



Geri Yansıma Spektroskopisi ile Hücre Kültürü Çalışmalarında Hücre Sayısının Belirlenmesi İçin Yeni Bir Metot

A New Method For Estimating The Number Of Cells By Back Reflection Spectroscopy In Cell Culture Studies

Aslınur Sırcan Küçüksayan¹, Ertan Küçüksayan²

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Antalya, Türkiye.

²Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Antalya, Türkiye.

Özet

Amaç: Hücre kültürü, hastalıkların teşhisine ve tedavisine yönelik çalışmalarda ve ilaç araştırmalarında en sık kullanılan yöntemdir. Hücre sayımı ise bu araştırmalarda sıklıkla tekrarlanan deneylerin standardizasyonu ve / veya optimizasyonu için önemli bir süreç olarak kabul edilmektedir. Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazları ile yapılabilmektedir. Ancak bu cihazlar yüksek maliyet ve hücre kayıpları gibi dezavantajlara sahiptir. Hücre sayısını belirlemenin en ideal yolu hücrelerin ortamlarını değiştirmeden, önemli ölçüde pH veya sıcaklık değişimi yaratmadan hızlı ve doğru ölçüm yapabilmektir. Bu çalışmanın amacı hücre kültürü deneylerinde hücre sayısını belirlemek için geri yansıma spektroskopisi kullanarak yeni bir yöntem geliştirmektir.

Materyal-Metot: Bu çalışmada, A375 malin melanoma hücreleri standart hücre kültürü tekniği ile çoğaltıldı. Hücre sayım cihazı ile sayılan farklı sayıdaki hücreler son hacim 1 ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra spektrometre, tungsten-halojen ışık kaynağı ve fiber optik probtan oluşan bir deney düzeneği kullanıldı. Numuneye etkileştikten sonra geri yansıyan ışık fiber optik probun dedektör fiberleri ile toplandı geri yansıyan spektrumlar Igor Pro ile analiz edilerek hücre sayısı belirlendi.

Bulgular: Farklı hücre sayılarındaki numunelerin spektrumların hücre sayısına bağlı olarak değiştiği belirlendi. Bu spektrumlardan elde edilen K (450-700 nm) parametresine karşı hücre sayısını veren bir kalibrasyon grafiği bulundu. Bu yöntem ile numunelerin hücre sayılarının %1,9-6,5 arasındaki hata oranları ile belirlendi.

Sonuç: Bu çalışmada fiber optik prob ile dalga boyuna bağlı geri yansıma ölçümleri yapılarak hücre kültürü koşullarına minimum müdahale ederek hücre sayısını gerçek zamanlı belirleyebilen yeni bir yöntem geliştirildi. Bu yöntem hücre sayısının zamana bağlı izlenmesine olanak veren invazif olmayan, objektif, tekrarlanabilir ve tecrübe gerektirmeyen bir teknik olarak geliştirilme potansiyeli vardır.

Anahtar kelimeler: Hücre Kültürü, Hücre Sayımı, Fiber Optik Prob, Geri Yansıma Spektroskopisi.

Abstract

Objective: Cell culture is the most commonly used method for drug research, the diagnosis and treatment of diseases. Cell counting is considered as an important process for the standardization and / or optimization of frequently repeated experiments in research based on cell culture. Cell counting can be done with automatic cell counting devices. However, these devices have disadvantages such as high costs and cell losses. The ideal way to determine the number of cells is to be able to measure quickly and accurately, without changing the environment of the cells, without allowing significant pH or temperature changes. The aim of this study is to develop a new method using back reflection spectroscopy to estimate the number of cells in cell culture experiments.

Material-Method: In study, we grew A375 malignant melanoma cells by standard cell culture technique. We adjusted the final volume of 1 ml the different number of cells counted by the cell counting device. Then, we used an experiment set consisting of a spectrometer, tungsten-halogen light source and fiber optic probe. After the light interacted with the sample, the reflected light was collected with the detector fibers of the probe. The reflected spectra were analysed with Igor Pro and the number of cells was determined.

Results: We determined that the spectra of samples with different cell numbers vary depending on the number of cells. We drew a calibration graph that gives the number of cells with the K (450-700 nm) parameter obtained from these spectra. Using this graph, we calculated the cell numbers of samples with error rates between 1.9-6.5%.

Conclusions: In this study, we developed a new method that can determine the number of cells in real time by minimum interference to cell culture conditions with fiber optic probe. This method is noninvasive, objective, reproducible, allowing time-dependent monitoring of the number of cells. This may have the potential to be developed as an experience-free technique.

Keywords: Cell Culture, Cell Count, Fiber Optic Probe, Back Reflection Spectroscopy.

Giriş

Hücre kültürü, canlılara ait hücrelerin kontrollü koşullar altında büyütülmesi, çoğaltılması ve in vitro olarak yetiştirilmesi sürecidir. Hücre kültürü çalışmaları ile farklı hücre tiplerinin normal fonksiyonlarını gerçekleştirme süreçlerinin anlaşılması ya da oluşturulan hastalık modellerinde teşhis ve tedavi için gerekli moleküler mekanizmaların aydınlatılması, gibi birçok deneysel çalışmaların yapılması mümkün olabilmektedir (1-6). Bu nedenle, hücre kültürü çalışmaları, başta sağlık bilimleri olmak üzere tüm uygulamalı bilimlerde kullanılan başlıca in vitro deney modellerinden biri haline gelmiştir. Hücre kültürü deney modelinin en büyük avantajı oksijen ve karbondioksit yoğunluğu, sıcaklık, pH ve osmotik basınç gibi hücre kültürü ortamının tüm koşullarının kontrol edilerek sabit tutulabilmesidir (7). Hücre kültürü deney protokollerinde hücre sayımı, deneylerin standardizasyonu ve optimizasyonu için önemli bir aşamadır. Hücre sayısını belirlemek için hemositometre ve otomatik kamera entegreli hücre sayım cihazları kullanılmaktadır. Ancak bu sistemlerde, tripan mavisi gibi özel belirtece ihtiyaç duyulmaktadır. Hemositometre, üzerinde sayım alanı olan özel bir cam lamdır. Belirli ölçülerde düz çizgilere sahip olan bu lamdan mikroskop ile hücre sayısı belirlenebilir. Ancak hemositometre ile yapılan ölçümler manuel olarak yapıldığından hata payı bulunmakta ve araştırmacılar için zaman alıcı olmaktadır (8). Hücre sayım cihazları ve sayım için kullanılan slaytları (lamları) yüksek maliyet oluşturması dezavantaj olmaktadır. Hücre sayısını belirlemenin en ideal yolu hücrelerin ortamlarını değiştirmeden, önemli ölçüde pH veya sıcaklık değişimi yaratmadan, ekzojen ajan ilave etmeden, hızlı ve doğru ölçüm yapabilmektir.

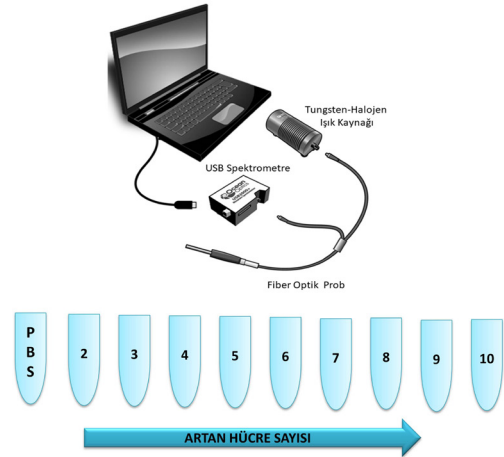
Geri yansıma spektroskopisi ölçüm yapılan ortamın optik özelliklerini belirleyebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde gönderilen ışık numuneyle etkileşir, geri yansıyan ışık toplanır ve spektrometreye gönderilerek analiz edilir. Sonuçta araştırılan ortam hakkında bilgi içeren 'spektrum' elde edilir. Bu spektrum, ışığın saçılımı ve absorpsiyonuna bağlı bir sinyaldir (9). Işığın yayıldığı ortamda, ortamın kırılma indisinden farklı bir kırılma indisine sahip bir parçacık var ise, ışık bu parçacığa çarptığında kırınıma uğrar (10). Yayılan ışık, parçacık ile etkileştikten sonra parçacığın boyutuna, şekline, ışığı kırma indisine bağlı olarak belirli açılar ile saçılırlar. Hücreler arası sıvının ışığı kırma indisi yaklaşık olarak 1,36 iken hücre zarının ışığı kırma indisi 1,42 civarındadır (11). Bu farktan dolayı ışık hücre kültürü ortamında, hücre zarından saçılmaya uğrar.

Geri Yansıma Spektroskopisi, araştırılan ortama (hücre, doku vb.) gönderilen ışığın ortamla etkileştikten sonra geri yansıyan ışığın özelliklerindeki değişiklikleri izlemek için kullanılır. Bu yöntem, hücrelerdeki kırılma indisi değişiminden dolayı elastik olarak saçılan fotonların oluşturduğu geri yansıma sinyaline dayanır (12). Böylece hücre kültürü ortamından dalga boyuna bağlı geri yansıma ölçümleri yapılarak numunelerdeki hücre sayısına bağlı sinyal elde edilebilir. Bu çalışmanın amacı hücre kültürü deneylerinde hücre sayısını belirlemek için geri yansıma spektroskopisi kullanarak ile yeni bir yöntem geliştirmek.

Materyal-Metot

Spektroskopik Donanım

Hücre kültürü numunelerinden spektroskopik ölçümler almak için kullanılan deney düzeneği; Şekil 1'de görüldüğü gibi spektrometre, fiber optik prob, ışık kaynağı ve bir dizüstü bilgisayardan oluşmaktadır. Deney düzeneğinde ışık kaynağı olarak tungsten lamba (Ocean Optics, Inc. Florida, ABD) kullanıldı. Spektroskopik verileri almak için kullanılan spektrometrenin (Ocean Optics, Inc. Florida, ABD) modeli USB2000'dir. Deneylerde kullanılan spektrometre 400 ile 850 nm arasındaki dalga boyuna duyarlı, 2048 elemanlı CCD (Charge Coupled Device) detektör dizisine sahiptir. Geri yansıyan ışığın spektroskopik analizi, bilgisayardaki yazılım (OOIBase32 Platinum, Ocean Optics, Inc, Florida, USA) ile yapıldı. Kullanılan optik prob dairesel geometriye sahiptir. Proben bir tane kaynak fiberinin çevresine altı tane dedektör fiber simetrik olarak konumlandırılmıştır. Tüm fiberler birbirlerine bitişik olarak yerleştirilmiştir. Fiberlerin sayısal açıklığı $0,22 \pm 0,02$ olup, çapları $400 \mu\text{m}$ ve yaklaşık uzunlukları 100cm 'dir.



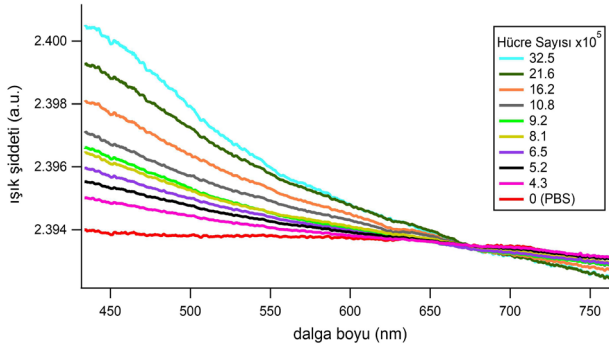
Şekil 1. Deney düzeneği; farklı sayıda hücre içeren ependorf tüpleri ve fiber optik sistem

Hücre Kültürü

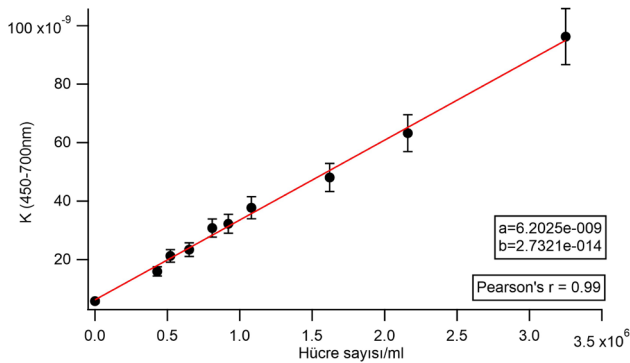
A375 malin melanoma hücreleri Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) %10 fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin ve 1 mM glutamin içeren medyumla, 37°C , %5 CO_2 ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe standart hücre kültürü tekniği ile çoğaltıldı. Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman Tripsin-EDTA ile kaldırılıp santrifüj edilerek süpernatanı atıldı ve kalan pelette olan hücreler, BioRad TC20 otomatik hücre sayım cihazı ile sayıldı. Aynı zamanda hemositometre ile de gözle sayıldı. Son hacim 1 ml olacak şekilde farklı $(0-32,5 \times 10^5)$ hücre sayısı aralığında toplam 10 numune ependorf tüpünde hazırlandı. Bu 10 numuneden ışık şiddeti ile hücre sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemek için ölçümler yapıldı. Aynı yöntemle son hacim 1ml olacak şekilde $5-30 \times 10^5$ hücre sayısı aralığında toplam altı numune daha ependorf tüpünde hazırlandı. Bu altı numuneden, ışık şiddeti ile hücre sayısı arasında belirlenen ilişkiyi test etmek için ölçümler yapıldı.

Kalibrasyon ve Ölçümler

Hazırlanan hücre kültürü numunelerinden spektroskopik ölçümler alınmadan önce, optik fiberlerin bağlantıları ile ara yüzeyde oluşan yansımaları ve ışık kaynağının spektral dağılımını elimine etmek için kalibrasyon ölçümleri yapıldı (13). Kalibrasyon yapılırken ilk olarak background sinyali ölçüldü. Bu ölçüm ışık kaynağı kapalıyken ve prob numunenin içindeyken alındı. Daha sonra, ışığı bütün dalga boylarında %98 oranında yansıtan beyaz bir madde (spectralon, Lab-sphere, Inc., North Sutton, N.H.) üzerinde geri yansıyan ışığın spektrumu ölçüldü. Böylece lambanın spektral dağılımını içeren spektrum kaydedildi. Kalibrasyon işleminden sonra hazırlanan hücre kültürü numunelerinden, prob numune tüpüne yaklaşık 0,5mm derinliğe daldırılarak ve siyah bir zemin üzerinde yapıldı. Her bir numuneden 8 kez dalga boyuna bağlı geri yansımaya spektrumları ölçümü yapıldı ve alınan ölçümler kaydedildi Kalibre edilmiş spektrum daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi hesaplandı (13-15). Elde edilen veriler, Igor Pro 8.04 teknik grafik ve veri analizi programı ile işlendi. Geri yansımaya spektrumlarının, 450-750nm aralığında altında kalan alan 1000'e normalize edildi. Numuneler iki ayrı sete ayrılarak ölçüm yapıldı. Birinci sette hazırlanan ilk 10 numuneden ışık şiddeti ile hücre sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemek için ölçümler yapıldı. İkinci sette hazırlanan altı numuneden ışık şiddeti ile hücre sayısı arasında belirlenen ilişkiyi test etmek için ölçümler yapıldı.



Şekil 2. Farklı hücre sayılarında ölçülen dalga boyuna bağlı geri yansımaya spektrumları



Şekil 3. Polinomal fit parametresine K (450-700 nm) karşı hücre sayısı grafiği

Bulgular

Hücreler flastktan kaldırılıp santrifüj edildikten sonra, hücre sayım cihazı ile hemositometre ile sayıldı. Son hacim 1 ml olacak şekilde $0-32,5 \times 10^5$ hücre sayısı aralığında olan ependorf tüpündeki toplam 10 numuneden spektroskopik ölçümler alındı. Farklı hücre sayılarındaki numuneler için dalga boyuna karşı ışık şiddeti spektrumları elde edildi. Bu spektrumlar hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir (Şekil 2). Spektrumlarda dalga boyu arttıkça ışık şiddetinin polinomal olarak azaldığı görülmektedir. Polinomal azalmanın hücre sayısı azaldıkça azaldığı, kontrol ölçümünde değişimin monotonik hale geldiği belirlendi. Dolayısıyla spektrumların hücre sayısına bağlı bu değişimleri ile analiz yapıldı.

Numunelerden elde edilen her bir spektrum, 450-700 nm aralığında, üç parametrelili polinom denklemine ($y=K_0+K_1x+K_2x^2$) fit edildi. Bu fit işleminden her bir hücre sayısına karşı K (450-700 nm) değeri belirlendi. Polinomal denkleme fit ile elde edilen K (450-700 nm) değerine karşı hücre sayısı/ml standart grafiği bulundu (Şekil 3). Şekil 3'de, K (450-700 nm)-hücre sayısı/ml grafiği görülmektedir. Grafik hücre sayısı ve K parametresi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu grafikten Pearson Korelasyon Katsayısı 0,99 bulundu. Böylece hücre sayısı ve hücre sayısına bağlı olarak değişen ışık şiddetini gösteren K değeri arasındaki ilişki belirlendi. Belirlenen ilişkinin doğruluğunu test etmek için daha sonra hazırlanan altı numuneden ölçülen spektrumlardan elde edilen K (450-700 nm) değerleri bu ilişkide yerine konularak hücre sayıları hesaplandı (Tablo 1). Numunelerin hücre sayıları ile spektroskopik olarak bulunan K (450-700 nm) değerinden hesaplanan hücre sayıları arasındaki fark karşılaştırılarak bağıl hata belirlendi.

Tablo 1'de numunelerin hücre sayıları ve dalga boyuna bağlı geri yansımaya ölçümleri ile hesaplanan hücre sayıları gösterilmektedir. Spektroskopik ölçümler ile hücre sayısına bağlı olarak değişen ışık şiddetini gösteren K değeri kullanılarak hücre sayıları $4,6 \pm 1,9$ hata ile bulundu. Tablo 1 de, numunelerin hücre sayısı ve spektroskopik yöntemle hesaplanan hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu (Mann-Whitney U Testi $p=0,94$).

Tablo 1. Her bir numunenin hücre sayısı, spektroskopik yöntemle hesaplanan hücre sayısı ve % hatası

Numune No	Hücre Sayısı/ml	Spektroskopik yöntemle hesaplanan hücre sayısı/ml*	Bağıl Hata (%)
1	$25,3 \times 10^5$	$24,8 \times 10^5$	%1,9
2	$20,8 \times 10^5$	$20,3 \times 10^5$	%2,4
3	$15,7 \times 10^5$	$14,9 \times 10^5$	%5,1
4	$10,5 \times 10^5$	$11,1 \times 10^5$	%5,7
5	$8,4 \times 10^5$	$8,9 \times 10^5$	%5,9
6	$4,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	%6,5

*Mann-Whitney U Testi $p>0,5$ hücre sayılarına göre

Tartışma

Hücre kültürü molekül, ilaç veya hastalıkların tüm etkenlerden bağımsız olarak araştırılabilmesi, ekonomik ve pratik olması, çevre şartlarının kontrol edilebilmesi dolayısıyla oldukça avantajlı bir deneysel modeldir (16-18). Hücrelerin kültür ortamında canlılıklarını sürdürebilmeleri, çoğalabilmeleri ve işlevlerini devam ettirebilmeleri ortamın koşullarına bağlıdır. Hücre kültüründe uygulanan araştırma protokollerinde hücre sayımı, periyodik olarak tekrarlanan, deneylerin standardizasyonu ve optimizasyonu için en önemli aşamalardan biridir. Hücrelerin ortamlarını değiştirmeden, önemli pH veya sıcaklık değişimine neden olmadan, dışarıdan bir kimyasal eklemeyen, hızlı ve doğru olarak yapılabilmesi hücre sayımının en ideal yoludur.

Hücre kültüründe hücre sayımını belirlemek için hemositometre ve otomatik hücre sayım cihazları kullanılmaktadır. Her iki yöntemde de tripan mavisi gibi eksojen bir ajan ilavesi gerekmektedir. Hemositometre ile yapılan ölçümler araştırmacılar için oldukça zaman alıcı olmaktadır. Bu yöntemde hücre sayım işlemi manuel olarak yapıldığından uzun süreli çalışmalarda, sayımın doğruluğu araştırmacının dikkatine bağlı olması dolayısıyla, hata oranı artabilmektedir (19). Hemositometre ile yapılan hücre sayımında insan kaynaklı oluşabilecek hataları en aza indirmek amaçlı yardımcı algoritmalar geliştirilmeye çalışılan çalışmalar yapılmaktadır (20, 21). Bu çalışmalarda laboratuvarlarda yapılan hücre sayma işlemi, kullanılan mevcut donanım değiştirilmeden bir bilgisayar yazılımı ile otomatik hale getirilmesine yönelik çeşitli algoritmalar önerilmektedir.

Otomatik hücre sayım cihazları hücre kültürü laboratuvarları için tasarlanmıştır. Tripan mavi boya ile kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen otomatik hücre sayım cihazları, hücre kültürü çalışmalarında, hemositometrelerle ilişkili subjektif yorumlamayı ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır. Coulter tekniği kullanan, empedans tabanlı hücre sayım cihazlarında bulunmaktadır (22). Teknik elektrik alan uygulanan mikro kanallardan (aperture) hücreler geçtiğinde bir direnç (empedans) oluşması prensibine dayanmaktadır. Oluşan empedans sinyali ölçülerek, matematiksel kalibrasyon katsayıları ile hesaplamalar sonucunda hücre sayıları elde edilir. Bu cihazlarda elektronik algılama bölgesi içeren mikro kanallardan oluşan tek kullanımlık sensörler kullanılır. Dolayısıyla ciddi bir sarf bütçesi gerektirmektedir. Ayrıca birden fazla sayıda hücrenin mikro kanallardan geçmesi veya boyut olarak çok küçük hücrelerin sensörde algılanmaması gibi hata kaynakları da içermektedir. Hücre kültürü çalışmalarında iş yükünü azaltmak ve hücre sayımını standartlaştırmak için hızlı sonuç verebilmektedir (23). Bu cihazların yüksek maliyetleri ve cihazlarda sayım için, slayt ve kimyasallardan oluşan kitlelere ihtiyaç duyulmasının ilave maliyetleri önemli bir dezavantaj olmaktadır. Ayrıca hücre sayım cihazları kullanırken, test ölçüm aralığı içinde kalmak için genellikle örnek dilüsyonu gereklidir; ancak zaman ve dilüent çözeltilerin hücre kültürü üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılabilmiştir. Hücre sayımında dilüent çözelti olarak kullanılan fosfat tamponlu salinin, hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (24).

Çalışmamızda farklı hücre sayılarındaki numunelerden fiber optik prob ile dalga boyuna karşı ışık şiddeti spektrumları elde edildi (Şekil 2). Şekil 2 incelendiğinde, dalga boyu arttıkça ışık şiddetinin polinomal olarak azaldığı görülmektedir. Spektrumlardaki bu polinomal ilişkinin hücre sayısına bağlı olarak da değişmektedir. Polinomal azalmanın hücre sayısı azaldıkça azaldığı, kontrol ölçümünde değişimin monotonik hale geldiği belirlendi. Spektrumlardaki bu değişim hücre sayısına bağlı olarak analiz edildi. Bu analiz sonucunda belirlenen K (450-700 nm) parametresi ve hücre sayısı arasında tam pozitif doğrusal bir ilişki olduğu belirlendi (Pearson Korelasyon katsayısı:0,99). Şekil 3'de K (450-700 nm) parametresine karşı hücre sayısını veren bir kalibrasyon grafiği görülmektedir. Böylece hücre kültürü numunelerinden fiber optik proba ölçeceğimiz spektrumlardan hesapladığımız K (450-700 nm) parametresi ile kalibrasyon grafiğinden numunenin hücre sayısını bulabileceğimiz bir yöntem geliştirildi. Yöntemin doğruluğunu test etmek için farklı hücre sayılarında hazırlanan altı numuneden fiber optik prob ile spektrumlar ölçüldü. Spektrumlardan elde edilen K (450-700 nm) değerleri ile kalibrasyon grafiğinden hücre sayıları bulundu (Tablo 1). Numunelerin hücre sayım cihazı ile belirlenen hücre sayıları ile spektroskopik olarak bulunan K (450-700 nm) değerinden hesaplanan hücre sayıları arasındaki fark karşılaştırılarak bağıl hata değerleri belirlendi. Tablo 1'de geliştirdiğimiz yöntem ile numunelerin hücre sayılarının %1,9-6,5 arasındaki hata oranları ile bulunabildiği ve istatistiksel olarak iki teknik arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir.

Sonuç

Bu çalışmada fiber optik prob ile dalga boyuna bağlı geri yansıma ölçümleri yapılarak hücre kültürü koşullarına minimum müdahale ederek hücre sayımını gerçek zamanlı belirleyebilen yeni bir yöntem geliştirildi. Bu yöntem hücre sayımının zamana bağlı izlenmesine olanak veren invazif olmayan, objektif, tekrarlanabilir ve tecrübe gerektirmeyen bir teknik olarak geliştirilme potansiyeli vardır.

Bu çalışma Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ALKÜ-BAP) Koordinatörlüğü tarafından 2019-04-01-MAP01 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. ALKÜ-BAP Koordinatörlüğü'ne vermiş olduğu destek için teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):5517-27.
2. Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(3):DE01-5.
3. Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(7):1685-94.

4. Kucuksayan E, Konuk EK, Demir N, Mutus B, Aslan M. Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2014;72:113-23.
5. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Hanikoglu F, Ozben T, Menounou G, Sansone A, et al. Effects of Somatostatin and Vitamin C on the Fatty Acid Profile of Breast Cancer Cell Membranes. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2019;19(15):1899-909.
6. Hanikoglu A, Kucuksayan E, Hanikoglu F, Ozben T, Menounou G, Sansone A, et al. Effects of somatostatin, curcumin, and quercetin on the fatty acid profile of breast cancer cell membranes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2020;98(3):131-8.
7. Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016;10(3):De1-De5.
8. Davis JM. *Basic Cell Culture*: Oxford University Press; 2002.
9. Sircan-Kucuksayan A, Uyuklu M, Canpolat M. Diffuse reflectance spectroscopy for the measurement of tissue oxygen saturation. *Physiol Meas*. 2015;36(12):2461-9.
10. Bohren CF, Huffman DR. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*: WILEY-VCH; 1998.
11. Bolin FP, Preuss LE, Taylor RC, Ference RJ. Refractive-Index of Some Mammalian-Tissues Using a Fiber Optic Cladding Method. *Applied Optics*. 1989;28(12):2297-303.
12. Mourant JR, Freyer JP, Hielscher AH, Eick AA, Shen D, Johnson TM. Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics. *Applied Optics*. 1998;37(16):3586-93.
13. Sircan-Kucuksayan A, Canpolat M. Retrieval of Chromophore Concentration in a Tissue Phantom by Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Optics and Spectroscopy*. 2014;117(4).
14. Karakas BR, Sircan-Kucuksayan A, Elpek OG, Canpolat M. Investigating viability of intestine using spectroscopy: a pilot study. *Journal of Surgical Research*. 2014;191(1):91-8.
15. Turhan M, Yaprak N, Sircan-Kucuksayan A, Ozbudak I, Bostanci A, Derin A, et al. Intraoperative assessment of laryngeal malignancy using elastic light single-scattering spectroscopy: A pilot study. *Laryngoscope*. 2017;127(3):611-5.
16. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-77.
17. Gurbuz N, Asoglu MR, Ashour AA, Salama S, Kilic GS, Ozpolat B. A selective serotonin 5-HT1B receptor inhibition suppresses cells proliferation and induces apoptosis in human uterine leiomyoma cells. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2016;206:114-9.
18. Erdoğan MA, Taşkıran D. Rotenon ile İndüklenen İn Vitro Parkinson Hastalığı Modelinde Glukagon Benzeri Peptid-1 Analogu Ekzenatidin Nöron Sağkalımına Etkisi. *SdÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*. 13.10.2019;10(4):362-268.
19. Huang DC, Hung KD, Chan YK. A computer assisted method for leukocyte nucleus segmentation and recognition in blood smear images. *Journal of Systems and Software*. 2012;85(9):2104-18.
20. Ozkan A, Isgor SB, Tora H, Uyar P, Iscan M, editors. An alternative method for cell counting. *Signal Processing and Communications Applications Conference*; 2011; Turkey: IEEE
21. Özkan A, İşgör BS, Şengül G, editors. Method proposal for distinction of microscope objectives on hemocytometer images. *Signal Processing and Communication Application Conference*; 2016; Turkey: IEEE.
22. Johnston G. Automated handheld instrument improves counting precision across multiple cell lines. *BioTechniques*. 2010;48(4):325-7.
23. Szabo SE, Monroe SL, Fiorino S, Bitzan J, Loper K. Evaluation of an automated instrument for viability and concentration measurements of cryopreserved hematopoietic cells. *Lab Hematol*. 2004;10(2):109-11.
24. Chen A, Leith M, Tu R, Tahim G, Sudra A, Bhargava S. Effects of diluents on cell culture viability measured by automated cell counter. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173375.