T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADHERENT TİP HÜCRE KÜLTÜRLERİ İÇİN NANOFİBER TEMELLİ 3D HÜCRE TAŞIYICI VE KRİYOPREZERVASYON SİSTEMLERİ

DUA ÖZSOYLU

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970198

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADHERENT TİP HÜCRE KÜLTÜRLERİ İÇİN NANOFİBER TEMELLİ 3D HÜCRE TAŞIYICI VE KRİYOPREZERVASYON SİSTEMLERİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

DUA ÖZSOYLU

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ
II. Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Torsten WAGNER

Bu çalışma Almanya Federal Eğitim ve Araştırma Bakanlığı tarafından 13N12585 numarası ile desteklenmiş olup, Aachen Uygulamalı Bilimler Üniversitesiyle birlikte yürütülen ortak doktora programı çerçevesinde yürütülerek sonuçlandırılmıştır.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970198

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **i**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **v**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**

KISALTMALAR ..... **ix**

TEŞEKKÜR ..... **xi**

ÖZET **1**

ABSTRACT **3**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **4**

2. GENEL BİLGİLER **6**

2.1 Biyosensörler ve Hücre Metabolizmasının Takibi 6

2.2 Hücre Dışı Asitleşme 6

2.3 Hücre Dışı Asitleşmenin Takibi 7

2.4 Hücre Dışı Asitleşmenin LAPS ile Takibi 7

2.5 LAPS' in Çalışma Prensibi 8

2.6 LAPS İle Sinyal Analizi 9

2.7 LAPS İle Kimyasal Görüntü Elde Edilmesi 10

2.8 Mikroakışkan Sistemler 12

2.9 LAPS'ın Mikroakışkan Sistemlere Entegre Edilmesi 12

2.10 Diferansiyel Biyokimyasal Görüntüleme 13

2.11 LAPS Yüzeyinin Biyo-Uyumluluğu 15

2.12 LAPS Yüzey Mühendisliği 16

2.13 Sensörlerde Plazma Uygulaması 16

2.14 Plazma Uygulamasının Sensör Davranışlarına Olası Etkileri 17

2.15 İleri Sensör Uygulamaları ve İnovatif Konsept Arayışları 18

2.16 Adherent Hücre Kriyopreservasyonu 18
2.17 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon 19
2.18 Adherent Hücre Kriyoprezervasyonunda Kriyo-Hasarı 19
2.19 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyonda Hibrit Yüzey Yaklaşımı 20
2.20 Elektro-Eğirme Tekniği İle Sensör Yüzey Modifikasyonu 21
3. GEREÇ VE YÖNTEM 23
3.1 Araştırmanın Tipi 23
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı 23
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi 23
3.4 Çalışma Materyali 23
3.5 Araştırmanın Değişkenleri 23
3.6 Veri Toplama Araçları 24
3.6.1 Sensör Üretimi 24
3.6.2 Elektrokimyasal Karakterizasyonlar 24
3.6.3 Plazma Muamelesi 25
3.6.4 Temas Açısı (Islanabilirlik) Ölçümleri 25
3.6.5 Plazma Muamelesinin Sensör Islanabilirliğine Etkisinin Araştırılması 25
3.6.6 Plazma Muamelesinin Sensör Davranışlarına Etkisinin Araştırılması 26
3.6.7 Sıcaklık Muamelesiyle LAPS'ı Tavlama (Annealing) 28
3.6.8 Plazma-Kaynaklı Sensör Davranışının Bozulmasının Detaylı İncelenmesi 28
3.6.9 Hücre Kültürü 29
3.6.10 Biyo-Uyumluluk Analizleri 30
3.6.11 Diferansiyel Taramalı LAPS Ölçümü 31
3.6.12 Kullanıma Hazır Formatta Hücre-Temelli Biyosensör Geliştirme 32
3.6.13 Elektro-Eğirme Tekniği İle Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu 33

3.6.14 Modifiye Edilmiş LAPS Yüzeyine Plazma Uygulaması ve Karakterizasyonu 34
3.6.15 Kriyo-Çip Elde Edilmesi 34
3.6.16 Kriyo-Çip İçinde Hücre Kültürü ve Analizler 35
3.6.17 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon ve Çözdürme 36
3.6.18 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon (OSC) Sonrası Hücre Dışı Asitleşmenin Diferansiyel Tespiti 36
3.6.19 İstatistik Analizler 37
3.7 Araştırma Planı 38
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi 38
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları 38
3.10 Etik Kurul Onayı 39
4. BULGULAR 40
4.1 Plazma Muamelesinin Islanabilirlik Üzerine Etkisi 40
4.2 Hidrofobiklik Geri Kazanımı 41
4.3 Plazma Muamelesinin Sensör Davranışlarına Genel Etkisi 43
4.4 LAPS'ın Sensör Özellikleri Üzerine Tavlama (*Annealing*) Etkisi 48
4.5 Plazma İle Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Özellikleri 51
4.6 Modifiye LAPS Yüzeylerinin Biyo-Fonksiyonalitesi 54
4.7 Diferansiyel Hücre Dışı Asitleşme Tespiti: 59
4.8 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon İçin Yüzey Özellikleri 61
4.9 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyona Hücre Yanıtları 62
4.10 Konseptin İspatı Deneyleri 66
5. TARTIŞMA 70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 72
7. KAYNAKLAR 75

8. EKLER 82

8.1 Araştırma Ekleri.....82

8.2 Etik Kurul.....87

8.3 Özgeçmiş 98

8.4 Makaleler 93

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. İş-zaman cizelgesi. 38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. LAPS'ın çalışma prensibi 8

Şekil 2. Taramalı LAPS ölçümüyle bir biyokimyasal görüntünün elde edilmesi 10

Şekil 3. Hücre dışı asitleştirmenin etiketsiz, kantitatif, diferansiyel tespiti için mikroakışkan çip sistemi.....15

Şekil 4. Elektro-eğirme tekniği ile LAPS yüzeyinin elastik PEVA liflerle modifiye edilmesinin şematik gösterimi. 22

Şekil 5. LAPS yüzeyindeki maskeleme düzenlemeleri ve çeşitli plazma/UV uygulamaları 29

Şekil 6. Sensör-üstü kriyoprezervasyon (OSC), hücre-temelli *lab-on-a-chip* cihazları için "yerinde ve kullanıma-hazır" konseptleri sunar.....33

Şekil 7. Hidrofobiklik geri kazanımı 41

Şekil 8. Plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) önce ve sonra LAPS çipinden elde edilen I/V eğrileri. 43

Şekil 9. O_2 plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) önce ve sonra LAPS'ın sol (L) ve sağ (R) taraflarının sabit foto-akım modunda ölçümü 44

Şekil 10. O_2 plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) önce ve sonra pH hassasiyeti 45

Şekil 11. Hidrofobiklik geri kazanımı ve sinyal değişimi ilişkisi.....47

Şekil 12. Tavlama etkisi 49

Şekil 13. Tavlama etkisinin görselleştirilmesi 50

Şekil 14. LAPS yüzeyinin ıslanabilirlik değişiklikleri 52

Şekil 15. Çeşitli uygulamaların sensör karakteristiğine etkileri.....53

Şekil 16. O_2 plazma ile modifiye edilmiş sensör yüzeylerinin CHO-K1 hücrelerinin morfolojisi, yayılması ve yaşayabilirliği üzerindeki etkisi.....56

Şekil 17. Farklı yüzeylerde zamana bağlı canlı hücre (CHO-K1) yoğunluğu.....58

Şekil 18. Mikroakışkan kanallar içindeki adherent CHO-K1 hücrelerinin hücre dışı asitleşmesini gösteren diferansiyel (biyo-)kimyasal görüntü 60

Şekil 19. Numunelerin ıslanabilirlik özelliğini gösteren farklı yüzeylerde “sessile drop” metoduyla su damlası (statik) temas açısı ölçüm sonuçları 62

Şekil 20. Kriyo-çip kullanılarak sensör-üstü kriyoprezervasyona (-80°C, gece boyunca) hücre yanıtları 63

Şekil 21. Sensör-üstü kriyoprezervasyona (-80°C, gece boyunca) ilişkin çeşitli yüzeylerde hücre geri kazanımlarının karşılaştırılması 65

Şekil 22. İki-kanallı kriyo-çip kullanılarak CHO-K1 hücrelerinin sensör-üstü kriyoprezervasyonundan (OSC) sonra foto-akım değişiklikleri 67

Şekil 23. İki-kanallı kriyo-çip kullanılarak CHO-K1 hücrelerinin sensör-üstü kriyoprezervasyonu (OSC) sonrası hücre dışı asitleştirmenin diferansiyel kimyasal görüntüleri.....68

Şekil 24. Elde edilen O_2 plazmayla işlevselleştirilmiş hücre-temelli mikroakışkan çip sistemine dair grafiksel özet. 73

Şekil 25. Sensör-üstü kriyoprezervasyon metodunu kullanan ve ileri yüzey mühendisliğiyle modifiye edilmiş bir biyosensörün entegre edildiği kriyo-çipin kullanıma-hazır format sunan çalışma mekanizmasına dair grafiksel özet.....74

Şekil 26. Kriyo-çip için 3D baskılı dondurma kabı 82

Şekil 27. Mikro-agar tuz köprüsünün hazırlanış adımları. 83

Şekil 28. Ohmik arka taraf bağlantısı için 3D baskılı adaptör.....83

Şekil 29. Mikroakışkan kanalların içindeki LAPS yüzeyinde CHO-K1 hücre adezyonu 84

Şekil 30. Mikroakışkan kanalların içindeki LAPS yüzeyinden CHO-K1 hücre ayrılmaları.....84

Şekil 31. Elektrospun PEVA liflerle modifiye edilmiş sensör (LAPS) yüzeyi 85

Şekil 32. Birbiriyle kaynaşmış elektro-eğirilmiş lifler.....86

Şekil 33. Modifiye edilmemiş LAPS yüzeyinde hücre kaybı 86

KISALTMALAR

OSC: Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon (*On-Sensor Cryopreservation*)

LAPS: Işıkla-Adreslenebilen Potansiyometrik Sensör

PH_e: Hücre Dışı pH

EA: Hücre Dışı Asitleşme (Extracellular Acidification)

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu (*Scanning Electron Microscopy*)

3D: 3 boyutlu (*Three Dimensional*)

DMSO: Dimetil Sülfoksit (*Dimethyl sulfoxide*)

Lab-on-a-chip: Çip-Üstü-Laboratuvar

PEVA: Polietilen Vinil Asetat

OCR: Oksijen Tüketim Oranı

ECAR: Hücre Dışı Asitleşme Oranı

ISFET*:* İyon-Duyarlı Alan-Etkili-Transistor

VUV: Vakumlu Ultraviyole Fotonlar

ECM*:* Hücre Dışı Matriks

α_L: Termal Genleşme Katsayısı

SD: Standart Sapma

DI: De-iyonize

HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-iperazinetansülfonik asit

CHO-K1: Çin Hamsteri Yumurtalık Hücreleri

FCS: Fötal Buzağı Serumu

CCK: Cell Counting Kit (Hücre Sayma Kiti)

PBS: Phosphate-Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)

LDH: Laktat Dehidrogenaz

ATP: Adenozin Trifosfat

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca üzerimde büyük emeği olan danışmanım Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ'a ve Prof. Dr. Torsten WAGNER'e, çalışmalarıma değerli katkılarından dolayı başta Prof. Dr. Mustafa Muammer DEMİR'e, Prof. Dr. Michael Josef SCHÖNING'e ve Dr. Tuğba ISIK'a, destekleri için Fh Aachen Üniversitesindeki çalışma arkadaşlarım Rene WELDEN'e, Melanie JABLONSKI'ye, David ROLKA'ya, Benno SCHNEIDER'e, Thomas SCHNITZLER'ya, Dr. Farnoosh VAHIDPOUR'a, Heiko IKEN'e ve Dr. Elke BÖRMANN-EL-KHOLY'ye teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) BIDEB 2214-A kapsamında bana vermiş olduğu yurt dışı doktora araştırma bursu için, Alman Federal Eğitim ve Araştırma Bakanlığı'na (Opto-Switch FKZ: 13N12585), Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimine (proje no. 2018.KB.SAG.004) bu tez çalışmasına finansal destekleri için teşekkürü borç bilirim.

Her açıdan desteklerini hep yanımda hissettiğim ve onlar olmadan başaramazdım dediğim çok kıymetli ailem ile çok değerli eşim Damla DURAN ÖZSOYLU'ya teşekkürü borç bilirim.

ADHERENT TİP HÜCRE KÜLTÜRLERİ İÇİN NANOFİBER TEMELLİ 3D HÜCRE TAŞIYICI VE KRİYOPREZERVASYON SİSTEMLERİ

Dua ÖZSOYLU, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir, Türkiye, duaozsoylu@gmail.com

ÖZET

Son zamanlarda hücre-temelli (*cell-based*) ve elektrokimyasal biyosensörleri kullanan ileri çip-üstü-laboratuvar (*lab-on-a-chip*) cihazları geliştirmek için önemli çabalar sarf edilmektedir. Buna rağmen, mevcut sistemler, "yerinde kullanıma-hazır" (*ready-to-use on-site*) formatlar için hala uygun değildir, çünkü cihazın içindeki hücrelerin, son kullanıcıya alışılagelmiş nakliyatı sırasında hayatta kalmayı sağlayacak inkübatör koşullarına (CO_2, besinler, vb.) ihtiyaçları vardır. Bu çalışmada, adherent hücrelerin bir sensör yüzeyinde, örn. ışıkla-adreslenebilen potansiyometrik sensör (LAPS), dondurularak (-80°C) korunmasını sağlayan sensör-üstü kriyoprezervasyon (OSC) adını verdiğimiz bir strateji ortaya koyuldu.

LAPS yüzeyindeki adherent hücrelerin kriyo-hasarına eğilimli olduğu anlaşıldı. Bu yüzden, yüzey OSC sonrası hücre geri kazanımını arttırmak üzere modifiye edildi. Bu modifikasyon: *i*) yüksek termal genleşme katsayısına ve düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip polietilen vinil asetattan (PEVA) oluşan elastik elektro-eğirilmiş liflerinin entegrasyonuna ve *ii*) O_2 plazma ile muamele edilmesine dayanmaktadır. Modifiye edilmiş sensör, yalnız hızlı çözme için kritik olan termal kütleyi azaltmak için değil, aynı zamanda hassas bir şekilde kontrol edilebilen bir mikro-ortam sağlamak için bir mikroakışkan çip sistemine entegre edildi. Bu yeni kriyo-çip sisteminin, OSC sırasında hücreleri canlı tutmak için etkili olduğu bulundu. Konseptin ispatı deneyleri kapsamında, kanser hücrelerinin (CHO-K1) hücre dışı asitleştirilmesi, diferansiyel LAPS ölçümleri ile değerlendirildi. Sonuçlar, literatürde ilk kez, kriyo-çip kullanan OSC'ye dayalı stratejimizin, çözmeden hemen sonra etiketsiz ve kantitatif ölçümlere izin verdiğini ve bunun da çözme sonrası ek kültürleme adımlarını ortadan kaldırdığını gösterdi.

Üretim aşamasındayken hücreleri içeren çiplerin OSC'ye dayalı dondurulması ve bir soğuk-zincir nakli yoluyla son kullanıcıya gönderilmeleri, "yerinde kullanıma-

hazır” formatı mümkün hale getirebilir. Dahası, bu strateji, gelecekte diğer hücre-temelli çip-üstü-laboratuvar cihazlarına da potansiyel olarak uyarlanabilir.

Anahtar Sözcükler: Kriyoprezervasyon, biyosensör, adherent hücreler, kriyo-çip

NANOFIBER-BASED 3D CELL CARRIER AND CRYOPRESERVATION SYSTEMS FOR ADHERENT CELLS

Dua ÖZSOYLU, Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340, Izmir, Turkey, duaozsoylu@gmail.com

ABSTRACT

Significant efforts have been recently made to develop advanced cell-based lab-on-a-chip devices using electrochemical sensors. However, current systems are still not suitable for a ready-to-use format as the cells inside the device need incubator conditions (CO_2, nutrients, etc.) for survival during conventional transportation. Herein we propose a strategy called on-sensor cryopreservation (OSC), which enables the adherent cells to be preserved by freezing (-80°C) on a sensor surface, such as the light-addressable potentiometric sensor (LAPS).

Adherent cells on the LAPS surface were prone to cryo-injury; thus, the surface was modified to enhance the cell recovery for OSC. It relies on *i*) the integration of elastic electrospun fibers composed of polyethylene vinyl acetate (PEVA), which has a high thermal expansion coefficient and low glass-transition temperature, and *ii*) the treatment with O_2 plasma. The modified sensor is integrated into a microfluidic chip system not only to decrease the thermal mass, which is critical for fast thawing, but also to provide a precisely controlled micro-environment. This novel cryo-chip system is effective for keeping cells viable during OSC. As a proof-of-concept application, the extracellular acidification of cancer cells (CHO-K1) was evaluated by differential LAPS measurements. Results show, for the first time, that our strategy based on OSC using the cryo-chip allows label-free and quantitative measurements directly after thawing, which eliminates additional post-thaw culturing steps.

The freezing of the chips containing cells at the manufacturing stage and sending them via a cold-chain transport could open up a new possibility for the ready-to-use on-site format. Moreover, this strategy is potentially adaptable to other cell-based lab-on-a-chip devices in the future.

Key Words: Cryopreservation, biosensor, adherent cells, cryo-chip

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücre dışı asitleştirme, iki hayati metabolik yolaktaki değişimler için temel bir göstergedir; glikoliz ve hücresel solunum. Hücre-temelli biyosensörler kullanılarak hücre dışı asitleşmeyi izleyip bu değişikliklerin ölçülmesi, bozuklukları kanser de dahil olmak üzere çok sayıda hastalıkla ilişkili olan bu yolakların incelenmesinde önemli bir rol oynarlar.

Hücre dışı asitleşmeyi veya hücre dışı pH'i ölçebilen çok sayıda biyosensör sistemi geliştirilmiş olmasına rağmen, sadece birkaç sistem kantitatif, invaziv olmayan, etiketsiz (*label-free*) ve gerçek zamanlı (*real-time*) bir ölçüm profili sunabilmektedir. Hücreler genellikle bu biyosensörlerin yüzeyinde tutunarak (adherent) yetiştirildikten sonra analiz edilirler. Bu sistemlerden ise sadece ışıkla-adreslenebilen potansiyometrik sensör (LAPS) uzamsal çözünürlük yeteneğine sahiptir ve bu eşsiz özellik sayesinde, sensörün tamamı yerine aynı sensör üzerindeki istenilen herhangi bir noktadan ölçüm alınabilir. Sensör üzerindeki çok sayıda bölgenin tarama prensibiyle ölçülmesiyle elde edilen sinyallerden, tıpkı piksellerden bir fotoğrafın oluşturması gibi, (biyo-)kimyasal bir görüntü elde edilebilir. Bu prensip, tek bir hücrenin bile taranarak hücre dışı pH'in hücre membranı boyunca uzamsal değişimini bir (biyo-)kimyasal görüntü olarak gösterebilme potansiyeline sahiptir.

Hücre-temelli, yani ölçümlerde hücreleri kullanan biyosensörleri daha etkili hale getirmek için günümüzde çok sayıda çalışma yapılıyor olmasına rağmen, bu alandaki mevcut sistemler henüz "*ready-to-use*" yani "kullanıma-hazır" konsepti için uygun değildir. Çünkü, birçok hazırlık aşamasıyla bu biyosensörlerin bünyesinde optimize edilmiş olan hücrelerin son kullanıcıya nakliyesi sırasında dikkatle dengede tutulması gereken çok sayıda hayati parametre (oksijen, besin maddeleri ve sıcaklık gibi) vardır ve bu parametrelerin geleneksel nakliye sırasında bu sistemlere sağlanabilmesi pratikte mümkün değildir. Ayrıca, optimize edilen bu sistemlerin ileriki bir tarihte kullanılabilmesi için prezervasyonu da mümkün değildir, çünkü sistemin temel taşları olan hücrelerin uzun süreler boyunca aynı sistem bünyesinde kültürü sınırlıdır. Bu yüzden, mevcut sistemler "*on-demand use*" yani "ihtiyaç-durumunda kullanım" konsepti için de uygun değildir. Hali hazırda araştırmacılar, analizlerini yapmadan

önce bu sistemler içerisinde ilgili hücreleri kendi koşullarında kendileri yetiştirdikten bir süre sonra (genellikle 2-3 gün sonra) optimize hale gelen sistemi kullanırlar. Ancak bu durum, son kullanıcı için zaman ve mesai kaybıyla sonuçlanmakla kalmaz, aynı zamanda sisteme olan acil ihtiyaçlara da cevap verilememesine neden olur. Bu yüzden, "kullanıma-hazır" ve "ihtiyaç-durumunda kullanım" konseptlerini mümkün hale getirebilecek yeni metot ve araçlara acilen ihtiyaç vardır. Bu başarılması durumunda, hücre-temelli biyosensörlerin tek bir merkezden (örneğin bir fabrikadan) seri üretimleri mümkün hale gelebilecektir. Standart hale getirilmiş bu sistemler, analizlerde görülebilecek muhtemel "uygulamadan-uygulamaya" ve "operatörden-operatöre" farklılıkları da ortadan kaldırarak farklı merkezler arasında daha kıyaslanabilir sonuçların elde edilebilmesine de olanak tanıyabilir.

Araştırmanın esas amacı, yukarıda bahsedilen ihtiyaçlara cevap verebilecek bir hücre prezervasyon metodunun ve araçlarının geliştirilmesidir. Amaçlanan yeni metot adherent hücrelerin sensör (LAPS) üzerinde dondurularak korunması yani "sensör-üstü kriyoprezervasyon" prensibine dayanmaktadır. Ancak, hücreler adherent haldeyken yapılan kriyoprezervasyon, hücrelerde kriyo-hasarının görülmesine neden olur. Bu kriyo-hasarını azaltmak için sensör yüzeyinde ileri yüzey mühendislikleri yapılmıştır. Buna göre, öncelikle sensör yüzeyinin biyo-uyumluluğunun arttırılması amaçlanmıştır. Bunun için, O_2 plazma muamelesiyle yüzeyin biyo-işlevselleştirmesi hedeflenmiş olup, bu muamelenin yalnızca biyo-uyumluluğa olan etkisinin değil, aynı zamanda sensör davranışları üzerine olan etkilerinin de araştırılması ve muhtemel negatif etkilerin bertaraf edilmesi hedeflenmiştir. Daha sonra, sert LAPS yüzeyinde oluşturulacak hibrit (elastik/sert) bir yapının kriyoprezervasyondan sonra hücre geri kazanımına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, yüzeyin polietilen vinil asetat (PEVA) temelli elastik elektro-eğirilmiş liflerle modifikasyonu sayesinde hücre geri kazanımının arttırılması hedeflenmiştir. Son olarak, bu yeni metodu (sensör-üstü kriyoprezervasyon) kullanan mikroakışkan temelli bir kriyo-çip 'in geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilecek bu kriyo-çip 'in "kullanıma-hazır" ve "yerinde ihtiyaç-durumunda kullanım" konseptlerini mümkün hale getirip getiremeyeceğinin ispatlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biyosensörler ve Hücre Metabolizmasının Takibi

Biyosensörleri kullanan hücre-bazlı analizler, ilaç keşfi, kanser araştırması, immünoloji, kök hücre araştırması ve rejeneratif tıp dahil olmak üzere başlıca biyomedikal araştırma çalışmalarının tüm alanlarında olağanüstü bir rol oynamaktadır. Hücreleri bir canlı model sistem olarak kullanan bu analizler, deney hayvani kullanımına ihtiyacı azaltarak bilimsel çalışmaların yapılmasına olanak vermektedirler. Temel olarak, araştırılacak hücreler bu analiz sistemi üzerinde kültürlenir ve seçilen deneysel uyarana (örn., biyomoleküller, ilaçlar, kimyasallar) hücresel tepkileri, sistem içindeki biyosensörler vasıtasıyla kantitatif, invaziv olmayan ve etiketsiz (*label-free*) olarak ölçülür. Hücre kültürü ortamında, hücre dışı pH, laktat, oksijen, CO_2 gibi çeşitli aşağı akım parametreleri hücrelerin birçok temel aktivitesini (örn. hücre metabolizması, canlılıkları, çoğalması ve yer değiştirmesi) belirlemek için izlenebilir. Özellikle, hücre metabolizmasının izlenmesi şüphesiz hücre-temelli deneyler alanındaki en önemli konulardan biridir.

2.2 Hücre Dışı Asitleşme

Hücre metabolizması, metabolik yolaklar olarak adlandırılan biyokimyasal reaksiyonlar kümesidir. İyi bilinen metabolik yolaklar olarak glikoliz ve hücresel solunum, hücrelerde enerji üretimi (katabolizma) için son derece önemlidir. Bu yolaklar, hücreye enerji üretmek için glikoz gibi ana besinleri kullanırken laktat, CO_2 ve H^+ iyonları gibi reaksiyon yan ürünleri hücre dışı ortama salınır [1]. Bu yan ürünler, çoğunlukla obezite [2], şizofreni [3], ayrıca kanser, nörodejenerasyon ve diyabet [4] gibi yaygın hastalıklarla ilişkili olan bu enerjiyle ilgili yolakların anormal düzenlendiklerine dair bir işaret olarak kullanılabilen hücre dışı asitleşmeye neden olurlar. Bu nedenle, hücre-temelli analizler kullanılarak hücre dışı asitleştirmenin izlenmesi, bu yaygın hastalıkların biyolojik temellerini anlamada muazzam bir değere sahiptir.

2.3 Hücre Dışı Asitleşmenin Takibi

Hücre dışı asitleşmeyi ölçmek için, tek kullanımlık, kolay çalışılabilen ve düşük maliyetli oldukları için çoğunlukla floresans-temelli olan optik analizler kullanılır [5]. Fakat bu etiketleme-temelli yaklaşımlar, zaman-yoğun etiketleme adımlarına sahip olması, çalışılan hücresel sistemlere potansiyel olarak müdahale etmesi, incelenen hücrelerin analiz için feda edildiği bir son-nokta analizi olması ve floresans sinyalinin zamanla kararlılığını kaybetmesi gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bununla birlikte, hücre dışı asitleştirmenin etiketsiz, invaziv olmayan ve kantitatif algılanması için biyosensörleri kullanan sadece birkaç hücre bazlı analiz geliştirilmiştir. Bunlardan Seahorse XF analizör (Agilent Technologies Inc., USA) oksijen tüketim oranı (OCR) ve hücre dışı asitleşme oranını (ECAR) takip etmede optik metotlar kullanır [6]. Ancak, bu sistemde analiz, genellikle sınırlı miktarda besin içeren ve serum içermeyen, tamponlanmamış ortam kullanır. Bu durum hücre kültürünün uzun süreli yapılması istendiğinde ortam içindeki besinlerin tükenmesine yol açabilmektedir [7]. Bu, hücrelerin anormal aktivitesine neden olabilir ve bu da yanlış sonuçlara neden olabilir. Buna ek olarak, Seahorse analizörü, sürekli besin kaynaklarının verilmesini sağlayan steril, kapalı ve kesme gerilmesi sağlayabilen bir mikroperfüzyon konsepti sunamamaktadır. Bu nedenle, bu sistem uzun-süreli olarak hücre dışı asitleştirmenin izlenmesine cevap verememektedir. ECAR' in gerçek-zamanlı takibi için Bionas Discovery 2500 (Bionas GmbH) cihazı yarı iletken-temelli sensörler ile çalışır [8]. Bununla birlikte, hücre dışı asitleşmenin uzun-süreli ölçümü için iyon-duyarlı alan-etkili-transistor (ISFET) kullanan alan-etki-temelli metotların daha uygun olduğu görülmüştür [9].

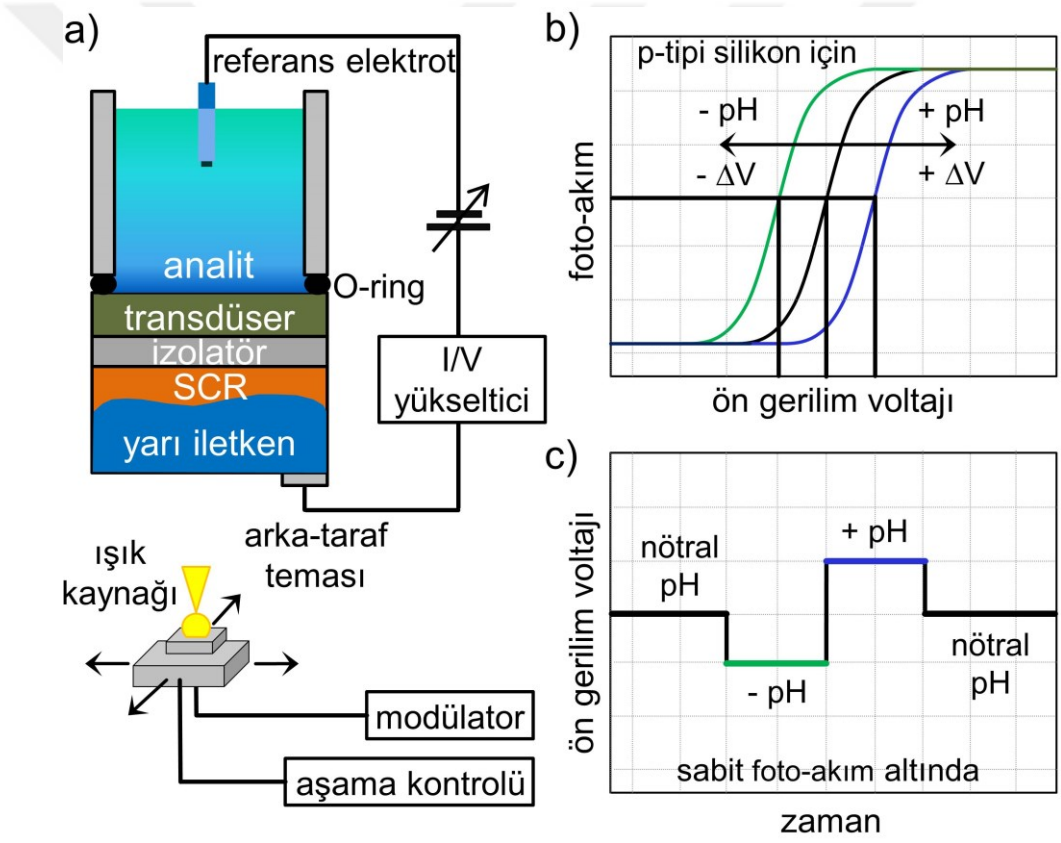
2.4 Hücre Dışı Asitleşmenin LAPS ile Takibi

Bir başka alan-etki-temelli biyosensör olan ışıkla-adreslenebilen potansiyometrik sensör (LAPS), uzamsal çözünürlük yeteneği sayesinde mevcut biyosensör çözümlerine göre olağanüstü üstünlük sergilemektedir. Sensör yüzeyi üzerinde istenen bir algılama noktası, pH'e duyarlı transdüser tabakası (genellikle Ta_2O_5 veya Si_3N_4) yoluyla hücre dışı asitleşmeyi izlemek için, ışık aydınlatmasıyla adreslenebilir [10]. Dahası, bu eşsiz özellik kullanılarak, hücre dışı pH (pH_e) ve hücre

dışı asitleştirmenin (EA) biyokimyasal görüntüsünü elde etmek için sensör üzerindeki belirli bir alan modüle edilmiş bir ışık kaynağı tarafından taranabilir.

2.5 LAPS' in Çalışma Prensibi

Yarı iletken-izolatör temelli (alan-etki yapısında) potansiyometrik sensörler etiket kullanmadan ve kantitatif (biyo-)kimyasal algılamada önemli bir rol oynarlar [11]. Işıkla-adreslenebilen potansiyometrik sensör (LAPS), bu tür sensörlerin önemli bir alt tipi olup; sensör yüzeyindeki yüklerin (iyonlar gibi) varyasyonlarını uzamsal olarak çözülmüş bir şekilde tespit edebilirler [12,13]. Şekil 1, pH-duyarlı Ta_2O_5 transdüser tabakasına sahip LAPS'ın çalışma prensibine genel bir bakış sunmaktadır.



Şekil 1. LAPS'ın çalışma prensibi. **a)** Işıkla-adreslenebilen potansiyometrik sensör (LAPS), elektrik bağlantısı ve ışık kaynağı ile gösterilmiş taramalı LAPS ölçüm düzeneğinin şematik gösterimi; SCR: uzay-şarj bölgesi. **b)** Farklı analit konsantrasyonları için LAPS düzeneğinden elde edilen şematik I/V eğrileri. **c)** Farklı analit konsantrasyonları için LAPS düzeneğinden sabit foto-akım modunda gerçekleştirilen ölçümlerin şematik çizimi.

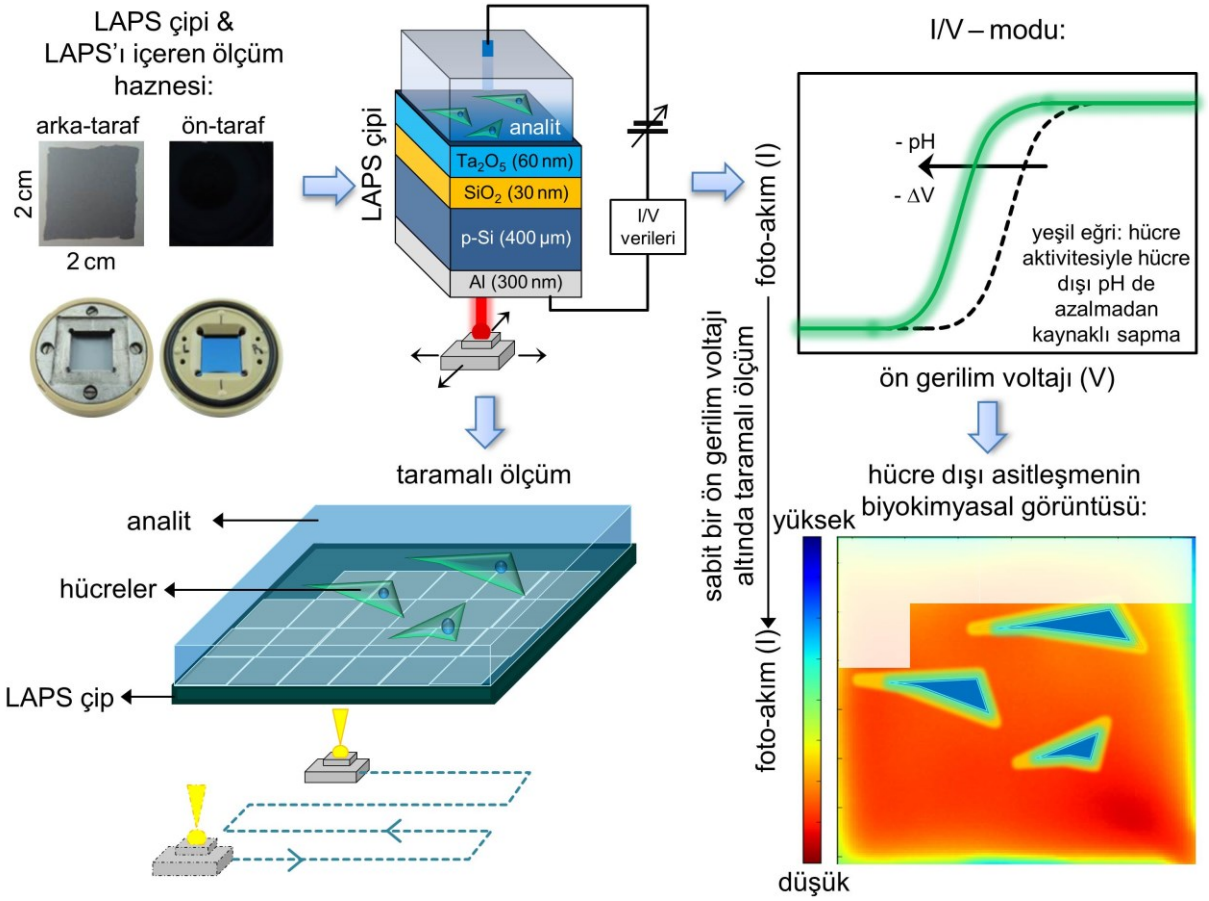
Analit çözeltisindeki H^+ iyonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak, transdüser üzerinde ortaya çıkan yüzey potansiyeli, bir referans elektrotu ile yarı iletken arasına uygulanan DC ön gerilim voltajı ile üst üste bindirilir. Bu, yarı iletken/izolatör arayüzünde bir uzay-şarj bölgesi [space-charge region (SCR)] oluşmasına neden olur (Şekil 1(a)). Bu arada, LAPS sensörlünün belirli bir bölgesini ya da noktasını aydınlatarak elektron boşluk çiftleri (*electron-hole pairs*) oluşturmak için modüle edilmiş bir ışık kaynağı kullanılır. Uzay-şarj bölgesiyle bu elektron-boşluk çiftlerinin lokal etkileşimi, harici olarak algılanabilir bir foto-akım oluşmasını sağlar. Yüzey potansiyelindeki lokal varyasyonlar, uzay-şarj bölgesindeki foto-akımın genliğini etkiler. Bu yolla, ışık kaynağının yerini değiştirerek, sensörün belirli bir bölgesinde meydana gelen foto-akım okunabilir [11,13–15]. LAPS'ın çalışma prensibi ile ilgili daha fazla ayrıntıya ilgili literatürlerden ulaşılabilir [10,13,16–18].

2.6 LAPS İle Sinyal Analizi

LAPS kullanıldığında, karakteristik foto-akım/voltaj grafikleri (I/V eğrileri) elde edilir. Bunu elde etmek için, uygulanan ön gerilim voltajıyla aynı anda yarı iletkenin seçilen bir bölgesi bir ışık kaynağı ile (lazer gibi) aydınlatılır. İşlem, uygulanan bu ön gerilim voltajının kademeli olarak değiştirilmesiyle birçok kez tekrarlanır ve her bir uygulanan ön gerilim voltajına göre elde edilen foto-akımlar kaydedilerek bu grafikler elde edilir. Şekil 1(b)'de gösterildiği gibi, çözeltideki lokal analit konsantrasyonuna bağlı olarak, bu I/V eğrisi yatay eksen boyunca hareket eder. Foto-akim, I/V eğrisinin tükenme (deplesyon) aralığından seçilen bir noktadan (genellikle deplesyonun ortasindan) seçilerek bir sabit olarak tanımlandığında, bu seçilmiş ölçüm alanındaki potansiyelin lokal konsantrasyon değişimine karşılık gelen yatay potansiyel kayma değeri (ΔV) zamanın bir fonksiyonu olarak hesaplanabilir (Şekil 1(c)). Bu şekilde elde edilen grafikten pH' ya göre potansiyeldeki (voltajdaki) değişim anlaşılabileceği için, buradan kolaylıkla sensörün pH-duyarlılığı (örn. 58 mV/pH seklinde) hesaplanabilir. LAPS ile sinyal analiziyle ilgili daha fazla detaya ilgili literatürlerden erişilebilir [11,14,18].

2.7 LAPS İle Kimyasal Görüntü Elde Edilmesi

Bir önceki bölümde foto-akimin bir sabit olarak seçilmesiyle buna karşılık gelen voltajdaki değişime göre pH-duyarlılığının hesaplanabileceği belirtilmişti. Benzer yaklaşımla, voltaj (potansiyel) değerinin sabit tutulmasıyla ise ona karşılık gelen foto-akimin saptanabileceği de akiktir. Bu da, ışık kaynağının aydınlattığı (sensörün altından) her noktadan bir foto-akim elde edilebileceği anlamına gelmektedir. Şekil 2'de, taramalı LAPS ölçümleri sayesinde bu her bir ölçüm noktasından elde edilen sonuçların bir araya getirilerek bir biyokimyasal görüntünün nasıl elde edilebildiği gösterilmiştir.



Şekil 2. Taramalı LAPS ölçümüyle bir biyokimyasal görüntünün elde edilmesi. Söz konusu temsili biyokimyasal görüntü hücre dışı asitleşmenin pH-duyarlı Ta_2O_5 transdüser tabakası sayesinde saptanabilmesiyle elde edilmiştir. Biyokimyasal görüntüdeki yüksek foto-akimin ölçüldüğü bölgeler hücre dışı asitleşmeyi işaret etmektedir.

Yukarıdaki şekilde detaylıca tarif edildiği üzere, eğer sensör yüzeyindeki iyonların (örneğin H^+ iyonları) konsantrasyonunda uzamsal olarak farklar var ise, örneğin yüzeyin bazı bölgelerinde hücrelerin bulunması ve bunların metabolik olarak aktif olup hücre dışına asidik karakterdeki moleküllerin (H^+ iyonları gibi) salınması durumunda, bu farklar elde edilen bu foto-akimin şiddetini de etkileyecektir. Bu konsantrasyon farklarını detaylı bicimde inceleyebilmek için ışık kaynağı belirli mesafelerle adım adım hareket ettirilerek (yani bir tarama prensibiyle) her bir noktaya özel foto-akim değerleri kaydedilebilir. Buradan hareketle, bu değerlerin sensör üzerindeki okunma koordinatları bilindiği için, her bir koordinata karşılık gelen değerler bilgisayar programı ile yan yana getirilirler. Başka bir bilgisayar programı ise, bu değerlerin büyüklüklerine göre onlara renkler kodlar ve en küçük değerden en büyük değere doğru bir renk skalası da isler. Böylece, tıpkı piksellerden bir fotoğrafın oluşturması gibi, ortaya bir görüntü (fotoğraf) çıkar. Sonuç olarak, bu görüntüdeki piksel değerlerinin farklılığı yani renk farklılığının esas kaynağı sensör yüzeyindeki iyonların konsantrasyonlarının farklılığı olduğu için bu fotoğraflara “kimyasal görüntü” denmektedir. Ayrıca, bu iyonların biyolojik bir materyal olan hücrelerden salınmasından dolayı ise, bu fotoğraflar “(biyo-)kimyasal görüntü” seklinde de ifade edilmektedirler. Işık ile bu şekilde bir uzamsal taranabilme prensibine sahip olması ve bu yolla bir (biyo-)kimyasal görüntü elde edilebilmesi LAPS'ın essiz bir özelliğidir [19–21]. Çalışmalarımızda kullandığımız LAPS çipinin transdüser yüzeyi Ta_2O_5 yapısında olduğu için bu sensör hücre katabolik aktivitesinin ürünü olan H^+ iyonlarına karşı duyarlıdır ve bu da elde edilen (biyo-)kimyasal görüntünün hücre dışı pH’i (pHe) yansıtması anlamına gelmektedir. Zaman içinde hücre katabolik reaksiyonlarını arttırdıkça dış ortama kazandıracağı bu asidik moleküllerin sayısı da artacağı için bir hücre dışı asitleşme durumu söz konusudur ve dolayısıyla, bu sensör ile hücre dışı asitleşmenin biyokimyasal bir görüntüsü elde edilmiş olur. Özellikle hayvan hücreleri veya mikroorganizmalar gibi biyolojik unsurlar söz konusu olduğu durumlarda, etiketsiz, kantitatif, gerçek-zamanlı ve invaziv olmayan bu ölçümlerle elde edilen bu (biyo-)kimyasal görüntüler hücre biyolojisi çalışmaları için büyük bir potansiyele sahiptir. Hücrede Bunlara ek olarak, kültürlenmiş hücrelerin sensör yüzeyi üzerindeki metabolik aktivitesi, sadece sensör yüzeyi ile hücreler arasındaki yaklaşık 10 nm’lik bir boşluktan H^+ iyonları gibi markör moleküller vasıtasıyla okunmaktadır. Bu

kavramın biyolojik görüntülemede ek bir yararı vardır, çünkü bu dar araştırma alanına etiketsiz bir görüntüleme sağlayan diğer yöntemlerle erişilmesi mümkün değildir [14].

2.8 Mikroakışkan Sistemler

Analizlerde mikroakışkanların kullanımı, geleneksel makro ölçekli analiz sistemlerine göre bir takım avantajlar sunmaktadır. Bu faydalardan ilki, sistemin çok daha küçük numune boyutları ve daha az reaktif hacmine ihtiyaç duymasıdır. Bu durum maliyetin düşürülmesi ve bu reaktifleri üretmek için harcanan zaman ve is gücünden büyük ölçüde tasarruf sağlanması anlamına gelmektedir. Ayrıca, her bir analiz devresinin çip üzerinde kapladığı alan çok küçük olması nedeniyle, simültane olarak birden fazla analit çalışılabilir ve bu da yüksek-verimde ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Kullanılan komponentlerin küçük olması nedeniyle, geleneksel tezgah üstü uygulamaların ötesinde bir çalışma esnekliği sağlanabilmektedir. Ayrıca, bileşenlerin boyutları küçüldükçe analiz çözünürlüğü ve algılama özellikleri de arttırılmış olur. Algılama limitlerinin düşürülmesi nedeniyle aşırı hassasiyet de mümkündür. Dahası, tüm bir analiz çok küçük akışkan kanalcıkların içerisinde vuku bulduğu için, koşulların (sıcaklık, besin maddeleri, sıvı akışı vb.) kontrolünün daha doğru ve hassas bicimde yapılabilmesi mümkündür. Bu da, sistemin çok kesin sonuçlar vermesine ve parametrelerin hassas kontrolüne olanak sağlar. Bu nedenle, mikroakışkan sistemler operatör müdahale etme ihtiyacını en aza indirerek yüksek otomasyonlu bir profil de sunar. Dahası, birden çok analizin tek bir mikroakışkan çip üzerinde gerçekleştirilebilmesine olanak sağlıyor olmasından dolayı, bu sistemler çip-üzeri-laboratuvar cihazlarının (*lab-on-a-chip devices*) genellikle vazgeçilmez elemanları halini almışlardır.

2.9 LAPS'ın Mikroakışkan Sistemlere Entegre Edilmesi

Biyolojik analizler için gelişmiş çip-üzerinde-laboratuvar cihazlarının geliştirilmesinde mikroakışkan sistemlerin yansıra, elektrokimyasal biyosensörlerin de büyük payı vardır. Biyosensörler minyatürize edilerek bu cihazlara entegre edildiklerinde, hedeflenen biyolojik analitlerin etiketsiz, gerçek-zamanlı, invaziv olmadan ve kantitatif olarak yüksek verimde takibi mümkün olabilmektedir. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada [22], LAPS'ın mikroakışkan bir sistemle

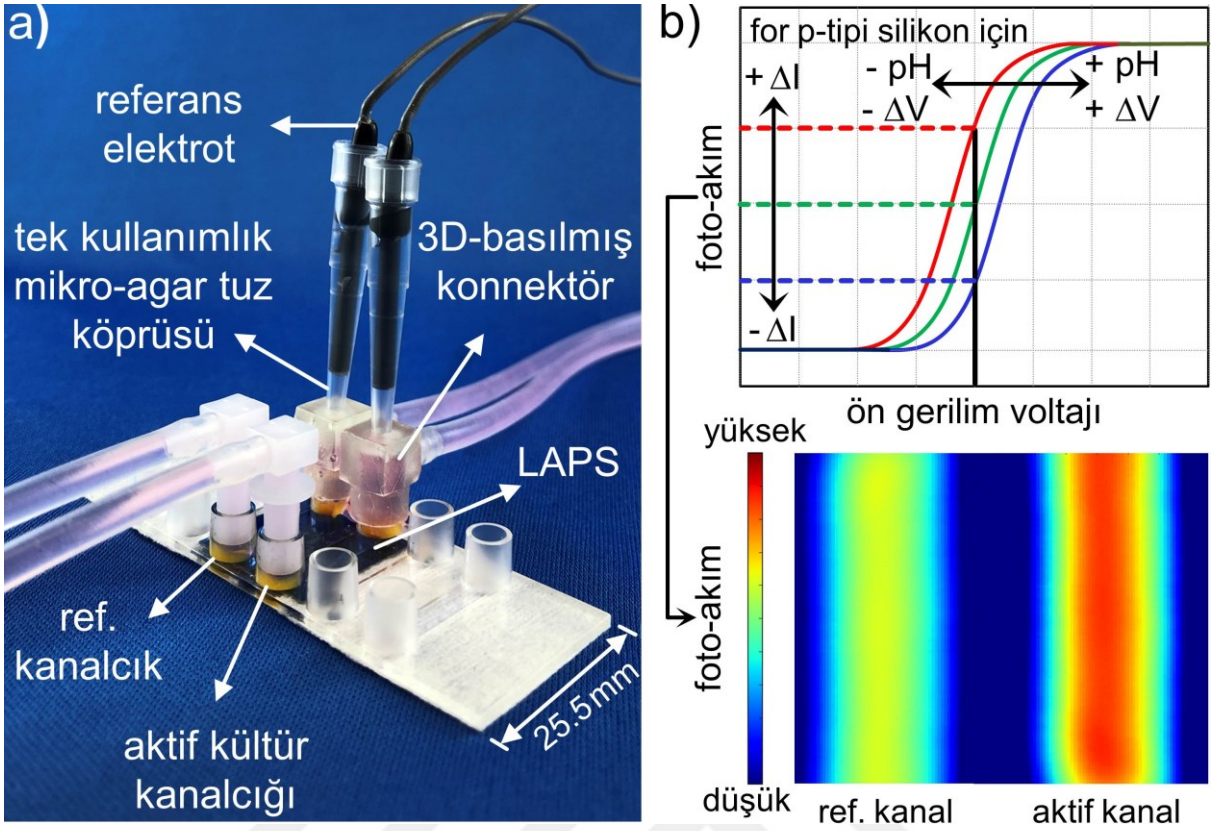
birleştirilmesinin hücrelerin uzun-süreli izlenmesini mümkün hale getirebileceği rapor edilmiş olmasına rağmen, bu çalışmada sistemin biyo-uyumluluğu değerlendirilmemiş ve bu konuda hakkında bir çalışma yapılmamıştır. Sensör yüzeyi, hücrelerin ticari kültür kapları (örn. flask, petri, pleyt) gibi standardize edilmiş yüzeylerde büyüdükleri gibi sağlıklı bicimde büyüyebilmeleri için yüksek hücre uyumluluğu sağlamalıdır. Bu durum, bu yüzeylerde büyütülen hücrelerin daha *in vivo* benzeri davranışlar sergilemesine ve bu sistemlerle analizler (örn. ilaç keşif deneyleri) yapıldığında daha gerçekçi *in vitro* sonuçlar elde edilebilmesine olanak sağlayabilir. Bu yüzden, sensörün yüzey biyofonksiyonalitesini arttırmak bu alanda yapılacak çalışmalar için bir zorunludur.

Tüm bunlara ek olarak, daha önce bahsedildiği gibi yakın zamanda LAPS çipi mikroakışkan sisteme entegre edilmiş olmasına rağmen [22], şimdiye kadarki hiçbir çalışmada bu mikroakışkan kanalcıkların içerisinde gerçeklesen hücre dışı asitleşmenin biyokimyasal görüntüsü gösterilmemiştir. Bu yüzden, bu tez çalışmasının ana amaçlarından biri olarak, kanalcıkların içerisinde ki bu asitleşmenin bir biyokimyasal görüntü seklinde görselleştirilebilmesidir.

2.10 Diferansiyel Biyokimyasal Görüntüleme

Sensörlerin biyolojik analiz ve bilimsel çalışmalarda kullanımı giderek artmaktadır. Ancak, sensörlerin algılama kapasitesinin çok hassas olması gerektiğinin yanı sıra, uzun süreli (örneğin 8 saat) ölçümler sırasında bu hassasiyetin korunabilmesi ve elde edilen sinyalde görülebilecek sapmaların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu sapmalar, sensörün kendinden (içsel) kaynaklanabileceği gibi, dışsal yani ölçüm koşullarından kaynaklı da olabilir. Özellikle, ölçümler sırasında ortam sıcaklığında yaşanabilecek dalgalanmalar, ölçümler sırasında kullanılan besin ortamlarının zaman içinde değişebilecek özelliklerinden (pH gibi) kaynaklanabilecek sapmalar veya her sensörün daha önce kalibre edilmiş olsa bile ölçümler sırasında zamana bağlı gösterdiği performans değişimleri (örneğin sinyal sapmaları) sıkça görülebilmektedir. Tüm bu nedenlerden ötürü, doğru sonuçların alınabilmesi ve tekrarlanabilir nitelikte ölçümlere erişebilmek için farklı ölçüm stratejilerine ihtiyaç yüksektir. Bunu sağlamak için, genellikle ölçümün sonunda hücreler öldürülerek sinyaldeki sıfır temel çizgisine ulaşıp, olası

sinyal sapmaları tespit edilir ve bu sapma değerleri ölçümlerden alınan sonuçlardan çıkartılarak en doğru sonuca ulaşma hedeflenir [23]. Ancak, bu durum sistemin gerçek zamanlı analizleri gerçekleştirebilmesi için sorunlara neden olabilir. Neyse ki, LAPS'ın uzamsal çözünürlük kabiliyeti [24] yoluyla aynı sensör üzerinde hem kontrol ölçümü hem de aktif kültür ölçümünün yapılabilmesi bu soruna çözüm sunabilir. Tek bir LAPS'ın iki mikrokanalcık sunabilen bir mikroakışkan sisteme entegre edilmesiyle bir kanalcık referans (hücreleri içermeyen, yani kontrol) olarak, diğeri ise aktif ölçüm kanalcığı olarak hizmet edebilir. Zaman içinde sinyal dalgalanmaları aynı sensörün farklı noktalarında aynı şekilde vuku bulduğu için [25], kontrol kanalcığında görülen sinyal dalgalanması eş zamanlı olarak aktif ölçüm kanalcığından çıkartılmasıyla sinyaldeki sapma kompanse edilebilir. Bu şekilde, aktif ölçüm kanalındaki hücreleri öldürmeden sinyaldeki sapmanın etkisi ortadan kaldırılabilir. Bu şekilde yapılan ölçüme diferansiyel ölçüm adi verilir. Bildiğimiz kadarıyla, şimdiye kadar LAPS'ı kullanan bir mikroakışkan sistemden edilmiş hücre dışı asitleşmenin bir diferansiyel biyokimyasal görüntüsü rapor edilmemiştir. Şekil 3'de bu çalışma ile elde edilmiş diferansiyel mikroakışkan çip sistemi ve yukarıda bahsedilen diferansiyel ölçüm sistemi sunulmuştur.



Şekil 3. Hücre dışı asitleştirmenin etiketsiz, kantitatif, diferansiyel tespiti için mikroakışkan çip sistemi. **a)** Tek bir LAPS'ın iki özdeş ve ayrılmış mikrokanal ile mikroakışkan sisteme entegre edildiği diferansiyel ölçüm düzeneğinin fotoğrafı. Tek kullanımlık bir mikro-agar tuz-köprüsü ile birlikte 3D-basılmıs, biyo-uyumlu konektörler, akış ve ölçüm koşulları altında devamlı bir kapalı sistem sağlar. **b)** LAPS yapısının şematik foto-akım/gerilim (I/V) eğrileri ve kanallar içindeki farklı analit konsantrasyonları için temsili diferansiyel (biyo-)kimyasal görüntü (ref.: referans).

2.11 LAPS Yüzeyinin Biyo-Uyumluluğu

Hücre-temelli biyosensörler özellikle adherent hücreler için kullanıldığında, sensörler en güçlü sinyalin elde edilebilmesi için hücrelere en yakın pozisyonda konumlandırılırlar. Dolayısıyla, bunu sağlamanın en kolay yolu, hücrelerin doğrudan sensör üzerine ekilerek orada büyütülmesidir. Hücreler bu biyo-uyumlu yüzeylerle çok sayıda hücre-substrat etkileşimi kurarak tutunur ve burada doğal ortamlarındakine (*in vivo*) benzer şekilde davranış sergileyerek sağlıklı bir şekilde prolifere olurlar [26]. Bu yüzden, sensör yüzeyinin hücreler için biyo-uyumlu bir profil sergilemesi zorunluluktur. Fakat pH duyarlılığı için LAPS yüzeyinde önemli bir unsur

olan Ta_2O_5 tabakası üzerinde hücrelerin kültürlenmesi hakkındaki kanıtlar azdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, tantal pentoksit (Ta_2O_5) yerine olumlu mekanik özellikleri ve iyi biyo-uyumluluğu ile implant malzemesi olarak kullanılan tantal (Ta) metaline odaklanma eğilimindedir [27,28]. Bu nedenle, hücre-yüzey etkileşimleri hakkında temel bilgiler elde etmek için Ta_2O_5 yüzeylerinin biyo-fonksiyonunu karakterize etmek ve geliştirmek bir zorunludur.

2.12 LAPS Yüzey Mühendisliği

Hücre-substrat etkileşimine, dolayısıyla yüzey biyo-uyumluluğuna aracılık eden en önemli unsurlardan biri çoğunlukla kültür ortamında bulunan ya da hücre yüzeyinde bulunan proteinlerin substrata yeterli ve uygun bicimde adsorbsiyonudur. Yüzey ıslanabilirliği bu aracı proteinlerin adsorbsiyonunu en çok etkileyen unsurlardan biridir. Aşırı hidrofilik yüzeylerde, su molekülleri ile yüksek yüzey hidrasyon kabiliyetine sahip bu yüzey arasındaki güçlü hidrojen bağından kaynaklanan yüksek itici solvasyon kuvvetleri nedeniyle proteinlerin yüzeylere yapışması güçtür [26,29]. Bu yüzden, yüzeyin ıslanabilirliğinin karakterize edilmesi ve belirli bir seviyede tutulması gerekmektedir. Çoğu hayvan hücresinin adezyon, yayılma ve proliferasyon için normal hidrofilik (yüksek yüzey serbest enerjili) yüzeyleri tercih etme eğilimi olduğu bilinmektedir [26]. Bu nedenle, ıslanabilirlik gibi yüzey özelliklerinin plazma muamelesi ile kontrol edilmesi, yüzey biyo-fonksiyonunu arttırmak için en önemli yaklaşımlardan biridir [26]. Plazma uygulaması, ıslak-kimyasal muamele gibi diğer yöntemlere kıyasla, basit, güvenli, ucuz ve çevre dostu bir profil sunar [30]. Ancak, sensörler söz konusu olduğunda, plazma modifikasyonları sensörün algılama davranışını ve elektronik özelliklerini de etkileyebileceğinden [31–34], ek olarak sensör üzerinde elektrokimyasal karakterizasyonların da yapılması gerekmektedir.

2.13 Sensörlerde Plazma Uygulaması

Plazma maddenin dört temel halinden biridir. Yüzeylere plazma uygulamanın çok sayıda kullanım alanı bulunmaktadır. Termal olmayan plazma muamelesi hızlı, düşük maliyetli ve çevre dostu yüzey mühendisliği için çekici ve umut verici bir araç sunar. Plazma uygulaması, yüzey aktivasyonu, dağlaması/aşındırması (*etching*),

dekontaminasyonu ve biriktirmesi (*deposition*) gibi sensör üretim ve modifikasyon mühendisliğinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Örneğin, oksijen (O_2) plazması, alan-etki-temelli bir SiO_2 EIS (elektrolit - izolatör - yarı iletken) sensörü üzerindeki altın nano-parçacıklardan organik kaplama maddelerini uzaklaştırmak için başarıyla kullanıldı [35]. Ayrıca, O_2 plazma uygulamasının SiO_2 EIS sensörleri üzerindeki enzimlerin immobilizasyonunu iyileştirmek için yüzeyi işlevselleştirmede de etkili olduğu bulunmuştur [35]. Bir Si_3N_4 EIS sensörünün kullanıldığı başka bir çalışmada da, O_2 plazma uygulamasının hem enzim immobilizasyonunu iyileştirmek hem de pH-duyarlılığını arttırmak için yararlı bir araç olduğu bildirilmiştir [36]. Görüldüğü gibi, plazma uygulaması bu alanda önemli bir yer kaplamasına rağmen, uygulamanın sensörler üzerine olası yan etkilerine dair yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Özellikle, vakumlu ultraviyole fotonlar (VUV'lar) gibi plazma tarafından yayılan radyasyon, plazma-kaynaklı sensör davranışının bozulmasına neden olabilir [25]. Bu nedenle, plazma muamelesinin sensör davranışı üzerindeki etkileri de karakterize edilmeli ve olası yan etkileri bertaraf edilmelidir.

2.14 Plazma Uygulamasının Sensör Davranışlarına Olası Etkileri

Plazma uygulaması sırasında, kaynağı yine plazma olan iyon bombardımanı, radikal fluks veya plazmadan yayılan radyasyon nedeniyle plazma-kaynaklı sensör davranışlarında bozulmalar oluşabilir. Özellikle, vakum ultraviyole fotonları (VUV'ler) gibi radyasyonlar sensöre derinlemesine nüfuz edebilir ve yarı iletken kafes ile dielektrik tabakanın atomlarını iyonize edebilirler. Bu, o alanda eşitsizliklere ve dolayısıyla sensörün elektriksel davranışında bir değişikliğe neden olabilir [31–34]. Plazma muamelesinin sensör davranışı üzerindeki olası etkilerini saptamak ve gerekli iyileştirmeleri yapmak bu yüzden önemlidir. Fakat bugüne kadar yapılan çalışmalar bu çalışmanın konusu olan Ta_2O_5 LAPS yerine SiO_2 EIS sensörleriyle ilgilidir [32,35–37].

Bir çalışmada, bir HfO_2 LAPS'ın Na^+ iyon duyarlılığını arttırmak için termal (300°C) karbon tetraflorür (CF_4) plazma uygulaması kullanılmıştır [38]. Aynı grubun başka bir çalışmasında ise, bu plazma uygulaması, bir HfO_2 LAPS 'ın amonyum (NH_4^+) iyon duyarlılığını arttırmak için kulan ilmiştir [39]. Ancak, bildiğimiz kadarıyla

daha önce yapılmış hiçbir çalışma, O_2 plazma muamelesinin Ta_2O_5 LAPS üzerindeki etkilerini ıslanabilirlik veya sensör davranışları açısından araştırmamıştır.

2.15 İleri Sensör Uygulamaları ve İnovatif Konsept Arayışları

Şimdiye kadar hücre-temelli biyosensörleri iyileştirmek için önemli çabalar harcanmış olsa da, bu alandaki mevcut sistemler hala "yerinde kullanıma-hazır" (*ready-to-use on-site*) format için uygun değildir; çünkü birçok hazırlık aşamasıyla optimize edilmiş biyosensör sisteminin içinde adherent haldeki hücrelerin, son kullanıcıya taşınması sırasında dikkatle dengede tutulması gereken oksijen, besin maddeleri, pH ve sıcaklık gibi bazı hayati parametrelere ihtiyacı vardır [40]. Bu parametrelerin geleneksel nakliye sırasında sağlanması genellikle mümkün değildir. Bu nedenle, her merkez kendi hücre-temelli biyosensör sistemini kendisi hazırlar. Fakat, bu genellikle günler alan hücre kültürü ve optimizasyon aşamalarına ihtiyaç duymaktadır [41–43]. Ayrıca, operasyonlar sadece yerleşik altyapısı ve hücre kültürü için deneyimli kadrosu olan merkezlerde sınırlıdır. Ayrıca, hücre-temelli biyosensörlerin geliştirilmesindeki ana zorluklardan biri, hücrelerin sağlıklı bir durumda taşınabilir bir sistem içinde depolanabilmesi ile ilgilidir [44,45]. Bu zorluk, hücre-temelli sistemlerin bu da pratik uygulanabilirliklerini ve ticarileşme kapasitelerini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, biyosensör uygulamalarında "yerinde kullanıma-hazır" format sağlamak için tüm optimize edilmiş kültürün korunmasına acil ihtiyaç vardır.

2.16 Adherent Hücre Kriyopreservasyonu

Kriyoprezervasyon, yani sıfırın altındaki sıcaklıklarda hücrelerin dondurulması, korunması ve daha sonra talep üzerine çözülmesi işlemi, yukarıda belirtilen uygulamalardaki boşluğun doldurulmasına yardımcı olabilir. Ancak, adherent hücreler için geleneksel kriyoprezervasyon, hücrelerin kültür yüzeyinden kaldırılması, santrifüjleme ve kültür ortamından başka bir yerde muhafaza edilmesi de dahil olmak üzere hala çok zaman alıcı ve manuel uygulama adımlarına ihtiyaç duyar. Bu, "kullanıma hazır" konseptler için elverişsizdir, çünkü, hücrelerin yüzeyden kaldırılması, platform içerisinde tümüyle optimize edilmiş kültürü dağıtır, hem de hücre-hücre iletişimini, hücre-substrat bağlantılarını ve hücre iskeletinin

organizasyonunu bozar [46]. Bu nedenle, hücrelerin doğal halleriyle substrata adherent haldeyken doğrudan kriyoprezervasyonu çok umut verici bir yaklaşımdır. Fakat bir substrat üzerindeki yapışık hücreler, büyük ihtimalle donmakta olan hücre membranı ve temasta oldukları sert substrat arasındaki doğrusal termal genleşme katsayılarındaki uyumsuzluktan dolayı, kriyo-hasarına daha yatkındırlar. Bu uyumsuzluk hücre zarı hasarı, hücre ayrılması ve hücre kırılması ile sonuçlanabilir [46–48]. Bu nedenle, bu zorlukların üstesinden gelmek ve kriyoprezervasyondan sonra yüksek hücre kazanımı sağlamak için yenilikçi yöntemlere ve araçlara acilen ihtiyaç vardır.

2.17 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon

Adherent-hücre kriyoprezervasyonunda yukarıda bahsedilen problemlerin üstesinden gelebilmek için hücrelerin tutundukları yüzeylerde (biyosensörün yüzeyi) modifikasyonlar yapılarak kriyoprezervasyon kaynaklı hücre kriyo-hasarı azaltılabilir. Bu, kriyoprezervasyondan sonra yüksek hücre-kazanımı (*cell-recovery*) anlamına gelmektedir. Bu başarılabilirse, sensör-üstü kriyoprezervasyon (*on-sensor cryopreservation*) tekniği etkin hale gelebilir. Bu kavram bildiğimiz kadarıyla ilk kez bu çalışmayla önerilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, modifiye edilmiş bu biyosensörler mikroakışkan sistemlere entegre edilerek kriyoprezervasyonun daha hassas kontrolü de mümkün hale getirilebilir. Tüm bunlar etkili bicimde başarılabilirse, elde edilen bu çip sistemi (kriyo-çip) sayesinde “yerinde kullanıma-hazır” ve “ihtiyaç durumunda kullanım” konseptleri hayata geçirilebilir. Tercihen, gerçekleştirilecek yüzey modifikasyonu ve “sensör-üstü kriyoprezervasyon” tekniği diğer çeşit biyosensörlere de uydurulabilir yapıda olmalıdır. Böylece, bu teknik diğer çip-üzerinde-laboratuvar cihazlarına da “yerinde kullanıma-hazır” ve “ihtiyaç durumunda kullanım” konseptleri sunabilir.

2.18 Adherent Hücre Kriyoprezervasyonunda Kriyo-Hasarı

Maddelerin sıcaklık değişimlerine orantılı olarak boyutları/uzunlukları değişmektedir (genleşme ya da büzüşme). Her maddenin kendine özgü olan bu özelliği onun termal genleşme katsayısını (α_L) olarak verilir. Birbirleri ile temas halinde olan iki tabakanın termal genleşme katsayısının birbirinden çok farklı olması

durumunda, sıcaklık değişimleri sırasında bir tabaka daha fazla genleşirken diğer tabaka daha az genleşir. Bu durum tabakaların birbirine bir stres kuvveti oluşturmasına neden olur ki bu da birbirinden kopmalarına veya zayıf bölgelerinden kırılarak bu stresin hafifletilmesine sebebiyet verir. Bu durum yaşanmaması için tabakaların α_L değerleri birbirine yakın seçilmelidir. Adherent hücre kriyoprezervasyonunda son zamanlarda yapılan çalışmalar bu prensibe dayanmaktadır [47–49]. Bu çalışmalara göre, donma sırasında hücre membranı ile substrat arasında kalan dar bölgede oluşan buz tabakası, kriyo-hasarın esas kaynağını oluşturmaktadır. Bu buz tabakasının nispeten yüksek olan α_L değeriyle substratın α_L değeri örtüşmemekte ve donma sırasında bu iki tabaka arasındaki farklı uzunluk değişimleri uyuşmazlık stresinin bir kademeleşmesini oluşturabilir ve bu da muhtemelen çatlama, kabarma, burkulma ve parçalanma oluşumu ile bu tabakaların bu stresten kurtulup rahatlamasıyla sonuçlanabilmektedir [47,49]. Bu buz tabakası hücre membranı ve adezyon proteinlerini de kavradığından dolayı, üzerinde meydana gelen bu negatif etkiler doğrudan onlara da yansımaktadır. Bu durum, hücrenin parçalanmasına veya yüzeyden kopmasına neden olabileceği için bu mekanizmanın adherent hücre kriyoprezervasyonunda kriyo-hasarın nedenlerinden birisi olduğu düşünülmüştür. Bu yüzden, substratın lineer termal genleşme katsayısının (α_L), dondurma ve çözme işlemleri sırasında substrat ile temas halindeki hücre zarı arasında oluşan buzun ki ile eşleşmesi gerektiği varsayılmıştır. Buradan hareketle, α_L değeri buzunkine yakın olan materyalden elde edilmiş kültür yüzeyleri ile çalışılmış ve müspet sonuçlar elde edilebilmiştir [47–49]. Benzer mekanizmanın sensör-üstü kriyoprezervasyon için de araştırılması ve kriyoprezervasyon sırasında görülebilecek olası kriyo-hasarının azaltılması için çalışmalar yapılmalıdır.

2.19 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyonda Hibrit Yüzey Yaklaşımı

Bu çalışmada kullanılan LAPS'ın kültür yüzeyi (bir transdüser) Ta_2O_5'ten oluşmaktadır. Bu tabakanın da α_L değerinin buzunkinden oldukça düşük olması yukarıda belirtilen nedenlerden ötürü kriyoprezervasyon sırasında hücre kaybına neden olabilir. Bunun için, öncelikle bu yüzeyden kaynaklanan olası kriyo-hasarların araştırılması ve bu sonuçlara göre yenilikçi yöntem ve araçların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

LAPS'ın sert kültür yüzeyi, yüksek termal genleşme katsayısına sahip olan polietilen vinil asetattan (PEVA) oluşan elastik elektro-eğirilmiş liflerle modifiye edilmiştir.

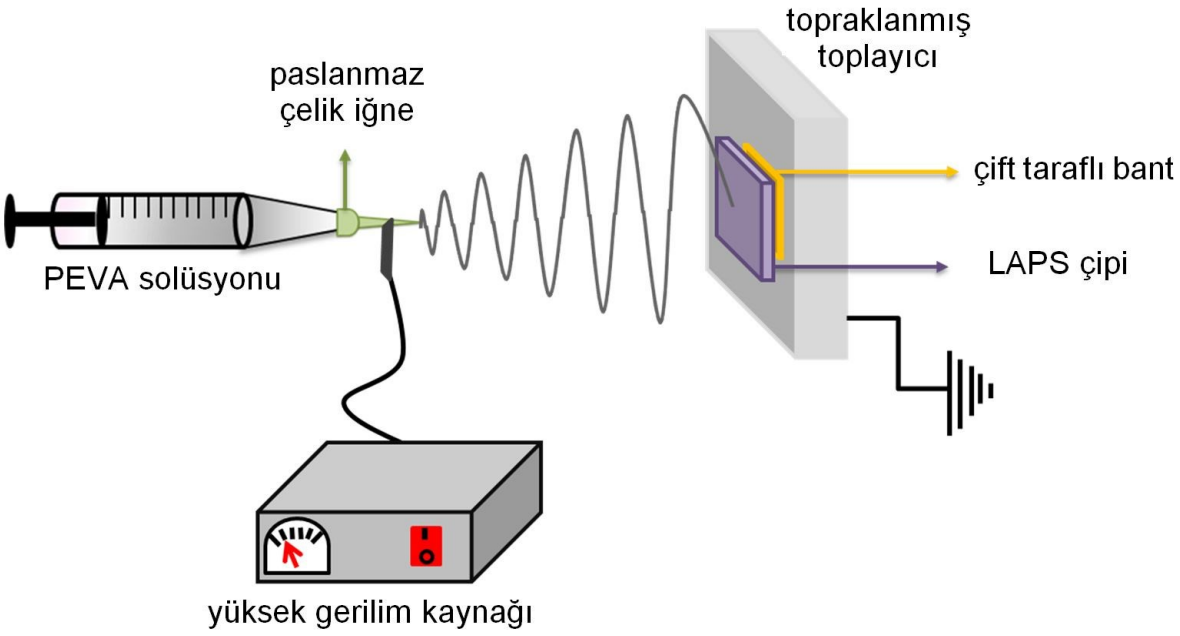
Çalışmamızda PEVA polimerinin (özellikle vinil asetat oranı ağırlıkça %40 olan) tercih edilmesinin başlıca nedenleri şunlardır:

- Düşük camsı geçiş sıcaklığına, yüksek elastikiyete ve yüksek termal genleşme özelliklerine sahip olması.
- Biyo-uyumlu olması ve biyo-bozunur olmaması.
- Etanol sterilizasyonuna ve UV radyasyonuna karsı dayanıklı olması.
- Birçok polimer için bir çözücü olan DMSO gibi kriyoprotektan ajanlara karsı dayanıklı olması.
- Düşük maliyetli ve elektro-eğirme tekniğine uygun olması.
- Şimdiye kadar hakkında çok az sayıda çalışma yapılmış olması.

Bu sayede, bildiğimiz kadarıyla şimdiye kadar ilk kez bir hibrit yapı (elastik/sert) adherent hücre kriyoprezervasyonunu iyileştirmek için kullanılmıştır. Hücre-temelli biyosensörler genellikle sert ve genleşme katsayısı düşük olan materyallerden yapılmış kültür yüzeylerine sahip oldukları için, yukarıda bahsedilen modifikasyonun başarılı olması durumunda bu yaklaşım diğer sensörlere de uygulanabilir olmasından dolayı geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir.

2.20 Elektro-Eğirme Tekniği İle Sensör Yüzey Modifikasyonu

Elektro-eğirme tekniği, hücre dışı matriksin (ECM) lifli yapısını taklit edebilen, ince (birkaç mikron veya daha küçük) ve sürekli liflerin üretimine izin veren bir tekniktir [50]. Şekil 4'de LAPS çipinin PEVA liflerle kaplanarak modifiye edilmesi için uygulanan elektro-eğirme düzeneğinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 4. Elektro-eğirme tekniği ile LAPS yüzeyinin elastik PEVA liflerle modifiye edilmesinin şematik gösterimi.

Tipik olarak, liflerin elde edileceği polimer ve/veya polimerler uygun çözücüde çözülerek bir polimer çözeltisi elde edilir. Elde edilen bu çözelti ucunda metal iğnesi bulunan bir enjektöre doldurulur. Daha sonra, bir pompa yardımıyla bu çözelti iğnenin ucundan dışarıya kontrollü bir akış rejimiyle pompalanır. İğnenin ucundan çıkan polimer çözeltisi yüksek bir elektriksel potansiyele maruz bırakılır. Bu potansiyel, polimer çözeltisinin iğnenin ucundan fırlamasana, bir polimer jeti oluşmasına ve çözeltinin yüzey geriliminin üstesinden gelinmesine neden olur. Jet, bükülme dengesizliklerine maruz kalır, çözücünün uzaması ve buharlaşmasından ötürü fibriler yapı bir toplayıcı üzerinde toplanmaktadır [51]. Modifiye edilecek sensör de bu toplayıcı üzerine yerleştirilmiş olduğu için, sensör yüzeyinde de bu fibriler yapı oluşur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu tez ile ilgili çalışmalar 25 Şubat 2016 (tez konusunun enstitü tarafından kabulünü takiben) tarihinden itibaren literatür (kaynak) tarama ile başlamıştır. Deneysel ve veri toplamayla ilgili çalışmalar Eylül 2017 – Haziran 2020 tarihleri arasında Fh Aachen University of Applied Sciences, The Institute of Nano- and Biotechnologies, Biomedical Engineering, Campus Jülich, Almanya' da gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma Şubat 2016 – Ağustos 2020 zaman diliminde yapılmıştır.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırma çalışmalarda rutin kullanılan ve *in-vitro* kullanıma hazır haldeki ticari ve devamlı hücre hattıyla yapılacak bir *in-vitro* çalışma olduğu için herhangi bir gönüllü veya benzerlerini kapsayan örnekleme sahip değildir.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmamızda ticari bir hücre hattı olan Çin hamsteri yumurtalık (CHO-K1) hücreleri (DSMZ, Almanya) kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Genel olarak, araştırmanın bağımlı değişkenleri hücreler ve modifiye edilmiş yüzey ve/veya çip sistemleridir. Araştırmanın bağımsız değişkenleri ise yüzeylerin ıslanabilirliği, sensör elektroniğinde olan değişiklikler, yüzey biyo-uyumluluğu, donma sonrası hücre metabolik aktivitesidir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Sensör Üretimi

Alan-etki-temelli bir biyokimyasal sensör olan LAPS, Al/p-Si/SiO_2/Ta_2O_5 yapısıyla elde edilmiştir (bkz. Şekil 2). Bunun için, termal kuru oksidasyon prosedürüyle (1000°C, 40 dakika, O_2) ince (30 nm) bir SiO_2 izolatör tabakasını üzerinde büyütmek için p-tipi bir silikon gofret (<100>, spesifik elektrik direnci: 5-10 Wcm, kalınlık: 400 µm) kullanıldı. 30 nm kalınlığa sahip bir tantal (Ta) tabakası, elektron demeti ile buharlaştırma tekniği ile ($0.5x10^{-6}$ mbar'da 0.5 nm/s) bu SiO_2 tabakasının üstüne elde edildi. Daha sonra, pH-duyarlı bir transdüser tabakası (60 nm Ta_2O_5), bir termal kuru oksidasyon işlemi (520°C, 120 dakika) ile bu tabakadan büyütüldü [13]. Sensörün arka yüzünde, 300 nm alüminyum (Al) katmanı, elektron demeti ile buharlaştırma tekniği ile (2 nm/s) ohmik arka-taraf teması sağlamak için elde edildi. Gofret daha sonra 2x2 cm^2 büyüklüğündeki tekli çiplere doğranmıştır. Çiplerin arka tarafında bir aydınlatma penceresi (1.5x1.5 cm^2) oluşturmak için Al katmanı, %5 hidroflorik asit kullanılarak kısmen çıkarıldı [52].

3.6.2 Elektrokimyasal Karakterizasyonlar

İyi-bilinen elektrokimyasal karakterizasyonlar, çalıştırılabilir ölçüde sensör davranışlarını sağlamak için sensör imalatından sonra bir elektrokimyasal spektrum analizörü (Zahner-Elektrik GmbH) kullanarak kaçak-akım, empedans ve kapasitans-voltaj (C/V) eğrilerini ölçerek gerçekleştirildi [52,53]. Foto-akım/gerilim (I/V) ölçümleri için, özel olarak hazırlanmış bir LAPS ölçüm düzeneği daha önce açıklandığı gibi [25] kullanıldı. Bunun için, LAPS çipi önce bir ölçüm haznesine (bkz. Şekil 2) monte edildi. Bu hazne bir elektrolit çözeltisi (Titrisol tamponu, pH 7) ile doldurulduktan ve içerisine bir Ag/AgCl referans elektrotu (3M KCl) daldırıldı. Duyarlı foto-akım elde etmek için, hareket ettirilebilir, odak noktası yaklaşık 70 µm çapında olan ve ışık yoğunluğu modülasyonlu olan bir lazer (QL78F6S-A, λ=780 nm, QSI) ışık kaynağı olarak kullanılmıştır. Yarı iletkenin belirli bir tanımlanmış alanını raster benzeri bir şekilde aydınlatmak için, modülasyonlu lazerin hareketi, doğrusal hareket eden bir nano-motor (XY-kademeli) (GMN, Almanya) tarafından tam olarak kontrol edildi. I/V eğrisinin tükenme (deplesyon) aralığının merkezinden elde edilen 0.45 V 'luk sabit bir ön gerilim, kimyasal görüntüleri kaydetmek için kullanıldı. Bu amaçla, 14 X 14 mm^2'lik

bir alan, 141 X 141 ölçüm noktası ile bir ölçüm alanını oluşturacak şekilde, motorların basamak genişliğinin 100 µm'ye ayarlanmasıyla taranmıştır. Tüm ölçümleri kontrol etmek için özelleştirilmiş bir LabVIEW yazılımı kullanılmıştır. PH hassasiyeti, sapma ve histerezis gibi sensör karakteristikleri, Titrisol tamponlarının (Titrisol, Merck, Almanya) pH değerleri (pH 7-9 arasında) ölçülerek belirlenmiştir.

3.6.3 Plazma Muamelesi

LAPS çipleri, plazma uygulamasından önce bir ultrasonik banyoda 3'er dakika boyunca aseton, izopropanol, etanol ve de-iyonize (DI) su ile art arda temizlendi ve azot gazi ile kurutuldu. O_2 plazma muamelesi düşük basınçlı bir plazma sistemi (Diener Plasma Surface Technology, model Femto) kullanılarak yapıldı. Numuneler sisteme yerleştirildikten sonra, 0.2 mbar'lık kontrollü bir basınçta 40 kHz'de çalışan bir radyo frekansı jeneratörüne bağlanan reaksiyon odasına O_2 gazı enjekte edildi. Uyarma (eksitayson) gücü 30 W, toplam gaz akış hızı 20 sccm olarak ayarlandı. Ancak, en elverişli plazma uygulamasına karar verebilmek için, numuneler ileriki bölümlerde detayları anlatılacağı üzere uygulama sırasında farklı maskeleme tekniklerine ve plazma uygulama sürelerine maruz bırakıldılar.

3.6.4 Temas Açısı (Islanabilirlik) Ölçümleri

Su temas açısı ölçümleri, LAPS'ın yüzey ıslanabilirliğinin değişikliğini anlamak için "sessile drop" metoduyla su damlası (statik) temas açısı ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. Kontrollü sıcaklık (22°C) ve bağıl nem (% 58-60) altında bir optik temas açısı ölçüm cihazı (DataPhysics Instruments GmbH, Almanya) kullanıldı. Ölçümler için, sensör yüzeyleri boyunca rastgele seçilen en az üç noktaya 5 µL de-iyonize su damlaları eklendi. Düşme etkisinden 10 saniye sonra görüntüler elde edildi ve temas açıları, cihazın yazılım modülü (SCA20) kullanılarak hesaplandı.

3.6.5 Plazma Muamelesinin Sensör Islanabilirliğine Etkisinin Araştırılması

Plazma uygulamasının süresinin artması, bu uygulamanın sensör davranışlarına olan olası negatif etkilerini de arttırabileceğinden, sensör yüzeyini yeteri kadar hidrofilik yapabilen en kısa süreli plazma uygulamasına karar verebilmek önemlidir. Bu yüzden, sensör yüzeyi farklı süreler boyunca plazma uygulamasına tabi tutulup, bu uygulamaların sensör ıslanabilirlik özelliklerine olan etkileri incelenmiştir. Bunun için, Bölüm 3.6.3 Plazma Muamelesi'nde anlatıldığı şekilde ancak farklı

süreler boyunca (30, 60, 90 ve 120 s) numuneler plazma muamelesine tabi tutulmuşlardır. Her bir grup için en az üç sensör kullanmıştır. Sonuçları hiç muamele edilmemiş (kontrol) yüzeylerle kıyaslayabilmek için bir grup (en az üç sensör) sensör plazma uygulaması sırasında (30 sn. boyunca) maskelenmiştir. Maskeleme işlemi silikon içermeyen adeziv bir plastik film (1007R-6.0, Ultron Systems, Inc., USA) ile yapılmıştır. Bu plastik film üzerine laboratuvar tipi bir alüminyum folyo da örtülmüştür. Plazma uygulaması sonrasında Bölüm 3.6.4 Temas Açısı (Islanabilirlik) Ölçümleri'nde anlatıldığı gibi temas açısı ölçümleri yapılarak ıslanabilirlik değişimleri saptanmıştır. Ayrıca, hidrofobikliğin zaman içinde geri kazanılıp kazanılmadığını (hidrofobiklik geri kazanımı) görmek için, numuneler plazma uygulamasından sonra sırasıyla önce 12 saat boyunca Titrisol solüsyonunda bekletilmiş, daha sonra bir saat, 24 saat ve 48 saat boyunca hücre kültür ortamında tutulmuş, bunlardan sonra ultrasonik banyoda 3'er dakika boyunca aseton, izopropanol, etanol ve de-iyonize (DI) su ile art arda temizlenmiş, son olarak da oda koşullarında (kapalı ortam) 5 gün boyunca bekletilmişlerdir. Her bir uygulama öncesinde ve sonrasında sensör ıslanabilirlikleri (kontrol numuneleri dahil) tekrar değerlendirilmiştir.

3.6.6 Plazma Muamelesinin Sensör Davranışlarına Etkisinin Araştırılması

Bu çalışmada kullanılan taramalı LAPS ölçüm düzeneği daha önce literatürde ayrıntılı olarak açıklanmıştır [11,17,18,21]. Kurulumun şematik diyagramı daha önce Şekil 1(a) ve Şekil 2 'de gösterilmiştir. Buna göre, Bölüm 3.6.1 Sensör Üretimi'nde açıklanan LAPS çipi, bir ölçüm hücresine monte edildi (Şekil 2). Bu hazne bir elektrolit çözeltisi (Titrisol tamponu, pH 7) ile doldurudu ve içerisine bir Ag/AgCl referans elektrotu (3M KCl) daldırıldı. Duyarlı foto-akım elde etmek için, hareket ettirilebilir, odak noktası yaklaşık 70 µm çapında olan ve ışık yoğunluğu modülasyonlu olan bir lazer (QL78F6S-A, λ=780 nm, QSI) ışık kaynağı olarak kullanılmıştır. Yarı iletkenin belirli bir tanımlanmış alanını raster benzeri bir şekilde aydınlatmak için, modülasyonlu lazerin hareketi, doğrusal hareket eden bir nano-motor (XY-kademeli) (GMN, Almanya) tarafından tam olarak kontrol edildi.

Şekil 1(b)'deki gibi I/V eğrileri elde edebilmek için, referans elektrot ve arka taraf-teması arasına −0.8V ila +2V arasında ön gerilim voltajları uygulandı. I/V eğrileri, sensör üzerindeki toplam 48 farklı noktadan elde edildi. Bunu yapmak için,

sensörün sol tarafında 24 noktadan (plazma muamelesi yapılacak kısım), sensörün sağ tarafında da 24 noktadan (maskelenecek yani referans olacak kısım) tarama şeklinde okunarak bu eğriler kaydedildi ve hem sol için hem de sağ için bir ortalama ayrı ayrı hesaplandı. Şekil 1(c)'de gösterildiği gibi, I/V ölçüm prosedürü, 250 nA'lik sabit bir foto-akımında karşılık gelen ön gerilim voltajını hesaplamak için her 10 dakikada bir tekrarlandı. Bu verilerden sabit foto-akım da ölçüm grafikleri elde edilmiştir. Ölçüm çözeltisi olarak pH 6 ila pH 8 aralığında Titrisol tampon çözeltileri (Titrisol, Merck, Almanya) kullanılmıştır. I/V eğrisinin tükenme (deplesyon) aralığının merkezinden elde edilen 0.5 V'luk sabit bir ön gerilim, kimyasal görüntüleri kaydetmek için kullanıldı. Bu amaçla, 14 X 14 mm^2'lik bir alan, 141 X 141 ölçüm noktası ile bir ölçüm alanını oluşturacak şekilde, motorların basamak genişliğinin 100 µm'ye ayarlanmasıyla taranmıştır. Tüm ölçümleri kontrol etmek için özelleştirilmiş bir LabVIEW yazılımı kullanılmıştır.

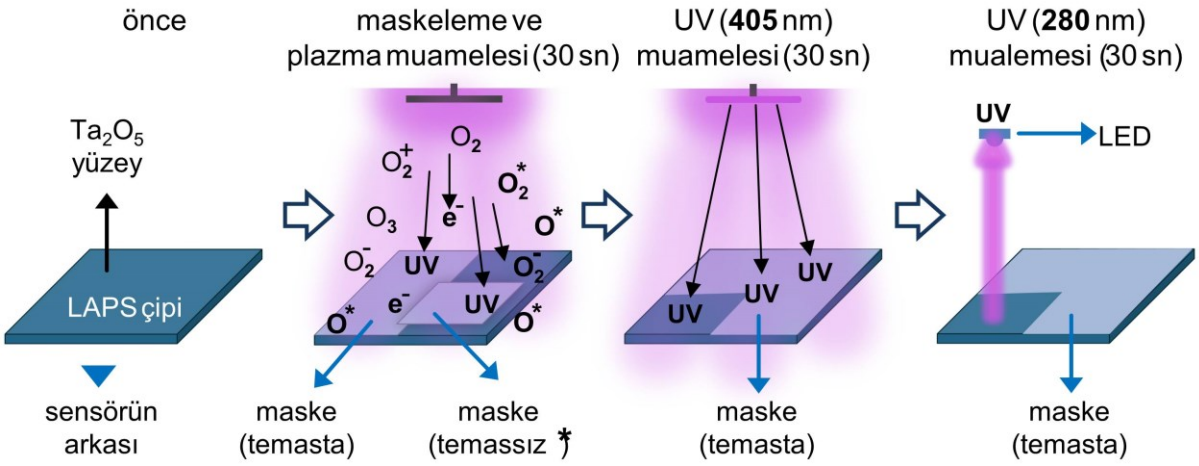
Yukarıdaki ölçümler tamamlandıktan sonra, sensör ölçüm haznesinden çıkartılmadan, sensörün sağ tarafı silikon içermeyen adeziv bir plastik film (1007R-6.0, Ultron Systems, Inc., USA) ile maskelenmiştir. Bu plastik film üzerine laboratuvar tipi bir alüminyum folyo da örtülmüştür. Sensörün sol tarafı ise açıkta bırakılmıştır. Daha sonra, sensör Bölüm 3.6.3 Plazma Muamelesi'nde anlatıldığı gibi plazma muamelesine (30 sn., 30W) maruz bırakılmıştır. Plazma işleminden hemen sonra maske uzaklaştırılmıştır. Bu uygulamanın etkilerini sensör davranışlarında görebilmek için, yukarıda anlatılan ölçüm işlemleri tekrarlanarak sürdürülmüştür. Ayrıca, zamana bağlı hidrofobiklik geri kazanımı ile sensör davranışlarındaki düzelmenin birbiri ile korele olup olmadığını anlamak için, yüzey bir hücre kültür ortamıyla inkübe edilmişlerdir. Hücre kültür ortamı için %5 fötal buzağı serumu (FCS) ve 100 mg/mL streptomisin (Sigma Aldrich) ile takviye edilmiş Dulbecco Modifiye Eagle Ortamının ve Ham'in Besin Ortamı F-12'nin bir karışımı (DMEM/Ham's F-12, hacmen 2:1 olacak şekilde, pH 7) kullanılmıştır. Her bir inkübasyon işleminden önce ve sonra, yukarıda belirtildiği gibi sinyal analizleri (I/V ölçümleri ve kimyasal fotoğraf elde edilmesi) tekrarlanmıştır.

3.6.7 Sıcaklık Muamelesiyle LAPS'ı Tavlama (Annealing)

Bir önceki bölümde kullanılan LAPS üzerinde bir tavlama etkisi oluşturarak sinyal bozulmalarının sıfırlanmasını sağlamak için, bir sıcak plaka (elektrikli ısıtıcı) 300°C'ye ayarlanarak sensörün 10 dakika boyunca tavlanması sağlandı. Ölçüm haznesinin plastik kısımlarını korumak için LAPS tavlama sırasında ölçüm bölmesinden çıkarıldı. Tavlamadan önce sensörün konumu, doğru konuma yeniden monte etmek için dikkatlice işaretlenmiştir.

3.6.8 Plazma-Kaynaklı Sensör Davranışının Bozulmasının Detaylı İncelenmesi

LAPS yüzeyi, farklı maskeleme teknikleri kullanılıp sensör yüzeyi dört alana ayrılarak O_2 plazma ile paternler oluşturulmuştur (desenlenmiştir). İlk alan (sol üst) Ta_2O_5 yüzeyleri birbirine değecek şekilde başka bir LAPS çipi ile maskelenmiştir. İkinci alan (sağ üst) maskelenmedi. Üçüncü alan (sağ alt), plazma ve plazmadan yayılan UV radyasyonunun etkilerini ayırt etmek için sensör yüzeyi ile maske arasında boşluk (0.5 mm) bırakacak şekilde bir maske ile (16 µm kalınlığında alüminyum folyo) sensör yüzeyinin kaplanmasıyla elde edilmiş seçici bir şekilde maskelenmiştir. Dördüncü alan (sol alt) da başka bir LAPS çipi ile maskelenmiştir. Daha sonra, sensör Bölüm 3.6.3 Plazma Muamelesi'nde anlatıldığı gibi plazma muamelesine (30 sn., 30W) maruz bırakılmıştır. Plazma işleminden hemen sonra maskeler uzaklaştırılmıştır. Ek olarak, ultraviyole fotonların sensör karakteristikleri üzerindeki rolünü daha da detaylı belirlemek için, dördüncü alan önce 405 nm dalga boyundaki UV fotonlarıyla 30 sn. boyunca muamele edildi ve daha sonra 280 nm dalga boyundaki UV radyasyonunu sağlayabilen bir LED (DUV280-HL46N, Roithner Lasertechnik GmbH) içeren özel tasarladığımız bir set kullanılarak yine 30 sn. boyunca muamele edildi. Yapılan bu uygulamaların daha kolay anlaşılır bicimde takip edilebilmesini sağlamak için bir çizim hazırlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. LAPS yüzeyindeki maskeleme düzenlemeleri ve çeşitli plazma/UV uygulamaları. *Temassız maskeleme, sensör yüzeyi ile maske arasında boşluk (0.5 mm) olduğunu göstermektedir.

Tüm bu uygulamaların sensör davranışı üzerindeki etkileri Bölüm 3.6.2 Elektrokimyasal Karakterizasyonlar'da açıklanan elektrokimyasal yöntemlerle karakterize edildi. Tüm işlemler ve ölçümler sırasında, sensör haznesinden çıkarılmadı, de-iyonize su ile durulandı ve tüm işlem prosedürlerinden önce azot gazi ile kurutuldu. Bunlara ek olarak, bu uygulamaların sensör ıslanabilirliğine etkileri Bölüm 3.6.4 Temas Açısı (Islanabilirlik) Ölçümleri'nde bahsedildiği gibi analiz edilmiştir.

3.6.9 Hücre Kültürü

Çin hamsteri yumurtalık hücreleri (CHO-K1) (DSMZ, Almanya) donmuş halde elde edildi. Dimetil sülfoksit (DMSO) içeren eski dondurma ortamı çözdükten ve uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler bir hücre kültürü ortamı içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. Bu hücre kültürü ortamı %5 fötal buzağı serumu (FCS) ve 100 mg/mL streptomisin (Sigma Aldrich) ile takviye edilmiş Dulbecco Modifiye Eagle Ortamının ve Ham'in Besin Ortamı F-12 (DMEM/Ham's F-12, hacmen 2:1 olacak şekilde, pH 7) karışımı ihtiva etmektedir. Hücreler, aynı ortam ile bir T-75 hücre kültürü flaskına ekildi ve nemlendirilmiş bir inkübatör' de (37°C, %5 CO_2) inkübe edildi. Ortam, taze besin ortamı sağlayarak hücreleri sağlıklı tutmak için her iki günde bir değiştirildi. Hücreler %80-90 konfluent hale geldiğinde, hücreleri üstel büyümede tutmak ve deneyler için yeterli hücre sayısına ulaşmak için pasajlandı. Hücrelerin pasajlanması

sırasıyla onların üç kez PBS çözeltisi ile yıkanması, 4 dakika boyunca 37°C'de % 0.25 tripsin-EDTA (Fisher Thermo Scientific) kullanıp inkübe edilerek yüzeyden ayrılması, tripsin/EDTA aktivitesini nötralize etmek için FCS içeren taze ortam eklenmesi ve hücre süspansiyonunun yeni hücre kültürü flasklarına bölünmesi seklinde gerçekleştirildi.

3.6.10 Biyo-Uyumluluk Analizleri

Yüzeylerin biyo-uyumluluk analizler için, örnekler 4 faklı şekilde hazırlandı: Flask yüzeyi (kontrol), muamele edilmemiş (nt) LAPS yüzeyi, 30 saniye plazma ile muamele edilmiş LAPS yüzeyi ve 150 saniye plazma ile muamele edilmiş LAPS yüzeyi. CHO-K1 hücreleri bir hemositometre kullanılarak sayıldıktan sonra aşağıdaki deneylerin hepsinde hücreler ($4x10^4$ hücre/cm^2'lik bir konsantrasyonda) bu örneklere ekildi. Hücre adezyonunun analizi için hücreler 30 dakika inkübe edildi, üç kez PBS ile yıkandı ve geri kalan hücrelerin görüntüleri bir dijital mikroskop kullanılarak toplandı. Hücrelerin yüzeyde tutunabilme özelliklerini test edebilmek için, kontrollü bir pompa sistemi (neMESYS290N, Cetoni) ile mikroakışkan sistem kullanılarak akış-temelli bir ayırma deneyi gerçekleştirildi. Bunun için, kontrollü bir pompa sistemi (neMESYS290N, Cetoni) ile mikroakışkan akış-temelli bir ayırma deneyi gerçekleştirildi. Bu yönteme göre, CHO hücreleri 1 saat süreyle inkübe edildi ve daha sonra bir sıvı (PBS) akışı tarafından üretilen ve giderek artan kesme gerilimine (*shear stress*) maruz bırakıldı. Hücrelerdeki lokal kesme gerilimini değerlendirmek için, sonlu eleman yazılımı (Comsol Multiphysics) kullanılarak hesaplamalı akışkan dinamiği çalışıldı. İlk olarak, yüzeye bağlanmamış hücreleri uzaklaştırmak için 5 dakika boyunca 0.2 dyn/cm^2'lik sabit bir sıvı kesme gerilimi uygulandı. Daha sonra, uygulanan kesme gerilimi, sabit bir zaman periyodu (1 dakika) ile basamaklar halinde arttırıldı ve geri kalan hücrelerin görüntüleri, dijital mikroskop kullanılarak toplandı.

Hücre morfolojisi ve hücre yayılmasının analizi için hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve hücrelerin görüntüleri toplandı. Hücre sayıları, hücre daireselliği ve hücre alanı ImageJ (National Institutes of Health, ABD)'nin parçacıkları analiz aracı kullanılarak ölçülmüştür. Hücre canlılığını değerlendirmek için, Cell Counting Kit (CCK)-8 assay (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japonya) kullanıldı. Kısaca, hücreler 24 saat

kültürlendikten sonra, kültür ortamında %10 CCK-8 çözeltisi hazırlandı, hücreler bu ortamla iki saat inkübe edildi. Daha sonra ortam, 96 oyuklu bir plaka içine aktarıldı ve absorbans okumaları, bir plaka okuyucu (Spark, Tecan Group Ltd., İsviçre) kullanılarak 450 nm'de elde edildi. Zamana bağlı hücre proliferasyonunu ölçmek için Eritrosin B ile bir boya dışlama deneyi de yapıldı. Hücreler 24, 48, 72, 96 ve 120 saat boyunca kültürlendikten sonra, 37°C'de 4 dakika boyunca %0.25 tripsin-EDTA işlemi ile ayrıldı. Bundan sonra, tripsin/EDTA aktivitesini nötralize etmek için 10 µL FCS eklendikten sonra iyice karıştırıldı. Canlı hücreler bir hemositometre kullanılarak sayıldı.

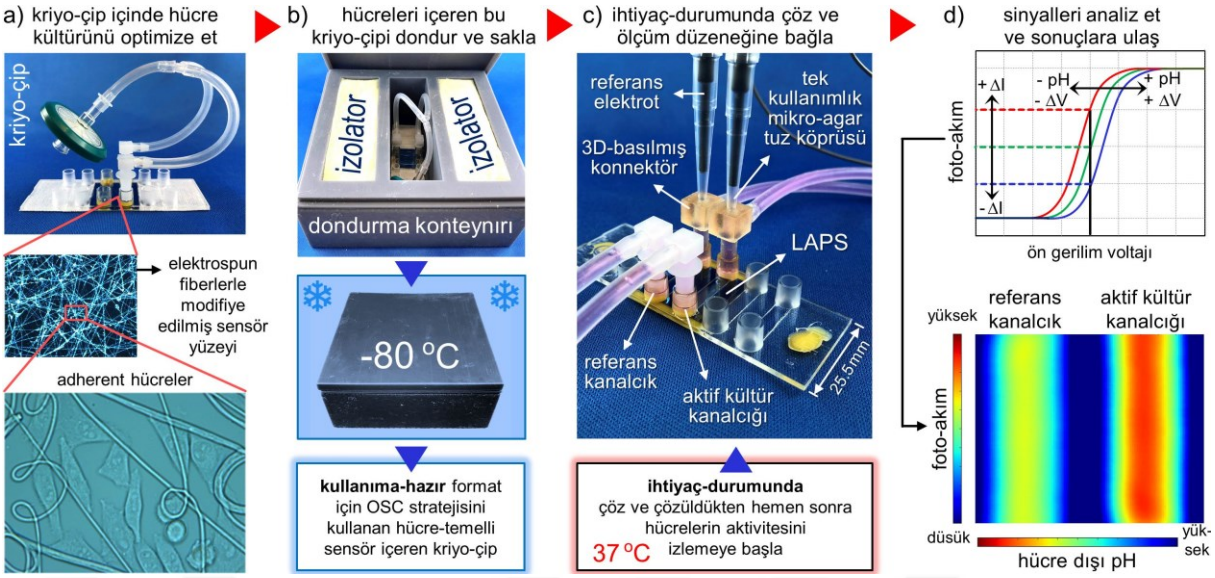
3.6.11 Diferansiyel Taramalı LAPS Ölçümü

30 saniye boyunca O_2 plazma ile muamele edilmiş LAPS çipleri, sensör yüzeyinde iki özdeş ve ayrılmış mikro kanal oluşturmak için dipsiz bir mikroakışkan slaydın (VI 0.4; ibidi GmbH, Almanya) arka tarafına monte edildi (Şekil 3(a)). Mikro kanalların yüksekliği ve genişliği sırasıyla 400 µm ve 3.8 mm'dir. Biyo-uyumlu, iki bileşenli epoksi yapıştırıcı (EP 655-T, Polytec PT GmbH, Almanya), sıvı sızıntılarından korunmak, aynı zamanda mikroakışkan çip sistemini mekanik olarak desteklemek için ve sensörün kenarlarını kapsüllemek için kullanıldı. Yapıştırıcının sertleştirilmesi 2 saat boyunca 70°C'de gerçekleştirildi. Referans elektrot (DriRef-2SH, World Precision Instruments Ltd) için uygun bağlantılar oluşturmak ve sistem içindeki steriliteyi korumak için bir konektör seti ve mikro-agar tuz köprüsü geliştirilmiştir (Şekil 3(a)). CHO-K1 hücrelerinin hücre dışı asitleşmesini diferansiyel bir şekilde tespit etmek için, her iki kanalın içine hücreler $4x10^4$ hücre/cm^2'lik bir konsantrasyonda ekildi. Cihaz kapalı bir sistem olduğundan ve bir CO_2 inkübatörünün dışında olduğundan, pH değerini fizyolojik bir aralık içinde tutmak için kültür ortamının tamponlanması gerekir. Bu nedenle, bu koşulları korumak için 15 mM HEPES tamponu (4-(2-hidroksietil)-1-iperazinetansülfonik asit) kullanıldı. Hücreler, 48 saat boyunca 37°C'de yetiştirildi. Ortam 24 saat sonra taze olanı ile değiştirildi. Ölçümler için, sodyum bikarbonat veya HEPES içermeyen Ham'in F-12 hücre kültür ortamı, LAPS ile ölçümleri mümkün kılmak üzere seçilmiştir. Ortam ayrıca %5 FCS, 17.5 mM D-glikoz, 100 U/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin eklenerek modifiye edildi.

48 saatlik kültivasyondan sonra ve ölçüm başlamadan önce, iki kanaldan birindeki (aktif kültür kanalı) hücrelerin kültür ortamı modifiye edilmiş ortam ile değiştirilirken, öteki kanaldaki hücrelerin ortamı referans ölçümleri elde etmek için %70 etanol (PBS içerisinde ve soğuk) ile 5 dakika boyunca maruz bırakılarak fikse edilmiş ve metabolik olarak söndürülmüştür. Bu çip sistemi 37°C'de bir saat daha inkübe edildi ve hücrelerin hücre dışı asitleşmesini belirlemek için diferansiyel taramalı LAPS ölçümleri yapıldı. Her iki kanal için kimyasal görüntüler daha önce Bölüm 3.6.2 Elektrokimyasal Karakterizasyonlar'da açıklandığı gibi kaydedildi. Ayrıca, Şekil 3(b), LAPS'ın karakteristik (I/V) eğrilerinden bir (biyo-)kimyasal görüntünün nasıl elde edildiğini temsili olarak göstermektedir.

3.6.12 Kullanıma Hazır Formatta Hücre-Temelli Biyosensör Geliştirme

Bu çalışmada, biyokimyasal sensörün (LAPS) sert kültür yüzeyi, yüksek termal genleşme katsayısına ve düşük cam geçiş sıcaklığına sahip olan polietilen vinil asetattan (PEVA) oluşan elastik elektrospun liflerle modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş sensör, kültürün daha hassas kontrolü için ve ayrıca hücre hayatta kalmasında hayati olan hızlı çözülmeyi sağlamayacak toplam kütlenin en aza indirilmesi için diferansiyel bir mikroakışkan çip sistemine entegre edildi. İlk kez, “sensör-üstü kriyoprezervasyon” konsepti bu sistemle birlikte kullanıldı ve bir konseptin ispatı deneyi olarak, kriyoprezervasyon sonrası hücre dışı asitleşmeyi izlemek için kanser hücreleri (CHO-K1) kullanılarak deneyler yapıldı. Bu konseptin dört aşamalı iş akışının açıklayıcı bir şeması Şekil 6'da özetlenmiştir. Bu yeni konseptin değerlendirilmesi ve geliştirilebilmesi için yapılan çalışmalar ileriki bölümlerde ayrıntılı olarak sunulmuştur.



Şekil 6. Sensör-üstü kriyoprezervasyon (OSC), hücre-temelli *lab-on-a-chip* cihazları için "yerinde ve kullanıma-hazır" konseptleri sunar: **a)** Elektro-eğirilmiş elastik PEVA liflerle modifiye edilen tek bir sensör (LAPS) çipinin mikroakışkan sisteme entegre edilmiş olduğu bir kriyo-çipin fotoğrafı. Sistem, adherent hücrelerin sensör-üzerinde kriyoprezervasyonunu gerçekleştirmek için iki özdeş ve ayrılmış mikro-kanal içerir. **b)** Kriyo-çipler için tasarlanmış, standart bir soğutma oranı sağlayan 3D-basılmıs dondurma konteyneri. **c)** Çip sisteminin diferansiyel ölçüm düzeneğinin fotoğrafı. **d)** Bu düzenekten elde edilen şematik foto-akım/gerilim (I/V) eğrileri ve kanallar içindeki hücre dışı asitleşmeyi görselleştirmek için temsili bir diferansiyel biyokimyasal görüntü. Dondurma konteyneri en fazla üç adet kriyo-çip için uygundur.

3.6.13 Elektro-Eğirme Tekniği İle Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

Sensör yüzeyi, elektro-eğirme tekniği kullanılarak elastik polietilen vinil asetat (PEVA) lifleri ile işlevselleştirildi. PEVA boncukları (Sigma-Aldrich, ağırlıkça %40 vinil asetat) bir kloroform ve *N,N*-Dimetilformamid karışımı (hacimce 3:2 oranında) içinde çözüldü. Nihai polimer konsantrasyonu, %13 (ağırlık/hacim) olacak şekilde ayarlandı ve çözelti, tamamen çözünmesi için gece boyunca karıştırıldı. LAPS çipleri, kaplanmadan önce bir ultrasonik banyoda 3'er dakika boyunca aseton, izopropanol, etanol ve de-iyonize (DI) su ile art arda temizlendi. Daha sonra sensör çipleri, kolektör (alüminyum folyo) üzerine çift-taraflı bir bantla sabitlendi. LAPS çiplerinin kaplanması için elektro-eğirme düzeneği şematik olarak Şekil 4'de gösterilmiştir. Viskoz PEVA çözeltisi, 5 mL'lik bir plastik şırıngaya aktarıldı, paslanmaz çelik bir iğne

(18 gauge) takıldı ve iğne, 18 kV'luk yüksek voltajlı bir güç kaynağına (Gamma High Voltage Research Ormond Beach, FL, US) yatay olarak bağlandı. Akış hızı, bir mikro infüzyon pompası (New Era NE300 Infusion Pump, Farmingdale, NY, ABD) kullanılarak 1.5 mL/saate ayarlandı. Kollektör ile iğne ucu arasındaki mesafe 10 cm olarak ayarlandı. LAPS çipleri üzerinde 20-22°C sıcaklıkta ve %48-50 bağıl nemde 60s boyunca PEVA çözeltisinin elektro-eğrilmesiyle pürüzsüz bir kaplama üretildi. Elektro-eğirilmiş liflerin morfolojik karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) (FEI Quanta 250 FEG, Oregon, ABD) ve bir dijital mikroskop (Keyence, ABD) ile gerçekleştirildi. Lif çapı dağılımları ve liflerin ortalama büyüklüğü ImageJ yazılımı (National Institutes of Health, ABD) kullanılarak istatistiksel olarak tahmin edilmiştir.

3.6.14 Modifiye Edilmiş LAPS Yüzeyine Plazma Uygulaması ve Karakterizasyonu

Modifiye edilmiş yüzeylerin hidrofilikliğini arttırmak için, düşük basınçlı plazma sistemi (Femto, Diener Plasma Surface Technology) kullanılarak O_2 plazma uygulaması gerçekleştirildi. Numuneler cihazın reaksiyon odasına yerleştirildikten sonra, O_2 gazı 0.2 mbar'lık kontrollü bir basınçta enjekte edildi. Cihazın radyo frekans jeneratörü 40 kHz'de çalıştırılırken bir eksitasyon gücü, toplam gaz akış hızı, kontrollü bir basınç ve plazma maruz kalma süresi sırasıyla 30W, 20 sccm, 0.2 mbar ve 30 sn. olacak şekilde ayarlandı [25]. Plazma işleminden sonra ıslanabilirlik değişikliklerini karakterize etmek için, kontrollü bir ortam sıcaklığı (22°C) ve bağıl nem (%58-60) altında bir optik temas açısı ölçüm cihazı (Data Physics Instruments GmbH, Almanya) kullanılarak bir “sessile drop” metoduyla su damlası (statik) temas açısı ölçümleri yapıldı. Ölçümler, numune yüzeyleri boyunca rastgele seçilen üç noktada en az 5 µL DI su damlasıyla ve damla etkisinden 10 saniye sonra gerçekleştirildi. Damlaların görüntüleri, cihazın yazılım modülü (SCA20) kullanılarak analiz edilmiş ve temas açılarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.6.15 Kriyo-Çip Elde Edilmesi

Modifiye edilmiş LAPS çipleri, sensörün yüzeyinde iki özdeş mikro-kanal oluşturmak için dibi olmayan bir mikroakışkan slaytın (sticky-Slide VI 0.4; ibidi GmbH, Almanya) arka tarafına sabitlenmiştir (Şekil 6(a)). Biyo-uyumlu, iki bileşenli bir epoksi yapıştırıcı (EP 655-T, Polytec PT GmbH, Almanya), sıvı sızıntısına karşı korumak ve

ayrıca sistemi mekanik olarak destekleyerek sensörün kenarlarını düzgün bir şekilde kapatmak ve kapsüllemek için kullanıldı. Yapıştırıcının sertleştirilmesi, gece boyunca 50°C'de inkübatörde gerçekleştirildi. Steriliteyi garantiye almak ve kriyoprotektan çözeltisinin donarken genişlemesinden kaynaklanabilecek olası komplikasyonları önlemek için, 0.22 mikron steril filtre ve Y-tipi boru bağlantı parçası ile birbirine bağlanmış tüpler kullanılarak bir filtre-seti hazırlandı (Şekil 6(a)).

3.6.16 Kriyo-Çip İçinde Hücre Kültürü ve Analizler

Çin hamsteri yumurtalık (CHO-K1) hücreleri (DSMZ, Almanya), %5 fetal buzağı serumu (FCS) ve 100 mg/mL streptomisin (Sigma Aldrich) ile takviye edilmiş Ham'in Besin Ortamı F-12 ve Dulbecco Modifiye Eagle Ortamının (Ham's F-12/DMEM, hacmen 1:2 olacak şekilde, pH 7.4) karışımı ile kültürlendi. Hücreler, bir inkübatör içerisinde (37°C, nemlendirilmiş ve %5 CO_2 ile) inkübe edildi. Hücreleri sağlıklı tutmak için, ortam iki günde bir taze ortam ile değiştirildi. Hücreler %80-90 oranında yüzeyi kapladıklarında, ileriki deneyler için hücre sayısını arttırmak ve hücreleri üstel büyümede tutmak için yeni bir kültür kabına geçirilerek pasajlandı.

Yeterli miktarda hücre elde edildiğinde, önceden bir saat boyunca %70 etanol ile sterilize edilmiş kriyo-çiplerin kanallarının içerisine $4x10^4$ hücre/cm^2 ekildi. Kontrol örnekleri olarak, modifiye edilmemiş LAPS çipleri ve elastik polimer slaytlar da (kaplanmamış, 180 µm kalınlığında, ibidi GmbH, Almanya) dipsiz mikroakışkan slaytlara aynı şekilde monte edildikten sonra kullanıldı (bkz. Bölüm 3.6.15 Kriyo-Çip Elde Edilmesi). Kültür ortamı her 24 saatte bir tazesiyle değiştirildi. Hücreler 48 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı, bir kit aracılığıyla (Cell Counting Kit [CCK]-8 assay, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japonya) kullanılarak analiz edildi. CCK-8 test çözeltisi 1:10 oranında besin ortamı ile seyreltildi ve bir filtreden (0.2 µm gözenek boyutlu) süzülerek sterilize edildi. Kanallar bu solüsyon ile üç kez yıkandıktan sonra, yine bu solüsyon ile bir saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. Negatif kontrol örnekleri (hücre içermeyen) de hazırlandı ve aynı prosedür onlar için de gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra, her kanaldaki solüsyon, hücre aktivitesi tarafından üretilen formazan boyasının homojen konsantrasyonunu sağlamak için iyice karıştırıldı ve 96-kuyucuklu bir analiz plakası içine ayrı ayrı aktarıldı. Absorbans,

bir mikro-plaka okuyucuda (Spark, Tecan Group Ltd., İsviçre) 650 nm referans dalga boyu ile 450 nm'de ölçüldü. Relativ absorbans (RA) aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$RA = (A_{\text{test grubu}}) - (A_{\text{hücresiz kontrol grup}}) - (A_{\text{650 nm'de referans grup}}).$$

3.6.17 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon ve Çözdürme

Yukarıda bahsedilen CCK-8 analizlerinden sonra, kriyo-çiplerin kanalları, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanmış %90 FCS'den oluşan bir kriyoprotektan çözeltisi ile iki kez yıkandı ve kanallar bu çözelti ile dolduruldu. Filtre-setleri kanalların giriş ve çıkışlarına yerleştirildi. Daha sonra çipler, 3-boyutlu (3D) yazıcı ile basılmış bir dondurma kabına yerleştirildi (Şekil 6(b)) ve daha sonra -80°C'lik bir dondurucuya aktarıldı. Söz konusu dondurma kabı bilgisayar ortamında tasarlanmış ve stereolitografik (SLA) 3D yazıcı ile basılmıştır. Dondurma kabinin ayrıntıları tezin eklerinde sunulmuştur (bkz. Şekil 26, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri). Numuneler gece boyunca (en az 12 saat) dondurucuda tutuldu. Donmuş çipler, doğrudan inkübatöre (37°C) aktarılarak mümkün olduğu kadar çabuk çözüldü. Kanalların içindeki kriyoprotektan solüsyonu, buz kristalleri yok olur olmaz taze kültür ortamı (37°C) ile üç kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Hücreler kriyoprezervasyondan hemen sonra ve ayrıca 12 saat boyunca yapılan inkübasyondan sonra bir önceki bölümde tarif edilen yöntemlerle tekrar analiz edildi.

3.6.18 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon (OSC) Sonrası Hücre Dışı Asitleşmenin Diferansiyel Tespiti

Elektro-eğirilmiş PEVA liflerle modifiye edilmiş ve O_2 plazma ile muamele edilmiş LAPS çiplerini içeren kriyo-çipler, konseptin ispatı deneylerinde kullanıldı. Kriyo-çipin iki kanalından biri "referans kanalı" (hücreler olmadan), diğeri ise "aktif kültür kanalı" (hücrelerle) olarak tanımlandı. Bu, hücreli ve hücresiz kanallar arasında diferansiyel ölçüm yapılmasını sağlamaktadır. Hücre kültürü, kriyoprezervasyon ve çözdürme, önceki iki bölümde tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Hücreler çözüldükten hemen sonra, kanallardaki kriyoprotektan çözeltisi taze ölçüm ortamı ile değiştirildi. Ölçümler sırasında cihazın içindeki steriliteyi korumak için, tek kullanımlık mikro pipet uçlarının (200 µL) ucu içerisinde bir mikro-agar tuz-köprüsü geliştirilmiştir (Şekil 6(c)). Bu tuz köprüsünün hazırlama aşamaları ile ilgili detaylar tezin eklerinde sunulmuştur (bkz. Şekil 27, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri). Modifiye edilmiş bir ölçüm ortamı içeren

10 mL'lik cam şırınga, 3D basılmış konektörler ve tüpler laminar akış kabininde aseptik koşullar altında sisteme monte edildi. Şırınganın içindeki modifiye edilmiş ortam, 25mM D-Glikoz, %5 FCS, 100 U/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ile takviye edilmiş Ham's F-12 hücre kültür ortamından oluşmakla birlikte; ölçümler sırasında ortam tamponlanmaması gerektiğinden sodyum bikarbonat veya 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES) kullanılmamıştır.

Kanallardaki hücrelere bu ortamın takviyesi için kontrollü bir pompa sistemi (neMESYS290N, Cetoni) kullanıldı. Kriyo-çipine ohmik arka-taraf temasını sağlamak için tasarlanmış ve 3D-yazdırılmış bir adaptör takıldı. Bu adaptörle ilgili detaylar tezin eklerinde sunulmuştur (bkz. Şekil 28, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri). Daha sonra aynı özellikte iki referans elektrotu (DriRef-2SH, World Precision Instruments Ltd) ve sıcaklık kontrolü sağlayan bir plaka (ibidi GmbH, Almanya) içeren özel olarak geliştirilmiş bir taramalı LAPS düzeneğine yerleştirildi. Sıcaklık bir sıcaklık kontrolörü (ibidi GmbH, Almanya) tarafından kontrol edildi ve 37°C'ye ayarlandı. 10 dakikalık bir inkübasyon ardından, hücre dışı asitleşmeyi izlemek için diferansiyel taramalı LAPS ölçümleri yapıldı. Şekil 6(d), biyokimyasal bir görüntünün nasıl elde edildiğini göstermektedir. Her iki kanal için biyokimyasal görüntüler, daha önce kaydedilmiş I/V eğrilerinin deplesyon aralığının merkezinden elde edilen 0.4V'luk sabit bir ön gerilim ile kaydedildi. Kanallar, adım genişliği 200 µm'ye ayarlanarak tarandı. Bu şekilde, her kanal için 19 x 46 ölçüm noktasından oluşan bir görüntü elde edilmiştir. Her ölçüm noktası için foto-akım değişikliğini doğru bir şekilde değerlendirmek için, referans kanalında gözlemlenen olası sapma etkisini çıkararak dahili normalleştirme aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

Normalize edilmiş foto-akim = $[(I_{\text{aktif kanal çözmeden sonra}}) - (I_{\text{aktif kanal sıfır noktası}})] - [(I_{\text{referans kanal çözmeden sonra}}) - (I_{\text{referans kanal sıfır noktası}})]$.

3.6.19 İstatistik Analizler

Bütün deneyler en az üç kez tekrarlandı. Bu çalışmada sunulan tüm veriler, aksi belirtilmedikçe ortalamaları ve standart sapmaları (SD) ile gösterilmiştir. Örnekler arasındaki istatistiksel anlamlılık tek-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-hoc analizi kullanılarak hesaplandı. Aksi belirtilmedikçe P değerinin 0.05’ den küçük olması anlamlı kabul edildi.

3.7 Araştırma Planı

İş-zaman çizelgesi Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. İş-zaman çizelgesi.

İş planı tanımı	Aylar							
	1–17	18-22	23-27	28-32	33-38	39-44	45-52	53
Literatür araştırması.								
LAPS yüzey biyo-uyumlulugunun iyileştirilmesi.								
Iyileştirilmiş LAPS' in mikroakışkan sisteme entegrasyonu ve sistemin validasyonu.								
Kriyoprezervasyon icin hibrit yüzey elde edilmesi.								
Kriyo-çip elde edilmesi.								
Kriyo-çip ile sensör-üstü kriyoprezervasyonun (OSC) gercekleştirilmesi.								
Kriyo-çip ile sensör-üstü kriyoprezervasyonun (OSC) hem biyolojik hem de elektrokimyasal analizlerle validasyonu.								
Tez yazımı ve savunma.								

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Örnekler arasındaki istatistiksel anlamlılık tek-yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post-hoc analizi kullanılarak hesaplandı. Ayrıca, çip içerisinde sıvı akışının simülasyonu ve kesme stresinin hesaplanmasında sonlu eleman yazılımı (Comsol Multiphysics) kullanıldı. Grafiklerin oluşturulması için OriginLab 7.0 (OriginLab Corporation) kullanıldı. Kimyasal görüntülerin elde edilmesi için Python yazılımı (Python Software Foundation) kullanıldı.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Kriyo-çipin içerisindeki hücrelerin geneline ait hücre dışı asitleşme analiz edilebilmiş olmasına rağmen, tek bir hücreye ait hücre dışı asitlemenin analizi için sistemin uzamsal çözünürlüğünün arttırılması ihtiyacı hala LAPS sensörünün en önemli limitasyonlarından birisidir. Bunu sağlayabilmek için daha ince bir yarı iletken tabakanın kullanılması veya ışık kaynağı ile ilgili değişiklikler (örn. daha küçük çapta bir aydınlatma) yapılması faydalı olabilir. Ancak bunlar bu çalışmanın ana

hedeflerinin kapsamı dışında olup, elde ettiğimiz hibrit yüzey modifikasyonu ileride geliştirilecek daha ileri sensör yapıları için de kullanışlı durumdadır.

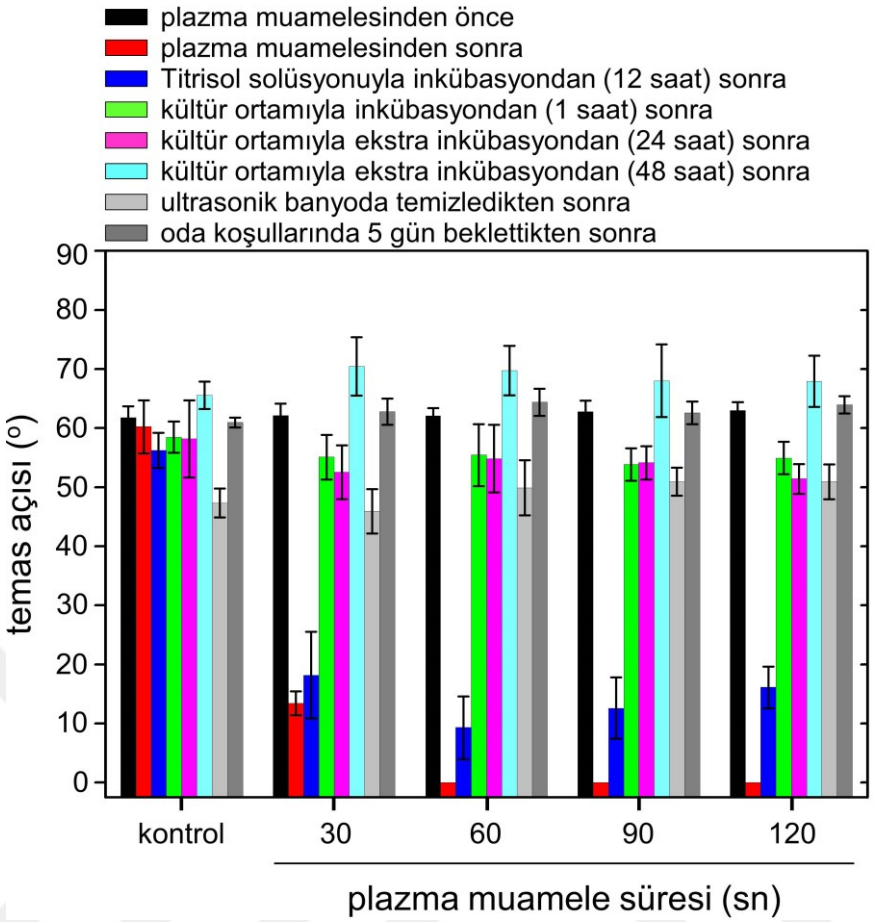
3.10 Etik Kurul Onayı

Etik Kurul'un 30.06.2016 tarih ve 1289-GOA protokol numaralı 2016/18-25 karar numarası ile görüşülen çalışma etik açıdan uygun görülmüş olup; ilgili onay dokümanı ekte sunulmuştur (bkz. Bölüm 8.2 Etik Kurul).

4. BULGULAR

4.1 Plazma Muamelesinin Islanabilirlik Üzerine Etkisi

Sıvı ıslanabilirliği, yüzeylerin hidrofilikliğini (düşük temas açısı) ve hidrofobiklik (yüksek temas açısı) özelliklerini gösterir. Şekil 7, O_2 plazma işleminden önce ve sonra temas açısının ölçümleri ile araştırılan Ta_2O_5 yüzeylerinin (plazma ile modifiye edilmiş veya kontrol) ıslanabilirliğini gösterir. Genel olarak, tüm numune gruplarının ortalama temas açıları plazma muamelesinden önce 62.4° ± 0.5° 'ye eşitti. Hidrofiliklik, plazma muamelesi sırasında tarif edildiği gibi maskelenen kontrol numuneleri hariç plazma ile muamele edilmiş tüm yüzeyler için önemli ölçüde artmıştır. Bu, maskeleme için kullanılan tekniğin etkili olduğunu göstermektedir. Plazma uygulama süresi 60 sn. ile 120 sn. arasında olan muameleden sonra aşırı yüksek ıslanabilirlik görülmesi nedeniyle temas açısı kaydedilememiştir. Bu, Şekil 7'de "sıfır" değerine işaret eden kırmızı çubuklar ile belirtilmiştir. Öte yandan, 30 saniye boyunca plazma uygulaması yapıldığında, temas açısı muameleden sonra 13.4° ± 2.0° 'ye düşmüştür.



Şekil 7. Hidrofobiklik geri kazanımı: Ta_2O_5 LAPS'taki O_2 plazma muamele sürelerinin bir serisi için hidrofiliklik değişikliklerinin ve hidrofobiklik geri kazanımının su damlası temas açılarıyla araştırılması; kontrol, bir plazma muamelesi (30 sn. boyunca) sırasında maskelenen örneğe karşılık gelmektedir.

4.2 Hidrofobiklik Geri Kazanımı

Şekil 7'de sunulduğu üzere, Titrisol solüsyonu (pH 7) ile 12 saatlik inkübasyondan sonra, numunelerin, kontrol numuneleri dışında hidrofilikliği biraz arttı. Ayrıca, 60-120 sn. plazma uygulama süreleri için temas açısı ortalama 12.7° ± 3.7° 'ye yükselirken, 30 saniye boyunca muamele edilen örneklerin temas açısı ortalama 13.4° ± 2.0°' den 18.2° ± 7.3° 'ye yükseldi. Bununla birlikte, tüm plazma uygulama süreleri için temas açısındaki en fazla artış, bir saat boyunca kültür ortamı inkübasyonundan sonra görülmüş olup; muamele edilmiş tüm yüzeylerin ortalama temas açıları neredeyse eşit bir değere (54.8° ± 0.7°) ulaşmıştır. Bunlar, aynı protokol ile inkübe edilen kontrol numunelerinin temas açılarına (58.5° ± 2.6°)

yaklaştılar. Bu güçlü ıslanabilirlik düşüşü, FCS proteinleri ve hücre kültürü ortamı içindeki inorganik maddeler gibi kültür ortamı-kaynaklı içeriklerin adsorbsiyonuna bağlanabilir [54–56].

24 saat boyunca ilave bir kültür ortamı inkübasyonu temas açılarında önemli değişikliklere yol açmamıştır; bununla birlikte, 48 saatlik ek inkübasyon, kontrol örnekleri de dahil olmak üzere tüm deney gruplarındaki temas açılarını önemli ölçüde arttırdı. Bu muhtemelen biyolojik kontaminasyondan kaynaklanmaktadır, çünkü inkübasyonlar steril koşullar altında yapılmamıştır ve 48 saat daha inkübasyondan sonra yüzeylerde bazı mikroorganizma koloni işaretleri izlenmiştir. Son olarak, kültür ortamıyla inkübasyon aşamalarından sonra, numuneler, tüm yüzey kontaminantlarını uzaklaştırmak için ultrasonik bir banyoda temizlendi. Şekil 7'de görülebileceği gibi, kontrol örnekleri dahil tüm deney gruplarındaki temas açıları, temizlikten sonra ortalama 49.0° ± 2.2° 'ye önemli ölçüde düşmüştür. Bu temizleme adımı, temas açılarındaki artışın yukarıda tartışıldığı gibi kirletici maddelerden kaynaklandığını doğrulamaktadır. Ayrıca bu ortalama temas açısı değeri (49.0° ± 2.2°), literatürde verilen temiz, yalın Ta_2O_5 yüzeylerinin temas açısına tam olarak uymaktadır [57]. Bu aynı zamanda temizleme işleminin uygun şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Ayrıca, numuneler oda sıcaklığı koşulları altında beş gün bekletildikten sonra, tüm deney numuneleri için temas açıları, 49.0° ± 2.2° 'den 62.9° ± 1.3°' ye önemli ölçüde yükseldi ve ortalama 62.4° ± 0.5° olan başlangıç değerlerine neredeyse eşit hale geldi. Havada bulunan hidrokarbonlar bu tür ıslanabilirlik düşüşlerinin kaynağı olabilir. Çünkü, hidrokarbonların sensör yüzeylere havadan adsorbsiyonu sonucu yüzeyin serbest yüzey enerjisi en aza indirilerek hidrofiliklik kaybı yaşandığı daha önce rapor edilmiştir [58]. Ayrıca, bir ultrasonik banyo ile derinlemesine temizlemeye tabi tutulsalar da, yüzeyler plazma muamelesinden sonraki hidrofiliklik özelliklerine tam olarak geri dönememişlerdir. Bu, zaman içinde yüzey ıslanabilirliği ve yüzey serbest enerjisindeki azalmaya ilave olarak farklı mekanizmaların da var olduğunu gösterir.

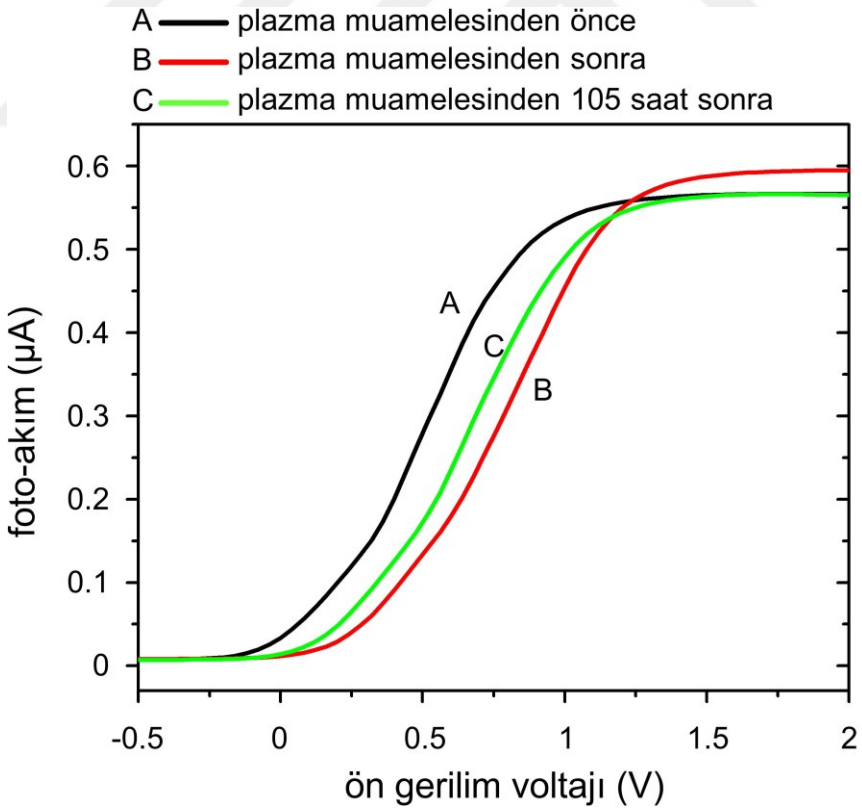
Plazma muamelesi, metal oksitler için rapor edildiği gibi sensör yüzeyinde sıkışmış elektronlarca meydana gelmiş kusurlu bölgeler oluşturabilir [59,60]. Hidroksil adsorpsiyonu için elverişli olan bu kusurlu bölgeler, yüzey hidrofilisitesinde bir artışa

neden olur. Fakat hidroksil radikallerinin kültür ortamından veya havadan adsorpsiyonundan sonra, yüzey enerjisel olarak kararsız hale gelir. Bu kararsız yüzey, önceden adsorbe edilen hidroksil gruplarının yerini kademeli olarak oksijen atomları aldığı için hidrofilikliğini yavaş yavaş kaybeder. Bu durum, bu çalışmada görülen ıslanabilirlik dönüşümünün nedeni olabilir. Bu fenomen metal oksit üzerinde plazma işleminden sonra "hidrofobiklik geri kazanımı" olarak adlandırılabilir.

Daha önce açıklandığı gibi (bkz. Bölüm 2.11 LAPS Yüzeyinin Biyo-), hücre kültürü için hidrofilik olan fakat aşırı hidrofilik (süperhidrofilik) olmayan yüzeyler genellikle ideal kabul edilmektedir [61–64]. Bu nedenle, 30 saniyelik bir plazma muamele süresinin en ideal olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, bu prosedür bu çalışmadaki diğer deneyler için kullanılmıştır.

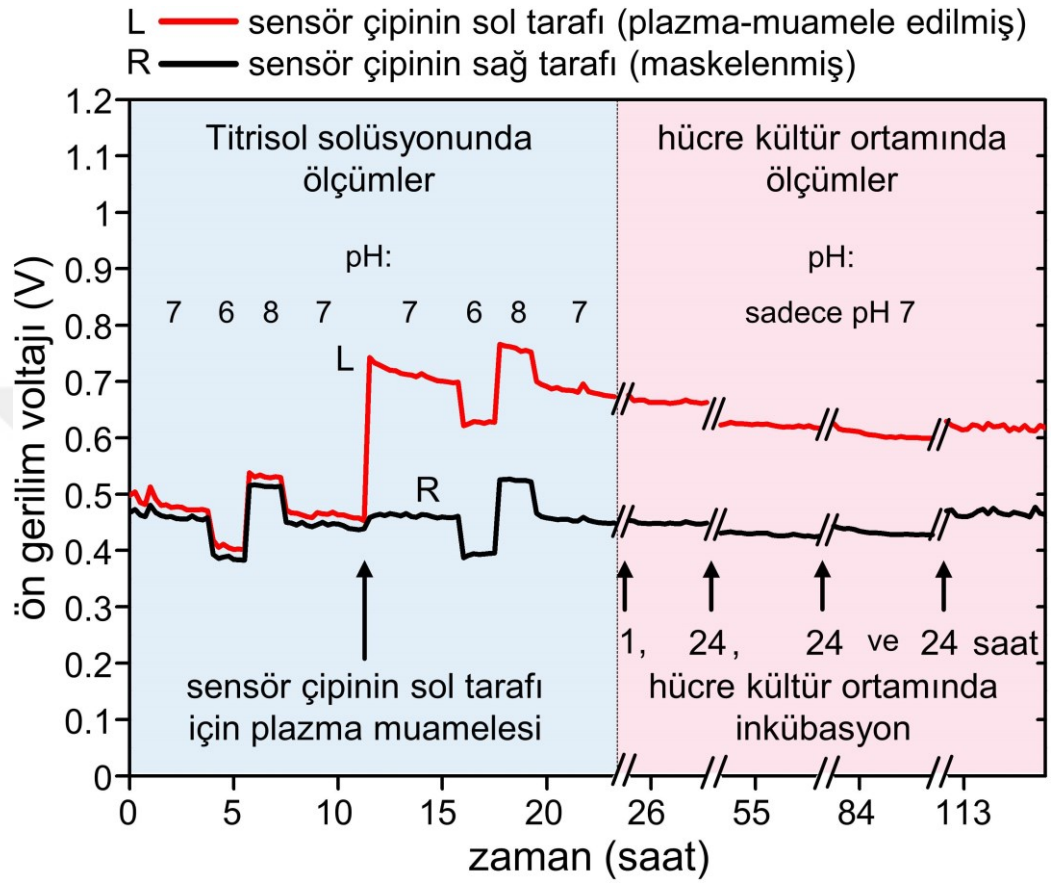
4.3 Plazma Muamelesinin Sensör Davranışlarına Genel Etkisi

Şekil 8, plazma muamelesinden önce ve sonra I/V eğrilerini göstermektedir.



Şekil 8. Plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) önce ve sonra LAPS çipinden elde edilen I/V eğrileri.

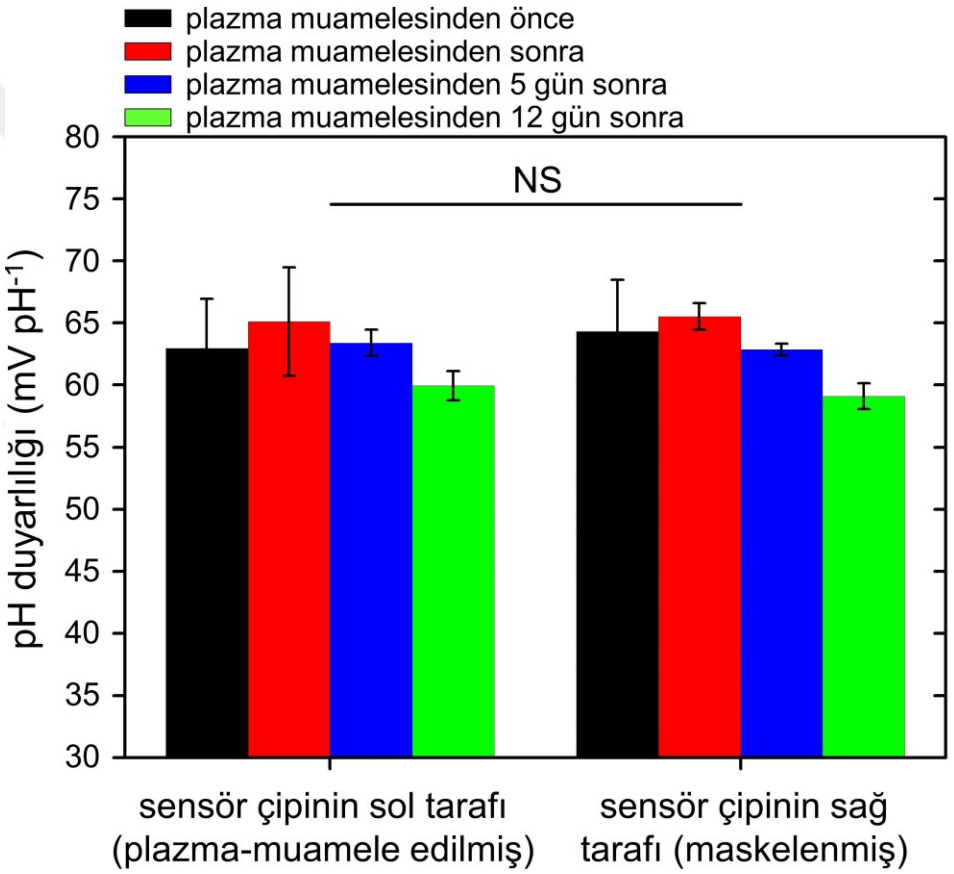
Ayrıca, değiştirilen pH tampon çözeltilerine karşı sensör tepkileri, plazma muamelesinin etkisi ve kültür ortamı ile inkübasyonun etkisi Şekil 9'da şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 9. O_2 plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) önce ve sonra LAPS'ın sol (L) ve sağ (R) taraflarının sabit foto-akım modunda ölçümü. Plazma muamelesi sırasında sağ taraf maskelenmiştir.

Hem kontrol hem de uygulama grupları için ölçümler, LAPS'ın uzamsal çözünürlük kabiliyeti sayesinde sadece bir sensör kullanılarak aynı anda gerçekleştirilebilmiştir. İlk basta, sensörün sol tarafı (L, muamele edilmiş) ve sağ tarafı (R, kontrol) arasında ortalama 16 mV'luk bir fark vardı. Sensörden sinyal alınmaya ilk başlandıktan 11 saat + 15 dakika sonra plazma muamelesi (30 sn.) yapıldı. Muameleden sonra, sensörün muamele edilen tarafı sensör sinyalinde ortalama 250 mV'luk bir artış göstermesine rağmen maskelenen taraf yaklaşık 17 mV'luk bir ortalama artış gösterdi. Sensörün maskelenmiş tarafından gelen sensör sinyali 117 saatlik bir ölçüm süresi içinde yüksek tekrarlanabilirlik, oldukça düşük

histerezis (≈4 mV) ve çok düşük sapma (0.034 mV h^{-1}) göstermiştir. Ek olarak, plazma işleminden sonra sensörün muamele edilen tarafında 1.18 mV h^{-1} değerinde bir negatif sapma gözlendi. Şekil 10, plazma muamelesinden önce ve sonra, muamele edilen tarafın ve maskelenmiş tarafının pH duyarlılığını göstermektedir. Buradaki veriler, Şekil 9'da gösterilen ölçümlerin sonuçlarından elde edildi ve bu ölçümlerden sonra, sensör, plazma işleminden sonra (5 ve 12 gün sonra) ölçüm devam edene kadar (Şekil 9'da gösterilmemiştir) ortamın içinde bırakıldı. pH duyarlılığını saptamak için her ölçüm, pH 6 - pH 8 aralığında olan Titrisol tampon çözeltileri kullanılarak yapıldı.

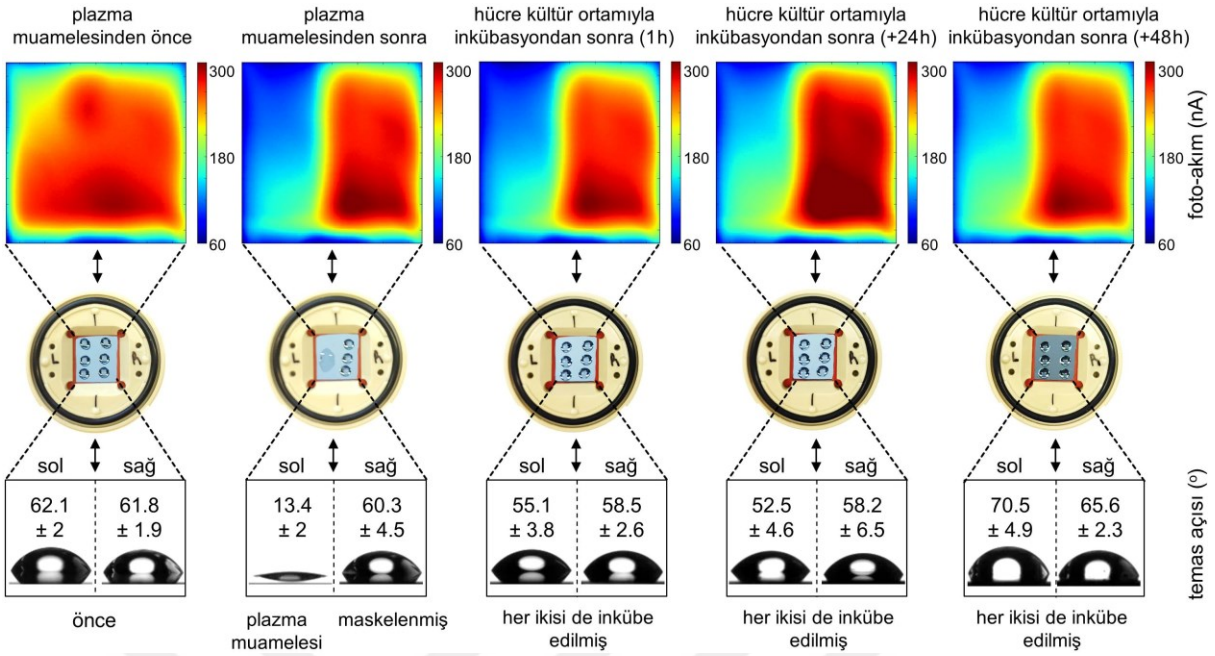


Şekil 10. O_2 plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) önce ve sonra pH hassasiyeti; NS, anlamlı değil, p> 0.05 (eşleştirilmemiş, 2-tailed t-testi).

Sonuçlara göre, sensörün sol tarafı (muamele edilmiş) ve sağ tarafı (maskelenmiş) açısından pH duyarlılığındaki farklılıklar iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.96, eşleştirilmemiş, 2-tailed t-testi). Bununla birlikte, sensörün muamele edilen tarafındaki sonuçların standart sapmaları, maskelenen

tarafınkinden daha yüksekti, ancak plazma muamelesinden 5 ve 12 gün sonra azalarak birbirlerine daha yakın oldular. Ek olarak, her iki tarafın pH duyarlılıkları, maksimum Nernstian pH duyarlılığının teorik değerinden (300 K'de 59.6 mV pH^{-1}) biraz daha yüksekti. Bu, ölçümler sırasında laboratuvardaki sıcaklık dalgalanmalarıyla, yüzey hassasiyeti artışıyla [65] ve pH duyarlılığını kalibre etmek için kullanılan tampon çözeltilerinin yetersiz konsantrasyon çeşitliliği (sadece pH 6, pH 7 ve pH 8) ile açıklanabilir.

Ek olarak, Şekil 9'da görülebileceği gibi, plazma muamelesinden sonra 1 saat boyunca hücre kültürü ortamına maruz kalmak, plazma ile muamele edilmiş sensörlerin su damlası temas açılarında (bkz. Bölüm 4.2 Hidrofobiklik Geri) yüksek bir artışa neden olmasına rağmen sensör sinyalini etkilememiştir. Bu etkileri daha detaylı incelemek için, kimyasal görüntüler 0.5 V'luk sabit bir ön gerilimde kaydedilmiştir. Bu görüntülerin yardımıyla, foto-akım sinyalinin uzamsal dağılımları ortaya çıkarılabildi ve böylece maskeleme, plazma uygulaması, tavlama veya kültür ortamıyla inkübasyondan kaynaklanan etkiler görselleştirilebildi. Böyle bir kimyasal görüntü oluşturmak için, sensör üzerindeki 19881 farklı ölçüm noktası ayrı ayrı okunarak kaydedildi ve sonuçlar, söz konusu etkilerin yerini, kuvvetini ve homojenliğini gösteren kimyasal bir görüntü olarak gösterildi. Sonuçlar Şekil 11'da özetlenmiştir.



Şekil 11. Hidrofobiklik geri kazanımı ve sinyal değişimi ilişkisi. O_2 plazma muamelesi (30 sn. boyunca) ve çeşitli inkübasyon prosedürleri altında taramalı LAPS düzeneğinden elde edilen kimyasal görüntüler sunulmuştur. LAPS'ın sağ tarafı (R) plazma muamelesi sırasında maskelenmiş ve maske bundan hemen sonra çıkarılmıştır. Plazma muamelesinin rejimleri, aynı LAPS'taki yukarıda gösterilen görüntülerdeki sıraya göre sırasıyla gerçekleştirildi. Her görüntünün boyutu 14 x 14 mm^2'dir. Her inkübasyon için FCS ve L-glutamin içeren ve sodyum bikarbonat içermeyen hücre kültür ortamı kullanıldı. Ölçüm çözeltilerinin (analitlerin) pH değerleri daima pH 7'ye ayarlandı.

Genel olarak, kimyasal görüntülerden görülebileceği gibi (Şekil 11), sensörün muamele edilen tarafı (L), plazma işleminden sonra foto-akımlarda belirgin bir azalma gösterdi, ancak maskelenmiş taraf (R) neredeyse aynı kaldı. Daha sonra, hücre kültür ortamıyla inkübasyon, sensörün muamele edilen tarafının su damlası temas açısında belirgin bir artışa neden olmuş olmasına rağmen, bu inkübasyon işlemi her iki tarafta da foto-akımlarla ilgili önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Ayrıca, muamele edilen taraf, maskelenen tarafa kıyasla foto-akımlarda hafif bir sapma da göstermiştir. Bu, kimyasal görüntülerin sol alt köşesindeki “1 saat” ve “48 saat” arasındaki renk değişiminden görülebilir. Bunların tümü, bu bölümde daha önce tartışılan I/V ölçümlerinin sonuçlarıyla uyumluydu. Ek olarak, görüntüler, plazma

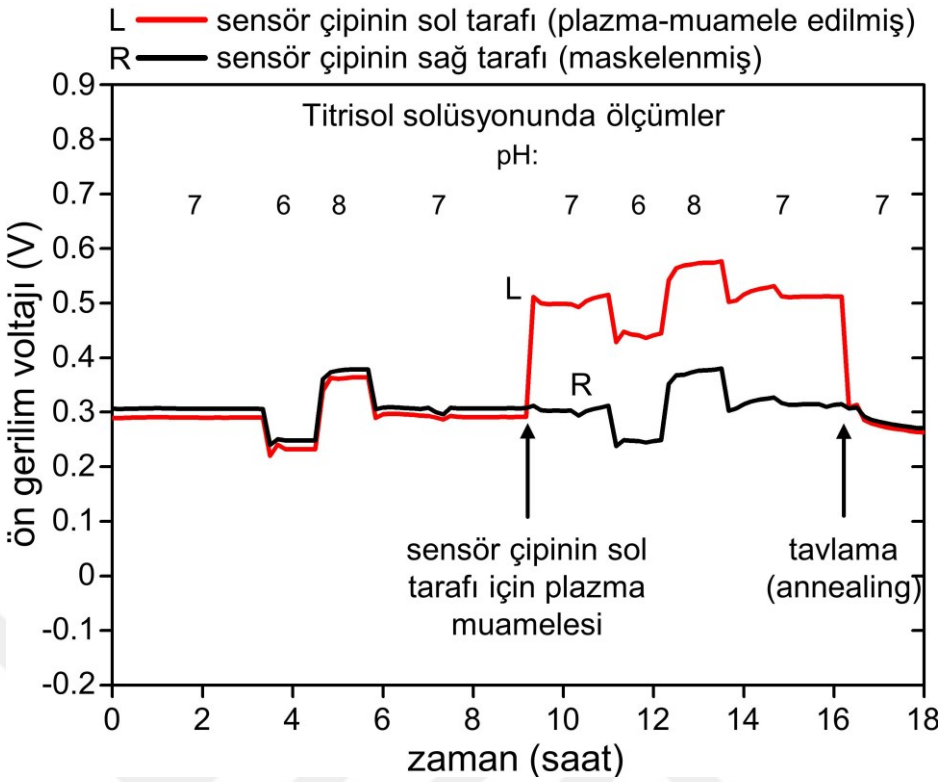
muamelesinin muntazam etkilerini işaret eden sensör boyunca foto-akımların homojen bir uzamsal dağılımını göstermektedir.

Bu sonuçlar, O_2 plazma muamelesinin sadece yüzey ıslanabilirlik özelliğini değil, aynı zamanda sensör özelliklerini de etkilediğini göstermektedir. Buna ek olarak, plazma muamelesinden sonra ıslanabilirlik azalmasıyla (hidrofobiklik geri kazanımı), sensör özelliklerinin (davranışlarının) geri kazanılmasının birbiri ile ilişkili olmadığı bulunmuştur.

Plazmadan kaynaklanan radyasyon, özellikle VUV'ler, yarı iletken ve dielektrik katmanlara elektronlar ve/veya elektron boşluk çiftleri enjekte edebilir. Bunlar katman boyunca hareket edebilir ve sıkışabilir, yeniden birleştirebilir veya katmanları terk edebilirler [31–33]. Dielektrik tabakadaki sıkışmış yükler, plazma işleminden sonra azalmış foto-akım sinyalinin kaynağı olabilir. Elektrik alanının altındaki kaçak akımlarla zaman içinde yük birikiminin nötralizasyonu, sensörün muamele edilmiş tarafında (L) görülen sapmanın nedeni olabilir. Önceki bir çalışmada, bir EIS sensörünün bir SiO_2 yüzeyi 100 W'da 2 dakika boyunca O_2 plazması ile muamele edildikten sonra 27 mV dakika^{-1} 'lık büyük bir sapma ve 1710 mV'luk bir voltaj kayması rapor edilmiştir [37]. Bu tez çalışmasında, plazma muamelesinden sonra görülebilecek sinyaldeki sapmayı ve ortalama potansiyel kaymalarını azaltmak için, daha ılımlı bir plazma muamelesi (30 sn., 30 W) seçilmiştir. Böylece sinyalde daha düşük bir sapma (1.18 mV saat^{-1}) ve düşük bir potansiyel kayması (250 mV) görülmüştür. Genellikle, bu büyüklükteki bir sapma, özellikle sensör yüzeyi boyunca bu sapmanın tekdüze olmasından dolayı ve LAPS'ın diferansiyel ölçüm prensibi [20] ile telafi edilebilecek olmasından dolayı hücre kültürü deneyleri için kabul edilebilir ölçüdedir.

4.4 LAPS'ın Sensör Özellikleri Üzerine Tavlama (*Annealing*) Etkisi

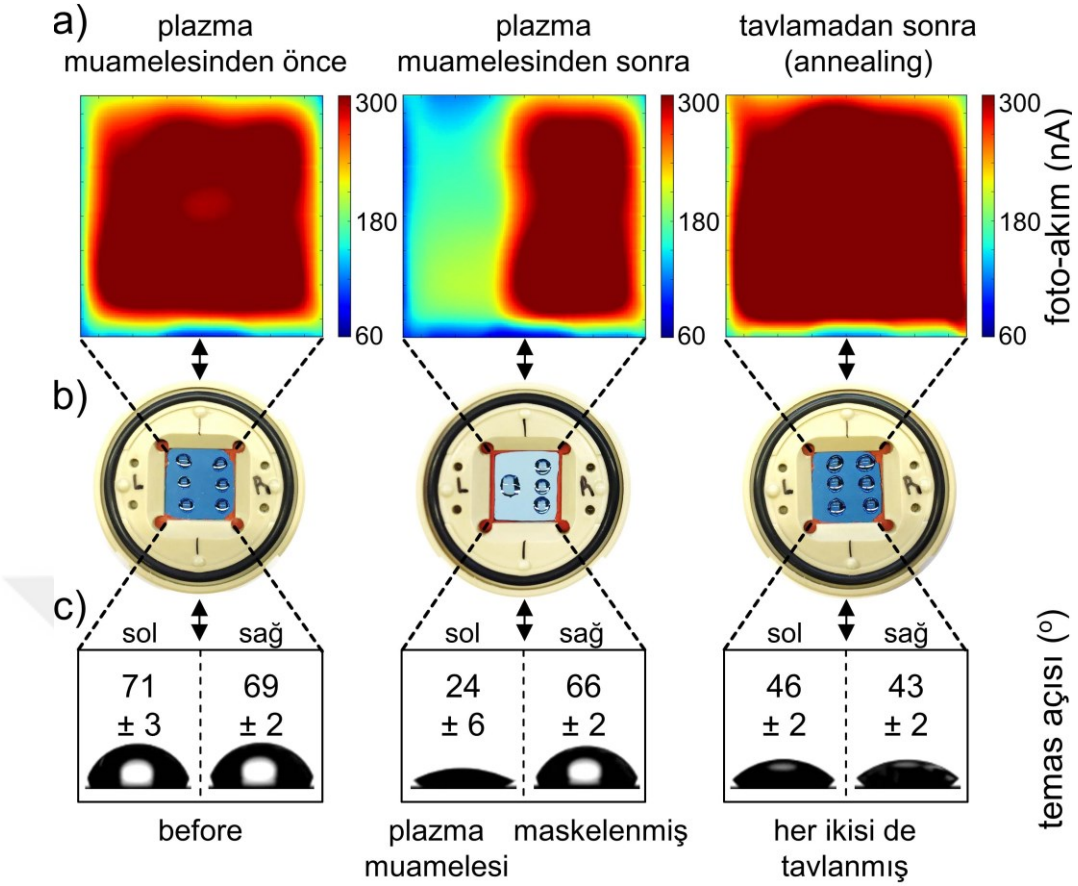
Sabit foto-akım modunda yapılan ölçüm için, sensörün sol tarafından (L, muamele edilmiş) ve sağ tarafından (R, kontrol) kaydedilen sinyaller Şekil 12'de sunulmuştur.



Şekil 12. Tavlama etkisi. LAPS'ın sol (L) ve sağ (R) taraflarının sabit foto-akım modunda ölçümü bir tavlama (10 dakika, 300°C) prosedürünün LAPS'ın O_2 plazma ile muamele edilmiş kısmı (L) ve muamele edilmemiş kısmı (R) üzerindeki etkisini göstermektedir. Plazma muamelesi, 9 saat + 10 dakika. Tavlama prosedürü ise 16 saat + 10 dakikaya sensör çalışmasından sonra gerçekleştirildi.

30 saniye boyunca uygulanan plazma muamelesinden sonra, maskelenen taraf ön gerilim voltajı sinyalinde ortalama yaklaşık 2 mV'luk bir düşüş göstermesine rağmen, sensörün muamele edilen tarafı ortalama yaklaşık 210 mV'luk bir artış gösterdi. Tavlama aşamasından (300°C'de 10 dakika) sonra, sensörün muamele edilen tarafındaki ön gerilim voltaj sinyali başlangıç değerine geri döndü. Ayrıca, sensörün sol tarafı (muamele edilmiş) ve sağ tarafı (maskelenmiş) açısından pH duyarlılığındaki farklılıklar iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.65$, eşleştirilmemiş, 2-tailed t-testi).

Şekil 13, plazma muamelesiyle (30 sn.) ve tavlamayla (10 dakika, 300°C) ilişkili olarak kimyasal görüntüleri ve ıslanabilirlik değişikliklerini göstermektedir.



Şekil 13. Tavlama etkisinin görselleştirilmesi. **a)** Ta_2O_5 temelli LAPS'ın O_2 plazma muamelesinden (30 sn. boyunca) ve tavlanma prosedüründen (10 dakika boyunca, 300°C' de) önce ve sonra olacak şekilde taramalı LAPS düzeneğinden elde edilen kimyasal görüntüler. Söz konusu muameleler, aynı LAPS çipinden görüntülerdeki sıraya göre sırasıyla gerçekleştirildi. Her kimyasal görüntünün boyutu 14 x 14 mm^2'dir. b) Ta_2O_5'lı LAPS'ın sol (L) ve sağ (R) taraflarındaki yüzeyli su damlacıklarının (sabit) temsili görüntüleri ve bunlara karşılık gelen ölçülmüş statik temas açıları.

Kimyasal görüntülerden görülebileceği gibi (Şekil 13(a)), plazma uygulamasından sonra maskelenen tarafın (R, sağ) aynı kalmasına rağmen, sensörün sol tarafında (muamele edilen taraf) foto-akımında önemli bir azalma görülmüştür. Bu, bir önceki bölümde görülen sonuçlarla tutarlıdır. Tavlama işleminden sonra, sensörün muamele edilmiş tarafında foto-akımın artmış olduğu ve neredeyse tamamen başlangıç değerine geri döndüğü görülmektedir. Bu, sıkışan yüklerin dielektrik malzemeden salınmasıyla açıklanabilir; çünkü artan sıcaklığın bu

dengeye gelme sürecini hızlandırdığı bilinmektedir [37,66]. Ek olarak, görüntüler sensör yüzeyi boyunca foto-akımların homojen bir uzamsal dağılımı göstermekle birlikte; bu muntazam bir plazma muamelesine ve tavlama işlemine işarete etmektedir.

Ek olarak, hidrofiliklik, plazma muamelesi sırasında maskelenen taraf (kontrol) dışında, sensörün muamele edilen tarafı için önemli ölçüde artmıştır. Tavlama işlemi her iki tarafın ıslanabilirlik özelliklerini değiştirdi ve onları yalın bir Ta_2O_5 yüzeyinin temas açısı değerlerine (49°) yaklaştırdı (Şekil 13(b) ve Şekil 13(c)). Muamele edilen taraftaki (L) temas açısının artması, yüksek sıcaklıkta hızlandırılmış hidrofobiklik geri kazanımdan kaynaklanabilir. Diğer yandan, sensörün kontrol tarafındaki temas açısında gözlenen azalma ise, olası kirleticilerin tavlama sırasındaki yüksek sıcaklıktan (300°C'de) dolayı yakılarak giderilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

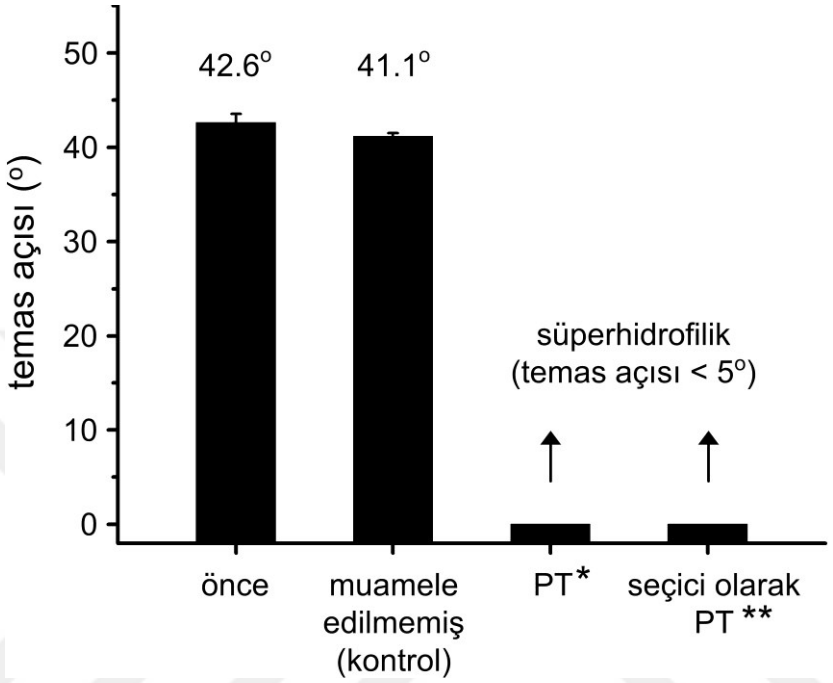
Bu sonuçlar, tavlama işleminin (10 dakika, 300°C), LAPS'ın yüzey ıslanabilirliği ve elektrokimyasal davranışlarıyla ilgili özelliklerini tamamen "sıfırlayabilme" yeteneğinin altını çizmektedir. Bu, LAPS' a iyi bir yeniden kullanılabilme özelliği sağlamak için de önemlidir. Ayrıca, sonuçlar, plazmayla desenlendirilmiş (*patterned*) bir LAPS çipini sıfırlamak için de bu tavlama adımının kullanılabileceğini göstermektedir.

4.5 Plazma İle Modifiye Edilmiş Yüzeylerin Özellikleri

Montajdan sonra çeşitli çalışma koşullarında garantili bir okuma hassasiyeti sağlamak için sensör karakteristikleri belirlenmiştir. LAPS'ın pH duyarlılığı 57 ± 1.6 mV/pH ve histerezisi 4 mV olarak bulunmuştur. Ön gerilimdeki kaymanın, pH değişiklikleri ile yüksek derecede korele halde olduğu görülmüştür (R^2 = 0.9998). Bu nedenle, LAPS, bu çalışmada daha sonraki deneyler için kullanılabilecek çok iyi özellikler göstermiştir. Ayrıca bu, elde edilen mikro-agar tuz-köprüsünün aşağıdaki deneyler için de uygun olduğunu göstermektedir. Ek olarak, sonuçlar, literatürde daha önce sunulmuş Ta_2O_5 transdüser yüzeye sahip bir sensörün Nernstian pH duyarlılığına tam olarak uymaktadır [13].

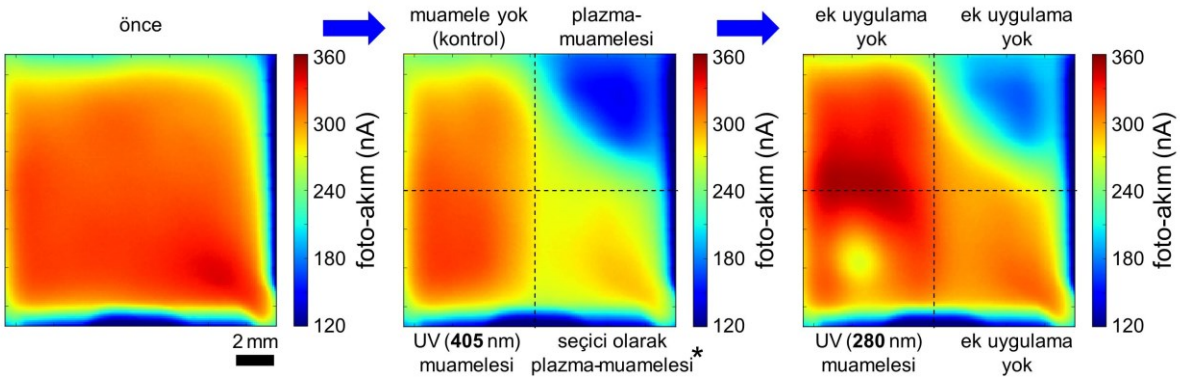
LAPS yüzeyinde paternler oluşturulması, uzaysal çözünürlük kabiliyeti sayesinde tek bir çip kullanarak aynı koşullar altında birden fazla parametrenin kesin

olarak test edilmesini mümkün kılar. Şekil 14, plazma muamelesinden sonra LAPS yüzeyinin sol üst tarafında "kontrol" olarak adlandırılan bölgede, ıslanabilirlikte önemli bir değişikliğe neden olmadan başarılı bir şekilde maskeleme yapılabildiği ifade etmektedir.



Şekil 14. LAPS yüzeyinin ıslanabilirlik değişiklikleri. *PT, 30 saniye boyunca gerçekleştirilen O_2 plazma muamelesini ifade etmekte; **Seçici plazma uygulaması, sensör yüzeyinin önceden bir maske (16 µm kalınlığında alüminyum folyo) ile kaplanması ve sensör yüzeyi ile bu maske arasında bir boşluk (0.5 mm) bırakıldıktan sonra plazma uygulamasının yapılması anlamına gelmektedir.

Ek olarak, plazma ile muamele edilmiş ve seçici olarak plazma ile muamele edilmiş her iki yüzey süperhidrofilik hale gelmiştir. Bununla birlikte, seçici plazma uygulamasının ana nedeni sadece ıslatılabilirliğin modifikasyonu değil, aynı zamanda yüzeyin radyasyondan, özellikle plazmadan yayılan vakumlu ultraviyole fotonlardan (VUV) gölgelenmesiydi. Plazma işleminin sensör karakteristiği üzerindeki etkileri, Şekil 15'teki kimyasal görüntülerle görselleştirildi.



Şekil 15. Çeşitli uygulamaların sensör karakteristiğine etkileri. O_2 plazma uygulaması (30 sn.) öncesi ve sonrası ya da 405 nm (orta şekil) ve 280 nm'lik (sağdaki şekil) çeşitli UV uygulamaları öncesi ve sonrası O_2 plazma-/UV radyasyon-kaynaklı sensör davranışının bozulmasının taramalı LAPS düzeneğinden elde edilen kimyasal görüntülerle görselleştirilmesi. Oklar, uygulama rejimlerinin aynı LAPS çipi kullanılarak elde edilen bu görüntülerdeki sıraya göre gerçekleştirildiğini ifade etmektedir. *Seçici plazma muamelesi, sensör yüzeyinin önceden bir maske (16 µm kalınlığında alüminyum folyo) ile kaplanması ve sensör yüzeyi ile bu maske arasında bir boşluk (0.5 mm) bırakıldıktan sonra plazma uygulamasının yapılması anlamına gelmektedir.

LAPS çipinin sağ üst tarafına uygulanan doğrudan plazma muamelesinin (maske olmadan) etkileriyle karşılaştırıldığında, sensör çipinin sağ alt tarafına uygulanan seçici plazma uygulamasının, daha düşük bir foto-akım düşüşü ile karakterize olan plazma-kaynaklı sensör davranışının bozulmasını en aza indirmede üstün olduğu bulunmuştur.

Plazma iyon, radikal ve foton kaynağıdır. Yüksek enerjili fotonlar, özellikle VUV'ler, eğer enerji seviyeleri dielektrik bant aralığından daha büyükse, dielektrik tabakanın içindeki elektronlara ve elektron boşluk çiftlerine nüfuz edebilir ve enjekte edebilirler. Bu boşluklar, oksijen boşluğu oluşturmak için kafes oksijen ile reaksiyona girebilir [67]; elektronlar ise kafes metal iyonları ile reaksiyona girerek sıkışmış elektronlar (kusurlu bölgeler) oluşturabilir [68]**.** Bunlar, I/V eğrisinde düz-bant voltaj kaymasına ve dolayısıyla sensörün elektriksel davranışında bir değişikliğe yol açabilir [25]. Bu nedenle, seçici plazma uygulaması yöntemi, yüzeyin plazma reaksiyon odası içinde üretilen gereksiz fotonlardan korunmasını sağlar. Bununla birlikte, bu yöntem,

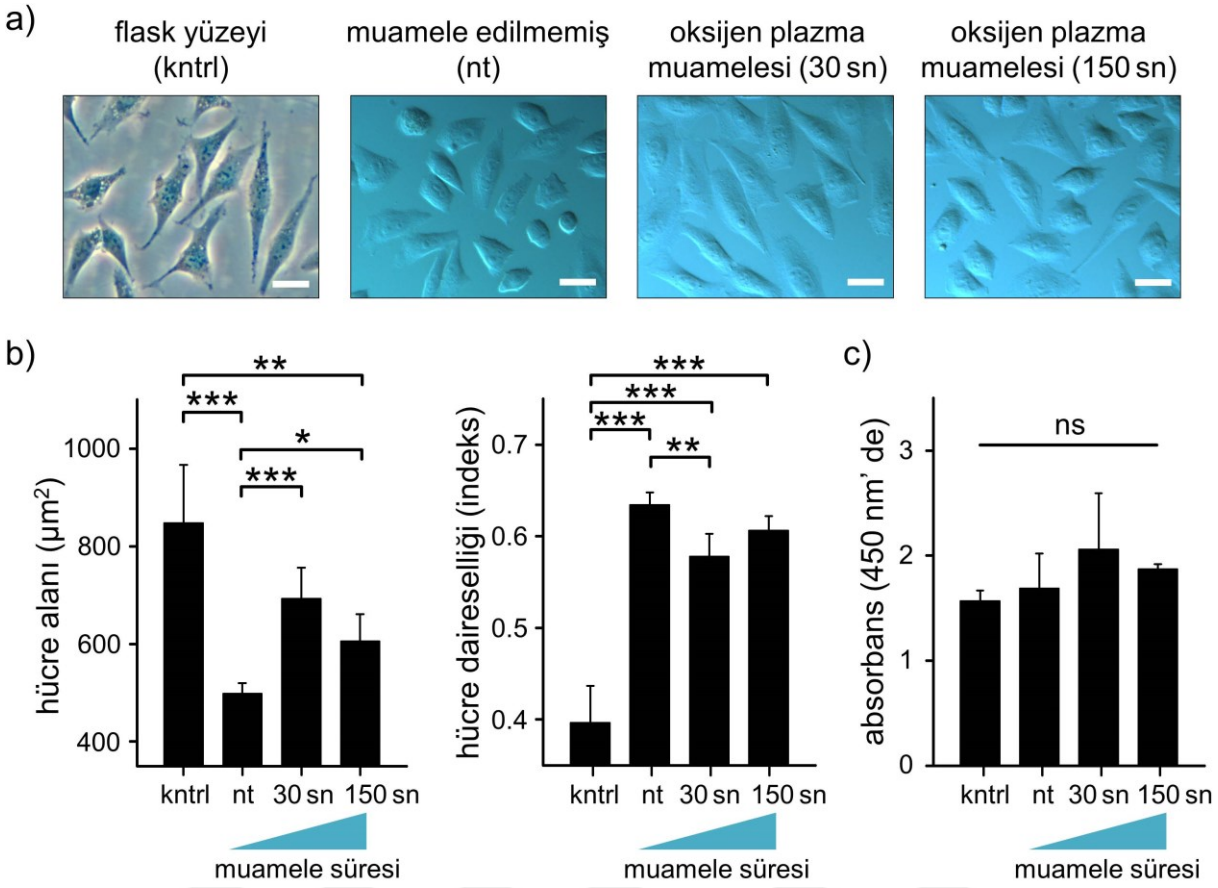
sensör ve maske arasındaki boşluk içinde yanal olarak yayılabilen radikalleri engelleyemez. Neyse ki, radikaller dielektrik içine VUV'lar kadar derin nüfuz edemezler ve sadece yüzeyi süperhidrofilik hale getirmek için yeterli olan yüzey tabakasını etkileyebilirler [69]. Bu durum, seçici muamele yönteminin iyi hidrofiliklik sağlarken bozulmayı tamamen engellememesinin nedeni olabilir.

Ultraviyole fotonların sensör davranışındaki bozulmada rolünü kanıtlamak için, LAPS yüzeyinin plazma muamelesi sırasında maskelenen sol alt kısmı, sırasıyla 405 nm ve 280 nm dalga boyuna sahip ultraviyole radyasyona maruz bırakıldı (bkz. Şekil 15 orta - sol alt alan ve sağ - sol alt alan). Yüksek enerjili ultraviyole radyasyonun (280 nm) UV radyasyonuna (405 nm) kıyasla foto-akım düşüşüne neden olduğu bulunmuştur. Fakat kimyasal bir görüntü ile görselleştirilen bu foto-akım düşüşü, plazma muamelesinden sonra gözlendiği kadar yüksek değildi (bkz. Şekil 15 üst sağ alan). Bunun nedeni, plazmanın ayrıca ultraviyole radyasyondan (280 nm) daha yüksek enerjiye sahip olan VUV fotonlar (100-200 nm) da yayması olabilir. Bu sonuçlar önceki çalışmalarla uyumludur [68,69]. Yüksek enerjili ultraviyole fotonların LAPS üzerindeki etkilerini göstermek, ışıkla adreslenebilen elektrotlar [70] veya hidrojeller [71] gibi UV ışığı kullanan diğer sensör uygulamalarının LAPS ile kombine edilmesi istendiğinde oldukça yararlı olabilir. Ayrıca, sonuçlar ultraviyole radyasyonun (405 nm) plazma muamelesinden sonra intrinsik (içsel) sensör özelliklerini etkilemeden mikrobiyal dekontaminasyonu sağlamak için yararlı bir araç olabileceğini de göstermektedir [72].

4.6 Modifiye LAPS Yüzeylerinin Biyo-Fonksiyonalitesi

Hücre adezyon testine göre, hücrelerin %58'i, modifiye edilmemiş yüzey üzerinde tutunmuşken, plazma ile işleme tabi tutulmuş (30 sn. ve 150 sn.) yüzeylerde bu oran %59 olacak şekilde bulunmuştur (bkz. Tezin Ekleri, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri, Şekil 29). Artan kesme gerilmesinin büyüklüğü ile birlikte, 30 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş yüzey üzerinde büyütülen hücreler, ayrılmaya karşı en yüksek direnci gösterirken, 150 saniyede boyunca plazma ile muamele edilmiş yüzey de ise en azın direnci göstermiştirler (bkz. Tezin Ekleri, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri, Şekil 30). Ancak gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kültürdeki hücrelerin morfolojik olarak karakterizasyonu, onların farklı substratlar

üzerinde büyürken ki genel sağlık durumları hakkında kanıt sağlamak için önemlidir. Geliştirilmiş biyofonksiyona sahip yüzeylerde kültürlenen adherent hücreler tipik bir morfolojik özelliği temsil ederler. Örneğin, epitelyal hücreler olarak CHO hücreleri çoğunlukla çokgen şekle sahip, uzamış veya bazen iğ benzeri ve nispeten iyi yayılmış bir morfoloji sergilerler [73]. Bu çalışmada, ticari bir hücre kültür flaskı üzerinde büyütülen CHO-K1 hücreleri bu özellikleri temsil etti ve bu, plazma ile muamele edilmiş bir LAPS yüzeyinde büyütülen CHO-K1 hücrelerinin morfolojik özelliklerini karşılaştırmak için bir kontrol olarak kabul edildi (Şekil 16(a)).

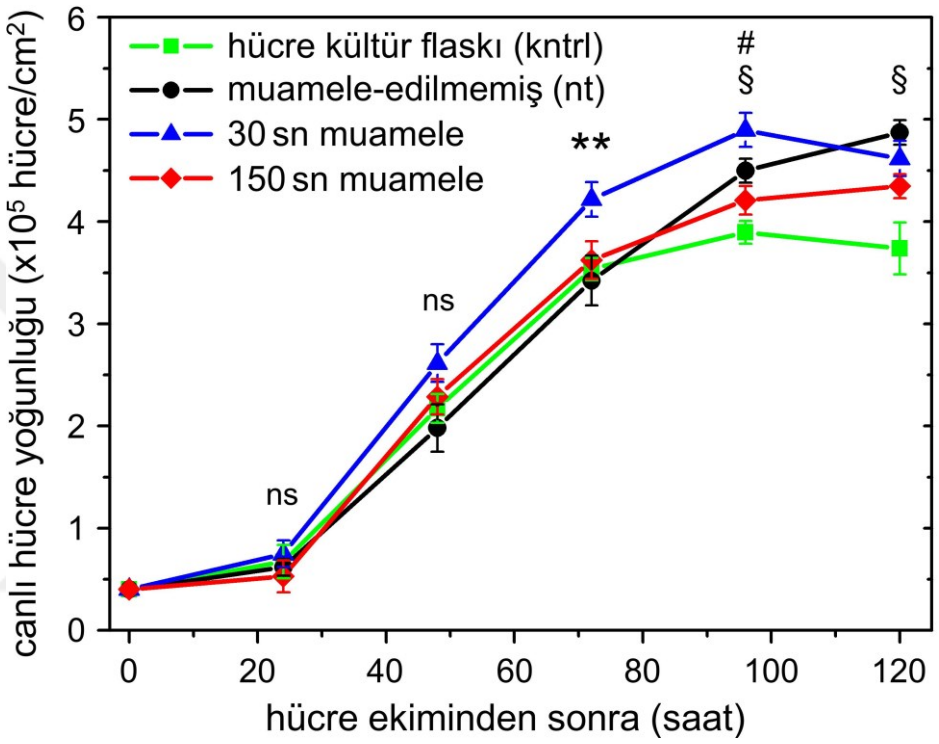


Şekil 16. O_2 plazma ile modifiye edilmiş sensör yüzeylerinin CHO-K1 hücrelerinin morfolojisi, yayılması ve yaşayabilirliği üzerindeki etkisi. **a)** Hücre morfolojisini göstermek için modifiye edilmiş yüzeyler üzerindeki hücrelerin mikroskop görüntüleri. **b)** Modifiye edilmiş yüzeyler üzerinde büyütülen hücrelerin yayılma karakteristiklerini göstermek için, hücre alanının ve hücre daireselliğinin kantitatif olarak değerlendirilmesi. **c)** Modifiye edilmiş sensör yüzeylerindeki hücrelerin canlılığını göstermek için CCK8 analizinden elde edilen relativ absorbans değerleri. Buradaki tüm sonuçlar 24 saatlik kültürleme sonrasında elde edilmiştir. Notlar: Yüzey modifikasyonları için seçici plazma uygulamaları (30 sn. ve 150 sn.) yapıldı; hata çubukları standart sapmaları gösterir; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Kısaltmalar: kntrl, kontrol (ticari bir hücre kültürü flask yüzeyi); nt, plazma uygulaması yapılmamış sensör yüzeyi (plazma uygulaması sırasında maskelenir); ns, değişimleri arasında anlamlı bir fark olmayan (P>0.05); CCK8, hücre canlılığı analiz kiti-8; görüntülerdeki ölçekler 25 μm'dir.

Sonuçlara göre, 30 saniye boyunca plazmayla muamele edilmiş LAPS yüzeylerinde büyütülen hücreler, kontrol örnekleri ile benzer morfolojik özellikler sergilerken, muamele edilmemiş ve 150 saniye plazma ile muamele edilmiş yüzey, uzamış veya çokgen şeklinde değil, daha yuvarlak benzeri bir morfoloji göstermiştir. Farklılıklar ayrıca hücre daireselliği (bir hücrenin çevresinin alanı ile karesi arasındaki oranla orantılı) ve hücre alanı (hücrenin yüzeye yayıldığı alanla orantılı) gibi morfolojik parametreler kullanılarak nicel olarak analiz edilmiştir (Şekil 16(b)). Hücrelerin ortalama yayılma alanı, 30 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş yüzey üzerinde muamele edilmemiş yüzeye göre 1.4 kat ($p = 0.0006$) artmıştır. Ayrıca, hücrelerin ortalama yayılma alanı, 150 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş yüzeylerde muamele edilmemiş yüzeylere karşı 1.2 kat ($p = 0.01$) artmıştır. Ek olarak, ortalama yayılma alanı, ticari flask yüzeyinde muamele edilmemiş yüzeylere karşı 1.7 kat ($p = 0.0001$) fazladır. Fakat 30 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş yüzey ile ticari flask yüzeyi kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Diğer gruplara göre hücre daireselliği ticari flask yüzeyinde anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0.0001$). En yüksek dairesellik, plazma uygulaması ile muamele edilmemiş yüzeyde görülmüştür ve bu, CHO-K1 hücreleri için tipik olmayan daha az uzamış ve daha yuvarlak bir şekle işaret etmektedir. Hücre daireselliği, 30 saniye plazma ile muamele edilmiş yüzeyde, muamele edilmemiş yüzeye kıyasla önemli ölçüde düşüktü ($p = 0.004$), ancak 150 saniye plazma ile muamele edilmiş yüzeyde önemli ölçüde değişmedi. Bu sonuçlar, 30 saniye plazma ile işleme tabi tutulmuş LAPS yüzeyinin, işlem görmemiş LAPS yüzeyine ve 150 saniye boyunca plazma ile işlem görmüş LAPS yüzeyine kıyasla hücre morfolojisi ve yayılması ile ilgili gelişmiş biyolojik işlevsellik sağladığını göstermiştir. Bu sonuçlar, bir titanyum alaşımının kristalli bir β-Ta_2O_5 kaplamasıyla sadece yüzey ıslanabilirliğini değil, aynı zamanda NIH-3T3 hücrelerinin yayılmasının ve çoğalmasının da arttırdığının gösterildiği başka bir çalışmanın bulgularıyla da [74] uyumludur. Ayrıca, en yüksek hücre canlılığı 30 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş yüzey üzerinde gözlenmiştir, ancak ticari flask yüzeyi de dahil tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 16(c)).

Şekil 17, zamana bağlı hücre çoğalmasını göstermektedir. Dikkat çekici bir şekilde, 72 saatlik kültürden sonra canlı hücre yoğunluğu (geç log fazı), 30 saniye plazma ile muamele edilmiş yüzeyde muamele edilmemiş yüzeye kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti (p = 0.01). Yine 72 saatlik kültürden sonra canlı hücre yoğunluğu (geç log fazı), 30 saniye plazma ile muamele edilmiş yüzeyde ticari kültür flaskına kıyasla daha da yüksekti (p = 0.004).



Şekil 17. Farklı yüzeylerde zamana bağlı canlı hücre (CHO-K1) yoğunluğu. Notlar: Hata çubukları standart sapmaları gösterir; P<0.01 (**30 saniye boyunca O_2 plazma ile muamele edilmiş sensör yüzeyine karşı hücre kültürü flaskı (kntrl) ve muamele edilmemiş sensör yüzeyi (nt); #30 saniye boyunca O_2 plazma ile muamele edilmiş sensör yüzeyine karşı 150 saniye boyunca muamele edilmiş sensör yüzeyi; §hücre kültürü flaskına (kntrl) karşı muamele edilmemiş sensör yüzeyi (nt) ve 30 saniye boyunca O_2 plazma ile muamele edilmiş sensör yüzeyi. Kısaltmalar: kntrl, kontrol (ticari hücre kültürü flaskının yüzeyi); nt, muamele edilmiş sensör yüzeyi; ns, değişimleri arasında anlamlı bir fark olmayan (P>0.05).

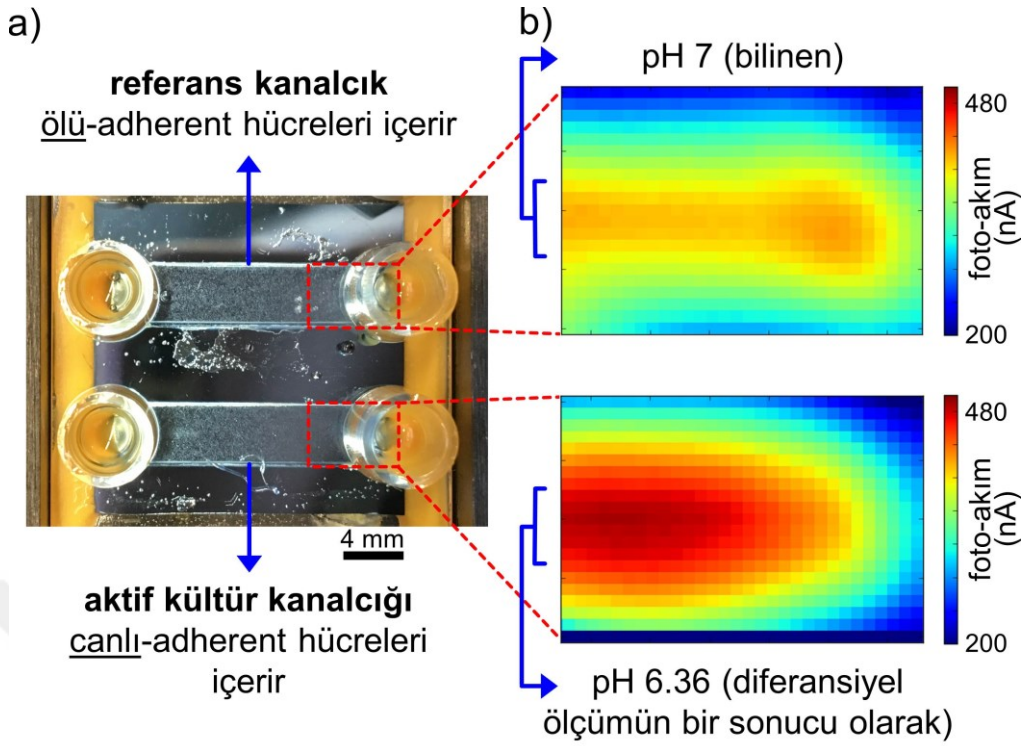
Ayrıca, büyümenin durağan fazında, canlı hücre yoğunluğu, 30 saniye plazma ile muamele edilmiş yüzey üzerinde kültür flaskı ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde

daha yüksek olmuştur. Hücre sayımı sırasında, durağan fazda LAPS yüzeyinde büyütülen hücrelerin, flaskın yüzeyinde büyütülen hücrelerden açıkça daha küçük olduğu da gözlemlenmiştir. Bu, Şekil 16(a) ve Şekil 16(b) 'de verilen sonuçlarla uyumludur. Ticari kültür flaskının yüzeyine göre, LAPS yüzeyinde genel olarak görülen bu yüksek hücre yoğunluğu (Şekil 17), her bir hücrenin kapladığı alanın küçük olması ve dolayısıyla bu sinirli alana daha fazla hücrenin adezyonu nedeniyle olabilir. Genel olarak, bu sonuçlar, 30 saniyelik O_2 plazma muamelesinin, özellikle hücre davranışını değerlendirmek için en önemli zaman çerçevesi olan büyümenin log fazında daha iyi hücre proliferasyonu sağladığını göstermektedir. Sonuçlar ayrıca, bir titanyum substratı üzerinde doğal bir hidroksiapatit (nHA) kaplama yapısına Ta_2O_5 nanopartiküllerinin dahil edilmesinin insan fötal osteoblastik hücrelerinin (hFOB) çoğalmasını ve yayılmasını arttırdığının tespit edildiği önceki bir çalışmayla uyumludur [75].

Ek olarak, proteinler, plazma tarafından yoğun bir şekilde muamele edilen bir yüzeye serbest yüzey enerjisinin aşırı artması nedeniyle tutunamazlar. Bunun nedeni, su molekülleri ile yüksek yüzey hidrasyon kabiliyetine sahip bu yüzey arasındaki sağlam hidrojen bağından kaynaklanan güçlü itici solvasyon kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır [26,29]. Bununla birlikte, kültür ortamı içindeki proteinlerin yüzeye yeterli bir adsorpsiyonu, hücre-yüzey etkileşimine aracılık etmek için çok önemlidir. Bu, 150 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş bir LAPS yüzeyinin 30 saniye boyunca plazma ile muamele edilmiş bir LAPS yüzeyine göre neden daha iyi biyo-fonksiyonellik göstermediğini açıklayabilir. Tüm bu bulgular, hidrofilik yüzeylerde hücre yayılımı ve hücre çoğalması ile ilgili önceki çalışmalarda [26,29] gözlemlenen sonuçlarla uyumludur.

4.7 Diferansiyel Hücre Dışı Asitleşme Tespiti:

Bir konseptin ispati çalışması olarak, CHO-K1 hücrelerinin hücre dışı asitleştirilmesi, plazma ile modifiye edilmiş LAPS çipli bir mikroakışkan sistem kullanılarak (biyo-)kimyasal bir görüntü olarak görüntülendi. Şekil 18(a), kanallarının içinde adherent CHO-K1 hücreleri olan mikroakışkan çip sistemini göstermektedir.



Şekil 18. Mikroakışkan kanallar içindeki adherent CHO-K1 hücrelerinin hücre dışı asitleşmesini gösteren diferansiyel (biyo-)kimyasal görüntü. **a)** 48 saatlik kültürden sonra kanalların içinde büyümüş adherent CHO-K1 hücrelerini içeren mikroakışkan çip sistemine monte edilmiş LAPS'ın fotoğrafı. Daha sonra, 5 dakika boyunca %70'lik soğuk etanol (PBS ile hazırlanmış) ölçümden önce referans kanaldaki hücrelerin fiksasyonunu ve metabolik olarak söndürülmesini sağlamak için uygulandı. **b)** CHO-K1 hücrelerinin hücre dışı asitleşmesini (pH 7'den pH 6.36'ya) göstermek için taramalı LAPS ölçümünden elde edilen diferansiyel (biyo-)kimyasal görüntü.

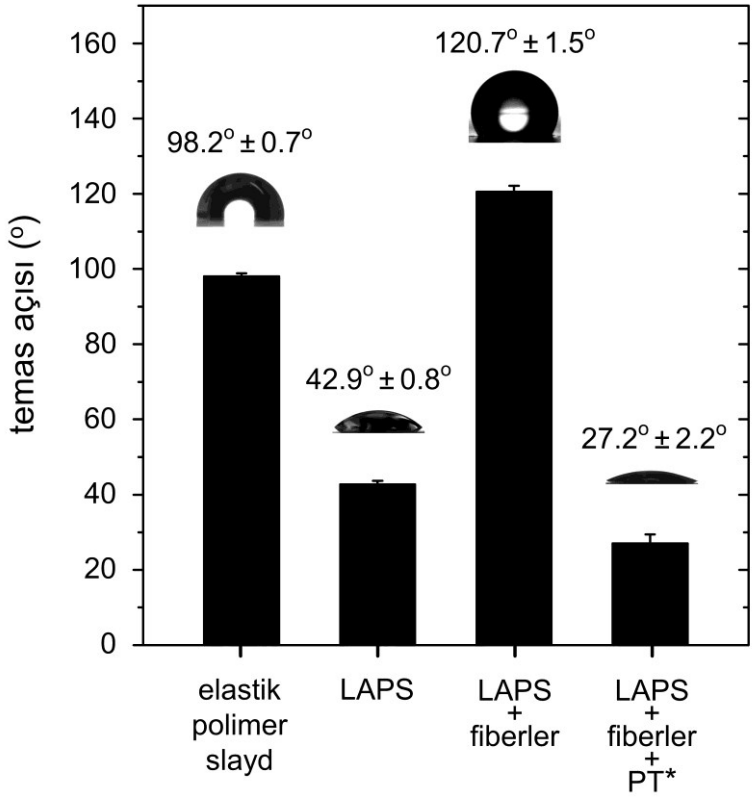
Üst kanaldaki (referans kanal) hücreler soğuk etanol ile fikse edilmiş ve metabolik olarak söndürülmüşken, alt kanaldaki (aktif kültür kanalı) hücrelere taze kültür ortamı verilmiştir. Tripsin ile ayırmak veya Triton-X ile parçalamak yerine hücrelerin yüzeye sabitlenmesi ve söndürülmesi, hem hücre-yüzey bütünlüğünü korumak hem de hücrelerin tüm aktivitesini tamamen durdurmak amacıyla yapılmıştır. Bu, hücre katmanının modifikasyonuna bağlı olarak lokal empedans değişikliklerinin etkisi ile ilgili kanallar arasındaki olası farklılıkları ortadan kaldırmak için özellikle önemlidir. Her iki kanal, pH 7'ye ayarlanmış kültür ortamı ile doldurulduu. 1 saatlik inkübasyondan sonra, kimyasal görüntüleri elde etmek için, foto-akım ölçümleri 0.45 V'luk sabit bir ön gerilim voltajı altında çalışılmıştır (Şekil 18(b)).

Sensör çipinin pH duyarlılığı (61.4 ± 3 nA/pH) kullanılarak, aktif kültür kanalı içindeki pH değeri, referans kanalına kıyasla (diferansiyel algılama) hesaplandı ve pH 6.36 olarak bulundu.

Literatürdeki bir çalışmada [23], daha doğru sonuçlara ulaşabilmek için, ölçümün sonunda sıfır temel çizgisine ulaşıp olası intrinsik sinyal sapmalarını tespit edebilmek için T98G beyin kanseri hücreleri öldürülmüştür. Ancak, bu durum sistemin gerçek zamanlı analizleri gerçekleştirebilmesi için sorunlara neden olabilir. Bu nedenle, bu deneydeki çip sistemi, LAPS'ın uzamsal çözünürlük kabiliyeti yoluyla aynı sensör üzerinde hem kontrol ölçümü hem de aktif kültür ölçümünün yapılmasına izin verir [24]. Bu şekilde, aktif ölçüm kanalındaki hücreleri öldürmeden sinyaldeki sapmanın etkisi ortadan kaldırılabilir, çünkü zaman içinde birçok sinyal dalgalanması sensörün her iki kanalında da aynı şekilde vuku bulur [25].

4.8 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon İçin Yüzey Özellikleri

LAPS yüzeyindeki elektro-eğirilmiş PEVA lifleri SEM ve dijital mikroskop ile karakterize edildi. Ortalama lif çapı 3.3 ± 0.5 μm olarak ölçüldü. Hidrofilik LAPS yüzeyi, liflerin eklenmesi ile hidrofobik bir duruma (yüksek temas açısı değerleri) dönüştürülmüştür (Şekil 19). Islanabilirlik, hücre-substrat etkileşimini arttırmak için en önemli faktörlerden biri olduğundan ve hücreler çoğunlukla hidrofilik yüzeyleri tercih etme eğiliminde olduklarından [26], bu hidrofobik yüzeyi hidrofilik duruma (düşük temas açısı) dönüştürmek için O_2 plazma uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 19).

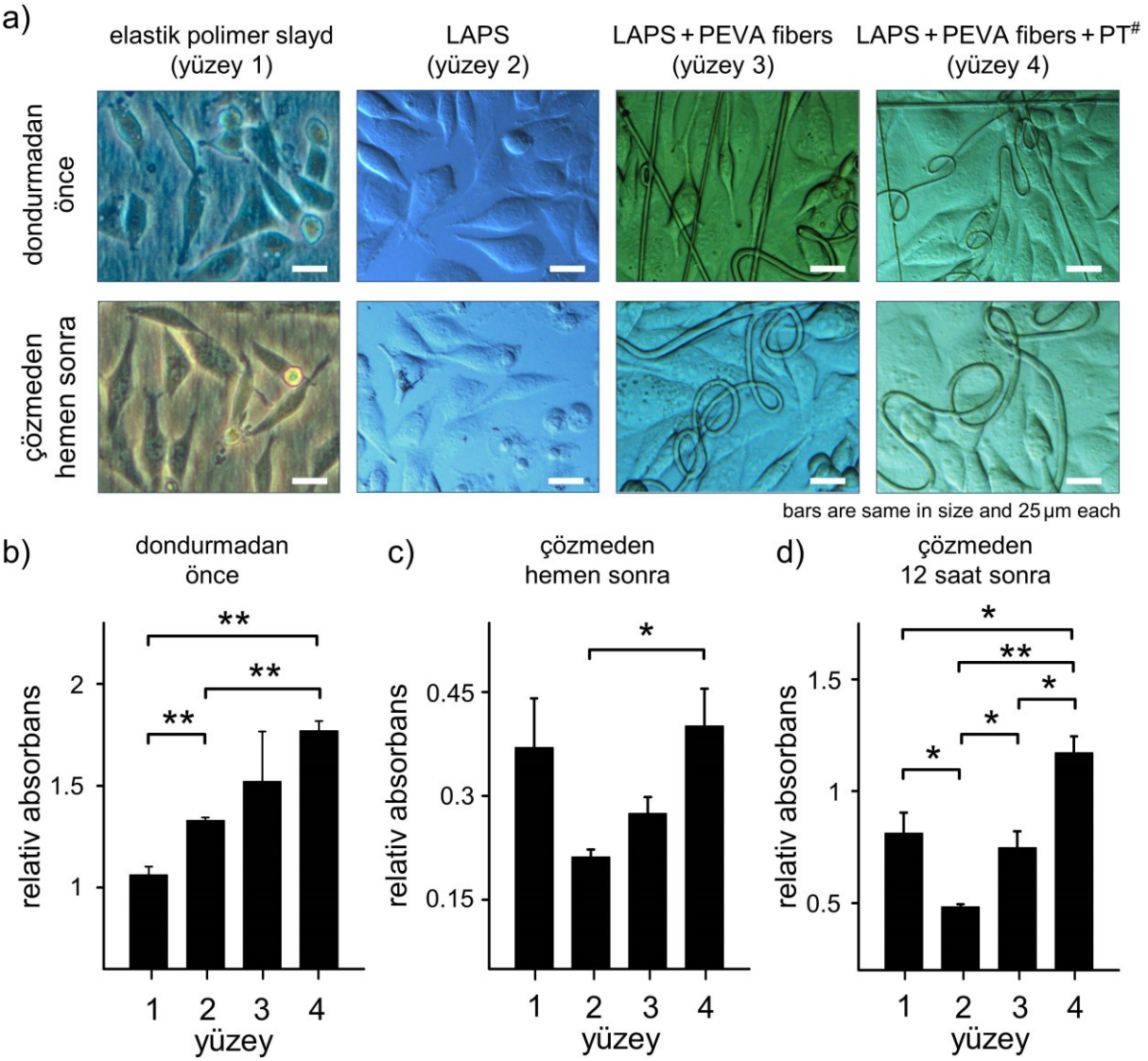


Şekil 19. Numunelerin ıslanabilirlik özelliğini gösteren farklı yüzeylerde "sessile drop" metoduyla su damlası (statik) temas açısı ölçüm sonuçları. *PT, O_2 plazma muamelesini (30 saniye boyunca) ifade etmektedir.

Yapılan bu O_2 plazma uygulaması liflerin bütünlüğünü etkilememiştir (bkz. Tez Ekleri, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri, Şekil 31). Hemen hemen tüm lifler, birbirlerine değdikleri yerlerde iç içe geçerek kaynaştıkları ve yüzeyde erimiş ve düzleşmiş bir morfoloji oluşturduklarından sensör yüzeyi ile temas halindeydiler (bkz. Tez Ekleri, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri, Şekil 32).

4.9 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyona Hücre Yanıtları

CHO-K1 hücrelerinin morfolojisi ve canlılığı, sensör-üstü kriyoprezervasyondan hemen önce ve sonra olmak üzere analiz edildi çünkü bu parametreler onların genel sağlıkları ve farklı substratlar üzerinde donma ve çözülme sürecine yanıtları hakkında bir kanıt sağlamak için temel olarak önemlidir. Donmadan önce, PEVA lifleri ile modifiye edilmiş LAPS yüzeyinde büyütülen hücreler, iyi yayılmış, çokgen şekilli ve epitelyal hücreler olarak uzamış [73] yapılarıyla tipik morfolojik özelliklerini göstermiştir (Şekil 20(a), "yüzey 3").



Şekil 20. Kriyo-çip kullanılarak sensör-üstü kriyoprezervasyona (-80°C, gece boyunca) hücre yanıtları. **a)** Donmadan önce ve çözmeden hemen sonra hücre morfolojisini tasvir etmek için farklı yüzeylerdeki CHO-K1 hücrelerinin temsili mikroskop görüntüleri. #PT, O_2 plazma muamelesini (30 saniye boyunca) ifade etmektedir. **b)** Kriyoprezervasyondan önce; **c)** çözmeden hemen sonra; ve **d)** çözmeden 12 saat sonra hücre canlılığını göstermek için CCK-8 analizinden elde edilen nispi absorbans değerleri. Elastik polimer slayt (yüzey 1), LAPS (yüzey 2), PEVA lifleri ile modifiye edilmiş LAPS (yüzey 3), ve PEVA lifleri ile modifiye edilmiş ve daha sonra O_2 plazma işleminden geçmiş LAPS (yüzey 4). (*P< 0.01, **P< 0.001).

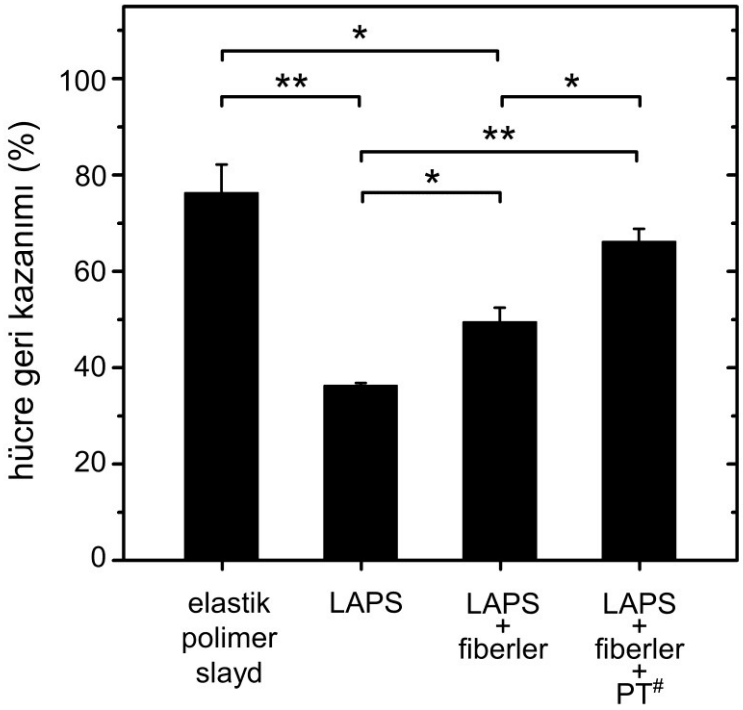
O_2 plazma ile modifiye edilmiş yüzeylerde de hücreler tipik morfolojik özelliklerini sergilemişlerdir (Şekil 20(a), "yüzey 4"). Bununla birlikte, elastik polimer

slayt ("yüzey 1") veya modifiye edilmemiş LAPS ("yüzey 2") üzerinde büyütülen hücreler çoğunlukla iğ benzeri veya daha yuvarlak bir morfoloji gösterdi ve bu hücreler yüzeyi tam olarak kaplayamadığı için kültür yüzeyinin bazı alanlarında nispeten küçük boşluklar da görüldü. Bu sonuçlar, dondurma öncesinde hücre canlılığını gösteren CCK-8 deneylerinden elde edilen absorbans değerleri (Şekil 20(b)) ile tam uyum içindedir. Nispeten yüksek canlılığa işarete eden en yüksek absorbans değerleri, PEVA lifleri ile modifiye edilmiş ve daha sonra yüzeyin arttırılmış ıslatılabilir özelliği ile ilişkili olan O_2 plazması ile muamele edilmiş LAPS yüzeylerinde gözlenmiştir (Şekil 20(b), "yüzey 4"). Nispeten düşük canlılığı gösteren en düşük absorbans değerleri hidrofobik polimer slaytta (“yüzey 1”) görülmüştür. Ancak, ıslanabilirliği oldukça düşük olmasına rağmen PEVA lifleri ile modifiye edilmiş LAPS yüzeyinde de ("yüzey 3") hücre canlılığının yüksek olduğu görülmüştür. Düşük ıslanabilirlik, PEVA liflerinin dahil edilmesinden dolayı artmış yüzey pürüzlülüğü ile ilişkili olabilir [26]. Dahası, elektrospun liflerin yüksek yüzey alanı, yapı ve adsorbe edilen unsurlar (örn., hücreler, proteinler) arasındaki etkileşimleri de arttırdığı için bu lifli yüzeylerin daha fazla adsorpsiyon kapasitesine sahip olma eğilimi vardır [76–78]. Her şeyden önce, polimerin kimyasal bileşimi, sertliği ve esnekliği gibi diğer birçok parametre de hücre davranışı için sinerjistik bir etkiye neden olabilir.

Dondurulmuş hücrelerin çözülmesinden hemen sonra, modifiye edilmemiş LAPS yüzeyinde kriyoprezervasyonu yapılmış çoğu hücre, parçalanmış bir zar ve dağılmış bir sitozol ile karakterize kriyo-yaralanma fenotipi gösterdi (Şekil 20(a), “yüzey 2”). Bu yüzeyde hücrelerin bütün bir tabaka olarak kısmi kayıpları da gözlenmiştir (bkz. Tez Ekleri, Bölüm 8.1 Araştırma Ekleri, Şekil 33). Bunun aksine, diğer yüzeylerde kriyoprezervasyonları yapılmış hücreler, çözüldüklerinde donmadan önce gösterdikleri ile aynı morfolojiyi sergilemiştir (Şekil 20(a)). Bu gözlemler ayrıca hücre canlılığı analiz edilerek de doğrulandı. En düşük hücre canlılığı modifiye edilmemiş LAPS yüzeyinde görülmüştür (Şekil 20(c), “yüzey 2”). Dikkat çekici bir şekilde, donmadan önce elastik polimer slayt üzerindeki hücrelerin en düşük canlılık oranına sahip olmasına rağmen (Şekil 20(b), “yüzey 1”), dondurmadan sonra bu yüzeylerde hücre canlılığının nispeten yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 20(c), “yüzey 1”). Tüm yüzeylerdeki absorbans değerleri dondurma işleminden öncesine göre kıyaslandığında, çözdürmeden hemen sonra düşmüştür. Bu genellikle donma

ve çözme işlemi sırasında yaşanan termal şok ve mekanik strese atfedilebilir. Bu yüzden, hücrelerin normal fonksiyonlarını geri kazanmaları için çözdürüldükten sonra 12 saat boyunca inkübasyonlar sağlandı. Bu çözülme sonrası hücre ölümü gibi hücre gidişatını gözlemlemek de önemlidir [79]. İnkübasyondan sonra en yüksek canlılık, PEVA lifleri ile modifiye edilmiş ve daha sonra O_2 plazması ile muamele edilmiş olan LAPS yüzeyinde gözlenmiştir (Şekil 20(d), “yüzey 4”).

Şekil 21, sensör-üstü kriyoprezervasyona yanıt olarak faklı yüzeylerdeki hücre geri kazanımını göstermektedir.



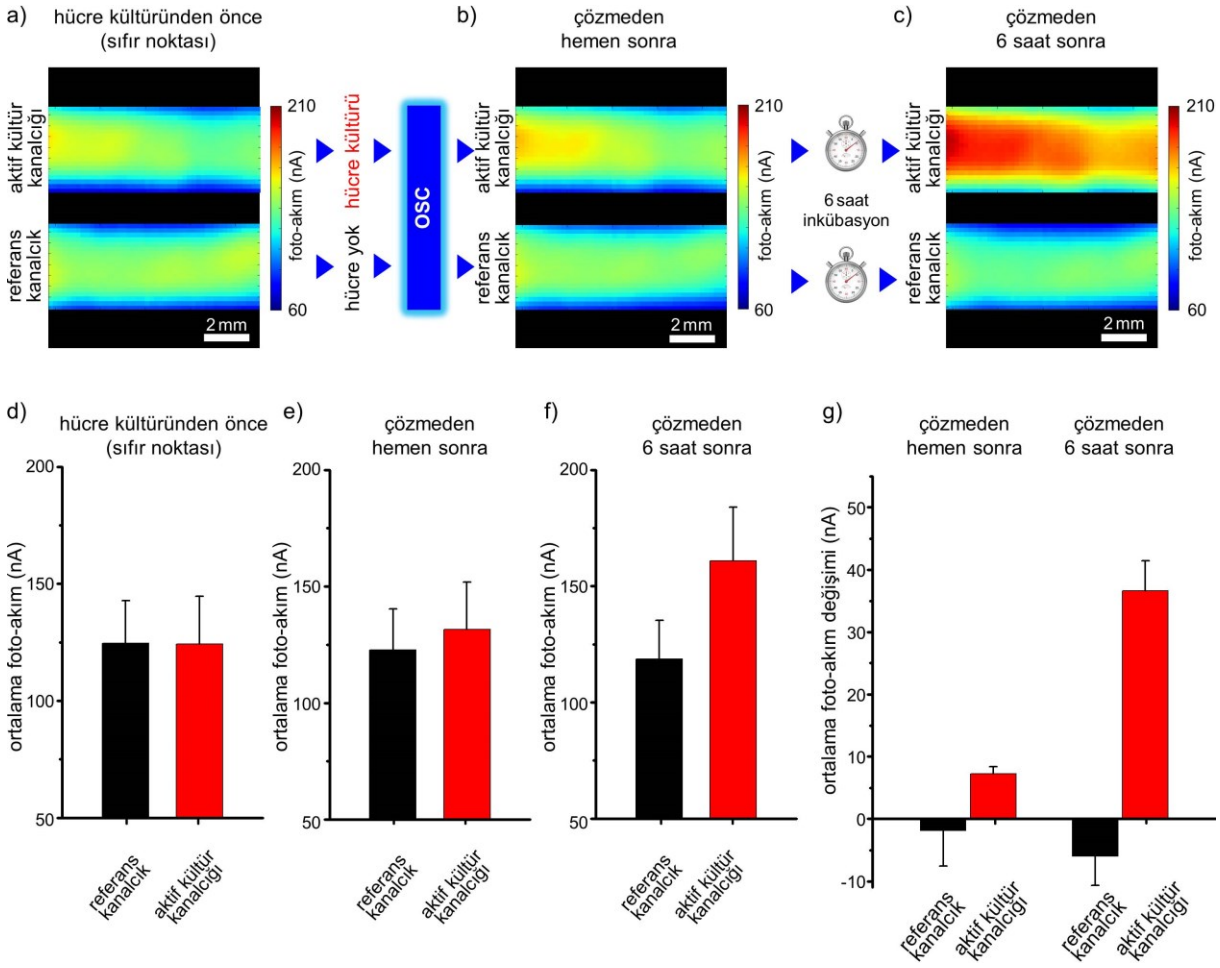
Şekil 21. Sensör-üstü kriyoprezervasyona (-80°C, gece boyunca) ilişkin çeşitli yüzeylerde hücre geri kazanımlarının karşılaştırılması. Notlar: Geri kazanım değerleri, dondurulmadan hemen önce ve çözdürme işleminden 12 saat sonra hücre canlılığına göre analiz edildi. #PT, O_2 plazma muamelesini (30 saniye boyunca) ifade etmektedir. *P< 0.01, **P< 0.001.

Dikkat çekici bir şekilde, slayt veya lif olarak elastik polimerler içeren yüzeyler daha iyi hücre geri kazanımı gösterdi. Örneğin, elastik polimer slayt üzerinde büyütülüp kriyo-prezerve edilmiş hücrelerde, hücre canlılığının diğer yüzeylere göre daha düşük olduğu görülmesine rağmen (Şekil 20(b), "yüzey 1"), bu yüzeyler

çözündürme işleminden 12 saat sonra en yüksek hücre geri kazanımını gösterdi (Şekil 21). Ek olarak, sensör yüzeyleri arasında en yüksek geri kazanım, elastik PEVA lifleri ile modifiye edilip daha sonra O_2 plazması ile muamele edilmiştir LAPS yüzeyinde görülmüştür.

4.10 Konseptin İspatı Deneyleri

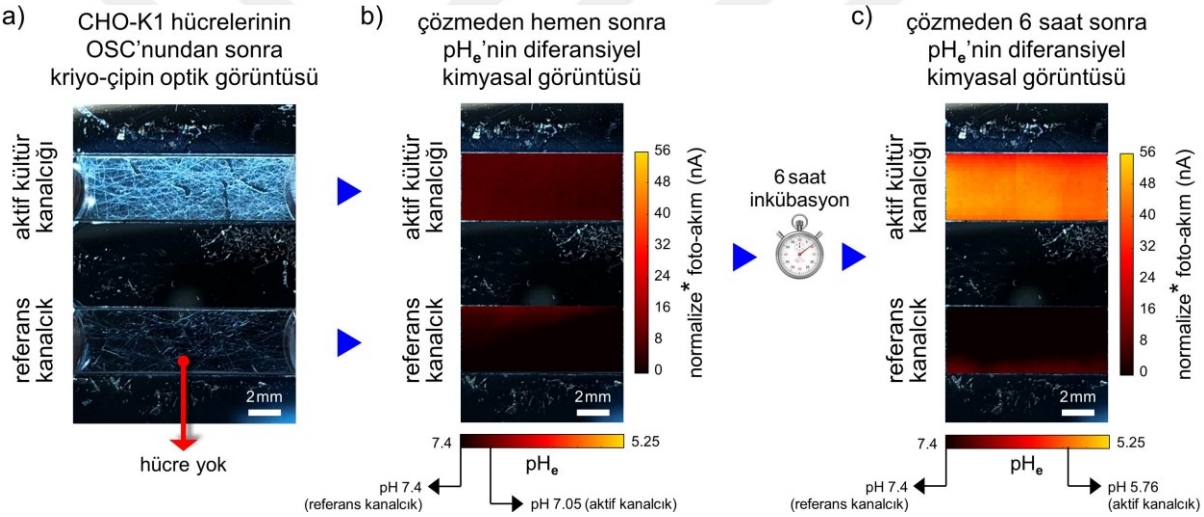
OSC stratejisi ve bir model sistem olarak adherent memeli hücreleri (CHO-K1) kullanılarak kriyo-çipin performansı, çözmeden sonra diferansiyel LAPS ölçümleri ile doğrulanmıştır. Şekil 22, kriyo-çip kullanılarak OSC 'den (-80ºC) sonra hücrelerin hücre dışı asitleşmesini görselleştirmek için üç kimyasal görüntüyü gösterir. Şekil 22(a), hücre kültürlenmeden önce ölçüm ortamı (pH 7.4) ile yapılan bir başlangıç (sıfır noktası) ölçümü sonucunda elde edilmiş foto-akım skalasına sahip kimyasal görüntüyü gösterir. Beklendiği gibi, her iki kanal da oldukça benzer foto-akım sinyalleri gösterir. Daha sonra CHO-K1 hücreleri sadece aktif kültür kanalı içinde kültürlendi ve OSC gece boyunca -80ºC'de gerçekleştirildi. Çözdürüldükten hemen sonra her iki kanal da taze ölçüm ortamı (pH 7.4) ile dolduruldu ve 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra ölçüm yapıldı. Kimyasal görüntü (Şekil 22(b)), referans kanalın aksine, aktif kültür kanalında foto-akım değerlerinin hafifçe arttığını gösterir, bu da sadece hücre dışı asitleşmeyi değil, aynı zamanda OSC'den sonra hücre geri kazanımını da gösterir. Aktif kültür kanalı içindeki foto-akım değerlerindeki artış, çözmeden 6 saat sonra daha da belirgindi (Şekil 22(c)). Bu değişiklikleri ayrıntılı olarak göstermek için, her bir kanalın ortalama foto-akım değerleri, hücre kültüründen önce (Şekil 22(d)), çözmeden hemen sonra (Şekil 22(e)) ve çözmeden 6 saat sonra (Şekil 22(f)) olacak şekilde bir grafik olarak verilmiştir. Her kanalın başlangıç (sıfır noktası) foto-akım değerleri ile karşılaştırıldığında, aktif kültür kanalındaki ortalama foto-akım değişikliği çözmeden hemen sonra 7.2 nA ± 1.1 nA ve çözmeden 6 saat sonra 36.6 nA ± 4.7 nA bulundu. Buna rağmen, referans kanalındaki ortalama foto-akım değişikliği çözmeden hemen sonra -1.8 nA ± 5.7 nA ve çözmeden 6 saat sonra -6 nA ± 4.7 nA olarak bulundu (Şekil 22(g)).



Şekil 22. İki-kanallı kriyo-çip kullanılarak CHO-K1 hücrelerinin sensör-üstü kriyoprezervasyonundan (OSC) sonra foto-akım değişiklikleri. Her kanala ilişkin kimyasal görüntü, **a)** hücre kültüründen önce (sıfır noktası), **b)** çözmeden hemen sonra ve **c)** çözmeden 6 saat sonra ölçülen foto-akım dağılımlarını temsil eder. **d)** Hücre kültüründen önce (sıfır noktası), **e)** çözmeden hemen sonra ve **f)** çözmeden 6 saat sonra, referans kanalı ile aktif kültür kanalı arasındaki ortalama foto-akımların karşılaştırılması. **g)** Çözüldükten hemen sonra ve çözüldükten 6 saat sonra her kanal için foto-akım değişikliklerinin karşılaştırılması. Elektro-eğirilmiş PEVA lifleri ile modifiye edilen ve ardından O_2 plazması ile muamele edilen kriyo-çip, hücrelerin yapışık bir durumda kriyoprezervasyonu (-80^{o}C, gece boyunca) için kullanıldı. Her kanal için aynı ölçüm ortamı (pH 7.4) kullanıldı. Foto akımdaki artış hücre dışı asitleşmeyi işaret etmektedir.

Referans kanalında hücre bulunmadığından, bu kanaldaki bu foto-akım değişiklikleri negatif sinyal sapmasını gösterir. Bu sapma değerleri oldukça küçük

olmasına rağmen, bu LAPS çipinin genel olarak sapma davranışını açıklar; bu durum aktif kültür kanalının sonuçlarını da etkilemektedir. Bu nedenle, aktif kültür kanalındaki hücre dışı asitleşmeyi doğru bir şekilde değerlendirmek için bu sapma davranışı kompanse edilmelidir. Bunu gerçekleştirmek için veri normalizasyonu ile diferansiyel kimyasal görüntüleme uygulanmıştır. Bu, her bir kanalın foto-akım değerlerinden (Şekil 22(b) veya Şekil 22(c)) ilgili kanalın başlangıç (sıfır noktası) değerlerinin (Şekil 22(a)) ve görülen sapma değerinin (Şekil 22(g), referans kanaldaki) çıkarılmasına dayanır (hesaplama formülü hakkında ayrıntılar için bkz. Bölüm 3.6.18 Sensör-Üstü Kriyoprezervasyon (OSC) Sonrası Hücre Dışı Asitleşmenin Diferansiyel Tespiti). Bu şekilde elde edilen hücre dışı asitleştirmenin diferansiyel kimyasal görüntüleri Şekil 23'de sunulmuştur.



Şekil 23. İki-kanallı kriyo-çip kullanılarak CHO-K1 hücrelerinin sensör-üstü kriyoprezervasyonu (OSC) sonrası hücre dışı asitleştirmenin diferansiyel kimyasal görüntüleri. **a)** OSC sonrası kriyo-çip kanallarının optik görüntüsü. Hücre dışı pH (PH_e)'in **b)** çözmeden hemen sonra ve **c)** çözmeden 6 saat sonra diferansiyel kimyasal görüntüleri. *Normalizasyon, her kimyasal görüntünün foto-akım değerlerinin başlangıç (sıfır noktası) değerlerinden çıkarılması ve karşılık gelen referans kanalında görülen sapma değerlerinin daha da çıkarılmasıyla gerçekleştirilmiştir (ayrıntılar için, Bölüm 3.6.18'e ve Bölüm 4.10'e bakınız). Hücre dışı pH (pH_e), foto-akım farkından ve LAPS çipinin pH duyarlılığından (26 nA/pH) hesaplandı. Foto-akımdaki artış hücre dışı asitleşmeyi işaret etmektedir.

OSC sonrası kriyo-çip kanallarının optik görüntüsü Şekil 23(a)'da gösterilmiştir. Bu optik görüntü, çözme işleminden hemen sonra (Şekil 23(b)) ve çözülmeden 6 saat sonra (Şekil 23(c)) pH_e 'nin diferansiyel kimyasal görüntülerine karşılık gelir. Aktif kültür kanalındaki normalize edilmiş foto-akımdaki ortalama artış, çözmeden hemen sonra 9.1 nA ± 1.1 nA (Şekil 23(b)) ve çözmeden 6 saat sonra 42.6 nA ± 4.7 nA (Şekil 23(c)) olarak bulundu. LAPS çipinin 26 nA/pH' lık bir pH duyarlılığı göz önüne alındığında, bu artışlardan anlaşılacağı üzere LAPS yüzeyinde çözmeden hemen sonra $\Delta pH \approx 0.35$ kadar bir değişime (asitleştirme), çözmeden 6 saat sonra ise $\Delta pH \approx 1.64$ kadar bir değişime (asitleştirme) olduğu bulunmuştur. Yukarıda belirtilen pH kaymaları, aktif kültür kanalı içindeki ortalama pH değerinin çözmeden hemen sonra pH 7.4'ten pH 7.05'e, çözmeden 6 saat sonra ise pH 7.4'ten pH 5.76'ya değiştiğini göstermektedir. Çözülme sonrası hücre canlılığını işaret eden bu hücre dışı asitleştirme, CCK-8 deneyi kullanılarak gözlemlenen önceki sonuçları da doğrulamaktadır (Şekil 20(c) ve (d), "yüzey 4").

5. TARTIŞMA

Elastik polimerlerin adherent hücre kriyoprezervasyonu üzerindeki olumlu etkileri daha önce literatürde tartışılmıştır [47–49]. Substratın lineer termal genleşme katsayısının (α_L), dondurma ve çözme işlemleri sırasında substrat ile temas halindeki hücre zarı arasında oluşan buzun ki ile eşleşmesi gerektiği varsayılmıştır. Aksi takdirde, iki tabaka arasındaki farklı uzunluk değişimleri uyuşmazlık stresinin bir kademeleşmesini oluşturabilir ve bu da muhtemelen çatlama, kabarma, burkulma ve parçalanma oluşumu ile bu tabakaların bu stresten kurtulup rahatlamasıyla sonuçlanabilmektedir [47,49]. Modifiye edilmemiş LAPS'ın kültür yüzeyi (bir transdüser) Ta_2O_5'ten oluşmaktadır. Bu katı Ta_2O_5' in termal genleşme katsayısı (α_L= $3.6x10^{-6}$/K) [80], buzun termal genleşme katsayısından (α_L= $55x10^{-6}$/K) [81] yaklaşık 15 kat daha düşüktür. Bu fark, modifiye edilmemiş LAPS numunelerinde gözlenen düşük hücre geri kazanımının (Şekil 21, "LAPS") yanı sıra yüzeyden hücre kopması ve hücrelerin bütün bir tabaka olarak kısmi kayıplarının nedeni de olabilir. Rijit cam yüzey üzerinde dondurulan Çin hamsteri fibroblast hücreleri için benzer gözlemler daha önce bildirilmiştir [47]. Bu nedenle, vinil asetat (VA) (ağırlıkça %40 oranında) komonomerine sahip PEVA kopolimeri bu çalışma için özellikle tercih edildi, çünkü daha yüksek vinil asetat konsantrasyonu daha büyük termal genleşme katsayısını (bir polimer film olarak yaklaşık α_L= $550x10^{-6}$/K) ve elastikiyeti garanti etmektedir [82]. Her ne kadar PEVA 'nın α_L'si buzunkinden yaklaşık 10 kat daha büyükse de, bu uyumsuzluk stresi, PEVA liflerinin esnekliğinin (Young 'ın esneklik modülü= yaklaşık 0.0034 GPa) [83] buzun esnekliğinden (Young'ın esneklik modülü= yaklaşık 9 GPa) [47] oldukça yüksek olması sayesinde bu liflerde elastik gerilim enerjisi olarak depolanabilir. Fakat polimerler soğutulduklarında esnekliğini camsı geçiş sıcaklığına (Tg) kadar koruyabilirler. Bu açıdan, kriyoprotektan bir ajan olarak %10 DMSO kullanıldığında, hücre dışı kompartımandaki buz çekirdeklime sıcaklığına (genellikle -6°C ile -9°C arasında) [84] bakıldığında PEVA polimeri oldukça düşük Tg' si (-20°C) [83] ile üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca, daha önce bildirildiği gibi, yüzeyler üzerindeki plazma uygulaması, hücrelerin fokal adezyon noktalarının yoğunluğunu arttırabilir [85], bu da hücre membranı ile temastaki substratı arasında zarar verici buz oluşumunu azaltabilir [86]. Bu sensör-üstü kriyoprezervasyonda, O_2 plazması ile

muamele edilmiş numunelerde gözlenen yüksek hücre geri kazanımının nedeni olabilir (Şekil 21, “LAPS + lifler + PT”).

Sunulan kriyo-çip sisteminin CCK-8 testine (1-4 saat) kıyasla analiz için gereken daha kısa inkübasyon süresi (burada 10 dakika) ile olağanüstü üstünlük sergilediğini de belirtmek gerekir. Laktat dehidrogenaz (LDH)- veya adenozin trifosfat (ATP)-temelli testler gibi bazı etiket-temelli yaklaşımlar, 10 dakikalık inkübasyondan sonra ölçüme izin verse de, bunlar çoğunlukla zaman-yoğun uygulama adımlarına sahip olma, hücrelerin analiz için bir lizis tamponu ile parçalanarak feda edilmesine dayalı bir son-nokta analizi olmaları ve potansiyel olarak incelenen hücresel sistemlere müdahale etmeleri [87] gibi bazı dezavantajlara sahiptirler. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma aynı zamanda bir hücre çözme işleminden hemen sonra adherent hücre aktivitesinin etiketsiz, kantitatif ve invaziv olmayan bir şekilde ölçülebildiğini gösteren ilk rapordur.

Ayrıca, sonuçlar, bir biyosensör yüzeyi üzerinde hücrelerin kriyoprezervasyonunun ve ek hücre kültürleme adımlarına (örn., hücrelerin santrifüjlenmesi, ekilmesi ve immobilizasyonu) gerek duyulmadan çözmeden hemen sonra sinyal analizinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bu tür kriyo-çiplerin (hücrelerle birlikte prezervasyonları yapılmış) büyük ölçekli ve standartlaştırılmış üretimi ve bunların son kullanıcıya soğuk zincirle taşınması pratik uygulanabilirliklerini destekleyebilir. Bu durum, onların, altyapısı veya hücre kültürü için deneyimli personeli bulunmayan merkezlerde bile kullanımına olanak sağlayarak bir kullanıma-hazır (*ready-to-use*) formata erişmelerini mümkün kılabilir. Bu aynı zamanda, bu alandaki ana zorluklardan biri olan hücre tabanlı biyosensörlerin ticarileşme potansiyelini de [44] arttırmaktadır. Ayrıca, mikroakışkan sistemlerin yıkamayı, dondurma-çözdürme döngülerini, kriyoprotektan çözeltisi değişimini ve otomasyonu hassas bicimde kontrol edebilecek olmasından dolayı [88], bu çalışmada elde edilen metot (OSC) ve araçlar (sensörleri içeren kriyo-çipler) gelecekte kriyoprezervasyon için yeni bir dönüm noktası olabilir. Bu nedenle, burada sunulan ve OSC stratejisi kullanan biyosensörün bu sistemlere entegrasyonu, bu hücre-temelli mikroakışkan sistemler için “yerinde kullanıma-hazır” (*ready-to-use on-site*) ve “hepsi bir arada” (*all-in-one*) çözümlerin elde edilmesine olanak sağlayabilir.

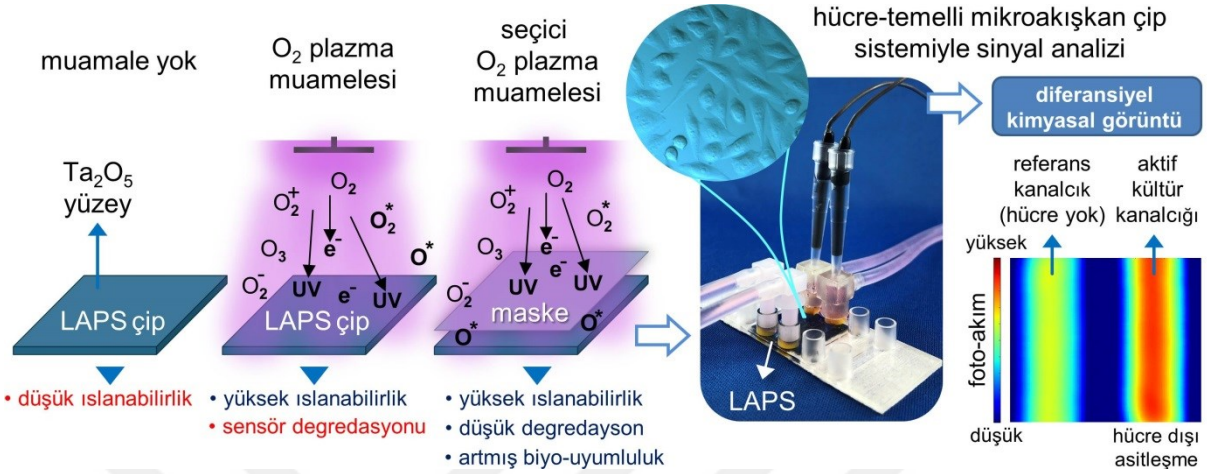
6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın genel amacı hücre-temelli elektrokimyasal biyosensörlerin "*ready-to-use on-site*" formatı sunabilmesini sağlamaktır. Bunu başarabilmek için yapılan çalışmalar birbiriyle bağlantılı olan su üç bölümden oluşmaktadır: 1) Sensör yüzeyinin biyo-işlevselliğini arttırmak için yapılacak O_2 plazma muamelesinin sensör (LAPS) davranışları ve yüzey ıslanabilirliği üzerine olan etkilerinin incelenmesi, 2) Uygulanacak plazma muamelesinin en iyi biyo-işlevselliğe olanak sağlayacak şekilde optimize edilmesi ve bu muamelenin olası yan etkilerinin bertaraf edilmesi, 3) Daha ileri yüzey mühendislikleriyle modifiye edilmiş sensörün (LAPS) bir mikroakışkan sisteme entegre edilmesiyle elde edilmiş bir kriyo-çip ve bunu kullanan yeni bir metot (sensör-üstü kriyoprezervasyon) geliştirilmesiyle hedeflenen kullanıma-hazır formata ulaşılması. Bu üç bölüm için sonuç ve önerilere aşağıda ayrı ayrı değinilmiştir.

İlk bölümde, LAPS yüzeyine 30 sn. süreyle yapılan plazma muamelesinin (30 W'da), süper-hidrofiliklik için bir eşik değeri olduğu bulunmuştur. 300°C'de 10 dakikalık bir ısıl tavlama işlemi, modifiye edilmiş yüzey ıslanabilirliği ve elektrokimyasal özelliği ile ilgili olarak LAPS özelliklerinin "sıfırlanmasına" yol açmıştır. Bu bulgular, LAPS yüzeyinin O_2 plazma muamelesiyle daha hidrofilik olması istendiğinde yararlı bir kılavuz sağlar. Ek olarak, bu bulgular, EIS (elektrolit - izolatör - yarı iletken) veya Ta_2O_5 yüzeyli ISFET (iyon-duyarlı alan-etkili-transistor) gibi diğer alan-etkili biyosensörlere uygulanabilir. Bunlar gelecekteki çalışmaların konusu olabilir.

İkinci bölümde, plazmadan yayılan yüksek enerjili ultraviyole fotonların (örneğin, VUV 'ların), plazma-kaynaklı sensör (LAPS) davranışının bozulmasında önemli bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Yüzeyin fotonlardan gölgelenmesine dayanan seçici bir plazma uygulama yöntemi, yüksek yüzey ıslanabilirliğini sağlamakla birlikte plazma kaynaklı sensör bozulmasını da en aza indirir. Biyo-fonksiyonalite analizleri ise, seçici olarak O_2 plazması (30 sn., 30 W) ile muamele edilen LAPS yüzeyinin, hücre yayılmasını ve çoğalmasını destekleyerek adherent CHO-K1 hücreleri için gelişmiş bir biyo-uyumluluk sergilediğini gösterdi. Tüm bu sonuçlarla ilgili grafiksel özet Şekil 24'de sunulmuştur. Bu, daha gerçekçi *in vitro* sonuçlar elde etmek için (örneğin, ilaç keşif deneyleri için) özellikle önemli olabilir. Gelecekteki araştırmalar, H^+ iyonlarına ek

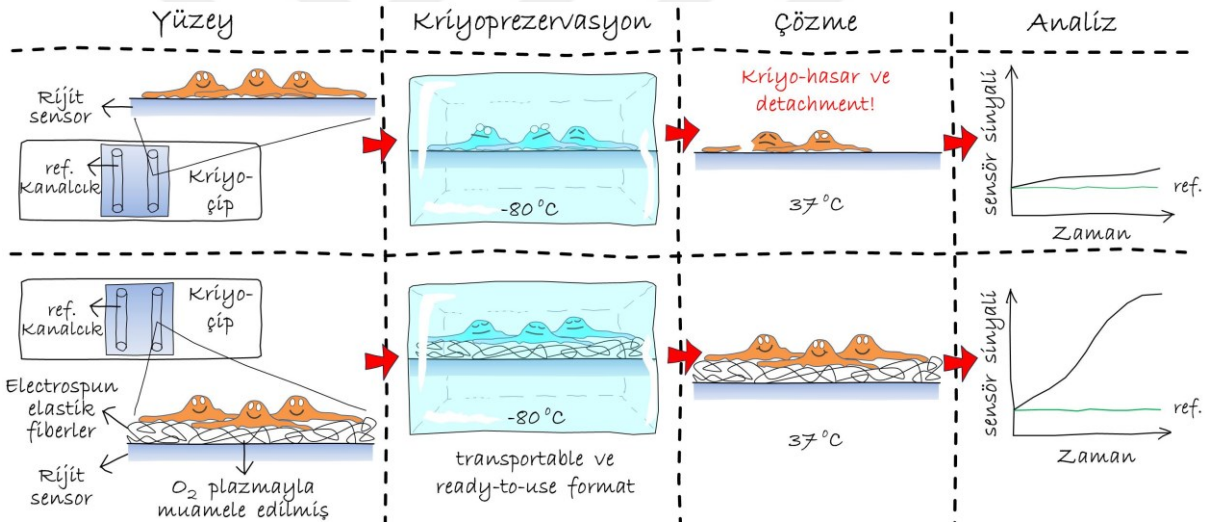
olarak aynı sensör çipinde çoklu olarak oksijen veya laktat gibi farklı biyo-moleküllerin de algılanması için LAPS yüzeyinde algılama patenlerinin oluşturulmasına odaklanmalıdır.



Şekil 24. Elde edilen O_2 plazmayla işlevselleştirilmiş hücre-temelli mikroakışkan çip sistemine dair grafiksel özet.

Son bölümde, plazma ile muamele edilmiş ve hibrit bir yapı (sert/elastik) kullanan yeni kriyo-çip sisteminin, sensör-üstü kriyoprezervasyon sırasında hücrelerin hayatta kalması için, modifiye edilmemiş LAPS yüzeyine kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. Sensör-üstü kriyoprezervasyondan sonra bu çip sisteminin uygulanması adına bir konseptin ispati deneyi yapıldı. Biyokimyasal görüntüler ve EA 'nın tespiti ile modifiye edilmiş sensör yüzeyi üzerinde kriyoprezervasyonları yapılmış hücrelerin hayatta kaldığı ve güvenilir sinyaller verdiği doğrulandı. Bu bulgular, ilk kez, adherent hücrelerin sensör üzerindeyken kriyoprezervasyonunun mümkün olduğunu göstermiştir. Böylece, bu tür kriyo-çip sistemleri, lab-on-a-chip cihazları için sensör-üstü kriyoprezervasyonu ve sinyal analizlerini mümkün hale getirmekte olup; “kullanıma-hazır”, aynı zamanda “ihtiyaç durumunda kullanım” konseptlerinin önünü açtığı da ortaya koyulmuştur. Tüm hücrelerle optimize haldeki sistemi üretim aşamasında standart halde hazırlamak ve bunları geleneksel soğuk-zincir taşımacılığı ile son kullanıcıya ulaştırabilmek, muhtemel “uygulamadan uygulamaya” ve “operatörden operatöre” farklılıkları ortadan kaldırarak daha fazla tekrar edilebilir sonuçların elde edilebilmesine neden olur. Tüm bu sonuçlarla ilgili grafiksel özet Şekil 25’de sunulmuştur. Kısa vadede, sensör-üstü kriyoprezervasyon konsepti laboratuvarda ve klinik alanlarda uygulama bulabilir. Yine de, bu kavramın tam

potansiyeli, kök hücreler, primer hücreler; hatta organoidler gibi organ-benzeri yapıları içeren diğer sınırlı hücre tipleri incelenerek de araştırılmalıdır. Daha da önemlisi, biyokimyasal sensörleri içeren bu kriyo-çipler, spermlerin, oositlerin yanı sıra gametlerin ve embriyoların kriyoprezervasyonuna ve aynı zamanda teşhisine izin vererek yardımcı üreme teknolojilerinin gereksinimlerini karşılama potansiyeli de bulunmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, halen, uzayda sıfır-/mikro-yerçekimi altında adherent hücrelerle yapılan deneyler, hücre-yüzey temasının kaybı ve manipülasyon zorlukları nedeniyle güçlükle gerçekleştirilebilmektedir. Gelecekte, bu tür kullanıma-hazır algılama platformlarının uzaya gönderilmesi, orada "ihtiyaç-halinde" dünya dışı deneylerin yapılmasını da mümkün hale getirebilir. Bu, hücre biyolojisinde dünya dışı etkileri (örn., kozmik radyasyon) incelemek için adherent hücrelerin mikro-çip seviyesinde gerçek-zamanlı izlenmesini kolaylaştırabilir.



Şekil 25. Sensör-üstü kriyoprezervasyon metodunu kullanan ve ileri yüzey mühendisliğiyle modifiye edilmiş bir biyosensörün entegre edildiği kriyo-çipin kullanıma-hazır format sunan çalışma mekanizmasına dair grafiksel özet.

7. KAYNAKLAR

[1] Mookerjee SA, Goncalves RLS, Gerencser AA, Nicholls DG, ve ark. The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 2015;1847(2):171–81.

[2] Agrawal A, Prakash YS. Obesity, Metabolic Syndrome, and Airway Disease. Immunol Allergy Clin North Am. 2014;34(4):785–96.

[3] Sullivan CR, Mielnik CA, Funk A, O'Donovan SM, ve ark. Measurement of lactate levels in postmortem brain, iPSCs, and animal models of schizophrenia. Sci Rep. 2019;9(1):5087.

[4] DeBerardinis RJ, Thompson CB. Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us? Cell. 2012;148(6):1132–44.

[5] Wu S, Wu S, Yi Z, Zeng F, ve ark. Hydrogel-based fluorescent dual pH and oxygen sensors loaded in 96-well plates for high-throughput cell metabolism studies. Sensors (Switzerland). 2018;18(2):564.

[6] Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, ve ark. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. Am J Physiol Physiol. 2007;292(1):C125–36.

[7] Wang D, Green MF, McDonnell E, Hirschey MD. Oxygen flux analysis to understand the biological function of sirtuins. In: Hirschey MD, editor. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 241–58.

[8] Thedinga E, Kob A, Holst H, Keuer A, ve ark. Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. Toxicol Appl Pharmacol. 2007;220(1):33–44.

[9] Lee C-S, Kim S, Kim M. Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing. Sensors. 2009;9(9):7111–31.

[10] Poghossian A, Schöning MJ. Silicon-based chemical and biological field-effect sensors. In: Encyclopedia of sensors Vol 10. 2006. p. 463–534.

[11] Yoshinobu T, Krause S, Miyamoto K, Werner CF, ve ark. (Bio-)chemical Sensing and Imaging by LAPS and SPIM. In: Schöning MJ, Poghossian A, editors. Label-Free Biosensing: Advanced Materials, Devices and Applications. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 103–32.

[12] Yoshinobu T, Iwasaki H, Ui Y, Furuichi K, ve ark. The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging. Methods. 2005;37(1):94–102.

[13] Schöning MJ, Wagner T, Wang C, Otto R, ve ark. Development of a handheld 16 channel pen-type LAPS for electrochemical sensing. Sensors Actuators B Chem. 2005;108(1–2):808–14.

[14] Wu F, Campos I, Zhang D-W, Krause S. Biological imaging using light-addressable potentiometric sensors and scanning photo-induced impedance microscopy. Proc R Soc A Math Phys Eng Sci. 2017;473(2201):20170130.

[15] Wagner T, Rao C, Kloock JP, Yoshinobu T, ve ark. “LAPS Card”—A novel chip card-based light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Sensors Actuators B Chem. 2006;118(1–2):33–40.

[16] Wagner T, Vornholt W, Werner CF, Yoshinobu T, ve ark. Light-addressable potentiometric sensor (LAPS) combined with magnetic beads for pharmaceutical screening. Phys Med. 2016;1:2–7.

[17] Yoshinobu T, Ecken H, Poghossian A, Simonis A, ve ark. Constant-Current-Mode LAPS (CLAPS) for the Detectionof Penicillin. Electroanalysis. 2001;13(8–9):733–6.

[18] Poghossian A, Yoshinobu T, Simonis A, Ecken H, ve ark. Penicillin detection by means of field-effect based sensors: EnFET, capacitive EIS sensor or LAPS? Sensors Actuators B Chem. 2001;78(1–3):237–42.

[19] Yoshinobu T, Miyamoto KI, Wagner T, Schöning MJ. Recent developments of chemical imaging sensor systems based on the principle of the light-addressable potentiometric sensor. Sens Actuators, B. 2015;207(PB):926–32.

[20] Özsoylu D, Kizildag S, Schöning MJ, Wagner T. Differential chemical imaging of extracellular acidification within microfluidic channels using a plasma-functionalized light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Phys Med. 2020;100030.

[21] Moritz W, Yoshinobu T, Finger F, Krause S, ve ark. High resolution LAPS using amorphous silicon as the semiconductor material. Sensors Actuators B Chem. 2004;103(1–2):436–41.

[22] Liang T, Gu C, Gan Y, Wu Q, ve ark. Microfluidic chip system integrated with light addressable potentiometric sensor (LAPS) for real-time extracellular acidification detection. Sens Actuators, B. 2019;301:127004.

[23] Weltin A, Slotwinski K, Kieninger J, Moser I, ve ark. Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: A transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. Lab Chip. 2014;14(1):138–46.

[24] Miyamoto KI, Sato T, Abe M, Wagner T, ve ark. Light-addressable potentiometric sensor as a sensing element in plug-based microfluidic devices. Micromachines. 2016;7(7):111.

[25] Özsoylu D, Kizildag S, Schöning MJ, Wagner T. Effect of Plasma Treatment on the Sensor Properties of a Light- Addressable Potentiometric Sensor (LAPS). Phys status solidi. 2019;216(20):1900259.

[26] Chen L, Yan C, Zheng Z. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. Mater Today. 2018;21(1):38–59.

[27] Balla VK, Banerjee S, Bose S, Bandyopadhyay A. Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures. Acta Biomater. 2010;6(6):2329–34.

[28] Wei X, Liu B, Liu G, Yang F, ve ark. Mesenchymal stem cell-loaded porous tantalum integrated with biomimetic 3D collagen-based scaffold to repair large osteochondral defects in goats. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):72.

[29] Ahmed M, Ramos TADS, Damanik F, Quang Le B, ve ark. A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis. Sci Rep. 2015;5(1):14804.

[30] Puliyalil H, Cvelbar U. Selective plasma etching of polymeric substrates for advanced applications. Nanomaterials. 2016;6(6):108.

[31] Shohet JL, Ren H, Nichols MT, Sinha H, ve ark. The effects of plasma exposure on low- k dielectric materials. In: Zhang Y, editor. Proc SPIE. 2012. p. 83280I.

[32] Szekeres A, Alexandrova S, Kirov K. The effect of O2 plasma on properties of the Si□SiO2 system. Phys Status Solidi. 1980;62(2):727–36.

[33] Lauer JL, Upadhyaya GS, Sinha H, Kruger JB, ve ark. Plasma and vacuum ultraviolet induced charging of SiO 2 and HfO 2 patterned structures. J Vac Sci Technol A Vacuum, Surfaces, Film. 2012;30(1):01A109.

[34] Hasumi M, Takenezawa J, Nagao T, Sameshima T. Characterization of Plasma-Irradiated SiO 2 /Si Interface Properties by Photoinduced-Carrier Microwave Absorption Method. Jpn J Appl Phys. 2011;50(3):03CA03.

[35] Gun J, Rizkov D, Lev O, Abouzar MH, ve ark. Oxygen plasma-treated gold nanoparticle-based field-effect devices as transducer structures for bio-chemical sensing. Microchim Acta. 2009;164(3–4):395–404.

[36] Li-Te Yin, Jung-Chuan Chou, Wen-Yaw Chung, Tai-Ping Sun, ve ark. Characteristics of silicon nitride after O/sub 2/ plasma surface treatment for pH-ISFET applications. IEEE Trans Biomed Eng. 2001;48(3):340–4.

[37] Arreola J, Keusgen M, Schöning MJ. Effect of O 2 plasma on properties of electrolyte-insulator-semiconductor structures. Phys status solidi. 2017;214(9):1700025.

[38] Chin C-H, Lu T-F, Wang J-C, Yang J-H, ve ark. Effects of CF 4 Plasma Treatment on pH and pNa Sensing Properties of Light-Addressable Potentiometric Sensor with a 2-nm-Thick Sensitive HfO 2 Layer Grown by Atomic Layer Deposition. Jpn J Appl Phys. 2011;50(4):04DL06.

[39] Yang J-H, Lu T-F, Wang J-C, Yang C-M, ve ark. LAPS with nanoscaled and highly polarized HfO2 by CF4 plasma for NH4+ detection. Sensors Actuators B Chem. 2013;180:71–6.

[40] Banerjee P, Kintzios S, Prabhakarpandian B. Biotoxin Detection Using Cell-

Based Sensors. Toxins (Basel). 2013;5(12):2366–83.

[41] Cheng MS, Lau SH, Chan KP, Toh C-S, ve ark. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. Biosens Bioelectron. 2015;70:74–80.

[42] Jiang D, Liu Y, Jiang H, Rao S, ve ark. A novel screen-printed mast cell-based electrochemical sensor for detecting spoilage bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones) in freshwater fish. Biosens Bioelectron. 2018;102:396–402.

[43] Park JS, Grijalva SI, Jung D, Li S, ve ark. Intracellular cardiomyocytes potential recording by planar electrode array and fibroblasts co-culturing on multi-modal CMOS chip. Biosens Bioelectron. 2019;144:111626.

[44] Ye Y, Guo H, Sun X. Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. Biosens Bioelectron. 2019;126:389–404.

[45] Gupta N, Renugopalakrishnan V, Liepmann D, Paulmurugan R, ve ark. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. Biosens Bioelectron. 2019;141:111435.

[46] Beier AFJ, Schulz JC, Dörr D, Katsen-Globa A, ve ark. Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. Cryobiology. 2011;63(3):175–85.

[47] Rutt T, Eskandari N, Zhurova M, Elliott JAW, ve ark. Thermal expansion of substrate may affect adhesion of Chinese hamster fibroblasts to surfaces during freezing. Cryobiology. 2019;86:134–9.

[48] Batnyam O, Suye S, Fujita S. Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature. RSC Adv. 2017;7(81):51264–71.

[49] Liu B, McGrath J. Freezing osteoblast cells attached to hydroxyapatite discs and glass coverslips: Mechanisms of damage. Sci China Ser E Technol Sci. 2007;50(2):248–56.

[50] Liverani L, Raffel N, Fattahi A, Preis A, ve ark. Electrospun patterned porous scaffolds for the support of ovarian follicles growth: a feasibility study. Sci Rep. 2019;

[51] Demir MM, Yilgor I, Yilgor E, Erman B. Electrospinning of polyurethane fibers. Polym (Guildf). 2002;43(11):3303–9.

[52] Schöning MJ, Brinkmann D, Rolka D, Demuth C, ve ark. CIP (cleaning-in-place) suitable “non-glass” pH sensor based on a Ta2O5-gate EIS structure. Sensors Actuators B Chem. 2005;111–112:423–9.

[53] Poghossian A, Mai D-T, Mourzina Y, Schöning MJ. Impedance effect of an ion-sensitive membrane: characterisation of an EMIS sensor by impedance spectroscopy, capacitance–voltage and constant–capacitance method.

Sensors Actuators B Chem. 2004;103(1–2):423–8.

[54] Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. J Biomed Mater Res. 1988;22(S13):145–58.

[55] Wu C-C, Wei C-K, Ho C-C, Ding S-J. Enhanced Hydrophilicity and Biocompatibility of Dental Zirconia Ceramics by Oxygen Plasma Treatment. Materials (Basel). 2015;8(2):684–99.

[56] Cimalla V. Label-Free Biosensors Based on III-Nitride Semiconductors. In: Schöning MJ, Poghossian A, editors. Label-Free Biosensing: Advanced Materials, Devices and Applications. Cham: Springer; 2018. p. 59–102.

[57] Donkov N, Zykova A, Safonov V, Mateev E. Modern methods of Ta 2O 5 coatings deposition for biomedical applications. Probl Atom Sci Tech. 2009;153–5.

[58] Prydatko A V., Belyaeva LA, Jiang L, Lima LMC, ve ark. Contact angle measurement of free-standing square-millimeter single-layer graphene. Nat Commun. 2018;9(1):4185.

[59] Subedi DP, Madhup DK, Sharma A, Joshi UM, ve ark. Retracted: Study of the wettability of ZnO nanofilms. Int Nano Lett. 2012;2(1):1.

[60] Sun R-D, Nakajima A, Fujishima A, Watanabe T, ve ark. Photoinduced Surface Wettability Conversion of ZnO and TiO 2 Thin Films. J Phys Chem B. 2001;105(10):1984–90.

[61] Fukazawa K, Nakao A, Maeda M, Ishihara K. Photoreactive Initiator for Surface-Initiated ATRP on Versatile Polymeric Substrates. ACS Appl Mater Interfaces. 2016;8(38):24994–8.

[62] Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. J Biomed Mater Res. 1998;41(3):422–30.

[63] Jeong J-T, Choi M-K, Sim Y, Lim J-T, ve ark. Effect of graphene oxide ratio on the cell adhesion and growth behavior on a graphene oxide-coated silicon substrate. Sci Rep. 2016;6(1):33835.

[64] Baek SM, Shin MH, Moon J, Jung HS, ve ark. Superior Pre-Osteoblast Cell Response of Etched Ultrafine-Grained Titanium with a Controlled Crystallographic Orientation. Sci Rep. 2017;7(1):44213.

[65] Pan T-M, Wang C-W, Chen C-Y. Structural Properties and Sensing Performance of CeYxOy Sensing Films for Electrolyte–Insulator–Semiconductor pH Sensors. Sci Rep. 2017;7(1):2945.

[66] Szekeres A, Alexandrova S, Kirov K. The effect of O2 plasma on properties of the Si□SiO2 system. Phys Status Solidi. 1980;62(2):727–36.

[67] Chen H, Feng G, Fan W, Han J, ve ark. Laser plasma-induced damage characteristics of Ta 2 O 5 films. Opt Mater Express. 2019;9(7):3132.

[68] Lü J, Huang K, Chen X, Zhu J, ve ark. Reversible wettability of nanostructured ZnO thin films by sol-gel method. Appl Surf Sci. 2010;256(14):4720–3.

[69] Lee J, Graves DB. Roles of plasma-generated vacuum-ultraviolet photons and oxygen radicals in damaging nanoporous low- k films . J Vac Sci Technol A Vacuum, Surfaces, Film. 2013;31(4):041302.

[70] Welden R, Scheja S, Schöning MJ, Wagner P, ve ark. Electrochemical Evaluation of Light-Addressable Electrodes Based on TiO2 for the Integration in Lab-on-Chip Systems. Phys Status Solidi A. 2018;215(15):1800150.

[71] Breuer L, Pilas J, Guthmann E, Schöning MJ, ve ark. Towards light-addressable flow control: Responsive hydrogels with incorporated graphene oxide as laser-driven actuator structures within microfluidic channels. Sens Actuators, B. 2019;288:579–85.

[72] McKenzie K, Maclean M, Grant MH, Ramakrishnan P, ve ark. The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. Microbiol (United Kingdom). 2016;162(9):1680–8.

[73] Porter K, Prescott D, Frye J. Changes in surface morphology of Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. J Cell Biol. 1973;57(3):815–36.

[74] Xu J, Bao X ke, Fu T, Lyu Y, ve ark. In vitro biocompatibility of a nanocrystalline β-Ta2O5 coating for orthopaedic implants. Ceram Int. 2018;44(5):4660–75.

[75] Horandghadim N, Khalil-Allafi J, Urgen M. Effect of Ta2O5 content on the osseointegration and cytotoxicity behaviors in hydroxyapatite-Ta2O5 coatings applied by EPD on superelastic NiTi alloys. Mater Sci Eng C. 2019;102:683–95.

[76] Leong MF, Chian KS, Mhaisalkar PS, Ong WF, ve ark. Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. J Biomed Mater Res Part A. 2009;89A(4):1040–8.

[77] Isık T, Horzum N, Yıldız ÜH, Liedberg B, ve ark. Utilization of Electrospun Polystyrene Membranes as a Preliminary Step for Rapid Diagnosis. Macromol Mater Eng. 2016;301(7):827–35.

[78] Isık T, Demir MM. Medical Waste Treatment via Waste Electrospinning of PS. Fibers Polym. 2018;19(4):767–74.

[79] Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation. Organogenesis. 2009;5(3):90–6.

[80] Tien C-L, Lee C-C, Chuang K-P, Jaing C-C. Simultaneous determination of the

thermal expansion coefficient and the elastic modulus of Ta 2 O 5 thin film using phase shifting interferometry. J Mod Opt. 2000;47(10):1681–91.

[81] Marchenko A. Thermo-mechanical loads of confined sea ice on structures. Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci. 2018;376(2129):20170341.

[82] González-Benito J, Castillo E, Cruz-Caldito JF. Determination of the linear coefficient of thermal expansion in polymer films at the nanoscale: influence of the composition of EVA copolymers and the molecular weight of PMMA. Phys Chem Chem Phys. 2015;17(28):18495–500.

[83] Wang K, Deng Q. The Thermal and Mechanical Properties of Poly(ethylene-co-vinyl acetate) Random Copolymers (PEVA) and its Covalently Crosslinked Analogues (cPEVA). Polymers (Basel). 2019;11(6):1055.

[84] Meneghel J, Kilbride P, Morris JG, Fonseca F. Physical events occurring during the cryopreservation of immortalized human T cells. Hinderberger D, editor. PLoS One. 2019;14(5):e0217304.

[85] Parizek M, Kasalkova N, Bacakova L, Slepicka P, ve ark. Improved Adhesion, Growth and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells on Polyethylene Grafted with Bioactive Molecules and Carbon Particles. Int J Mol Sci. 2009;10(10):4352–74.

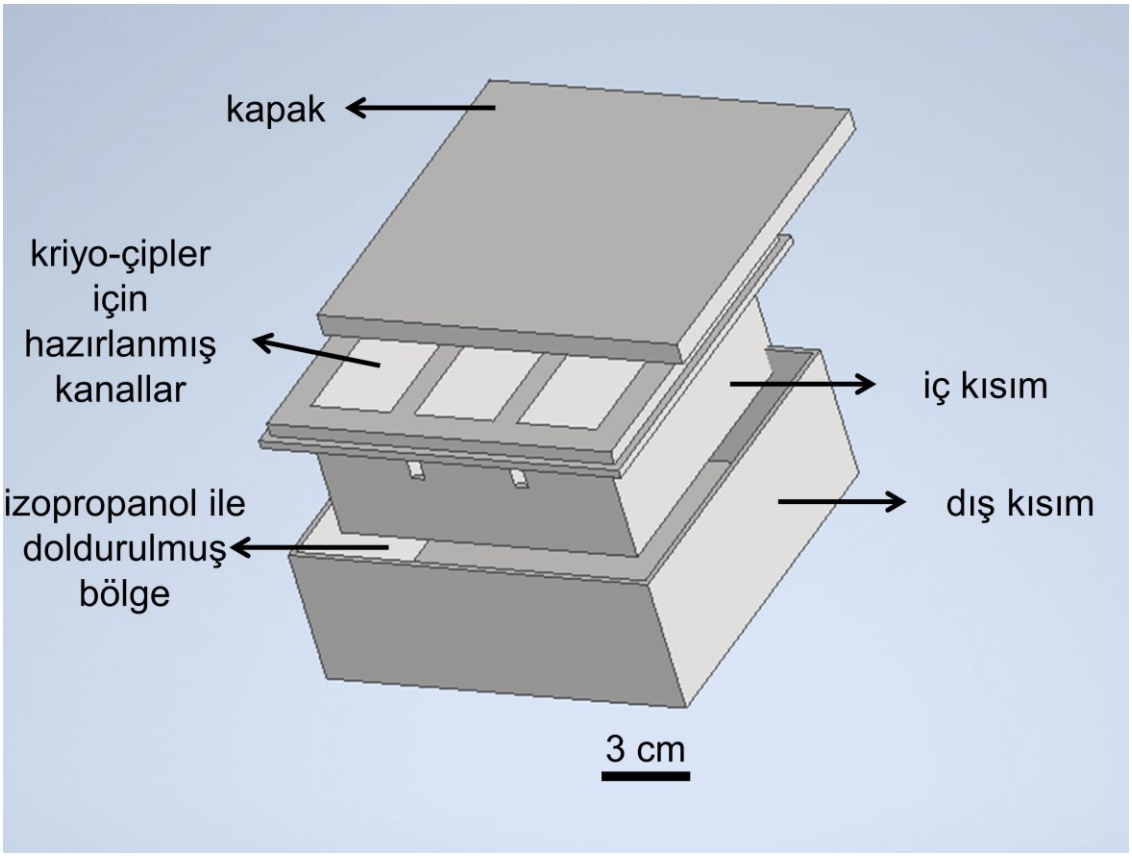
[86] Bissoyi A, Bit A, Singh BK, Singh AK, ve ark. Enhanced cryopreservation of MSCs in microfluidic bioreactor by regulated shear flow. Sci Rep. 2016;6(1):35416.

[87] Vetten MA, Tlotleng N, Tanner Rascher D, Skepu A, ve ark. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. Part Fibre Toxicol. 2013;10(1):50.

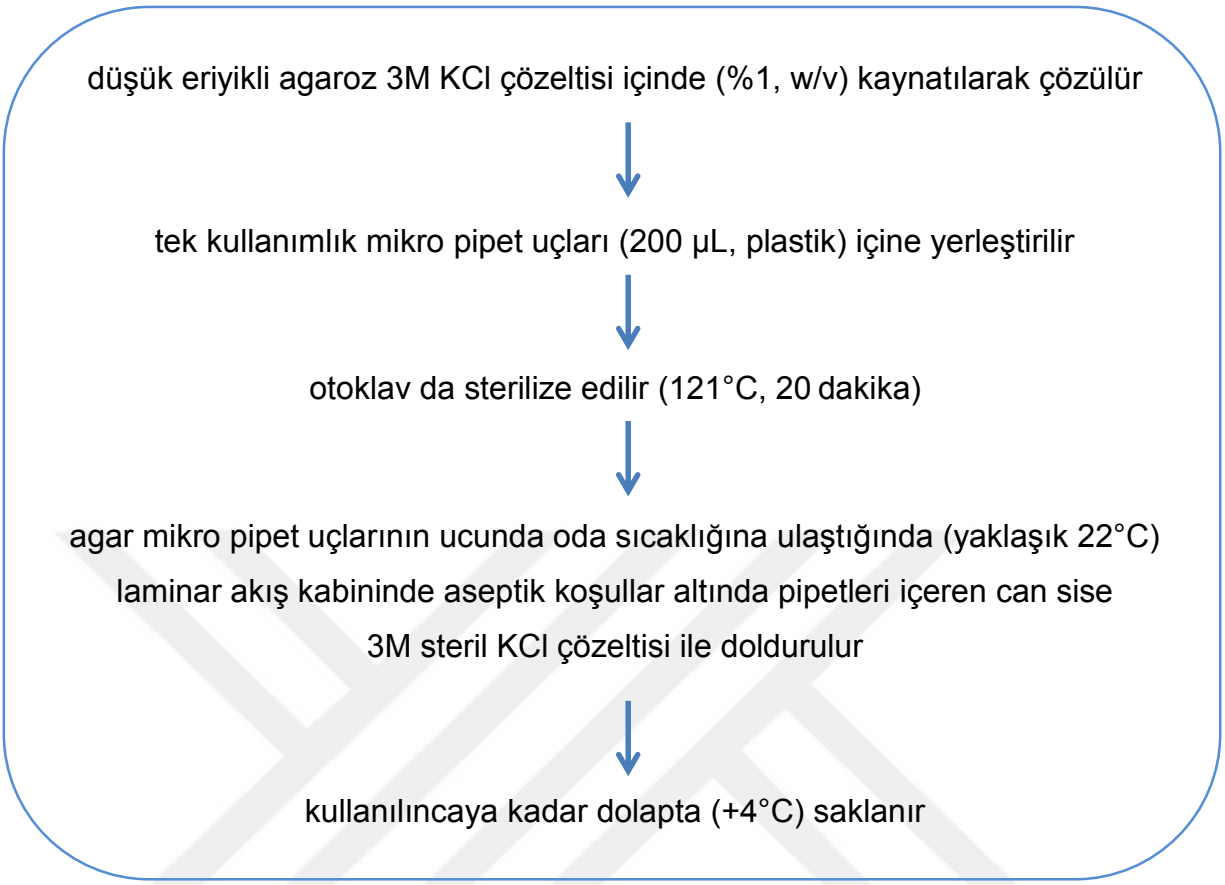
[88] Zhao G, Fu J. Microfluidics for cryopreservation. Biotechnol Adv. 2017;35(2):323–36.

8. EKLER

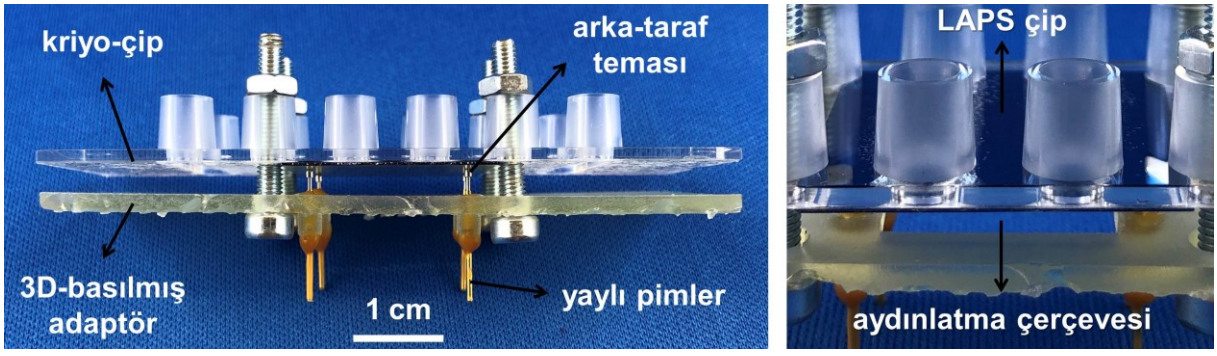
8.1 Araştırma Ekleri



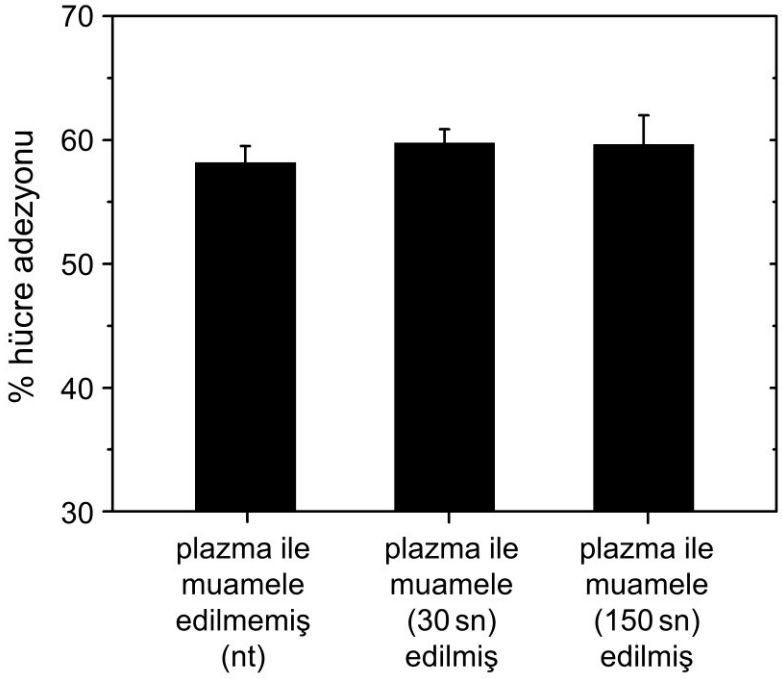
Şekil 26. Kriyo-çip için 3D baskılı dondurma kabı. İç kısım ile dış kısım arasındaki mesafe 1 cm'dir ve bu boşluk kullanılmadan önce izopropanol (%100) ile doldurulmuştur. Kanallar arasında 0.5 cm mesafe vardır ve iç kısım dış kısma yerleştirilip izopropanol ile doldurulduğunda bu boşluklar da izopropanol ile dolmaktadır. Kriyo-çip içine yerleştirildikten sonra her kanalın üzerine 0.5 cm kalınlığında bir izolatör keçesi yerleştirilir.



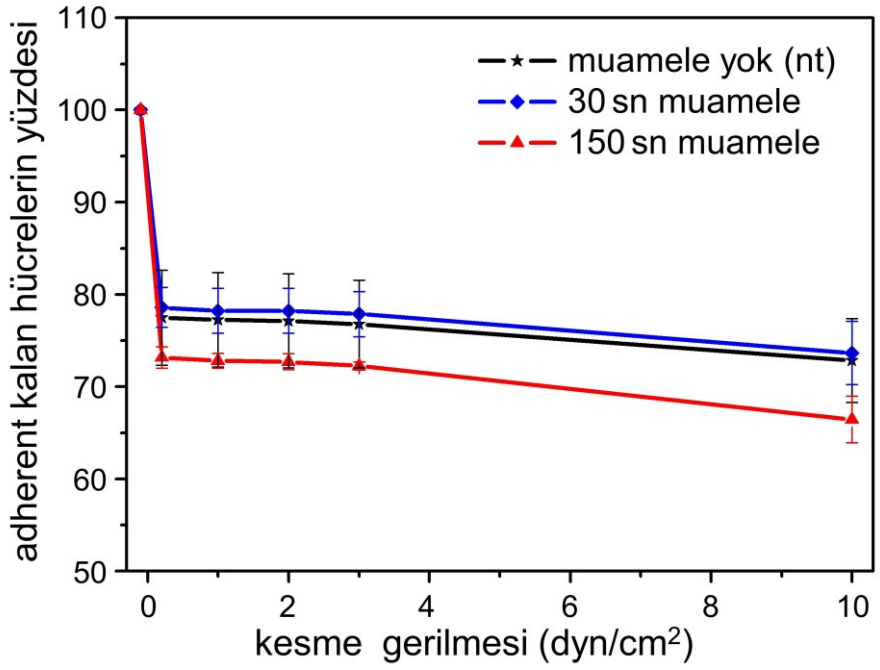
Şekil 27. Mikro-agar tuz köprüsünün hazırlanış adımları.



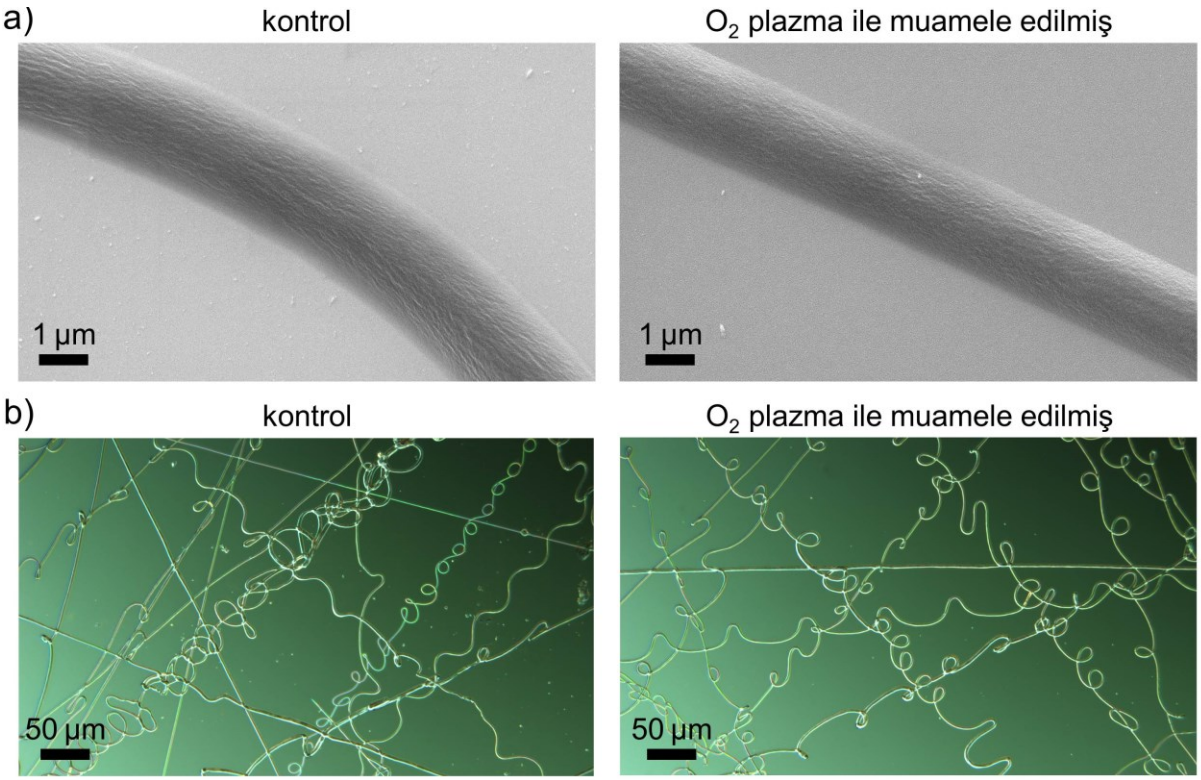
Şekil 28. Ohmik arka taraf bağlantısı için 3D baskılı adaptör. Aydınlatma çerçevesi, LAPS çipinin arka tarafından modüle edilmiş ışık aydınlatması için bir pencere sağlar.



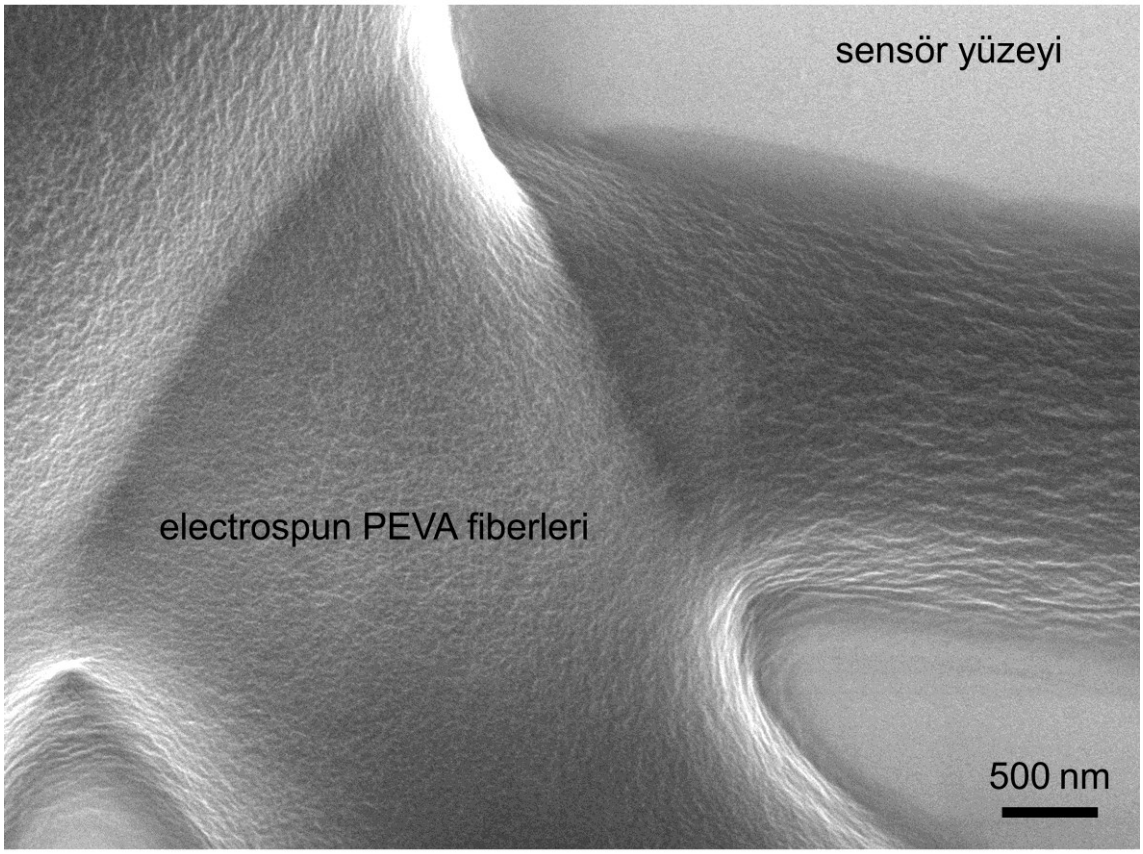
Şekil 29. Mikroakışkan kanalların içindeki LAPS yüzeyinde CHO-K1 hücre adezyonu. Not: "nt", plazma tedavisi sırasında maskelenen işlenmemiş yüzey anlamına gelir.



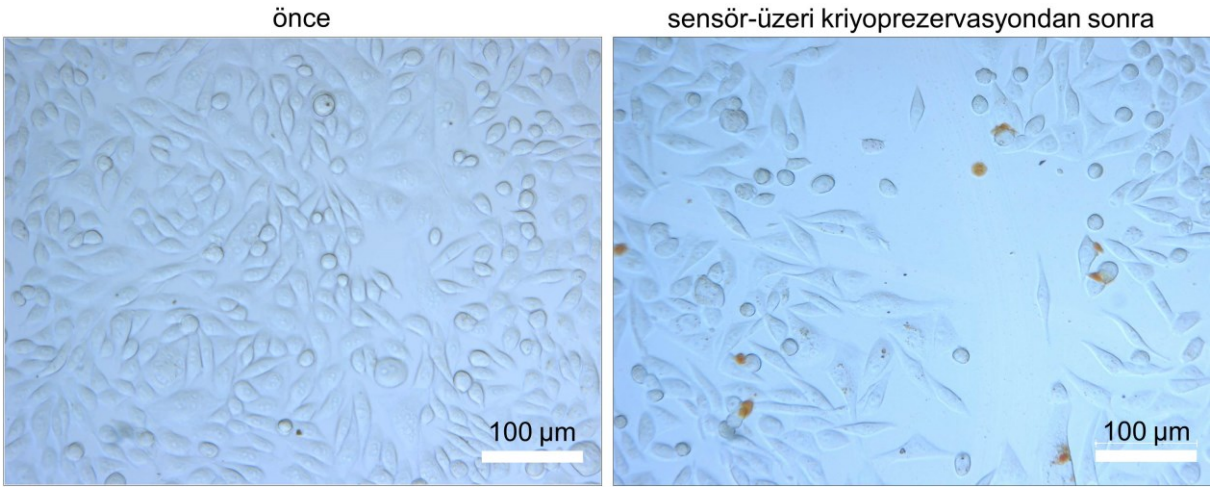
Şekil 30. Mikroakışkan kanalların içindeki LAPS yüzeyinden CHO-K1 hücre ayrılmaları (*detachment*). Not: "nt", plazma tedavisi sırasında maskelenen işlenmemiş yüzey anlamına gelir.



Şekil 31. Elektrospun PEVA liflerle modifiye edilmiş sensör (LAPS) yüzeyi. **a)** Plazma işleminden önce (solda) ve sonra (sağda) PEVA liflerinin bütünlüğünü gösteren SEM görüntüleri. **b)** Plazma tedavisinden önce (sonra) ve sonra (sağda) sensör yüzeyinde elektrospun PEVA ağının bütünlüğünü göstermek için daha düşük büyütmeli dijital mikroskoptan elde edilen görüntüler.

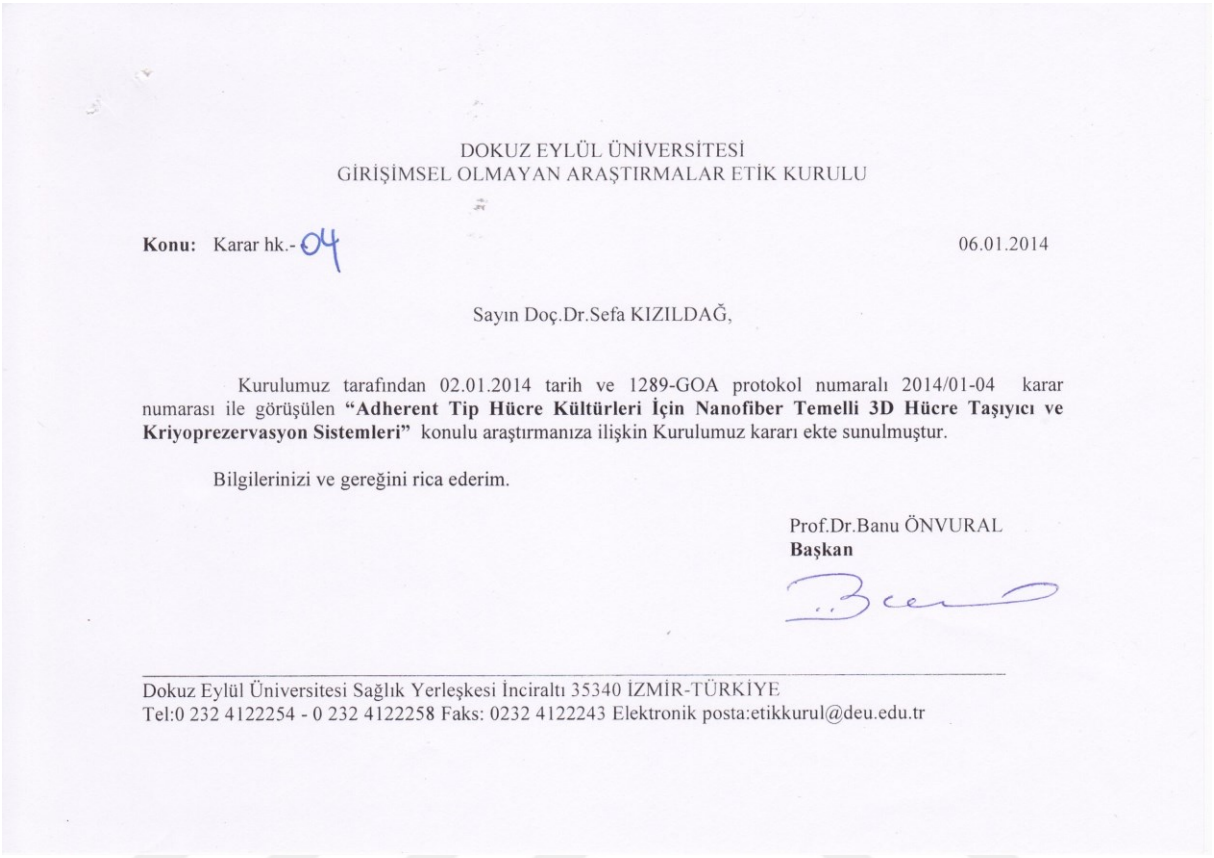


Şekil 32. Birbiriyle kaynaşmış elektro-eğirilmiş lifler. SEM görüntüsü, birleşim yerlerinde birbirleriyle iç içe gecen ve ayrıca sensör (LAPS) yüzeyinde erimiş ve düzleştirilmiş bir morfoloji oluşturan elektrospun PEVA liflerini göstermektedir.



Şekil 33. Modifiye edilmemiş LAPS yüzeyinde hücre kaybı. CHO-K1 hücrelerinin "önce" (solda) ve "sensör-üstü kriyoprezervasyondan sonra" (sağda) karşılaştırılması için mikroskobik görüntüler.

8.2 Etik Kurul



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 04 06.01.2014

Sayın Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ,

Kurulumuz tarafından 02.01.2014 tarih ve 1289-GOA protokol numaralı 2014/01-04 karar numarası ile görüşülen **"Adherent Tip Hücre Kültürleri İçin Nanofiber Temelli 3D Hücre Taşıyıcı ve Kriyoprezervasyon Sistemleri"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1289-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Adherent Tip Hücre Kültürleri İçin Nanofiber Temelli 3D Hücre Taşıyıcı ve Kriyoprezervasyon Sistemleri**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2014/01-04**	**Tarih: 02.01.2014**
	Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ'ın sorumlusu olduğu **"Adherent Tip Hücre Kültürleri İçin Nanofiber Temelli 3D Hücre Taşıyıcı ve Kriyoprezervasyon Sistemleri"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 612

01.07.2016

Sayın Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ,

Kurulumuz tarafından 30.06.2016 tarih ve 1289-GOA protokol numaralı 2016/18-25 karar numarası ile görüşülen **"Adherent Tip Hücre Kültürleri İçin Nanofiber Temelli 3D Hücre Taşıyıcı ve Kriyoprezervasyon Sistemleri"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1289-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Adherent Tip Hücre Kültürleri İçin Nanofiber Temelli 3D Hücre Taşıyıcı ve Kriyoprezervasyon Sistemleri**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	**Belge Adı**	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
	Araştırıcı Dilekçesi	21.06.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2016/18-25**	**Tarih:30.06.2016**
	Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ'ın sorumlusu olduğu **"Adherent Tip Hücre Kültürleri İçin Nanofiber Temelli 3D Hücre Taşıyıcı ve Kriyoprezervasyon Sistemleri"** isimli klinik araştırmaya ait 21.06.2016 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Çalışmaya yardımcı araştırmacı olarak Mustafa Muammer Demir'in katılması, -Hücre hatlarına hücre dondurma potansiyelleri önem ihtiva etmesinden dolayı kullanıma hazır halde satın alınacak insan mezenkimal kök hücre hatlarının dahil edilmesi, -Çalışma süresinin Ocak 2016'dan Ocak 2018'e uzatılması, ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılamadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılamadı
Prof.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☒	H ☐	*Katılmadı
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

* Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ çalışmada sorumlu araştırmacı olduğundan dosya görüşülürken toplantıda bulunmamıştır.

8.3 Özgeçmiş

DUA ÖZSOYLU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi	01/06/1986
İletişim Adresi	1776/9 Sok. No:59, Kat:1, Daire: 2, Mevlana Mah.
Telefon	1632061353
	(506) 833 00 14
E-posta	duaozsoylu@gmail.com
	oezsoylu@fh-aachen.de
Web Adresi	www.duaozsoylu.com

Öğrenim Bilgileri

10 Şubat 2014 - Şu Anda (6 yıl 5 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.55 / 4.0

16 Eylül 2009 - 17 Nisan 2013 (3 yıl 8 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: 966
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.18 / 4.0

09 Eylül 2003 - 12 Haziran 2009 (5 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR.
Diploma Numarası: 15007
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.13 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Ekim 2019 - Şu Anda (9 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, FH AACHEN UNİVERSİTY OF APPLİED SCİENCES

01 Haziran 2018 - 01 Eylül 2018 (4 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, FH AACHEN UNİVERSİTY OF APPLİED SCİENCES

01 Ocak 2014 - 01 Ağustos 2017 (3 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, DATEKS TEKNİK SİSTEMLER A.Ş

01 Haziran 2011 - 01 Ocak 2014 (2 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
DİĞER, HİTİT TIBBİ CİHAZLAR A.Ş

01 Ocak 2010 - 01 Ocak 2012 (2 yıl 1 ay) (Yarı Zamanlı)
DİĞER, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

01 Ocak 2007 - 01 Ocak 2009 (2 yıl 1 ay) (Yarı Zamanlı)
DİĞER, EGE ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyoteknoloji -- Biyosensör

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyoteknoloji -- Biyomateryal

Teknik Bilimler -- Kimya Mühendisliği ve Teknolojisi -- Kimyasal Teknolojiler -- Elektrokimyasal Teknolojiler

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Tıbbi Biyoloji

Teknik Bilimler -- Elektrik-Elektronik Mühendisliği -- Elektronik -- Nanoteknoloji

Teknik Bilimler -- Havacılık ve Uzay Mühendisliği -- Isıl Kontrol -- Kriyojenik teknoloji

Anahtar Kelimeler

Biyosensörler

Kriyobiyoloji

Çip Üstü Laboratuvar

Mikroakışkanlar

Mikroakışkan Çipler

Kriyojenik İşlem

Kriyojeller

Assay Geliştirme

Biyodeneyler

Mikrofabrikasyon

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

D. ÖZSOYLU, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Differential chemical imaging of extracellular acidification within microfluidic channels using a plasma-functionalized light-addressable potentiometric sensor (LAPS), Physics in Medicine, 2020, 2352-4510, 10, C, 100030.

D. ÖZSOYLU, T. ISIK, M. M. DEMİR, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, On-Sensor Cryopreservation of Adherent Cells in Lab-on-a-Chip Systems, ECS Meeting Abstracts, 2020, MA2020-01, MA2020-01, 27, 2022-2022.

D. OEZSOYLU, S. KİZİLDAG, M. J. SCHOENİNG & T. WAGNER, Effect of Plasma Treatment on the Sensor Properties of a Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS), PHYSICA STATUS SOLIDI A-APPLICATIONS AND MATERIALS SCIENCE, 2019, 1862-6300, 216, 20.

A. P. AKAY, G. C. KAYA, S. KOSE, C. E. YAZİCİOGLU, H. O. ERKURAN, S. A. GUNEY, K. OGUZ, D. KESKİN, B. BAYKARA, N. I. EMİROGLU, M. S. EREN, S. KİZİLDAG, T. ERTAY, D. OZSOYLU, S. MİRAL, H. DURAK, A. S. GONUL & L. A. ROHDE, Genetic imaging study with [Tc-(99m)] TRODAT-1 SPECT in adolescents with ADHD using OROS-methylphenidate, PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY, 2018, 0278-5846, 86, 294-300.

C. E. YAZİCİOGLU, V. KARATOSUN, S. KİZİLDAG, D. OZSOYLU & S. KAVUKCU, ACVR1 gene mutations in four Turkish patients diagnosed as fibrodysplasia ossificans progressiva, GENE, 2013, 0378-1119, 515, 2, 444-446.

Bildiriler

D. ÖZSOYLU, T. ISIK, M. M. DEMİR, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Surface modification of a light-addressable potentiometric sensor (LAPS) with electrospun PEVA fibre, Sözlü Sunum, 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces, 08 Temmuz 2019, 09 Temmuz 2019.

D. ÖZSOYLU, T. ISIK, M. M. DEMİR, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Surface modification of a light-addressable potentiometric sensor (LAPS) with electrospun PEVA fibre, Poster Sunumu, 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces, 08 Temmuz 2019, 09 Temmuz 2019.

D. ÖZSOYLU, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Visualising the effect of oxygen plasma treatment on a lightaddressable potentiometric sensor (LAPS), Sözlü Sunum, 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces, 08 Temmuz 2019, 09 Temmuz 2019.

D. ÖZSOYLU, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Visualising the effect of oxygen plasma treatment on a lightaddressable potentiometric sensor (LAPS), Poster Sunumu, 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces, 08 Temmuz 2019, 09 Temmuz 2019.

D. ÖZSOYLU, T. BRONDER, S. DANTİSM, H. IKEN, T. SCHHNİTZLER, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Cryopreservation of cells on the surface of light-addressable potentiometric sensors (LAPS), Poster Sunumu, INB Symposium , 12 Şubat 2018, 13 Şubat 2019.

D. ÖZSOYLU, T. BRONDER, S. DANTİSM, H. IKEN, T. SCHNİTZLER, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Cryopreservation of cells on electrolyte insulator semiconductor (EIS)-based sensors, Sözlü Sunum, 11th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces, 01 Temmuz 2018, 03 Temmuz 2018.

D. ÖZSOYLU, T. BRONDER, S. DANTİSM, H. IKEN, T. SCHNİTZLER, S. KIZILDAĞ, M. J. SCHÖNİNG & T. WAGNER, Cryopreservation of cells on electrolyte insulator semiconductor (EIS)-based sensors, Poster Sunumu, 11th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces, 01 Temmuz 2018, 03 Temmuz 2018.

O. YİĞİTTÜRK, F. TURGAY, H MAYİLOV, G. A. BALCI & D. ÖZSOYLU, The Effects Of Long-Time Underwater Rugby Training on Serum Paraoxonase 2 and Paraoxonase 3 enzyme and The Role of Paraoxonase 2 A148G And Paraoxonase 2 S311C Polymorphisms, Poster Sunumu, 15. International Sport Sciences and Congress, 15 Kasım 2017, 18 Kasım 2017.

A. AKAY, Ç. ERESEN YAZICIOĞLU, H. ÖZEK ERKURAN & D. ÖZSOYLU, Genetic Imaging Study Of Adolescents With Attention-Deficit/Hyperavtivity Disorder Using OrosMethylphenidate: Assessing The Dopamine Transporter Gene With [Tc-99m] Trodat-1 Spect, Sözlü Sunum, 27. Turkish Child and Adolescent Psychiatry Congress., 10 Mayıs 2017, 13 Mayıs 2017.

D. ÖZSOYLU, B. DEĞİRMENCİOĞLU, Ç. ERESEN YAZICIOĞLU & K. ALPTEKİN, Investigation of the Relationship Between Schizophrenia and KREMEN1 Gene, Poster Sunumu, 4th Schizophrenia International Research Society Conference, 05 Nisan 2014, 09 Nisan 2014, 0920-9964, 153, 1, S239 - S230.

B. DEĞİRMENCİOĞLU, D. ÖZSOYLU, C. GÜNES, Ç. ERESEN YAZICIOĞLU & K. ALPTEKİN, Relationship Of KREMEN1 Gene Variation with Symptomatology and Cognitive Functioning in Schizophrenia, Poster Sunumu, 4th Schizophrenia International Research Society Conference, 05 Nisan 2014, 09 Nisan 2014, 0920-9964, 153, 1, S121 - S121.

D. ÖZSOYLU, KLİNİK OLARAK FİBRODİSPLAZİ OSSİFİKANS PROGRESİVA TANİSİ KONULMUS SPORADİK ÜÇ OLGUDA ACVR1 GENİ MUTASYON ANALİZİ, Poster Sunumu, XII.ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ, 27 Ekim 2011, 27 Ekim 2011, 31, 6, S174 - S175.

D. ÖZSOYLU, IN VİTRO KOŞULLARDA KLONAL ÇOĞALTILAN TÜRKİYE?YE ÖZGÜ BAZI ENDEMİK TIBBİ BİTKİLERİN DOĞAYA YENİDEN KAZANDIRILMASI, Poster Sunumu, ÖZGÜN ÇÖZÜMLER PROJE PAZARI VE YARIŞMASI, 08 Aralık 2010, 08 Aralık 2010.

Projeler

BAP, ARAŞTIRMACI, DİKKAT EKSİKLİĞİ HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU TANISI İLE SAĞALTILAN ERGENLERDE İZLEM ÇALIŞMASI: GENETİK, KLİNİK GİDİŞ TEDAVİ VE TC-99M TRODAT BEYİN SPECT SONUÇLARI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Nisan 2008, 01 Ekim 2009.

ÜNİVERSİTE, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, ENDEMİK GEVEN (ASTRAGALUS PTİLODES BOİSS. VAR. PTİLODES) BİTKİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI, Yürütülen Kuruluş: EGE ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: ARAŞTIRMA BURS VE DESTEKLERİ MÜDÜRLÜĞÜ (Yurt İçi) , 01 Eylül 2008, 01 Haziran 2009.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, 3. 'lük Ödülü, Teknik Tekstiller Proje Pazarı Yarismasi, Ödül Alınan Kurum: SUN Grup, Dokuz Eylül Teknoloji Geliştirme Bölgesi - DEPARK ve Dokuz Eylül Teknoloji Transfer Ofisi - DETTO (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 15 Mayıs 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, iPro Teşvik Ödülü, 7. `İşte BU! Yenilikçi Girişimci Proje Yarışması?, Ödül Alınan Kurum: Boğaziçi Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 12 Aralık 2014.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, 1. 'lik Ödülü, 12. "Ne Üretelim?" Proje Yarışması , Ödül Alınan Kurum: KİMYA MÜHENDİSLİĞİ PR. (İNGİLİZCE), TÜRKİYE, 12 Eylül 2014.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, 3. 'lük Ödülü, 2. Inovasyon Ödülleri Yarismasi, Ödül Alınan Kurum: İzmir Genç İş Adamları Derneği (IGID) (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 18 Nisan 2014.

Yayılımlar

?BİTKİ TEMELLİ AŞI ÜRETİMİ? BİRİNCİLİK GETİRDİ, MEDYADA HABER, Ulusal, 13 Eylül 2014.

İşte BU Proje Yarışması Final Töreni?nde Ödüller Sahiplerini Buldu, MEDYADA HABER, Ulusal, 12 Aralık 2014.

?İşte Bu!? Yarışmasında Ödüller Sahiplerini Buldu, MEDYADA HABER, Ulusal, 28 Temmuz 2019.

Enstitümüz Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı öğrencisi Dua ÖZSOYLU Tebrik Mesajı, MEDYADA HABER, Ulusal, 14 Haziran 2017.

İcat Çıkardılar, Ödül Aldılar, MEDYADA HABER, Ulusal, 18 Nisan 2014.

Teknik tekstil projeleri pazara çıktı, MEDYADA HABER, Ulusal, 18 Mayıs 2017.

Genç mucitlerin ödül getiren çalışmalar, MEDYADA HABER, Ulusal, 15 Eylül 2014.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

DUA ÖZSOYLU, Yarışma Programları Müdürlüğü, 2238- Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması, 2. Aşamada Elendi, 2014 - 1.
DUA ÖZSOYLU, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı, 2008.
DUA ÖZSOYLU, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-D Sanayiye Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2016 - 1.
DUA ÖZSOYLU, Yarışma Programları Müdürlüğü, 2238- Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması, 1. Aşamada Elendi, 2014 - 1.
DUA ÖZSOYLU, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Türkiye'ye Döndü, 2017 - 2, 02.04.2018 - 02.04.2019.
DUA ÖZSOYLU, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-A Yurt Dışı Bilimsel Etkinliklere Katılma Desteği Programı, Destekleniyor, 2020 - 1, 26.05.2020 - 29.05.2020.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

8.4 Makaleler

Tez çalışmamızdan elde edilmiş ilgili makaleler sırasıyla hiçbir değişiklik yapılmadan ilerleyen sayfalarda tam sayfaya sığacak şekilde sunulmuştur. Bu araştırma makaleleri *Open Access* olup; aşağıdaki bağlantılara tıklanarak bunlara kolaylıkla ulaşılabilir:

- Effect of Plasma Treatment on the Sensor Properties of a Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS)
- Differential chemical imaging of extracellular acidification within microfluidic channels using a plasma-functionalized light-addressable potentiometric sensor (LAPS)
- On-Sensor Cryopreservation of Adherent Cells in Lab-on-a-Chip Systems

Ayrıca, bu tez çalışmasından elde edilmiş olup *Biosensors & Bioelectronics* dergisinde yayınlanmak üzere 21 Temmuz 2020 tarihinde başvurusu yapılmış "***On-sensor cryopreservation offers ready-to-use concept for cell-based lab-on-a-chip applications***" ismindeki makale hakemlerce inceleme aşamasında (***under review***) olup ilerleyen sayfalarda bu taslak makale de sunulmuştur.

Dua Özsoylu' nun uluslararası konferanslarda hem poster hem de sözlü sunum olarak sunduğu bilimsel katkılarına tezin en son kısmında yer verilmiştir.

physica status solidi pss a
www.pss-a.com

Effect of Plasma Treatment on the Sensor Properties of a Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS)

*Dua Özsoylu, Sefa Kizildag, Michael J. Schöning, and Torsten Wagner**

A light-addressable potentiometric sensor (LAPS) is a field-effect-based (bio-) chemical sensor, in which a desired sensing area on the sensor surface can be defined by illumination. Light addressability can be used to visualize the concentration and spatial distribution of the target molecules, e.g., H^+ ions. This unique feature has great potential for the label-free imaging of the metabolic activity of living organisms. The cultivation of those organisms needs specially tailored surface properties of the sensor. O_2 plasma treatment is an attractive and promising tool for rapid surface engineering. However, the potential impacts of the technique are carefully investigated for the sensors that suffer from plasma-induced damage. Herein, a LAPS with a Ta_2O_5 pH-sensitive surface is successfully patterned by plasma treatment, and its effects are investigated by contact angle and scanning LAPS measurements. The plasma duration of 30 s (30 W) is found to be the threshold value, where excessive wettability begins. Furthermore, this treatment approach causes moderate plasma-induced damage, which can be reduced by thermal annealing (10 min at 300 °C). These findings provide a useful guideline to support future studies, where the LAPS surface is desired to be more hydrophilic by O_2 plasma treatment.

1. Introduction

Potentiometric sensors based on a semiconductor-insulator field-effect structure play an important role in label-free (bio-)chemical sensing.[1] The light-addressable potentiometric sensor (LAPS) is an important subtype of this kind of sensors, which is able to detect the variations of the surface charge in a spatially resolved manner.[2] **Figure 1** provides an overview of the working principle of a pH-sensitive Ta_2O_5 LAPS. Depending on the concentration of the H^+ ions in the analyte solution, a surface potential is generated on the transducer, superimposed with the DC bias voltage applied between a reference electrode and the semiconductor. Therefore, this generates a space-charge region at the semiconductor/insulator interface. A modulated light source is used to create electron-hole pairs by illuminating a certain area of the LAPS structure. The local interaction of those electron-hole pairs with the space-charge region provides an externally detectable photocurrent. Local variations in the surface potential influence the amplitude of the photocurrent in the space-charge region. In this way, by changing the location of the light source, the generated photocurrent in the particular sensor area can be read out.[1–5]

Typical current versus voltage plots (I/V curves) can be obtained by sweeping the applied bias voltage and simultaneously illuminating an area of the semiconductor. As shown in Figure 1b, depending on the local analyte concentration in the solution, the I/V curve moves along the horizontal axis. When the photocurrent (e.g., at the inflection point of the slope) is defined as constant, the horizontal shift ΔV, which corresponds to the local change of the potential at this particular measurement area, can be calculated as a function of time (Figure 1c). More details regarding the measurement principle can be found elsewhere.[1,3,6]

The spatial scanning principle of the LAPS also has a great potential for chemical imaging applications, especially where biological substances such as animal cells or microorganisms are concerned. The metabolic activity of the cultured cells on the sensor surface can be detected by means of marker molecules such as H^+ ions at the interface between the sensor surface and the cells. This concept has an additional benefit in the biological imaging because this investigating area is usually not accessible to other methods, which provides a label-free concept.[3]

Nonthermal plasma treatment offers an attractive and promising tool for a rapid, low-cost, and environmental friendly surface engineering. It is increasingly used in sensor applications

D. Özsoylu, Prof. S. Kizildag
Medical Biology and Genetics
Graduate School of Health Sciences
Dokuz Eylül University
Balcova, 35340 Izmir, Turkey

D. Özsoylu, Prof. M. J. Schöning, Prof. T. Wagner
Institute of Nano- and Biotechnologies
Aachen University of Applied Sciences
Heinrich-Mußmann-Straße 1, 52428 Jülich, Germany
E-mail: torsten.wagner@fh-aachen.de

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under https://doi.org/10.1002/pssa.201900259.

© 2019 Aachen University of Applied Sciences. Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

The copyright line for this article was changed on 8 November 2019 after original online publication.

DOI: 10.1002/pssa.201900259

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

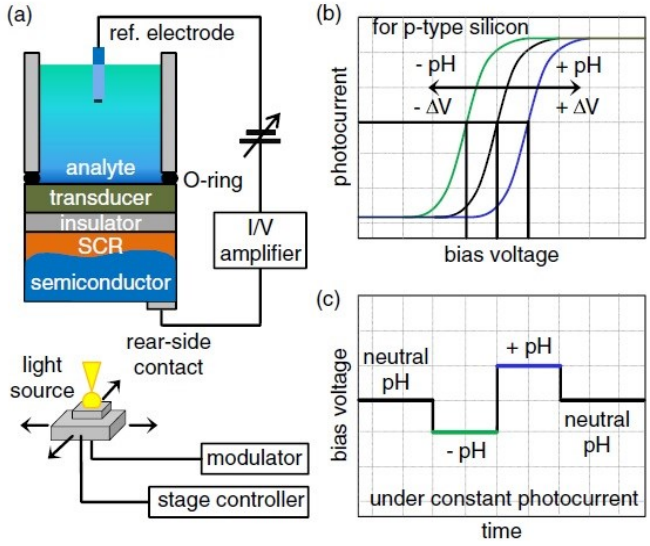


Figure 1. a) Schematic representation of the scanning LAPS measurement setup with a light-addressable potentiometric sensor (LAPS), electrical connection, and light source; SCR, space-charge region. b) Schematic *I/V* curves of the LAPS structure for different analyte concentrations. c) Schematic drawing of constant photocurrent mode measurement of the LAPS structure for different analyte concentrations; ref.: reference.

for surface activation, etching, decontamination, and deposition. For instance, oxygen (O_2) plasma was used successfully to remove organic capping agents from gold nanoparticles on a field-effect SiO_2 EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) sensor.[7] It was also found to be effective in surface functionalization to improve the immobilization of enzymes on SiO_2 EIS sensors.[7] In another study where a Si_3N_4 EIS sensor was used, O_2 plasma treatment was reported as a useful tool for both improving the enzyme immobilization and increasing the pH sensitivity.[8]

In addition, the plasma treatment is an excellent tool to improve bio-compatibility of surfaces by controlling the surface wettability.[9] It is well known that most animal cells tend to prefer rather hydrophilic surfaces but not superhydrophilic surfaces (contact angle below 5°) for growth, adhesion, and spread,[10–13] despite some exceptions.[14] A sufficient adsorption of proteins to the surface is crucial to mediate the adhesion of cells in cell culture medium. However, proteins are unable to adhere to superhydrophilic surfaces, due to strong repulsive solvation forces arising from strong hydrogen bonding between the water molecules and the surface, which has high surface hydration ability.[9,15]

Other influences of the plasma treatment should be carefully considered: an intensive plasma treatment for a long duration to obtain hydrophilic surfaces adversely influences the electrical properties and the sensing behavior of sensors.[16–19] During the plasma treatment, a plasma-induced damage occurs because of the ion bombardment, radical flux, or radiation emitted by the plasma. In particular, the radiation, e.g., vacuum ultraviolet photons (VUVs), can deeply penetrate the sensor and ionizes atoms of the semiconductor lattice and dielectric layer, resulting in imparities and hence a change of the electrical behavior of the sensor.[16–19] Because of all of these, characterization and optimization of plasma treatment play an important role in this field. However, the studies to date tended to focus on SiO_2 EIS sensors[7,8,19,20] rather than Ta_2O_5 LAPS. In a study that set out to improve the Na^+-ion sensitivity of a HfO_2 LAPS, the thermal (300 °C) carbon tetrafluoride (CF_4) plasma treatment was utilized.[21] In another study from the same group, this treatment was used again to increase ammonium (NH_4^+) ion sensitivity of a HfO_2 LAPS.[22] However, no previous studies investigated the effects of O_2 plasma treatment on Ta_2O_5 LAPS in terms of wettability for cell culturing and effect toward the signal properties.

In this study, the influence of O_2 plasma treatment and thermal annealing on Ta_2O_5 LAPS were investigated by means of contact angle- and scanning LAPS measurements. Furthermore, this article seeks to address the following questions: 1) What is the optimum O_2 plasma treatment duration for the LAPS that can provide high hydrophilic properties, but does not impact the sensor signal? 2) Is there a correlation between the measurement signal and the wettability alterations when the sensor is incubated in cell culture medium? 3) Is there an optimum condition for the plasma treatment, which emphasizes the incubation of cell culture medium and having no negative impact on the sensor characteristics?

2. Experimental Section

2.1. Fabrication of the LAPS Chip

The LAPS consisted of a p-doped silicon wafer (400 µm, <100>, 5–10 Ωcm) and a 30 nm thick SiO_2 layer prepared by thermal dry oxidation. Electron-beam evaporation technique was utilized to deposit an additional layer of 30 nm tantalum on top of the SiO_2 layer. After a thermal oxidation step (520 °C, 120 min), a 60 nm thick Ta_2O_5 layer was achieved. To create an ohmic rear-side contact, the SiO_2 layer on the backside of the silicon wafer was removed by hydrofluoric acid (HF), and an aluminum layer with a thickness of 300 nm was deposited by electron-beam evaporation. The annealing (10 min, 400 °C in N_2 atmosphere) was carried out to improve the connection between the aluminum and the silicon wafer. The wafer was diced into single chips with the size of 20 × 20 mm^2. The rear-side contact was partially detached by an HF etching step to create an illumination window (15 × 15 mm^2) to enable illumination from the light source.

2.2. Contact Angle Measurements

Water contact angle measurements were carried out by a sessile drop technique (static) using an optical contact angle measuring device (DataPhysics Instruments GmbH, Germany). The measurement involved adding 5 µl of de-ionized water drops in a minimum of three randomly selected spots across the sensor surfaces. Images were acquired 10 s after drop impact, and contact angles were calculated by using the software module (SCA 20) of the device. The controlled environment temperature was 22 °C, and the relative humidity was 58%–60%. Three LAPS chips were used for each experimental group. Hydrophobic recovery experiments consisted of five different parameter

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

settings (15 chips), whereas annealing experiments consisted of treated (3 chips) and control samples (3 chips). Before the measurements, the samples were rinsed with de-ionized water and dried with nitrogen. After the last culture medium incubation step in the experiments about hydrophobic recovery, the samples were in addition cleaned in an ultrasonic bath using consecutively acetone, isopropanol, ethanol, and de-ionized water for 3 min.

2.3. Plasma Treatment

To see the effects of plasma treatment on wettability and hydrophobic recovery, the LAPS chips ($n = 21$) were subjected to O_2 plasma treatment using a low-pressure plasma system from Diener Plasma Surface Technology (model Femto) that was coupled to a radio frequency (RF) generator operating at 40 kHz. O_2 gas was injected into the reaction chamber at a controlled pressure of 0.2 mbar and at an excitation power of 30 W, a total gas flow rate of 10 sccm, and plasma exposure durations of 30, 60, 90, and 120 s, respectively. The control samples were masked using a silicon-free adhesive plastic film (model 1007R-6.0, Ultron Systems, Inc., USA) and an aluminum foil on top of it during the plasma treatment (30 s). For scanning LAPS measurements, the right side of the sensor surface was masked during the plasma treatment (30 s).

2.4. Scanning LAPS Measurement Setup

The scanning LAPS measurement setup used in this study was described in detail in our previous reports.[1,6,23,24] The schematic diagram of the setup is shown in Figure 1a. In brief, the LAPS chip as described in Section 2.1 was assembled in a measurement cell. An Ag/AgCl electrode with 3 M KCl was used as a reference electrode, which was dipped into the electrolyte solution in the measurement chamber. A movable light-intensity modulated laser (QL78F6S-A from QSI) with a wavelength of 780 nm and a focus point of about 70 µm in diameter was utilized as a light source in the LAPS setup to generate the responsive photocurrent. The motion of the modulated laser in a raster-like manner was precisely controlled by a step motor (GMN, Germany) with stage controller that enables illuminating a certain defined area of the semiconductor.

For the measurement of I/V curves, a bias voltage ranging from −0.8 to +2 V was applied between the reference electrode and the rear-side contact. The I/V curves were recorded in a scanning manner at 48 different points (24 points on the left side [plasma treatment], 24 points on the right side [reference] of the LAPS) and an average was calculated for the left and right sides separately. This I/V measurement procedure was repeated every 10 min to calculate the corresponding bias voltage at a constant photocurrent of 250 nA. The constant photocurrent measurement graphs were obtained from these data. Titrisol buffer solutions (Titrisol, Merck, Germany) in pH range of 6 to 8 were used as measurement solutions. For incubations and measurements with cell culture medium, a modified Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM/Ham's F-12, 2:1 mixture, pH 7, without sodium bicarbonate) was prepared with standard culture medium components such as glucose, glutamine, vitamins, and 5% fetal calf serum (FCS). The chemical images were recorded at a constant bias voltage of 0.5 V that was selected from the middle of depletion range of I/V curve by using either the Titrisol buffer solution (pH 7) or the cell culture medium (pH 7) for incubated samples. The step width of the motors was set to 0.1 mm, and an area of $14 \times 14\,mm^2$ was scanned, creating a measurement area of 141×141 measurement spots. The whole measurements were controlled by customized LabVIEW software.

2.5. Annealing

A hot plate was used to produce an annealing effect on the LAPS at 300 °C for 10 min. The LAPS was removed from the measurement chamber during the annealing to protect the plastic parts of the chamber. The position of the sensor was marked carefully to reassemble it to the correct location after the annealing.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of Plasma Treatment on Wettability and Hydrophobic Recovery

Liquid wettability indicates hydrophilicity (lower contact angle) and hydrophobicity (higher contact angle) properties of the surfaces. **Figure 2** shows the wettability of plasma-modified Ta_2O_5 surfaces investigated with measurements of the contact angle before and after O_2 plasma treatment. Overall, the average contact angles of all groups of samples were equal to 62.4° ± 0.5°,

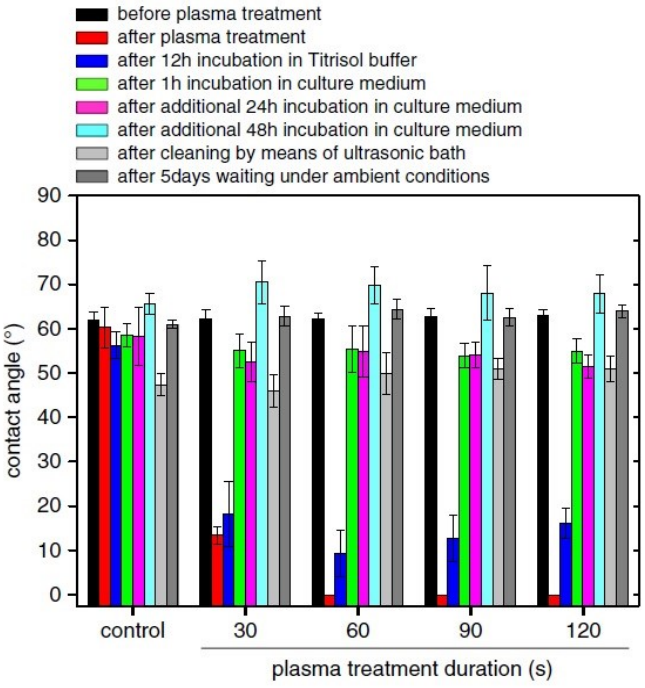


Figure 2. Investigation of hydrophilicity alterations and hydrophobic recovery by water contact angles for the series of O_2 plasma treatment durations on a Ta_2O_5 LAPS; the control corresponds to the sample masked during a plasma treatment for 30 s.

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

with the given standard deviation margins, before plasma treatment. The hydrophilicity significantly increased for all plasma-treated surfaces except for the control samples, which were, as described, masked during the plasma treatment. This shows that the technique used for masking was effective. For 60–120 s of plasma durations, no contact angle could be recorded because of the extremely high wettability after the treatments. This is indicated in the diagram by the values of "zero" for the respective red bars. On the other hand, for 30 s of plasma duration, the contact angle was reduced to $13.4° \pm 2.0°$ after the treatment.

In addition, after 12 h incubation with Titrisol buffer (pH 7), the samples became more hydrophobic again, except the control samples. For 60–120 s of plasma durations, the contact angle rose to an average of $12.7° \pm 3.7°$, while the contact angle of the sample treated for 30 s rose from $13.4° \pm 2.0°$ to $18.2° \pm 7.3°$. However, the most increase in the contact angle for all plasma durations was seen after the culture medium incubation for 1 h, where the contact angles of all treated surfaces reached an almost equal value of $54.8° \pm 0.7°$ on average and became closer to contact angles of the control samples incubated with the same protocol ($58.5° \pm 2.6°$). This strong wettability decay can be attributed to the adsorption of medium-borne ingredients such as FCS proteins and inorganic matters inside the cell culture medium.[25–27]

An additional medium incubation for 24 h did not lead to any significant changes in the contact angles; however, additional 48 h incubation significantly increased the contact angles in all experimental groups, including the control samples as well. This is probably due to the biological contamination because the incubations were not conducted under sterile environments and some colony traces of microorganisms were seen on the surfaces after additional 48 h of incubation. After the last culture medium incubation step, the samples were cleaned in an ultrasonic bath to remove all surface contaminants. As can be seen in Figure 2, the contact angles in all experimental groups, including the control samples, significantly decreased to $49.0° \pm 2.2°$ on average after the cleaning. This cleaning step emphasizes further that the increase in the contact angles was due to the contaminants, as discussed above. In addition, the average contact angle value, $49.0° \pm 2.2°$ was in complete compliance with the contact angle of clean, bare Ta_2O_5 surfaces given in literature.[28] This also proves that the cleaning process was carried out appropriately.

Furthermore, the contact angles for all experimental samples significantly increased from $49.0° \pm 2.2°$ to $62.9° \pm 1.3°$ after waiting for 5 days under room temperature conditions and became equal to their initial values of $62.4° \pm 0.5°$ on average. Such wettability decays are known to be caused by the adsorption of hydrocarbons from the air, minimizing the free surface energy, compared to a recently cleaned surface.[29] Moreover, although they were subjected to in-depth cleaning with an ultrasonic bath, the surfaces did not fully regain their hydrophilicity properties compared to the plasma treatments. This indicates that additional mechanisms are also responsible for the decrease in the surface wettability and surface-free energy with time.

Plasma treatment can generate defective sites like surface-trapped electrons as it was reported for metal oxides.[30,31] These defective sites, which are favorable for hydroxyl adsorption, cause an increase in the surface hydrophilicity. However, after the adsorption of hydroxyl radicals from the medium or air, the surface becomes energetically unstable. This unstable surface gradually loses its hydrophilicity as the previously adsorbed hydroxyl group is replaced gradually by oxygen atoms. This may be the cause of wettability conversion, and this phenomenon can be called "hydrophobic recovery" after plasma treatment on metal oxide.

As described previously (see Section 1), for cell culturing hydrophilic but not superhydrophilic surfaces would be ideal. Because of this, a plasma treatment duration of 30 s was found to be the most ideal. Therefore, this procedure was used for further experiments in this study.

3.2. Influence of Plasma Treatment on Characteristics of the LAPS

Figure 3 shows *I/V* curves before and after plasma treatment. The sensor responses toward varying pH buffer solutions, the effect of plasma treatment, and the response to culture medium are schematically shown in **Figure 4**. The measurements for both control and treatment groups were performed at the same time using only one sensor due to spatial resolution ability of the LAPS. First, an average voltage difference of 16 mV was found between the left side (L, treated) and right side (R, control) of the sensor. The plasma treatment (30 s) was applied after 11 h and 15 min sensor operation. After the treatment, the treated side of the sensor showed an average increase of about 250 mV in the sensor signal although the masked side showed an average increase of about 17 mV. The sensor signal from the masked side of the sensor exhibited a high reproducibility, quite low hysteresis (≈4 mV), and very low drift (0.034 mV h^{-1}) within a measurement time for 117 h. In addition, a negative drift of 1.18 mV h^{-1} in the treated side of the sensor was observed after the plasma treatment. **Figure 5** shows the pH sensitivity of the

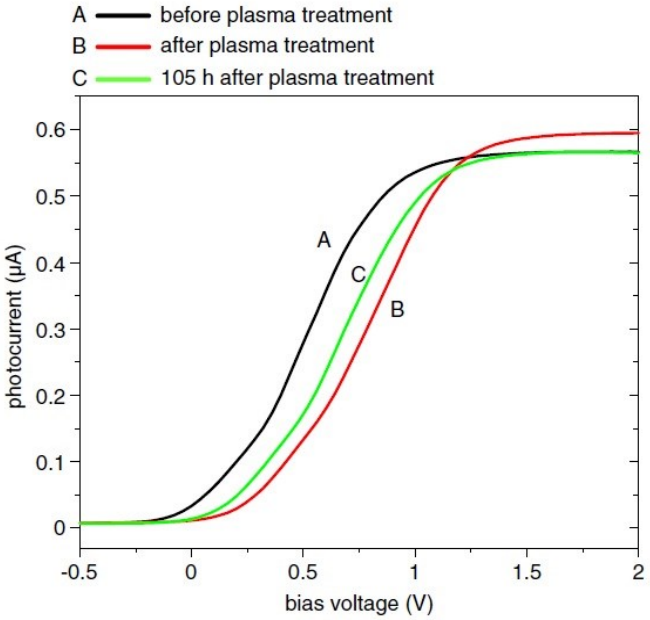


Figure 3. *I/V* curves of the LAPS structure before and after plasma treatment.

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

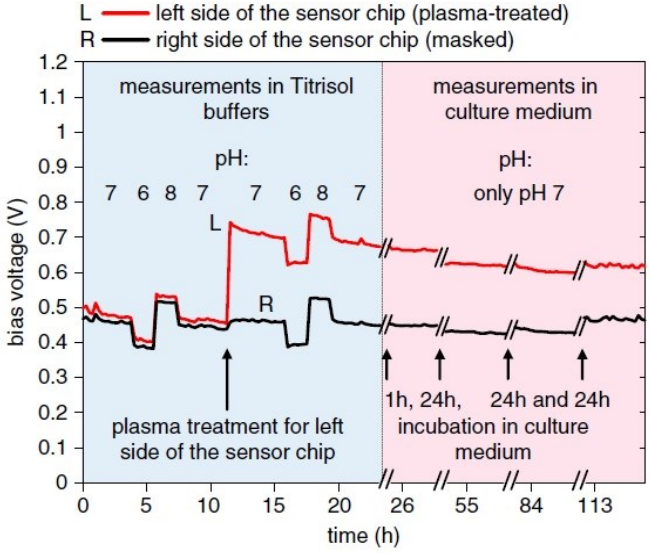


Figure 4. Constant photocurrent measurement of the left (L) and right (R) sides of the LAPS before and after O_2 plasma treatment (30 s). The right side was masked during the plasma treatment.

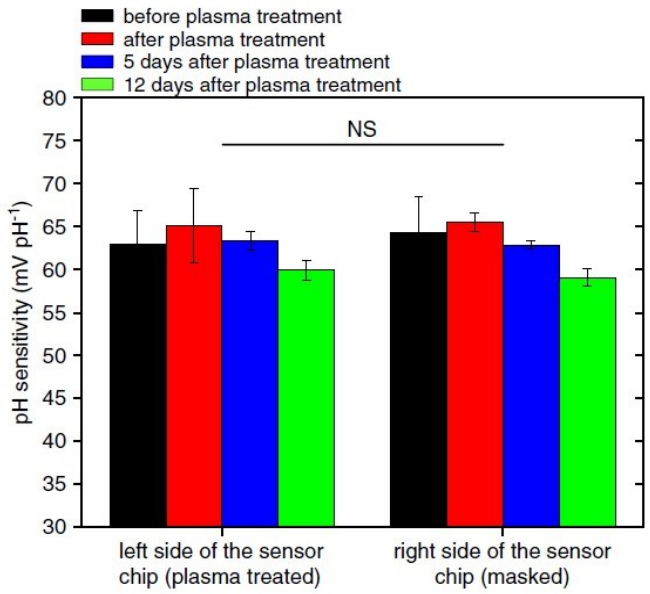


Figure 5. pH sensitivity before and after O_2 plasma treatment (30 s); NS, not significant, $p > 0.05$ (unpaired, two-tailed t-test).

treated side and the masked side of the sensor before and after plasma treatment. The data here were obtained from the results of the measurements shown in Figure 4, and after these measurements, the sensor was left inside the medium until the measurement was continued 5 and 12 days after the plasma treatment (not shown in Figure 4). Each measurement for pH sensitivity was performed by using Titrisol buffer solutions in the range of pH 6–pH 8. According to the results, the differences in pH sensitivity were not statistically significant between the two groups, the left side (treated) and the right side (masked) of the sensor ($p = 0.96$, unpaired, two-tailed t-test). However, the standard deviations of the results on the treated side of the sensor were higher than those of the masked side after the plasma treatment but they became smaller and closer to each other 5 and 12 days after the plasma treatment, respectively. In addition, the pH sensitivities of both sides were slightly higher than the theoretical value of maximum Nernstian sensitivity (59.6 mV pH^{-1} at 300 K). This might be explained by temperature fluctuations of the laboratory during the measurements, an increase in the surface site density,[32] and insufficient concentration diversity (only pH 6, pH 7, and pH 8) of buffer solutions used for calibrating the pH sensitivity.

In addition, as it can be noticed in Figure 4, the exposure for 1 h to the cell culture medium after the plasma treatment did not influence the sensor signal although it caused the described increase in the contact angles of the plasma-treated sensors (see Section 3.1). To further study these effects, chemical images were recorded at a constant bias voltage of 0.5 V. With the help of those images, one can reveal the spatial distributions of the photocurrent signal and hence visualize the influences due to masking, plasma treatment, annealing, or medium incubation. To create such a chemical image, 19 881 different measurement points on the sensor were recorded separately, and results were shown as a chemical image to indicate the location, strength, and uniformity of said influences. The results were summarized in **Figure 6**.

Overall, as it can be seen from the chemical images (Figure 6), the treated side (L) of the sensor showed a remarkable decrease in the photocurrents after the plasma treatment although the masked side (R) remained almost the same. Thereafter, the medium incubation did not cause any significant changes in both sides regarding the photocurrents despite the increase in the contact angle of the treated side of the sensor (see Figure 2). Furthermore, the treated side depicts a slight drift in the photocurrents in comparison to the masked side. This can be seen by the change of color between "1 h and 48 h" in the left lower corner of the chemical images. All of these were in agreement with previous results for individual I/V measurements discussed earlier in this section. In addition, the images present a homogeneous spatial distribution of the photocurrents along the sensor, which indicates the uniform influences of the plasma treatment.

These results show that the O_2 plasma treatment affects not only the surface wettability property but also the sensor characteristics. In addition, after plasma treatment, the wettability decay does not correlate to the recovery of sensor characteristics, as both depend on different parameters.

The radiation, especially VUVs, can inject electrons and/or electron-hole pairs in the semiconductor and dielectric layers. They are able to move throughout the layer and become trapped, recombine, or leave the layers.[16–19] The trapped charges within the dielectric layer can contribute to the decreased photocurrent signal after the plasma treatment. Neutralization of the charge accumulation over time by leakage currents under the electrical field can be the reason for the drift, which was seen in the treated side (L) of the sensor. In a previous study, a large drift of 27 mV min^{-1} and a voltage shift of 1710 mV were reported after a SiO_2 surface of an EIS sensor was treated by O_2 plasma for 2 min at 100 W.[20] In this study, a more gentle condition

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

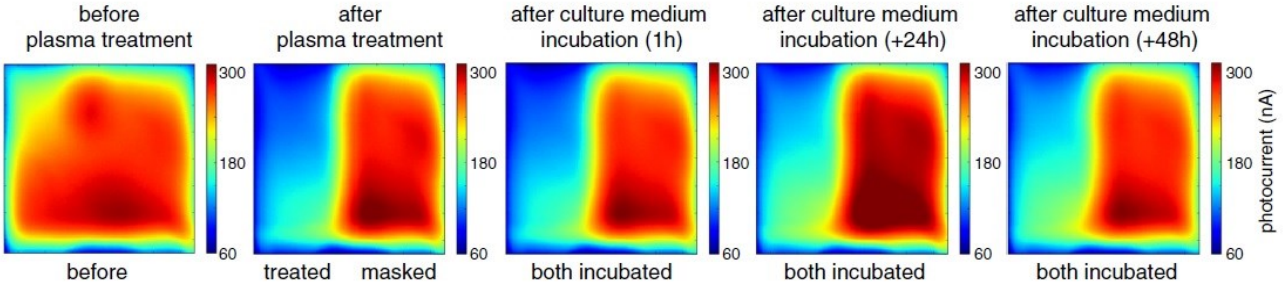


Figure 6. Chemical images from the scanning LAPS setup under O_2 plasma treatment (30 s) and various incubation procedures. The right side (R) of the LAPS was masked during the plasma treatment, and the mask was removed right after that. The treatment regimes were performed sequentially according to the order in the images on the same LAPS. The size of each image is $14 \times 14\,mm^2$. Cell culture medium with FCS and L-glutamine and without sodium bicarbonate was used for each incubation. The pH values of the measurement solutions were always adjusted to pH 7.

(30 s, 30 W) was selected for the plasma treatment to reduce the drift and the average potential shifts, which were seen to be $1.18\,mV\,h^{-1}$ and 250 mV, respectively. Usually, a drift of this size can be acceptable for cell culture experiments, especially as it appears to be uniform along the sensor surface, which can therefore be compensated by means of the differential measuring principle of the LAPS.[2]

3.3. Annealing Effect on the Sensor Properties of the LAPS

For constant photocurrent mode measurement, the recorded signals from the left side (L, treated) and the right (R, control) side of the sensor were plotted in **Figure 7**. After the plasma treatment step for 30 s, the treated side of the sensor showed an average increase of about 210 mV in the bias voltage signal although the masked side showed an average decrease of about 2 mV. After the described annealing step (10 min at 300 °C), the bias voltage signal from the treated side of the sensor returned to its initial value. In addition, the differences in pH sensitivity were not statistically significant between the two groups, the left side (treated) and the right side (masked) of the sensor ($p = 0.65$, unpaired, two-tailed t-test).

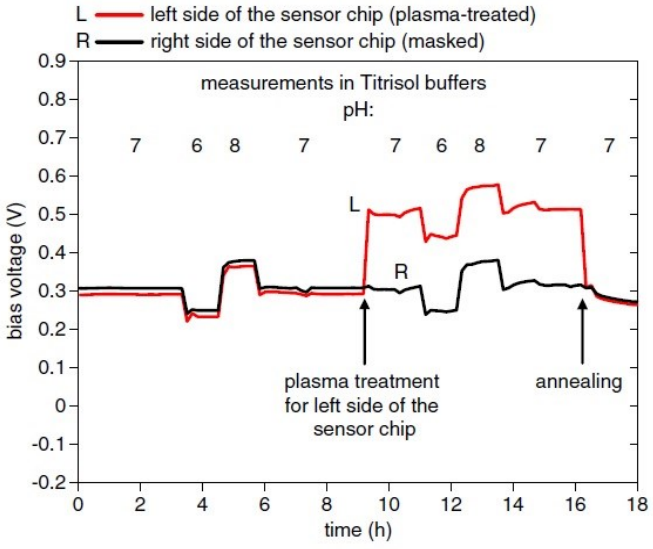


Figure 7. Constant photocurrent measurement of the left (L) and right (R) sides of the LAPS shows the effect of an annealing (10 min, 300 °C) procedure on the O_2 plasma-treated part (L) and nontreated part (R) of the LAPS. The plasma treatment was performed after 9 h and 10 min sensor operation. The annealing step was set at 16 h and 10 min.

Figure 8 displays the chemical images and the wettability alterations, response to the plasma treatment (30 s), and the annealing (10 min, 300 °C). As it can be seen from the chemical images (Figure 8a), the left side of the sensor showed a remarkable decrease in the photocurrent after the plasma treatment despite the fact the masked side remained the same. This is consistent with the results in Section 3.2. After the annealing process, the treated side of the sensor depicts an increase of the photocurrent and went almost completely back to its initial value. This might be explained by the release of the trapped charges from the dielectric material, as the increased temperature will accelerate those equilibrium processes.[19,20] In addition, the images present a homogeneous spatial distribution of the photocurrents among the sensor surface, which indicates an uniform plasma treatment and annealing process.

In addition, the hydrophilicity significantly increased for the treated side of the sensor except for the control side, which was masked during the plasma treatment. The annealing process changed the wettability properties of both sides and brought them closer to the contact angle values (49°) of a bare Ta_2O_5 surface (Figure 8b). The increase of the contact angle in the treated side (L) might be due to an accelerated hydrophobic recovery at a higher temperature. On the other hand, the removal of contaminants at 300 °C could explain the decrease in the contact angle on the control side of the sensor.

These results underline that an annealing process (10 min, 300 °C) has the ability to completely "reset" the properties of the LAPS regarding its surface wettability and electrochemical characteristic. This is essential to provide a good reusability of LAPS. Moreover, the results indicate that an annealing step could be utilized to reset a plasma-patterned LAPS.

4. Conclusions

In this study, the effects of O_2 plasma treatment and annealing on a Ta_2O_5 LAPS were investigated by means of contact

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

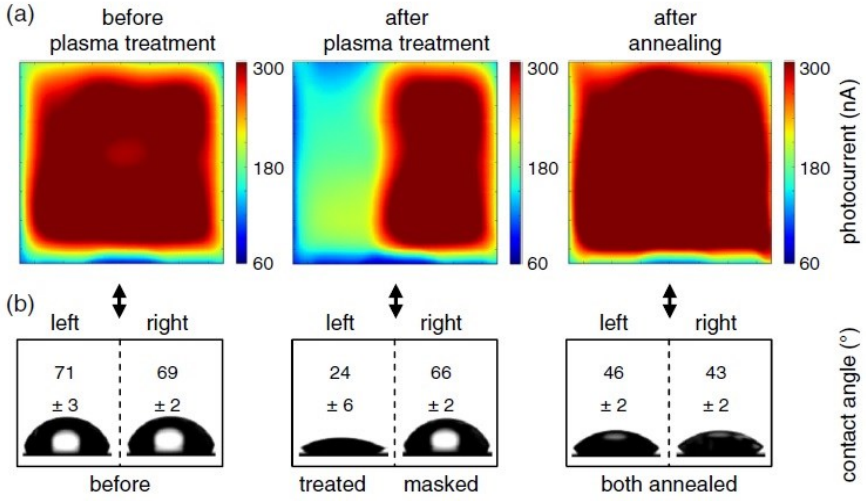


Figure 8. a) Chemical images from the scanning LAPS setup before and after O_2 plasma treatment (30 s) and annealing (10 min, 300 °C) of a Ta_2O_5-based LAPS. The treatments were performed sequentially according to the order in the images on the same LAPS. The size of each image is 14 × 14 mm^2. b) Representative images of sessile water droplets on left (L) and right (R) sides of the LAPS with a Ta_2O_5 surface, and the corresponding measured static contact angles.

angle- and scanning LAPS measurements. The conclusions are summarized as follows.

The technique used for masking against the effects of the plasma treatment was effective, simple, and low cost. It successfully preserved both wettability and electrical properties of the sensor. The 30 s of plasma duration (30 W) was found to be a threshold value where the excessive wettability, being superhydrophilic, begins. To determine this transition was particularly important since most animal cells tend to prefer rather hydrophilic surfaces but not superhydrophilic surfaces (contact angle below 5°) for culturing.

After the plasma treatment, an increase of about 250 mV in the bias voltage signal was observed in the treated side of the sensor; this was also confirmed by means of chemical images. This might be associated with the radiation emitted by plasma, especially VUV, which can inject electrons and/or electron-hole pairs in the dielectric layer. The cell culture medium incubation after plasma treatment did not cause any changes in the photocurrent response of the sensor; however, it led to strong wettability decays most likely due to the adsorption of serum proteins in the medium. This affinity of the surface for proteins could be utilized to modify the surface with specific proteins. A thermal annealing process of 10 min at 300 °C led to a "reset" of the LAPS properties regarding its altered surface wettability and electrochemical characteristic. This behavior enables the reusability of the LAPS chip. Furthermore, thermal sterilization of the sensor can be performed, which is an important process step in cell culture experiments.

These findings provide a useful guideline to support future studies, e.g., determining the metabolic activity of cells, where the LAPS surface is desired to be more hydrophilic by O_2 plasma treatment. In addition, these findings can be applied to other types of field-effect bio-sensors like EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) or ISFET (ion-sensitive field-effect transistor), which has Ta_2O_5 surface. These could be the subject of future studies.

Acknowledgements

D.Ö. would like to acknowledge the PhD research scholarship grant from Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK) under BIDEB 2214-A. The authors also gratefully thank the Federal Ministry of Education and Research of Germany (Opto-Switch FKZ: 13N12585), Scientific and Technological Research Council of Turkey (project no. 217S205), Dokuz Eylül University (project no. 2018.KB.SAG.004) for financial support. This study is a part of PhD thesis study of D.Ö. (thesis number DEU.HSI.PhD-2013970198) in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Turkey. Furthermore, the authors would like to thank H. Iken for the LAPS chip processing, T. S. Bronder, P. Cremer, and M. Frese for support during contact angle measurements.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

hydrophobic recovery, light-addressable potentiometric sensors (LAPS), plasma treatment, wettability

Received: April 2, 2019
Revised: June 28, 2019
Published online: August 16, 2019

[1] T. Yoshinobu, S. Krause, K. I. Miyamoto, C. F. Werner, A. Poghossian, T. Wagner, M. J. Schöning, *(Bio-)Chemical Sensing and Imaging by LAPS and SPIM*, Springer International Publishing, Cham **2018**, pp. 103–132.
[2] S. Dantism, D. Röhlen, T. Wagner, P. Wagner, M. J. Schöning, *Phys. Status Solidi A* **2018**, *215*, 1800058.
[3] F. Wu, I. Campos, D. W. Zhang, S. Krause, *Proc. Royal Soc. A* **2017**, *473*, 20170130.
[4] M. J. Schöning, T. Wagner, C. Wang, R. Otto, T. Yoshinobu, *Sens. Actuators B: Chem.* **2005**, *108*, 808.

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[5] T. Wagner, C. Rao, J. Kloock, T. Yoshinobu, R. Otto, M. Keusgen, M. J. Schöning, *Sens. Actuators B: Chem.* **2006**, *118*, 33.
[6] A. Poghossian, T. Yoshinobu, A. Simonis, H. Ecken, H. Lüth, M. J. Schöning, *Sens. Actuators B: Chem.* **2001**, *78*, 237.
[7] J. Gun, D. Rizkov, O. Lev, M. H. Abouzar, A. Poghossian, M. J. Schöning, *Microchim. Acta* **2009**, *164*, 395.
[8] L.-T. Yin, J.-C. Chou, W.-Y. Chung, T.-P. Sun, S.-K. Hsiung, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2001**, *48*, 340.
[9] L. Chen, C. Yan, Z. Zheng, *Mater. Today* **2018**, *21*, 38.
[10] K. Fukazawa, A. Nakao, M. Maeda, K. Ishihara, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 24994.
[11] K. Webb, V. Hlady, P. A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41*, 422.
[12] J. T. Jeong, M.-K. Choi, Y. Sim, J. T. Lim, G. S. Kim, M. J. Seong, J. H. Hyung, K. Soo Kim, A. Umar, S. K. Lee, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33835.
[13] S. Mi Baek, M. Hwan Shin, J. Moon, H. Sang Jung, S. Am Lee, W. Hwang, J. T. Yeom, S. Kwang Hahn, H. Kim, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44213.
[14] S. Shin, J. Seo, H. Han, S. Kang, H. Kim, T. Lee, *Materials* **2016**, *9*, 116.
[15] M. Ahmed, T. Ramos, F. Damanik, B. Quang, P. Wieringa, M. Bennink, C. van Blitterswijk, J. Boer, L. Moroni, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14804.
[16] L. Shohet, H. Ren, M. Nichols, H. Sinha, W. Lu, K. Mavrakakis, Q. Lin, N. M. Russell, M. Tomoyasu, G. Antonelli, *Proc. SPIE* **2012**, *8328*, 83280I.
[17] J. L. Lauer, G. S. Upadhyaya, H. Sinha, J. B. Kruger, Y. Nishi, J. L. Shohet, *J. Vac. Sci. Technol. A* **2012**, *30*, 01A109.
[18] M. Hasumi, J. Takenezawa, T. Nagao, T. Sameshima, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2011**, *50*, 03CA03.
[19] A. Szekeres, S. Alexandrova, K. Kirov, *Phys. Status Solidi A* **1980**, *62*, 727.
[20] J. Arreola, M. Keusgen, M. J. Schöning, *Phys. Status Solidi A* **2017**, *214*, 1700025.
[21] C. H. Chin, T. F. Lu, J. C. Wang, J. H. Yang, C. E. Lue, C. M. Yang, S. S. Li, C. S. Lai, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2011**, *50*, 04DL06.
[22] J. H. Yang, T. F. Lu, J. C. Wang, C. M. Yang, D. G. Pijanowska, C. H. Chin, C. E. Lue, C. S. Lai, *Sens. Actuators B: Chem.* **2013**, *180*, 71.
[23] T. Yoshinobu, H. Ecken, A. M. Ismail, H. Iwasaki, H. Lüth, M. J. Schöning, *Electrochim. Acta* **2001**, *47*, 259.
[24] W. Moritz, T. Yoshinobu, F. Finger, S. Krause, M. Martin-Fernandez, M. J. Schöning, *Sens. Actuators B: Chem.* **2004**, *103*, 436.
[25] B. Kasemo, J. Lausmaa, *J. Biomed. Mater. Res.* **1988**, *22*, 145.
[26] C. C. Wu, C. K. Wei, C. C. Ho, S. J. Ding, *Materials* **2015**, *8*, 684.
[27] V. Cimalla, *Label-Free Biosensors Based on III-Nitride Semiconductors*, Springer, Cham **2018**, pp. 59–102.
[28] N. Donkov, A. Zykova, V. Safonov, E. Mateev, *Probl. Atom. Sci. Tech.* **2009**, *1*, 153.
[29] D. Kara, L. A. Belyaeva, L. Jiang, L. M. C. Lima, G. F. Schneider, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4185.
[30] D. P. Subedi, D. K. Madhup, A. Sharma, U. M. Joshi, A. Huczko, *Int. Nano Lett.* **2012**, *2*, 1.
[31] R. D. Sun, A. Nakajima, A. Fujishima, T. Watanabe, K. Hashimoto, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1984.
[32] T. M. Pan, C. W. Wang, C. Y. Chen, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2945.

© 2019 Aachen University of Applied Sciences.
Published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

General Information
Web of Science Coverage
Journal Citation Report
Peer Review Information

Return to Search Results

PHYSICA STATUS SOLIDI A-APPLICATIONS AND MATERIALS SCIENCE

Share This Journal

ISSN / eISSN **1862-6300 / 1862-6319**
Publisher **WILEY-V C H VERLAG GMBH, POSTFACH 101161, WEINHEIM, GERMANY, 69451**

General Information

Journal Website	Visit Site
Publisher Website	Visit Site
1st Year Published	1970
Frequency	Semi-monthly
Issues Per Year	24
Country / Region	GERMANY
Primary Language	Multi-Language

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals
Core Collection	Science Citation Index Expanded (SCIE)	Physics, Condensed Matter | Physics, Applied | Materials Science, Multidisciplinary	Find Similar Journals
Current Contents	Physical, Chemical & Earth Sciences	Applied Physics/Condensed Matter/Materials Science	Find Similar Journals

Physics in Medicine 10 (2020) 100030

Contents lists available at ScienceDirect

Physics in Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/physmed

Differential chemical imaging of extracellular acidification within microfluidic channels using a plasma-functionalized light-addressable potentiometric sensor (LAPS)

Dua Özsoylu [a,b], Sefa Kizildag [b], Michael J. Schöning [a,c], Torsten Wagner [a,c,*]

[a] Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, 52428, Jülich, Germany
[b] Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340, Izmir, Turkey
[c] Institute of Complex Systems (ICS-8), Research Centre Jülich GmbH, 52425, Jülich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Light-addressable potentiometric Sensor
Plasma treatment
Differential chemical image
Extracellular acidification
Microfluidic chip system

ABSTRACT

Extracellular acidification is a basic indicator for alterations in two vital metabolic pathways: glycolysis and cellular respiration. Measuring these alterations by monitoring extracellular acidification using cell-based biosensors such as LAPS plays an important role in studying these pathways whose disorders are associated with numerous diseases including cancer. However, the surface of the biosensors must be specially tailored to ensure high cell compatibility so that cells can represent more *in vivo*-like behavior, which is critical to gain more realistic *in vitro* results from the analyses, e.g., drug discovery experiments. In this work, O_2 plasma patterning on the LAPS surface is studied to enhance surface features of the sensor chip, e.g., wettability and biofunctionality. The surface treated with O_2 plasma for 30 s exhibits enhanced cytocompatibility for adherent CHO–K1 cells, which promotes cell spreading and proliferation. The plasma-modified LAPS chip is then integrated into a microfluidic system, which provides two identical channels to facilitate differential measurements of the extracellular acidification of CHO–K1 cells. To the best of our knowledge, it is the first time that extracellular acidification within microfluidic channels is quantitatively visualized as differential (bio-)chemical images.

1. Introduction

Cell metabolism is broadly defined as a set of biochemical reactions that are organized into metabolic pathways. Two well-known metabolic pathways, glycolysis and cellular respiration, are profoundly important for producing energy (catabolism) in living organisms. The glycolytic pathway converts glucose as a major nutrient into pyruvate, which is then converted to lactate + H^+ while the respiratory pathway uses pyruvate and creates CO_2, which dissociates to HCO_3^- + H^+. These by-products, especially H^+ ions are not only the source of extracellular acidification [1], but they are also an indicator for abnormal regulations of these bio-energetic pathways, which are likely associated with common diseases such as cancer, diabetes, neurodegeneration [2], schizophrenia [3], and obesity [4]. Thus, monitoring of extracellular acidification with a quantitative read-out principle has a tremendous impact in studying biological fundamentals of these diseases.

Optical assays, particularly fluorescence analysis, are mostly used for measuring extracellular acidification since they provide disposable, easily-operated and low-cost features [5]. However, these label-based approaches have some drawbacks such as a time-intensive labeling step, potentially interfering with the cellular systems under study, being an endpoint analysis where the cells under study are sacrificed for analysis, and losing the stability of the fluorescence signal with time. In contrast to endpoint analysis for monitoring extracellular acidification, only a few instruments enable label-free, quantitative, and non-invasive studies. In particular, the Seahorse XF analyzer (Agilent Technologies Inc., USA), using optical sensors, provides real-time and high-throughput detection of oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) for cells seeded in a 96-well plate. However, the assay uses un-buffered media usually containing a limited amount of nutrients and no serum, which could result in depletion of nutrients during an extended incubation time of cells [6]. Also, the Seahorse analyzer does not offer a sterile and closed microperfusion concept, which ensures the delivery of continuous nutrient supplies, and shear stress is created by the fluid flow. Thus, this system is unable to ensure long-term monitoring for extracellular acidification. The

* Corresponding author. Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, 52428, Jülich, Germany.
E-mail address: torsten.wagner@fh-aachen.de (T. Wagner).

https://doi.org/10.1016/j.phmed.2020.100030
Received 30 April 2020; Received in revised form 29 May 2020; Accepted 3 June 2020
Available online 11 June 2020
2352-4510/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

light-addressable potentiometric sensor (LAPS) represents exceptional superiority in the monitoring of extracellular acidification with high precision and sensitivity of pH through its pH-sensitive transducer layer (usually Ta_2O_5 or Si_3N_4). The LAPS is a field-effect-based (bio-)chemical sensor based on a semiconductor structure. Having spatial resolution ability by means of addressing a desired sensing area on the sensor surface with light illumination is a unique feature of LAPS. This feature brings great potential to obtain (bio-)chemical imaging of extracellular acidification by scanning the particular area on the sensor surface [7,8]. In a study published recently [9], it was shown that combining LAPS with a microfluidic system could provide long-term monitoring of cells, however, the biocompatibility of the sensor surface was not explored. The sensor surface should ensure high cell compatibility so that cells can grow healthy as they grow on well-established surfaces such as culture plates. Therefore, it is imperative to enhance surface biofunctionality to gain more realistic *in vitro* results from the analyses, e.g., drug discovery experiments.

Wettability of the surface is one of the key factors to influence cell behavior. It is well known that most animal cells tend to prefer hydrophilic (high surface-free energy) surfaces for adhesion, spread and growth [10]. Thus, controlling the surface properties such as wettability by plasma treatment is one of the most significant approaches to enhance surface biofunctionality [10], and it offers a simple, safe, inexpensive and environmental-friendly profile versus other methods such as wet-chemical treatment [11]. However, the evidence about the culturing of cells on a Ta_2O_5 layer, which is an essential component on the LAPS surface for pH sensitivity is scarce. The studies to date tend to focus on tantalum metal (Ta) which is used as implant materials for its favorable mechanical features and good biocompatibility [12,13] rather than tantalum pentoxide (Ta_2O_5). Therefore, it is imperative to characterize the biofunctionality of plasma-modified Ta_2O_5 surfaces to gain fundamental insights on the cell-surface interactions. Additional characterizations must also be done when it comes to sensors, since the plasma modifications could also affect the sensor behavior. In particular, radiation such as vacuum ultraviolet photons (VUVs) emitted by the plasma could cause plasma-induced sensor degradation [14]. Thus, the effects of plasma treatment on the sensor behavior have to be characterized and minimized.

In this work, O_2 plasma patterning on the surface of LAPS was utilized and the effects of treatment on the sensor behavior were visualized by chemical images. For biofunctionality analysis of plasma-modified sensor surfaces, essential tests were carried out by assessing cell adhesion, detachment, morphology, spreading, viability, and growth. Moreover, a differential microfluidic chip system integrated with this modified LAPS was developed. A representative schematic of the chip system is displayed in Fig. 1. The main goals in this study are, therefore: 1) characterization and minimization of plasma-induced sensor degradation; 2) improving biofunctionality of the sensor surface to ensure high cell compatibility; and 3) acquiring differential (bio-)chemical images of the extracellular acidification of cells.

2. Material and methods

2.1. Fabrication and electrochemical characterization of LAPS

The LAPS consists of a p-doped <100> silicon wafer with a specific electrical resistivity of 5–10 Ωcm and a thickness of 400 µm. A thin (30 nm) insulator layer of SiO_2 was grown by a thermal dry oxidation procedure (40 min at 1000 °C, O_2). An electron-beam evaporation technique (0.5 nm/s, at 6×10^{-6} mbar) was utilized to deposit an additional layer of 30 nm Tantalum (Ta) on top of the SiO_2 layer. A pH-sensitive transducer layer (Ta_2O_5) with a thickness of 60 nm was achieved by an additional thermal dry oxidation step (520 °C, 120 min) [15]. For an ohmic rear-side contact on the backside of the silicon wafer, an aluminum layer (300 nm) was deposited by electron-beam evaporation (2 nm/s) on the rear side and this was partially removed by using a wet-chemical etching process with 5% hydrofluoric acid (HF) to create an illumination window (15×15 mm^2) after dicing the wafer into single chips with the size of 20×20 mm^2 [16]. After sensor fabrication, electrochemical characterization procedures using an electrochemical spectrum analyzer (Zahner-Elektrik GmbH) were performed to characterize the sensor properties such as capacitance-voltage-(C/V), leakage-current measurement, impedance spectroscopy, and constant-capacitance (ConCap) measurements [17]. In addition, photocurrent-voltage (I/V) measurements were performed with a custom-made scanning LAPS set-up as previously described in literature [18]. The LAPS chip was assembled in a measurement chamber. An Ag/AgCl reference electrode (3 M KCl) was dipped into the electrolyte solution (Titrisol buffer, pH 7). To generate the responsive photocurrent, a movable light-intensity modulated laser (QL78F6S-A, λ = 780 nm, QSI) was utilized as a light source with a focus point of about 70 µm in diameter. To illuminate a certain defined area of the semiconductor in a

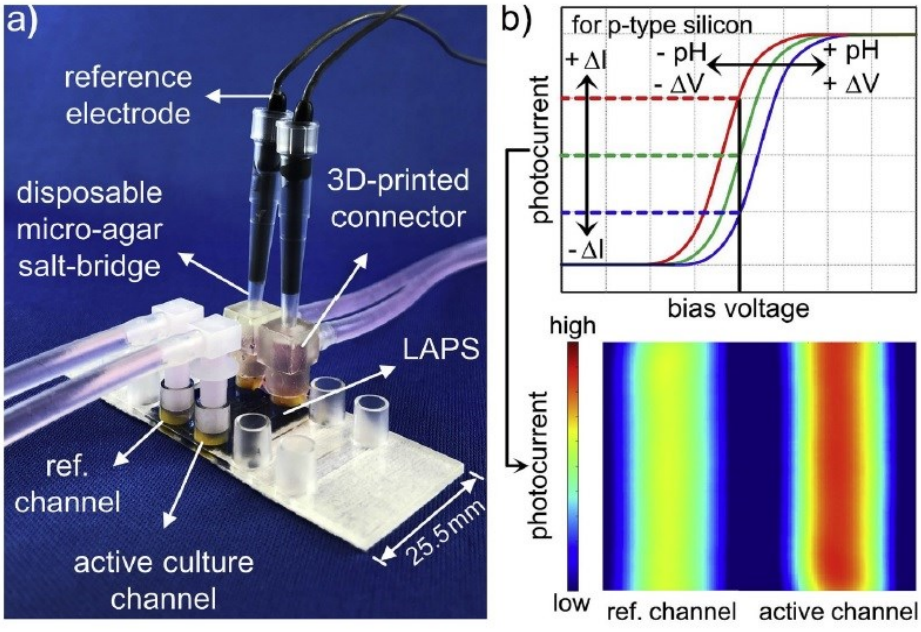


Fig. 1. Microfluidic chip system for label-free, quantitative, differential detection of extracellular acidification. a) Photo of a differential set-up where a single LAPS is integrated into the microfluidic system with two identical and separated micro-channels. 3D-printed, bio-compatible connectors in combination with a disposable micro-agar salt-bridge provide a continuously closed system under fluid flow and measurement conditions. b) Schematic photocurrent vs. voltage (I/V) curves of the LAPS structure and representative differential (bio-)chemical image for different analyte concentrations inside the channels (ref.: reference).

raster-like manner, the movement of the modulated laser was precisely controlled by a linear XY-stage (GMN, Germany). A constant bias voltage of 0.45 V obtained from the center of the depletion range of the I/V curve was used to record the chemical images. For this purpose, an area of 14×14 mm^2 was scanned by setting the step width of the motors to 100 µm, creating a measurement area of 141×141 measurement spots. A customized LabVIEW software was utilized controlling the whole measurements. The pH sensitivity, possible drift, and hysteresis of the sensor was determined using different concentrations (pH 5–9) of Titrisol buffers (Titrisol, Merck, Germany).

2.2. Plasma treatment and characterization

The surface of LAPS was patterned with O_2 plasma by dividing the sensor surface into four areas, using different masking techniques. Fig. 2 describes the masking arrangement. Briefly, the first area (upper left) was masked with another LAPS chip with their Ta_2O_5 surfaces touching each other. The second area (upper right) was not masked. The third area (lower right) was selectively masked by covering the sensor surface with a mask (16 µm thick aluminum foil) leaving a space (0.5 mm) between the sensor surface and the mask to distinguish the effects of the plasma and UV radiation emitted by the plasma. The fourth area (lower left) was also masked with another LAPS chip. O_2 plasma treatment was performed using a low-pressure plasma system (Diener Plasma Surface Technology, model Femto). After the samples were masked and placed in the system, O_2 gas was injected into the reaction chamber coupled to a radio frequency generator operating at 40 kHz at a controlled pressure of 0.2 mbar. The excitation power, total gas flow rate, and plasma exposure duration were 30 W, 20 sccm and 30 s, respectively. In addition, to further determine the role of ultraviolet photons on the sensor characteristics, the fourth area was exposed to UV radiation with a wavelength of 405 nm (30 s) and subsequently of 280 nm (30 s) using a custom-made set-up including a LED (DUV280-HL46N, Roithner Lasertechnik GmbH). The effects of treatment on the sensor behavior were characterized by the electrochemical methods described in Section 2.1. During all treatments and measurements, the sensor was not removed from its chamber and it was rinsed with de-ionized water and dried with nitrogen before all the treatment procedures.

Water contact angle measurements were carried out by a sessile drop method (static) to figure out the alteration of the surface wettability of the LAPS with reference to the different surface treatments. An optical contact angle measuring device (DataPhysics Instruments GmbH, Germany) was used under a controlled temperature (22 °C) and relative humidity (58–60%). For the measurements, 5 µL of de-ionized water drops were added in a minimum of three randomly selected spots across the sensor surfaces. Images were acquired 10 s after drop impact and contact angles were calculated by using the software module (SCA 20) of the device.

2.3. Cell culturing and biofunctionality analyses

Chinese hamster ovary (CHO–K1) cells (DSMZ, Germany) were obtained in a frozen state. After thawing and removing the old media containing Dimethyl sulfoxide (DMSO), cells were re-suspended in a cell culture medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM/Ham's F-12, 2:1 mixture, pH 7) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Sigma Aldrich). Cells were seeded onto a T-75 cell culture flask with the same medium and incubated in a humidified atmosphere (37 °C, 5% CO_2). The medium was changed every two days to keep the cells healthy by providing fresh nutrients. When cells became 80–90% confluent, they were passaged to maintain cells in exponential growth and to reach enough cell numbers for the experiments. The passaging was done by rinsing the cells three times with PBS solution, detaching the cells using 0.25% trypsin-EDTA (Fisher Thermo Scientific) at 37 °C for 4 min, adding fresh medium with FCS to neutralize the trypsin/EDTA activity, and splitting the cell suspension to new cell culture flasks.

For the biofunctionality analyses, the samples were prepared as flask surface (control), non-treated (nt) LAPS surface, 30 s plasma-treated LAPS surface, and 150 s plasma-treated LAPS surface. A concentration of 4×10^4 cells/cm^2 was seeded on the samples in all following experiments after the CHO–K1 cells were counted using a hemocytometer. For the analysis of cell adhesion, cells were incubated for 30 min, washed three times with PBS and images of remaining cells were collected using a digital microscope. The percentages of cell adhesion were obtained by comparing the number of the remaining cells with the number of initial cells seeded (4×10^4 cells/cm^2). To determine the cell detachment, a microfluidic flow-based detachment assay was performed with a controlled pump system (neMESYS290N, Cetoni). Details of the procedure are provided in the Supplementary Information (Section 1.). For the analysis of cell morphology and spreading, cells were incubated for 24 h. After incubation, the cells were washed two times with PBS and images of the cells were collected. The cell numbers, circularity, and area were measured using the Analyze Particles tool of ImageJ (National Institutes of Health, USA). To assess cell viability, a Cell Counting Kit (CCK)-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) assay was performed. Briefly, after cells were cultured for 24 h, 10% CCK-8 solution in the culture medium was prepared, the cells were incubated with this medium for 2 h. Afterward, the medium was transferred in a 96-well plate, and the absorbance readings were obtained at 450 nm using a plate reader (Spark, Tecan Group Ltd., Switzerland). To measure cell proliferation over time, a dye exclusion assay was performed with Erythrosine B. After cells were cultured 24, 48, 72, 96, and 120 h, they were detached by 0.25% trypsin-EDTA treatment at 37 °C for 4 min. After that, 10 µL of FCS was added and thoroughly mixed to neutralize the trypsin/EDTA activity. The viable cells were counted using a hemocytometer.

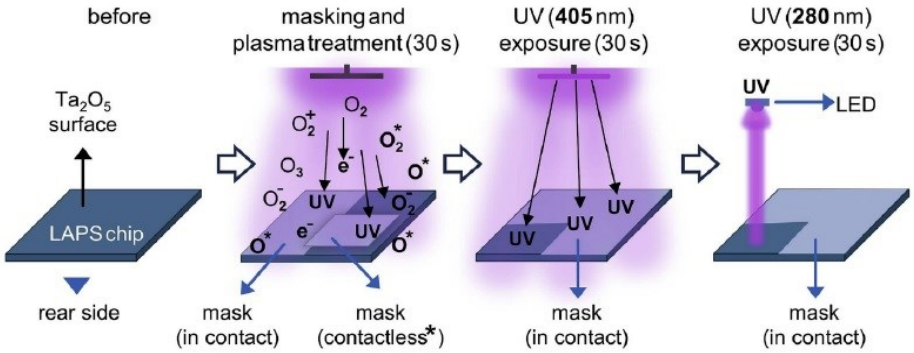


Fig. 2. The masking arrangements and various treatments on the LAPS surface. *Contactless masking indicates that there is a space (0.5 mm) between the sensor surface and the mask.

2.4. Differential scanning LAPS measurement

LAPS chips, treated with O_2 plasma for 30 s, were mounted to the rear-side of a bottomless microfluidic slide (sticky-Slide VI 0.4; ibidi GmbH, Germany) to form two identical and separated micro-channels on the sensor surface (Fig. 1 (a)). The height and width of the micro-channels are 400 µm and 3.8 mm, respectively. A bio-compatible, two-component epoxy adhesive (EP 655-T, Polytec PT GmbH, Germany) was used to encapsulate the edges of the sensor to protect them from liquid leakage and also to mechanically support the chip system. The curing of the adhesive was performed at 70 °C, for 2 h. In order to create appropriate connections for the reference electrode (DriRef-2SH, World Precision Instruments Ltd) and maintain the sterility inside the system, a connector set and micro-agar salt-bridge was developed (Fig. 1(a)). To detect the extracellular acidification of CHO–K1 cells in a differential way, a concentration of 4×10^4 cells/cm^2 was seeded inside each channel. As the device is a closed system and outside of a CO_2 incubator, the culture medium needs to be buffered to keep the pH value within a physiological range. Therefore, 15 mM HEPES buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) was used to maintain these conditions. Cells were cultivated at 37 °C for 48 h. The medium was replaced with fresh one after 24 h. For the measurements, the Ham's F-12 cell culture medium without sodium bicarbonate or HEPES was selected to enable the measurements by LAPS. The medium was also modified by supplementing 5% FCS, 17.5 mM D-glucose, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin.

After 48 h of cultivation and before the measurement starts, the cells in one of the two channels were fixed and quenched with 70% ethanol in PBS (ice-cold) for 5 min to obtain reference measurements while the culture medium was replaced with the modified cell culture medium for the active channel. The device was incubated at 37 °C for one additional hour and differential scanning LAPS measurements were carried out to determine the extracellular acidification of the cells. For both channels, the (bio-)chemical images were recorded as previously described in Section 2.1. An area of 6×4.2 mm^2 was scanned by setting the step width of the motors to 200 µm, creating a measurement area of 30×21 measurement spots for each channel. Fig. 1(b) also depicts how a chemical image is obtained from the characteristic (I/V) curves of the LAPS.

3. Results and discussion

3.1. Characteristics of modified surfaces

The sensor characteristics after assembly were determined to ensure a guaranteed level of read-out accuracy over the various operating conditions. The pH sensitivity and hysteresis of the LAPS was found to be 57 ± 1.6 mV/pH and 4 mV, respectively. The shift of the bias voltages was highly correlated with the pH changes ($R^2 = 0.9998$). Thus, the LAPS represents very good characteristics, which can be used for further experiments in this study. It also indicates that a micro-agar salt-bridge is suitable for the following experiments as well. In addition, the results were in complete compliance with nearly Nernstian pH sensitivity of a sensor based on a Ta_2O_5 transducer surface given in literature [15].

Patterning the LAPS surface allows us to precisely test multiple parameters under identical conditions using only a single chip owing to its spatial resolution ability. Thus, the masking arrangement described in Fig. 2 was chosen to analyze individually the effect of the treatment with plasma, selective plasma and UV-light on a single LAPS chip. Fig. 3 depicts successfully masking without a significant alteration in wettability on the upper left side of the LAPS surface, called "control" after the plasma treatment. Besides, the surfaces, plasma-treated and selectively plasma-treated (30 s or 150 s) became superhydrophilic. However, the main reason for the selective treatment was not only the modification of the wettability but also shading the surface from the radiation, especially vacuum ultraviolet photons (VUVs) emitted by the plasma. The

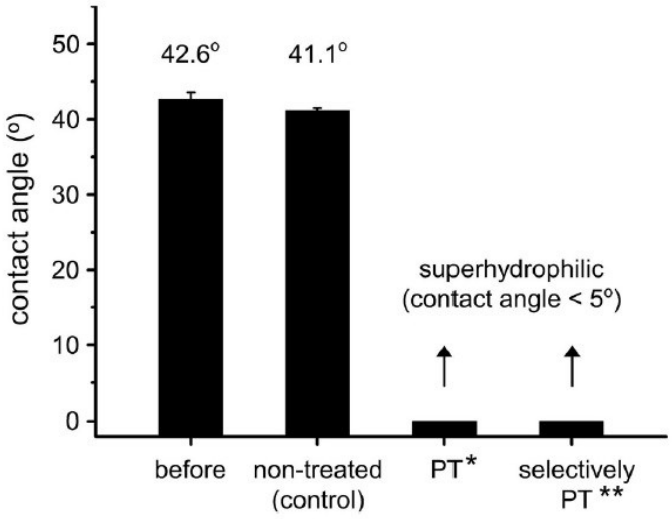


Fig. 3. Wettability alterations of the LAPS surface. *PT indicates O_2 plasma treatment for 30 s; **Selective plasma treatment means covering a part of the sensor surface with a mask (16 µm thick aluminum foil), leaving a space (0.5 mm) between the sensor surface and the mask during the PT.

effects of the plasma treatment on sensor characteristics were visualized with chemical images in Fig. 4. When it was compared with the effects of the plasma treatment (without mask) on the upper right side of the LAPS chip, the selective plasma treatment on the lower right side of the sensor chip was found to be superior in minimizing the plasma-induced sensor degradation, which was characterized with a lower photocurrent decline.

Plasma is a source of ions, radicals, and photons. The high-energy photons, especially VUVs, can penetrate and inject electrons and electron-hole pairs inside the dielectric layer if their energy level is larger than the bandgap of the dielectric. These holes can react with lattice oxygen to form oxygen vacancies [19]; while the electrons can react with lattice metal ions to form trapped electrons (defective sites) [20]. These give rise to a flat band voltage shift in the I/V curve and hence, a change in the electrical behavior of the sensor [14]. Therefore, the selective treatment method prevents the surface from the redundant photons generated inside the plasma chamber. However, this method is unable to block the radicals, which can laterally diffuse inside the space between sensor and mask. Fortunately, the radicals can not penetrate inside the dielectric as deep as VUVs and might affect only the surface layer [21], which is enough to make the surface superhydrophilic. This could be the reason why the selective treatment method did not prevent the degradation completely while providing decent hydrophilicity.

To further prove the role of ultraviolet photons on the degradation, the lower left part of the LAPS surface, which was masked during plasma treatment, was exposed to ultraviolet radiation with a wavelength of 405 nm and 280 nm, respectively (see Fig. 4 middle-bottom left area and right-bottom left area). It was found that high-energy ultraviolet radiation (280 nm) caused a photocurrent decline compared to the UV radiation (405 nm). However, this photocurrent reduction visualized by a chemical image was not as high as in the plasma treatment (see upper right area in Fig. 4 middle and right). This could be due to the fact that plasma can also emit photons, e.g., VUVs (100–200 nm), which have higher energy than ultraviolet radiation (280 nm). These results are in agreement with previous studies [20,21]. Showing the impacts of high-energy ultraviolet photons on LAPS could also be helpful for other sensor applications, which use UV light, in particular, where e.g., light-addressable electrodes [22] or light-addressable hydrogels [23] were wanted to be combined with LAPS. Furthermore, the results also indicate that ultraviolet radiation (405 nm) could be a useful tool to ensure microbial decontamination after plasma treatment without affecting the intrinsic sensor characteristics [24].

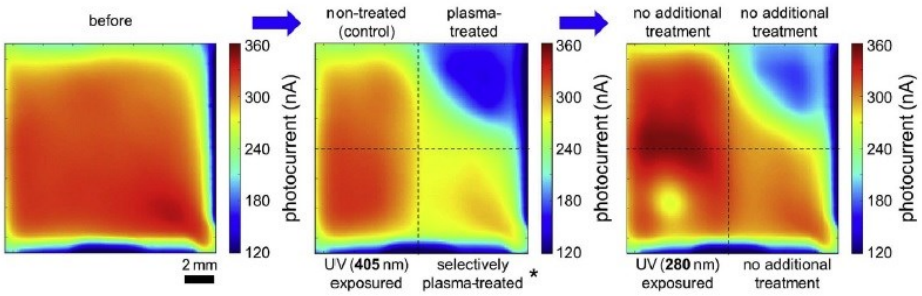


Fig. 4. Visualization of O_2 plasma-/UV radiation-induced sensor degradation with chemical images from the scanning LAPS set-up before and after O_2 plasma treatment (30 s) and after various UV exposures for 405 nm (middle figure) and 280 nm (right figure). The arrows denote that the treatment regimes were performed sequentially according to the order in the images on the same LAPS. *Selective plasma treatment means covering a part of the sensor surface with a mask (16 μm thick aluminum foil) by leaving a space (0.5 mm) between the sensor surface and the mask.

3.2. Biofunctionality of modified LAPS surfaces

According to the cell adhesion test, 58% of the cells remained adherent on the non-treated surface, compared to 59% on plasma-treated (30 s and 150 s) surfaces (Fig. S1, Supplementary Information). The differences in the adhesion percentage among surfaces are very small although the contact angles of the surfaces (treated and non-treated) differ a lot (see Section 3.1.). One possible explanation could be due to the effects of the complex serum proteins of the cell culture medium, which can act as mediators to the adhesion process. More sensitive methods such as quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) could be used to further investigate the differences in cell adhesion in future studies [25]. With an increasing magnitude of shear stress, the cells grown on 30 s plasma-treated surface showed the highest resistance to detachment, while 150 s plasma-treated surface showed the least (Fig. S2, Supplementary Information). However, the differences between groups were not statistically significant. The morphological characterization of cells in culture is important to provide evidence about their state, e.g., general health and condition of cells grown on different substrates. Adherent cells cultured on surfaces with improved biofunctionality represent a typical morphological characteristic. For instance, CHO cells as epithelial cells have a mostly polygonal shape, are elongated or occasionally spindle-like and have a relatively well-spreading [26]. In this study, CHO–K1 cells grown on a commercial cell culture flask represented these characteristics and were considered as a control to compare morphological characteristics of CHO–K1 cells grown on a plasma-treated LAPS surface (Fig. 5(a)).

According to the results, cells grown on 30 s plasma-treated LAPS surfaces exhibited similar morphological characteristics with the control samples, whereas the non-treated surface and 150 s plasma-treated surface showed a more rounded-like morphology rather than elongated or polygonal in shape. The differences were also quantitatively analyzed by using the morphological parameters such as cell circularity (proportional to the ratio between the area and the square of the perimeter of a cell) and cell area (proportional to the area that cell spread on surface) (Fig. 5(b)). The mean spread area of cells increased 1.4-fold ($p = 0.0006$) on the 30 s plasma-treated surface versus non-treated surface; 1.2-fold ($p = 0.01$) on the 150 s plasma-treated surface versus the non-treated surfaces; 1.7-fold ($p = 0.0001$) on the commercial flask surface versus the non-treated surface. There was no statistically significant difference between the 30 s plasma-treated surface and the flask surface.

Cell circularity was significantly lower ($p < 0.0001$) on the flask surface versus all other groups. The highest circularity was seen in the non-treated surface and this indicates a less elongated and more rounded shape, which is untypical for the CHO–K1 cells. Cell circularity was significantly lower ($p = 0.004$) on the 30 s plasma-treated surface versus the non-treated surface, but not significantly altered on the 150 s plasma-treated surface. These results revealed that a 30 s plasma-treated LAPS surface provides improved biofunctionality regarding cell morphology and spread compared to the non-treated surface and the 150 s plasma-treated LAPS surface. These results agree with the findings

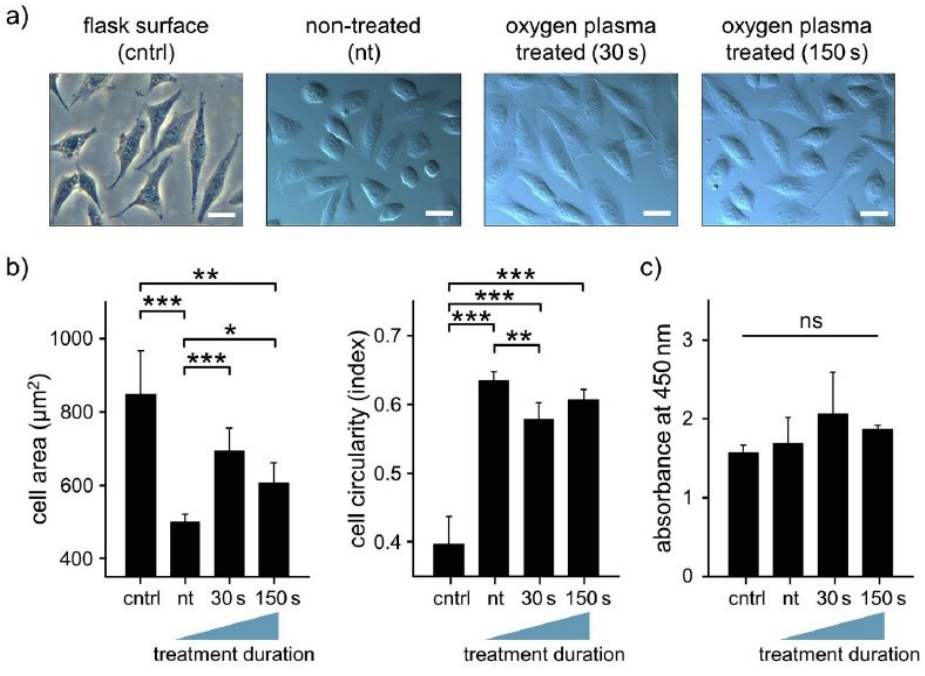


Fig. 5. Effect of O_2 plasma-modified sensor surfaces on morphology, spreading and viability of CHO–K1 cells. a) Representative microscope images of the cells on the modified surfaces to depict the cell morphology. b) Quantification of area and circularity of cells grown on the modified surfaces to represent cell spreading. c) Relative absorbance values from CCK8 analysis to reveal the viability of the cells on the modified sensor surfaces. All results here were obtained after 24 h of culture. Notes: The selective plasma treatments (30 s and 150 s) were performed for the surface modifications; the error bars show the standard deviations; *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$. Abbreviations: Cntrl, control (the surface of a commercial cell culture flask); nt, non-treated sensor surface (masked during the plasma treatment); ns, non-significant ($P > 0.05$); CCK8, cell counting kit 8; bars are 25 μm.

of another study [27], in which a crystalline β-Ta_2O_5 coating of a titanium alloy increased not only the surface wettability but also the spread and proliferation of NIH-3T3 cells. Moreover, the highest cell viability was observed on the 30 s plasma-treated surface, however, the difference among all groups including the flask surface was not statistically significant (Fig. 5(c)).

Fig. 6 depicts the cell proliferation over time. Remarkably, the viable cell density after 72 h culture (late log phase) was significantly higher on the 30 s plasma-treated surface versus the non-treated surface ($p = 0.01$) and even higher compared to the commercial culture flask ($p = 0.004$). Furthermore, in the stationary phase of growth, the viable cell density was significantly higher on the 30 s plasma-treated surface compared to the culture flask. During the cell counting, it was also observed that cells grown on the LAPS surfaces in the stationary phase were smaller than cells grown on the flask surface. This is in agreement with the results given in Fig. 5(a) and (b). This high cell density seen on the LAPS surfaces versus the flask surface (Fig. 6) maight be because the area covered by each cell was small and more cells could adhere to the limited area. Overall, these results indicate that 30 s of O_2 plasma treatment provides better cell proliferation especially in the log phase of growth, which is the most important time frame to assess the cell behavior. The results were also in compliance with a previous study [28], in which the incorporation of Ta_2O_5 nanoparticles into a natural hydroxyapatite (nHA) coating structure on a titanium substrate was found to enhance proliferation and spread of human fetal osteoblastic cells (hFOB).

Besides, proteins are unable to adhere to a surface, which was intensely treated by plasma because of increased surface-free energy of the surface. This is due to strong repulsive solvation forces arising from strong hydrogen bonding between the water molecules and the surface, which has a high surface hydration ability [10,29]. However, a sufficient adsorption of proteins inside the culture medium to the surface is crucial to mediate the cell-surface interaction. This could explain why a LAPS surface treated by plasma for 150 s did not show better biofunctionality than a 30 s plasma-treated surface. All of these findings are in good agreement with the results observed in previous studies [10,29] regarding enhanced cell spread and cell proliferation on hydrophilic surfaces.

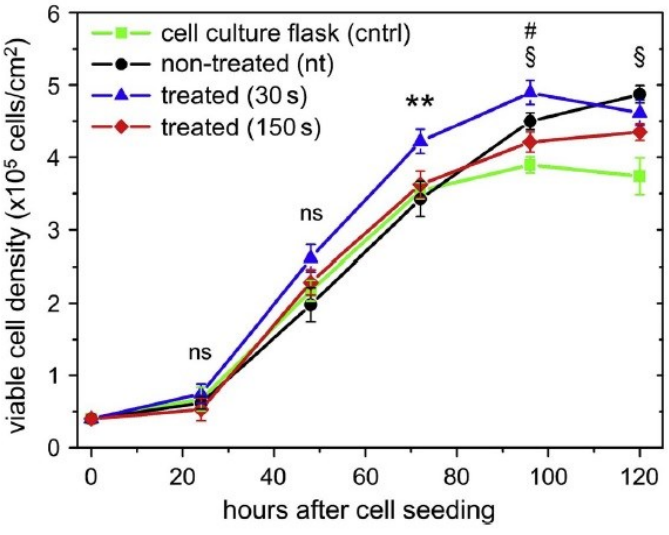


Fig. 6. Viable cell density of CHO–K1 cells grown on O_2 plasma-modified sensor surfaces versus the surfaces of a commercial cell culture flask and a non-treated sensor surface for 5 days cell culture. Notes: The error bars show the standard deviations; $P < 0.01$ (**treated (30 s) versus cell culture flask (cntrl) and non-treated (nt); #treated (30 s) versus treated (150 s); §cell culture flask (cntrl) versus non-treated (nt) and treated (30 s)), abbreviations: Cntrl, control (the surface of commercial cell culture flask); nt, non-treated sensor surface; ns, non-significant ($P > 0.05$).

3.3. Differential extracellular acidification detection

As a proof-of-concept study, the extracellular acidification of CHO–K1 cells was visualized as a (bio-)chemical image using a microfluidic system with the plasma-modified LAPS chip. Fig. 7(a) shows the microfluidic chip system with CHO–K1 cells grown adherently inside the channels. Cells in the upper channel were fixed and quenched by cold ethanol, while the cells in the lower channel were given fresh culture medium. Fixing and quenching of cells on the surface instead of detaching them with trypsin or lysing with Triton-X were made with the intention to both preserve the cell-surface integrity and to completely stop all activity of the cells. This was especially important to eliminate possible differences between the channels regarding the effect of local impedance changes due to the modification of the cell layer. Both channels were filled with culture medium adjusted to pH 7. After 1 h of incubation, the photocurrent measurements were utilized under a constant bias voltage of 0.45 V to obtain the chemical images (Fig. 7(b)). By using a pH sensitivity (61.4 ± 3 nA/pH) of the sensor chip, the pH value inside the active culture channel was calculated compared to the reference channel (differential detection) and found to be pH 6.36.

In a study discussed in literature [30], T98G brain cancer cells were killed to achieve a zero baseline at the end of the measurement for more accurate results, however, this could cause problems for real-time analysis. Thus, the chip system in this experiment allows performing both control measurement and active culture measurement on the same sensor through the spatial resolution ability of LAPS [31]. In this way, the influence of drift could be eliminated without killing cells in the active measurement channel because many signal fluctuations over time are seen in the same manner on both channels of the sensor [14].

4. Conclusions and future work

In this work, the effects of O_2 plasma treatment on LAPS were studied in terms of surface wettability, sensor behavior, and cell compatibility. It was revealed that the high-energy ultraviolet photons (e.g., VUVs) emitted by the plasma play an important role in the plasma-induced sensor degradation, which was visualized with the chemical images using LAPS. A selective treatment method, based on shading the surface from the photons, ensure high surface wettability as well as minimizing

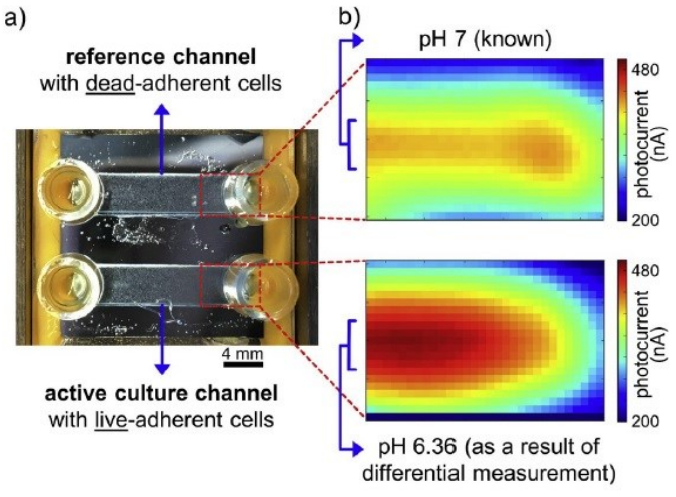


Fig. 7. Differential (bio-)chemical image showing extracellular acidification of adherent CHO–K1 cells inside microfluidic channels. a) Image of LAPS assembled to microfluidic chip system including CHO–K1 cells grown adherent inside the channels for 48 h culture. Thereafter, 70% ethanol in PBS (ice-cold) for 5 min was used for fixation and metabolic quenching of the cells in the reference channel before measurement. b) Differential (bio-)chemical image from the scanning LAPS measurement to show extracellular acidification (from pH 7 to pH 6.36) of CHO–K1 cells.

the plasma-induced sensor degradation. Biofunctionality analyses showed that the LAPS surface, selectively treated with O_2 plasma (30 s, 30 W), exhibits enhanced cytocompatibility for adherent CHO–K1 cells, which promotes cell spreading and proliferation. This could be particularly important to achieve more realistic *in vitro* results (e.g., for drug-discovery experiments). Furthermore, a proof-of-concept experiment for the application of the chip system including the plasma-modified LAPS was performed, and thus, the extracellular acidification of the adherent CHO–K1 cells was visualized as a (bio-)chemical image, based on scanning LAPS measurements.

Monitoring of extracellular acidification using this chip system is widely applicable to many areas including the evaluation of physiological and pathophysiological processes, such as cellular response to hypoxia, ischemia, and drug candidates, as well as studying the development and progression of autophagy and tumorigenesis. However, more research is needed to separate the contribution of the glycolytic acidification from the respiratory acidification, since quantitative measurements of the glycolytic rate using extracellular flux analysis is the desired endpoint of many experiments. Future research should, therefore, concentrate on LAPS arrays for multi-sensing of different biomolecules such as oxygen or lactate in addition to H^+ ions on the same sensor chip. Furthermore, advanced surface engineering using an electrospun nanofiber-based 3D-structured matrix to ensure a more *in vitro*-like cell niche and high-resolution (bio-)chemical imaging of single-cell or organoids could also be the subject of future studies.

CRediT authorship contribution statement

Dua Özsoylu: Writing - original draft, Conceptualization, Investigation, Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **Sefa Kizildag:** Formal analysis, Validation. **Michael J. Schöning:** Formal analysis, Writing - review & editing. **Torsten Wagner:** Supervision, Validation, Writing - review & editing.

Acknowledgements

The authors thank the German Federal Ministry of Education and Research (project no.: 13N12585) for the financial support of this work. Dua Özsoylu (DÖ) would like to acknowledge the PhD research scholarship grant from the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK) under BIDEB 2214-A. This study is a part of PhD thesis study of DÖ (thesis no.: DEU. HSI. PhD - 2013970198) in Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences, Turkey. Furthermore, the authors would like to thank H. Iken for the LAPS chip processing and Th. Schnitzler for the support in cell culturing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.phmed.2020.100030.

References

[1] S.A. Mookerjee, R.L. Goncalves, A.A. Gerencser, D.G. Nicholls, M.D. Brand, The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1847 (2) (2015) 171–181, https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.10.005.

[2] R.J. Deberardinis, C.B. Thompson, Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? Cell 148 (6) (2012) 1132–1144, https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.032.

[3] C.R. Sullivan, C.A. Mielnik, A. Funk, S.M. O'Donovan, E. Bentea, M. Pletnikov, A. J. Ramsey, Z. Wen, L.M. Rowland, R.E. McCullumsmith, Measurement of lactate levels in postmortem brain, iPSCs, and animal models of schizophrenia, Sci. Rep. 9 (1) (2019) 5087, https://doi.org/10.1038/s41598-019-41572-9.

[4] A. Agrawal, Y.S. Prakash, Obesity, metabolic syndrome, and airway disease: a bioenergetic problem? Immunol. Allergy Clin. 34 (4) (2014) 785–796, https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.07.004.

[5] S. Wu, S. Wu, Z. Yi, F. Zeng, W. Wu, Y. Qiao, X. Zhao, X. Cheng, Y. Tian, Hydrogel-based fluorescent dual pH and oxygen sensors loaded in 96-well plates for high-throughput cell metabolism studies, Sensors 18 (2) (2018) 564, https://doi.org/10.3390/s18020564.

[6] D. Wang, M.F. Green, E. McDonnell, M.D. Hirschey, Oxygen Flux Analysis to Understand the Biological Function of Sirtuins, vol. 1077, Humana Press, Totowa, NJ, 2013, pp. 241–258, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-637-5_16.

[7] T. Wagner, C. Rao, J.P. Kloock, T. Yoshinobu, R. Otto, M. Keusgen, M.J. Schöning, LAPS Card"-A novel chip card-based light-addressable potentiometric sensor (LAPS), Sens. Actuators, B 118 (1–2) (2006) 33–40, https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.019.

[8] T. Yoshinobu, K.I. Miyamoto, T. Wagner, M.J. Schöning, Recent developments of chemical imaging sensor systems based on the principle of the light-addressable potentiometric sensor, Sens. Actuators, B 207 (PB) (2015) 926–932, https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.002.

[9] T. Liang, C. Gu, Y. Gan, Q. Wu, C. He, J. Tu, Y. Pan, Y. Qiu, L. Kong, H. Wan, P. Wang, Microfluidic chip system integrated with light addressable potentiometric sensor (LAPS) for real-time extracellular acidification detection, Sens. Actuators, B 301 (2019), https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127004, 127004.

[10] L. Chen, C. Yan, Z. Zheng, Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors, Mater. Today 21 (1) (2018) 38–59, https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.002.

[11] H. Puliyalil, U. Cvelbar, Selective plasma etching of polymeric substrates for advanced applications, Nanomaterials 6 (6) (2016) 108, https://doi.org/10.3390/nano6060108.

[12] V.K. Balla, S. Banerjee, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures, Acta Biomater. 6 (6) (2010) 2329–2334, https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.021.

[13] X. Wei, B. Liu, G. Liu, F. Yang, F. Cao, X. Dou, W. Yu, B. Wang, G. Zheng, L. Cheng, Z. Ma, Y. Zhang, J. Yang, Z. Wang, J. Li, D. Cui, W. Wang, H. Xie, L. Li, F. Zhang, W. C. Lineaweaver, D. Zhao, Mesenchymal stem cell-loaded porous tantalum integrated with biomimetic 3D collagen-based scaffold to repair large osteochondral defects in goats, Stem Cell Res. Ther. 10 (1) (2019) 72, https://doi.org/10.1186/s13287-019-1176-2.

[14] D. Özsoylu, S. Kizildag, M. J. Schöning, T. Wagner, Effect of plasma treatment on the sensor properties of a light-addressable potentiometric sensor (LAPS), Phys. Status Solidi A 216 (20). doi:10.1002/pssa.201900259.

[15] M. Schöning, D. Brinkmann, D. Rolka, C. Demuth, A. Poghossian, CIP (cleaning-in-place) suitable "non-glass" pH sensor based on a Ta2O5-gate EIS structure, Sens. Actuators, B 111–112 (2005) 423–429, https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.03.053.

[16] M.J. Schöning, T. Wagner, C. Wang, R. Otto, T. Yoshinobu, Development of a handheld 16 channel pen-type LAPS for electrochemical sensing, Sens. Actuators, B 108 (1–2 SPEC. ISS) (2005) 808–814, https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.01.055.

[17] A. Poghossian, D.T. Mai, Y. Mourzina, M.J. Schöning, Impedance effect of an ion-sensitive membrane: characterisation of an EMIS sensor by impedance spectroscopy, capacitance-voltage and constant-capacitance method, Sens. Actuators, B 103 (1–2) (2004) 423–428, https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.071.

[18] T. Yoshinobu, H. Iwasaki, Y. Ui, K. Furuichi, Y. Ermolenko, Y. Mourzina, T. Wagner, N. Näther, M.J. Schöning, The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging, Methods 37 (1) (2005) 94–102, https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.020.

[19] H. Chen, G. Feng, W. Fan, J. Han, Y. Li, Q. Lai, Laser plasma-induced damage characteristics of Ta 2 O 5 films, Opt. Mater. Express 9 (7) (2019) 3132, https://doi.org/10.1364/OME.9.003132.

[20] J. Lü, K. Huang, X. Chen, J. Zhu, F. Meng, X. Song, Z. Sun, Reversible wettability of nanostructured ZnO thin films by sol-gel method, Appl. Surf. Sci. 256 (14) (2010) 4720–4723, https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.02.080.

[21] J. Lee, D.B. Graves, Roles of plasma-generated vacuum-ultraviolet photons and oxygen radicals in damaging nanoporous low- k films, J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film. 31 (4) (2013), 041302, https://doi.org/10.1116/1.4807299.

[22] R. Welden, S. Scheja, M.J. Schöning, P. Wagner, T. Wagner, Electrochemical evaluation of light-addressable electrodes based on TiO2 for the integration in lab-on-chip systems, Phys. Status Solidi A 215 (15) (2018), https://doi.org/10.1002/pssa.201800150, 1800150.

[23] L. Breuer, J. Pilas, E. Guthmann, M.J. Schöning, R. Thoelen, T. Wagner, Towards light-addressable flow control: responsive hydrogels with incorporated graphene oxide as laser-driven actuator structures within microfluidic channels, Sens. Actuators, B 288 (2019) 579–585, https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.086.

[24] K. McKenzie, M. Maclean, M.H. Grant, P. Ramakrishnan, S.J. MacGregor, J. G. Anderson, The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling, Microbiol. 162 (9) (2016) 1680–1688, https://doi.org/10.1099/mic.0.000350.

[25] D. Yongabi, M. Khorshid, A. Gennaro, S. Jooken, S. Duwé, O. Deschaume, P. Losada-Pérez, P. Dedecker, C. Bartic, M. Wübbenhorst, P. Wagner, QCM-D study of time-resolved cell adhesion and detachment: effect of surface free energy on eukaryotes and prokaryotes, ACS Appl. Mater. Interfaces 12 (16) (2020) 18258–18272, https://doi.org/10.1021/acsami.0c00353.

[26] K. Porter, D. Prescott, J. Frye, Changes in surface morphology of Chinese hamster ovary cells during the cell cycle, J. Cell Biol. 57 (3) (1973) 815–836, https://doi.org/10.1083/jcb.57.3.815.

[27] J. Xu, X. ke Bao, T. Fu, Y. Lyu, P. Munroe, Z.H. Xie, In vitro biocompatibility of a nanocrystalline β-Ta2O5 coating for orthopaedic implants, Ceram. Int. 44 (5) (2018) 4660–4675, https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.12.040.

[28] N. Horandghadim, J. Khalil-Allafi, M. Urgen, Effect of Ta2O5 content on the osseointegration and cytotoxicity behaviors in hydroxyapatite-Ta2O5 coatings applied by EPD on superelastic NiTi alloys, Mater. Sci. Eng. C 102 (2019) 683–695, https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.05.005.

[29] M. Ahmed, T.A.D.S. Ramos, F. Damanik, B. Quang Le, P. Wieringa, M. Bennink, C. Van Blitterswijk, J. De Boer, L. Moroni, A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis, Sci. Rep. 5 (2015), https://doi.org/10.1038/srep14804, 14804.

[30] A. Weltin, K. Slotwinski, J. Kieninger, I. Moser, G. Jobst, M. Wego, R. Ehret, G. A. Urban, Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem, Lab Chip 14 (1) (2014) 138–146, https://doi.org/10.1039/c3lc50759a.

[31] K.I. Miyamoto, T. Sato, M. Abe, T. Wagner, M.J. Schöning, T. Yoshinobu, Light-addressable potentiometric sensor as a sensing element in plug-based microfluidic devices, Micromachines 7 (7) (2016) 111, https://doi.org/10.3390/mi7070111.

Supplementary Information

Differential chemical imaging of extracellular acidification within microfluidic channels using a plasma-functionalized light-addressable potentiometric sensor (LAPS)

*Dua Özsoylu [a, b], Sefa Kizildag [b], Michael J. Schöning [a, c], Torsten Wagner [a, c, *]*

[a] *Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, 52428, Jülich, Germany*
[b] *Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340, Izmir, Turkey*
[c] *Institute of Complex Systems (ICS-8), Research Centre Jülich GmbH, 52425, Jülich, Germany*

[*] *Present address: FH Aachen Campus Jülich, Institut für Nano- und Biotechnologien, Heinrich-Mußmann-Str. 1, 52428 Jülich*

Section 1. Cell detachment assay

To study cell detachment, a microfluidic flow-based detachment assay was performed with a controlled pump system (neMESYS290N, Cetoni). According to this method, CHO cells were incubated for 1 hour and, afterwards, exposed to the increasing magnitude of shear stress generated by a liquid flow. To evaluate the local shear stress on cells, computational fluid dynamics was performed using a finite element software (Comsol Multiphysics). First, a constant fluid shear stress of 0.2 dyn/cm^2 was applied for 5 min to remove the unattached cells. Then, the imposed shear stress was increased in steps with a fixed time period (1 min) and images of remaining cells were collected using the digital microscope. The percentages of the cell detachment were obtained by comparing the number of the detaching cells with the initial cell numbers on the surface before the applied liquid flow.

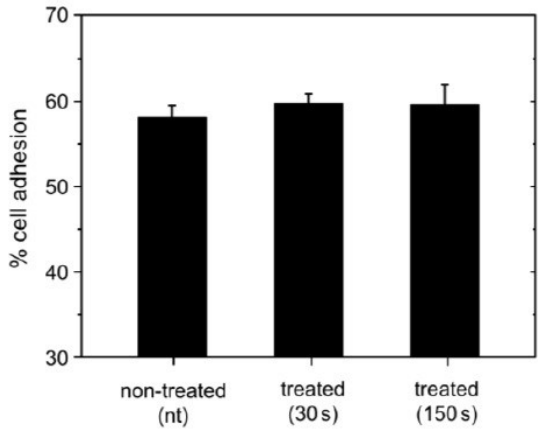


Fig. S1: CHO-K1 cell adhesion on the LAPS surface inside the microfluidic channels. Note: "nt" means non-treated surface, which was masked during the plasma treatment.

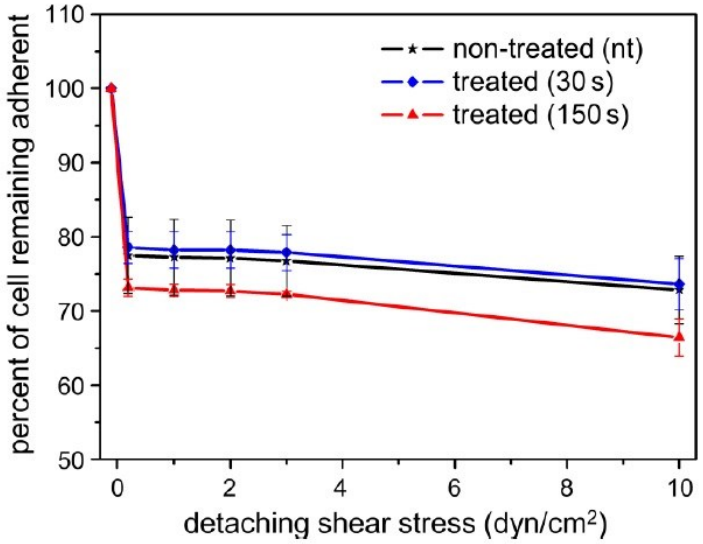


Fig. S2: CHO-K1 cell detachments from the LAPS surface inside the microfluidic channels. Note: "nt" means non-treated surface, which was masked during the plasma treatment.

IOPscience Journals Books Publishing Support Login Search IOPscienc

ECS Meeting Abstracts

On-Sensor Cryopreservation of Adherent Cells in Lab-on-a-Chip Systems

Dua Özsoylu[1,2], Tugba Isik[3,4], Mustafa Muammer Demir[4], Sefa Kizildag[2], Michael J. Schoening[1,5] and Torsten Wagner[5,1]

Published 1 May 2020 • © 2020 ECS - The Electrochemical Society
ECS Meeting Abstracts, Volume MA2020-01, Number 27

— Hide article information

Author affiliations

[1] Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), FH Aachen

[2] Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University

[3] School of Chemistry, University of Bristol

[4] Izmir Institute of Technology

[5] Institute of Complex Systems (ICS 8), Research Centre Jülich GmbH

ORCID iDs

Dua Özsoylu https://orcid.org/0000-0001-9507-5336

Michael J. Schoening https://orcid.org/0000-0003-4347-6685

Citation

Dua Özsoylu *et al* 2020 *Meet. Abstr.* **MA2020-01** 2022

DOI

https://doi.org/10.1149/MA2020-01272022mtgabs

Abstract

Introduction

Biochemical sensors are one of the essential tools for cell-based assays used in major research fields including drug discovery, cancer research, and immunology. Although significant efforts have been made to develop new technologies and tools, most existing systems in this field are still not suitable for "ready-to-use in-field" applications, as the cells inside the assay need vital parameters, such as oxygen, nutrients, and temperature and therefore will not survive during a transportation to an end user. Nevertheless, providing these parameters is not practicable during conventional transportation either. Those systems need to be assembled and prepared on-site, which often requires a cell culture laboratory setting and trained staff. Thus, there is an urgent need for preserving the whole optimized assay system to utilize them for concepts like "ready-to-use" or "on-demand-use".

Cryopreservation, the process of freezing and preserving the cells at sub-zero temperatures is a well-known technique for cell culturing. It could be one possible solution to solve the transportation and storage challenges in the fields mentioned above. However, freezing of adherent cells is more prone to the cell membrane damage and cell detachment, due to ice crystal formation and a mismatch in the linear thermal expansion between the frozen cell membrane and the rigid substrate [1]. Therefore, innovative methods and tools must be implemented to overcome these challenges.

In this work, for the first time, the surface of a field-effect-based sensor was modified with flexible electrospun fibers to allow on-sensor cryopreservation. Furthermore, a protocol was developed to freeze and to thaw adherent cells in a microfluidic channel.

Method

The light-addressable potentiometric sensor (LAPS), a field-effect-based biochemical sensor, can detect the extracellular acidification of the cells due to its pH sensitive transducer layer (Ta_2O_5). The LAPS was fabricated as a structure of Al/p-Si/SiO_2/Ta_2O_5 as described in Ref. [2]. The sensor surface was modified with flexible polyethylene vinyl acetate (PEVA) fibers using an electrospinning method. The modified LAPS chip was then fixed to the underside of a bottomless microfluidic slide to form a miniaturized device (cryo-chip) (Figure 1(a) and (b)). A flexible polymer coverslip and a conventional LAPS were used as control samples. All samples were sterilized by 70% ethanol for one hour under aseptic conditions in a laminar flow cabinet to maintain the sterility. Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells were adherently cultured inside the channels of the device with the mixture of Ham's Nutrient Mixture F-12/Dulbecco's Modified Eagle Medium (Ham's F-12/DMEM, 1:2 mixture, pH 7) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. After the cell culture inside the channels were obtained for 48h under cell culture conditions in an incubator, the entire device was placed in a 3D-printed freezing container and frozen at -80°C using a cryoprotectant solution (90% fetal calf serum supplemented with 10% dimethyl sulfoxide). The samples were kept in the freezer overnight. The frozen device was then thawed rapidly by transferring them directly to the incubator (37°C). The cryoprotectant solution inside the channels was removed by washing with the fresh medium (37°C) four times, as soon as the ice crystals disappeared. Cell recovery and cell viability were analyzed before and after cryopreservation using a dye exclusion assay and a cell counting kit (CCK)-8 assay. In addition, as proof-of-concept measurements, the extracellular acidification of the cells was monitored by the LAPS chip, after the cryopreservation.

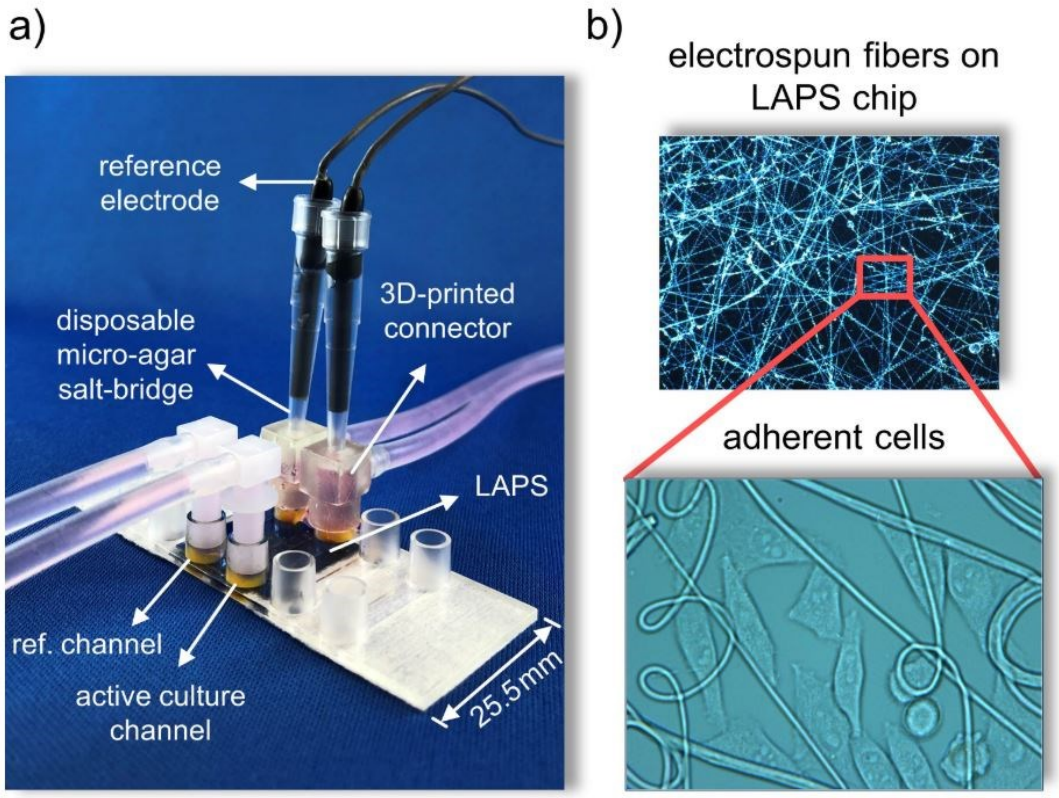


Figure 1: Photos of the cryo-chip system for on-sensor cryopreservation. a) The modified LAPS chip integrated in a microfluidic chip system and its complementary connections; b) culturing of the CHO-K1 cells inside the channels on the LAPS surface, which are modified by electrospun PEVA fibers.

Results and Conclusions

The results showed that the sensor surface modified with the electrospun PEVA fibers exhibits enhanced biocompatibility, which promotes cell proliferation and spreading. In addition, the novel cryo-chip system using this hybrid structure (rigid/flexible) is effective compared to an un-modified LAPS surface for keeping cells viable during on-sensor cryopreservation. These findings showed, for the first time, that a cryopreservation on-chip is possible and that microfluidic systems including semiconductor based sensors can survive the cryopreservation treatment. Thus, this kind of cryo-chip systems enable on-sensor cryopreservation and measurement which can open up a new possibility for "ready-to-use, in field" applications. Being able to prepare the entire system at the manufacturing stage and to send them via a cold-chain transport further eliminate potential run-to-run and operator-to-operator variability, resulting in more reproducible results.

Acknowledgements

Dua Özsoylu (DÖ) would like to acknowledge the PhD research scholarship grant from Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK) under BIDEB 2214-A. The authors also gratefully thank the Federal Ministry of Education and Research of Germany (Opto-Switch FKZ: 13N12585). This study is a part of PhD thesis study of DÖ (thesis number DEU. HSI. PhD-2013970198) in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Turkey.

References

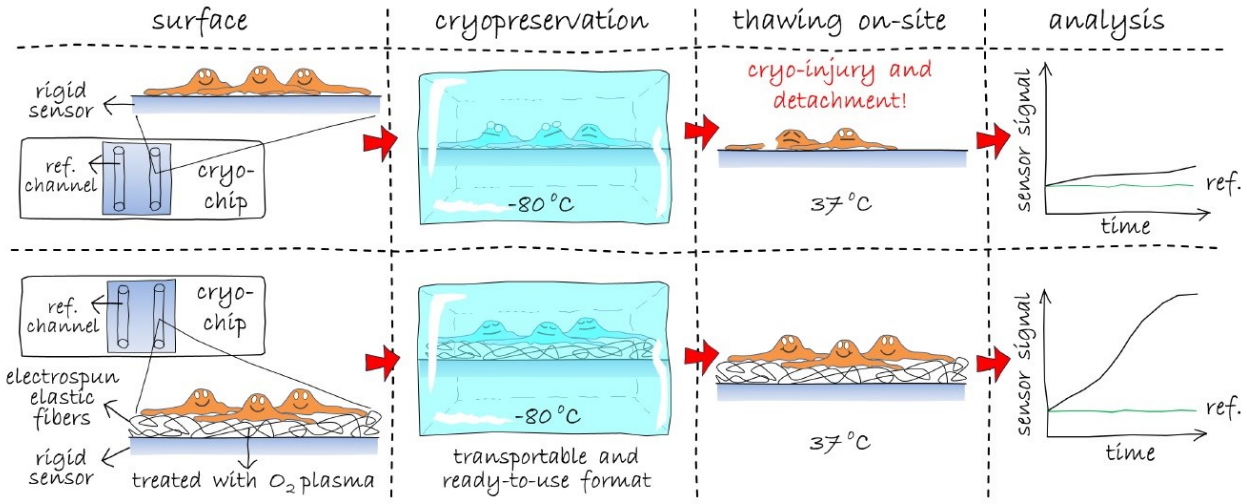
[1] T. Rutt, N. Eskandari, M. Zhurova, J.A.W. Elliott, L.E. McGann, J.P. Acker, J.A. Nychka, Thermal expansion of substrate may affect adhesion of Chinese hamster fibroblasts to surfaces during freezing, Cryobiology. 86 (2019), 134–139. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.006.

[2] D. Özsoylu, S. Kizildag, M.J. Schöning, T. Wagner, Effect of plasma treatment on the sensor properties of a light-addressable potentiometric sensor (LAPS), physica status solidi (a). 216 (2019), 1900259. doi.org/10.1002/pssa.201900259.

Graphical Abstract

On-sensor cryopreservation offers ready-to-use concept for cell-based lab-on-a-chip applications

Dua Özsoylu, Tuğba Isık, Mustafa M. Demir, Michael J. Schöning, Torsten Wagner



Highlights

On-sensor cryopreservation offers ready-to-use concept for cell-based lab-on-a-chip applications

Dua Özsoylu, Tuğba Isık, Mustafa M. Demir, Michael J. Schöning, Torsten Wagner

- A novel strategy, on-sensor cryopreservation (OSC) is revealed for biopreservation of cell-based biosensors.
- Modification of a rigid sensor surface with elastic electrospun fibers ensures cell survival for OSC.
- Increased wettability of the hybrid (elastic/rigid) structure by plasma treatment contributes the improved cell recovery.
- Cryo-chip including the above sensor enables label-free, quantitative and non-invasive monitoring of adherent cell activity directly after thawing.
- The ready-to-use on-site system using the cryo-chip is validated by differential chemical images of cell activity.

On-sensor cryopreservation offers ready-to-use concept for cell-based lab-on-a-chip applications

Dua Özsoylu[a,b], Tuğba Isık[d,e], Mustafa M. Demir[d], Michael J. Schöning[a,c,*] and Torsten Wagner[a,c,*]

[a]Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, 52428, Jülich, Germany
[b]Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340, Izmir, Turkey
[c]Institute of Complex Systems (ICS-8), Research Centre Jülich GmbH, 52425, Jülich, Germany
[d]Department of Materials Science and Engineering, Izmir Institute of Technology, 35430 Izmir, Turkey
[e]School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, UK

ARTICLE INFO

Keywords:
On-sensor cryopreservation
Cryo-chip
Ready-to-use
Light-addressable potentiometric sensor
Chemical imaging
Extracellular acidification

ABSTRACT

Significant efforts have been recently made to develop advanced cell-based lab-on-a-chip devices using electrochemical sensors. However, current systems are still not suitable for a ready-to-use format as the cells inside the device need incubator conditions (CO_2, nutrients, etc.) for survival during conventional transportation. Herein, we propose a strategy called on-sensor cryopreservation (OSC), which enables the adherent cells to be preserved by freezing (-80 °C) on a sensor surface, such as the light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Adherent cells on the LAPS surface were prone to cryo-injury; thus, the surface was modified to enhance the cell recovery for OSC. It relies on i) the integration of elastic electrospun fibers composed of polyethylene vinyl acetate (PEVA), which has a high thermal expansion coefficient and low glass-transition temperature, and ii) the treatment with O_2 plasma. The modified sensor is integrated into a microfluidic chip system not only to decrease the thermal mass, which is critical for fast thawing, but also to provide a precisely controlled micro-environment. This novel cryo-chip system is effective for keeping cells viable during OSC. As a proof-of-concept application, the extracellular acidification of cancer cells (CHO-K1) was evaluated by differential LAPS measurements. Results show, for the first time, that the OSC strategy using the cryo-chip allows label-free and quantitative measurements directly after thawing, which eliminates additional post-thaw culturing steps. The freezing of the chips containing cells at the manufacturing stage and sending them via a cold-chain transport could open up a new possibility for a ready-to-use on-site format.

1. Introduction

Cell-based biosensors play an outstanding role in all areas of major biomedical research including drug discovery, cancer research, immunology, stem cell research, and regenerative medicine. These biosensors, which use cells as a living model system, allow performing experiments and reducing the need for animal testing. Basically, the cells to be investigated are cultured on sensor chips and their cellular response to selected experimental stimuli (e.g., biomolecules, drugs, chemicals) is measured quantitatively and non-invasively. In the cell culture environment, several downstream parameters such as extracellular pH, lactate- and oxygen concentration, and CO_2 content can be monitored to identify many fundamental activities of cells including cellular metabolism, viability, cell proliferation, and migration; here, monitoring cellular metabolism is undoubtedly one of the most important issues in the field of cell-based biosensors.

Cellular metabolism is the set of biochemical reactions called metabolic pathways. Glycolysis and cellular respiration are extremely important metabolic pathways for the production of energy (catabolism) in cells. These pathways use major nutrients such as glucose to produce energy for the cell while the by-products of the reactions such as lactate, CO_2 and H^+ ions are released to the extracellular environment (Mookerjee et al., 2015). These by-products cause extracellular acidification, which can be used as a sign for abnormal regulations of these energy-related pathways that are

*Corresponding authors
ORCID(s):

mostly associated with extensive diseases such as obesity (Agrawal and Prakash, 2014), schizophrenia (Sullivan et al., 2019), as well as cancer, neurodegeneration, and diabetes (DeBerardinis and Thompson, 2012). Therefore, monitoring of the extracellular acidification using cell-based biosensors has a tremendous value in understanding the biological fundamentals of these common diseases.

Only a few cell-based biosensors have been developed for label-free, non-invasive and quantitative sensing of extracellular acidification, including optical methods using the Seahorse XF analyzer (Agilent Technologies Inc., USA) to monitor oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) (Wu et al., 2007), semiconductor-based methods using the Bionas Discovery 2500 (Bionas GmbH) for real-time monitoring of ECAR (Thedinga et al., 2007), and field-effect-type methods using an ion-sensitive field-effect transistor (ISFET), which seem to be more suitable for long-term measurements of extracellular acidification (Lee et al., 2009). Another field-effect-based biosensor, the light-addressable potentiometric sensor (LAPS), exhibits remarkable superiority over existing biosensor solutions through its uncomplicated spatial resolution ability. A desired sensing point on the sensor surface can be addressed by light illumination to monitor the extracellular acidification through its pH-sensitive transducer layer. In addition, by using this unique feature, a defined area can be scanned by a modulated light beam to obtain a two-dimensional chemical image of extracellular pH (pH_e) and extracellular acidification (EA). More details regarding the working principle of LAPS can be found elsewhere (Wagner et al., 2016; Schöning et al., 2005b; Yoshinobu et al., 2001; Poghossian et al., 2001; Parak et al., 1997, 2000).

Although significant efforts have been made to improve cell-based biosensors, existing systems in this field are still not suitable as a ready-to-use on-site format because the cells inside the biosensor system are very demanding for some vital parameters such as oxygen, nutrients, pH and temperature, which must be carefully kept in balance during transportation to the end-user (Banerjee et al., 2013). Providing these parameters is often not practicable during conventional transportation. Therefore, it is usually necessary to prepare the cell-based biosensor system right on-time and on-spot. However, this requires the need for cell culturing and optimization stages, which usually takes days (Cheng et al., 2015; Jiang et al., 2018; Park et al., 2019). Furthermore, operations are limited only to those facilities with established infrastructure and experienced staff for cell culturing. Moreover, one of the main challenges for development of cell-based biosensors is the storability of cells in a healthy state within a portable system, which is critical for their practical applicability and commercialization (Ye et al., 2019; Gupta et al., 2019). Thus, there is an urgent need for preserving the whole optimized culture in biosensor applications to enable ready-to-use on-site format.

Cryopreservation, the process of freezing and preserving cells at sub-zero temperatures, and thawing them on-demand at a later time, could help to fill the gap in the applications mentioned above. However, conventional cryopreservation requires still many time-consuming and manual application steps, including detaching the cells from the culture surface, centrifugation and preserving them elsewhere. This is unfavorable for providing a “ready-to-use” format, as detaching the cells can destroy the whole optimized culture as well as breaking down the cell-cell communication, cell-substrate connections, and organization of the cytoskeleton (Beier et al., 2011). Thus, direct cryopreservation of cells while they adhere to the sensor chip in a more natural setting envisages a very promising approach. However, adherent cells are more prone to cryo-injury, which is most likely due to a mismatch in the coefficient of linear thermal expansion between the frozen cell membrane and the rigid substrate in contact. The mismatch could result in a damage of cell membrane, cell detachment, and cell breakage (Beier et al., 2011; Rutt et al., 2019; Batnyam et al., 2017). This could also occur in cell-based biosensors that have a rigid culture surface, such as LAPS. Therefore, innovative methods and tools must be implemented to overcome these challenges and to ensure a high cell recovery.

In this study, the rigid culture surface of the LAPS is modified with elastic electrospun fibers composed of polyethylene vinyl acetate (PEVA), which has a high thermal expansion coefficient and low glass-transition temperature. The

modified sensor is then integrated into a microfluidic chip system for precise control of the microenvironment inside the channels as well as for reducing of the thermal mass around the cells to enable fast thawing, which is vital for cell survival. For the first time, the strategy called on-sensor cryopreservation (OSC) has been utilized using this biosensor system (cryo-chip). The performance of this cryo-chip has been validated not only by testing the viability and recovery of the cells (here, CHO-K1) in response to the cryopreservation but also by monitoring their extracellular acidification. An illustrative schematic of the four-step workflow of the procedure is outlined in Fig. 1a-d. The main hypothesis of this study is that the implementation of PEVA electrospun fibers on the LAPS enables a hybrid (elastic/rigid) sensor surface that ensures a better cell recovery for the introduced OSC.

2. Material and methods

2.1. Sensor fabrication and electrochemical characterizations

The LAPS is made of an Al/p-Si/SiO_2/Ta_2O_5 structure. To obtain this structure, a p-doped silicon wafer (<100>, specific electrical resistivity: 5-10 Ωcm, thickness: 400 µm) was used to grow a thin (30 nm) insulating layer of SiO_2 by thermal dry oxidation procedure (40 min at 1000 °C, O_2). A tantalum (Ta) layer with a thickness of 30 nm was deposited on top of the SiO_2 layer by electron-beam evaporation (0.5 nm/s, 6×10^{-6} mbar). Thereafter, a pH-sensitive transducer layer (60 nm Ta_2O_5) was grown from this layer by a thermal dry oxidation step (520 °C, 120 min). At the rear side, a 300 nm aluminum (Al) layer was deposited as an ohmic contact by electron-beam evaporation (2 nm/s). The wafer was then diced into single chips with the size of 2×2 cm^2. To create an illumination window (1.5×1.5 cm^2) on the rear side of the chip, the Al layer was partially removed by using 5% hydrofluoric acid.

Electrochemical characterization techniques were carried out after sensor fabrication to study sensor functionality by measuring leakage-current-, impedance- and capacitance-voltage (C/V) curves using an electrochemical spectrum analyzer (Zahner-Elektrik GmbH) (Schöning et al., 2005a; Poghossian et al., 2004). For photocurrent-voltage (I/V) measurements, a custom-made scanning LAPS set-up was used as previously described (Wagner et al., 2006; Özsoylu et al., 2019). The sensor characteristics such as pH sensitivity, drift and hysteresis were determined by utilizing Titrisol buffers (Titrisol, Merck, Germany) between pH 5-9.

2.2. Surface modification and characterization

The sensor surface was functionalized with elastic PEVA fibers using the electrospinning technique. PEVA beads (Sigma-Aldrich, vinyl acetate 40 wt%) were dissolved in a mixture of chloroform and *N,N*-Dimethylformamide (3:2, v/v). The resulting polymer concentration was adjusted to 13% (w/v) and the solution was stirred overnight for complete dissolution. The LAPS chips were cleaned consecutively with acetone, isopropanol, ethanol, and deionized (DI) water for 3 min in an ultrasonic bath before coating. Then, the chips were fixed with a double-sided tape on the collector (aluminum foil). The electrospinning setup for the coating of LAPS chips is schematically depicted in Fig. S1 (Supplementary Information). The viscous PEVA solution was transferred into a 5 mL plastic syringe, a stainless-steel needle (18 gauges) was attached, and the needle was connected to a high voltage power supply of 18 kV (Gamma High Voltage Research Ormond Beach, FL, US). The flow rate was adjusted to 1.5 mL/h by using a micro-infusion pump (New Era NE300 Infusion Pump, Farmingdale, NY, USA). The tip-to-collector distance was set to be 10 cm. A smooth coating was fabricated on the LAPS chips by 60 s electrospinning of PEVA solution at 20 - 22 °C temperature and 48 - 50% relative humidity. The morphological characterization of electrospun fibers was carried out by Scanning Electron Microscopy (SEM) (FEI Quanta250 FEG, Oregon, USA) and digital microscope (Keyence, USA). The fiber diameter distributions and average size of fibers were estimated statistically by using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

2.3. Plasma treatment and characterization

To increase the hydrophilicity of the modified chip surface, O_2 plasma treatment was performed using a low-pressure plasma system (Femto, Diener Plasma Surface Technology). After the samples were placed into the reaction chamber, O_2 gas was injected at a controlled pressure of 0.2 mbar. A radio-frequency generator was operated at 40 kHz while the excitation power, total gas flow rate, controlled pressure, and plasma exposure duration were 30 W, 20 sccm, 0.2 mbar and 30 s, respectively (Özsoylu et al., 2019). To characterize the wettability alteration after the plasma treatment, water contact angle measurements by means of a sessile drop method (static) were performed under controlled temperature (22 °C) and relative humidity (58 - 60%) using an optical contact angle measuring device (Data Physics Instruments GmbH, Germany). The measurements were carried out by adding 5 µL of DI water drops in a minimum of three randomly selected spots across the sample surfaces. Images of the drops were acquired 10 s after drop impact to calculate the contact angles by using the software module SCA20. Surface topography, roughness and area of the samples were analyzed by atomic force microscopy (AFM) (BioMat Workstation, JPK Instruments, Germany).

2.4. Cryo-chip arrangement

The modified LAPS chip was fixed to the rear side of a bottomless microfluidic slide (sticky-Slide VI 0.4; ibidi GmbH, Germany) to form two identical microchannels on the surface of the sensor (Fig. 1a). A biocompatible, two-component epoxy adhesive (EP 655-T, Polytec PT GmbH, Germany) was used to properly seal and encapsulate the edges of the sensor for protecting from liquid leakage and also to mechanically support it. The curing of the adhesive was performed at 50 °C, overnight. To ensure the sterility and to prevent complications due to the expansion of the cryoprotectant solution as it freezes, a filter set was prepared by using a 0.22 micron sterile filter and tubes, connected with Y-style tube fitting (Fig. 1a).

2.5. Cell culturing and analysis

Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells (DSMZ, Germany) were cultured with the mixture of Ham's Nutrient Mixture F-12 / Dulbecco's Modified Eagle Medium (Ham's F-12/DMEM, 1:2 mixture, pH 7.4), supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Sigma Aldrich). Cells were incubated inside an incubator providing 37 °C humidified and 5% CO_2-containing atmosphere. To keep the cells healthy, the medium was replaced every 2 days by fresh medium. When the cells became confluent (80 - 90%), they were passaged in a new culture flask to increase the cell numbers for the next experiments as well as to maintain the cells in the exponential growth.

Once, a sufficient amount of cells was obtained, 4×10^4 cells/cm^2 were seeded inside the channels of the cryo-chip, which were previously sterilized by 70% ethanol for one hour. As control samples, unmodified LAPS chips and elastic polymer coverslips (uncoated, 180 µm thick, ibidi GmbH, Germany) were used after they were mounted in the same way to the bottomless microfluidic slides (see Section 2.4). The culture medium was replaced with fresh one every 24 h. After the cells were incubated for 48 h, the cell viability was analyzed using a Cell Counting Kit (CCK)-8 assay (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). CCK-8 test solution at a 1:10 dilution in the medium was prepared and sterilized by filtering through a filter (0.2 µm pore size). After the channels were washed three times with this solution, the cells were incubated in the incubator with the same solution for 1 hour. Negative control samples (without cells) were also prepared and the same procedure was performed. After the incubation, the solution in each channel was thoroughly mixed to ensure homogenous concentration of the formazan dye produced by the cell activity, and it was transferred in a 96-well plate. The absorbance (A) was measured at 450 nm with a reference wavelength of 650 nm on a microplate reader (Spark, Tecan Group Ltd., Switzerland). The relative absorbance (RA) was calculated as follows

(see Eq. (1)):

$$RA = (A_{\text{test group}}) - (A_{\text{blank group without cells}}) - (A_{\text{reference at 650 nm}}). \quad (1)$$

2.6. On-sensor cryopreservation and thawing

In the next step, the channels of the cryo-chip were washed twice with a cryoprotectant solution comprised of 90% FCS supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and subsequently, the channels were filled with this solution. The filter sets were connected to the inlet and the outlet of the channels. Thereafter, the chips were placed in a 3D-printed freezing container (Fig. 1b), and then transferred to a -80 °C freezer. The freezing container was designed and printed by a stereolithography (SLA) 3D printer (for details, see Fig. S2 in Supplementary Information). The samples were kept in the freezer overnight (at least 12 h). The frozen chip was thawed as rapidly as possible by transferring it directly to the incubator (37 °C). The cryoprotectant solution inside the channels was removed by flushing the channels three times with fresh culture medium (37 °C) as soon as the ice crystals disappeared. The cells were analyzed immediately after thawing and after an incubation for 12 h with the method described in Section 2.5. The cell recovery was calculated as follows (see Eq. (2)):

$$\text{Recovery} = (RA_{\text{after thawing}}) \,/\, (RA_{\text{before freezing}}) \times 100\%. \quad (2)$$

All experiments were repeated at least three times. All data presented in this work were shown as the means and standard deviation (SD) unless otherwise indicated. Statistical significance between populations was calculated by using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc analysis; a P-value of <0.05 is considered as significant.

2.7. Differential detection of extracellular acidification after OSC

The cryo-chip, composed of the LAPS chip modified with the electrospun PEVA fibers, treated with the O_2 plasma, was used for the following proof-of-concept measurements. One of the two channels of the cryo-chip was identified as a "reference channel" (without cells), while the other was identified as an "active culture channel" (with cells). This enables differential measurements between the channels with and without cells. The cell culturing, cryopreservation and thawing were performed as described in Sections 2.5. and 2.6. All application steps except cell seeding were performed in the same way for both channels. After thawing, the cryoprotectant solution within the channels was immediately replaced with a modified measurement medium, which consists of the Ham's F-12 cell culture medium supplemented with 25 mM D-glucose, 5% FCS, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. No sodium bicarbonate or 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) were used as the medium should not be highly buffered during the measurements. A self-made micro-agar salt-bridge was developed inside the tip of disposable micropipette tips (200 µL)(Fig. 1c); and it was sterilized using an autoclave to maintain the sterility inside the cryo-chip during the measurements. The details about the preparation steps of this salt-bridge are summarized in Fig. S3 (Supplementary Information). The 3D-printed connectors, tubes and 10 mL glass syringe containing the measurement medium were assembled under aseptic conditions in a laminar flow cabinet. A controlled pump system (neMESYS290N, Cetoni) was applied to supply the medium to the cells inside the channels. A 3D-printed adapter to create an ohmic rear side connection of the LAPS was attached to the cryo-chip (Fig. S4, Supplementary Information); then, it was placed in a self-developed scanning LAPS measurement set-up containing two identical reference electrodes (DriRef-2SH, World Precision Instruments Ltd) and a heated plate for temperature control (ibidi GmbH, Germany), set to 37 °C. The differential scanning LAPS measurements were carried out to monitor the extracellular acidification of the cells. Fig. 1d illustrates how a chemical image is obtained: For both channels, the chemical images were recorded with a constant

bias voltage of 0.4 V obtained from the inflection points of the previously recorded I/V curves. More details of the measurement mode of LAPS can be found elsewhere (Miyamoto et al., 2013; Özsoylu et al., 2020). The channels of the cryo-chip were scanned step-wise with a width of 200 µm. In this way, an image composed of 19×46 measurement spots was obtained for each channel, which is exemplarily shown in Fig. 1d, bottom part. To correctly evaluate the photocurrent (I) change for each measurement point, internal normalization by subtracting the possible drift effect observed in the reference channel was performed as follows (see Eq. (3)):

$$I_n = [(I_{AC\ \text{after thawing}}) - (I_{AC\ \text{initial}})] - [(I_{RC\ \text{after thawing}}) - (I_{RC\ \text{initial}})]. \quad (3)$$

where I_n is the normalized photocurrent, I_{AC} is the photocurrent in the active culture channel, and I_{RC} is the photocurrent in the reference channel.

3. Results and discussion

3.1. Surface characteristics

Various characterization techniques, such as scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), digital microscopy and contact angle measurements, were performed to understand the characteristics of the PEVA fibers and various surfaces. The average diameter of PEVA electrospun fibers was 3.3 ± 0.5 µm. Fig. 2a shows the representative AFM height images of various surfaces. The modification of the LAPS surface with the PEVA fibers increases the surface roughness and area. Moreover, the hydrophilic LAPS surface was turned into a hydrophobic state (high contact angle values) by the attachment of the fibers (Fig. 2b). As wettability is one of the most important factors to enhance cell-substrate interaction and cells mostly tend to prefer hydrophilic surfaces (Chen et al., 2018), O_2 plasma treatment was performed to obtain again a hydrophilic surface (low contact angle) (Fig. 2b). The treatment did not influence the integrity of the fibers (Fig. S5, Supplementary Information). Almost all fibers were in contact with the LAPS surface as the fibers coalesced one with the other in junctions and also formed a melded and flattened morphology on the sensor surface (Fig. S6, Supplementary Information).

3.2. Cell responses to on-sensor cryopreservation (OSC)

The morphology and viability of the CHO-K1 cells were analyzed just before and after performing the OSC, as these parameters are fundamentally important to provide evidence about their general health and response to the process of freezing and thawing on different surfaces. Before freezing, the cells grown on the LAPS surface, which was modified with PEVA fibers, represented their typical morphological characteristics being well-spread, polygonal in shape and elongated as epithelial cells (Porter et al., 1973) (Fig. 3a, "surface 3"). The same results were obtained when the modified surface was treated with O_2 plasma ("surface 4"). In contrast, the cells grown on the surface of the polymer coverslip ("surface 1") or the unmodified LAPS ("surface 2") mostly showed a spindle-like or more rounded-like morphology and the culture could not reach full confluence on these surfaces. These results were in good agreement with the absorbance values before freezing (Fig. 3b), indicating the cell viability analyzed with the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The lowest absorbance values, indicating a relatively low viability, were found on the hydrophobic polymer coverslip ("surface 1"). The cell viability was observed to be high on the LAPS surface modified with PEVA fibers ("surface 3"), although the wettability of this surface has been quite low in Fig. 2b. The low wettability might be attributed to the increased roughness of the surface (Chen et al., 2018), which comes from the incorporation of PEVA fibers (Fig. 2a). Besides, the high surface area of the electrospun fibers can enhance the interaction between the scaffolds and adsorbed species (e.g., cells, proteins) so that fibrous surfaces are prone to have more adsorption capacity (Leong et al., 2009; Isık et al., 2016; Isık and Demir, 2018). The highest absorbance values,

which indicate a relatively high viability, were observed for the LAPS surface modified with PEVA fibers and then treated with O_2 plasma ("surface 4") that is correlated with the enhanced wettable property of the surface (Fig. 2b). Above all, many other parameters such as chemical composition, stiffness and elasticity of the polymer could cause a synergistic effect for the cell behavior, leading to an the improved adsorption on the sensor surface.

Immediately after thawing, most cells cryopreserved on the unmodified LAPS surface showed a cryo-injury phenotype characterized by a disrupted membrane and released cytosol (Fig. 3a, "surface 2"). Partial detachment of the cell monolayer was also observed on this surface (Fig. S7, Supplementary Information). Conversely, the cells cryopreserved on other surfaces displayed the same morphology as they showed before freezing (Fig. 3a). These observations were also validated by analyzing the cell viability. The lowest cell viability was seen on the unmodified LAPS surface (Fig. 3c, "surface 2"). Remarkably, it was noticed that the cell viability was also high on the elastic polymer coverslip (Fig. 3c, "surface 1"), although the lowest viability had been seen in this surface before freezing (Fig. 3b, "surface 1"). Possible explanations for this cell behavior with regard to the surface elasticity are discussed in detail in the next paragraph. The absolute absorbance values for all surfaces decreased immediately after thawing versus before freezing. This is usually attributed to the thermal shock and mechanical stress for the cells during the freezing and thawing process. Thus, the cells were allowed to recover by an incubation for 12 h after thawing (Fig. 3d), which is also important to observe the cell progress such as possible post-thawing cell death (Baust et al., 2009). After the incubation, the highest viability was observed again for the LAPS surface, which was modified with PEVA fibers and then treated with O_2 plasma (Fig. 3d, "surface 4").

Fig. 4 depicts the cell recovery in response to OSC. The highest recovery among the sensor surfaces was seen on the LAPS surface, modified with elastic PEVA fibers and then treated with O_2 plasma. The beneficial effects of elastic polymers on adherent cell cryopreservation were previously discussed in literature (Rutt et al., 2019; Batnyam et al., 2017; Liu and McGrath, 2007). It was hypothesized that the linear thermal expansion coefficient (α_L) of the substrate should match with that of the ice, formed between the substrate and the cell membrane in contact during the cooling and warming process. Otherwise, different length changes can create gradients of mismatch stress, which are likely relieved through the formation of cracking, blistering, buckling and disintegration (Rutt et al., 2019; Liu and McGrath, 2007). The unmodified LAPS surface consists of Ta_2O_5. The α_L of Ta_2O_5 (3.6×10^{-6}/K) (Tien et al., 2000) is approximately 15 times lower than the α_L of ice (55×10^{-6}/K) (Marchenko, 2018). This difference could be the reason for the low cell recovery (Fig. 4, "LAPS") as well as for the cell detachment and partial monolayer loss observed on the unmodified LAPS samples. Similar observations were previously reported for Chinese hamster fibroblast cells cryopreserved on a rigid glass surface (Rutt et al., 2019). Therefore, the PEVA copolymer with a vinyl acetate (VA) comonomer (weight percent of 40%) was particularly preferred for this study as a higher concentration of vinyl acetate ensures larger α_L values (approx. 550×10^{-6}/K as a polymer film) and elasticity (González-Benito et al., 2015). Although the α_L of PEVA is approximately 10 times higher than the α_L of ice, this mismatch stress could be stored as elastic strain energy in the fibers as the elasticity of the PEVA fibers (Young's modulus of elasticity: approx. 0.0034 GPa) (Wang and Deng, 2019) is highly greater than that of ice (Young's modulus of elasticity: approx. 9 GPa) (Rutt et al., 2019). In addition, the polymer can also keep elasticity until its glass-transition temperature (T_g). In this respect, the PEVA polymer shows superiority with its low T_g (-20 °C) (Wang and Deng, 2019), which is lower than the ice nucleation temperature (usually between -6 °C and -9 °C) in the extracellular compartment, when 10% DMSO was used as a cryoprotective agent (Meneghel et al., 2019). Besides, as it was reported previously (Parizek et al., 2009), the plasma treatment on surfaces can increase the density of focal adhesion points of cells, which could decrease the harmful ice formation between the cell membrane and the substrate in contact (Bissoyi et al., 2016). This might explain the high cell recovery on the samples treated with O_2 plasma after OSC (Fig. 4, "LAPS+fibers+PT").

Moreover, the cells grown and cryopreserved on the elastic polymer coverslip as a reference sample displayed a high cell recovery, although the cell viability had been found to be lower than on other surfaces (Fig. 3b, "surface 1"). This also supports the above-mentioned findings and the hypothesis that the usage of the elastic polymers has beneficial effect on adherent cell cryopreservation (Rutt et al., 2019; Batnyam et al., 2017; Liu and McGrath, 2007).

It is also important to note that the size and shape of the growing ice crystals during freezing and thawing are associated with cell recovery (Biggs et al., 2017). The alterations in surface wettability and topography modulate these characteristics of ice crystals (Li and Guo, 2018); therefore, the increased wettability and roughness (Fig. 2) after modifications of the sensor surface could be associated with the high cell recovery observed in this study. Besides, ice recrystallization (growth in ice crystals, especially during thawing) is another contributor to cryo-injury (Biggs et al., 2017). It should be further explored whether the PEVA exhibits an ice recrystallization inhibition (IRI) activity, which was recently shown in polymers such as poly(vinyl alcohol) (PVA) (Biggs et al., 2019).

3.3. Proof-of-concept measurements

The performance of the cryo-chip using the OSC strategy and adherent mammalian cells (CHO-K1) as a model system was validated by differential LAPS measurements after thawing. Fig. 5 depicts three chemical images to visualize the extracellular acidification of the cells after OSC (-80 °C) using the cryo-chip. Fig. 5a shows the chemical image with the photocurrent scale before cell culturing as a result of an initial (point zero) measurement performed with the measurement medium (pH 7.4) without cells. As expected, both channels show rather similar photocurrent signals. Thereafter, CHO-K1 cells were cultured only within the active culture channel, and the OSC was performed overnight at -80 °C. Immediately after thawing, both channels were filled with fresh measurement medium (pH 7.4), and connected to the measurement set-up. The chemical image (Fig. 5b) shows that in contrast to the reference channel, the photocurrent values slightly increase in the active culture channel, which indicates not only extracellular acidification but also cell recovery after OSC. Furthermore, the increase of the photocurrent values within the active culture channel was more visible 6 h after thawing (Fig. 5c). To show these alterations in detail, the average photocurrent values of each channel are given as bar diagrams before cell culturing (Fig. 5d), immediately after thawing (Fig. 5e) and 6 h after thawing (Fig. 5f). Compared to the initial (zero point) photocurrent values of each channel, the average photocurrent change in the active culture channel was 7.2 nA $\pm$ 1.1 nA immediately after thawing and 36.6 nA $\pm$ 4.7 nA, 6 h after thawing. Instead, the average photocurrent change in the reference channel was -1.8 nA $\pm$ 5.7 nA immediately after thawing and -6 nA $\pm$ 4.7 nA, 6 h after thawing (Fig. 5g). As there are no cells within the reference channel, the photocurrent changes in this channel indicate a negative sensor signal drift. Despite the fact that these values were rather small, it describes the drift behavior of the overall LAPS chip, which also influences the results of active culture channel. Therefore, this drift behavior should be compensated to correctly evaluate the contribution of the extracellular acidification in the active culture channel. To carry out this, differential chemical imaging was implemented by performing a data normalization. This relies on i) subtracting the photocurrent values of each channel (Fig. 5b or Fig. 5c) from their initial (zero point) values (Fig. 5a) and ii) deducting the corresponding drift value seen in the reference channel (Fig. 5g) from the subtracted photocurrent values (for details about the calculation formula, see Section 2.7). In this way, the differential chemical images of the extracellular acidification are shown in Fig. 6.

The optical image of the channels of the cryo-chip after the OSC is displayed in Fig. 6a. This optical image corresponds to the differential chemical images of pH_e with the photocurrent scale immediately after thawing (Fig. 6b) and 6 h after thawing (Fig. 6c). The average increase in the normalized photocurrent in the active culture channel was 9.1 nA $\pm$ 1.1 nA immediately after thawing (Fig. 6b) and 42.6 nA $\pm$ 4.7 nA, 6 h after thawing (Fig. 6c), which corresponds to a pH shift (acidification) at the LAPS surface of $\Delta pH \approx 0.35$ and $\Delta pH \approx 1.64$, respectively, when considering a pH sensitivity of 26 nA/pH of the LAPS chip. The above-mentioned pH shifts indicate that the average pH value

within the active culture channel changed from pH 7.4 to ca. pH 7.05 immediately after thawing and from pH 7.4 to ca. pH 5.76, 6 h after thawing. This extracellular acidification, indicating post-thaw cell viability, also confirms the previous results observed using the CCK-8 assay (Fig. 3c and Fig. 3d, "surface 4"). In terms of the analysis speed, it is worth to note that the utilized CCK-8 assay needs 1 - 4 h incubation time for the first analysis after thawing. Although some label-based approaches, like lactate dehydrogenase (LDH)- or adenosine triphosphate (ATP)-based assays allow measurement after 10 min incubation, they mostly have some drawbacks such as time-intensive application steps, being an endpoint analysis where the cells are sacrificed by a lysis buffer for analysis, and are potentially interfering with the cellular systems under study (Vetten et al., 2013). The presented cryo-chip system exhibits remarkable superiority through its short preparation time of usually some minutes required for the first analysis. To the best of our knowledge, this is also the first report to show that analysis of adherent cell activity can be measured immediately after thawing in a label-free, quantitative, and non-invasive manner.

Moreover, the results show that cryopreservation of cells on a biosensor surface and signal analysis after thawing without the need for additional cell culturing steps, e.g., centrifugation, seeding, and immobilization of cells, are possible. Large scale and standardized production of such preserved cryo-chips and cold-chain transportation of them to the end-user could support their practical applicability, that is being in a ready-to-use format even in facilities, which do not have established infrastructure and skilled staff for cell culturing. This also ameliorates the commercialization potential of cell-based biosensors, which is one of the main challenges in this field (Ye et al., 2019). Moreover, it was emphasized that microfluidic systems could be an emerging milestone for cryopreservation in the future, as they offer precise control on washing, freezing-thawing cycles, exchange of cryoprotectant solution and automation (Zhao and Fu, 2017). With recent breakthroughs in biosensors and their integration with organ-on-a-chip (OoC) systems, the need for plug-and-play platforms is increasing in this field day by day (Ashammakhi et al., 2020). Therefore, the presented biosensor chip using OSC strategy could become a key element for these systems to achieve ready-to-use on-site as well as all-in-one solutions.

4. Conclusions and future work

The cryo-chip system introduced in this study using a hybrid (rigid/elastic) structure is effective, compared to an unmodified LAPS surface, for keeping cells viable during on-sensor cryopreservation. A proof-of-concept experiment was performed for the application of the chip system after OSC with CHO-K1 cells. It was confirmed by chemical images and detection of the extracellular acidification that the cells cryopreserved on the modified sensor surface survived. These findings showed, for the first time, that a cryopreservation of adherent cells on a sensor is possible. The introduced cryo-chip system can open up a new possibility for "ready-to-use on-site" applications. Being able to prepare the entire system at the manufacturing stage and to send it via a cold-chain transport further eliminates potential run-to-run and operator-to-operator variability, resulting in more reproducible results.

In future, the new introduced OSC may find applications in the laboratory and the clinical fields. However, the full potential of this concept should also be explored by studying other limited cell types such as stem cells, primary cells, and even organ-like structures such as organoids. The cryo-chip could potentially address the needs for assisted reproductive technologies, enabling cryopreservation and diagnosis of sperm, oocytes as well as gametes and embryos as requested in literature (Zhao and Fu, 2017). Experiments with adherent cells under zero-/micro-gravity are challenging due to the loss of the cell-surface contact and the difficult handling of the cells in space. Here, sending this kind of ready-to-use sensing platform into space could allow to perform extraterrestrial experiments on-site. This could facilitate the real-time monitoring of adherent cells on chip level to study extraterrestrial influences (e.g., cosmic radiation) on cell biology.

Acknowledgements

Dua Özsoylu (DÖ) would like to acknowledge the PhD research scholarship grant from Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK) under BIDEB 2214-A. The authors also gratefully thank the Federal Ministry of Education and Research of Germany (Opto-Switch FKZ: 13N12585). This study is a part of PhD thesis study of DÖ (thesis number DEU. HSI. PhD- 2013970198) in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Turkey. Furthermore, the authors would like to thank H. Iken for the LAPS chip processing, D. Rolka for the support in SEM and AFM image analysis, B. Schneider for 3D-printed structures and Th. Schnitzler for the support in cell culturing.

CRediT authorship contribution statement

Dua Özsoylu: Writing - original draft, conceptualization, investigation, methodology, formal analysis, visualization, writing - review & editing. **Tuğba Isık:** Investigation. **Mustafa M. Demir:** Formal analysis, validation. **Michael J. Schöning:** Supervision, formal analysis, validation, writing - review & editing. **Torsten Wagner:** Supervision, funding acquisition, validation, writing - review & editing.

References

Agrawal, A., Prakash, Y., 2014. Obesity, metabolic syndrome, and airway disease. Immunol. Allergy Clin. North Am. 34, 785–796. doi:10.1016/j.iac.2014.07.004.

Ashammakhi, N., Darabi, M.A., Çelebi-Saltik, B., Tutar, R., Hartel, M.C., Lee, J., Hussein, S.M., Goudie, M.J., Cornelius, M.B., Dokmeci, M.R., Khademhosseini, A., 2020. Microphysiological Systems: Next Generation Systems for Assessing Toxicity and Therapeutic Effects of Nanomaterials. Small Methods 4, 1900589. doi:10.1002/smtd.201900589.

Banerjee, P., Kintzios, S., Prabhakarpandian, B., 2013. Biotoxin detection using cell-based sensors. Toxins (Basel). 5, 2366–2383. doi:10.3390/toxins5122366.

Batnyam, O., Suye, S.i., Fujita, S., 2017. Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature. RSC Adv. 7, 51264–51271. doi:10.1039/C7RA10604A.

Baust, J.G., Gao, D., Baust, J.M., 2009. Cryopreservation: an emerging paradigm change. Organogenesis 5, 90–96. doi:10.4161/org.5.3.10021.

Beier, A., Schulz, J., Dörr, D., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J., Zimmermann, H., 2011. Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. Cryobiology 63, 175–185. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.06.003.

Biggs, C.I., Bailey, T.L., Ben Graham, Stubbs, C., Fayter, A., Gibson, M.I., 2017. Polymer mimics of biomacromolecular antifreezes. Nat. Commun. 8, 1546. doi:10.1038/s41467-017-01421-7.

Biggs, C.I., Stubbs, C., Graham, B., Fayter, A.E.R., Hasan, M., Gibson, M.I., 2019. Mimicking the ice recrystallization activity of biological antifreezes. when is a new polymer "active"? Macromol. Biosci. 19, 1900082. doi:10.1002/mabi.201900082.

Bissoyi, A., Bit, A., Singh, B.K., Singh, A.K., Patra, P.K., 2016. Enhanced cryopreservation of MSCs in microfluidic bioreactor by regulated shear flow. Sci. Rep. 6, 35416. doi:10.1038/srep35416.

Chen, L., Yan, C., Zheng, Z., 2018. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. Mater. Today 21, 38–59. doi:10.1016/j.mattod.2017.07.002.

Cheng, M.S., Lau, S.H., Chan, K.P., Toh, C.S., Chow, V.T., 2015. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. Biosens. Bioelectron. 70, 74–80. doi:10.1016/j.bios.2015.03.018.

DeBerardinis, R.J., Thompson, C.B., 2012. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? Cell 148, 1132–1144. doi:10.1016/j.cell.2012.02.032.

González-Benito, J., Castillo, E., Cruz-Caldito, J.F., 2015. Determination of the linear coefficient of thermal expansion in polymer films at the nanoscale: influence of the composition of EVA copolymers and the molecular weight of PMMA. Phys. Chem. Chem. Phys. 17, 18495–18500. doi:10.1039/C5CP02384J.

Gupta, N., Renugopalakrishnan, V., Liepmann, D., Paulmurugan, R., Malhotra, B.D., 2019. Cell-based biosensors: recent trends, challenges and future perspectives. Biosens. Bioelectron. 141, 111435. doi:10.1016/j.bios.2019.111435.

Isık, T., Demir, M.M., 2018. Medical waste treatment via waste electrospinning of PS. Fibers Polym. 19, 767–774. doi:10.1007/s12221-018-1037-0.

Isık, T., Horzum, N., Yıldız, Ü.H., Liedberg, B., Demir, M.M., 2016. Utilization of electrospun polystyrene membranes as a preliminary step for rapid diagnosis. Macromol. Mater. Eng. 301, 827–835. doi:10.1002/mame.201600127.

Jiang, D., Liu, Y., Jiang, H., Rao, S., Fang, W., Wu, M., Yuan, L., Fang, W., 2018. A novel screen-printed mast cell-based electrochemical sensor for detecting spoilage bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones) in freshwater fish. Biosens. Bioelectron. 102, 396–402. doi:10.1016/j.bios.2017.11.040.

Lee, C.S., Kim, S., Kim, M., 2009. Ion-sensitive field-effect transistor for biological sensing. Sensors 9, 7111–7131. doi:10.3390/s90907111.

Leong, M.F., Chian, K.S., Mhaisalkar, P.S., Ong, W.F., Ratner, B.D., 2009. Effect of electrospun poly(D,L-lactide) fibrous scaffold with nanoporous surface on attachment of porcine esophageal epithelial cells and protein adsorption. J. Biomed. Mater. Res. Part A 89A, 1040–1048. doi:10.1002/jbm.a.32061.

Li, Q., Guo, Z., 2018. Fundamentals of icing and common strategies for designing biomimetic anti-icing surfaces. J. Mater. Chem. A 6, 13549–13581. doi:10.1039/C8TA03259A.

Liu, B., McGrath, J., 2007. Freezing osteoblast cells attached to hydroxyapatite discs and glass coverslips: mechanisms of damage. Sci. China Ser. E Technol. Sci. 50, 248–256. doi:10.1007/s11431-007-0021-5.

Marchenko, A., 2018. Thermo-mechanical loads of confined sea ice on structures. Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 376, 20170341. doi:10.1098/rsta.2017.0341.

Meneghel, J., Kilbride, P., Morris, J.G., Fonseca, F., 2019. Physical events occurring during the cryopreservation of immortalized human T cells. PLoS One 14, e0217304. doi:10.1371/journal.pone.0217304.

Miyamoto, K.I., Ichimura, H., Wagner, T., Schöning, M.J., Yoshinobu, T., 2013. Chemical imaging of the concentration profile of ion diffusion in a microfluidic channel. Sensors Actuators B Chem. 189, 240–245. doi:10.1016/j.snb.2013.04.057.

Mookerjee, S.A., Goncalves, R.L., Gerencser, A.A., Nicholls, D.G., Brand, M.D., 2015. The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1847, 171–181. doi:10.1016/j.bbabio.2014.10.005.

Özsoylu, D., Kizildag, S., Schöning, M.J., Wagner, T., 2019. Effect of plasma treatment on the sensor properties of a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Phys. status solidi 216, 1900259. doi:10.1002/pssa.201900259.

Özsoylu, D., Kizildag, S., Schöning, M.J., Wagner, T., 2020. Differential chemical imaging of extracellular acidification within microfluidic channels using a plasma-functionalized light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Phys. Med. 10, 100030. doi:10.1016/j.phmed.2020.100030.

Parak, W.J., George, M., Domke, J., Radmacher, M., Behrends, J., Denyer, M., Gaub, H., 2000. Can the light-addressable potentiometric sensor (LAPS) detect extracellular potentials of cardiac myocytes? IEEE Trans. Biomed. Eng. 47, 1106–1113. doi:10.1109/10.855939.

Parak, W.J., Hofmann, U.G., Gaub, H.E., Owicki, J.C., 1997. Lateral resolution of light-addressable potentiometric sensors: an experimental and theoretical investigation. Sensors Actuators A Phys. 63, 47–57. doi:10.1016/S0924-4247(97)80428-1.

Parizek, M., Kasalkova, N., Bacakova, L., Slepicka, P., Lisa, V., Blazkova, M., Svorcik, V., 2009. Improved adhesion, growth and maturation of vascular smooth muscle cells on polyethylene grafted with bioactive molecules and carbon particles. Int. J. Mol. Sci. 10, 4352–4374. doi:10.3390/ijms10104352.

Park, J.S., Grijalva, S.I., Jung, D., Li, S., Junek, G.V., Chi, T., Cho, H.C., Wang, H., 2019. Intracellular cardiomyocytes potential recording by planar electrode array and fibroblasts co-culturing on multi-modal CMOS chip. Biosens. Bioelectron. 144, 111626. doi:10.1016/j.bios.2019.111626.

Poghossian, A., Mai, D.T., Mourzina, Y., Schöning, M.J., 2004. Impedance effect of an ion-sensitive membrane: characterisation of an EMIS sensor by impedance spectroscopy, capacitance–voltage and constant–capacitance method. Sensors Actuators B Chem. 103, 423–428. doi:10.1016/j.snb.2004.04.071.

Poghossian, A., Yoshinobu, T., Simonis, A., Ecken, H., Lüth, H., Schöning, M.J., 2001. Penicillin detection by means of field-effect based sensors: EnFET, capacitive EIS sensor or LAPS? Sensors Actuators B Chem. 78, 237–242. doi:10.1016/S0925-4005(01)00819-X.

Porter, K., Prescott, D., Frye, J., 1973. Changes in surface morphology of chinese hamster ovary cells during the cell cycle. J. Cell Biol. 57, 815–836. doi:10.1083/jcb.57.3.815.

Rutt, T., Eskandari, N., Zhurova, M., Elliott, J.A., McGann, L.E., Acker, J.P., Nychka, J.A., 2019. Thermal expansion of substrate may affect adhesion of chinese hamster fibroblasts to surfaces during freezing. Cryobiology 86, 134–139. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.10.006.

Schöning, M.J., Brinkmann, D., Rolka, D., Demuth, C., Poghossian, A., 2005a. CIP (cleaning-in-place) suitable "non-glass" pH sensor based on a Ta_2O_5-gate EIS structure. Sensors Actuators B Chem. 111-112, 423–429. doi:10.1016/j.snb.2005.03.053.

Schöning, M.J., Wagner, T., Wang, C., Otto, R., Yoshinobu, T., 2005b. Development of a handheld 16 channel pen-type LAPS for electrochemical sensing. Sensors Actuators B Chem. 108, 808–814. doi:10.1016/j.snb.2005.01.055.

Sullivan, C.R., Mielnik, C.A., Funk, A., O'Donovan, S.M., Bentea, E., Pletnikov, M., Ramsey, A.J., Wen, Z., Rowland, L.M., McCullumsmith, R.E., 2019. Measurement of lactate levels in postmortem brain, iPSCs, and animal models of schizophrenia. Sci. Rep. 9, 5087. doi:10.1038/s41598-019-41572-9.

Thedinga, E., Kob, A., Holst, H., Keuer, A., Drechsler, S., Niendorf, R., Baumann, W., Freund, I., Lehmann, M., Ehret, R., 2007. Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. Toxicol. Appl. Pharmacol. 220, 33–44. doi:10.1016/j.taap.2006.12.027.

Tien, C.L., Lee, C.C., Chuang, K.P., Jaing, C.C., 2000. Simultaneous determination of the thermal expansion coefficient and the elastic modulus of Ta_2O_5 thin film using phase shifting interferometry. J. Mod. Opt. 47, 1681–1691. doi:10.1080/09500340008231417.

Vetten, M.A., Tlotleng, N., Tanner Rascher, D., Skepu, A., Keter, F.K., Boodhia, K., Koekemoer, L.A., Andraos, C., Tshikhudo, R., Gulumian, M., 2013. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. Part. Fibre Toxicol. 10, 50. doi:10.1186/1743-8977-10-50.

Wagner, T., Rao, C., Kloock, J., Yoshinobu, T., Otto, R., Keusgen, M., Schöning, M.J., 2006. "LAPS card"- a novel chip card-based light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Sensors Actuators B Chem. 118, 33–40. doi:10.1016/j.snb.2006.04.019.

Wagner, T., Vornholt, W., Werner, C.F., Yoshinobu, T., Miyamoto, K.I., Keusgen, M., Schöning, M.J., 2016. Light-addressable potentiometric sensor (LAPS) combined with magnetic beads for pharmaceutical screening. Phys. Med. 1, 2–7. doi:10.1016/j.phmed.2016.03.001.

Wang, K., Deng, Q., 2019. The thermal and mechanical properties of poly(ethylene-co-vinyl acetate) random copolymers (PEVA) and its covalently crosslinked analogues (cPEVA). Polymers (Basel). 11, 1055. doi:10.3390/polym11061055.

Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S., Ferrick, D.A., 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. Am. J. Physiol. Physiol. 292, C125–C136. doi:10.1152/ajpcell.00247.2006.

Ye, Y., Guo, H., Sun, X., 2019. Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. Biosens. Bioelectron. 126, 389–404. doi:10.1016/j.bios.2018.10.039.

Yoshinobu, T., Ecken, H., Poghossian, A., Simonis, A., Iwasaki, H., Lüth, H., Schöning, M.J., 2001. Constant-current-mode LAPS (CLAPS) for the detection of penicillin. Electroanalysis 13, 733–736. doi:10.1002/1521-4109(200105)13:8/9<733::AID-ELAN733>3.0.CO;2-N.

Zhao, G., Fu, J., 2017. Microfluidics for cryopreservation. Biotechnol. Adv. 35, 323–336. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.01.006.

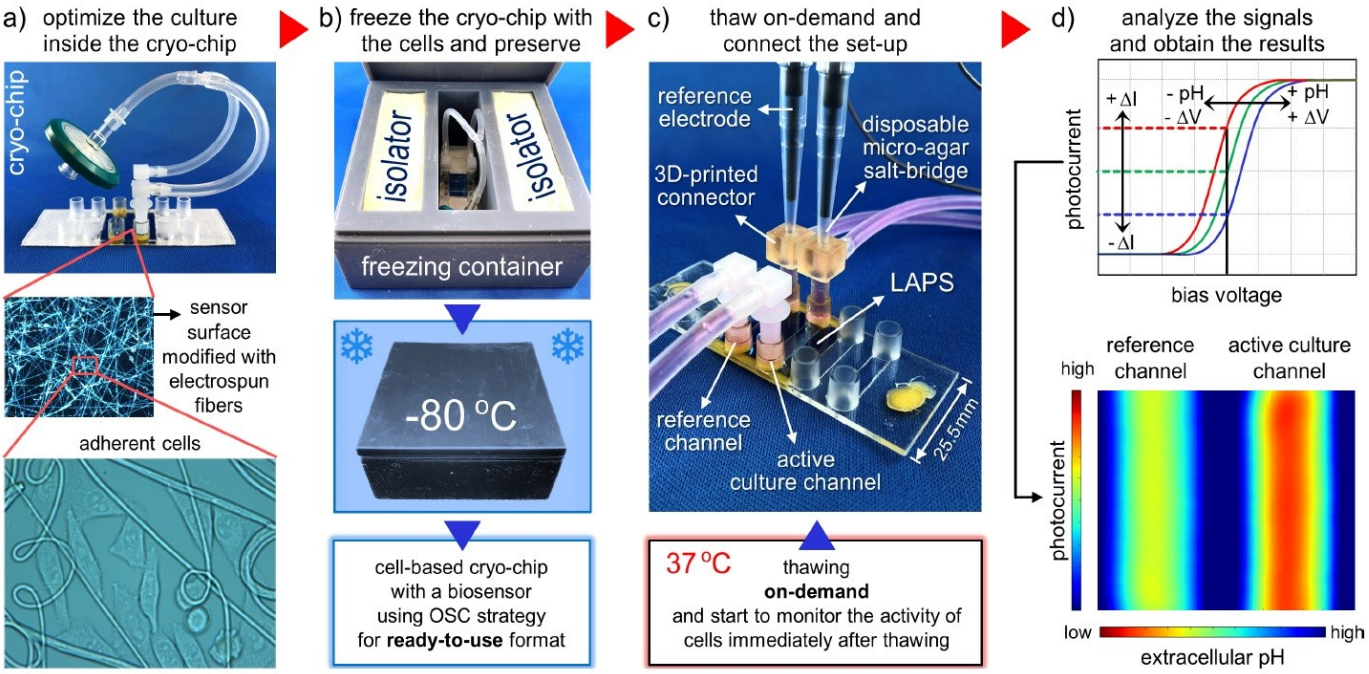


Fig. 1: On-sensor cryopreservation (OSC) offers ready-to-use on-site format for cell-based lab-on-a-chip devices: a) Photo of cryo-chip where a single sensor (LAPS) chip, which was modified with elastic electrospun PEVA fibers, is integrated in the microfluidic system. The system contains two identical and separated micro-channels to realize the OSC of adherent cells. b) 3D-printed freezing container designed for cryo-chips ensuring a standardized cooling rate. c) Photo of differential measurement set-up of the chip device. d) Schematic photocurrent vs. voltage (I/V) curves obtained from the set-up and representative differential chemical image to visualize the extracellular acidification inside the channels. The freezing container is available for up to 3 cryo-chips.

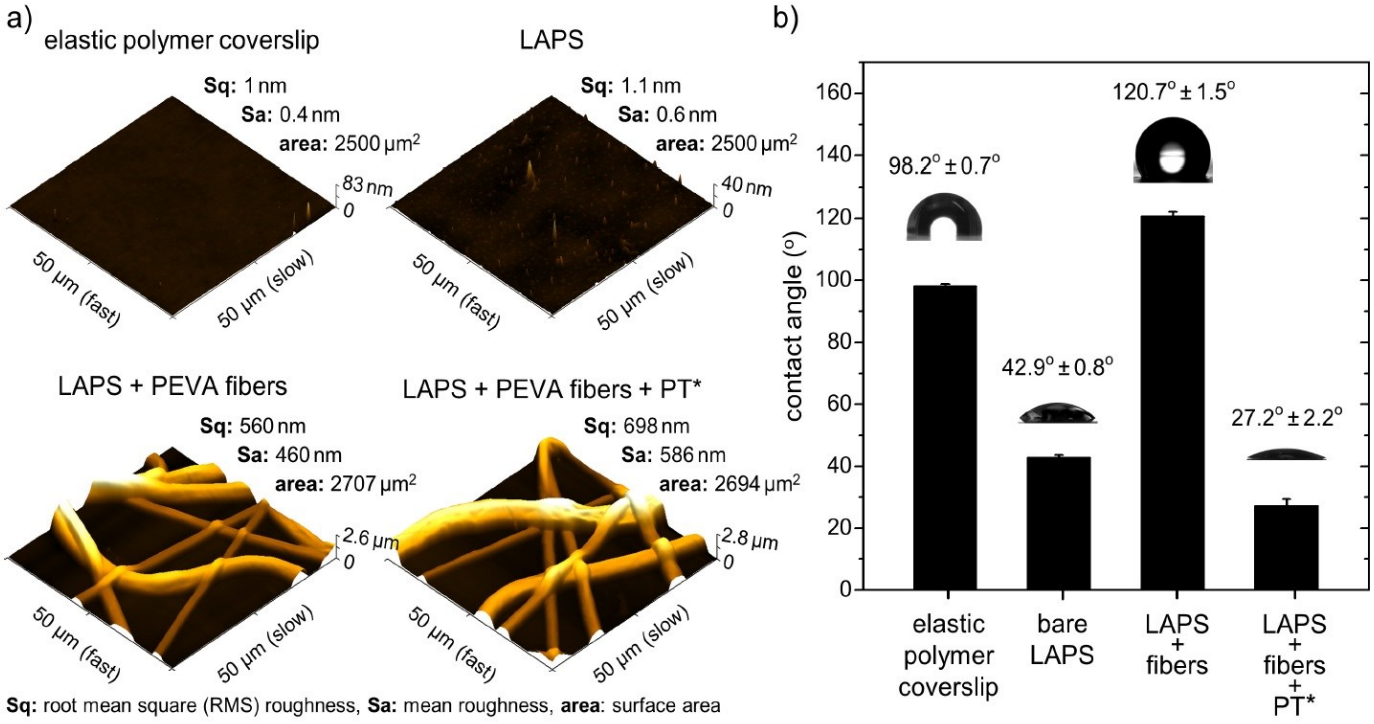


Fig. 2: The characteristics of various surfaces. a) Representative AFM height images showing surface topography, roughness and area. b) Sessile drop contact angle measurements of deionized (DI) water to indicate the wettability of the samples. *PT indicates O_2 plasma treatment for 30 s. The representative photos of the water droplets and the mean values of their contact angles are also presented above each column.

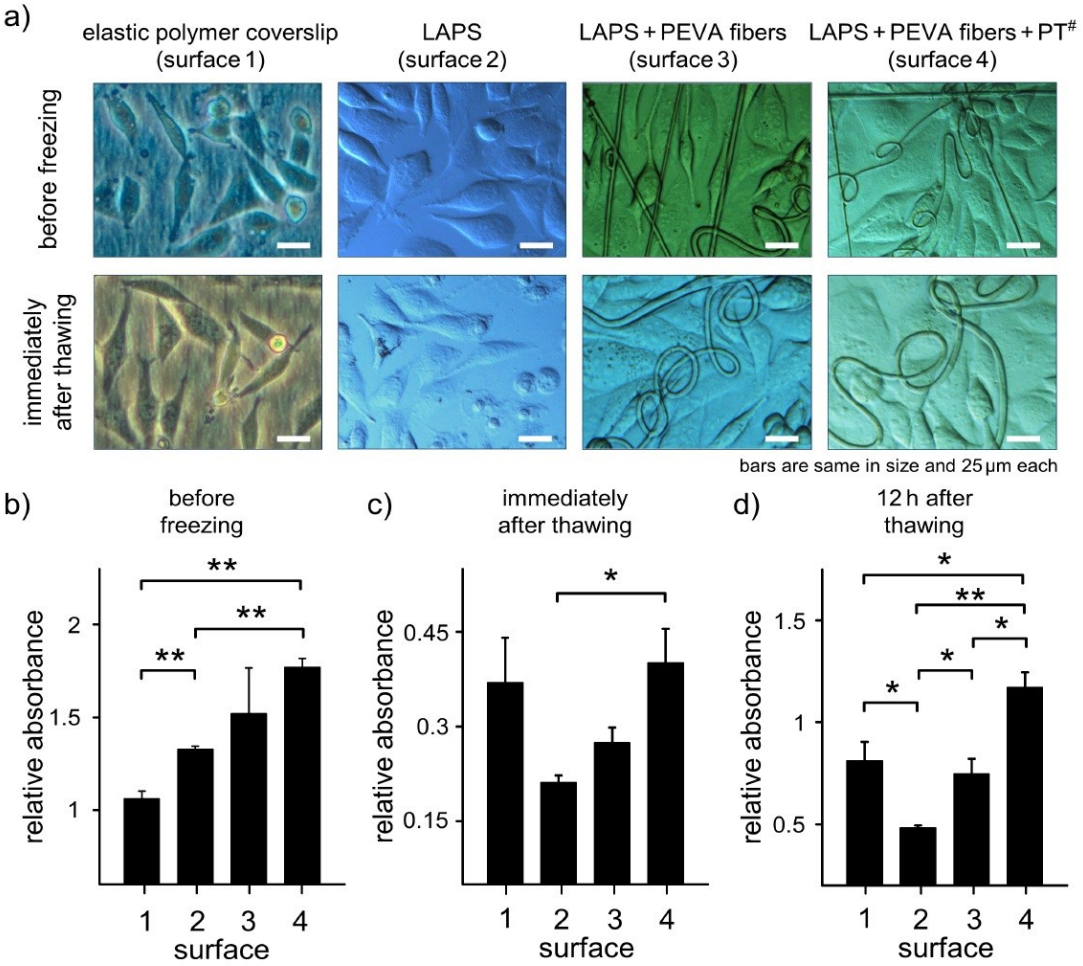


Fig. 3: Cell responses to the OSC (-80 °C, overnight) using the cryo-chip. a) Representative microscopic images of CHO-K1 cells on various surfaces to depict the cell morphology before freezing and immediately after thawing (#PT indicates O_2 plasma treatment for 30 s). Relative absorbance values from CCK-8 analysis to show the cell viability on the surfaces as elastic polymer coverslip (surface 1), LAPS (surface 2), LAPS modified with PEVA fibers (surface 3), and LAPS modified with PEVA fibers and treated with O_2 plasma (surface 4) b) before freezing, c) immediately after thawing, and d) 12 h after thawing; (*$P < 0.01$, **$P < 0.001$).

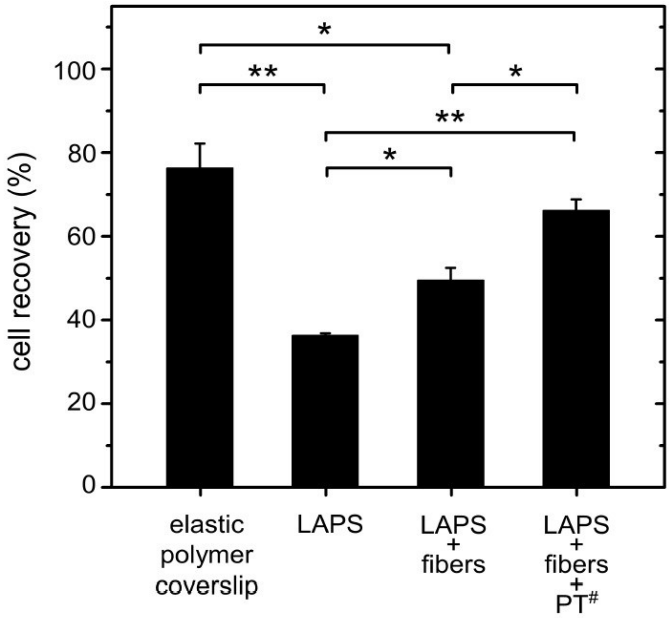


Fig. 4: Comparison of cell recovery obtained by an CCK-8 assay with regard to the OSC (-80 °C, overnight) for various surfaces. The recovery was analyzed according to cell viability just before freezing and 12 h after thawing. #PT indicates O_2 plasma treatment for 30 s. *$P < 0.01$, **$P < 0.001$.

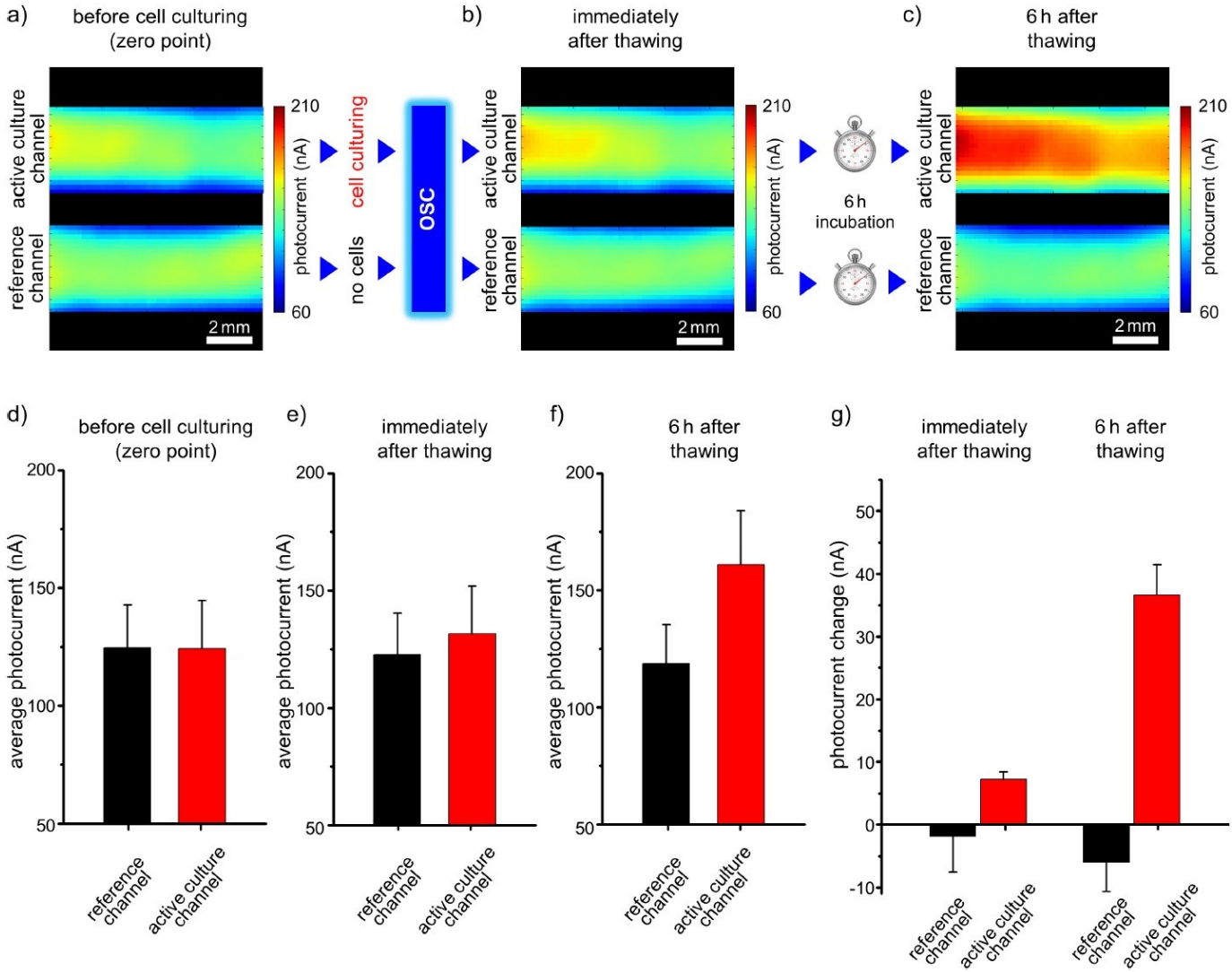


Fig. 5: Post-thawing photocurrent alterations after the OSC of CHO-K1 cells using the two-channel cryo-chip. The chemical images for each channel represent the photocurrent distributions measured a) before cell culturing (zero point), b) immediately after thawing, and c) 6 h after thawing. Comparison of the average photocurrents between the reference channel and the active culture channel corresponding to the chemical images d) before cell culturing (zero point), e) immediately after thawing, and f) 6 h after thawing. g) Photocurrent changes for each individual channel immediately after thawing, and 6 h after thawing. The cryo-chip, modified by electrospun PEVA fibers and treated with O_2 plasma, was used for the cryopreservation (-80 °C, overnight) of the cells in an adherent state. The same measurement medium (pH 7.4) was applied for all measurements. The increase in photocurrent indicates an extracellular acidification.

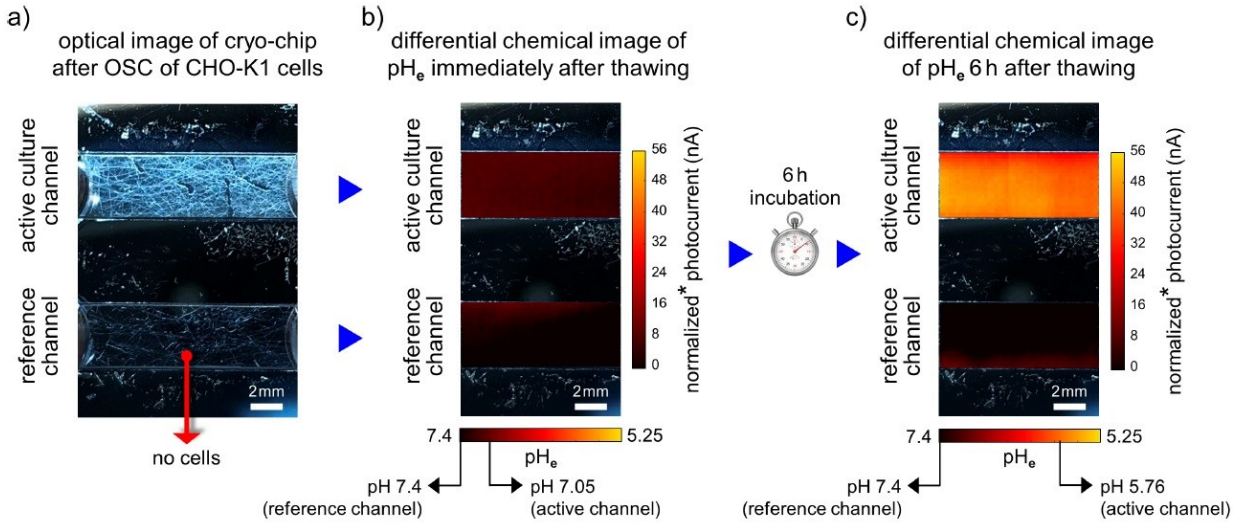


Fig. 6: Differential chemical images of extracellular acidification after the OSC of CHO-K1 cells using the two-channel cryo-chip. a) Optical image of the channels of the cryo-chip after the OSC. Differential chemical images of pH_e b) immediately after thawing, and c) 6 h after thawing. *The normalization was performed by subtracting the photocurrent values of each chemical image from their initial (zero point) values and further subtracting the drift values seen in the corresponding reference channel (for details, see Section 2.7 and Section 3.3). Extracellular pH (pH_e) was calculated from the photocurrent difference and the pH sensitivity (26 nA/pH) of the LAPS chip. The increase in photocurrent indicates the extracellular acidification.

Supplementary Information

On-sensor cryopreservation offers ready-to-use concept for cell-based lab-on-a-chip applications

*Dua Özsoylu [a, b], Tugba Isik [c, d], Mustafa M. Demir [d], Michael J. Schöning [a, e, *], Torsten Wagner [a, e, *]*

[a] *Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, 52428, Jülich, Germany*

[b] *Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340, Izmir, Turkey*

[c] *School of Chemistry, University of Bristol, Bristol, UK*

[d] *Department of Materials Science and Engineering, Izmir Institute of Technology, 35430 Izmir, Turkey*

[e] *Institute of Complex Systems (ICS-8), Research Centre Jülich GmbH, 52425, Jülich, Germany*

* Corresponding authors: Prof. Dr. Michael J. Schöning, Prof. Dr. Torsten Wagner
Emails: schoening@fh-aachen.de (M.J. Schöning); torsten.wagner@fh-aachen.de (T. Wagner)
Address: FH Aachen Campus Jülich, Institut für Nano- und Biotechnologien, Heinrich-Mußmann-Str. 1, 52428 Jülich, Germany

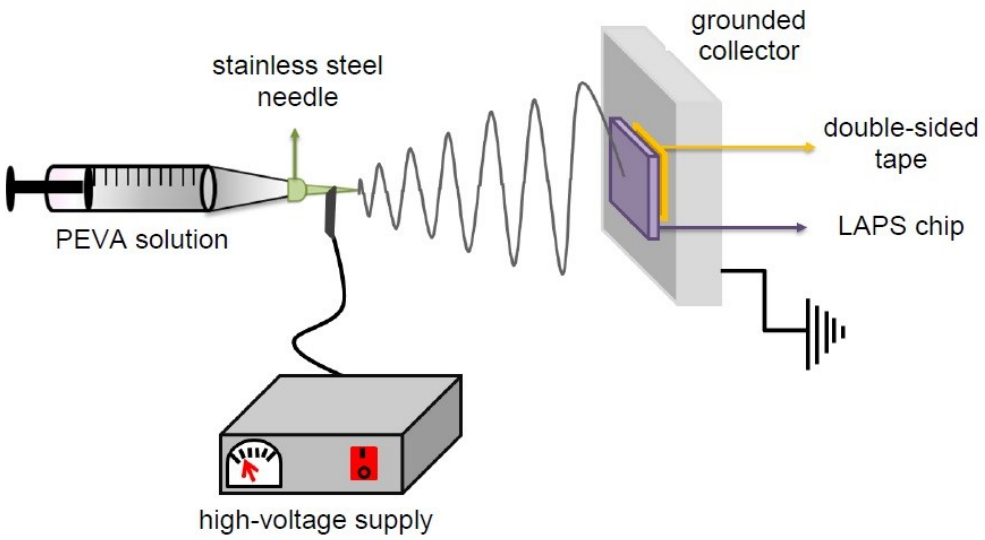


Fig. S1: Schematic representation of the electrospinning set-up for PEVA fiber coating of LAPS chips. Electrospinning is a technique that allows the fabrication of continuous fibers, which are able to mimic the fibrous structure of the extracellular matrix (ECM) [1]. Typically, the polymer solution is subjected to a high electrical voltage; the voltage can overcome the surface tension of the solution by allowing the ejection of a polymer jet from the tip. The jet is exposed to bending instabilities and forms a fibrillar structure due to elongation and evaporation of solvent, and is randomly collected onto a stationary collector [2].

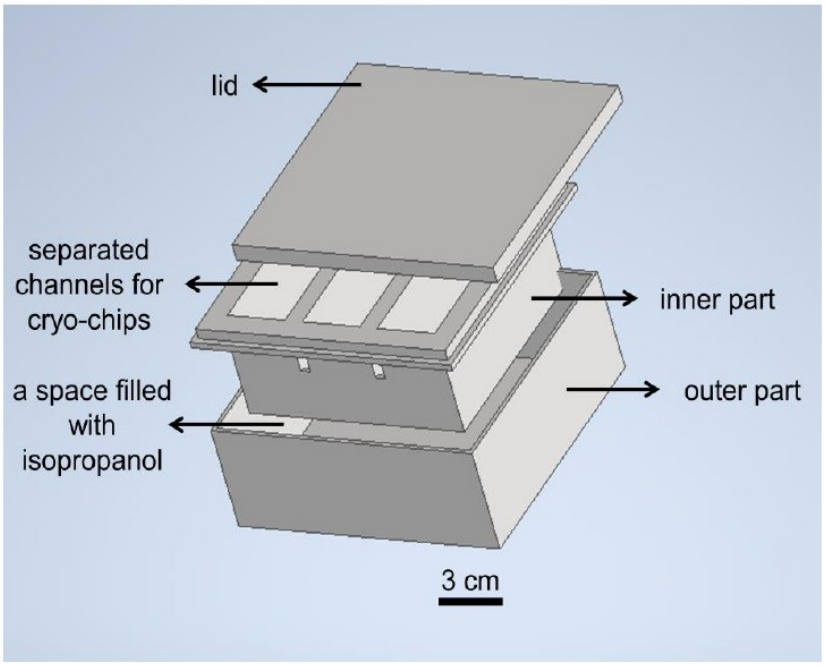


Fig. S2: 3D-printed freezing container for the cryo-chip. The distance between the inner part and the outer part is 1 cm and this space was filled with isopropanol (100%) before use. There is 0.5 cm distance between the channels and these spaces are also filled with the isopropanol when the inner part is inserted into the outer part, filled with the isopropanol. A 0.5 cm thick insulator felt is accommodated into the each channel after the cryo-chip is placed into it.

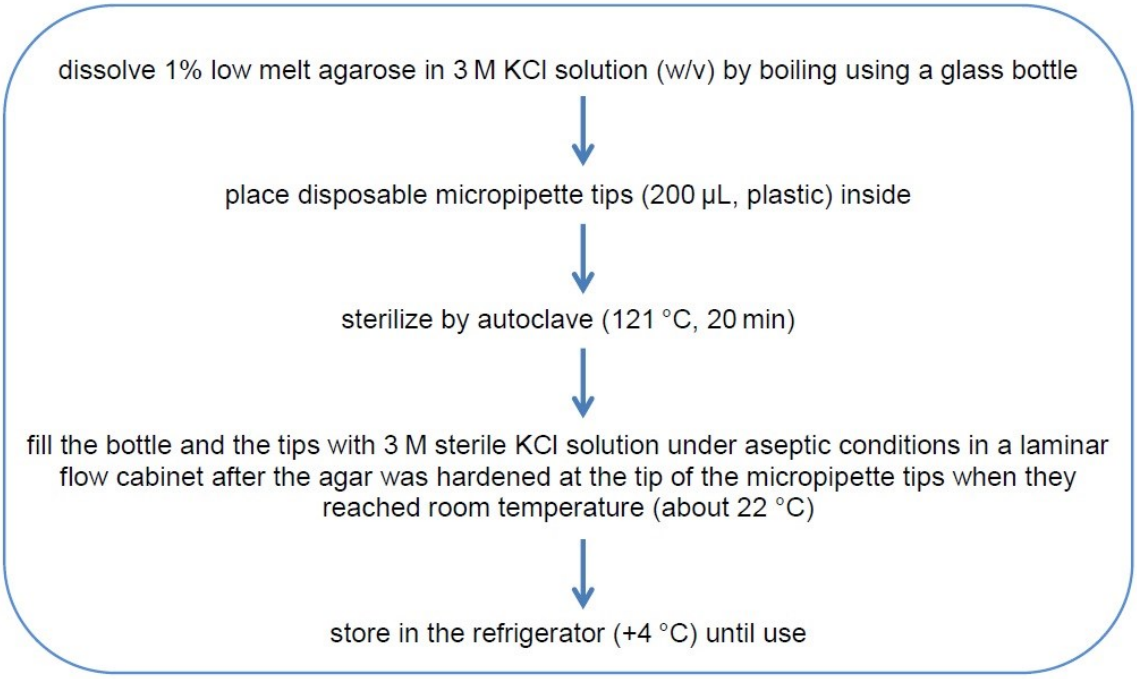


Fig. S3: Preparation steps for sterile micro-agar salt-bridge.

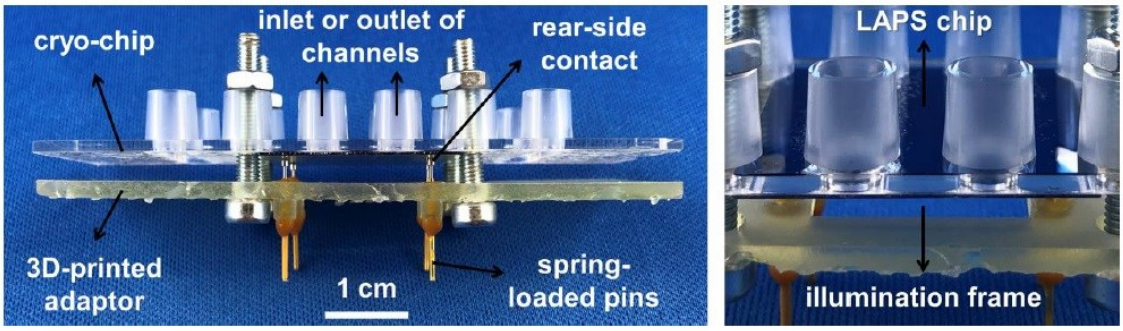


Fig. S4: 3-D printed adaptor for ohmic rear-side connection. The illumination frame provides a window for the modulated light illumination from the rear-side of the LAPS chip.

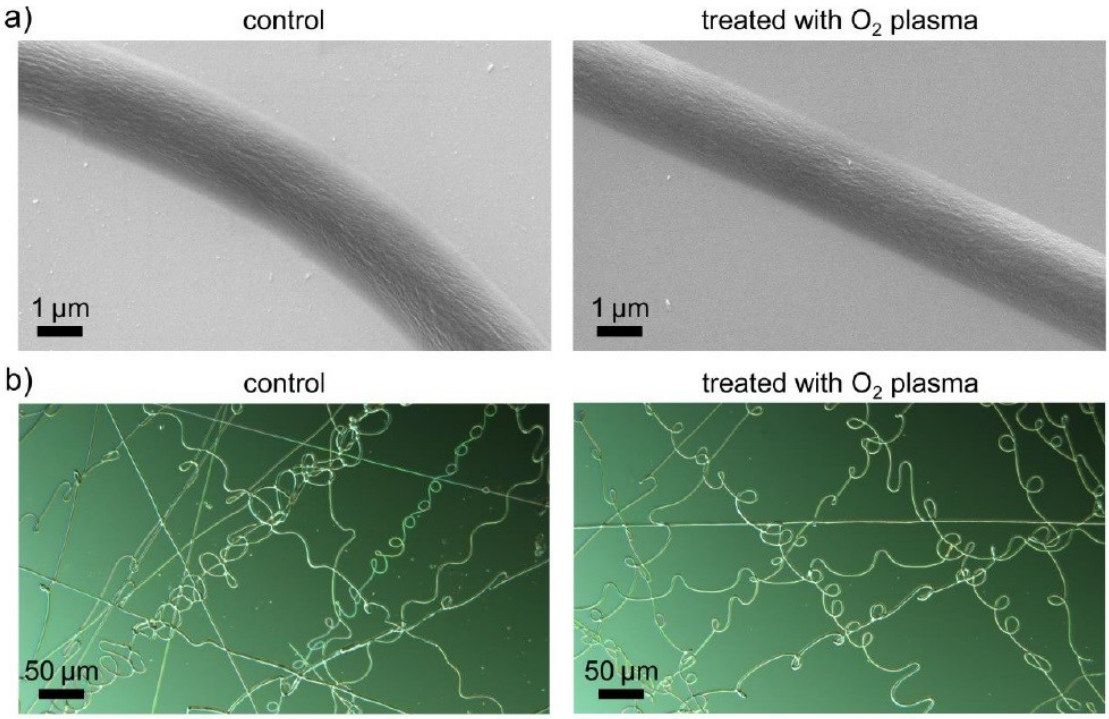


Fig. S5: Modified sensor (LAPS) surface with electrospun PEVA fibers. a) SEM images to show the integrity of PEVA fibers before (left) and after plasma treatment (right). b) Images from digital microscope with lower magnification to display the integrity of the fibrous PEVA net on the sensor surface before (left) and after plasma treatment (after).

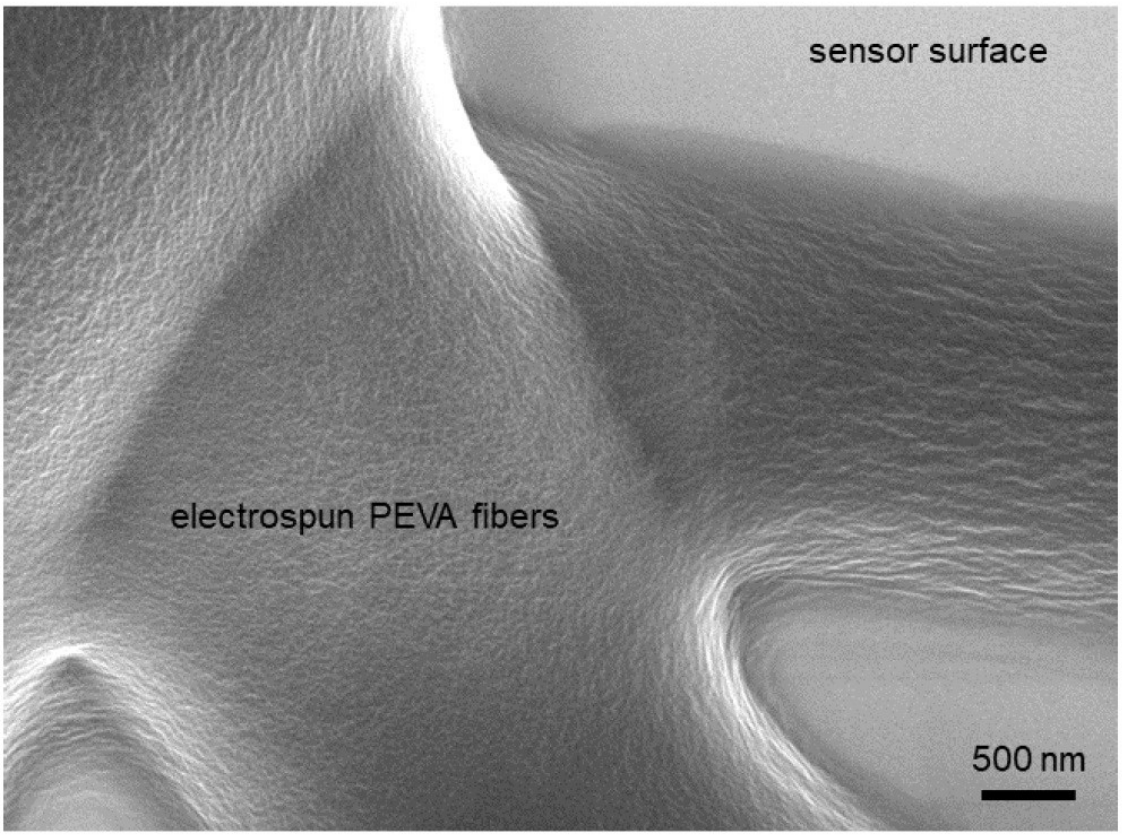


Fig. S6: SEM image demonstrates electrospun PEVA fibers, which coalesced one with the other in the junctions and also formed a melded and flattened morphology on the sensor (LAPS) surface.

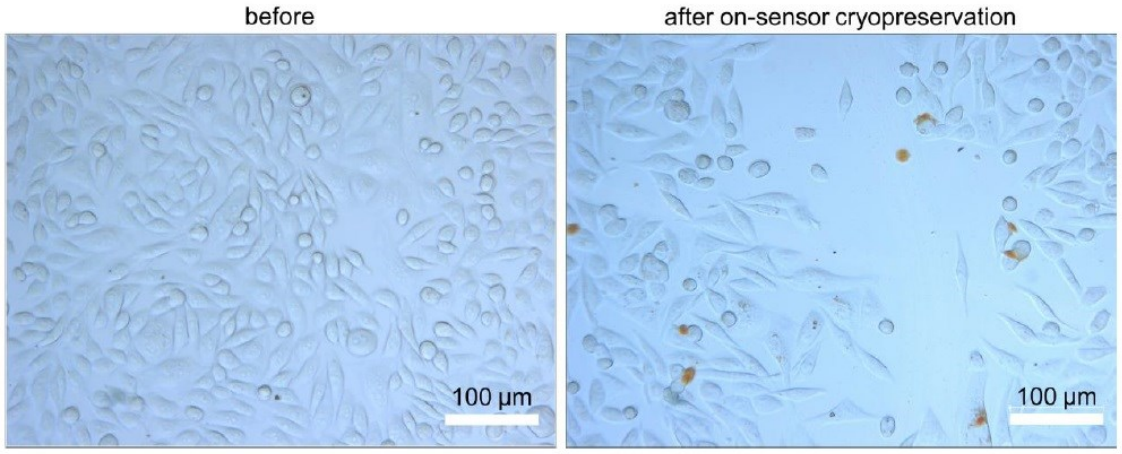


Fig. S7: Microscopic images for the comparison before (left) and after on-sensor cryopreservation (right) of CHO-K1 cells on an unmodified LAPS surface. Detachment and the partial loss are observed in the right image.

References:

[1] L. Liverani, N. Raffel, A. Fattahi, A. Preis, I. Hoffmann, A. R. Boccaccini, M. W. Beckmann, R. Dittrich, Electrospun patterned porous scaffolds for the support of ovarian follicles growth: a feasibility study, Sci Rep 9 (2019) 1150.

[2] M. M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman, Electrospinning of polyurethane fibers, Polymer 43 (2002) 3303-3309.

11th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces

July 01, 2018 to July 03, 2018 in Wittenberg/Germany

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

Dua Özsoylu

has participated in the

"11th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces"

in Wittenberg, Germany, July 01 to July 03, 2018.

Wittenberg, July 01, 2018

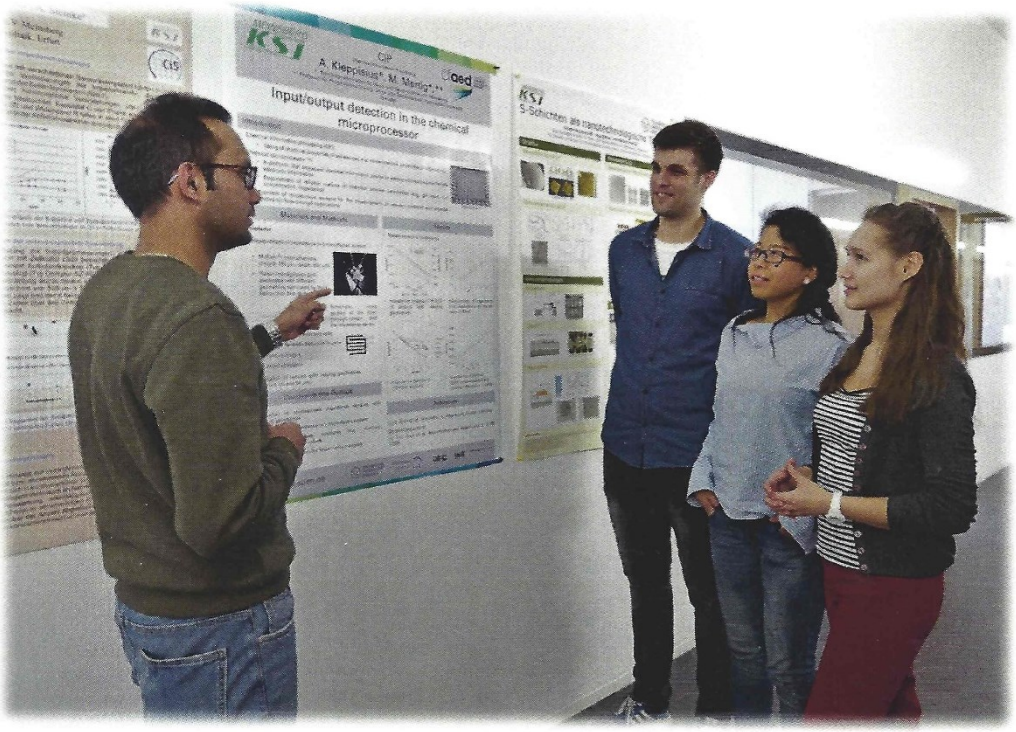
MEINSBERG KSI

Prof. Michael Mertig

Conference Chair EnFi2018

EnFI 2018

11th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces



Leucorea, Lutherstadt Wittenberg, July 01 - 03, 2018

Conference booklet

Organized by

MEINSBERG KSI

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN

Organization

International steering committee

Theodor Doll, *Hannover Medical School, Germany*
Michael J. Schöning, *Aachen University of Applied Sciences, Germany*
Patrick H. Wagner, *KU Leuven, Belgium*

Scientific advisory board

Achim Hassel, *Johannes Kepler University Linz, Austria*
Sven Ingebrandt, *RWTH Aachen University, Germany*
Michael Keusgen, *Philipps-Universität Marburg, Germany*
Fred Lisdat, *Wildau Technical University of Applied Sciences, Germany*
Andreas Offenhäuser, *Forschungszentrum Jülich GmbH, Germany*
Arshak Poghossian, *Aachen University of Applied Sciences, Germany*
Torsten Wagner, *Aachen University of Applied Sciences, Germany*

Local organizing committee

Michael Mertig (Chair), *KSI Meinsberg and TU Dresden*
Andreas Heerwig, *KSI Meinsberg*
Alexander Herms, *KSI Meinsberg*
Johanna Zessin *TU Dresden/ IPF Dresden*
Antje Böhm, *KSI Meinsberg*
Rainer Mittmann, *KSI Meinsberg*

P65

Cryopreservation of cells on electrolyte insulator semiconductor (EIS)-based sensors

Özsoylu D.[1,2], Bronder T.S.[1], Dantism S.[1], Iken H.[1], Schnitzler Th.[1], Kizildag S.[2], Schöning M.J.[1], Wagner T.[1]

dua.oezsoylu@alumni.fh-aachen.de

[1]Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), FH Aachen, Campus Jülich, Heinrich-Mußmann-Str. 1, 52428 Jülich, Germany

[2]Institute of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Mithatpaşa Cad. 1606, 35330, Balçova, İzmir, Turkey

Abstract: Cell-based experimental platforms (CBEPs) are one of the essential tools for drug discovery. Despite significant efforts that have been recently made to develop new technologies and tools in this field, current CBEPs are not suitable for conventional transportation because optimised-platforms need incubator conditions (CO_2, humidity, etc.) so that cells in the system can survive during the transportation. Therefore, they usually cannot offer mass production and ready-to-use concepts. Cryopreservation could be a powerful solution for those challenges and it could eliminate run-to-run and operator-to-operator variability in the laboratories as well.

Keywords: Cryopreservation, EIS sensor, cell, microfluidics, electrochemical characterisation.

Introduction

Cryopreservation is the process of freezing and preserving cells at very low temperatures, a basic technique used for cell culture studies. Recently, cell-based experimental platforms (CBEPs) with sensors have become a very important research field in modern biology and medical science. Nevertheless, measurements with CBEP biosensor set-ups require trained staff for the preparation of the cell culture and the complex medium exchange processes. This avoids usually the usage in mass production and ready-to-use concepts [1].

Here, we present a new concept for CBEP set-ups, which enables the cryopreservation of adherent cells by directly freezing them on the sensor surface.

EIS sensors have the ability to detect the metabolic activity of cells, thanks to their pH-sensitive layer (e.g., Ta_2O_5). EIS sensors that consist of a 30 nm thick SiO_2 layer, a 60 nm thick Ta_2O_5 layer and a 300 nm thick Al layer have been prepared. Electrochemical characterisations of chips have been carried out by performing the analysis of leakage current, capacitance vs. voltage, constant capacitance and impedance measurements before and after cryopreservation, to understand the effect of cryopreservation conditions on the sensor chips. For the cryopreservation of the sensor chips, a freezing temperature of -150 °C was overnight applied and after freezing, the thawing temperature was set to be 37 °C.

Results and Discussion

The results from the electrochemical characterisation indicated that there was no significant change in the sensor characteristic due to the cryopreservation. Figure 1 depicts constant capacitance measurements before and after cryopreservation for different pH values.

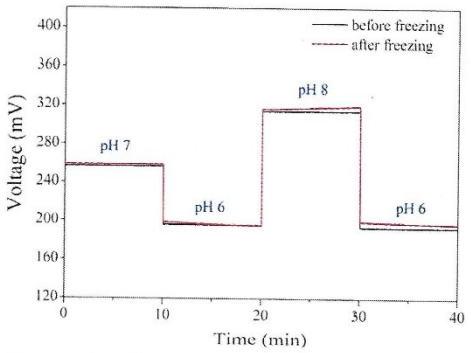


Figure 1: Constant capacitance measurements before and after cryopreservation of the EIS chips.

Conclusion

Results showed that the EIS chips stayed electrochemically durable after cryopreservation and these findings will open up a new possibility to give cell-based experimental platforms the ability of cryopreservation. As a result, CBEPs can be easily transported by cold chain and become ready-to-use and mass production concepts can be realised. To improve further this new concept, the authors work on new set-ups which should combine EIS chips and microfluidic systems to create advanced CBEPs.

References

[1] Zhao G. et al.: Biotechnol. Adv. 2017, **35**, 323–336

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Federal Ministry of Education and Research of Germany (Opto-Switch FKZ: 13N12585), Scientific and Technological Research Council of Turkey (project no. 217S205), Dokuz Eylül University (project no. 2018.KB.SAG.004). This study is a part of PhD thesis study of Dua Özsoylu (thesis number DEU.HSI.PhD-2013970198) in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences.

EnFI 2019
Engineering of Functional Interfaces
Book of Abstracts
12th International Workshop
on Engineering of Functional Interfaces
Leuven, July 8-9, 2019
KU LEUVEN
www.EnFI-2019.eu

Organizing Committee

Patrick Wagner	KU Leuven, Belgium
Michael Wübbenhorst	KU Leuven, Belgium
Jan Vanfleteren	Ghent University and IMEC, Belgium
Laurent Francis	Université Catholique de Louvain, Belgium
Joël De Coninck	Université de Mons, Belgium
Danielle Verachtert	KU Leuven, Belgium
Peter Cornelis	KU Leuven, Belgium

EnFI 2019 - 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces

Visualising the effect of oxygen plasma treatment on a light-addressable potentiometric sensor (LAPS)

Özsoylu D.[1,2], Kizildag S.[1], Schöning M.J.[2], Wagner T.[2]

duaozsoylu@gmail.com

[1]Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340 Izmir, Turkey

[2]Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), FH Aachen, Heinrich-Mußmann-Straße 1, 52428 Jülich, Germany

Abstract: O_2 plasma treatment offers an attractive and promising tool for rapid surface engineering. However, potential impacts of the technique should be carefully investigated, especially for sensors, where the sensor characteristic may be suffered from plasma-induced damage. In this work, a LAPS (light-addressable potentiometric sensor) with a Ta_2O_5 pH-sensitive surface was successfully patterned by O_2 plasma treatment, and its effect was investigated by means of scanning LAPS measurements.

Keywords: Light-addressable potentiometric sensor, LAPS, plasma treatment, patterning.

Introduction

The light-addressable potentiometric sensor (LAPS) is able to detect the variations of the surface charge in a spatially resolved manner. The spatial scanning principle of the LAPS also has a great potential for chemical imaging applications, especially where biological substances such as animal cells or microorganisms are concerned. The metabolic activity of the cultured cells on the sensor surface can be visualized as a chemical image by means of marker molecules such as H^+-ions [1].

Non-thermal plasma treatment offers an attractive and promising tool for a rapid, low-cost and environmental-friendly surface engineering. It is increasingly used in sensor applications for surface activation, etching, decontamination, deposition, and improving bio-compatibility of surfaces by controlling the surface wettability. However, during the plasma treatment, a plasma-induced damage could occur because of the ion bombardment, radical flux or radiation emitted by the plasma. In this work, the effect of the plasma treatment on the LAPS characteristic is studied.

Results and Discussion

To visualize the effect of O_2 plasma treatment, the right side (R) of a LAPS surface was masked using a silicone-free adhesive plastic film (model 1007R-6.0, Ultron Systems, Inc., US) and an aluminium foil on top of it during the treatment with an RF generator operating at 40 kHz (30 s, 30 W, gas flow rate: 10 sccm). The chemical image after the treatment was recorded at a constant bias voltage of 0.5 V, using a Titrisol buffer solution (pH 7) and setting the scan steps to 100 µm. Thereafter, a hot plate was used to produce an annealing effect on the LAPS at 300 °C for 10 min. Figure 1 depicts the influence of O_2 plasma treatment on the LAPS signal and its spatial distribution.

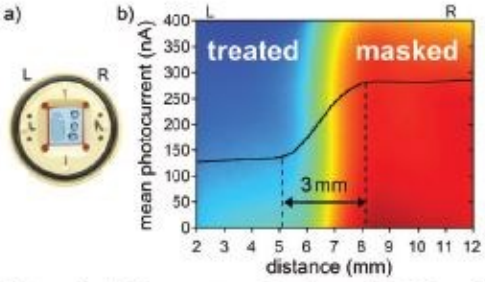


***Figure 1:** a) Measurement chamber with LAPS and drops of water indicating wettability. b) Image of the photocurrents after the treatment.*

Conclusions

The technique, used for masking against the plasma treatment, was effective, simple and low cost. The average photocurrent decrease was 150 nA. Additionally, the annealing process has the ability to completely "reset" the properties of the LAPS regarding its surface wettability and electrochemical characteristic. This is essential to provide a good reusability of LAPS devices.

References

[1] F.Wu, I. Campos, D.W. Zhang, and S. Krause, Proc. Royal Soc. A 473(05), 20170130 (2017).

Acknowledgements

Dua Özsoylu (DÖ) would like to acknowledge the PhD research scholarship grant from Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK) under BIDEB 2214-A. The authors also gratefully thank the Federal Ministry of Education and Research of Germany (Opto-Switch FKZ: 13N12585), Scientific and Technological Research Council of Turkey (project no. 217S205), Dokuz Eylül University (project no. 2018.KB.SAG.004) for financial support. This study is a part of PhD thesis study of DÖ (thesis number DEU.HSI.PhD-2013970198) in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Turkey.

EnFI 2019 - 12th International Workshop on Engineering of Functional Interfaces

Surface modification of a light-addressable potentiometric sensor (LAPS) with electrospun PEVA fibre

Özsoylu D.[1,2], Isık T.[3], Demir M.M.[3], Kızıldağ S.[1], Schöning M.J.[2], Wagner T.[2]

duaozsoylu@gmail.com

[1]Medical Biology and Genetics, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Balcova, 35340 Izmir, Turkey

[2]Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), FH Aachen, Heinrich-Mußmann-Straße 1, 52428 Julich, Germany

[3]Department of Materials Science and Engineering, Izmir Institute of Technology, 35430 Urla, Izmir, Turkey

Abstract: Providing biocompatible surfaces via surface modification is an important step for cell cultivation. Electrospinning is a method based on the use of electrostatic forces for generating ultrafine fibres from varieties of materials, which include polymers, composites and ceramics. The fibres can mimic the extracellular matrix (ECM) of the *in-vivo* niche of cells and this can promote real cell behavior.

Keywords: Light-addressable potentiometric sensor, LAPS, electrospinning, electrospun fibres.

Introduction

Potentiometric sensors based on a semiconductor-insulator field-effect structure play an important role in label-free (bio-)chemical sensing. The light-addressable potentiometric sensor (LAPS) is an important sub-type of this kind of sensors. Light addressability can be employed to visualize the concentration and the spatial distribution of the target molecules, e.g., H^+-ions. This unique feature has a great potential for the label-free imaging of the metabolic activity of living organisms, e.g., adherent cells [1]. However, the cultivation of those organisms on the sensor surface needs specially tailored surface properties, which have to provide a favorable environment for the organisms.

Electrospun fibres manufactured by electrospinning method offer an attractive and promising tool for a rapid and low-cost surface engineering. The fibres can mimic the physical structure of the native extracellular matrix (ECM) with similar shape, high porosity and high surface area, and therefore provide excellent environment for cell cultivation.

Results and Discussion

To modify the surface of LAPS chips by adding fibres, the electrospinning method was utilized by using polyethylene vinyl acetate (PEVA) as precursor solution. The method was optimized by changing the parameters such as the ratio of solvents (Chloroform : Dimethylformamide), flow rate, and spinning time. Experiments were performed at temperature and relative humidity in the range of 20 - 22 °C and 48 - 50%, respectively. Morphology and diameter of the fibres were determined using scanning electron microscopy (SEM). It was found that the optimal polymer solution concentration, solvent ratio, and flow rate that ensure good polymer dissolution and suitable process conditions were 13% (w/v), 30:20 (v:v) and 1.5 ml/h, respectively. In addition, the optimal distance between the needle and the collector, spinning time and applied voltage parameters that provide proper geometry allowing cell to reach the sensor surface were found to be 10 cm, 60 sec and 18 kV, respectively. Figure 1 depicts the bare and modified sensor surfaces.

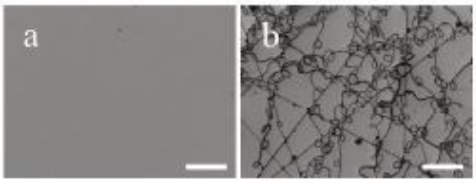


Figure 1: *SEM images of the LAPS surfaces; a) bare surface of the Ta_2O_5 - based sensor surface; b) surface modified with PEVA electrospun fibres; scale bars represent 100 µm.*

Conclusions

Electrospun fibres from biocompatible PEVA could be obtained successfully on LAPS surface by electrospinning. The structure of fibres on LAPS could not only be beneficial to promote biocompatibility but results in a better comparison between *in-vivo*- and *in-vitro* measurements.

References

[1] F. Wu, I. Campoi, D.W. Zhang, and S. Krause, Proc. Royal Soc. A 473(05), 20170130 (2017).

Acknowledgements

Dua Özsoylu (DÖ) would like to acknowledge the PhD research scholarship grant from Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK) under BIDEB 2214-A. The authors also gratefully thank the Federal Ministry of Education and Research of Germany (Opto-Switch FKZ: 13N12585), Scientific and Technological Research Council of Turkey (217S205), Dokuz Eylül University (2018.KB.SAG.004) for financial support. This study is a part of PhD thesis study of DÖ (DEU.HSI.PhD-2013970198) in Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Turkey.