücre hareketi simülasyonları. Bu simülasyonlar sırasında minimum 3.7 Vpeak maksimum 10 Vpeak voltaj değerleri kullanılmıştır. Basınç ve hız değerleri Tablo Z'de verildiği gibidir. Kırmızı çizgiler ÇİD geliştirmiş hücrelerin, mavi çizgiler ise dirençsiz hücrelerin izleyeceği yolu göstermektedir.	58
Şekil 36. 2. DEF alanı için tasarlanan birinci nesil DEF çipine ait maske setleri.	59
Şekil 37. ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri ile ilaca duyarlı olanların ayrılması için tasarlanmış birinci nesil DEF çipleri.	59
Şekil 38. İkinci Nesil DEF Çiplerinin Şematiği.	61
Şekil 39. K562 ve eritrositler için farklı frekanslarda elektrik alan karesinin alansal değişimi üç boyutlu simülasyonu ile akış çizgisi simülasyonları. (a) Eritrositler için 5 kHz'deki üç boyutlu benzetim, (b) Eritrositler için 26.3 kHz'deki üç boyutlu benzetim, (c) K562 kanser hücreleri için 5 kHz'deki üç boyutlu benzetim, (d) K562 kanser hücreleri için 26.3 kHz'deki üç boyutlu benzetim.	63
Şekil 40. İkinci nesil DEF çipinin maske çizimi ve DEF alanı yakın görünüm (Tasarım 1).	63
Şekil 41. İkinci nesil DEF çipinin maske çizimi ve DEF alanı yakın görünüm (Tasarım 2).	64
Şekil 42. İkinci nesil DEF çiplerinin üretiminde izlenen üretim şeması.	65
Şekil 43. Üretilen İkinci Nesil DEF Çipleri.	65
Şekil 44. ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri ile ilaca duyarlı olanların ayrılması için tasarlanmış ikinci nesil DEF çipleri.	66
Şekil 45. İkinci nesil tasarımın elektrik alan değişiminin simülasyonu.	67
Şekil 46. İkinci nesil çiplerde hücre hareketlerinin simülasyonu. (A) İlaç dirençliliği geliştirmiş kanser hücrelerinin DEF kuvvetinden etkilenmeden çıkışa yönlendirilmesi. (B) Aynı simülasyon şartları altında ilaç dirençliliği geliştirmiş hücrelerin elektrotlar üzerinde hapsedilmesi.	68
Şekil 47. İkinci nesil DEF çipi tasarımına ait maske serimleri.	68
Şekil 48. Üretimi tamamlanan ikinci nesil DEF çipi, V şekilli engeller ve 3 boyutlu elektrotların mikroskop altında alınmış görüntüleri.	69
Şekil 49. İkinci nesil DEF çiplerinin testi sırasında kullanılan test düzeneği.	70
Şekil 50. Üçüncü nesil DEF çiplerinin şematiği – Tasarım1.	71
Şekil 51. Ucu açık ve kapalı elektrotlar arasındaki DEF alanı karşılaştırması.	73
Şekil 52. Toprak hatları yokken (a) ve varken (b) elektrotlardan yayılan gerilim alanları.	74
Şekil 53. Üçüncü nesil DEF çiplerinin şematiği – Tasarım 2.	75

Şekil 54. İkinci alternatif için sıvı akış yönelim çizgilerinin ve basınç değişimlerinin gösterildiği benzetim sonucu.	77
Şekil 55. Üçüncü nesil DEF çiplerine ait maske çizimleri ve kanal geçişlerinin yakın görünümü (Tasarım 1).	77
Şekil 56. Üçüncü nesil DEF çiplerine ait maske çizimleri ve kanal geçişlerinin yakın görünümü (Tasarım 2).	78
Şekil 57. Üçüncü nesil DEF çiplerinin üretim şeması	79
Şekil 58. Üretilen üçüncü nesil DEF çipleri (Tasarım 1).	79
Şekil 59. Üretilen üçüncü nesil DEF çipleri (Tasarım 2).	80
Şekil 60. Üçüncü nesil DEF çiplerine ait üç farklı tasarımın hücre yakalama verimliliğini gösteren simülasyon sonuçları.	82
Şekil 61. Üçüncü nesil DEF çipleri için yapılan 4 farklı tasarımın üretiminde kullanılacak maske serimleri.	83
Şekil 62. Üretimi tamamlanan üçüncü nesil DEF çipi, damla şekilli engeller ve 3 boyutlu elektrotların mikroskop altında alınmış görüntüleri.	83
Şekil 63. Entegre sistemde damla şekilli engellere sahip DEF alanı sayısının COMSOL simülasyonları ile 2 olarak belirlenmesi.	84
Şekil 64. Entegre sistemin maske seti.	86
Şekil 65. Üretilen iki aşamalı entegre DEF çipi.	86
Şekil 66. K562, K562/dox ve K562/ima hücrelerinden izole edilen RNA'ların kalite analizleri için agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılması.	90
Şekil 67. Hassas K562 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafiği (a) ve pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (b).	94
Şekil 68. Doxorubicin dirençli (0.1, 0.3 ve 0.5 μM) K562 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (a) ve farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafikleri (b-d).	94
Şekil 69. Imatinib dirençli (0.2, 0.3 ve 0.5 μM) K562 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (a) ve farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafikleri (b-d).	95
Şekil 70. ER testleri sonucunda elde edilen dielektrik özellikler kullanılarak hassas ve dirençli K562 hücrelerinin MATLAB simülasyonu ile oluşturulmuş DEF spektrumu. (Akışkan iletkenliği = 1 mS/m, elektriksel geçirgenlik = 78).	97
Şekil 71. Doxorubicin dirençli (1 μM) MCF-7 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (a) ve farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafikleri (b-c).	98
Şekil 72. 10 mS/m iletkenliğe sahip sıvı içinde hücreler için $\text{Re}(f_{\text{CM}})$ - frekans grafiği.	99
Şekil 73. Hücre sitoplazmik iletkenliği ve hücre zarı geçirgenlik katsayısı değişkenlerinin ortalama değerleri alınarak K562 (solda-mavi)-K562AR (solda-kırmızı) ve MCF-7 (sağda-yeşil)-MCF7/dox (sağda-pembe) hücreleri için oluşturulmuş $\text{Re}(f_{\text{CM}})$ -frekans grafiği ve ayrışma frekansları (48.64 ve 47.97 MHz).	99
Şekil 74. Canlı ve ölü maya hücreleri ile yapılan testler sonucunda birinci nesil DEF çiplerinde hücre ayrıştırmanın gerçekleştirildiği gösterilmektedir. Kanal girişinde canlı ve ölü maya hücreleri karışık halde iken, DEF alanında sadece canlı maya hücrelerinin bulunduğu, ölü hücrelerin akış kuvveti ile kanal dışına çıktığı gözlenmiştir. Canlı maya hücrelerinin DEF kuvveti etkisiyle elektrotlara doğru çekilerek "pearl chain" yapısını oluşturduğu görülmektedir.	101
Şekil 75. Voltajın uygulanıp kesilmesi ile manipüle edilen maya hücreleri.	101
Şekil 76. Sabit gerilim (20 V_{pp}) ve akış hızı (0.2 $\mu\text{l}/\text{dk}$) altında eritrositler. (a) 5 kHz, (b) 26.3kHz.	103
Şekil 77. Sabit gerilim (20 V_{pp}) ve akış hızı (0.2 $\mu\text{l}/\text{dk}$) altında K562 kanser hücreleri (a) 5 kHz (b) 26.3 kHz.	103
Şekil 78. Sabit gerilim (20 V_{pp}) ve akış hızı (10 $\mu\text{l}/\text{dk}$) altında eritrositler – 10MHz.	104

Şekil 79. Sabit gerilim (20 V _{pp}) ve akış hızı (10 µl/dk) altında K562 kanser hücreleri – 10MHz.	104
Şekil 80. İmatinib (A) ve Doxorubicin (B) dirençli K562 lösemi hücrelerinin 48.64 MHz frekans ve 9 V _{pp} 'te elektrotlarda yakalanması. Akış hızı = 10 µl/dk.	106
Şekil 81. 48.64 MHz frekans ve 9 V _{pp} 'te, 10 µl/dk akış hızı ile gelen dirençsiz K562 hücrelerinin kanal içindeki yolu.	106
Şekil 82. Farklı voltajlarda yakalanan imatinib dirençli K562 lösemi hücreleri (f=48.64 MHz, akış hızı=10 µl/dk) (video1).	107
Şekil 83. Dirençsiz ve imatinib (A)- doxorubixin (B) dirençli K562 hücrelerinin 2.nesil DEF çipleri kullanılarak 6.67 µl/dk akış hızında 9 V _{pp} voltaj kullanılarak ayrıştırılması (f = 48.64 MHz). Kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda hapsolmuş halde görülen hücreler, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile görüntülenmiş "cell tracker red" isimli boya ile kırmızı renge boyanmış dirençli K562 hücreleridir. Yeşil renklendirilmiş imajlar GFP filtresi altında alınmış görüntülerdir. Dirençsiz K562 hücreleri hapsolmadığından bu imajlarda herhangi bir hücre görülmemektedir. (C) Dirençsiz ve imatinib dirençli K562 hücrelerinin 2.nesil DEF çiplerinin akış hızı performansının belirlenmesi amacıyla 10 µl/dk akış hızında 9 V _{pp} voltaj kullanılarak ayrıştırılması (f = 48.64 MHz). (D) 48.64 MHz ve 6.67 µl/dk akış hızında ilaca duyarlı hücrelerin kanal içindeki davranışları. 45 s'lik denge durumuna gelindiğinde kanalda ilaca duyarlı hücre kalmamıştır (video2).	108
Şekil 84. Sabit voltajda (20 V _{pp}), farklı akış hızı (10 µl/dk (solda) ve 20 µl/dk (sağda)) altında hapsolan MCF7/dox1000 hücreleri.	109
Şekil 85. 47.97 MHz frekans ve 9 V _{pp} 'de, 5 µl/dk akış hızı altında kanala gelen dirençsiz MCF7 hücrelerinin kanal içindeki yolu.	110
Şekil 86. Dirençsiz ve doxorubicin dirençli MCF7 hücrelerinin ayrıştırılması sırasında farklı zamanlarda alınmış ve "false coloring" ile renklendirilmiş imajlar (f = 47.97 MHz, voltaj = 9 V _{pp} , akış hızı = 5 µl/dk). Kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda hapsolmuş halde görülen hücreler, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile görüntülenmiş, "cell tracker red" isimli boya ile kırmızı renge boyanmış doxorubicin dirençli MCF7 hücreleridir. Yeşil renklendirilmiş imajlar GFP filtresi altında alınmış görüntülerdir. Dirençsiz MCF7 hücreleri hapsolmadığından bu imajlarda herhangi bir hücre görülmemektedir (video3).	111
Şekil 87. V şekilli engeller sebebi ile oluşmuş hava kabarcığının hapsolan hücrelere zarar vermesi.	111
Şekil 88. Farklı şekillerde engeller kullanılarak, imatinib dirençli K562 hücrelerinin DEF kuvveti ile elektrotlarda hapsedilmesi simülasyonları: (A) V şekilli engeller, (B) Damla şekilli engeller.	112
Şekil 89. 10 ms/m iletkenliğe sahip sıvı içinde hücreler için $Re(f_{cm})$ & frekans grafiği.	113
Şekil 90. Hücrelerin ikinci DEF bölgesinde gördükleri 51 MHz frekansla hareketleri. (a) Yönlenebilir K562 kanser hücreleri ve (b) merkeze doğru yönlenebilir eritrositler.	114
Şekil 91. Sabit Gerilim (20 V _{pp}) ve Akış Hızı (16 µl/dk) altında a) Eritrositler b) K562 Kanser Hücreleri – 1 MHz (video4).	114
Şekil 92. Dirençsiz ve doxorubicin dirençli K562 hücrelerinin ayrıştırılması sırasında farklı zamanlarda alınmış ve "false coloring" ile renklendirilmiş imajlar (f = 48.64 MHz, V = 9 V _{pp} , flow rate = 10 µl/dk). Kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda hapsolmuş halde görülen hücreler, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile görüntülenmiş, "cell tracker red" isimli boya ile kırmızı renge boyanmış doxorubicin dirençli K562 hücreleridir. Yeşil renklendirilmiş imajlar GFP filtresi altında alınmış görüntülerdir. 30 s'lik denge durumuna gelindiğinde kanalda ilaca duyarlı hücre kalmamıştır. Ayrıca damla şekilli engeller kullanıldığından kanalda hava kabarcığı oluşumu görülmemiştir.	115
Şekil 93. Entegre sistem kullanılarak kırmızı kan hücreleri (5x10 ⁶ hücre/ml) ve K562 lösemi hücreleri (1x10 ⁶ hücre/ml) karışımında ÇİD gelişiminin tespiti. (A) 2.DEF alanı 1. bölgede hapsolmuş ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri (FDA ile boyanmış ve GFP filtre ile görüntülenmiştir). Aynı elektrot bölgelerine aynı anda kırmızı filtre ile bakıldığından herhangi bir kırmızı kan hücresi gözlemlenmemiştir (voltaj = 18 V _{pp} , frekans = 48.64 MHz, akış hızı = 10 µl/dk). (B) Hapsolan ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri gözlemlendiği anda 1.DEF alanına	

bakıldığında kırmızı kan hücrelerinin 8 µm'lik filtrelerde elendiği görülmektedir (<i>voltaj</i> = 20 V_{pp} , <i>frekans</i> = 1 MHz, <i>akış hızı</i> = 10 µl/dk). (C) Entegre sistemde yeşil renk ile boyanan ilaca duyarlı ve kırmızı renk ile boyanan ÇİD geliştirmiş K562 hücrelerinin 1. ve 2. DEF alanlarındaki hareketleri (<i>voltaj</i> = 20 V_{pp} , <i>frekanslar</i> = 1 ve 48.64 MHz, <i>akış hızı</i> = 10 µl/dk). 117	117
Şekil 94. Entegre sistem kullanılarak kırmızı kan hücreleri (5×10^6 hücre/ml) ve MCF7 göğüs kanseri hücreleri (1×10^6 hücre/ml) karışımında ÇİD gelişiminin tespiti. (A) 2.DEF alanı 1. ve 2. bölgede hapsolmuş ÇİD geliştirmiş MCF7 hücreleri (FDA ile boyanmış ve GFP filtre ile görüntülenmiştir). Aynı elektrot bölgelerine aynı anda kırmızı filtre ile bakıldığından herhangi bir kırmızı kan hücresi gözlemlenmemiştir (<i>voltaj</i> = 20 V_{pp} , <i>frekans</i> = 47.97 MHz, <i>akış hızı</i> = 5 µl/dk). (B) Hapsolan ÇİD geliştirmiş MCF7 hücreleri gözlemlendiği anda 1.DEF alanına bakıldığında kırmızı kan hücrelerinin 8 µm'lik filtrelerde elendiği görülmektedir (<i>voltaj</i> = 20 V_{pp} , <i>frekans</i> = 1 MHz, <i>akış hızı</i> = 5 µl/dk). 118	118
Şekil 95. Doxorubicin dirençli K562 hücrelerinin direnç seviyeleri ve DEF tepkileri arasındaki bağıntı. Hapsolmuş hücre sayıları (ortalama), hapsolmuş 100 nM doxorubicin dirençli K562 hücrelerinin sayısı ile normalize edilerek KMDR (y eksen) katsayısı hesaplanmıştır. Her direnç seviyesi için, her testte kullanılan hücre konsantrasyonu 2.5×10^5 hücre/ml'dir. 120	120
Şekil 96. Sayılan hücre hatlarında P-gp mRNA ifadesi. 120	120
Şekil 97. 10 s O_2 plazma yapılmış parilen mikro-kanalda platelet hareketlerini gösteren mikroskop görüntüleri (20X lens). 122	122
Şekil 98. 30 s O_2 plazma yapılmış parilen mikro-kanalda platelet hareketlerini gösteren mikroskop görüntüleri (20X lens). 122	122
Şekil 99. O_2 plazma yapılmamış kontrol kanalında platelet tutunumunu gösteren mikroskop görüntüleri (20X lens). 122	122

Özet

Kanser tüm dünyada en önemli ikinci ölüm sebebi olup, her yıl 8.2 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Kanser tedavisinde başarının en önemli etkenlerinden biri erken teşhistir. Metastaz ve çoklu ilaç dirençliliği (ÇİD) ise ölüm oranının artmasına neden olan en önemli iki sebeptir. Bu nedenle metastaz ve ÇİD gelişiminin tedavi öncesi ve süresince takip edilmesi, uygun tedavi yönteminin seçilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Ancak, klinikte metastaz ve ÇİD gelişiminin tespitine yönelik yaygın olarak kullanılabilen bir yöntem bulunmamaktadır.

Önerilen projenin **temel amacı** şüphelenilen dokuda **kanser hücrelerinin varlığını tespit eden ve bu kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci (ÇİD) mekanizması geliştirip geliştirmedişinin kontrolünü sağlayan**, dielektroforez (DEF) tabanlı bir hücre ayırıştırma sistemi geliştirilmesidir. Bu iki aşamalı DEF sisteminin, ilk aşamada kanser ve normal doku hücrelerini boyut farklılıklarına göre, ikinci aşamada ise ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerini diğer kanser hücrelerinden dielektrik özelliklerindeki farklılığa göre ayırması beklenmektedir.

Proje süresince, simülasyon ve test sonuçlarına bağlı olarak her iki DEF alanı için 3 farklı nesil DEF çipi geliştirilmiştir. Projenin son aşamasında, son tasarımlar birleştirilerek iki aşamalı bir DEF çipi tasarımı yapılmış ve MEMS üretimleri gerçekleştirilmiş. Tasarımların testleri hassas ve dirençli MCF-7 meme kanseri ve K562 lösemi hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Kan hücrelerini K562 kanser hücrelerinden ayırıştırması planlanan birinci aşama DEF çipinin 1000 kat seyreltilmiş kırmızı kan hücresi (5×10^6 kan hücresi/ml) içinde 1×10^6 hücre/ml kanser hücresini ayırıştırabildiği gözlenmiştir. İkinci aşama DEF çipi ise 100 hassas kanser hücresi içinden 1 dirençli kanser hücresini ayırıştırabilecek hassasiyettedir.

Proje kapsamında kullanılan hücrelerin hassas bir şekilde dielektrik karakterizasyonlarını yapabilecek özgün bir elektrorotasyon (ER) çipi geliştirilmiş ve farklı ilaç dirençlilik seviyesine sahip MCF-7 meme kanseri ve K562 lösemi hücrelerinin dielektrik özellikleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak, DEF yönteminin herhangi bir biyolojik işaretlemeye gerek duyulmaksızın hassas ve hızlı bir şekilde kanser ve kanserde ÇİD gelişimini tespit edebilecek bir platform olabileceği gösterilmiştir. Proje süresince elde edilen veriler, kanserde metastaz ve ÇİD gelişiminin erken tespitini sağlayabilecek MEMS-tabanlı bir çip-üstü-laboratuvar sisteminin geliştirilmesi için temel oluşturacak niteliktedir.

Anahtar kelimeler:

Dielektroforez, elektrorotasyon, lösemi, meme kanseri, BioMEMS

Abstract

Cancer has the 2nd rank in the mortality all over the world. 8.2 million people die due to cancer every year. Early diagnosis is one of the most crucial parameter in the cancer therapy. Metastasis and multidrug resistance (MDR) are the two reasons, causing to increase of death rate in cancer. Therefore, the observation of the metastasis and the development of MDR in cancer patient is crucial to determine the accurate therapy. However, there are not any method to detect metastasis and MDR in the clinic.

The **main objective** of the proposed project is to develop a dielectrophoresis (DEP) based cell separation system (i) **to detect cancer cells** obtained from the suspected tissue, and also (ii) **to separate the MDR cancer cells from non-resistant ones**. The proposed two-stage DEP system is supposed to separate cancer cells from normal tissue cells due to their size differences at the first stage, and separate MDR cells from non-resistant ones due to differences in their dielectric properties at the second stage.

Three generations were developed for both DEP stages based on the simulations and test results. At the last stage of the project, last generations were merged and two-stage DEP device was designed and fabricated. MDR and sensitive K562 and MCF7 cell lines were utilized in the tests of integrated DEP devices. At the first stage, K562 cancer cells (1×10^6 cells/ml) were separated from blood cells (5×10^6 cells/ml). The second DEP stage has the selectivity to detect one MDR cancer cell inside 100 sensitive ones.

During the project, an electrorotation (ER) device was developed to characterize the cells dielectrically. The dielectric properties of MCF7 and K562 cells, having different drug resistance levels, were determined by utilizing ER devices.

In conclusion, results prove that DEP can provide an efficient and rapid platform for the detection of cancer and MDR in cancer, in a label-free manner. These results form a basis for the development of a MEMS based lab-on-a-chip system to provide early diagnosis of metastasis and MDR in cancer.

Keywords:

Dielectrophoresis, electrorotation, leukemia, breast cancer, BioMEMS

1. GİRİŞ

MEMS tabanlı biyomedikal sistemler başta hücre tanıma ve ayırıştırma olmak üzere kan analizi, vücut içi otomatize ilaç dağıtımı, gıda analizi gibi pek çok uygulamada kullanılabilir. Dünyada değişik araştırma kurumları ve şirketler farklı yaklaşımlar ile yüksek performanslı MEMS tabanlı hücre tanıma ve ayırıştırma sistemleri üzerine çalışmaktadır. Bu çalışmalar arasında çip düzeyinde dielektroforez (DEF) sistemleri, optik sistem gerektirmemeleri ve teorik olarak en hassas ayırıştırma sağlayabilmeleri nedeniyle, hücre ayırıştırma uygulamaları için etkin bir yöntem olarak görülmektedir.

DEF, boyutları ve/veya dielektrik özellikleri farklı parçacıkları ayırıştırmakta kullanılan temel bir tekniktir. Bu teknikte homojen olmayan elektrik alan uygulanan parçacıklar boyutlarına ya da dielektrik özelliklerine bağlı olarak farklı büyüklükte dielektroforetik kuvvete maruz kalırlar ve bu sayede ayırışma gerçekleşir. DEF prensibi, hücrelerin de farklı boyut ve dielektrik özelliklerde olabilmesi nedeniyle hücre ayırıştırma gerektiren biyomedikal uygulamalarda da kullanılabilir. Kanseri hücreleri yapı ve büyüklükleri itibarıyla normal doku hücrelerinden farklı olduklarından DEF sistemleri kanser hastalıklarının erken teşhisinde etkin bir çözüm yolu olma potansiyeline sahiptir. DEF yöntemi kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayırıştırılmasında kullanılabileceği gibi, boyutları birbirine çok yakın olan çoklu ilaç direnci (ÇİD) geliştirmiş kanser hücrelerinin ayırıştırılmasında da kullanılabilir. ÇİD bir tümörün bir ilaca karşı direnç geliştirmesinin ardından, o ilaçla aynı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip olmayan başka ilaçlara karşı da çapraz direnç geliştirmesi olarak tanımlanır. Bu tip vakalarda hastalar kemoterapiye cevap vermemektedir. Bu sebeple kanser hücrelerinin içinde ÇİD geliştirenlerin tespit edilebilmesi, kullanılacak tedavi yöntemini belirlemek ve tedavi sürecini hızlandırmak açısından oldukça önemlidir.

Bu proje kapsamında, literatürde ilk kez, şüphelenilen dokuda **kanseri hücrelerinin varlığını tespit eden ve bu kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci (ÇİD) mekanizması geliştirip geliştirmedeğinin kontrolünü sağlayan, DEF tabanlı bir hücre ayırıştırma sistemi geliştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.** İki aşamalı bir DEF sisteminden oluşan MEMS-tabanlı yapıda, ilk aşamada kanser ve normal doku hücrelerini boyut farklılıklarına göre, ikinci aşamada ise ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerini diğer kanser hücrelerinden dielektrik özelliklerindeki farklılığa göre ayrılması sağlanmaya çalışılmıştır. Proje kapsamında MCF7 meme kanseri ve K562 lösemi hücrelerinin farklı ilaç dirençliliği seviyelerine sahip alt tipleri ile çalışmalar yapılmıştır. Bu hücrelerin modellemeleri için gerekli dielektrik özelliklerini belirleyebilmek için, **elektrotasyon (ER)** yöntemi kullanılmış, bu kapsamda özgün, MEMS-tabanlı ER çipleri geliştirilmiştir. Geliştirilen farklı DEF çipleri ile optimum verimin elde edilebileceği, özgün çipler tasarlanmıştır. Yapılan çalışmalar çeşitli uluslararası

konferanslarda sunulmuş, bilimsel dergilerde yayınlanmış ve iki adet yüksek lisans tezi tamamlanmıştır.

Bu proje raporunda, proje kapsamında yapılan çalışmalar detaylı şekilde anlatılmaktadır. Bölüm 2'de kanser, kanserde ÇİD gelişimi, teşhis yöntemleri, ve proje kapsamında kullanılan yöntemler ile ilgili literatür bilgisi ile beraber teorik bilgiye yer verilmektedir. Üçüncü bölümde, kullanılan gereç ve yöntemler (hücre modellemeleri, ER çiplerinin geliştirilme süreçleri ve dielektrik karakterizasyonlar, DEF çiplerinin geliştirilme süreçleri, biyolojik testler) detaylı olarak anlatılmıştır. Dördüncü bölümde elde edilen bulgular ayrıntıları ile sunulmuştur. Beşinci bölümde çalışmanın sonuçları genel olarak tartışılmış ve gelecekte bu alanda yapılabilecek çalışmalara yönelik öngörüler verilmeye çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kanser ve Çoklu İlaç Dirençliliği

Kanser, mutasyona uğramış hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Dünya sağlık örgütünün 2014 verilerine göre kanser dünyada ikinci en önemli ölüm sebeplerinden olup, her yıl 8.2 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye’de her yıl 90.000’den fazla insan kanser nedeniyle ölmekte, ve her yıl yaklaşık 145.000-160.000 (toplam popülasyonun %0.2’si) yeni kanser vakası kaydedilmektedir. Ülkemizde, kadınlarda en sık rastlanan kanser türü, toplam kanser vakalarının %25’ini oluşturan meme kanseri iken, erkeklerde sigara tüketimine bağlı olarak solunum yolu kanserleri en sık rastlanan kanser türüdür. Çocuklarda ise kan kanseri (lenfoma ve myeloma) en sık görülen kanser türüdür.

Kanser tedavisinin başarısı büyük oranda erken tanı ve uygun tedavi yönteminin hastalığın erken safhalarında belirlenmesine bağlıdır. Metastaz ve çoklu ilaç dirençliliğinin (ÇİD) gelişimi, ölüm oranının artmasına neden olan en önemli iki sebeptir. Metastaz, kanserli hücrelerin buldukları doku dışına doğrudan veya kan/lenf damarlarıyla başka bölgelere sıçramalarına verilen isimdir. Metastatik gelişim kanser hücrelerinin birincil organdan endotelial-mezankimal değişim ile kana veya lenf dokusuna geçmesi ile başlar. Kanda dolaşan kanser hücreleri (Circulating Tumor Cells, CTCs) başka dokulara yerleşerek burada yeni tümörlerin oluşumuna neden olma potansiyeli taşırlar. Dolayısıyla, kanda CTC tespiti metastatik gelişimin takibi ve hastalığın tedavisinin doğru şekilde yönlendirilebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Sağkalım oranının artmasında ve tedavi sürecinin kılınmasında, CTC’nin erken tespiti oldukça önemlidir. Dolayısıyla, metastatik kanser hastalarında tedavinin etkinliğinin belirlenebilmesi açısından kantitatif ve gerçek zamanlı CTC tespitinin hastalık süresince rutin bir şekilde yapılması gerekmektedir. Ancak, kanda CTC oranının oldukça düşük olması nedeniyle (1-5 CTC/10⁹ hücre), CTC bir kanser biyo-markörü olarak kullanılamamaktadır. Metastazın gerçekleştiğini gösteren kritik CTC sayısı kanser türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin metastatik meme kanserinde ve prostat kanserinde 7.5 ml’de 5, metastatik kolon kanserinde ise 3’ten fazla CTC bulunması durumda hastanın yasama şansının azaldığına kanaat getirilir (Miller, 2010; Knoll, 2011). FDA tarafından anlamlı bir parametre olarak kabul görmüş olmasına rağmen, CTC sayısı, teknolojik kısıtlamalar nedeni ile klinik uygulamalarda metastatik biyo-işaret olarak henüz yaygın olarak kullanılamamaktadır.

Metastazın dışında, kanser özellikle tekrar ettiği durumlarda ölümcül sonuçlar doğurmaktadır. Kanserin tekrar etmesinin altında yatan en büyük neden, kanser hücrelerinin çoklu ilaç dirençliliği (ÇİD) geliştirmesidir. ÇİD kanser hücrelerinin farklı kimyasal yapı ve fonksiyondaki

kemoterapi ilaçlarına karşı çapraz direnç geliştirmesi olarak tanımlanır (Wu vd., 1987). Bu mekanizma hücre zarında bulunan ve ABC transport familyası proteinlerinden olan çeşitli taşıyıcı proteinlerin (P-glikoprotein, MRP1, BCRP gibi) aşırı ifadesi ile ilişkilendirilmektedir. Bu proteinler hücre içi ilaç konsantrasyonunu hızlı bir şekilde azaltarak, ilacın hücreye etki etmesini önlemektedirler. Bazı hastalarda ÇİD kemoterapi sonrası gelişirken (kazanılmış ilaç direnci), bazılarında kanserin başlangıcından itibaren, tedaviye başlanmadan önce (*de novo* ilaç direnci) var olabilir. Dolayısıyla ÇİD, sadece kanserin tekrar ettiği durumlarda değil, başlangıcından itibaren de gelişebilmektedir. Bu nedenle, ÇİD gelişiminin belirlenmesi için kemoterapi öncesi ve sırasında tarama yapılması doğru tedavi yönteminin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde ÇİD için hızlı bir teşhis yöntemi bulunmamaktadır. ÇİD genellikle hastaların ilaca tepki vermediği ve tümörün büyümeye devam ettiği gözlemlendiğinde tespit edilir. Bu durumda, modülatör terapisi uygulanarak dirençliliğe yol açan hücre zarı proteinlerinin inhibe edilmesi sağlanır. Ancak, bu tedavi sürecini uzatan ve sağ kalım şansını azaltan bir yöntemdir, çünkü dirençlilik bu süreç içinde artar. Dolayısıyla, ÇİD gelişiminin hastalığın başında ve tedavi süreci boyunca rutin olarak test edilmesi oldukça önemlidir. ÇİD'in erken tespiti tedavi süresini ve dolayısıyla tedavi masraflarını, kemoterapinin yan etkilerini azaltırken, tedavinin başarı şansını ciddi şekilde arttıran bir parametredir.

Klinikte ÇİD tespiti için kullanılmakta olan çeşitli ürünler bulunmaktadır. eFluor-Cell™ (ENZO Life Sciences, Farmingdale, New York, UK), Multi-Drug Resistance Assay Kit-Calcein AM (Cayman Chemical, Michigan, USA), Multi-Drug Resistance quantitation kit (Sigma- Aldrich, USA), MarkerGene™ Multidrug resistance Microtiterplate Assay Kit (Marker Gene Technologies Inc. St. Louis Missouri, USA), and Vybrant™ Multidrug Resistance Assay Kit (Molecular Probes®, Life Sciences, USA)) gibi ürünler floresan işaretleme, sitometrik sayım ve kantifikasyon yöntemlerini kullanmaktadırlar. Hücre içi floresan değeri, ABC transport proteinlerinin (MDR, BCRP ve MRP) aktivitesi ile ilişkilendirilerek, dirençlilik seviyesi belirlenmektedir. CTC sayımı için de benzer şekilde sürekli akış sitometresi prensibine dayalı çeşitli yüksek maliyetli yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. FACS (fluorescent activated cell sorting) ve MACS (magnetic activated cell sorting) olarak adlandırılan bu yöntemlerde hücrelerin floresan veya manyetik olarak işaretlenmesi gerekmektedir. Bu teknikler yüksek çıktılı (high throughput) tarama sağlasa da, hücrelerin canlı kalmaması, biyolojik işaretleme gerektirmeleri, taşınabilir olmamaları, ekipman maliyetleri ve uzman personel ihtiyacı nedeniyle kısıtlı kaynaklara sahip bölgelerde uygulanamamaktadır. Bu nedenle, düşük maliyetli, CTC tespiti için kullanımı kolay, taşınabilir, yüksek çıktılı ve güvenilir bir çip üstü laboratuvar (Lab-on-a-chip, LOC) sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

CTC tespitinde karşılaşılan en büyük zorluk milyarlarca kan hücresi içinden birkaç CTC'nin seçici olarak yakalanmasıdır. Ancak, CTC'ler onları diğer kan hücrelerden ayıran bazı biyolojik ve fiziksel farklılıklara sahiptir ve bu sayede ayırıştırma sağlanabilir. Örneğin, epitel doku kaynaklı CTC'lerin hücre zarında epitel hücre tutunma proteini (Epithelial Cell Adhesion Protein – EpCAM) bulunmaktadır. EpCAM epitel doku kökenli CTC'lerin algılanmasında biyo-ışaret (biomarker) olarak kullanılmaktadır. Ancak, epitel doku kaynaklı olmayan CTC'lerde (melanoma, beyin kanseri, sarkoma gibi) EpCAM bulunmadığından, CTC'lerin tespitinde tek başına kullanılamamaktadır. Ayrıca, metastaz oluşumunun ilk aşamasında gerçekleşen ve hücrelerin tümörden ayrılarak kan dolaşımına karışımını sağlayan epitel-mezenkimal dönüşüm (epithelial to mesenchymal transition - EMT) sırasında EpCAM ifadesi tamamen yok olabilmektedir. Bu nedenle CTC tespitinde sitokeratin (Cytokeratins (CK) 8, 18, 19) ifadesi, hücre çekirdeği varlığı ve CD45 (lökosit spesifik antijen) yokluğu gibi, CTC'leri kan hücrelerinden ayıran farklı işaretlere de bakılır [5]. Bu dört kriter (EpCAM(+), CK(+), CD45(-) ve hücre çekirdeği varlığı) mevcut teknoloji ile CTC tespiti için FDA tarafından onaylanan altın standartlar olarak kabul görmektedir. Bunların yanı sıra, hücre büyüklüğü, dielektrik/manyetik farklılıklar gibi CTC'leri kan hücrelerinden ayıran diğer özellikler herhangi bir antijenik işaretleme olmaksızın CTC ayırıştırmasında kullanılabilir.

Günümüzde FDA onaylı tek bir CTC algılama metodu mevcuttur. CellSearch (Veridex LLC, Huntingdon, PA, USA) olarak bilinen bu sistemde CTC'ler anti-EpCAM işaretleli manyetik parçacıklarla işaretlenerek immüno-manyetik olarak ayırıştırma sağlanır. Daha sonra hücreler immüno-floresan boyama ile sitokeratin ve CD45, floresan boyama ile hücre çekirdeği tespiti için boyanır. EpCAM(+), CK(+), CD45(-) ve hücre çekirdeği bulunan hücreler floresan mikroskop altında bir operatör tarafından gözle belirlenir ve sayılır (Miller ve Doyle, 2010). CellSearch çeşitli kanser türlerinden kaynaklanan metastazın tespiti için etkili bir metod olarak görülse de, operatörden kaynaklanan farklılıklar oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra, metod sadece EpCAM(+) hücrelerin tespitinde kullanılabilir çünkü ilk aşamadaki manyetik ayırıştırma yöntemi EpCAM varlığına bağlıdır. Ayrıca, metod çok fazla floresan boyama işlemi gerektirmekte, bu da maliyeti arttırmakta ve metodu pratiklikten uzaklaştırmaktadır. CellSearch ile ayırıştırılan hücreler canlılığını kaybettiğinden, kanser hücrelerinin ileri moleküler analizine olanak sağlamamaktadır. Bu nedenlerle, daha güvenilir ve hassas bir CTC ayırıştırma ve sayma yönteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda oldukça ilgi gören mikroakışkan platformlar düşük maliyetli, hızlı ve hassas CTC tespitinde kullanılabilecek platformlar olarak görülmektedir. 1990'lı yılların başlarında LOC sistemlerinin (Manz vd, 1990) geliştirilmesini takiben hızlı, hassas ve güvenilir moleküler teşhis ve tedaviye yönelik birçok mikroakışkan LOC platformları geliştirilmeye çalışılmıştır.

Mikro-boyutlu klinik/laboratuvar analiz cihazları düşük maliyetli olmaları, eğitilmiş insan gücüne gereksinimi azaltmaları, ve analiz hızı ve hassasiyetini arttırmaları nedeni ile makro örneklerine göre ciddi avantajlar sağlamaktadır.

CTC yakalamaya yönelik son on yılda geliştirilen mikroakışkan platformlar temel olarak antikor-antijen ilişkisine bağlı afinite bazlı sistemler ve hücre büyüklüğüne bağlı filtrasyon sistemleri veya her ikisini birlikte kullanan sistemlerdir. FACS, manyetik, dielektroforetik, elektroforetik, akustik veya optik gibi harici kuvvetler uygulanarak yapılan ayrıştırılmalar da literatürde gösterilmiştir. Tüm kriterleri karşılamada yetersiz kalsalar da bu metotlardan bazıları ticarileşme aşamasına getirilebilmiş ancak henüz hiçbiri FDA onayı almamıştır. Bu çalışmalardan başarıya ulaşan birkaçından burada bahsedilecektir.

Filtrasyon sistemleri CTC'lerin (16-20 μm) normal kan hücrelerinden (RBC~8 μm , WBC ~10-15 μm) büyük olmasını kullanarak bir ayrıştırma sağlamaktadır. Örneğin, Harvard-MIT HST'den Prof. Toner'in grubu mikroakışkan sistem içinde EpCAM kaplı mikro çıkıntılar kullanarak kanser hücrelerinin ayrıştırılmasını sağlayan PDMS (poly-dimethyl-silixane) bazlı bir sistem geliştirmiştir (Nagrath vd., 2011). Bu sistemde, mikro çıkıntılar büyüklüğe bağlı filtrasyon ve yüzey alanının artmasını sağlarken, yüzeylerine immobilize edilen EpCAM antikorları sayesinde de kanser hücrelerinin yüzeye tutundurulması sağlanmaktadır. Aynı grup kanal içi karıştırma ve antijen-antikor ilişkisinin daha etkin olabilmesi için balık sırtı (herringbone) kanal yapısı kullanmışlardır (Stotta vd., 2010). Başka bir çalışmada, mikro gözenekli parilen membran filtresi kullanılarak CTC'lerin büyüklüğe bağlı ayrıştırılması sağlanmıştır (Lin vd., 2010). On-Q-ity (Waltham-Massachusetts) şirketi ise CTC'lerin büyüklük ve EpCAM-afinite bazlı ayrıştırmasını sağlayan mikroakışkan bir chip geliştirmişlerdir (OnQChip). Mikroakışkan kanal içine belli bir geometrik düzen içinde yerleştirilen EpCAM kaplı mikro-çıkıntılar içeren bu sistem sayesinde Veridex CellSearch sisteminden daha etkin bir CTC ayrıştırma çipi geliştirilebilmiştir (Smirnov vd., 2012). EpCAM (-) CTC'ler için EMT belirteçleri kullanılmış ve bu sayede %70 ayrıştırma sağlanmıştır. EMT belirteçlerinin yokluğunda CTC yakalama oranı %5 olarak belirlenmiştir (Waltham, 2012). Benzer bir strateji Biocept firmasının geliştirdiği OncoCEE-BRTM platformunda da kullanılmıştır. Antikor ile kaplanan mikro-çıkıntılar içeren mikroakışkan kanal ile 8 mL kandan CTC yakalama sağlanmıştır. Sistem ayrıca CTC'lerin sayılabilmesini ve HER2/neu antijenik belirtecin (meme kanseri belirteci) varlığının FISH (fluorescence in situ hybridization) yöntemi ile tespit edilebilmesini sağlamaktadır. Farklı yüzey antijenlerine karşı geliştirilen antikorlardan oluşan bir kokteyl kullanılarak EpCAM(-) ve CK(-) CTC'lerin tespit edilebilmesi sağlanmıştır (Mikolajczyk vd., 2011). Bu teknolojilerin bir kısmı var olan CellSearch

sisteminden daha iyi bir ayrıştırma sağlamakta olsa da, floresan boyama, optik görüntüleme ve yetişmiş teknik personel ihtiyaçlarını ortadan kaldıramamışlardır.

Dielektrik, akustik ve manyetik gibi aktif kuvvetler kullanarak, işaretleme olmaksızın CTC ayrıştırması sağlayabilen sistemler de geliştirilmiştir. Kanseri hücrelerinin dielektrik özelliklerinin normal hücrelerden farklı olması özelliğinden faydalanılarak CTC'lerin dielektroforez (DEF) (dielectrophoresis, DEP) yöntemi ile ayrıştırılması, zenginleştirilmesi veya yakalanması yönünde çeşitli sistemler önerilmiştir. CTC'ler gerek büyüklük gerekse dielektrik farklılıkları nedeniyle normal kan hücrelerinden DEF kullanılarak yeterince seçici ve etkin bir şekilde ayrılabilirler (Shim vd., 2013). Bu yöntemden faydalanarak ApoCell Inc. (Houston) firması tarafından sürekli akış altında CTC ayrıştırması sağlayan ApoStream cihazı geliştirilmiştir. Konvansiyonel DEP-Field Flow Fractionation (DEP-FFF) sisteminin bir versiyonu olan bu metod ile hücreler sürekli akış altında frekansa bağlı dielektrik özelliklerinden faydalanılarak ayrıştırılabilmektedir. Sistem birden fazla kanser tipi için kullanılabilmiş ve ayrıştırılan hücreler canlı kaldıklarından ileri moleküler analizler yapılabilmektedir. Bu sistem ile prostat, meme, kolon ve karaciğer kanseri hastalarından alınan örneklerden kanser hücrelerinin %68 geri alım ve %95 saflıkla ayrıştırılabildiği gösterilmiştir (Gupta vd., 2012). Ancak, örnek ön işlem süreçleri (eritrositlerin ayrıştırılması, hücrelerin DEP tamponuna aktarılması gibi) ve hücrelerin sayımı için yetişmiş teknik eleman ihtiyacı, sistemin hasta-başı analiz sistemi olarak uygulamasını sınırlamaktadır. Hücreleri akustik veya manyetik kuvvetlerle ayırmaya çalışan diğer sistemlerde de benzer problemler yaşanmaktadır.

Bahsi geçen mikroakışkan platformlar CTC'lerin belli ölçülerde ayrıştırılabilmesini sağlamasına rağmen, hasta başı analiz (POC) sistemi olarak uygulamalarına geçişte çeşitli zorluklar içermektedir. Örneğin, kanın eritrositlerden ayrıştırılması ve hücrelerin uygun tampon çözelti içine aktarılması gerekir. Eritrositlerin ayrıştırılması santrifüj veya eritrositlerin tahribi ile gerçekleştirilir ki bu yöntemler diğer hücrelerde deformasyona sebep olabilir veya sağkalım şansını azaltabilir. İdeal bir CTC ayrıştırma sisteminin işlem görmemiş tüm kan örneği ile çalışabilir olması, kullanımının kolay olması ve istenilen çıktıyı direkt olarak sağlaması (kandaki toplam CTC sayısı, gibi) beklenir. Ayrıca, ayrıştırılan hücrelerden genetik veya biyokimyasal analizler yapılabilmesi için hücrelerin sistemden canlı olarak çıkması gerekir. Yakın zamanda ABD'de geliştirilen bir CTC izolasyon cihazı bu anlamda ümit vaatmektedir (Dharmasiri vd., 2013). Bu sistemde CTC zenginleştirme için EpCAM ile kaplanmış mikro çıkıntılar kullanılmıştır. Kanseri hücreleri bu yapılar üzerine tutunarak yakalanırken, kan hücreleri mikroakışkan kanal içinde akışla birlikte atılmaktadır. Daha sonra enzimatik yöntemlerle antikorlardan ayrılan CTC'ler mikrokanal içine yerleştirilen Pt

elektrotlar sayesinde iletkenlik değişimine bağlı olarak sayılmaktadır. Sayılan hücreler elektroforetik olarak sıvıdan ayrıştırılır, bir rezervuarda toplanır ve ileri moleküler analizler için kullanılabilir. Bu sistemle 10 ml kanın 40 dakikada işlenebildiği ve %96 ± %4 ayrıştırma verimi ile çalıştığı gösterilmiştir. Sistem, BioFluidica Technologies (Chapel Hill, North Carolina) tarafından ticarileştirilme aşamasındadır. Polimer bazlı bir malzeme kullanılarak geliştirilen bu sistem basit olması, çip-üstü sayım yapabilmesi ve yüksek çıktılı olması açısından oldukça ümit vericidir ancak seri üretime uygun değildir ve sadece EpCAM(+) hücreleri tespit edebilmektedir.

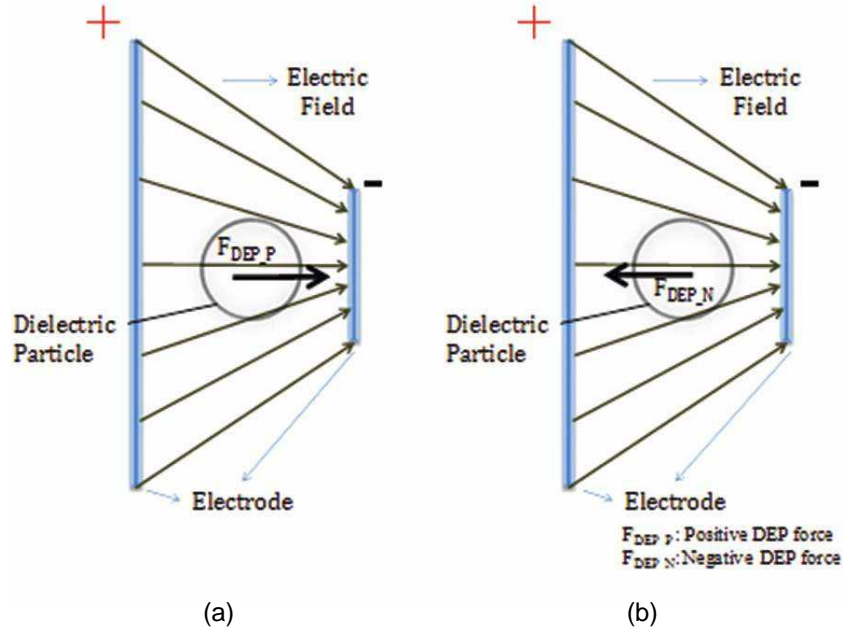
Bu projede, kandan CTC ayırımını herhangi bir moleküler işaretlemeye gerek duymaksızın sadece elektriksel yöntemlerle yapabilecek, ve CTC'lerin ÇİD geliştirmiş tiplerini aynı platform üzerinde dirençsiz CTC'lerden ayırabilecek bir MEMS-tabanlı LOC sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için kanser hücrelerinin dielektrik özelliklerindeki farklılıklardan faydalanan DEP yöntemi kullanılmıştır. İki aşamalı bu DEP çipinde, birinci aşamada kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılması, ikinci aşamada ise, ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerinin dirençsiz kanser hücrelerinden ayrıştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, proje süresince hücrelerin dielektrik özelliklerini hassas bir şekilde belirleyebilecek MEMS-tabanlı elektrorotasyon çipleri geliştirilmiş, farklı hücre tiplerinin dielektrik özellikleri belirlenmiş ve literatüre bu anlamda ciddi bir katkı sağlanmıştır.

2.2 Dielektroforez

Dielektroforez, boyutları ya da dielektrik özellikleri farklı parçacıkları ayrıştırmakta kullanılan temel bir tekniktir. Bu teknikte homojen olmayan elektrik alan uygulanan parçacıklar boyutlarına ya da dielektrik özelliklerine bağlı olarak farklı büyüklükte dielektroforetik kuvvetlere maruz kalırlar. Bu kuvvet aşağıdaki gibi formüle edilebilir.

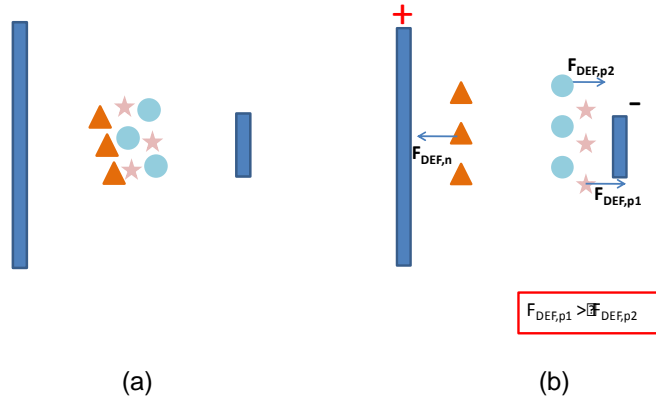
$$F_{DEF} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m r^3 Re(f_{cm}) \nabla E_{rms}^2 \quad (1)$$

Eşitlik 1'de görülen ϵ_0 ve ϵ_m sırasıyla havanın ve parçacıkların içinde bulunduğu akışkanın elektriksel geçirgenliğini (permittivity), r parçacığın yarıçapını, ∇E_{rms}^2 parçacığın maruz kaldığı homojen olmayan elektrik alanının değişimini ifade etmektedir. $Re(f_{cm})$ ifadesi ise parçacık ve içinde bulunduğu akışkanın dielektrik özelliklerine göre belirlenen ve Clausius Mossotti (CM) faktörü diye adlandırılan bir parametrenin reel sayı kısmını gösterir. Bu faktörün reel sayı kısmının değeri -0.5 ile 1 arasında değişmektedir. İfade içerisindeki diğer tüm değerler pozitif büyüklükler olduğundan, dielektroforetik kuvvetin yönünü belirleyen $Re(f_{cm})$ ifadesinin işaretidir. Bir parçacık dielektrik özelliklerine göre, dielektroforetik kuvvetin güçlü olduğu (pozitif dielektroforez- pDEF) ya da zayıf olduğu tarafa doğru yönelebilir (negatif dielektroforez- nDEF) (Şekil 1 a,b).



Şekil 1. Homojen olmayan elektrik alan etkisindeki bir dielektrik parçacık üzerinde oluşan dielektroforetik kuvvet. (a) pozitif DEF, (b) negatif DEF.

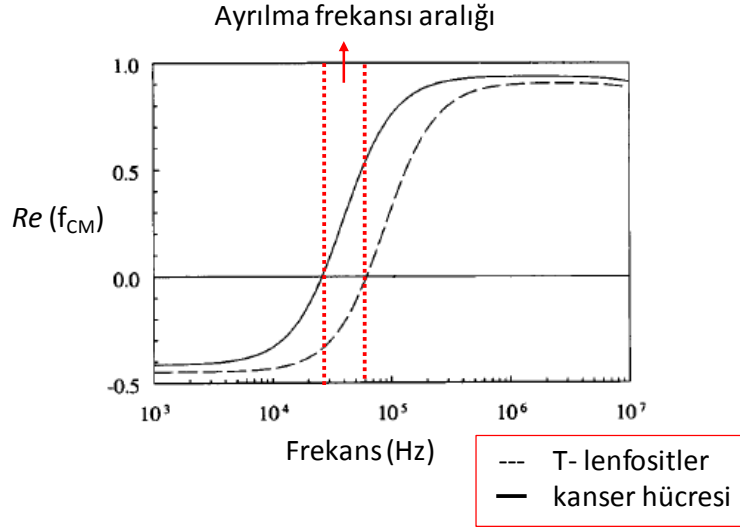
Yukarıdaki açıklamalara ve dielektroforetik kuvvet ifadesine (Eşitlik 1) göre, *boyutları ve/veya dielektrik özellikleri farklı* olan parçacıklar DEF ile birbirinden ayrılabilir. Boyutları farklı parçacıkların ayrılmasında DEF kuvvetinin büyüklük farkı kullanılırken, boyutları aynı parçacıklar ayrılırken DEF kuvvetinin büyüklük ve/veya yön farkı kullanılır (Şekil 2 a,b).



Şekil 2. Farklı boyut ve/veya dielektrik özelliklere sahip parçacıkların DEF ile ayrıştırılması. (a) elektrik alan uygulanmadığı durumda parçacıklar üzerinde dielektroforetik kuvvet oluşmamaktadır. (b) elektrik alan altında parçacıkların maruz kaldığı kuvvetlerin yönü (üçgen ve yuvarlak parçacıklar) ya da şiddeti (yuvarlak ve yıldız parçacıklar) farklı olabilir.

Eğer boyutları aynı, dielektrik özellikleri farklı iki parçacık birbirinden ayrılacaksa öncelikle frekans spektrumunda CM faktörü değişimleri incelenmeli ardından ayrılmanın gerçekleşeceği frekans aralığı belirlenerek dielektroforez uygulanmalıdır. Örnek olarak Şekil 3'te iki farklı hücrenin CM faktörü dağılımı ile dielektroforez kullanılarak ayrılabilirleri

frekans aralığı görülmektedir. Bu aralığın dışında CM faktörünün büyüklüğünün farklı olduğu yerler bulunmaktadır. Teorik olarak bu alanlarda da ayırıştırma yapmak mümkündür. Ancak bu fark çok az olduğundan aynı büyüklükteki parçacıkları hız farkından yararlanılarak ayırıştırma oldukça zordur. Bu sebeple bu tip parçacıklar ayırıştırılırken CM faktörün zıt işaretlere sahip olduğu frekans aralıklarının kullanımı tercih edilir.

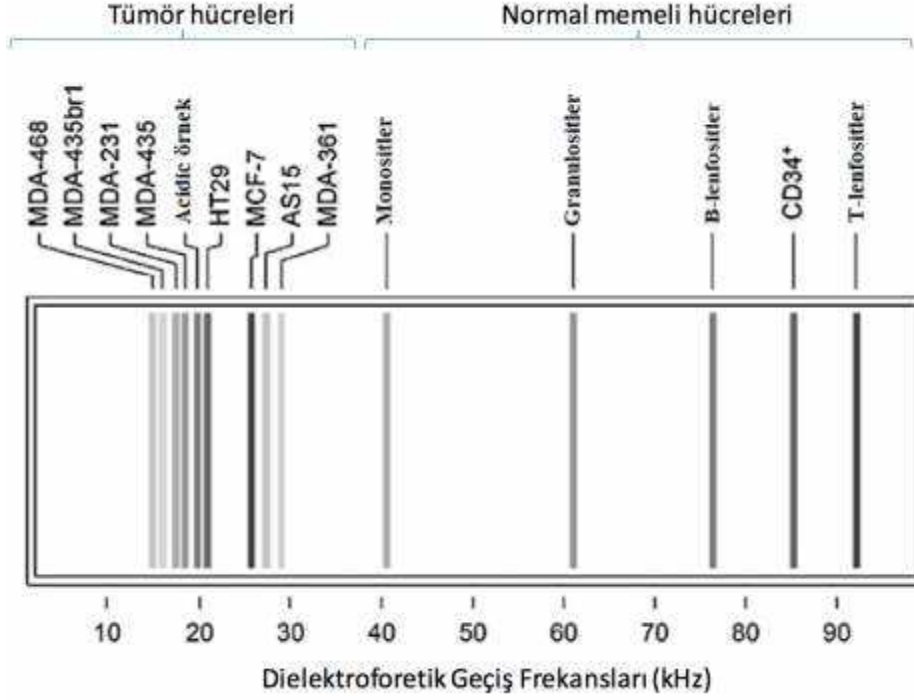


Şekil 3. İki farklı hücrenin CM faktör dağılımı ve DEF kullanılarak ayrılabilirleri frekans aralığı.

Parçacıkların ayırıştırılabilmesi için gerekli elektrik alan değişiminin (∇E_{rms}^2) çok yüksek değerlerde ($>10^{12} \text{ kg}^2\text{m/s}^6\text{A}^2$) olması, bunun için de potansiyel uygulanacak elektrotlar arasındaki uzaklıkların mikrometre seviyesine kadar inmesi gerekmektedir. Bu sebeple teorisi 1950'lerde geliştirilmiş olan DEF sistemlerinin gerçekleştirilmesi ancak MEMS teknolojisindeki gelişmeler sayesinde yakın zamanda mümkün olabilmektedir (Pethig, 2010).

DEF prensibi, hücrelerin de farklı boyut ve dielektrik özelliklerde olabilmesi nedeniyle hücre ayırıştırma gerektiren biyomedikal uygulamalarda da kullanılabilir (Pethig vd., 2010; Demircan vd., 2011; Jones, 1995). Bu amaçla yapılan çalışmalarda farklı tip hücreler dielektrik özelliklerine bağlı olarak modellenmiştir. Hücreler küresel ve homojen kabul edilerek iki temel modelleme tipi oluşturulmuştur: tek tabaka modellemesi (single shell modelling) ve çoklu tabaka modellemesi (multiple shell modelling) (Shim vd., 2013). Bu modeller kullanılarak pek çok doku, bakteri ve tümör hücresinin CM faktör-frekans analizleri yapılmıştır. Bu analizlerin yardımıyla DEF prensibi, biyolojik ve yapay parçacıklarla denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Gascoyne vd., 1992; Wang vd., 1993; Markx vd., 1994, 2001; Chui ve Holmes, 2001; Gascoyne ve Vykoukal, 2004; Pethig, 2010). Şekil 4'te 9 farklı tümör hücresi ve bazı memeli hücrelerinin CM faktör-frekans analizleri sonucu belirlenmiş $Re(f_{cm})$ değerlerini sıfıra eşitleyen frekans (geçiş frekansı) değerleri verilmektedir. Geçiş frekansı

farklı olan hücrelerin zıt işaretli CM faktöre sahip olduğu bir ayrılma frekansı aralığı mutlaka olacağından DEF ile ayrılmaları mümkündür. Şekil 3 incelendiğinde, örneklerin bulunduğu akışkana 50 kHz frekansında bir voltaj uygulandığında MDA-468 insan meme kanseri hücresi ve T-lenfositlerin zıt işaretli CM faktöre sahip oldukları görülmektedir. Bu iki tip hücreye ait ayrılma frekansı aralığı ise 15 ile 75 kHz arasındır (Gascoyne ve Vykoukal, 2004).

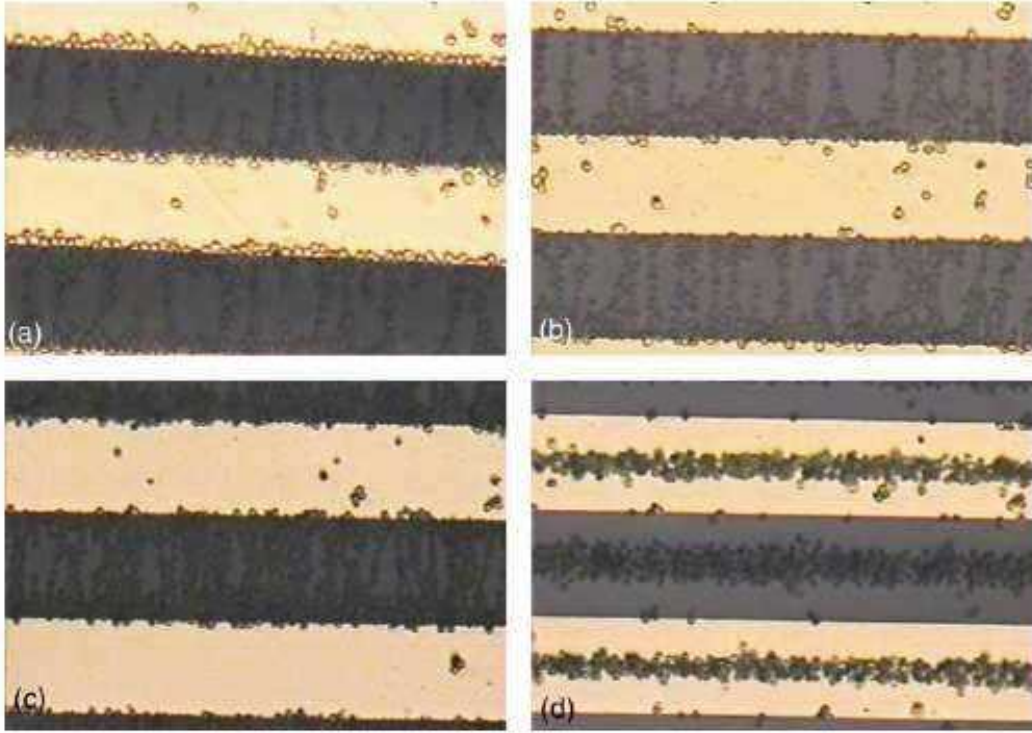


Şekil 4. Farklı tümör hücresi ve bazı memeli hücrelerinin CM faktör-frekans analizleri sonucu ile belirlenmiş $Re(f_{cm})$ değerlerini sıfırlayan frekans (geçiş frekansı) değerleri (Gascoyne ve Vykoukal, 2004).

Kanserin erken teşhisi için analiz sonuçların hızlı bir biçimde elde edilmesi etkili tedavide büyük öneme sahiptir. Fakat bu hastalığı erken safhada tespit etmek, hücre sayılarının içinde buldukları dokuya göre azlığı sebebiyle oldukça hassas sistemlerle mümkün olabilmektedir. Var olan makro sistemlerle bu hassasiyete erişme başarısı düşüktür. DEF sistemleri boyutları farklı hücreleri ayırmada olumlu sonuçlar vermektedir (Kang vd., 2006, 2007). Tümör hücreleri ile normal doku hücrelerinin boyut farklılıkları göz önünde bulundurulduğunda, DEF ayırıştırma sistemleri ile kanser hastalığı teşhisi yapılabilir (Huang vd., 1997; Wang vd., 2000; Kang vd., 2006; Broche vd., 2007).

DEF prensibi boyutları farklı hücreleri ayırmada kullanıldığı gibi boyutları aynı, dielektrik özellikleri farklı hücrelerin ayırıştırılmasında teorik olarak kullanılabilir (Huang vd., 1997; Marx vd., 1997; Gascoyne ve Vykoukal, 2004; Pethig, 2010; Yang vd., 2010). Yapay parçacıklarla hücrelerin dielektrik özelliklerinin taklit edilmesi mümkün olmadığından bu ayırıştırma çeşidinde gerçek hücreler kullanılmak zorundadır. Dielektrik özellik farkı

kullanılarak ayrıştırma yapabilmek adına öncelikle sadece tek tip hücrenin bulunduğu akışkan ortamdaki hücrelerin canlılık durumu tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu konuda olumlu sonuçlar alınmıştır (Markx vd, 1994; Huang vd., 1992; Hakoda vd., 2010; Doh ve Cho, 2005). Şekil 5'te canlı ve cansız maya hücrelerinin aynı frekanslardaki elektrik potansiyeline verdikleri tepkiler görülmektedir. Şekil 5 incelendiğinde 10 kHz'de canlı hücrelerin elektrot kenarlarında toplandığı ama ölü hücrelerin elektrot üzerine yayıldığı görülebilir.



Şekil 5. Canlı ve ölü maya hücrelerinin 8 V_{pp} sinüzoidal voltaj altındaki DEF tepkileri. Parlak renkteki bölgeler elektrotları, koyu renktekiler camı göstermektedir. (a) 10 kHz'de canlı maya hücreleri , (b) 5 MHz'de canlı maya hücreleri, (c) 10 KHz'de ölü maya hücreleri, (d) 5 MHz'de ölü maya hücreleri (Doh ve Cho, 2005).

Bu sonuçlardan yola çıkılarak, DEF yönteminin boyutları birbirine çok yakın, dielektrik özellikleri farklı olan ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerinin hassas kanser hücrelerinden ayrıştırılmasında da kullanılabileceği öne sürülebilir. Dirençli ve hassas kanser hücreleri arasındaki dielektriksel farklılığın, dirençli hücrelerde aşırı derecede ifade edilen ve dirençliliğe neden olan P-glikoprotein (P-gp) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, P-gp proteinin hücre zarına bağlı klor (Cl-) pompalarını modüle ettiğini (Assef ve Kotsias, 2002; Assef vd., 2005), dolayısıyla, dirençli hücrelerde hücre zarı ve sitoplazmik iletkenliğin değiştiğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada yapısı ve ebatları neredeyse aynı olan bir çeşit kanser hücresi ve onun direnç geliştirmiş tipi arasında sitoplazmik iletkenlikleri açısından yaklaşık olarak 2 kat fark tespit etmişlerdir (Duncan vd., 2008).

2.3 Elektrorotasyon

Dielektroforetik hücre ayırıştırma sistemlerinin tasarımı aşamasında hücre modellemelerinin yapılması, bunun için de, hücre zarı ve sitoplazmanın dielektrik özelliklerinin bilinmesi gerekir. Dielektrik özelliklerin belirlenmesinde elektrorotasyon (ER), DEF, ve impedans akış sitometrisi (IFC) gibi çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında ER, hücre zarı ve sitoplazmik dielektrik karakterizasyonu en doğru ve pratik şekilde yapan metot olarak öne çıkmaktadır. Bu metot, homojen bir şekilde dönen elektrik alanının varlığında üzerlerinde indüklenen dipol moment sebebiyle parçacıkların dönmesi ilkesine dayanır. Parçacıkların dönüş hızı, uygulanan elektrik alan kuvveti, frekansı, parçacığın dielektrik özelliği ve parçacıkların içinde bulunduğu çözeltinin iletkenliğine ve akışkanlığına bağlı olarak değişir. ER tekniği ile hücre zarı kapasitansı (C_m), total efektif hücre zarı öz iletkenliği (G_m^*) ve hücre içi iletkenliği (σ_i) değerleri belirlenebilmektedir. Bu metot uygulanırken DEF prensibinin tersine $Re(f_{CM})$ değil, $Im(f_{CM})$ yani imgesel f_{CM} kullanılır. Eğer bu değer sıfırdan büyükse, uygulanan elektrik alan, periyodunun yarısından az bir süre sonra parçacık içinde dipol moment oluşmasını sağlar ve parçacık üzerinde elektrik alan yönünün tersi yönde bir tork oluşur. Bu değer sıfırdan küçük olduğunda ise, uygulanan elektrik alan, periyodunun yarısından fazla bir süre sonra parçacık içinde dipol moment oluşmasını sağlar ve parçacık üzerinde elektrik alan dönüş yönünde bir tork oluşturur (Jones, 1995; Griffith ve Cooper, 1998) (23, 30). Bu torkun değeri aşağıdaki gibi ifade edilebilir (Arnold ve Zimmermann, 1982).

$$T = -4\pi\epsilon_{med}R^3Im(f_{CM})E^2 \quad (2)$$

Bu formülde T dögüsel torku, ϵ_{med} akışkanın elektrik alan geçirgenliğini, R parçacık yarıçapını, $Im(f_{CM})$ Clausius Massotti (CM) faktörün imgesel kısmını, E ise elektrik alan kuvvetini ifade etmektedir. CM faktörü aşağıdaki şekilde formüle edilir:

$$F_{CM} = Re(F_{CM}) + jIm(F_{CM}) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_{med}^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_{med}^*} \quad (3)$$

Burada $j = \sqrt{-1}$, ϵ_p^* ve ϵ_{med}^* sırasıyla parçacık ve akışkanın kompleks elektriksel geçirgenliğini ifade eder. Kompleks elektriksel geçirgenlik aşağıdaki şekilde formüle edilir:

$$\epsilon_n^* = \epsilon_n - j\frac{\sigma_n}{\omega} \quad (4)$$

Burada n parçacık (p) veya akışkanı (med), σ iletkenliği, ω ise uygulanan elektrik sinyalin açısal frekansını ifade etmektedir.

Yarı çapı R ve hücre zarı kalınlığı δ olan bir biyolojik hücrenin tek tabakalı modellenmesinde, ε_p^* kompleks hücre elektriksel geçirgenliğine ($\tilde{\varepsilon}_2^*$) dönüşür ve aşağıdaki formülle ifade edilir (Jones, 1995).

$$\tilde{\varepsilon}_2^* = \tilde{\varepsilon}_2 + j\tilde{\sigma}_2 = \varepsilon_m^* \left[\frac{(R/(R-\delta))^3 + 2(\varepsilon_i^* - \varepsilon_m^*)/(\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_m^*)}{(R/(R-\delta))^3 - (\varepsilon_i^* - \varepsilon_m^*)/(\varepsilon_i^* + 2\varepsilon_m^*)} \right] \quad (5)$$

Burada ε_m^* kompleks hücre zarı geçirgenliğini ve ε_i^* kompleks hücre içi geçirgenliğini ifade eder. Ancak tek tabakalı hücre modellerinde hücre içi (sitoplazma, çekirdek ve diğer organeller) tek bir tabaka olarak modellenir. Parçacığın maksimum rotasyon frekansı (f_{pk}), $\frac{dlm(F_{CM})}{dw} = 0$ kabul edilerek aşağıdaki şekilde hesaplanabilir.

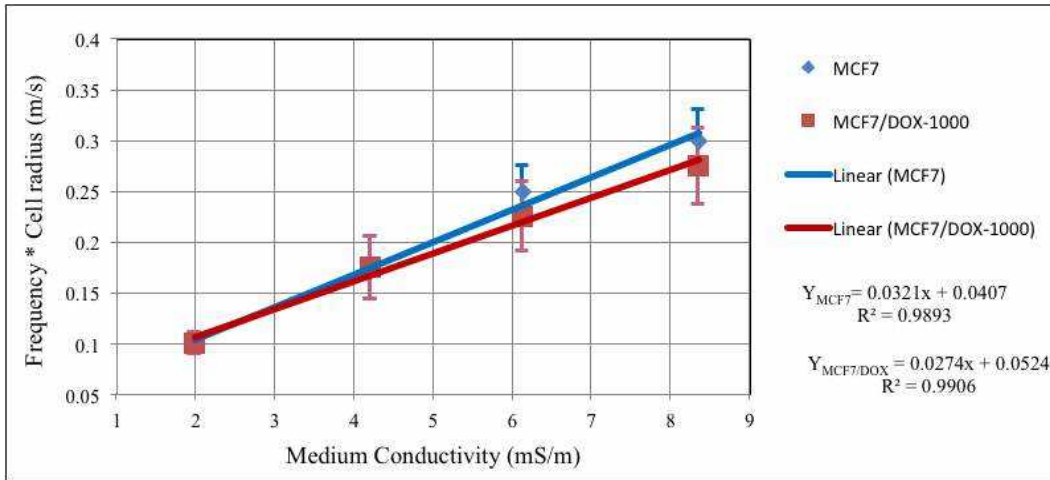
$$w_{pk} = 2\pi f_{pk} = \frac{\tilde{\sigma}_2 + 2\sigma_{med}}{\tilde{\varepsilon}_2 + 2\varepsilon_{med}} \quad (6)$$

Düşük frekans (DC-limit) yaklaşımları kullanılarak, eşitlik 6 aşağıdaki şekilde basitleştirilebilir (Arnold ve Zimmermann, 1982; Pethig vd, 2005; Lei vd, 2011).

$$Rf_{PK} = \frac{\sigma_{med}}{\pi C_m} + \frac{G_m^* R}{2\pi C_m} \quad (7)$$

Burada C_m hücre zarı kapasitansını ve G_m^* total efektif hücre zarı iletkenliğini ifade eder. Eşitlik 6 maksimum rotasyon frekansı ve hücre yarı çapı ile akışkan iletkenliği (σ_{med}) arasında, Şekil 6'da örneklendirildiği gibi, lineer bir bağıntı sunar. Rf_{PK} ve σ_{med} grafiği $y = mx + c$ gibi lineer olmalıdır. Dolayısıyla;

$$m = \frac{1}{\pi C_m} \quad c = \frac{R}{2\pi C_m} \left(\frac{2K_{ms}}{r^2} + G_m \right) \quad (8)$$



Şekil 6. Maksimum rotasyon frekansının akışkan iletkenliğine bağlı değişimini gösteren lineer bağıntı grafiği. Farklı iletkenlikteki akışkanlar içinde yapılan ER testleri sonucu elde edilen bu bağıntı ile hücre zarı kapasitansını ve total efektif hücre zarı iletkenliği hesaplanabilir.

Birçok memeli hücresi için R değeri birkaç μm , δ ise 8-10 nm aralığındadır. Ayrıca, DC limit yaklaşımları kullanılarak, maksimum rotasyon frekansının 1 MHz'in altında, akışkan iletkenliğinin de 100 mS/m'nin altında tutulması ile, eşitlik 5 aşağıdaki gibi sadeleştirilebilir (Lei vd, 2011).

$$\frac{\tilde{\varepsilon}_2}{\varepsilon_0} = \frac{\frac{\sigma_i^2}{w^2 \varepsilon_0^2} \left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_0}\right) \left(\frac{\delta}{R}\right)}{\left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_0}\right)^2 + \frac{\sigma_i^2}{w^2 \varepsilon_0^2} \left(\frac{\delta}{R}\right)^2} \quad (9a)$$

ve

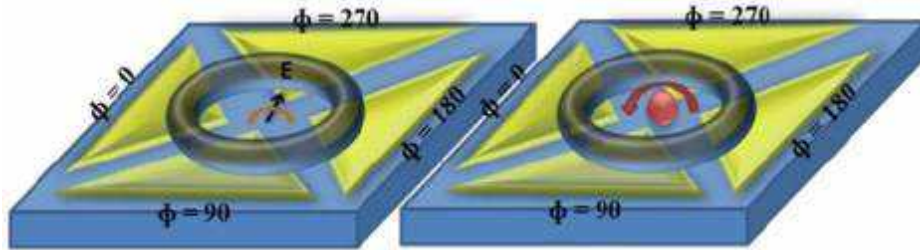
$$\tilde{\sigma}_2 = \frac{\frac{\sigma_m \sigma_i^2}{w^2 \varepsilon_0^2} \left(\frac{\delta}{R}\right)}{\left(\frac{\varepsilon_m}{\varepsilon_0}\right)^2 + \frac{\sigma_i^2}{w^2 \varepsilon_0^2} \left(\frac{\delta}{R}\right)^2} \quad (9b)$$

Eşitlik 9a ve 9b eşitlik 5'e yerleştirildiğinde, eşitlik 10 elde edilir.

$$\begin{aligned} \sigma_i^2 \left[\frac{C_m \delta^2}{\omega_{pk} \varepsilon_0^2 R} + \frac{2\varepsilon_1}{\omega_{pk} \varepsilon_0^2} \left(\frac{\delta}{R}\right)^2 - \frac{G_m \delta^2}{\omega_{pk}^2 \varepsilon_0^2 R} - \frac{2\sigma_{med}}{\omega_{pk}^2 \varepsilon_0^2} \left(\frac{\delta}{R}\right)^2 \right] - \sigma_i \left[\left(\frac{C_m \delta}{\varepsilon_0}\right)^2 \right] \\ = \frac{2\sigma_1 C_m^2 \delta^2}{\varepsilon_0^2} - 2\varepsilon_1 \omega_{pk} \frac{C_m^2 \delta^2}{\varepsilon_0^2} \end{aligned} \quad (10)$$

C_m ve G_m değerleri lineer grafiğin eğim ve kesişim noktasından belirlenir. ω_{pk} ve σ_{med} elektrorotasyon deneyleri sonucunda elde edilir. Dolayısıyla, hücre içi öziletkenlik (σ_i) değerleri eşitlik 10'dan hesaplanabilir.

Elektrorotasyon metodunun uygulanabilmesi için birçok çalışma yapılmış ve birçok elektrot konfigürasyonu kullanılmıştır. En etkin ve yaygın konfigürasyon "quadruple" elektrot yapısıdır (Şekil 7). Bu yapıda, elektrik alan sinyali elektrotlara 90 derece faz farkı ile uygulanır ve elektrotlar arasındaki bölgede döngüsel elektrik alan kuvveti oluşturulur.



Şekil 7. Elektrorotasyon testlerinde kullanılan üçgen, dörtlü elektrot yapısı ve sinüs voltaj uygulandığında oluşan döngüsel elektrik alan.

ER biyolojik hücrelerin dielektrik karakterizasyonunda başarı ile uygulanan bir metottür. Bu güne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda eritrositlerin (Gims vd., 1996, Georgieva vd., 1998), lökositlerin (Xun vd., 1990; Griffith vd., 1998; Yang vd., 1999; Han vd., 2009), fibroblastların

(Berardi vd., 2009), çeşitli kanser hücrelerinin (Becker vd., 1995; Christofanilli vd., 1995; Labeed vd., 2003) ve bakterilerin (Hölzel, 1999) dielektrik karakterizasyonları ER ile gerçekleştirilmiştir.

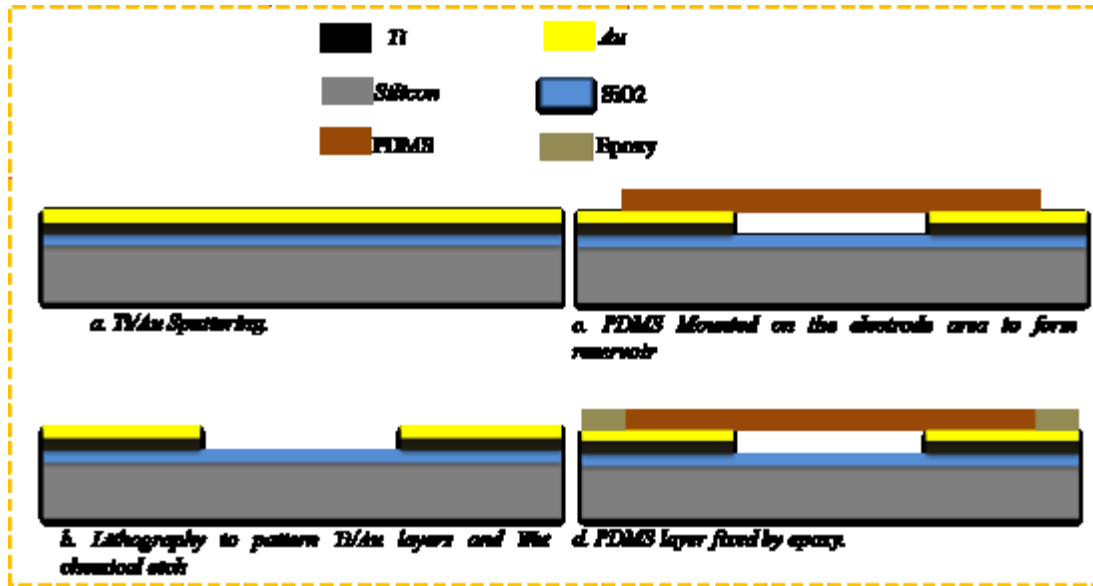
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Elektrorotasyon ile Dielektrik Karakterizasyonlar

Kanser hücrelerinin dielektrik özelliklerinin belirlenmesi için elektrorotasyon (ER) yöntemi kullanılmıştır. Proje süresince düzlemsel (iki boyutlu (2D)) ve üç boyutlu (3D), dörtlü (quadropol) elektrot yapılarına sahip farklı ER çipleri tasarlanmıştır. Bu çiplerin tasarım ve simülasyonlarına yönelik çalışmalar aşağıda özetlenmektedir.

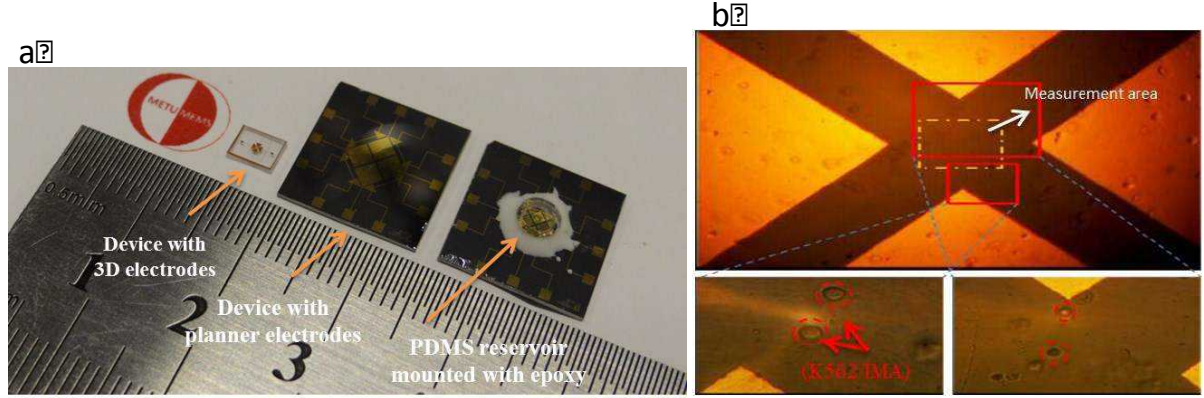
3.1.1 Birinci Nesil ER Çiplerinin Tasarım ve Üretimleri

Birinci nesil ER çiplerinin üretim şeması ve üretilen çipler sırasıyla Şekil 8 ve Şekil 9'da verilmektedir. Bu çipte silisyum pul üzerine işlenmiş iki boyutlu düzlemsel Au elektrotlar kullanılmıştır. Üretim tek bir maske kullanılarak silisyum pul üzerine Ti/Au (200/400 nm) şekillendirme işlemi ile gerçekleştirilmiştir. ER ölçümlerinin yapılacağı, elektrotlar arasındaki alana kuyucuk oluşturacak şekilde polydimethylsiloxane (PDMS) port yerleştirilmiş ve epoxy ile çip üzerine yapıştırılmıştır.



Şekil 8. Birinci nesil ER çipi üretim şeması.

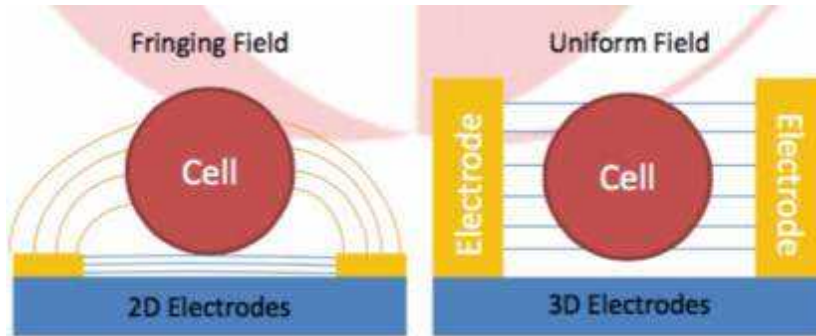
Üretilen çiplerle kanser hücrelerinin ER testleri yapılmış, ancak tekrar edilebilir sonuçlar elde edilememiştir. Bunun nedeni, elektrot yüksekliğinin (400 nm) hücre çapına göre (~12 µm) çok düşük kalması, dolayısıyla, hücrelerin dönüşüne yol açan elektrik alanının hücre çapı boyunca homojen dağılmamasından kaynaklanmaktadır. Hücreler, elektrotlar arasında oluşan *fringing field* nedeniyle dönmekte, bu da test sonuçlarının farklılık göstermesine yol açmaktadır.



Şekil 9. Birinci ve ikinci nesil ER çipleri (a), K562/IMA hücreleri ile yapılan testler (b).

3.1.2 İkinci Nesil ER Çiplerinin Tasarım ve Üretimleri

Birinci nesil ER çiplerinde karşılaşılan problemleri aşmak için, hücreler üzerinde homojen bir dögüsel elektrik alan oluşturabilecek, 3D elektrot yapısına sahip ikinci nesil ER çipleri tasarlanmıştır. Bu 3D ER çiplerinde elektrot yüksekliği 30 μm 'ye kadar çıkartılarak, hücrelerin *fringing field* etkisinden kurtulması hedeflenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. 2D ve 3D elektrotlarda elektrik alan dağılımını gösteren şematik. 3D elektrot yapısındaki ER çiplerinde, hücreler z-ekseninde homojen bir elektrik alan dağılımı etkisinde kalmaktadır.

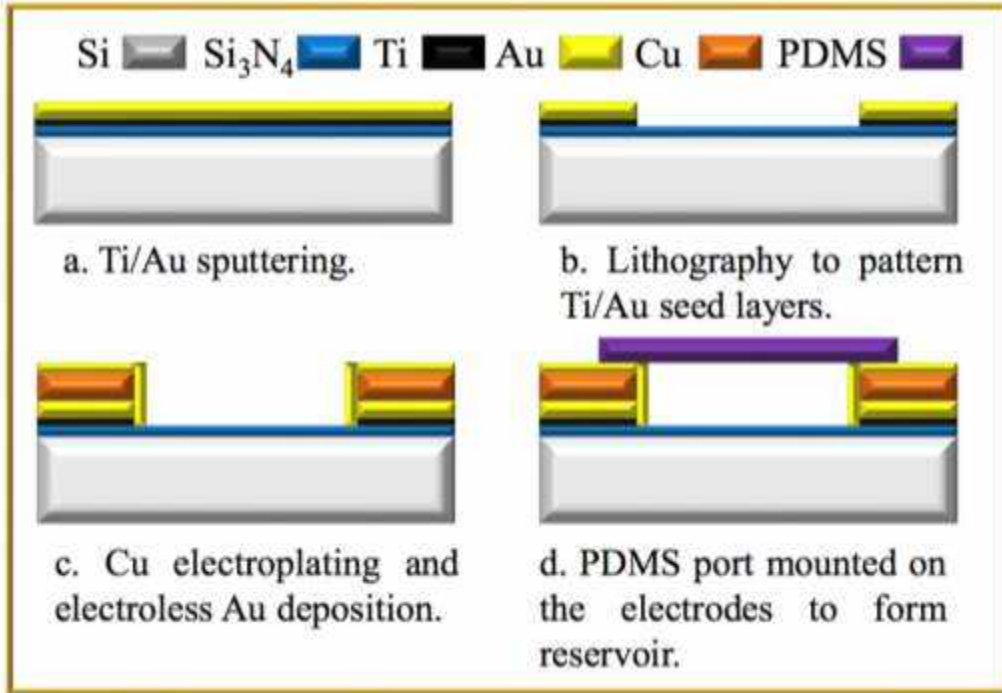
İkinci nesil ER çiplerinde, elektrotlar Cu-elektrokaplama yöntemi kullanılarak yükseltilmiş, daha sonra tüm yüzeyler parilen ile kaplanmıştır. Üstteki parilen tabakası ölçüm alanının olduğu yerlerde kaldırılarak, PDMS port monte edilmiştir. Ancak, ölçüm alanın çok küçük olması ve parilen ve PDMS'in hidrofobik olması nedeniyle, hücre süspansiyonunun çipe yüklenmesinde problem yaşanmıştır. Birinci ve ikinci nesil ER çipi fotoğrafları ve testler sırasında elde edilen görüntüler Şekil 8'de verilmektedir.

3.1.3 Üçüncü Nesil ER Çiplerinin Tasarım ve Üretimleri

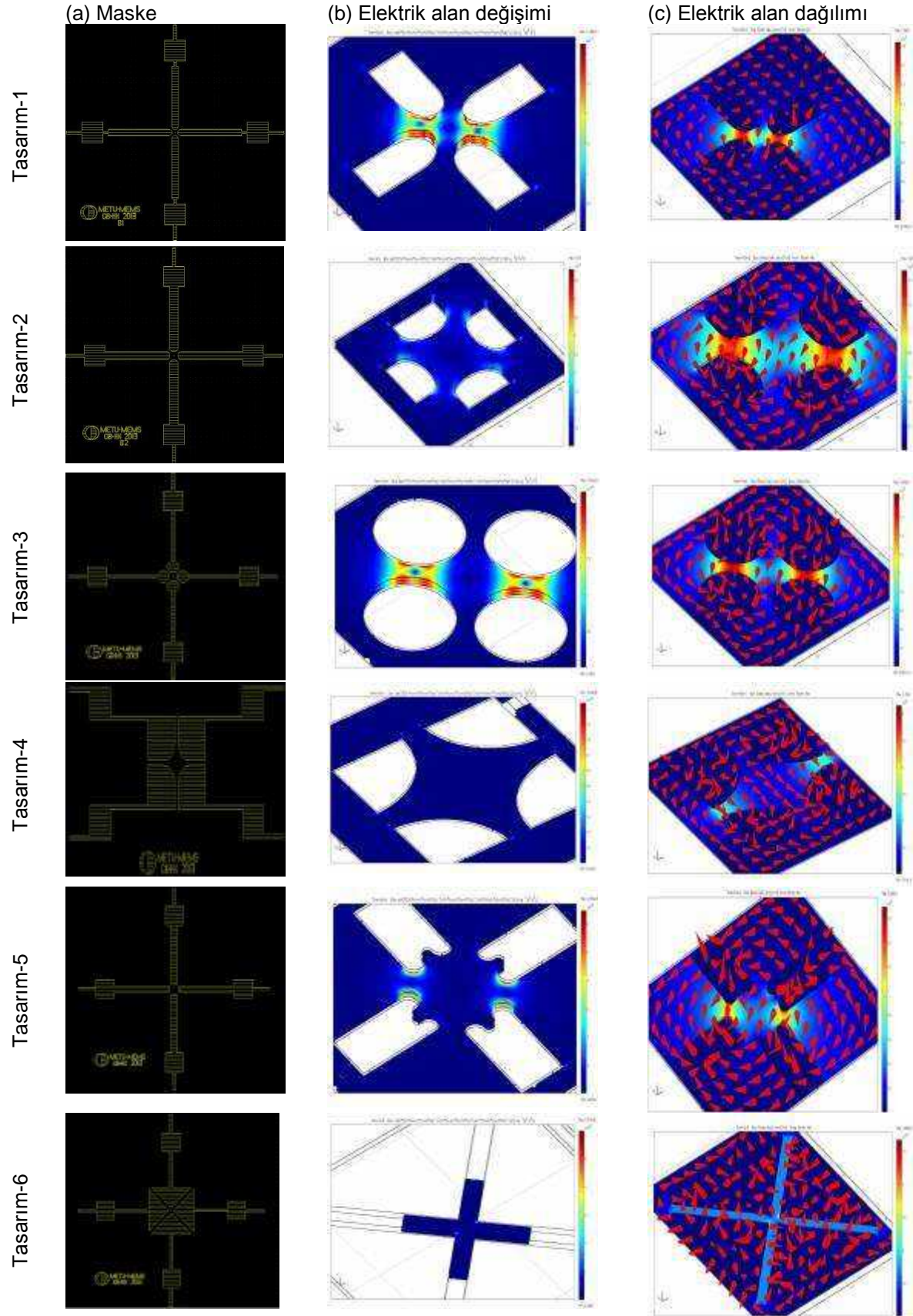
Birinci ve ikinci nesil ER çiplerinde karşılaşılan problemleri aşmak için, üçüncü nesil ER çipi tasarlanmış ve Şekil 11'de verilen üretim şemasına göre, tek bir maske kullanılarak

üretimiştir. Üçüncü nesil ER çiplerinde, Si pul üzerine Ti/Au tabakası işlendikten sonra, Cu-elektrokaplama ile 3 boyutlu, 30 µm yüksekliğinde elektrotlar elde edilmiştir. İkinci nesil ER çiplerinde kullanılan yalıtkan parilen tabakası yerine, bu çipte Cu elektrotların tampon çözelti (PBS solüsyonu) ile temasını ve elektroliz problemini önlemek için, elektrotların üzeri, *Electroless Au Deposition* yöntemi ile, Au kaplanmıştır. Elektrotlar arasındaki ölçüm alanına kuyucuk oluşturacak şekilde PDMS port yerleştirilmiştir.

Bu üretimde, ölçüm alanında oluşan tork dağılımının homojenliğini arttırmak amacıyla, 6 farklı elektrot yapısına sahip ER çipi üretilmiştir. Homojen tork dağılımı, ölçümlerin tekrarlanabilirliğini ve dolayısıyla güvenilirliğini arttıracaktır. Bu elektrot yapılarına ait çizimler ve elektrik alan değişimi ve dağılımına yönelik simülasyonlar Şekil 12’de verilmektedir. Tasarımlarda, elektrot geometrileri ölçüm alanındaki dielektroforetik kuvveti ve dolayısıyla, hücrelerin yanal hareketini minimuma indirecek şekilde değiştirilmiştir.

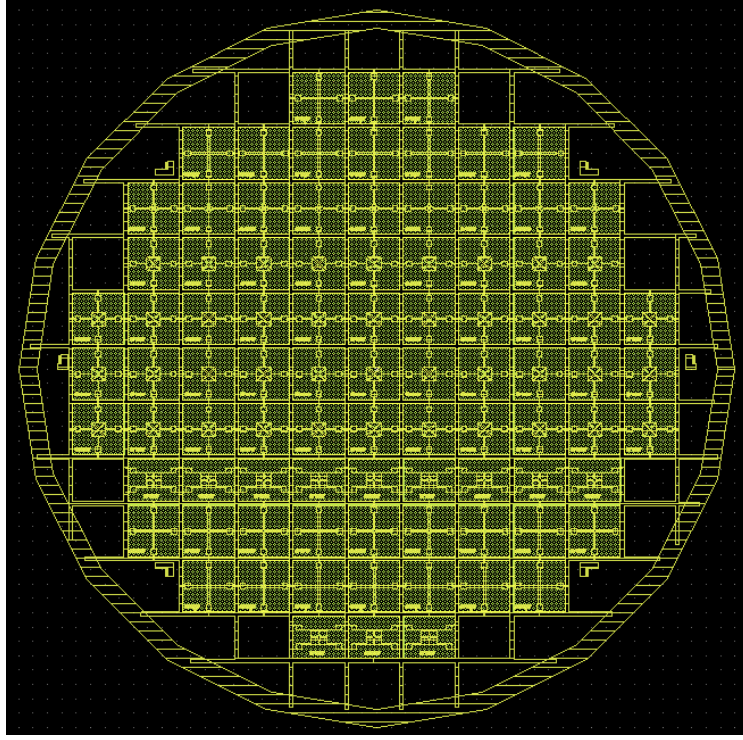


Şekil 11. Üç boyutlu elektrot yapısı içeren, üçüncü nesil ER çipi üretim şeması.

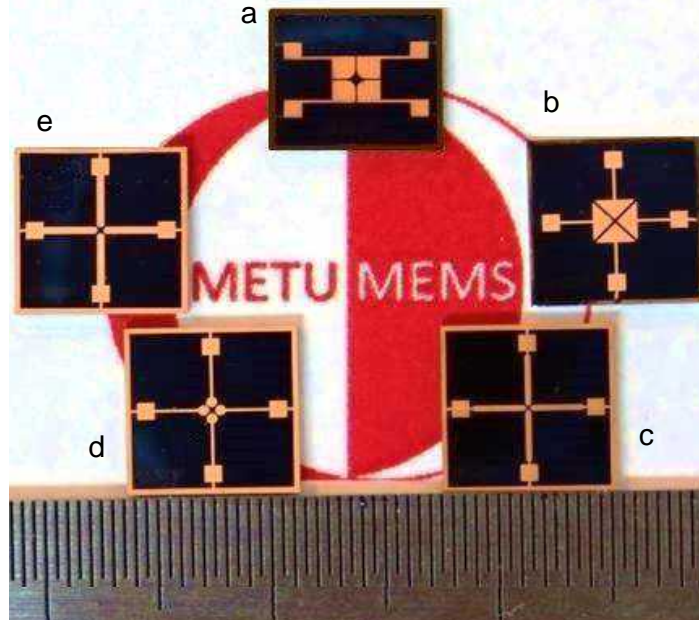


şekil 12. Tasarlanan 3. nesil ER çiplerinin maske çizimleri (a), elektrik alan değişim şiddeti simülasyonları (b) ve elektrik alan norm dağılımları (c).

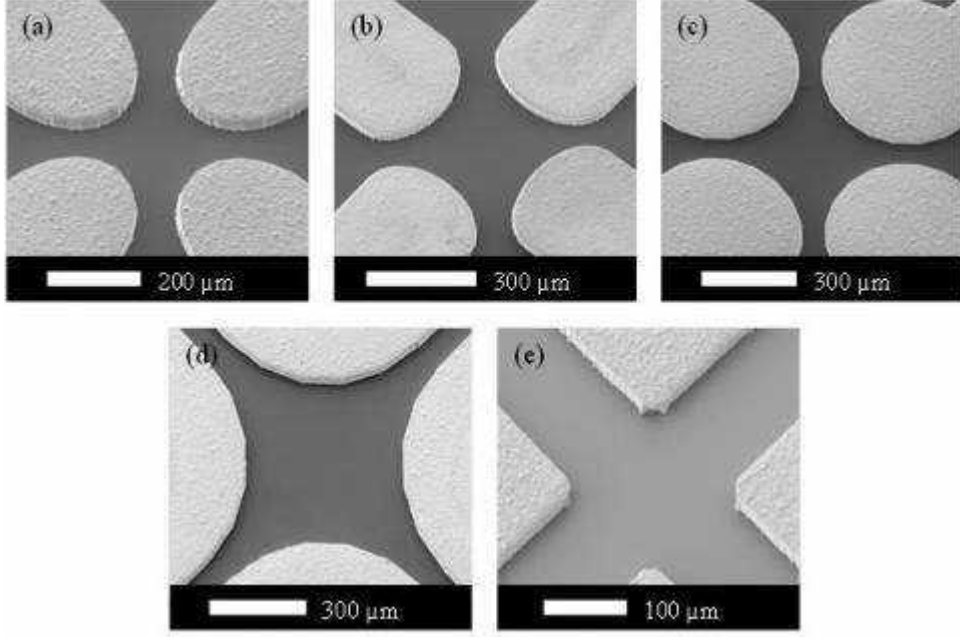
Üçüncü nesil ER çipi üretiminde kullanılan maske Şekil 13'te verilmektedir. Farklı elektrot yapılarına sahip toplamda 89 çip, 4 inçlik pul kullanılarak tek bir üretimle elde edilebilmiştir. Üretilen çiplere ait görsel ve SEM fotoğrafları sırasıyla Şekil 14 ve Şekil 15'te verilmektedir.



Şekil 13. Üçüncü nesil ER çiplerinin 4 inçlik pul üzerindeki maske çizimi.



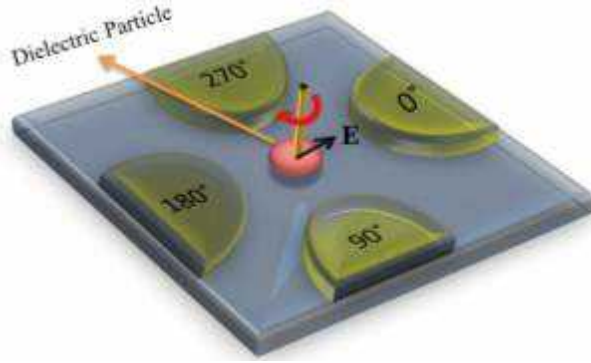
Şekil 14. Üçüncü Nesil ER çipleri (a) polinomik, (b) piramid, (c) yassı, (d) yuvarlak, (e) yayvan elektrot yapısına sahip ER çipi.



Şekil 15. 3D ER çiplerinin SEM fotoğrafları.

3.1.4 ER Çipleri Üzerinde Döngüsel Tork (ROT-T) Dağılımının Karakterizasyonu

ER testlerinde, indüklenen döngüsel tork sonucu oluşan hücre dönüşü, cihaz yüzeyindeki etken elektrik alan (*effective electric field*, EEF) dağılımına bağlı olarak değişir. Bu elektrik alan dört kutuplu elektrot yapısına 90° faz farklı dört sinyal uygulanarak oluşturulur (Şekil 16).

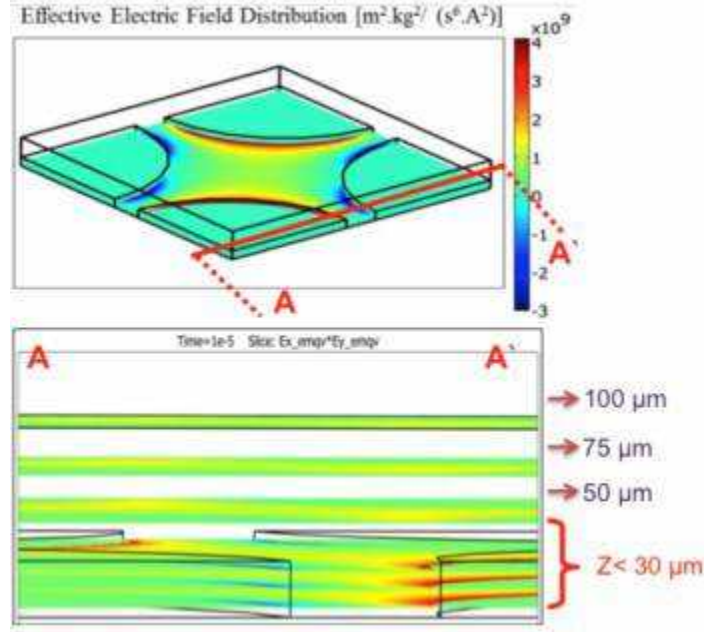


Şekil 16. ER çiplerinin çalışma prensibi. Elektrotlara 90° faz farkı ile elektriksel sinyal uygulandığında, frekansa bağlı olarak dielektrik parçacık elektrik alan yönünde veya tersi yönde döner.

Literatürde döngüsel elektrik alan oluşturmak için farklı elektrot geometrilerinden faydalanılmaktadır. Elde edilen sonuçların güvenilirliği, çeşitli deneysel koşullara bağlıdır. Örneğin, kullanılan solüsyonun iletkenliği, sıcaklık, parçacık üzerine etki eden döngüsel torkun sabitliği, parçacığın ölçüm sırasındaki konumu gibi etkenler analiz sonuçlarını etkileyebilir. Dolayısıyla, ölçümler sırasında homojen bir EEF dağılımının sağlanması veya tüm ölçümlerin homojen EEF dağılımının olduğu elektrotlar arası bölgelerde yapılması zorunludur.

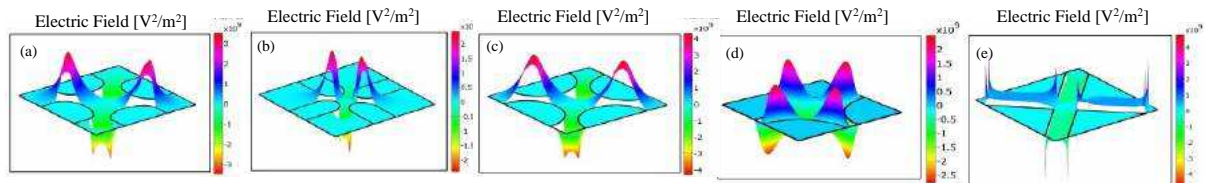
Üçüncü nesil ER çipleri, üç boyutlu elektrot yapıları ile özgün bir yapıya sahiptir. Literatürde iki boyutlu elektrot yapısındaki ER çipleri için detaylı karakterizasyonlar gösterilmesine rağmen, üç boyutlu elektrotlarda döngüsel torkun detaylı karakterizasyonu yapılmamıştır. İki boyutlu elektrotlarla yapılan çalışmalarda, parçacığın yüzeye olan uzaklığının sabit kaldığı varsayılmıştır. Ancak, z-ekseninde akışkanın kaldırma kuvveti ve EEF dağılımındaki farklılıklar nedeniyle, parçacığın pozisyonu ve maruz kaldığı ROT-T ciddi ölçüde değişmektedir. Bunların yanı sıra, elektrik alanın homojen dağılmadığı elektrotlar arası bölgelerde, parçacıklar DEF kuvvetine de maruz kalmakta, bu da parçacıkların x-y ekseninde hareket ederek ölçümler sırasında pozisyonlarının değişmesine neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, proje kapsamında geliştirilen farklı elektrot geometrilerindeki ER çiplerinin elektriksel karakterizasyonunu yaparak, optimum elektrot yapısının elde edilmesini sağlamaktır. Bu nedenle, bu çalışmada ROT-T dağılımının üç boyutlu karakterizasyonu, FEM simülasyonları ve biyolojik deneylerle gerçekleştirilmiştir. ROT-T dağılımının x, y ve z eksenlerinde en homojen olduğu elektrot tasarımı ve ölçümlerin yapılması gereken elektrotlar arası alan, simülasyon ve deneysel yöntemlerle belirlenmiştir.

EEF simülasyonları FEM (Finite Element Modeling) analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (COMSOL Multiphysics®, generalized electrostatic module). Modellemede üretilen elektrot yapılarının birebir kopyası kullanılmış, ayrıca, subdomain ve boundary koşulları gerçek test koşullarını yansıtabilecek şekilde seçilmiştir. Elektrotlar 30 µm yükseklikte ve 100 µm yükseklikteki akışkan sıvı içinde kabul edilmiştir. Akışkanın iletkenlik ve görece elektriksel geçirgenliği sırasıyla 8.5 mS/m ve 78 olarak kabul edilmiştir. Döngüsel elektrik alan oluşturmak için, elektrotlara 50 kHz frekansta, 90° faz farkı ile sinüs sinyal uygulanmıştır. EEF dağılımını maksimum hassasiyetle belirleyebilmek için simülasyonlarda mesh boyutu 500 nm'nin altında tutulmuştur. z-eksenindeki EEF dağılımı simülasyonlarında, x-y ekseninde sabit bir nokta belirlenmiştir. Bu nokta, x-eksenine 45° açı yapacak ve merkezden elektrot ucuna olan uzaklığın ¼'üne denk gelecek şekilde seçilmiştir. Bu nokta boyunca z = 5, 15, 25, 50, 75 ve 100 µm'de simülasyonlar yapılmıştır (Şekil 17). Dikey eksenindeki her noktada elde edilen EEF değeri z=5 µm'deki değerle kıyaslanmıştır. Dolayısıyla, elektrot yüksekliği boyunca ve elektrot yüksekliğinin üzerindeki EEF değişimi, farklı elektrot geometrilerindeki çiplerle kıyaslanabilmektedir. x-y eksenindeki EEF değişimi simülasyonları z=15 µm'de gerçekleştirilmiştir. Her bir çip için, elektrotlar arası bölgede dairesel bir alan belirlenmiştir. Bu bölge, merkezdeki EEF değerinin %5, %10 ve %20'si ile sınırlı olacak şekilde seçilmiştir. Bunun için, merkezden itibaren 1 µm adım boyutuyla üç boyutlu simülasyonlar yapılmıştır.



Şekil 17. Z-ekseninde EEF dağılımının belirlenmesi için yapılan FEM simülasyonları.

FEM analizleri sonucu elde edilen z-eksenindeki EEF değişiminin simülasyon sonuçları Şekil 18'de verilmektedir. Nümerik analizler için FEM (COMSOL) sonuçları MATLAB'a aktarılmıştır. EEF değerleri, elektrotlar arası alanın merkezindeki EEF değeri ile karşılaştırılmıştır. FEM analizi sonuçları, EEF dağılımının elektrot yüksekliğinin üzerindeki bölgede ciddi miktarda değiştiğini göstermektedir. Bu, elektrik alanın sıçrayan elektrik alan (fringing field) etkisi nedeniyle homojen dağılım göstermemesinden kaynaklanmaktadır. Yassı ve yuvarlak elektrotlarda değişim en az miktarda (%32) iken, yayvan elektrot yapısında EEF değişimi en yüksek miktardadır (%60). Bu durum, hücrelerin dönüş hızının z-eksenindeki (dikey eksenindeki) konumlarına bağlı olduğunu göstermektedir.



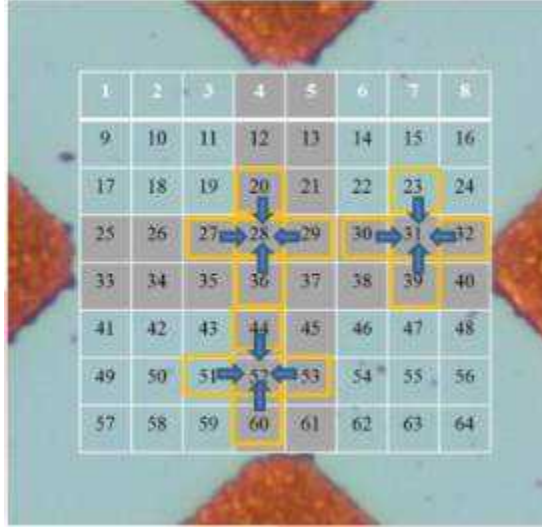
Şekil 18. Dikey eksenindeki EEF dağılımının. (a) Yayvan, (b) yassı, (c) yuvarlak, (d) polinomik, (e) piramit elektrotlar. Simülasyon sonuçlarına göre, maksimum EEF komşu elektrotlar arasındaki bölgelerde oluşmaktadır.

Modelleme sonucu elde edilen verilerin doğrulanması için, K562/IMA-0.3 kanser hücreleri kullanılarak farklı elektrot yapısındaki çiplerle ER testleri yapılmıştır. Elektrotlar arasındaki bölgede, hücrelerin dönüş hızı hesaplanarak, bir ROT-T haritası elde edilmiştir. Bu analizlerin gerçekleştirilmesi için ER çiplerinin elektrotlar arası bölgesi Tablo 1'de bahsedildiği gibi segmentlere ayrılmıştır. Tablo 1'de de belirtildiği gibi, elektrotlar arası uzaklık, tasarımlar

arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle, segment sayısı (64-88), testler sırasında uygulanan voltaj (5-12.5 V_{pp}), ve ölçüm yapılan hücre sayısı farklılık göstermektedir. Segmentlerin büyüklüğü hücre büyüklüğü göz önünde bulundurularak ayarlanmıştır. Şekil 19'da üçgen (polinomik) elektrot yapısındaki ER çipinin EEF karakterizasyonu için yapılan segmentasyon ve deneysel sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan algoritma gösterilmektedir. Ölçümler sırasında hücre her zaman sabit kalmamakta, x-y ekseninde hareket edebilmektedir. Dolayısıyla, komşu segmentlerin EEF dağılımlarından etkilenebilmektedirler. Analizlerin ve elde edilen ROT-T haritasının doğruluğunu arttırmak için, komşu segmentlerin EEF etkilerini de içeren bir algoritma geliştirilmiştir. Her bir segmentin EEF değerinin bulmak için, o segmentin ve yakınındaki diğer 4 segmentin deneysel sonuçlarının ortalaması alınmıştır (örn. Segment 28 için 20, 27, 28, 29 ve 36 numaralı segmentlerin deneysel verilerinin ortalaması alınmıştır). Analizlerin güvenilirliğini arttırmak için, her bir segmentte en az iki hücrenin dönüş hızı ölçülmüştür. Ayrıca, yakındaki hücrelerin dipol momentinden etkilenmemeleri için, ölçümler diğer hücrelere en az üç hücre boyutu uzaklıkta duran hücrelerle sınırlandırılmıştır. Kaydedilen dönüş hızları, ölçümler sırasındaki çip üzerindeki pozisyonlarına göre, MATLAB *Surface Fitting Toolbox* kullanılarak haritalandırılmıştır.

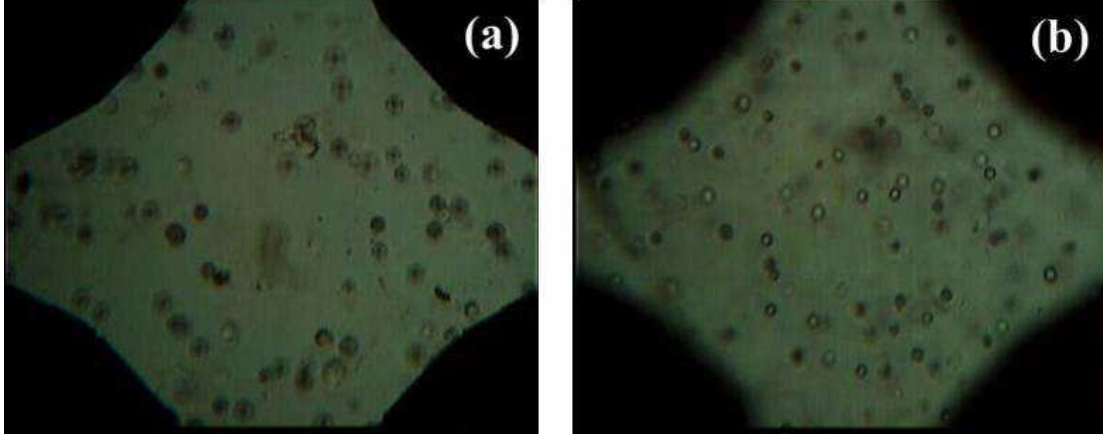
Tablo 1. Farklı 3D elektrorotasyon çiplerinin elektrotlar arası uzaklığı, ayrılan segment ve rotasyonu ölçülen hücre sayısı.

	Elektrotlar arası uzaklık (μm)	Segment sayısı	Ölçülen hücre sayısı
Yayvan	200	64	421
Yassı	300	81	652
Yuvarlak	300	81	551
Piramit	200	64	232
Polinomik	500	88	395



Şekil 19. Üçgen (polimomial) elektrot yapısındaki ER çiplerinin EEF karakterizasyonu için elektrotlar arası bölgenin segmentlere ayrılması ve deneysel verilerin değerlendirilmesinde kullanılan algoritma.

Testler sırasında K562/IMA-0.3 hücreleri (ortalama $R = 7.65 \mu\text{m}$) kullanılmış ve hücrelerin içinde bulunduğu sıvının iletkenliği (8.5 mS/m) ve uygulanan frekans (50 kHz) sabit tutulmuştur. 3-boyutlu karakterizasyon için hücrelerin dikey eksenindeki (z-ekseni) pozisyonları da dikkate alınmıştır. Bunun için, mikroskobun odaklama özelliğinden faydalanılarak, yüzey alana uzaklıkları $30 \mu\text{m}$ altı veya $30 \mu\text{m}$ üstü olan hücreler ayrı ayrı incelenmiştir. Şekil 20'de farklı odaklama uzaklıkları kullanılarak görüntülenen kanser hücreleri gösterilmektedir.



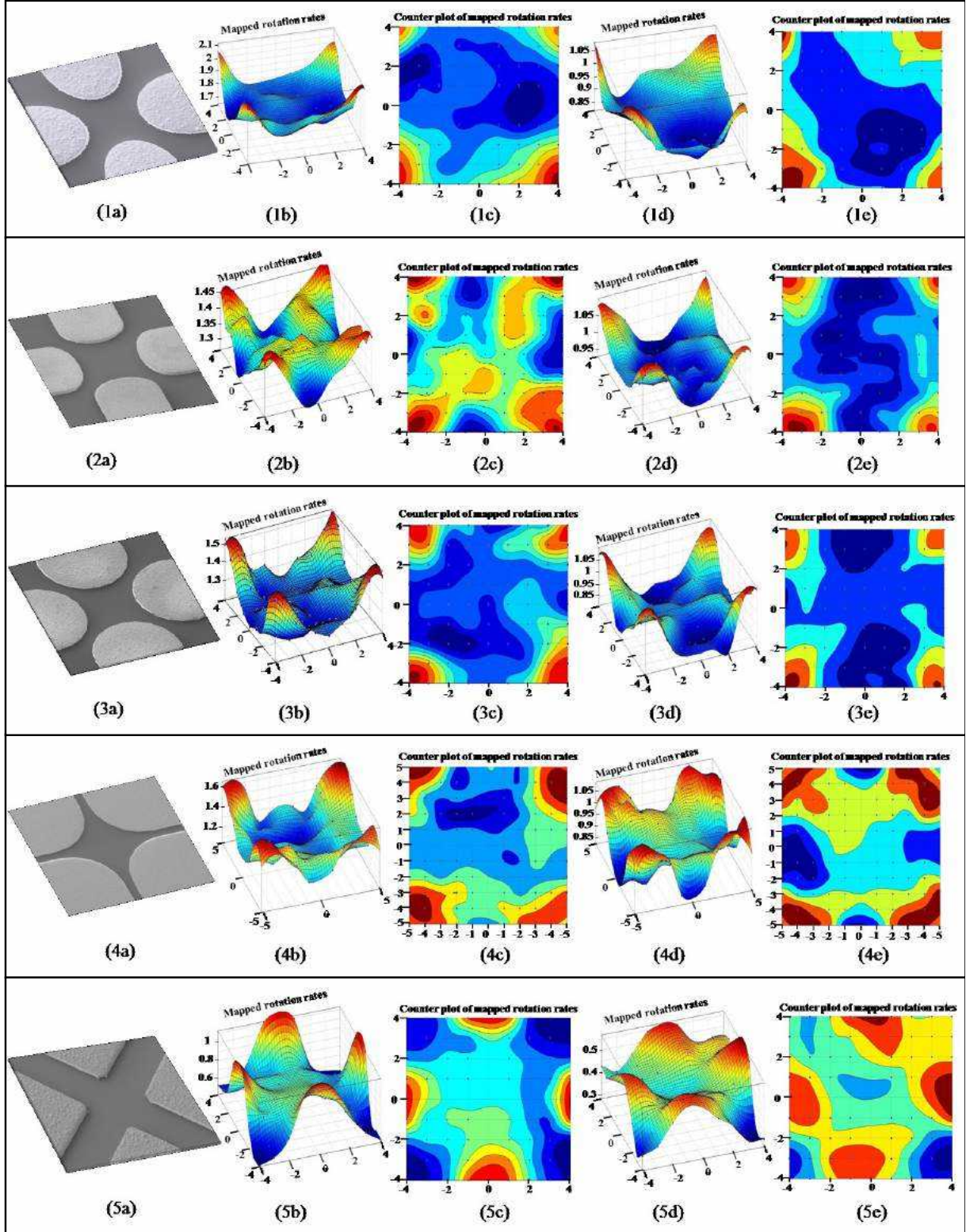
Şekil 20. Test sırasında hücrelerin (a) $z < 30 \mu\text{m}$ ve (b) $z > 30 \mu\text{m}$ 'deki görüntüleri.

Test sonucunda elde edilen verilerin MATLAB *Surface Fitting Toolbox* kullanılarak haritalandırılmış hali Şekil 21'de verilmektedir. Gerek FEM analizleri, gerekse deneysel sonuçlar, eliptik ve dairesel elektrotların çipin merkezinde daha homojen bir EEF ve ROT-T dağılımını sağladığını göstermektedir. EEF ve ROT-T kuvveti komşu elektrotlar arasındaki bölgelerde artmaktadır. Deneylerde, döngüsel elektrik alan kuvvetindeki düşüş nedeniyle, hücre dönüş hızının elektrot uçlarına yaklaştıkça, , azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, E^2

bileşenlerinden birinin (E_x veya E_y) elektrot uçlarına yaklaştıkça ihmal edilebilecek kadar düşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum, FEM analizi sonuçları ile de örtüşmektedir. Ayrıca, elektrot uçlarında DEP kuvveti artmaktadır. Bu hücrelerin hızla elektrotlara yaklaşmasına veya elektrotlardan uzaklaşmasına neden olmaktadır. Elektrik alandaki değişimler nedeniyle bu bölgelerde hücreler homojen olmayan yarı dögüsel bir hareket sergilemektedirler. Bu nedenle, ölçümlerin, EEF'in homojen dağıldığı merkeze yakın bölgelerde yapılması gerekmektedir. EEF miktarının x-y eksenindeki sabitliğini belirlemek için, yüzeyin 15 μm üzerindeki dikey pozisyonda, x-y eksenini boyunca 1 μm adımlarla FEM analizleri yapılmıştır. Tablo 2'de, EEF değişiminin merkezi EEF miktarına göre %5, %10 veya %20 değiştiği alanların toplam ölçüm alanına oranı gösterilmektedir. Sonuçlar, sivri uçlu elektrotların, yuvarlak veya eliptik elektrotlara göre daha homojen bir EEF dağılımı sağladığını göstermektedir. EEF'in merkeze göre %5 veya %10 değiştiği alan üçgen elektrot yapısında diğer elektrotlara göre daha fazladır. Üçgen elektrotlar merkezde daha homojen bir EEF dağılımı sağlamasına rağmen, oluşan ROT-T kuvvetinin değeri diğer elektrot yapılarına göre daha azdır.

FEM analiz sonuçları ve deneysel veriler, dikey ekseninde (z-ekseni) oldukça tutarlı sonuçlar vermiştir (Tablo 3). Deneysel sonuçlar değerlendirilirken, ROT-T'nin $z=100 \mu\text{m}$ 'deki değeri $z<30 \mu\text{m}$ 'deki değerle, EEF sonuçları değerlendirilirken ise, $z=100 \mu\text{m}$ 'deki değer, $z=5 \mu\text{m}$ 'deki değer ile kıyaslandığında, FEM analiz sonuçları ile deneysel sonuçların birbirine oldukça olduğu gözlenmektedir. Deneysel sonuçlar, dikey ekseninde ROT-T'deki maksimum değişimin yayvan elektrot yapısında (%49), minimum değişimin ise polinomik, yassı ve dairesel elektrot yapılarında (%28-32) olduğunu göstermektedir. Burada, elektrotlar arası uzaklığın da dikkate alınması gerekmektedir. Çünkü, bu uzaklık arttıkça 3D elektrotların sağladığı etki, elektrot yüksekliğinin uzaklığa oranı düştüğünden, azalmaktadır.

Sonuç olarak, piramit yapılı, sivri uçlu üçgen elektrotların en homojen ve sabit EEF ve ROT-T dağılımını sağladığı görülmüştür. Dairesel veya polinomik elektrot yapılarında ise, oluşan EEF kuvvetinin değeri daha yüksektir. Hücre dönüş hızı ölçümleri elektrot yüksekliği boyunca yapıldığında, 3 boyutlu elektrotların 2 boyutlu elektrotlara göre oldukça avantajlı olduğu anlaşılmıştır. Sıçrayan elektrik alan etkisinin minimal düzeyde kaldığı bu alanda, z-ekseninde oldukça homojen bir elektrik alan dağılımı gözlenmektedir. Bu durum hem FEM analizleri ile gösterilmiş, hem de deneysel sonuçlarla ispatlanmıştır. Ayrıca 3D elektrotlar, akım yoğunluğunu azalttığından, elektrotlar üzerinde ısı oluşumunu, dolayısıyla, ölçüm sırasında sıvıdaki ısı değişimini en aza indirmektedir. Isınma sıvının iletkenliğini değiştireceğinden ER deneylerinde önemli bir parametredir.



Şekil 21. Deneysel olarak ölçülen hücre dönüş hızlarının çip yüzeyine *MATLAB Surface Fitting Toolbox* kullanılarak haritalandırılması. (1a-e) Yayvan, (2a-e) yassı, (3a-e) yuvarlak, (4a-e) polinomik ve (5a-e) piramit elektrot yapısı. (1-5a) Elektrotların SEM görüntüleri. Elektrotların pozisyonları ile haritalandırma görüntüleri birebirdir. (1-5 b) ve (1-5 c) hücrelerin $z < 30 \mu\text{m}$ 'deki dönüşü, (1-5 d) ve (1-5 e) hücrelerin $z = 100 \mu\text{m}$ 'deki dönüşü.

Tablo 2. Farklı elektrot geometrileri için x-y ekseninde EEF'in sabitliğinin kıyaslaması. Karşılaştırmalar toplam dairesel ölçüm alanına göre EEF'in merkezi değerinin %5, %10 ve %20 değiştiği dairesel alanlar göz önünde bulundurularak yapılmıştır.

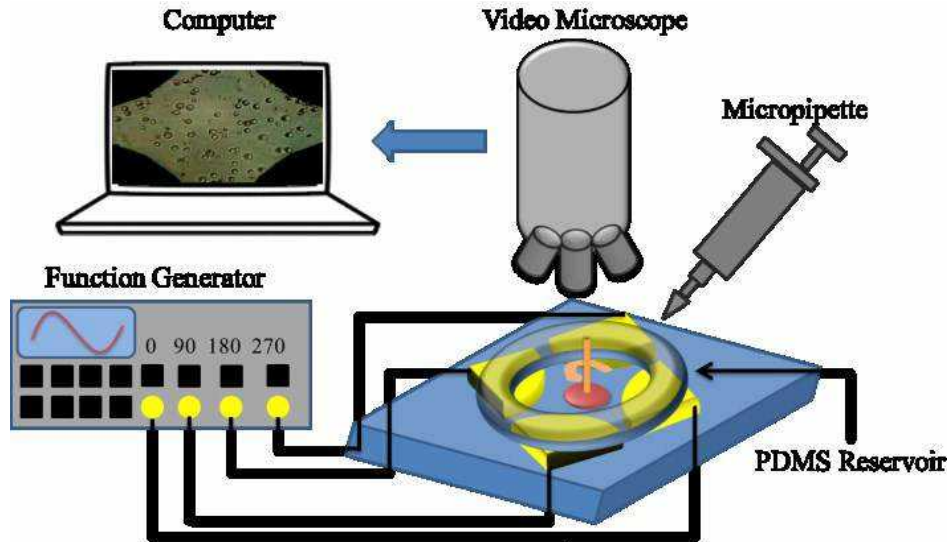
Elektrot geometrisi	Elektrot uçları arası uzaklık (μm)	Merkezi EEF'in %5 değişim gösterdiği alan		Merkezi EEF'in %10 değişim gösterdiği alan		Merkezi EEF'in %20 değişim gösterdiği alan	
		Merkezden radyal uzaklık (μm)	Toplam dairesel ölçüm alanına göre % dairesel ölçüm alanı	Merkezden radyal uzaklık (μm)	Toplam dairesel ölçüm alanına göre % dairesel ölçüm alanı	Merkezden radyal uzaklık (μm)	Toplam dairesel ölçüm alanına göre % dairesel ölçüm alanı
Yayvan elektrot	200	28	7.84 %	36	12.96%	46	21.16%
Yassı elektrot	300	46	9.40%	57	14.44%	70	21.78%
Yuvarlak elektrot	300	46	9.40%	57	14.44%	70	21.78%
Polinomik elektrot	500	90	12.96%	105	17.64%	120	23.04%
Piramit elektrot	200	41	16.81%	70	49%	-	-

Tablo 3. FEM modellemeleri ve deneysel olarak elde edilen sonuçların farklı elektrot geometrileri için dikey eksende kıyaslaması. *Simülasyonlar için değişim değeri $z=5 \mu\text{m}$ 'deki EEF değeri baz alınarak hesaplanmıştır. Deneysel sonuçlar için değişim miktarı $z<30 \mu\text{m}$ 'deki değer baz alınarak hesaplanmıştır.

z [μm]	EEF simülasyon sonuçları [V^2/m^2]						Deneysel sonuçlar Ortalama 1/dönüş hızı	
	Z < 30 μm			Z > 30 μm			Z < 30 μm	Z= 100 μm
Yayvan elektrot	1.55E+09	1.52E+09	1.44E+09	1.18E+09	9.60E+08	8.98E+08	3.66	0.92
Değişim*	-	0.02	0.07	0.24	0.38	0.42	-	0.49
Yassı elektrot	1.43E+09	1.41E+09	1.38E+09	1.25E+09	1.15E+09	1.10E+09	2.78	1.92
Değişim*	-	0.01	0.04	0.12	0.20	0.23	-	0.31
Yuvarlak elektrot	1.45E+09	1.43E+09	1.40E+09	1.28E+09	1.16E+09	1.12E+09	2.64	1.80
Değişim*	-	0.01	0.04	0.12	0.20	0.23	-	0.32
Piramit elektrot	1.02E+09	1.00E+09	9.71E+08	8.57E+08	7.57E+08	7.21E+08	1.40	0.88
Değişim*	-	0.02	0.05	0.16	0.26	0.29	-	0.37
Polinomik elektrot	2.01E+09	1.98E+09	1.92E+09	1.70E+09	1.52E+09	1.44E+09	2.68	1.92
Değişim*	-	0.02	0.04	0.16	0.25	0.28	-	0.28

3.1.5 Test Düzeneği

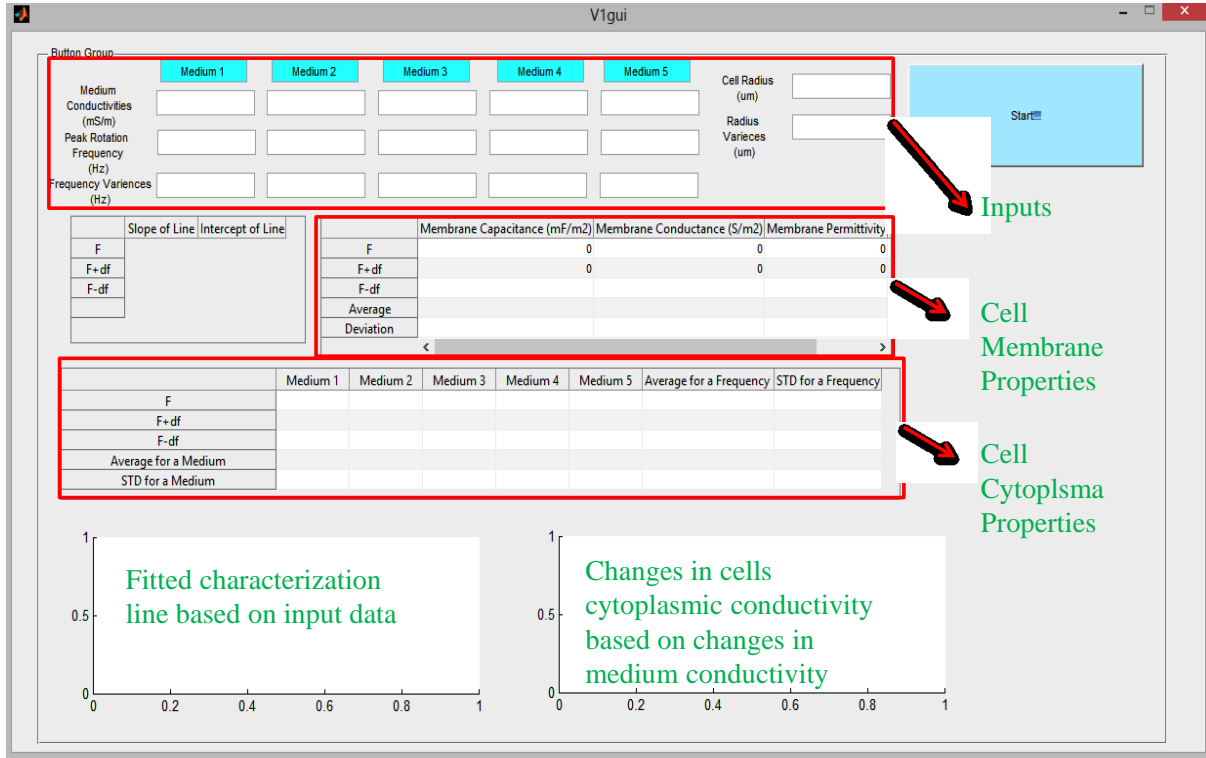
Dirençli ve hassas K562 lösemi ve MCF7 meme kanseri hücrelerinin dielektrik karakterizasyonları, polinomik yapıdaki ER çipleri kullanılmıştır. Hücreler, kültür solüsyonundan alınarak santrifüj ile çöktürülmüş (oda sıcaklığında 1000 rpm dönüş hızıyla 5 dk.) ve ER testlerinin yapılacağı izotonik solüsyonda iki kez yıkandıktan sonra aynı solüsyon içinde süspansiyon edilmiştir. ER izotonik solüsyonu 1 - 8 mS/m iletkenlikte (10X PBS ile ayarlanır) hazırlanmıştır ve %8.5 (w/v) sukroz ve %0.3 (w/v) dekstroz içermektedir. Hücre konsantrasyonu 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde seyreltikten sonra testlerde kullanılmıştır. Test düzeneği Şekil 22'de verilmektedir. Hücre solüsyonu (3 μ l) PDMS port yapıştırılmış ER çiplerinin haznelere enjektör yardımı ile konularak, sinyal jeneratöründen (Agilent 81150A) 90° faz farkı ile, BNC bağlantılı 50Ω koaksiyal kablolar kullanılarak, 10-12.5 V_{pp} voltaj, 1-100 kHz frekans aralığında (5 kHz artışlarla) sinüs sinyal uygulanmıştır. Sinyalin gücü, manuel ölçüme olanak sağlaması için, hücre dönüş hızını 180-240 rpm'de tutacak şekilde optimize edilmiştir. Ölçümler sırasında uygulanan elektrik alan nedeniyle hücrelerin dielektrik özelliklerinin değişebileceği göz önünde bulundurularak, kuyucuk içindeki hücre süspansiyonu her ölçüm sırasında birkaç kez yenilenmiştir. Bölüm 3.1.4'te bahsedilen döngüsel torktaki değişimi minimize etmek için, ölçüm alanı FEM analizleri sonucunda belirlenen bölge ile sınırlandırılmıştır. Bu bağlamda, hücrelerin dielektrik karakterizasyonuna yönelik ölçümler, çip merkezinden 50 μ m radyal uzaklıktaki dairesel alanda yapılmıştır. Bu alan içinde ROT-T değişimi %15'in altında kalmaktadır. Hücre dönüşleri video mikroskobu ile kaydedilmiş ve bir sayaç yardımı ile yavaşlatılmış videolardan dönüş hızları ölçülmüştür.



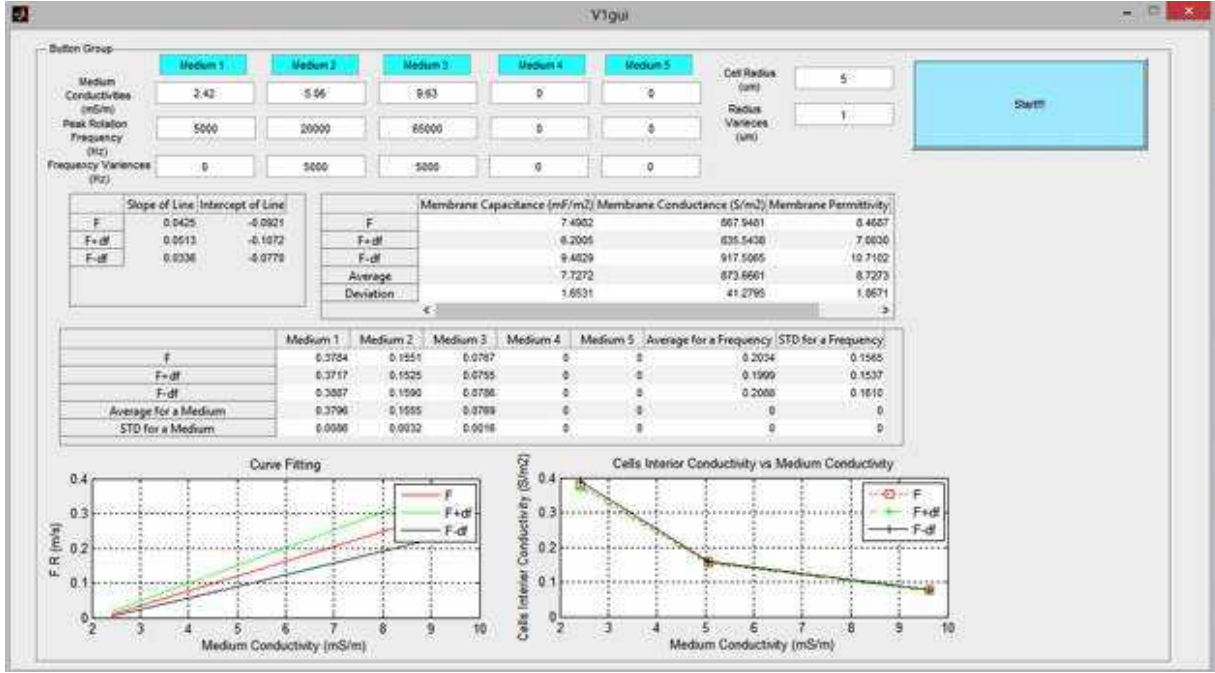
Şekil 22. ER çipleri test düzeneği.

Her bir frekans değerinde, en az 12 hücrenin dönüş hızı belirlenen dairesel alan içinde ölçülerek ortalama değerler kaydedilmiştir. Hücre dönüş hızlarının yakındaki hücrelerin dipol

momentinden etkilenmemesi için, ölçümler birbirinden en az 3 hücre boyutu ayrı duran hücrelerle sınırlandırılmıştır. Her bir test 5 kHz'lik aralıklarla ,1 kHz'den 100 kHz'e artan ve 100 kHz'den 1 kHz'e azalan frekanslarda en az iki kez tekrar edilmiştir. Her bir iletkenlik değerinde elde edilen maksimum rotasyon hızı, ölçümlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen dönüş hızlarından Bölüm 2.3'te bahsedilen yaklaşım ve hesaplamalarla hücre zarı kapasitansı (C_m), total efektif hücre zarı iletkenliği (G_m^*) ve hücre içi öz iletkenliği (σ_i) değerlerine ulaşılmıştır. Hücre dielektrik özelliklerinin deneysel olarak elde edilen maksimum rotasyon frekansından otomatik olarak belirlenmesi için MATLAB tabanlı bir algoritma geliştirilmiştir (Şekil 23). Bu program pik rotasyon frekansı, sıvı iletkenliği ve hücre yarıçapını girdi olarak alıp hücre zarı sığası ve öz iletkenliği ile sitoplazmik iletkenliği otomatik olarak hesaplayabilmektedir. Bunun yanı sıra geliştirilen algoritma, hücre yarı çapı veya pik rotasyon frekansındaki değişimlerden kaynaklanan standart sapmaları da otomatik olarak hesaplayabilmektedir. Şekil 24'te örnek bir program çıktısı görüntüsü verilmektedir.



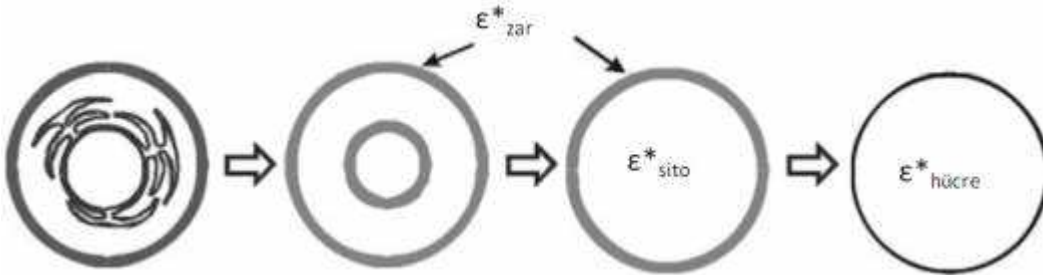
Şekil 23. Hücre dielektrik özelliklerinin hesaplanması için geliştirilen MATLAB algoritması.



Şekil 24. MATLAB algoritması ile hesaplanan hücre dielektrik özelliklerini gösteren ara yüz görüntüsü.

3.2 Hücre Modelleme

Elektrotasyon yöntemi ile dielektrik özellikleri belirlenen hücrelerin DEF parmak izlerinin çıkarılabilmesi için modellenmeleri gerekir. Bu modelleme sonucunda $Re(f_{CM})$ -frekans değişimi elde edilir. Proje kapsamında kullanılan kanser hücreleri tekli tabaka hücre modellemesi yöntemi ile modellenmiştir. Bu yöntemde hücre zarı ile sitoplazmanın dielektrik özelliklerine ihtiyaç vardır. Şekil 25 çekirdekli bir memeli hücresinin tekli tabaka hücre modellemesi yöntemi ile modellenmesini göstermektedir.



Şekil 25. Çekirdekli bir memeli hücresinin tekli tabaka hücre modellemesi yöntemi ile modellenmesi.

Şekil 25'te görüldüğü gibi hücrelerin tekli tabaka modeli kullanılarak modellenmesi için hem sitoplazmanın hem de hücre zarının elektriksel iletkenlik ve geçirgenliğinin bilinmesi gerekmektedir. Modellemenin yapılmasıyla eşitlik 11'de bulunan $\epsilon_{hücre}^*$ değeri elde edilir. Kanser hücrelerini modellemede kullanılan formül aşağıdaki gibidir (Huang vd., 1992).

$$\varepsilon_{hücre}^* = \varepsilon_{zar}^* \left\{ \frac{[(r+d)/r]^3 + 2[(\varepsilon_{sito}^* - \varepsilon_{zar}^*)/\varepsilon_{sito}^* + 2\varepsilon_{zar}^*]}{[(r+d)/r]^3 - [(\varepsilon_{sito}^* - \varepsilon_{zar}^*)/\varepsilon_{sito}^* + 2\varepsilon_{zar}^*]} \right\} \quad (11)$$

Bu eşitlikte r hücre yarı çapını, d ise hücre zarı kalınlığını ifade etmektedir.

Kan hücrelerinin modellenmesinde ise, hücrelerin hücre zarı kalınlığı ve iletkenliği değerlerine ulaşılamadığından, formülde modifikasyona gidilmesi gerekmiştir. Buna göre hücre zarı iletkenliği sıfır varsayılmıştır (nötrofiller için bu değer $1e-10$ 'dur). Hücre zarı kalınlığı değerine ulaşılamadığından, ölçülen birim alana düşen sığa değeri ile işlem yapılmıştır (Eşitlik 12).

$$f_{CM} = - \frac{w^2(\tau_1\tau_m - \tau_c\tau'_m) + jw(\tau'_m - \tau_1 - \tau_m) - 1}{w^2(\tau_c\tau'_m + 2\tau_1\tau_m) - jw(\tau'_m + 2\tau_1 + \tau_m) - 2} \quad (12)$$

Bu eşitlikte,

$$\begin{aligned} \tau_m &= \frac{C_m R}{\sigma_c} & \tau_c &= \frac{\varepsilon_c}{\sigma_c} \\ \tau_1 &= \frac{\varepsilon_1}{\sigma_1} & \tau'_m &= \frac{C_m R}{\sigma_1} \end{aligned}$$

Yukarıdaki eşitliklerde C_m birim alana düşen hücre zarı sığa değeri, σ_c sitoplazmik iletkenlik, ε_1 akışkan geçirgenliği, σ_1 akışkan iletkenliğini göstermektedir.

Formüller MATLAB yazılımına, modüler bir program yazılarak aktarılmıştır. Kullanılan kod ekler bölümünde (Ek 1) sunulmaktadır.

Kod girdisi olarak kullanılan hücre ve akışkan dielektrik özellik bilgileri Tablo 4'te verilmektedir. Modelleme sonucu, MATLAB'dan elde edilen $Re(f_{CM})$ -frekans değişim grafikleri "Bulgular" bölümünde sunulmaktadır.

Tablo 4. Hücre ve akışkan dielektrik özellikleri bilgileri.

	$\sigma_{sito}(S/m)$	ε_{sito}	$\sigma_{hücrezarı}(S/m)$	$\varepsilon_{hücrezarı}$
Akışkan	2.5×10^{-3}	78	-	-
K562	0.23	40	1.8×10^{-6}	8
K562AR	0.5	40	2×10^{-6}	9
MCF7	0.23	40	3.4×10^{-6}	14
MCF7/dox	0.4	40	2.57×10^{-6}	14
Eritrositler	0.5	106	1×10^{-6}	9.06

3.3 COMSOL Simülasyonları

COMSOL simülasyonlarında, mikro-akışkanlar teorisinden yararlanılarak akışkan içindeki direnç kuvveti DEF kuvvetine eşitlenmiş ve parçacık hızı için aşağıdaki formüle ulaşılmıştır.

$$v_p = v + \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m r^2 Re(f_{CM})}{3\mu} \nabla |E|^2 \quad (13)$$

Eşitlik 13'te verilen ε_0 ve ε_m sırasıyla havanın ve parçacıkların içinde bulunduğu akışkanın elektriksel geçirgenliğini (permittivity), r parametresi parçacığın yarıçapını, $Re(f_{CM})$ ifadesi parçacık ve içinde bulunduğu akışkanın dielektrik özelliklerine göre belirlenen ve Clausius Mossotti (CM) faktörü diye adlandırılan parametrenin reel sayı kısmını göstermektedir. μ parametresi hücrelerin içinde bulunduğu sıvının akışkanlığını ifade etmektedir ve 8.92×10^{-4} Pa.s olarak alınmıştır. v ve v_p , sırasıyla parçacığın içinde bulunduğu sıvının ve parçacığın hızını ifade etmektedir. $\nabla |E|^2$ ise parçacığın maruz kaldığı homojen olmayan elektrik alanın değişimini göstermektedir. Bu parametrenin katsayısına *katsayı DEF* denilerek COMSOL simülasyonlarda ortak bir isim oluşturulmuştur.

DEF testleri sırasında sinüs sinyali kullanılacaktır. Bu sebeple öncelikle zamana bağlı simülasyon yapıp elektriksel alanın değişimi gözlemlenmektedir. Ardından toplanan simülasyon sonuçları kaydedilerek, elektriksel alan kuvvetinin en yüksek olduğu an seçilip denge durumu simülasyonları yapılarak hücrelerin izleyeceği yol bulunup simülasyon tamamlanmaktadır. Bu kapsamda COMSOL Multiphysics içerisindeki *“Electrostatics, generalized”* ve MEMS modülü altındaki *“Incompressible Navier-Stokes”* alt modüllerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Zamana bağlı simülasyon tamamlandıktan sonra *“Postprocessing”* bölümünden elektrik alan kuvvetinin en yüksek olduğu an seçilip 2 ya da 3 boyutta parçacığın maruz kaldığı homojen olmayan elektrik alanın değişimi ($\nabla |E|^2$) simüle edilir. Simüle edilen bu değer 10^{12} $\text{kg}^2/\text{m}^6/\text{s}^6/\text{A}^2$ 'den büyük olması ayrışmanın görülmesi için yeterlidir.

Elektrik alan kuvvetinin yeterli olduğunun simülasyonla gerçekleşmesi ve elektrot boyları, sayıları ve aralarındaki uzaklıklar ile kanal genişliklerinin belirlenmesinin ardından toplanan simülasyon sonuçlarının kaydedilmesi için COMSOL programında *“Solver Manager”* açılıp *“store solution”* butonu tıklanır. Elektrik alan kuvvetinin maksimum olduğu an seçilir. Ardından, mikroakışkan simülasyonları çipin amacı çerçevesinde gerçekleştirilir.

3.4 Birinci Nesil DEF Çipleri

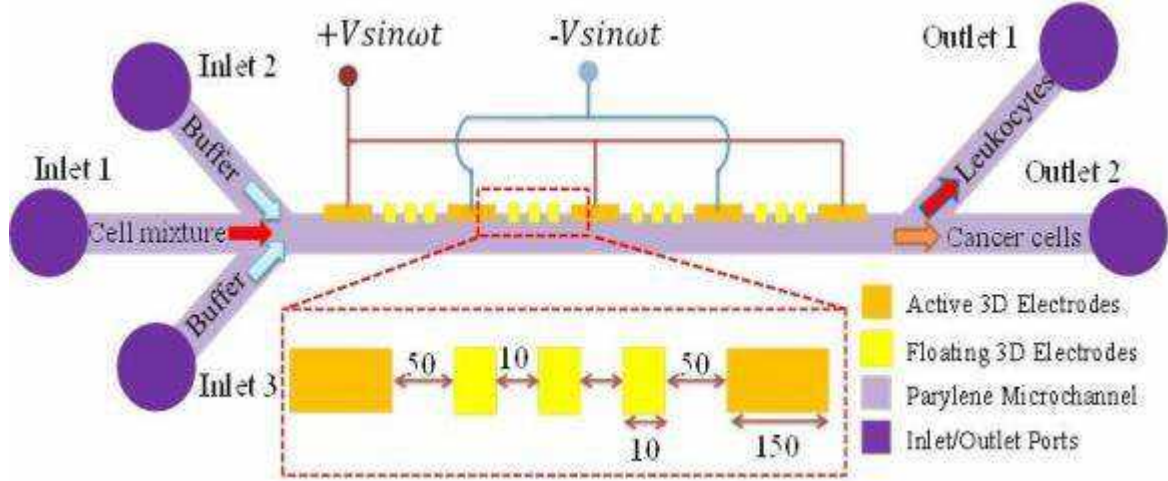
Proje kapsamında iki aşamalı bir DEF çipi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çipin ilk aşamasında kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılması, ikinci aşamada ise dirençli ve duyarlı kanser hücrelerinin birbirinden ayrıştırılması düşünülmüştür. Her iki aşama için de üç farklı tasarım proje süresince geliştirilmiş ve ayrıştırma koşulları optimize edilmiştir. Bu tasarımların simülasyonları ve üretim süreçleri, test aşamalarında kullanılan yöntemlerle birlikte aşağıda anlatılmaktadır.

3.4.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması

Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırıldığı alan projenin son ürün çipinin 1. DEF alanı olarak isimlendirilmiştir. 1. DEF alanı olarak tasarlanan birinci nesil DEF çipinin tasarımı ve COMSOL simülasyonları ile optimize edilen parametreleri ve üretim akışı aşağıda verilmiştir.

Tasarım:

İlk DEF çipinin tasarımı için öncelikle kan ve kanser hücrelerinin dielektrik özellikleri literatürden derlenmiş ve ayrışma frekansları belirlenmiştir. Yapılan simülasyonlar sonucunda 160 MHz'de kan hücrelerinin pDEF kuvvetine maruz kaldığı, hassas ve dirençli K562 hücrelerinin ise nDEF kuvvetine maruz kaldığı görülmüştür. Bu bulgulardan yola çıkılarak tasarlanan birinci nesil DEF çipinin yapısı Şekil 26'da gösterilmektedir. Bu tasarımda mikrokanal duvarına yerleştirilmiş, kanal yüksekliği boyunca uzanan üç boyutlu 5 adet elektrot kullanılmaktadır. Ayrıca, ayrışma için uygulanması gereken voltajı düşürmek adına, ana elektrotlar arasına yerleştirilecek 3'er adet serbest elektrot sisteme eklenmiştir. Serbest elektrotlar voltaja bağlı olmayan elektrotlardır. Kanal genişliği yapılan optimizasyonlara göre 75 µm olarak seçilmiştir. Kanal yüksekliği birinci nesil üretimi için 25 µm olarak seçilmiştir, çünkü, akan bir sıvı içerisinde boyutu maksimum 20 µm olan hücreleri odaklayabilmek kanal yüksekliği arttıkça zorlaşmaktadır. Mikrokanal ve elektrotların boyutları ile ilgili bilgiler Tablo 5'te verilmektedir. Şekil 26'da görüldüğü gibi 3'lü kanal girişi ve 2'li kanal çıkışı kullanılmıştır. Ortadaki giriş hücre karışımı için yanlardaki 2 giriş ise tampon çözeltinin girişi için kullanılmaktadır. İki adet tampon çözelti girişinin amacı orta girişten gelen hücre karışımını kanalın tam merkezinden geçecek şekilde hizalamaktır. Bu amaç için tampon çözelti girişinden gelen akışkanlar COMSOL simülasyonları sonucu belirlenen basınç değerleri ile basınç kontrolörü yardımı ile sisteme verilir. Giriş 1 ve 2 için belirlenen basınç değerleri sırasıyla 31 kPa ve 35.7 kPa'dır. Akış hızı ise 0.00077 m/s'dir.



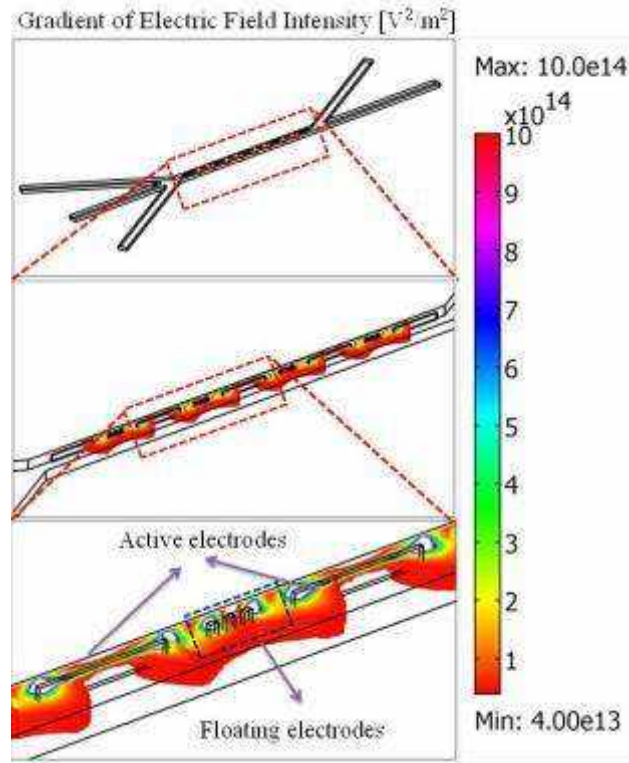
Şekil 26. Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılması için tasarlanan birinci nesil DEF çipi şematığı.

Tablo 5. Kan ve kanser hücrelerinin ayrıştırılması için tasarlanan birinci nesil çipin 1. DEF alanını oluşturan kanal ve elektrotların boyutları.

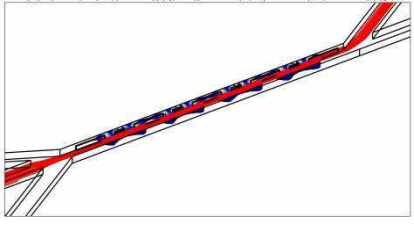
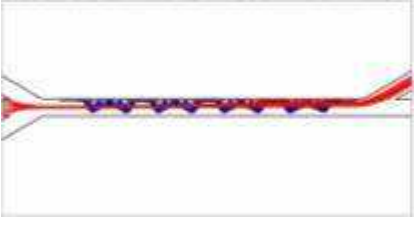
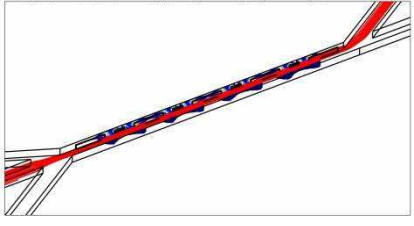

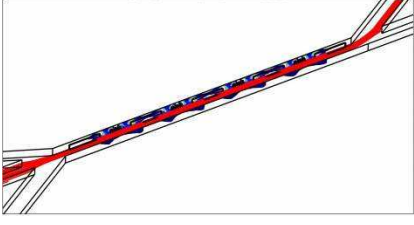
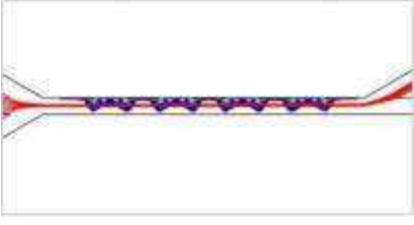
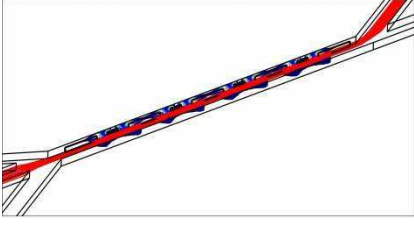


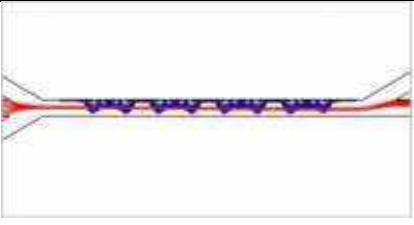

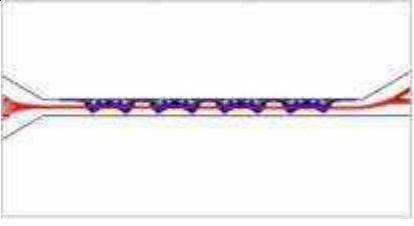
Parametre	Boyutlar
Kanal genişliği	75 μm
Kanal yüksekliği	30 μm
Ana elektrot uzunluğu	150 μm
Ana elektrot yüksekliği	25 μm
Ana elektrotlar arası uzaklık	150 μm
Serbest elektrot uzunluğu	10 μm
Serbest elektrot yüksekliği	25 μm
Serbest elektrotlar arası uzaklık	10 μm

Simülasyonlar:

Uygulancak olan voltajın büyüklüğü yapılan simülasyonlar ve optimizasyonlar sonucu minimum 6 V_p , maximum 9 V_p olarak belirlenmiştir. Frekans değeri ise yapılan MATLAB simülasyonları sonucu 160 MHz olarak seçilmiştir. Belirlenen bu frekansta seçilen tüm kan hücreleri pozitif DEF kuvveti görüp çıkış 1'den sistemi terk ederken, kanser hücreleri negatif DEF kuvvetine maruz kalacak ve çıkış 2'den sistemi terk edeceklerdir. Kanal içinde oluşacak elektrik alanın üç boyutlu COMSOL simülasyonu (Şekil 27) tasarlanan çiple yeterli DEF kuvvetinin sağlanabildiğini göstermektedir. Şekil 28'de verilen ve kan hücrelerinin izleyeceği yolu gösteren simülasyonlara göre kan hücreleri üst çıkışa yönlendirirken, kanser hücreleri alt çıkışa yönlendirilerek %100 ayrıştırma sağlanabilmektedir.



Şekil 27. DEF alanında parçacığın maruz kalacağı elektrik alanın karesinin alansal değişiminin 3 boyutlu FEM (COMSOL Multiphysics) simülasyonu.

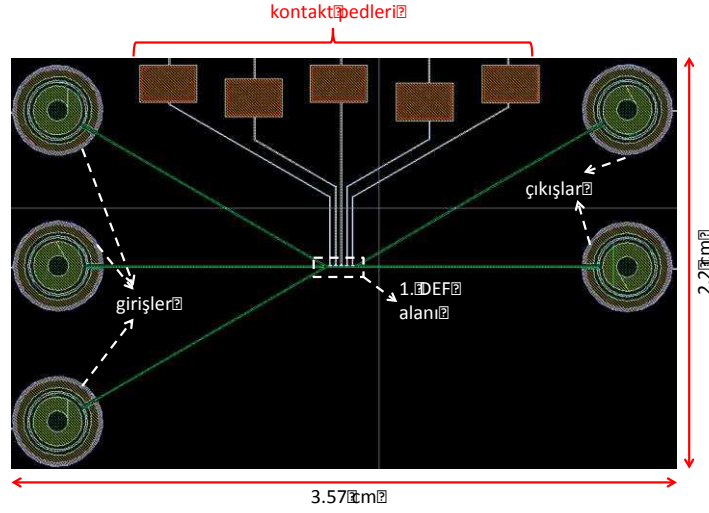
	3D side view	2D top view
Granulocytes		
B-Lymphocytes		
T-Lymphocytes		
Monocytes		
K562		
K562/IMA-0.2		

Şekil 28. Birinci nesil DEF alanından geçişte kan ve kanser hücrelerinin izleyeceği yolu gösteren simülasyonlar.

Üretim:

Tasarlanan çipe ait maske çizimi (CADENCE) Şekil 29'da verilmektedir. Birinci nesil DEF çiplerinin üretim sürecinin geliştirilmesi sırasında daha önce grubumuz tarafından yapılmış

mikrokanal projelerinde kullanılan Ti/Au püskürtme süreleri, voltajları ve yükseklikleri, fotorezist serme hızları ve süreleri, fotorezist UV maruziyet ve geliştirici süresi, belirlenen kalınlıkta parilen kaplanabilmesi için gerekli parilen miktarları, Ti ve Au kimyasal aşındırmada gerekli süreler, Cu elektrot kaplama sırasında kullanılacak akımın büyüklüğü ve kaplamanın süresi, açıklıkların oluşması için gerekli RIE işlemi süresi değerleri DEF çipi dizaynına uygun olarak yapılan hesaplamalar ve üretim denemeleri ile optimize edilmiştir.

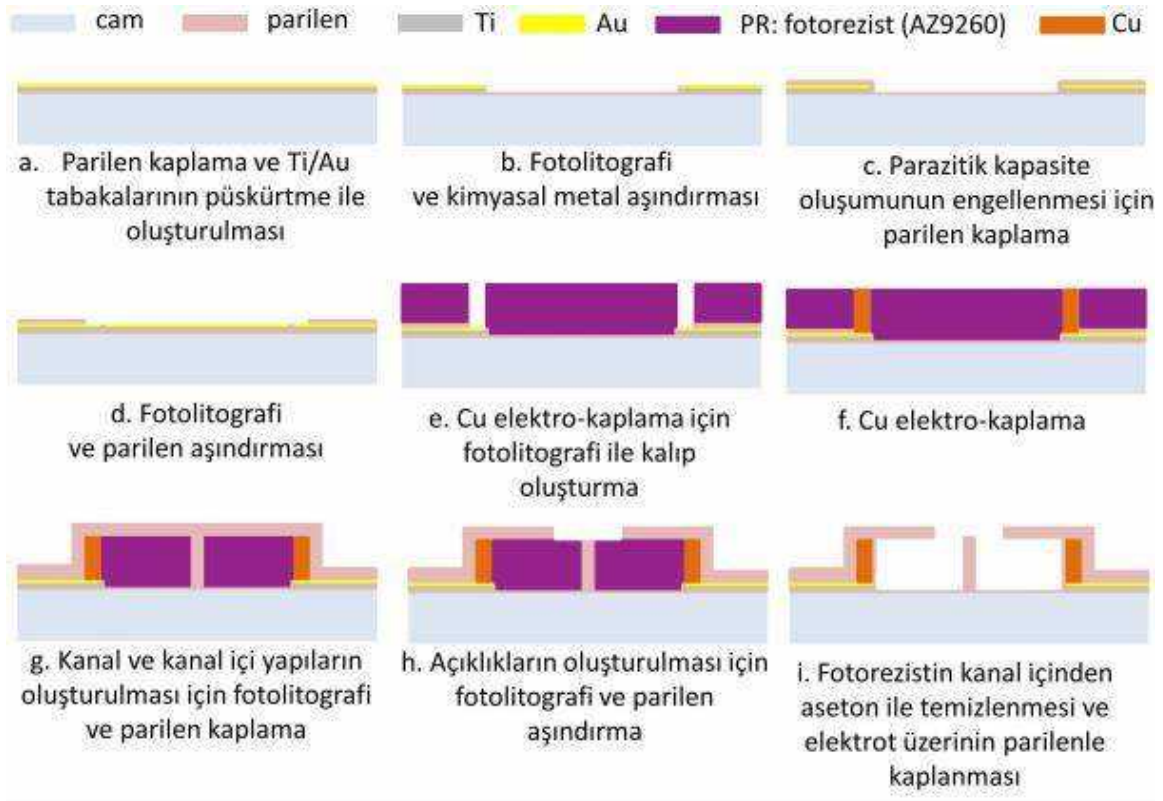


Şekil 29. Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılmasında kullanılan birinci nesil DEF çipine ait maske serimi.

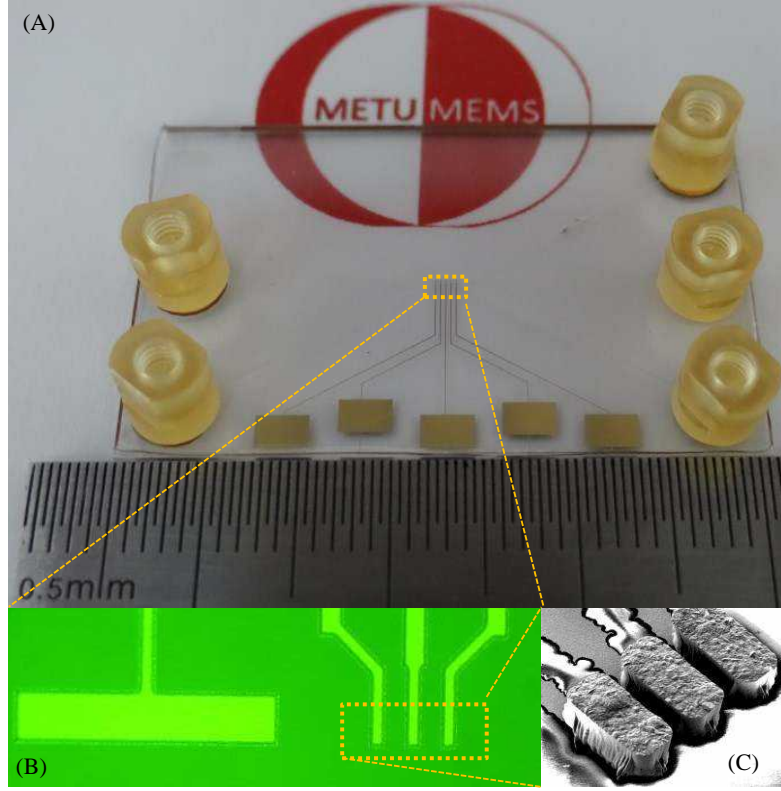
Buna göre geliştirilen üretim şeması Şekil 30'da verilmektedir. Farklı mikroskop çeşitleri (normal veya ters) ile gözlem yapılabilmesi adına taban malzemesi olarak cam seçilmiştir. Elektrotların kanaldan geçecek sıvı ile temasını engellemek için izolasyon materyali olarak ince bir Parilen tabakası kaplanılmasına karar verilmiştir. Au yüzeye tutunmadığından tutucu olarak Ti kaplanır. Ti üstüne yine püskürtme tekniği ile Au tabaka kaplanır. Kaplanan Ti ve Au'nun şekillendirilmesi için yapılacak kimyasal aşındırma işlemi için fotorezist kaplama, UV maruziyeti ve fotorezist geliştirici ile 1. maske kullanılarak şekillendirilir (fotolitografi). Ardından Au ve Ti aşındırıcılar kullanılarak, Ti ve Au tabaka şekillendirilmesi tamamlanır. Yüzeyde kalan fotorezist aseton ile tamamen yıkanır. Parazitik kapasite oluşumunun engellenmesi adına ince bir parilen kaplaması yapılır. Ardından Cu elektro-kaplamanın yapılabilmesi için 3 boyutlu elektrotların oluşturulacağı bölgeleri belirlemek adına 2. maske ile litografi işlemi gerçekleştirilir. Belirlenen yerler RIE işlemi ile açılır. Yüzeydeki fotorezist aseton ile tamamen temizlenir. Au iletkenliği kullanılarak elektro-kaplama yapılabilmesi için bu kaplamanın yapılacağı bölgeleri şekillendirmek adına 2. maske tekrar kullanılarak litografi işlemi gerçekleştirilir. Elektro-kaplama yöntemi ile kanal yüksekliği boyunca 3 boyutlu elektrotlar oluşturulur. Bu teknikte Cu elektro-kaplama için $CuSO_4$ çözeltisi kullanılır. Yüzeyde kalan fotorezist aseton ile tamamen yıkanır. Kanalların oluşturulması için 3. maske

kullanılarak litografi işlemi gerçekleştirilir ve ardından kalın bir Parilen tabakası ile yüzeyin kaplanmasıyla kanalların duvarları ve tavanı oluşturulur. RIE işlemi ile oluşturulacak açıklıkların yerinin belirlenmesi için; 4. maske kullanılarak litografi işlemi yapılır ve RIE işlemi uygulanır.

Hem kan hücrelerini kanser hücrelerinden ayıran hem de ÇİD geliştirmiş ve dirençsiz kanser hücrelerini ayıran DEF çiplerinin üretim şemaları; iki çipin birbirine entegrasyonu sırasında sorun yaşamamak adına aynı olacak şekilde tasarlanmıştır. Her çipin tek tek test edilebilmesi için pulun kesilmesi gerekmektedir. Kesilme işlemi bittikten sonra çipler asetona konulur ve kanal içini koruyan fotorezist yıkanır. Daha sonra ince bir Parilen tabakanın kanal içini kaplayabilmesi için tekrar Parilen kaplama yapılır ve üretim sonlandırılır. Üretilmiş çipe ait görsel Şekil 31'de verilmektedir.



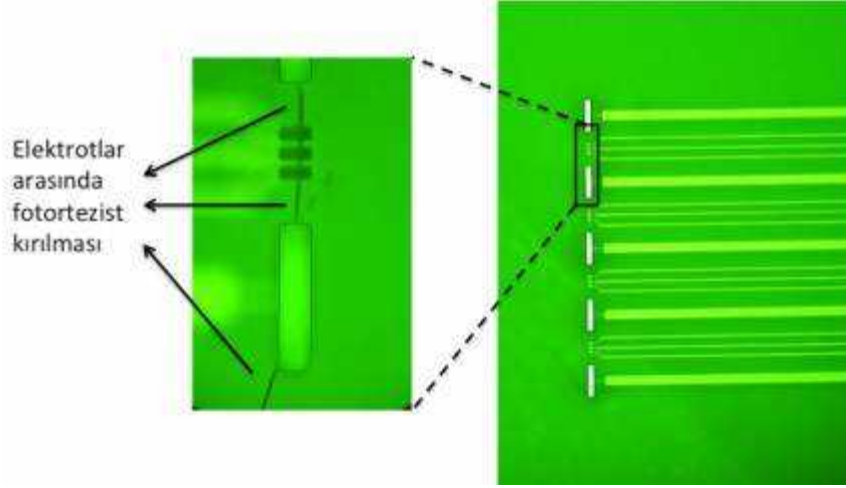
Şekil 30. Birinci nesil DEF çiplerinin üretim akışı.



Şekil 31. Kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrıştırılmasında kullanılan birinci nesil DEF çipi.

Birinci nesil DEF çiplerinin üretimi aşamasında çeşitli problemlerle karşılaşmıştır. Örneğin, iki ana elektrot arasında bulunan serbest elektrotların bazılarının Cu-elektrokaplama sırasında birleştiği gözlenmiştir. Bu durum, kanal içinde tahmin edilenden daha az bir DEF kuvvetinin oluşmasına neden olsa da, kanser hücreleri ile yapılan testlerde hücrelerin yönlendirilebildiği gözlenmiştir. Ayrıca, giriş ve çıkış portlarının sayıca fazla ve büyük olması nedeniyle, 4 inçlik pul üzerinde ancak 7 adet çip üretilmiştir. Çiplerin tekrar üretimi sırasında elektrokaplama litografisinin daha düzgün yapılarak serbest elektrotların birbirine yapışması problemi çözülmeye çalışılmış, ancak önemli bir gelişme kaydedilememiştir. Elektrokaplama için yapılan fotolitografi aşamasında kalın serimler için uygun olan AZ9260 fotorezisti kullanılmaktadır. Bu fotorezist ile tek seferde 15 μm 'ye kadar çıkılabilmektedir. Tasarlanan üç boyutlu elektrotlar kanal yüksekliği boyunca (30 μm) uzanmaktadır. Bunu sağlamak için AZ9260 kimyasalının yüzey üzerine iki aşamada (double spin) kaplanması gerekmektedir. Ayrıca serbest elektrotlar arası uzaklığın düşük (10 μm) olması, rezist şekillendirilmesi sırasında bu alanda yeterli çözünürlüğün sağlanması zorlaştırmaktadır. Rezistin çift katman olarak serimi sırasında ısıl işlemler uygulanmaktadır. Bu işlemlerin, elektrokaplama için kullanılan metal hatlar ve fotorezist arasındaki ısınma farklılıklarından dolayı, rezist kalınlığı boyunca kırılmalara yol açtığı gözlenmiştir. Üretimin bu aşamalarında

gözlenen problemler Şekil 32’de gösterilmiştir. Bu kırılmalar sırasında oluşan boşluklar, Cu-elektrokaplama aşamasında elektrotların birbirine yapışmasına, ve kısa devre oluşmasına neden olduğundan istenen DEF etkisi gözlenememektedir.



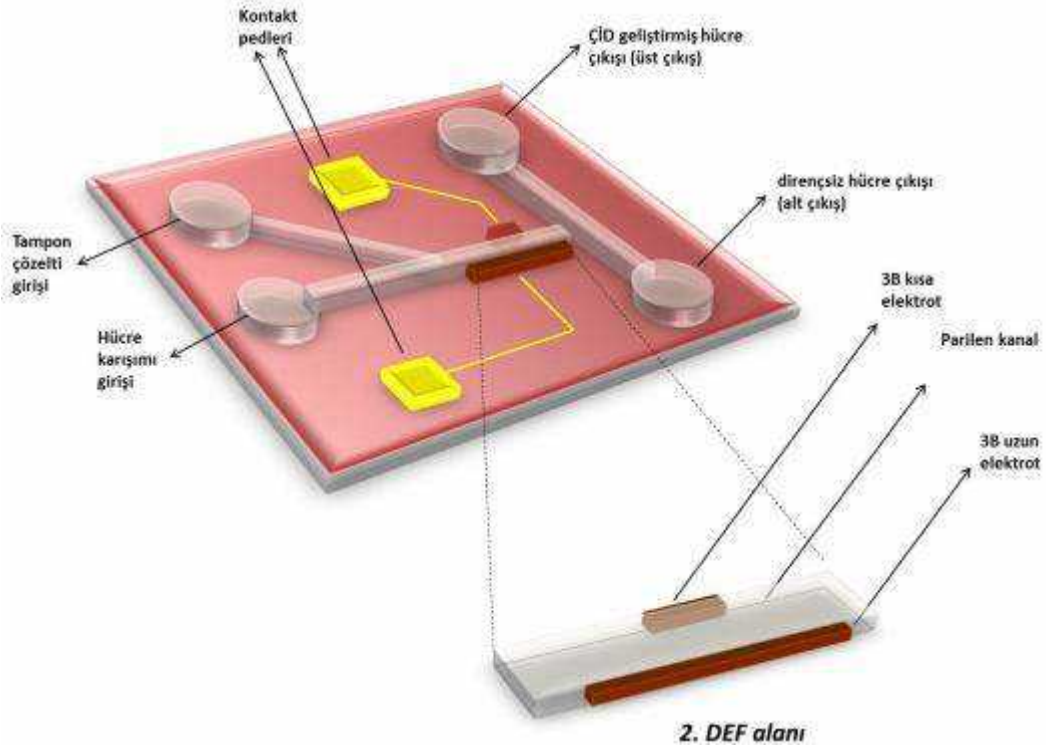
Şekil 32. Elektrokaplama litografisi sırasında fotorezistte oluşan kırılmalar

3.4.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması

ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerinin ilaca duyarlı kanser hücrelerinden ayrıştırıldığı alan projenin son ürün çipinin 2. DEF alanı olarak isimlendirilmiştir. 2. DEF alanı olarak tasarlanan birinci nesil DEF çipinin tasarımı ve COMSOL simülasyonları ile optimize edilen parametreleri, üretim akışı ve test edilme prosedürü aşağıda verilmiştir.

Tasarım:

ÇİD geliştirmiş olan kanser hücrelerini ilaca duyarlı olanlardan ayırmak için önerilen, 3 boyutlu elektrot yapısında DEF teorisi kavramının ispatı için öncelikle Şekil 33’te şematik olarak verilen kanal ve elektrot yapıları tasarlanmıştır.



Şekil 33. ÇİD geliştirmiş ve dirençsiz kanser hücrelerinin ayrışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla tasarlanan birinci nesil DEF çipinin yapısı.

Elektrot yapısı, boyutları ve ayrıştırıcı içindeki konumları: Homojen olmayan elektrik alan elde edilebilmesi adına, elektrotlardan bir tanesi kısa bir tanesi uzun olacak ve kanalın iki yanında karşılıklı duracak şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca DEF kuvvetinde kayıp olmaması için elektrotlar kanal yüksekliği boyunca uzatılmıştır. Hücre çapı maksimum 20 μm olup en azından iki hücrenin yan yana geçebilmesi için elektrotlar arası uzaklık, yani kanal genişliği, minimum 50 μm ; DEF kuvveti elektrik alan kuvveti ile doğru orantılı olduğundan bu uzaklık maksimum 75 μm olarak belirlenmiştir. Bu nedenle 2 farklı kanal genişliği ile dizayn yapılmıştır. Kanal yüksekliği tüm çiplerde sabit tutulmuş ve birinci nesil üretimi için 25 μm olarak seçilmiştir çünkü akan bir sıvı içerisinde boyutu maksimum 20 μm olan hücrelere odaklama yapmak kanal yüksekliği arttıkça zorlaşmaktadır.

Kısa ve uzun elektrotların boyunu belirlemek için uzun elektrotlarınki 600, 900 ve 1000 μm değerlerinde sabit tutulmuş ve kısa elektrotların boyuna, kanal genişliği ve uzun elektrot boyu göz önüne alınarak, simülasyonlar sonucu 40 ve 60 μm olarak karar verilmiştir. Buna göre tasarlanan farklı çiplerin elektrot ve kanal genişliği parametreleri Tablo 6'da verilmiştir. Uzun elektrot ve kısa elektrotların boyutuna göre yapılan bu 4 farklı dizaynın amacı daha düşük voltajlar kullanılarak da ayrışmanın gerçekleştirilebileceğini göstermektir. Çünkü kullanılan voltajın düşük olması DEF çiplerinin hasta başı analizlerde kullanılmasını sağlamaktadır.

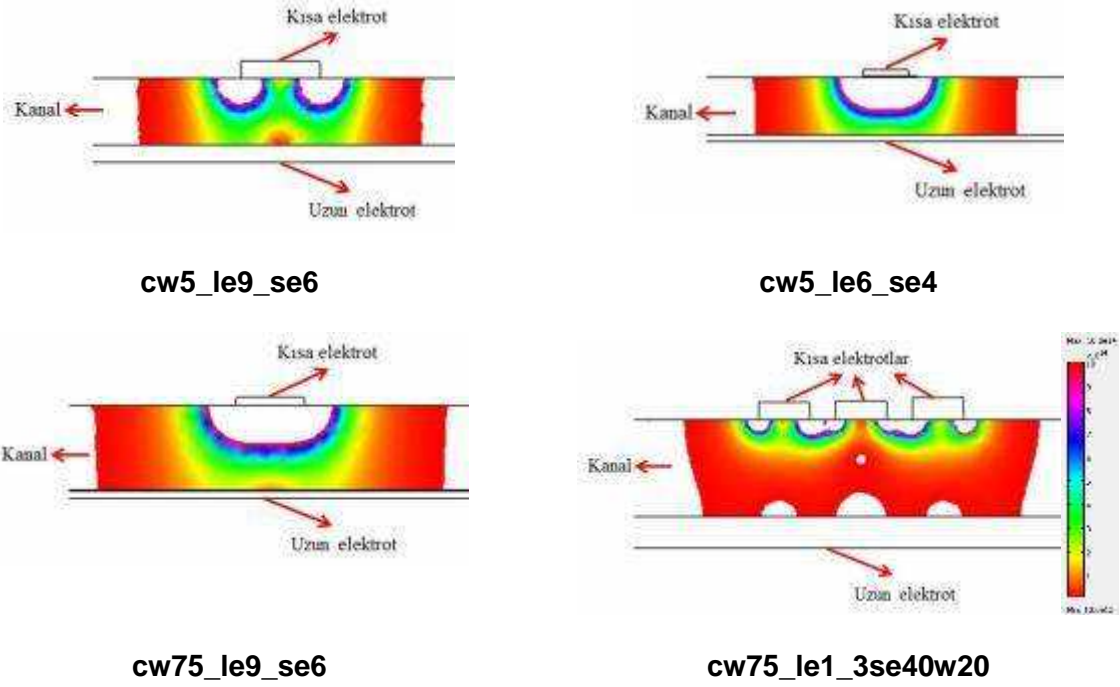
Tablo 6. Dirençli ve duyarlı kanser hücrelerinin ayrıştırılması için tasarlanan birinci nesil DEF çiplerinin kanal ve elektrotlarının boyutları.

Çip kodu	Kanal genişliği (µm)	Uzun elektrot boyu (µm)	Kısa elektrot boyu (µm)	Kısa elektrot sayısı
cw5_le9_se6	50	900	60	1
cw5_le6_se4	50	600	40	1
cw75_le9_se6	75	900	60	1
cw75_le1_3se40w20	75	1000	40	3

Mikro kanalın yapısı ve boyutları: Hücreler kanala girdiklerinde hızları değişken olabilir. Bu sebeple denge durumuna ulaşma sürelerinin belirlenmesi için MATLAB simülasyonları yapılmış ve bu süre zarfında almaları gereken yol 250 µm olarak belirlenmiştir. Hücre ve tampon çözelti girişleri minimum 250 µm uzunluğunda tasarlanmıştır. Hücrelerin kanal içerisinde akışa kapılıp rastgele dağılmaması için kanala ilk girdikleri sırada hidrodinamik olarak odaklanmaları sağlanacaktır. Bu sayede kanala gelen tüm hücreler DEF kuvvetinin en yoğun olduğu bölgeden geçerek alt tarafta bulunan çıkışa yönlendirilecektir (Şekil 33). Bu nedenle kanal girişi Y-kanal yapısı şeklinde tasarlanmıştır. Gelen sıvıyı yarı yarıya ayırıp akış üzerinde kanal çıkışının etkisini sıfırlamak adına kanal çıkışı ise T-kanal şeklinde tasarlanmıştır. Duyarlı kanser hücreleri alt tarafta bulunan çıkışa yönlendirildikleri halde ÇİD geliştirmiş olanlar DEF kuvveti sayesinde üst tarafa doğru çekileceklerinden üst çıkışta toplanacaklardır (Şekil 33).

Uygulanacak olan voltajın büyüklüğü ve frekansı: “Bulgular” bölümünde bahsedildiği gibi, MATLAB simülasyonlarına göre ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri ile duyarlı olanların ayrıştırılabileceği frekans 48.64 MHz olarak belirlenmiştir. Belirlenen frekansta ÇİD geliştirmiş hücreler pozitif DEF kuvveti görürken, duyarlı olanlar negatif ve çok küçük bir DEF kuvvetine maruz kalacaklardır. Uygulanacak voltajın büyüklüğü yapılan simülasyonlar ile minimum $3.7 V_{peak}$ maksimum $10 V_{peak}$ olarak belirlenmiştir.

COMSOL simülasyonları gerçekleştirirken üçüncü boyuta, yani kanal derinliği boyunca, simülasyona gerek görülmemiştir, çünkü, elektrotlar kanal yüksekliği boyunca uzanmakta ve elektriksel alan kuvvetinde 3. boyutta değişim oluşmamaktadır. Bu nedenle 2 boyutta parçacığın maruz kaldığı homojen olmayan elektrik alanının değişimi ($\nabla|E|^2$) simüle edilmiştir. Şekil 34 pul üzerinde yer alan 4 farklı dizayn için simüle edilen bu değeri kısa elektrot etrafına odaklı bir şekilde renk/değer skalası ile birlikte göstermektedir. COMSOL simülasyonları ile optimize edilen deney değerleri 4 farklı dizayn için Tablo 7’de verilmiştir.



Şekil 34. ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerini ilaca duyarlı olanlardan ayırmak için tasarlanan 4 farklı çip için 2 boyutta parçacığın maruz kaldığı elektrik alanın karesinin alansal değişiminin simülasyonu.

Tablo 7. ÇİD geliştirmiş ve dirençsiz kanser hücrelerinin ayrışmasının sağlanacağı 4 farklı DEF çipi dizaynı için belirlenmiş basınç ve hız değerleri.

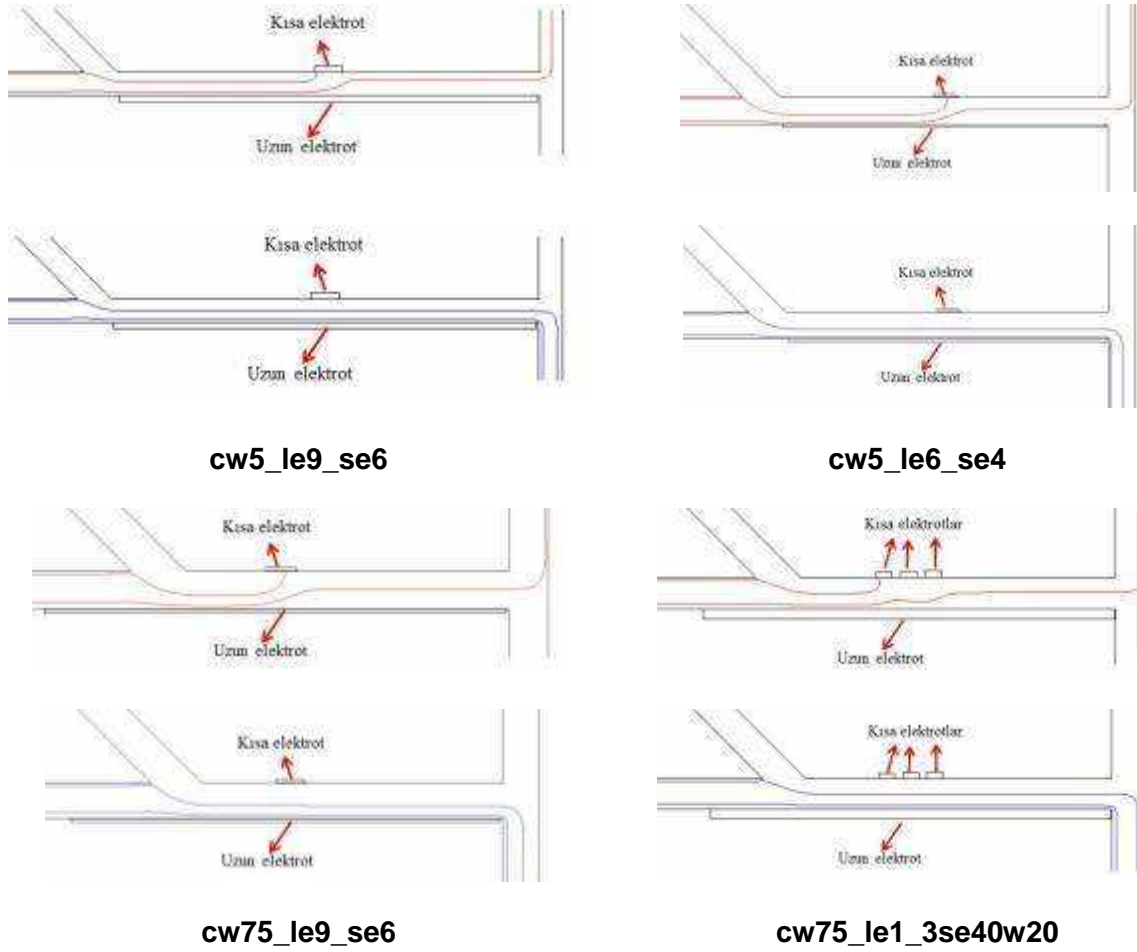
Çip kodu	Hız (m/s)	Basınç (Pa)
cw5_le9_se6	0.008	17500
cw5_le6_se4	0.008	18500
cw75_le9_se6	0.008	10000
cw75_le1_3se40w20	0.008	10000

“Bulgular” bölümünde açıklanan MATLAB simülasyonlarına göre ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri ile dirençsiz olanların ayrıştırılabileceği frekans 48.64 MHz olarak belirlenmiştir. Şekil 73’te görüldüğü gibi bu frekansta ÇİD geliştirmiş hücrelerin $Re(f_{CM})$ değeri 0.3619 iken dirençsiz olanları -0.01752’dir. Bu değerler kullanılarak, katsayı DEF ÇİD geliştirmiş ve dirençsiz kanser hücreleri için sırasıyla 4.574×10^{-18} ve -2.21×10^{-19} olarak hesaplanmıştır.

Belirlenen frekans 48.64 MHz olduğundan simülasyon süresi 2.056×10^{-8} s şeklinde, zaman artış adımı ise maksimum elektrik alan kuvvetinin oluştuğu noktaları yakalamak adına 5.14×10^{-9} s olarak belirlenmiştir. Frekans değerinin çok yüksek olması sebebiyle simülasyon süresi ve elektrik alan kuvvetinin oluştuğu zaman aralıkları nanosaniye seviyesindedir. Bu

sebeple parçacık DEF alanından geçerken >2000 defa maksimum elektrik alana maruz kalmakta bu değer de DEF kuvvetinden etkilenmesi için yeterli olmaktadır.

Şekil 35, 4 farklı dizayn için ayrışmanın gerçekleştiğini gösteren hücre hareketi simülasyonlarını içermektedir. Dirençsiz hücreler hidrodinamik olarak aşağıdaki çıkışa yönlendirilirken DEF kuvveti ile çekilen ÇİD geliştirmiş hücreler yukarıdaki çıkışa doğru gitmektedirler.

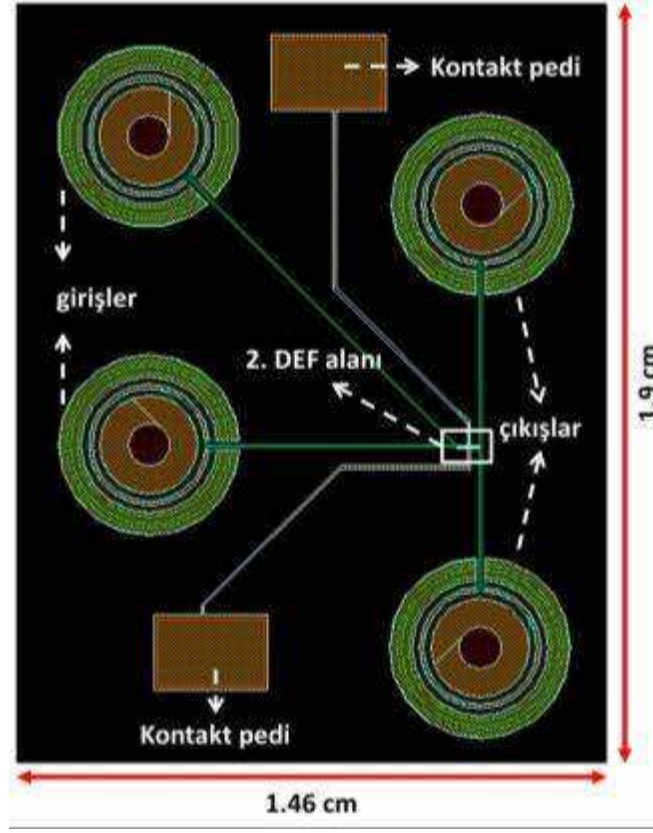


Şekil 35. ÇİD geliştirmiş ve duyarlı K562 lösemi kanser hücrelerinin ayrışmasının sağlanacağı 4 farklı DEF çipi dizaynı için ayrışmanın gerçekleştiğini gösteren hücre hareketi simülasyonları. Bu simülasyonlar sırasında minimum 3.7 Vpeak maksimum 10 Vpeak voltaj değerleri kullanılmıştır. Basınç ve hız değerleri Tablo Z'de verildiği gibidir. Kırmızı çizgiler ÇİD geliştirmiş hücrelerin, mavi çizgiler ise dirençsiz hücrelerin izleyeceği yolu göstermektedir.

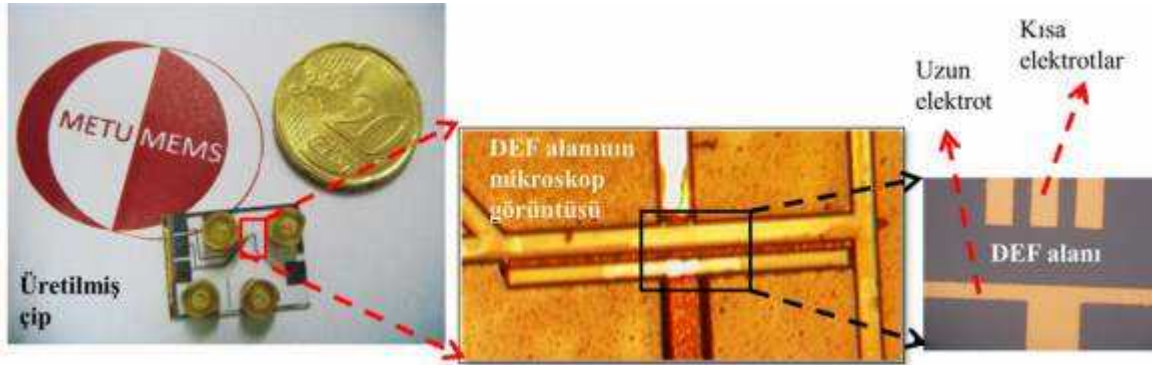
Üretim:

2. DEF alanı için tasarlanan birinci nesil DEF çipinin maske setlerinin serimleri Şekil 36'da verilmektedir. Çipler, kan hücrelerinin kanser hücrelerinden ayrılması için tasarlanan 1. DEF

alanı çipleri ile aynı şekilde üretilmiştir (Bölüm 3.4.1, Şekil 30). Üretilen çiplere ait görseller Şekil 37'de verilmektedir.



Şekil 36. 2. DEF alanı için tasarlanan birinci nesil DEF çipine ait maske setleri.



Şekil 37. ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri ile ilaca duyarlı olanların ayrılması için tasarlanmış birinci nesil DEF çipleri.

Testler:

Birinci nesil çiplerin testleri maya hücreleri ile kapiler akış altında yapılmıştır. Akış kapiler olduğundan yüksek hızlı kamera yerine normal kamera kullanılmıştır.

Birinci nesil DEF çiplerinin ilk testleri canlı ve ölü maya hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle 1 g yaş maya 2 ml suya glikoz ile eklenerek 2 saat 37°C'de, maya hücrelerinin canlanması ve çoğalması için bekletilmiştir. Ardından bu solüsyonun yarısı ayrılıp diğer yarısı 95°C'de 20 dakika tutulmuştur ve hücrelerin ölmesi sağlanmıştır. Sonra bu iki popülasyon karıştırılmış ve *trypan blue* isimli ölü hücreye eklendiğinde hücrenin rengini koyu maviye çeviren boya ile boyanmıştır. Canlı ve ölü maya hücrelerinin dielektrik özellikleri farklı boyutları neredeyse aynıdır. Bu sebeple DEF ile ayrıştırılabilir olmaları gerekmektedir. Hücreler literatürdeki bilgilere göre modellenmiş ve ölü hücrelerin sıfır DEF kuvveti gördüğü frekans 1.45 MHz olarak belirlenmiştir. Aynı frekansta canlı hücrelerin pozitif DEF kuvveti ile elektrotlara doğru çekilmeleri gerekmektedir. Elde edilen test sonuçları "Bulgular" bölümünde sunulmaktadır.

3.5 İkinci Nesil DEF Çipleri

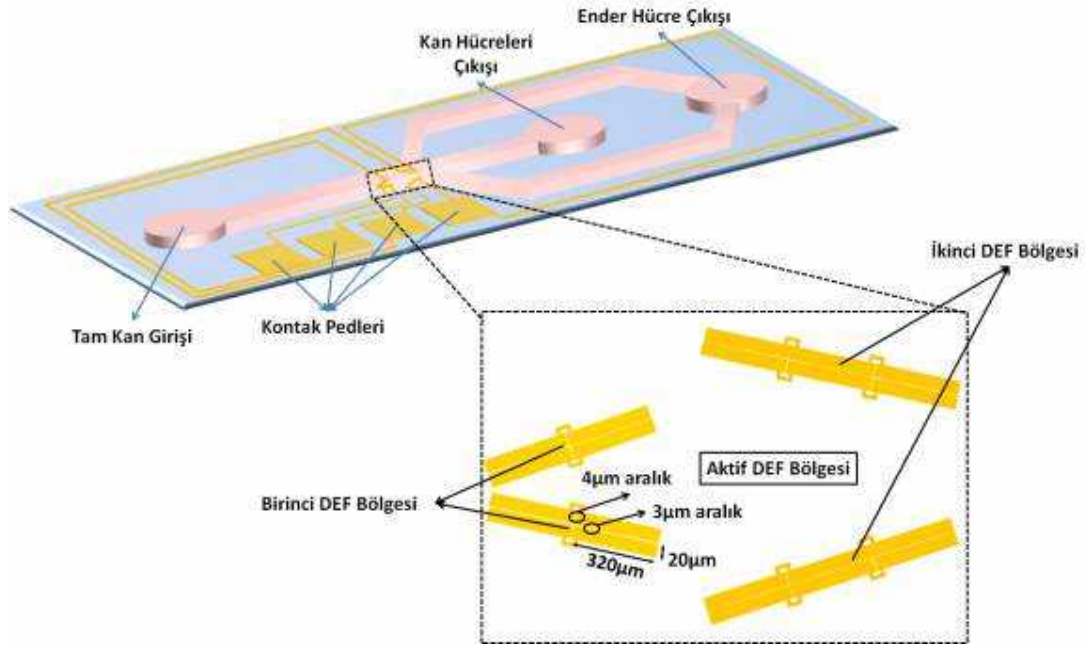
3.5.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması

Tasarım:

Tasarımda, genel negatif dielektroforez prensibi hücrelerin ayrıştırılması için tercih edilmiştir. Tasarım, bir adet giriş ve üç adet çıkış kanalına sahiptir. Düzlemsel elektrotların kanal tabanındaki yerleşimi negatif dielektroforez prensibinin işleyişine göre tasarlanmıştır. Giriş yolundan verilen eritrosit ve K562 kanser hücreleri karışımı ilk olarak birincil elektrot bölgesine ulaşacak ve burada tüm hücreler "Bulgular" bölümünde açıklanan MATLAB simülasyon sonucundan seçilen 5 kHz frekansa göre ana kanalın yan duvarlarına doğru yönelecek ve ikincil elektrot bölgesine hücreler iki kanaldan verilmiş gibi ulaşacaklardır. İkincil elektrot bölgesinde elektrotların frekansları, 26.3 kHz olarak uygulanacak ve hücreler aynı MATLAB simülasyonuna göre farklı tepkiler oluşturacaklardır. Eritrositler bu frekans değerinde negatif dielektroforetik özellik görüp, elektrot geometrisi boyunca ilerleyerek orta çıkış kanalına yöneleceklerdir. K562 kanser hücreleri ise bu frekansta dielektroforetik alan etkisi altında kalmadan normal akışlarına devam ederek, üst ve alt çıkış kanallarına yöneleceklerdir.

Tasarımın özelliği, hücre karışımının ana kanala verilmesi sırasında tampon sıvıya ihtiyaç duyulmaksızın, sadece dielektroforez etkisiyle aktif yönlendirmenin sağlanabilmesidir.

Şekil 38 ikinci nesil DEF çiplerinin şematüğünü göstermektedir. Tasarımdaki DEF alanıyla ilgili tüm parametreler Tablo 8'de belirtilmiştir.



Şekil 38. İkinci Nesil DEF Çiplerinin Şematığı.

Tablo 8. İkinci Nesil DEF Alanı Parametreleri.

Parametre	Ana Kanal	Elektrotlar	Çıkış Kanalları
Uzunluk	8970 µm	320 µm	-
Genişlik	1000 µm	20 µm	500 µm, 2x300 µm
Yükseklik	40 µm	0.4 µm	40 µm
Malzeme Türü	Parilen C	Altın	Parilen C
Malzeme Kalınlığı	20 µm	-	20 µm
Yalıtım Tabakası Kalınlığı	-	0.5 µm	-
Giriş&Çıkış Kanalı Açılı	-	-	-45°, 0°, 45°
Elektrot Türü	-	Düzlemsel	-
Elektrot Açılı	-	15°	-
Elektrot Aralıkları	-	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	-
Ana Kanal ile Elektrotlar Arası Mesafe	5 µm	5 µm	-
Elektrot Sayısı	-	20	-
Gerilim Genliği	-	>10 V _{pp}	-
Gerilim Frekansları	-	5 kHz & 26.3 kHz	-

MATLAB benzetimleri yapılırken, testlerde kullanılacak sıvıya uygun olarak, kanal içindeki sıvının iletkenliği 10 mS/m ve geçirgenlik katsayısı 78 olarak alınmıştır. MATLAB'dan elde edilen $Re(f_{CM})$ -frekans değişim grafikleri "Bulgular" bölümünde sunulmaktadır.

Bu tasarımın çalışabilirliğinin gösterilmesi için üç boyutlu benzetimlere ihtiyaç duyulmuştur. Bunun sebebi, düzlemsel elektrotların ana kanalın tabanında kullanılması ve bu nedenle z yönünde elektriksel alan değişiminin oluşmasıdır. Kanal yükseklikleri, bu parametrenin değişmediği seviyeye göre ayarlanmıştır.

Simülasyonlar sırasında, testlerde kullanılacak sıvıya uygun olarak, kanal içindeki sıvının iletkenliği 10 mS/m, geçirgenlik katsayısı 78 ve akışkanlığı 8.92×10^{-4} Pa.s olarak alınmıştır.

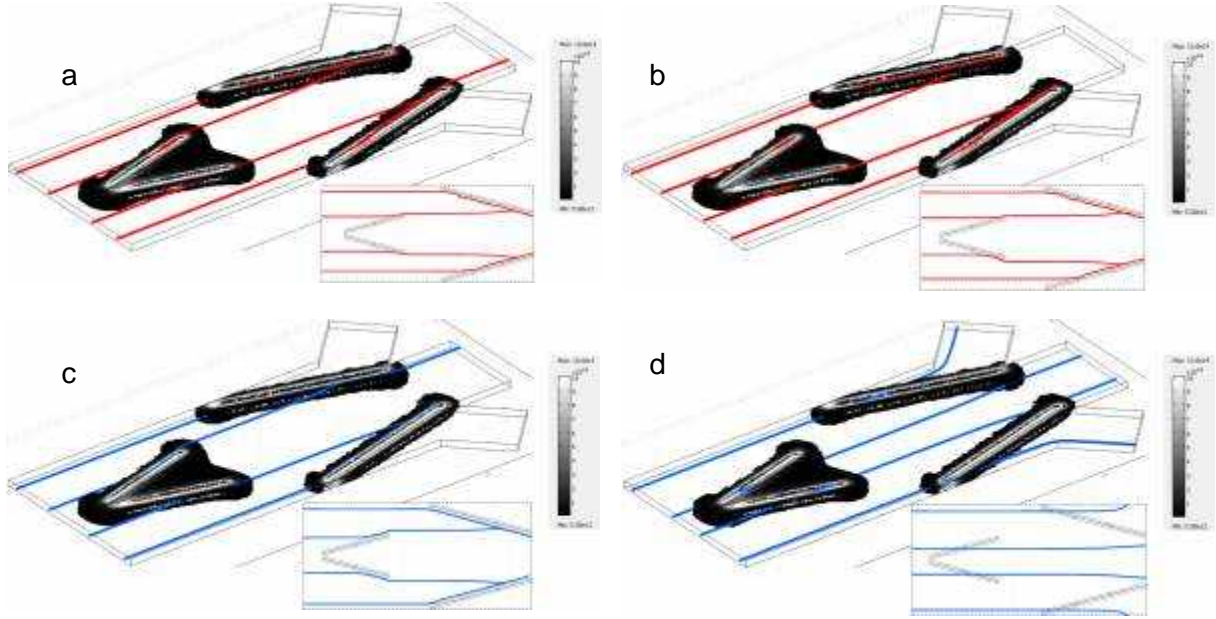
Elektrik alan simülasyonlarına ek olarak hücrelerin kanal içindeki hareketini temsil edecek akış çizgisi simülasyonları da gerçekleştirilmiştir. Akış çizgisi simülasyonları eritrositler ve K562 kanser hücrelerinin sahip oldukları dielektrik özelliklere göre oluşturulmuştur.

Negatif dielektroforez alanı hesaplamaları akış çizgisi simülasyonlarına uygulanırken, formüllerin üç boyuta uyarlanması sağlanarak COMSOL'da kullanılmak üzere hız akış formülleri güncellenmiştir ve Tablo 9'da kullanılan değerler gösterilmektedir.

Tablo 9. Eritrosit ve K562 Kanser Hücrelerinin Akış Formülüne Eklenen Değerleri.

	Ortalama Hücre Yarıçapı (μm)	Medium geçirgenlik katsayısı (ϵ_m)	Medium akışkanlığı (Pa.s)	5kHz seviyesindeki sabit	26.3kHz seviyesindeki sabit
Eritrositler	3.20	78	8.92×10^{-4}	1.188×10^{-18}	9.464×10^{-19}
K562 Kanser Hücreleri	8.70	78	8.92×10^{-4}	7.043×10^{-18}	2.595×10^{-21}

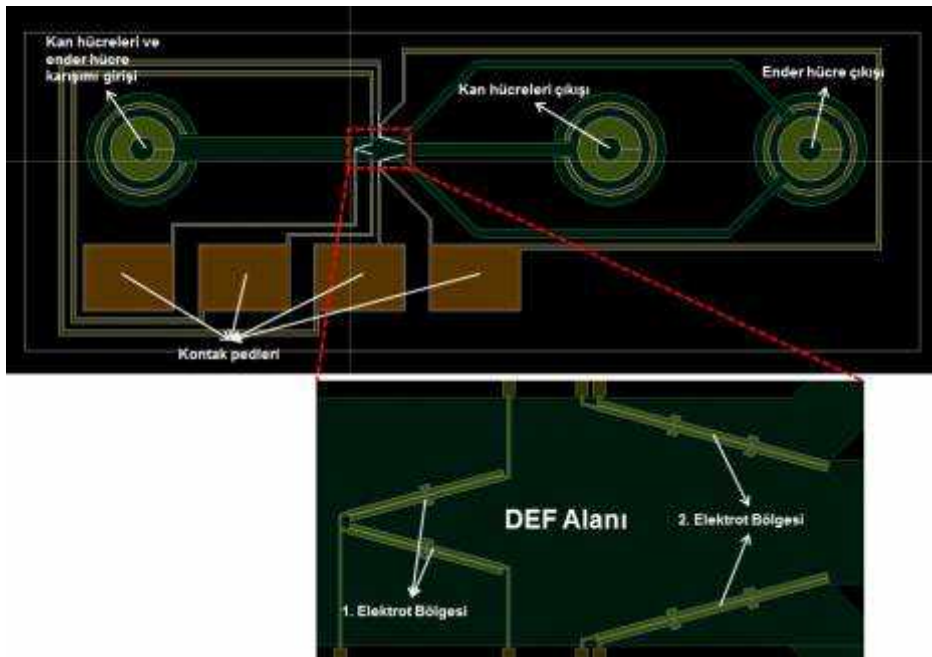
Elektrik alan karesinin alansal değişimi simülasyonu ile akış çizgisi simülasyonları aynı sistemde çözümlenerek hücrelerin akış boyunca yönelimlerini gösteren şekiller oluşturulmuştur (Şekil 39).



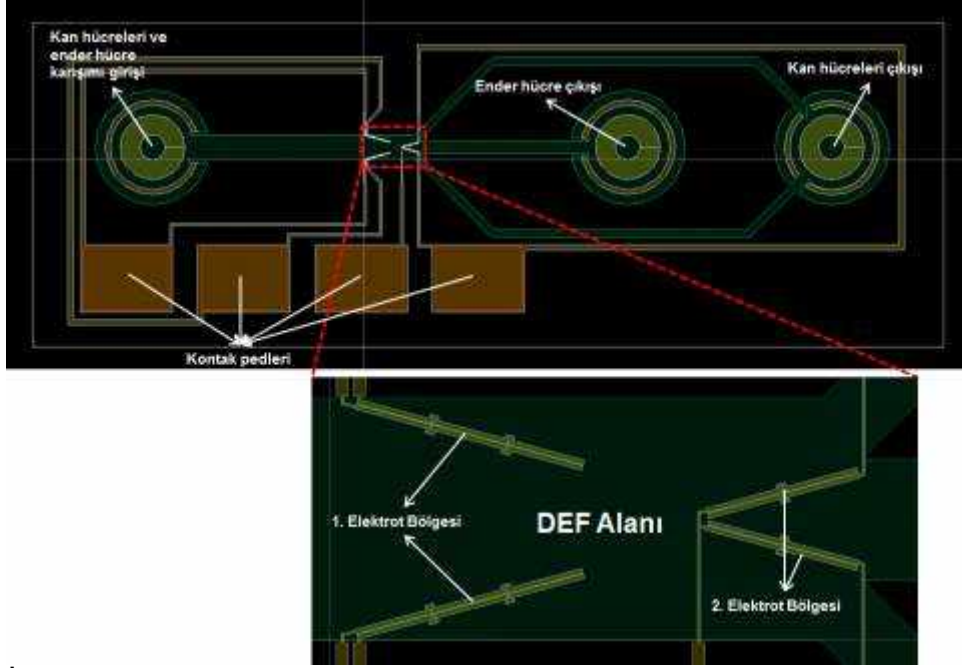
Şekil 39. K562 ve eritrositler için farklı frekanslarda elektrik alan karesinin alansal değişimi üç boyutlu simülasyonu ile akış çizgisi simülasyonları. (a) Eritrositler için 5 kHz'deki üç boyutlu benzetim, (b) Eritrositler için 26.3 kHz'deki üç boyutlu benzetim, (c) K562 kanser hücreleri için 5 kHz'deki üç boyutlu benzetim, (d) K562 kanser hücreleri için 26.3 kHz'deki üç boyutlu benzetim.

Üretim:

İkinci nesil DEF çiplerinin üretimi için kullanılan maske setlerine ait çizimler Şekil 40 ve Şekil 41'de verilmektedir. Düzlemsel elektrot sistemi için iki farklı tasarım yapılmıştır.

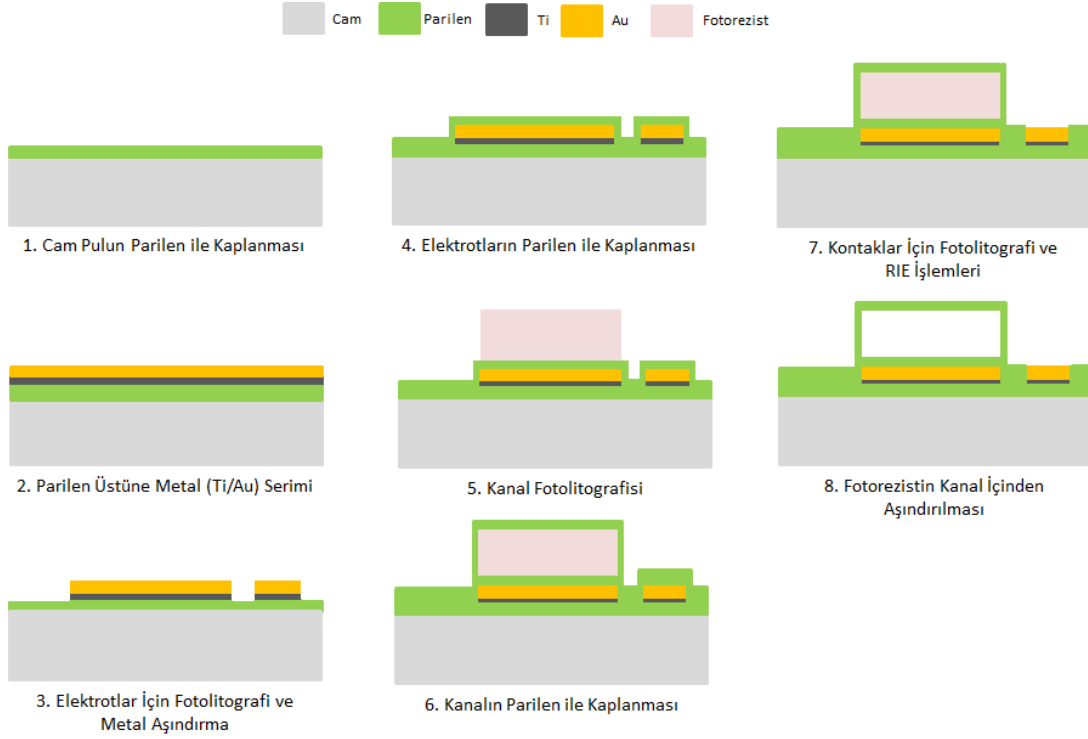


Şekil 40. İkinci nesil DEF çipinin maske çizimi ve DEF alanı yakın görünüm (Tasarım 1).

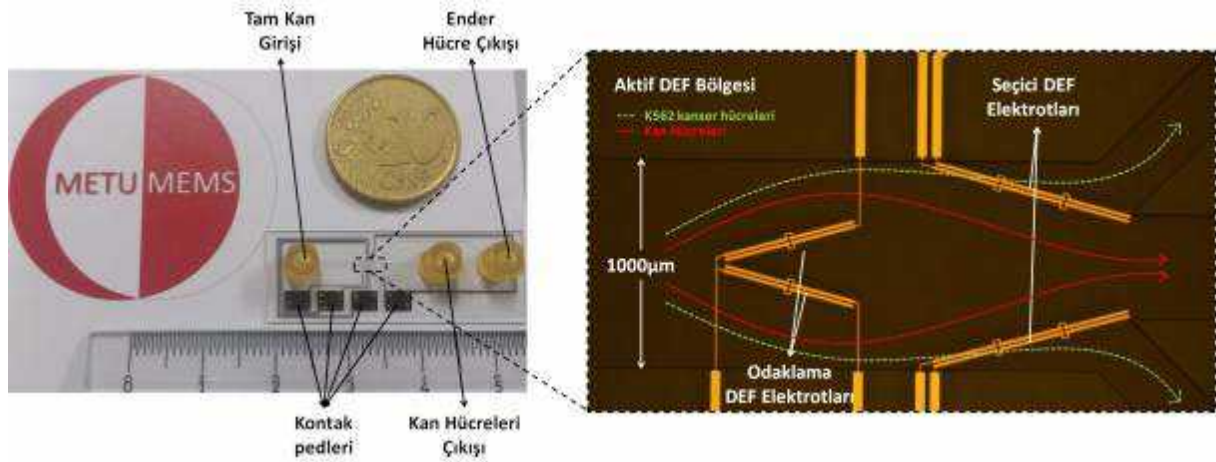


Şekil 41. İkinci nesil DEF çipinin maske çizimi ve DEF alanı yakın görünümü (Tasarım 2).

Düzlemsel elektrot sistemi tasarımı için planlanan üretim şeması Şekil 42'de gösterilmektedir. Farklı mikroskop çeşitleri (normal veya ters) ile gözlem yapılabilmesi adına taban malzemesi olarak cam seçilmiştir. Au yüzeye tutunmadığından, tutucu olarak Ti kaplanıp kullanılmıştır. Ti üstüne yine püskürtme tekniği ile Au tabaka kaplanmıştır. Ti ve Au'nun şekillendirilmesinde kullanılacak kimyasal aşındırma işlemi için fotorezist kaplama, UV maruziyeti ve fotorezist geliştirici ile şekillendirme işlemleri uygulanmıştır. Ardından Au ve Ti aşındırıcılar kullanılarak, Ti ve Au tabaka şekillendirilmesi tamamlanmıştır. Yüzeyde kalan fotorezist aseton ile yıkanmıştır. Elektrotların oluşumu bu şekilde tamamlanmıştır. Düzlemsel elektrotlar üç boyuta ihtiyaç duymadıkları için elektro kaplama tekniğinin uygulanmasına gerek kalmamıştır. Ti ve Au kaplamalarının ardından, yüzey ince bir Parilen tabakası kaplanmıştır. Bu ara basamak üretim sırasında Au tabakanın altında açıkta kalmış olan Ti materyalinin sıvı ile temasını yok ederek, baloncuk oluşumunu engellemesi sağlanmıştır. Ardından kanal oluşumu için litografi işlemi tekrarlanmıştır. Oluşturulan kanalın kalın bir Parilen tabakası ile kaplanmasıyla, duvarları ve tavanı oluşturulmuştur. RIE işlemi ile oluşturulan açıklıkların yeri belirlenerek kanal giriş çıkışları ve elektrot kontaklarının açılması sağlanmıştır. Son işlemde fotorezist kanal içinden aşındırılarak kanallar açığa çıkartılmıştır. Üretilen ikinci nesil DEF çipleri Şekil 43'te sunulmaktadır.



Şekil 42. İkinci nesil DEF çiplerinin üretiminde izlenen üretim şeması.



Şekil 43. Üretilen İkinci Nesil DEF Çipleri.

Testler:

İlk üretim şemasına göre üretilen tasarımların testleri, farklı frekansların eritrositler ve K562 dirençsiz hücrelerine uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.

İkinci DEF alanı ikinci nesil DEF çiplerinin test aşamalarında belirlenen test süreci kandan kanser hücrelerinin ayrıştırılması çalışmalarında ana hatlarıyla korunmuştur. Sadece testler sırasında kullanılan iletkenliği 2.5 mS/m olan ve 8.5 % sukroz ile 0.3 % dekstroz içeren sıvının iletkenliği 10 mS/m olarak değiştirilmiştir. Bunun sebebi, MATLAB'ta yapılan frekans

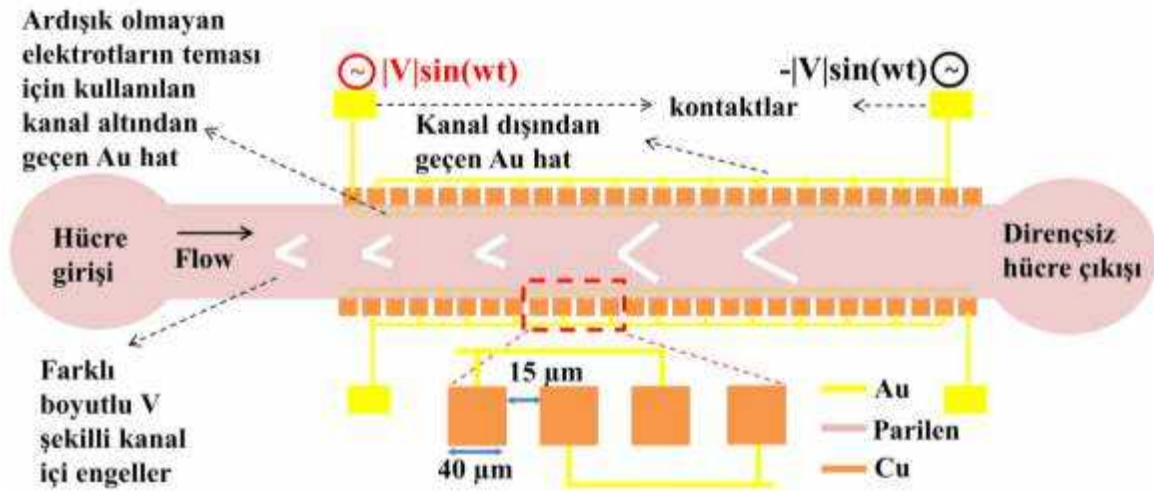
karşılaştırmalarında 10mS/m seviyesindeki ayrıştırmanın 2.5mS/m seviyesine göre daha belirgin olmasıdır. Hücrelerin kanal içinde ayrı ayrı gözlemlenebilmesi için, eritrositler normal ışık altında ve K562 dirençsiz hücreleri de FDA ile boyanarak test edilmiştir. Hücrelerin hareketleri K562 dirençsiz hücreleri için GFP filtresi kullanılarak floresan mikroskop altında, eritrositler ise filtresiz olarak yüksek çözünürlüklü hızlı kamera (*Evolve 128*) ile gözlenmiştir. Test sonuçları “Bulgular” bölümünde sunulmaktadır.

3.5.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması

“Bulgular” ve “Tartışma/Sonuç” bölümlerinde detaylıca açıklandığı şekilde; birinci nesil DEF çiplerinin testleri aşamasında karşılaşılan sorunlar sebebi ile ikinci nesil DEF çiplerinin tasarımına karar verilmiştir. Birinci nesil DEF çiplerinin testleri sırasında basınç sürümlü sıvı ile test yapıldığında 2 farklı basınçlı sıvı süren cihaz kullanıldığından bu iki cihazın uyumlu çalışmasının özellikle dielektrik özellik temelli ayrıştırmalarda sorun çıkaracağı fark edilmiştir. Ayrıca, bu DEF alanı 2. DEF alanı olacağından 1. DEF alanından gelen sıvıya basınç sürümlü başka bir sıvı ile müdahale etmek test aşamasını karmaşık ve hata oranı yüksek hale getirmektedir. Bundan dolayı, ikinci DEF alanı için, sıvı yönlendirmesini pasif olarak kanal içinde yapabilecek bir tasarım yapılmıştır. İkinci nesil DEF çipinin tasarımı ve COMSOL simülasyonları ile optimize edilen parametreleri, üretim akışı ve test edilme prosedürü aşağıda verilmiştir.

Tasarım:

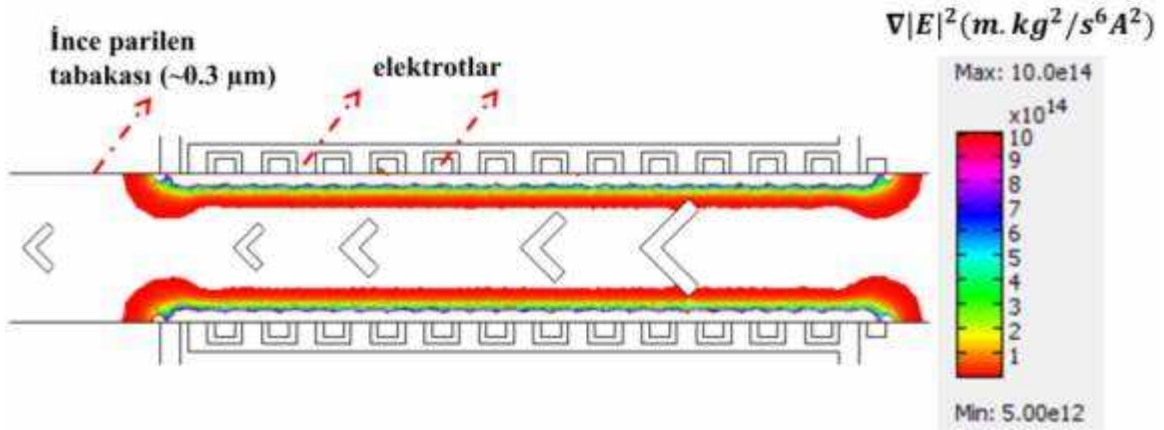
İkinci DEF alanında, herhangi bir basınçlı sıvı akışı kontrolüne ihtiyaç duymaksızın hücre ayrıştırması yapabilecek bir DEF çipi tasarımının yapılması hedeflenmiştir. Bunun için, Şekil 44'te şematığı verilen 2. nesil DEF çipi tasarlanmıştır.



Şekil 44. ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri ile ilaca duyarlı olanların ayrılması için tasarlanmış ikinci nesil DEF çipleri.

Bu tasarımın temel amacı dirençli kanser hücrelerinin elektrotlarda DEF kuvveti ile hapsedilmesi, dirençsiz hücrelerin ise sürekli akan ve şırınga pompası ile akış hızı ayarlanan sıvı ile çıkışa yönlendirilmesidir. Bunun için, 300 μm genişliğinde, 1.5 mm uzunluğunda (DEF alanı) ve 25 μm yüksekliğinde, kanal duvarları boyunca parçalı 3 boyutlu elektrotlardan oluşan bir mikro-kanal yapısı tasarlanmıştır. İçeride kullanılan farklı boyutlardaki V şekilli parilen engeller kanal derinliği (25 μm) boyunca uzanmaktadır ve gelen hücreleri DEF alanına pasif olarak yönlendirmektedirler. Ardışık olmayan 3 boyutlu (40x40x25 μm) elektrotlar kanal altı ve kanal dışından geçen Au hatlar ile temas eder hale getirilerek, tek kontakten hepsinin aynı voltajı alabilmesi sağlanmıştır. Bu sayede, ardışık elektrotlara 180° faz farklı voltaj ile sürülebilme ve homojen olmayan elektrik alan oluşumu sağlanmaktadır. Nümerik simülasyonlarla yapılan tekrarlar ve üretim limitleri göz alınarak; elektrot genişlikleri 40 μm , aralarındaki uzaklık ise 15 μm olarak optimize edilmiştir. Parilen engellerin boyut ve sayılarına da yine nümerik çözümler ile ulaşılmıştır. Çözümler sırasında sıvı akışı için kullanılan “Incompressible Navier-Stokes” eşitlikleri DEF eşitlikleri ile birlikte çözülerek sonuçlara ulaşılmıştır.

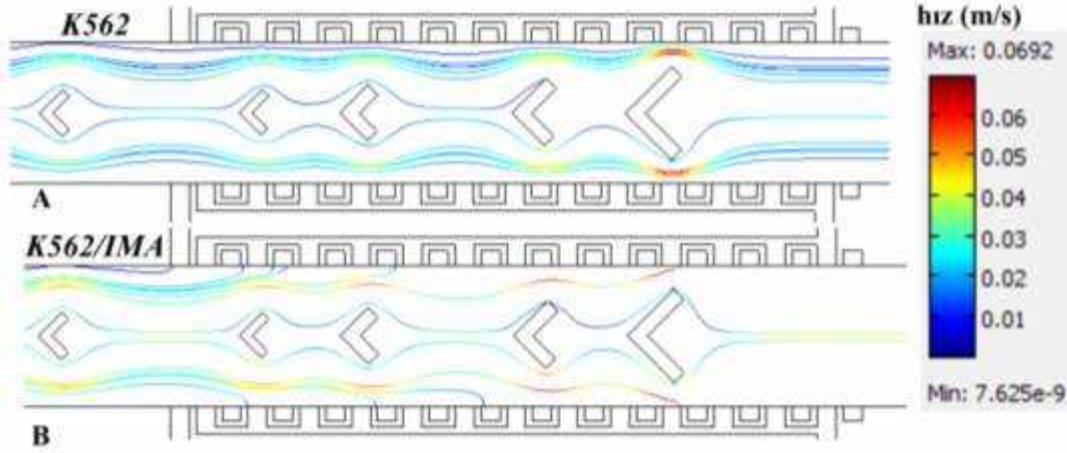
Aşağıdaki şekillerde sonlu element modellemesi ile COMSOL yazılımı kullanılarak yapılmış simülasyon sonuçları görülmektedir. Şekil 45'teki simülasyon elektrik alanının değişiminin DEF kuvveti ile canlı hücre manipülasyonu için yeterli olduğunu ($>10^{12} \text{ kg}^2/\text{s}^6\text{A}^2$) göstermektedir.



Şekil 45. İkinci nesil tasarımın elektrik alan değişiminin simülasyonu.

Şekil 46A'daki simülasyon ilaç dirençliliği göstermeyen kanser hücrelerinin öncelikle V şekilli engeller sebebi ile DEF alanına yönelişini daha sonra DEF kuvvetinden etkilenmeden çıkışa yöneldiklerini göstermektedir. Şekil 46B ise aynı frekans ve voltajda, ilaç dirençliliği geliştirmiş kanser hücrelerinin elektrotlar üzerinde DEF kuvveti ile hapsedildiğini göstermektedir. Bu simülasyona göre bazı direnç geliştirmiş hücrelerin de çıkışa yöneldiği

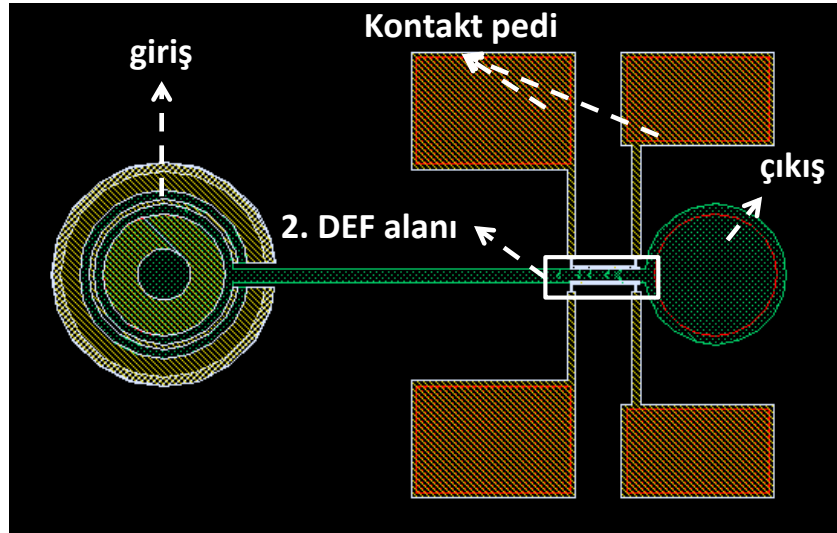
görülmektedir. İkinci nesil DEF çipleri revize edilerek üretilen üçüncü nesil DEF çiplerinde bu durum göz önünde bulundurularak, çip performansı %100'e çıkarılmaya çalışılmıştır.



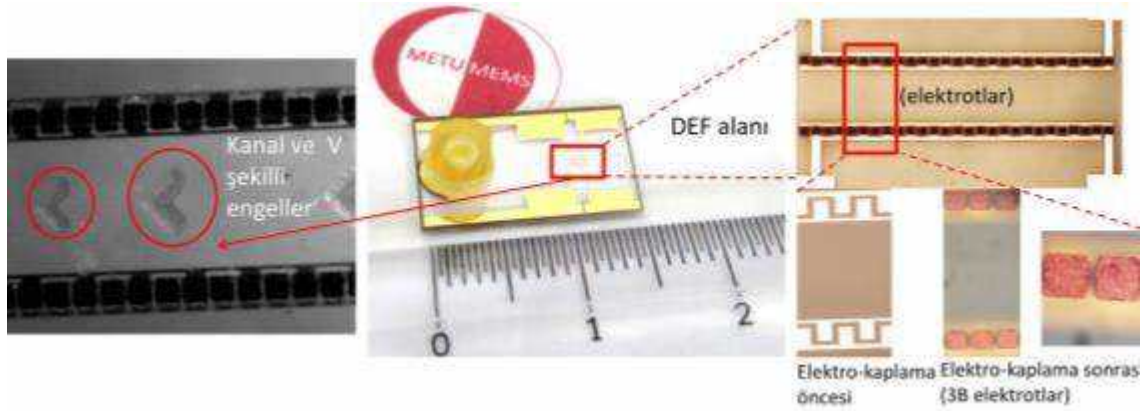
Şekil 46. İkinci nesil çiplerde hücre hareketlerinin simülasyonu. (A) İlaç dirençliliği geliştirmiş kanser hücrelerinin DEF kuvvetinden etkilenmeden çıkışa yönlendirilmesi. (B) Aynı simülasyon şartları altında ilaç dirençliliği geliştirmiş hücrelerin elektrotlar üzerinde hapsedilmesi.

Üretim:

İkinci nesil DEF çiplerinin üretim akışı birinci nesil DEF çipleri ile aynıdır (Şekil 30). İkinci nesil DEF çipi tasarımına ait maske serimleri Şekil 47'de verilmektedir ve Şekil 48 üretilmiş ikinci nesil DEF çiplerini göstermektedir.



Şekil 47. İkinci nesil DEF çipi tasarımına ait maske serimleri.

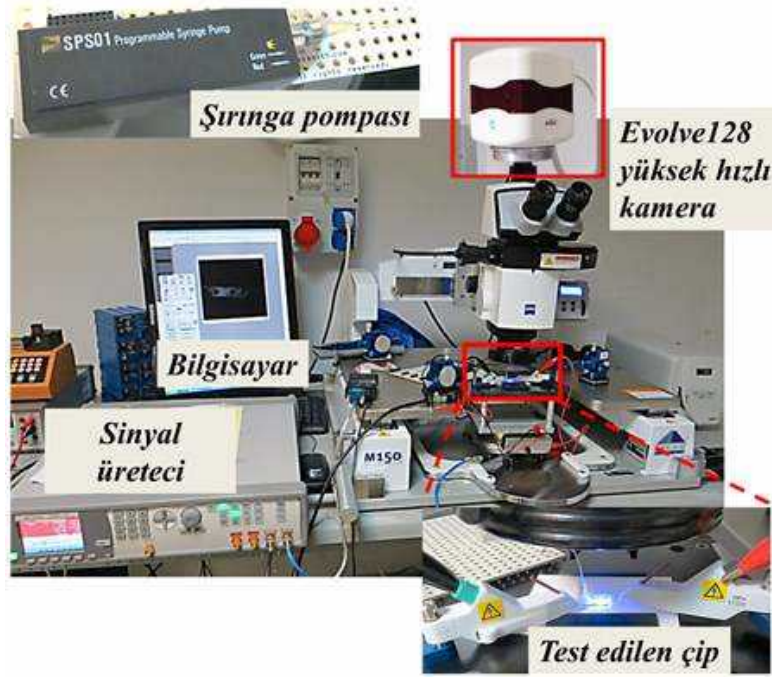


Şekil 48. Üretimi tamamlanan ikinci nesil DEF çipi, V şekilli engeller ve 3 boyutlu elektrotların mikroskop altında alınmış görüntüleri.

Testler:

Üretilen ikinci nesil çipler ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Bu testler sırasında hücreler besi ortamından alınıp iletkenliği 2.5 mS/m olan ve 8.5 % sukroz ile 0.3 % dekstroz içeren sıvıyla 2 kez yıkanmıştır. Hücre sayımı yapılarak testlerin amacına uygun olarak ayarlanmıştır. Hücrelerin kanal içinde gözlemlenebilmesi için, canlı hücreleri boyayan bir floresan boya (Fluorescein diacetate, FDA) kullanılmıştır ($1 \mu\text{l}/10^6$ hücre). Hücre hareketleri GFP filtre kullanılarak floresan mikroskop altında yüksek çözünürlüklü hızlı kamera (*Evolve 128*) ile gözlenmiştir.

Şekil 49 testler sırasında kullanılan deney düzeneğini göstermektedir. FDA floresan bir boya olduğu için testlerin karanlıkta yapılması gerekmektedir. Sürekli kanal içi akışı yüksek hızlarda yapıldığından hücreler yüksek hızla hareket etmektedir. Bu sebeple düşük yoğunluktaki ışıkta yüksek hızla görüntü alabilen *Evolve 128* kamera kullanılmıştır.



Şekil 49. İkinci nesil DEF çiplerinin testi sırasında kullanılan test düzeneği.

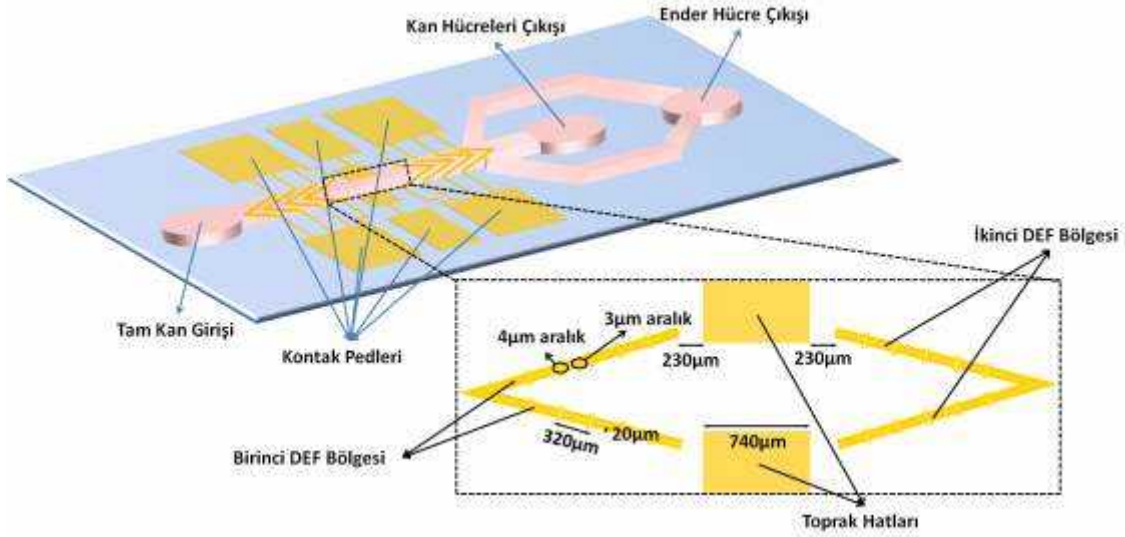
3.6 Üçüncü Nesil DEF Çipleri

3.6.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması

Tasarım:

Son tasarımda bir önceki tasarımda karşılaşılan problemler göz önünde bulundurularak iki yeni alternatif geliştirilmiştir. İlk alternatif, bir önceki tasarımda gözlenen elektrotların orta bölgelerindeki boşluklardan hücre kaçışlarının engellenmesi için elektrot uçlarının birleştirilmesi, farklı DEF bölgeleri arası frekans karışımını engellemek için toprak hattının iki DEF bölgesi arasına eklenmesi ve elektrot sayılarının verimliliğin artırılması için çoğaltılmasını içeren tasarımdır. İlk DEF bölgesi için 5 adet ve ikinci DEF bölgesi için de yine 5 adet elektrot yapısı, uçları birleştirilip, simetrik ve asimetric olarak kanala yerleştirilerek (asimetric olanlar için, elektrot uçları kanal orta çizgisinden y ekseninde $20 \mu\text{m}$ aşağı ve yukarı gelecek şekilde) hücrelerin bir önceki tasarımda açık uç bölgelerinden kaçışlarının engellenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca, farklı frekansların birbirleriyle olan etkileşimini engellemek için farklı DEF bölgeleri arasına iki adet toprak hattı yerleştirilerek frekans karışımının önüne geçilmesi planlanmaktadır. Bu tasarımda hem nDEF hem de pDEF frekansları kullanılabilir. pDEF frekansları, genel anlamda hücre tutuklanması için kullanılıyor olsa da, sıvı akışı ve DEF alanı etkileşiminin hassas şekilde ayarlanmasıyla elektrotlar üzerinde hücrelerin zarar görmeden kaymaları ve yönlendirilmelerinin mümkün olduğu yapılan testlerde gözlemlenmiştir. Ana kanalın yüksekliği, hücrelerin kanaldaki hareketlerine engel olmayacak şekilde, $40 \mu\text{m}$ 'den $20 \mu\text{m}$ 'ye indirilmiştir. Böylece, üretim

aşamasındaki kanal oluşturma basamağının kolaylaştırılması ve kanal içindeki sıvı akışının hızlanması sağlanmıştır. Şekil 50 üçüncü nesil birinci alternatif DEF çiplerinin şematini göstermektedir. Son tasarımın birinci alternatifine ilgili tüm parametreler Tablo 10'da belirtilmiştir.



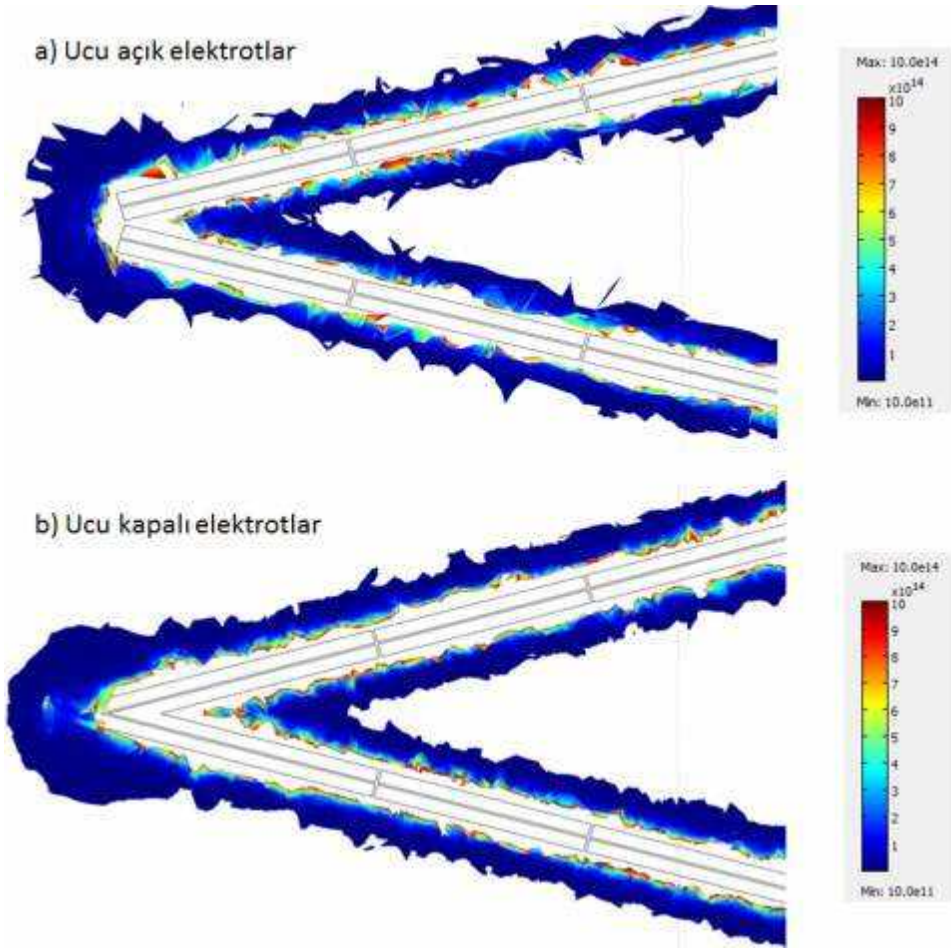
Şekil 50. Üçüncü nesil DEF çiplerinin şematini – Tasarım1.

Bu tasarımlar yapılırken oluşturulan alternatiflerin çalışabilirliğinin gösterilmesi için simülasyonlarına yeni parametreler ışığında devam edilmiştir. Birinci tasarımda ilk olarak elektrotlarının uçlarının kapatılmasının DEF alanını nasıl etkilediği incelenmiştir. Şekil 51 açık ve kapalı elektrot uçları arasındaki DEF alanı değişimini göstermektedir.

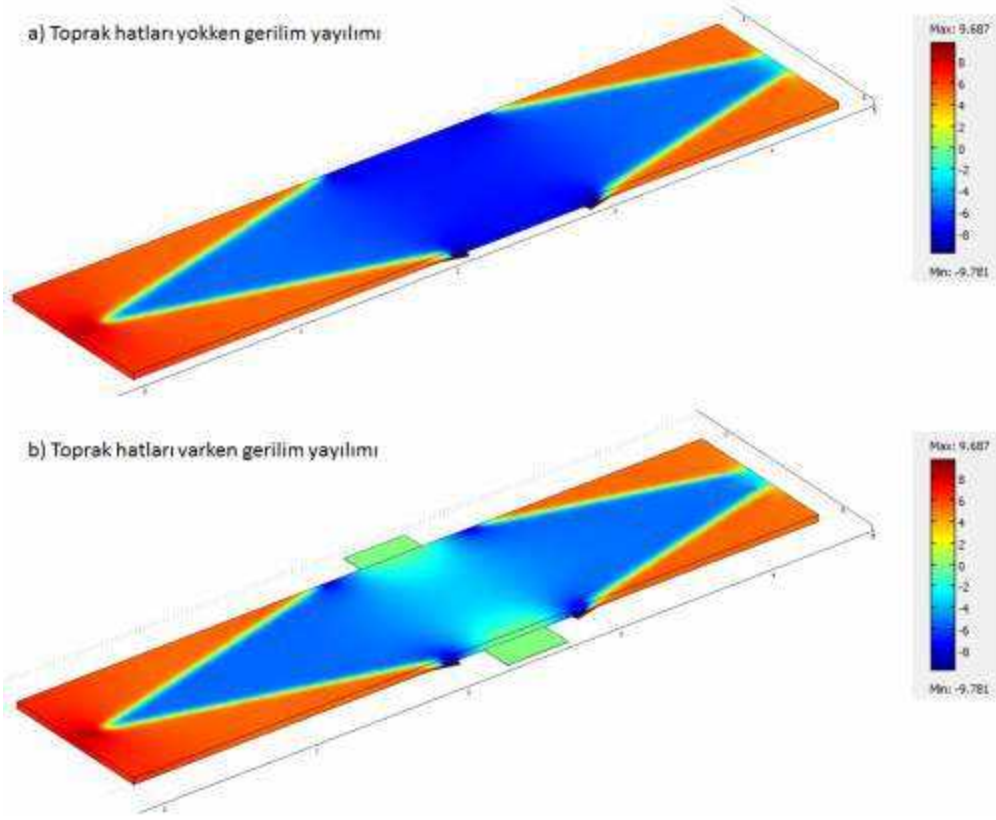
Ucu kapalı elektrotlarda DEF alanının sürekliliği sağlanmıştır. Böylece testlerde elektrot ortalarından hücre kaçışlarının engellenmesi öngörülmektedir. Bu simülasyonlardan sonra, aynı tasarımda farklı elektrot bölgeleri arasına yerleştirilen toprak hatlarının frekans karışımını engelleyip engellemediği kontrol edilmiştir. Şekil 52(a) toprak hatları yokken ve Şekil 52(b) de toprak hatları varken ana kanal içinde elektrot bölgelerindeki gerilim değişimini göstermektedir.

Tablo 10. Üçüncü Nesil DEF Çipleri İçin Parametreler– Tasarım1.

	Ana Kanal	Elektrotlar	Çıkış Kanalları
Uzunluk	13720 μm	320 μm	-
Genişlik	1000 μm	20 μm	1000 μm , 2x500 μm
Yükseklik	20 μm	0.4 μm	20 μm
Malzeme Türü	Parilen C	Altın	Parilen C
Malzeme Kalınlığı	20 μm	-	20 μm
Yalıtım Tabakası Kalınlığı	-	0.5 μm	-
Giriş&Çıkış Kanalı Açıları	-	-	-45°, 0°, 45°
Elektrot Türü	-	Düzlemsel	-
Elektrot Açıları	-	15°	-
Elektrot Aralıkları	-	3 μm (paralel) 4 μm (sıralı)	-
Elektrot Sayısı	-	220	-
Gerilim Genliği	-	>10 V _{pp}	-
Gerilim Frekansları	-	nDEF: 5 kHz & 26.3 kHz pDEF: 1 MHz & 51 MHz	-

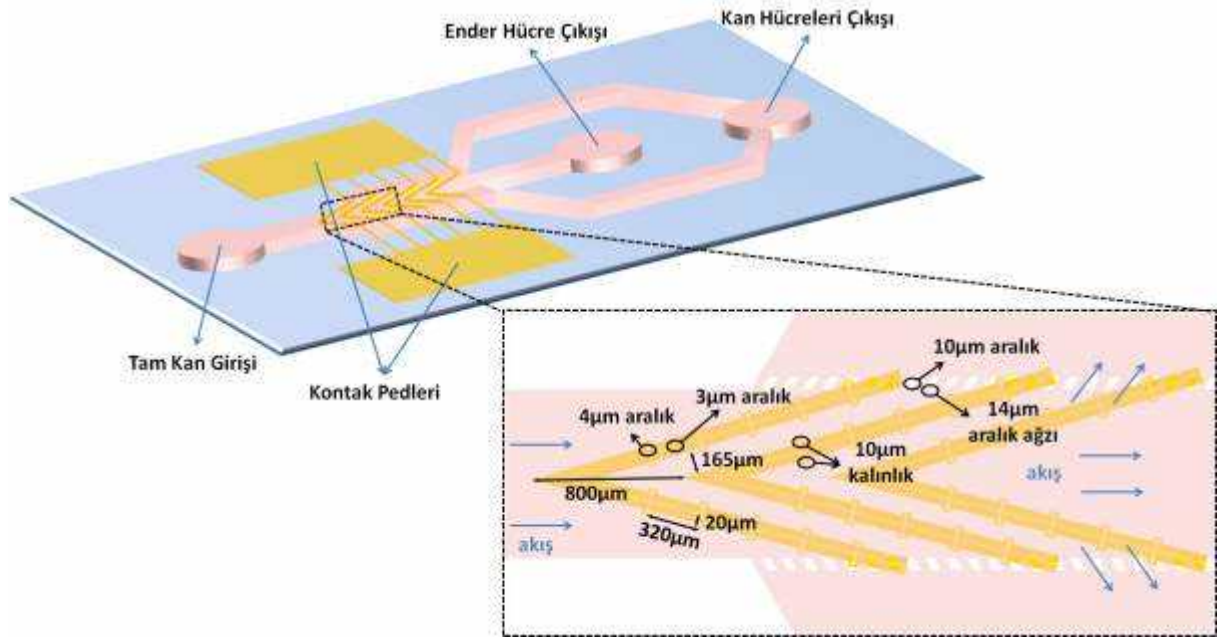


Şekil 51. Ucu açık ve kapalı elektrotlar arasındaki DEF alanı karşılaştırması.



Şekil 52. Toprak hatları yokken (a) ve varken (b) elektrotlardan yayılan gerilim alanları.

İkinci tasarım, sadece pDEF frekans aralığında bir frekans belirlenerek hücrelerin elektrotlar üzerinde kaymasını sağlamak ve ana kanaldan yeni tasarlanan yan kanallara kan hücrelerini geçirecek ama K562 hücrelerini geçiremeyecek büyüklükte geçişlerden ayrıştırmanın (filtreleme) yapılmasını sağlama prensipleri üzerine tasarlanmıştır. Elektrot şekilleri birinci alternatifte olduğu gibi uçları kapalı olacak şekilde ve simetrik ve ana kanalın orta çizgisinden y ekseninde 20 μm aşağı ve yukarı asimetric olarak tasarlanmıştır. Tek bir frekans kullanılarak yönlendirme ve filtreleme yapılacağı için topraklama hatlarına veya ikinci DEF bölgesine ihtiyaç duyulmaması sağlanmıştır. Şekil 53 üçüncü nesil ikinci alternatif DEF çiplerinin şematüğini göstermektedir. Son tasarımın ikinci alternatifıyla ilgili tüm parametreler Tablo 11'de belirtilmiştir.



Şekil 53. Üçüncü nesil DEF çiplerinin şematığı – Tasarım 2.

Tablo 11. Üçüncü nesil DEF çipleri için parametreler– Tasarım 2.

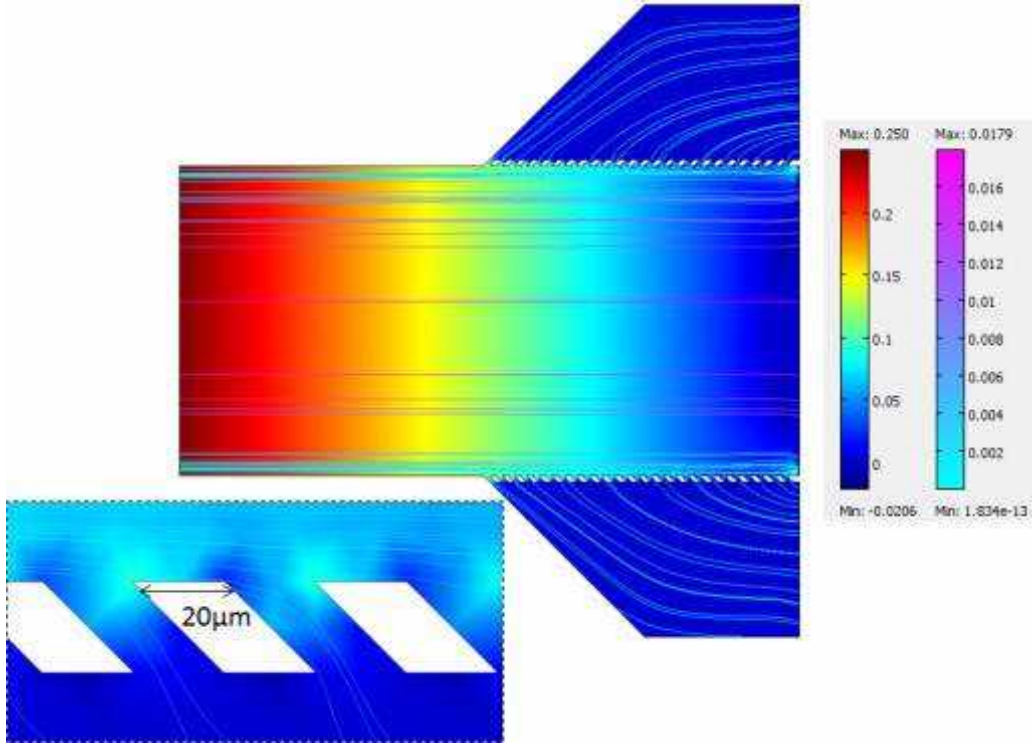
	Ana Kanal	Elektrotlar	Yan Kanallar
Uzunluk	11650 µm	320 µm	-
Genişlik	1000 µm	20 µm	500 µm
Yükseklik	20 µm	0.4 µm	20 µm
Malzeme Türü	Parylene-C	Altın	Parylene-C
Malzeme Kalınlığı	20 µm	-	20 µm
Yalıtım Tabakası Kalınlığı	-	0.5 µm	-
Yan Kanal Açıları	-	-	45°
Elektrot Türü	-	Düzlemsel	-
Elektrotlar Açıları	-	15°	-
Elektrot Aralıkları	-	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	-
Elektrot Sayısı	-	220	-
Gerilim Genliği	-	>10 V _{pp}	-
Gerilim Frekansı	-	1 MHz – 50 MHz	-

İkinci alternatifin benzetimleri yapılırken ana kanal ile yan kanallar arası filtrelerin açıları, genişlikleri ve bu bölgelerdeki sıvı akış hızları incelenmiştir. Benzetimler için, dört ayrı çalışma oluşturularak belirlenen parametreler Tablo 12’de belirtilmiştir.

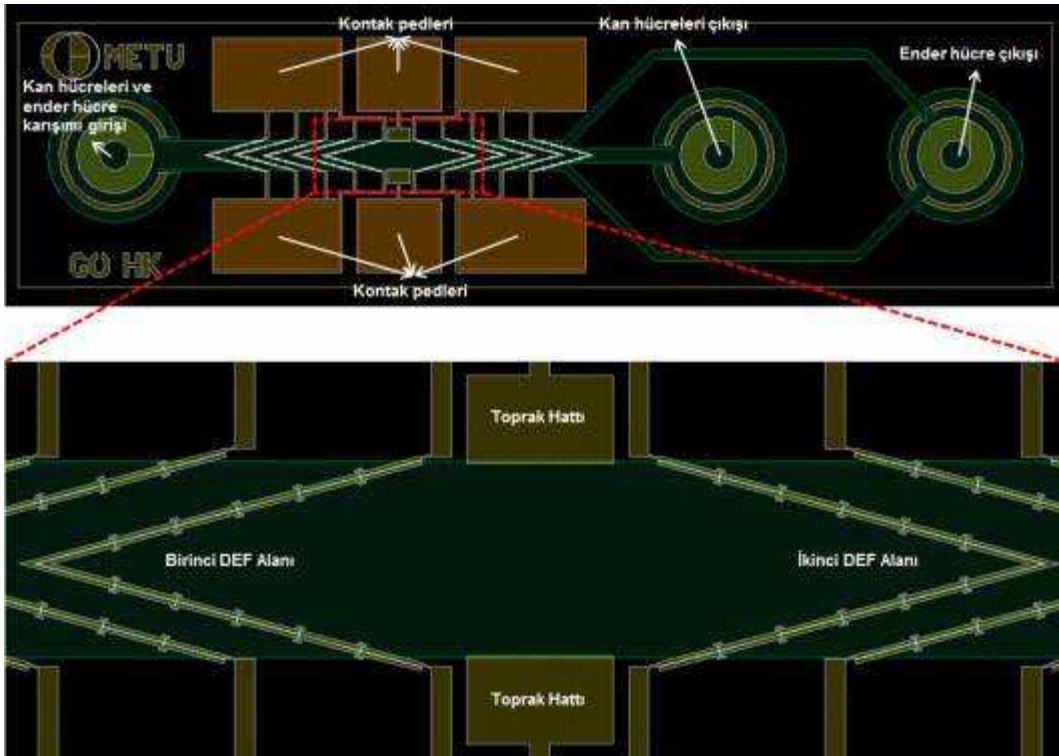
Tablo 12. İkinci alternatif tasarım için kanallar arası filtre parametreleri.

	Birinci Çalışma	İkinci Çalışma	Üçüncü Çalışma	Dördüncü Çalışma
Filtre Açısı	45°	15°	30°	90°
Filtre Genişliği	10 µm	10 µm	10 µm	10 µm
Filtre Giriş Genişliği	14.1 µm	38.6 µm	20 µm	10 µm
Ana Kanal Genişliği	1000 µm, 500 µm	-	-	-
Duvar Derinliği	20 µm, 50 µm, 100 µm	-	-	-
Duvar Genişliği	20 µm, 100 µm	-	-	-

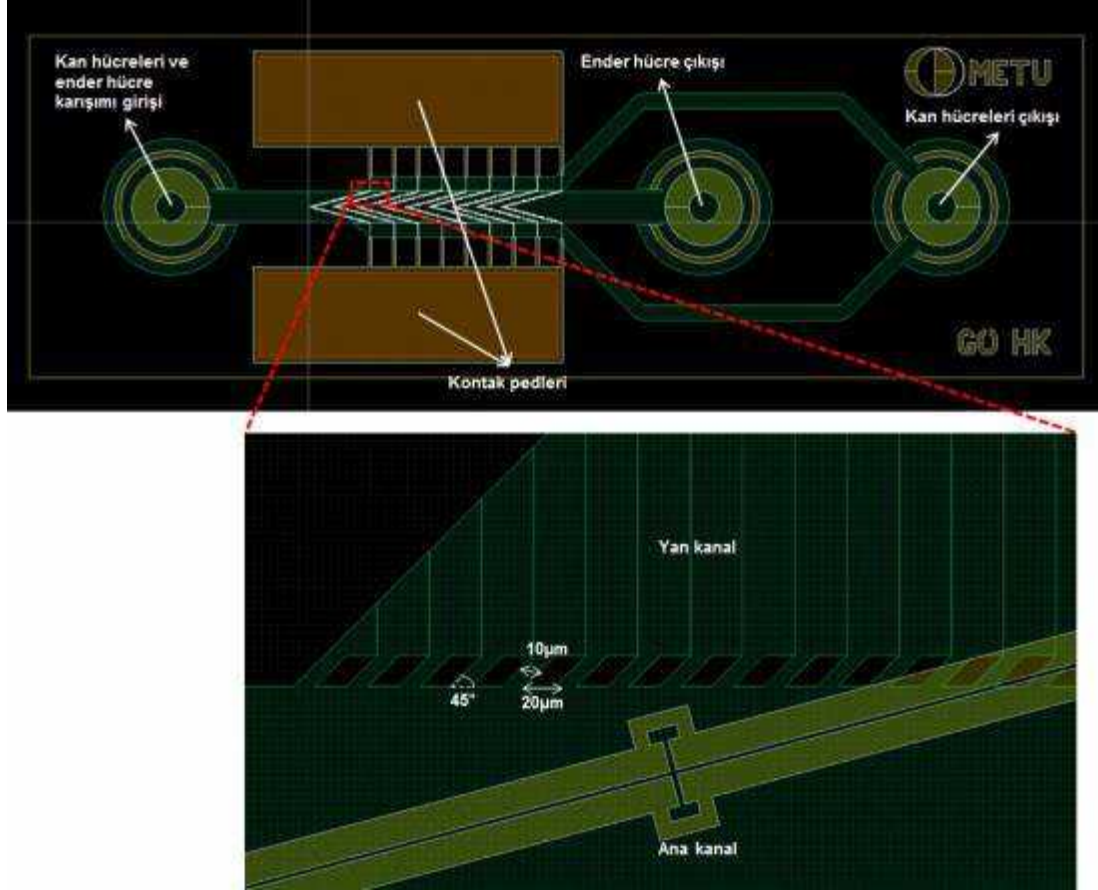
Tablo 12’de belirtilen parametrelerde ikinci ve üçüncü çalışmaların filtre giriş genişlikleri, planlanan filtre genişliğinin 10 µm olmasıyla, sırasıyla 38.6 µm ve 20 µm olarak hesaplandığından, bu filtrelerin kendilerine yönelen K562 kanser hücrelerini dahi geçirecekleri öngörülmüştür. Bu nedenle, bu çalışmaların simülasyonlarından vazgeçilmiştir. Birinci ve dördüncü çalışmalarda ise filtre giriş genişlikleri filtrelemeye uygundur. Bu nedenle simülasyonlara bu parametrelere göre devam edilmiştir. Filtrelerin çevrelerindeki basınç ve sıvı akış yönelim çizgileri incelenerek en uygun çalışmanın birinci çalışma olduğuna karar verilmiştir. Birinci çalışmanın da kendi içinde ana kanal genişliği, duvar derinliği ve duvar genişliği için çeşitli parametreler denenmiş olup, en uygun sonuçlar 1000 µm ana kanal genişliği, 20 µm duvar derinliği ve 20 µm duvar genişliği ile alınmıştır. Şekil 54’te bu parametrelere göre yapılan sıvı akış yönelim çizgilerinin ve basınç değişimlerinin gösterildiği simülasyon sonucu gösterilmektedir. Yeni tasarımlara ait maske serimleri Şekil 55 ve Şekil 56’da gösterilmektedir.



Şekil 54. İkinci alternatif için sıvı akış yönelim çizgilerinin ve basınç değişimlerinin gösterildiği benzetim sonucu.



Şekil 55. Üçüncü nesil DEF çiplerine ait maske çizimleri ve kanal geçişlerinin yakın görünümü (Tasarım 1).

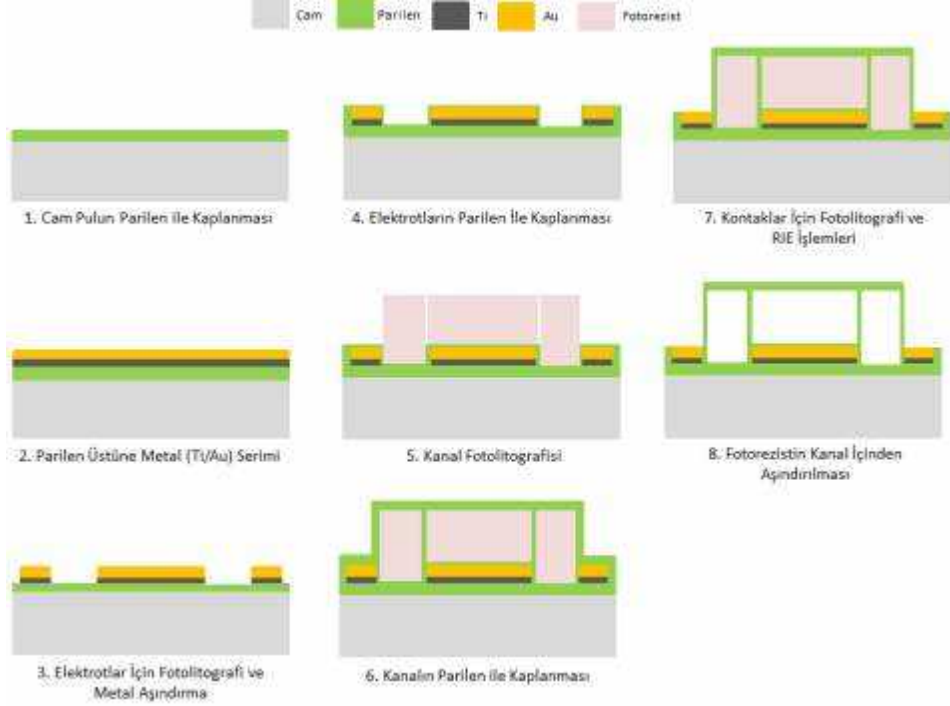


Şekil 56. Üçüncü nesil DEF çiplerine ait maske çizimleri ve kanal geçişlerinin yakın görünümü (Tasarım 2)

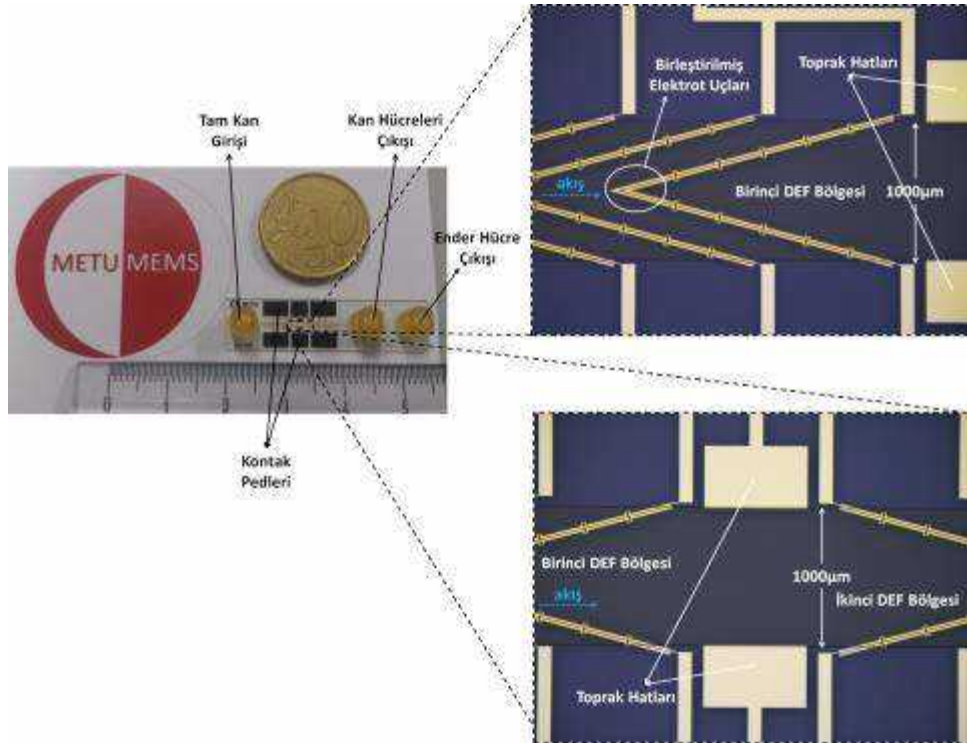
Üretim:

Bir önceki üretim şemasına benzer basamaklar içeren, ancak tasarımında farklılıklar gösteren üçüncü nesil DEF çipinin üretim şeması Şekil 57’de gösterilmektedir. Farklı mikroskop çeşitleri (normal veya ters) ile gözlem yapılabilmesi adına taban malzemesi olarak ikinci nesilde olduğu gibi cam seçilmiştir. Ti, tekrar cam üstüne kaplanıp Au için tutucu amaçlı kullanılmıştır. Ti üstüne yine püskürtme tekniği ile Au tabaka kaplanmıştır. Ti ve Au’nun şekillendirilmesinde kullanılacak kimyasal aşındırma işlemi için fotorezist kaplama, UV maruziyeti ve fotorezist geliştirici ile şekillendirme işlemleri uygulanmıştır. Ardından Au ve Ti aşındırıcılar kullanılarak, Ti ve Au tabaka şekillendirilmesi tamamlanmıştır. Yüzeyde kalan fotorezist aseton ile yıkanmıştır. Elektrotların oluşumu bu şekilde tamamlanmıştır. Ti ve Au kaplamalarının ardından, yüzey elektroliz olayını engellemek için, ince bir Parilen tabakası kaplanmıştır. Ardından kanal oluşumu için litografi işlemi tekrarlanmıştır. Oluşturulan kanalın kalın bir Parilen tabakası ile kaplanmasıyla, ana duvarları, aralıkların duvarları ve kanal tavanı oluşturulmuştur. RIE işlemi ile oluşturulan açıklıkların yeri belirlenerek kanal giriş çıkışları ve elektrot kontaktlarının açılması sağlanmıştır. Son işlemde fotorezist kanal içinden

aşındırılarak kanallar açığa ve kanallar arası aralıklar açığa çıkartılmıştır. Üretilen üçüncü nesil birinci alternatif DEF çipleri Şekil 58'de sunulmaktadır.

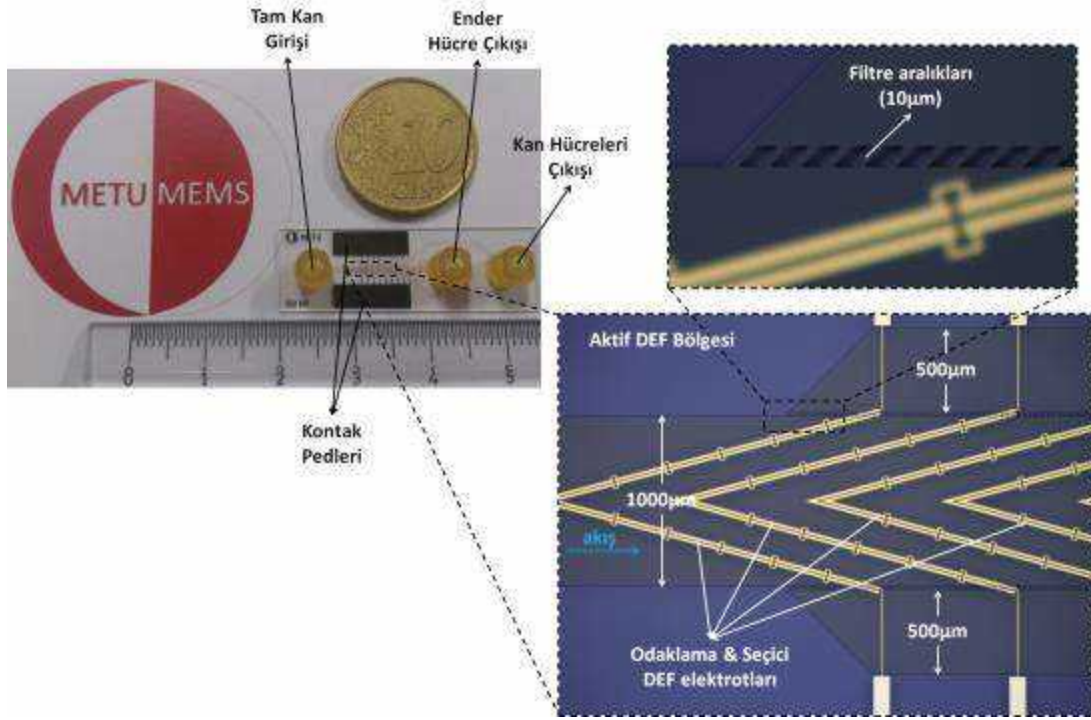


Şekil 57. Üçüncü nesil DEF çiplerinin üretim şeması



Şekil 58. Üretilen üçüncü nesil DEF çipleri (Tasarım 1).

Üçüncü nesil DEF çiplerinin üretiminde kanal litografisi yapılırken birinci tasarım için hassasiyet birinci nesil DEF çipleriyle aynı olmasına rağmen, özellikle ikinci alternatif için yapılan kanal litografisinde ana kanal ile yan kanallar arasındaki boşluklar oluşturulurken, bu bölgelerin küçük boyutları göz önünde bulundurularak üretim aşamasının bu basamağında hassas çalışma gerçekleştirilmiştir. Üretilen üçüncü nesil ikinci alternatif DEF çipleri Şekil 59'da sunulmaktadır.



Şekil 59. Üretilen üçüncü nesil DEF çipleri (Tasarım 2).

Testler:

Üçüncü nesil DEF çiplerinin testleri, farklı frekansların eritrositler ve K562 dirençsiz hücrelerine uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.

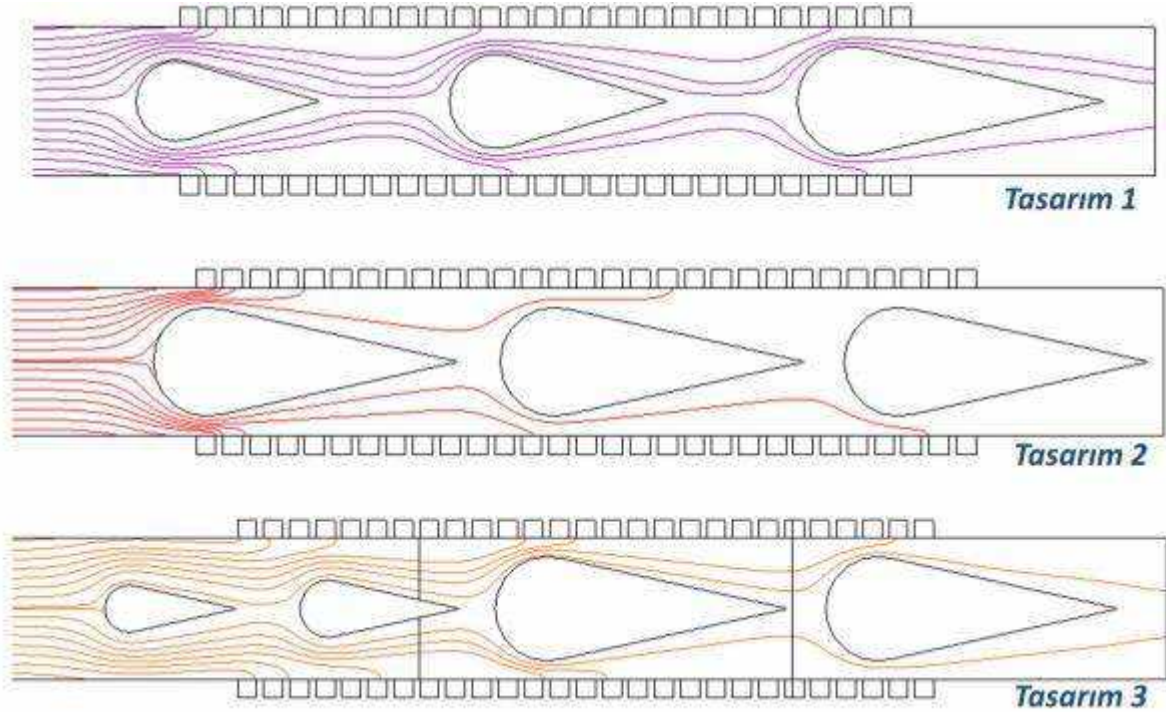
İkinci nesil DEF çiplerinin testlerinde kullanılan iletkenliği 10 mS/m olan sıvıyla çalışılmaya devam edilmiştir. Hücrelerin kanal içinde aynı anda gözlemlenebilmesi için, eritrositler kırmızıya (CellTracker™ Red), K562 dirençsiz hücreleri yeşile (FDA) boyanmıştır. Hücrelerin hareketleri GFP ve 31002 TRITC, Chroma filtreleri kullanılarak floresan mikroskop altında yüksek çözünürlüklü hızlı kamera (*Evolve 128*) ile gözlenmiştir.

3.6.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması

Tasarım:

İkinci nesil DEF çiplerinde V şekilli parilen engeller kullanılmıştır. V şeklinin doğası sebebiyle; bu engellerin iki kolu arasında boşluk bulunmaktadır. Bu durum, içeriye mikro akışkan verildiğinde havanın hapsolmesiyle hava kabarcığı oluşumuna sebep olmaktadır. Hava kabarcığı mikro akışkan sebebiyle hareket etmekte; kanalın tıkanmasına sebep olabileceği gibi, elektrotların üzerini kapatarak ya da hapsolmüş hücrelere hızla çarpıp dağılmalarını sağlayarak DEF hassasiyetinin azalmasına ve akış rejiminin bozulmasına sebep olmaktadır. “Bulgular” bölümünde bu durum deneyler sırasında elde edilmiş bir görsel ile açıklanmıştır. Bu sorunun çözümü için damla şekilli engeller önerilmiştir. Hava kabarcığı sorununun yanı sıra ikinci nesil DEF çiplerinde kullanılan elektrotlar tüm hücreleri hapsedmek için yeterli değildir. Üçüncü nesil DEF çiplerinde bu sayının artırılması ile tasarım parametreleri güncellenmiştir.

Tasarımlar damla şekilli engellerin birbirine ve duvarlara olan uzaklıklarını değiştirilerek çeşitlendirilmiştir. Simülasyon programları yardımı ile yapılan iterasyonlar sonucu 10 adet tasarıma ulaşılmış, bunlar arasından belirlenen 4 tanesinde V-şekilli engellerin verimliliğinden daha yüksek verim elde edilmiştir. Şekil 60 bu tasarımlarda hücrelerin kanal içindeki hareketinin simülasyon sonuçlarını göstermektedir (voltaj = 20 V_{pp}, akış hızı = 10 µl/dk, f = 48.64 MHz). Ara basamaklarda itere edilen parametrik analizler ayrıntılı olarak sunulmamaktadır. Bu 4 adet tasarımın son tasarımlar olmasına karar verilmiştir. Tasarım 1 ve 3'te DEF alanında V-şekilli engellerde olduğu gibi 27'şer adet, tasarım 2'de 29'ar adet karşılıklı yerleştirilmiş 3 boyutlu elektrot bulunmaktadır. Elektrot yüksekliği, kanal yüksekliği ve genişliği birinci ve ikinci nesil çiplerinde ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi tasarlanmış olup, sırasıyla 25 µm, 30 µm ve 300 µm olarak belirlenmişlerdir ve dört tasarım için de aynıdır. Tablo 13, dört tasarım için tüm tasarım parametrelerini özetlemektedir. Tasarım 1, 2 ve 3'te damla şekilli engeller ve damla şekilli engeller ile duvarlar arası mesafeler optimize edilmiştir. Tasarım 4'te ise tasarım 3'teki parametreler aynı şekilde kullanılmış; fakat, damla şekilli engeller lamine edilmiştir. Bu tasarımda akış üzerindeki stres azaltılarak hücrelerin hapsolme verimliliğinin artırılması hedeflenmiştir.



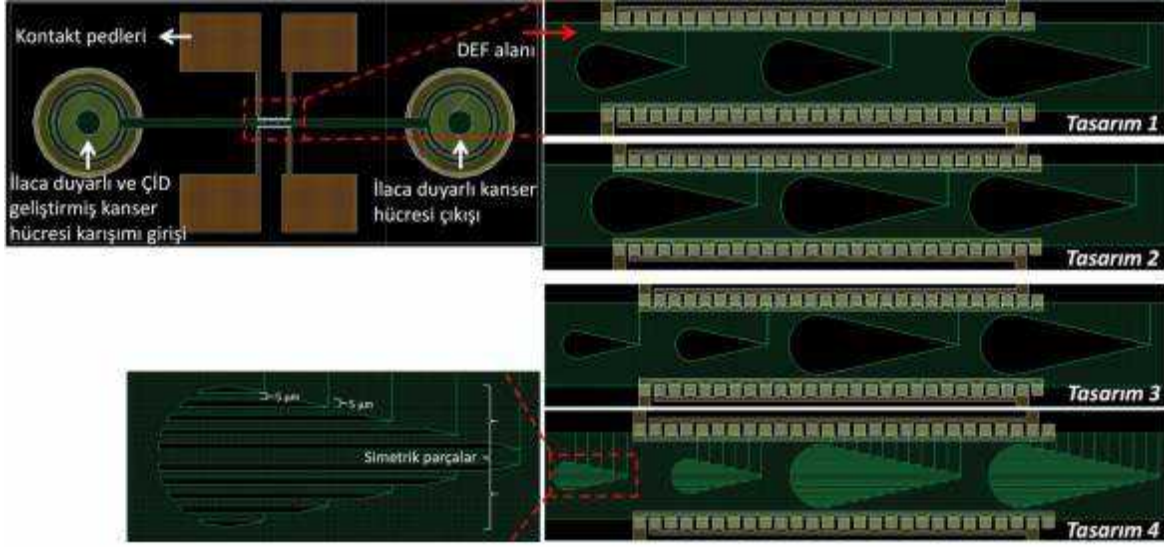
Şekil 60. Üçüncü nesil DEF çiplerine ait üç farklı tasarımın hücre yakalama verimliliğini gösteren simülasyon sonuçları.

Tablo 13. Üçüncü nesil DEF çipi için tasarlanan 4 çeşide ait tasarım parametreleri.

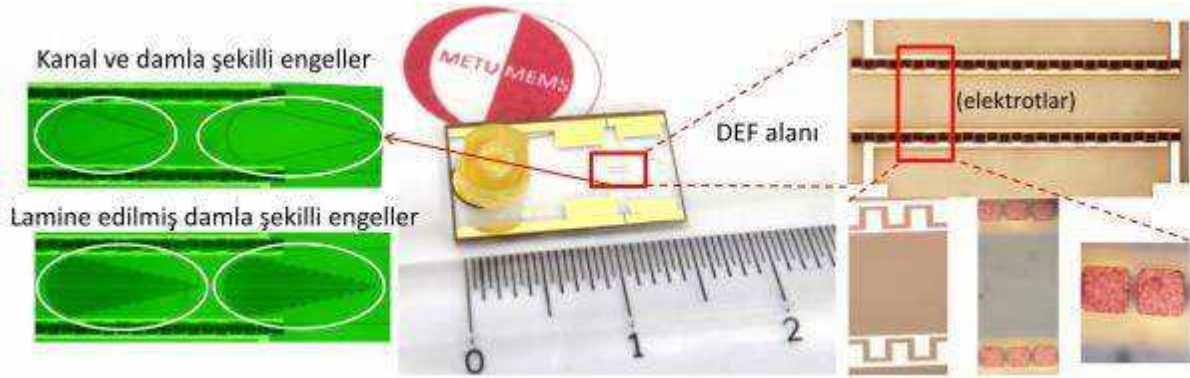
	Tasarım 1	Tasarım 2	Tasarım 3	Tasarım 4
Kanal yüksekliği (μm)	30	30	30	30
Kanal genişliği (μm)	300	300	300	300
Elektrot yüksekliği (μm)	25	25	25	25
Her DEF alanında bulunan karşılıklı elektrot sayısı	27	29	27	27
Damla şekilli engeller arası uzaklıklar (sırası ile) (μm)	260, 260	85, 85	155, 100, 100	155, 100, 100
Damla şekilli engeller ve kanal duvarları arası uzaklık (sırası ile) (μm)	70, 55, 40	40, 40, 40	100, 90, 40, 40	100, 90, 40, 40

Üretim:

Şekil 61 üretim sırasında kullanılacak maskeleri göstermektedir. Üçüncü nesil DEF çiplerinin üretim şematiği ikinci nesil DEF çipleri ile aynı olup Şekil 30'da verilmektedir. Şekil 62 üretilmiş üçüncü nesil DEF çiplerini göstermektedir.



Şekil 61. Üçüncü nesil DEF çipleri için yapılan 4 farklı tasarımın üretiminde kullanılacak maske serimleri.



Şekil 62. Üretimi tamamlanan üçüncü nesil DEF çipi, damla şekilli engeller ve 3 boyutlu elektrotların mikroskop altında alınmış görüntüleri.

Testler:

Üretilen üçüncü nesil çipler, ikinci nesil çiplerde olduğu gibi, ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Hücrelerin DEF solüsyonuna aktarılması ile ilgili uygulanan prosedür ve test düzeneği ikinci nesil DEF çiplerinde sunulduğu haliyle kullanılmıştır.

3.7 Entegre Sistemin Tasarım, Üretim ve Testleri

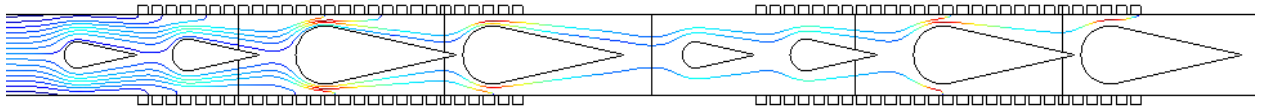
Tasarım:

Birinci DEF alanı için son olarak yapılan 3. nesil tasarımlar test edildiğinde filtre boyutlarının kanser hücrelerini tutmak için yeterli miktarda küçük olmadığına anlaşıldığı üzerine ("Bulgular" bölümünde detaylı olarak anlatılmaktadır.), 14 μm olan yatay genişliklerinin 10 ve 8 μm 'ye düşürülmesine karar verilmiştir. Ayrıca asimetric olarak tasarlanan elektrot yapısının

da simetrik olana göre daha iyi sonuç verdiği gözlemlendiğinden; birinci DEF alanı elektrotları entegre sistemde asimetrik tasarlanmıştır.

İkinci DEF alanı için ise damla şekilli engeller, “Bulgular” bölümünde sunulduğu üzere hava kabarcığı sorununu çözmüştür. Ayrıca, 29 elektrotlu ve V şekilli engeller ile aynı yerlerde konumlanmış damla şekilli engellere sahip tasarımlar yapılan testlerde optimum sonucu veren yapılar olmuştur.

Birinci ve ikinci DEF alanları için üçer nesil olmak üzere yapılan tasarımlardan alınan sonuçlar ile iki DEF alanı için de geliştirilen son ürün tasarımları, entegre sistemde bir araya getirilerek; amacı kan hücrelerinden kanser hücrelerini ayırıp ardından kanser hücrelerinde ÇİD gelişimini tespit etmek olan projenin son ürünü tasarlanmıştır. Entegre sistem için, birinci DEF alanı olarak Şekil 55-56’da verilen ve bölüm 3.6.1’de açıklanan tasarımlar, ikinci DEF alanı olarak Şekil 61’de verilen ve bölüm 3.6.2’de açıklanan damla şekilli engellere sahip tasarımlarla birleştirilerek, 5 farklı çip tasarımı elde edilmiştir. Bu tasarımlara ait bilgiler Tablo 14’te sunulmaktadır. Birinci ve ikinci DEF alanlarının entegrasyonu sırasında optimize çiplerin tasarım parametreleri haricinde iki farklı parametre ortaya çıkmıştır. Birincisi, birinci ve ikinci DEF alanları arası uzaklık olup üretim limitleri, akış stabilizasyonu ve mikroakışkan bağlantıları dikkate alınarak 3750-4000 μm olarak belirlenmiştir. İkincisi ise 2. DEF alanındaki seri olarak bağlanan elektrot dizilerinin sayısı ve aralarındaki uzaklıktır. Bu elektrot dizileri sayısı COMSOL simülasyonu ile 2 adet olarak belirlenmiştir (Şekil 63). Aralarındaki uzaklık ise akış stabilizasyonu ve kontakt pedlerin uygun yerleşimi için 850-900 μm olarak tasarlanmıştır.



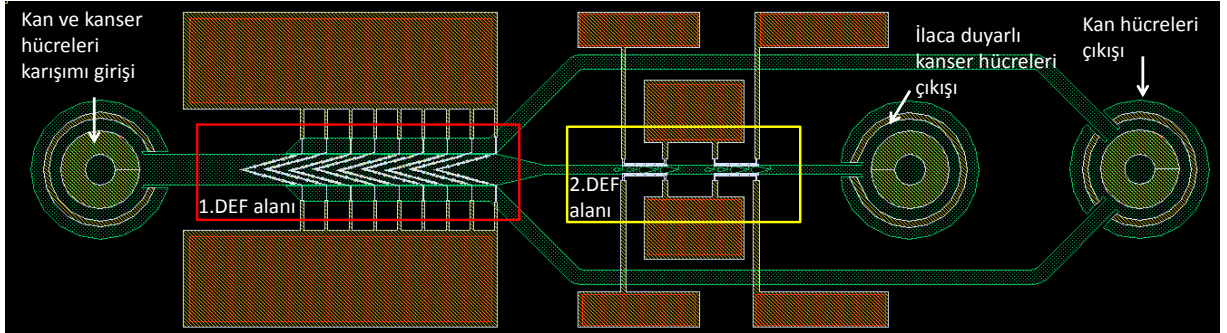
Şekil 63. Entegre sistemde damla şekilli engellere sahip DEF alanı sayısının COMSOL simülasyonları ile 2 olarak belirlenmesi.

Tablo 14. Entegre sistemde 1. ve 2. DEF alanlarına ait parametreler.

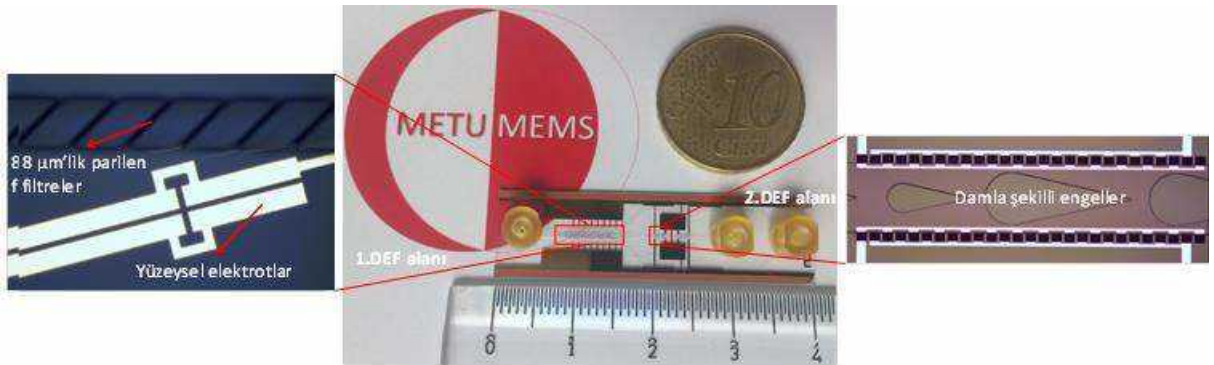
Tasarım	1.DEF alanı parametreleri					2.DEF alanı parametreleri				
	Elektrot açısı	Elektrot aralıkları	Filtre genişliği	Topraklama	Kanal eni	Elektrot aralıkları	Damla şekilli engeller arası uzaklıklar	Damla şekilli engeller ve kanal duvarları arası uzaklık	Kanal eni	1.ve 2. DEF alanı arası mesafe
1	15°	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	10 µm	YOK	1000 µm	15 µm	155, 100, 100 (µm)	100, 90, 40, 40 (µm)	300 µm	3750 µm
2	15°	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	8 µm	YOK	1000 µm	15 µm	155, 100, 100 (µm)	100, 90, 40, 40 (µm)	300 µm	3750 µm
3	15°	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	YOK	VAR	1000 µm	15 µm	155, 100, 100 (µm)	100, 90, 40, 40 (µm)	300 µm	4000 µm
4	15°	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	10 µm	YOK	1000 µm	15 µm	260, 260 (µm)	70, 55, 40 (µm)	300 µm	4000 µm
5	15°	3 µm (paralel) 4 µm (sıralı)	8 µm	YOK	1000 µm	15 µm	260, 260 (µm)	70, 55, 40 (µm)	300 µm	4000 µm

Üretim:

Birinci ve ikinci DEF alanı için üretilen çiplerin üretimi birbiri ile uyumlu olup, ikinci DEF alanı için optimize edilen üretim şeması birinci DEF alanı için olan üretim akışını kapsamaktadır. Çünkü, birinci DEF alanında düzlemsel elektrotlar kullanılmakta ve ikinci DEF alanı için yapılan 3 boyutlu elektrotlar da şekillendirilmiş altın yüzeylerden kontakt alınarak büyütülmektedir. Bu işlem sırasında düzlemsel elektrotlar fotorezist ile korunarak elektrokaplama ile 3. boyuta büyümeleri engellenmektedir. Üretim sırasında kullanılan maske çizimleri Şekil 64'te verilmektedir. Şekil 65 üretilmiş entegre sistemi göstermektedir.



Şekil 64. Entegre sistemin maske seti.



Şekil 65. Üretilen iki aşamalı entegre DEF çipi.

Testler:

Entegre sistem testleri Şekil 49'da verilen deney düzeneği kullanılarak, 2. ve 3. Nesil DEF çiplerinde olduğu gibi yapılmıştır. Farklı testler için; farklı akış hızı, voltajlar, farklı hücreler ve boyama malzemeleri kullanıldığından "Bulgular" bölümünde sonuçlar açıklanırken bu bilgiler her test için ayrıntılı olarak sunulmaktadır.

3.8 Hücre Hatlarında Dirençliliğin Geliştirilmesi

Testler sırasında kullanılan kanser hücrelerinde (K562 lösemi ve MCF-7 meme kanseri) ilaç dirençliliğinin geliştirilmesi çalışmaları ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü, Kanser Araştırma Laboratuvarı (Prof. Dr. Ufuk Gündüz) tarafından yürütülmüştür.

3.8.1 Hücre Kültür Ortamı

K562 lösemi ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları 75 cm² kültür yüzeyli filtre kapaklı flasklarda %10 fetal bovin serum (FBS) ve %0,2 gentamisin içeren 15 mL RPMI 1640 besi yeri ortamında, 37°C'de , %5 CO₂'li nemlendirmiş ortamda (CO₂ inkübatörü kullanılarak) çoğaltılmıştır. Hücreler her 3-4 günde bir aşağıda anlatıldığı gibi pasajlanarak yeni besi yerine aktarılmıştır.

K562 lösemi hücreleri süspansiyon hücre oldukları için flask yüzeyine yapışmazlar. K562 hücrelerinin bulunduğu ortam pipet ile çekilerek santrifüj tüpüne aktarılır. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatan uzaklaştırılır ve pelet yeni besi yeri içinde pipetlenerek çözündürülür. Hücre sayımı yapılarak çalışılan K562 hücre hattı için uygun ekim yoğunluğunda hücre yeni flaska ekilir ve taze besi yeri eklenerek ortam hacmi 15 mL'ye tamamlanır. Daha sonra hücreler inkübatöre yerleştirilir.

MCF-7 meme kanseri hücreleri yapışkan hücreler oldukları için flask yüzeyine yapışır durumda bulunurlar. MCF-7 hücrelerinin bulunduğu flasktan eski besi yeri pipet yardımı ile uzaklaştırılır. Hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanır. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için Trypsin-EDTA eklenip 5 dakika CO₂ inkübatöründe bekletilir. Flask yüzeyinden kalkan hücreler taze besi yeri eklenerek pipetlenir. Hücre sayımı yapılarak MCF-7 hücre hattı için uygun ekim yoğunluğunda hücre yeni flaska ekilir ve taze besi yeri eklenerek ortam hacmi 15 mL'ye tamamlanır. Daha sonra hücreler inkübatöre yerleştirilir.

3.8.2 Dirençli Hücre Hatlarının Geliştirilmesi

Hücreler düşük konsantrasyonda kanser ilaçlarına maruz bırakılıp, pasajlamalar sırasında ilaç konsantrasyonu kademeli olarak arttırıldığında kanser hücreleri ilaç dirençliliği kazanabilmektedir. Bunun için, hücreler pasajlandıktan sonra besi yeri ortamına düşük konsantrasyonda ilaç eklenir ve hücreler bu ilaç konsantrasyonuna alışmaya kadar aynı dozda ilaç verilmeye devam edilir. Hücreler buldukları ilaçlı ortama uyum sağladıkları tespit edildikten sonra bir sonraki pasajlama işleminde ilaç konsantrasyonu arttırılır. İlaç konsantrasyonundaki bu düzenli artış, farklı ilaç dozlarına dirençli hücrelerin elde edilmesini sağlar. Hücrelerin belirli bir ilaç konsantrasyonuna direnç kazandığının saptanması, ilk olarak, hücrelerin Trypan Blue (0.2 mL trypan blue / mL hücre süspansiyonu) ile boyanıp mikroskop altında canlı ve ölü hücre sayılarının belirlenmesi ile sağlanır. Eğer ölü hücreler

toplam hücre popülasyonunun %10'undan az ise, hücreler verilen ilaç dozuna dirençli hale gelmiştir. Daha sonra ilaç dirençliliğinin kesin olarak belirlenmesi için duyarlı ve dirençli hücrelerin XTT hücre çoğalma tayini testi ile IC₅₀ (hücre proliferasyonu inhibisyonunun %50'si oluşturan ilaç konsantrasyonu) değerleri belirlenir. Böylece, hücrelerin ilaca karşı duyarlı hücrelere göre kaç kat direnç kazandığı belirlenmiş olur (Eşitlik 14).

$$\text{Kat Dirençliliği} = \frac{K562/Dox'un IC_{50}Değeri}{K562'nin IC_{50}Değeri} \quad (14)$$

Proje kapsamında K562 lösemi hücrelerinin 0.1 – 1 µM doxorubicin (DOX) ve 0.1 – 1 µM imatinib (IMA) dirençli hatları ile MCF-7 meme kanser hücrelerinin 1 µM DOX dirençli hatları geliştirilmiştir.

3.9 Dirençli Hatlarda P-gp İfadesinin Belirlenmesi

Bölüm 3.8'de bahsedildiği gibi farklı dirençlilik miktarlarına sahip hücre hatları geliştirilmiştir. “Bulgular” bölümünde de elektrotasyon yöntemi ile farklı dielektrik özelliklere sahip oldukları kanıtlanarak sunulmuştur. Bilindiği gibi, K562 hücrelerinde ilaç dirençliliği, aynı zamanda bir Cl⁻ kanalı modülatörü olan P-gp ifadesinin artışı ile gerçekleşmektedir. P-gp ifadesindeki artış hücrelerin sitoplazmik iletkenliğinin artmasına, dolayısıyla DEF tepkilerinin değişmesine neden olmaktadır. Ancak, ER analizlerinde ve dielektroforez testlerinde bu tepkinin ilaç dirençlilik seviyesi ile paralel olarak lineer bir şekilde artmadığı “Bulgular” bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Bu durumda, yüksek ilaç dirençliliği olan hücreler için dirençlilik mekanizmasının P-gp ifadesinden bağımsız farklı bir mekanizma ile olabileceği veya hücrelerin sitoplazmik öziletkenliklerini kontrol eden farklı bir mekanizmayı devreye sokuyor olabileceği soruları gündeme gelmiştir. Bu sorulara yanıt bulabilmek adına, ilaç dirençliliği geliştiren hücrelerin P-gp ifadesinin moleküler tespitinin RT-PCR yöntemi ile yapılmasına karar verilmiştir. Bu çalışmalar, DEF ile elde edilen verileri sağlamlaştıracak olmasının yanı sıra, hücrelerin ilaç dirençliliği geliştirme mekanizmalarını aydınlatmaya katkıda bulunacak yeni bilgilere ulaşılmasının önünü açmıştır. Bu çalışmaları yapabilmek için K562 lösemi hücrelerinden RNA izolasyonu protokolü aşağıdaki şekilde optimize edilmiştir.

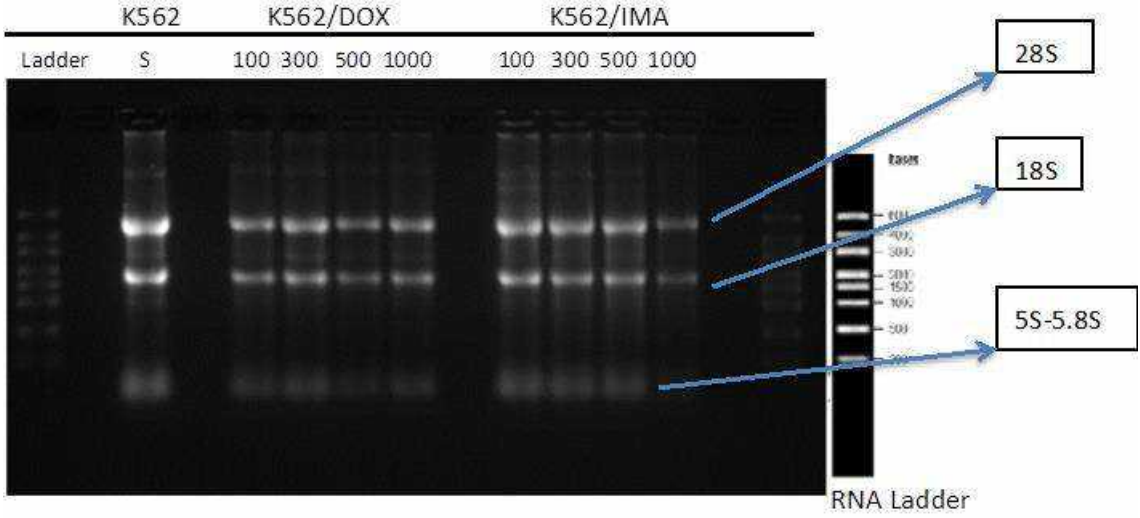
RNA izolasyonu için TRI Reagent (Sigma) protokolü uygulandı. Öncelikle T75 flasklarda süspansiyon halinde bulunan K562 hücreleri falkon tüpüne alındı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüpdeki süpernatant atıldı ve pelet üzerine 1 mL TRI Reagent eklenip karıştırılıp ependorf tüpüne taşındı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Sonraki aşamada tüpün içine 200 µl kloroform eklenip iyice çalkaladıktan sonra 15 dakika buzun içinde bekletildi ve daha sonra 15 dakika, 12000 rcf'de, 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpte 3 tabaka meydana geldi. Üst tabakada RNA, ortada tabakada DNA ve alt tabakada protein ve lipitler bulunmaktadır. Pipetle üsteki tabaka (RNA tabakası) alınıp başka tüpe

aktarıp üzerine 500 µl isopropanol eklenip iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 10 dakika, 12000 rcf'de, 4°C'de santrifüj edildi. Tüpün dibinde pellet oluşumu görüldü ve süpernatant dökülüp pellet üzerine buzda bekletilen %75 etanolden 1000 µl koyulup 15 dakika, 12000 rcf'de, 4°C'de santrifüj edildi. Sonraki aşamada etanol dışarı alınıp RNA pelleti oda sıcaklığında 5-10 dakikalığına kurumaya bırakıldı. Kurutulan RNA peleti çözülmesi için 50-100 µl RNase Free su koyulup 55°C'de 10-15 dakika bekletildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu, Nanodrop ölçümleri ile belirlendi (Tablo 15). Nanodrop sonuçları RNA konsantrasyonlarını ve A260/280 değerlerini göstermektedir. A260/A280 değerlerinin 2'ye yakın olması RNA'nın saf ya da safa yakın olduğunu göstermektedir.

Tablo 15. K562 hücrelerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları (NanoDrop ölçüm sonuçları).

Hücre	Konsantrasyon (ng/µL)	A260/A280
K562/S	2667.8	1.96
K562/100 IMA	1877.8	1.99
K562/300 IMA	1540.6	1.96
K562/500 IMA	1526.6	1.95
K562/1000 IMA	697.2	1.92
K562/100 Dox	1133.3	2.00
K562/300 Dox	1495.2	2.00
K562/500 Dox	824.7	1.98
K562/1000 Dox	1097.2	2.03

RNA'ların kalite durumları agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gösterildi. İzole edilen RNA'lar %2'lik agaroz jelinde *High Range RIBORuler RNA ladder* solüsyonu ile aynı anda, 80 voltta 60 dakika yürütüldü ve UV jel görüntüleme sistemi ile analiz edildi (Şekil 66). Gerek NanoDrop, gerekse agaroz jel elektroforezi sonuçları RNA'ların başarılı bir şekilde, herhangi bir kırılmaya uğramadan izole edilebildiğini göstermektedir.



Şekil 66. K562, K562/dox ve K562/ima hücrelerinden izole edilen RNA'ların kalite analizleri için agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılması.

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR):

İzole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar 1:50 oranında nükleaz içermeyen su ile seyreltilmiştir. cDNA'lar FastStart SYBR Green qPCR Master Mix ile (Roche, Almanya) Rotor Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazında çoğaltılmış; gen ifadelerindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz edilmiştir. Aşağıda qPCR'da kullanılan MDR1 (P-gp, ABCB1) ve β -actin (ATCB) primer çiftlerinin dizileri ve bu dizilerin alındığı kaynaklar verilmektedir (Tablo 16). Ayrıca, hücre hatlarındaki MDR1 geninin ifadesinin belirlenmesi için kullanılan malzemelerin miktarları ve reaksiyon koşulları Tablo 17'de verilmektedir.

Tablo 16. qPCR'de kullanılan primer çiftleri.

Primer	Sekans 5' - 3'	Amplikon boyutu (bp)	Referans
ABCB1 forward	GGGAGCTTAACACCCGACTTA	154	Harward PrimerBank, ID: 318037598c2
ABCB1 reverse	GCCAAAATCACAAGGGTTAGC TT		
ATCB forward	CCAACCGCGAGAAGATGA	97	Kaplan ve Gündüz (2012)
ATCB reverse	CCAGAGGCGTACAGGGATAG		

Tablo 17. qRT-PCR reaksiyon koşulları.

Bileşenler	MDR1	β -actin
Master Mix	10 μ L	10 μ L
Forward Primer 10 μ M	0,2 μ L	0,2 μ L
Reverse Primer 10 μ M	0,2 μ L	0,2 μ L
Su	5,6 μ L	5,6 μ L
cDNA	4 μ L	4 μ L
İlk Denaturasyon	95°C ; 10 dk	95°C ; 10 dk
Denaturasyon	95°C ;15 s	95°C ; 15 s
Anneal Sıcaklığı	60°C ;60 s	55°C ; 45 s
Ekstensiyon Sıcaklığı	72°C ; 60 s	72°C ; 45 s
Tekrar Sayısı	36	32

3.10 Parilen mikrokanalların heparin ile kaplanarak biyo-uyumluluğunun sağlanması

Geliştirilen mikroçiplerde parilen kanal yapısı kullanılmaktadır. Parilen biyoyumlu bir malzeme olmasına rağmen, zamanla hidrofobik yapı kazanarak kanalların yüzey direncinin artmasına yol açabilmektedir. Bu durum mikrokanalın akış dinamiğini etkileyerek kanalların tıkanmasına yol açmaktadır. Bunun yanı sıra, kan testleri sırasında parilen mikrokanalların pıhtılaşmaya yol açabildiği bilinmektedir. Bu sorunu çözmek için, diğer polimer bazlı biyosensörlerde veya vücut içine yerleştirilen implantlarda sıklıkla kullanılan heparin kaplama yönteminin parilen yüzeyler için geliştirilmesine karar verilmiştir.

Heparin kanda doğal olarak bulunan ve kan damarlarında pıhtılaşmayı (trombogenez) engelleyen negatif yüklü bir karbonhidrattır (glikozaminoglikan). Heparin, kanda anti-trombin molekülüne bağlanarak trombini inaktive eder ve böylece pıhtılaşma mekanizmasını durdurur.

Heparin kaplama biyomedikal implantlarda sıklıkla kullanılan bir metottur. Poliüratan (PU) polimetilmetakrilat (PMMA), polydimetilsiloksan (PDMS) gibi malzemelerin yüzeylerinin heparin ile kaplanmasına yönelik metotlar literatürde mevcuttur. Ancak, parilen yüzeylerin heparin kaplanmasına yönelik literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu nedenle, literatürdeki parilen yüzey modifikasyonu ve farklı yüzeyler için heparin kaplama metodları incelenerek derlenmiş ve aşağıdaki protokol hazırlanmıştır. Öncelikle hazırlanan düz yüzeylerde daha sonra da parilen mikrokanallarda bu protokol uygulanmıştır.

1. Parilen yüzeyler (1-20 μm) O_2 plazmaya maruz bırakılır (0.8 mbar, 50100 W, 1-5 dk). Bu işlem parilen yüzeyinin hidrofilik ve fonksiyonel hale gelmesini sağlamaktadır.
2. Plazma uygulamasının hemen ardından yüzeye %30'luk akrilik asit ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHCOOH}$) uygulanır ve kurumaya bırakılır. Bu işlem sonrasında yüzey negatif yüklü $-\text{COOH}$ aktif hale gelir.
3. Daha sonra yüzey 10 g/L EDC ((N-3-(dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) içeren sitrat tamponu (0.2 M, pH 5.0) içinde 4 $^\circ\text{C}$ 'de 2 saat bekletilir. Bu işlem yüzeyde fonksiyonel amin gruplarının oluşmasını sağlar. Alternatif olarak yüzey APTES'e maruz bırakılabilir, bu durumda da yüzeyde pozitif yüklü amin fonksiyonel grupları oluşur.
4. Sitrat tamponu (0.2 M, pH 5.0) içinde hazırlanmış olan 1.25 g/L'lik heparin solüsyonu yüzeye uygulanır ve 4 $^\circ\text{C}$ 'de 24 saat bekletilir.
5. Yüzey dH_2O ile yıkanır ve oda sıcaklığında, desikatör içinde kurumaya bırakılır.

Bu protokolün uygulanmasına ait sonuçlar "Bulgular" bölümünde sunulmaktadır.

4. BULGULAR

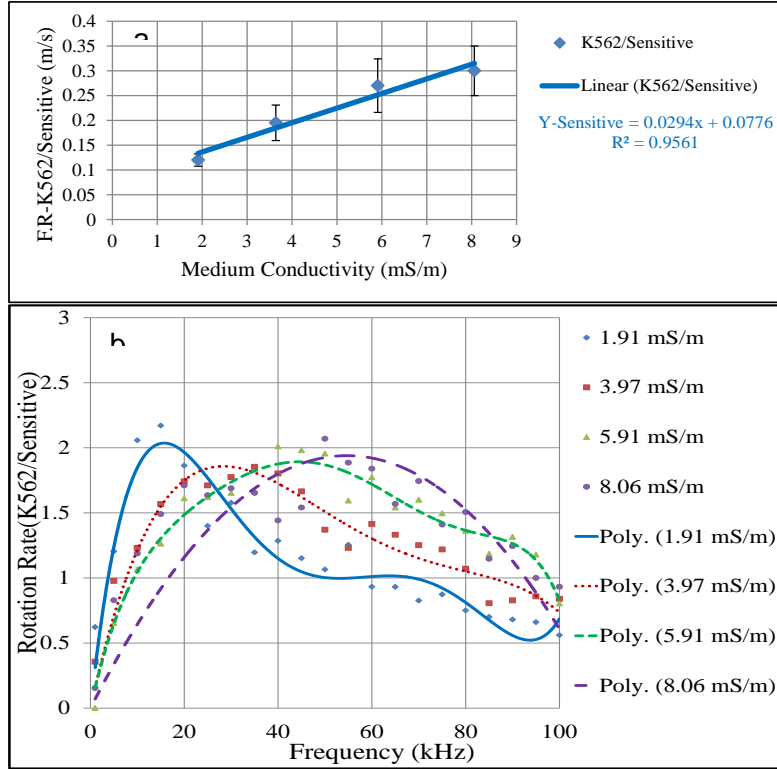
4.1 Hücrelerin Elektrotasyon ile Dielektrik Karakterizasyonları

Kanser hücrelerinin dielektroforez ile ayrıştırılmasında ayrışma frekanslarının belirlenebilmesi ve uygun DEF çipi tasarımlarının yapılabilmesi için hücre modellemelerine ihtiyaç vardır. Bunun için hücrelerin dielektrik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Literatürden derlenen bilgilerin tutarsızlığı nedeniyle, proje kapsamında kullanacak hücrelerin daha güvenilir yöntemlerle dielektrik karakterizasyonlarının yapılmasına karar verilmiştir. Bun kapsamında yapılan araştırmalar sonucunda en güvenilir yöntemin ER olduğu anlaşılmıştır. Ancak literatürde var olan dörtlü elektrot yapısına sahip 2D (iki boyutlu) elektrot yapıları ile yapılan ilk ER testlerinde, homojen bir elektrik alan kuvvetinin oluşmadığı, ve ölçümlerin değişken sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Bunun üzerine, literatürde ilk kez 3D elektrot yapılarına sahip ER çipleri tasarlanmıştır. Bu sayede dikey ekseninde, hücreleri içine alan homojen bir elektrik alan sağlanabilmiş ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Farklı elektrot geometrilerinde tasarlanan bu çiplerle detaylı EEF ve ROT-T karakterizasyonları yapılarak, en uygun elektrot geometrisine karar verilmiştir. EEF ve ROT-T karakterizasyonlarına yönelik çalışmaların detayları Bölüm 3.1.4'te verilmektedir.

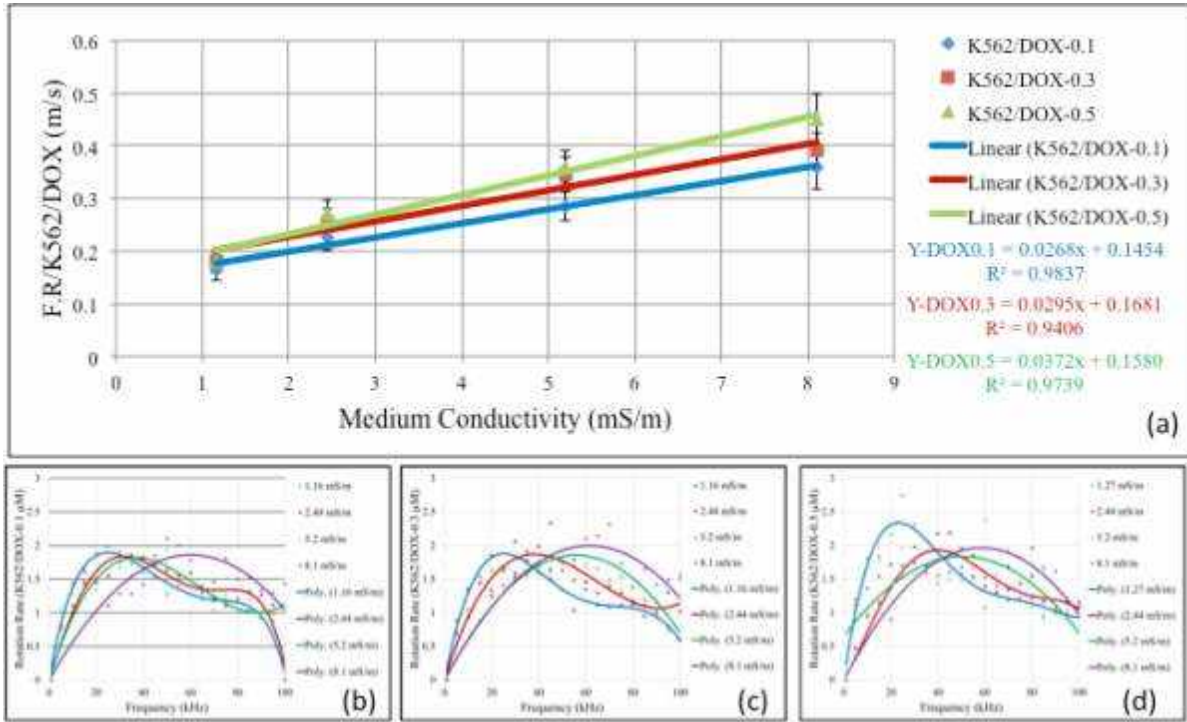
Dirençli ve hassas kanser hücrelerinin dielektrik karakterizasyonları polinomik 3D elektrot yapısına sahip ER çipleri kullanılarak ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için, hücreler farklı iletkenlikteki akışkanlar içinde, döngüsel tork kuvvetine maruz bırakılmış ve pik rotasyon frekansları belirlenmiştir. Bölüm 2.3'de bahsedilen yaklaşım ve Bölüm 3.1'de bahsedilen gereç ve yöntemlerle hücrelerin dielektrik karakteristikleri belirlenmiştir.

4.1.1 Dirençli ve Hassas K562 Hücrelerinin Dielektrik Karakterizasyonu

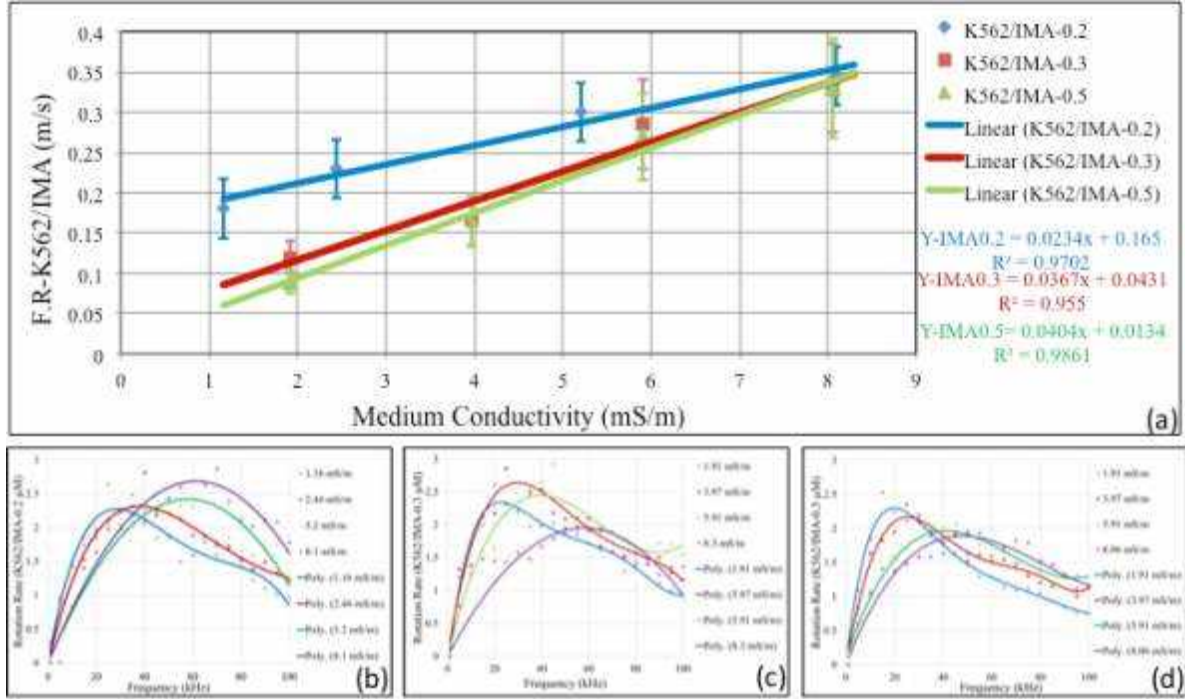
K562 hücrelerinin pik rotasyon frekansları, iletkenlikleri 1.16 ile 8.1 mS/m arasında değişen dört farklı akışkan içinde, 1kHz – 0.1 MHz aralığında sinüs sinyal uygulanarak belirlenmiştir. Şekil 67, 68 ve 69'da K562 hücrelerinin sırasıyla hassas, doxorubicin dirençli (0.1, 0.3 ve 0.5 μM) ve imatinib dirençli (0.1, 0.3 ve 0.5 μM) hatlarının dielektrik karakterizasyonları için yapılan ER testlerinin sonuçları verilmektedir. Şekil 67-69 (a)'da verilen grafiğin x ve y ekseninin kesişim noktalarından K562 hücrelerinin hücre zarı kapasitansı (C_m) ve total efektif hücre zarı iletkenliği (G_m^*) hesaplanmıştır. Daha sonra, DC limit yaklaşımı kullanılarak (Bölüm 2.3) sitoplazmik öziletkenlik değerlerine ulaşılmıştır. Elde edilen değerler Tablo 18'de verilmektedir.



Şekil 67. Hassas K562 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafiği (a) ve pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (b).



Şekil 68. Doxorubicin dirençli (0.1, 0.3 ve 0.5 µM) K562 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (a) ve farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafikleri (b-d).



Şekil 69. Imatinib dirençli (0.2, 0.3 ve 0.5 μM) K562 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (a) ve farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafikleri (b-d).

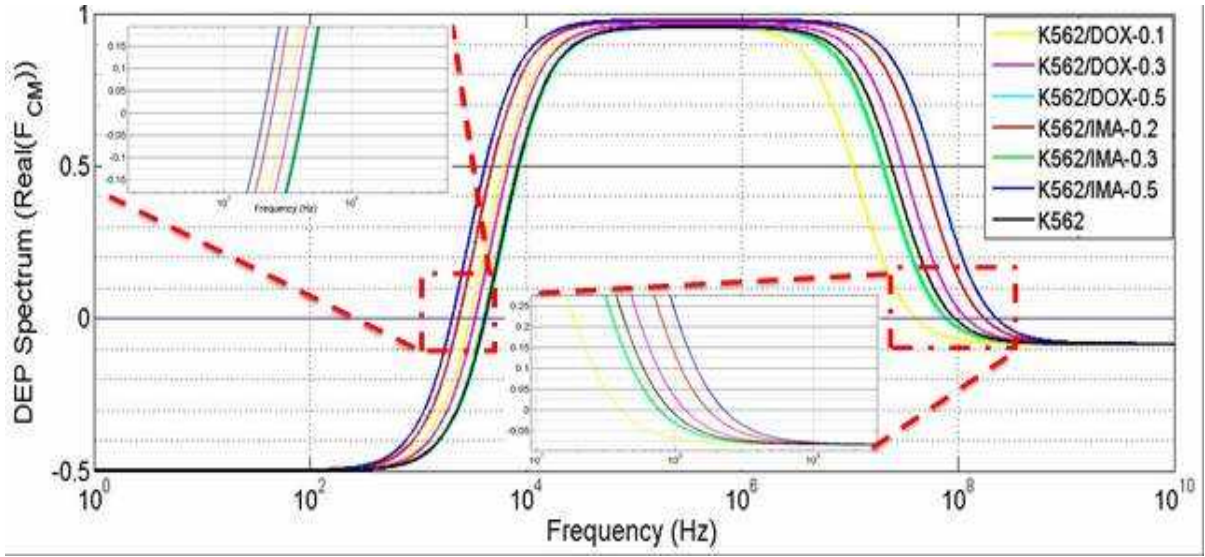
Tablo 18. K562 hücrelerinin hassas ve ilaç (Doxorubicin ve Imatinib) dirençliliği geliştirmiş hatlarının ER yöntemi ile belirlenmiş dielektrik özellikleri.

Dielektrik özellik	Hücre hattı						
	Hassas K562	DOX-0.1 $[\mu\text{M}]$	DOX-0.3 $[\mu\text{M}]$	DOX-0.5 $[\mu\text{M}]$	IMA-0.2 $[\mu\text{M}]$	IMA-0.3 $[\mu\text{M}]$	IMA-0.5 $[\mu\text{M}]$
Hücre zarı kapasitansı $[\text{mFm}^{-2}]$	8.93 \pm 1.43	12.29 \pm 2.15	11.02 \pm 1.93	8.70 \pm 1.71	15.63 \pm 3.02	9.19 \pm 1.52	8.10 \pm 1.69
Etken hücre zarı iletkenliği $[\text{Sm}^{-2}]$	336 \pm 73	1810 \pm 14	1895 \pm 59	1377 \pm 22	2953 \pm 82	450 \pm 20	113 \pm 18
Hücre zarı elektriksel geçirgenliği	10.09 \pm 1.61	13.89 \pm 3.21	12.45 \pm 2.17	9.82 \pm 1.93	17.66 \pm 3.41	10.38 \pm 2.59	9.15 \pm 2.81
Sitoplazmik iletkenlik $[\text{Sm}^{-1}]$	0.32 \pm 0.08	0.14 \pm 0.01	0.41 \pm 0.07	0.26 \pm 0.04	0.60 \pm 0.10	0.27 \pm 0.10	0.78 \pm 0.19
Hücre yarıçapı $[\mu\text{m}]$	6 \pm 1	6 \pm 1	6 \pm 1	6 \pm 1	6 \pm 1	6 \pm 1	6 \pm 1

Hücre zarı, hücrelerin farklı çevresel streslere karşı ilk tepkilerinin olduğu, ve hücre içi ikincil sinyal iletim mekanizmalarının başlatıldığı bölgedir. Hücrelerin canlılığını koruyabilmesinde hücre zarı bütünlüğü ve çevresel streslere karşı geliştirdiği direnç önemli

bir rol oynamaktadır. Kemoterapatik ilaçlara karşı kanser hücrelerinin geliştirdiği direnç de hücre zarında yer alan ilaç atım pompalarının (P-gp, MRP1, BCRP gibi) aşırı ifadesi sonucu oluşmaktadır. Bu sayede hücre, sitoplazmik ilaç konsantrasyonunu hızlı bir şekilde düşürerek, hücrenin toksik ilaç etkisinden kurtulmasını sağlar. K562 hücrelerinde ilaç dirençliliği P-gp'nin aşırı ifadesi ile ortaya çıkmaktadır. P-gp ilaç atım pompası olmasının yanı sıra, hücre zarındaki Cl-kanallarının da aktivitesini modüle etmektedir (Idriss vd., 2000; Assef vd., 2005). Bu nedenle, dirençli hücrelerin dielektrik özellikleri farklılık göstermektedir. Ancak, ilaç dirençliliği seviyesindeki artışın hücre dielektrik özelliklerine nasıl yansıdığına dair literatürde bir veri bulunmamaktadır.

Bu proje kapsamında, ER testleri ile elde edilen sonuçlar, hassas ve düşük ilaç dirençliliği (0.1 -0.2 μ M) geliştirmiş hücre hatları arasında sitoplazmik öz iletkenliği ciddi miktarda değiştiğini göstermektedir. Ancak, ilaç dirençlilik seviyesi ile sitoplazmik öziletkenlik arasında lineer bir bağıntı bulunmadığı gözlenmiştir. Düşük ilaç dirençliliğine sahip hücre hatlarında, hücre zarı kapasitansı ve etken hücre zarı iletkenliği hassas hücrelere göre daha fazla iken, ilaç dirençliliği fazla olan hücre hatlarında, hassas hücrelerle yakın dielektrik özellikler belirlenmiştir. Bu sonuçlar, düşük ve yüksek ilaç dirençliliği geliştiren hücrelerin, bunu farklı mekanizmalar kullanarak sağladıklarını gösteriyor olabilir. Bunu anlayabilmek için, P-gp ve Cl- kanalı ifadeleri gibi daha detaylı moleküler analizler yapılmalıdır. Sonuçlar ayrıca, IMA ve DOX dirençliliği geliştirmiş hücrelerin etken hücre zarın iletkenliğindeki değişimlerin de farklı olduğunu göstermektedir. K562/IMA hücreleri düşük ilaç dirençliliği seviyesinde hücre zarı iletkenliğinde hızlı bir artış göstermekte, ilaç dirençlilik seviyesi artınca iletkenlik hızlı bir şekilde hassas hücrelerdeki seviyeye düşmektedir. K562/DOX hücrelerinde hücre zarı iletkenliğindeki artış yüksek ilaç konsantrasyonlarında da büyük ölçüde korunmaktadır. Her ne kadar IMA ve DOX ilaç dirençliliği benzer mekanizmalar ile oluşmakta ise de, sebep oldukları hücre zarı protein ifadesi artışı ve dolayısıyla hücre zarı iletkenliğindeki değişim farklılık gösterebilmektedir. Öte yandan, yapılan çalışmada hem DOX hem de IMA dirençliliği geliştirmiş K562 hücrelerinin sitoplazmik iletkenlik ile ilaç dirençliliği seviyesi değişimleri arasında her hangi bir ilişki gözlenememiştir. ER analizleri sonucunda elde edilen dielektrik özelliklere bağlı olarak DEF spektrumu oluşturulmuş, ve bu hücrelerin dielektroforetik yöntemlerle birbirinden ayrıştırılabileceği gösterilmiştir (Şekil 70).



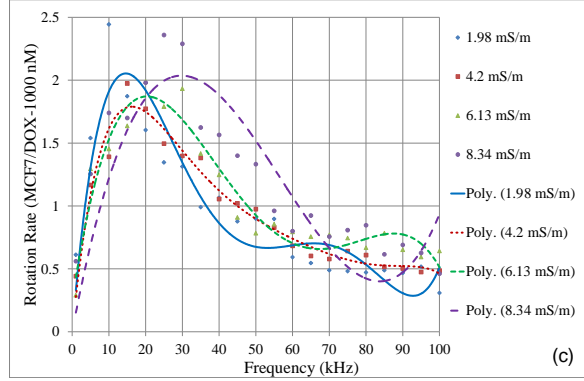
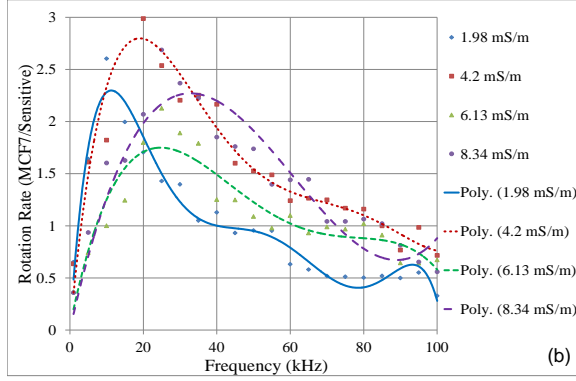
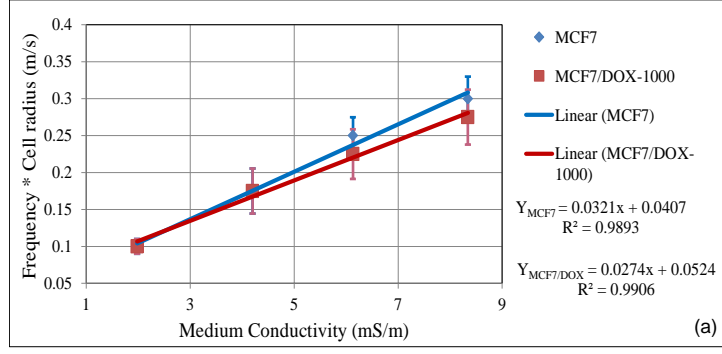
Şekil 70. ER testleri sonucunda elde edilen dielektrik özellikler kullanılarak hassas ve dirençli K562 hücrelerinin MATLAB simülasyonu ile oluşturulmuş DEF spektrumu. (Akışkan iletkenliği = 1 mS/m, elektriksel geçirgenlik = 78).

4.1.2 Dirençli ve Hassas MCF-7 Hücrelerinin Dielektrik Karakterizasyonu

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hassas ve doxorubicin dirençli (1 μM) hatlarının pik rotasyon frekansları iletkenlikleri 1.98 ile 8.34 mS/m aralığında değişen dört akışkan içinde, 1 kHz ile 0.1 MHz aralığında sinüs sinyal uygulanarak elde edilmiştir. Hücrelerin farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı rotasyon hızları ve pik rotasyon hızlarının akışkan iletkenliği ile bağıntısı Şekil 71’de, bu sonuçlardan elde edilen hücre dielektrik özellikleri Tablo 19’da verilmektedir.

Tablo 19. MCF-7 hücrelerinin hassas ve ilaç (Doxorubicin) dirençliliği geliştirmiş hatlarının ER yöntemi le belirlenmiş dielektrik özellikleri.

Dielektrik özellik	Hücre hattı	
	MCF-7	MCF-7/DOX-1 [μM]
Hücre zarı kapasitansı [mFm^{-2}]	9.92 ± 0.29	11.76 ± 1.56
Etken hücre zarı iletkenliği [Sm^{-2}]	253 ± 2	387 ± 50
Sitoplazmik öziletkenlik [Sm^{-1}]	0.50 ± 0.03	0.43 ± 0.05
Hücre yarıçapı [μm]	10 ± 1	10 ± 1

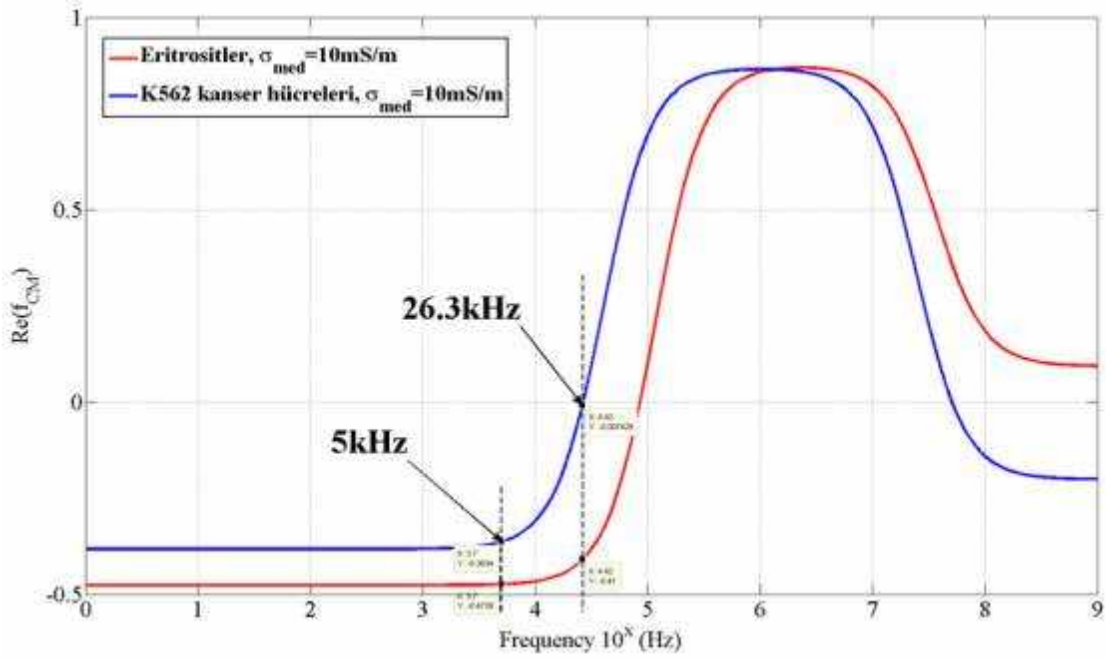


Şekil 71. Doxorubicin dirençli (1 μ M) MCF-7 hücrelerinin ER testleri sırasında elde edilen pik rotasyon frekansının akışkan iletkenliği ile bağıntısını veren lineer grafik (a) ve farklı iletkenlikteki akışkanlarda frekansa bağlı maksimum rotasyon hızı grafikleri (b-c).

4.2 Hücre Modelleme

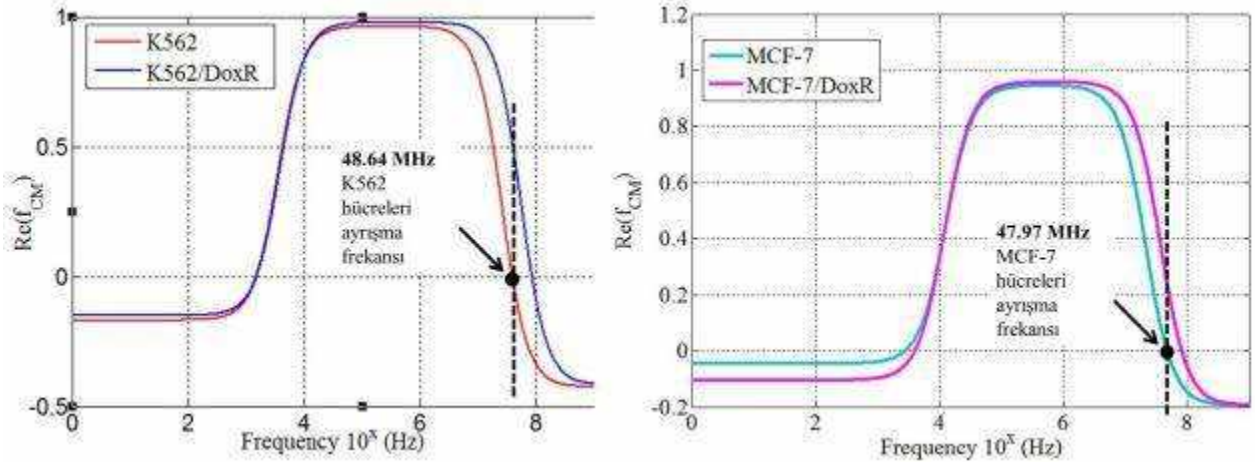
Tüm MATLAB simülasyonları yapılırken, testlerde kullanılacak sıvıya uygun olarak, kanal içindeki sıvının öziletkenliği 2.5 mS/m ve geçirgenlik katsayısı 78 olarak alınmıştır. Ayrıca Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi, “Function” özelliği kullanılarak kod modül haline getirilmiş ve tek satırlık bir kod ile çağrılarak, girilecek her girdiye karşılık $Re(f_{CM})$ -frekans grafiği oluşturabilir hale getirilmiştir.

Kan ve kanser hücrelerinin Eşitlik 11 ve 12 kullanılarak modellenmesi sonucu elde edilen MATLAB simülasyonu Şekil 72’de gösterilmektedir. Hücrelerin ayrıştırılması için frekanslar, aşağıdaki MATLAB grafiğindeki değerlere bakılarak belirlenmiştir. 5 kHz’ten düşük frekanslarda tüm hücreler nDEF ile itilmekte, 26.3 kHz’de de kanser hücreleri (hem ilaca duyarlı hem de ÇİD geliştirmiş) pDEF ile çekilmektedir.



Şekil 72. 10 mS/m iletkenliğe sahip sıvı içinde hücreler için $Re(f_{CM})$ - frekans grafiği.

2. DEF alanında ise ÇİD geliştirmiş hücreler ilaca duyarlı olanlardan ayrılacağı için çalışma frekansı değişiklik göstermektedir. Şekil 73'teki MATLAB simülasyonlarına göre K562 lösemi hücreleri için bu değer 48.64 MHz, MCF7 göğüs kanseri hücreleri için ise 47.97 MHz olarak belirlenmiştir.



Şekil 73. Hücre sitoplazmik iletkenliği ve hücre zarı geçirgenlik katsayısı değişkenlerinin ortalama değerleri alınarak K562 (solda-mavi)-K562AR (solda-kırmızı) ve MCF-7 (sağda-yeşil)-MCF7/dox (sağda-pembe) hücreleri için oluşturulmuş $Re(f_{CM})$ -frekans grafiği ve ayrışma frekansları (48.64 ve 47.97 MHz).

4.3 Birinci Nesil DEF Çipleri

Proje kapsamında her iki DEF alanı için simülasyon ve deneysel sonuçlara bağlı olarak üç farklı nesil DEF çipi tasarımı geliştirilmiştir. Bu çiplerden elde edilen bulgular aşağıda özetlenmektedir.

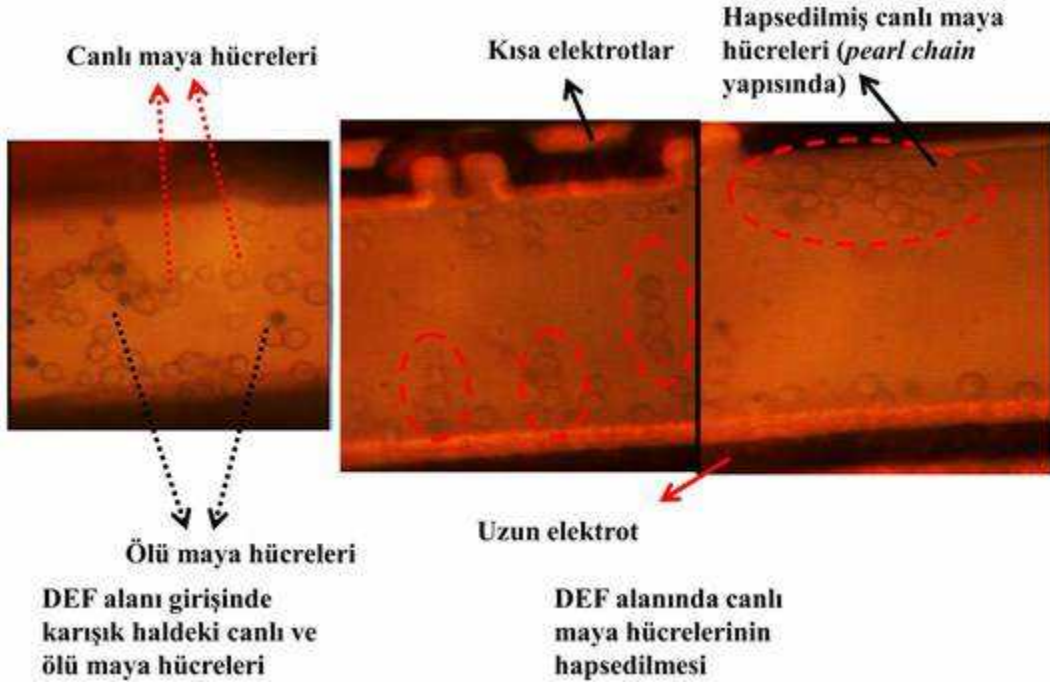
4.3.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması

Kan hücrelerini kanser hücrelerinden ayıracak olan birinci nesil DEF çiplerinde, yüksek bir pDEP kuvveti sağlayabilmek için üç boyutlu elektrotların arasına serbest elektrotlar yerleştirilmiş, bu elektrotlar arasındaki uzaklık da DEF kuvvetini yüksek tutmak için 10 µm olarak belirlenmiştir. Ancak, üç boyutlu elektrotların üretiminde kullanılan Cu elektrokaplama aşamasında, serbest elektrotların birbirine yapıştığı gözlenmiştir. Bu nedenle yeterli DEF kuvveti oluşturulamamış ve bu çiplerle biyolojik testler gerçekleştirilememiştir. Bunun yanı sıra, üretim aşamasında Bölüm 3.3.1'de bahsedilen çeşitli zorluklarla karşılaşmış ve tasarımda değişikliğe gidilmiştir.

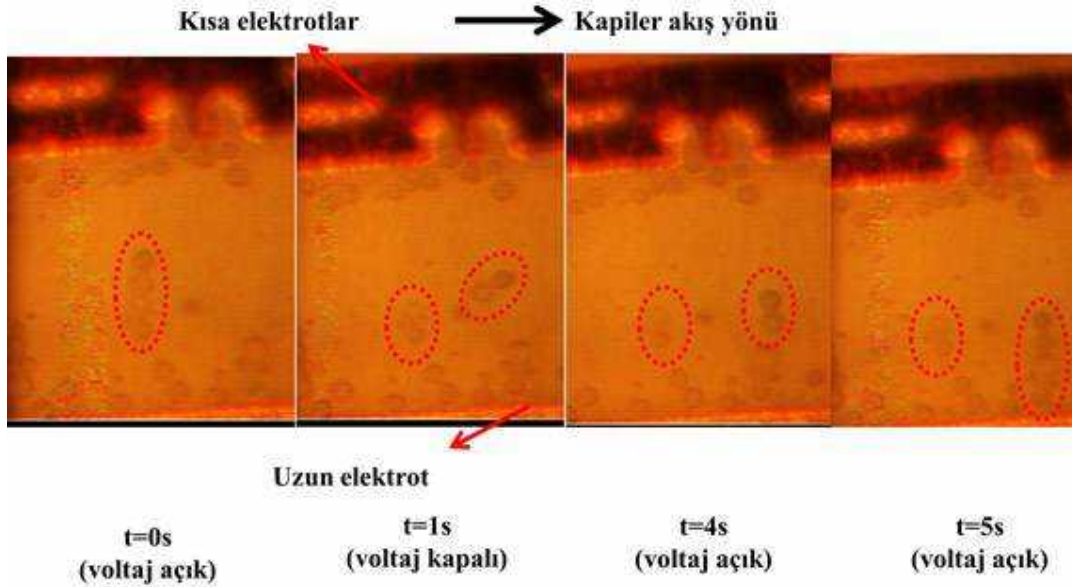
4.3.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması

Birinci nesil DEF çiplerinde 3 boyutlu elektrot kavramının çalıştığının ispatlanması için öncelikle çalışılması daha kolay olan maya hücreleri ile testler yapılmıştır. Test öncesi hazırlıklar Bölüm 3.4.2'de açıklanmıştır.

Yapılan testler sonucunda DEF kuvveti etkisi altına girmiş canlı maya hücrelerinin göstermesi gereken *pearl chain* (Şekil 74) yapılarının DEF alanında olduğu gözlemlenmiştir. Ölü maya hücreleri ise kılcal (kapiler) akış ile çıkışa doğru gitmişlerdir. Bu testler sırasında 16 V_{pp} voltaj kullanılmıştır. Ayrıca uygulanan voltajın kapatılıp açılması ile yakalanan canlı maya hücrelerinin manipüle edilebileceği de gösterilmiştir. Şekil 75'te ilk olarak uygulana voltaj sayesinde yakalanmış 4 canlı maya hücrelerinin oluşturduğu zincir görülmektedir. Ardından voltaj kesilmiş ve bu 4 hücreden 2'si koparak akış ile sağa doğru hareket etmeye başlamıştır. Sonrasında voltaj tekrar uygulanmış ve bu 2 hücre elektrotta başka bir bölgesinden tekrar hapsolmuştur.



Şekil 74. Canlı ve ölü maya hücreleri ile yapılan testler sonucunda birinci nesil DEF çiplerinde hücre ayrıştırmanın gerçekleşebildiği gösterilmektedir. Kanal girişinde canlı ve ölü maya hücreleri karışık halde iken, DEF alanında sadece canlı maya hücrelerinin bulunduğu, ölü hücrelerin akış kuvveti ile kanal dışına çıktığı gözlenmiştir. Canlı maya hücrelerinin DEF kuvveti etkisiyle elektrotlara doğru çekilerek "pearl chain" yapısını oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 75. Voltajın uygulanıp kesilmesi ile manipüle edilen maya hücreleri.

Bu testler sonucunda dielektrik özellikleri farklı, boyutları birbirine yakın hücrelerin farklı DEF tepkisi gösterdikleri ve tasarlanan çiplerle ayrıştırılabilecekleri kanıtlanmıştır. Fakat testler sırasında basınç sürümlü sıvı ile test yapıldığında 2 farklı basınçlı sıvı süren cihaz kullanılacağından bu iki cihazın uyumlu çalışmasının özellikle dielektrik özellik temelli

ayrıştırılmalarda sorun çıkaracağı fark edilmiştir. Ayrıca, bu DEF alanı 2. DEF alanı olacağından 1. DEF alanından gelen sıvıya basınç sürümlü başka bir sıvı ile müdahale etmek test aşamasını karmaşıktırarak hata oranı yüksek hale getirmektedir. Bundan dolayı, ikinci DEF alanı için, sıvı yönlendirmesini pasif olarak kanal içinde yapabilecek, ikinci nesil tasarım yapılmıştır.

4.4 İkinci Nesil DEF Çipleri

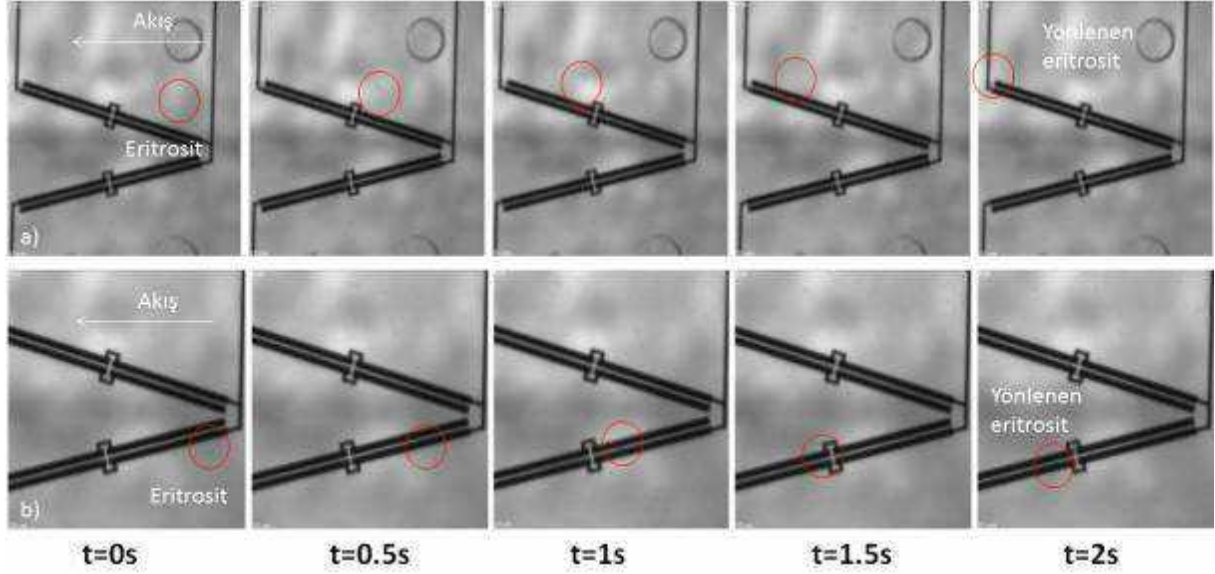
4.4.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması

Bölüm 3.4.1'de de bahsedildiği gibi ikinci nesil DEF çipleri ardışık iki DEF elektrot bölgesinden oluşmaktadır. Bu tasarımda, üç boyutlu elektrotlar yerine, üretimi daha basit olan düzlemsel elektrotlar kullanılmıştır. Düzlemsel elektrot kullanıldığında, tüm hücrelerin DEF kuvvetine maruz kalabilmesi için kanal yüksekliğinin hücre boyutu ile sınırlanması gerekir. Öte yandan, kanal genişliği artırılarak (parilen çökme limitine kadar, yaklaşık 1000 μm) akış hızı (throughput) artırılabilir. İkinci nesil tasarımda, hücrelerin nDEF kuvvetine maruz bırakılarak akış sırasında yönlendirilmesi, böylelikle eritrositlerin orta çıkış kanalından, kanser hücrelerinin ise yan çıkış kanallarından çıkarak ayrıştırılması hedeflenmiştir. Giriş yolundan verilen eritrosit ve K562 kanser hücreleri karışımı ilk olarak birincil elektrot bölgesine ulaşacak ve burada tüm hücreler "Bulgular" bölümünde açıklanan MATLAB simülasyon sonucundan (Şekil 72) seçilen 5 kHz frekansa göre ana kanalın yan duvarlarına doğru yönelecek ve ikincil elektrot bölgesine hücreler iki kanaldan verilmiş gibi ulaşacaklardır. İkincil elektrot bölgesinde elektrotların frekansları, 26.3 kHz olarak uygulanacak ve hücreler aynı MATLAB simülasyonuna göre farklı tepkiler oluşturacaklardır. Eritrositler bu frekans değerinde negatif dielektroforetik özellik görüp, elektrot geometrisi boyunca ilerleyerek orta çıkış kanalına yöneleceklerdir. K562 kanser hücreleri ise bu frekansta dielektroforetik alan etkisi altında kalmadan normal akışlarına devam ederek, üst ve alt çıkış kanallarına yöneleceklerdir.

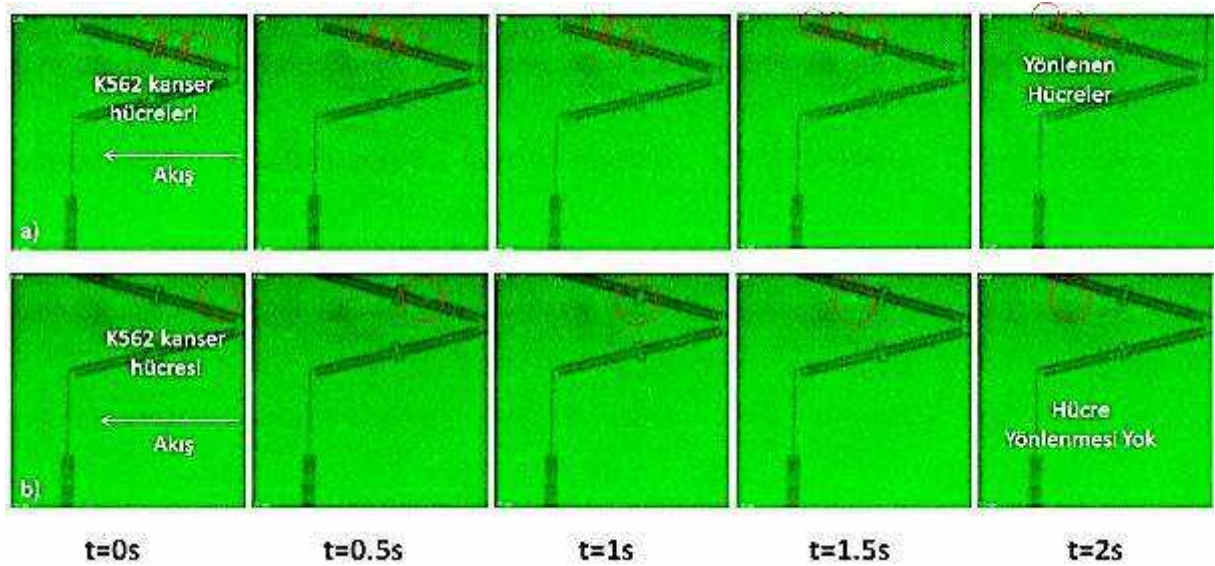
Belirlenen bu frekanslara göre üretilmiş olan ikinci nesil DEF çiplerinin eritrositler ve K562 kanser hücreleri ile elde edilen test sonuçları, sırasıyla Şekil 76'da ve Şekil 77'de verilmiştir. Mikroskobun görüntü alanı (field of view) sınırlamasından dolayı, sadece birinci elektrot bölgesinde gerçekleşen yönlendirmeler gösterilmektedir. Eritrositler için yapılan testler, eritrositlerin normal ışık altında opak olmalarından dolayı filtre kullanılmadan gerçekleştirilmiş olup, 5 kHz ve 26.3 kHz frekanslarında yönlendirilen hücreler işaretlenerek gösterilmektedir. Eritrositlerin mikrokanal içindeki hareketleri küme halinde olduklarında rahatça gözlemlenmektedir. nDEP frekansları sisteme uygulanırken kanal içindeki akış hızı yavaş

olduğundan hücrelerin yoğun olmalarına rağmen toplu şekilde gözlemlenememelerine neden olmuştur.

K562 kanser hücreleri için yapılan testlerde, görüntüleme yeşil floresan ışık altında yapılmış olup, mikrokanal içindeki akışın eritrositlerde olduğu gibi yavaş olmasından kaynaklanan küme halinde hücre hareketi yerine hücrelerin yönelimleri ayrı ayrı gözlemlenmiştir.

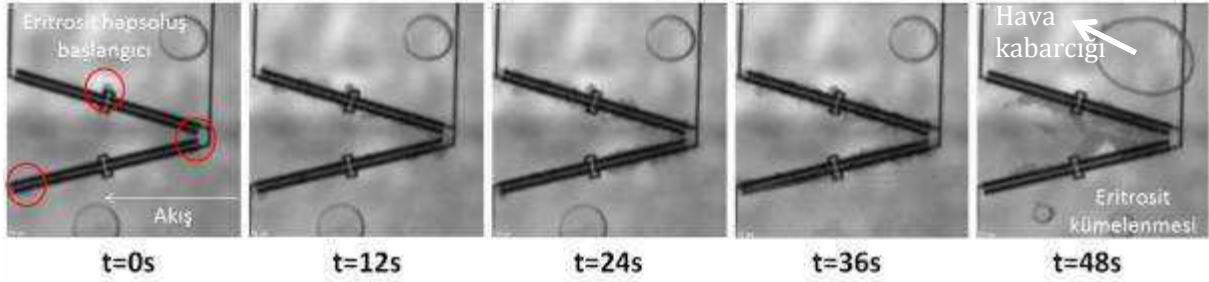


Şekil 76. Sabit gerilim ($20 V_{pp}$) ve akış hızı ($0.2 \mu\text{l}/\text{dk}$) altında eritrositler. (a) 5 kHz, (b) 26.3kHz.

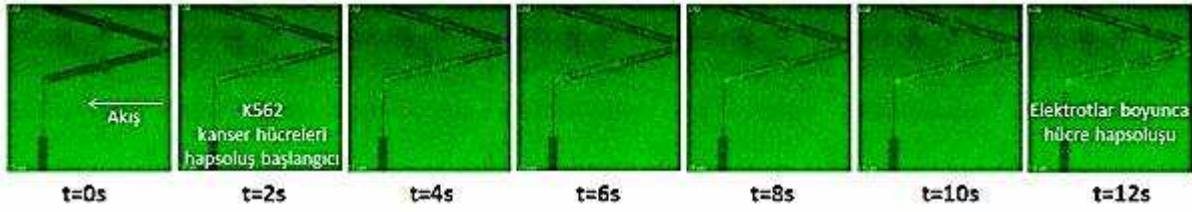


Şekil 77. Sabit gerilim ($20 V_{pp}$) ve akış hızı ($0.2 \mu\text{l}/\text{dk}$) altında K562 kanser hücreleri (a) 5 kHz (b) 26.3 kHz.

Testlerin devamında nDEF frekansları olan kHz seviyelerinden (5 – 26.3 kHz) pDEF frekansları olan MHz seviyelerine (1 -10 MHz) geçiş yapılarak elektrotlar üzerindeki hücre hapsoluşları incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 78’de ve Şekil 79’da verilmiştir. Eritrositler ve K562 kanser hücreleri üzerinde yapılan pDEF testlerinde, hücrelerin elektrotlar üzerine tutunarak hapsoldükleri açıkça görülmektedir. Elektrotlar üzerindeki hapsoluş miktarları kullanılan hücre konsantrasyonuna göre değişmektedir. Testler sırasında kanal içlerinde bazı bölgelerde, kullanılan mikroşırıngadan gelen hava kabarcıkları tespit edilmiştir. Bu hava kabarcıkları elektrotların çevresinde kaldıklarında, hücre akışlarını bozmaktadırlar.



Şekil 78. Sabit gerilim (20 V_{pp}) ve akış hızı (10 µl/dk) altında eritrositler – 10MHz.



Şekil 79. Sabit gerilim (20 V_{pp}) ve akış hızı (10 µl/dk) altında K562 kanser hücreleri – 10MHz.

Yapılan testler sonucunda, pDEF frekanslarında hücrelerin daha iyi yönlendirilebildiği gözlenmiştir. Tablo 20, farklı akış hızlarında her iki elektrot bölgesinde pDEF veya nDEF kuvvetinin oluşup oluşmadığını göstermektedir. Buna göre, nDEF kuvveti, 1 µl/dk ve üzeri akışlarda etkisiz hale gelirken, pDEF kuvveti 20 µl/dk'ya kadar etkili olabilmektedir. Dolayısıyla nDEF kuvveti, bu sistemde yüksek akış hızlarında ayrışmayı sağlayabilmek için yeterli değildir.

Tablo 20. Eritrosit ve K562 hücrelerinin farklı akış hızlarındaki nDEF veya pDEF kuvvetinden etkilenme durumları.

Hücre Çeşidi	Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)	Uygulanan DEF	Akış Hızı ($\mu\text{l}/\text{dk}$)					
			0.2	0.5	1	5	10	20
Eritrositler	5×10^6	nDEF	+	+	-	-	-	-
		pDEF	+	+	+	+	+	+
K562 Kanser Hücreleri	1×10^6	nDEF	+	+	-	-	-	-
		pDEF	+	+	+	+	+	+

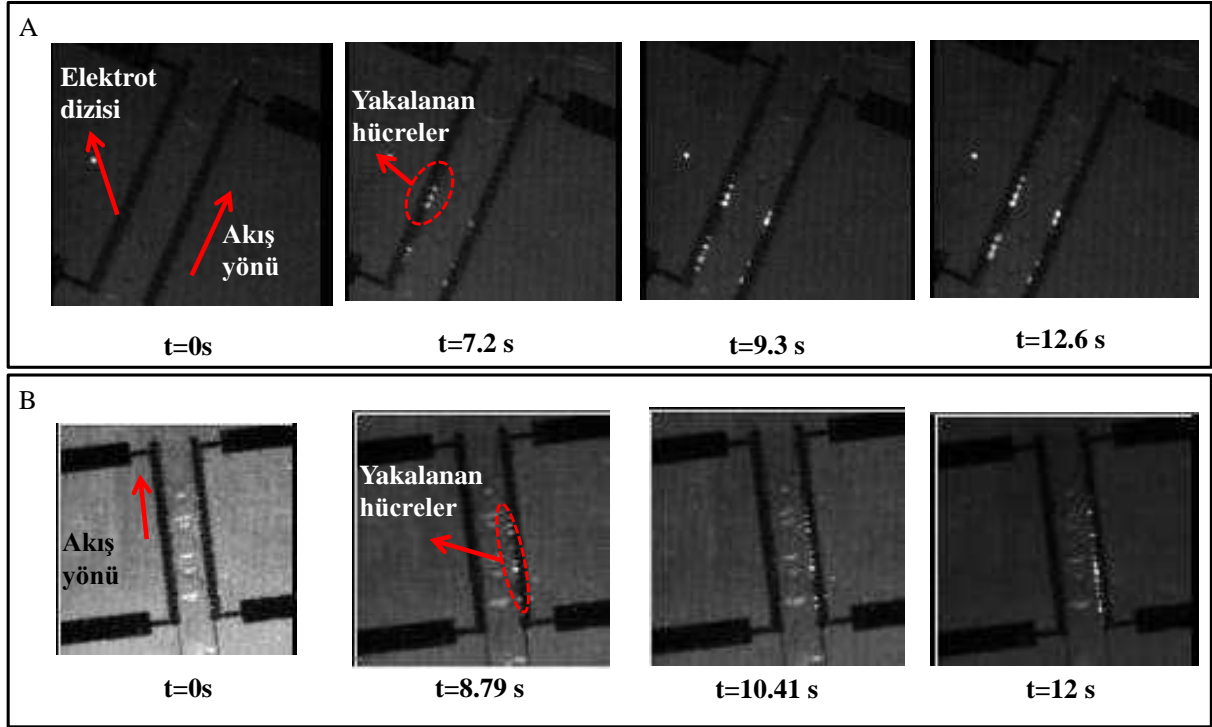
Ayrıca, ikinci nesil tasarımlarda, elektrotların açık olan uç bölgelerinde DEF alanının etkisinin düşmesiyle hücre kaçışları gözlenmiştir. Bu sonuçlar, düzlemsel elektrotlar kullanılarak pDEF ile hücreleri elektrotlar üzerinde kaydırmak suretiyle yönlendirme yapılabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda tasarımlar revize edilerek üçüncü nesil çipler geliştirilmiştir.

4.4.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayrıştırılması

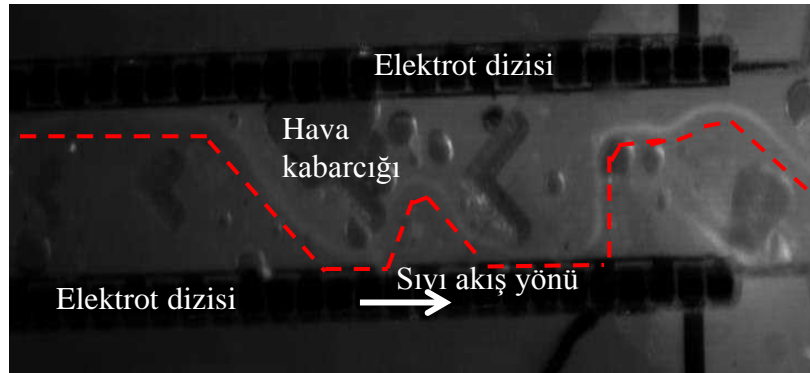
Üretilen ikinci nesil çipler ÇİD geliştirmiş K562 lösemi ve MCF7 meme kanseri hücreleri kullanılarak test edilmiştir. Aşağıda bu iki hücre hattı ile alınan test sonuçları sunulmaktadır.

K562 lösemi hücreleri ile yapılan testler ve sonuçları:

Bölüm 4.2'de belirtildiği üzere, hücre modellemeleri sonucu dirençsiz K562 hücrelerinin sıfır DEF kuvveti gördüğü frekans 48.64 MHz olarak belirlenmiştir. Doxorubicin direnci geliştirmiş K562 lösemi hücrelerinin bu frekansta pozitif DEF kuvveti ile elektrotlara doğru çekilip yakalanması gerekmektedir. Imatinib direnci geliştirmiş K562 hücrelerinin de aynı frekansta benzer tepkiyi vermesi beklenmektedir, çünkü, hücrelerin imatinib ve doxorubicin direnci geliştirme mekanizmaları aynıdır. İki tip ilaca karşı da direnç P-glycoprotein (P-gp) yüksek miktarda ekspresyonu sonucu oluşmaktadır. İlk test sonuçları her iki hücre tipinin de 48.64 MHz'de elektrotlarda hapsoldüğünü, dirençsiz hücrelerin ise şırınga pompası ile sürülen sıvı ile çıkışa doğru aktığını göstererek imatinib dirençli hücreler ile doxorubicin dirençli olanların benzer dielektrik özellik gösterdiği varsayımını doğrulamıştır. Şekil 80'de elektrotlar üzerinde yakalanmış imatinib (A) ve doxorubicin (B) dirençli hücreler görülmektedir. Tüm deneylerde 48.64 MHz frekans ve 9 V_{pp} büyüklüğünde voltaj uygulanmıştır. Sıvı akış hızı 10 $\mu\text{l}/\text{dk}$ 'dır. Şekil 81 aynı deney koşulları altında sıfır DEF kuvveti gördüğü için yakalanmayıp akış ile çıkışa yönelen dirençsiz K562 hücrelerinin kanal içindeki yolunu göstermektedir. Bu testler sayesinde aynı deney koşulları altında dirençli ve dirençsiz hücrelerin DEF kuvvetine karşı farklı tepkiler verdiği gösterilerek, bu iki tip hücrenin DEF ile ayrıştırılabileceği kanıtlanmıştır.



Şekil 80. İmatinib (A) ve Doxorubicin (B) dirençli K562 lösemi hücrelerinin 48.64 MHz frekans ve 9 V_{pp}'te elektrotlarda yakalanması. Akış hızı = 10 µl/dk.

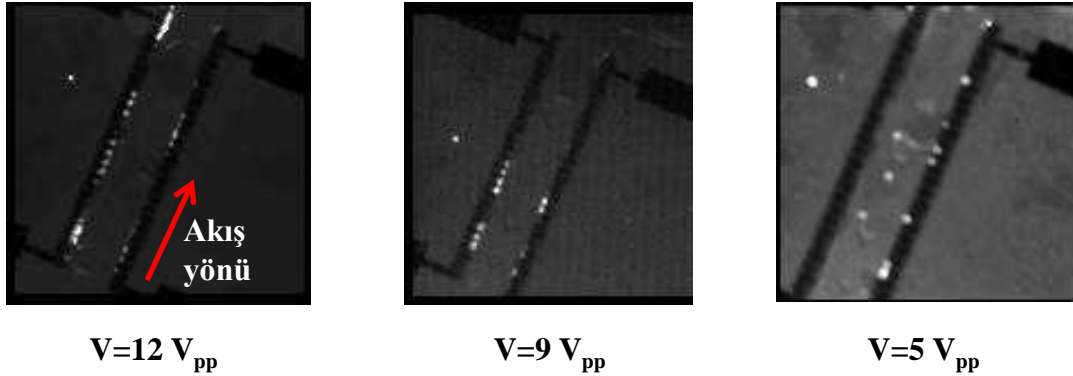


Şekil 81. 48.64 MHz frekans ve 9 V_{pp}'te, 10 µl/dk akış hızı ile gelen dirençsiz K562 hücrelerinin kanal içindeki yolu.

Ayrıca imatinib dirençli K562 hücreleri kullanılarak ikinci nesil çiplerin performans analizleri yapılmıştır. Yapılan çip performans testleri 6.25×10^5 hücre/ml konsantrasyonlu hücrelerin minimum 5 V_{pp}'e kadar yakalanabildiğini göstermiştir. Şekil 82 farklı voltajlarda yakalanmış imatinib dirençli hücreleri göstermektedir. Test sonuçlarına göre 20 V_{pp} voltajda hücreler yakalanmaktadır. Fakat bu voltaj değerinde parilerin elektrik alana karşı dayanıklılığı yetmemekte ve hücreler patlayarak ölmektedirler.

Voltaj performans analizlerinin ardından akış hızı performans analizleri de yapılmıştır. Bu testler için Tablo 21'de görülen farklı akış hızları 2 farklı (6.25×10^5 ve 3×10^5 hücre/ml) hücre

konsantrasyonu için denenmiştir. Test sonuçlarına göre 20 $\mu\text{l}/\text{dk}$ hızda dahi hücre yakalanması görülmektedir.



Şekil 82. Farklı voltajlarda yakalanan imatinib dirençli K562 lösemi hücreleri ($f=48.64$ MHz, $akış\ hızı=10$ $\mu\text{l}/\text{dk}$) (video1).

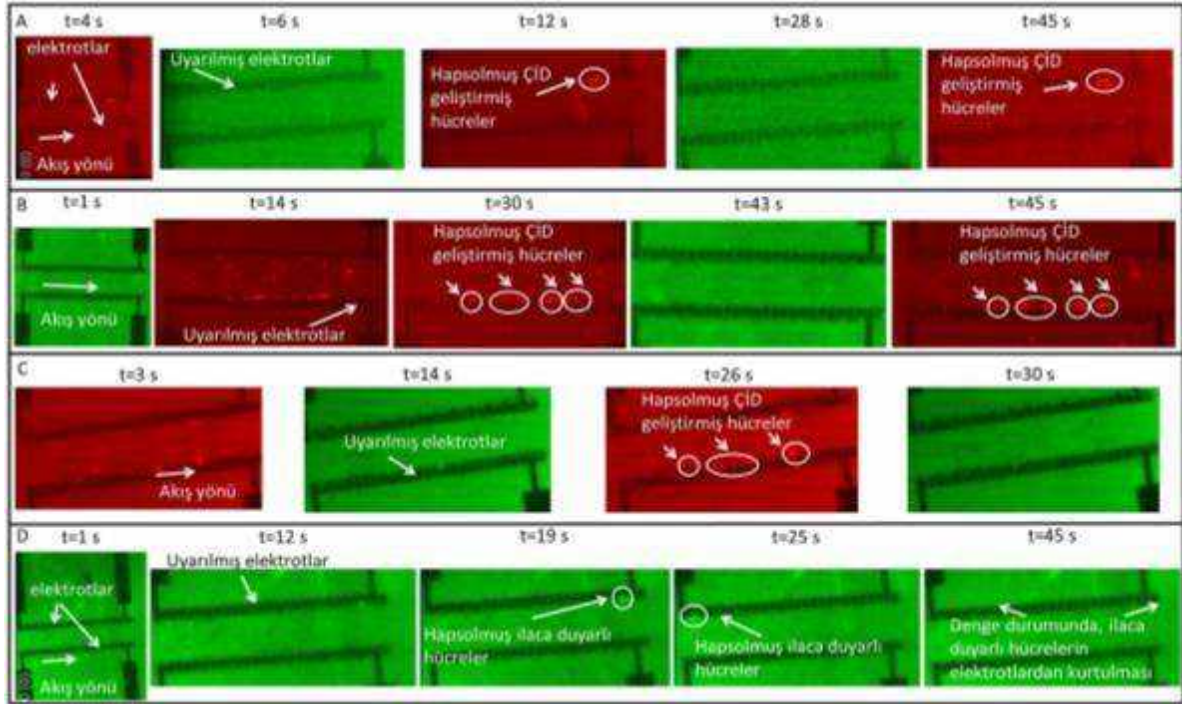
Tablo 21. İkinci nesil çiplerinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı akış hızlarında hücre yakalama performansı analiz sonuçları ($f=48.64$ MHz, $voltaj=15$ V_{pp}).

Konsantrasyon	Akış Hızı ($\mu\text{l}/\text{dk}$)				
	1	3	6.67	10	20
6.25×10^5 hücre/ml	+	+	+	+	+
3×10^5 hücre/ml	+	+	+	-	-

Ayrıştırma testlerinde, dirençsiz ve imatinib dirençli K562 hücreleri aynı anda kanal içine verileceğinden ikisinin farklı renklerde boyanması ve bir boyanın görülebildiği dalga boyunda diğerinin görülemez olması gerekmektedir. Bu sayede 2 farklı filtre kullanılarak, 2 farklı renkteki hücre ayırt edilebilmektedir. Bu sebeplerle ve tüm sitoplazmayı boyayarak hücrelerin görülmesini kolaylaştırdıkları için “cell tracker red” (kırmızı renk) ve “FDA” (yeşil renk) boya kullanılmıştır. Testler sırasında dirençli K562 hücrelerinin görüntülenmesi için 31002 TRITC (Chroma) filtresi kullanılmıştır. Dirençsiz K562 hücreleri ise GFP filtresi ile görüntülenmişlerdir. Ancak, testler sırasında kullanılan *Evolve 128* yüksek hızlı florasan görüntüleme yapabilen kamera monokromatiktir. Bu sebeple alınan görüntüler işlenerek “false coloring” metodu ile renklendirilmiş ve analizler işlenmiş görüntüler üzerinden yapılmıştır.

Optimize edilmiş deney koşulları altında ($akış\ hızı = 10$ $\mu\text{l}/\text{dk}$, $voltaj = 9$ V_{pp}), K562 hücrelerinin dirençli ve dirençsiz hücre hatları farklı konsantrasyonlarda karıştırılarak, çiplerin spesifik hücre yakalamadaki etkinliği test edilmiştir. Bunun için, 2.5×10^3 hücre/ml dirençli hücre ile 2.5×10^5 hücre/ml dirençsiz hücre (100 katı) kullanılarak tekrarlı testler yapılmıştır. Şekil 83 bu testler sırasında alınan imajları göstermektedir. Şekil 83'te, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile alınan imajlar kırmızı skala ile, GFP filtresi ile alınanlar ise yeşil skala ile

renklendirilmişlerdir. Şekil 83(A)'da görülen hücreler hücre karışımından DEF kuvveti sayesinde, 6.67 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızı altında, hapsedilen imatinib dirençli K562 hücreleri, Şekil 83(B)'dekiler ise doxorubicin dirençli K562 hücreleridir. Şekil 83(C), çiplerin akış hızı performansını belirlemek için 10 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızı altında da imatinib dirençli K562 hücrelerinin ilaca duyarlı olanlardan ayrılabilirdiğini göstermektedir. Ayrıca, Şekil 83(A) ve 83(C) denge durumu süreleri de (45s ve 30 s) akış hızları ile tutarlılık göstermektedir. Şekil 83(D)'deki imajlar, kanala sadece ilaca duyarlı hücrelerin verildiği testlerin sonuçlarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre ilk 12 s, ilaca duyarlı hücreler elektrotlarda tutunmazken; 19-25 s aralıklarında hidrodinamik olarak elektrot üstünde tutuklanmış olan ilaca duyarlı hücreler görülmektedir. Fakat, denge durumuna gelindiğinde (45 s), kanal içinde herhangi bir ilaca duyarlı hücre kalmamıştır.

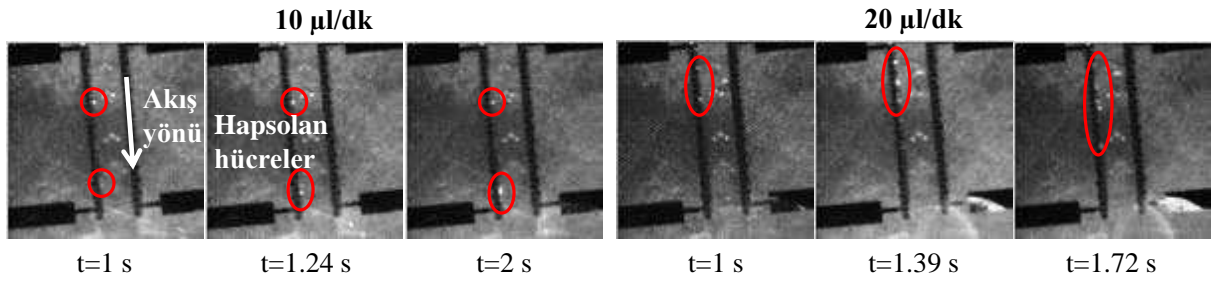


Şekil 83. Dirençsiz ve imatinib (A)- doxorubicin (B) dirençli K562 hücrelerinin 2.nesil DEF çipleri kullanılarak 6.67 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızında 9 V_{pp} voltaj kullanılarak ayrıştırılması ($f = 48.64$ MHz). Kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda hapsolmuş halde görülen hücreler, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile görüntülenmiş “cell tracker red” isimli boya ile kırmızı renge boyanmış dirençli K562 hücreleridir. Yeşil renklendirilmiş imajlar GFP filtresi altında alınmış görüntülerdir. Dirençsiz K562 hücreleri hapsolmadığından bu imajlarda herhangi bir hücre görülmemektedir. (C) Dirençsiz ve imatinib dirençli K562 hücrelerinin 2.nesil DEF çiplerinin akış hızı performansının belirlenmesi amacıyla 10 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızında 9 V_{pp} voltaj kullanılarak ayrıştırılması ($f = 48.64$ MHz). (D) 48.64 MHz ve 6.67 $\mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızında ilaca duyarlı hücrelerin kanal içindeki davranışları. 45 s’lik denge durumuna gelindiğinde kanalda ilaca duyarlı hücre kalmamıştır (video2).

MCF7 meme kanseri hücreleri ile yapılan testler ve sonuçları:

Dirençsiz ve doxorubicin dirençli MCF7 hücreleri MATLAB'da modellenmiş ve çalışma frekansı 47.97 MHz olarak belirlenmiştir. Bu modelleme çerçevesinde belirlenen frekansta, doxorubicin dirençli MCF7 hücreleri elektrotlar üzerinde hapsolacak dirençsiz olanlar ise DEF kuvvetinden etkilenmeden çıkışa yönlenecektir.

Optimum voltaj ve akış hızı değerlerini belirleyebilmek adına, farklı akış hızlarında sabit voltaj değerindeki hapsolma testleri sonuçları Şekil 84te sunulmaktadır. Ayrıca Tablo 22 yapılan tüm voltaj ve akış hızı performans testlerinin sonuçlarını özetlemektedir.

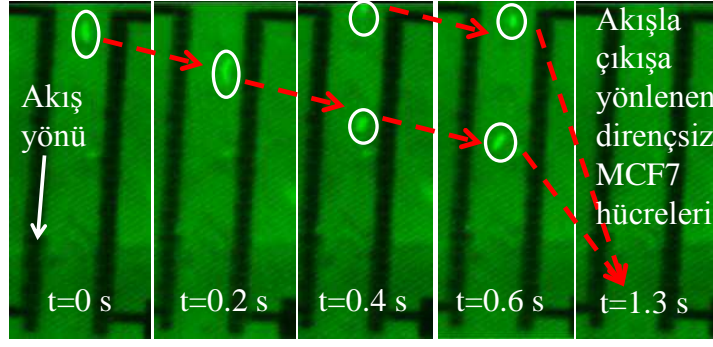


Şekil 84. Sabit voltajda (20 V_{pp}), farklı akış hızı (10 µl/dk (solda) ve 20 µl/dk (sağda)) altında hapsolan MCF7/dox1000 hücreleri.

Tablo 22. İkinci nesil DEF çiplerinin, MCF7/dox1000 hücrelerinin hapsolma testlerindeki voltaj ve akış hızı performans sonuçları (+, hücrelerin hapsedildiğini; -, hücrelerin hapsedilemediğini göstermektedir). Akış hızı performans testlerinde voltaj (20 V_{pp}), voltaj performans testlerinde akış hızı (5 µl/dk) sabittir.

Konsantrasyon (hücre/ml)	Akış hızı (µl/dk)					Voltaj (V _{pp})			
	1	3	6.67	10	20	7	12	15	20
6.25x10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5x10 ⁵	+	+	+	+	-	+	+	+	+

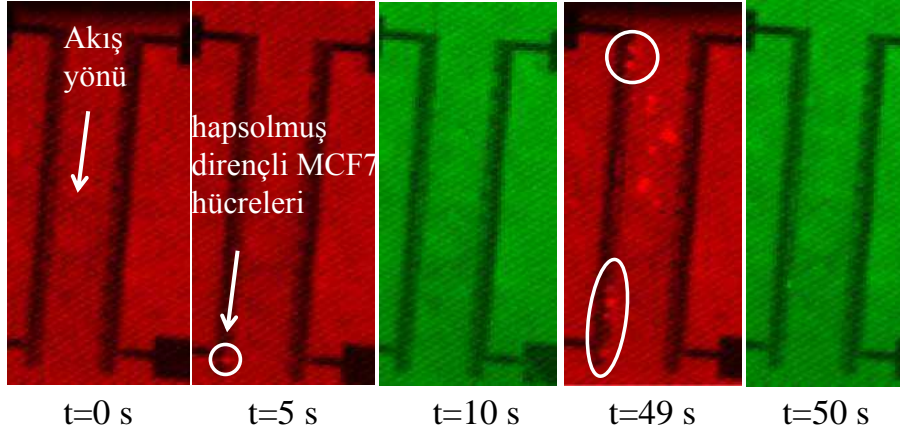
Aynı akış hızı ve voltaj değerlerinde dirençsiz MCF7 hücreleri ile de testler yapılmış ve hapsolmadan çıkışa yönlendikleri görülmüştür. Şekil 85'te hapsolmadan çıkışa yönlenen dirençsiz MCF7 hücrelerinin kanal içindeki yolu görülmektedir. Bu testler sayesinde aynı deney koşulları altında dirençli ve dirençsiz MCF7 hücrelerinin DEF kuvvetine karşı farklı tepkiler verdiği gösterilerek, bu iki tip hücrenin de K562 lösemi hücrelerinde olduğu gibi ikinci nesil DEF çipleri ile ayrıştırılabileceği ispatlanmıştır.



Şekil 85. 47.97 MHz frekans ve $9 V_{pp}$ 'de, $5 \mu\text{l/dk}$ akış hızı altında kanala gelen dirençsiz MCF7 hücrelerinin kanal içindeki yolu.

Ayrıştırma testlerinde, dirençsiz ve doxorubicin dirençli MCF7 hücreleri de lösemi hücrelerinin testlerinde olduğu ve yukarıda anlatıldığı gibi iki farklı renkte, sırasıyla yeşil ve kırmızı, boyanmıştır. Boyanmadan önce lösemi hücrelerinden farklı olarak, MCF7 hücreleri yüzeye tutunan hücreler olduğundan öncelikle tripsin enzimi ile yüzey ve hücre arasında oluşan bağlar kesilmiştir. Ardından, hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüş ve içinde buldukları RPMI 1640 solüsyonu atılmıştır.

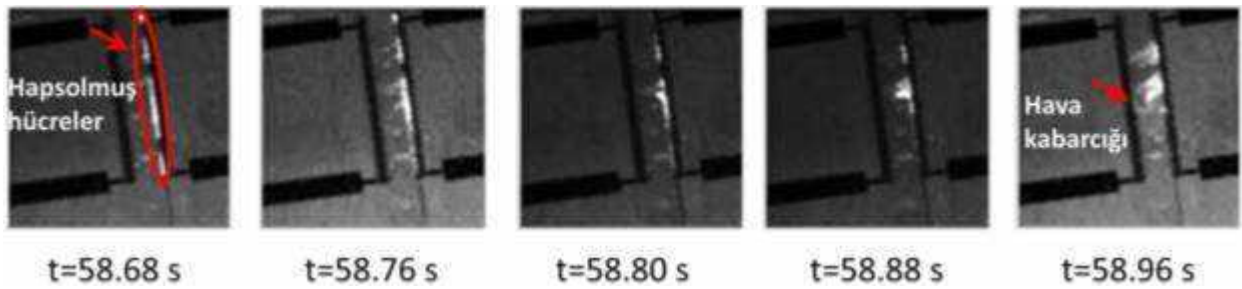
Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan dirençsiz ve doxorubicin dirençli MCF7 hücre karışımı mikro-şırınga pompası kullanılarak 2. nesil DEF çiplerine verilmiştir. Şekil 86, sürekli akış altında ($5 \mu\text{l/dk}$) test edilen DEF alanının farklı zamanlarda alınmış imajlarını göstermektedir. Şekilde görüldüğü üzere MCF7/dox1000 hücreleri 5. saniyeden itibaren elektrotlar üzerinde hapsolmeye başlarken (kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda), konsantrasyonu 100 kat daha fazla olmasına rağmen, tüm dirençsiz MCF7 hücreleri akışla birlikte çıkışa yönlendirilmiştir. Yeşil renklendirilmiş imajlarda hapsolan herhangi bir hücrenin görülmemesi bunu kanıtlamaktadır.



Şekil 86. Dirençsiz ve doxorubicin dirençli MCF7 hücrelerinin ayrıştırılması sırasında farklı zamanlarda alınmış ve “false coloring” ile renklendirilmiş imajlar ($f = 47.97$ MHz, $voltaj = 9$ V_{pp}, $akış\ hızı = 5$ µl/dk). Kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda hapsolmuş halde görülen hücreler, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile görüntülenmiş, “cell tracker red” isimli boya ile kırmızı renge boyanmış doxorubicin dirençli MCF7 hücreleridir. Yeşil renklendirilmiş imajlar GFP filtresi altında alınmış görüntülerdir. Dirençsiz MCF7 hücreleri hapsolmadığından bu imajlarda herhangi bir hücre görülmemektedir (video3).

İkinci nesil DEF çiplerinde karşılaşılan sorunlar ve çözümleri:

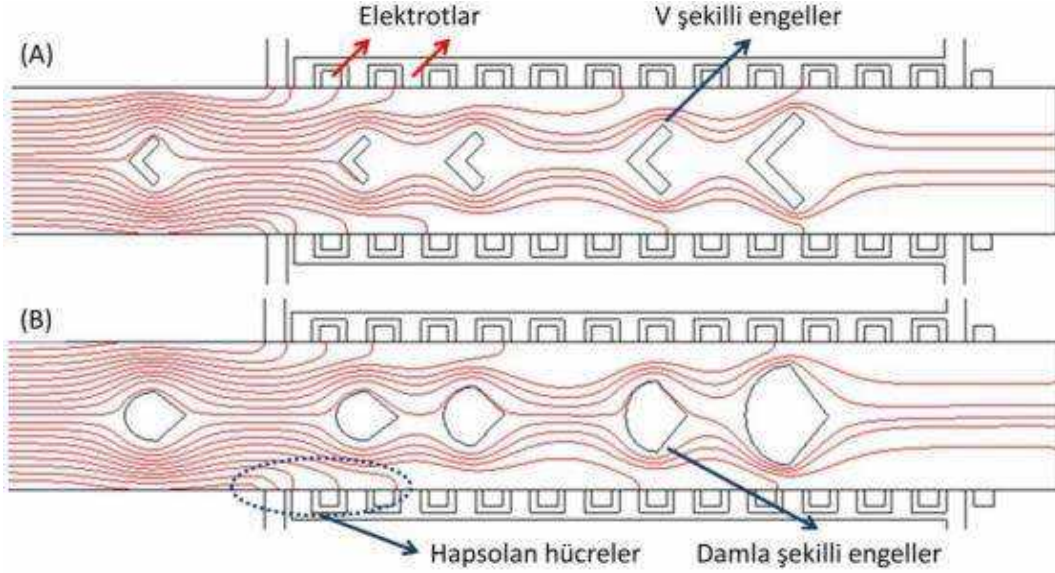
İkinci nesil DEF çiplerinde V şekilli parilen engeller kullanılmıştır. V şeklinin doğası sebebi ile; bu engellerin iki kolu arasında boşluk bulunmaktadır. Bu durum, içeriye mikro akışkan verildiğinde havanın hapsolması ile hava kabarcığı oluşumuna sebep olmaktadır. Hava kabarcığı mikro akışkan sebebi ile hareket etmekte; kanalın tıkanmasına sebep olabileceği gibi, elektrotların üzerini kapatarak ya da hapsolmuş hücrelere hızla çarpıp dağılmalarını sağlayarak DEF hassasiyetinin azalmasına ve akış rejiminin bozulmasına sebep olmaktadır. Şekil 87’de hızla gelen hava kabarcığının hapsolan hücrelere verdiği zarar görülebilmektedir.



Şekil 87. V şekilli engeller sebebi ile oluşmuş hava kabarcığının hapsolan hücrelere zarar vermesi.

Bu sorunun çözümü için damla şekilli engeller önerilmiştir. Damla şeklinde havanın hapsolacağı yer olmadığından hava kabarcığı oluşumunun engelleneceği ön görülmüştür. Burada amaç, V şekilli yerine damla şekilli engeller kullanarak, DEF hassasiyetini düşürmeden hava kabarcığı oluşumu engellenerek; pasif olarak hücreleri DEF alanına

odaklamaktır. V şekilli engeller ile aynı boyutta ve aynı yerlere yerleştirilen damla şekilli engeller ile simülasyonlar yapılmış ve beklenildiği gibi DEF hassasiyetinde düşüş olmadığı gösterilmiştir. Şekil 88'de yapılan simülasyonların sonuçları karşılaştırmalı olarak görülmektedir.

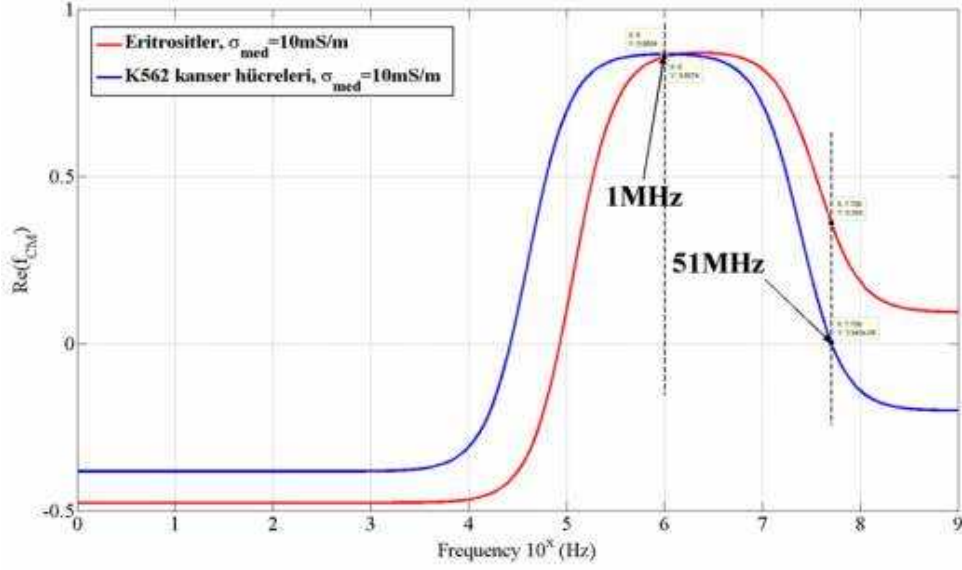


Şekil 88. Farklı şekillerde engeller kullanılarak, imatinib dirençli K562 hücrelerinin DEF kuvveti ile elektrotlarda hapsedilmesi simülasyonları: (A) V şekilli engeller, (B) Damla şekilli engeller.

4.5 Üçüncü Nesil DEF Çipleri

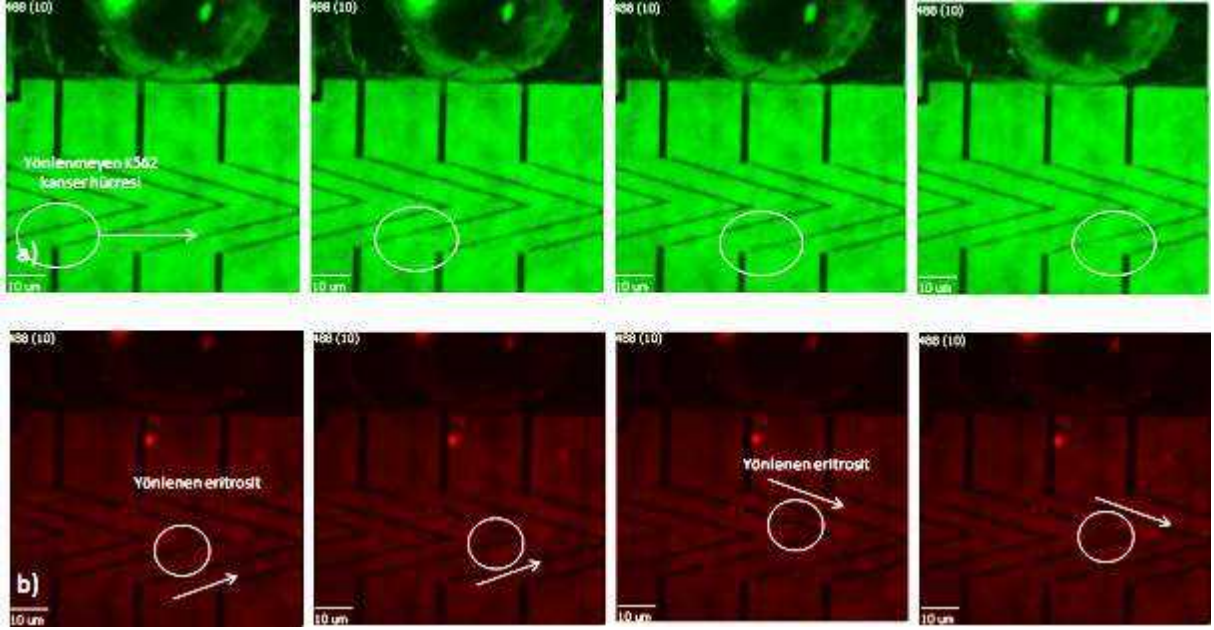
4.5.1 Kan Hücrelerinin Kanser Hücrelerinden Ayrıştırılması

Üçüncü nesil DEF çiplerinde, ikinci nesilde karşılaşılan problemleri aşmak üzere iki farklı DEF çipi tasarımı gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ayrıştırılması için ikinci tasarımdaki elektrotlar üzerinde hücrelerin kayışından yola çıkılarak belirlenen pDEF frekans değerleri Şekil 89'daki MATLAB grafiğinden belirlenmiştir.



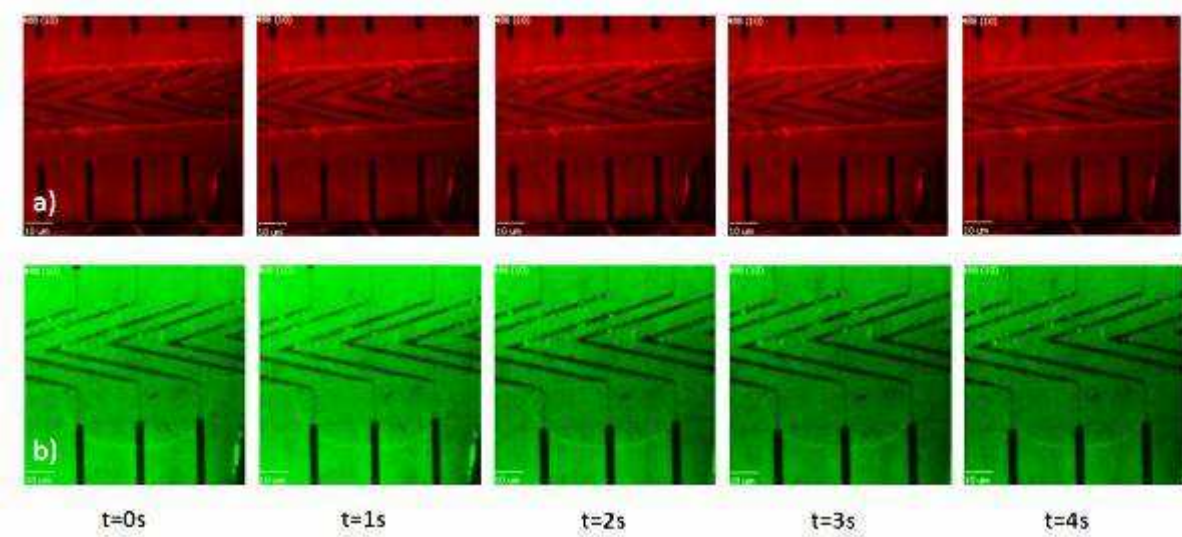
Şekil 89. 10 ms/m iletkenliğe sahip sıvı içinde hücreler için $Re(f_{cm})$ & frekans grafiği.

Üçüncü nesil DEF çipleri için geliştirilen iki farklı tasarımda kullanılan frekanslar değişiklik göstermektedir. İlk tasarımda, ikinci nesil DEF çiplerin genel anlamda toprak hatlı olanı geliştirildiği için bu çiplerde hem ikinci nesil için kullanılan nDEF frekansları hem de yeni belirlenen pDEF frekansları kullanılabilir. Testler yapılırken ilk olarak 5 kHz ve 26.3 kHz frekansları denenmiştir. Yeni oluşturulan topraklama hatlarının, sisteme uygulanan frekansların karışmasını önlediği gözlemlenmiştir. Ancak, hücrelere uygulanan nDEF kuvvetinin hücrelerin akış hızlarına göre düşük kalması nedeniyle aynı çiplerde yeni belirlenen 1 MHz ve 51 MHz frekansları denenmiştir. Birinci DEF bölgesine uygulanan 1 MHz frekansı tüm hücrelerin elektrotlar üzerinde kayarak kanal duvarlarına yönelmelerini sağlarken, ikinci DEF bölgesine uygulanan 51 MHz frekansı ise eritrositleri pDEF etkisiyle elektrotlardan kaydırarak ortaya toplamakta ve K562 kanser hücrelerinin yönelmeden devam etmelerini sağlamaktadır. İkinci DEF bölgesindeki hücre hareketlerini gösteren sonuçlar Şekil 90'da paylaşılmıştır.



Şekil 90. Hücrelerin ikinci DEF bölgesinde gördükleri 51 MHz frekansla hareketleri. (a) Yönlenebilir K562 kanser hücreleri ve (b) merkeze doğru yönlenebilir eritrositler.

İkinci tasarım, DEF etkisiyle ana kanal duvarlarına yönlenebilir hücrelerin duvardaki filtrelerden geçip geçmemesi üzerine tasarlandığı için, Şekil 89'daki iki hücre grubunun da pDEF alanını en fazla hissedeceği 1 MHz frekansı uygulama frekansı olarak seçilmiş ve uygulanmıştır. Sonuçlar Şekil 91'de verilmektedir.



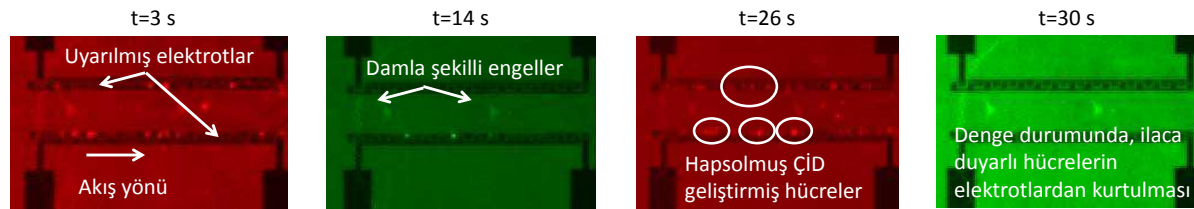
Şekil 91. Sabit Gerilim ($20 V_{pp}$) ve Akış Hızı ($16 \mu\text{l}/\text{dk}$) altında a) Eritrositler b) K562 Kanser Hücreleri – 1 MHz (video4).

İkinci tasarım çiplerde, eritrositler ve K562 kanser hücrelerinin karışımı için yapılan testler, gözlem kolaylığı açısından iki hücre grubu da farklı renkteki floresan boyalarla boyanarak gerçekleştirilmiştir. Eritrositler kırmızı floresan boya, K562 kanser hücreleri için önceki

testlerde olduğu gibi yeşil floresan boya kullanılarak işaretlenmiştir. Eritrositlerin hücre konsantrasyonları 5 milyon hücre/ml olarak hazırlanıp uygulanırken, K562 kanser hücreleri 1 milyon hücre/ml olarak denenmiştir. İki hücre grubu da 1MHz frekans etkisiyle elektrotlar üzerinden kayarak duvarlardaki filtrelemlere yönlendirilmiş ve boyutları filtrelerden geçmesine engel olan K562 kanser hücreleri ana kanal içinde kalarak yollarına devam etmiştir. Eritrositler ise aynı filtrelemlere yönlendikten sonra, küçük boyutları sayesinde yan kanallara geçerek ve bir kısmı filtrelemlerde tutularak, ana kanaldaki eritrosit yoğunluğunun düşürülmesi sağlanmıştır. Bu çiplerde, eritrositlerin yan kanallara geçtikten sonra tekrar ana kanala dönememeleri ve bu sayede K562 hücre grubunun hareketlerini engellemeleri önemli bir avantaj sağlamaktadır.

4.5.2 Dirençli ve Hassas Kanser Hücrelerinin Ayırıştırılması

V şekilli engellere sahip 2. nesil çiplerinde optimize edilmiş deney koşulları altında (*akış hızı* = 10 $\mu\text{l/dk}$, *voltaj* = 9 V_{pp}), K562 hücrelerinin dirençli ve dirençsiz hücre hatları farklı konsantrasyonlarda karıştırılarak, damla şekilli engellerle üretilmiş, elektrot açısından V şekilli engeller ile aynı özelliklere sahip çiplerin spesifik hücre yakalamadaki etkinliği test edilmiştir. Bunun için, 2.5×10^3 hücre/ml dirençli hücre ile 2.5×10^5 hücre/ml dirençsiz hücre (100 katı) kullanılarak tekrarlı testler yapılmıştır. Şekil 92 bu testler sırasında alınan imajları göstermektedir. V şekilli engellere sahip 2. nesil çiplerde olduğu gibi yeşil imajlar ilaca duyarlı hücrelere, kırmızı imajlar ÇİD geliştirmiş hücrelere aittir. Toplam deney denge süresi, akış hızı 10 $\mu\text{l/dk}$ olduğundan, 30 s'dir.



Şekil 92. Dirençsiz ve doxorubicin dirençli K562 hücrelerinin ayırıştırılması sırasında farklı zamanlarda alınmış ve “false coloring” ile renklendirilmiş imajlar ($f = 48.64$ MHz, $V = 9$ Vpp, flow rate = 10 $\mu\text{l/dk}$). Kırmızı ile renklendirilmiş imajlarda hapsolmuş halde görülen hücreler, 31002 TRITC (Chroma) filtresi ile görüntülenmiş, “cell tracker red” isimli boya ile kırmızı renge boyanmış doxorubicin dirençli K562 hücreleridir. Yeşil renklendirilmiş imajlar GFP filtresi altında alınmış görüntülerdir. 30 s’lik denge durumuna gelindiğinde kanalda ilaca duyarlı hücre kalmamıştır. Ayrıca damla şekilli engeller kullanıldığından kanalda hava kabarcığı oluşumu görülmemiştir.

Damla şekilli engellere sahip çipler, V şekilli engellere sahip çipler ile aynı seçiciliğe sahip olup hava kabarcığı oluşumunu tamamen ortadan kaldırmışlardır. Ayrıca tasarım 4 olarak geçen sıvı akışını stabil hale getirmek için tasarlanmış, lamine edilmiş damla şekilli engelli

çipler hava kabarcığı oluşumunu engellememiş aksine köşeli yapılar sebebi ile arttırmıştır. Tasarım 2 100% seçicilik için tasarlanmıştır; fakat, damla şekilli engeller kanal duvarına çok yakın olduğundan fazla konsantrasyonda hücre içeren solüsyonlarda kanal tıkanması engellenememiştir. Bu test sonuçları çerçevesinde; entegre sistemde tasarım 1 ve 3'ün kullanılmasına karar verilmiştir.

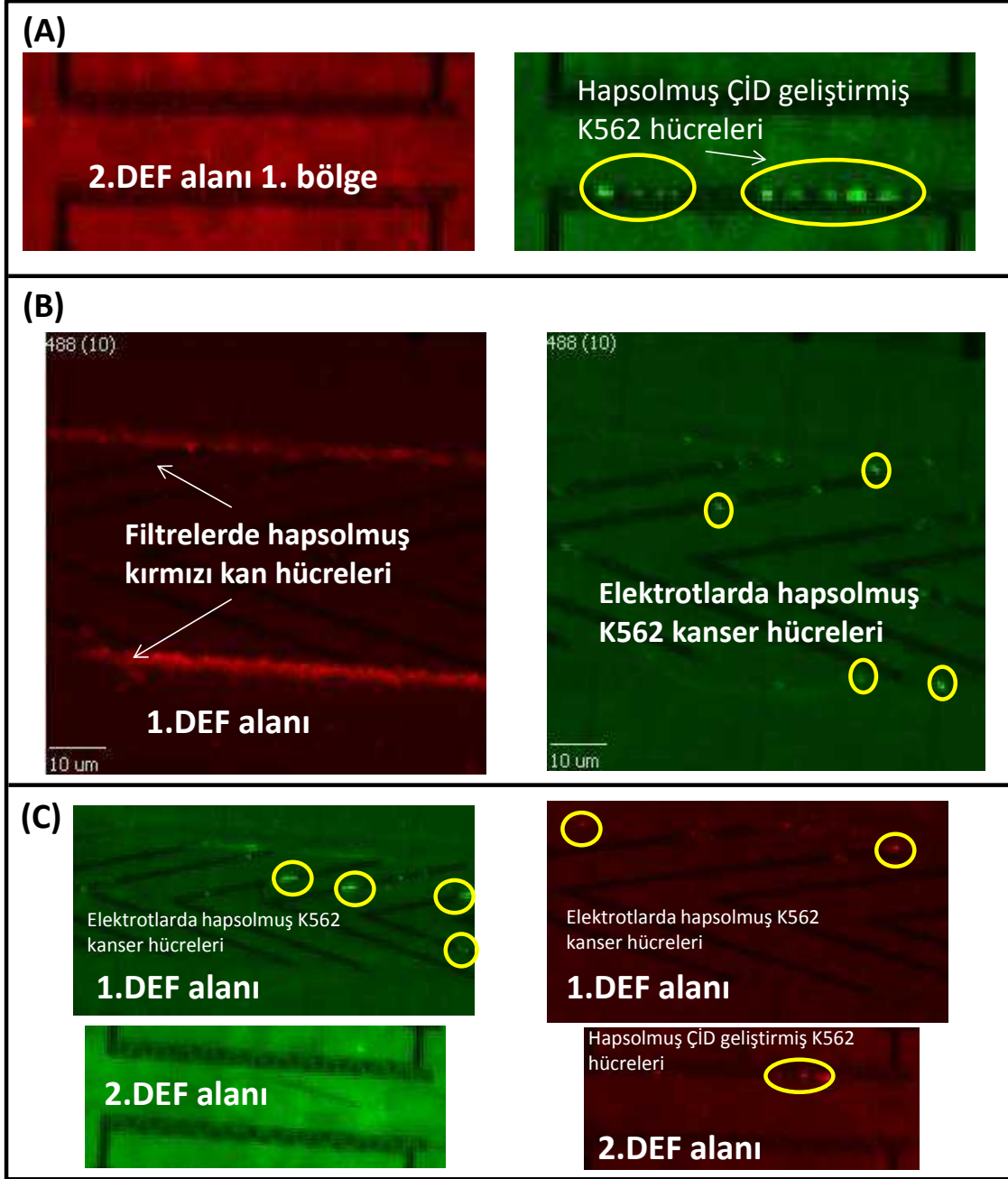
4.6 Entegre Sistem ile ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerinin tespiti

Entegre edilmiş sistem ile testlere başlanmış ve farklı hücre grupları ve tasarımlar için farklı deney koşulları oluşturulmuştur. Aşağıda kan hücrelerinden ÇİD geliştirmiş K562 ve MCF7 hücrelerinin tespitini gösteren testler, parametreleri ve sonuçları ile sunulmaktadır.

K562 lösemi hücreleri ile yapılan testler ve sonuçları:

Bu testler sırasında 5×10^6 hücre/ml konsantrasyona sahip kırmızı kan hücresinden 1×10^6 hücre/ml konsantrasyondaki K562 kanser hücresi ilk DEF alanında ayrıştırılmış, ikinci DEF alanında ise ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri hapsedilmiştir. Gözleme amacı ile kırmızı kan hücreleri kırmızı renkte (*cell tracker red*), ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri ise yeşil renkte (*FDA*) boyanmıştır. Testler sırasında ikinci ve üçüncü nesil çiplerin test edilmesi sırasında olduğu gibi iki çeşit filtre ile kanalın aynı bölgesi incelenmiş ardından "*false coloring*" metodu ile renklendirilmiş imajlar Şekil 93'te sunulmuştur. Bu imajlarda kırmızı renkli olanlar kırmızı kan hücrelerinin görülmesi gereken anlara, yeşil renkli olanlar ise ÇİD geliştirmiş K562 hücrelerinin görülmesi gereken anlara aittir. 2. DEF alanında kırmızı renkli imajlarda herhangi bir hücre görülmezken, yeşil imajlarda aynı alanlarda hapsedilmiş K562 hücreleri görülmektedir (Şekil 93A). Aynı anlarda 1. DEF alanı incelendiğinde kırmızı kan hücrelerinin filtrelerde hapsediği görülmektedir (Şekil 93B).

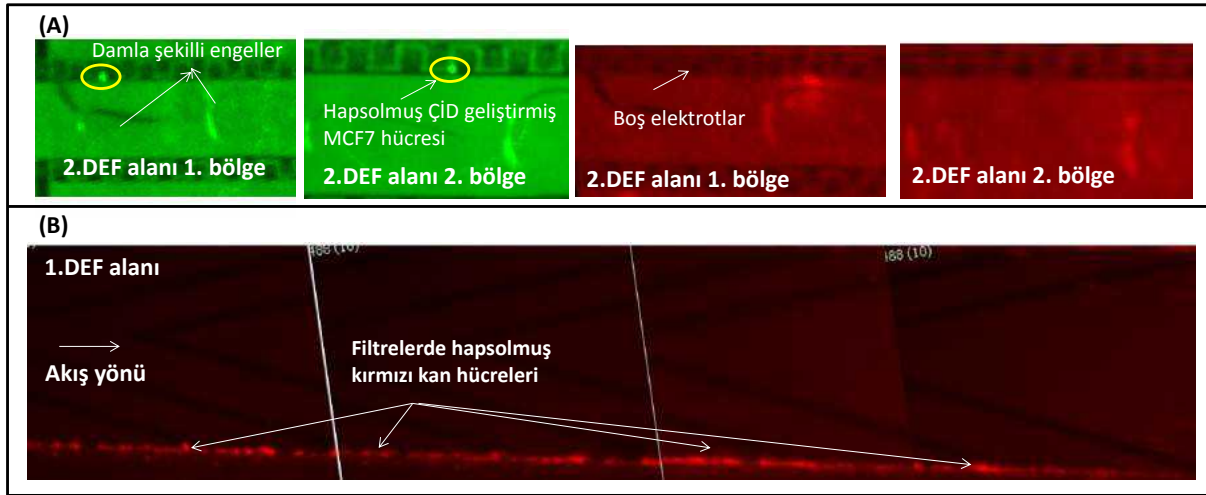
Bu testler aynı şekilde ilaca duyarlı (*FDA* ile yeşil renkte boyanmıştır) ve ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri (*cell tracker red* ile kırmızı renkte boyanmıştır) karışımı ile de yapılmış olup; 1.DEF alanında, 1 MHz frekansta iki hücre çeşidinin de, MATLAB modellemelerine uygun olarak, filtrelerden kaçmadan yüzeysel elektrotlar boyunca yönlendiği gözlemlenirken, 2.DEF alanında ise, 48.64 MHz frekansta, ikinci ve üçüncü nesil DEF çiplerindeki sonuçlar ile uyumlu olarak herhangi bir ilaca duyarlı K562 hücresi tutunumu görülmemiştir (Şekil 93C).



Şekil 93. Entegre sistem kullanılarak kırmızı kan hücreleri (5×10^6 hücre/ml) ve K562 lösemi hücreleri (1×10^6 hücre/ml) karışımında ÇİD gelişiminin tespiti. (A) 2.DEF alanı 1. bölgede hapsolmuş ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri (FDA ile boyanmış ve GFP filtre ile görüntülenmiştir). Aynı elektrot bölgelerine aynı anda kırmızı filtre ile bakıldığından herhangi bir kırmızı kan hücresi gözlemlenmemiştir ($voltaj = 18 V_{pp}$, $frekans = 48.64$ MHz, $akış hızı = 10 \mu\text{l/dk}$). (B) Hapsolan ÇİD geliştirmiş K562 hücreleri gözlemlendiği anda 1.DEF alanına bakıldığında kırmızı kan hücrelerinin $8 \mu\text{m}$ 'lik filtrelerde elendiği görülmektedir ($voltaj = 20 V_{pp}$, $frekans = 1$ MHz, $akış hızı = 10 \mu\text{l/dk}$). (C) Entegre sistemde yeşil renk ile boyanan ilaca duyarlı ve kırmızı renk ile boyanan ÇİD geliştirmiş K562 hücrelerinin 1. ve 2. DEF alanlarındaki hareketleri ($voltaj = 20 V_{pp}$, $frekanslar = 1$ ve 48.64 MHz, $akış hızı = 10 \mu\text{l/dk}$).

MCF7 meme kanseri hücreleri ile yapılan testler ve sonuçları:

Bu testler sırasında 5×10^6 hücre/ml konsantrasyona sahip kırmızı kan hücresinden 1×10^6 hücre/ml konsantrasyondaki MCF7 kanser hücresi ilk DEF alanında ayrıştırılmış, ikinci DEF alanında ise ÇİD geliştirmiş MCF7 hücreleri hapsedilmiştir. Gözlemeleme amacı ile kırmızı kan hücreleri kırmızı renkte (*cell tracker red*), ÇİD geliştirmiş MCF7 hücreleri ise yeşil renkte (*FDA*) boyanmıştır. Testler sırasında ikinci ve üçüncü nesil çiplerin test edilmesi sırasında olduğu gibi iki çeşit filtre ile kanalın aynı bölgesi incelenmiş ardından “*false coloring*” metodu ile renklendirilmiş imajlar Şekil 94’te sunulmuştur. Bu imajlarda kırmızı renkli olanlar kırmızı kan hücrelerinin görülmesi gereken anlara, yeşil renkli olanlar ise ÇİD geliştirmiş MCF7 hücrelerinin görülmesi gereken anlara aittir. 2. DEF alanında kırmızı renkli imajlarda herhangi bir hücre görülmezken, yeşil imajlarda aynı alanlarda hapsolmuş MCF7 hücreleri görülmektedir (Şekil 94A). Aynı anlarda 1. DEF alanı incelendiğinde kırmızı kan hücrelerinin filtrelerde hapsoldüğü görülmektedir (Şekil 94B).



Şekil 94. Entegre sistem kullanılarak kırmızı kan hücreleri (5×10^6 hücre/ml) ve MCF7 göğüs kanseri hücreleri (1×10^6 hücre/ml) karışımında ÇİD gelişiminin tespiti. (A) 2.DEF alanı 1. ve 2. bölgede hapsolmuş ÇİD geliştirmiş MCF7 hücreleri (FDA ile boyanmış ve GFP filtre ile görüntülenmiştir). Aynı elektrot bölgelerine aynı anda kırmızı filtre ile bakıldığından herhangi bir kırmızı kan hücresi gözlemlenmemiştir (*voltaj* = $20 V_{pp}$, *frekans* = 47.97 MHz, *akış hızı* = 5 μ l/dk). (B) Hapsolan ÇİD geliştirmiş MCF7 hücreleri gözlemlendiği anda 1.DEF alanına bakıldığında kırmızı kan hücrelerinin 8 μ m’lik filtrelerde elendiği görülmektedir (*voltaj* = $20 V_{pp}$, *frekans* = 1 MHz, *akış hızı* = 5 μ l/dk).

4.7 Hücre Hatlarında Dirençliliğin Geliştirilmesi

Proje kapsamında K562 lösemi ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin doxorubicin (0.1-1 μ M) ve imatinib (1 μ M) dirençli hatları geliştirilmiştir. Hücre hatlarında dirençliliğin belirlenmesi için, öncelikle hücreler Trypan Blue ile boyanıp mikroskop altında canlı ve ölü hücre sayıları

belirlenmiştir. Daha sonra, XTT hücre çoğalma analizleri ve IC₅₀ (hücre proliferasyonu inhibisyonunun %50'si oluşturan ilaç konsantrasyonu) testleri gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerleri ve dirençli hücrelerin duyarlı hücrelere göre kaç kat dirençlilik kazandığını gösteren veriler Tablo 23'te verilmektedir.

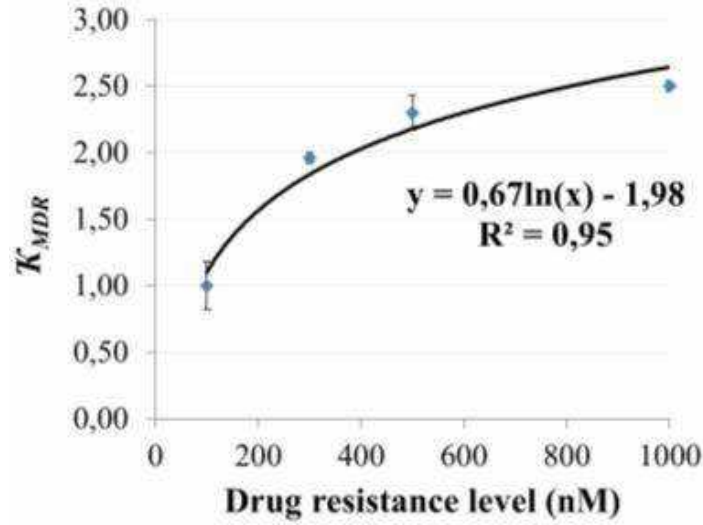
Tablo 23. Doxorubicin dirençliliği geliştiren K562 ve MCF-7 hücrelerinin IC₅₀ değerleri.

Hücre Hattı	Ortalama IC ₅₀ (µM)±OSH	Dirençlilik Artışı (Kat)
K562	0.048 ± 0.001	-
K562/100Dox	1.00 ± 0.07	21
K562/300Dox	2.02 ± 0.32	42
K562/500Dox	4.35 ± 0.14	91
K562/1000Dox	10.28 ± 0.15	214
MCF-7	1.84±0.07	-
MCF-7/1000Dox	202.57±6.7	110.21

4.8 Dirençli Hatlarda P-gp İfadesinin Belirlenmesi

Dirençli hücrelerin DEF tepkilerinin ilaç dirençlilik seviyesi ile ilişkisi:

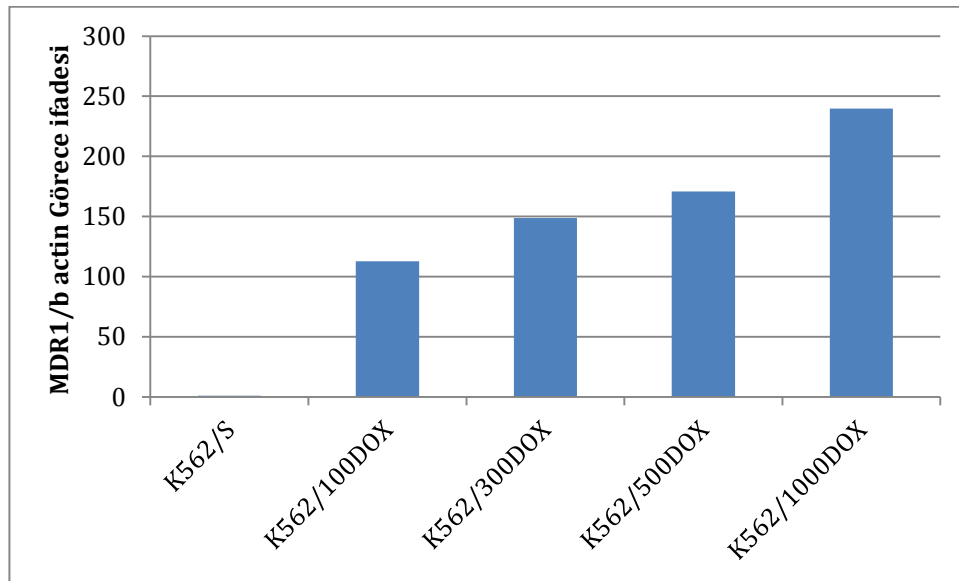
ÇİD geliştirmiş kanser hücreleri farklı miktarlarda ilaca karşı dirençli olabilirler. Bu durumda aktif ilaç atılımını sağlayan P-gp ifadelerinde farklılık gösterebilirler. Ayrıca bu değişim hücrenin dielektrik özelliklerini, dolayısıyla da DEF tepkisini değiştirmelidir. İlaç dirençlilik seviyesinin hücrelerin dielektrik özelliklerine etkisini gözlemlemek için 100, 300, 500 ve 1000 nM doxorubicine dirençli K562 hücreleri kullanılarak, hücre hapsedme testleri yapılmış (akış hızı = 5 µl/dk, voltaj = 9 V_{pp}, hücre konsantrasyonu = 2.5x10⁵ hücre/ml); hapsolan hücreler floresan parlaklık ölçümü yapılarak (*Image J*) sayılmış ve Şekil 95'te görülen grafik elde edilmiştir. Elde edilen bu grafiğe göre, hücrelerin ilaç direnci seviyesi ve DEF tepkileri arasında lineer olmayan bir ilişki vardır. 100 nM doxorubicin dirençli K562 hücreleri ile karşılaştırıldığında, 300 nM'a dirençli olanların elektrotlarda 2 kat daha fazla hapsoldüğü; fakat, 300 ve 500 nM'a dirençli olanlar karşılaştırıldığında bu katsayının 1.1'e, 500 ve 1000 nM'a dirençli olanlar karşılaştırıldığında ise bu katsayının 1.08'e düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, P-gp ifadesinin ilaç dirençlilik seviyesi ile lineer olarak artmadığını ya da P-gp ifadesi arttığı halde hücrenin sitoplazmik iletkenliğinin değişmediğini gösteriyor olabilir. Çünkü, sitoplazmik iletkenliğin sürekli artması hücrenin metabolizmasına zarar vererek hücre için ölümcül olabilir. Hücrelerin DEF tepkisindeki bu karakteristiğin gerçek sebebinin bulunabilmesi için biyolojik testlerle (RT-PCR) doğrulama yapılması adına RNA izolasyonu ve RT-PCR çalışmaları yapılmış olup aşağıda sonuçlar sunulmaktadır.



Şekil 95. Doxorubicin dirençli K562 hücrelerinin direnç seviyeleri ve DEF tepkileri arasındaki bağıntı. Hapsolmuş hücre sayıları (ortalama), hapsolmuş 100 nM doxorubicin dirençli K562 hücrelerinin sayısı ile normalize edilerek K_{MDR} (y eksen) katsayısı hesaplanmıştır. Her direnç seviyesi için, her testte kullanılan hücre konsantrasyonu 2.5×10^5 hücre/ml'dir.

qRT-PCR ile dirençli hatlarda P-gp ifadesinin belirlenmesi:

İlaç dirençliliği ve P-gp ilişkisinin incelendiği bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda doxorubicin ilacına direnç geliştirilmiş K562 kanser hücre hatları P-gp ifadesi için incelenmiştir. qRT-PCR analizi sonucunda hücrelerdeki ilaç dirençliliği ile P-gp ifadesi arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir. İlaç dirençliliğinin artmasıyla birlikte hücrelerdeki P-gp ifadesinin mRNA düzeyinde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 96).



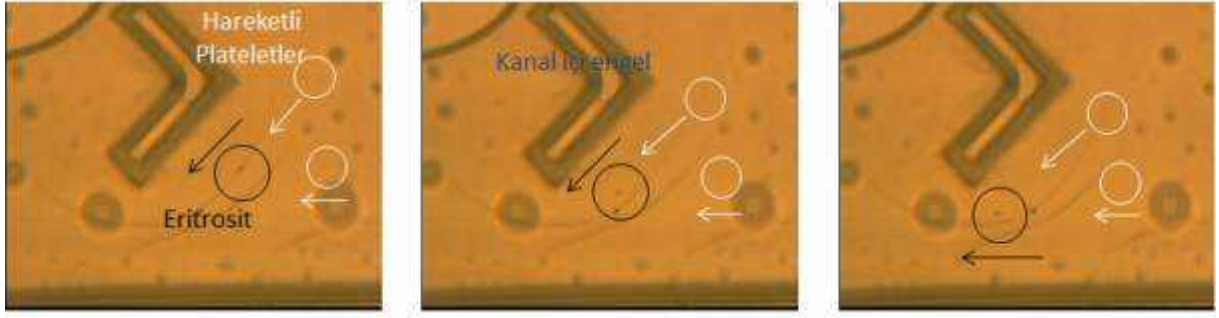
Şekil 96. Sayılan hücre hatlarında P-gp mRNA ifadesi.

4.9 Parilen mikrokanalların heparin ile kaplanarak biyo-uyumluluğunun sağlanması

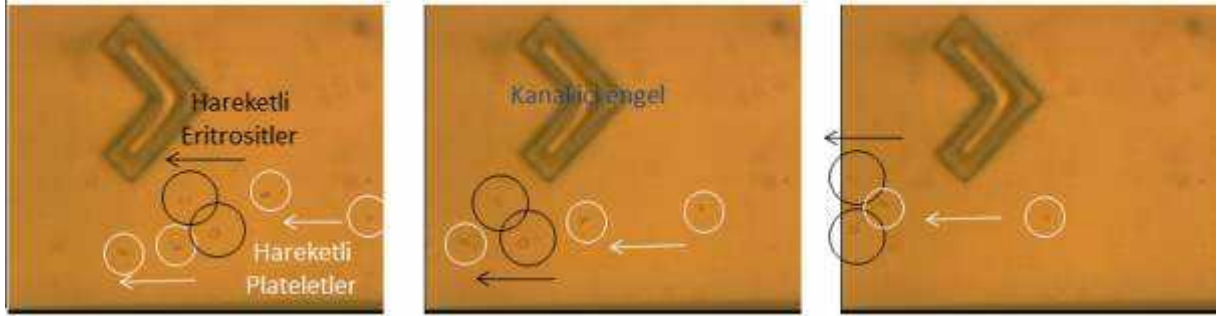
Protokolların uygulanmasına öncelikle parilen kaplı cam düz yüzeylerde başlanmıştır. Testler için 4 inçlik cam pullar üzerine 10 µm kalınlıkta parilen kaplanmış ve pullar 1x1cm ve 2x2 cm boyutlarında kesilerek testler ve gerekli yüzey analiz ölçümleri (XPS, kontak açısı, AFM ve SEM) için hazırlanmıştır. Parilen yüzeyin reaktif hale getirilmesi aşamasında gerçekleştirilen O₂ plazma uygulaması optimizasyonu için 10 saniye ve 30 saniye süre ile 50 W O₂ plazma uygulandı. Daha sonra yüzeyler akrilik asit solüsyonuna (%30) maruz bırakılarak kurumaya bırakıldı. Sitrat tamponu (0.2 M, pH 5.0) içinde çözülen EDC (10 g/L) yüzeylere 2 saat süreyle 4°C'de uygulanarak yüzeyde reaktif amin gruplarının oluşması sağlandı. Son olarak yüzeyler sitrat tamponu içinde çözülmüş heparin (1.25 g/L) solüsyonda 24 saat süreyle 4°de bekletilerek heparin kaplaması gerçekleştirildi. Heparin ile kaplanan yüzeyler kandan izole edilen platelet bakımından zengin plazma (PRP) hücre süspansiyonuna 5, 15 ve 30 dakika süre ile maruz bırakılarak hücre tutunması mikroskop altında gözlemlendi.

Yapılan testler sonucunda, heparin kaplaması yapılmayan yüzeylerde yüksek miktarda hücre tutunması gözlenirken, heparin ile kaplanan yüzeylerde düşük düzeyde hücre tutunması gerçekleşmiştir. 10 saniye süreyle O₂ plazma uygulanan yüzeylerin platelet yapışma testlerinde 15 ve 30 dakika sonrasında az miktarda hücre tutunması gözlenirken, 30 saniye O₂ plazma uygulanan yüzeylerde hücre yapışmasına rastlanamamıştır. Bu durum yüzeylerin başarılı bir şekilde heparin ile kaplanabildiğini göstermektedir.

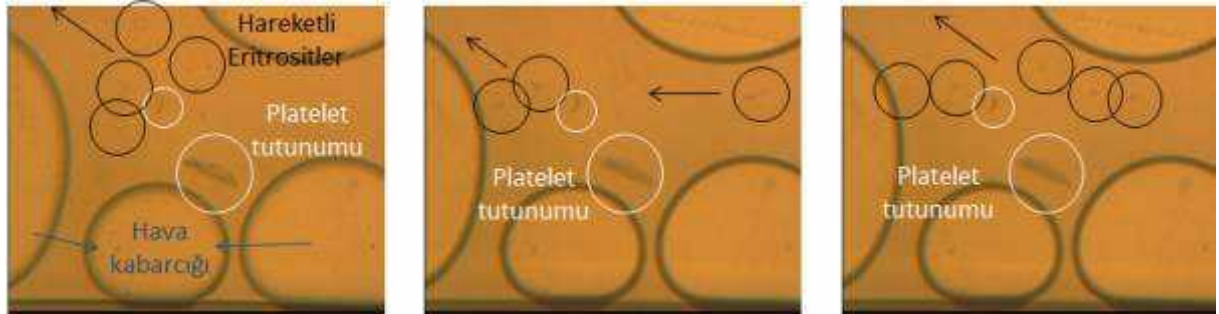
Yüzey testlerinin ardından parilen mikrokanalların heparin ile kaplanıp test edilmesi aşamasına geçilmiştir. 300 µm genişliğindeki mikro-kanallar, kandan izole edilen platelet bakımından zengin plazma (PRP) hücre süspansiyonuna maruz bırakılmıştır. Mikro-kanal çalışması için düz parilen yüzey testlerinde uygulanan O₂ plazma süreleri (10 saniye ve 30 saniye) tekrarlanıp, kontrol kanalından (O₂ plazma uygulanmayan) alınan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Mikro-kanallardaki hücre tutunumu gözlemi PRP hücre süspansiyonunun akışkan olduğu durumda mikroskopla yapılarak görüntüler alınmıştır. O₂ plazma yapılmış olan mikro-kanallarda platelet tutunumları neredeyse hiç gözlemlenmemiştir, ancak O₂ plazma yapılmamış olan kontrol kanalının bir çok bölgesinde platelet tutunumları tespit edilmiştir. Gözlemler sırasında PRP hücre süspansiyonunda az miktarda eritrosite de rastlanmıştır ve sonuçlar Şekil 97, Şekil 98 ve Şekil 99'da sunulmaktadır. Bu sonuçlar, uygulanan protokol ile heparinin parilen mikro-kanal içlerinde de düz parilen yüzeyler kadar başarılı şekilde kaplanabildiğini göstermektedir.



Şekil 97. 10 s O_2 plazma yapılmış parilen mikro-kanalda platelet hareketlerini gösteren mikroskop görüntüleri (20X lens).



Şekil 98. 30 s O_2 plazma yapılmış parilen mikro-kanalda platelet hareketlerini gösteren mikroskop görüntüleri (20X lens).



Şekil 99. O_2 plazma yapılmamış kontrol kanalında platelet tutunumunu gösteren mikroskop görüntüleri (20X lens).

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bu proje kapsamında, kanser ve kanserde çoklu ilaç dirençliliğinin gelişimini hızlı ve hassas bir şekilde tespit edebilecek MEMS tabanlı bir biyosensörün geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çalışma, ODTÜ Elektrik Elektronik Mühendisliği, ODTÜ MEMS Merkezi ve ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü'nün ortak çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları birçok uluslararası konferansta sunulmuş ve bilimsel dergilerde yayınlanarak literatüre önemli katkılar sağlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarının, kanserde erken teşhise yönelik çip-üstü-laboratuvar sistemlerinin geliştirilmesine bir temel oluşturması amaçlanmıştır.

Proje başlangıcında literatür taranmış, DEF ile ÇİD tespitinde bazı çalışmalar yapılarak temel birtakım sonuçların bulunduğu gözlemlenmiş; fakat, ÇİD geliştirmiş hücrelerin dielektrik özellik bilgilerinde eksiklikler olduğu fark edilmiştir. Bu sebeple, projenin başlangıcından itibaren farklı konsantrasyondaki ilaca dirençlilik gösteren K562 ve MCF7 hücre hatları geliştirilmeye ve ER yöntemi ile dielektrik özellikleri belirlenmeye başlanmıştır. Literatürde 100 nM Doxorubicin'e dirençli ve ilaca duyarlı K562 hücreleri ile 1000 nM Doxorubicin'e dirençli ve ilaca duyarlı MCF7 hücrelerinin dielektrik özellik bilgileri bulunmakta iken proje kapsamında hem bu hücrelerin dielektrik özellikleri belirlenerek literatür ile uyumlu olduğu ortaya çıkarılmış hem de 300, 500 ve 1000 nM doxorubicin dirençli ve 100, 300, 500 ve 1000 nM imatinib dirençli K562 hücrelerinin dielektrik karakterizasyonları yapılmıştır. Bu kapsamda tasarlanan özgün ER çiplerinin EEF ve ROT-T karakterizasyonları da tamamlanarak projenin temel amacı olan DEF ile özel hücre tespiti yanında ER metodunda da önemli ölçüde aşama kaydedilmiştir.

Literatür incelendiğinde teorik olarak oldukça uygunluğa ve doğruluğa ulaşılmış olan hücre modelleme teknikleri görülür. Proje kapsamında tek tabaka hücre modelleme tekniği kullanılmıştır. Bu kapsamda yazılan modüler MATLAB kodları sayesinde hücre bilgisi girilerek her hücre için spesifik grafikler kolayca elde edilebilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen frekans ve $Re(f_{CM})$ bilgileri çip tasarımlarında ve testlerinde etkin olarak kullanılmıştır.

Proje kapsamında öngörülen üç nesil üretim proje çıktılarının yerine getirilebilmesi için yeterli olmuştur. Her iki DEF alanı için de birinci nesil üretimler; hataların anlaşılması, test düzeneklerinin oluşturulması, hücrelerin hazırlanıp mikroakışkan içinde test edilebilmesi ve optimum test parametrelerinin elde edilebilmesi için temel oluşturmuştur. İkinci nesil üretimler birinci nesil temelinde görülemeyen ama kritik olan sorunların gözlemlenmesi ve sonuçlarının tartışılarak optimum tasarıma yaklaşılması için yol göstermiştir. Üçüncü nesil üretimler iki DEF alanının entegrasyonunun sağlanması için son noktalara ışık tutmuşlardır.

Kanser hücrelerinin kan hücrelerinden yüksek oranda temizlenerek ikinci DEF alanına gönderilmesinin amaçlandığı birinci DEF alanında, 1×10^6 hücre/ml konsantrasyona sahip kanser hücreleri, 5×10^6 hücre/ml konsantrasyona sahip kırmızı kan hücrelerinden yüksek oranda temizlenmiştir. Birinci DEF alanında literatürde daha önce uygulanmamış asimetrik elektrot yapısı kullanılarak DEF etkinliği artırılmıştır. Ayrıca, filtreleme tekniği uygulanarak mekanik olarak elektriksel ayrıştırmanın etkinliği de artırılmıştır. İkinci DEF alanında ise damla şekilli engeller ve amaca yönelik sayıda elektrot dizilerinin kullanılması ile ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerinin ilaca duyarlı kanser hücrelerinden 100 kat daha az sayıda iken dahi yakalanması sağlanmıştır. Entegre sistemde kullanılan akış hızları ve voltaj değerleri literatürde, 1. ve 2.DEF alanları kendi özelliklerinde değerlendirildiğinde, parilen kullanımı ve MEMS üretim yetenekleri sayesinde öncü yere sahip olmuştur.

DEF tekniği hücre tespit etme sistemi olmasının yanında sayısal değerler sağlayamamaktadır. Bu sebeple öncelikle üretilen bu entegre sisteme bir sayma sistemi eklenmelidir. Bu amaçla, proje kapsamında öğrenilen üretim yetenekleri ile paralel olarak *Coulter* sayacı diye adlandırılan teknik kullanılmış olup grubumuzda bu konuda bir yüksek lisans tezi yazılmı olup, çalışmalarına devam edilmektedir. ÇİD geliştirmiş hücreler analiz edilirken farklı seviyelerdeki ilaç dirençliliklerinin DEF tepkilerinin de farklı olduğu fark edilerek P-gp ekspresyonu farklılıklarını anlayabilmek adına biyomoleküler analizler de başlatılmıştır.

Ayrıca, ileride bu entegre sistemin klinikte kullanılacak çip-üstü analiz sistemine dönüşmesi planlandığından, tam kan çalışmalarına yönelik olabilmesi için yan çalışma olarak heparin kaplama denemeleri başlatılmış olup devam edilmektedir.

Tüm sistem, şuanki haliyle minyatür bir çip-üstü analiz sistemidir. Bu sebeple, tam kan çalışmaları sırasında kanallar paralelize edilerek daha çok analitin daha kısa zamanda test edilmesi sağlanabilir. Bu kapsamda proje önerisinde öngörüldüğü gibi; üretilen ve klinikte kullanılacak çip-üstü analiz sistemi için çok önemli bir yere sahip ve literatürde ilk olan bir sistem üretilmiştir.

6. EKLER

EK 1:

```
function
out=CM_with_effective_final(a_long,a_short,eps_i,eps_o,s_i,s_o,eps_m,s_m)

r=(a_long/a_short)^3;

f=logspace(0,9,100000);
w=2*pi*f;

for k=1:100000

eps_1_comp=(eps_i-(i*(s_i/w(1,k))));
eps_2_comp=(eps_o-(i*(s_o/w(1,k))));
eps_med_comp=(eps_m-(i*(s_m/w(1,k))));

num=(eps_1_comp-eps_2_comp);
den=(eps_1_comp+(2*eps_2_comp));

par=(num/den);

eps_eff_p=(eps_2_comp)*((r+(2*par))/(r-par));

CM=real((eps_eff_p-eps_med_comp)/(eps_eff_p+(2*eps_med_comp)));

out(1,k)=CM;
end

p=plot(log10(f(1,:)),out(1,:));
xlabel('Frequency 10^x (Hz)');
ylabel('Re(f_C_M)');
title('Frequency vs Re(f_C_M)');
set(p,'Color','blue');
end
```

7. KAYNAKLAR

- Arnold, W. M. ve Zimmermann U. 1982. "Rotating-field-induced rotation and measurement of the membrane capacitance of single mesophyll cells of *Avena Sativa*", *Z. Naturforsch.*, 37c, 908–915.
- Assef, Y. A., Kotsias, B. A. 2002. "An outwardly rectifying anion channel in human leukaemic K562 cells", *Pflugers Arch - Eur J Physiol.*, 444:816–820.
- Assef, Y. A., Cavarra, S. M., Damiano, A. E., Ibarra, C., Kotsias, B. A. 2005. "Ionic currents in multidrug resistant K562 human leukemic cells", *Leukemia Research*, 29, 1039–1047.
- Becker, F. F., Wang, X. B., Huang, Y., Pethig, R., Vykoukal, J. ve Gascoyne, P. R. 1995. "Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 860– 864.
- Berardi, V., Aiello, C., Bonincontro, A. ve Risuleo, G. 2009. "Alterations of the plasma membrane caused by murine polyomavirus proliferation: an electrorotation study", *J. Membr. Biol.*, 229, 19–25.
- Broche L. M., Bhadal N., Lewis M. P., Porter S., Hughes M. P., ve Labeed F. H. 2007. "Early detection of oral cancer-Is dielectrophoresis the answer?", *Oral Oncology*, 43, 2, 199–203.
- Chui L. ve Holmes D. 2001. "The dielectrophoretic levitation and separation of latex beads in microchips", *Electrophoresis*, 22, 3893-3901.
- Cristofanilli, M., De Gasperis, G., Zhang, L., Hung, M.-C., Peter, A., Gascoyne, R. C. ve Hortobagyi, G. N. 2002. "Automated electrorotation to reveal dielectric variations related to HER-2/neu overexpression in MCF-7 sublines", *Clin. Cancer Res.*, 8, 615–619.
- Demircan, Y., Yılmaz, G., Kūlah, H., in: Demirci, U., Khademhosseini, A., Langer, R., Blander, J. (Eds.), *Electrophoresis and dielectrophoresis for Lab-on-a-chip (LOC) Analyses*, World Scientific Publishers, Singapore 2012, pp. 341-376.
- Doh I. ve Cho Y. H. 2005. "A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process", *Sensors and Actuators A: Physical*, 121, 1, 59–65.
- Duncan L., Shelmerdine H., Hughes M., Coley H., Hübner Y., ve Labeed F. 2008. "Dielectrophoretic analysis of changes in cytoplasmic ion levels due to ion channel blocker action reveals underlying differences between drug-sensitive and multidrug-resistant leukaemic cells", *Physics in Medicine and Biology*, 53, N1.

- Gascoyne P. R. C. ve Vykoukal J. V. 2004. "Dielectrophoresis-based sample handling in general-purpose programmable diagnostic instruments", *Proceedings of the IEEE*, 92, 1, 22–42.
- Georgieva, R., Neu, B., Shilov, V. M., Knippel, E., Budde, A., Latza, R., Donath, E., Kieseewetter, H. ve Baumler, H. 1998. "Low Frequency Electrorotation of Fixed Red Blood Cells", *Biophys. J.*, 74, 2114–2120.
- Gimsa, J., Müller, T., Schnelle, T. ve Fuhr, G. 1996. "Dielectric spectroscopy of single human erythrocytes at physiological ionic strength: dispersion of the cytoplasm", *Biophys. J.*, 71, 495–506.
- Griffith, A. W. ve Cooper, J. M. 1998. "Single-cell measurements of human neutrophil activation using electrorotation", *Anal. Chem.*, 70, 2607–2612.
- Hakoda M., Wakizaka Y. ve Hirota Y. 2010. "Separation of viable and nonviable animal cell using dielectrophoretic filter", *Biotechnology Progress*, 26, 4, 1061-1067.
- Han, S. -I., Joo, Y. -D. ve Han, K. -H. 2013. "An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation", *Analyst*, 138, 1529–1537.
- Hölzel, R. 1999. "Non-invasive determination of bacterial single cell properties by electrorotation", *Biochim. Biophys. Acta*, 1450, 53–60.
- Hu, Z. X. ve Arnold, W. M. 1990. "Alterations in the electrical properties of T and B lymphocyte membranes induced by mitogenic stimulation. Activation monitored by electrorotation of single cells", *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1021, 191–200.
- Huang Y., Holzel R., Pethig R., ve Wang X. B. 1992. "Differences in the AC electrodynamic properties of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies", *Physics in Medicine and Biology*, 37, 7, 1499-1517.
- Huang Y., Wang X. B., Becker F. F. ve Gascoyne P. 1997. "Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation", *Biophysical Journal*, 73, 2, 1118–1129.
- Jones, T. B. 1995. *Electromechanics of Particles*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Kang K. H., Kang Y., Xuan X., ve Li D. 2006. "Continuous separation of microparticles by size with Direct current-dielectrophoresis", *Electrophoresis*, 27, 694-702.
- Kang Y., Li D., Kalams S. A., ve Eid J. E. 2007. "DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size", *Biomedical Microdevices*, 10, 243-249.

- Kaplan, E. & Gündüz, U. 2012. "Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance", *Biomed. Pharmacother.*, 66, 29–35.
- Labeed, F. H., Coley, H. M., Thomas, H. ve Hughes, M. P. 2003. "Assessment of Multidrug Resistance Reversal Using Dielectrophoresis and Flow Cytometry", *Biophys. J.*, 85, 2028–2034.
- Lei, U. Sun, P. -H. ve Pethig, R. 2011. "Refinement of the theory for extracting cell dielectric properties from dielectrophoresis and electrorotation experiments", *Biomicrofluidics*, 5, 44109(0)–44109(16).
- Lin H. K., Zheng S., Williams A. J. 2010. "Portable Filter-Based Microdevice for Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells", *Clinical Cancer Research.*, 16(20), 5011–5018.
- Manz A., Grabner N., Widmer H. M. 1990. "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing", *Sensors and Actuators B Chem.*, 1, 244–248.
- Markx G. H., Talary M. S., ve Pethig R. 1994. "Separation of viable and non-viable yeast using dielectrophoresis", *Journal of Biotechnology*, 32, 1, 29-37.
- Markx G. H., Pethig R., ve Rousselet J. 1997. "The dielectrophoretic levitation of latex beads, with reference to field-flow fractionation", *Journal of Physics D: Applied Physics*, 30, 2470.
- Mikolajczyk S.D., Millar L.S., Tsinberg P., Coutts S.M. Zomorodi M., Pham T., Bischoff F.Z.; Pircher T.J. 2011. "Detection of EpCAM-negative cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood", *Journal of Oncology.*, 252361.
- Miller M. C., Doyle G.V., Terstappen M.M. 2010. "Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch System in patients with metastatic breast, colorectal and prostate cancer", *Journal of Oncology*, 617421.
- Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S., Bell D.W., Irimia D., Ulkus L., Smith M.R., Kwak, E.L., Digumarthy S., Muzikansky A., Ryan P., Balis U.J., Tompkins R.G., Haber D.A., Toner M. 2011. "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology", *Nature*, 450(7173), 1235–1239.
- Pethig, R., Jakubek, L. M., Sanger, R. H., Heart, E., Corson, E. D. ve Smith, P. J. S. 2005. "Electrokinetic measurements of membrane capacitance and conductance for pancreatic beta-cells", *IEE Proc. Nanobiotechnol.*, 152, 189–93.
- Pethig, R., 2010. "Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications", *Biomicrofluidics*, 4, 022811.

Smirnov D., Merdek K., Sprott K., Skelley A., Huang R., Tenney D., Jiang C., Milutinovic A., Tims D., Dong Y., Cain J., Wolfe M., Pierceall B., Walter Carney W. 2012. "A microfluidic system for the selection of circulating tumor cells that utilize both affinity and size capture technologies". *Cancer Research.*, 72(8).

Stotta S.L., Hsua C.H., Tsukrova D.I., Yu M., Miyamoto D.T., Waltman B.A., Rothenberg S.M., Shaha A.M., Smas M.E., Korir G.K., Floyd, Jr F.P., Gilman A.J., Lord J.B., Winokur D., Springer S., Irimia, D., Nagrath S., Sequist L.V., Lee R.J., Isselbacher K.J., Maheswaran S., Haber D.A., Toner M. 2010. "Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip", *PNAS.*, 107(43), 18392-18397.

Vykoukal, D. M., Gascoyne, P. R. C. ve Vykoukal, J. 2009. "Dielectric characterization of complete mononuclear and polymorphonuclear blood cell subpopulations for label-free discrimination", *Integr. Biol.*, 1, 477–484.

Waltham, M. A., AACR Annual Meeting, (2012).

Wang, X., –B., Huang, Y., Burt, J. P. H., Markx, G. H., ve Pethig, R. 1993. "Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells", *Journal of Physics D: Applied Physics*, 26, 1278.

Wang, X. B., Yang, J., Huang, Y., Vykoukal, J., Becker, F. F., ve Gascoyne, P. R. C. 2000. "Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation", *Analytical Chemistry*, 72, 4, 832–839.

Yang, J., Huang, Y., Wang, X., Wang, X. B., Becker, F. F. ve Gascoyne, P. R. 1999. *Biophys. J.*, 76, 3307–3314.

Yang F., Yang, X., Jiang, H., Bulkhaults, P., Wood, P., Hrushesky, W. ve Wang, G. 2010. "Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells", *Biomicrofluidics*, 4, 013204.

8. PROJE ÇIKTILARI

A. TEZLER

1. **Y. Demircan.** Detection of imatinib and doxorubicin resistance in k562 leukemia cells by 3d-electrode contactless dielectrophoresis. Yüksek Lisans Tezi. ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü, Haziran 2013.
2. **G. Bahrieh, 2014.** "Assesment of Changes in the Dielectric Properties of Multidrug Resistant Cancer Cells by Electrorotation Technique," Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü. Ağustos 2014.
3. **G. Özkayar.** "Enrichment of rare cells from whole blood by using dielectrophoresis," ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ağustos 2015.
4. **Ö. Laçın.** "High Throughput MEMS- Based Coulter Counter Device for Cell Counting and Cell Sizing Applications," Yüksek Lisans Tezi. ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü, Ağustos 2014.

B. BİLİMSEL MAKALELER

1. Y. Demircan, E. Özgür, H. Külâh, "Dielectrophoresis: Applications and Future Outlook in Point of Care," Electrophoresis, Vol. 34, pp. 1008-1027, 2013.
2. Y. Demircan, A. Koyuncuoğlu, M. Erdem, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külâh, "Label-free detection of multidrug resistance in K562 cells through isolated 3D-electrode dielectrophoresis" Electrophoresis, Vol. 36, pp. 1149-1157, 2015.
3. G. Bahrieh, M. Erdem, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külâh, "Assessment of effects of multi drug resistance on dielectric properties of K562 leukemic cells using electrorotation" RSC Advances, Vol. 4, pp. 44879-44887, 2014.
4. G. Bahrieh, E. Özgür, A. Koyuncuoğlu, M. Erdem, U. Gündüz, H. Külâh, "Characterization of the distribution of rotational torque on electrorotation chips with 3D electrodes" Electrophoresis, DOI 10.1002/elps.201500061, 2015.

C. ULUSAL ÇALIŞTAY SUNUMLARI

1. Y. Demircan ve H. Külâh, "Detection of Imatinib and Doxorubicin Resistance in K562 Leukemia Cells by 3D-Electrode Contactless Dielectrophoresis", 1st Graduate Research Workshop, METU, Ankara, 2014.
2. Y. Demircan ve H. Külâh, "Label-free Detection of Leukemia Cells with a Lab-On-a-Chip System Integrating Dielectrophoresis and CMOS Imaging", 2nd Graduate Research Workshop, METU, Ankara, 2015.

D. ULUSLAR ARASI KONFERANS SUNUMLARI

3. Y. Demircan, S. Örgüç, J. Musayev, E. Özgür, M. Erdem, U. Gündüz, S. Eminoğlu, H. Külâh, T. Akın. "Label-free detection of leukemia cells with a lab-on-a-chip system integrating dielectrophoresis and CMOS imaging", 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems-Transducers, 21-25 June 2015, Anchorage, Alaska, ABD.
4. Y. Demircan, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külâh. "Dielectrophoretic Detection of Multidrug Resistance in Cancer" 2nd International Conference on Biosensors, 10-12 Haziran 2015, İzmir, Türkiye.
5. G. Özkayar, Y. Demircan, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külâh "Enrichment of K562 Human Leukemia Cells From Diluted Whole Blood by Using Dielectrophoresis" 2nd International Conference on Biosensors, 10-12 Haziran 2015, İzmir, Türkiye.
6. O.S.Lacın, Y. Demircan, M. Erdem, Ö. Zorlu, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külâh, "High throughput parylene micro-channel coulter counter for parallel cell counting and sorting" Dielectrophoresis 2014, 14-16 June 2014, Institute of Physics, London, UK.

7. G. Bahrieh, M. Erdem, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külah, "Analyses of changes in dielectric properties of doxorubicin resistant breast cancer cells through electrorotation with 3D electrodes" Dielectrophoresis 2014, 14-16 June 2014, Institute of Physics, London, UK.
8. Y. Demircan, M. Erdem, E. Özgür, U. Gündüz, H. Külah, "Label-free multidrug resistance detection in MCF-7 cells by isolated 3d-electrode dielectrophoresis" Dielectrophoresis 2014, 14-16 June 2014, Institute of Physics, London, UK.
9. G. Bahrieh, A. Koyuncuoğlu, E. Özgür, H. Külah, "Separation of sensitive and imatinib resistant K562 human leukemia cells through leukocytes by 3D contactless dielectrophoresis" 25th Micromechanics and Microsystems Europe workshop, MME 2014, 31 Ağustos- 3 Eylül, 2014, İstanbul, Türkiye.
10. Y. Demircan, M. Erdem, E. Ozgur, U. Gunduz, and H. Külah, "Determination of Multidrug Resistance Level in K562 Leukemia Cells by 3D-Electrode Contactless Dielectrophoresis," International Conference on Microelectromechanical Systems (MEMS'14), pp., San Francisco, Ca, USA, Jan. 2014.
11. G. Bahrieh, M. Erdem. E. Özgür, U. Gündüz, and H. Külah, "Dielectric Analysis of Changes in Electric Properties of Doxorubicin Resistant K562 Leukemic Cells Through Electrorotation with 3-D Electrodes" 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ TAS, 2013, Freiburg, Germany.
12. G. Bahrieh, H. Ceylan Koydemir, M. Erdem. E. Özgür, U. Gündüz, and H. Külah, "Dielectric Characterization of Imatinib Resistant K562 Leukemia Cells through Electrorotation with 3-D Electrodes" IEEE Sensors Conference, 2013, Baltimore, USA.
13. Y. Demircan, A. Koyuncuoglu, M. Erdem, E. Ozgur, U. Gunduz, and H. Külah, "Detection of Imatinib Resistance in K562 Leukemia Cells by 3D-Electrode Contactless Dielectrophoresis," International Conference on Solid-State Sensors, Actuators, and Microsystems, Transducers'13, pp.2086-2089, Barcelona, Spain, on June, 2013.

E. ÖDÜLLER

1. **Dielectrophoresis 2014, Mansel Davies Ödülü:** Y. Demircan, M. Erdem, E. Özgür, U. Gündüz, and H Külah, "Label-Free Multidrug Resistance Detection in MCF-7 Cells by Isolated 3D-Electrode Dielectrophoresis" presented in *Dielectrophoresis 2014 Conference*, London, UK, July 16th, 2014. http://www.iop.org/activity/groups/subject/di/prize/page_40692.html & <http://www.aesociety.org/>
2. **ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yılın Tezi Ödülü:** Garsha Bahrieh, "Assesment of Changes in the Dielectric Properties of Multidrug Resistant Cancer Cells by Electrorotation Technique," Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü. Ağustos 2014.
3. **Graduate Research Workshop METU, En iyi sunum ödülü (2.lik):** Y.Demircan ve H. Külah, "Detection of Imatinib and Doxorubicin Resistance in K562 Leukemia Cells by 3D-Electrode Contactless Dielectrophoresis", 1st Graduate Research Workshop, METU, Ankara, 2014.
4. **Graduate Research Workshop METU, En iyi sunum ödülü (3.lük):** Y. Demircan ve H. Külah, "Label-free Detection of Leukemia Cells with a Lab-On-a-Chip System Integrating Dielectrophoresis and CMOS Imaging", 2nd Graduate Research Workshop, METU, Ankara, 2015.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. HALUK KÜLAH
Proje No:	111E194
Proje Başlığı:	Kanser Ve Çoklu İlaç Dirençliliği Tespiti İçin Mems Tabanlı Dielektroforetik Hücre Ayırıştırma Sistemi Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	EBRU ÖZGÜR
Danışmanlar:	UFUK GÜNDÜZ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. ELEKTRİK-ELEKTRONİK MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/06/2012 - 01/06/2015
Onaylanan Bütçe:	426504.0
Harcanan Bütçe:	371489.02
Öz:	<p>Kanser tüm dünyada en önemli ikinci ölüm sebebi olup, her yıl 8.2 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Kanser tedavisinde başarının en önemli etkenlerinden biri erken teşhistir. Metastaz ve çoklu ilaç dirençliliği (ÇİD) ise ölüm oranının artmasına neden olan en önemli iki sebeptir. Bu nedenle metastaz ve ÇİD gelişiminin tedavi öncesi ve süresince takip edilmesi, uygun tedavi yönteminin seçilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Ancak, klinikte metastaz ve ÇİD gelişiminin tespitine yönelik yaygın olarak kullanılabilen bir yöntem bulunmamaktadır.</p> <p>Önerilen projenin temel amacı şüphelenilen dokuda kanser hücrelerinin varlığını tespit eden ve bu kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci (ÇİD) mekanizması geliştirip geliştirmediğinin kontrolünü sağlayan, dielektroforez (DEF) tabanlı bir hücre ayırıştırma sistemi geliştirilmesidir. Bu iki aşamalı DEF sisteminin, ilk aşamada kanser ve normal doku hücrelerini boyut farklılıklarına göre, ikinci aşamada ise ÇİD geliştirmiş kanser hücrelerini diğer kanser hücrelerinden dielektrik özelliklerindeki farklılığa göre ayırması beklenmektedir.</p> <p>Proje süresince, simülasyon ve test sonuçlarına bağlı olarak her iki DEF alanı için 3 farklı nesil DEF çipi geliştirilmiştir. Projenin son aşamasında, son tasarımlar birleştirilerek iki aşamalı bir DEF çipi tasarımı yapılmış ve MEMS üretimleri gerçekleştirilmiştir. Tasarımların testleri hassas ve dirençli MCF-7 meme kanseri ve K562 lösemi hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Kan hücrelerini K562 kanser hücrelerinden ayırıştırması planlanan birinci aşama DEF çipinin 1000 kat seyreltilmiş kırmızı kan hücresi (5x10⁶ kan hücresi/ml) içinde 1x10⁶ hücre/ml kanser hücresini ayırıştırabildiği gözlenmiştir. İkinci aşama DEF çipi ise 100 hassas kanser hücresi içinden 1 dirençli kanser hücresini ayırıştırabilecek hassasiyettedir.</p> <p>Proje kapsamında kullanılan hücrelerin hassas bir şekilde dielektrik karakterizasyonlarını yapabilecek özgün bir elektrotasyon (ER) çipi geliştirilmiş ve farklı ilaç dirençlilik seviyesine sahip MCF-7 meme kanseri ve K562 lösemi hücrelerinin dielektrik özellikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, DEF yönteminin herhangi bir biyolojik işaretlemeye gerek duyulmaksızın hassas ve hızlı bir şekilde kanser ve kanserde ÇİD gelişimini tespit edebilecek bir platform olabileceği gösterilmiştir. Proje süresince elde edilen veriler, kanserde metastaz ve ÇİD gelişiminin erken tespitini sağlayabilecek MEMS-tabanlı bir çip-üstü-laboratuvar sisteminin geliştirilmesi için temel oluşturacak niteliktedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Dielektroforez, elektrotasyon, meme kanseri, MEMS, çip-üstü-laboratuvar, mikroakışkan sistemler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Projenin Yapılan Yayınlar:	<p>1- DETECTION OF IMATINIB RESISTANCE IN K562 LEUKEMIA CELLS BY 3D-ELECTRODE CONTACTLESS DIELECTROPHORESIS (Bildiri),</p> <p>1- Dielectrophoresis: Applications and future outlook in point of care (Makale/Kitap/Kitapta Bölüm)2- Dielectrophoresis: Applications and future outlook in point of care (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>3- Assessment of effects of MDR on dielectric properties of K562 leukemic cells using electrorotation (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>4- High throughput parylene micro-channel coulter counter for parallel cell counting and sorting (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>5- Dielectric Characterization of Imatinib Resistant K562 Leukemia Cells through Electrorotation with 3-D Electrodes (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>6- Detection of Imatinib Resistance in K562 Leukemia Cells by 3D-electrode Contactless Dielectrophoresis (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>7- Determination of Multidrug Resistance Level in K562 Leukemia Cells by 3D-Electrode Contactless Dielectrophoresis,? International Conference on Microelectromechanical Systems (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>8- DIELECTRIC ANALYSIS OF CHANGES IN ELECTRIC PROPERTIES OF DOXORUBICIN RESISTANT K562 LEUKEMIC CELLS THROUGH ELECTROROTATION WITH 3-D ELECTRODES (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>9- Analyses of changes in dielectric properties of doxorubicin resistant breast cancer cells through electrorotation with 3D electrodes (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>10- Label-free multidrug resistance detection in MCF-7 cells by isolated 3D-electrode dielectrophoresis (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>11- DIELECTROPHORETIC SEPARATION OF K562 HUMAN LEUKEMIA CELLS FROM LEUKOCYTES BY ISOLATED 3D ELECTRODES (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p>
----------------------------	---