

Mrd Biyoçip: Minimal Rezidüel Hastalığın Güvenilir Ve Basit Bir Yolla İzlenmesi

Program Kodu: 1003

Proje No: 115E020

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Kutay İçöz

Araştırmacılar:

Dr. Osman Alphan Küpesiz

Dr. Zühre Kaya

Dr. Suzan Çınar

Dr. Günnur Deniz

Dr. Ekrem Ünal

Dr. Bülent Yılmaz

Nisan 2019
KAYSERİ

Önsöz

Bu projede minimal rezidüel hastalığın (MRD) güvenilir ve basit bir yolla izlenmesi için geliştirilmesi planlanan MRD Biyoçip çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çocukluk çağında en sık görülen kanser olan akut lenfoblastik lösemi hastalarında tedavi başlangıcında ve kemoterapi sırasında kanserli hücreleri tespit edip nicel ölçümler yapabilmesi amaçlanan MRD Biochip için gerçekleştirilen çalışmalar bu raporda sunulmuştur. Bulunan sonuçlar ile 3 adet SCI makale yayınlanmış olup, 2 tane makale daha hazırlık aşamasındadır. 4 adet uluslararası konferansta sözlü bildiri üretilmiştir. Ayrıca bu proje desteği ile 1 öğrencinin (Tayyibe Gerçek) yüksek lisans tezi tamamlanmıştır, 1 öğrencinin (Ünal Akar) yüksek lisans tezi 2019 yazında tamamlanacaktır, 1 öğrencinin (Fatma Uslu) de doktora tezi devam etmektedir. Ayrıca projemiz ACT Venture Partners risk sermayesi tarafından ticarileştirebilecek teknoloji adayı olarak seçilmiş ve projemize 30000 TL destek verilerek “Kavram İspatı ve Teknoloji Ticarileştirme Fizibilite Çalışması” kapsamında yatırım almıştır. Bu yatırımın bir parçası olarak Erciyes Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi tarafından MRD Biyoçip’in patentlenebilir olduğuna dair patent incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Ülkemizdeki elim olaylar nedeniyle maalesef elimizde olmayan nedenlerle projemiz belli bir süre dondurulmuş, kurumlardaki karışıklıklar projeye yansımıştır. Projemiz ilk hedeflenen tarihte bitirilememiş daha sonra TÜBİTAK’tan talep edilen süre uzatması kullanılarak proje başvurusunda belirlenen hedeflere ulaşılmıştır. Bütçe aktarılması yapılmadığı için bursiyerlere ödeme yapılamamış proje başından itibaren 4 bursiyer projeyi tamamlayamadan ayrılmıştır. Bütün bu sıkıntılara rağmen tüm ekip olarak özveri ile elimizden gelenin en iyisini yapmaya çalıştık.

Bu proje 1003 Öncelikli Alanlar desteği kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Başta destek sağlayan kurum olarak TÜBİTAK’a daha sonra da emeği geçenlere ve değerlendirenlere teşekkür ederiz.

İçindekiler

İçindekiler	iii
Tablo ve Şekil Listeleri.....	iv
Özet.....	vi
Abstract.....	vii
1. Giriş.....	1
2. Literatür Özeti.....	3
3. Gereç ve Yöntem.....	8
3.1 Altın Kaplı Yüzey Modifikasyonu:.....	9
3.2 Manyetik Boncuklar ile Hücre Yakalama	9
3.3 Görüntü İşleme Teknikleri ile Hücre Sayımı	11
3.4 Çip Üretimi ve Hücre Kültürü Testleri.....	15
4. Bulgular	17
4.1 Yüzey fonksiyonelleştirme metotları	17
4.2 Manyetik Boncuklar ile Hücre yakalama deneyleri	21
4.3. Görüntü İşleme Metotları ile Hücre Sayımı.....	24
4.4 MRD Biyoçip Kontrol Deneyleri	37
4.5 Hastalara uygulanan tedavi protokolü.....	39
4.6 Hasta Örneklerinin Akım Sitometrisi ve MRD Biyoçip ile İncelenmesi	41
4.4.1 35x35µm karolar	44
4.4.2 15x15µm karolar	45
4.4.3 24x24µm karolar	46
5. Tartışma/Sonuç.....	49
Kaynaklar	53
EK.....	57

Tablo ve Şekil Listeleri

Tablo 2. 1: MRD yöntemlerinin karşılaştırmalı öne çıkan özellikleri (Patiroğlu, 2011).....	3
Tablo 2. 2: Akım sitometrisi yönteminde çoğunlukla kullanılan immünofenotipik belirleyiciler (Campana & Coustan-Smith, 2002).....	4
Tablo 3. 1: Deneyleerde kullanılan hücre, manyetik boncuk ve antikorlar.....	10
Tablo 3. 2: 20X ve 40X objektif özellikleri.....	12
Tablo 4. 1: Ortalama manyetik boncuk hata oranı 40X ve 20X objektifler.....	24
Tablo 4. 2: Algoritmaların ortalama hücre sayımı performansı.....	24
Tablo 4. 3: SVM, NN ve RF metotlarının performanslarının karşılaştırılması.....	25
Tablo 4. 4: MANYETİK PARÇACIK SAYMA SONUÇLARI.....	31
Tablo 4. 5: Hasta Örneklerinin manyetik partiküller ile inkübasyonu/ayırıştırılması deneylerinin akım sitometrisi ile analizi-1.....	42
Tablo 4. 6 Hasta Örneklerinin manyetik partiküller ile inkübasyonu/ayırıştırılması deneylerinin akım sitometrisi ile analizi-2.....	42
Tablo 4. 7: MRD Biyoçip Hasta Verisi hasta kodu: SNG.....	47
Şekil 2. 1: ALL B tipi için kullanılan belirleyiciler ve akım sitometrisi ile yapılan MRD çalışmasına bir örnek.....	5
Şekil 2. 2: Flüoresan mikroskop ile MRD tespiti (Campana & Coustan-Smith, 2002).....	5
Şekil 2. 3: Mikroakışkan tabanlı kanser hücrelerini veya kanser hücrelerine özgü proteinleri algılamak için geliştirilen farklı biyosensör sistemler.....	8
Şekil 3. 1: Altın yüzeylere antikor sabitleme yöntemi (Kato et al., 2007).....	9
Şekil 3. 2: Manyetik boncuklar ile bağlanma deneyleri; yakalanan hücreler yüzeyi fonksiyonel hale getirilmiş QCM yüzeyine aktarılarak sandviç yapısı oluşturulmuştur. Yıkama solüsyonlarındaki hücreler sayılmıştır. İkinci manyetik boncuklar ile double sorting deneyleri gerçekleştirilmiştir.....	11
Şekil 3. 3: Kayıt edilen 40X ve 20X görüntüler.....	11
Şekil 3. 4: 40X görüntülerden manyetik boncuk ve hücre sayımı için kullanılan algoritmalar.....	13
Şekil 3. 5: 20X görüntülerden hücre sayımı için geliştirilen algoritmanın ana basamakları.....	14
Şekil 3. 6: Altın padlerin/karoların üretim aşamaları.....	15
Şekil 3. 7: Şu ana kadar üretilen biyoçip prototipleri, mikro manyetik parçacık çapı 4,5 µm'dür.....	17
Şekil 4. 1: Test edilen metotlar için B lymphoblast, CD19 antikor ve protein G için QCM frekans kaymaları.....	18
Şekil 4. 2: Protein G tabakasının AFM analizi A) MPS ve B) MUA kaplamaları.....	18
Şekil 4. 3: Metot E'nin BSA ve BSA olmadan QCM frekans kaymaları.....	19
Şekil 4. 4: BSA katmanının AFM analizi A) MPS and B) MUA kaplamaları.....	20
Şekil 4. 5: Metot D nin farklı hücre konsantrasyonları için uygulanması sonucu QCM frekans kaymaları.....	21
Şekil 4. 6: CD19 ve CD45 kaplı nano boyutlu manyetik boncukların hücre kaçırma oranı.....	22
Şekil 4. 7: CD19 ve CD45 kaplı mikro boyutlu manyetik boncukların hücre kaçırma oranı.....	22
Şekil 4. 8: Nano ve mikro boyutlu manyetik boncukların çift yakalama (double sorting) hücre kaçırma oranları.....	23
Şekil 4. 9: Nano manyetik boncuk ile yakalanan hücreleri QCM yüzeyde sabitlenmiş antikorlar ile yakalanması sonucu frekans kaymaları.....	23
Şekil 4. 10: Biyoçip görüntü örneği. Mavi ok izole şeklindeki parçacığı, yeşil ok yumak şeklinde bulunan parçacığı ve kırmızı ok karoya yapışık halde bulunan parçacığı göstermektedir.....	26

Şekil 4. 11: Parçacık resminin (a) üç boyutlu topolojik görüntüsü çukur içinde bir tepelik oluşturuyor (b).....	27
Şekil 4. 12: Resimdeki yalnız ve kümelenmiş immünomanyetik parçacıkları bulma algoritmasının akış diyagramı ve ilgili görüntüler	28
Şekil 4. 13: Resimdeki karolara bağlanmış toplam immünomanyetik parçacıkların sayısının ve konumunun kestirimi	30
Şekil 4. 14: Karoya bağlı immünomanyetik parçacık örneği.....	30
Şekil 4. 15: Çipten elde edilen görüntüdeki hücrelerin tespiti	32
Şekil 4. 16: Varyans Hesaplamasını İçeren Hücre Tespit Algoritması	32
Şekil 4. 17: Varyans hesabı içeren algoritmanın uygulaması.....	33
Şekil 4. 18: 20X objektif ile elde edilen görüntü ve uygulanan varyans penceresi.....	34
Şekil 4. 19: Varyans uygulanması ve ara görüntüler.....	34
Şekil 4. 20: Varyans uygulamasında karolar ve parçacıkların tespiti.....	36
Şekil 4. 21: Varyans uygulamasında hücrelerin tespiti.....	36
Şekil 4. 22 Antikor kontrol deneyleri	37
Şekil 4. 23 MRD Biyoçip karakterizasyon ölçümleri A) Girişteki hücre miktarı, B) Çip içerisinde yakalanan hücre sayısı C) aradaki korelasyon	38
Şekil 4. 24: ALLIC BFM 2009 protokolüne göre risk grupları özellikleri ve nüks oranları (Campbell et al. 2009).....	39
Şekil 4. 25 Risk gruplarına göre ALL IC BFM 2009 protokolünü risk gruplarına göre genel tedavi şeması (Campbell et al. 2009)	40
Şekil 4. 26: Hasta örnekleri ile gerçekleştirilen akım sitometrisi deneyleri.....	41
Şekil 4. 27 Hasta HG'nin MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri.....	44
Şekil 4. 28: Hasta HG'nin örneklerinin MRD biyoçip içerisindeki örnek görüntüleri A) Tanı anı B) 15. Gün örneği.....	44
Şekil 4. 29: Hasta MEB'in MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri	45
Şekil 4. 30 Hasta MEB'in örneklerinin MRD biyoçip içerisindeki örnek görüntüleri A) Tanı anı B) 15. Gün örneği.....	45
Şekil 4. 31 Hasta YKA'nın örneklerinin akım sitometrisi verileri ve MRD biyoçip içerisindeki örnek görüntüleri A) Tanı anı B) 15. Gün örneği.....	46
Şekil 4. 32 Hasta YKA'nın MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri.....	46
Şekil 4. 33 Hasta SNG'nin MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri	48

Özet

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre Türkiye’de çocukluk çağında en sık görülen kanser türü lösemidir ve lösemi türleri arasında Akut Lenfoid Lösemi (ALL) 15 yaş altındaki çocuklarda gözlenen lösemilerin %80’inini oluşturur. Lösemiden korunmanın kesin bir yöntemi şu an için bilinmemektedir ve lösemi hastalarına uygulanan kemoterapi (ilaç tedavisi), radyoterapi, kemik iliği nakli ve immünoterapi gibi farklı tedaviler mevcuttur. Akut lenfoblastik lösemi hastalarının tedavi sürecinde uygulanan kemoterapi her hastaya aynı şekilde etki etmemekte; bazı hastalar tedaviye yanıt verirken bazı hastalarda lösemik hücreler (blastlar) kemoterapiye direnç göstermektedir. Sonuçta tedaviden kaçan bu lösemik blastlar hastalık tekrarlarına (relapslara) neden olabilmektedirler. Tedavinin 15. gününde incelenen minimal rezidüel (kalıntı) hastalık (minimal residual disease, MRD) akut lösemi hastalarında sağ kalımın en önemli göstergesi olup uluslararası tedavi protokollerinde standart olarak kullanılmaktadır. Bu protokollere göre MRD pozitif tespit edilir ise kemoterapi tedavisi daha da yoğunlaştırılmaktadır. MRD ölçümü günümüzde akım sitometrisi (flow cytometry FC) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılabilmektedir. Her iki yöntemde de sonuç almak uzun vakit almakta, her iki yöntemin de maliyeti yüksek olup, sadece uzman kullanıcılar tarafından akredite olmuş referans laboratuvar ortamlarında gerçekleştirilebilmektedir. **Alt yapı yetersizliği ve yüksek maliyetlerden dolayı tedavi edilen ALL hastalarının çoğunluğunda MRD tespiti mümkün olamamaktadır.** Oysa kemoterapi gören hastalarda, relapslara neden olan hücreler için MRD taraması ile, tedavinin seyri değişebilecek, her hastaya uygun ilaç dozajı ayarlanabilecek ve ileri dönemde relapslar azaltılabilecektir. Günümüzde MRD testi için kullanılan laboratuvar yöntemleri kadar hassas, fakat maliyeti daha düşük biyosensör cihazların geliştirilmesi lösemi tedavisinde çığır açacak potansiyele sahiptir. Mikro/nano teknoloji tabanlı biyoçipler üreterek alternatif bir metot geliştirerek, hastaların tedavi sürecini iyileştirmek, hekimlere büyük kolaylık sağlamak, ülkemize katma değeri yüksek bir ürün kazandırmak mümkündür. Geliştirilmek istenen biyoçip ile B öncül ALL hastalarındaki kanserli hücrelerin kemoterapi sürecindeki durumları ve tedaviye gösterdikleri yanıt izlenebilecek, bu da hastalara en uygun ilaç dozajının ayarlanarak kişiye özel tedavi uygulanmasını mümkün kılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Minimal Rezidüel Hastalık, Biyoçip, Mikro akışkan Cihazlar, BioMEMS, Manyetik Parçacıklar, Lösemi

Abstract

According to the data from Public Health Agency of Turkey, leukemia is the most common type of cancer in childhood and acute lymphoid leukemia (ALL) is observed 80% among all types leukemia for the children under the age of 15. At the moment there is no absolute way to prevent leukemia; but there are different treatments for patients such as drug therapy (chemotherapy), bone marrow transplantation, radiation treatment and immunotherapy. Among these methods chemotherapy is a widely used first line treatment but results differs from patient to patient. Some of the treated patients with chemotherapy achieve remission however the cancer cells of some patients are resistant to treatment. The resistant cancer cells (blast cells) can cause relapses and repeat the cancer. Current international treatment protocols aimed to monitor the minimal residual disease (MRD) of the involved patients with ALL on the 15th day of chemotherapy treatment, which is an important indicator for survival rate. According to these protocols in the case of positive MRD detection, intensive chemotherapy is applied. Today Flow Cytometry (FC) and Polymerase Chain Reaction (PCR) are two laboratory techniques used for MRD detection. Both methods are time and cost consuming and require trained personnel to operate in a certified lab environment. It is not possible to use these techniques for most of the children with ALL due to lack of infrastructure and high costs. On the other hand the screened patients for MRD should be switched to more intensive treatment arms. Personalized drug dosing should be adjusted which can ultimately change the disease course by reducing the estimated relapses. Developing low cost but highly sensitive biosensor systems for MRD screening can open a new era in leukemia treatment; this method can be an alternative to current techniques. By fabricating micro/nano technology based biochips, it is possible to establish an alternative method, improve the treatment process, enable an efficient tool for medical doctors and add value to economic growth of medical market in Turkey. The MRD biochip would allow monitoring B ALL blast cells during the chemotherapy treatment and their response to drugs, which would enable adjusting drug doses for personalized treatment.

Keywords: Minimal Residual Disease, Biochip, Microfluidic Devices, BioMEMS, Magnetic particles, Leukemia

1. Giriş

Projenin temel amacı çocukluk çağında en sık görülen kanser olan B öncül akut lenfoblastik lösemi hastalarında tedavi başlangıcında ve kemoterapi sırasında kanserli hücreleri tespit edip nicel ölçümler yapabilmek için biyoçip/biyosensör cihazlar (MRD Biochip) üretmek ve bu biyosensörlerin kullanıldığı ölçüm sistemi geliştirmektir. Hedeflenen sistem, düşük maliyetli olma (pahalı ekipmanlara gereksinim duymama), kullanımı kolay olma (uzman kullanıcıya ihtiyaç duymama) ve kısa sürede netice elde etme gibi avantajlara sahip olacaktır. Günümüzde MRD tespiti için kullanılan akım sitometrisi maliyeti yüksek, uzun zaman ve uzman kullanıcı gereksinimi olan bir yöntemdir. Bu yüzden her bir hastanın durumunu akım sitometrisi ile izlemek mümkün değildir. Projenin başarılı olabilmesi için ulaşılmak istenen hedefler:

- 1) Mikro/Nano elektromekanik sistemlerin, mikroakışkan sistemlerin ve mikro manyetik parçacıkların kullanıldığı biyoçip tasarımı ve prototip üretimini gerçekleştirmek,**
- 2) Görüntü işleme metotları geliştirilerek biyoçip ile uyumlu çalışacak hücre ve manyetik parçacık tespit yazılımlarını hazırlamak,**
- 3) Geliştirilen sistemi (hastalardan alınacak örneklerden önce) hücre kültürlerinden elde edilen hücreler kullanarak test etmek,**
- 4) Hastalardan alınacak kan veya kemik iliği örneklerinde kanserli hücrelerin biyoçip ile tespit edilmesi ve sistemin performansının referans laboratuvar yöntemleri ile karşılaştırılarak belirlemek,**
- 5) Geliştirilen sistemin klinik kullanım için optimize etmektir.**

Hedeflenen çalışmaların büyük bir çoğunluğunu proje kapsamında gerçekleştirilmiş olup bu rapor hazırlandığı tarihte 5.hedef üzerinde çalışmalar tamamlanmak üzeredir.

Danışman Görüşlerine Dair Açıklamalar:

2. gelişme raporunda danışman tarafından iletilen görüşlere dair kısa açıklamayı burada yaparken, ayrıntıların raporumuzun ilgili bölümlerinde yer aldığınız belirtmek isteriz.

- Cam üzerinde oluşturulan altın yüzeylerin fonksiyonel hale getirilmesi ile hücre yakalanması çalışmalarının yapıldığı iş paketi 4 kapsamında gerçekleştirilen nihai tasarımın detaylarının rapor edilmesi (bir önceki raporda yapılan modifikasyonların devam ettiği belirtilmiş, ancak nihai yöntem sunulmamıştır),

Bu alandaki çalışmalarımızı "Quartz-Crystal Microbalance Measurements of CD19 Antibody Immobilization on Gold Surface and Capturing B Lymphoblast Cells: Effect of Surface Functionalization", doi: 10.1002/elan.201700789 makalesi ile yayınladık. Özetle optimize

edilen nihai teknikte sırasıyla altın yüzeyler temizlendikten sonra sırasıyla 11-Mercaptoundecanoic asit (MUA) daha sonra N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) / N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) bağlayıcı molekülü, antikor oryantasyonu için Protein G, antikor, istenmeyen bağlanmaları önlemek için bovine serum albumin (BSA) uygulanmıştır

Altın >> MUA >> EDC=NHS >> ProteinG >> Antikor (CD19) >> BSA >> B lymphoblast hücreler

- Hasta örneklerindeki hedef hücrelerin yakalanmasında kullanılan manyetik partiküllerin özelliklerinin verilmesi (ticari olup olmadığının, değilse hazırlama prosedürlerinin),

Bu alandaki çalışmalarımızı "Capturing B Type Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Using Two Types of Antibodies" doi: 10.1002/btpr.2737 makalesi ile yayınladık. Özetle mikro ve nano boyutta ticari ürünler kullanılmıştır. 120 nm boyutundaki partiküller Miltenyi firmasından, 4,5 µm boyutundaki partiküller Dyanbeads Thermo Fisherden temin edilmiştir.

- Yeni tasarlanacak çip ile yapılacak çalışmalarda karşılaşılabilecek problemler (etkin ayırma yapılamaması, lösemi hücreleri dışında diğer hücre yığınları ile karşılaşılması vb.) göz önünde bulundurularak hızlı denemeler yapılarak tasarımın iyileştirilmesi,

Hasta örneklerindeki hedef hücrelerin manyetik partiküller ile ayrıştırılması akım sitometrisi ölçümleri ile karşılaştırılarak incelemiştir. Bu ölçümler göstermiştir ki manyetik partiküller hücre kültüründe çalıştığı verimlere yakın verimlilikte hasta örnekleri içinde çalışmaktadır. Detaylar raporumuzda yer almaktadır.

- Kan örneklerindeki lösemi hücrelerinin yakalanmasının görüntülenmesi; raporda çip içi görüntülenme yapılacağı belirtilse de henüz yapılmamış olması ve bu görüntülerin, hazırlanan aktif yüzey ile hasta örneklerinin etkileşimi sonrasında verilmesi gerektiği, görüntü elde edilmediği takdirde, bağlanmanın spesifik olduğuna karar vermek üzere başka kontrol analizlerinin yapılmasına ihtiyaç olduğu,

Hasta örnekleri ile hem manyetik ayrıştırmanın verimliliği hem de çip ile hücre tespiti deneyleri gerçekleştirilmiştir. Manyetik partiküller ile ayrılan hücreler çipe iletilerek yüzeyde yakalanmaları sağlanmıştır. Ayrıca kontrol deneyleri gerçekleştirilerek hücrelerin spesifik bağlanma oranları ya da farklı antikora bağlanma oranları irdelenmiştir.

2. Literatür Özeti

Akut Lenfoid Lösemi (ALL) hastalarında tedavi oranlarının son yıllarda artmasına rağmen, yoğunlaştırılmış ilaç tedavisi; ikincil kanserler, kardiyomiyopati, nöropsikolojik problemler gibi ciddi doku ve işlev bozukluklarına yol açabilmektedir (Basso et al. 2009) (Campana and Coustan-Smith 1999) (Gaipa et al. 2013)(Lipshultz et al. 1991). Maalesef tedavinin tesirini arttırmak ve ilaç toksisitesini düşürmek için kullanılan klinik ve biyolojik parametreler yeterli değildir ve bu yüzden bazı hastalar gereksiz yere yoğunlaştırılmış ilaç tedavisine maruz kalırken bazı hastalarda da ise bu yoğun tedavilere rağmen relapslar (hastalık tekrarı) görülebilmektedir (Campana and Coustan-Smith 1999)(Gaipa et al. 2013). Lösemi hastalarının minimal kalıntı hastalık için takip edilmesinin klinik önemi; hastaya uygulanacak tedavinin seyrini belirlemede ve sonraki aşamaları planlamada önemli katkılar sağlayabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Ratei et al. 2009)(Basso et al. 2009)(Gaipa et al. 2013)(Nyvold et al. 2002)(Szczepeński 2007). Özellikle yüksek relaps riskine sahip hastaları erken teşhis ederek gerekli tedaviye yönlendirmede, uygulanan ilaç tedavilerinin etkinliğini erken göstermede MRD çalışmaları kullanılmaktadır (Gaipa et al. 2013)

MRD tayininde Akım Sitometrisi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

MRD tayininde, kemoterapi başladıktan 15 gün sonra kemik iliğinden alınan örnekteki blastik hücre sayısının tüm çekirdekli hücre sayısına oranı tespit edilmektedir.

Günümüzde MRD tayini için akım sitometrisi (Flow Cytometry-FC) ve polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction- PCR) metotları kullanılmaktadır (Basso et al. 2009). Akım sitometrisi metodu immünofenotipleme esasına dayalı olup, lösemik hücrelerin fenotip farklılıklarını algılamaya çalışır. Lösemi hücreleri normal hücrelerden farklı belirleyicileri (marker) ekspresyonlar, FC metodunda farklı antikorlardan oluşan algılayıcı paneller yardımıyla bu farklı belirleyiciler algılanmaya çalışılır. PCR yönteminde lösemik hücrelerde bulunan kromozomal anormallikler ve füzyon genlerinin, zincirleme reaksiyonlar ile çoğaltılarak algılanması esasına göre çalışır (Patiroğlu 2011).

Tablo 2. 1: MRD yöntemlerinin karşılaştırmalı öne çıkan özellikleri (Patiroğlu, 2011)

	Akım Sitometrisi	PCR (Ig/TCR gen düzenlenmesi)	PCR (Füzyon genlerinin incelenmesi)
Hassasiyet	10^{-3} - 10^{-4} (binde bir on binde bir)	10^{-4} - 10^{-5} (on binde bir-yüz binde bir)	10^{-4} - 10^{-5} (on binde bir-yüz binde bir)

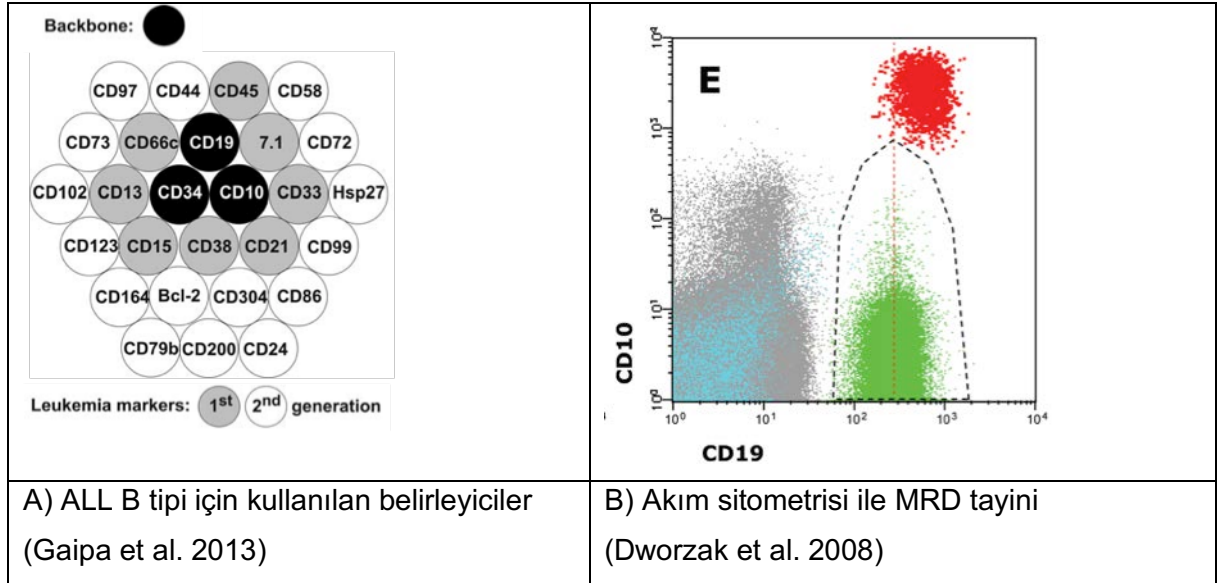
Avantajlar	Hızlı (1-2 gün) Nispeten tekniği kolay	Yüksek oranda DNA stabilitesi	Nispeten hızlı (2-3 gün) Nispeten basit
Dezavantajlar	İmmünofenotipik kaymalar	Oldukça karışık ve yavaş	Kontaminasyon riski yüksek RNA değişkenliği

Tablo 2.1'de görüldüğü üzere **akım sitometrisi ve PCR teknikleri yüksek oranda hassasiyete ulaşmakla beraber uzun süre alması gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Ayrıca bu metotlar sadece uzman personel tarafından gerçekleştirilebilmektedir ve maliyetleri de hayli yüksektir (hasta başına PCR için 5000 TL, akım sitometrisi için 750-1000 TL)**. İki metodun doğruluklarının birbiri ile karşılaştırılması için hastalardan alınan örnekler üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki, test sonuçları birbiri ile yüksek oranda mutabıktır, fakat MRD tayini için PCR yönteminin kullanılması akım sitometrisine göre en az 2-3 kat daha pahalıdır (Kerst et al. 2005).

ALL hastalığına sahip çocukların %85'i B tipi lenfosit hücrelerine (B tipi ALL), %15'i de T tipi lenfosit hücrelerine (T tipi ALL) sahiptir. Akım sitometrisi yönteminde her iki ALL tipi için tek bir antikor kullanılması lösemik hücreleri tespit etmede yeterli olmamaktadır. Bu yüzden farklı antikorların bir arada kullanıldığı kombinasyonlar tercih edilmektedir (Tablo 2.2 (Dworzak et al. 2008) (Ratei et al. 2009)(Campana and Coustan-Smith 2002).

Tablo 2. 2: Akım sitometrisi yönteminde çoğunlukla kullanılan immünofenotipik belirleyiciler (Campana & Coustan-Smith, 2002)

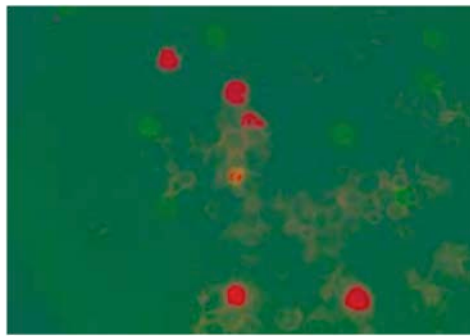
ALL	Fenotip	Frekans (%)
B tipi	CD19/CD34/CD10/TdT	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD22	20-30
	CD19/CD34/CD10/CD38	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD45	30-50
	CD19/CD34/CD10/CD58	40-60
T tipi	TdT/CD3	90-95
	CD34/CD3	30-50



Şekil 2. 1: ALL B tipi için kullanılan belirleyiciler ve akım sitometrisi ile yapılan MRD çalışmasına bir örnek

Şekil 2.1 A)'da ve tablo 2.2'de ALL B tipi için akım sitometrisinde kullanılan belirleyici antikorlar gösterilmiştir(Gaipa et al. 2013). **Görüldüğü üzere CD19, CD10 ve CD34 belirleyicileri ALL-B tipi için ana belirleyicilerdir.** Şekil 2.1 B)'de ise akım sitometrisi ile CD 10 ve CD 19 belirleyicileri beraber kullanılarak yapılan MRD tayini çalışması görülmektedir (Dworzak et al., 2008). Lösemi hücreleri kırmızı ile gösterilmiştir. Hastaların MRD için takip edilmesi ve ileride relapsların olup olmadığının kontrolü akım sitometrisi ile nicel olarak mümkündür.

MRD tespiti için akım sitometrisi ve PCR teknikleri geliştirilmeden önce Flüoresan mikroskop kullanılmış, daha sonra yerini çok uzun süre almasından dolayı daha duyarlı olan bu iki tekniğe bırakmıştır (Bradstock et al. 1981)(van Dongen et al. 1992). Hücrelerin flüoresan mikroskop ile çekilmiş görüntüleri incelendiğinde 2 antikorun kullanıldığı durumda elde edilen yanıt daha net gözlemlenebilmektedir.



Şekil 2. 2: Flüoresan mikroskop ile MRD tespiti (Campana & Coustan-Smith, 2002).

Şekil 2.2’de görüldüğü üzere ALL T tipi bir hastanın kemik iliğinden alınan örneğin anti-TdT (kırmızı) ve anti CD-3 (yeşil) antikolar ile flüoresan etiketlenmesi sonucu bir hücrenin her iki etiketi de (kırmızı ve yeşil) taşıdığı görülmektedir. Bu hücre T tipi lösemik lenfoblasttır (görüntünün ortasında yer alan hücre).

Akım sitometrisi ve flüoresan mikroskop teknikleri göstermektedir ki lösemik hücrelerin yüzeyinde bulunan antijenlere bağlanan antikolar ile hücrelerin işaretlenmesi, yakalanması ve sağlıklı hücrelerden ayırt edilmesi mümkündür.

Akım sitometrisi yöntemini kullanan laboratuvarlar genellikle tek bir lazer kullanarak 3 adet belirleyiciyi algırlarlar (Lucio et al. 2001), bununla beraber 2 adet lazer kullanımı, sisteme UV lazer eklenmesi gibi ekstra cihazlar ile algılanan belirleyici sayısı artırılarak daha hassas fakat yüksek maliyetli ölçümler yapan laboratuvarlar da vardır. Gelişmiş akım sitometrisi cihazları ile Tablo 1’de verilen hassasiyet değerlerini arttırmak, MRD için 10^5 (yüz bin) hücrede 1 hücreyi tespit etmek mümkündür (Neale et al. 1999). Akım sitometrisi metodunu kullanan bazı araştırma grupları B tipi ALL hücreleri için öncelikle immünofenotipleme yapılmasını gerekli görmektedir. Böylece her bir hasta için tüm işaretleyiciler kullanılmak zorunda kalınmaz. Fakat bu işlem tüm analizi daha da maliyetli ve uzun süre alan bir hale getirir. ALL B tipi için genellikle CD19, CD10 ve CD34 antikolarının kombinasyonları kullanılır, bunlara CD38, CD45, CD22 ve CD58 gibi antikolar eklenebilir (Campana & Coustan-Smith, 2002; Gaipa et al., 2013).

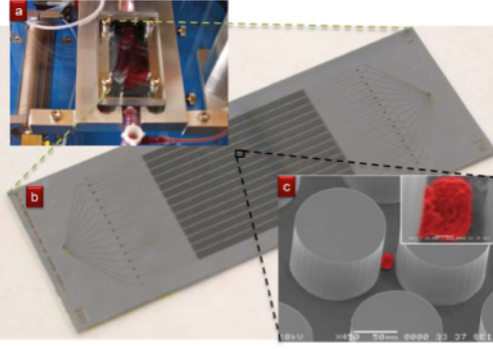
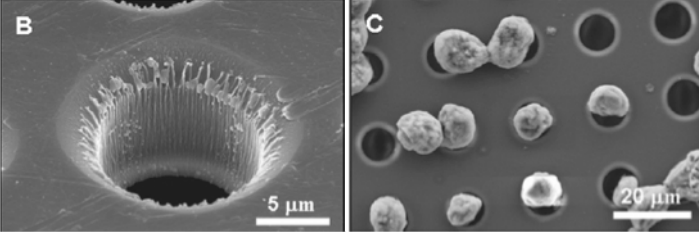
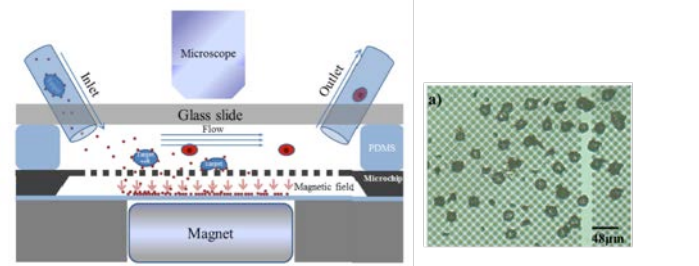
Mikroakışkan sistemler ve manyetik parçacıklar:

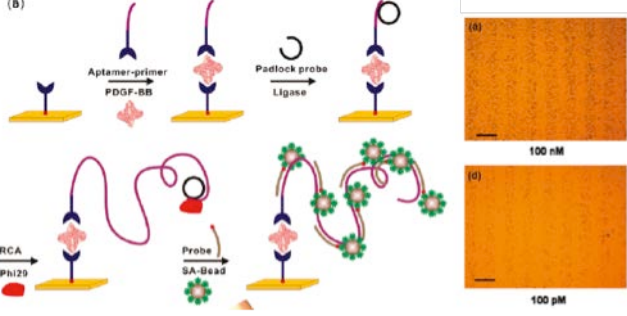
Tüm dünyadaki BioMEMS/Biyosensör araştırma grupları arasında tıbbi uygulamalar için mikroakışkan tabanlı sistemler tasarlama mikro ve nano üretim tekniklerindeki gelişmelerin yardımı ile yaygınlaşmaktadır. Mikroakışkan sistemlerin günümüzde kullanılan standart makroakışkan sistemlere göre önemli avantajları vardır : 1) mikroakışkan sistemlerde akış laminer ve deterministik özellikler gösterir, 2) mikroakışkan sistemlerde tek bir hücre boyutunda fiziksel yapılar üretilebilir, 3) mikro pompalar, mikro valfler gibi sıvı akışını kontrol edecek mekanizmalar mikroakışkan sisteme entegre edilerek üretilebilir, 4) üretimi düşük maliyetlidir, 5) makroakışkan sistemlere göre daha az reaktif malzeme kullanılır ve daha az atık oluşturulur ve 6) mikroakışkan sistemler ile taşınabilir, az yer kaplayan analiz yöntemleri oluşturulabilir (Folch 2012).

Manyetik parçacıklar sahip oldukları önemli avantajlardan dolayı manyetik ayırıştırma ve algılama (Chang et al. 2012)(Neuberger et al. 2005)(Olsvik et al. 1994), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) (Gleich and Weizenecker 2005) ve gen iletimi (Plank et al. 2002) gibi farklı biyomedikal ve biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Manyetik parçacıkların tercih sebebi olmasında en önemli özellikler: 1) manyetik parçacıkların dışarıdan manyetik alan uygulanarak hareketleri kontrol edilebilir, 2) manyetik parçacıklar farklı biyomoleküller ile kaplanarak başka

biyomoleküllere bağlanabilir ve biyo-uyumlu hale getirilebilir, 3) boyutları kontrol edilerek uygulamalara özel üretilmeleri mümkündür (Pankhurst et al. 2003)(Osaka et al. 2006)(Zacco et al. 2006)(Yin et al. 2005). Manyetik parçacıkların aynı zamanda mikroakışkan çiplerde (Suzuki, Ho, and Kasagi 2004), kanser hücrelerinin ürettiği proteinlerin (Lee et al. 2010) ve kanser hücrelerinin (Chang et al. 2014)(Lim et al. 2012)(Allard et al. 2004) algılanmasında kullanıldığı örnekler bize bu parçacıkların biyosensörlerdeki potansiyelini göstermektedir.

Mikroakışkan sistemler kullanarak nadir kanser hücrelerin tespit edilmesi (Nagrath et al. 2007) farklı metotlar kullanarak flüoresan, manyetik veya her ikisinin de yardımıyla gösterilmiştir (Chen, Li, and Sun 2012)(Li et al. 2013).

<p>A) Nadir kanser hücrelerini antikolar ile yakalamak için geliştirilen mikroakışkan tabanlı biyosensör (Nagrath et al. 2007)</p>	
<p>B) Mikro-elekleri kullanarak tümör hücrelerini filtreleme (Zheng et al. 2007)</p>	
<p>C) Manyetik parçacıklar kullanarak kanser hücrelerini algılamak için geliştirilen mikroakışkan ve mikro-elek tabanlı</p>	

biyosensör (Chang et al. 2012)	
D) Manyetik parçacıklar kullanarak kanser hücrelerinin ürettiği proteinleri algılamak için geliştirilen biyosensör (Lee et al. 2010)	 <p>(b)</p> <p>Aptamer-primer PDGF-BB</p> <p>Payload probe Ligase</p> <p>RCA Psi29</p> <p>Probe SA-Bead</p> <p>(b) 100 nM</p> <p>(d) 100 pM</p>

Şekil 2. 3: Mikroakışkan tabanlı kanser hücrelerini veya kanser hücrelerine özgü proteinleri algılamak için geliştirilen farklı biyosensör sistemler

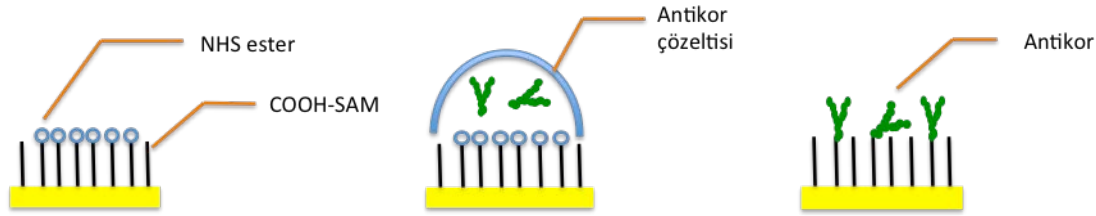
Görüldüğü üzere mikroakışkan sistemler ve manyetik parçacıklar kullanarak yeni nesil özgün biyosensör cihazlar tasarlama ve geliştirmek birçok araştırma grubu tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.3). Yapılan literatür çalışması, taranan akademik ve endüstriyel kaynaklar göstermiştir ki MRD için halihazırda geliştirilmiş, mikro/nano teknoloji tabanlı üretim tekniklerinin sağladığı avantajları kullanan bir biyoçip/biyosensör cihaz bulunmamaktadır. Literatür taramasında karşılaştığımız bir araştırmada PCR tekniğinin uygulamadaki zorluklarını azaltmak için geliştirilen biyoçip tabanlı MLL geni tespitini ve böylece MRD takibini hedefleyen bir sistem geliştirilme aşamasında olup, bu sistem PCR metodunun en önemli dezavantajlarından olan süre konusunda çok önemli bir iyileşme sağlamamakta, sadece PCR için gerekli olan uygun primer seçimini kolaylaştırmaktadır (Giusiano et al. 2010) (Maroc et al. 2004).

3. Gereç ve Yöntem

MRD Biyoçip için yapılan çalışmaları **manyetik boncuklar ile hücre yakalama, altın kaplı yüzey modifikasyonu, mikroakışkan çip tasarımı ve üretimi ile görüntü işleme ile hücre sayımı alt çalışmaları** olarak açıklanacaktır.

3.1 Altın Kaplı Yüzey Modifikasyonu:

Proje önerisinde yer verilen altın kaplı alanları antikorlar ile fonksiyonel hale getirme metodu olarak literatürde bulunan (Kato, Toda, & Iwata, 2007) Şekil 3.1’de özetlenen metot;
Altın yüzey + 11-mercapto-1-undecanoic acid (COOH- sonlu grup) + N-hydroxysuccinimide (NHS ester) + Antikor



Şekil 3. 1: Altın yüzeylere antikor sabitleme yöntemi (Kato et al., 2007)

denenmiştir fakat istenen miktarda hücre tutulması yüzeyde gerçekleşmeyince yüzey çalışmalarının detaylı bir şekilde irdelenmesi gerekmiştir. Proje önerimizde öngöremediğimiz bu sorun için Quartz Crystal Microbalance (QCM) ile ölçümler yapılarak hücre yakalayacak optimum yüzey modifikasyonu metodu belirlenmiştir. QCM deneyleri ile karşılaştırılan yüzey modifikasyonu için kullanılan thiol moleküller ve ara bağlayıcı linker moleküller şunlardır:

Thiol: 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPS), 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA)

Linker: 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt (Sulfo-SMCC), N-Ethyl-N’-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC),/ N-hydroxysulfosuccinimide (NHS),

Yüzey bloklama: Bovine Serum Albumin (BSA).

QCM cihazı ile karşılaştırılması yapılan 6 farklı yüzey modifikasyon metodu:

Metot A: Altın >> Protein G >> CD19 >> BSA >> B lymphoblast hücreleri

Metot B: Altın >> MPS >> Sulfo-SMCC >> CD19 >> BSA >> B lymphoblast hücreleri

Metot C: Altın>> MPS >> Sulfo-SMCC >> Protein G >> CD19 >> BSA >> B lymphoblast hücreleri

Metot D: Altın >> MUA >> EDC/NHS >> Protein G >> CD19 >> BSA >> B lymphoblast hücreleri

Metot E: Altın >> MPS >> EDC/NHS >> Protein G >> CD19 >> BSA>>B lymphoblast hücreleri

Metot F: Altın >> MPS >> EDC/NHS >> CD19 >> BSA >> B lymphoblast hücreleri

Protein G antikorların yüzey üzerinde oryantasyonunu etkileyerek fonksiyonel guruplarının yüzeyde dik durmalarını sağlamakta böylece hücre yakalama oranlarını arttırmaktadır. CD19 antikorunu yüzeye sabitlenerek B lymphoblast hücreleri yakalanmıştır.

3.2 Manyetik Boncuklar ile Hücre Yakalama

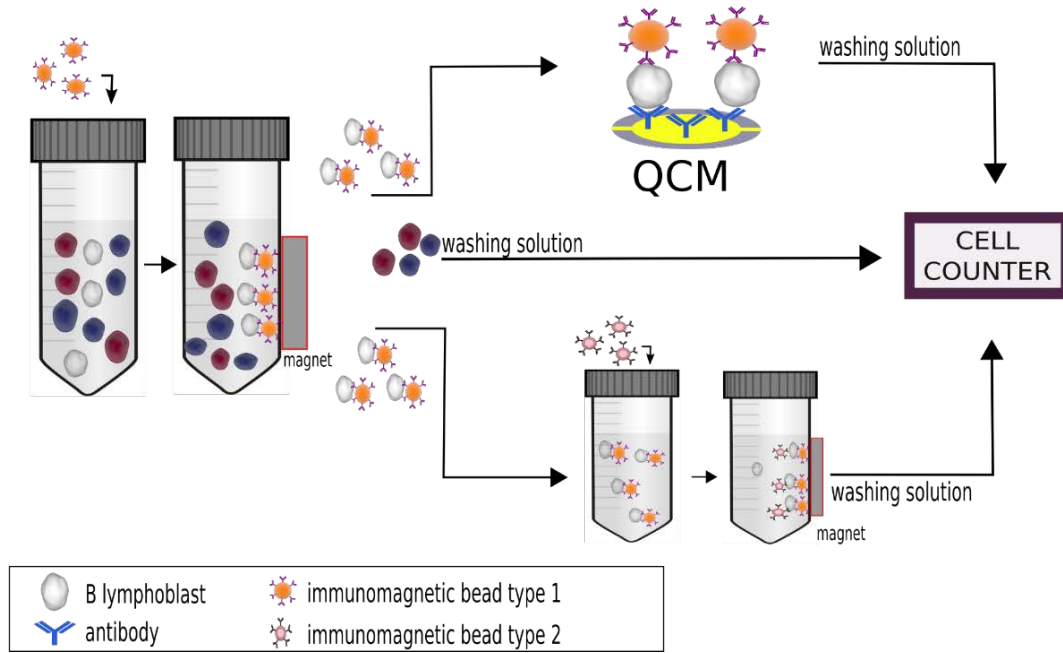
Antikor kaplı manyetik boncuklar ile hücreleri yakalamak için geliştirilen deneyler şekilde özetlendiği üzere üç farklı grup olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültüründen manyetik boncuklar ile yakalanan hücreler QCM sensör yüzeyine bağlanmış farklı tipte antikor ile yakalanarak sandviç yapısı oluşturulmuştur. Manyetik boncuklar ile yakalanan hücreleri saymak için başlangıçtaki hücre sayısı ve yıkama solüsyonlarındaki hücreler sayılarak

yakalama oranları belirlenmiştir. Bu yöntemin takip edilmesinin nedeni ise manyetik boncukların hücre sayım cihazlarını tıkayabilecek olmasıdır. Yakalama oranını arttırmak ve ikinci antikorun hücrede varlığını test etmek için yakalanan hücreler ikinci bir antikor kaplı manyetik boncuk ile yakalanarak “double sorting” gerçekleştirilmiştir (şekil 3.2). Manyetik boncuk deneylerinde üretici firmaların tavsiye ettiği protokollerin verimini belirlemek ve süreçleri optimize etmek için gerçekleştirilen deneylerde kullanılan malzemeler tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3. 1: Deneylerde kullanılan hücre, manyetik boncuk ve antikorlar

Hücre Kültürü	Manyetik Boncuk Üretici Firmaları (parçacıkların çapları)	Manyetik Boncukların kaplı olduğu antikorlar
ATCC CCRF-SB B lymphoblast	Dynabeads (4.5 µm) Miltenyi (120 nm)	CD19 CD45 CD34 CD10 CD38

CD38 ve CD10 ile yapılan deneyler sonucunda hücre yakalama oranlarının çok düşük olduğu belirlenmiştir. Kullanılan sarf malzemedeki kaynaklı bir durum olabileceği düşünülerek yeni malzemeler sipariş edilip deneyler tekrarlanmıştır. Fakat sonuç değişmemiştir bu durumda akım sitometrisi ölçümleri yapılarak hücrelerin CD38 ve CD10 antijeni taşıyıp taşımadıkları incelenmiştir. Hücreler CD38 ve CD10 antijeni barındırmamaktadır, bu durum literatür ile çelişmektedir ileride incelenmesi gereken bir konudur.

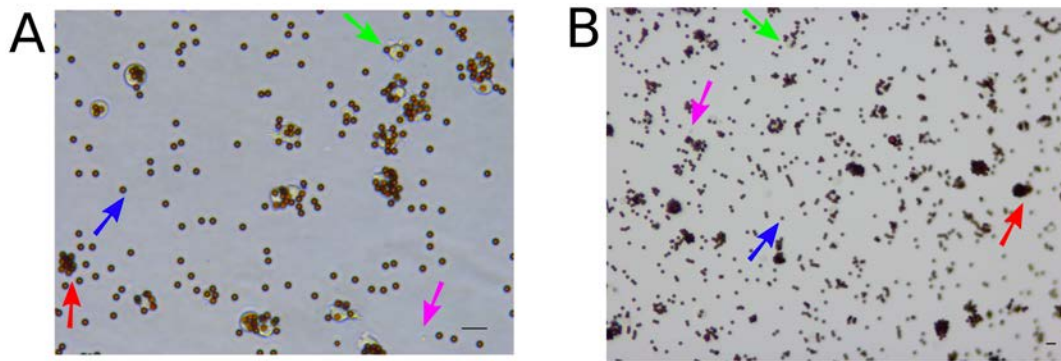


Şekil 3. 2: Manyetik boncuklar ile bağlanma deneyleri; yakalanan hücreler yüzeyi fonksiyonel hale getirilmiş QCM yüzeyine aktarılarak sandviç yapısı oluşturulmuştur. Yıkama solüsyonlarındaki hücreler sayılmıştır. İkinci manyetik boncuklar ile double sorting deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayımları hem manuel olarak hem de MUSE hücre sayım cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3 Görüntü İşleme Teknikleri ile Hücre Sayımı

Mikroskobun 20X ve 40X objektifleri kullanılarak çekilen görüntülerden manyetik boncukların ve hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3'de yer alana görüntülerde mavi oklar hiç bir hücreye bağlanmamış fazla miktardaki manyetik boncukları göstermektedir. Pembe oklar hiç boncuk bağlanmamış hücreleri veya hücre parçalarını göstermektedir. Yeşil oklar manyetik boncuk bağlanmış hücreleri, kırmızı oklar ise manyetik boncuklar ile tamamen kaplanmış hücreleri göstermektedir.



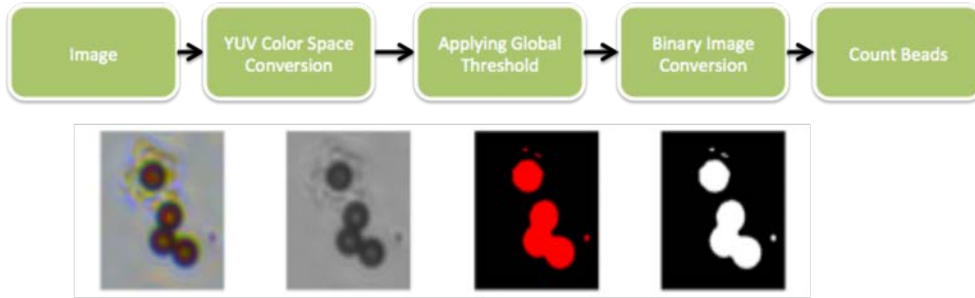
Şekil 3. 3: Kayıt edilen 40X ve 20X görüntüler.

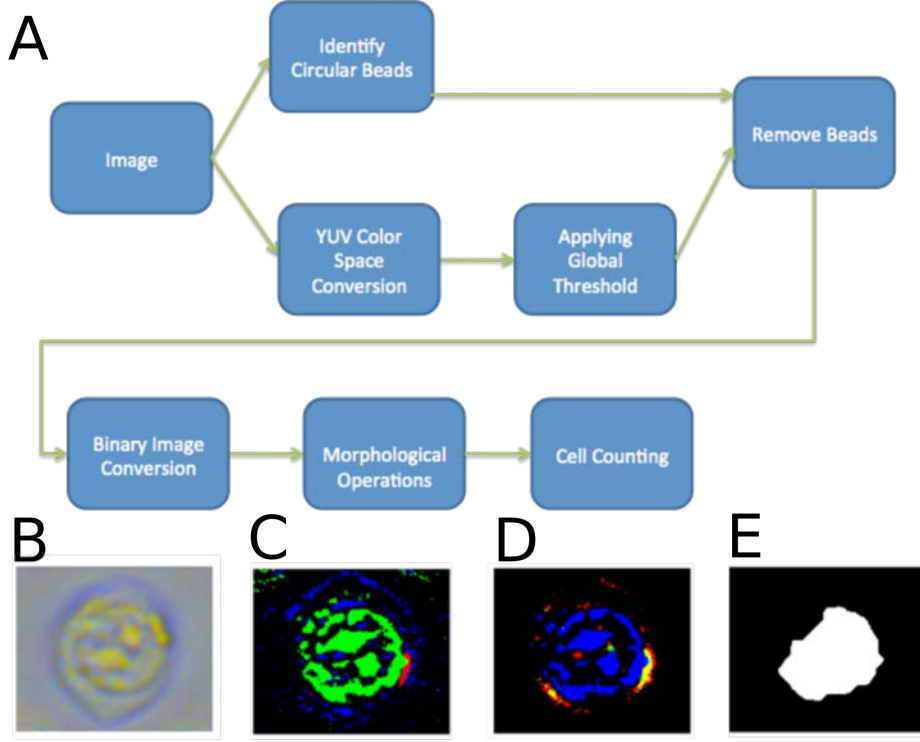
Tablo 3.2’de kullanılan kayıt sisteminin en önemli özellikleri sunulmuştur. 40X objektifin çözünürlüğü daha yüksek iken görüş alanı daha düşüktür. Görüntüleme sistemi ile çip yüzeyi taranacağı için düşük görüş alanının daha uzun süre tarama olarak neticelenecektir.

Tablo 3. 2: 20X ve 40X objektif özellikleri.

	Objektif 20X	Objektif 40X
Nümerik aperture	0.40	0.65
Çalışma Mesafesi (mm)	1.2	0.56
Görüş Alanı (mm ²)	0.278	0.069
Piksel çözünürlüğü (µm/pixel)	0.46	0.23

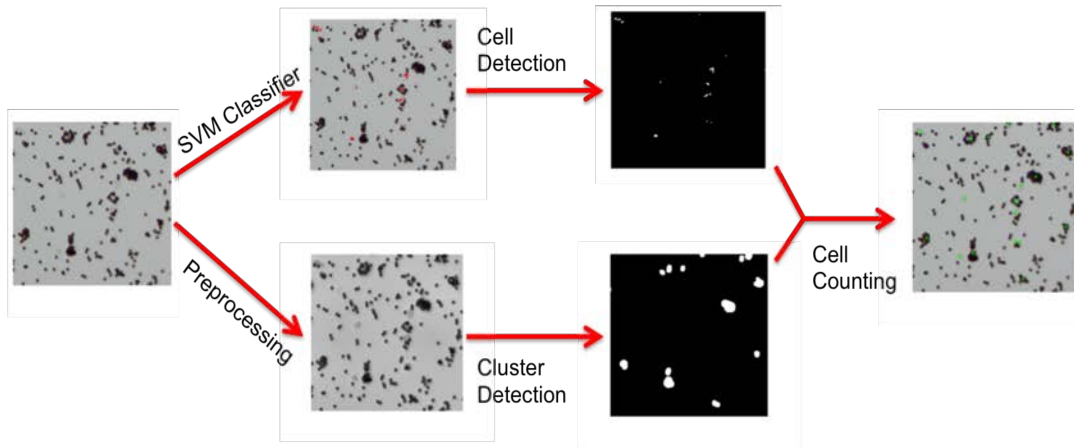
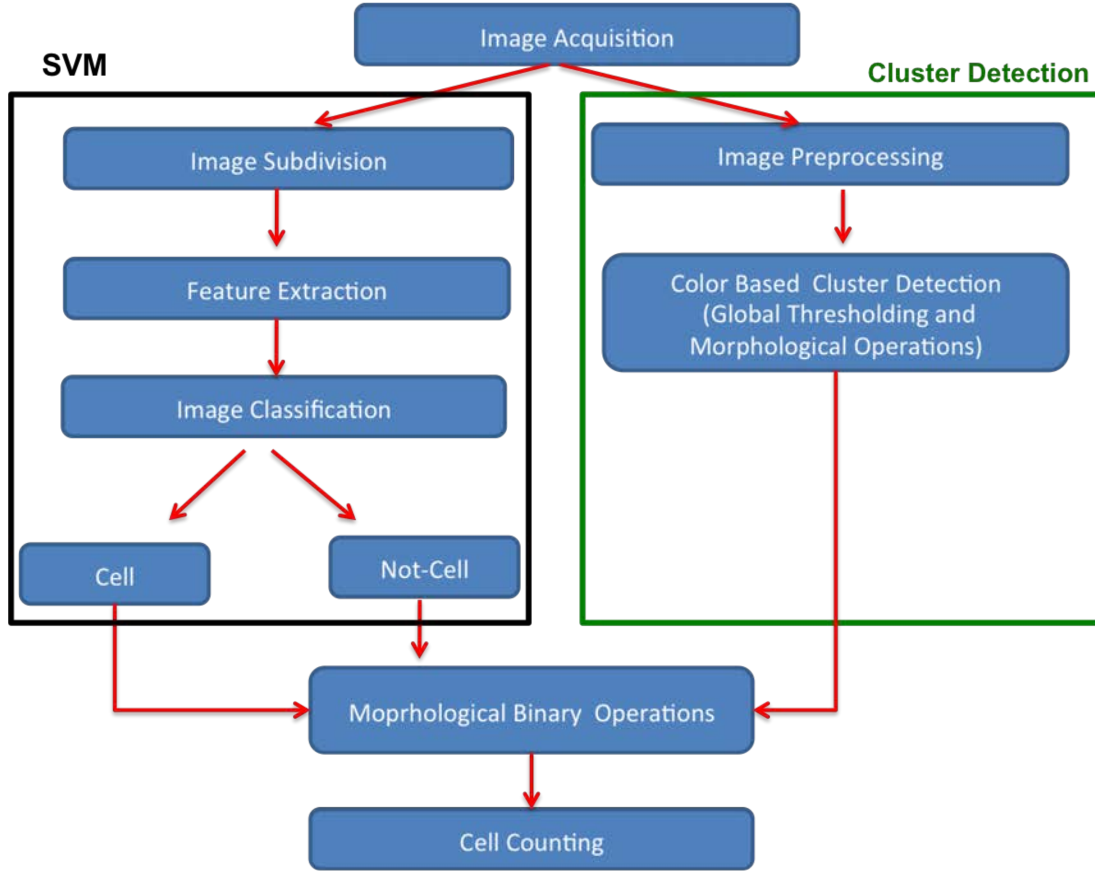
Hem 20X hem de 40X için ayrı algoritmalar geliştirilmiştir. 40X objektifler ile kayıt edilen görüntülerin çözünürlüğü daha yüksek olduğu için hücre ve manyetik boncuk sayımı daha kolay gerçekleştirilmiştir. 40X objektif ile kayıt edilen görüntüler için renk değişimlerini temel alan algoritmalar hücreleri ve manyetik boncukları algılamak için yeterli olmaktadır. Renk temelli metotlarda görüntü önce YUV renk uzayına çevrilmekte daha sonra uygulanan eşik değerler ile renkler belirginleştirilmekte en son olarak görüntüler siyah beyaz görüntülere çevrilerek sayım işlemi gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.4).





Şekil 3. 4: 40X görüntülerden manyetik boncuk ve hücre sayımı için kullanılan algoritmalar

Hücre sayımında ise manyetik boncuklar görüntüden çıkarılmakta ve morfolojik işlemler ile hücre yapıları elde edilmektedir. Bu metotlar 20X için istenen doğrulukta sonuç vermediği için makine öğrenmesine dayalı daha gelişmiş metotları kullanmak gerekmektedir (Şekil 3.5).







Şekil 3. 5: 20X görüntülerden hücre sayımı için geliştirilen algoritmanın ana basamakları

Bunun için Support Vector Machine (SVM) temelli makine öğrenmesi metodu 20X görüntüleri uygulanarak hücre, manyetik boncuk ve manyetik boncuk kümelerinin algılanması ve hücrelerin sayılması gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca geliştirilen ve MRD Biyoçipten alınan görüntüler için görüntü işleme algoritmasına yapılan eklemeler bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.4 Çip Üretimi ve Hücre Kültürü Testleri


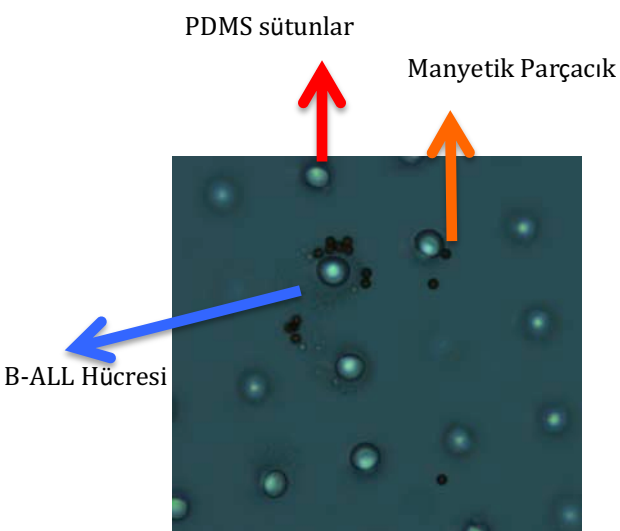
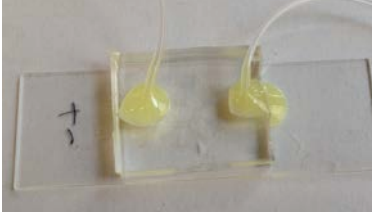
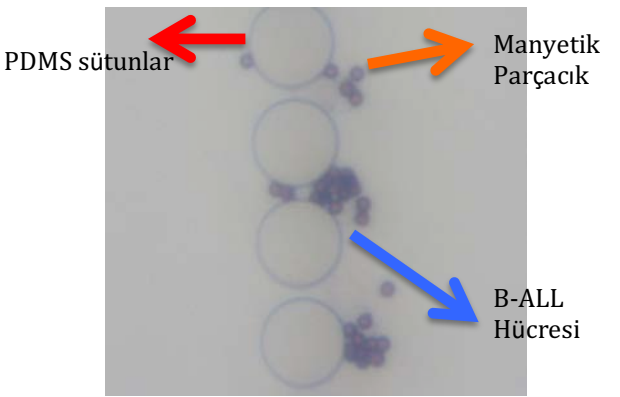
Proje kapsamında farklı çip tasarımları test edilmiş olup sonuçları bulgular kısmında açıklanmıştır. Projede şu ana kadar ürettiğimiz ve hücre kültürü ile denemeler yaptığımız tasarımlar 3 grup olarak sınıflandırılabilir. Altın padler/karolar temiz odada (ODTÜ MEMS) üretilmiştir (Şekil 3.6).

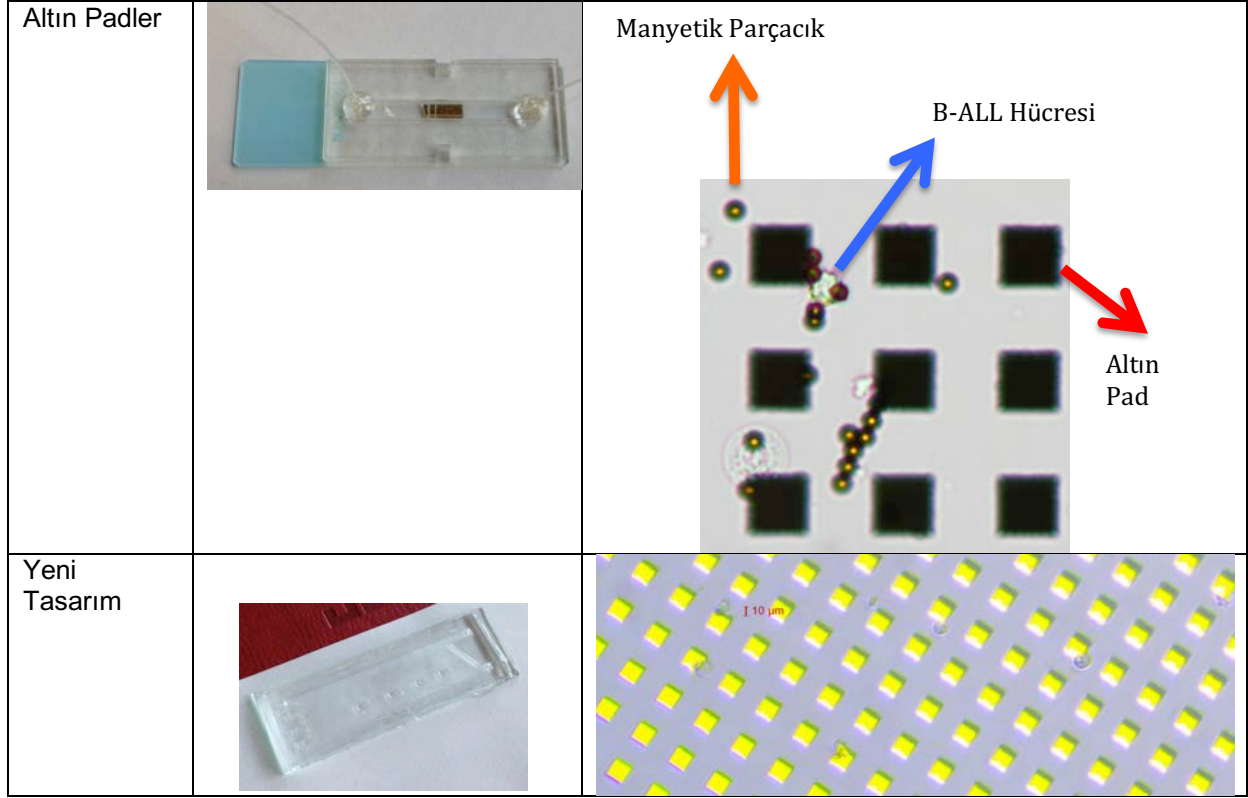
 altın  fotoresist  silikon	
	fotoresist uygulanması
	Altın depozit edilecek yüzeye desen verilmesi
	Yüzeyin altın kaplanması
	Fotoresist kaldırma "lift-off" tekniği ile altın kaplanmayacak kısımların yüzeyden ayrılması ve desenin oluşturulması

Şekil 3. 6: Altın padlerin/karoların üretim aşamaları

Padlerin bulunduğu ortamda bulunan hücrelere bağlanmamış fazla miktardaki manyetik parçacıkları filtrelemek için 2. Dönemde DLD (Deterministic Lateral Displacement) yöntemi ve tek sıra PDMS sütun yöntemi denenmiştir. Bu 2 tasarımında üretim aşamaları proje önerisinde öngörülen her bir filtrenin DRIE metodu ile üretilmesi yöntemine göre çok ucuz ve kolaydır, çünkü bir kere kalıp "mold" üretildikten sonra aynı kalıp kullanılarak PDMS malzemedan birçok cihaz üretmek mümkündür. Ayrıca PDMS malzeme ışık geçiren yapıda olduğundan ışık mikroskobu ile incelenmesi daha kolaydır. DLD çipi Bilkent UNAM'da üretilmiştir. DLD sistemlerin kan akışında yer alan kırmızı ve beyaz kan hücrelerini ayırmada başarılı bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir, elimizdeki hücreleri manyetik parçacıklardan ayırmak için bu yöntem denenmiş akış hızı, kanal basıncı gibi parametrelerin değiştirildiği birçok denemeden sonra başarılı sonuç elde edilememiştir. Bunun en önemli nedeni DLD sistemlerin çalışması için gereken sabit basınç ve akışım lösemi hücrelerinin mekanik yapılarını bozması ve bozulan hücre yapısının sütunlar etrafında toplanmasıdır (Şekil 3.7). Yani akışa dayanıklı kan hücreleri DLD sistemler ile ayrılabilirken lösemi hücreleri daha narin yapıda olduklarından yapıları bozulmaktadır. Benzer gözlem tek sütun filtrelerde de gözlenmiştir. Hücrelerin yapısı uygulanan basınç nedeniyle kolayca bozulmaktadır. Lösemi hücrelerinin mekaniksel özelliklerinin incelenmesi ayrı bir araştırma projesi olabilecek niteliktedir. Bu mekaniksel olarak

narın hücrelerin mikroakışkan kanallarda harekâtı düşük basınç ve düşük hızlarda sağlanmalıdır. DLD ve tek sütun prototiplerden edindiğimiz bilgiler ışığında düşük basınç ve düşük akış hızı gerektiren yeni tasarımımız yapılmış olup denemelerine başlanmıştır (Şekil 3.7). Bu tasarımda sıvı akışı ile beraber manyetik alan da kullanılarak hücrelere bağlanmayan manyetik boncukların ortamdaki uzaklaştırılması denenmektedir. Altın alanların metot D ile fonksiyonel hale getirilmesi ile hücrelerin yakalandığı gösterilmiştir. Proje önerisinde amaçlanan DRIE ile silisyum üzerinde delikler hazırlanması bu metodun uygulanmasında karşılaşılan zorluklardan dolayı iptal edilmiştir. Yüzeyle yakalanan hücreler sabitlenirken fazla miktardaki manyetik boncuklar sıvı akışı ile ortamdaki uzaklaştırılacaktır. Böylece hücreleri yüzeyle yakalamanın önemli bir avantajı ortaya çıkmaktadır DRIE kullanımına gerek kalmamaktadır ve üretim kolaylaşmaktadır.

Yöntem	Çip Tüm Görüntüsü	Çip İçi
Deterministic Lateral Displacement		
PDMS tek sıra sütunlar		



Şekil 3. 7: Şu ana kadar üretilen biyoçip prototipleri, mikro manyetik parçacık çapı 4,5 µm'dur.

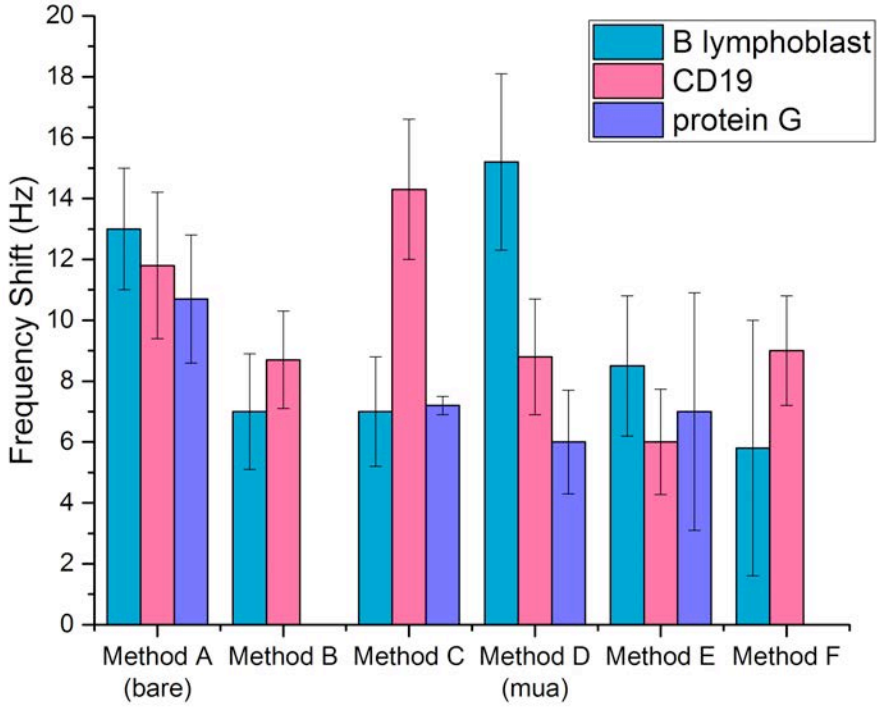
4. Bulgular

4.1 Yüzey fonksiyonelleştirme metotları

Bu alanda yapılan çalışmalar Electroanalysis (IF 2.85) dergisinde yayınlanmıştır:

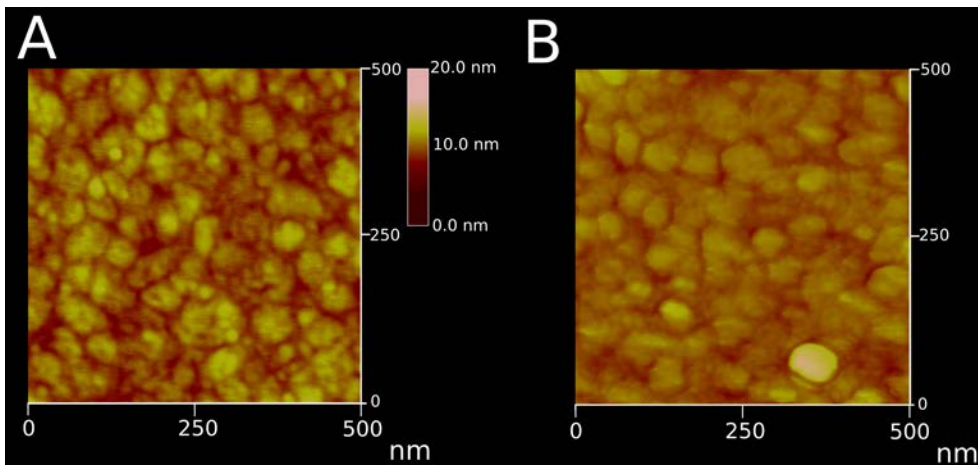
Quartz-Crystal Microbalance Measurements of CD19 Antibody Immobilization on Gold Surface and Capturing B Lymphoblast Cells: Effect of Surface Functionalization, Kutay Icoz, Mehmet Cagri Soylu, Zeynep Canikara, Ekrem Unal, Electroanalysis, 2018, 30, DOI: 10.1002/elan.201700789

Karşılaştırılan altı metot için protein G, CD19 ve B lymphoblast hücreler için QCM ölçüm sonuçları şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1: Test edilen metotlar için B lymphoblast, CD19 antikor ve protein G için QCM frekans kaymaları

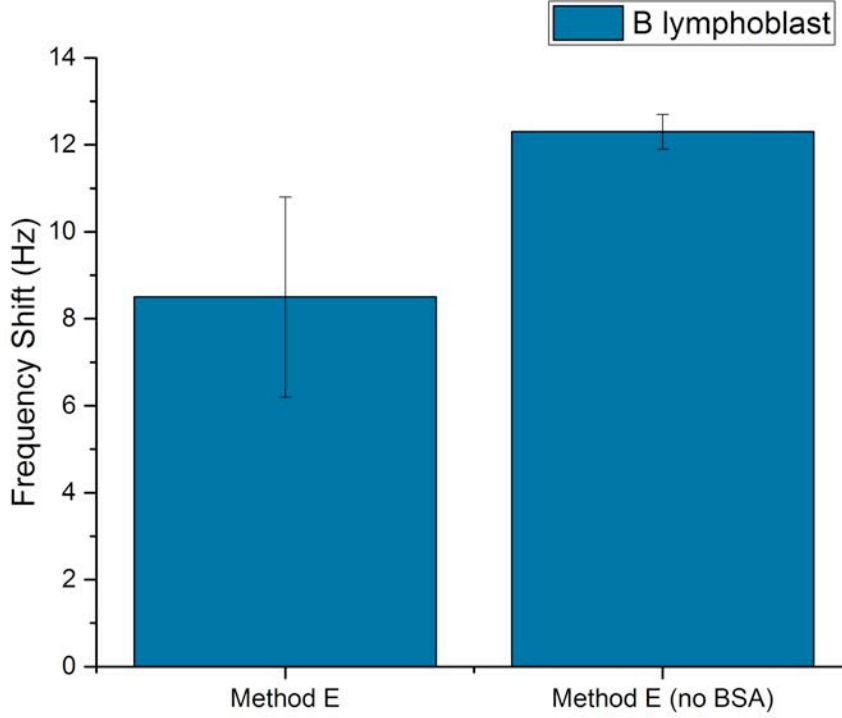
Bu ölçümler bize metot D'nin en yüksek oranda hücre yakalama oranına sahip olduğunu göstermektedir. QCM sonuçlarını atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ölçümleri ile kontrol etmek için yapılan ölçümlerde ilk olarak protein G katmanı hem MUA hem MPS üzerinde analiz edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2: Protein G tabakasının AFM analizi A) MPS ve B) MUA kaplamaları.

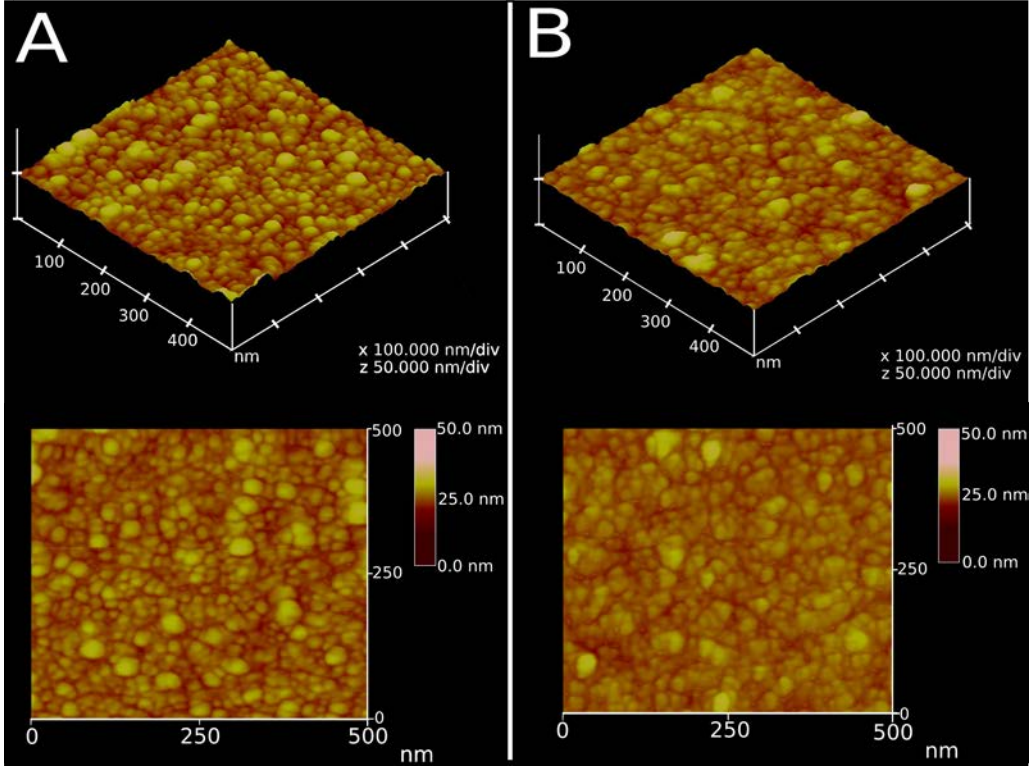
AFM ölçümleri QCM ölçümleri ile tutarlı olup protein G katmanı MPS üzerine daha çok bağlanmaktadır. Fakat hücre bağlanması MUA üzerinde daha çoktur. Ölçümler sonucu çıkan

bu durumu incelemek ve farkın neden kaynaklandığını araştırmak için bazı ek deneyler yapılmıştır. Yüzeyleri pasifleştirmek için kullanılan BSA'nın hücre bağlanmasına etki edebileceği düşünülerek MUA ve MPS kaplı yüzeyler için AFM ve QCM ölçümleri yapılmıştır (şekil 4.3).



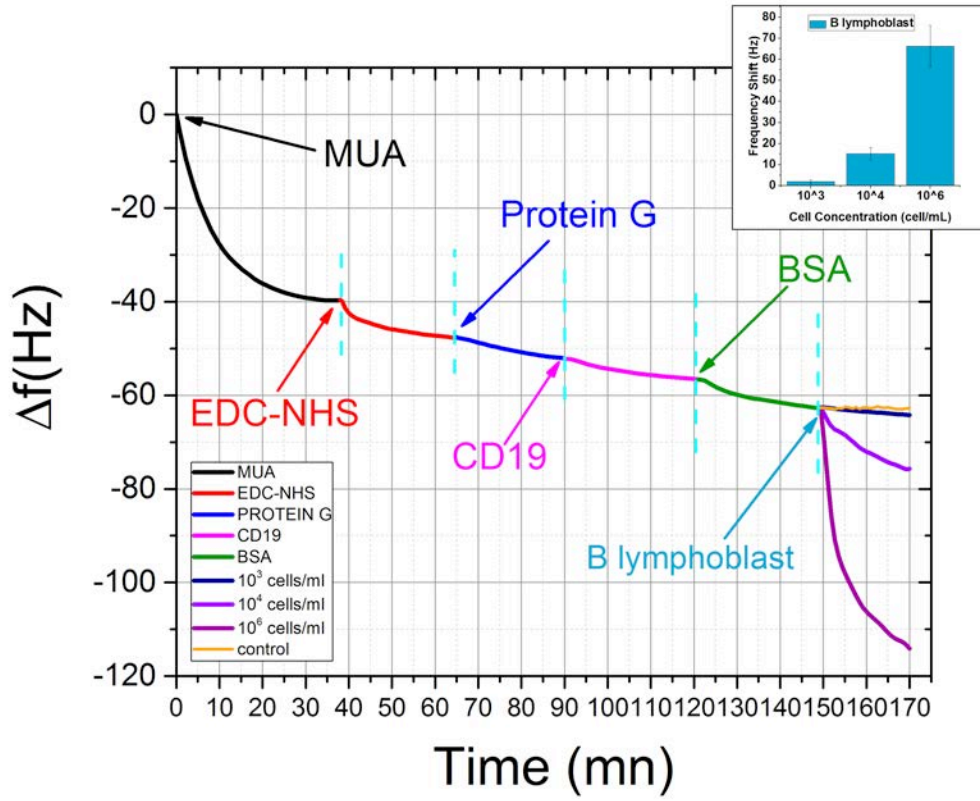
şekil 4. 3: Metot E'nin BSA ve BSA olmadan QCM frekans kaymaları

BSA olmadığı durumda daha çok hücre bağlandığı görülmektedir bu durum BSA'nın MPS kaplı yüzeyde MUA kaplı yüzeye göre antikorların hücelere bağlanma etkisini azalttığı sonucunu çıkarmaktadır. Bu durumu AFM ile de kontrol etmek için BSA katmanı MUA ve MPS kaplı yüzeylerde ölçülmüştür (şekil 4.4).



Şekil 4. 4: BSA katmanının AFM analizi A) MPS and B) MUA kaplamaları

Bu ölçümler sonucunda MPS kaplı yüzeyde BSA'ların daha çok girintili çıkıntılı bir yüzey oluşturduğu bu yüzden de hücre bağlanmasını zorlaştırdığı sonucu çıkarılmıştır. Optimum metot olarak belirlenen MUA yüzeyinde konsantrasyon deneyleri de gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5). Böylece metot D ile kaplanmış QCM sensörü ile minimum ölçülebilen hücre sayısı 10^3 hücre/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 5: Metot D nin farklı hücre konsantrasyonları için uygulanması sonucu QCM frekans kaymaları

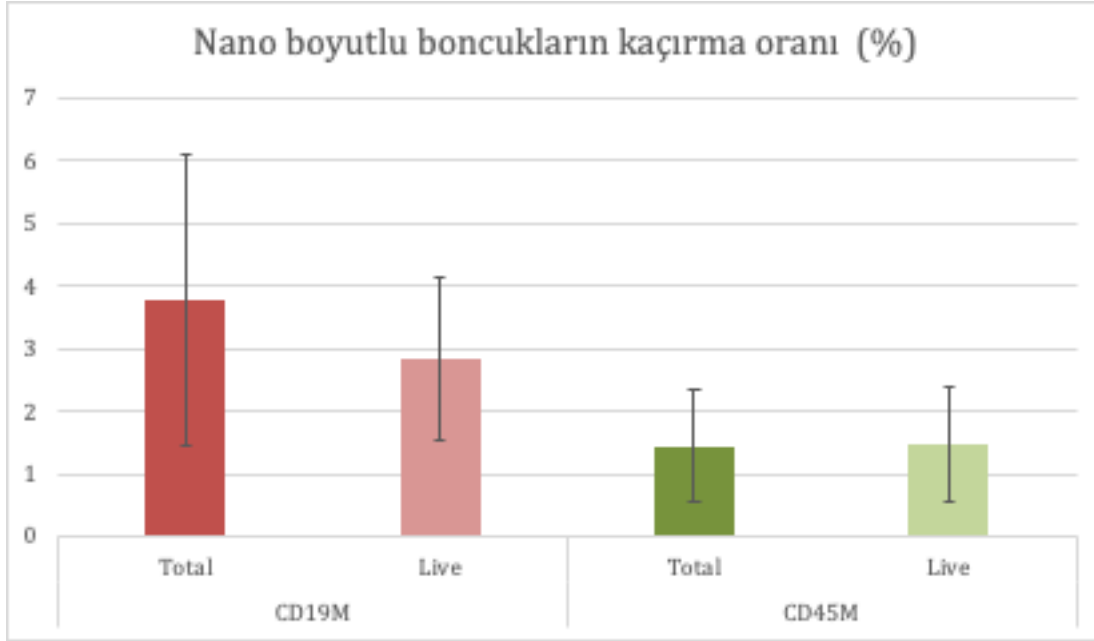
Yüzeyi fonksiyonel hale getirmek için kullanılan metot D'nin farklı hücre konsantrasyonları ile test edilmesi ile biyoçip için gerekli olan yüzey kaplama metodu belirlenmiştir.

4.2 Manyetik Boncuklar ile Hücre yakalama deneyleri

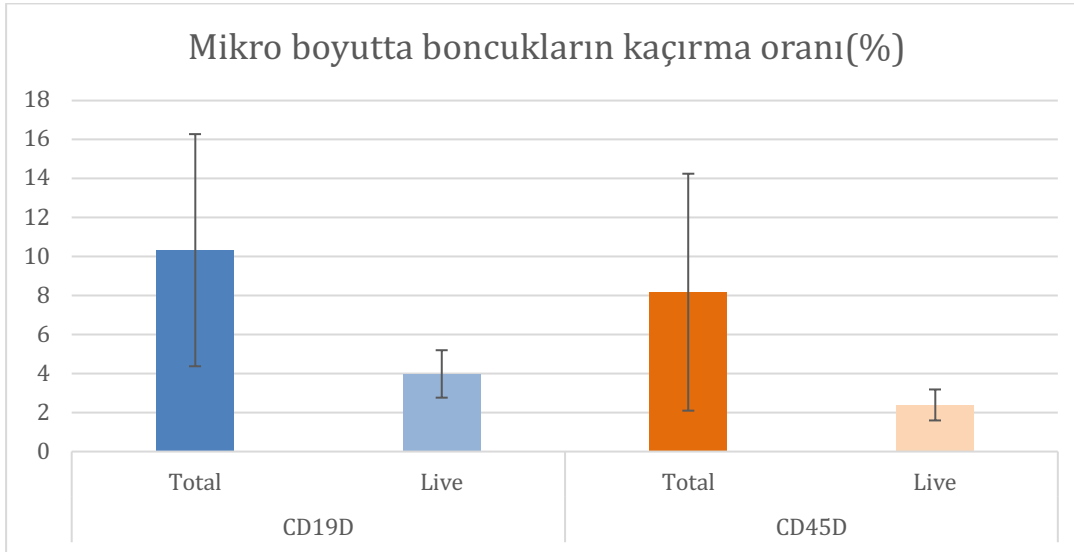
Bu alanda yapılan çalışmalar Biotechnology Progress (IF 1.94) dergisinde yayınlanmıştır:

Capturing B type Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Using Two Types of Antibodies, Kutay Icoz, Tayyibe Gercek, Aysegul Murat, Servet Ozcan, Ekrem Unal, Biotechnology Progress, 2018, DOI: 10.1002/btpr.2737

Ayrıca altın yüzeylere sabitlenmiş yüzey reseptörlerine bağlanma ve işaret kuvvetlendirme deneyleri için farklı manyetik platformlar yapılmıştır. İlk olarak nano boyutlu manyetik parçacıkların hücre yakalama oranları incelenmiş hem toplam (total) hücre sayıları hem de canlı (live) hücreler için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerde %98 civarı yakalama oranlarına ulaşılmıştır. Şekil 4.6'da CD 19 ve CD 45 kaplı nano boyutlu manyetik boncuklar ile süreç optimizasyonu yapıldıktan sonra gerçekleştirilen hücre kaçırma oranları yer almaktadır. %2'den daha az kaçırma oranı ile hücreler yakalanabilmektedir. Şekil 4.7'de ise aynı deneyleri mikro boyuttaki manyetik boncuklar ile gerçekleştirilmiştir. CD45 için %2 den biraz fazla kaçırma oranı bizlere hücreleri yakalamak için nano boyutlu manyetik boncukların biraz daha iyi performans gösterdiğini kanıtlamaktadır.

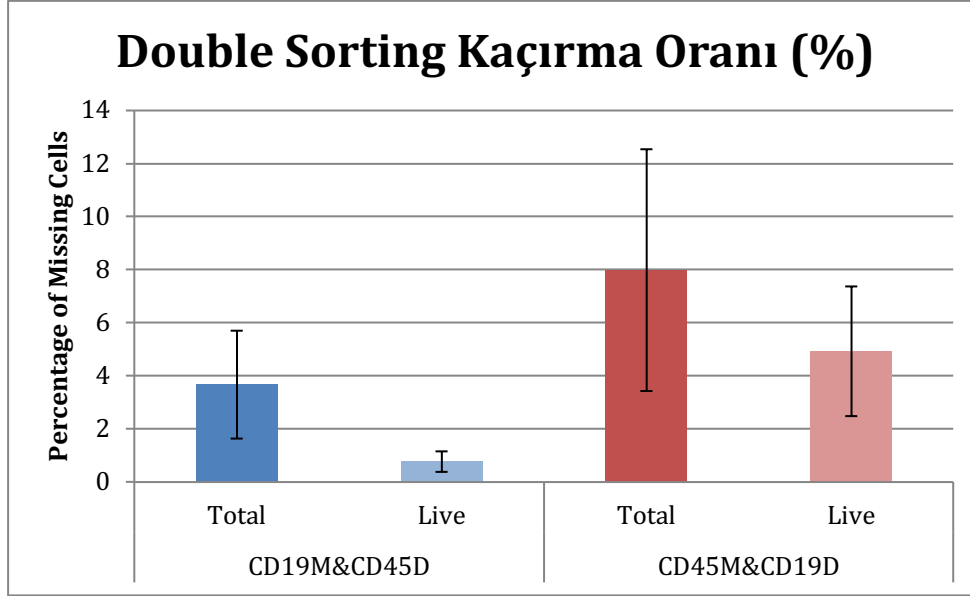


Şekil 4. 6: CD19 ve CD45 kaplı nano boyutlu manyetik boncukların hücre kaçırma oranı



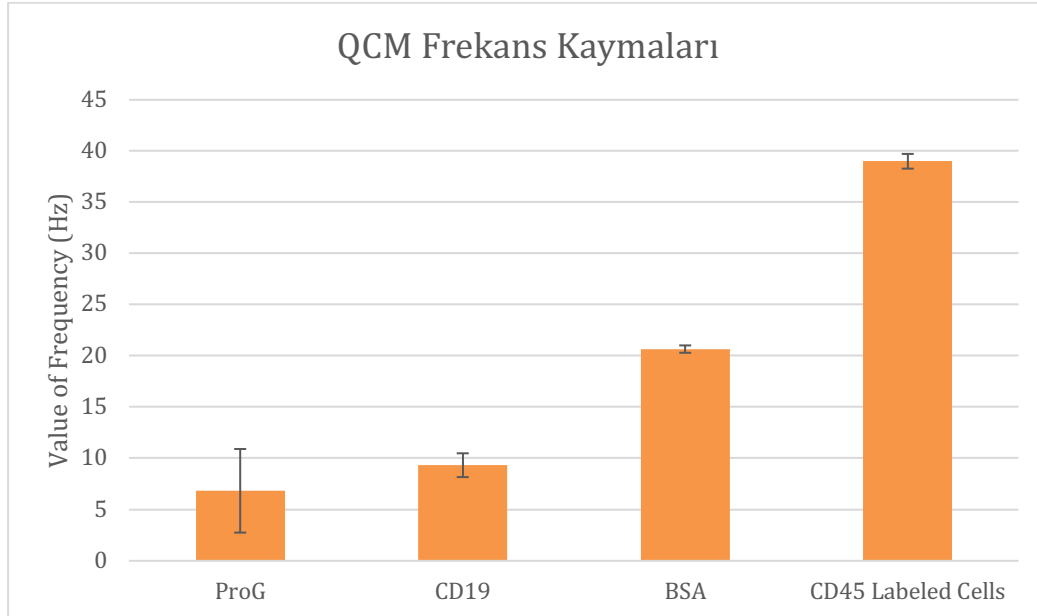
Şekil 4. 7: CD19 ve CD45 kaplı mikro boyutlu manyetik boncukların hücre kaçırma oranı

Nano boyutlu boncuklar optik mikroskop altında görülememektedir, projenin amacı hücreleri optik mikroskop yardımıyla saymak olduğu için mikro boyutlu boncukların hücrelere bağlanma oranları irdelenmelidir. Bu amaçla yapılan deneylerde hücre yakalama oranları %96-%98 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 8: Nano ve mikro boyutlu manyetik boncukların çift yakalama (double sorting) hücre kaçırma oranları

MRD'nin takip edilmesi için hedefimiz üç adet antikorun aynı anda hücrede olup olmadığı kontrol etmekte bunlardan iki tanesi manyetik boncuklar ile bir tanesi de altın yüzeylere tutturulmuş olarak hücrelere bağlanacaktır. İki adet manyetik boncuk ile hücreleri yakalamak için double sorting deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8). İlk olarak nano boyutlu manyetik boncuklar ile hücreler yakalanmış daha sonra farklı antikor ile kaplı mikro boyutlu manyetik boncuklar hücrelere bağlanarak hücrelerin iki tip antikor ile tespit edilmesi sağlanmıştır.



Şekil 4. 9: Nano manyetik boncuk ile yakalanan hücreleri QCM yüzeyde sabitlenmiş antikorlar ile yakalanması sonucu frekans kaymaları.

Manyetik boncuklar ile yakalanan hücrelerin yüzeyde sabitlenmiş antikorlar ile yakalanması deneyleri QCM cihazı ile test edilmiştir (Şekil 4.9). Bu amaçla nano boncuklar ile yakalanan hücreler, yüzeyi metot D ile fonksiyonel hale getirilmiş QCM sensörüne aktarılmış ve bağlanma frekans değişimi olarak incelenmiştir. Yüzeyde oluşturulan sandviç yapısı QCM ölçümleri kanıtlanmıştır.

4.3. Görüntü İşleme Metotları ile Hücre Sayımı

Bu alanda yapılan çalışmalar Biomedical Signal Processing And Control (IF:2.78) dergisinde yayınlanmıştır:

Automated quantification of immunomagnetic beads and leukemia cells from optical microscope images,

Fatma Uslu, Kutay Icoz, Kasim Tasdemir, Bulent Yilmaz, Biomedical Signal Processing and Control, 49(2019), 473-482

Hücre sayımı ve manyetik boncuk sayımı için hata oranı (error rate)

$$E = \left| \frac{\tilde{N} - N}{N} \right|$$

olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar tablo 4.1'de özetlenmiştir. Manyetik boncuk tespiti yüksek doğruluk ile yapılabilmektedir.

Tablo 4. 1: Ortalama manyetik boncuk hata oranı 40X ve 20X objektifler.

	40X Images	20X Images
E	0.0171	0.0384

Hücre sayımı için yapılan analizler sonucu 40X ve 20X objektifler için görüntü işleme metotlarının performansını ölçmek için gereken önemli parametreler tablo 4.2' de özetlenmiştir.

Tablo 4. 2: Algoritmaların ortalama hücre sayımı performansı

	40X Objektif	20X Objektif
Precision	0.916	0.797
Recall	0.815	0.883
Specificity	0.749	0.358
False Negative Rate	0.184	0.116
F-Measure	0.861	0.833
Detection Error	0.134	0.159

Algoritmaların 40X için daha iyi sonuç vermesi 40X görüntülerin daha net olmasından kaynaklanmaktadır. Support Vector Machine (SVM) yerine alternatif metotlar Neural Networks (NN) ve Random Forest (RF) metotlarının performansı elde edilen görüntülerle beraber WEKA programına uygulanarak karşılaştırılma yapılmıştır (tablo 4.3).

Tablo 4. 3: SVM, NN ve RF metotlarının performanslarının karşılaştırılması

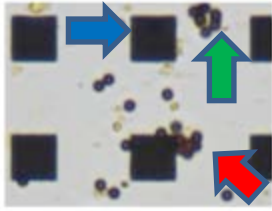
Hücre Algılama			
	SVM (Support Vector Machine)	NN (Neural Network)	RF (Random Forest)
Ortalama Accuracy	82.5372	76.6250	87.4058
Ortalama TP Rate	0.825	0.766	0.874
Ortalama FP Rate	0.174	0.233	0.126
Ortalama Precision	0.833	0.789	0.879
Ortalama Recall	0.825	0.766	0.874
Ortalama F-Measure	0.823	0.758	0.873
Ortalama MCC	0.658	0.556	0.753
Ortalama ROC Area	0.825	0.848	0.927
Ortalama PRC Area	0.778	0.842	0.921

Random Forest metodu SVM ve NN metotlarına göre daha doğru şekilde hücreleri algılama oranına sahiptir. Bu ölçümler bize RF metodunun ilerisi için kullanılabileceğini göstermektedir. RF metodu ile 20X objektiflerden doğruluk %87 seviyesindedir. Eğer çip yüzeyi tarama hızı sorun olmayacak nitelikte ise 40X objektif kullanılarak %90 üzeri doğrulukta algılama ve sayım yapılabilmektedir. Bu oranları iyileştirmenin mümkün olduğu görüntülerin incelenmesi ile ortaya çıkmaktadır. Doğruluk oranının düşük olduğu görüntülerde net olmayan köşeler mevcuttur. Geliştirilen algoritmalar bu net olmayan kısımlarda düşük performans göstermektedir. Bunun önlenmesi için görüntülerin standart olarak netlik sorunu olmayacak

şekilde kayıt edilmesi gerekmektedir. Netlik sorunu olan görüntüleri, görüntü işleme teknikleri ile hata oranını azaltacak şekilde işleme tabi tutmak şu an üzerinde durduğumuz bir konudur. Manyetik parçacıkların ve hücrelerin mikroskop görüntülerinden algılanması için yapılan çalışmaların bir sonraki aşaması çip içindeki görüntülerin işlenmesidir. Çip içerisinde kare şeklindeki karoların tespiti yeni bir problem olarak görüntülerde yer almaktadır. Buradaki temel amaç, uzman yardımı olmadan tam otomatik bir şekilde immünomanyetik parçacıkların tüm resimdeki sayısını ve karolara göre konumunu tespit etmektir.

Mikroskoptan alınan tipik bir biyoçip görüntü parçası örneği Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi mikro karolar düzenli ve sıralı bir şekilde dizilmiş olarak bulunmaktadır. Fakat immünomanyetik parçacıklar resmin geneline saçılmış olarak görülmektedir. Görüntü işleme açısından bu parçacıklar üç farklı şekilde incelenebilir:

- 1-) Tek başına izole şekilde bulunan parçacıklar (mavi ok ile gösterilen),
- 2-) Diğer birçok parçacıklarla birleşerek bir yumak şeklinde bulunanlar (yeşil ok ile gösterilen),
- 3-) Karolara yapışık halde bulunanlar (kırmızı ok ile gösterilen).



Şekil 4. 10: Biyoçip görüntü örneği. Mavi ok izole şeklindeki parçacığı, yeşil ok yumak şeklinde bulunan parçacığı ve kırmızı ok karoya yapışık halde bulunan parçacığı göstermektedir.

Görüntü işleme açısından bu analizin çeşitli kolaylıkları ve zorlukları bulunmaktadır. Kolaylık olarak şunlar sayılabilir:

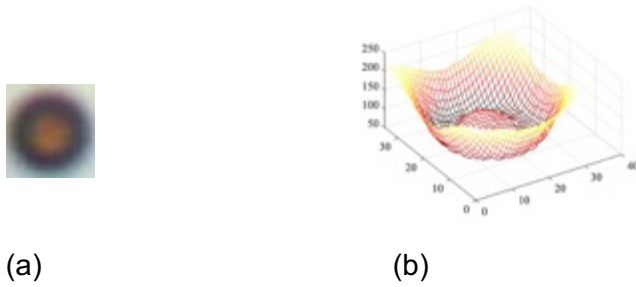
- 1-) Görüntülerin arka planının ön plan nesnelere göre oldukça açık renkte olması ve yüksek bir kontrastlık oluşturması,
- 2-) Görüntünün aydınlatılmasının dengeli ve oldukça düz olması,
- 3-) İmmünomanyetik parçacıkların yuvarlak şekilde ve eşit boyutta olmaları; karoların da eşit boyutta ve parçacıklardan farklı olarak düzenli dağılmış olmaları,
- 4-) Görüntülerde sorun oluşturabilecek ciddi bir bulanıklık ya da gürültünün bulunmamasıdır.

Bunlara karşılık, kümelenen parçacıkların şekillerinin kaybolması, karolara yapışan parçacıkların bir kısmının görünmemesi, bazı hücre parçacıklarının oldukça opak ve koyu renkte olup parçacıklarla karıştırılabilecek özellikte olmaları, az sayıda olsalar da bazı parçacıkların daha bozuk yapıda olup hücre parçacıklarına ya da kabarcıklara benzemeleri, resmin çerçevesiyle kesişen karoların farklı boyutlarda olmaları zorluklar olarak sayılabilir.

İzole olarak bulunan parçacıkların konumlarının tespiti için düzgün şekilli ve yuvarlak görünmeleri sebebiyle akla ilk gelen yöntem olarak Hough Dönüşüm tabanlı bir yuvarlak tespiti

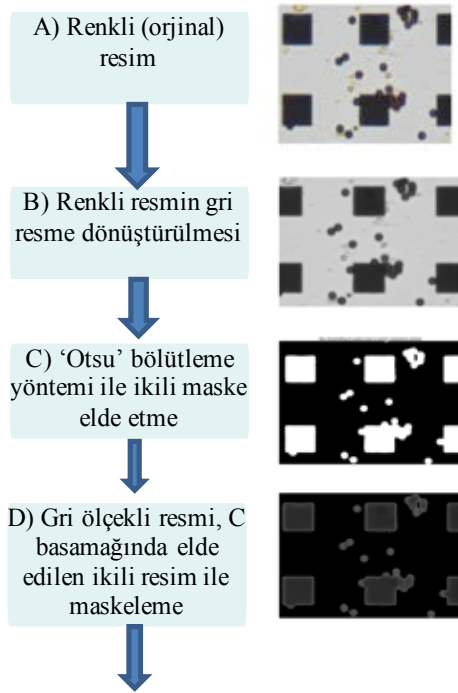
yöntemi (Meyer 1994) kullanmak olacaktır. Görüntüler üzerinde denenen bu yöntem, izole parçacıklarda iyi sonuçlar verse de hücrenin parçacığa bağlanması, kümelenme olması, parçacığın karolara yapışmış olması gibi durumlarda parçacıkları kaçırmaktadır.

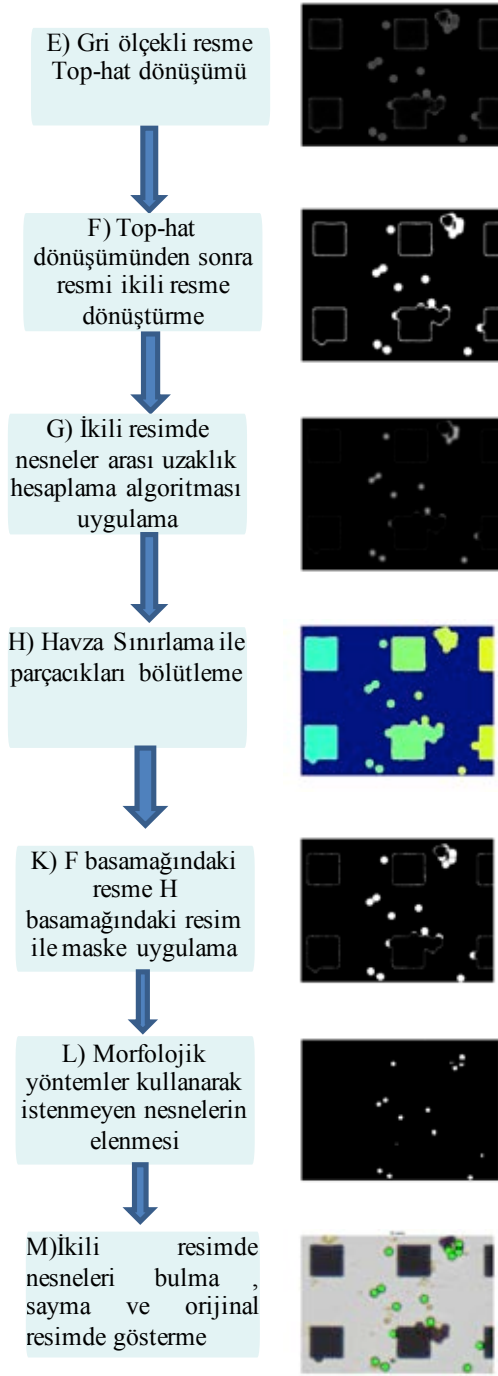
Parçacıkların düzgün yuvarlak şekilde olmalarının yanında gözlenen bir diğer özellikleri ise merkezlerinin açık renkte, çeperine yakın kısımların ise koyu renkte olmasıdır (Şekil 4.11 a). Bu da görüntü üç boyutlu topoloji olarak düşünüldüğünde Şekil 4.11b'deki gibi etrafında çember şeklinde çukur olan küçük tepeciklerin olduğunu göstermektedir. Bu bulgudan faydalanarak Havza Sınırlama (Watershed) yönteminin yararlı olacağı düşünülmüştür.



Şekil 4. 11: Parçacık resminin (a) üç boyutlu topolojik görüntüsü çukur içinde bir tepecik oluşturuyor (b).

Aşağıdaki Şekil 4.12, kullanılan algoritmanın genel yapısını vermektedir.





Şekil 4. 12: Resimdeki yalnız ve kümelenmiş immünomanyetik parçacıkları bulma algoritmasının akış diyagramı ve ilgili görüntüler

20x objektif ile alınan mikroskop görüntüleri üç kanallı RGB resimlerdir. Şekil 4.12'deki şemada verildiği gibi ilk olarak, resim gri seviye resime (I_{gri}) dönüştürüldü. Immünomanyetik parçacıklar ve karolar, açık renkteki arka plan görüntüsünden oldukça farklı tonda olduğu için evrensel eşikleme ile bölütleme uygulandı.

$$I_{maske}(x, y) = \begin{cases} 1, & \text{eğer } \tau_{otsu} > I_{gri}(x, y) \\ 0, & \text{diğer} \end{cases} \quad (1)$$

Denklem (1) de Otsu metodu (Otsu 1979) uygulanarak bulunan eşik değeri τ_{otsu} olarak, piksel pozisyonları (x, y) olarak gösterilmiştir. Elde edilen ikili resimde ($I_{maske}(x, y)$) sadece karo alanlar ve immünomanyetik parçacıklar bulunmaktadır (Bkz. 4.12C). Böylece istenmeyen nesnelere (hücreler, hücre parçaları, arka plan, vs.) maske uygulanarak atılabilecektir. Sonrasında bu ikili resim maske olarak kullanılıp gri ölçekli resme uygulandı ve 4.12D 'de görüldüğü gibi gri ölçekli resimde sadece karo alanlar ve immünomanyetik parçacıkların olduğu alanlar elde edildi.

Karo alanları da görüntüden atabilmek için, parçacıkların karolardan çok daha küçük nesnelere oluşundan faydalanıldı. Morfolojik işlemlerden Top-Hat dönüşümünde, yapılandırma elemanı (Structuring Element) olarak parçacıkların yarı çapı (~10 piksel) ile karoların içine sığabilecek en büyük dairenin yarı çapı (~50 piksel) arasında bir büyüklükte (20 piksel) disk şekli seçildi. Böylece uygulanan Top-Hat dönüşümü **Error! Reference source not found.**'deki gibi karoların büyük kısmını elemiş oldu (I_{TopHat}).

Gereksiz nesnelere ve karoların büyük kısmının resimden atıldığı, resmin genelde Havza sınırlama yöntemi (Meyer 1994) ile bölütleme yapmadan önce uygulandığı gibi uzaklık haritası çıkarıldı. ($I_{uzaklık}$) Uzaklık ölçümü olarak Euclidean yöntemi kullanıldı. Devamında uygulanan Havza sınırlama bölütleme yöntemi ile resimdeki nesnelere (O_l) etiketlendi.

$$O_l \leftarrow \text{Havza Sınırlama } (I_{uzaklık}) \quad (2)$$

Bu denklemde $l = \{1, 2, \dots, N\}$ etiketlenen nesnenin indeksini göstermektedir. Havza sınırlama uygulamanın amacı, resimde birleşik olarak görünen parçacıklar arasında sınır çekebilmektir. Çünkü çok fazla sayıda parçacık birleştiğinde karodan daha fazla yer kaplayarak morfolojik işlemlerle elemeyi zorlaştırmaktadır.

Etiketli nesnelere (O_l) olduğu yerlerde olan ve B_{TopHat} resminde pozitif olan pikseller alınarak, parçacıkların birbirinden ayrılmış olduğu Şekil 4.12K 'de görülen $B_{ayrık}$ resmi elde edilmiştir.

$$B_{ayrık} = B_{TopHat} \cap \{O_l | l = \{1, 2, \dots, N\}\} \quad (3)$$

Elde edilen $B_{ayrık}$ ikili resimde istenmeyen karo kenarları hala mevcuttur (Şekil 4.12K). Bu küçük istenmeyen nesnelere ve diğer gürültüleri temizlemek için erozyon morfolojik işlemi uygulandı ve B_{izole} ikili görüntüsü elde edildi (Şekil 4.12L). İzole olarak bulunan yalnız parçacıkların konumları bu yöntemle bulundu.

Yukarıda anlatılan algoritma, bazı karo alanlara yapışmış olan bazı immünomanyetik parçacıkları bulamamaktadır (Şekil 4.12M). Bu sorunu gidermek için karoya yapışık parçacık kümesini tespit eden yeni bir kısım eklendi. Karoya yapışık parçacık kümesini tespit eden algoritmanın akış diyagramı Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4. 13: Resimdeki karolara bağlanmış toplam immünomanyetik parçacıkların sayısının ve konumunun kestirimi



Şekil 4. 14: Karoya bağlı immünomanyetik parçacık örneği

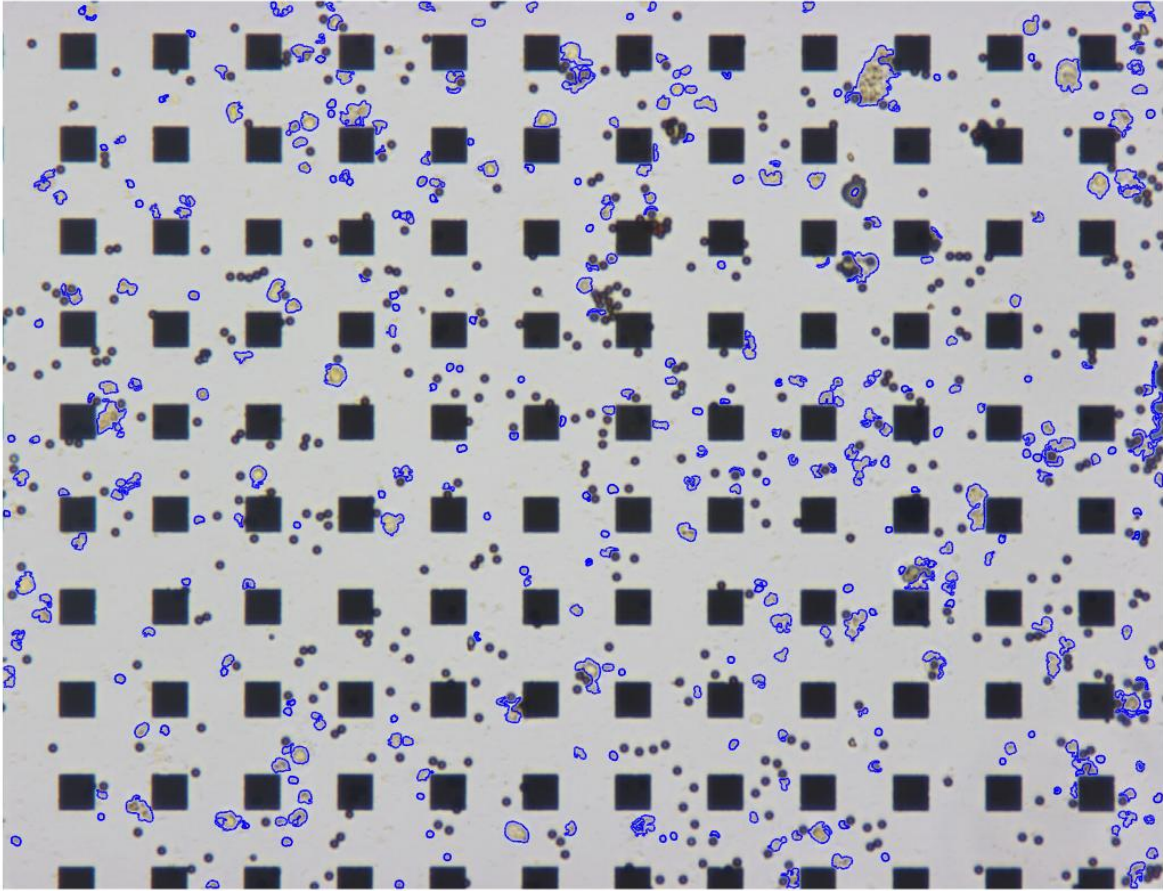
Birinci basamakta Otsu ile bölütleme yapılarak yine ön plan nesnelere elde edildi. İkinci basamakta elde edilen ikili resme, sadece karolar ve karolara bağlı immünomanyetik parçacıkları (Şekil 4.14) elde etmek için karo alanlarının boyutundan küçük, immünomanyetik parçacıkların alanından büyük 20 piksel yarıçapında bir disk yapı elemanı ile açma ile yeniden oluşturma (opening by reconstruction) morfolojik işlemi uygulandı. Üçüncü basamakta resimdeki nesnelere bulunarak her birinin konumu, alanı ve toplam sayısı kestirildi. Dördüncü basamakta tek bir karo alanının ve tek bir immünomanyetik parçacığın alanı hesaplandı ve beşinci basamakta resim üzerinde bulunmuş her bir nesneden tek bir karonun alanı çıkarıldı ve kalan alan hesaplandı. Böylece kalan alan yapışık parçacıkların alanını göstermekteydi. Altıncı basamakta kalan alan tek bir immünomanyetik parçacığın alanına bölünerek ortalama olarak karoya bağlanmış immünomanyetik parçacığın sayısı kestirildi. Son basamakta ise ilk kısımda verilen algoritma çıktısı ile bu kısımdaki çıktılar toplanarak bir resimdeki toplam immünomanyetik parçacık sayısı kestirildi. Geliştirilen algoritmanın deney sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. Görüldüğü üzere bütün resimlerde %90 üzerinde bir hassasiyet ve %94 üzerinde hatırlama oranı yakalanmıştır. Kullanılan teknikler ile resimde yalnız bulunan, birbiri ile bağlanarak küme oluşturan ve resimdeki karolara bağlanarak bulunan immünomanyetik

parçacıkların toplam sayısı bulunmuş ve Tablo 4.4'de verilen sonuçlara göre, verilen çip resmi üzerinde bulunan toplam immünomanyetik parçacık sayısı ortalama %93 F-ölçütü başarıyla ve %2 yanlış negatif tespit oranı ile bulunabilmektedir.

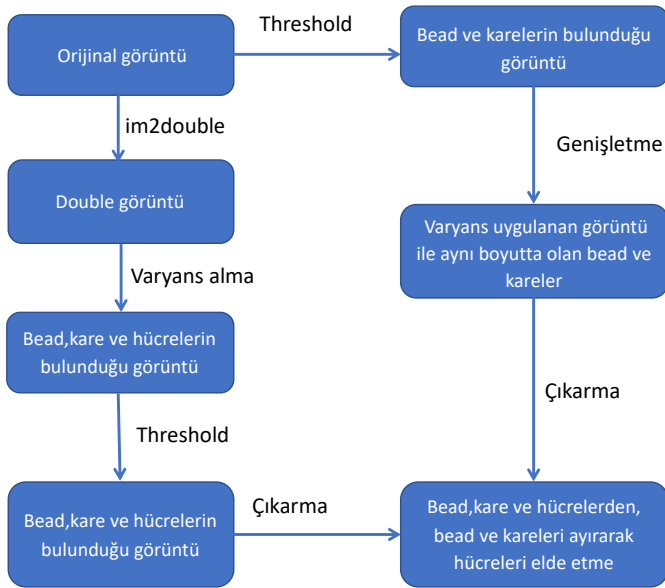
Tablo 4. 4: MANYETİK PARÇACIK SAYMA SONUÇLARI

	Doğru Pozitif	Yanlış Pozitif	Yanlış Negatif	Hassasiyet	Hatırlama	Yanlış negatif oranı	F-ölçüm
Resim1	496	25	16	0.95	0.96	0.03	0.95
Resim2	529	39	18	0.93	0.96	0.03	0.94
Resim3	575	37	23	0.93	0.96	0.03	0.94
Resim4	563	48	11	0.92	0.98	0.01	0.94
Resim5	51	3	3	0.94	0.94	0.05	0.94
Resim6	73	12	2	0.85	0.97	0.02	0.90
Resim7	56	6	2	0.90	0.96	0.03	0.92
Ortalama	334	24	10	0.91	0.96	0.02	0.93

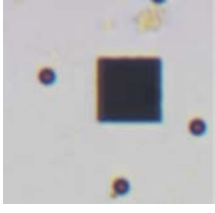
Araştırmanın geri kalan kısmında görüntü üzerindeki hücre sayısı, konumu ve çeşidinin otomatik olarak tespit edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve hasta örneklerine uygulanmıştır. Şekil 4.15'te görüldüğü üzere çip içerisinden alınan örnekler geliştirilen görüntü işleme teknikleri ile analiz edilmiş ve hücreler tespit edilmiştir. Mavi çerçeve içerisine alınan hücreler ve hücre parçaları tespit edilmektedir. Önceki geliştirilen algoritmalarından farklı olarak varyans hesaplamasını içeren yöntem şekil 4.16'da sunulmuştur.



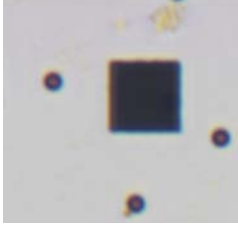
Şekil 4. 15: Çipten elde edilen görüntüdeki hücrelerin tespiti



Şekil 4. 16: Varyans Hesaplamasını İçeren Hücre Tespit Algoritması



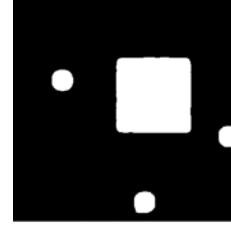
Renkli original resim



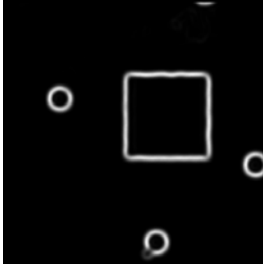
Varyansını alabilmek için double hale getirdiğimiz resim.



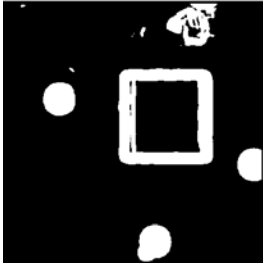
Bead ve kareler



Sınırları genişlemiş bead ve kareler



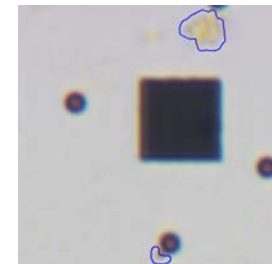
Varyans işleminin sonucu



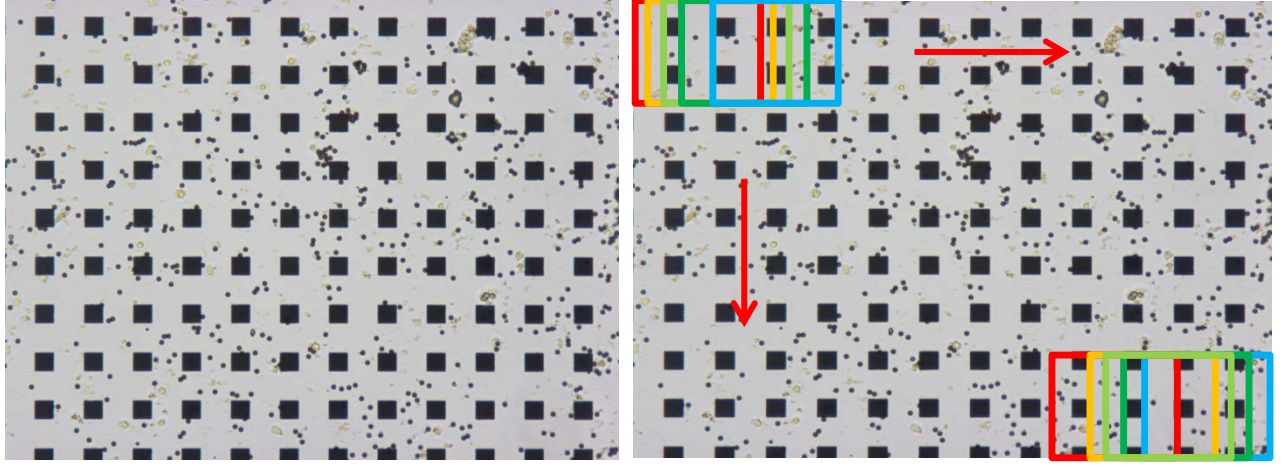
Bead, kare ve hücreler



Hücreler

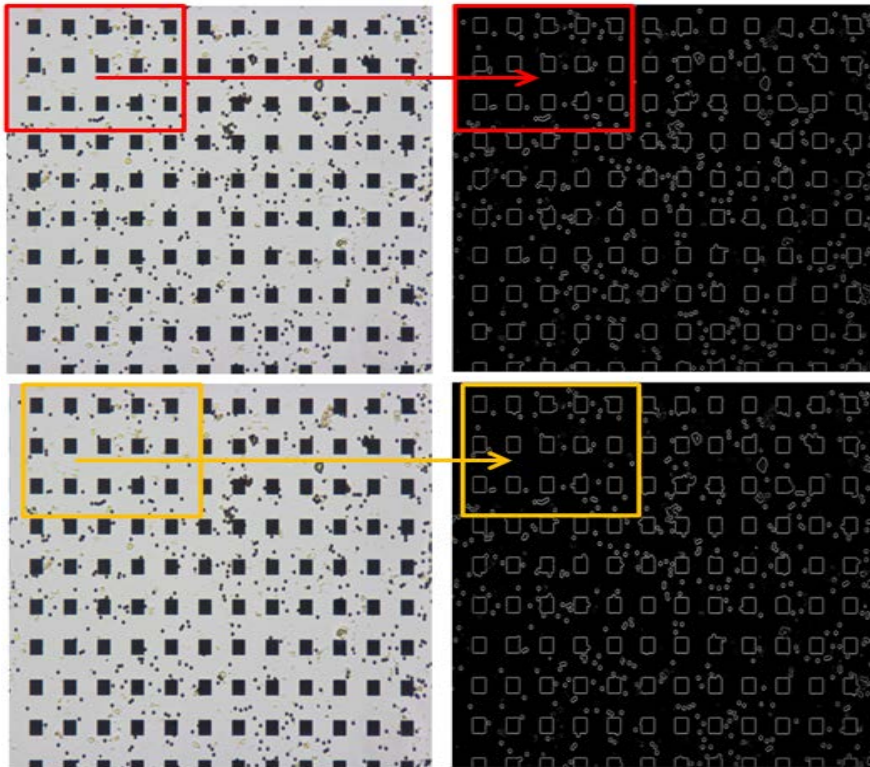


Şekil 4. 17: Varyan hesabı içeren algoritmanın uygulaması



Şekil 4. 18: 20X objektif ile elde edilen görüntü ve uygulanan varyans penceresi

Bu çalışmada hücre bulma için kullandığımız yöntem Şekil 4.18'deki orijinal (renkli) görüntüye varyans uygulamaktır. Bu işlemi görüntü üzerinde belirli bir büyükte oluşturduğumuz pencere boyutları ile yaptık. Oluşturduğumuz pencereleri görüntünün tamamını tarayacak şekilde gezdirerek her pencere için ayrı varyans hesabı yaptık. Bu pencereleri Şekil 4.18' teki renkli kareler gibi resmin tamamı için her satır ve sütun boyunca aynı işlemin tekrarlanmış hali olarak düşünebiliriz. Farklı boyutlarda pencereleri deneyerek en iyi sonuç veren pencere boyutunu seçtik.



Şekil 4. 19: Varyans uygulanması ve ara görüntüler

Pencereleme kısmını matris boyutunda düşünerek ele alırsak, 5x5 boyutunda bir deneme görüntümüz olsun. Bunun üzerinde 3x3 boyutunda bir pencereyi her piksel için güncelleme

yapacak şekilde dolaştırırsak sonuç olarak deneme görüntümüzün varyansını aşağıdaki gibi buluruz. Aynı şekilde 10x10 boyutlarında bir deneme görüntüsüne 3x3 boyutunda pencere uygulayarak da varyansını bulmuş oluruz. Bu sayede görüntüdeki süreklilik olmayan noktaları tespit ederek bead, kare ve hücreleri tespit etmiş oluruz (şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Deneme_görüntü

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	1	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

Deneme_varyans 1

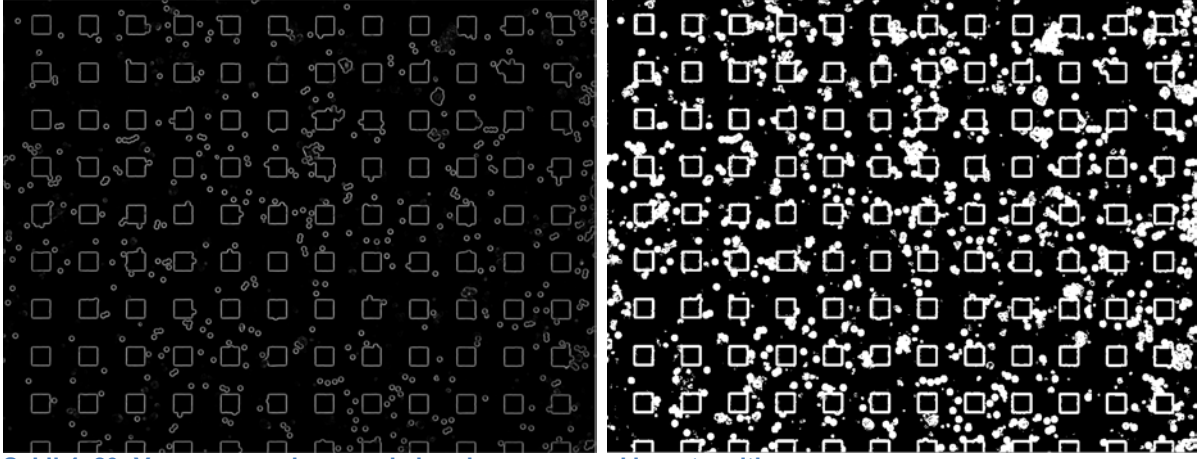
0	0	0	0	0
0	0.111	0.111	0.111	0
0	0.111	0.111	0.111	0
0	0.111	0.111	0.111	0
0	0	0	0	0

Deneme_görüntü

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

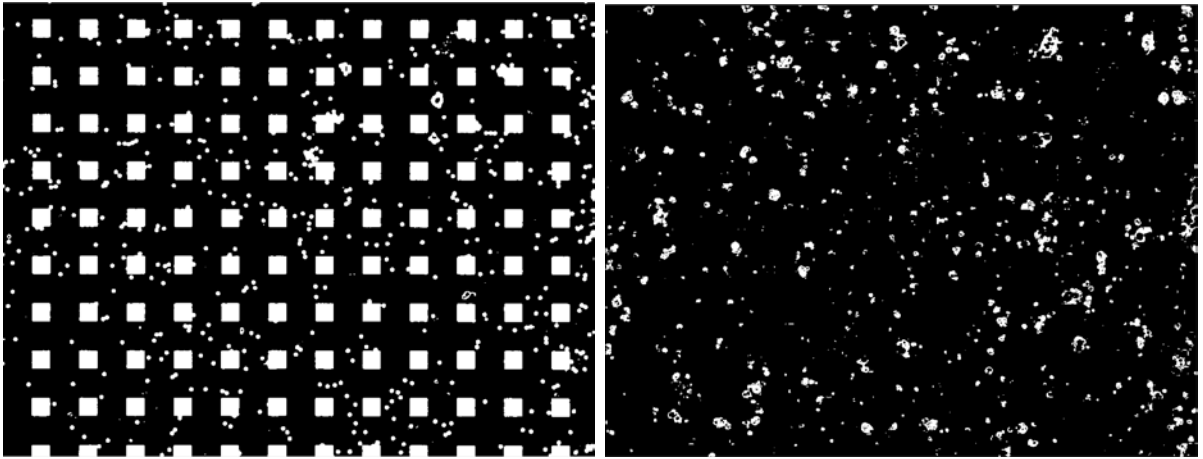
Deneme_varyans 2

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0.111	0.111	0.111	0	0	0.111	0.111	0.111	0
0	0.111	0.111	0.111	0	0	0.111	0.111	0.111	0
0	0.111	0.111	0.111	0	0	0.111	0.111	0.111	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0.111	0.111	0.111	0	0	0.111	0.111	0.111	0
0	0.111	0.111	0.111	0	0	0.111	0.111	0.111	0
0	0.111	0.111	0.111	0	0	0.111	0.111	0.111	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4. 20: Varyans uygulamasında karolar ve parçacıkların tespiti

Her pencere için hesaplanan varyans değerlerini bir matriste depolayarak şekil 4.20'de görüldüğü gibi varyans görüntüsünü elde ettik. Bu görüntüdeki detayları daha net görebilmek için belirli bir eşik değerinin üzerini görüntüledik ve şekil 4.20'de görülen sonucu elde ettik. Bu görüntüde bead, kare ve hücreleri arka plandan ayırt etmiş olduk. Bead, kare ve hücreleri beyaz kısımlar; arka planı ise siyah kısımlar olarak etiketledik. Hücreleri de bu bead ve karelerden ayırt etmek için orijinal görüntümüze farklı bir eşik değeri uygulayarak şekil 4.21'de görülen sadece bead ve karelerden oluşan görüntüyü elde ettik.



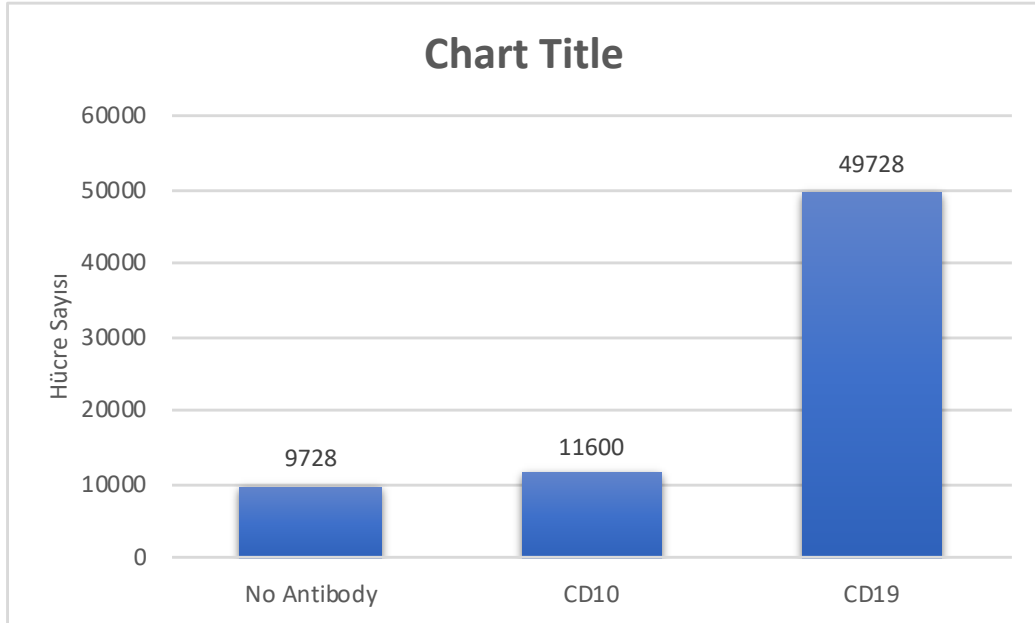
Şekil 4. 21: Varyans uygulamasında hücrelerin tespiti

Şekil 4.21'te bead,kare ve hücreleri elde ettiğimiz görüntüden, bead ve kareleri elde ettiğimiz görüntüyü çıkarma işlemi yaptık. Sonuç olarak elimizde sadece hücrelerin olduğu şekil 4.21'deki görüntüyü elde ettik. Görüntüdeki gürültülerden kurtulmak için bağlı olmayan nesnelere boyutlarına göre temizleme işlemi yaptık ve morfolojik işlemleri uyguladık.

Morfolojik işlemler ile elde ettiğimiz hücrelerin sınırlarını belirleyerek orijinal görüntü üzerinde çizdirdik. Hücreleri tespit ettikten sonra hücre sayma kısmına geçtik ve burada 3 gruba ayırdık. Karelere yapışık hücreler, boncuğa yapışık hücreler, tek başına olan hücreler. Karelere yapışık hücreleri bulmak için bead ve kareleri bulduğumuz ikili resmi yeniden yapılandırdık. Daha önce bahsettiğimiz yöntemleri tekrar uygulayarak karelere yapışık hücreleri elde ettik.

4.4 MRD Biyoçip Kontrol Deneyleri

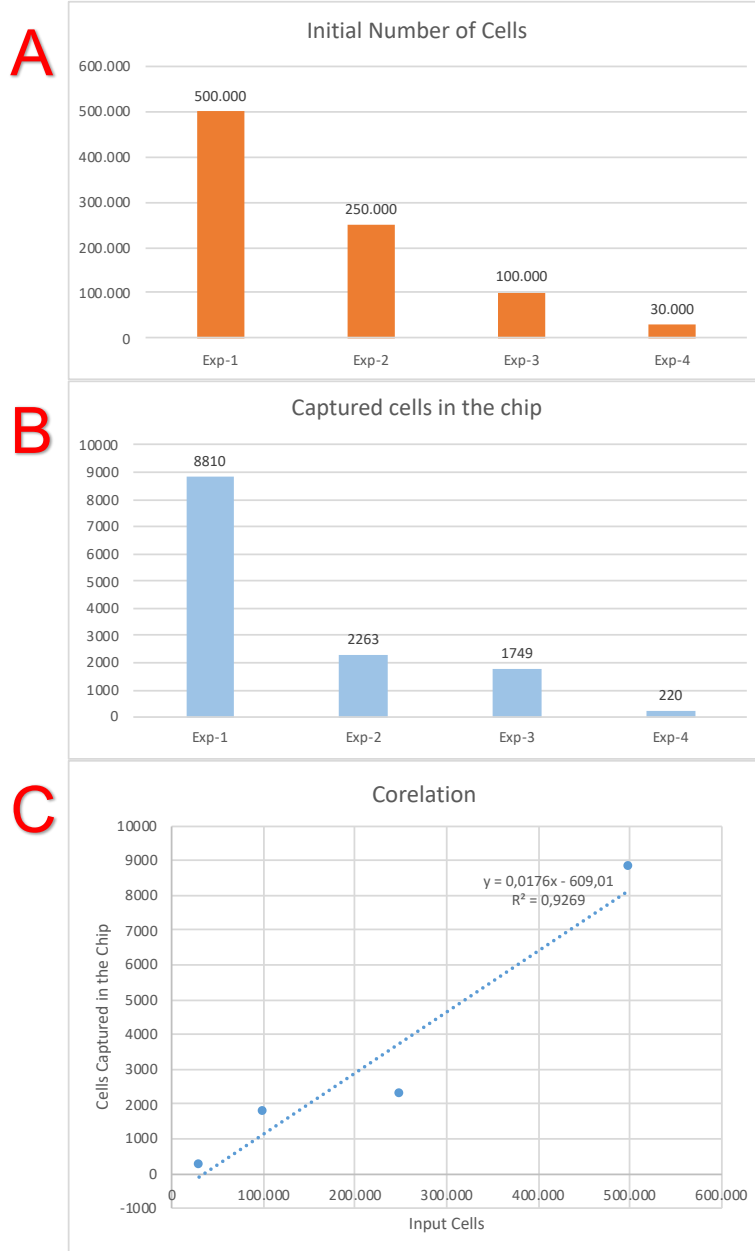
Hasta örneklerine geçmeden önce CCRF-SB hücre hattı ile MRD biyoçip'in yüzeyine antikor yerleştirilmeyen durum ve CD10 antikorunu yerleştirilen durum kontrol deneyleri olarak gerçekleştirilmiştir. Buradaki amaç uygulanan hücre sayısını yüksek tutup MRD biyoçip içerisindeki spesifik ve nonspesifik bağlanma oranlarını incelemektir. Bu amaçla 600000 hücre MRD biyoçip'e aktarılmıştır. 33040 karo alan bulunan durumda karolara birden fazla hücrenin bağlandığı gözlenmiştir. Antikor kaplanmayan durum ile CD19 kaplanan durumun karşılaştırılması şekil 4.22'de sunulmuştur.



Şekil 4. 22 Antikor kontrol deneyleri

Görüldüğü üzere antikorun varlığı 5 kat daha fazla hücrenin tutunmasını sağlamaktadır. Bununla beraber yaklaşık on bin hücrenin arzulanmayan şekilde bağlanması dikkat edilmesi gereken bir noktadır. Bunun sebeplerinden biri de girişte çok fazla hücre (600000) uygulanmasıdır, gerçek örneklerde bu kadar çok hücre uygulanmayacaktır. Hasta örneklerinden önce gerçekleştirilen bu deneyler ile yüzeylerin pasifize edilmesinin önemi, yıkama ve inkübasyon sürelerinin optimizasyonunun önemi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca CCRF-SB

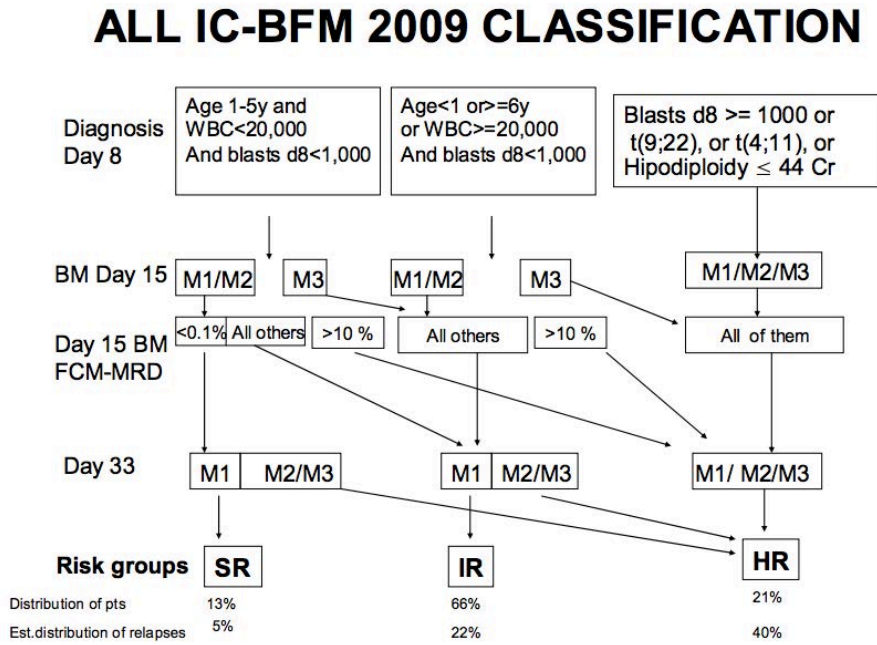
hücrelerinin akım sitometrisi ile analizi göstermiştir ki CD10 antijeni bu hücrelerin ancak %8'in de CD19 ise %99'unda mevcuttur. Bizlerde yüzeye CD10 antikorunu koyarak, CD19 ile kıyaslamasını gerçekleştirdik. Ayrıca girişteki hücre sayıları azaltılarak çip içerisinde yakalanan hücre miktarları da deneysel olarak incelenmiştir. Bu amaçla 500000 hücreden başlayarak girişteki hücre sayıları azaltılmış her biri durumda çip içerisinde yakalanan hücreler sayılarak korelasyon bulunmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23 MRD Biyoçip karakterizasyon ölçümleri A) Girişteki hücre miktarı, B) Çip içerisinde yakalanan hücre sayısı C) aradaki korelasyon

4.5 Hastalara uygulanan tedavi protokolü

Proje için örnek alınan hastalar Akut Lenfoblastik Lösemi Inter Continental Berlin Frankfurt Münster 2009 (ALL-IC BFM 2009) protokolü ile tedavi edilmiştir. Bu protokolde hastalar yaş, tanı anı beyaz küre yüksekliği, genetik mutasyon ve tedaviye yanıt özellikleri baz alınarak relaps geliştirme olasılığına göre risk gruplarına ayrılır. Yüksek riskli hastalar daha yoğun kemoterapi ile tedavi edilirler. Tedavi dört fazdan oluşur: remisyon indüksiyonu (hücum), konsolidasyon (pekiştirme), idame ve merkezi sinir sistemi (MSS) profilaksisi içerir. Kemik iliği 15.gün M1 (kemik iliğinden blast sayısı $<5\%$) olan hastalardan Minimal rezidüel hastalık (MRD) değeri $<10^{-4}$ olanların neredeyse hiç nüks etmediği, ancak $MRD \geq 10^{-3}$ olan hastaların kötü seyrettiği görülmüştür (Şekil 4.24).

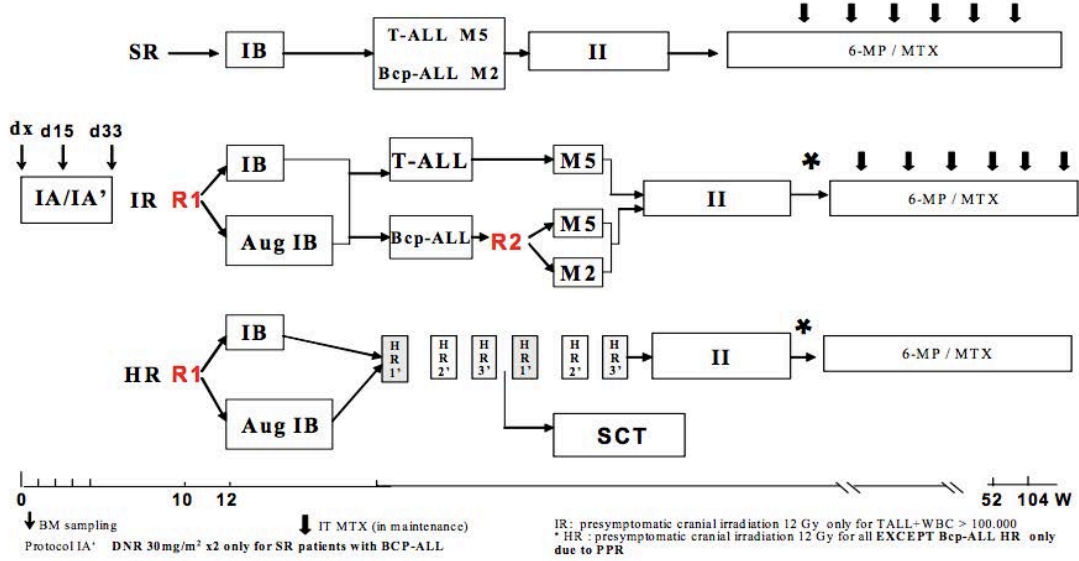


Şekil 4. 24: ALLIC BFM 2009 protokolüne göre risk grupları özellikleri ve nüks oranları (Campbell et al. 2009)

Başlangıç hücum tedavisinde ilk on beş gün ortak ilaç aldıktan sonra tedaviye yanıtlarına göre hastalar üç gruba ayrılıp standart risk grubu, orta risk grubu, yüksek risk grubu olarak tedavi kol şeklinde tedavi uygulandı (şekil 4-25).

ALL IC-BFM 2009 : TREATMENT

Version approved after Bergamo on August 2009



Şekil 4. 25 Risk gruplarına göre ALL IC BFM 2009 protokolünü risk gruplarına göre genel tedavi şeması (Campbell et al. 2009)

Hücum tedavisinde (protokol-IA): Prednizolon , vinkristin, daunorubisin, L-asparaginaz içerir. Prednizolon 60 mg/m²/gün hastanın durumuna göre ağızdan veya damar içi olarak (steroid dozu ilk 5 gün doz artırılıp başlanır, ilk 28 gün sonrası üçer gün ara ile %50 doz azaltılarak kesilir). Vinkristin 1.5 mg/m²/gün 4 doz (8.,15., 22., 29. günlerde) damar içi olarak verildi. Daunorubisin 30 mg/m²/gün 1 saatte damar içine infüzyon şeklinde uygulandı. Düşük risk grubundan 2 doz şekinden (8. ve 15. günde) uygulanırken orta ve yüksek risk grubunda 4 dozda (8., 15., 22., 29. günlerde) uygulandı. L-asparaginaz 5000 ünite/ m²/ gün, damar içi 1 saatte infüzyon şeklinde (12., 15., 18., 21., 24., 27. günlerde) uygulandı.

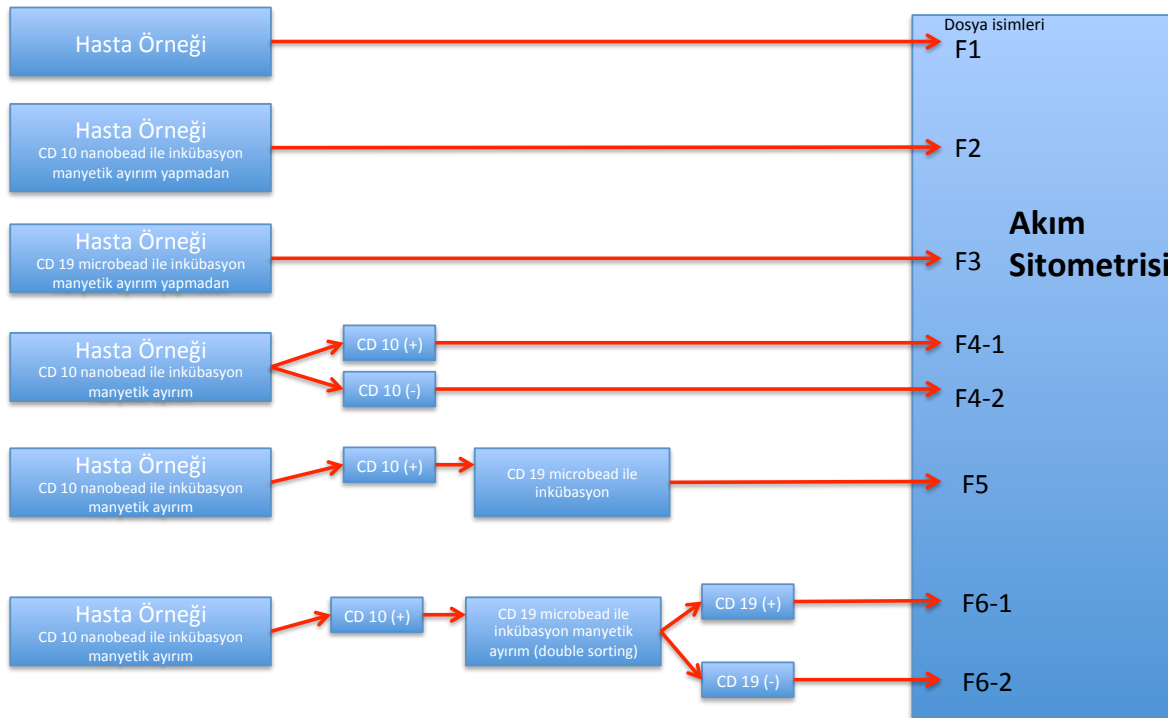
Hücum tedavisinin ikinci kısmında ise (protokol-1B) ise siklofosamid (1000 mg/m²/gün) damar içi 1 saatte infüzyon şeklinde (36., 64. Gününde) uygulandı. 6-Mercaptopurine 60 mg/m²/gün dozunda ağız yoluyla (36. İle 63. Günler arasından verildi. Sitarabin 75 mg/m²/gün dozunda 4 günlük bloklar halinde 4 blok halinde (38.-41.gün, 45-48. gün, 52.-55.gün, 59-62.gün) damar içi 1 saatte infüzyon olarak uygulandı.

Bu protokolda tanımlanan 15. gün örneklerinin incelenmesi ile MRD tayini yapılmaktadır. Bu nedenle MRD Biyoçip için 15. gün örneklerine yoğunlaşmış, hasta örneği oldukça ilerleyen günlerin örnekleri de incelenmiştir.

4.6 Hasta Örneklerinin Akım Sitometrisi ve MRD Biyoçip ile İncelenmesi

Hasta örneklerinin manyetik boncuklar ile yakalanması ve ayrıştırılması işlemleri akım sitometrisi ölçümleri ile analiz edilerek hücre kültüründe elde edilen sonuçlardan farklılıklar olup olmadığı ve MRD biyoçip ile hasta ölçümlerinin yapılarak karşılaştırmalı analizler gerçekleştirilmiştir. Bir önceki rapor döneminde gerçekleştirilen ölçümler özetle şekil 4.26'de gösterilmiştir. Toplam 41 kemik iliği örneği, 10 periferik kan örneği toplam 51 hasta örneği deneylerde kullanılmıştır. Hastaların hepsi çocukluk çağı lösemi hastaları olup örneklerin bir kısmı sadece manyetik parçacıkların bağlanma ve ayrıştırma deneylerinde ve optimizasyon çalışmalarında, bir kısmı da çip deneylerinde kullanılmıştır. Hasta deneylerinin hepsinde referans sistem olarak akım sitometrisi verileri kullanılmıştır. **Akım sitometrisinde “event-olay” sayımı yapılmakta ve 10000 event üzerinden değerlendirilmektedir.** Örneğin tanı anında çok fazla hücre akım sitometrisine verilmesine rağmen sadece 10000 event içindeki yüzdesi veri olarak elde edilmektedir. Bizde bu nedenler çipdeki hücre sayılarını akım sitometrisindeki event yüzdeleri ile karşılatırmayı uygun bulduk. Raporun bundan sonraki kısımlarında aynı verileri tekrarlamamak adına tüm hasta verileri yerine anlamlı bilgiler içeren veriler yer almaktadır.

Hasta Örnekleri (MRD S9) ile planlanan/gerçekleştirilen deneyler-iki tip manyetik boncuk



Şekil 4. 26: Hasta örnekleri ile gerçekleştirilen akım sitometrisi deneyleri

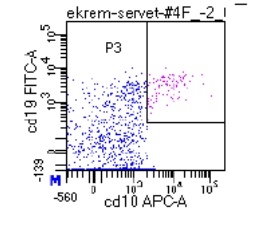
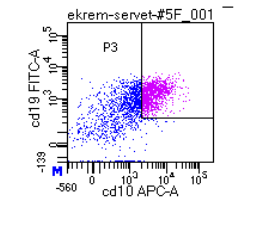
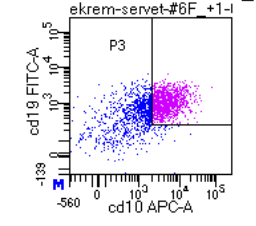
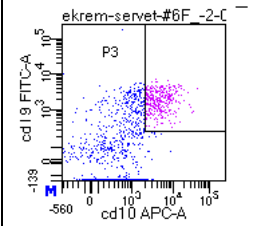
MRD biyoçip deneyleri Şekil 4.26'de (F6-1) gösterilen CD10+ ve CD19+ ayırıştırma yöntemi ile gerçekleştirilecek olup önce hedef hücreler CD10 kaplı manyetik boncuklar ile ayırıştırılıp daha sonra CD19 kaplı manyetik boncuklar ile 2. ayırıştırma gerçekleştirilecek ve CD45 ile kaplı altın kaplı pedlerin olduğu çiplere iletilecektir. Böylece çip içerisinde yakalanan hücrelerin CD45, CD10 ve CD19 antikora aynı anda sahip olup olmadığı analizi gerçekleştirilecektir. Yapılan ölçümlerin sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4. 5: Hasta Örneklerinin manyetik partiküller ile inkübasyonu/ayırıştırılması deneylerinin akım sitometrisi ile analizi-1

Örnekler:	F1 (Hasta Örneği-ışlenmemiş)	F2 (CD10 nano partiküllere bağlanmış hücreler-ayırıştırma yok)	F3 (CD 19 mikro partiküller ile bağlanmış hücreler-ayırıştırma yok)	F4-1 (CD10+ nano parçacıklar ile ayırıştırma)
Akım Sitometrisi Ölçümleri:	%70 CD19+ ve CD 10+	%36 CD19+ ve CD10+	%80 CD19+ ve CD10+	%93 yakalama oranı
Sonuç:	Örnekteki hücrelerin %70'i hedef hücre niteliğinde (pembe renkli veriler)	%70 den %36 olan gerileme akım sitometrisinde CD10 hücrelerinin sadece nano parçacıklar ile inkübe edilmesinin neticesi, akım sitometrisi nano partiküllü hücreleri analiz ettiğinde CD10 okumasında sayı azalması sadece kayma meydana geldiğini göstermektedir. Nano partiküller hücre yüzeylerini belli ölçüde satüre etmiş.	Akım sitometrisinde çok fazla kayma gözlenmedi, CD19 mikro partiküller hücrelerin yüzeyini satüre edemediğinden boya molekülleri hücrelere bağlanabilmiş ve akım sitometrisi etkilenmemiş	F2 deneyi ile uyumlu nano parçacıkların akım sitometrisine olan etkisi benzer şekilde kayma olarak gözlemlendi (mavi renkli yoğun veriler).

Tablo 4. 6 Hasta Örneklerinin manyetik partiküller ile inkübasyonu/ayırıştırılması deneylerinin akım sitometrisi ile analizi-2

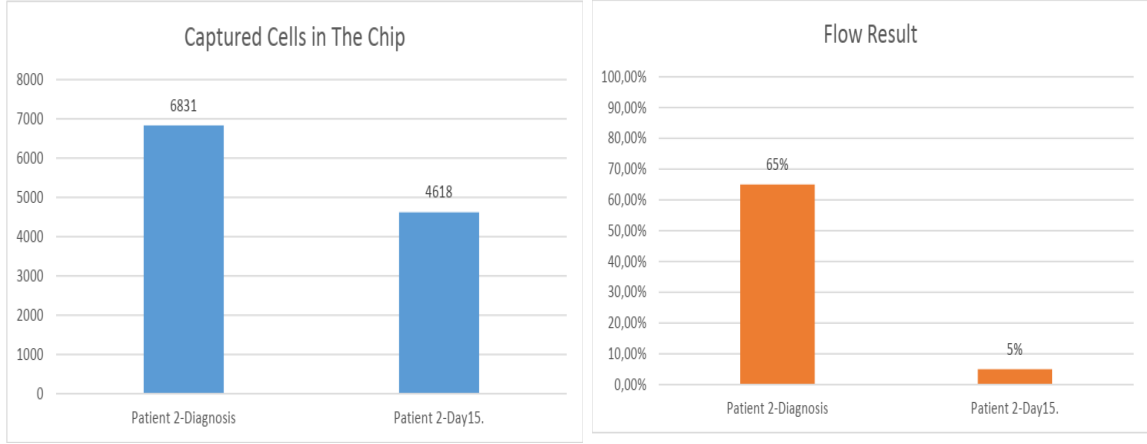
Örnekler:	F4-2 (CD10- nano parçacıklar ile)	F5 (CD10+ nano partiküller ile ayırıştırma ve CD19+ mikro partiküllere)	F6-1 (double sorting CD10+ ve CD19+)	F6-2 (double sorting CD10+ ve CD19-)

	ayrıştırılmayan kalan hücreler)	bağlanmış hücreler-CD19+ ayrıştırma yok)		
Akım Sitometrisi Ölçümleri :	%5.5			
Sonuç:	Ayrıştırma sonucunda kaçan hücreler, yakalama oranının hasta örneğinde %94 seviyesinde olduğunu göstermektedir. F4-1 ile uyumlu.	CD10+ nano partiküllerin etkisi F2 ve F4-1 dekiler ile uyumlu mavi renkli verilerde kayma söz konusu	CD10+ nano partiküllerin etkisi benzer şekilde görülmektedir. Hücrelerin CD 19+ hücrelerin varlığı F6-2 ile uyumlu	CD10+ ve CD19- hücreler arasında CD19+ hücreler gözlenmektedir, bu durum bazı hücrelerin bu örnekte iyi ayrıştırılmadığını göstermektedir.
				

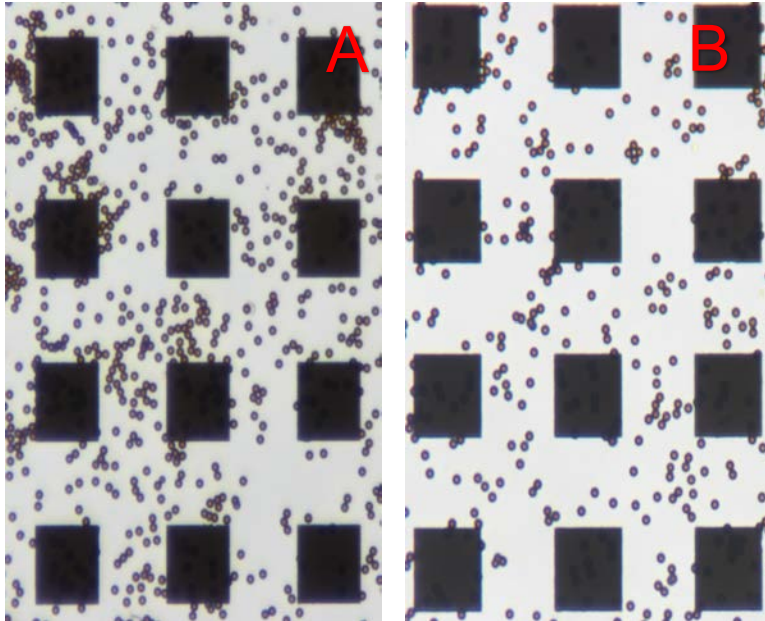
Hasta örnekleri ile yapılan detaylı akım sitometrisi çalışmaları göstermiştir ki manyetik parçacıklar ile %94-95 seviyesinde hücre yakalama oranına erişmek mümkündür. Bunun yanı sıra literatürde yer almayan manyetik parçacıkların akım sitometrisi analizlerine etkisini de bu ölçümler ile göstermiş bulunmaktayız. Özellikler nano boyutlu parçacıklar hücre yüzeyini satüre etmekte ve kaymalara neden olmaktadır. Bu bilgi ile akım sitometrisi verileri değerlendirilmediği takdirde yanlış yorumların yapılması mümkündür. Akım sitometrisi ile yapılan bu analizlerden sonra MRD biyoçip'in hasta örnekleri ile denenmesi çalışmalarına geçilmiştir. Bu deneyler için yüzeylere CD45 antikoruna kaplanmış hasta örneklerindeki hedef hücreler CD10+ ve CD19+ (double sorting) ile ayrıştırılarak biyoçipe iletilmiştir. Yüzeyde yakalanan hücreler görüntü işleme teknikleri ile analiz edilerek hastanın akım sitometrisi verileri ile karşılaştırılmıştır.

4.4.1 35x35µm karolar

Hasta Kodu: HG, 16 yaşında erkek hasta, tanı anı ve 15. Gün kemik iliği örnekleri geliştirilen yöntemler kullanılarak MRD Biyoçip ile incelendi (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).



Şekil 4. 27 Hasta HG'nin MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri



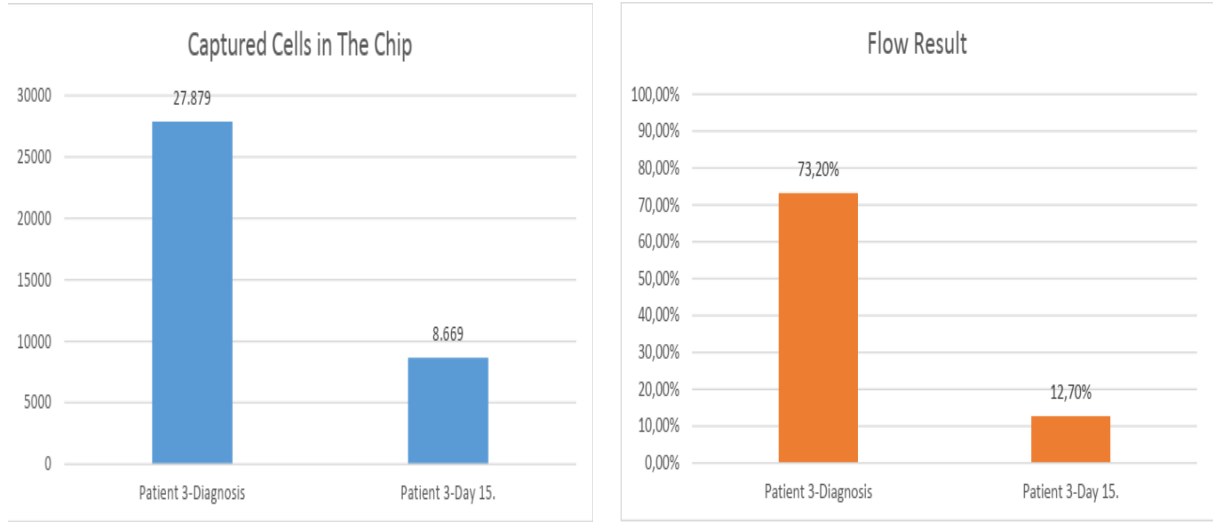
Şekil 4. 28: Hasta HG'nin örneklerinin MRD biyoçip içerisindeki örnek görüntüleri A) Tanı anı B) 15. Gün örneği

HG hastasının hem MRD biyoçip ve hem de akım sitometrisi verilerinde hücre sayılarındaki azalma gözlenmektedir. Akım sitometrisinde azalış daha yüksek iken MRD biyoçipte azalma daha azdır. Kare alanlar 35x35 µm olduğu için hücreler karoların üzerine gelebilmekte bu da

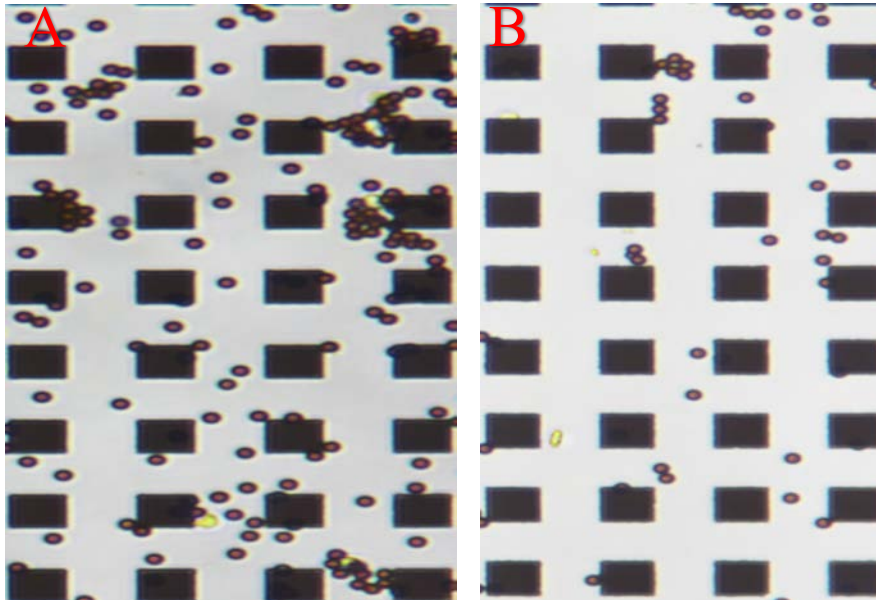
sayım hatasına neden olabilmektedir. Bu nedenle daha küçük karoların olduğu çipler hazırlanmıştır ve testleri yapılmıştır.

4.4.2 15x15µm karolar

Hasta Kodu: MEB, 2 yaşında erkek hasta tanı anı, 15. Gün, 90. Gün ve 105. gün kemik iliği örnekleri incelendi (şekil 4.29 ve Şekil 4.30).



Şekil 4. 29: Hasta MEB'in MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri

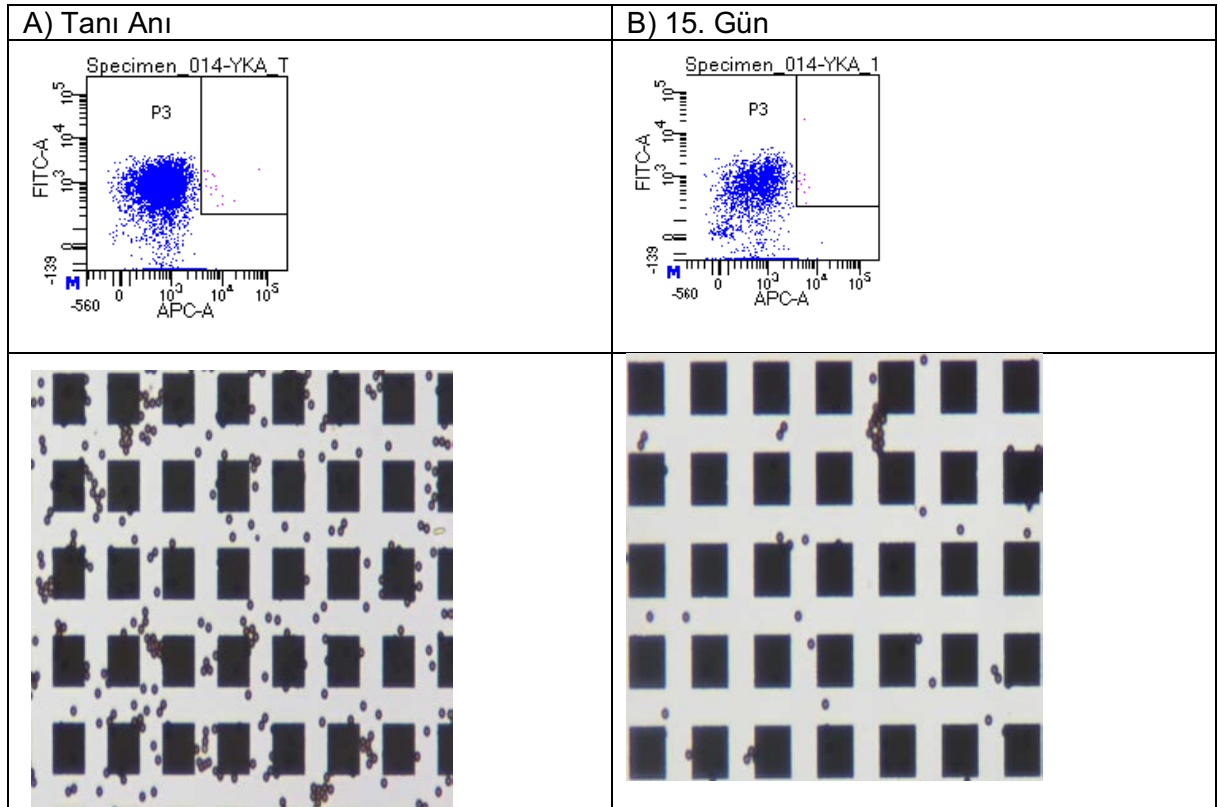


Şekil 4. 30 Hasta MEB'in örneklerinin MRD biyoçip içerisindeki örnek görüntüleri A) Tanı anı B) 15. Gün örneği

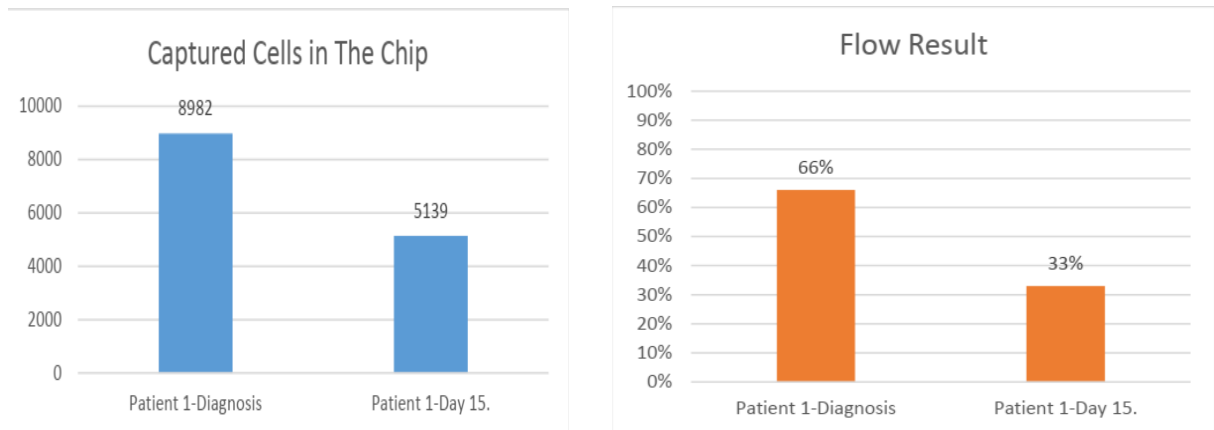
MEB hastasının hem MRD biyoçip ve hem de akım sitometrisi verilerinde tanı ve 15. Gün örneklerindeki hücre sayılarındaki azalma gözlenmektedir.

4.4.3 24x24µm karolar

Hasta Kodu: YKA, 12 yaşında erkek hasta tanı anı ve 15. gün gün kemik iliği örnekleri incelendi. Akım sitometrisine giden örneklerde mavi noktaların yoğunluğunun azalması kemoterapinin etkisini göstermektedir (Şekil 4.31 ve Şekil 4.32).



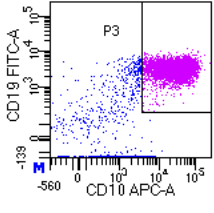
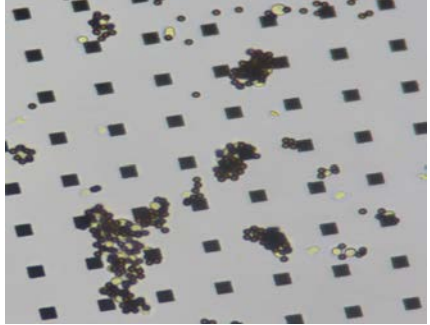
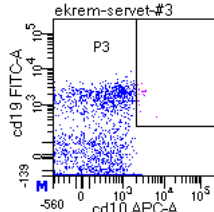
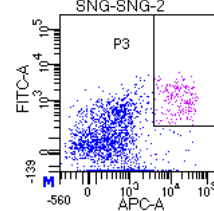
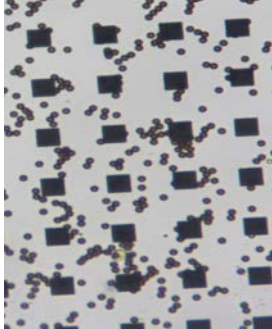
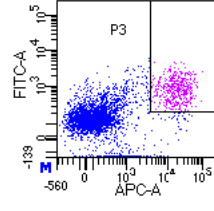
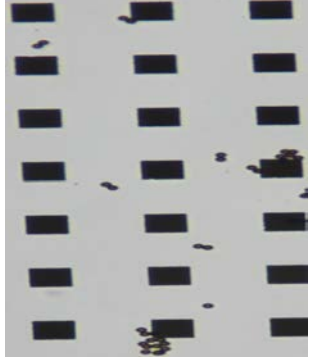
Şekil 4. 31 Hasta YKA'nın örneklerinin akım sitometrisi verileri ve MRD biyoçip içerisindeki örnek görüntüleri A) Tanı anı B) 15. Gün örneği

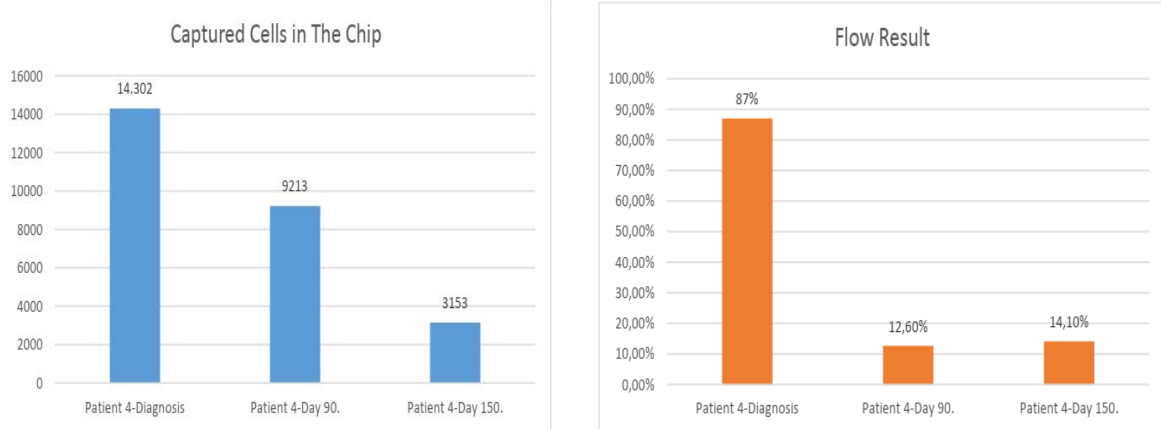


Şekil 4. 32 Hasta YKA'nın MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri

Hasta Kodu: SNG kız hasta tanı anı, 15. gün, 90. gün, ve 150. gün kemik iliği örnekleri incelendi. Akım sitometrisine giden örneklerde pembe noktaların yoğunluğunun azalması kemoterapinin etkisini göstermektedir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.33).

Tablo 4. 7: MRD Biyoçip Hasta Verisi hasta kodu: SNG

Hasta Kodu / Örnek Bilgisi	Akım Sitometrisi	MRD Biyoçip/ örnek görüntü
SNG/Tanı Anı, kemik iliği	<p>SNG-SNG-1</p>  <p>%84 oranında CD19+ ve CD10+</p>	
SNG /15. Gün, kemik iliği	<p>ekrem-servet-#3</p>  <p>%2 oranında CD19+ ve CD10+</p>	<p>Yeterli örnek olmadığı için MRD biyoçip ile test edilemedi</p>
SNG/ 90. Gün	<p>SNG-SNG-2</p>  <p>%12,6 oranında CD19+ ve CD10+</p>	
SNG/150. gün	<p>SNG-SNG-3</p>  <p>%14,1 oranında CD19+ ve CD10+</p>	



Şekil 4. 33 Hasta SNG'nin MRD biyoçip sonuçları ve akım sitometrisi ölçümleri

SNG kodunu verdiğimiz hastanın MRD biyoçip ile yapılan ölçümleri akım sitometrisi ile uyumlu olup hücre sayılarındaki azalma gözlenmektedir. Akım sitometrisinde sadece 2 antikor verisi verilmekte bu da MRD biyoçip ile gerçekleştirilen 3 antikorlu ölçümler ile bazı farklılıklara sebebiyet vermektedir. Örneğin bazı hastalarda CD45 antijeni hücre zarında diğer hastalara göre daha çok veya daha az bulunabilmektedir. Bu da yakalanan hücre miktarlarını etkileyebilmektedir. Tanı anı ve 15. Gün örneklerinde CD10, CD19, CD45 antijenleri önemli rol oynarken, kemoterapinin etkisiyle yüzey antijenlerinin ekspresyonu değişmekte ve sağlıklı hücrelerde de CD45 görülebilmektedir. Bu durumda farklı antijenlerin algılanmasına gidilebilir. Bu bilgi bizim proje süresinde öğrendiğimiz ve farklı mekanizmaların olduğunu gösteren literatürde çok irdelenmemiş bir alandır. Bu projenin devamı olabilecek projelerde yüzeylere farklı antikorlar yerleştirilerek hücrelerin hangi bölgede yakalandığı ve dolayısıyla hangi antijenlerin hücrede bulunduğu tespiti yapılabilir. Örneğin bir yüzeye CD45 farklı bir yüzeye CD34 yerleştirilerek hücreler seri/paralel halde her ikisinden de geçirilerek algılama yapılabilir. Elde edilen deneyim göstermektedir ki MRD araştırmalarında keşfedilecek çok daha fazla bilgi mevcuttur. Tabi bu çalışmaların yapılabilmesi için disiplinler arası bir ekibin kurulması ve maddi olanakların bulunması gerekmektedir. Bizler 1003 projesinde bu alanda ilk defa biyoçip uygulaması yaparak önemli bir adım attığımızı inanıyoruz. Görüntü işlemedeki hata oranlarını incelediğimizde hasta örneklerinin değerlendirilmesine etkisinin kabul edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür bu konudaki detaylar ek kısmında yer almaktadır.

5. Tartışma/Sonuç

Şu ana kadar gerçekleştirilen çalışmalar ile altın yüzeyleri fonksiyonelleştirme metotlarının optimum olanı Metot D: Altın >> MUA >> EDC/NHS >> Protein G >> CD19 >> BSA >> B lymphoblast hücreleri olarak tespit edilmiştir. Hücre önerisinde yüzeyleri fonksiyonel hale getirmenin daha kısa sürede gerçekleştirileceği ön görülmüştü fakat takip edilen literatürdeki metot istenen oranda hücre yakalama sonucunu vermeyince bu konuya daha çok vakit ayırmak gerektiği ortaya çıkmıştır. Başlangıçta sarf malzemelerde sorun olduğu düşünülerek yeni malzemeler sipariş edilmiş ve denemeler tekrarlanmıştır. Malzemelerin yurt dışından gelmesi deney süreçlerini yavaşlatmaktadır. Daha sonra QCM cihazı ile yapılan deneyler ile detaylı bir şekilde her katmanın bir öncesine bağlanıp bağlanmadığı gözlemlenebilmiştir. Böylece etraflıca bir yüzey fonksiyonelleştirme çalışması yapılarak optimum metot bulunmuştur.

Manyetik boncuklar ile hücre yakalama oranları tespit edilmiş ve double sorting ile %98 oranında bağlanma oranı elde edilmiştir. Farklı firmaların farklı antikorlar ile kaplı manyetik boncukları test edilerek süreç optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Nano boyutlu manyetik boncuklar ile ayrılan hücreler QCM sensörü üzerinde yakalanarak MRD Biyoçip içerisinde gerçekleştirilmek istenen senaryo test edilmiştir.

20X ve 40X görüntülerden hücre sayımı gerçekleştirilmiş olup makine öğrenmesi metotları geliştirilmiştir. 40X görüntülerde %90 üzerinde doğruluk ile hücre sayımı yapılabilmektedir. Bu oranın artırılması da görüntü kayıt esnasında netlik sorununa neden olabilecek durumların giderilmesi ile mümkündür. Ayrıca görüntü işleme teknikleri ile arka planın homojen hale getirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Yapılan Weka testi ile Random Forest metodunun daha iyi performans gösterdiği ortaya çıkmıştır. Yapılan iyileştirmelerden sonra makine öğrenmesi metotlarının performansı karşılaştırılmıştır. Çip içerisindeki görüntülerin incelenmesinde makine öğrenmesinin dışında hesaplama hızında avantaj sağlayan varyans değişimini temel alan metotlar kullanılarak hücrelerin, karoların, manyetik boncukların tespiti gerçekleştirilmiş ve hasta örneklerinin analizinde kullanılmıştır.

Farklı çip üretimleri gerçekleştirilmiş olup farklı metotlar ile serbest manyetik boncukların ortamdaki ayrılması denemeleri gerçekleştirilmiştir. Çipler PDMS yada PMMA malzemelerden üretilmiş olup filtre sütunlar, DLD yapılar test edilmiştir. Üretimin kolay olması ve maliyeti azaltması için altın padlerin/karoların kullanılmasına karar verilmiştir.

Hasta örnekleri ile yapılan çalışmalar sonucunda bu deneyler ile önemli bilgilere ve sonuçlara ulaşılmıştır. Hasta örneklerindeki hücreler, sistemin testlerinin yapıldığı hücre kültüründeki hücrelere göre çok daha küçük boyutta olmaktadır bu da küçük karoların daha verimli çalıştığını göstermektedir. Gerçekleştirilen ölçümlerin önemli bir bölümünde 15. Gün örnekleri

akım sitometrisi ve çip verileri örtüşmektedir. Hasta örneklerindeki kemoterapi neticesinde hedef hücrelerde görülen azalma verisine MRD bioçip ile ulaşılabilmektedir. Olumlu verilerin yanında yeni sorular ve sorunlarda bu proje ile ortaya çıkmıştır. Bunlardan en önemlisi çipin hassasiyetinin çok düşük hedef hücre sayıları için nasıl olacağı hasta verileri ile incelenememiştir çünkü hasta örneklerindeki hedef hücrelerin sadece 1000 hücrede 1 tane olması gibi bir durumla karşılaşılmamıştır. Böyle bir durum hücre kültüründe yapay olarak gerçekleştirilebilir. Ayrıca hastaların tıbbi durumları ve örnek verip vermemeyi istemeleri arzulan örnek alımını engellemiştir. Örneğin bazı hastaların tanı anı örnekleri alınamamış fakat diğer günlerdeki örnekleri alınabilmiştir. Bazı hastalardan alınan örnekler içerisinde çok az kemik iliği elde edilmiş olup hastaya rahatsızlık vermemek ve kemik iliğini zorlamamak için daha fazla örnek temin etmek için girişimde bulunulmamıştır.

Bizi sevindiren bir haber de MRD biyoçip ile ölçümü yapılan hastaların kemoterapiye yanıt vermeleri ve iyileşme sürecine girmiş olmalarıdır. MRD biyoçip ile hücre sayılarındaki azalma kemoterapinin işe yaradığını ve tekrar ilaç verilmesine gerek olmadığını sonucunu MRD biyoçip için ortaya koyabilmiştir.

Hasta örneklerinde manyetik parçacıkların bazı hastalar için çok iyi çalıştığı gözlemlenmişken bazı durumlarda daha düşük yakalamalar gözlenmiştir. Bu durumun incelenmesi ve irdelenmesi gerekmektedir. Muhtemelen hastalarda CD19/CD10 antijeni üretimi ve dağılımı farklılık gösteriyor. MRD çalışmaları bilim dünyasında hala tartışmaların olduğu aktif bir alan daha farklı kombinasyonlar farklı hastalar için daha iyi sonuç verebilir. MRD biyoçip açısından sistemin farklı antikolar ile adaptasyonu ve çalışması mümkündür. Proje ile elde ettiğimiz veriler yeni bilimsel soruları ortaya çıkarmıştır ve farklı projelere teşkil edebilecektir.

MRD biyoçip ile elde edilen bilgiler/kazanımların detayları raporda açıklanmıştır kısaca özetleyecek olursak:

-B-ALL hücrelerini yüzeyde yakalamak için optimum yüzey fonksiyonelleştirme metodu tespit edilmiştir.

-2 farklı manyetik parçacık/bead/boncuk ile hedef hücrelerin yakalanması optimize edilmiş olup hasta örneklerinden yakalama oranları akım sitometrisi ile

-Farklı biyoçip tasarımları gerçekleştirilip test edilmiştir, cam üzerine altın kaplı padlerin/karoların hem düşük maliyetle üretilmeleri hem de mikroskop altında incelemeye müsait olmaları nedeniyle tercih edilmiştir.

-Görüntü işleme tekniklerinde farklı metotlar denemiş makine öğrenmesi, varyans değişimi gibi teknikler hem 20X hem de 40X görüntülere uygulanmış ve %5 hata ile hücrelerin, manyetik parçacıkların tespit edildiği ortaya konmuştur.

-Manyetik parçacıkların yakalama oranı biyoçip ile yakalanan hücre oranları aynı eğilimi göstermektedir. Bu da manyetik parçacıklar hücre yakalamada iyi çalışıyorsa biyoçip

de benzer sonuç vermektedir.

-Hasta örnekleri ile geliştirilen sistemler test edilmiş ve MRD biyoçip ile test edilen tüm örneklerde biyoçip'in doğru okuma yaptığı gözlenmiştir.

Projede ortaya çıkan yeni projelere kaynaklık edebilecek sorunlar özetle:

-MRD biyoçip'in göreceli/karşılaştırmalı ölçümlerde başarılı bir araç olduğu gösterilmiştir fakat çok düşük hedef hücre durumunda hasta örnekler ile test yapılamamıştır. Bu durumda olan bir hasta örneği ile karşılaşamadık.

-Antikor kombinasyonu olarak CD19/CD10/CD45 kullanılmıştır fakat her hasta da bu kombinasyonun aynı sonucu vermediğin gözlemledik, en iyi sonuç için belki hastaların fenotiplerinin belirlenmesi ve ona göre antikor seçimi yapılması gerekmektedir. Bu durumun incelenmesi ayrı bir proje olarak yerinde olur.

-Görüntü işlemeyi Matlab ile yaparken donanım ve yazılım tasarımı tekrar düşünülerek dijital görünüş işleme kartları ile görüntüleme sistemi tasarımına gidilebilir

-MRD biyoçip'in altın alanlar dışındaki kısımlarının pasifizasyonu için BSA'dan farklı yeni tekniklerin denenmesi MRD'nin nicel ölçümlerdeki performansını artırabilir.

Proje kapsamında 3 adet SCI'da taranan makale yayınlanmıştır, 3 adet makale hazırlık aşamasındadır, 4 adet konferansta sözlü sunumu gerçekleştirilmiştir. Bir yüksek lisans öğrencisinin (Tayyibe Gerçek) tezi olup tez (IMMUNOMAGNETIC SEPARATION AND IMMOBILIZATION OF LEUKEMIA CELLS USING CELL SURFACE MARKERS) YÖK sistemine yüklenmiştir.

Ayrıca projemiz risk sermayesinden ön yatırım olarak teknolojik geliştirmelerin ticari ürüne dönüşebilme potansiyeli için fizibilite raporu hazırlanmıştır. Bu raporun bir parçası olarak patentlenebilir ürün olduğu Erciyes Üni. ETTO tarafından raporlanmıştır.

Proje bütçesi çoğunlukla sarf malzeme alımı ve öğrenci bursları için kullanılmıştır ve bu olanağın sağlanmasında katkısı bulunanlara teşekkür ederiz. Ülkemiz de Tübitak'ın sağladığı destekler olmasa bilimsel çalışmaları gerçekleştirmek mümkün olamaz, bu yüzden Tübitak desteklerine teşekkür etmekle beraber hızlı yanıt verme ve akademisyene olabildiğince esneklik tanınması konusunda isteklerimizi belirtmek isteriz.

Ülkemizde yaşanan sıkıntılar direkt olarak projeye etki etmiştir. Örneğin projemizin beklemeye alınması ve taleplerimize cevap verilmemesi projenin akışını ciddi olarak etkilemiştir. Burs bütçemiz aktarılmadığı için öğrencilere burs ödemesi yapılamamış bu da sıkıntılara neden olmuştur. Proje başlangıcından itibaren özellikle bursiyer bulma konusundaki sıkıntılar ve malzeme tedariklerinde yaşanan gecikmeler istenen sonuçlara arzulanan sürede ulaşmamızı engelleyen faktörlerden olmuştur. Proje başvurulduğu yıllarda dolar 2.9 TL iken 2018 yazında

7 TL'den malzeme almak durumunda kaldık ve kurum bütçesinden faydalandık. Bütün olumsuzluklara rağmen yapılan çalışmalar önemli bir bilgi birikimine neden olmuştur ve önemli kazanımlar elde edilmiştir. Projenin yeni projelere kapı açacak potansiyelde olması ve teknolojik ilerlemelerin kaydedilmesi ülkemiz ve bizler açısından kazanç olarak değerlendirilmektedir. Tüm aksaklıklara rağmen projemize özveri ile katkı sağlayan herkese ve her kuruma bir kere daha teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Allard, W. J. et al. 2004. "Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but Not in Healthy Subjects or Patients with Nonmalignant Diseases." *Clinical Cancer Research* 10(20):6897–6904.
- Basso, G. et al. 2009. "Risk of Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Predicted By Flow Cytometric Measurement of Residual Disease on Day 15 Bone Marrow." *Journal of Clinical Oncology* 27(31):5168–74.
- Bradstock, K. F. et al. 1981. "Immunological Monitoring of Residual Disease in Treated Thymic Acute Lymphoblastic-Leukemia." *Leukemia Research* 5(4–5):301–9.
- Campana, D. and E. Coustan-Smith. 1999. "Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Flow Cytometry." *Cytometry* 38(4):139–52. Retrieved (internal-pdf://60.3.176.209/campana_Review.pdf).
- Campana, D. and E. Coustan-Smith. 2002. "Advances in the Immunological Monitoring of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia." *Best Practice & Research Clinical Haematology* 15(1):1–19.
- Campbell, Myriam et al. 2009. *A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood Non-B Acute Lymphoblastic Leukemia STEERING COMMITTEE*. Retrieved April 24, 2019 (http://www.bialaczka.org/wp-content/uploads/2016/10/ALLIC_BFM_2009.pdf).
- Chang, C. L., C. A. Savran, S. Jalal, and D. E. Matei. 2012. "Micro-Aperture Chip System for High-Throughput Immunomagnetic Cell Detection." *2012 IEEE Sensors Proceedings* 1672–75.
- Chang, Chun-li et al. 2014. "High-Throughput Immunomagnetic Cell Detection Using a Microaperture Chip System." *Sensors* 14(9):3008–13.
- Chen, J., J. Li, and Y. Sun. 2012. "Microfluidic Approaches for Cancer Cell Detection, Characterization, and Separation." *Lab on a Chip* 12(10):1753–67.
- van Dongen, J. J., T. M. Breit, H. J. Adriaansen, A. Beishuizen, and H. Hooijkaas. 1992. "Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Immunological Marker Analysis and Polymerase Chain Reaction." *Leukemia* 6 Suppl 1:47–59. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1548936>).
- Dworzak, Michael Norbert et al. 2008. "Standardization of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Evaluation in Acute Lymphoblastic Leukemia: Multicentric Assessment Is Feasible." *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 74(6):331–40.
- Folch, Albert. 2012. *Introduction to BioMEMS*. FL: CRC Press Taylor and Francis Group.
- Gaipa, Giuseppe, Giuseppe Basso, Andrea Biondi, and Dario Campana. 2013. "Detection of Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cytometry Part B*

- *Clinical Cytometry* 84(6):359–69.
- Giusiano, S. et al. 2010. “Development of a Biochip-Based Assay Integrated in a Global Strategy for Identification of Fusion Transcripts in Acute Myeloid Leukemia: A Work Flow for Acute Myeloid Leukemia Diagnosis.” *International Journal of Laboratory Hematology* 32(4):398–409.
- Gleich, Bernhard and Jürgen Weizenecker. 2005. “Tomographic Imaging Using the Nonlinear Response of Magnetic Particles.” *Nature* 435(7046):1214–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988521>).
- Kerst, Gunter et al. 2005. “Concurrent Detection of Minimal Residual Disease (MRD) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia by Flow Cytometry and Real-Time PCR.” *British Journal of Haematology* 128(6):774–82.
- Lee, Joonhyung, Kutay Icoz, Ana Roberts, Andrew D. Ellington, and Cagri a Savran. 2010. “Diffractometric Detection of Proteins Using Microbead-Based Rolling Circle Amplification.” *Analytical chemistry* 82(1):197–202.
- Li, Peng, Zackary S. Stratton, Ming Dao, Jerome Ritz, and Tony Jun Huang. 2013. “Probing Circulating Tumor Cells in Microfluidics.” *Lab on a chip* 13(4):602–9. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3990734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Lim, Jit Kang et al. 2012. “Rapid Magnetophoretic Separation of Microalgae.” *Small* 8(11):1683–92.
- Lipshultz, S. E. et al. 1991. “Late Cardiac Effects of Doxorubicin Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood.” *The New England journal of medicine* 324(12):808–15.
- Lucio, P. et al. 2001. “BIOMED-1 Concerted Action Report: Flow Cytometric Immunophenotyping of Precursor B-ALL with Standardized Triple-Stainings.” *Leukemia* 15(8):1185–92. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.leu.2402150>).
- Maroc, N. et al. 2004. “A Diagnostic Biochip for the Comprehensive Analysis of MLL Translocations in Acute Leukemia.” *Leukemia* 18(9):1522–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322560>).
- Meyer, Fernand. 1994. “Topographic Distance and Watershed Lines.” *Signal Processing*.
- Nagrath, Sunitha et al. 2007. “Isolation of Rare Circulating Tumour Cells in Cancer Patients by Microchip Technology.” *Nature* 450(7173):1235–39.
- Neale, G. a et al. 1999. “Tandem Application of Flow Cytometry and Polymerase Chain Reaction for Comprehensive Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Leukemia* 13(8):1221–26. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10450750>).

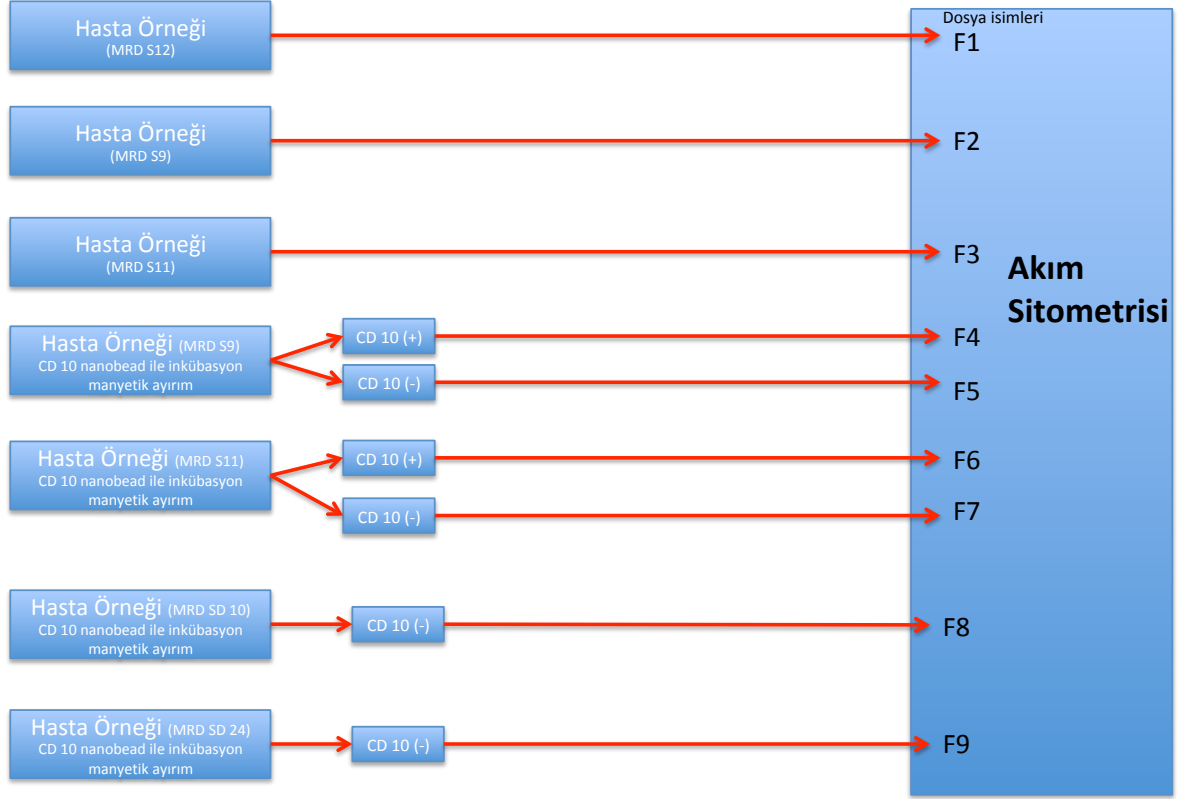
- Neuberger, T., B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. Vonrechenberg. 2005. "Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: Possibilities and Limitations of a New Drug Delivery System." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1):483–96. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885305001137>).
- Nyvold, Charlotte et al. 2002. "Precise Quantification of Minimal Residual Disease at Day 29 Allows Identification of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and an Excellent Outcome." *Blood* 99(4):1253–58. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830473>).
- Olsvik, Ørjan et al. 1994. "Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology." *Clinical Microbiology Reviews* 7(1):43–54.
- Osaka, Tetsuya et al. 2006. "Synthesis of Magnetic Nanoparticles and Their Application to Bioassays." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384(3):593–600.
- Otsu, Nobuyuki. 1979. "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms." *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*.
- Pankhurst, Q. a, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson. 2003. "Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine." *Journal of Physics D: Applied Physics* 36(13):R167–81. Retrieved (<http://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=201%5Cnhttp://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=201?key=crossref.3e466fa3dbc8e71868fa521781326623>).
- Patroğlu, Türkan. 2011. "Lösemide Minimal Rezidüel Hastalık." in *37. Ulusal Hematoloji Kongresi*. Ankara: Türk Hematoloji Derneği.
- Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, M. Anton, and C. Bergemann. 2002. "Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery by Magnetic Force." Pp. 79–80 in *European Cells and Materials*, vol. 3.
- Ratei, R. et al. 2009. "Monitoring Treatment Response of Childhood Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 Protocol with Multiparameter Flow Cytometry: Predictive Impact of Early Blast Reduction on the Remission Status after Induction." *Leukemia* 23(3):528–34. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2008.324>).
- Suzuki, Hiroaki, Chih Ming Ho, and Nobuhide Kasagi. 2004. "A Chaotic Mixer for Magnetic Bead-Based Micro Cell Sorter." *Journal of Microelectromechanical Systems* 13(5):779–90.
- Szczepański, T. 2007. "Why and How to Quantify Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia?" *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 21(4):622–26.

- Yin, Shizhuo et al. 2005. "Measuring Single Cardiac Myocyte Contractile Force via Moving a Magnetic Bead." *Biophysical journal* 88(2):1489–95. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.048157>).
- Zacco, E., M. I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, and M. P. Marco. 2006. "Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues." *Analytical Chemistry* 78(6):1780–88.
- Zheng, Siyang et al. 2007. "Membrane Microfilter Device for Selective Capture, Electrolysis and Genomic Analysis of Human Circulating Tumor Cells." *Journal of chromatography. A* 1162(2):154–61. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307009478>).

EK

Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz fakat rapor içindeki akışı bozmamak için verilerin bir kısmı burada sunulmuştur.

Hasta Örnekleri ile planlanan/gerçekleştirilen deneyler-tek tip manyetik boncuk



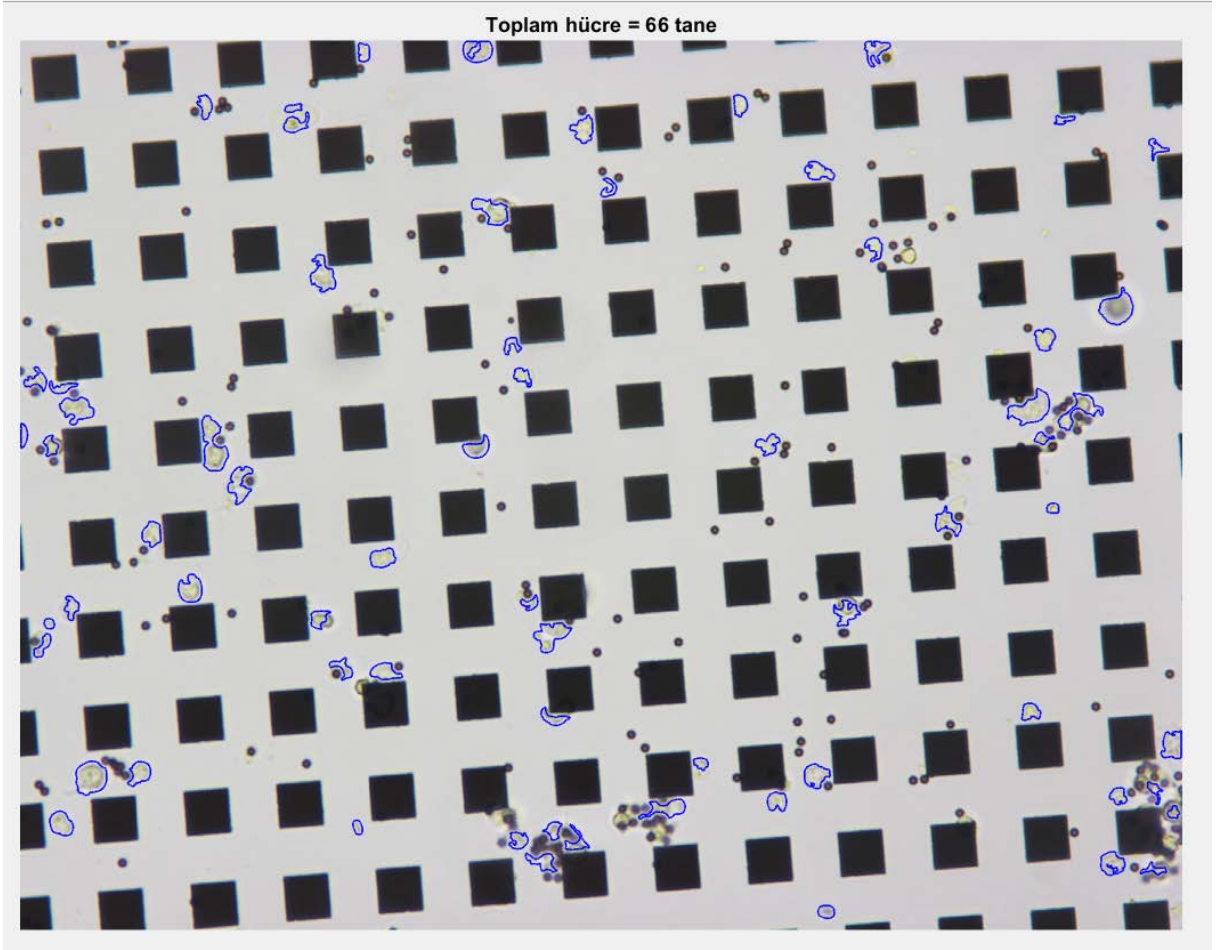
Hasta Kodu	Örnek tipi	Yakalama Oranları %	Antibody	Referans Cihaz
MRD_S1	Kemik iliği	92	CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S2	Peripheral	78	CD 19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S3	Kemik iliği	47,50	CD19	Muse/Kan Sayımı Cihazı
MRD_S4	Kemik iliği	91	CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S5	Peripheral	53	CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S6	Peripheral	89	CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S7	Peripheral	68	CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S8	Kemik iliği	82	CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S9	Kemik iliği	84	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_S10	Kemik iliği	95	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_S11	Peripheral	81	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_S12	Peripheral	65	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_S13	Peripheral	57	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_S24	Kemik iliği	87	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_S25	Peripheral	90	CD10	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_S26	Peripheral	40	CD10	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_YKA	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_YKA_15.gün	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_AKC	Kemik iliği	50	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_AKC_15.gün	Kemik iliği	88	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_HG	Kemik iliği	43	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_HG_15.gün	Kemik iliği	66	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_HG_33.gün	Kemik iliği	33	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_CYB_15.gün	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_CYB_33.gün	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_CYB_49.gün	Peripheral	90	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_KIA	Kemik iliği	90	CD19/CD10	Akım Sitometrisi

MRD_KIA_15.gün	Kemik iliği	100	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_KIA_36.gün	Kemik iliği	66	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_MEB	Kemik iliği	95	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_MEB_15.gün	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_MEB_90.gün	Kemik iliği	89	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_MEB_105.gün	Kemik iliği	50	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_ESO_15.gün	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_ESO_36.gün	Kemik iliği	68	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_ESO_150.gün	Kemik iliği	20	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_ESO_176.gün	Kemik iliği	70	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_ESO_196.gün	Kemik iliği	99	CD19/CD10	Akım Sitometrisi
MRD_EG_33.gün	Kemik iliği	yeterince kemik iliği yok		
MRD_EG_36.gün	Kemik iliği	yeterince kemik iliği yok		
MRD_AA	Kemik iliği	Hedef hücre yok denecek kadar az		
MRD_EYDT	Kemik iliği	Hedef hücre yok denecek kadar az		
MRD_AKC	Kemik iliği	yeterince kemik iliği yok		
MRD_AKC_18.gün	Kemik iliği	Hedef hücre yok denecek kadar az		
MRD_UK_kontrol	Kemik iliği	79	CD10	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_UK_kontrol	Kemik iliği	87	CD10/CD19	Muse/Kan Sayım Cihazı
MRD_EO_15.gün	Kemik iliği	75	CD10	Akım Sitometrisi
MRD_EO_15.gün	Kemik iliği	67	CD10/CD19	Akım sitometrisi
MRD_GA_15.gün	Kemik iliği	30	CD10	Akım Sitometrisi
MRD_GA_33.gün	Kemik iliği	57	CD10/CD19	Akım sitometrisi
MRD_GA_150.gün	Kemik iliği	Hedef hücre yok denecek kadar az		

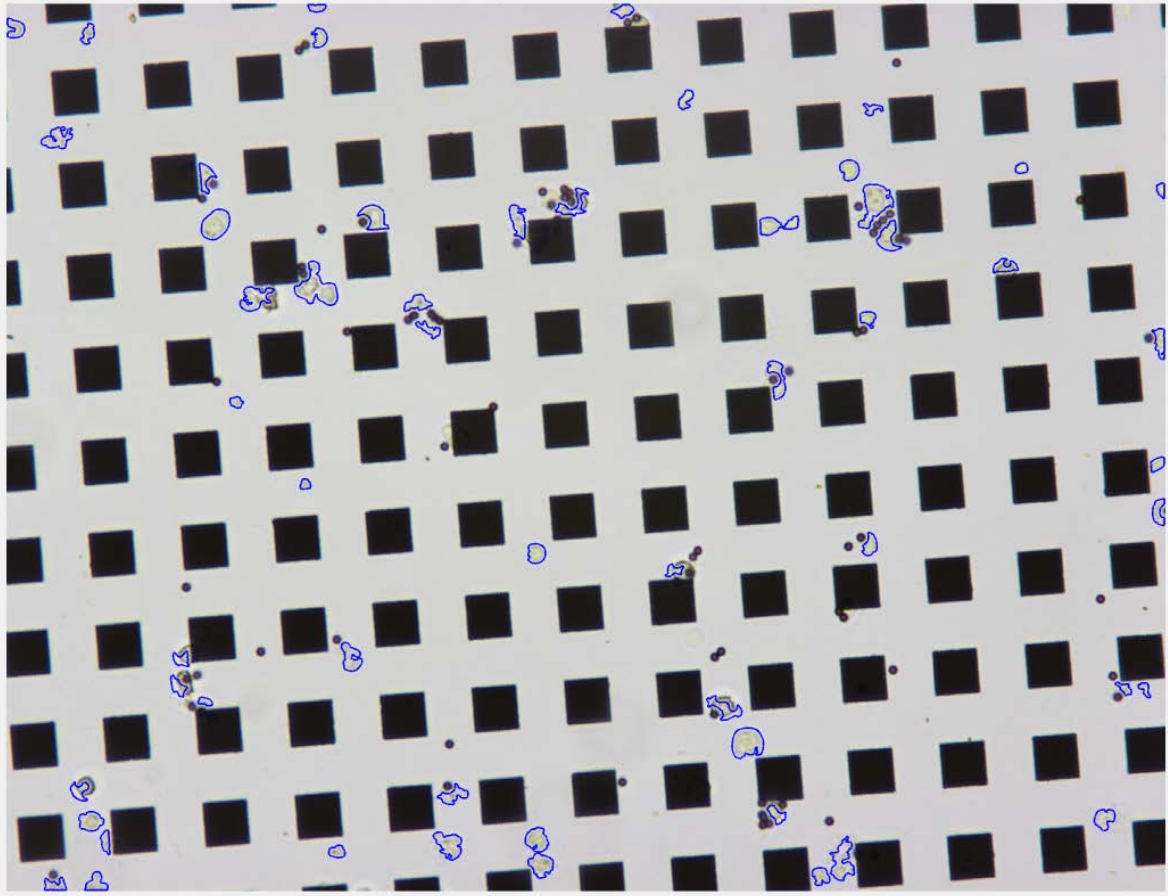
Görüntü İşlemenin Hata oranları

Hasta örneklerinin incelendiği MRD biyoçip deneylerinde 22 çip deneyindeki görüntüler uzman yardımıyla incelenerek hata oranları tespit edildi. Buna göre toplam algılanan 2024 hücrede programın kaçırdığı hücre sayısı 100 hücrenin altında olup hata oranının %5'in altında olduğu tespit edilmiştir. Bu da 4000 civarı olan hasta örneklerindeki en düşük hücre sayısı göz önüne alındığında 200 hücreye tekabül etmektedir ki bu sayı şu aşamada kabul edilebilir düzeydedir. Daha hassas hücre sayılarının tespiti gerektiği durumlarda algoritmada yapılacak iyileştirme çalışmaları ve farkını daha önce gösterdiğimiz 40X objektife geçilerek hata oranını düşürmek, mümkündür.

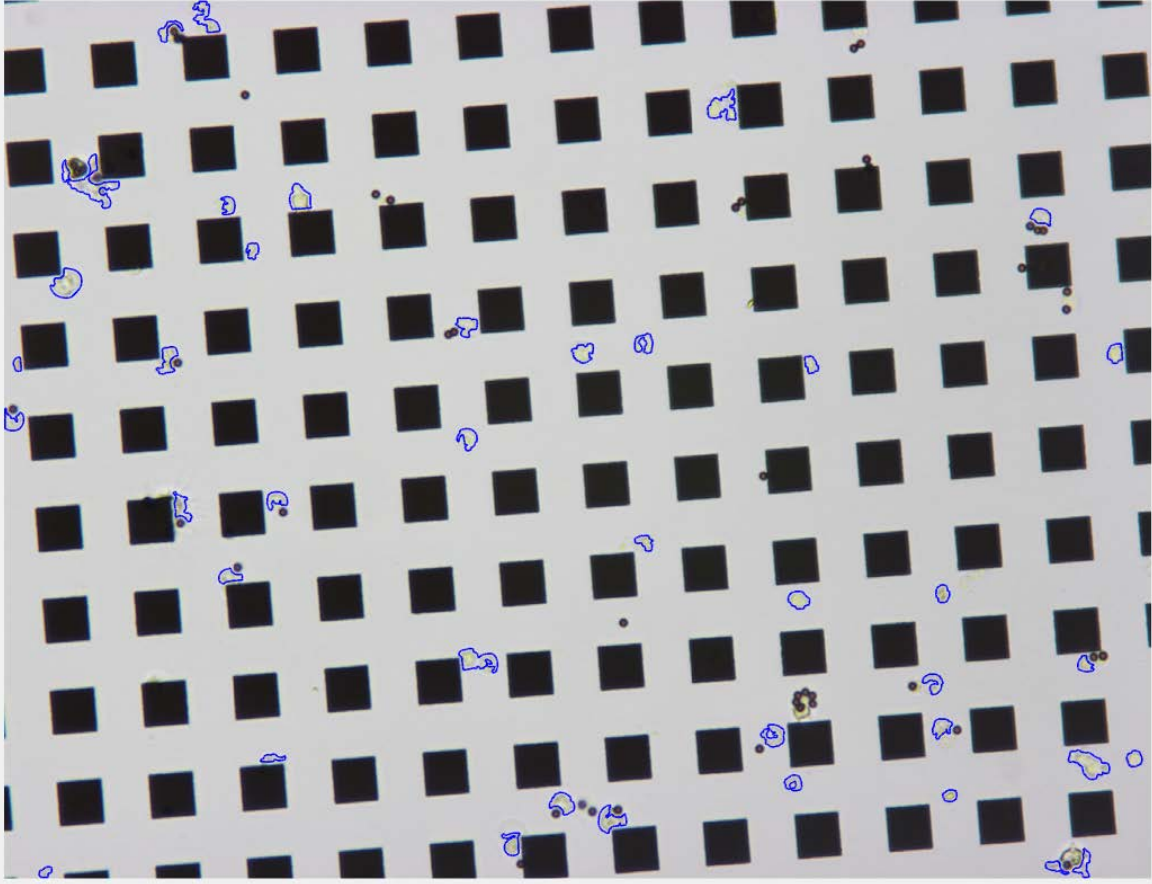
Örnek Resimler ve Tespit Edilen hücreler



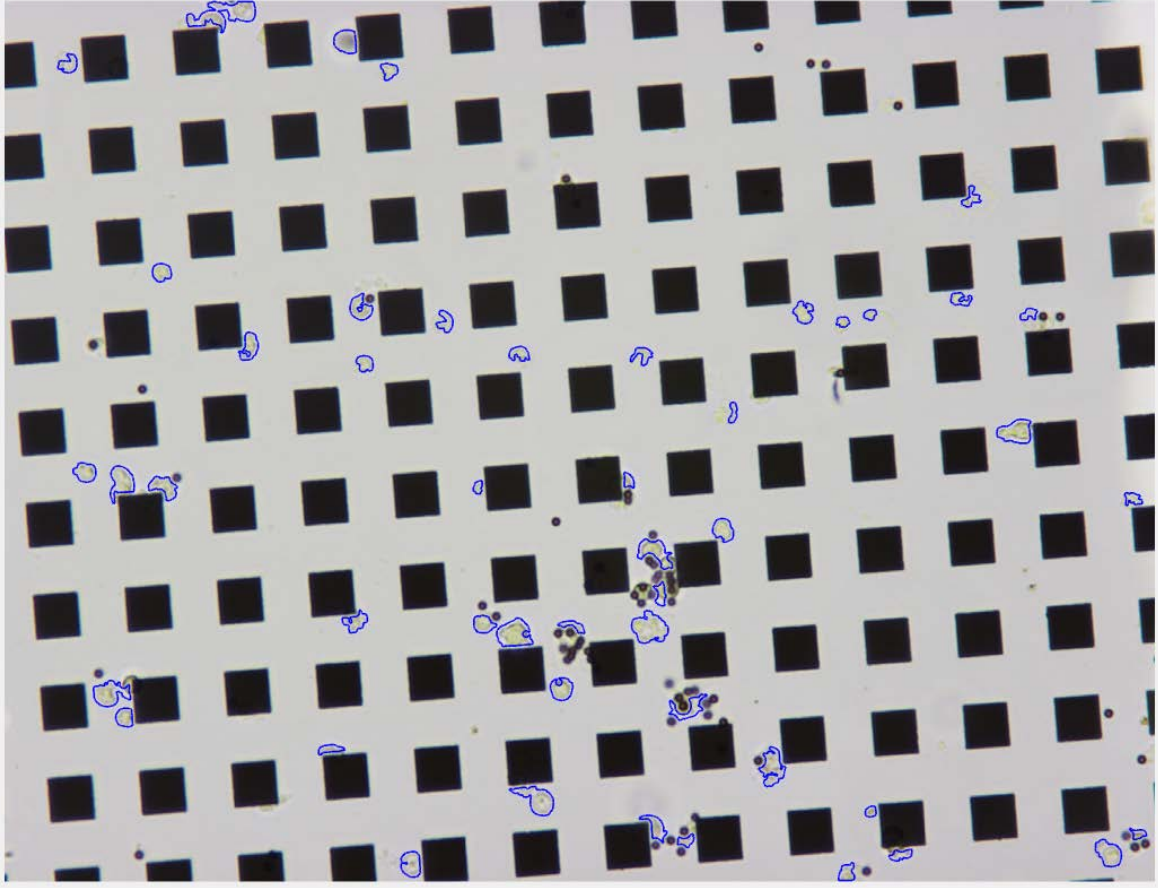
Toplam hücre = 56 tane



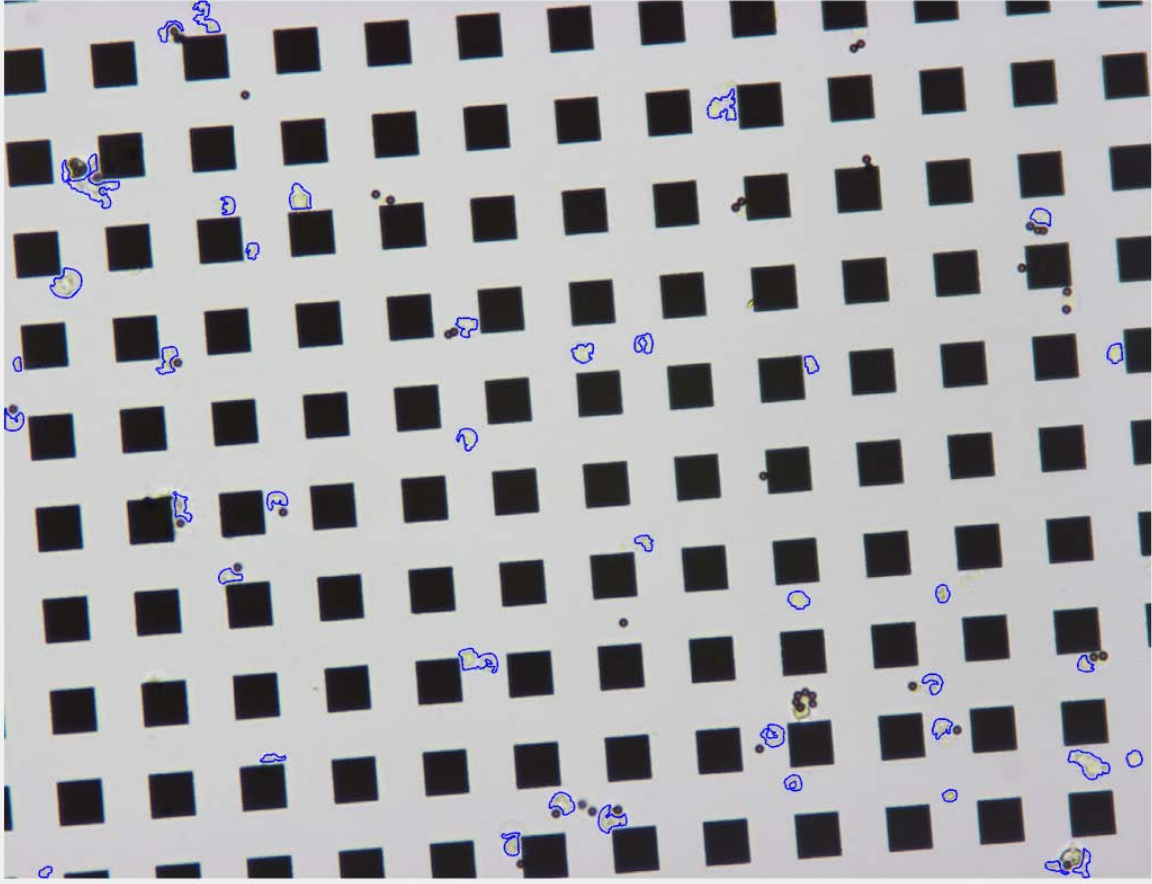
Toplam hücre = 40 tane



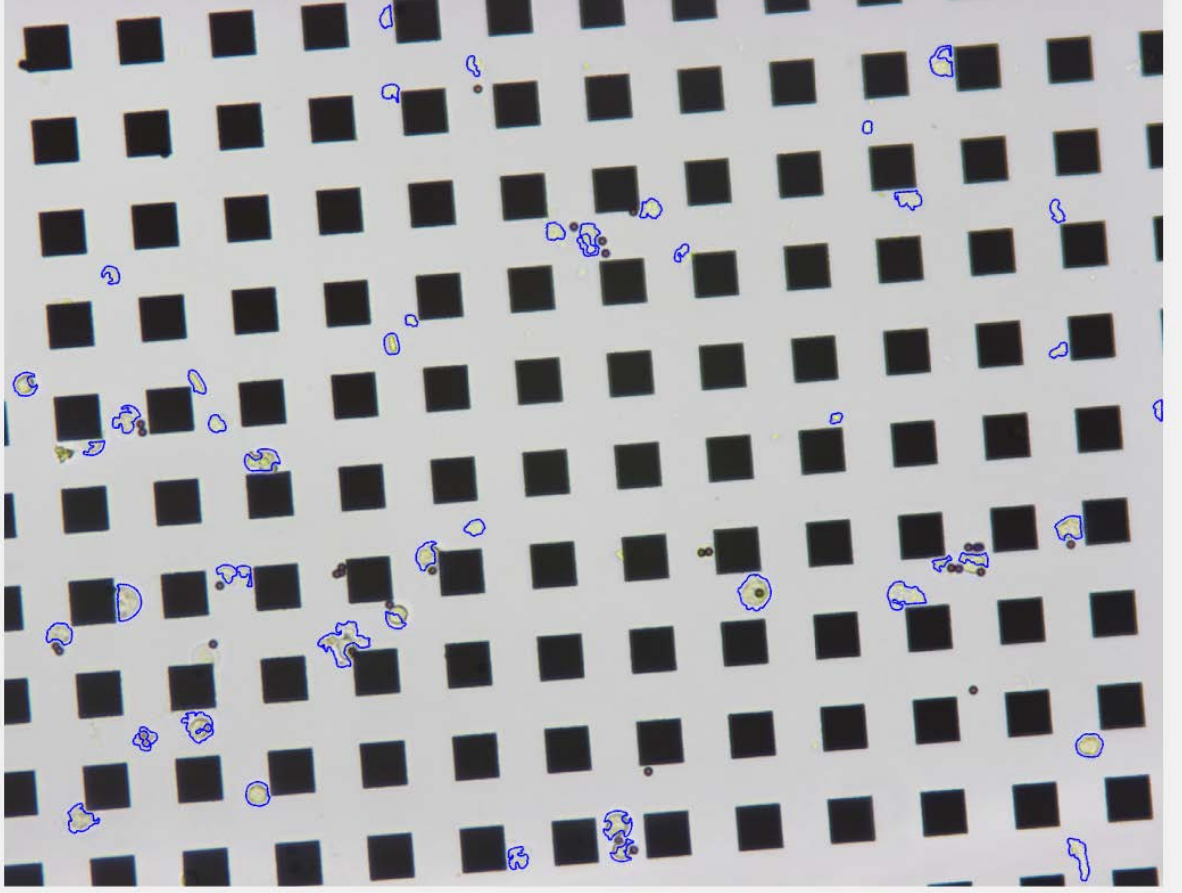
Toplam hücre = 48 tane



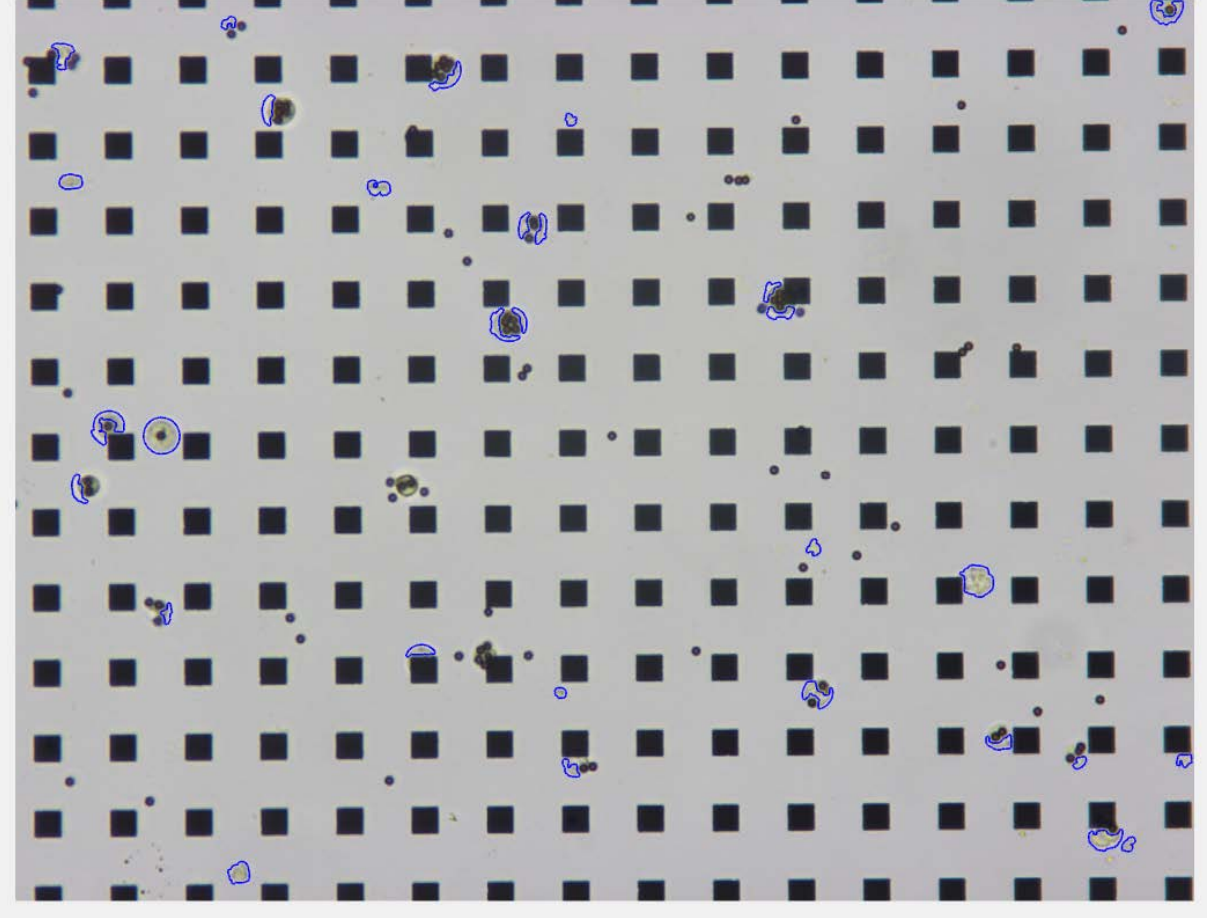
Toplam hücre = 40 tane



Toplam hücre = 44 tane



Toplam hücre = 30 tane



Toplam hücre = 34 tane

