



POLİTEKNİK DERGİSİ

JOURNAL of POLYTECHNIC

ISSN: 1302-0900 (PRINT), ISSN: 2147-9429 (ONLINE)

URL: <http://dergipark.org.tr/politeknik>



Mikroakışkan çiplere kök hücre ve doku mühendisliği perspektifinden bakış

A Stem cell and tissue engineering perspective on microfluidic chips

Yazar(lar) (Author(s)): Gülşah TORKAY¹, Ayça BAL ÖZTÜRK²

ORCID¹: 0000-0002-6803-494X

ORCID²: 0000-0002-6502-528X

To cite to this article: Torkay G. ve Bal-Öztürk A., “mikroakışkan çiplere kök hücre ve doku mühendisliği perspektifinden bakış”, *Journal of Polytechnic*, 27(2): 429-443, (2024).

Bu makaleye şu şekilde atıfta bulunabilirsiniz: Torkay G. ve Bal-Öztürk A., “Mikroakışkan çiplere kök hücre ve doku mühendisliği perspektifinden bakış”, *Politeknik Dergisi*, 27(2): 429-443, (2024).

Erişim linki (To link to this article): <http://dergipark.org.tr/politeknik/archive>

DOI: 10.2339/politeknik.1094010

Mikroakışkan Çiplere Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Perspektifinden Bakış

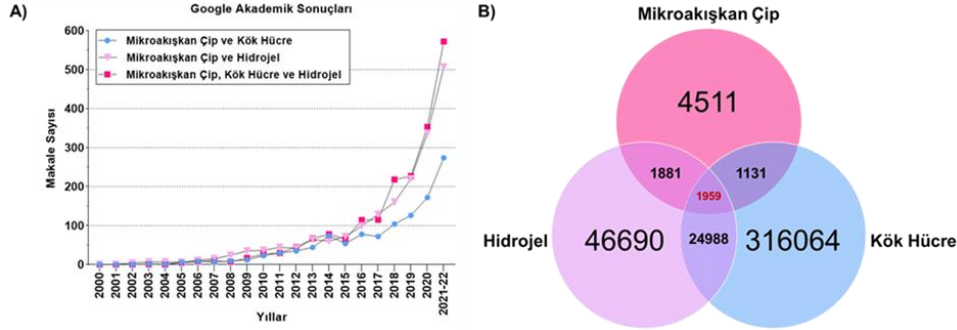
A Stem Cell and Tissue Engineering Perspective on Microfluidic Chips

Önemli noktalar (Highlights)

- ❖ Mikroakışkan sistemlerin biyolojik bilimlerdeki önemi (Importance of microfluidics in biological sciences)
- ❖ Çip sistemlerinin geleneksel yöntemlerin yerine geçmesi (Chip systems replacing traditional methods)

Grafik Özet (Graphical Abstract)

Bu çalışmada mikroakışkan çip sistemlerinin üretim süreçleri, avantajları ve dezavantajları özetlenerek bu alandaki kök hücre ve doku mühendisliği çalışmalarına değinilmiştir (In this study, the production processes, advantages and disadvantages of microfluidic chip systems are summarized and stem cell and tissue engineering studies in this field are mentioned).



Şekil. Google Akademik sonuçlarına göre 2000 yılından günümüze mikroakışkan çip sistemleri, kök hücreler ve hidrojeller ile ilişkili yayın sayıları (A) ve bu konuların bir arada çalışıldığı toplam yayın sayıları (B). / **Figure.** According to the Google Scholar results, the number of publications related to microfluidic chip systems, stem cells, and hydrogels since 2000 (A) and the total number of publications working on these issues together (B).

Amaç (Aim)

Bu çalışmada araştırmacılara detaylı bir kaynak sağlamak amaçlanmıştır (In this study, it is aimed to provide a detailed resource for researchers).

Tasarım ve Yöntem (Design & Methodology)

Bu derlemede, Google Akademik literatür taraması sonucunda elde edilen önemli çalışmalara yer verilmiştir (In this review, important studies as a result of Google Scholar literature search is highlighted).

Özgünlük (Originality)

Son yıllarda; çip sistemlerinin önemi, tasarım süreçleri, üretimde kullanılan malzemeler, özellikle kök hücre ve doku mühendisliğinde potansiyel uygulama alanlarını bir arada inceleyen ulusal bir derleme yoktur (There is no national review in recent years that examines the importance of chip systems, design processes, materials used, and potential application areas, especially in stem cell and tissue engineering)

Bulgular (Findings)

Çip sistemlerinde kök hücre ve doku mühendisliği çalışmaları her geçen yıl artmaktadır (Stem cell and tissue engineering studies in chip systems are increasing every year).

Sonuç (Conclusion)

Çip sistemleri geleneksel yöntemlerin yerini almaya başlamıştır (Chip systems have begun to replace traditional methods).

Etik Standartların Beyanı (Declaration of Ethical Standards)

Bu makalenin yazar(lar)ı çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler. / The author(s) of this article declare that the materials and methods used in this study do not require ethical committee permission and/or legal-special permission.

Mikroakışkan Çiplere Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Perspektifinden Bakış

Derleme Makalesi / Review Article

Gülşah TORKAY¹, Ayça BAL ÖZTÜRK^{1,2*}

¹Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Bölümü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstinye Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

²Eczacılık Temel Bilimler Bölümü, Eczacılık Fakültesi, İstinye Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

(Geliş/Received: 27.03.2022 ; Kabul/Accepted: 31.05.2022 ; Erken Görünüm/Early View: 24.08.2022)

ÖZET

Kolayca modifiye edilebilir ve pek çok çalışmaya entegre edilebilir özellikleriyle mikroakışkan sistemler son yıllarda araştırmacıların ilgi odağındadır. Mikroakışkan çipler sayesinde daha az solüsyon ve sürekli perfüzyon ile kontrollü ve optimize hücre kültürü çalışmaları yapılabilmektedir. Son yıllarda özellikle rejeneratif tıbbın ilgisini çeken kök hücrelerin tek başına veya diğer hücrelerle birlikte kültürlenmesi ve kullanılan kök hücrelerin istenilen yönde farklılaştırılması çip sistemlerinde sıklıkla çalışılmaktadır. Bu sistemlere hücreler arası ortam koşullarını taklit edecek hidrojellerin veya hücrelerinden arındırılmış organ matrislerinin de ilave edilmesi *in vivo*'ya daha yakın sonuçlar vermektir. Çiplerin üretildiği malzeme, yüzey modifikasyonları, akış hızı, besi yeri içeriği, kullanılan hidrojellerin mekano-kimyasal özellikleri, elektriksel, kimyasal ya da mekanik uyarımlar neticesinde kök hücrelerin farklılaşmaları da dahil tüm davranışlarının oldukça değiştiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Mikroakışkan çip sistemlerinin ilerleyen zamanlarda kişiselleştirilmiş tıp, ilaç toksisite deneyleri, hasta-yanı hızlı tanı kitleri ve birçok temel bilim araştırmasına yeni bir boyut kazandıracağı, özellikle hayvan deneylerinin yerini alarak daha güvenilir ve ucuz potansiyel yöntemlerin başında geleceği öngörülmektedir. Tüm bu sebepler çip sistemlerini araştırma odağı yapmaktadır. Bu çalışmada; mikroakışkan çip sistemlerinin üretimi, avantajları, dezavantajları ve doku mühendisliği alanındaki uygulamaları tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: mikroakışkan sistemler, çip-üstü-lab, çip-üstü-organ, doku mühendisliği, kök hücre.

A Stem Cell and Tissue Engineering Perspective on Microfluidic Chips

ABSTRACT

Microfluidic systems, which can be easily modified and integrated into many studies, have been the focus of attention of researchers in recent years. Thanks to microfluidic chips, controlled and optimized cell culture studies can be performed with less solution and continuous perfusion. In recent years, culturing the stem cells which has attracted the attention of regenerative medicine, alone or together with other cells and differentiating these cells in the desired direction, are frequently studied in chip systems. Adding hydrogels or decellularized organ matrices to these systems that will mimic the intercellular environment conditions gives results closer to *in vivo*. There are many studies showing that all the behaviors of the stem cells, including the differentiation, change considerably due to the material from which the chips are produced, the surface modifications, the flow rate, the medium content, the mechano-chemical properties of the hydrogels used, and electrical, chemical or mechanical stimulations. It is predicted that microfluidic chip systems will add a new dimension to personalized medicine, drug toxicity experiments, point-of-care rapid diagnostic kits, and many basic science researches in the future, and will be one of the more reliable and inexpensive potential methods, especially by replacing animal experiments. All these reasons make chip systems the focus of research. In this study; The fabrication, advantages, disadvantages, and applications of microfluidic chip systems in tissue engineering are discussed.

Keywords: microfluidic systems, lab-on-chip, organ-on-chip, tissue engineering, stem cell.

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Teknolojinin ve diğer bilimsel gelişmelerin hızla ivme kazanmasıyla araştırmacılar her geçen yıl disiplinler arası yaklaşımlardan faydalanarak yeni sistemler geliştirmektedir. Bunlardan biri de mikroakışkan çip sistemleridir. 1960'lı yıllarda temelleri atılan ve 1979'da Stanford'da geliştirilen gaz kromatografisi [1] ile güncel uygulamalardaki yerini almaya başlayan mikroakışkan sistemler, esasen milimetrik ölçülerin altında, çok küçük bir hacim ve boyutta, yüzey kuvvetlerinin hakimiyetinde

akışkanların davranışlarını ve bu davranışların kontrolünü ifade eder. Fizik ve mekaniğin prensiplerini esas alan, kimyasal dinamiklerden etkilenen, mühendislik araçları ile geliştirilen bu sistemler günümüzde özellikle biyoteknolojinin ilgi odağı olmaya başlamıştır. Mikroakışkan sistemlerin; reaktif hacimlerini azaltmaları [2], yüksek verimlilikle reaksiyon sürelerini kısaltmaları [3-4], dışarıdan müdahaleyi en aza indirgeyebilmeleri [5], çok farklı modifikasyonlarla farklı protokollere uygulanabilmeleri [6] ve tüm deneysel aşamaları tek bir cihazda bütünleştirerek birden fazla işlemin paralel bir şekilde gerçekleşmesini mümkün kılmaları [7] biyolojik süreçlerin minyatürleştirilmesine olanak sağlar. Bu

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author)
e-posta : aycabal@gmail.com

minyatürleştirmeden yola çıkılarak bu küçük sistemlere lab-on-chip (LoC) yani çip üzerinde laboratuvar denmektedir. Mikroakışkan sistemler sayesinde, tek bir hücrenin dahi fizyolojisi incelenebilmekte ve böylelikle popülasyondaki heterojenite anlaşılmaktadır [8]. Bu sayede mevcut tekniklerle elde edilebilenden çok daha fazla bilgiye daha kontrollü ve hızlı şekilde ulaşılmaktadır.

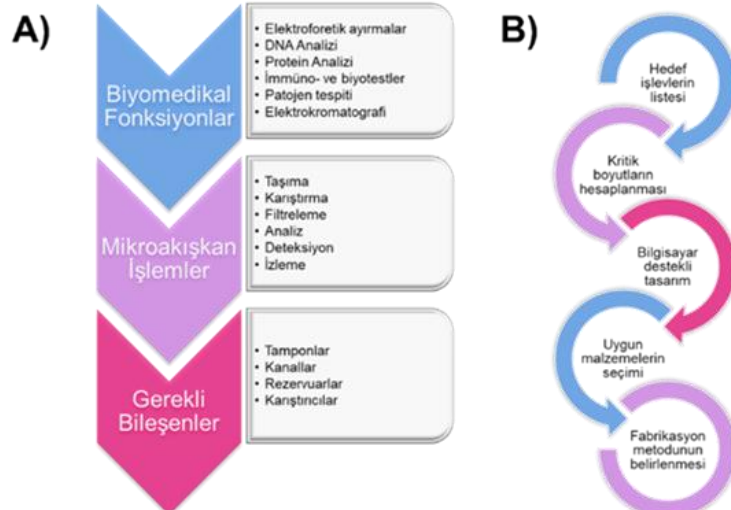
Son yıllarda özellikle rejeneratif tıp alanında oldukça önemli olan kök hücreler bugüne dek pek çok LoC sisteminde çalışılmıştır [9-13]. Bu sistemler kök hücrelerin karakterini anlamaya [14], onları istenilen yönde farklılaştırarak tedavi potansiyellerini hassas biçimde artırmaya yönelik [15] olmuştur. Bu noktada hücrelerin, *in vivo* koşullara daha yakın biçimde, 3 boyutlu (3B) hücre dışı matris (ECM) benzeri ortam içerisinde yer aldığı çeşitli yapı iskeleleri de çip modelleri ile entegre edilmiştir [16]. Doku mühendisliğinde, özellikle hidrojeller ve hücrelerinden arındırılmış ECM'ler sıklıkla kullanılmaktadır. Hidrojeller genellikle doğal ya da sentetik polimerlerden üretilen, biyouyumlu ve biyobozunur, yüksek su tutma kapasitesine sahip, gözenekli iskele yapıları; hücrelerinden arındırılmış ECM'ler ise gerçek dokuların hücreleri fakat protein yapısını koruyan halleridir [17]. Hem doku mühendisliği kapsamında yaratılan 3B kültür ortamı hem de mikroakışkan sistemler sayesinde elde edilen kontrollü koşullar bir araya geldiğinde kök hücreleri daha iyi anlamamız ve manipüle etmemiz mümkün olmaktadır [18]. Statik ve 2 boyutlu (2B) kültür ortamının aksine dinamik ve 3B bir kültür ortamı *in vivo* koşullara daha yakındır [19].

2. MİKROAKIŞKAN SİSTEMLER (MICROFLUID SYSTEMS)

Milimetrik ölçülerin altında, mikro (μ) ve nano (n) hacim ve boyutlarda, yüzey kuvvetlerinin hakimiyetinde akışkanların davranışlarını ve bu davranışların hassas bir şekilde kontrolünü ifade eden mikroakışkan sistemler; fizik, mekanik, kimya ve mühendislik gibi pek çok disiplini bünyesinde barındıran ve günümüzde biyoteknolojik amaçlar doğrultusunda yoğun biçimde çalışılan bir alandır. Laboratuvarında uygulanan deneysel prosedürlerin ve biyolojik süreçlerin mikroakışkan çipler üzerinde çalışılmasını ifade eden LoC sistemleri, mikro toplam analiz sistemleri (μ TAS) olarak da adlandırılır. Bu sistemler; numune enjeksiyonundan, karıştırma, depolama, filtreleme ya da ayırma yoluyla optik analiz, inkübasyon ve örnek işleme kadar birçok işlevi tek bir platforma entegre edebilmektedir [20]. Tüm bu işlevleri paralel şekilde gerçekleştirebilecek karmaşık çip sistemleri de geliştirilmektedir.

Hücrelerin birbiriyle olan etkileşimleri ve moleküller arası uzaklıklar düşünüldüğünde biyolojik materyalleri çip sistemlerinde çalışmak mantıklı görünmektedir. Örneğin; hücrelerin çapı yaklaşık 1 ila 20 μ m arasında değişirken bir sıvı içerisinde moleküller arası uzaklık ise yaklaşık 0,1 nm'dir. Öte yandan bir çözünenin difüzyon hızı memeli hücrelerine göre 10^5 kat, bir proteine göre ise 50 kat fazladır [21]. Yani hücre ve çevresindeki olaylar mikro ve nano ölçeklerde gerçekleşir, akışkanlar dinamiğinden son derece etkilenir [22]. Bu durumda çip sisteminde reaktifleri karıştırma, dağıtma, reaksiyona sokma, hücreleri yakalama ve biyolojik analizleri gerçekleştirme gibi olaylar için mikron ve mikron-altı düzeyde etki eden fiziksel kuvvetleri hesaba katmak gerekir. Sıvı ve gazlar ya da bir başka deyişle akışkanlar, bir kaydırıcı kuvvet uygulanması ile deforme olabilen maddelerdir, yani bunun için basınç, alan gradyanları, yüzey gerilimi ve yerçekimi gibi bir dış etken gereklidir. Kısacası akışkanın viskozitesini aşarak akmayı sürdürmek için belli bir kuvvet uygulamak şarttır. Bu konu fiziğin akışkanlar mekaniği altında incelenir ve LoC sistemleri için oldukça önemlidir. Çip içerisinde bu tür işlevler genellikle, hareket halindeki bir sıvıya etki eden yerçekimi, basınç ve viskoziteden kaynaklanır [21]. Çipler içerisindeki akış, şırınga ve peristaltik pompalar gibi geleneksel, harici akışkan pompalar veya çip-üstü piezoelektrik, pnömatik ve elektromanyetik mikro-pompalar tarafından sağlanır [23]. Mikro-pompaları ve onları çalıştırmak için gerekli güç kaynaklarını çip üzerine entegre etme süreçleri oldukça karmaşık olduğundan geleneksel yöntemler daha çok tercih edilir. Pompa sistemlerine ve çiplerin giriş-çıkış noktalarına bağlanan küçük ölçekli hortumlar yardımıyla sıvı çevrimi sağlamak en yaygın yaklaşımlardan biridir.

Mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinde, hücrelere besiyeri ulaştıracak bir mikro-kanal sistemi tasarlanır. Akış sürekli ya da belli aralıklarla sağlanır ve besiyeri devridaim yapılabilir. Mikro-kanallardaki kayma gerilmesi, geleneksel makro ölçekli kültürlerle nazaran önemli ölçüde büyüktür. Literatürde "shear stress" olarak geçen kayma gerilmesi, bir malzemenin deformasyonuna neden olabilen mekanik bir kuvvettir. Gerçek sıvılar bu gerilmeye dayanamaz ve sürekli olarak "deforme" olurlar, yani basitçe akarlar. Farklı hücre tipleri, ortamdaki kayma gerilmesine farklı tepki verdiğinden ve hücreler tarafından tolere edilebilecek bir eşik değeri olduğundan, bu kuvvetin ölçüsü dikkatli bir şekilde hesaplanmalıdır [24-25]. Değişen kayma gerilmesi, hücrelerde gen ekspresyonlarını dahi etkilemektedir [26].



Şekil 1. Mikroakışkan sistem tasarlanması için gerekli süreç ve bileşenler. A) Birçok uygulamayı tasarlarken ortak bileşenler üzerinden hareket etmeyi sağlayan hiyerarşik tasarım yaklaşımı ve B) Mikroakışkan bir sistem tasarlama sürecindeki temel basamaklar. (Necessary processes and components for designing a microfluidic system. A) A hierarchical design approach that allows using common components when designing many applications and B) The basic steps in the process of designing a microfluidic system.)

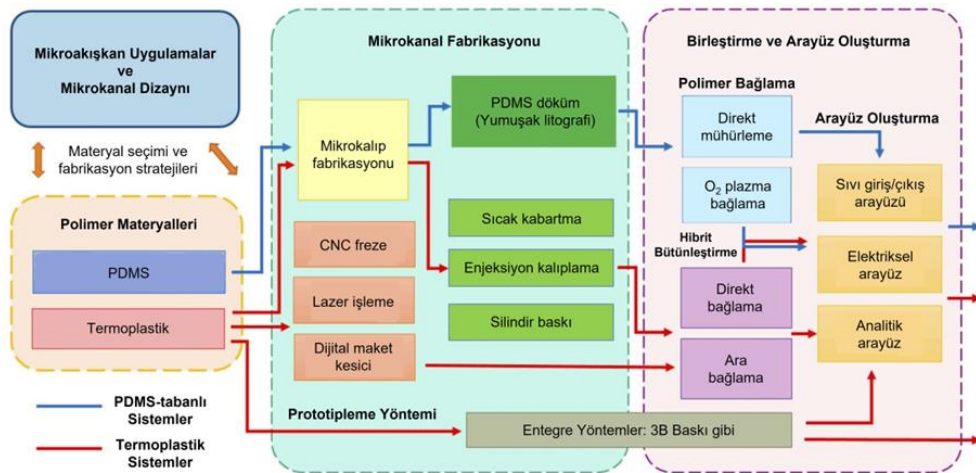
Mikroakışkan sistemleri rutin uygulamalara dönüştürmek esas hedeflerden birisidir. Uygulamaların karmaşıklığı, yönetilebilir bir seviyeye indirgenememelidir. Bir LoC mimarisi için önerilen hiyerarşik sınıflandırmada; en üst seviyede fonksiyon, ikinci seviyede mikroakışkan işlemler, üçüncü seviyede ise bu işlemleri gerçekleştirmek için gereken bileşenler yer alır [27]. Bu mimari, araştırma için gereksinim duyulan özellikleri ve bileşenleri seçme esnekliği sağlar (Şekil 1A). Mikroakışkan sistemlerin tasarım süreçleri, kullanılan teknikler ve malzemeler bir sonraki bölümde daha detaylı tartışılmıştır.

2.1. Mikroakışkan Sistemlerin Üretiminde Kullanılan Teknikler ve Malzemeler (Techniques and Materials Used in the Production of Microfluidic Systems)

Mikroakışkan bir sistem tasarlamak, çok sayıda aşama, tekrarlama ve optimizasyon gerektiren karmaşık bir süreçtir (Şekil 1B). Tasarım süreci, cihazın sahip olması gereken işlevlerin belirlenmesi ile başlar ve çip üzerinde

gerçekleştirilecek işlemler göz önünde bulundurularak kritik tasarım boyutlarının belirlenmesi ile devam eder. Kritik boyutlar, üretim sürecini belirlemek için önemli olup kullanılacak yöntem ve yapılacak işlemlere uygun olarak malzemeler seçilmelidir [28]. Örneğin; deneysel süreçlerde ya da üretim aşamasında izopropanol veya etil alkol ile yapılması gereken bir işlem varsa, mikroakışkan çip bu kimyasallarda çözünen polimetilmetakrilat (PMMA) kullanılarak imal edilmemelidir.

Çip prototiplerinin üretiminde kullanılan tekniklerin başında lazer uygulamaları, bilgisayarlı sayısal kontrol (CNC) frezeleme, fotolitografi ve yumuşak litografi gelmektedir (Şekil 2). Mikro-kanallar, doğrudan lazer aşındırma ya da frezeleme işlemiyle veya indirekt olarak maskeli fotolitografik desenleme işlemleriyle oluşturulabilmektedir (Şekil 3A). Lazer uygulamalarında polimer moleküllerinin bağlarını kırmak için yüksek güçte bir lazer ışığı kullanılır ve böylece uygulanan bölgelerden polimerler uzaklaştırılır. Frezeleme yönteminde, işlenen parça üzerinde ilerlenerek



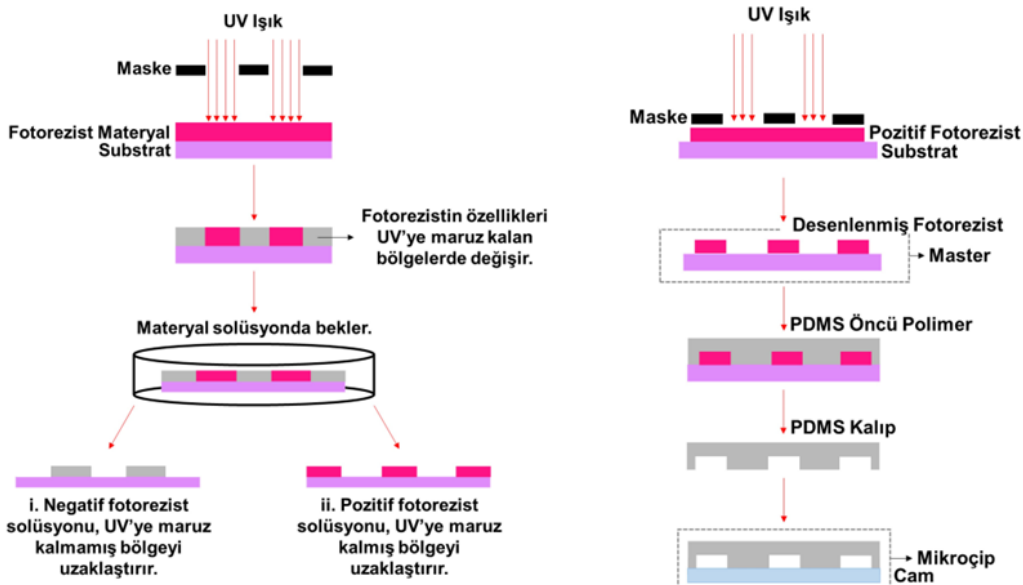
Şekil 2. Farklı teknikler ile mikroakışkan sistem üretimi, [30]'dan uyarlanarak. (Production of microfluidic systems with different techniques, adapted from [30].)

malzemeyi çıkarmak için döner bıçaklar kullanılır. Fotolitografi tekniğinde ise mikron altı seviyelere kadar küçük desenler; foto-kimyasallar, foto-rezistler ve ışık yardımıyla yazdırılır. İstenilen desen bir radyasyon kaynağına, bir maske yardımıyla seçici olarak maruz bırakılarak ışığa duyarlı bir malzemeye aktarılır. Işığa duyarlı kimyasal maddenin fiziksel özellikleri değişir ve bu değişen özellikler maruz kalan bölgelerin maruz kalmayan bölgelerden farklı olmasını sağlar. Böylece çapraz bağlanma sağlanmaktadır [29]. Ticarileşmiş mikroakışkan sistemlerin orta ve yüksek hacimli seri üretiminde; enjeksiyon kalıplama, silindirik baskı ve sıcak kabartma yöntemleri tercih edilir [30].

Lazer ablasyon ve mikro-frezleme teknikleri genellikle termoplastik polimerler üzerinde kullanılmaktadır. Desenleme işlemlerinin ardından termoplastik mikrokanallar, termal birleştirme adı verilen bir yöntemle kapatılır [31]. Termoplastikler dışında sıklıkla kullanılan bir başka malzeme, yumuşak bir çeşit elastomer olan polidimetilsiloksan (PDMS)'dir. PDMS döküm ya da yumuşak litografi; hedeflenen yapının ters görüntüsünü taşıyan bir ana parçanın, ışık ya da sıcaklık gibi bir dış faktöre maruz bırakıldıktan sonra katılaştıran sıvı bir malzeme ile kaplanmasıdır. Malzeme polimerleştikçe kalıbın şeklini almaya başlar. Polimerleşmenin ardından oluşan kopya, ana parçayı genellikle sağlam bırakarak çıkarılır. Bu yöntem, mikro ve nano yapıların oluşturulması için ucuz ve etkilidir. Kapalı bir mikroakışkan sistem elde etmek için, kalıptan çıkarılan kopya, cam ve benzeri materyaller ile birleştirilir (Şekil 3B). Farklı amaçlar doğrultusunda farklı malzemeler ve tasarımlar kullanılabilir.

Mikroakışkan çip sistemlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan bazı malzemeler ve özellikleri Çizelge 1'de

verilmiştir. Elastomerler oldukça viskoelastik yapıda olan özel polimerlerdir. Oda sıcaklığının altındaki camı geçiş sıcaklıklarında hafifçe çapraz bağlı ve amorf formdadırlar. Polimer zincirleri arasındaki moleküller arası kuvvetler oldukça zayıftır. Mikroakışkan sistemlerin üretiminde hedefe bağlı olarak PDMS dışında başka elastomerler (tetrafloroetilen-propilen [32], stirenik blok kopolimerler [33] gibi) cam, SU-8 gibi negatif fotorezistler, çeşitli termoplastikler sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar arasında en bilinenlerden biri PMMA'dır ve ticari olarak pleksi ismiyle tanınır. Optik olarak şeffaf ve elektriksel olarak yalıtkan olan cam, amorf bir malzemedir ve genellikle standart fotolitografi veya ıslak/kuru aşındırma yöntemleriyle işlenir [34]. Seramik mikroakışkan platformlar; homojen yüzey kimyasına sahip, tamamen hava geçirmez bir şekilde kapatılmış olarak düşük sıcaklıklı co-firing teknolojisi kullanılarak üretilebilirler. Bu teknoloji, tüm seramik destek yapısının ve herhangi bir iletken, dirençli ve dielektrik malzemenin aynı anda bir fırında pişirildiği bir tekniktir. Seramik substratlarından çok katmanlı devrelerin üretimini sağlar. Esasen kapasitörler, indüktörler, dirençler, transformatörler ve hibrit devreler üretilmesinde kullanılan bu yöntem, mikro-elektromekanik sistemlerin (MEMS) elektronik bileşenlerinin sağlam montajı için de uygundur. Seramik mikroakışkan sistemlerde genellikle düşük sıcaklıkta pişirilmiş seramikler kullanılır. Alüminyum oksit bazlı malzemeler örnek olarak gösterilebilir [35]. Termosetler, yüksek oranda çapraz bağlı polimerik yapılarından dolayı mukavemetleri yüksektir ve ısıtıldıklarında sertleşirler. Optik olarak şeffaf ve ucuz olmalarına rağmen gaz geçirgen değildirler, bu da onları uzun süreli hücre kültürleri için yetersiz materyaller yapar.



Şekil 3. Temel fotolitografi ve çip üretim süreçleri. A) Negatif (i) ve pozitif (ii) fotorezistlerde desen oluşturma prensibi ve B) Fotolitografi ve PDMS kalıplama tekniği kullanılarak mikroakışkan çip üretimi. (Basic photolithography and chip manufacturing processes. A) Principle of pattern formation on negative (i) and positive (ii) photoresists, and B) Microfluidic chip fabrication using photolithography and PDMS molding technique.)

Çizelge 1. Mikroakışkan cihaz üretimi için kullanılan malzemelere genel bakış [34]'den uyarlanarak. (Overview of materials used for microfluidic device fabrication, adapted from [34].)

Özellik	Silisyum/Cam	Seramik	Elastomer	Termoset	Termoplastik	Hidrojel	Kağıt
Young modülü	130-180/50-90	~120	~0.0005	2.0-2.7	1.4-4.1	Düşük	0.0003-0.0025
Yaygın mikrofabrikasyon	Fotolitografi	Düşük sıcaklıklı co-firing	Kalıplama	Kalıplama, fotopolimerizasyon	Termo-kalıplama	Kalıplama, fotopolimerizasyon	Fotolitografi, baskı
En küçük kanal	<100 nm	~100 µm	<1µm	<100 nm	~100 nm	~10 µm	~200 µm
Kanal profili	Sınırlı 3B	3B	3B	3B	3B	3B	2B
Çok katmanlı kanallar	Zor	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Orta	Kolay
Termo-stabilite	Çok yüksek	Çok yüksek	Orta	Yüksek	Orta-Yüksek	Düşük	Orta
Yükseltgen direnci	Harika	Mükemmel	Orta	İyi	Orta-İyi	Düşük	Düşük
Çözücü uyumluluğu	Çok yüksek	Çok yüksek	Düşük	Yüksek	Orta-Yüksek	Düşük	Orta
Hidrofobiklik	Hidrofilik	Hidrofilik	Hidrofobik	Hidrofobik	Hidrofobik	Hidrofilik	Amfilik
Yüzey yükü	Çok stabil	Çok stabil	Stabil değil	Stabil	Stabil	-	-
Oksijen geçirgenliği	<0.01	<0.01	~500	0.03-1	0.05-5	>1	>1
Optik transparanlık	Hayır/Yüksek	Hayır	Yüksek	Yüksek	Orta-Yüksek	Düşük-Orta	Düşük

PDMS tabanlı mikroakışkan sistemler, kolay imalat, düşük maliyet, optik şeffaflık ve yüksek gaz geçirgenliği gibi avantajlar sağladıkları için biyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [36]. PDMS tabakanın da dahil olduğu bileşenler, tam bir sistem oluşturmak üzere tersinir ya da kalıcı şekilde monte edilmelidir. Bir PDMS bileşeninin başka bir PDMS bileşeni veya bir cam alt tabaka ile tersinir olarak birleştirilmesi klipsler ile sıkıştırılarak sağlandığında ileri gelen sızdırmazlık yeteneği, iki düz yüzey arasındaki van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanır. Bu kuvvetler genellikle yüksek basınçlara dayanıklı değildir. Ayrıca dengesiz bir sıkıştırmada sızıntı riski olasıdır. Çip içerisindeki kanallarda, akışın neden olduğu yüksek basınca dayanabilmek için PDMS yüzeylerini kimyasal olarak modifiye etmek kalıcı bir montaj sağlar. Bu montaj genellikle oksijen (O₂) plazma uygulaması ile sağlanır. O₂ plazma işlemiyle, PDMS yüzeyindeki silan (Si-CH₃) grupları, başka bir yüzeydeki hidroksil, karboksilik asit, keton gibi uygun gruplarla yoğunlaşabilen ve 30-50 psi basınca dayanabilen, silanol (Si-OH) gruplarına dönüşür [36]. O₂ plazma yöntemi, temiz bir odada plazma jeneratörü veya reaktif iyon aşındırıcı gerektirmesi nedeniyle birçok araştırmacı alternatif arayışlarına gitmektedir. Bu alternatiflerden biri olan mikro-transfer montaj yönteminde hiç sızıntı olmadığı gösterilmiştir [37]. Ayrıca dönele kaplama cihazı dışında özel bir ekipman gereksinimi olmadığından ve toz gibi kirleticilerden etkilenmediğinden temiz oda ihtiyacı da yoktur. O₂ plazma yönteminde zaman zaman PDMS yüzey pürüzlülüğünden kaynaklı sızıntılar olabilmektedir. Tasarlanan çipin, sistemin dış ekipmanları ile de bağlantılı olması gerekir. Bunun için ticari olarak temin

edilebilen konektörler ve epoksi yapıştırıcılar kullanılmakta olup çeşitli sınırlılıkları bulunmaktadır [38]. Cihazlara kalıcı şekilde bağlanabilen polimer ara bağlanatılar da mevcuttur ancak genellikle otoklav gibi sterilizasyon koşullarına dayanamadıklarından biyolojik uygulamalarda kullanımları çoğunlukla uygun değildir.

Son yıllarda giderek yaygınlaşan bir diğer üretim tekniği ise 3B yazıcılarıdır. Hızlı prototipleme imkânı ve nispeten basit prosedürü sayesinde zaman alıcı, daha fazla uzmanlık ve pahalı ekipman gerektiren diğer yöntemlere kıyasla mikroakışkan cihazların imalatı için özellikle ilgi çekicidir [39]. Bu noktada ise günümüzde kullanılan 3B yazıcıların halen yeterince iyi çözünürlükte baskı yapamamaları sorunu akla gelmektedir. Bu sorunu aşabilen 3B-yazıcılar geliştirildikçe mikroakışkan sistemlerin üretiminde kullanımları artacaktır. Bu süreçte özellikle 3B baskı için kullanılacak malzemelerin seçimi ve çipin tasarımı önemlidir.

2.2. Mikroakışkan Sistemlerin Kullanım Alanları (Usage Areas of Microfluidic Systems)

Son yıllarda mikroakışkan sistemler, düşük maliyetli teşhis cihazları geliştirmek için yoğun olarak çalışılan bir alandır. Point-of-care (PoC) ya da hasta yanı testleri olarak da bilinen sistemler daha hızlı, uygulaması kolay ve düşük maliyetlidir. Bu tür hızlı test sistemleri özellikle kaynak ve uzman yetersizliği olan bölgeler ve gelişmekte olan ülkeler için oldukça faydalıdır. Örneğin, esasen lateral akış teknolojilerinden faydalanılan kâğıt-tabanlı mikroakışkan sistemler, PoC testlerinin karmaşık işlemlere ve harici ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan gerçekleştirilmesine izin verir. Bu sayede Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün ASSURED kriterleri (Şekil 4) de



Şekil 4. Tanı testleri için WHO tarafından belirlenen kriterler. (The criteria set by the WHO for diagnostic tests.)

karşılanabilir [40]. Günümüzde herkesçe bilinen; gebelik testleri, glukometreler ve hatta koronavirüse karşı geliştirilmiş antikorların varlığını tespit eden hızlı test kitleri akışkan sistemlerin kullanıldığı örneklerden bazılarıdır.

Genellikle tam kan, tükürük, idrar gibi test numunelerinde (farklı hücreler ve kirleticiler içerdiğinden) kapsamlı ve doğru analizler için hızlı ve efor gerektirmeyen ayrıştırma işlemleri şarttır. Benzer bir durum hücre lizatları ve süspansiyonları için de geçerlidir. Örnek bileşenleri; yıkama aşamalarından geçirilir ve yerçekimi, hidrodinamik, elektrik, manyetik veya dielektroforetik kuvvetlere ya da bunların kombinasyonuna dayanan farklı mekanizmalarla ayrıştırılabilir [41-42]. Son yıllarda özellikle lateral akış kullanan tam entegre akışkan sistemler yaygınlaşmaktadır [43]. Bu sistemlerde genellikle; örnek enjeksiyonun sağlandığı kısım, yıkama bölgeleri ve deteksiyon alanları bulunur.

Lizat hazırlamadan direkt hücre süspansiyonları ile çalışıldığı durumlarda hücreler çip üzerinde parçalanabilmektedir. Parçalama işlemi geleneksel yöntemlerde olduğu gibi termal, kimyasal, mekanik veya elektriksel yolla gerçekleştirilebilir [44]. En basit parçalama yöntemlerinden biri, hücre kültürü uygulamalarında sıklıkla kullanılan litik ajanlardır [43]. Mikro-kanaldan akışı sağlanan solüsyon, hücrelerle difüzyon yoluyla etkileşir. Parçalanmış hücrelerden salınan materyal bir saptama kanalına geçer [45]. Tüm bu süreçlerin yer aldığı, düşük maliyetli, ideal bir PoC cihazının; mikroakışkan sistemler ve malzeme bilimindeki gelişmelerle yakın gelecekte gerçekleşmesi beklenmektedir [46]. Amaç; cihazın, daha önce de belirtilen ASSURED kriterlerini karşılamasıdır. Portatif ve sabit bir ana aygıtta takılan ucuz maliyetli ve tek kullanımlık uçlar ile numunenin işleme bölümüne aktarılması, reseptörler aracılığıyla ilgili parametrenin saptanması ve en sonunda sonucun bir ekrana ya da akıllı cihaza yansıtılması beklenir. Bu sonuçların elektronik bir sağlık kaydında biriktirilmesi ve hatta doktor tarafından takip edilebilmesi de PoC cihazlarının hedeflerindedir.

Hücre içeriklerinin ya da hücre dışı vücut sıvılarında yer alan metabolitlerin ayrıştırılmasının yanı sıra hücrelerin kendisi de mikro ölçekli akışkan sistemlerde ayrıştırılabilmektedir. Bu ve benzeri uygulamalar

özellikle *in vitro* tanı testlerinde ön plana çıkmaktadır. Geleneksel hücre ayırma teknikleri genellikle hücre popülasyonlarındaki boyut, şekil, yoğunluk, adezyon ve deforme olabilirlik gibi mekanik ve fiziksel özelliklerin farklılıklardan yararlanır. Manyetik özelliklere dayalı ayırma da son yıllarda popüler hale gelmiştir. Benzer fiziksel ve elektromanyetik özelliklere sahip hücreler arasındaki ayrımı sağlamak için en verimli yöntemlerden biri ise hücre afinitesindeki farklılıkları (yüzey biyobelirteçleri) kullanmaktır [47]. Mikroakışkan hücre ayrıştırma teknikleri basitçe aktif ve pasif olarak sınıflandırılabilir. Aktif teknikler harici bir kuvvet alanına dayanırken pasif teknikler kanal geometrisine ve doğal hidrodinamik kuvvetlere dayanır [47]. Aktif ayrıştırma teknikleri arasında; floresanla aktive, manyetik, elektroforetik, optik ve akustik ayrıştırma sayılabilir. Pasif yöntemler arasında ise; sütun ve set yapıları, sıkışmış akış fraksiyonasyonu, hidrodinamik filtrasyon, eylemsizlik kuvvetleri, biyomimetik ayrıştırma ve afinite-tabanlı ayrıştırma yer alır [48].

Son yirmi yılda, mikroakışkan cihazlar hücre ayırma [49-50], biyokimyasal analizler [51], hibridizasyon [52] ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) [53] dahil olmak üzere çeşitli biyolojik uygulamalarda muazzam bir potansiyel göstermiştir. Bu sistemler, geleneksel makro ölçekli laboratuvar tekniklerine göre birçok avantaj sunar. Geleneksel teknikler, örneğin petri kaplarında gerçekleştirilen 2B kültür sistemleri, *in vivo* hücrel mikto ortamları taklit etmede yetersizdir. Hücreler kültür kabına alındığında birçok hücrel fenotip kaybolur [54]. Mikroakışkan sistemlerin hücrel süreçlere uygunluğu, hücrelerin incelenmesine dair yeni bakış açıları kazandırır. Özellikle kısıtlı numune ile çalışılması gereken durumlarda, örneğin tek hücre analizi gibi uygulamalarda [55-58], çip sistemlerinin avantajları aşikardır. Mikroakışkan sistemlerin organ-on-chip (OoC) yani çip-üstü-organ uygulamaları, tek bir organın veya birden fazla organın en küçük işlevsel birimlerinin üretilip çalıştırılmasına dahi izin verir [59]. Bu tür cihazlar, kaplarda kültürlenen hücrelere kıyasla daha uygun bir *in vitro* model sunar. Hatta 2B kültür yöntemleriyle taklit edemeyeceğimiz modelleri oluşturmak da mümkün olur [60-61]. Doğal doku ve organlarda mikroçevreler; hücre ve ECM bileşenleri, çözünür faktörler, sıvı akışı ve mekanik stres gibi parametreler açısından 3B, heterojen,

anizotropik ve dinamiktir [62]. Bu nedenle, hücrenel mikroçevreleri *in vitro* koşullarda olabildiğince taklit etmek hem biyolojik sistemlerin daha iyi anlaşılmasını hem de doku mühendisliği uygulamalarının başarısını artırmayı sağlar.

Mikroakışkan bir cihazda hücre kültürünün ilk adımı hücrelerin uygun şekilde ekilmesidir. Çoğu mikroakışkan cihaz, bir pipet ile doğrudan hücre ekimine izin verecek şekilde tasarlanır. Ekim sırasında ortaya çıkan problemlerden biri hava kabarcığı oluşmasıdır. Genellikle çip üretiminde kullanılan PDMS ve diğer bazı polimerlerin hidrofobitesinden ileri gelen hava kabarcığı oluşumu, kanalların tıkanmasına ve hücre kaybına yol açar. Önerilen bazı çözümler; kabarcık kapapları, hidrofilik kaplamalar ve aktif kontrol edilen kabarcık giderme sistemleridir ancak bu çözümler karmaşık ve maliyetli olduğundan en etkin çözüm hücre ekimi sırasında mümkün olduğunca titiz davranmaktır [63].

Hücrelerin tekrarlanabilir şekilde istenilen konumlara yönlendirmesi önemli bir husustur ve bu amaçla kullanılan çeşitli çip üstü immobilizasyon ve hücre yakalama teknikleri mevcuttur. Tek hücre bazında uygulanabilen teknikleri arasında; hidrodinamik akış ve odaklanma, çip üstü valfler ve pompalar, mikroakışkan damlacıklara enkapsülasyon, optik ve optoelektronik yakalama, dielektroforetik yakalama ve geometrik yakalama bulunur [22]. Çeşitli çalışmalar mikroakışkan sistemlerde hücre yoğunluğunun son derece yüksek (1×10^8 hücre/ml) ya da tek bir hücreye kadar düşen seviyelerde olabileceğini göstermektedir [64]. Burada önemli bir zorluk, yoğunluğun kuyularda istenilen şekilde ayarlanmasıdır. Bunun için hücre yükleme bölmesi ile kuyular arası mesafeyi en aza indirmek, çökelmeyi azaltmak amacıyla kollajen gibi viskoz bir taşıyıcı kullanmak ve hücre haznesini döndürmek gibi yaklaşımlar kullanılır [65].

Birkaç hücre tipi doğal fenotiplerinde tek tabakaya benzer (epitel gibi) veya süspanse (kan hücreleri gibi) olmasına rağmen, çoğu hücre *in vivo*'da 3B ortamda bulunur. Birçok mikroakışkan kültür sistemi, hücreleri 2B kültürlemek için tasarlanmıştır; ancak, son zamanlarda mikroakışkan cihazlarda hücrelerin doğal fenotipini 3B ortamlarda taklit etmek için çalışmalar yapılmaktadır [62]. 3B ECM ve hidrojel sistemleri, mikroakışkan sistemlerinde bu amaç için, örneğin damlacık metodu kullanılarak uygulanmaktadır [66]. Bu yöntemde hücreler çeşitli hidrojel yapıları içerisine mikroakışkan platform tarafından kontrollü şekilde yüklenir [67]. Bu metot ile yalnızca hücrelerin değil; tek bir sferoidin bir damlacık içerisine yüklenebildiği sistemler de geliştirmek mümkündür [68].

Mikroakışkan sistemlere hidrojellerin dahil edilmesi ile çözünür faktör gradyanlarının kontrolü [69] veya ayrık doku yapıları arasında dinamik etkileşim kurulabilecek bir arayüz ortamı sağlanması mümkündür. Hidrojellerin birden fazla ECM fazı oluşturmaları için mikroakışkan kanal yapıları tasarlanmaktadır. Örneğin; kök hücrelerin

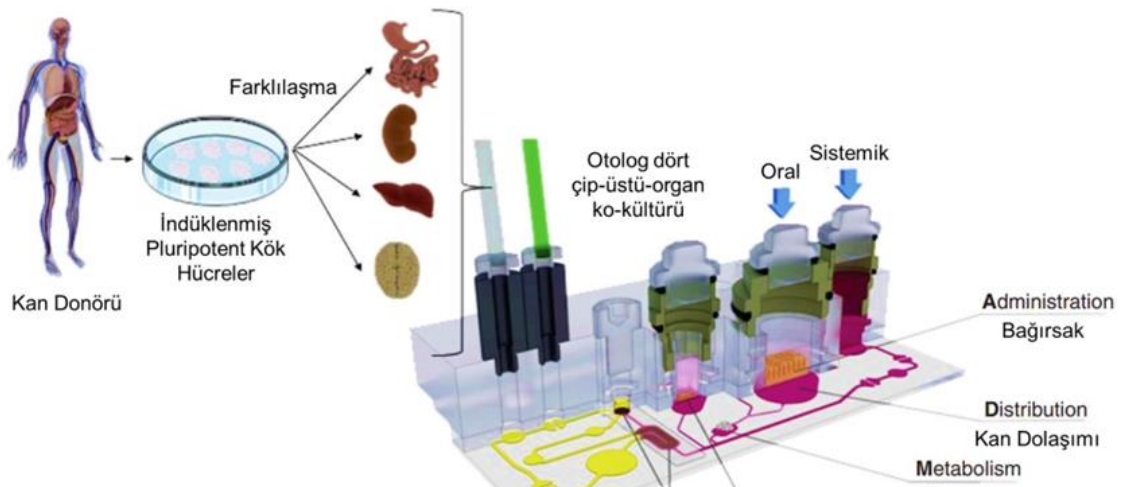
aynı jel içerisinde farklı hücre tiplerine dönüştürüldüğü arayüz yaklaşımlarında, mikroakışkan sistemler aracılı kontrollü kimyasal gradyanlardan faydalanılır [70].

Mikroakışkan sistemler aracılığıyla jel öncü çözeltilerinin iletimi, 3B doku iskelelerinin bileşimini ve yapısını hassas bir şekilde kontrol etmeyi sağlar. *In situ* jelleştirerek elde edilen hidrojel iskelesi, mikroakışkan sistemdeki kuyuların yapısı ile mikro-desenlenebilir. Bu yöntem ile birden fazla öncü çözeltili ile kompozit yapı iskeleleri de oluşturulabilir. Kompozitler, birbirinden farklı özelliklere sahip birden fazla bileşenin makro düzeyde bir araya gelmesiyle oluşan karmaşık yapılar olup bir malzemenin eksik yanını bir başka malzemenin güçlü özelliği ile kompanse edebilmeyi sağlar [71]. Yapı iskelelerinin oluşturulması amacıyla yaygın olarak kullanılan liyofilizasyon gibi teknikler ortalama gözenek boyutunu kontrol edebilir ancak çoğu zaman yeterince hassas olmayan gözenek dağılımına neden olabilir [72]. Jelasyonun yanı sıra benzer bir yöntem ile öncü çözeltilerden mikrosfer yapılar oluşturmak amacıyla *in situ* karıştırılmalar ve mikrosferlerin ilaç ya da büyüme faktörü gibi moleküllerle yüklenebilmeleri de mümkündür [73-74].

Mikroakışkan sistemlerinden faydalanabileceğimiz bir başka önemli hücrenel davranış olan hareket; çevresel faktörler, sinyal iletimi ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi süreçlerin birlikte uyumlu çalışmasından kaynaklanır. Yapışık bir hücrenin göçü; hücrenin morfolojik polarizasyonunu, hücre zarının uzanmasını, ileri yönde hücre-substrat yapışmalarının oluşumunu, kasılma kuvveti yoluyla hücre gövdesinin yer değiştirmesini ve geri yönde hücre-substrat yapışmalarının ayrılmasını kapsar [75]. Yönlendirilmiş hücre hareketliliği, organizmaların gelişimi ve sürdürülmesi için gereklidir. Hücre hareketliliğindeki herhangi bir anormalliğin zihinsel gerilik, vasküler hastalıklar, tümör oluşumu ve metastaz gibi ciddi patofizyolojik sonuçlara yol açtığı bilinmektedir [76]. Bu nedenle, hücre hareketliliğinin daha iyi kontrolü ve anlaşılması bu gibi durumlar için yeni tedavi stratejilerin geliştirilmesinde rol oynayabilir. Yara iyileşme sürecinde fibroblast ve epitel hücrelerinin yara bölgesine göçünde olduğu gibi kemotaktik hareketler kontrol edilirse iyileşme süreci desteklenebilir. Bu yöndeki ihtiyaçları karşılamak ve hücre hareketliliğini aktif ya da pasif olarak kontrol etmek amacıyla MEMS teknolojisini kullanan bazı yöntemler geliştirilmiştir. Örneğin "Roma platformu" adını alan yöntemde araştırmacılar morfolojik polarite ile mikro-desenlenmiş bir ortamda hücrelerin mekano-sensörlerinden faydalanarak hareket kontrolü sağlamışlardır [77]. Gradyan üreten mikroakışkan cihazlar da çeşitli çalışmalarda göç, proliferasyon, farklılaşma gibi hücre davranışlarının gerçek zamanlı izlenmesinde kullanılmıştır [78].

Çip sistemlerindeki en önemli yaklaşımlardan biri özellikle ilaç ve kozmetik sektörlerini ilgilendirmektedir. Bir ilacın ya da etken maddenin bir doku üzerindeki tedavi edici ya da toksik etkisi genellikle başka bir dokunun (örneğin; karaciğer, böbrek) metabolik

aktivitesine de bağlı olduğundan, *in vivo* düzeyde meydana gelen karmaşık farmakolojik ve farmakokinetik etkileşimlerin *in vitro* uygulamalar ile yeterince anlaşılabilmesi toksikolojide önemli bir sorundur [22]. Biyofarmasötikler için her ne kadar hücre bazlı testler yararlı ön veriler sağlasa da etkileri doğrulamak için halen hayvan testlerine gereksinim duyulmakta fakat klinik aşamaya gelindiğinde sonuçların insanda görülecek toksisiteyi bire bir tahmin edemediği görülmektedir [79]. Klinik deneylerdeki başarısızlıkların büyük bir çoğunluğunun karaciğer toksisitesinden kaynaklandığı ve bunun önemli bir zaman ve kaynak israfına yol açtığı düşünülmektedir [80]. Bu noktada LoC ve OoC sistemleri *in vivo* ve kliniğe daha yakın sonuçlar vermektedir [81]. Bu sistemler sayesinde hem hayvan deneylerine olan gereksinim azalmakta hem de özellikle kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının ivme kazanabileceği öngörülmektedir [82]. Doku veya organ düzeyindeki özellikleri taklit edebilen minimal işlevsel organ yapıları, *in vivo*'ya en yakın koşulların sağlanabilmesi için oluşturulmaktadır. Özellikle çip üzerinde karaciğer çalışmaları oldukça yaygındır [83]. En basit örneklerden biri, bir doku türünün işlevlerini sergileyen yalnızca bir tür hücreyi içeren perfüze edilmiş bir mikroakışkan sistemdir [84-85]. Örneğin indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (iPKH) elde edilen hepatositlerin karaciğer fonksiyonlarını devam ettirebildikleri; salgıladıkları albümin, CYP3A4, kolesterol ve üre düzeylerinden tespit edilebilmiştir [86]. Bu tür bir model kişiye özel tedaviler geliştirmek amacıyla hastanın kendi hücreleri kullanılarak da yapılabilir (Şekil 5). Ancak bu nispeten basit sayılabilecek sistem, çoğu zaman *in vivo*'yu taklit etmek için yetersizdir. Bu nedenle çip sistemlerine mikroçevreye daha çok benzeyecek şekilde farklı hücre türleri, ECM'yi taklit edecek yapılar, çeşitli sinyal molekülleri ve gerekli dış uyaranlar eklenmektedir [87-89].



Şekil 5. Hastadan elde edilen iPKH'lerin çeşitli hücre tiplerine farklılaştırılarak aynı çip platformu üzerinde birlikte kültürlenmesi, [59]'dan değiştirilerek. (Co-culture of patient-derived iPSCs on the same chip platform by differentiation them into various cell types, adapted from [59].)

2.3. Mikroakışkan Sistemlerin Güçlü ve Zayıf Yönleri (Strengths and Weaknesses of Microfluidic Systems)

Yaşam bilimleri çalışmalarında mikro ölçekli çip sistemlerinin pek çok avantajı olduğu gibi bazı zayıf yönleri de mevcuttur (Şekil 6). Her geçen gün araştırmacılar, bu zayıf yönleri iyileştirebilecek yeni yöntem ve teknolojiler geliştirmektedir. Çip üzerinde hücre kültürlerinin hassas kontrolü, hücrelerin sağlığı açısından önemlidir. Besin ortamı genellikle bir akış aracılığıyla sağlanır. Özellikle hücre duvarlarının olmayışı ve nispeten büyük boyutları birçok memeli hücresini kayma gerilmesine daha duyarlı hale getirir [90]. Bu gibi hücrelerin kullanıldığı mikroakışkan sistemlerde hücreler ortamdaki yeterli besini alırken aynı zamanda akıştan gerektiği ölçüde korunmalıdır. Bunun için difüzyon yoluyla yeterli besin iletimini sağlamak adına esas akış kanalı birkaç mikronluk çok sayıda paralel mikro-kanal ile hücrelerin bulunduğu kuyulara köprülendirilebilir [91]. Hücrelerin akış etkisinden korunmaları için hidrojellere enkapsülasyonları ya da hidrojellerin akış ile hücreler arasında arayüz görevi gördüğü modeller de mümkündür ancak bu durumda da difüzyon miktarı azalabilmektedir [65].

Çip sistemlerinde besiyeri iletimi (TissUse çiplerinde olduğu gibi) genellikle hassas bir şekilde kontrol edilen ve uygun hacimlerde akış sağlayabilen programlanmış pnömatik pompalar ile sürekli veya periyodik bir şekilde yapılabilmektedir [59]. Bunun yanı sıra tamamen yerçekiminin etkisi ile akış ve besiyeri iletimi sağlayan sistemler de mevcuttur (OrganoPlate, Mimetas) [92].

Farklı tip hücreleri çiplerin farklı kuyularında kültürlerken bölmeler arasında çapraz kontaminasyon olmaması gerekir. Bu nedenle, kullanılan hücre tipi ve gerekli parametreler arttıkça kanal ağı daha karmaşık tasarlanmalıdır. Akışın kesişen kanalların altından ya da üstünden geçmek için dikey hareket edebildiği tasarımlar kullanılabilir [93]. Bu yolla kanallar, düzlemsel yerleşim ile sınırlandırılmaksızın farklı kültür kuyularına yönlendirilebilir. Çip üzerine pnömatik valflerin

eklenmesi de daha kompleks sıvı manipülasyonlarını mümkün kılar.

Hücre kültürü için önemli gereksinimlerden biri O₂ ve karbondioksit (CO₂) dengesinin korunmasıdır. Farklı hücre türleri, optimum büyümeleri ve fenotiplerini koruyabilmeleri için farklı gaz konsantrasyonlarına ihtiyaç duyar. Örneğin, insan embriyonik kök hücreleri (iEKH), pluripotensilerini korumak için düşük O₂ seviyeli (<%5) bir ortama ihtiyaç duyarken diğer memeli hücreleri tipik olarak %21 normoksik koşullarda kültürlenir [94]. Kültür için uygun kabul edilen O₂ konsantrasyonu aralığındaki değişimler hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri ve farklılaşma davranışlarını etkileyebilmektedir. Hali hazırda farklı mezenkimal kök hücre (MKH) türleri, *in vivo* ortamda laboratuvar koşullarında maruz kaldıklarından çok farklı O₂ seviyelerinde bulunurlar [95]. PDMS tabanlı mikroakışkan platformlarının bir avantajı, PDMS'in yüksek gaz geçirgenliğine sahip olmasıdır (D = 4,1 x 10⁻⁵ cm²/s) [96]. PDMS'in bu geçirgenliği nedeniyle O₂'in inkübasyon ortamından hücrelere pasif difüzyonunun yeterli olduğu varsayılır. Bununla birlikte, cihazı birleştirirken sıklıkla kullanılan 5 dakikaya kadar plazma oksidasyonu da dahil çeşitli yüzey modifikasyonları gaz geçirgenliği önemli ölçüde azaltabilmektedir [97]. Tıpkı O₂ ve CO₂ düzeylerinde olduğu gibi sıcaklık seviyelerinin de kontrolü, çipin inkübatörde muhafaza edilmesi ile sağlanır. Bu durum, geleneksel yöntemlerde olduğu gibi ortam neminin de dengeli olmasını, aynı zamanda kontaminasyonun minimuma indirgenmesini sağlar. Gerekli durumlarda, özellikle sıcaklık gradyanı sağlanmak istendiğinde çiplere ısıtıcı üniteler ve soğuk akış kanalları da dahil edilebilmektedir [64].

2B konvansiyonel hücre kültürü sistemleri biyolojik ve tıbbi çalışmalar için çok önemli araçlar olsa da kullanılan yöntemler şaşırtıcı biçimde neredeyse 100 yıldır pek değişmemiş ve artık araştırmacılar bu kültür koşullarının *in vivo*'yu yansıtmada yetersiz olduğunu tartışmaya başlamıştır [98]. Çalışmaların çoğu, besin kaynağı, pH ve sıcaklık gibi kültür koşullarında makro ölçekli kontrol sağlanan plakalarda yürütülmektedir. Bu sistemler, hücre davranışının ayrıntılı şekilde anlaşılmasını yeterince sağlayamaz. Mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinde ise hücre yoğunluğu ile ortam hacmi oranı (*in vivo*'ya benzer şekilde) genellikle birden fazladır ve bu da daha fazla hücre-hücre etkileşimi sağlar. Bu durumda, mikroakışkan sistem içerisinde metabolitlerin makroskopik kültüre göre 50 kat hızlı tükeneceği ve atıkların 50 kat hızlı birikeceği varsayılır. Özet olarak, makroskopik kültürdeki 2-4 günlük zaman aralığı mikro sistemde 1-2 saatlik sürece denk gelir [99].

Makro ve mikro ölçekli hücre kültürü modelleri arasındaki önemli farklardan biri yüzey alanı/hacim oranıdır. Mikroakışkan sistemlerde yüzey alanı/hacim oranı çok daha fazladır. Gazların hem hücrelere hem de hücrelerden difüzyon yoluyla etkin taşınmasını sağladığından daha yüksek yüzey alanı/hacim oranının avantajlı olduğu varsayılır [100]. Bunun aksine, fare fibroblast hücrelerinin PDMS mikrokanaallarda 4 kat daha

düşük yüzey alanı/hacme sahip polistiren (PS) ve PDMS makro kültürlerine göre proliferasyonlarının azaldığı görülmüştür [101]. Bu oran arttıkça çoğalma ve metabolizma gibi temel işlevlerde değişiklikler meydana gelmektedir [99]. Hücre ve yüzey arasındaki etkileşimlerin hassas kontrolü hem biyokimyasal hem de fiziksel farklı uyaranların hücre davranışı üzerindeki etkisini incelemek için etkili bir platform sağlamaktadır.

Mikroakışkan cihazda sürekli perfüzyon yapıldığında biyomoleküllerin devamlı ortamdan yıkanmasından dolayı hücreler arası iletişim kısıtlanabilir. Bu durumun önüne geçebilmek için genellikle bir devridaim sistemi kullanılır. Bunun yanı sıra, bir hücrenin şartlandırılmış besiyeri başka bir hücreye yönlendirilerek ve ortak kültür sistemleri oluşturularak hücreler arası etkileşim sağlanabilir. Wang ve arkadaşları tasarladıkları mikroakışkan ortak kültür platformunda, nöral hücreler ile etkileşen MKH'lerin geleneksel transwell ortak kültür sistemine göre nöron benzeri hücrelere daha yüksek nöronal gen ekspresyonu (beta III tübülün: %67; glial fibril asidik protein (GFAP): %86,2 / beta III tübülün: %59,8; GFAP: %52,0) sergileyerek farklılaştıklarını görmüşlerdir [102].

PDMS yaygın bir materyal olmasına rağmen mikro ölçekli hücre çalışmaları için; deformasyon, buharlaşma, absorpsiyon, çapraz bağlanmamış oligomerlerin sızıntısı ve hidrofobik geri kazanım gibi bazı olumsuz özelliklere de sahiptir. PDMS ve PS'nin karşılaştırıldığı kritik bir derlemede bu özelliklerin detaylarından bahsedilmiştir [103]. PDMS'in biyolojik olarak parçalanamıyor olması, ilerleyen süreçlerde implantasyon için uygun olmadığını gösterir. Mikroakışkan sistemlerde kullanımı halen PDMS kadar yaygın olmamakla beraber, biyolojik olarak parçalanabilen, muazzam özelliklere sahip alternatiflerden biri poligliserol sebasat (PGS)'tır [104]. Biyouyumlu bir elastomer olan PGS, biyolojik olarak parçalanabilir ve sentez, kütleme veya cihaz yapıdırma işlemleri sırasında sert kimyasal gerektirmez. PDMS'e benzer şekilde desenlenir ve mikroakışkan cihazlar oluşturmak için kullanılır [105-107].

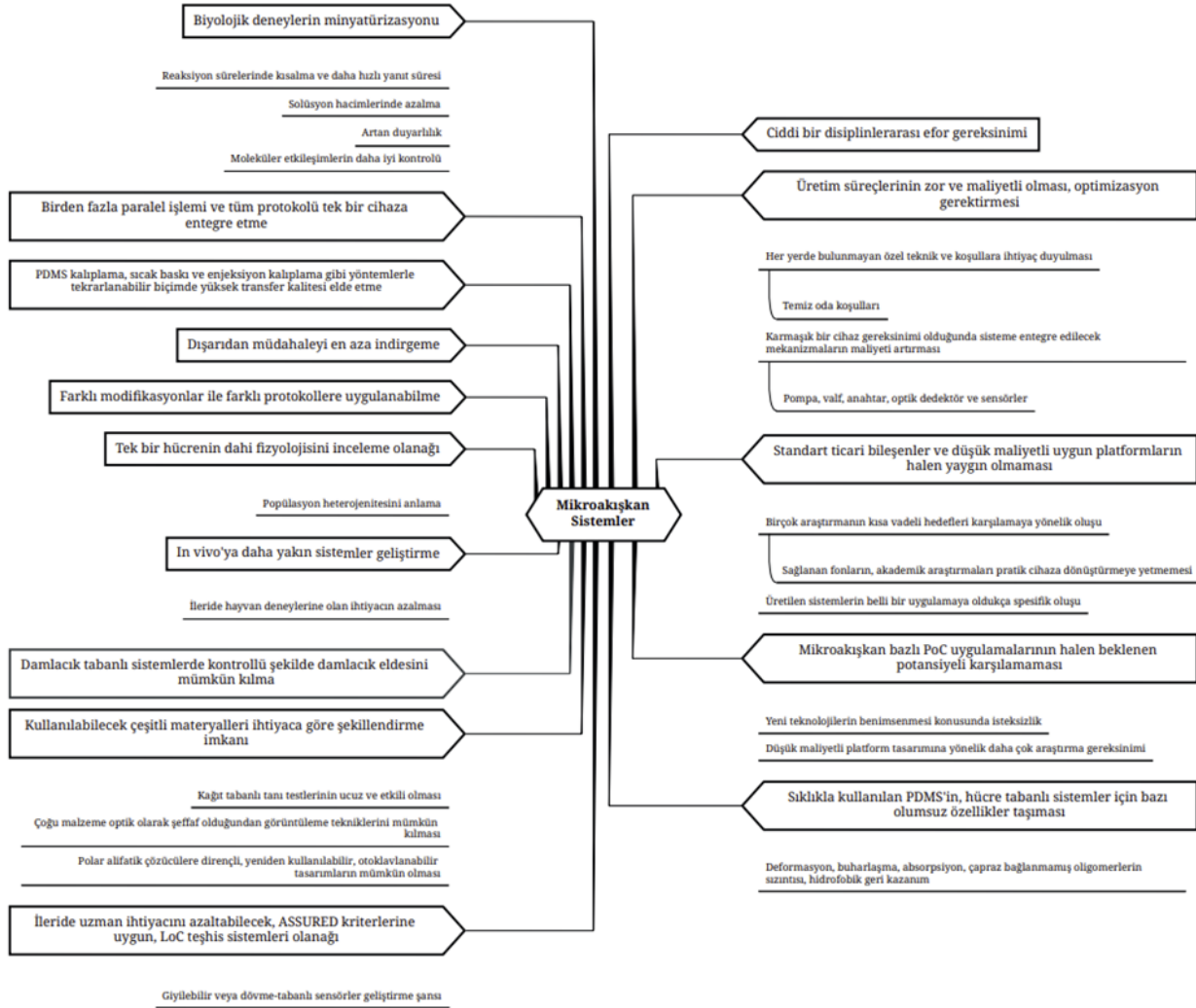
Mikroakışkan hücre kültürü sistemlerinin en güçlü yönlerinden biri, daha iyi mikroçevresel kontrol sağlarken ortam değişimi ve hücre pasajlama gibi geleneksel hücre kültürü ile benzer işlemleri hala mümkün kılmasıdır. Perfüzyon yeteneği, cihazların şeffaflığı, küçük hacimlerin yeterliliği, reaksiyon hızları ve yüksek verim bu sistemleri çekici kılar. Perfüzyon, reaktiflerin infüzyonuna izin verirken şeffaflık, hücresel yanıtların görüntülenmesini ve analizini sağlar. Hücre kültüründe cihazlar bir dolaşım sistemi görevi görerek besinlerin, gazların ve metabolitlerin hücrelere transferini artırır, sinyal moleküllerinin iletimini kontrol eder ve hücrelerin atıklarının uzaklaşmasına da katkı sağlar. Son yıllarda yaşam bilimleri ve mühendislik alanlarında deneysel platformların boyutunda sürekli bir azalma ile tezgâh-üstü dediğimiz deneysel sistemlerden LoC sistemlerine geçilmektedir. Bu geçişe, hızlı ve hassas numune işlenmesi için robotik cihazlar aracılığıyla otomasyon da eşlik etmektedir. Önceden

yüzlerce mikrolitre pahalı numuneleri kullanarak manuel olarak yaptığımız deneyleri, bugün örnek hacminde azalma sağlayan mikroakışkan cihazları kullanarak deneyi nanolitre ölçeğine indirgeyen robotik bir düzeneğe yaptırabilmemiz mümkündür. Tüm bunlar düşünüldüğünde imalat ve optimizasyon süreçlerindeki zorluklar göze alınabilir.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA (CONCLUSION AND DISCUSSION)

İncelenen pek çok çalışma doğrultusunda ortaya çıkan sonuç, mikroakışkan çip sistemlerinin neredeyse her

sistemlerine uygulamak mümkündür. Bu sistemler gerek ucuz maliyetli hasta yanı testleri gerek standart laboratuvar süreçlerinin minyatürizasyonu gerekse ilaç toksisite çalışmalarının iyileştirilmesi için kullanılmaktadır. İlaç geliştirmenin prelinik aşamasında hepatotoksik bileşiklerin tanımlanması oldukça önemlidir. Son zamanlarda kullanılan 2B *in vitro* modeller ile *in vivo* hayvan çalışmaları klinik hepatotoksisiteyi tahmin etmede çoğu zaman başarısız kalmaktadır. Klinik öncesi testlerde hayvan modellerinin kullanılması gerekli olmakla birlikte, hayvan çalışmaları ile insan toksisitesi arasındaki bulgularının uyumu %55



Şekil 6. Mikro ölçekli çip sistemlerinin avantajları (solda) ve dezavantajları (sağda). (Advantages (on the left) and disadvantages (on the right) of microscale chip systems.)

türlü çalışmaya uyarlanabileceği ve oldukça iyi sonuçlar elde edilebileceğidir. Bu sistemlere dahil edilen hidrojel veya hüresizleştirilmiş doku matrisleri ECM'yi taklit ederek hürelere mekaniksel ve kimyasal olarak uygun ortam sağlar. Son yıllarda rejeneratif tıpta oldukça önem arz eden kök hücreler ve kök hücrelerden farklılaştırılmış hücre tipleri, çip sistemlerinde sıklıkla çalışılmakta ve 2B hücre kültürlerine göre daha iyi sonuçlar vermektedir. Geleneksel kültür sistemlerinde uygulanan süreçlerin tamamını ve hatta daha fazlasını çip

seviyelerindedir [108]. Tüm bunlar OoC ve çip-üstü-insan (human-on-chip; HoC) yaklaşımlarını ilgi çekici kılmaktadır.

Çip sistemleri her ne kadar umut vaat eden sonuçlar verse de bu sistemlerin üretimi sırasında ihtiyaç duyulan disiplinler arası yaklaşım ve zorlu optimizasyon süreçleri birçok araştırmacıyı halen bu alana karşı çekinceli kılmaktadır. Üretim için standart ticari bileşenlerin yeterli olmaması ve bazı önemli imalat tekniklerinin temiz oda gibi pahalı koşullar ve her yerde bulunmayan

araçlar gerektirmesi mikroakışkan çip üretimindeki temel zorluklardandır. Bu zorlukların aşılması için her geçen gün farklı yaklaşımlar geliştirilmekte ve yaşam bilimlerinde mikroakışkan sistemler giderek önem kazanmaktadır.

4. SİMGELER VE KISALTMALAR (SYMBOLS AND ABBREVIATIONS)

μTAS : Mikro toplam analiz sistemleri
 2B : 2 boyutlu
 3B : 3 boyutlu
 ECM : Hücre dışı matris
 GFAP : Glial fibril asidik protein
 iEKH : İnsan embriyonik kök hücreleri
 iPKH : İndüklenmiş pluripotent kök hücre
 LoC : Lab-on-Chip
 MKH : Mezenkimal kök hücre
 OoC : Organ-on-Chip
 PDMS : Polidimetilsiloksan
 PGS : Poligliserol sebasat
 PMMA : Polimetilmetakrilat
 PoC : Point-of-care
 PS : Polistiren
 PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu
 WHO : Dünya Sağlık Örgütü

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Gülşah Torkay, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı (Başvuru No:1649B022101483) mali desteğine teşekkür eder.

ETİK STANDARTLARIN BEYANI (DECLARATION OF ETHICAL STANDARDS)

Bu makalenin yazar(lar)ı çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler.

YAZARLARIN KATKILARI (AUTHORS' CONTRIBUTIONS)

Gülşah TORKAY: Makalenin orijinal halinin yazımı, Görselleştirme / Writing the manuscript, Visualization

Ayça BAL ÖZTÜRK: Makalenin düzeltilmesi ve yayıma hazırlanması, Denetleme / Correction and preparation for publication, Supervision

ÇIKAR ÇATIŞMASI (CONFLICT OF INTEREST)

Bu çalışmada herhangi bir çıkar çatışması yoktur. / There is no conflict of interest in this study.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Terry S.C., Jerman J.H. and Angell J.B., "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer." *IEEE transactions on electron devices*, 26.12, (1979).
- [2] Buhlmann C., Preckel T., Chan S., Luedke G. and Valer, M., "A new tool for routine testing of cellular protein expression: integration of cell staining and analysis of protein expression on a microfluidic chip-based system", *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 14.2:119, (2003).
- [3] Shen S., Tian C., Li T., Xu J., Chen S. W., Tu Q., Wang, J. et al., "Spiral microchannel with ordered micro-obstacles for continuous and highly-efficient particle separation" *Lab on a Chip*, 17:21 3578-3591, (2017).
- [4] Yin B. F., Wan X. H., Yang M. Z., Qian C. C. and Sohan A. S. M., "Wave-shaped microfluidic chip assisted point-of-care testing for accurate and rapid diagnosis of infections" *Military Medical Research*, 9:1 1-13, (2022).
- [5] Hu B., Li J., Mou L., Liu Y., Deng J., Qian W., Jiang X. et al., "An automated and portable microfluidic chemiluminescence immunoassay for quantitative detection of biomarkers", *Lab on a Chip*, 17.13: 2225-2234, (2017).
- [6] Sista R., Hua Z., Thwar P., Sudarsan A., Srinivasan V., Eckhardt A., Pamula V., et al., "Development of a digital microfluidic platform for point of care testing", *Lab on a Chip*, 8:12 2091-2104, (2008).
- [7] Hong J. W., Chen Y., Anderson W. F. and Quake S. R. "Molecular biology on a microfluidic chip", *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18:18 S691, (2006).
- [8] Yin H., and Marshall D., "Microfluidics for single cell analysis", *Current opinion in biotechnology*, 23:1 110-119, (2012).
- [9] Zhang J., Wei X., Zeng R., Xu F. and Li X., "Stem cell culture and differentiation in microfluidic devices toward organ-on-a-chip", *Future science OA*, 3:2 FSO187, (2017).
- [10] Zhang Q., and Austin R. H., "Applications of microfluidics in stem cell biology", *BioNanoScience*, 2:4 277-286, (2012).
- [11] Giulitti S., Pellegrini M., Zorzan I., Martini P., Gagliano O., Mutarelli M., Martello G. et al., "Direct generation of human naive induced pluripotent stem cells from somatic cells in microfluidics." *Nature cell biology*, 21:2 275-286, (2019).
- [12] Zhong J. F., Chen Y., Marcus J. S., Scherer A., Quake S. R., Taylor C. R., and Weiner L. P., "A microfluidic processor for gene expression profiling of single human embryonic stem cells", *Lab on a Chip*, 8:1 68-74, (2008).
- [13] Gagliano O., Elvassore N., and Luni C., "Microfluidic technology enhances the potential of human pluripotent stem cells", *Biochemical and biophysical research communications*, 473:3 683-687, (2016).
- [14] Kamei K. I., Guo S., Takahashi H., Gschwend E., Suh C., Wang X., Tseng H. R., et al., "An integrated microfluidic culture device for quantitative analysis of human embryonic stem cells", *Lab on a Chip*, 9:4 555-563, (2009).
- [15] Hasani-Sadrabadi M. M., Hajrezaei S. P., Emami S. H., Bahlakeh G., Daneshmandi L., Dashtimoghadam E., Tayebi L., et al., "Enhanced osteogenic differentiation of

- stem cells via microfluidics synthesized nanoparticles”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11:7 1809-1819, (2015).
- [16] Cosson S. and Lutolf M. P., “Hydrogel microfluidics for the patterning of pluripotent stem cells”, *Scientific reports*, 4:1 1-6, (2014).
- [17] Saldin L. T., Cramer M. C., Velankar S. S., White L. J. and Badylak S. F., “Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function”, *Acta biomaterialia*, 49 1-15, (2017).
- [18] Miki T., Ring A. and Gerlach J., “Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions”, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17:5 557-568, (2011).
- [19] Coluccio M. L., Perozziello G., Malara N., Parrotta E., Zhang P., Gentile F., Di Fabrizio E. et al., “Microfluidic platforms for cell cultures and investigations”, *Microelectronic Engineering*, 208 14-28, (2019).
- [20] Manz A., Graber N., and Widmer H. M. “Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1:1, 244–248, (1990).
- [21] Dixit C. K., “Fundamentals of Fluidics”, *Microfluidics for biologists Fundamentals and Applications*, Springer, Berlin, Germany, (2016).
- [22] Solanki S. and Pandey C. M. “Biological Applications of Microfluidics System Microfluidics for biologists Fundamentals and Applications”, Springer, Berlin, Germany, (2016).
- [23] Amirouche F., Zhou Y. and Johnson T. “Current micropump technologies and their biomedical applications”, *Microsystem technologies*, 15:5 647-666, (2009).
- [24] Douville N. J., Zamankhan P., Tung Y. C., Li R., Vaughan B. L., Tai C. F., Takayama S. et al., “Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model”, *Lab on a Chip*, 11:4 609-619, (2011).
- [25] Park J. Y., Yoo S. J., Hwang C. M. and Lee S. H., “Simultaneous generation of chemical concentration and mechanical shear stress gradients using microfluidic osmotic flow comparable to interstitial flow”, *Lab on a Chip*, 9:15 2194-2202, (2009).
- [26] Ohtani-Kaneko R., Sato K., Tsutiya A., Nakagawa Y., Hashizume K. and Tazawa H., “Characterisation of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells under shear stress using an easy-to-use microfluidic cell culture system”, *Biomedical microdevices*, 19:4 1-10, (2017).
- [27] Fair R. B., “Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?”, *Microfluidics and Nanofluidics*, 3:3 245-281, (2007).
- [28] Dimov N., “Manufacturing Methods Overview for Rapid Prototyping” *Microfluidics for biologists Fundamentals and Applications*, Springer, Berlin, Germany, (2016).
- [29] Martinez-Duarte R. and Madou M., “SU-8 photolithography and its impact on microfluidics” *Microfluidics and Nanofluidics Handbook Fabrication, Implementation, And Applications*, CRC Press, (2010).
- [30] Tsao C. W., “Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production.” *Micromachines*, 7:12 225, (2016).
- [31] Tsao C. W., and DeVoe D. L., “Bonding of thermoplastic polymer microfluidics” *Microfluidics and nanofluidics*, 6:1 1-16, (2009).
- [32] Sano E., Mori C., Matsuoka N., Ozaki Y., Yagi K., Wada A., Torisawa Y. S. et al., “Tetrafluoroethylene-propylene elastomer for fabrication of microfluidic organs-on-chips resistant to drug absorption” *Micromachines*, 10:11 793, (2019).
- [33] Domansky K., Sliz J. D., Wen N., Hinojosa C., Thompson G., Fraser J. P., Ingber D. E. et al., “SEBS elastomers for fabrication of microfluidic devices with reduced drug absorption by injection molding and extrusion” *Microfluidics and Nanofluidics*, 21:6 1-12, (2017).
- [34] Ren K., Zhou J. and Wu H., “Materials for microfluidic chip fabrication”, *Accounts of chemical research*, 46:11 2396-2406, (2013).
- [35] Niculescu A. G., Chircov C., Bîrcă A. C. and Grumezescu A. M., “Fabrication and applications of microfluidic devices: A review”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22:4 2011, (2021).
- [36] Sia S. K. and Whitesides G. M., “Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies”, *Electrophoresis*, 24:21 3563-3576, (2003).
- [37] Yang Y., Kulangara K., Sia J., Wang L. and Leong K. W., “Engineering of a microfluidic cell culture platform embedded with nanoscale features”, *Lab on a Chip*, 11:9 1638-1646, (2011).
- [38] Yılmaz, H., Altın, Y., ve Bedeloğlu, A. "Grafen Takviyeli Epoksi Nanokompozitlerin Özelliklerinin İncelenmesi". *Politeknik Dergisi*, 24: 1719-1727, (2021)
- [39] Waldbaur A., Rapp H., Länge K. and Rapp B. E., “Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes”, *Analytical Methods*, 3:12 2681-2716, (2011).
- [40] Kosack C. S., Page A. L. and Klatser P. R., “A guide to aid the selection of diagnostic tests”, *Bulletin of the World Health Organization*, 95:9 639, (2017).
- [41] Tsutsui H. and Ho C. M., “Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems”, *Mechanics research communications*, 36:1 92-103, (2009).
- [42] Chen P., Feng X., Du W. and Liu B. F., “Microfluidic chips for cell sorting”, *Frontiers in Bioscience*, 13 2464-2483, (2008).
- [43] Chen P., Chen C., Liu Y., Du W., Feng X. and Liu B. F., “Fully integrated nucleic acid pretreatment, amplification, and detection on a paper chip for identifying EGFR mutations in lung cancer cells”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 283 472-477, (2019).
- [44] Selimović Š., Kaji H., Bae H. and Khademhosseini A., “Microfluidic systems for controlling stem cell microenvironments”, *Microfluidic Cell Culture Systems*, William Andrew Publishing (Elsevier), USA, (2019).
- [45] Schilling E. A., Kamholz A. E. and Yager P., “Cell lysis and protein extraction in a microfluidic device with detection by a fluorogenic enzyme assay”, *Analytical chemistry*, 74:8 1798-1804, (2002).

- [46] Gervais L., De Rooij N. and Delamarche E., "Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnostics", *Advanced materials*, 23:24 H151-H176, (2011).
- [47] Bhagat A.A.S., Bow H., Hou H.W. et al., "Microfluidics for cell separation", *Medical & Biological Engineering & Computing*, 48 999-1014, (2010).
- [48] Aghlmandi A., Nikshad A., Safaralizadeh R., Warkiani M. E., Aghebat-Maleki L. and Yousefi M., "Microfluidics as efficient technology for the isolation and characterization of stem cells", *EXCLI journal*, 20 426, (2021).
- [49] Wang X., Chen S., Kong M., Wang Z., Costa K. D., Li R. A. and Sun D., "Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies", *Lab on a Chip*, 11:21 3656-3662, (2011).
- [50] Okşak N. and Kuruca D. S. "Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonunda Güncel Yöntemler", *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 9-10, (2021).
- [51] Bilitewski U., Genrich M., Kadow S. and Mersal G., "Biochemical analysis with microfluidic systems", *Analytical and bioanalytical chemistry*, 377:3 556-569, (2003).
- [52] Vorwerk S., Ganter K., Cheng Y., Hoheisel J., Stähler P. F. and Beier M., "Microfluidic-based enzymatic on-chip labeling of miRNAs", *New biotechnology*, 25:2-3 142-149, (2008).
- [53] Oblath E. A., Henley W. H., Alarie J. P. and Ramsey J. M., "A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva", *Lab on a Chip*, 13:7 1325-1332, (2013).
- [54] Kashani S. Y., Moraveji M. K., Taghipoor M., Kowsari-Esfahan R., Hosseini A. A., Montazeri L., Bonakdar S. et al., "An integrated microfluidic device for stem cell differentiation based on cell-imprinted substrate designed for cartilage regeneration in a rabbit model", *Materials Science and Engineering: C*, 121 111794, (2021).
- [55] Zhong J. F., Feng Y. and Taylor C. R., "Microfluidic devices for investigating stem cell gene regulation via single-cell analysis", *Current medicinal chemistry*, 15:28 2897-2900, (2008).
- [56] Lecault V., VanInsberghe M., Sekulovic S., Knapp D. J., Wohrer S., Bowden W., Hansen C. L., et al., "High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays", *Nature methods*, 8:7 581-586, (2011).
- [57] Glotzbach J. P., Januszyk M., Vial I. N., Wong V. W., Gelbard A., Kalisky T., Gurtner G. C. et al., "An information theoretic, microfluidic-based single cell analysis permits identification of subpopulations among putatively homogeneous stem cells", *PLoS one*, 6:6 e21211, (2011).
- [58] Zhou Y., Basu S., Laue E. and Seshia A. A., "Single cell studies of mouse embryonic stem cell (mESC) differentiation by electrical impedance measurements in a microfluidic device", *Biosensors and Bioelectronics*, 81 249-258, (2016).
- [59] Ramme A. P., Koenig L., Hasenberg T., Schwenk C., Magauer C., Faust D., Dehne E. M., et al. "Autologous induced pluripotent stem cell-derived four-organ-chip", *Future science OA*, 5:8 FSO413, (2019).
- [60] Yin F., Zhu Y., Zhang M., Yu H., Chen W. and Qin J. A., "3D human placenta-on-a-chip model to probe nanoparticle exposure at the placental barrier", *Toxicology in Vitro*, 54 105-113, (2019).
- [61] Lee P. J., Hung P. J. and Lee L. P., "An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture", *Biotechnology and bioengineering*, 97:5 1340-1346, (2007).
- [62] Gillette B. M., Parsa H. and Sia S. K., "Microfluidics for Engineering 3D Tissues and Cellular Microenvironments", *Microfluidic Cell Culture Systems*, *William Andrew Publishing (Elsevier)*, USA, (2013).
- [63] Sadeghi S. and Elitaş M., "A simple, bubble-free cell loading technique for culturing mammalian cells on lab-on-a-chip devices", *Sabancı University*, (2017).
- [64] Xiao Y., Zhang B., Hsieh A., Thavandiran N., Martin C. and Radisic M., "Microfluidic Cell Culture Techniques", *Microfluidic Cell Culture Systems*, *William Andrew Publishing (Elsevier)*, USA, (2013).
- [65] Kim L., Toh Y. C., Voldman J. and Yu H., "A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells", *Lab on a Chip*, 7:6 681-694, (2007).
- [66] Mora-Boza A., Castro L. M. M., Schneider R. S., Han W. M., García A. J., Vázquez-Lasa B. and San Román J., "Microfluidics generation of chitosan microgels containing glycerylphosphate crosslinker for in situ human mesenchymal stem cells encapsulation", *Materials Science and Engineering: C*, 120 111716, (2021).
- [67] Kanda P., Benavente-Babace A., Parent S., Connor M., Soucy N., Steeves A., Davis D. R., et al., "Deterministic paracrine repair of injured myocardium using microfluidic-based cocooning of heart explant-derived cells", *Biomaterials*, 247 120010, (2020).
- [68] Tomasi R. F. X., Sart S., Champetier T. and Baroud C. N., "Individual control and Quantification of 3D spheroids in a high-density microfluidic droplet array" *Cell reports*, 31:8 107670, (2020).
- [69] Shin Y., Jeon J. S., Han S., Jung G. S., Shin S., Lee S. H., Chung S., et al., "In vitro 3D collective sprouting angiogenesis under orchestrated ANG-1 and VEGF gradients", *Lab on a chip*, 11:13 2175-2181, (2011).
- [70] Lyu J., Chen L., Zhang J., Kang X., Wang Y., Wu W., Tang K., et al., "A microfluidics-derived growth factor gradient in a scaffold regulates stem cell activities for tendon-to-bone interface healing", *Biomaterials Science*, 8:13 3649-3663, (2020).
- [71] Özdemir, A. O., Karataş, Ç. ve Yücesu, S., "Elyaf Konfigurasyonunun Termoplastik Kompozit Levhaların Mekanik Özelliklerine Etkisi", *Politeknik Dergisi*, 24: 599-607, (2021)
- [72] Chin C. D., Khanna K. and Sia S. K., "A microfabricated porous collagen-based scaffold as prototype for skin substitutes", *Biomedical microdevices*, 10:3 459-467, (2008).
- [73] Sheth S., Stealey S., Morgan N. Y. and Zustiak S. P., "Microfluidic Chip Device for In Situ Mixing and Fabrication of Hydrogel Microspheres via Michael-Type Addition", *Langmuir*, 37:40 11793-11803, (2021).
- [74] Zamora-Mora V., Velasco D., Hernández R., Mijangos C., and Kumacheva E., "Chitosan/agarose hydrogels: Cooperative properties and microfluidic preparation", *Carbohydrate polymers*, 111 348-355, (2014).

- [75] Yoon S. H., Kim Y. K. and Mofrad M. R., "Mechanobiological Approaches for the Control of Cell Motility" Microfluidic Cell Culture Systems, *William Andrew Publishing (Elsevier)*, USA, (2013).
- [76] Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Horwitz A. R., et al., "Cell migration: integrating signals from front to back", *Science*, 302:5651 1704-1709, (2003).
- [77] Yoon S. H., Kim Y. K., Han E. D., Seo Y. H., Kim B. H. and Mofrad M. R., "Passive control of cell locomotion using micropatterns: the effect of micropattern geometry on the migratory behavior of adherent cells", *Lab on a Chip*, 12:13 2391-2402, (2012).
- [78] Chung B. G. and Choo J., "Microfluidic gradient platforms for controlling cellular behavior", *Electrophoresis*, 31:18 3014-3027, (2010).
- [79] Van Norman G. A., "Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?", *JACC: Basic to Translational Science*, 4:7 845-854, (2019).
- [80] Dickson I., "Multispecies liver-on-a-chip for improved drug toxicity testing", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17:1 4-4, (2020).
- [81] Marx U., Andersson T. B., Bahinski A., Beilmann M., Beken S., Cassee F. R., Roth A., et al., "Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing", *Altex*, 33:3 272, (2016).
- [82] Mastikhina O., Moon B. U., Williams K., Hatkar R., Gustafson D., Mourad O., Nunes S. S., et al., "Human cardiac fibrosis-on-a-chip model recapitulates disease hallmarks and can serve as a platform for drug testing", *Biomaterials*, 233 119741, (2020).
- [83] Ehrlich A., Duche D., Ouedraogo G. and Nahmias Y., "Challenges and opportunities in the design of liver-on-chip microdevices", *Annual review of biomedical engineering*, 21 219-239, (2019).
- [84] Satoh W., Takahashi S., Sassa F., Fukuda J. and Suzuki H., "On-chip culturing of hepatocytes and monitoring their ammonia metabolism", *Lab on a Chip*, 9:1 35-37, (2009).
- [85] Kang Y. B., Eo J., Bulutoglu B., Yarmush M. L. and Usta O. B., "Progressive hypoxia-on-a-chip: An in vitro oxygen gradient model for capturing the effects of hypoxia on primary hepatocytes in health and disease", *Biotechnology and bioengineering*, 117:3 763-775, (2020).
- [86] Danoy M., Poulain S., Jellali R., Gilard F., Kato S., Plessy C., Leclerc E., et al., "Integration of metabolomic and transcriptomic profiles of hiPSCs-derived hepatocytes in a microfluidic environment", *Biochemical Engineering Journal*, 155 107490, (2020).
- [87] Kang Y. B., Sodunke T. R., Lamontagne J., Cirillo J., Rajiv C., Bouchard M. J. and Noh M., "Liver sinusoid on a chip: Long-term layered co-culture of primary rat hepatocytes and endothelial cells in microfluidic platforms", *Biotechnology and bioengineering*, 112:12 2571-2582, (2015).
- [88] Lauschke V. M., Shafagh R. Z., Hendriks D. F. and Ingelman-Sundberg M., "3D primary hepatocyte culture systems for analyses of liver diseases, drug metabolism, and toxicity: Emerging culture paradigms and applications", *Biotechnology journal*, 14:7 1800347, (2019).
- [89] Ortega-Prieto A. M., Skelton J. K., Cherry C., Briones-Orta M. A., Hateley C. A. and Dorner M., "Liver-on-a-Chip Cultures of Primary Hepatocytes and Kupffer Cells for Hepatitis B Virus Infection", *MyJoVE Corporation*, (2016).
- [90] Santiago P. A., de Campos Giordano R. and Suazo C. A. T., "Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers", *Process Biochemistry*, 46:1 35-45, (2011).
- [91] Park E. S., Brown A. C., DiFeo M. A., Barker T. H. and Lu H., "Continuously perfused, non-cross-contaminating microfluidic chamber array for studying cellular responses to orthogonal combinations of matrix and soluble signals" *Lab on a Chip*, 10:5 571-580, (2010).
- [92] Bircsak K. M., DeBiasio R., Miedel M., Alsebah A., Reddinger R., Saleh A., Gough A. et al., "A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate®" *Toxicology*, 450 152667, (2021).
- [93] Park E. S., Brown A. C., DiFeo M. A., Barker T. H. and Lu H., "Continuously perfused, non-cross-contaminating microfluidic chamber array for studying cellular responses to orthogonal combinations of matrix and soluble signals", *Lab on a Chip*, 10:5 571-580, (2010).
- [94] Ezashi T., Das P. and Roberts R. M., "Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:13 4783-4788, (2005).
- [95] Samal J. R., Rangasami V. K., Samanta S., Varghese O. P. and Oommen O. P., "Discrepancies on the Role of Oxygen Gradient and Culture Condition on Mesenchymal Stem Cell Fate", *Advanced Healthcare Materials*, 10:6 2002058, (2021).
- [96] Merkel T. C., Bondar V. I., Nagai K., Freeman B. D. and Pinnau I., "Gas sorption, diffusion, and permeation in poly (dimethylsiloxane)", *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38:3 415-434, (2000).
- [97] Shiku H., Saito T., Wu C. C., Yasukawa T., Yokoo M., Abe H., Yamada H., et al., "Oxygen permeability of surface-modified poly (dimethylsiloxane) characterized by scanning electrochemical microscopy", *Chemistry letters*, 35:2 234-235, (2006).
- [98] Jensen C. and Teng Y., "Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?", *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7 33, (2020).
- [99] Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R. and Fleming R. M., "Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices", *Biosensors and Bioelectronics*, 63 218-231, (2015).
- [100] Walker G. M., Zeringue H. C. and Beebe D. J., "Microenvironment design considerations for cellular scale studies", *Lab on a Chip*, 4:2 91-97, (2004).
- [101] Paguirigan A. L. and Beebe D. J., "From the cellular perspective: exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures", *Integrative Biology*, 1:2 182-195, (2009).
- [102] Wang D. Y., Wu S. C., Lin S. P., Hsiao S. H., Chung T. W. and Huang Y. Y., "Evaluation of transdifferentiation from mesenchymal stem cells to neuron-like cells using

- microfluidic patterned co-culture system”, *Biomedical Microdevices*, 13:3 517-526, (2011).
- [103] Berthier E., Young E. W. and Beebe D., “Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia”, *Lab on a Chip*, 12:7 1224-1237, (2012).
- [104] Vogt L., Ruther F., Salehi S. and Boccaccini A. R., “Poly (Glycerol Sebacate) in Biomedical Applications—A Review of the Recent Literature”, *Advanced Healthcare Materials*, 10:9 2002026, (2021).
- [105] Wang Y., Ameer G. A., Sheppard B. J. and Langer R., “A tough biodegradable elastomer”, *Nature biotechnology*, 20:6 602-606, (2002).
- [106] Wang Y., Kim Y. M. and Langer R., “In vivo degradation characteristics of poly (glycerol sebacate)”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 66:1 192-197, (2003).
- [107] Bellan L. M., Chamberlain H., Wu D. and Langer R., “Microfluidic Vascular Networks for Engineered Tissues”, *Microfluidic Cell Culture Systems*, *William Andrew Publishing (Elsevier)*, USA, (2013).
- [108] Olson H., Betton G., Robinson D., Thomas K., Monro A., Kolaja G., Heller A., et al., “Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32:1 56-67, (2000)