

## **ÖZET**

### **SANTRİFÜJ PRENSİBİ İLE ÇALIŞAN KAPALI KANAL MİKROAKIŞKAN PLATFORM**

5 Buluş, en az bir ucu kapalı dolum kanalı (2) ve en az bir numune haznesi (1) içeren en az bir mikroakışkan çip (3) ve bu mikroakışkan çipi (3) santrifüj cihazına yerleştirmek için tasarlanmış en az bir santrifüj tüp (4) içeren bir mikroakışkan platform ve bu platform üzerinde santrifüj prensibi kullanarak bir ucu kapalı kanal içinde gerçekleşen sıvı dolumu ile yapılabilen biyolojik analizler ile ilgilidir.

10

## İSTEMLER

1. Mikroakışkan platform olup özelliği;
  - Bir ucu kapalı ve düz kesit alanlı en az bir dolum kanalı (2), kanala (2) bağlı en az bir numune haznesi (1) içeren mikroakışkan çip (3),
  - Mikroakışkan çipi (3) santrifüj cihazına yerleştirmek için tasarlanmış en az bir santrifüj tüp (4) içermesi ve

Dolum kanalı (2) kanal uzunluğu (h), kanal genişliği (w) ve kanal yüksekliğine (L) göre mikroakışkan çipin (3) içerisine konumlandığı santrifüj cihazı dönüş hızının ayarlanabilir veya programlandırılabilir olması ile karakterize edilmesidir.
2. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; bahsi geçen bir ucu kapalı dolum kanalı (2) uzunluğunun 5-50 mm olmasıdır.
3. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; bahsi geçen bir ucu kapalı dolum kanalı (2) genişliğinin 0,1-5 mm olmasıdır.
4. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; numune haznesinin (1) cam, polystyrene, polyvinyl chloride, cyclic olefin co-polymers, polycarbonate, polydimethylsiloxane (PDMS)) ve Polimetil metakrilat (PMMA) içeren gruptan seçilen malzeme katmanından oluşmasıdır.
5. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; numune haznesinin (1) 1-100 µL hacminde olmasıdır.
6. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; santrifüj tüp (4)'ün mikroakışkan çipin (3) girebileceği şekilde olması ve santrifüj sırasında çipin (3) hareketini önleyen en az bir girinti içermesidir.
7. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; sıvı dolumunda kullanılmasıdır.
8. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; hematokrit analizinde kullanılmasıdır.
9. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; beyaz kan hücresi miktarının belirlenmesinde kullanılmasıdır.
10. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; Plazma ayrıştırma ve plazmayı çip dışına alınmasında kullanılmasıdır.

11. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; biyobelirteç analizinde kullanılmasıdır.

12. İstem 1'e uygun mikroakışkan platform olup özelliği; çip içindeki örneğin mikroskop altında incelenmesinde kullanılmasıdır.

5 13. Sıvı dolum yöntemi olup özelliği;

a) Bir ucu kapalı ve düz kesit alanlı en az bir dolum kanalı (2) ve kanala (2) bağlı en az bir numune haznesi (1) içeren, dolum kanalı (2) kanal uzunluğu (h), kanal genişliği (w) ve kanal yüksekliğine (L) göre santrifüj cihazı dönüş hızının ayarlandığı en az bir mikroakışkan çipin (3) sağlanması,

10 b) Mikroakışkan çipi (3) santrifüj cihazına yerleştirmek için tasarlanmış en az bir santrifüj tüp (4) 'ün sağlanması,

c) Sıvının en az bir numune haznesine (1) doldurulması,

d) Mikroakışkan çipin (3)'in santrifüj tüpüne (4) yerleştirilmesi,

15 e) Dolum kanalı (2) kanal uzunluğu (h), kanal genişliği (w) ve kanal yüksekliğine (L) göre santrifüj cihazı dönüş hızının ayarlanması,

f) Mikroakışkan çipin (3) ayarlanan santrifüj hızında belirli bir süre döndürülerek santrifüj kuvveti ile kanal (2) içinden numune haznesine (1) hava çıkışı sağlanarak belirlenen sıvı hacimlerinin numune haznesinden (1) kanal (2) içine doldurulması işlem adımlarını içermesidir.

20 14. İstem 13'e uygun bir yöntem olup, mikroakışkan çipi (3) farklı santrifüj hızlarında belirlenen sürelerde döndürerek istenilen numune haznesinden (1) dolum kanalına (2) farklı sıvıların programlanabilir olarak doldurulmasında kullanılmasıdır.

25

30

35

## TARİFNAME

### SANTRİFÜJ PRENSİBİ İLE ÇALIŞAN KAPALI KANAL MİKROAKIŞKAN PLATFORM

#### 5 **Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan**

Buluş ile merkezkaç kuvveti kullanılarak, sıvıların/numunelerin kapalı kanal sistemine dolumu ve manipülasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikroakışkan çip, belli bir dönme hızında döndürülerek hazneye koyulan sıvının sadece girişi olan kapalı kanala dolumu gerçekleştirilir. Bu prensip, kimyasal analizlerde, hücre analizlerinde, tanı amacıyla biyomedikal ve sağlık alanında pek çok çalışmaya uyarlanabilme potansiyeline sahiptir.

#### **Buluşla İlgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)**

Mikroakışkan sistemler, küçük hacimde sıvılar ile çalışarak hasta-başı testleri için büyük avantaj taşıyan sistemler konumuna gelmiştir. Özellikle santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler, pompa, aktif valf gibi yapıları ortadan kaldırıp çip dışı numune işleme aşamalarını, hataya açık pipetleme işlemlerini elimine etmektedir (Hugo vd., 2014).

Lab-on-disc olarak adlandırılan santrifüjlenebilir platformlar, düşük maliyetli fabrikasyon ile işlem sağlayabilmektedir. Fakat bu çalışmalarda kanallar ve odacıklar farklı katmanlarda konumlandırılmış olup en üst katmanda sıvı hareketini sağlamak için havalandırma katmanı gerektirmektedir (Clime vd., 2019). Mikroakışkan platformun radyal yönde bir mikroakışkan kanal boyunca sıvıyı ileri geri dolaştırabilen, kılcal ve merkezkaç kuvvet arasındaki etkileşime dayalı bir pompalama tekniğinde, platformun dönüş hızının azaltılmasıyla beraber, kılcal harekete göre sıvılar kanal boyunca içe doğru hareket edebilmektedir (Garcia-Cordero vd., 2010). Basit ve etkili bir yöntem olmasına rağmen, bu yöntemde sıvının yalnızca küçük bir bölümü bir alt rezervuarda merkeze doğru yer değiştirebilmektedir. Bu nedenle bu yöntem, yalnızca birkaç karışabilir çözeltinin karıştırılması ya da analitlerin fonksiyonlanmış bir yüzeyde devirdaimi için uygundur. Mikroakışkan bir kanal aracılığıyla bağlanan iki rezervuar arasındaki sıvı akışında oluşan benzer bir mekanizma mikroakışkan diskin ani hızlanmaları ve yavaşlamaları tarafından oluşan Euler atalet kuvveti ile elde edilir. Euler kuvveti, mikroakışkan kanal boyunca yukarı yönde, diskin açısal hızı ile üretilmektedir. Bu kuvvet her zaman merkezkaç kuvveti ile yarışacağından, kanal boyutu ve yönüne göre optimizasyonlara ihtiyaç

duymaktadır (Deng vd., 2014). Sıvıları radyal olarak içe doğru pompalayan bir çalışmada, merkezkaç kuvvet etkisi altında daha az yoğun bir numune sıvısını, dönme merkezine doğru itecek yüksek yoğunluklu bir sıvı kullanarak gerçekleştirilmiştir (Kong vd., 2012). Numune bütünlüğünü korumak için karışmayan sıvılara veya ara faz olarak havaya ihtiyaç duyulmaktadır. Tek yönlü karakteri ve pompalama için ek sıvı ihtiyacı bu yaklaşımı sınırlandırmaktadır. Sunulan bir pasif pompalama sisteminde, bitişik bir kanalda sıvı kolunda üretilen hidrostatik basınç ile havanın pnömatik olarak sıkıştırılmasına dayanan bir prensip yer almaktadır. Bu çalışmada, biriken pnömatik enerji, platformun dönüş hızının azaltılmasıyla serbest kalır ve sıvıyı dönüş merkezine geri pompalamak için kullanılır (Clime vd., 2019).

Yöntem hassas ve tekrarlanabilir olmasına rağmen ek sıkıştırma odalarının üretilmesine ihtiyaç duyar. Sifon valf kullanılan bir santrifüj sisteminde, sifon yapısı, sıvıları bir dönüş hızı aralığında boşaltabilir veya dönüş frekansını artırarak akışı kesebilir (Zhu vd., 2018). Kesintili sifon valfi, sifonun tepesinde ek bir hava deliğinden oluşmaktadır. Dönüş durdurulduğunda sifon beslenir, disk dönmeye başlayınca ise dönüş hızı yeterince yüksekse sifondaki sıvı merkezden uzaklaşır. Böylece hava, sifon tepesindeki hava deliğinden sifona girerek sifon kanalındaki sıvıyı kesecektir. Daha düşük dönüş hızında ise, hava deliği yakınındaki gaz-sıvı arayüzünde bir menisküs oluşturur. Sıvı, sifon aracılığıyla yükleme odasından toplama odasına iletilir. Sifon yapıları içeren santrifüjlenebilir bu sistemlerin tasarımı ve üretimi karmaşık olduğu gibi bu çalışmada da disk dönerken sabit dış kuvvetlere maruz kalır, sıvı-gaz arasındaki arayüz belirli konumlardaki stabilizasyona bağlı olacaktır. Hidrofilik ve hidrofobik biyobelirteçlerle uyumlu bir sistem ile kandan serum ayrıştırabilen santrifüjlenebilir bir diskte, çapraz akışlı filtrasyon yöntemi serumu ayırır ve serumdaki amfifilik biyobelirteçleri tutar (Lenz vd., 2021). Cihaz bir membranla ayrılmış, birbiri üzerinde yer alan odacıklardan oluşur ve disk üzerinde farklı göreve sahip dört ayırma birimi mevcuttur. Çapraz akışlı filtrasyon sırasında, numune merkezkaç kuvveti ile filtreden teğetsel olarak geçer. Membran gözeneklerinden daha küçük bileşenler basınç arttıkça filtreden geçerken, daha büyük bileşenler membran yüzeyinde kalır. Polimer disk üzerinde kapalı kanal içerisinde hematokrit ölçüm sağlayan bir çalışmada disk üzerinde giriş haznesi, hidrofobik valfli fazla akış kanalı ve iki katmanlı kapiler kanal oluşturulmuştur (Riegger, Lutz vd, 2007). Santrifüj destekli kılcal dolmuş, farklı seviyelerde iki katmanlı kanal (üst seviye alt-orta seviyeden daha geniş) kullanılması ve kapalı kanal ucunun özel şekillendirilmesi ile sağlanmıştır. Kapiler kuvvet santrifüj ile desteklenerek kanı kapalı kapiler kanala taşır. Kanal kılcal uca ulaştığında ters yönde dolumu başlar, hidrofobik valfin açılması ile fazlalık kan buradaki hazneye dolar ve kırmızı kan hücrelerinin sedimentasyonu ile hematokrit değeri ölçülür. Bu yöntem, sadece iyi

hesaplanmış özel kanal kesit alanı olan mikroakışkan çipleri gerektirdiği için üretim süreci meşakkatli ve masraflıdır. Kanallara sıvı dolumunu PDMS'in hava geçirgenliğini kullanan bir çalışmada, özkütle-gradyanlı solüsyon ve mikropartiküller vakum altında kanallara doldurulmuştur (Oksuz & Tekin, 2021). Mikroakışkan sistemin santrifüjlenebilmesi için giriş 5 bloklanması bu sistem ile önlenerek farklı yoğunluklardaki mikropartiküllerin ayrıştırılması başarılmıştır. Sistem hücre ayrıştırma için avantaj sunan bir çalışma olmasına rağmen farklı sıvı manipülasyonlarına uygun bir sistem olmadığı gibi, vakum altında kanallara numune yüklenmesi de oldukça uzun sürmektedir.

Aktif elemanlar; sıvı akışı ve kontrolü için vakum, manyetik, elektriksel ve mekanik kuvvetler 10 gibi dış kuvvet uygulanmasını gerektirmektedir. Merkezkaç kuvveti ile indüklenen sıvı akışlarının tek yönlü karakteri, mikroakışkan devrelerin tasarımında temel bir sınırlandırmaya yol açar. Aktif pompalama elementi kullanılan bir çalışmada, kalıcı mıknatısların üzerine entegre edildiği deforme olabilen polimer katmanlarla kapatılmış bir pompa sistemi yer almaktadır (Haeberle & Zengerle, 2007). Odaların sabit bir manyetik alanda dönmesi 15 sağlanarak, deforme olabilen odalarda havanın sıkıştırılması ile sabit bir sıvı akışı başlar. Aktif eleman kullanılan santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler, ilgi çekici yöntemler sunmasına rağmen uygulanması için dönen platform üzerine monte edilmesi gereken setler ve bunların kontrol edilmesini gerektirmektedir. Elektronik pompaların monte edilmesi ve elektromekanik valflerin kullanması ile yapılan bir santrifüj platformunda, platform yüksek hızda dönerken 20 pnömatik bir bağlantı aracılığıyla çip üzerindeki basınç portlarında hava basıncı oluşturur (Clime vd., 2019). Oluşan hava basıncı çip üzerindeki devre elemanlarıyla etkileşime geçerek valfleme, ters pompalama, kabarcık karıştırma gibi işlevleri gerçekleştirir. Ancak böyle karmaşık bir platformu üretmek için gereken maliyet artmaktadır.

Klinikte pek çok hastalık tanısının koyulması, hastalık sürecinin izlenmesi gibi aşamalarda 25 hastadan alınan numunenin ön muamele işlemine tabi tutularak santrifüjlenmesi gerekmektedir. Mikroakışkan sistemler, klinikte vazgeçilmez bir basamak olan santrifüj özelliğini santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler ile ortaya konulabilir. Disk üzeri laboratuvar olarak adlandırılan lab-on-a-disc sistemlerinde yer alan pasif pompalama yöntemlerine bakıldığı zaman sıvı hareketi farklı katmanlarda konumlandırılan odacıklar, havalandırma delikleri, sifon 30 yapıları, membranlar veya valflerle sağlanabilmektedir. Bu tasarımlar hem maliyeti artırmak hem de sıvı hareketini kısıtlamanın yanı sıra, verimli bir sıvı aktarımını da garantileyemez. Ayrıca sıvı manipülasyonu için kullanılan elemanlar hassas olduğu için, yöntemin iyi optimize edilmesi, sıvıların taşmaması için ek sıkıştırma veya atık odacıklarına ihtiyaç duymaktadır.

Mikroakışkan sistemler üzerine eklenen her odacık ve katman, maliyeti ve kullanma kolaylığını doğrudan etkilemektedir. Aktif pompalama sistemlerine bakıldığı zaman, dışarıdan mekanik, elektriksel veya manyetik kuvvetleri kullanarak yapılan çalışmalar pek çok karmaşık manipülasyona ve analize izin veren yöntemler olmasına rağmen dönen bir platform üzerine monte edilmesi gereken bileşenler sistemin kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır. Ayrıca önceki tekniklere bakıldığı zaman çoğu santrifüjlenebilir mikroakışkan sistem disk şeklinde tasarlanmıştır. Bu da tasarlanan sisteme dönme hızı kazandırabilmek için disk okuyucu şeklinde döndürme platformuna, yani ek bir cihaz tasarımına, ihtiyaç duyulacağı anlamına gelir.

Özetle önceki teknikte karşılaşılan teknik problem, sıvı manipülasyonu ve numune analizi için santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemlerde pahalı, üretimi karmaşıklaştıran ve stabiliteyi garanti edemeyen yapılar ve yöntemler kullanılmasıdır. Ayrıca kullanacak kişiler için ek cihaz alınması da gerekmektedir.

### **Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları**

Mevcut buluş, yukarıda bahsedilen gereksinimleri karşılayan, dezavantajları ortadan kaldıran ve ilave bazı avantajlar getiren bir mikroakışkan platform ile ilgilidir.

Buluşta, üretimi oldukça basite indirgeyerek sunulan dolum yöntemi ile teknikte kullanılan tüm ek yapılar ortadan kaldırıldı. Bu sayede her laboratuvarında bulunan santrifüj cihazına uyumlu hale getirildi. Dolum prensibini özgün kılan ise her kanalın farklı özelliklerine (genişlik, yükseklik, uzunluk) göre hidrolik direncinin değişmesi ve buna bağlı olarak dolum için ihtiyaç duyulan döndürme hızı (RPM)'nin da değişmesidir. Hidrolik direnç arttıkça ihtiyaç duyulan döndürme hızı artmaktadır. Uygulanan santrifüj kuvveti ile kanal içerisindeki basınç artırılmakta ve kanal içinden numune haznesine hava çıkışı sağlanarak kanala dolum sağlanmaktadır.

Santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler teknikte disk üzeri laboratuvar veya cd üzeri laboratuvar olarak bilinmektedir ve santrifüj kuvvetinin uygulanması ile sıvı manipülasyonu sağlayan sistemlerdir. Literatürde bilinen klasik mikroakışkan sistemlerde kanal dolumu giriş ve çıkış delikleri ile sağlanmaktadır. Kanala santrifüj kuvveti uygulanması için kapalı bir kanal kullanılmalıdır ve teknikte bilinen santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler ile bunun gerçekleşmesi için aktif, pasif valfler, membranlar, havalandırma delikleri kullanılmalıdır. Buluşta ise ilk kez herhangi bir ek yapı (valf,sifon,membran vs.) kullanılmadan düz bir kapalı kanal içerisinde sıvı manipülasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca teknikte sunulan disk ve cd üzeri laboratuvar sistemlerinde santrifüj kuvvetinin uygulanması için ek bir cihaz

gerekmektedir (CD rom gibi veya bu şekilde tasarlanan). Buluş ile sunulan yöntem ve tasarım santrifüj cihazına uygun olduğu için bu tür cihazlara ihtiyaç duymamaktadır. Bu sayede uygulama alanı da genişlemektedir.

5 Buluşun öncelikli amacı, dolum sağlayan ek odacıklar, valf, membran, sifon gibi yapılara ihtiyaç duymadan sadece santrifüj kuvveti ile tek kanal içerisinde kapalı kanal dolumu ve analiz sağlayan bir santrifüjlenebilir mikroakışkan sistem geliştirmektir. Buluşta bir hazneye sıvı yerleştirilmesi ve kanala doldurulup gerekli işlemlerin yapılması tamamıyla santrifüj kuvveti ile gerçekleştirilmektedir.

10 Buluş dolum yöntemi ile teknikte kullanılan tüm ek yapılar ortadan kaldırıldı. Bu sayede her laboratuvarında bulunan santrifüj cihazına uyumlu hale getirildi. Dolum prensibini özgün kılan ise her kanalın farklı özelliklerine (genişlik, yükseklik, uzunluk) göre hidrolik direncinin değişmesi ve buna bağlı olarak dolum için ihtiyaç duyulan döndürme hızı (RPM)'in de değişmesidir. Hidrolik direnç arttıkça ihtiyaç duyulan döndürme hızı artmaktadır. Uygulanan santrifüj kuvveti ile kanal içerisindeki basınç artırılmakta ve kanal içinden numune haznesine 15 hava çıkışı sağlanarak dolum sağlanmaktadır.

Buluş mikroakışkan sistem pek çok biyolojik analiz işlemine (kan örneği analizi, DNA analizi, saflaştırma, ayırıştırma, zenginleştirme, tek hücre) uyumlu olup pek çoğu mikroskopla görüntülenebileceği gibi telefon ile analiz edilmesine de izin veren bir sistemdir.

20 Buluş önceki tekniklerde temel problemler olan maliyet, karmaşık tasarım ve ek bir döndürme cihazına ihtiyacını ortadan kaldırarak avantaj sağlamasının yanı sıra literatürde bahsi geçen ek sıkıştırma odaları, sifon ve membran yapılarını kullanmadan, tek giriş odacığını iki yönlü (giriş ve çıkış) kullanma olanağı sunarak literatürde yer almayan bir prensip sunmaktadır. Sunulan bu yöntem sayesinde araştırma, hücre, tanı laboratuvarında bulunan santrifüj cihazında düşük hacimde (0,1  $\mu$ L-500  $\mu$ L) numune işleyebilen, kısa süreli analiz sağlayan, numune ön işlemini 25 ortadan kaldırabilecek potansiyele sahip bir yöntem hedeflemektedir. Arzu edilen yöntem ve analize göre kanal tasarımı geliştirilmiştir. Sonuç alabilmek için tek ihtiyaç duyulan mikroakışkan çipin santrifüj cihazına yerleştirilmesidir. Bu sayede diğer yöntemlerle kıyaslandığında buluş, maliyet konusunda büyük bir avantaj sağlarken, kullanım kolaylığı konusunda da bu avantajı sürdürüyor olacaktır. Yöntem ayrıca programlanabilir bir yapıda 30 olduğu için santrifüj cihazında birçok analiz basamağının otomatik yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Buluş ürünü ve kullanılan yöntem ile ilk kez kapalı bir kanal içerisine ek yapı kullanmadan

dolum sağlanmıştır. Dolum prensibini özgün kılan ise her kanalın farklı özelliklerine (genişlik, yükseklik, uzunluk) göre hidrolik direncinin değişmesi ve buna bağlı olarak dolum için ihtiyaç duyulan döndürme hızı (RPM)'in da değişmesidir. Hidrolik direnç arttıkça ihtiyaç duyulan döndürme hızı artmaktadır. Uygulanan santrifüj kuvveti ile kanal içerisindeki basınç artırılmakta ve kanal içinden numune haznesine hava çıkışı sağlanarak dolum sağlanmaktadır. Ürünü özgün kılan da dolum prensibine bağlı olarak santrifüj cihazına uyumlu, sıvı manipülasyonu sağlayan ve örnek analizi sağlayan bir ürün haline gelmiş olmasıdır.

Santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler teknikte disk üzeri laboratuvar veya cd üzeri laboratuvar olarak teknikte bilinmektedir ve santrifüj kuvvetinin uygulanması ile sıvı manipülasyonu sağlayan sistemlerdir. Literatürde bilinen klasik mikroakışkan sistemlerde kanal dolumu giriş ve çıkış delikleri ile sağlanmaktadır. Kanala santrifüj kuvveti uygulanması için kapalı bir kanal kullanılmalıdır ve teknikte bilinen santrifüjlenebilir mikroakışkan sistemler ile bunun gerçekleşmesi için aktif, pasif valfler, membranlar, havalandırma delikleri, özel kanal mimarileri kullanılmalıdır. Buluşta ise ilk kez herhangi bir ek yapı (valf,sifon,membran vs.) kullanılmadan düz bir kapalı kanal içerisinde sıvı manipülasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca teknikte sunulan disk ve cd üzeri laboratuvar sistemlerinde santrifüj kuvvetinin uygulanması için ek bir cihaz gerekmektedir (CD-ROM gibi veya bu şekilde tasarlanan). Buluşta sunulan yöntem ve tasarım laboratuvarında sıklıkla bulunan santrifüj cihazına uygun olduğu için bu tür cihazlara ihtiyaç duymamaktadır. Bu sayede uygulama alanı da genişlemektedir.

Çipe sırayla farklı rezervuarlardan dolum yapılabilir. Farklı kanal boyutları ve santrifüj hızları kullanılarak sadece istenilen rezervuardan çipe sıvı çekilebilir. Böylelikle moleküler analizler için solüsyonlar sıralı olarak çipe verilebilir. Kanal boyutu ayarlanarak rezervuardan istenilen hacimde sıvı çekilebilir. Böylelikle hassas bir sıvı miktarı analiz için kullanılabilir. Buluş ile hematokrit ve beyaz kan hücresi miktarı belirlenebilmekte ve ayrışan plazmanın çip üstünden toplanabilmesi sağlanmaktadır.

### **Buluşu Açıklayan Şekillerin Tanımları**

**Şekil 1:** Kapalı kanal mikroakışkan tasarımı (A) Mikroakışkan çip kısımları (üstten görünüm) (B) Çift taraflı bant kullanılarak oluşturulan mikroakışkan çip, kapalı uç bir dolum kanalı ve numune haznesi içermektedir (yandan görünüm).

**Şekil 2:** Mikroakışkan çipi santrifüj cihazına yerleştirmek için tasarlanmış santrifüj tüpü

**Şekil 3:** Mikroakışkan çipin kanal genişliği ve kanal yüksekliğine bağlı olarak dolum hızının

değişmesi (A) Aynı zamanda farklı kanal genişlikleri ve kanal yükseklerine sahip kanalların dolması için gerekli dönme hızı (B) Kanal yüksekliğine bağlı hidrolik direnç ve dönme hızının ilişkisi (C) Kanal genişliğine bağlı hidrolik direnç ve dönme hızının ilişkisi

5 **Şekil 4:** Sabit kanal genişliği ve yüksekliğinde kanal uzunluğuna bağlı olarak kanalın zamana bağlı dolum profili

**Şekil 5:** Kanal genişliği ve yüksekliği sabit tutularak kanal uzunluğuna göre hidrolik direnç ve dolum hızının ilişkisi

**Şekil 6:** Tam kan örneğinin mikroakışkan çip içerisinde sırasıyla 5, 10 ve 15 dakika santrifüjlenmesi sonucu oluşan buffy coat ve plazma bölgeleri

10 **Şekil 7:** (A) Farklı dönme hızlarında hesaplanan hematokrit değeri (B) Santrifüj sonrası plazma içerisinde kalan hücre miktarı

**Şekil 8:** Çip üstünde ölçülen hematokrit değerlerinin mikrohematokrit tüpü ile yapılan ölçümlerle kıyaslanması

**Şekil 9:** Buffy coat kalınlığı ve beyaz kan hücresi sayısı arasındaki korelasyon

15

### **Buluşu Oluşturan Unsurların/Kısımların/Parçaların Tanımları**

20 Bu buluşla geliştirilen mikroakışkan platformun daha iyi açıklanabilmesi için hazırlanan şekillerde yer alan parçalar/kısımlar/unsurlar aşağıda belirtilmektedir.

1: Numune haznesi

2: Dolum kanalı

3: Mikroakışkan Çip

25 4: Santrifüj Tüpü

### **Buluşun Ayrıntılı Açıklaması**

Buluş sıvı dolumu için bir mikroakışkan platform olup özelliği;

30 • Bir ucu kapalı ve düz kesit alanlı en az bir dolum kanalı (2) ve kanala (2) bağlı en az bir numune haznesi (1) içeren mikroakışkan çip (3) ve

- Mikroakışkan çipi (3) santrifüj cihazına yerleştirmek için tasarlanmış en az bir santrifüj tüp (4) içermektedir.

Dolum kanalı (2) kanal uzunluğu (h), kanal genişliği (w) ve kanal yüksekliğine (L) göre mikroakışkan çipin (3) içerisine konumlandığı santrifüj cihazı dönüş hızının ayarlanabilir veya programlandırılabilir olması ile karakterize edilmektedir.

5

Buluştta yer alan mikroakışkan çip (3) 5-50 mm uzunluğa ve farklı genişliklere (0,1-5 mm) sahip düz ve kapalı dolum kanalından (2) oluşmaktadır (Şekil 1 (A)). Mikroakışkan çip (3) 0.15 mm kalınlığa sahip çift taraflı bant ile alt yüzeyi 1 mm kalınlığa sahip olan lamel, üst yüzeyi numune haznesi (1) içeren Polimetil metakrilat (PMMA) katmanı ve kapalı dolum kanalı içermektedir (Şekil 1 (B)). Numune haznesinin (1) hacmi 1-100  $\mu\text{L}$ 'dir.

10

Sıvı dolum yöntemi aşağıdaki işlem adımlarını içermektedir:

- Bir ucu kapalı en az bir düz kesit alanlı dolum kanalı (2) ve kanala (2) bağlı en az bir numune haznesi (1) içeren, dolum kanalı (2) kanal uzunluğu (h), kanal genişliği (w) ve kanal yüksekliğine (L) göre santrifüj cihazı dönüş hızının ayarlandığı en az bir mikroakışkan çipin (3) sağlanması,

15

- Mikroakışkan çipi (3) santrifüj cihazına yerleştirmek için tasarlanmış en az bir santrifüj tüp (4) 'ün sağlanması,

- Sıvının en az bir numune haznesine (1) doldurulması,

- Mikroakışkan çipin (3)'in santrifüj tüpüne (4) yerleştirilmesi,

20

- Dolum kanalı (2) kanal uzunluğu (h), kanal genişliği (w) ve kanal yüksekliğine (L) göre santrifüj cihazı dönüş hızının ayarlanması,

- Mikroakışkan çipin (3) ayarlanan santrifüj hızında belirli bir süre döndürülerek santrifüj kuvveti ile kanal (2) içinden numune haznesine (1) hava çıkışı sağlanarak belirlenen sıvı hacimlerinin numune haznesinden (1) kanal (2) içine doldurulması.

25

Buluş yöntemi, mikroakışkan çipi (3) farklı santrifüj hızlarında belirlenen sürelerde döndürerek istenilen numune haznesinden (1) dolum kanalına (2) farklı sıvıların programlanabilir olarak doldurulmasında kullanılmaktadır.

Mikroakışkan çip (3), kanal (2) içine doldurulacak sıvı rezervuara koyulduktan sonra, özel olarak tasarlanmış santrifüj tüp (4) içerisine koyularak santrifüj cihazına yerleştirilmiştir (Şekil 2). Santrifüj tüp (4), mikroakışkan çipin (3) içerisine tam oturan ve santrifüj cihazı içerisinde

30

çipin (3) sabit durmasını sağlayan bir tüptür. Teknik olarak santrifüj cihazına tam oturan, içerisinde mikroakışkan çipin (3) girebileceği ve santrifüj sırasında çipin (3) hareketini önleyen en az bir girinti içermektedir.

5 Mikroakışkan çip (3), farklı santrifüj hızlarında (100- 1000 rpm) döndürülerek farklı sıvı hacimleri kanal (2) içine doldurulabilmektedir. Her kanal (2) özelliklerinden (uzunluk, genişlik, yükseklik) dolayı farklı hidrolik dirence sahiptir. Hidrolik direncin artması kanalın (2) dolum için daha yüksek dönme hızına ihtiyaç duyacağı anlamına gelmektedir. Bu sebeple her kanal (2) ilk olarak 100 rpm 5 dk'dan başlayarak 1000 rpm 5 dk'ya kadar tek tek döndürülerek bakılmıştır, burada amaç kanal (2) özelliklerine göre doldukları dönme hızını bulmaktır. Farklı 10 kanal (2) boyutları farklı dönüş hızlarında dolabilmektedir (Şekil 3A). Bu da çip (3) üstünde hazneye bağlı farklı kanal (2) genişlikleri kullanılırsa farklı dönüş hızlarında programlanabilir bir akış profili oluşturacağı anlamına gelmektedir. Böylelikle farklı sıvıların sırasıyla karıştırılması gereken işlemler, önerilen prensip ile santrifüj cihazı içinde gerçekleştirilebilir. Bu buluşta, kapalı kanal (2) sisteminin doldurulması valf, membran, sifon yapıları 15 kullanılmadan ilk kez sunulmaktadır.

Buluş ile farklı kanal (2) boyutlarının aynı zamanda farklı dönüş hızlarında dolabildiği gözlenmektedir (Şekil 3A). Elde edilen sonuçlara göre, kanal (2) genişliği ve kanal yüksekliği arttıkça sıvının kanala (2) dolması için gerekli dönme hızının azaldığı sonucu elde edilmiş olup Denklem 1 ile hidrolik direnç hesaplanarak dolum prensibini ortaya koymuştur (Denklem 1). 20 Hidrolik direnç (R), kanal yüksekliği (h), kanal genişliği (w), kanal uzunluğu (L) ve sıvı viskozitesi ( $\mu$ ) ile ilişkilidir. Kanal genişliğine ve kanal yüksekliğine bağlı hidrolik direnç hesaplanarak dolum için gerekli dönme hızı ile ilişkisine bakıldığında korelasyon görülmektedir (Şekil 3B, C). Bu da çip (3) üstünde rezervuarlara bağlı farklı kanal (2) genişlikleri kullanılırsa farklı dönüş hızlarında programlanabilir bir akış profili oluşturacağı 25 anlamına gelmektedir. Bu buluşta, kapalı kanal (2) sisteminin doldurulması valf, membran, sifon yapıları kullanılmadan ilk kez sunulmaktadır.

$$R = \frac{1}{1-0,63 \left(\frac{L}{w}\right)} \frac{12 \mu L}{h^3 w} \quad (\text{Denklem 1})$$

Kanal genişliği 2 mm ve kanal yüksekliği 150  $\mu$ m sabit tutulan kanalların kanal uzunluğuna 30 göre zamana bağlı hacim profili incelenmiştir (Şekil 4). Denklem 1 kullanılarak hidrolik direnç hesaplanmış olup kanal uzunluğu ve kanalın dolması için gerekli dönüş hızı arasındaki ilişki gösterilmiştir (Şekil 5). Böylece hidrolik direnci düşük olan yani kanal uzunluğu az olan kanalın

kendi hacminin %95'ine ulaşması daha kısa sürede gerçekleşirken kanal uzunluğu arttıkça bu süre de artmaktadır.

5 Buluş kapsamında hematoloji biriminde rutin olarak gerçekleştirilen hematokrit ve beyaz kan hücresi sayımını kapalı kanal (2) sistemde uygulanmıştır. 10 µL tam kan örneği numune haznesine (1) yerleştirilmiş ve ardından farklı dönme hızı ve sürelerinde santrifüj cihazında santrifüjlenmiştir. Bu sayede herhangi bir ek işlem, ek yapı kullanmadan plazma, tam kandan ayrılmıştır. Kanalın alt kısmında toplanan kırmızı kan hücrelerinin toplam kanal (2) içindeki örnek hacmine oranından hematokrit değeri hesaplanabilmektedir (Şekil 8). Elde edilen sonuca bakıldığında dönme hızlarının hematokrit hesaplanması üzerindeki etkileri aynı olduğundan 10 plazma içerisinde kalan hücre miktarı sayılarak optimum dönme hızı ve süresi 4000 rpm 10 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 7A, B). Klinikte, plazma ayrışması için kan içerisinde bulunan tüm hücrelerin çökmesi gerekmekte ve plazma içerisinde hücre kalmaması gerekmektedir. Bu sebeple de döndürme hızlarında plazma içerisinde kalan hücre sayıları incelendi ve en az hücre miktarı 4000 rpm 10 dakikada bulunmuştur. 15 dakika ile 10 dk 15 arasında hücre sayılarında fark olmadığı görülmüştür.

Tam kan örneğinden plazma ayrışması ile kırmızı kan hücresi arasında kalan ve beyaz kan hücresi, platelet içeren buffy coat bölgesini buluşta elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 6). Buffy coat kalınlığını da bakarak kan içindeki beyaz kan hücresi miktarı hesaplanabilmektedir (Şekil 9).

20 Sunulan teknik ile ilk kez kapalı uçlu bir kanal tek hazneden santrifüj kuvveti ile ek yapılar gerektirmeden doldurulmuş ve hematoloji biriminde rutin testlerden olan hematokrit değeri ve beyaz kan hücresi miktarı tespiti yapılabilmektedir. Bu buluş, çeşitli kan testlerine uygulanabileceği gibi farklı moleküler seviyede uygulamalara hizmet ederek ayrıştırma, saflaştırma, zenginleştirme gibi çalışmalarda da kullanılma potansiyeline sahiptir.

25 Dolum prensibine bakıldığı zaman, çipin dönme yönünde, sıvının kanal yüzeyine doğru menisküs yapısı oluşturduğu görülmektedir. Menisküs yapısı kanal boyunca ilerleyip, sıvıyı kanalın alt kısmından başlayarak dolmakta, kanal içindeki hava ise ters yönlü tahliye edilmektedir.

30 Tasarlanan sistem üzerinde kanal şekil ve konumlarında değişiklik yapılarak farklı haznelere sırasıyla numune doldurulması ve kanal içerisinde farklı numunelerin karıştırılması sağlanabilmektedir. Ayrıca tasarlanan kanal ve önerilen prensip ile tam kandan plazma ayrışması sağlanabildiği gibi ayrıştırılan plazma içerisindeki biyobelirteçlerin (kreatinin gibi)

ölçümü de yapılabilmektedir. Bunun için tam kan örneği numune haznesine yerleştirilir ve ardından santrifüjlenir. Bu sayede, tam kan içerisinde bulunan kırmızı kan hücreleri dipte toplanırken ortada buffy coat olarak bilinen beyaz kan hücrelerinin toplandığı bir bölge oluşmakta ve üstte saf plazma kalmaktadır. Mikroakışkan çip görüntüsünden kırmızı kan hücrelerinin kapladığı bölge ölçülerek, tüm örnek bölgesine oranlanır ve hematokrit değeri bulunmuş olur. Ayrıca, ortada buffy coat adı verilen bölgede beyaz kan hücreleri toplandığı için bu bölgeden beyaz kan hücresi sayısı hesaplanabilmektedir. Plazma içerisindeki biyobelirteçlerin ölçümü için ise kan örneği, çip dışında biyobelirteçlerle tepkimesi sonucunda tercihen kolorimetrik ürün veren solüsyonlar ile karıştırılarak numune haznesine verilmektedir.

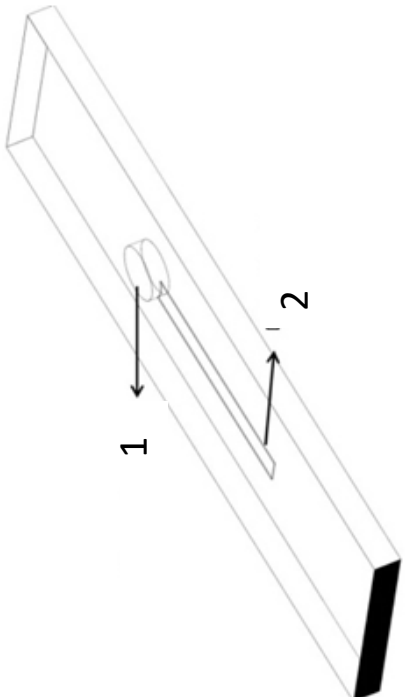
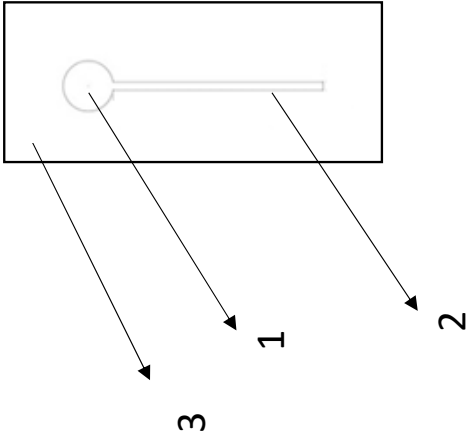
5

10

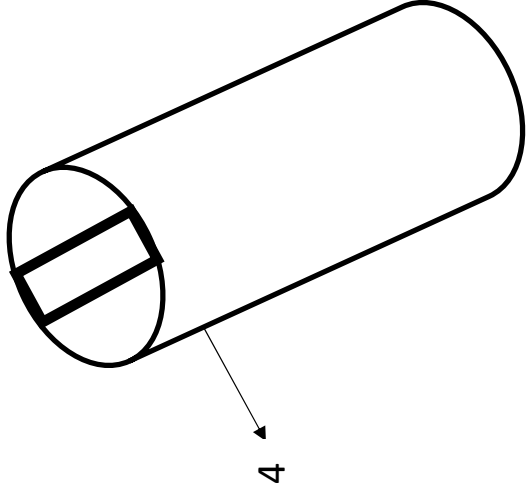
15

20

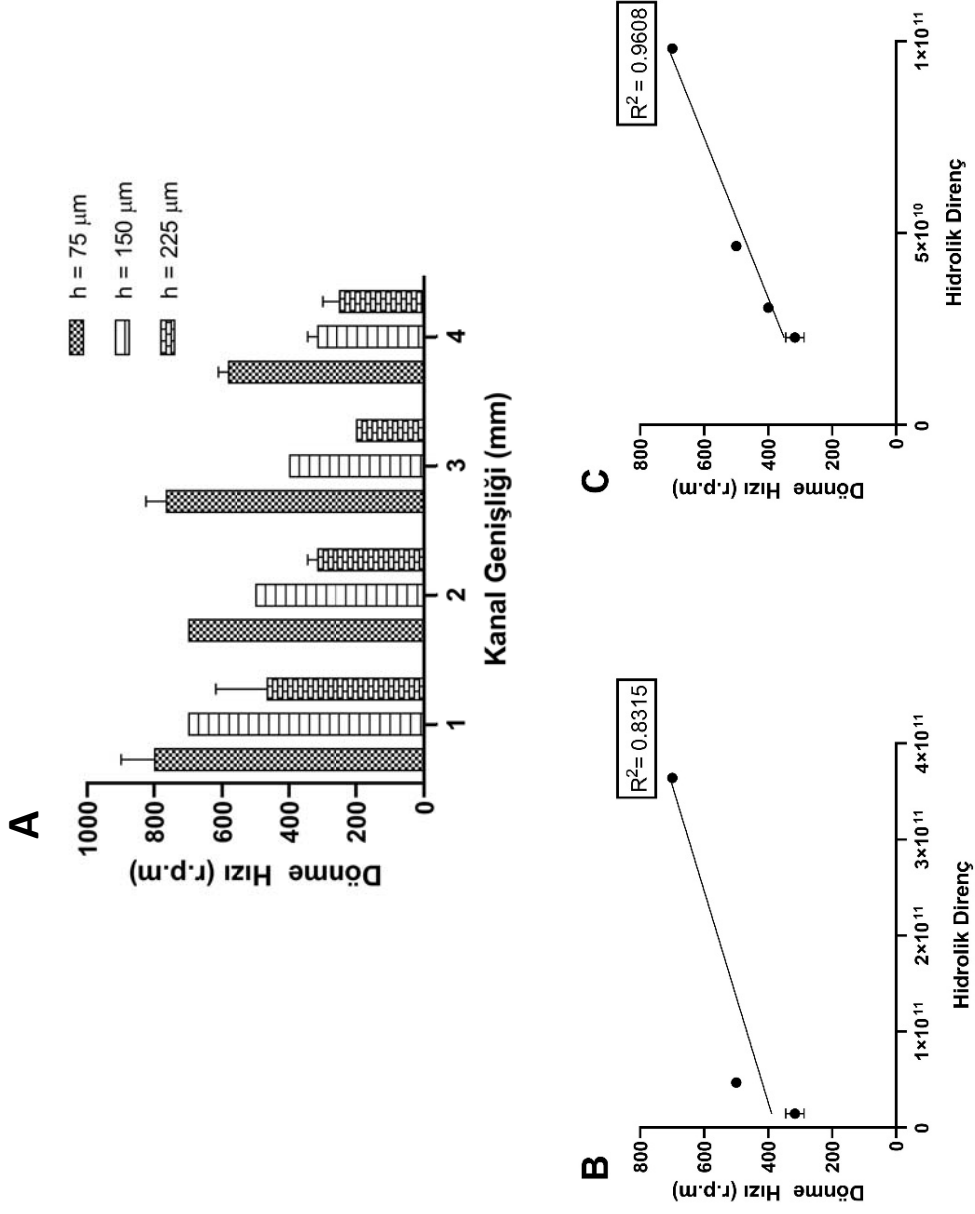
Ardından, santrifüj ile karışım kapalı kanala alınmakta ve yüksek hızlı santrifüj ile kırmızı kan hücreleri ve beyaz kan hücreleri çöktürülmektedir. Yukarıda bulunan plazma bölgesindeki biyobelirteçler solüsyonlar ile reaksiyona girerek bulunan biyobelirtecin konsantrasyonuna göre farklı yoğunlukta renk kanalda renk ortaya çıkarmaktadır. Bu renk yoğunluğuna göre biyobelirteç konsantrasyonu hesaplanabilmektedir. Bu yöntemle, aynı kanal içinde kan hücreleri plazmadan ayrıştırılarak, kan hücrelerin kolorimetrik ölçümlere olan olumsuz etkisi (arka plan gürültüsü gibi) giderilmektedir. Önerilen buluş, hücre ayrıştırmada, tek hücre çalışmalarında, santrifüj gerektiren pek çok moleküler ve klinik testlerde kullanılabilir potansiyeline sahiptir. Ayrıca önerilen sistem çok az miktarda örnek işleyebilmekte (0,1-2 µL), ayrıştırılan örnekler mikroskop altında da incelenebilmektedir. Ayrıştırılan örnekler yine mikroskop altından toplanıp farklı analizlerde de kullanılabilir.



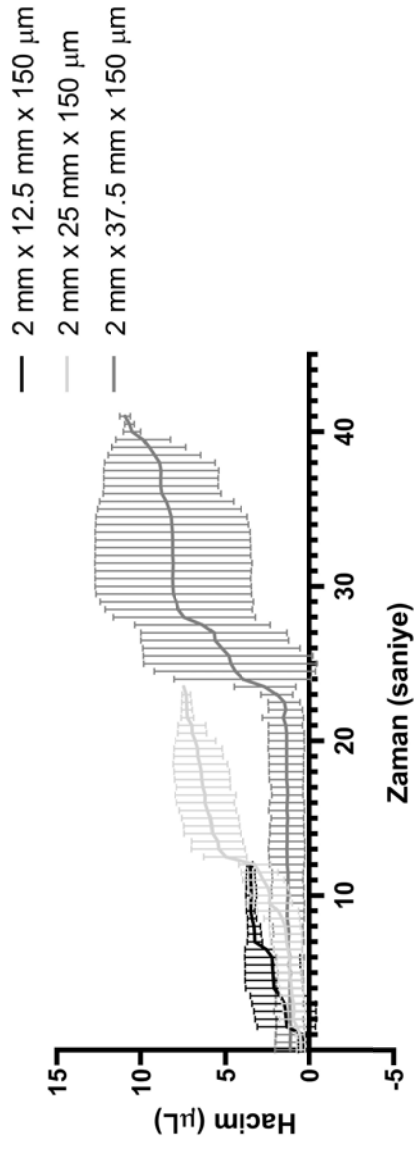
Şekil 1



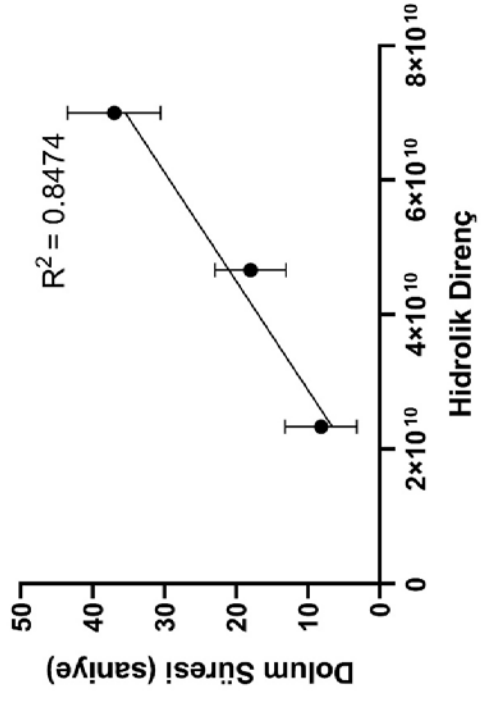
Şekil 2



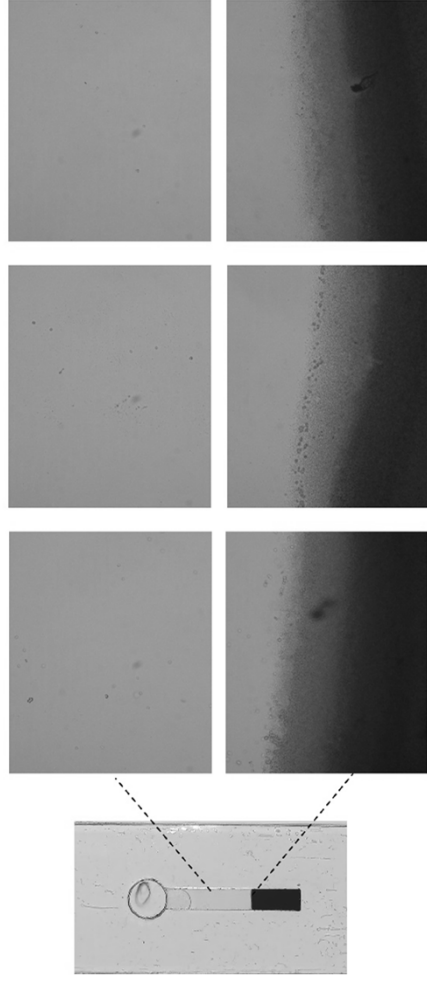
Şekil 3



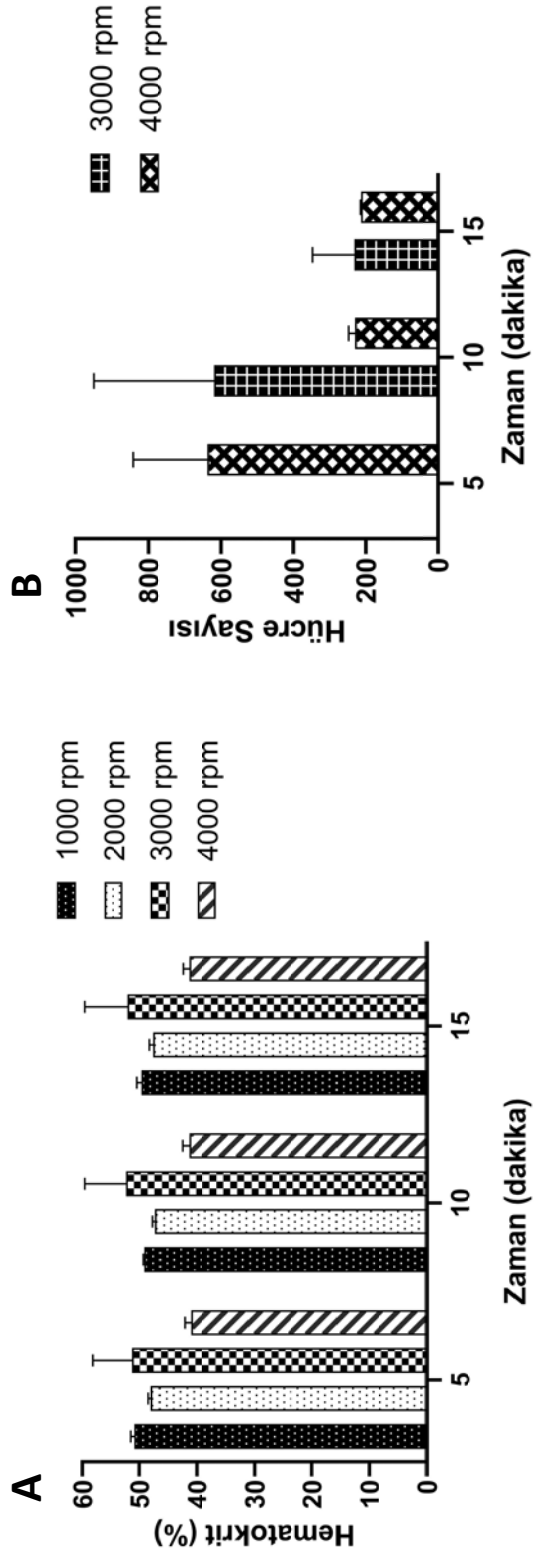
Şekil 4



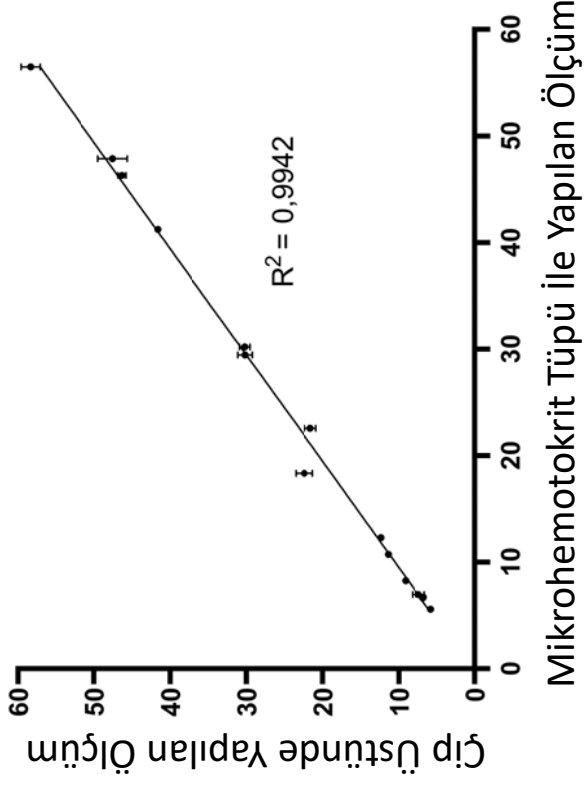
Şekil 5



Şekil 6

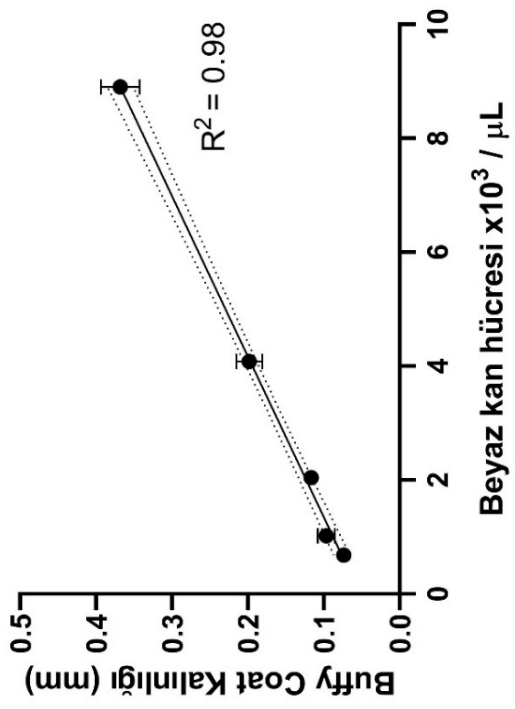


Şekil 7



Şekil 8

Mikrohemotokrit Tüpü İle Yapılan Ölçüm



Şekil 9