T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MİKROFLUİDİK SİSTEMLERDE HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

NİLGÜN OKŞAK

DANIŞMAN
PROF. DR. DÜRDANE SERAP KURUCA

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

“Aileme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD'nda sürdürdüğüm doktora eğitimi süresince her türlü konuda desteğini esirgemeyen, tecrübe ve deneyimleriyle katkı sağlayan, gerek bilimsel gerekse insani olarak iyi yetişmem için emek veren değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Dürdane Serap KURUCA'ya,

Tezimin laboratuvar çalışmalarını yapabilmeme imkan tanıyan ve samimi yaklaşımıyla yanımda duran, akademik başarıları ve konuları ele alış biçimiyle bana vizyon kazandıran İstanbul Teknik Üniversitesi MEMS Ar-Ge Merkezi Koordinatörü ve Makine Fakültesi öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Levent TRABZON'a,

Tezimin deneysel çalışmalarına destek veren, nazik bir yaklaşım ile bilgi ve deneyimlerini paylaşan sevgili arkadaşlarım İTÜ Nanobilim ve Nanomühendislik Bölümü Arş. Gör. Sultan ŞAHİN KESKİN'e, Dr. Zineb BENZAIT'e, yükseklisans öğrencileri İrem Bahar GÜL'e ve Büşra ARSLAN'a, İTÜ Makine Mühendisliği Bölümü doktora öğrencisi Anas HİJAZİ'ye, Mühendis Özgen KÖKLÜ'ye; İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD Hücre Kültürü Laboratuvarı sevgili grup arkadaşlarım doktora öğrencisi Güneş ÖZEN EROĞLU ve Işık Neslişah KORKUT'a,

Tez çalışmalarımın deneysel analizinde desteklerini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Esin ÇETİN AKTAŞ'a ve Sağlık Teknikeri Abdullah YILMAZ'a,

Tezimin deneysel çalışmaları için gerekli olan numunelerin sağlanmasında desteklerini esirgemeyen Yeni Yüzyıl Üniversitesi Gaziosmanpaşa Hastanesi, Kemik İliği Transplantasyon Merkezi öğretim üyesi Prof. Dr. Zeynep DOGUSAN'a ve ekibine,

Güveni, sevgisi ve desteğiyle hayatım boyunca daima yanımda olan SEVGİLİ AİLEME,

En içten duygularımla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36440.

İÇİNDEKİLER

İTHAF....2
TEŞEKKÜR....3
İÇİNDEKİLER....4
TABLOLAR LİSTESİ....6
ŞEKİLLER LİSTESİ....7
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ....9
ÖZET....11
ABSTRACT....12
1. GİRİŞ VE AMAÇ....13
2. GENEL BİLGİLER....16
2.1. Kök Hücre Tanımı....16
2.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması....16
2.2.1. Farklılaşma Yeteneklerine Göre Kök Hücreler....17
2.2.2. Elde Edildiği Kaynağa Göre Kök Hücreler....17
2.2.2.1. Hematopoetik Kök Hücreler....18
2.3. Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücreler (Very Small Embryonic Like=VSEL stem cells)....20
2.3.1. VSEL Kök Hücre Karakterizasyonu....22
2.4. Kök Hücre İzolasyon Yöntemleri....23
2.4.1. Mikroakışkan (Mikrofluidik; Lab-On-a- Chip) Sistemler ile İzolasyon....24
2.4.1.1. Ataletsel Mikroakışkan Sistemler ile İzolasyon....26
2.5. Kök Hücrelerin Klinik Uygulamadaki ve Araştırma Alanındaki Yeri....28
3. GEREÇ VE YÖNTEM....29
3.1. Mikroakışkan Sistem (Mikrokanal) Tasarımı....29
3.2. Mikroakışkan Sistem Fabrikasyonu ve Karakterizasyonu....30
3.2.1. Soft Litografi ile Kalıp (Master Template) Üretimi ve PDMS Dökümü....31
3.2.2. Oksijen Plazma İşlemi....32
3.2.3. Sızdırmazlık Testi....32
3.2.4. Mikroakışkan Sistem Optimizasyonu....33
3.2.4.1. Hücre Kültürü....34

3.3. Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin, Yoğunluk Gradyanlı Santrifüjleme Yöntemiyle ile Ön Ayrıştırılması....35
3.3.1. Aferez Materyali, Kemik İliği ve Periferik Kan Eldesi....35
3.3.1.1. Yoğunluk Gradyanlı Santrifüjleme....35
3.3.2. Hücre Morfolojisi ve Hücre Boyutunun Hesaplanması....36
3.4. Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin Mikroakışkan Sistemden Geçirilerek Toplanması....37
3.5. Mikroakışkan Sistemden Toplanan Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin Karakterizasyonu: Kanal Performansının Belirlenmesi....38
3.5.1. Hücre Canlılığının Saptanması....38
3.5.2. Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi....38
3.5.2.1. Floresan Boyama Tekniği ile Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi....39
3.5.2.2. Akış Sitometri Tekniği ile Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi....40
3.5.3. Mikroakışkan Sistemde Hücre Kaybı Seviyesi....40
3.6. İstatistiksel Analiz....41
4. BULGULAR....42
4.1. Hücre Morfolojisi ve Hücre Boyutu....42
4.2. Mikroakışkan Sistem Optimizasyonu: Optimum Akış Hızının Belirlenmesi....43
4.3. Mikroakışkan Sistemden Toplanan Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin Karakterizasyonu: Kanal Performansının Belirlenmesi....48
4.3.1. Hücre Canlılığının Saptanması....48
4.3.2. Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi:....49
4.3.2.1. Floresan Boyama Tekniği ile Mononükleer Hücrelerin ve Eritrositlerin Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi....49
4.3.2.2. Akış Sitometri Tekniği ile Mononükleer Hücre ve Alt Hücre Gruplarının (HKH ve VSEL Kök Hücre) Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi....52
4.3.3. Mikroakışkan Sistemde Hücre Kaybı Seviyesi....62
5. TARTIŞMA....63
KAYNAKLAR....72
HAM VERİLER....86
FORMLAR....87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....91

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Geleneksel izolasyon yöntemleri ile geliştirilen mikroakışkan cihazlar

Tablo 4-1: Sunflower tasarımlı mikrokanaldaki AfM-MNH'lerin akış hızına göre normalleştirilmiş odaklanma kalitesi değerleri

Tablo 4-2: AfM-MNH ortalama saflık değeri

Tablo 4-3: MNH ve HKH'lere ait ortalama geri kazanım oranı

Tablo 4-4: VSEL kök hücrelerin ortalama geri kazanım oranı

Tablo 4-5: VSEL kök hücrelerin ortalama saflık düzeyi

Tablo 4-6: VSEL kök hücrelerde rodamin 123 ^{sönük}, SSEA-4 ve CD133 pozitif ortalama değerleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kök hücrelerin sınıflandırılması

Şekil 2-2: Farklı kök hücre türleri ve kaynakları

Şekil 2-3: Farede VSEL kök hücre (2-4μm) ve hematopoetik kök hücrenin (8-10 μm) TEM Görüntüsü

Şekil 2-4: Fare Kİ ve insan KK'da VSEL kök hücrelerin tanımlanması.

Şekil 2-5: Periferal kandan fikol ile elde edilen hücrelerin giemsa boyamaları

Şekil 2-6: Hücrelerin immünofloresan boyama görüntüleri

Şekil 3-1: Hedef hücrelere ait ayrıştırma ve tanımlama işlem basamakları

Şekil 3-2: Sunflower mikrokanal tasarımı ve geometrik parametreler

Şekil 3-3: Sunflower tasarımlı mikrokanal çıkışlarında MNH ve VSEL kök hücre görünütüsü

Şekil 3-4: SU-8 fotorezist kullanılarak kalıp hazırlama üretim süreçleri

Şekil 3-5: Sunflower tasarımlı mikrokanal karakterizasyonu

Şekil 3-6: Hücrelerin kanaldan geçişinin floresan mikroskobu ile incelenmesi

Şekil 3-7: Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme sonucu oluşan fraksiyonların görüntüleri

Şekil 4-1: AfM-MNH ve eritrositlerin giemsa boyama görüntüleri

Şekil 4-2: Farklı hematolojik ürünlere ait mononükleer hücreleri ile K562 ve Jurkat hücrelerinin boyut dağılımları.

Şekil 4-3. Floresan boyalarla boyanmış ve boyanmamış hücrelerin görüntüsü

Şekil 4-4: Sunflower tasarımlı mikrokanalda hücre hatlarına ait odaklanma çizgileri

Şekil 4-5: Dondurulmuş aferez materyalinin çözülmesinden sonra pıhtılaşan ve hemoliz olan ürün görüntüleri

Şekil 4-6: Sunflower tasarımlı mikrokanaldaki MNH'lerin odak çizgisi görüntüleri

Şekil 4-7: Sunflower tasarımlı mikrokanaldan geçirilen MNH'lerde hücre canlılık seviyesi grafiği

Şekil 4-8: Mikrokanalın giriş ve çıkışlarına ait eritrosit (kırmızı) ve MNH'lerin (mavi) floresan görüntüleri

Şekil 4-9: Sunflower tasarımlı mikrokanalda AfM-MNH ve eritrositlere ait verimlilik ve saflık değerleri görüntüsü

Şekil 4-10: AfM-MNH ve AfM-HKH akış sitometri kapılama stratejisi.

Şekil 4-11: Sunflower tasarımlı mikrokanalın izolasyon verimlilik değerleri

Şekil 4-12: Sunflower tasarımlı mikrokanalda hematopoetik kök hücre saflık değeri

Şekil 4-13: VSEL kök hücrelere ait akış sitometri kapılama stratejisi

Şekil 4-14: VSEL kök hücrelerin akış sitometri analizine göre ortalama geri kazanım oranı ve saflık düzeyi

Şekil 4-15: VSEL kök hücrelerde rodamin $123^{sönük}$ popülasyona ait akış sitometri kapılama stratejisi.

Şekil 4-16: İki farklı izolasyon tekniğinde AfM-MNH hücre kaybı düzeyi

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AfM: Aferez Materyali

AfM-MNH: Aferez Materyali Mononükleer Hücre

ÇÜL: Çip-üstü-laboratuvar

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

dk: Dakika

DI: Deiyonize

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DTH: Dolaşımdaki Tümör Hücre

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FACS: Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma

FBS: Fetal Sığır Serum

GKO: Geri Kazanım Oranı

HKH: Hematopoetik Kök Hücre

iPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

Kİ: Kemik İliği

Kİ-MNH: Kemik İliği Mononükleer Hücre

KK: Kordon Kanı

MACS: Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma

MKH: Multipotent Kök Hücre

MNH: Mononükleer Hücre

MPK: Mobilize Periferik Kan

MzKH: Mezenkimal Kök Hücre

NOKaD: Normalleştirilmiş Odaklanma Kalitesi Değeri

OSD: Ortalama Saflık Değeri

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PDMS: Poli Dimetil Siloksan

PK: Periferik Kan

PK-MNH: Periferik Kan Mononükleer Hücre

Rodamin 123: Rho 123

rpm: Revolutions per Minute

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S.S: Standart Sapma

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu

UV: Ultraviyole

VSEL kök hücre: Very Small Embryonic-Like (Çok Küçük Embriyonik Benzeri) Kök Hücre

X: Ortalama Değer

YGS: Yoğunluk Gradyanlı Santrifüjleme

ÖZET

Okşak, N. (2023). Mikrofluidik Sistemlerde Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mononükleer hücreler (MNH); lenfosit ve monositler gibi farklılaşmış hücreler ile hematopoetik kök ve VSEL kök hücre gibi ilkel hücrelerden oluşan bir tür beyaz kan hücresidir. MNH'ler tüm kan hücrelerinin %0,06'sından daha azını oluşturur. Bu nedenle oldukça düşük olmalarından dolayı araştırma ve klinik uygulamalar için zenginleştirilmeleri gerekir. Günümüze kadar bu hücrelerin saflaştırılmasında çeşitli teknikler geliştirilmesine rağmen halen etkili bir yöntem bulunmamaktadır. Son on yılda, mikroakışkan sistemler hücre saflaştırmada etkili bir araştırma alanı olmuştur. Bundan dolayı birçok hastalık ve kanser türlerinin tanı ve tedavisinde etkili olduğu ispatlanmış MNH ve VSEL kök hücrelerin ataletsel mikroakışkan sistem ile yüksek verim ve saflıkla izolasyonunu amaçladık.

Sağlıklı kişilerin aferez ve kemik iliği donörlerin kullanılmayan materyalinden fikol tabakalandırma ile MNH zenginleştirildi. Ardından bu hücreler mikroakışkan sistemden geçirilerek ataletsel kuvvetler yöntemi ile, büyüklüklerine ve deformabilite özelliklerine göre ayrıştırıldı ve saflaştırıldı. Son aşamada hücre süspansiyonu mikroçipten geçirildikten sonra, MNH alt grubu hücreleri karakterize etmek için çeşitli pluripotent ve multipotent kök hücre markırları incelendi.

Önerdiğimiz mikroakışkan sistem ile, yüksek verim ve saflıkta MNH ve VSEL kök hücre elde edildi. MNH'ler %97,52'lik bir verimle ve %84 bir saflıkla toplanırken, VSEL kök hücreler %15,76'lık bir saflık ile toplandı. Hücre canlılığının etkilenmediği bu sistemde hücre kaybı oldukça düşüktü. Ataletsel mikrokanal ayırma tekniğimiz; sürekli işleme, yüksek akış hızı (0,7 ml/dk), otomasyon için işlem prosedürlerini basitleştirme ve kanalda tıkanmanın olmaması gibi avantajlara sahiptir. Ek olarak, bu teknik, bir akış sitometride hücrelerin doğrudan analizini kolaylaştırabilir ve manipülasyon işlem sayısını azaltabilir. MNH kök hücre alt gruplarının güvenilir bir şekilde ayrıştırılması rejeneratif tıp alanında önemli sorunları çözecektir.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre izolasyonu, mononükleer hücre karakterizasyonu, mikroakışkan sistem

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36440.

ABSTRACT

OKSAK, N. (2023). Separation and Characterization of Hematopoietic Stem Cells by Microfluidic Systems. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Physiology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Mononuclear cells are a kind of leukocyte that includes differentiated cells such as lymphocytes and monocytes and primitive cells such as hematopoietic and VSEL stem cells. Although various techniques have been developed for the purification of these cells, there is still no sufficiently good method. In the last decade, microfluidic systems have been an influential area of research in cell purification. Therefore, we aimed to investigate the separation of MNCs and VSEL stem cells using Sunflower-shaped microfluidic system.

After MNCs were enriched by ficoll stratification, these cells were separated according to their size and deformability properties by passing through the microfluidic system. In the final step, in these cells collected at outlets, various pluripotent and multipotent stem cell markers were examined for characterization.

With our proposed microfluidic system, MNCs and VSEL stem cells were obtained with high yields and purity. MNCs could be sorted with a recovery of 97.52% and a purity of 84%, while VSEL stem cells could be collected a purity of 15.76 %. In this microfluidic system, where cell viability was not affected, the cell loss was quite low. Our inertial microchannel separation technique has advantages such as continuous processing, a high operation flow rate (e.g., 0.7 ml/min), simplifying the operative procedures for automation, and creating no clogging problems. Furthermore, this technique can facilitate direct cell analysis in a flow cytometer, reducing the need for man-hand manipulation processes. Reliable separation of subsets of stem cells from MNCs will solve important problems in the field of regenerative medicine.

Key Words: Separation of stem cell, mononuclear cell characterization, microfluidic system

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36440.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler kendini yenileyebilen ve olgun işlevsel hücrelere farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanır. Kök hücre çalışmaları, son yıllarda biyolojinin temel sorunlarını incelemek ve hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler yaratmak üzere en çok araştırmanın yapıldığı bir alan haline geldi (Jones ve ark., 2010). Kök hücre nakli, lösemi ve lenfoma gibi bazı malign kan hastalıkları, kemik iliği yetmezlikleri ile doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde sıklıkla başvurulan hayat kurtarıcı yöntemlerden biridir (Erdem-Kuruca ve ark. 2019). Bu hastalıklara ek olarak diyabette (Chhabra ve Brayman 2013); deri kaybı, otoimmün, nörolojik, eklem ve kas hastalıklarında (Mazini ve ark. 2019); kardiyovasküler hastalıklarda (Bruun ve ark. 2018, Mazini ve ark. 2019) ve bazı kanser türlerinde (Zhang C.L. ve ark., 2017) de geniş uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca iskemi ve reperfüzyon hasarının tedavisinde kök hücrelerin kullanılması ile aşırı inflamasyonun baskılandığı ve hücre hasarının onarıldığı gösterilmiştir (Almendros ve ark. 2012). Bu özelliklerinden dolayı kök hücre tedavisi büyük önem taşımaktadır.

Kök hücre ve alt gruplarının, heterojen bir hücre süspansiyonundan izolasyonu, temel araştırma ve klinik uygulamaların hedefidir. Dolayısıyla, bu hücrelerin saflaştırılması için uzun yıllar çeşitli teknikler geliştirilmektedir (Chen, Q ve ark. 2013). Akış sitometri, hücre analizinde altın standarttır ve düzenli olarak kan hücrelerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu için kullanılmasına rağmen insan uygulamalarında (sorting) yeterli sterilizasyonun sağlanamaması nedeniyle risklidir. Ayrıca akış sitometri, kandaki nadir hücrelerin analizinde yetersizdir (Hur ve ark. 2010).

Mikroakışkanlara dayanan mikromanipülasyon teknikleri ile tanı ve tedavi için çeşitli hücreler izole edilebilir (Gao ve ark. 2019). Mikroakışkan sistemler, cihazların ve işlemlerin minyatürleştirilmesini amaçlamaktadır. Bu sistemler basit, hızlı ve özellikle nadir hücreler için yüksek oranda saflaştırılmış hücreler elde edilmek üzere tasarlanan yöntemler olarak ortaya çıkmıştır. Numune enjeksiyonu, akış ve toplama işlemlerinin tamamı tek bir çip üzerinde gerçekleşmektedir (Zhu ve Murthy 2014). Hücre saflaştırılmasında mikroakışkan sistemler son on yılda oldukça etkin bir araştırma alanı olmuştur. Bu sistemler, konsantre numunelerde nadir hücrelerin izolasyonunda yüksek verim elde edilmesi (Plouffe ve Murthy 2014), düşük kimyasal tüketimi, ucuz olma

(Ertl ve ark. 2014) entegrasyon kolaylığı, tekrarlanabilme (Chen Q ve ark. 2014) ve daha yüksek kök hücre geri kazanımı (Zhu ve Murthy 2014) gibi oldukça avantajlı özelliklere sahiptir. Çeşitli mikrokapiller, mikrosütunlar, mikroporlarla dizayn edilen bu sistemlerde hücrelerin boyut, mekanik esneklik, deformabilite, adezyon ve elektrik yükleri gibi özelliklerine dayalı saflaştırma yapılmaktadır (Mohameda ve ark. 2009; Hosokawa ve ark. 2013; Lv ve ark. 2013). Mikrofiltrasyon, dielektroforez, akustoforez (Plouffe ve Murthy 2014) ve ataletsel yöntemler (Kim ve ark. 2018) veya bunların kombinasyonları ile yapılan izolasyonla farklı hücre ve partiküller ayrılabilmektedir. Bu yeni teknolojiler hücrelerin boyut, şekil değiştirebilme, morfoloji, elektriksel özelliklerinin yanı sıra manyetik partiküller ve yüzey işaretleyici antikorlar kullanarak hücrelerin seçici izolasyonunu sağlar. Şimdiye kadar, hücrelerin seçici ayrıştırılması için evrensel olarak benimsenecek iyi bir teknik geliştirilmemiştir. Bu eksiklik araştırmacıları, uygulamalarında en uygun tekniği belirleyebilmek için farklı mikroakışkan mekanizmaların incelenmesine yönlendirmiştir. Geleneksel ayrıştırma tekniklerine uyarlanan çeşitli mikroakışkan cihazlar vardır. Bu cihazlar ile kan hücresi, bazı kanser hücre hatları, sperm hücreleri, E.Coli ve dolaşımdaki tümör hücresi (DTH) gibi hücreler izole edilmiştir (Caffiyar ve ark. 2017). Mikroakışkan sistemlerin deneysel olarak kullanılması ise son on yıla ait olduğu için klinikte kullanılabilmesi amacıyla daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Embriyonik kök hücre hatların ve mezenkimal kök hücrelerin (MzKH) dokulara farklılaşmasını mikroakışkan sistemlerde inceleyen bazı çalışmalar bulunsa da (Park ve ark. 2007; Villa-Diaz ve ark. 2009; Fung ve ark. 2009; Lanfer ve ark. 2009; Roda ve ark. 2009) hücre çoğaltma ve ayrıştırmada basit, ucuz, yüksek verimlilik ve saflık gibi özelliklere sahip tekniklere yönelik çalışmalar yeterli seviyede değildir.

Bu çalışmanın amacı, heterojen numune içerisindeki hematopoetik hücrelerin farklı alt gruplarının güvenilir bir şekilde ayrıştırılmasını sağlayacak bir mikroakışkan izolasyon tekniğinin geliştirilmesidir. 6-8 μm (VSEL kök hücre) ile 10-15 μm (MNH) boyutlarındaki hücrelerin ayrıştırılması hedeflendi. Bu amaçla aferez materyali, kemik iliği ve periferik kan örneklerinden yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile 2. katmanda mononükleer hücreler zenginleştirildikten sonra, bu hücreler mikroçiplere yüklenerek kanalın farklı çıkışlarında MNH ve VSEL kök hücreler ataletsel kuvvetler yöntemi ile, büyüklüklerine ve deformabilite özelliklerine göre ayrıştırıldı ve saflaştırıldı. Kök hücrelerin güvenilir bir şekilde ayrıştırmasını sağladığını düşündüğümüz bu

mikroakışkan temelli hücre ayrıştırma tekniği, rejeneratif tıp alanında nitelikli transplante edilebilir hücre materyali elde edilmesine ve maliyetin azalmasına katkı sağlayabilir.

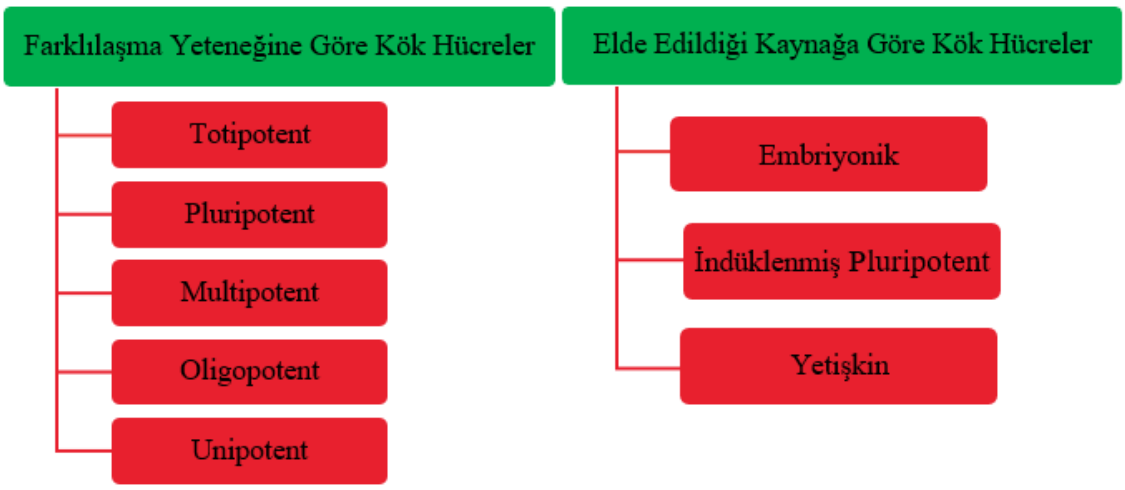
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre Tanımı

Kök hücreler, bir organizmanın herhangi bir hücresine dönüşebilen, kendini yenileme yeteneğine sahip ve vücudun iç onarım sistemleri olarak işlev gören özelleşmemiş hücreler olarak tanımlanır. Organizma canlı olduğu sürece kendini yenilemesi ve yeni hücre oluşumu sınırsız şekilde devam eder (Zakrzewski ve ark. 2019). Farklılaşmamış ve heterojen olan kök hücrelerin, kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma (pluripotency) potansiyeli vardır. Kendini yenileme, simetrik ve asimetrik hücre bölünmesi şeklinde gerçekleşir. Simetrik hücre bölünmesi yüksek bölünme kapasitesiyle öncü hücreye farklılaşmayı sağlarken, asimetrik hücre bölünmesi hem öncü hücreye farklılaşmayı hem de kendi yedeğinin oluşmasını sağlamaktadır (Morrison ve Kimble 2006). Farklılaşma, hücreler arasındaki fiziksel temas, kendini çevreleyen dokudaki kimyasal salgı ile oluşan ve genler tarafından kontrol edilen sinyaller yoluyla sağlanır (Zakrzewski ve ark. 2019). Kök hücrelerin üç germ katmanı ve türevlerine farklılaşabilme yeteneği olan pluripotensiyel özelliği ile hücre tipi belirlenebilir (Cavaleri ve Schöler 2009).

2.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine veya elde edildikleri kaynaklara göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Kök hücrelerin sınıflandırılması.

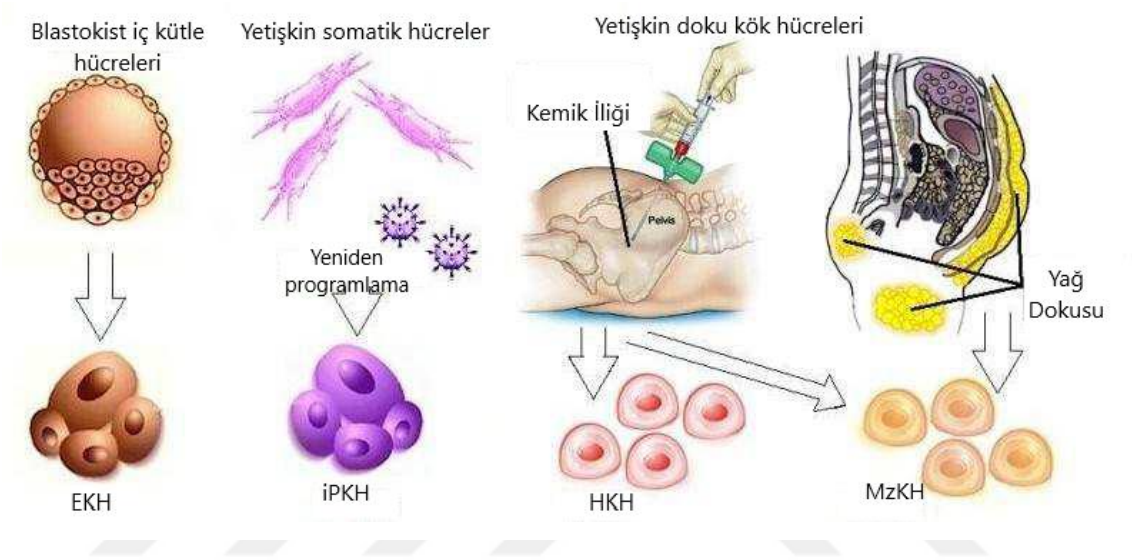
2.2.1. Farklılaşma Yeteneklerine Göre Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşma yetenekleri bakımından totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılır (Rajabzadeh ve ark. 2019). Totipotent kök hücreler, tüm hücre tipine farklılaşabilen ilk embriyonel hücrelerdir. Fertilize yumurta hücresi olan zigot hücresinin varoluşundan itibaren 4 hücreden 8 hücreye bölünmesine kadar olan tüm blastomerler totipotent olarak tanımlanır (Herzog ve ark. 2003; Mitalipov ve Wolf 2009). Bu hücreler hem embriyo hem de embriyo dışı yapıların oluşmasına izin verirler (Zakrzewski ve ark. 2019). Pluripotent kök hücreler; totipotent kök hücrelerden oluşan ve üç embriyonel germ tabakasından (ektoderm, endoderm ve mezoderm) meydana gelen hücreleri üretirler. Blastokistin iç hücre kütlesinden izole edilebilirler. Bu hücreler, fötal ya da yetişkin 200 farklı tipteki hücreden herhangi birine farklılaşabilir (Girlovanu ve ark. 2015). Multipotent kök hücreler (MKH); sınırlı farklılaşma yeteneğine sahip olmasına rağmen bir veya daha fazla hücre serilerine dönüşürler (Bibber ve ark. 2013). Örneğin kemik iliği MKH'leri tüm kan hücre serilerine, beyin MKH'leri ise farklı nöral hücrelere, glia veya hematopoetik kök hücrelere farklılaşabilir (Mundra ve ark. 2012). Oligopotent kök hücreler; birkaç hücre serisine farklılaşabilen hücrelerdir. Beyaz kan hücrelerine (miyeloid serisine) dönüşebilen ancak kırmızı kan hücrelerine dönüşemeyen miyeloid progenitör kök hücre buna örnek verilebilir. Unipotent kök hücreler, daha az farklılaşma yeteneğine sahip olup, mitoz bölünme özelliği ile karakterize edilir. İkinci özellikleri, onları rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday olmasıdır. Bu hücreler sadece belli bir hücre serisi oluştururlar (Zakrzewski ve ark. 2019).

2.2.2. Elde Edildiği Kaynağa Göre Kök Hücreler

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre embriyonik, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) ve yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2-2). Embriyonik kök hücreler; pluripotent yapıda olup kendini yenileme yeteneği gösterir ve bu hücreler blastokist iç hücre kütlesinden elde edilir. Üç embriyonel germ tabakası (ektoderm, endoderm ve mezoderm) hücrelerine ya da her türlü somatik hücreye farklılaşabilirler (Walters 2004; Rajboot ve Tewari 2018). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, ilk olarak Yamanaka ve ark. tarafından (2006) elde edilen, embriyonik kök hücre benzeri işlevi olan ve vücut somatik hücrelerinin bazı transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanan (re-programming) hücrelerdir (Takahashi ve Yamanaka, 2006).

Yetişkin kök hücreler, olgun dokudan türetilen sadece sınırlı sayıda hücre tipi oluşturabilen hücrelerdir. Bu kök hücreler, kemik iliğinde bol miktarda bulunmaktadır (Sada 2022). Ayrıca merkezi sinir sistemi, deri epidermis, sindirim kanalı, iskelet kası, kornea, retina, pankreas, göbek kordonu kanı, periferik kan, amniyotik sıvı, karaciğer, kalp, yağ dokusu ve akciğer gibi birçok doku ve organdan elde edilebilmektedir (Oyar 2016). Yetişkin kök hücrelerin en güzel örneği hematopoetik kök hücrelerdir (TÜBA, 2009, p. 41).



Şekil 2-2: Farklı kök hücre türleri ve kaynakları (Berryman ve List 2017 kaynağından düzenlenmiştir). EKH: Embriyonel kök hücre, iPKH:indüklenmiş pluripotent kök hücre, HKH:hematopoetik kök hücre, MzKH: Mezenkimal kök hücre.

2.2.2.1. Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler (HKH); hematopoetik hücrelere farklılaşarak tüm kan hücrelerinin oluşumunu sağlayan hücrelerdir (Barky ve ark. 2017). Kök hücre havuzunu korumak üzere (Zhao ve ark. 2014) hücre siklusunun G0 fazında (uyku) bulunmaktadır (Çelik 2017). HKH'ler plastisite, homing ve mobilizasyon özelliklerine sahiptir (Müller ve ark. 2002). Yetişkin hematopoetik sistemdeki HKH'ler, kendini yenileme ve multipotent özellikleri sayesinde bireyin tüm yaşamı boyunca kök hücre rezervi olarak korunmaktadır (Ng ve Alexander 2017).

Hematopoetik kök hücreler çeşitli spesifik yüzey markırların ekspresyonuna veya eksprese edilmemesine bağlı olarak tanımlanmaktadır. HKH, CD45 ve CD34 yüzey markırı taşırlar. Bununla birlikte bu hücrelerin popülasyonlarından biri, tirozin kinaz reseptör c-Kit (CD117) ve membran glikoprotein Sca-1'i (Okada ve ark. 1992) eksprese

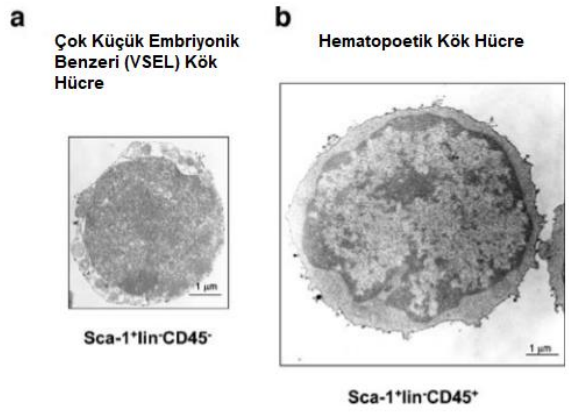
ederken, terminal farklılaşma markılarını (Lin-: Ter119, Gr-1, Mac-1, B220, CD4 ve CD8) eksprese etmemektedirler (Thomas ve ark. 1999; Rossi ve ark. 2011).

Embriyonik kök hücre ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin kullanımındaki kısıtlılık nedeniyle klinik kullanımda hematopoetik kaynaklı kök hücreler daha çok tercih edilmektedir. Yüksek rejenerasyon ve çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahip olduğu için embriyonik kök hücreler (EKH) (Sell 2004) biyomedikal araştırmalarda ve rejeneratif tıp alanında en çok araştırma yapılan kök hücre popülasyonlarıdır (He ve ark. 2003). Ancak insan embriyonik kök hücrelerin kullanımı, dünyanın birçok ülkesinde çeşitli etik tartışmalar, teratoma riski (Prokhorova ve ark. 2009) allojenik kullanımındaki immün reaksiyonlar (Kaufman 2009) nedeniyle klinik kullanımı sınırlandırılmıştır. Benzer şekilde iPKH' in klinik uygulamaları ile ilgili güvenlik sorunları hala devam etmektedir (Volarevic ve ark. 2018). Hematopoetik kök hücreler mobilize periferik kan (MPK), kordon kanı (KK) ve kemik iliğinden (Kİ) elde edilmektedir (Kaufman 2009; Barriga ve ark. 2012; Ng ve Alexander 2017). Yüksek rejenerasyon yeteneğinden dolayı en yaygın kullanılan kaynak kök hücre Kİ'dir. Klinikte Kİ vericiden toplandıktan sonra doğrudan (fraksiyone edilmeden tümü) alıcıya verilir. Oysa periferik kan projenitör hücre (PKPH=MPK) ve KK kapalı santrifüj sistemlerinden geçirilerek (aferez) daha çok mononükleer hücre tabakalarının bulunduğu kısım izole edilerek saklanır ve gerektiğinde hastaya verilmektedir. Bu kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için kg başına belli bir sayıda olması (en az 3,5 x 10^8 MNH/kg veya 2-6x10^6 CD34+ hücre/kg) ve ağırlıklı olarak pluripotent (çok yönlü farklılaşma) potansiyelli kök hücreler olması gerekir (Perutelli ve ark. 1999). Kordon kanı ve kemik iliğinin elde edilmesinde ve efektif kullanımında hala bazı sorunlar vardır. Hematopoetik kök hücre kaynağı olan kordon kanında bulunan kök hücre sayısı yetişkinlerde sayısal olarak yetersizdir. Bu nedenle kordon kanı neredeyse sadece çocuklarda kullanılabilmektedir (Rocha ve ark. 2006). Kemik iliği anestezi altında genellikle arka iliak kanattan toplanmaktadır. Birçok hasta için kemik iliği aspirasyonu/biyopsisi rahatsızlık vermenin yanı sıra endişe uyandırıcı invazif bir uygulamadır (Şekil 2-2) (Trewhitt 2001). Klinikteki bu problemler, yeni kök hücre tipinin ya da kolay ve verimi yüksek hücre ayrıştırma tekniklerin keşfedilmesine sebep olmuştur. Son zamanlarda keşfedilen plastisite ve pluripotent özelliklere sahip olduğu ileri sürülen çok küçük embriyonik

benzeri kök hücreler (Very Small Embryonic Like=VSEL stem cells) bu alandaki bazı sorunların kısmen üstesinden gelerek kök hücreye yeni bir bakış açısı kazandırmıştır.

2.3. Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücreler (Very Small Embryonic Like=VSEL stem cells)

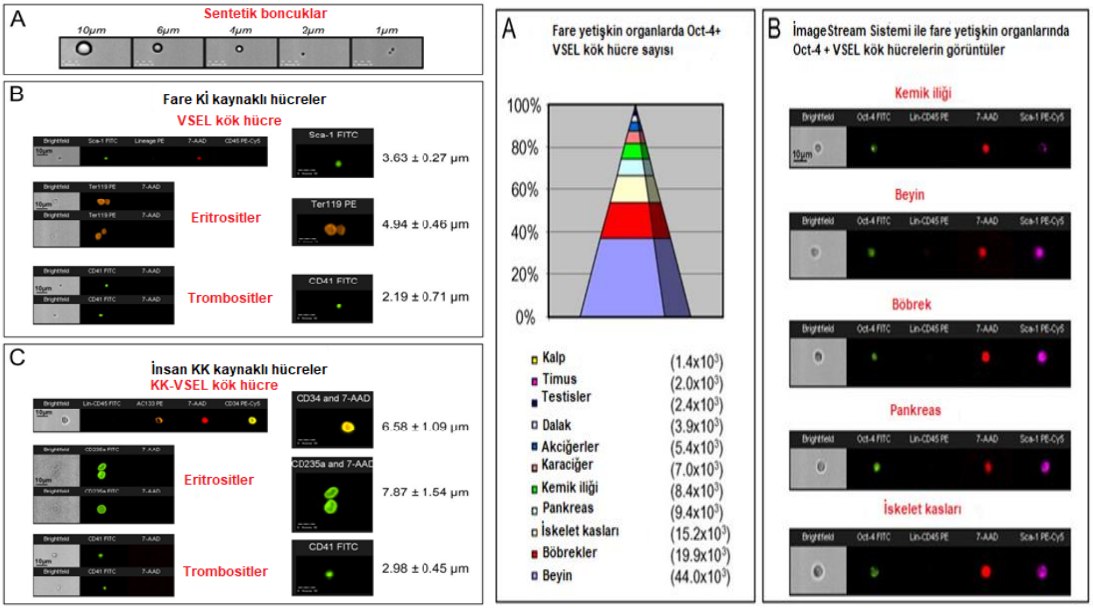
İlk olarak Kucia ve ark. (2006) tarafından fare kemik iliğinde embriyonik karakter taşıyan (VSEL kök hücre) çok küçük (2-4 μm) hücrelerden oluşan homojen bir popülasyon tanımlanmıştır. Normal hematopoetik kök hücrelerden farklı olan bu grup daha sonraki birçok çalışmada morfolojik, immünolojik ve in vitro farklılaşma potansiyeli gibi yöntemlerle net bir şekilde ayrılabilmektedir. Şekil 2-3'te farede VSEL kök hücre ve normal hematopoetik kök hücrenin Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile çekilen görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 2-3: Farede VSEL kök hücre (2-4μm) ve hematopoetik kök hücrenin (8-10 μm) TEM Görüntüsü (Kucia ve ark. 2008).

Daha sonraki çalışmalarda VSEL kök hücrelerinin plastisite ve pluripotent özelliklere sahip olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca hem hematopoetik hem de hematopoetik olmayan dokularda doğum sonrası doku yenilenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Kucia ve ark. 2008; Ratajczak ve ark. 2008, Zuba-Surma ve ark. 2009). Bu hücrelerin nükleus:sitoplazma oranı hematopoetik kök hücrelerden büyüktür ve kromatin yapısı daha kompakttır. Küçük boyutlarına rağmen diploid DNA'ya, çok sayıda mitokondriye ve yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler (Ratajczak ve ark. 2008) ve metabolik olarak aktivitesi düşüktür (Bhartiya ve ark. 2012). Ayrıca bu hücrelerin doku/organ hasarında kemik iliğinden periferik kana göç ettikleri rapor edilmiştir (Kucia ve ark. 2006). VSEL kök hücrelerin yetişkin bir bireyde

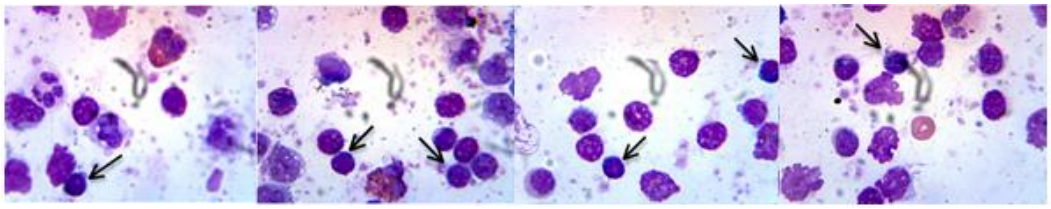
periferik kan, kemik iliği ve bütün vücut dokularında bulunduğu ifade edilmektedir; buna ek olarak yenidoğan kordon kanında bulunduğu gösterilmiştir (Kim Y. ve ark. 2014). Şekil 2-4'te fare Kİ ve insan KK'da VSEL hücrelerinin dağılımı görülmektedir. Burada, Zuba-Surma ve arkadaşları (2009) tarafından fare Kİ ve insan KK'da akış sitometride (image stream programı ile) referans olarak alınan boncuklarla mukayese edilerek büyüklüğe göre ve bazı embriyonel markırlarla yapılan tanımlamalar ile VSEL kök hücrelerin dağılımı görülmektedir.



Şekil 2-4: Fare Kİ ve insan KK'da VSEL kök hücrelerin tanımlanması. Sol tarafta fare Kİ ve insan KK'da akış sitometri ile hücre boyutlarının dağılımı ve sağ tarafta çeşitli fare dokularındaki Oct-4+VSEL kök hücrelerin dağılımı görülmektedir (Zuba-Surma ve ark. 2009).

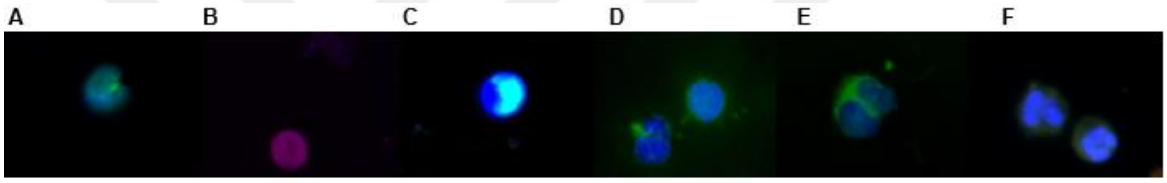
Bhartiya ve arkadaşları (2012) çalışmalarında kordon kanlarında VSEL'lerin, fikol tabakalama ile ayrılan kanın, mononükleer hücre katmanında değil aksine eritrositlerin bulunduğu en alt katmanda olduklarını göstermişlerdir. Bu, VSEL kök hücrelerin fikol ile izolasyonda, eritrosit katmanında bulunduğunu ve kordon kanı saklanması sırasında atıldıkları için bu yüksek rejenerasyona sahip hücrelerden yararlanılamadığını gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmada kullanılan metod, Erdem-Kuruca ve arkadaşları (2019) tarafından kordon kanı, aferez materyali ve periferik kandan aynı hücre grubunun izole edilmesinde kullanıldı ve bu hücreler immünofloresan boyama, akış sitometri ve western blotlama ile tanımlandı (Çelik 2014; Erdem-Kuruca ve ark. 2019). Şekil 2-5'te, fikol tabakalama ile ayrılan periferal kanın 2.

katmanından elde edilen hücrelerin yayma preperatlarında (giemsa) VSEL kök hücre olduğu düşünülen hücre görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 2-5: Periferal kandan fikol ile elde edilen hücrelerin giemsa boyamaları (Çelik 2014).

Aynı çalışmada 5. katmandan elde edilen bu hücrelerin immünofloresan boyamaları görülmektedir (Şekil 2-6). Otomatik hücre sayan cihaz (Contess) ile aynı hücrelerin çoğunlukla 5-6 µm çapında olduğu görülmektedir.



Şekil 2-6: VSEL kök hücrelerin immünofloresan boyama görüntüleri; Kordon kanı 5. katmanda a) Oct4 (yeşil), DAPI (mavi) b) SSEA4 (koyu pembe), DAPI (mavi); Periferal kan 5. katmanda c) NANOG (yeşil), DAPI (mavi), d) Oct4 (yeşil), DAPI (mavi); Aferez materyali 5. katmanda e) NANOG (yeşil), DAPI (mavi), F) SSEA4 (yeşil), DAPI (mavi) (Çelik 2014).

2.3.1. VSEL Kök Hücre Karakterizasyonu

VSEL kök hücre karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, VSEL kök hücrelerin CD45 antijenini eksprese etmediği ve çekirdekte embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörü Oct-4'ü eksprese ettiği tespit edilmiştir (Zuba-Surma ve ark. 2009). Başka bir grup kordon kanından, kemik iliğindeki gibi küçük boyutlu, Oct-4, NANOG mRNA'sını sentezleyen VSEL kök hücreleri izole etmeyi başarmıştır (Halasa ve ark. 2008). Daha sonra, Sovalat ve arkadaşları (2011) insan kemik iliğinde granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) kullanıldıktan sonra periferik kana mobilize olan CD34(+) hücreler elde etmiş ve VSEL kök hücre olduğu düşünülen bu olgunlaşmamış hücrelerin CD34(+)/CD133(+)/CXCR4(+)/Lin(-)/CD45(-) belirteçlerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu küçük hücrelerin (2-5 µm) Oct-4, NANOG ve SSEA-4 sentezlediğini, protein ve mRNA düzeyinde göstermişlerdir. Barriga ve arkadaşları da

(2012) fare ve insan kemik iliğinden izole edilen VSEL kök hücrelerin pluripotent hücre belirteci olan CD133'ü ve CD34'ü eksprese ettiğini ancak hematopoetik hücre belirteci olan CD45'i eksprese etmediğini doğruladılar. Yine insan periferal kan ve kordon kanından elde edilen VSEL kök hücre ile ilgili başka bir çalışmada, akış sitometri sonuçlarına göre debris katmanında, VSEL kök hücre belirteci taşıyan hücre sayısı CD45(-) popülasyonuna göre daha yüksek bulunmuş; elde edilen western blotlama ve immünofloresan sonuçlarına göre bu hücrelerde yüksek miktarda Oct-4 ve NANOG ekspresyonu görülmüştür. Aynı zamanda bu proteinlerin hücre içinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir (Erdem-Kuruca ve ark. 2019).

2.4. Kök Hücre İzolasyon Yöntemleri

Kök hücre alt gruplarının, heterojen bir süspansiyondan izolasyonu, temel araştırma ve klinik uygulamaların hedefidir. Dolayısıyla, bu hücrelerin saflaştırılması için uzun yıllardan beri çeşitli teknikler geliştirilmektedir (Chen Q. ve ark. 2013). Heterojen bir hücre süspansiyonunda, hücre alt gruplarının hızlı ve doğru ayrıştırılması, çeşitli biyolojik araştırmalar ve tıptaki birçok uygulama için elzemdir. Kök hücre izolasyon yöntemleri hücrelerin fiziko-kimyasal, biyo-fiziksel ve immün-afinite özellikleri ile tanımlanan kriterlere göre gruplandırılabilir (Diogo ve ark. 2014, p. 157-181).

a) Fiziko-kimyasal bazlı izolasyon: Boyut, yoğunluk ve yapışma özelliklerine göre gerçekleşir. İki temel yöntem vardır:
   - Santrifüjleme: Heterojen hücre süspansiyonunda, hücrelerin boyut ve/veya yoğunluk özelliklerine göre çöktürmeye dayanan ve böylece birkaç alt popülasyon oluşturan yöntemdir (Rahmanian ve ark. 2017).
   - Membran filtrasyonu: Hücre ile membran por boyutuna ve hücrenin membrana yapışma özelliğine göre filtrasyon gerçekleşir (Diogo ve ark. 2014, p. 157-181).
b) İmmün-afinite bazlı izolasyon: Yüzey markırlarının ekspresyon düzeyine göre gerçekleşmektedir (Diogo ve ark. 2014, p. 157-181). Üç temel teknik aşağıda verilmiştir:
   - Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (FACS): Florofor konjuge antikor bağlı hücrelerin akış sitometriden geçirildiğinde lazer ışınıyla uyarılarak yaydıkları floresan ışık yoğunluğuna göre ayrıştırılırlar (Yousuff ve ark. 2017)
   - Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (MACS): Antikor bağlı manyetik boncuklarla aktifleştirilen hedef hücrelerin negatif ve pozitif

seleksiyon yöntemiyle elde edilmesini sağlamaktadır (Hoeve ve ark. 2017, p. 138-140).

- Afinite kromatografisi: Çözünmeyen bir matrikse, hedef biyomolekül ile spesifik ve geri dönüşümlü olarak kompleks oluşturabilen ligandın sabitlenmesine dayalı güçlü bir ayırma yöntemidir (Rahmanian ve ark. 2017).
- Sulu iki fazlı afinite izolasyonu: Suda çözünen polimer-polimer veya polimer-tuz kombinasyonlarının karıştırılması ile yoğunluklarına göre oluşan fazlar ile ayrışma gerçekleşir. İki fazın arasında yoğunluk-adımı olarak hareket edebilen bir interfaz ve hedef hücreleri yakalayan arafazdan oluşur (Diogo ve ark. 2014, p. 157-181).

c) Biyo-fiziksel bazlı izolasyon (Etiketsiz): Elektriksel, ataletsel/ataletsel olmayan gibi özellikler ile gerçekleşir:
   - Alan Akışlı Fraksiyonlama (FFF): Boş bir kılcal kanal içinde, hareketli fazın laminer akışının ve akışa dik olarak uygulanan bir alanın kombine hareketi ile oluşan FFF odaklı izolasyon tekniğidir (Diogo ve ark. 2014, p. 157-181).
   - Dielektroforez (DEP): Hücreleri içsel elektro-fiziksel özelliklerine göre elektriksel alanda polarize ederek yönlendirmeye dayanan bir sistemdir (Pethig ve ark. 2010)
d) Mikroakışkan yöntem ile izolasyon: Çeşitli özelliklere göre (fiziksel, afinite, biyolojik vs.) gerçekleşir.

2.4.1. Mikroakışkan (Mikrofluidik; Lab-On-a- Chip) Sistemler ile İzolasyon

Mikroakışkan sistemler, çip-üstü-laboratuvar (ÇÜL) teknolojisi olarak bilinen, laboratuvarda yapılan birçok analizin mikro-ölçekte yapılmasına olanak sağlayan ve cihazların ve işlemlerin minyatürleştirilmesini amaçlayan sistemler olarak tanımlanır (Wen-Ming ve ark. 2012). Bu sistemler biyomedikal, gıda, kimya, tıp, eczacılık ve tarım (Düven ve ark. 2018; Zhu ve ark. 2020; Puneeth ve ark. 2021; Fattahi ve Hasanzadeh 2022; Lopes ve ark. 2022) ile su arıtma (Warkiani ve ark. 2015) gibi birçok alanda sahip olduğu avantajlar nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Bu avantajlar; yüksek verimlilik ve hassasiyet gibi çeşitli özelliklere sahip olma (Gao ve ark. 2019); düşük kimyasal tüketimi, ucuz olma (Ertl ve ark. 2014); entegrasyon kolaylığı, tekrarlanabilme (Chen Q. ve ark. 2013); numune enjeksiyonu, akış ve toplama işlemlerinin tamamının tek bir çip üzerinde gerçekleşmesi (Zhu ve Murthy 2014); ve

düşük volümle analizlerin gerçekleştirilmesine olanak sağlama (Sakamoto ve ark. 2007) şeklinde sıralanabilir. Bununla birlikte mikroakışkan sistemlerin, araştırmacıları zorladığı bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Kompleks ya da katı gıda numuneleriyle çalışılamamaktadır (Guo ve ark. 2015). Bu sistemlerde, biyolojik protokolleri ve sistemlerin ölçeklendirilmesini değiştirmek zor olabilir. Özel yazılımların geliştirilmesini gerektirebilir. Ek olarak farklı hücrelerin analizi, hücrelerin kesin olarak tanımlanması ve verilerin yorumlanması için karmaşık ve pahalı optik sistemlerin tasarlanmasına ihtiyaç duyulabilir (Rahmanian ve ark. 2017).

Hücre saflaştırılmasında mikroakışkan sistemler son on yılda oldukça etkin bir araştırma alanı olmuştur. Bu sistemler, konsantre numunelerde nadir hücrelerin izolasyonunda yüksek verim elde edilmesi (Plouffe ve Murthy 2014) ve daha yüksek kök hücre geri kazanımı (Zhu ve Murthy 2014) özellikleri nedeni ile kullanılmaktadır. Çeşitli mikrokapiller, mikrosütunlar, mikroporlarla dizayn edilen bu sistemlerde hücrelerin boyut, mekanik esneklik, deformabilite, adezyon ve elektrik yükleri gibi özelliklerine dayalı saflaştırma yapılmaktadır (Mohameda ve ark. 2009; Hosokawa ve ark. 2013; Lv ve ark. 2013). Mikrofiltrasyon, dielektroforez, akustoforez (Plouffe ve Murthy 2014) ve ataletsel yöntemler (Kim ve ark. 2018) veya bunların kombinasyonları ile yapılan izolasyonla farklı hücre ve partiküller ayrılabilmektedir (Tablo 2-1). Başlangıçta çok az sayıda bulunan DTH'leri yakalamak amacıyla geliştirilen bu sistemler şimdi çeşitli hücrelerin, mikroveziküllerin ve eksozomların saflaştırılması ve tanısı için kullanılmaktadır (Gwak 2018). Tablo 2-1'de bazı geleneksel yöntemler ile geliştirilen mikroakışkan sistemler ve izole edilmiş hücre türleri verilmiştir.

Tablo 2-1. Geleneksel izolasyon yöntemleri ile geliştirilen mikroakışkan cihazlar (Oksak ve Kuruca 2021, p. 422, Kaynak:Yousuff ve ark. 2017).

Yöntem	**µFACS**	**µMACS**	**µDEP**	**Ataletsel Ayrıştırma (Boyut)**	**Santrifüj ve PFF (Boyut ve Yoğunluk)**	**Akustoforez (Yoğunluk ve Sıkıştırılabilirlik)**
Teknik	Floresan bağlı antikor	Kalıcı mıknatıs, Elektromıknatıs, Kendinden montajlı mıknatıs.	Polarizasyon: DİK	Ataletsel kuvvet, Dean kuvvet.	Santrifügasyon, PFF.	Ses dalgası (Akustik kuvvet)
Hücre	Makrofaj E. Coli Fibroblast	Lökositler, DTH, Kök hücreler, Sitokin salgılayan hücreler, MCF-7 hücre hattı, HIV/AIDS ile ilgili epitoplar, E. Coli, CD4(+) lenfositleri.	DTH, Eritroist, Trombosit, Lökosit, Patojenler, PC3 hücre hattı, Sperm hücresi, MG-63 hücre hattı, NIH-3T3 hücre hattı.	Eritrosit, DTH, Sıtmayla enfekte hücreler, Cryptosporidium parvum, Virüs, Aerosoller, HPET tümör hücresi, Plazma, CHO hücre hattı, HeLa hücre.	DTH, Lökosit, Tam kan hücre, Plazma ekstraksiyonu.	Apoptotik hücre, Prostat kanseri hücre, İnsan trombosit, Lökosit.

µ: Mikroakışkan sistem/cihaz, MCF-7: Meme kanseri hücre hattı, PC3: Prostat kanseri hücre hattı, MG-63: Fare osteosarkom hücre hattı, NIH-3T3: Fare fibroblast hücre hattı, DTH: Dolaşımdaki tümör hücre, HPET: İnsan Prostat Epitelyal tümör hücre, CHO: Çin Hamsteri Yumurtalık hücre hattı, PFF: Sıkıştırılmış akış fraksiyonlama, DİK: Dielektroforetik kuvvet.

Mikroakışkan izolasyon teknikler; elektroforez (Qiao ve ark. 2016), dielektroforez (Zhang H. ve ark. 2019), manyetoforetik (Dagher ve ark. 2021) ve ultrasonik akustik ayırma (Wesera ve ark. 2020) gibi aktif teknik ve sıkıştırılmış akış fraksiyonlama (Yamada ve ark. 2004), hidrodinamik kromatografi (Yamada ve Seki, 2005), sedimantasyon (Huh ve ark. 2007) ve ataletsel odaklanma (Zhang J. 2017) gibi pasif tekniklerden oluşmaktadır. Aktif mikroakışkan tekniklerde partikül ayrıştırma (sorting) ve odaklama için bir dış kuvvet uygulanmaktadır (Sonmez ve ark. 2017).

2.4.1.1. Ataletsel Mikroakışkan Sistemler ile İzolasyon

Pasif tekniklerden biri olan ataletsel mikroakışkanlar, işaretleme olmadan partikül ayırma ve zenginleştirme için etkili bir yaklaşım sunmaktadır (Gou ve ark. 2018). Ataletsel mikroakışkanlar yüksek verim, hassasiyet, kontrol edilebilirlik, basitlik ve düşük maliyet gibi üstün yararları bakımından son yıllarda ilgi görmüştür. Fizyolojik numune işleme, klinik teşhis ile çevresel izleme ve temizleme için birçok ataletli mikroakışkan uygulama gösterilmiştir. Geleneksel mikroakışkanlara kıyasla üstündür. İlk olarak, hedef yalnızca numunenin akış hızını ayarlayarak gerçekleştirilebileceğinden

işlem kolaydır. İkincisi, kanal yapısı basittir ve bu nedenle, diğer yöntemler mikroakışkan çipe kolayca entegre edilebilir. Üçüncüsü, diğer yöntemlerle kıyaslandığında, verim oldukça yüksektir, bu yüzden ayrıştırma kısa sürede tamamlanabilir, bu da hücre canlılığı açısından önemlidir. Son olarak, ataletsel mikroakışkanların hücrelerin fonksiyonu üzerinde çok az etkisi vardır, bu yüzden biyomedikal cihazlar için uygundur (Kim ve ark. 2018).

Pasif bir yaklaşım olarak partikül/hücre ayrıştırması açısından ataletsel kuvvetlerin kullanımı son derece etkin ve çok farklı uygulamalarda kendini göstermiştir (Altinagac ve ark. 2015; Sonmez ve ark. 2017). Düz kanallarda, ataletsel kuvvet ve duvar-etkisi ataletsel kuvvetinin denge pozisyonu ile hücreler, boyutsal olarak farklı noktalara odaklanarak etkin bir şekilde ayrışmıştır (Asmolov 1999; Di Carlo ve ark. 2007). Odaklanmanın oluştuğu durumda, bu iki kuvvetin denge hali ve net ataletsel kaldırma kuvveti olarak Denklem 2-1'de belirtildiği gibi gösterilmektedir.

$$F_{L,net} = \rho \left(\frac{U_{max}}{D_H}\right)^2 C_L d_p^4 \ [N] \qquad (2\text{-}1)$$

$$D_H = \frac{4A_c}{P} = \frac{4WH}{2(W+H)} = \frac{2WH}{W+H} \qquad (2\text{-}2)$$

Sırasıyla ρ sıvı yoğunluğunu, U_{max} mikro-kanaldaki maksimum hız, D_H kanalın karakteristik çapını (W: Kanal genişliği ve H: Kanal Yüksekliği, Denklem 2-2), C_L kaldırma katsayısı (genelde 0,5 kabul edilir) ve d_p ise ortalama hücre çapını göstermektedir. Burada görüldüğü gibi $F_{L,net}$ hücre/partikül çapının 4. kuvvetten orantılıdır, bu yüzden bu tip sistematik ayrıştırma yaklaşımının etkili olduğu söylenebilir. Bu durum düşük Reynolds, Re, sayılarında ve $d_p/D_H \ll 1$ etkindir. Kanalın geometrisi spiral bir yapısı olduğunda, santrifüj etkileri ile kanal içerisinde birbirine zıt yönde vortiksler oluşmaktadır. Bu durum Dean kuvvetlerinin oluşumunu tetiklemekte ve Deklem 2-3'de olduğu gibi gösterilmektedir (Ookawara ve ark. 2004).

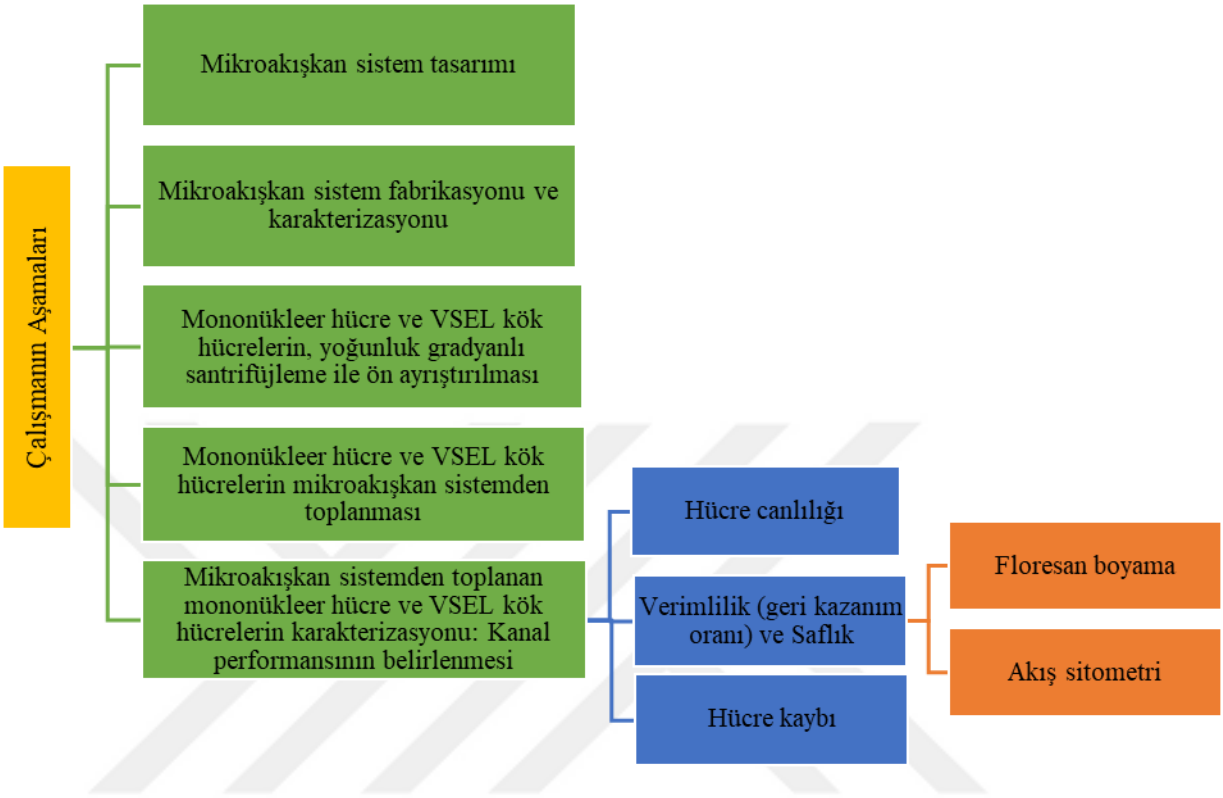
$$F_D = (5.4\times10^{-4})\pi\mu De^{1.63} d_p \ [N] \qquad (2\text{-}3)$$

F_D hücre boyutuna lineer olarak ilişkili ve spiral kanallarda $F_{L,net}$ ve F_D kuvvetlerinin denge durumuna göre hücreler/parçacıklar bir doğrultu üzerinde boyutlarına göre sıralanarak ayrışma sağlanmaktadır. μ burada sıvının dinamik vizkositesidir (Bhagat ve ark. 2008; Gossett ve Di Carlo 2009; Cadirci ve ark. 2018).

2.5. Kök Hücrelerin Klinik Uygulamadaki ve Araştırma Alanındaki Yeri

Kök hücreler, bir dizi hücre ve organa farklılaşarak hücresel tedavide hasarlı hücreleri iyileştirmek veya dokuları yeniden inşa etmek için kullanılabilmektedir. Kök hücrelerin kanser, görme kaybı, diyabet ve yanıkların tedavisindeki klinik önemi kök hücrelere yönelik bilimsel ve tıbbi araştırmaların artışına yol açtı (Sada 2022). Kök hücre tedavisi, hematolojik ve non-hematolojik bir çok hastalık için hayat kurtarıcı yöntemler arasında yer almaktadır. Kemik iliği yetmezlikleri, lösemi ve lenfoma gibi bazı malign kan hastalıklar (Erdem-Kuruca ve ark. 2019); eklem ve kas, kardiyovasküler, nörolojik ve otoimmün hastalıkların ve bazı kanser türlerin tedavisinde tercih edilmektedir (Chhabra ve Brayman 2013; Zhang C.L. ve ark. 2017; Mazini ve ark. 2019). Rejeneratif tedavi, katastrofik kazalar veya kronik hastalıklardan muzdarip bireyler; doğumsal hastalıklar veya yaşlanmanın neden olduğu doku ve organ anormalliklerinin onarımı için umut vaad eden yöntem haline gelmiştir. Bu tedavi yönteminde, sınırsız hücre bölünme potansiyeli ve farklı hücre türlerine farklılaşma yeteneği olan kök hücreler tercih edilmektedir. Hücre farklılaşma sinyallerinin ve mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi sebebiyle, araştırma aracı olarak kök hücrelere ilgi giderek artmaktadır (Sada 2022). Ayrıca bu alandaki ilerlemeler, son derece işlevsel kök hücreler elde etmek için basit, yüksek verimlilik sağlayan ve kullanıma hazır kök hücre izolasyon yöntemlerine duyulan ihtiyacı da arttırmıştır (Zhu ve Murthy 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

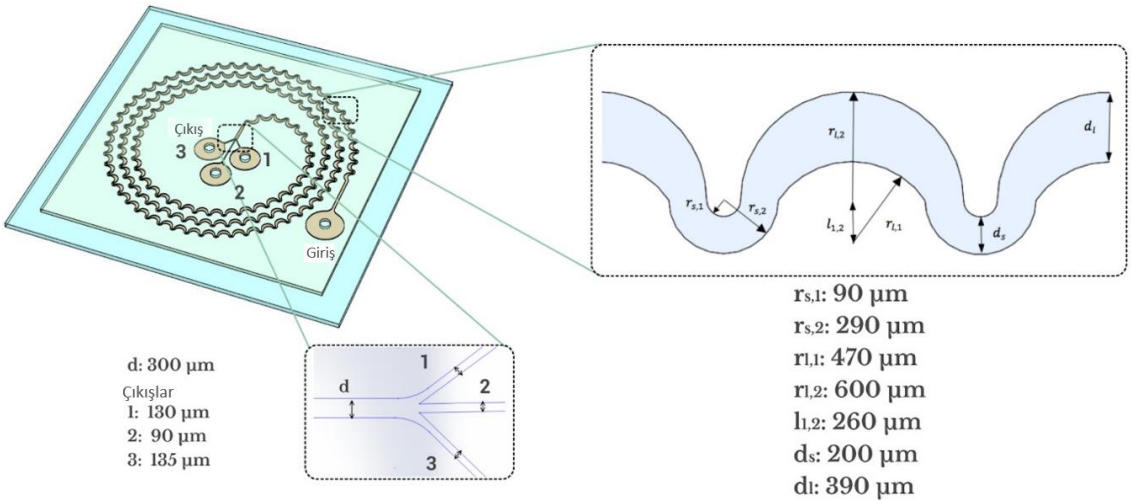


Şekil 3-1: Hedef hücrelere ait ayrıştırma ve tanımlama işlem basamakları.

Çalışmanın bütün aşamaları Şekil 3-1'de verilmiştir. Buna göre deneyler beş adımda gerçekleştirilmiştir.

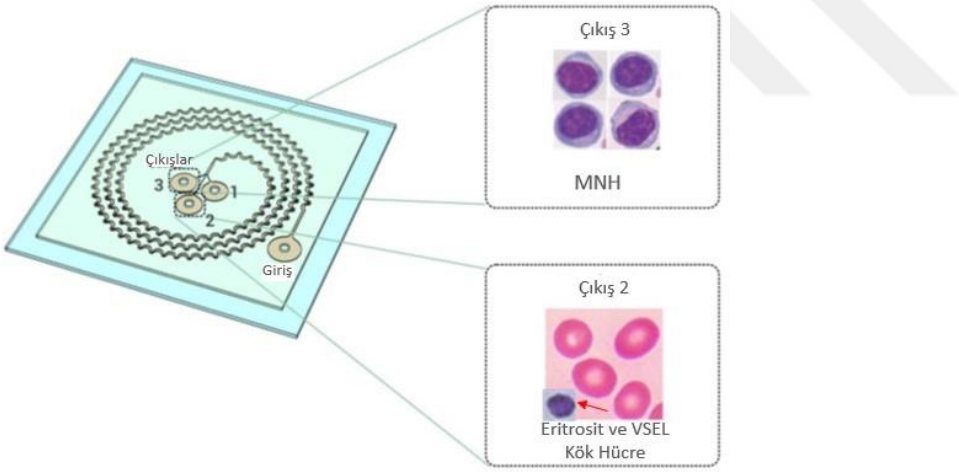
3.1. Mikroakışkan Sistem (Mikrokanal) Tasarımı

Bu projede, bilgisayar destekli "Autocat" çizim yazılımı kullanılarak Sonmez ve arkadaşları (2017) tarafından geliştirilen ve hücre ayrıştırmada başarılı sonuçlar elde edilen "Sunflower" mikrokanal tasarımı kullandı. Dört sarmal döngüden "oluşan Sunflower" tasarımlı spirallı mikrokanal, bir giriş ve üç çıkışa sahiptir. Başlangıç yarıçapı 12 mm olan sarmal üzerinde birbirini izleyen dar ve geniş dönüşlere sahip 151 tekrarlayan asimetrik eğrisel birim ile desenlenmiştir. Sonraki her döngü arasında 1,7 mm vardır. Asimetrik eğrisel (Sunflower) geometri, 390 µm geniş bir kısım çapı ve 200 µm dar bir kısım çapı ile tasarlanmıştır (Şekil 3-2). Hücre ayrışımı, eğriliğin dar kısmındaki dış duvarın yakınında ve eğriliğin geniş kısmındaki iç duvarda hücrelerin toplanmasıyla sağlanır (Di Carlo ve ark. 2007).



Şekil 3-2: Sunflower mikrokanal tasarımı ve geometrik parametreler.

Hedef hücreler, dean sürükleme kuvveti ve ataletsel kuvvetin denge pozisyonu sonucunda mikrokanal çıkışlarında yüksek saflıklarda ayrı mononükleer hücreler (10-15 µm) ve VSEL kök hücreler (6-8 µm) olarak ayrılırlar (Şekil 3-3).



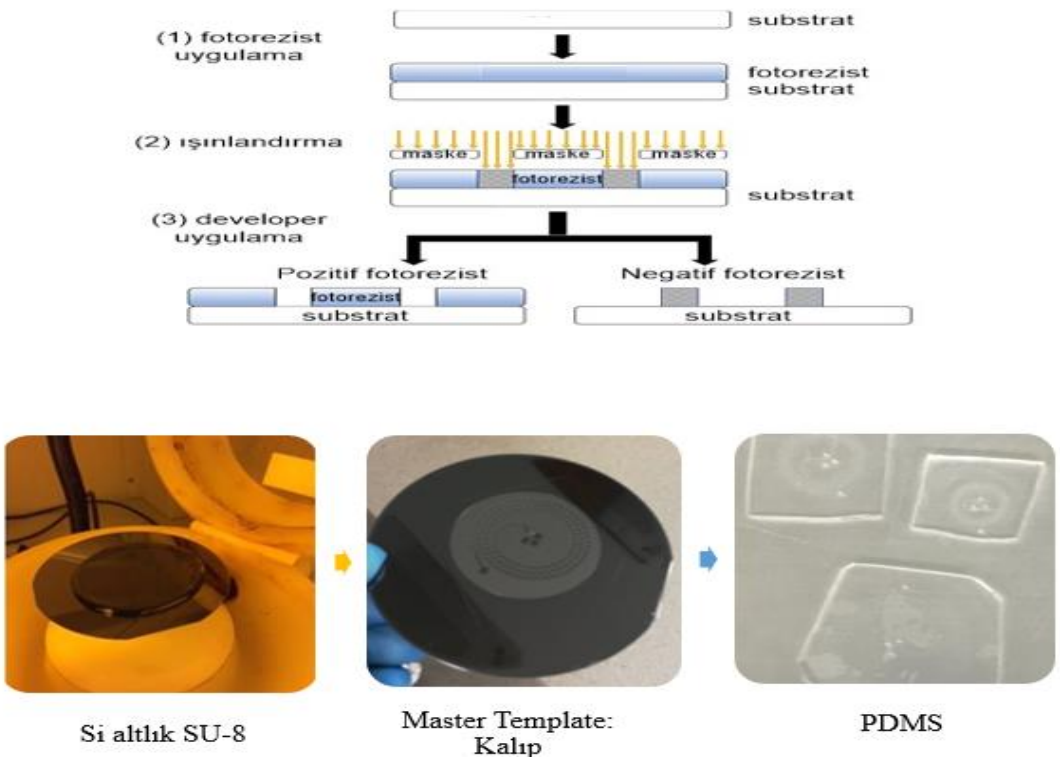
Şekil 3-3: Sunflower tasarımlı mikrokanal çıkışlarında MNH ve VSEL kök hücre görünütüsü. VSEL kök hücre kırmızı ok ile gösterilmiştir.

3.2. Mikroakışkan Sistem Fabrikasyonu ve Karakterizasyonu

Mikrokanal fabrikasyonu, İstanbul Teknik Üniversitesi (İTÜ) MEMS Ar-Ge Merkezi ve Nanoteknoloji Merkezi Litografi Laboratuvarında yapıldı.

3.2.1. Soft Litografi ile Kalıp (Master Template) Üretimi ve PDMS Dökümü

Işığa duyarlı bir polimerin UV ışık altında katılaşması ya da çözünmesi ile maskedeki desenin numuneye aktarılması işlemine litografi denir. ÇÜL mantığıyla tasarlanacak olan sistemin her bir parçası, fotolitografi yöntemi ile üretilen mikrokanal , İstanbul Teknik Üniversitesi Nanoteknoloji Merkezi Ltografi Laboratuvarında bulunan Direct Writing Laser (DWL) cihazı ile maskelere yazdırıldı. Desenin aktarıldığı maskelerden, PDMS kopyalar üretmek amacıyla silisyum altlık (Si altlık, Si wafer) üzerine, tasarlanan kalınlıkta SU-8 3050 fotorezist (MicroChem, USA) kaplandıktan sonra, OA1model 200 Mask Aligner (San Jose, USE) cihazıyla litografi ile UV ışık altında desen, önce Si altlık üzerine aktarıldı. Burada tasarlanan kalınlık mikrokanalların yüksekliğini ifade etmektedir. İşlem sonrasında optik profilometri ile SU-8 kalıp yapısının yüksekliği 145 μm olarak teyit edildi. Si altlık üzerine aktarılan desen üzerindeki istenmeyen kısımlar, SU-8 fotorezist özgün olan geliştirici madde (developer, 1-methoxy-2-propanol acetate) ile muamele edilerek ortamdan uzaklaştırıldı (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: SU-8 fotorezist kullanılarak kalıp hazırlama üretim süreçleri.

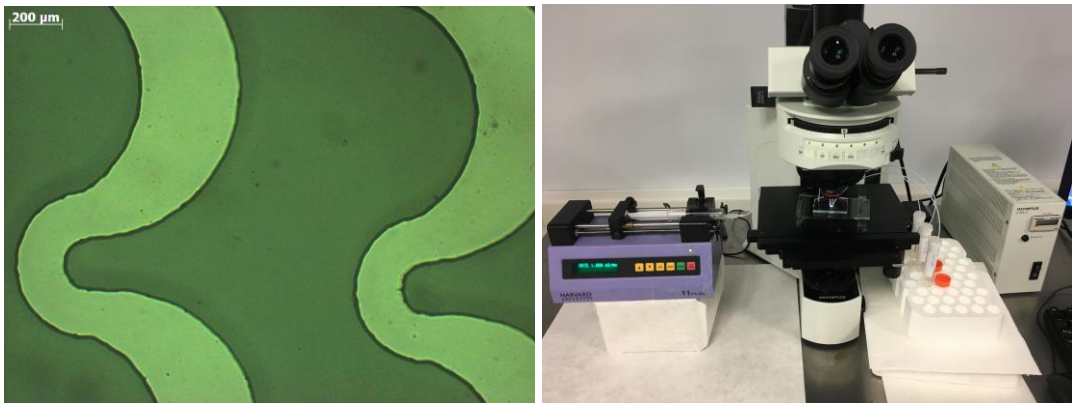
Kullanıma hazır hale gelen desen içeren SU-8 kaplı Si altlıktan PDMS kopya elde etmek için, PDMS 10:1 oranında katılaştırıcısı (Curing agent) ile karıştırılarak gerekli sertliğe sahip karışım elde edildi. Ardından PDMS, malzemede desenini çıkarmak amacıyla cam petri içine kaplanan alüminyum folyo kâğıdına çift taraflı bant ile yapıştırılan desen içeren SU-8 kaplı Si altlık üzerine döküldü. Hava kabarcıklarını ortamdan uzaklaştırmak için vakum desikatör içerisinde 15 dk'lık periyotlarla kabarcıklar alındı. Sonrasında 70°C'de 2 saat boyunca fırında bekletildi. Katılaşmanın devamı için 2 saat sonunda fırın kapatıldıktan sonra gece boyunca fırında bekletildi (Altinagac ve ark. 2015; Sonmez ve ark. 2017).

3.2.2. Oksijen Plazma İşlemi

Desen içeren SU-8 kaplı Si altlıktan sıyrılan PDMS üzerine yapıştırılacak lamlar, sonikatörde sırasıyla aseton, etil alkol ve deiyonize (DI) su ile30 dakika boyunca temizlendi. Son aşamada tekrar DI sudan geçirildikten sonra kuru azot ile lamlar ve PDMS mikrokanal kurutuldu. Ardından lam ve PDMS kalıp, hot plate üzerinde 45^{o}C'de ve 10-15 dakika bekletildi. Lam ve PDMS kalıp desen yukarı bakacak şekilde oksijen plazma cihazına (Harrick Plasma Cleaner; New York, USA) yerleştirildi. Oksijen plazma ile muamele edilen PDMS mikrokanal ve lamlar cihazdan çıkarıldıktan sonra yukarı bakan yüzleri birbirleriyle yapıştırıldı. Üretilecek sistemin üretim aşamasındaki basamakların her birinde optik mikroskop altında boyutsal ve kusur açısından karakterizasyonları yapıldı (Şekil 3-5 a).

3.2.3. Sızdırmazlık Testi

Tasarlanan ve üretilen mikroakışkan kanal sistemin sızdırmazlık testi şırınga pompası (Harvard Apparatus 11 Plus, Harvard Apparatus Inc., ABD) ile yapıldı ve ayrıştırma performansının durumu; 3, 6 ve 9 μm çapında polistren parçacıkları 0,2 ml/dk artışlarla 0,3-1,5 ml/dk akış hızlarında infüze edilerek belirlendi (Şekil 3-5).

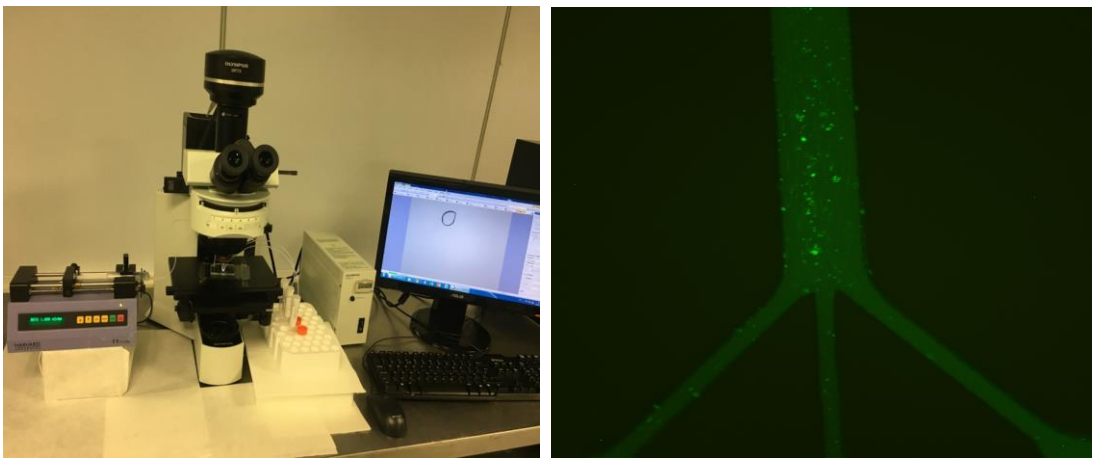


(a) (b)

Şekil 3-5: Sunflower tasarımlı mikrokanal karakterizasyonu a) Üretilen mikrokanalın mikroskop görüntüsü, 5x objektif ile görüntülenmiştir. b) Mikrokanalda sızdırmazlık testi süreci görüntüsü.

3.2.4. Mikroakışkan Sistem Optimizasyonu

Kanal geniş kısım çapı 390 µm ile dar kısım çapı 200 µm olan mikroakışkan cihazın (mikrokanal) çalışabilirliğe yönelik optimizasyon işlemleri için hematopoetik hücre olan K562 ve jurkat hücre hattı kullanıldı. Bu hücreler, $150x10^3$-$1x10^6$ hücre/ml'de konsantrasyonda 1x PBS'de süspanse edildi. Hücrelerin kanaldaki odaklanma (fokuslanma) davranışlarını izleyebilmek için rodamin 123 ve DAPI floresan boyaları ile boyandıktan sonra Olympus BX51 floresan mikroskop ve DP72 kamera kullanıldı (Şekil 3-6). Optimum akış hızını belirlemek için 1x PBS içinde süspanse edilen hücreler şırınga pompasıyla 0,2 ml/dk artışlarla 0,3-1,5 ml/dk akış hızlarında infüze edildi.



Şekil 3-6: Hücrelerin kanaldan geçişinin floresan mikroskobu ile incelenmesi.

Hücre odaklanma çizgisinin kalitesini değerlendirebilmek için ampirik bir formül olan normalleştirilmiş odaklanma kalitesi değeri (NOKaD) formülü kullanıldı (Sonmez ve ark. 2017). Bu formül aşağıdaki denklemle tanımlanabilir:

$$q_f = \left(\frac{W_{ch} - \Delta x_f}{W_{ch} - d_p}\right) \cdot \left(\frac{\Sigma V_f}{\Sigma V_{all}}\right) \qquad (3\text{-}1)$$

Burada qf normalleştirilmiş odaklanma kalitesi, Wch kanal genişliği (µm), dp parçacık çapı (µm), Δxf odak genişliği (µm), ΣVf odak genişliği içindeki gri değerlerin toplamı ve ΣVall kanal genişliği içindeki tüm gri değerlerin toplamı olarak tanımlanır. Odaklanma çizgisinde hücre konsantrasyonu arttıkça daha parlak floresan yoğunluğu üretir, bu şekilde odaklanma kalitesi artar (Sonmez ve ark. 2017).

3.2.4.1. Hücre Kültürü

K562 (İnsan kronik miyeloid lösemi hücre hattı) ve jurkat hücre hatları (İnsan akut T hücre lösemi hattı) İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD Prof. Dr. Dürdane Serap Kuruca'ya ait Hücre Kültürü Laboratuvarından temin edildi. Sıvı azot tankında (-196ºC'de) (Taylor-Wharton) kriyojenik tüplerde saklanan hücreler, sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra, hızlıca 37ºC'deki su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kriyonenik tüpler %70 etanol dezenfekte edildi ve DMSO'dan uzaklaştırmak için 37ºC'ye getirilmiş 10 mL RPMI 1640 besiyerine (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) aktarıldı, ardından 1500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti süspanse edildi ve ardından 10 mL RPMI 1640 besiyeri içeren T-25 kültür kabına alındı. Tüm hücre hattı standart prosedüre göre %10 FBS (Biological Industries) ve %1 penisilin/streptomisin eklenmiş RPMI-1640 besiyerinde kültürlendi. 37ºC'de %5 CO_2 ortam koşullarındaki etüvde (Nuaire-Nu 5500E, PSU-2T HEPA filtreli) pasajlanarak ve inkübe edilerek çoğaltıldı. Sayıları $5x10^5$ ve $1x10^6$ ulaşan hücreler deneye alındı.

3.3. Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin, Yoğunluk Gradyanlı Santrifüjleme Yöntemiyle ile Ön Ayrıştırılması

3.3.1. Aferez Materyali, Kemik İliği ve Periferik Kan Eldesi

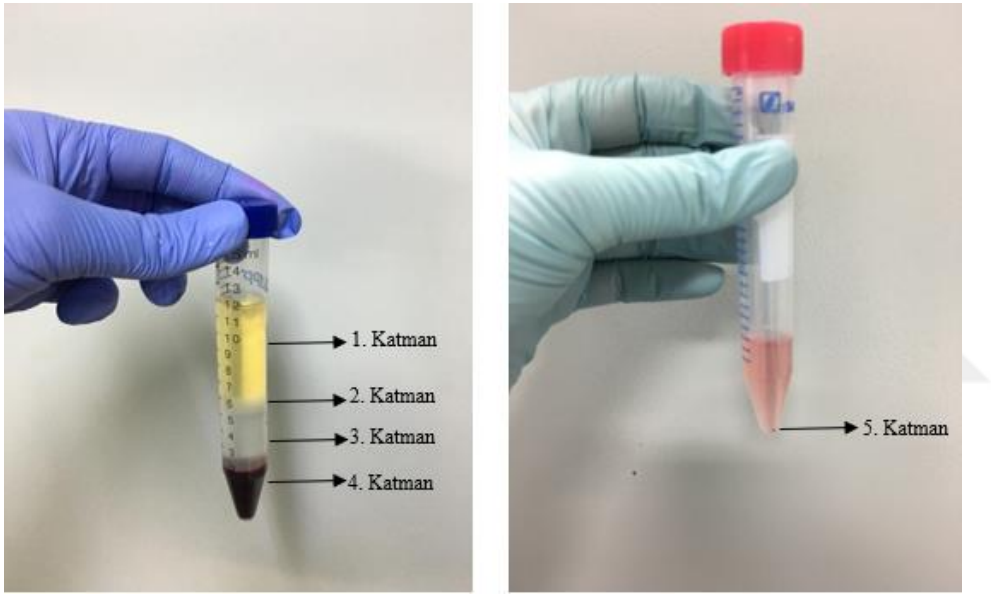
Hücreler; aferez materyali, kemik iliği ve periferik kan örneklerinden elde edildi. Aferez materyalleri ve kemik iliği örnekleri Yeni Yüzyıl Üniversitesi Gaziosmanpaşa Hastanesi, Kemik İliği Transplantasyon Merkezi tarafından sağlandı. Periferik kan için; bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra sağlıklı yetişkin gönüllülerden K2 EDTA kan alma tüplerine 10 ml kan örnekleri alındı. Araştırmaya sağlıklı 18 yaş ve üstü donörler dahil edildi; kronik bir hastalığı olan son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmiş ve sigara veya madde (uyuşturucu v.s.) kullanan donörler dahil edilmedi. Verilerin toplanmasında araştırmacılar tarafından literatür ışığında hazırlanan veri formu kullanıldı (Ek-1). Deneyler için yoğunluk gradyanlı santrifüjleme yöntemiyle hücre zenginleştirilmesi yapılmak üzere mononükleer hücre (2. katman) ve eritrosit fraksiyonları (4. katman) toplandı.

3.3.1.1. Yoğunluk Gradyanlı Santrifüjleme

Mononükleer hücre ve eritrosit fraksiyonları; aferez materyali (AfM), kemik iliği (Kİ) ve periferik kan (PK) örneklerinden yoğunluk gradyanlı santrifüjleme yöntemi ile elde edildi. Alınan AfM ve PK 1:1, Kİ ise 1:5 oranında 1x PBS (phosphate-buffered saline) ile dilüe edilip, daha sonra bu hücre süspansiyonu 1:2 oranında Lymphosep (Lymphocyte Separation Media; 1,077 ± 0,001 g/ml, Biosera LM T1702/500) üzerine yavaşça tabakalandırılarak, 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda 4 katman oluştu (Şekil 3-7). 1. katmanda, trombositlerce zengin plazma bulunur; 2. katman, bulutsu tabakadır ve mononükleer hücre katmanıdır. 3. katman; fikolun konumlandığı kısımdır. Son katman ise 4. katmandır ve eritrositlerin bulunduğu tüpün en alt kısmındadır. Bu katmanlardan 2. ve 4. katmanlar dikkatli bir şekilde alınarak ayrı tüplere aktarıldı. Ardından 2. katmanda zenginleştirilen mononükleer hücre katmanı 1:3 oranında RPMI eklenerek süspanse edildikten sonra 1200 rpm'de (300g) 5'er dk iki kez yıkandı ve süpernatant atıldı. Son olarak kalan pellet (MNH) 1x PBS ile süspanse edildi. Çalışmanın sonraki aşamalarında eritrositlere yakın boyuta sahip VSEL kök hücrelerin bol miktarda bulunduğu 4. katman kullanıldı. Ortalama eritrosit boyutu ~ 7-8 μm iken VSEL kök hücrelerin boyutu yaklaşık 6-8 μm'dir.

4. katmandaki hücrelerin ayrıştırılması (5. katman eldesi)

Tüpte kalan 4. katman ilk olarak 1:3 oranında RPMI ile dilüe edilerek 800 g'de 15 dk santrifüj edildi. Böylece eritrositlerin dibe çökmesi sağlanarak süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Ardından, yeni tüpe alınan süpernatant 1:3 oranında yeniden RPMI ile süspanse edildi. Bu, VSEL kök hücrelerin bulunduğu hücre süspansiyonudur. 5. katman eldesi için, hücre süspansiyonu 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve kalan pelet (VSEL kök hücre) 5. katman (Şekil 3-7) olarak adlandırılmaktadır (Bhartiya ve ark. 2012). Bu pelet, PBS ile süspanse edilerek 4^{o}C'de saklandı.



Şekil 3-7: Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme sonucu oluşan fraksiyonların görüntüleri

3.3.2. Hücre Morfolojisi ve Hücre Boyutunun Hesaplanması

Hücrelerin morfolojisi giemsa boyama yöntemiyle değerlendirildi. Lamlar, DI su ile temizlendi ve boyamadan önce N_2 gazı ile kurutuldu. Lamlara 5 µL MNH süspansiyonu (~5x10^3 hücre) eklendi ve havada kurutulmaya bırakıldı. Fiksasyon için hücreler 5-7 dk metanol içinde inkübe edildikten sonra DI su ile yıkandı. Daha sonra fikse olan hücrelerin üzerine birkaç damla seyreltilmiş giemsa boyası (Boya: DI su, 1:20 oranında) damlatıldı ve 30 dakika bekletildi. Son olarak boyanmış lamlar, DI su ile durulandı ve havayla kurutuldu. Boyalı hücreler bir ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

Hücrelerin boyutu, imageJ yazılımı kullanılarak ölçüldü. Lam üzerine bir damla hücre süspansiyonu damlatıldıktan sonra üzeri lamel ile kapatıldı. Ardından dört alan taranarak ortalama hücre çapları ölçüldü.

3.4. Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin Mikroakışkan Sistemden Geçirilerek Toplanması

AfM, Kİ ve PK örneklerinden yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile iki katman elde edildi (mononükleer hücre ve eritrosit fraksiyonu). Mononükleer hücre fraksiyonundaki farklı büyüklükteki hücreler (mononükleer hücre ve VSEL kök hücre), aynı mikroçipe yüklenerek ataletsel kuvvetler ile işaretlenmeden (etiketsiz) boyut ve yoğunluklarına göre kanal çıkışlarında toplandı. Eritrosit fraksiyonundan elde edilen VSEL kök hücre süspansiyonu mikrokanaldan geçirildi ancak bu hücreler yeterli sayıda olmadığından mikrokanal içerisinde gözlenemedi.

Hücre deneylerine başlamadan önce, hücrelerin yapışmasını veya mikrokanalın tıkanmasını önlemek için mikrokanala 1 ml 1x PBS çözeltisi içinde çözünmüş 1 mg BSA solüsyonu infüze edildi ve ardından 24 saat sonra DI su ile yıkandı.

1mg BSA/1ml PBS çözeltisi hazırlama (Genç 2015):

- 30 ml 1x PBS'e 60 mg BSA eklendi ve karıştırıcı ile homojenize çözündürüldü.
- Çözünen süspansiyona 30 ml 1x PBS daha eklendi.
- Elde edilen BSA çözeltisi alüminyum folyo ile kapatılarak 4^{o}C'de saklandı.

Mikrokanal sistemindeki hava kabarcıkları uzaklaştırmak için ilk olarak hücresiz 1x PBS solüsyonu infüze edildi. MNH ve VSEL kök hücreler, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile zenginleştirildikten sonra eritrositler ile karıştırıldı. Bu hücrelerin aferez materyali, kemik iliği ve periferik kandan kantitatif olarak ne kadar verimle (geri kazanım oranı) elde edileceğini belirlemek için, MNH'ler ve eritrositler (MNH:Eritrosit), aferez materyali ve periferik kan için 1:2, 1:3, 1:6 ve kemik iliği için 1:2 ile 1:3 hacim oranlarında karıştırıldı. Ardından miks hücre süspansiyonu mikrokanaldan geçirildi. Mikrokanal boyunca akışı kontrol etmek için bir şırınga pompası (Harvard Apparatus 11 Plus, Harvard Apparatus Inc., ABD) kullanıldı ve pompaya 5 ml'lik plastik şırıngalar bağlandı. Bir adet teflon boru (Adtech, 0,5 mm x 1,6 mm) mikroçip girişine, üç adet teflon boru mikroçip çıkışlarına takıldı.

Hücrelerin odaklanma davranışlarını anlamak için 1x PBS (1:5) ile seyreltilmiş hücreler, 0,3-1,5 ml/dk akış hızlarında ve 0,2 ml/dk artışla infüze edildi ve her çıkıştan gelen hücre süspansiyonu üç mikro tüpte toplandı. Kurulumun sanal olarak izlenmesi için bir Olympus EX51 epifloresan mikroskobu kullanıldı (Şekil 3-6).

3.5. Mikroakışkan Sistemden Toplanan Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin Karakterizasyonu: Kanal Performansının Belirlenmesi

3.5.1. Hücre Canlılığının Saptanması

Sunflower tasarımlı mikrokanal sistemi performansını değerlendirmek için hücreler, mikrokanala verilmeden önce ve hücreler toplandıktan sonra canlılık incelendi. Hücre canlılığı, hücreler herhangi bir işleme (antikor boyaması, %1 formaldehitte fikse etme, eritrosit lizis vs) tabi tutulmadan önce değerlendirildi.

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde tripan mavisi ile boyama yöntemi uygulandı. Tripan mavisi boyası ile (1:1 oranında) boyanarak mikroskopta Neubauer lamda hücreler sayıldı. Ölü hücreler tripan boya ile boyanarak mavi renkte görünürken canlı hücreler boyanmayan hücrelerdir. Bu şekilde canlı hücrenin varlığı tespit edildi. Hücre canlılığı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

Toplam hücre= Sayılan hücre x Dilüsyon faktörü x Toplam hacim x 10.000 (lam faktörü).

3.5.2. Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi

Kanal performansını değerlendirme kriterlerinden geri kazanım oranı (recovery rate) ve saflık düzeyi aşağıdaki denklemlere göre hesaplandı:

$$\%\, Relative\ recovery_{O2} = \frac{C_{o2}\mathrm{x}V_{o2}}{C_{o2}\mathrm{x}V_{o2} + C_{03}\mathrm{x}V_{o3}}\ \mathrm{x}\ 100\% \qquad (3-2)$$

$$\%\, Relative\ recovery_{O3} = \frac{C_{o3}\mathrm{x}V_{o3}}{C_{o2}\mathrm{x}V_{o2} + C_{03}\mathrm{x}V_{o3}}\ \mathrm{x}\ 100\% \qquad (3-3)$$

$$\%\, Purity_{Outlet} = \frac{C_{Outlet}\mathrm{x}100\%}{C_{Total}} \qquad (3-4)$$

Burada Co_2 ve Co_3, Çıkış 2 ve Çıkış 3 fraksiyonundaki hücre konsantrasyonlarıdır, Vo_2 ve Vo_3, Çıkış 2 ve Çıkış 3 fraksiyonunun hacimleridir. C_{outlet}, belirli bir çıkıştaki hücre konsantrasyonudur ve C_{total}, iki çıkıştan elde edilen fraksiyonun toplam hücre konsantrasyonu olarak tanımlanır (Lee ve ark. 2018).

3.5.2.1. Floresan Boyama Tekniği ile Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi

Mikrokanaldaki hücreleri izlemek ve odak davranışlarını incelemek için floresan boya olarak DAPI, Far red DDAO-SE ve rodamin 123 (rho 123) kullanıldı. DAPI, nükleer bir boyadır (Annette ve Lynda 1985). Bu boya mononükleer hücreleri boyarken, çekirdeğe sahip olmayan eritrositleri boyayamaz. Far Red DDAO-SE, amin reaktif bir boyadır (Theron ve ark. 2010) ve hücre sitoplazmasına kovalent olarak bağlanır (Zhou ve ark. 2016). Eritrositlerin çekirdeği olmadığı için çalışmada bu boya kullanıldı. Floresan boyamadan önce canlı mononükleer hücreler, tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemositometre ile sayıldı.

DAPI (Abbkine, CAT#BMD0063) boyama prosedürü için 1 mg DAPI, 1 mL DI su içinde çözüldü. 5 ml süspanse edilmiş hücre, 1 µl DAPI çalışma solüsyonuna ilave edildi ve nazikçe vortekslendi. 37°C'de %5 CO_2 içinde 15 dakika inkübe edildikten sonra 5 ml %5 FBS'li 1x PBS (Thermo 10010023) solüsyonunda 2-3 kez yıkandı.

Rodamin 123 ilk olarak, negatif membran potansiyelleriyle orantılı olarak mitokondriye bağlanan, mitokondriyal membrana özgü bir boya olarak karakterize edildi (Johnson ve ark. 1980). Bu boya canlı hücrelerin sitoplazmasında mitokondirileri boyar (Horobin ve ark. 2022). Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra pelet 1 ml 1x PBS ile süspanse edildi. Ardından 50 µl rho 123 (Sigma-Aldrich, R8004) çalışma solüsyonu eklendi, nazikçe vortekslendi. Karışım 37°C'de %5 CO_2'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası boyayı uzaklaştırmak için 2 kez yıkandı. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 1ml 1x PBS ile süspanse edildi. Floresan mikroskobunda görüntü alınana kadar 4ºC'de saklandı.

CellTraceTM Far Red DDAO-SE (Invitrogen, C34553) boyama prosedürü için hücreler, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yoluyla peletlendi. Süpernatant atıldıktan sonra eritrositler 1 mL 1x PBS içinde yeniden süspanse edildi. Daha sonra hücrelere 1 µl far red çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de %5 CO_2'de 15 dakika inkübe edildi.

Daha sonra, hücreler tekrar iki kez 5 mL %5 FBS'li 1x PBS çözeltisi ile yıkandı. Son olarak, her iki hücreden alınan peletler, 1x PBS içerisinde çözündürüldü ve deneyden önce 4^{o}C'de saklandı.

Floresan boya ile boyanmış miks hücre süspansiyonu (MNH ve Eritrosit) mikrokanaldan geçirilmeden önce (giriş) ve mikrokanaldan geçirildikten sonra (çıkışlar) hemositometre ile hücreler sayıldı. Ardından denklem 3-2, 3-3 ve 3-4 ile geri kazanım oranı ve saflık düzeyi hesaplandı. MNH grubu DAPI (mavi), eritrositler ise Far Red DDAO-SE (kırmızı) floresan boya kullanılarak görselleştirildi.

3.5.2.2. Akış Sitometri Tekniği ile Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi

Hücrelerin, mikroakışkan sistemde ayırmadan önce ve sonra akış sitometrik ölçümleri yapıldı. Ardından akış sitometri sonucuna göre (hücre sayıları) denklem 3-2, 3-3 ve 3-4 ile geri kazanım oranı ve saflık düzeyi hesaplandı. Boyamalar üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. İlk olarak, MNH ve eritrosit karışımı kanaldan geçirildikten sonra eritositler, eritrosit lizis ile ortamdan uzaklaştırıldı, ardından canlı mononükleer hücreler, tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemasitometre ile sayıldı. Daha sonra hücreler, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek peletlendi ve 100 ul 1x PBS içinde yeniden süspanse edildi. Birinci ölçüm için; FITC-konjuge CD34 (Santa Cruz, SC-7324) ve PerCyp-konjuge CD45 kombinasyonu (BD Biosciences; kat. 345809) ile ikinci ölçüm için PE-konjuge SSEA-4 (Santa Cruz, SC-21704), APC-konjuge CD133 (Exbio, 1A-820-T100) ve rodamin 123 (Sigma-Aldrich, R8004) kombinasyonu yapılarak karanlıkta 15-30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, hücreler 1x PBS ile yıkandı, 500 µl %1 formaldehit içinde yeniden süspanse edildi ve karanlıkta 2-4^{o}C'de saklandı. Hücreler 24 saat içinde analiz edildi. Toplam MNH'ler CD45(+), HKH'ler CD45(+)/CD34(+), VSEL kök hücreler CD45(-) /CD34(+)/SSEA-4(+)/CD133(+)/Rho 123^{sönük} olarak tanımlandı. Veriler NovoCyte 451180329104 ve NovoExpress 1.5.0 ile analiz edildi.

3.5.3. Mikroakışkan Sistemde Hücre Kaybı Seviyesi

Bazı çalışmalarda farklı yıkama adımları (van Beem ve ark. 2008) ve yoğunluk gradyanlı santrifüjlemenin (Pösel ve ark. 2012) kan hücrelerinde azalmaya neden

olduğu açıklanmıştır. Bu nedenle mikroakışkan sistem ile izolasyon tekniğinin hücre kaybı üzerindeki etkisini inceledik. Buna göre AfM-MNH kaybı değeri, Denklem 3-4'e göre hesaplandı:

$$\%\, Kayıp_{MNH} = \frac{K_{AS} - K_{YGS}}{K_{AS}} \text{x} 100\% \qquad (3\text{-}5)$$

Burada K_{AS}: Ana stoktaki toplam AfM-MNH sayısı ve K_{YGS}: Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile elde edilen toplam AfM-MNH sayısı olarak tanımlanmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

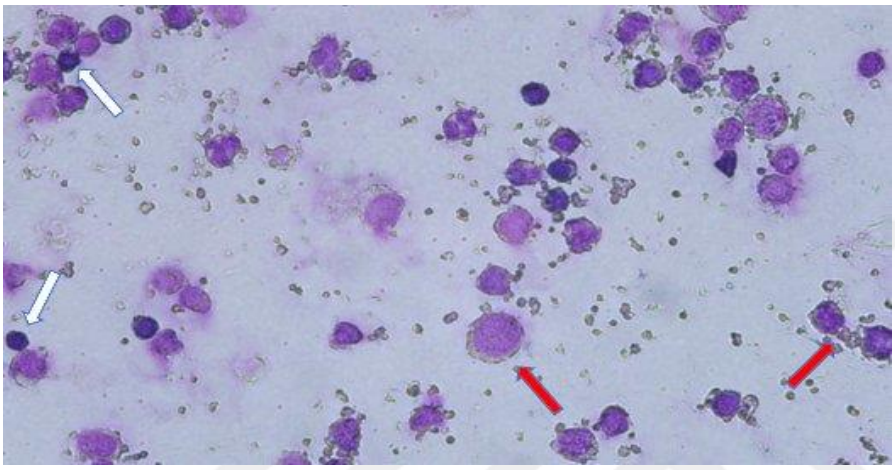
İstatistiksel analizler SPSS programı (25; SPSS Inc. Chicago USA) kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir. Tüm grupların değerleri varyans analizi ile karşılaştırılmış, gruplar arası farklar ise One Way ANOVA testi ve student t testi ile belirlenmiştir. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca geri kazanım oranı, saflık düzeyi, hücre boyutu ve hücre kaybı değeri microsoft office excell programı kullanılarak grafiklerde gösterilmiştir.

.

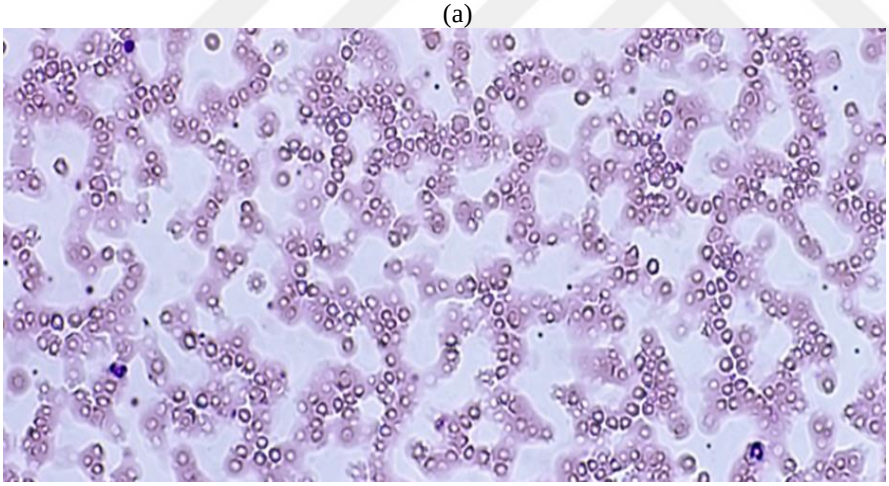
4. BULGULAR

4.1. Hücre Morfolojisi ve Hücre Boyutu

Mononükleer hücre, VSEL kök hücre ve eritrositlerin morfolojisini belirlemek için giemsa boyama yapıldı.



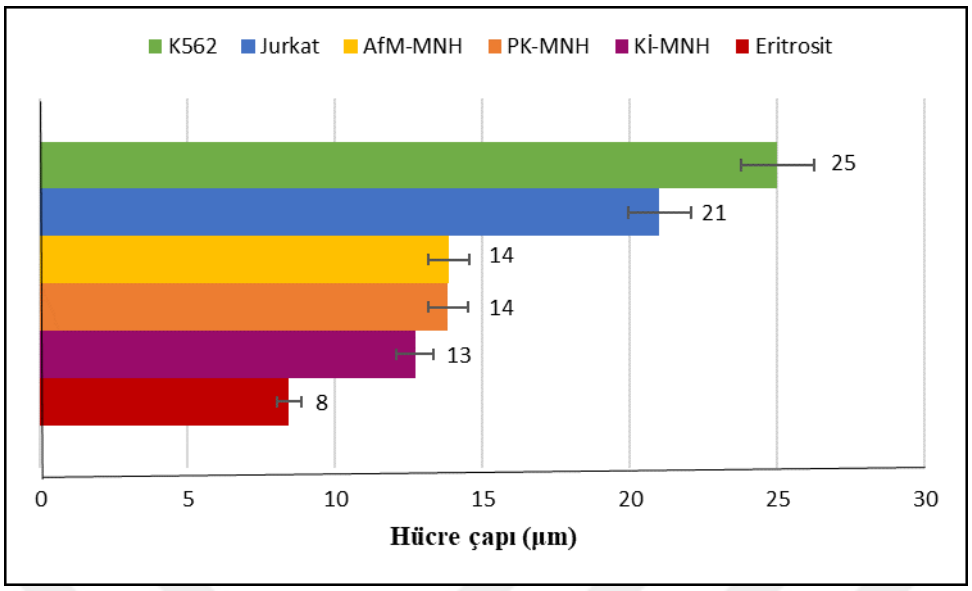
(a)



(b)

Şekil 4-1: AfM-MNH ve eritrositlerin giemsa boyama görüntüleri a) AfM-MNH, kırmızı ok monosit ve lenfositleri; beyaz ok VSEL kök hücre olarak düşündüğümüz hücreleri göstermektedir b) Periferik kanda eritrosit görüntüsü.

Şekil 4-1'de yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile kanın 2. katmanında zenginleştirilen mononükleer hücrelere ait giemsa boyama görüntüsü verilmiştir. Şekil 4-1 a'ya göre, tek parçalı çekirdeğe sahip AfM-MNH'lerden monosit ve lenfositler kırmızı ok ile, VSEL kök hücre olarak düşündüğümüz hücreler ise beyaz ok ile gösterilmektedir. Şekil 4-1 b'de, pembe renkli çekirdeksiz eritrositler görülmektedir.

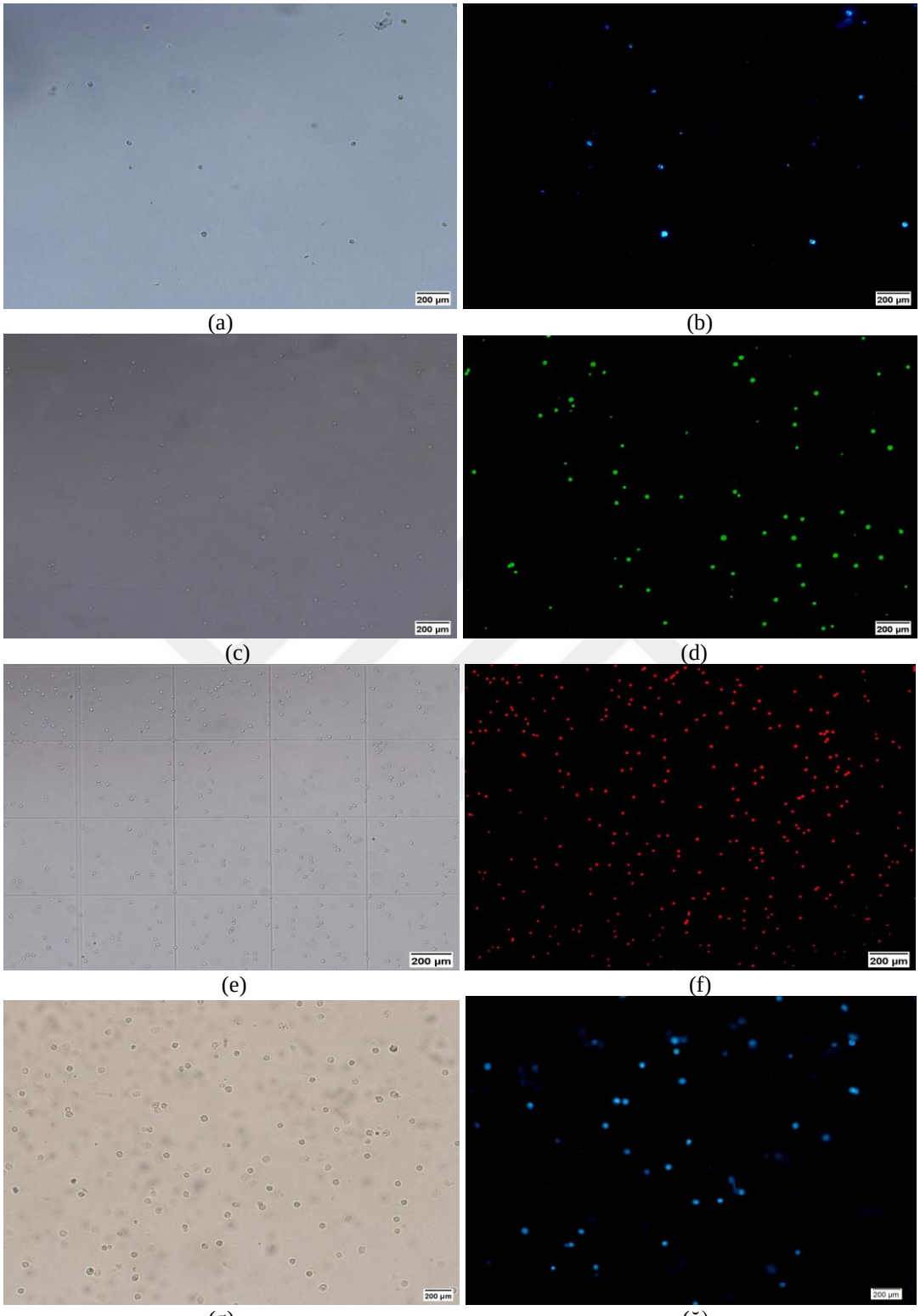


Şekil 4-2: Farklı hematolojik ürünlere ait mononükleer hücreleri ile K562 ve Jurkat hücrelerinin boyut dağılımları. Kİ-MNH: Kemik iliği mononükleer hücreleri, AfM-MNH: Aferez ürünü mononükleer hücreler, PK-MNH: Periferik kan mononükleer hücreler.

Şekil 4-2'de imageJ yazılımı ile ölçülen hücrelerin ortalama boyutu verilmiştir. Buna göre, K562 ve jurkat hücre hattının boyutu sırasıyla 25 µm ve 21 µm olarak ölçüldü. Aferez materyalindeki MNH'lerin çapları 9 µm ile 19 µm arasında, periferik kandaki mononükleer hücre çapları çoğunlukla 10 µm ile 21 µm arasında, ve kemik iliğindeki MNH'lerin çapları ise 8 µm ile 16 µm arasında değişiyordu. Eritrositlerin ortalama çapı 8.4 µm idi.

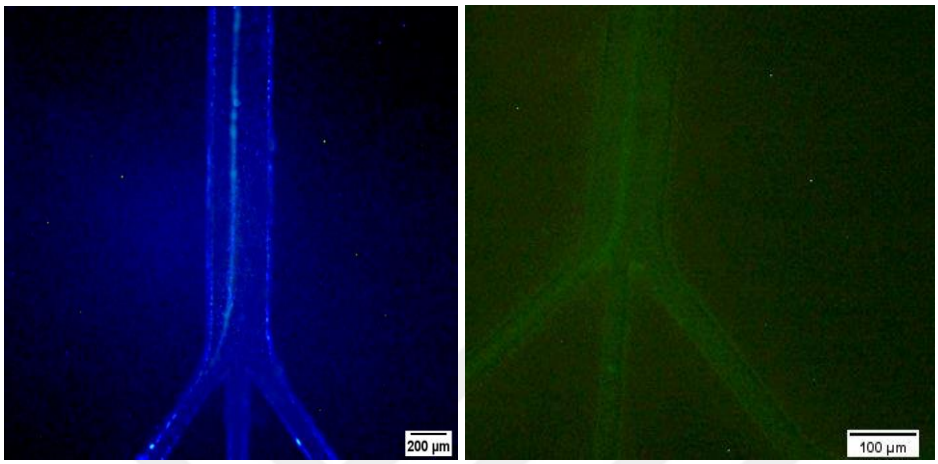
4.2. Mikroakışkan Sistem Optimizasyonu: Optimum Akış Hızının Belirlenmesi

Sıvı akış hızının, kan hücrelerinin odaklanması üzerine etkisi vardır. Bu nedenle, 1x PBS'de 1:5 oranında seyreltilmiş hücreler 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; ve 1,5 ml/dk akış hızlarında şırınga pompası yardımıyla infüze edildi. Hücre odaklanma çizgisinin kalitesini değerlendirebilmek için ampirik bir formül (Denklem 3-1) olan normalleştirilmiş odaklanma kalite değeri formülü kullanıldı (Sonmez ve ark. 2017).



Şekil 4-3. Floresan boyalarla boyanmış ve boyanmamış hücrelerin görüntüsü a) Boyanmamış K562 hücreleri b) DAPI ile boyanmış K562 hücreleri c) Boyanmamış jurkat hücreleri d) Rodamin 123 ile boyanmış jurkat hücreleri e) Boyanmamış eritrosit hücreleri f) Far red ile boyanmış eritrosit hücreleri. Görüntüler 10x objektif ile gösterilmiştir. g) Boyanmamış AfM-MNH'ler ğ) DAPI ile boyanmış AfM-MNH'Resimler 20x objektif ile kaydedilmiştir.

K562 ve jurkat hücreleri ile eritrositlerin mikrokanal içindeki davranışlarını izleyebilmek için uygun floresan boya seçimi önemlidir. Bunun için hücre hatlarını boyayabilen rodamin 123, DAPI ve eritrositler için de Far Red DDAO-SE floresan boya tercih edildi. Hedef hücre olan MNH için ise DAPI floresan boya kullanıldı (Şekil 4-3).



(a) (b)

Şekil 4-4: Sunflower tasarımlı mikrokanalda hücre hatlarına ait odaklanma çizgileri a) DAPI ile boyanmış K562 hücre hattına ait odaklanma çizgisi. b) Rho123 ile boyanmış jurkat hücre hattına ait odaklanma çizgisi. Görüntüler 5x objektif ile kaydedilmiştir.

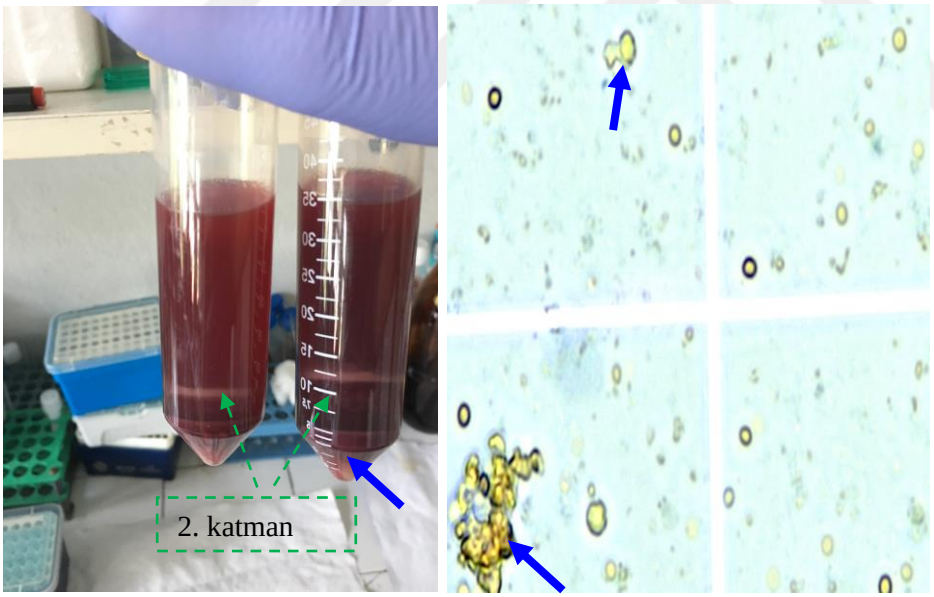
Şekil 4-4 a'da Sunflower tasarımlı mikrokanalda K562 hücrelerinin odaklanma çizgisi (mavi) görülürken, Şekil 4-4 b'de ise jurkat hücrelerine ait odaklanma çizgisi (yeşil) görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi her iki hücre hattı Çıkış 1'de toplanmıştır. Mikrokanal çipin optimum akış hızını belirlemek için ilk olarak K562 ve jurkat hücreleri $150x10^3$-$1x10^6$ hücre/ml'de olarak şırınga pompasıyla mikrokanala infüze edildi. Mikrokanal boyunca hızlı hareket eden hücreler, Olympus EX51 epifloresan ataçmanlı mikroskobu ve LMPlanFLN 5x objektifi (üzerine monte edilmiş Olympus DP72 soğutmalı dijital renkli kamera) kullanılarak görüntülendi.

Önerdiğimiz mikrokanal için optimum akış hızı hücre hatları ile belirlendikten sonra deneylere, hedef hücre olan mononükleer hücreler ile devam edildi. Proje başlangıcında, çeşitli nedenlerle (alıcı ölümü vs.) alıcılara kullanılamayacak olan ve uzun süredir (5-15 yıl) sıvı azotta saklanan aferez ve kemik iliği materyallerinin kullanımı amaçlanmıştı, ancak bu ürünlerin çözünmesinden sonra materyalde pıhtılaşma ve çökeltilerin oluşması, hücrelerin hemoliz olması (Şekil 4-5) sonucunda homojen bir hücre süspansiyonu elde edilememesi nedeniyle mikrokanalı tıkaması ve mikrokanala

yapışma ihtimaline karşı bu ürünler kullanılmadı. Bunun yerine taze aferez ve kemik iliği materyalleri ile çalışmalara devam edildi.



(a)



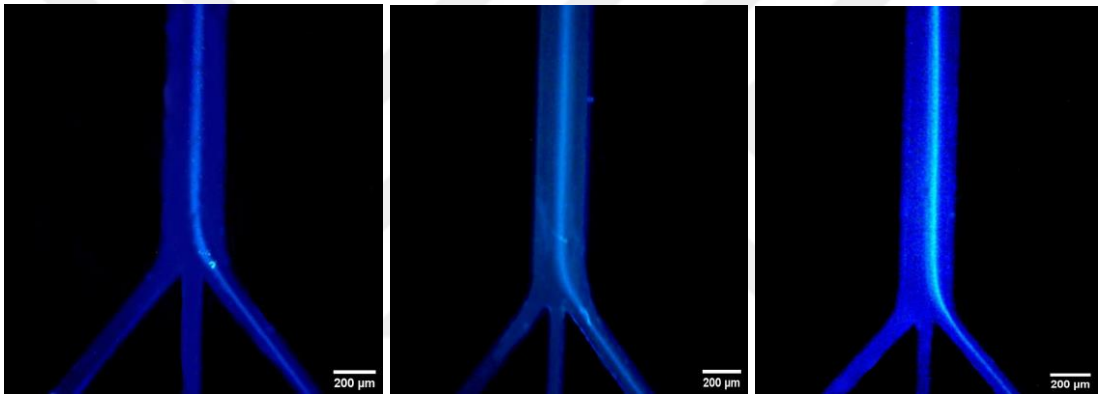
(b)

Şekil 4-5: Dondurulmuş aferez materyalinin çözülmesinden sonra pıhtılaşan ve hemoliz olan ürün görüntüleri a) DMSO'nun uzaklaştırılmasından sonra oluşan pıhtı b)Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile elde edilen mononükleer hücre tabakasında oluşan pıhtı ve tüm tabakaya yayılan hemoliz. Burada pıhtı mavi ok ile gösterilmiştir.

Şekil 4-5'te dondurulmuş aferez materyalinden DMSO'nun uzaklaştırma aşamalarında meydana gelen pıhtılaşmış hücreleri göstermektedir. Şekle göre mavi ok ile gösterilen pıhtıda, yıkama sayısı arttıkça miktarında da artış olduğu gözlendi. Şekil

4-5 a'da aferez materyalinden DMSO'yu uzaklaştırmak için, AfM 1:1 oranında 1x PBS ile sulandırıldı, ardından 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda mavi ok ile gösterilen pıhtı oluştu. Ardından kanın 2. katmanını elde etmek için YGS işlemi uygulandı, ancak Şekil 4-5 b'de görüldüğü gibi, YGS sonucunda beklenen 4 katman oluşmadı, sadece yeşil ok ile belirtilmiş 2. katman (MNH fraksiyonu) görüldü. MNH hücre süspansiyonu ayrı tüpe alınıp yıkandıktan sonra tekrar çökeltiler gözlendi (mavi ok ile gösterilmiştir).

Mikrokanalın çalışabilirliği (Hücre odaklanma çizgisinin ve hücre davranışlarının gözlenmesi) tespit edildikten sonra aynı deneyler mononükleer hücre grubuyla devam edildi.



(a) (b) (c)

Şekil 4-6: Sunflower tasarımlı mikrokanaldaki MNH'lerin odak çizgisi görüntüleri. a) AfM-MNH'lere ait odaklanma çizgisi b) Kİ-MNH'lere ait odaklanma çizgisi c) PK-MNH'lere ait odaklanma çizgisi. MNH'ler (mavi çizgi) DAPI floresan boyası ile boyandı. Görüntüler 5x objektif ile alınmıştır.

Şekil 4-6'da Sunflower tasarımlı mikrokanaldaki MNH'lere ait odak çizgisi görüntüleri verilmiştir. Buna göre aferez ürününden elde edilen MNH'ler (AfM-MNH), kemik iliği örneğinden elde edilen MNH'ler (Kİ-MNH) ve periferik kandan elde edilen MNH'ler (PK-MNH) mikrokanalın 3. Çıkışında toplandığı saptandı. 1. Çıkışta hücre birikimi gözlenmedi.

Mikrokanal boyunca hızlı hareket eden hücrelere ait yakalanan görüntülerin parlaklık analizi imageJ yazılımı ile yapıldı. Her akış hızında normalleştirilmiş odaklanma kalitesi değeri (NOKaD) hesaplandı ve ideal NOKaD tespit edildi.

Tablo 4-1: Sunflower tasarımlı mikrokanaldaki AfM-MNH'lerin akış hızına göre normalleştirilmiş odaklanma kalitesi değerleri

Akış hızı (ml/dk)	Normalleştirilmiş Odaklanma Kalitesi Değeri
0,3	0,829353
0,5	0,836954
0,7	0,857736
0,9	0,601093
1,1	0,331991

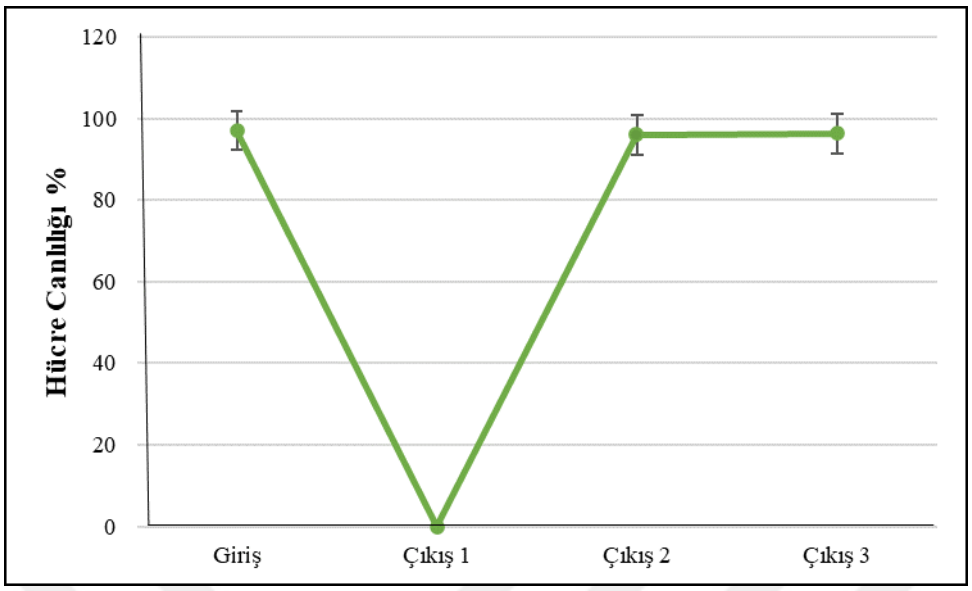
Tablo 4-1'de farklı akış hızlarında AfM-MNH'lere normalleştirilmiş odaklanma kalitesi değerleri verilmiştir. Tabloya göre Sunflower tasarımlı mikrokanalda AfM-MNH'ler için ideal normalleştirilmiş odaklanma kalitesi değeri (NOKaD); 0,7 ml/dk'da 0,86 olarak elde edilmiştir. Bu NOKaD, hedef hücrelerin optimum seviyede elde edildiği değerdir. Hücre süspansiyonunun akış hızı arttıkça hücrelerin odak çizgisi bozulmaya başladı. Ayrıca 1,5 ml/dk'dan itibaren PDMS tabakasının yırtılması ile mikrokanalın kollabe olduğu gözlendi.

4.3. Mikroakışkan Sistemden Toplanan Mononükleer Hücre ve VSEL Kök Hücrelerin Karakterizasyonu: Kanal Performansının Belirlenmesi

Eritrosit fraksiyonundan elde edilen VSEL kök hücreler yeterli sayıda olmadığından bu fraksiyon, mikroakışkan kanaldan geçirilemedi. Deneyler ürünlerin 2. katmanında zenginleştirilen mononükleer hücre fraksiyonu ile yapıldı.

4.3.1. Hücre Canlılığının Saptanması

Hücre canlılığı tripan mavisi boyasıyla hemositometre ile hücreler, herhangi bir işleme (antikor boyaması, %1 formaldehitte fikse etme, eritrosit lizis vs) tabi tutulmadan önce değerlendirildi.



Şekil 4-7: Sunflower tasarımlı mikrokanaldan geçirilen MNH'lerde hücre canlılık seviyesi grafiği.

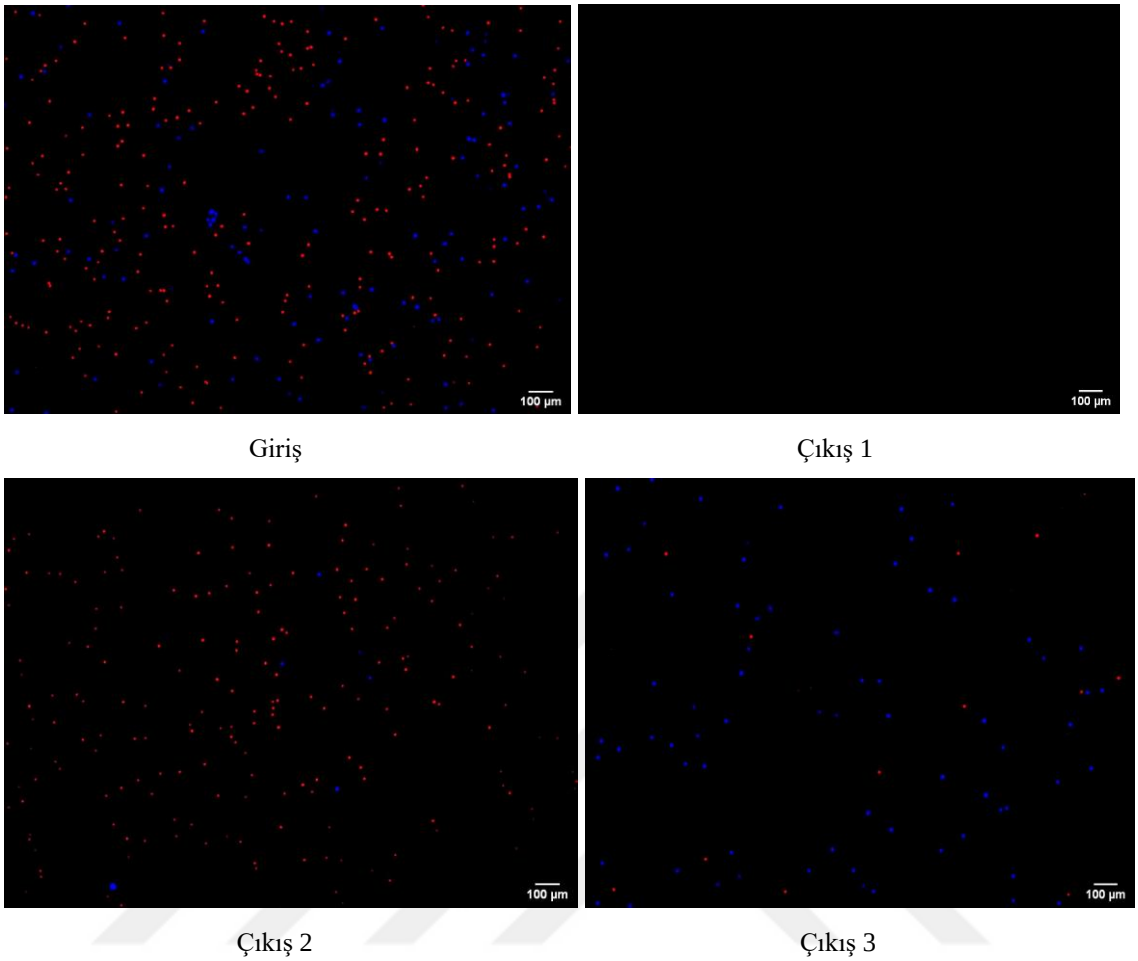
Şekil 4-7'de MNH'lerin Sunflower tasarımlı mikrokanaldan geçirilmeden önce (giriş) ve geçirildikten sonra (çıkış) ortalama hücre canlılık seviyesi grafiği verilmiştir. Çıkış 1'de herhangi bir hücre çıkışı gözlenmediğinden grafikte hücre canlılığı sıfır olarak görülmektedir. Ataletsel mikroakışkan sisteminden hücrelerin geçirilmesinden önce ve sonra total MNH'lerin canlılığı benzerdi ve %96,1±3,4 olarak saptandı ($p>0,05$).

4.3.2. Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi

Sunflower tasarımlı mikrokanalın verimliliği ve hücrelerin saflığı floresan boyama ve akış sitometri olmak üzere iki farklı teknikle incelendi.

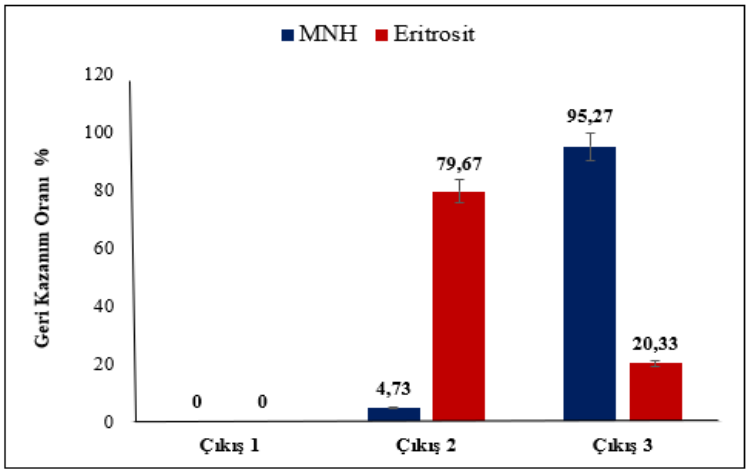
4.3.2.1. Floresan Boyama Tekniği ile Mononükleer Hücrelerin ve Eritrositlerin Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi

Mikrokanalın çıkışlarında ideal hücre fraksiyonu elde etmek için farklı hücre konsantrasyonları (Hücre:PBS; 1:1, 1:3, 1:5 oranlarda) uygulandı. Böylece farklı çıkışlarda ideal hücre saflaştırması (1:5 oranında) sağlandı. $250x10^3$-$1x10^6$ hücre/ml sayıda mononükleer hücre deneye alındı.

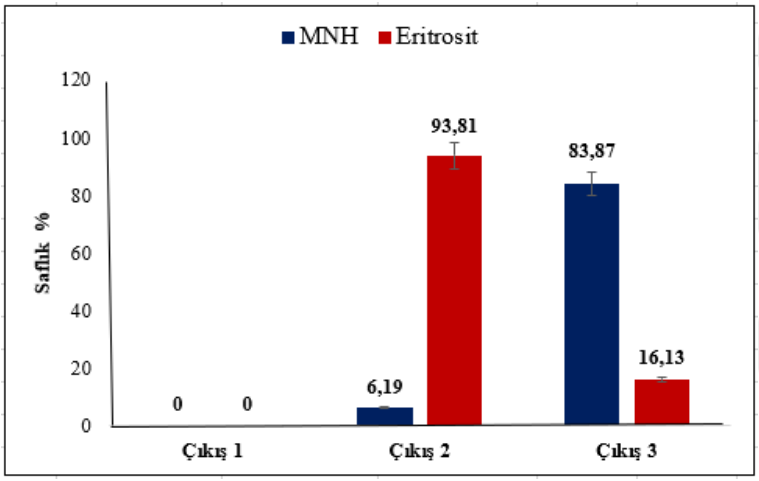


Şekil 4-8: Mikrokanalın giriş ve çıkışlarına ait eritrosit (kırmızı) ve MNH'lerin (mavi) floresan görüntüleri. Görüntüler 10x objektif ile alınmıştır.

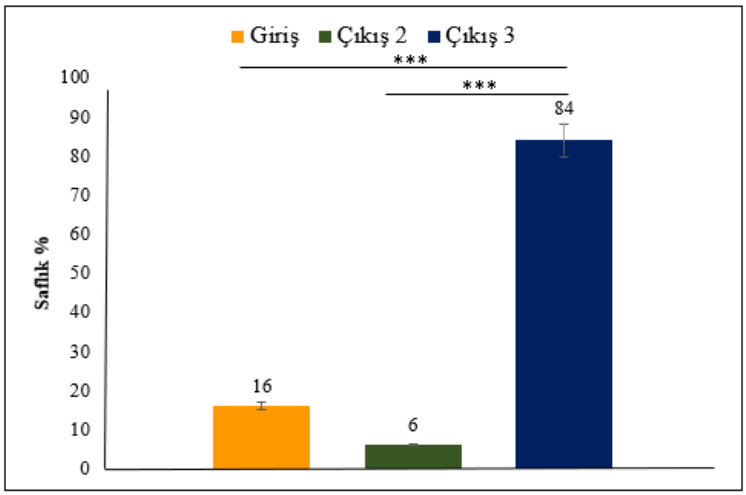
Şekil 4-8'de MNH'lerin Sunflower tasarımlı mikrokanaldaki giriş ve çıkışlarda görüntüleri verilmiştir. Şekle göre mikrokanalın girişinde miks olarak kanala verilen hücre süspansiyonu eritrosit (far red boya, kırmızı ile) ve MNH'lerin (DAPI boya, mavi ile) görüntüleri görülmektedir. Her bir hücre farklı çıkışlarda yoğunlaştı. Çıkış 2'de eritrositler birikirken, Çıkış 3'te hedeflenen hücrelerden MNH'ler toplandı.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4-9: Sunflower tasarımlı mikrokanalda AfM-MNH ve eritrositlere ait verimlilik ve saflık değerleri görüntüsü a) AfM-MNH ve eritrosit geri kazanım oranı b) AfM-MNH ve eritrosit saflık düzeyi c) MNH saflık düzeyi (*** $p<0.0001$, $n=6$).

Şekil 4-9 a ve b'de gösterildiği gibi, Çıkış 2'deki eritrositlerin ve Çıkış 3'teki MNH'lerin geri kazanım oranı sırasıyla, %79,67 ve %95,27 iken; hücrelerin saflık düzeyi sırasıyla, %93,81 ve %83,87 idi (MNH:PBS, 1:5 konsantrasyonda). Düşük seyreltme oranlarında, hedef çıkışta MNH'lerin saflık oranı düşük olarak tespit edildi.

Tablo 4-2: AfM-MNH ortalama saflık değeri (%)

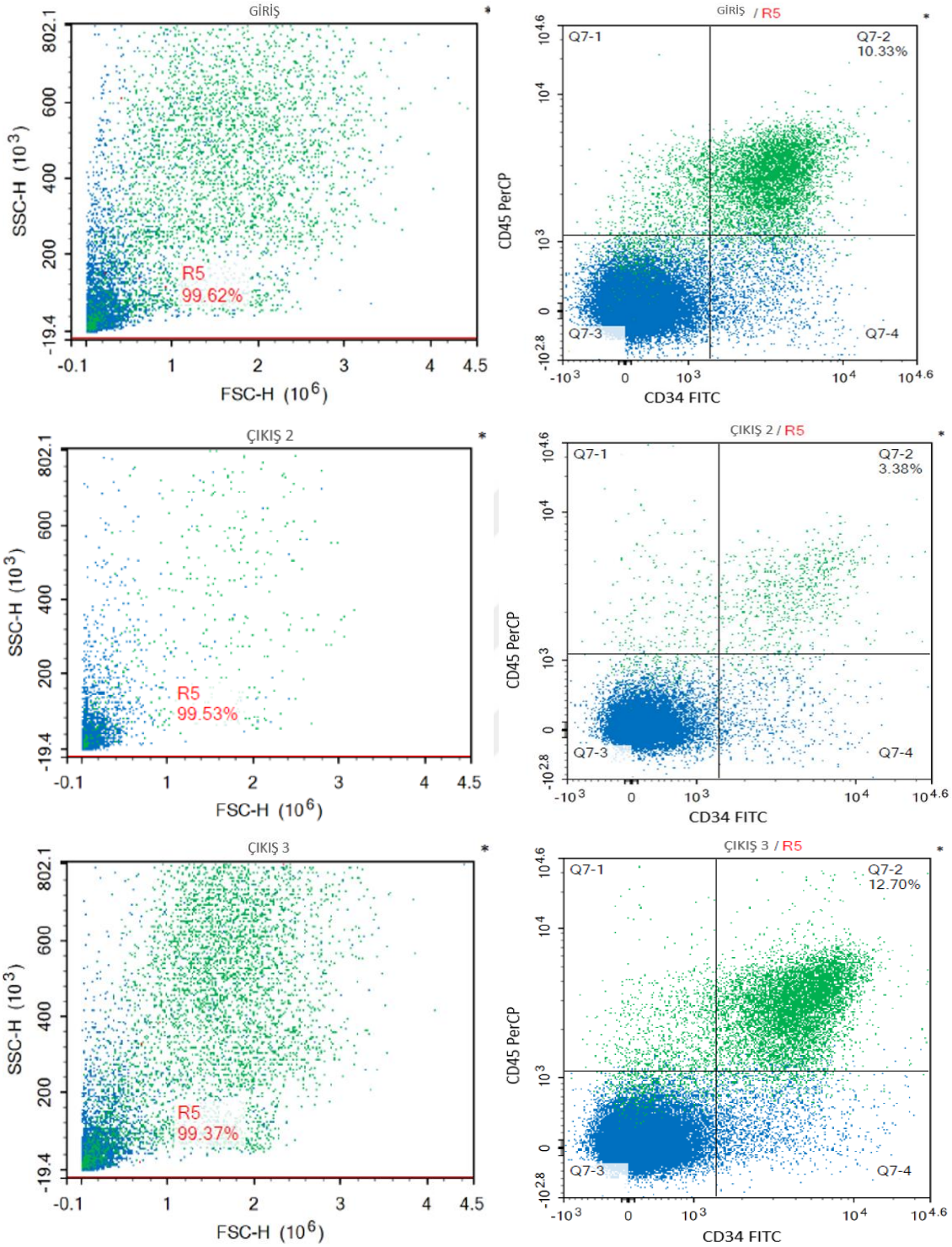
Grup	OSD %X±S.S	Max-Min Değerler	p Değeri
Ana stok	15,53±10,33	4,50-29,50	0.000
Çıkış 2	6,1±1,57	4,70-9,10	
Çıkış 3	83,87±3,4	4,50-86,90	

X:Ortalama değer, S.S:Standart sapma, OSD: Ortalama saflık değeri

Mikrokanal performansı değerlendirmek için ana stokta (giriş) ve çıkışlarda AfM-MNH saflık düzeyi incelendi. Tablo 4-2'de ve Şekil 4-9 c'de, MNH'lere ait ortalama saflık değeri (OSD) görülmektedir. Buna göre saflık değeri Çıkış 3'te, ana stok ve Çıkış 2'ye göre anlamlı bir farklılığın olduğu saptandı ($p<0.0001$).

4.3.2.2. Akış Sitometri Tekniği ile Mononükleer Hücre ve Alt Hücre Gruplarının (HKH ve VSEL Kök Hücre) Verimlilik (Geri Kazanım Oranı) ve Saflık Düzeyi

Mikroakışkan kanalın ayrıştırma performasını değerlendirmede, akış sitometri ölçümleri için aferez materyali (n = 6), kemik iliği (n = 4) ve periferik kan (n = 3) örnekleri kullanıldı. Aferez materyalinde ortalama $77x10^3$ MNH/µl ve 1017 HKH/µl sayıda hücre; kemik iliğinde ise $76x10^3$ MNH/µl ve 578 HKH/µl hücre bulunmaktadır. AfM-MNH ve eritrosit 1:2, 1:3, 1:6 oranında; Kİ-MNH ve eritrosit 1:2, 1:3 oranında ve PK-MNH ve eritrosit 1:2, 1:3, 1:6 oranında hücreler karıştırıldı. Mikrokanalın giriş ve çıkışlarında MNH, HKH ve VSEL kök hücreler akış sitometride analiz edildi.



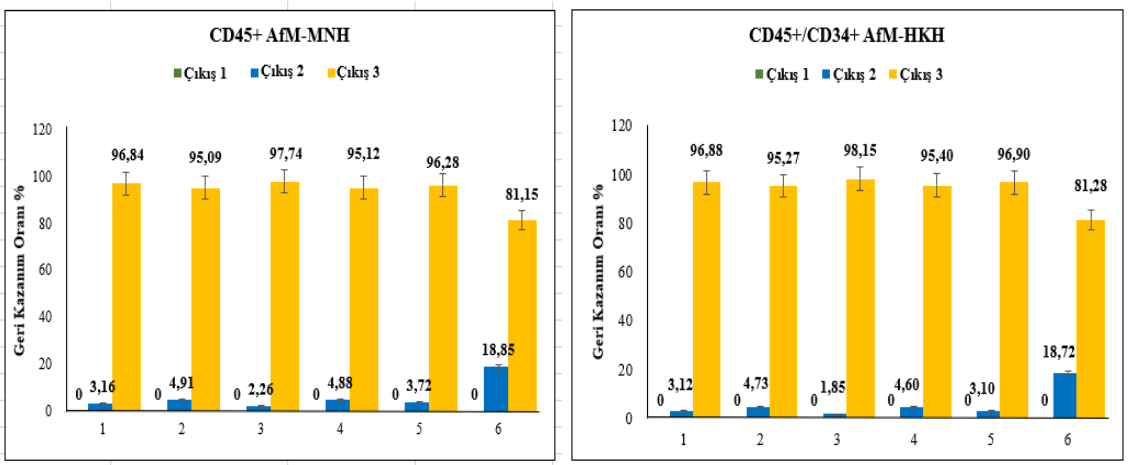
Şekil 4-10: AfM-MNH ve AfM-HKH akış sitometri kapılama stratejisi.

Şekil 4-10'da üç farklı hematopoetik ürüne ait MNH ve HKH'lerin mikrokanalın giriş ve çıkışlarındaki akış sitometri kapılama stratejisi verilmiştir.

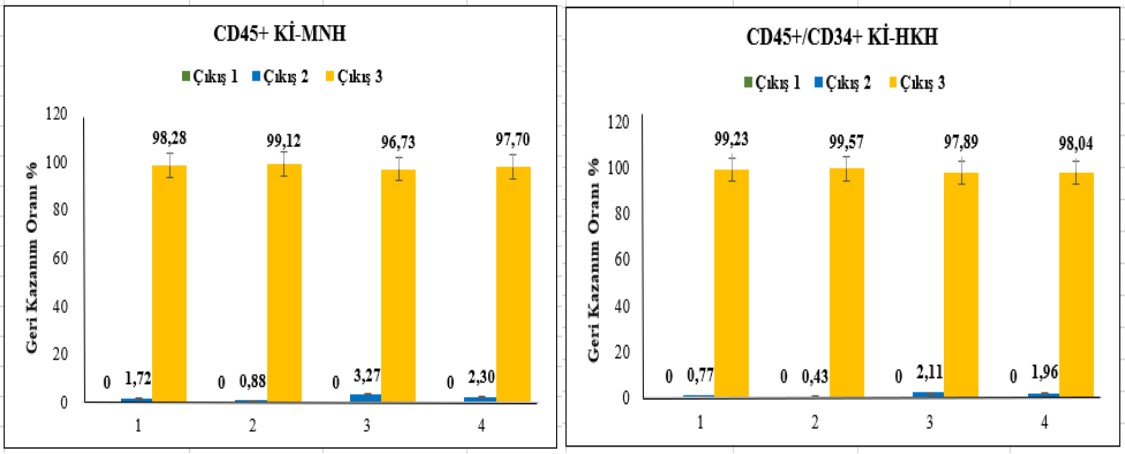
Tablo 4-3: MNH ve HKH'lere ait ortalama geri kazanım oranı (%).

Örnek Adı	Çıkış 1	Çıkış 2	Çıkış 3
CD45(+) AfM-MNH	0	6,44	93,56
CD45(+)/CD34(+) AfM-HKH	0	6,02	93,98
CD45(+) Kİ-MNH	0	2,04	97,96
CD45(+)/CD34(+) Kİ-HKH	0	1,32	98,68
CD45(+) PK-MNH	0	1,64	98,36

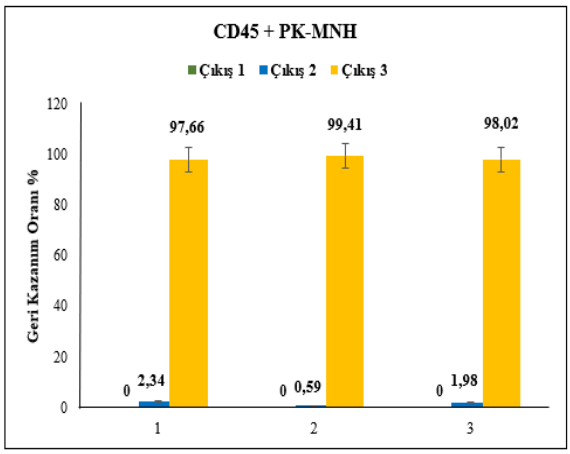
Tablo 4-3'te; MNH'lerin ve HKH'lerin ortalama geri kazanım oranları gösterilmektedir. Tablo 4-3'e göre, AfM-MNH'lere (CD45+ hücre) ait geri kazanım oranı, Çıkış 2 ve Çıkış 3'te sırasıyla ortalama %6,44 ve %93,56 olarak tespit edilirken, AfM-HKH'lerin (CD45+/CD34+ hücre) geri kazanım oranı Çıkış 2 ve Çıkış 3'te sırasıyla ortalama %6,02 ve %93,98 olarak bulundu. Ayrıca, Kİ-MNH (CD45+ hücre) ve Kİ-HKH'lerin (CD45+/CD34+ hücre) ortalama geri kazanım oranı değerleri benzerdi. Çıkış 2 ve Çıkış 3'te, Kİ-MNH'lerin (CD45+ hücre) ortalama değeri sırasıyla %2,04 ve %97,96 iken, Kİ-HKH'lerin (CD45+/CD34+ hücre) ortalama değeri sırasıyla %1,32 ve %98,68 idi. Periferik kandan izole edilen MNH'lerin (CD45+ hücre) ortalama geri kazanım oranı, Çıkış 3'te, Çıkış 2'ye göre daha yüksekti (Tablo 4-3).



(a)



(b)

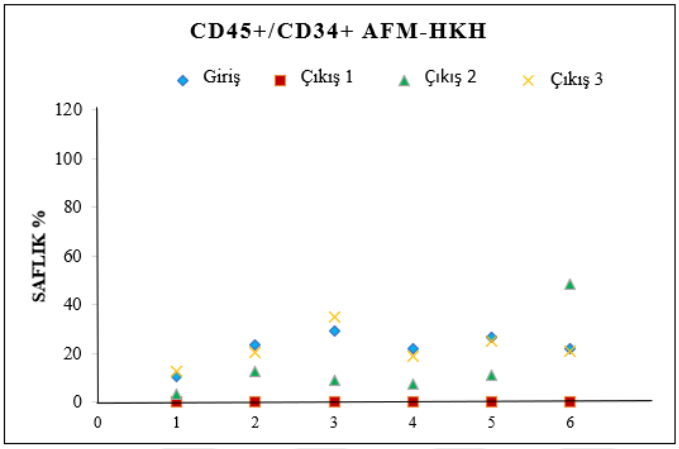


(c)

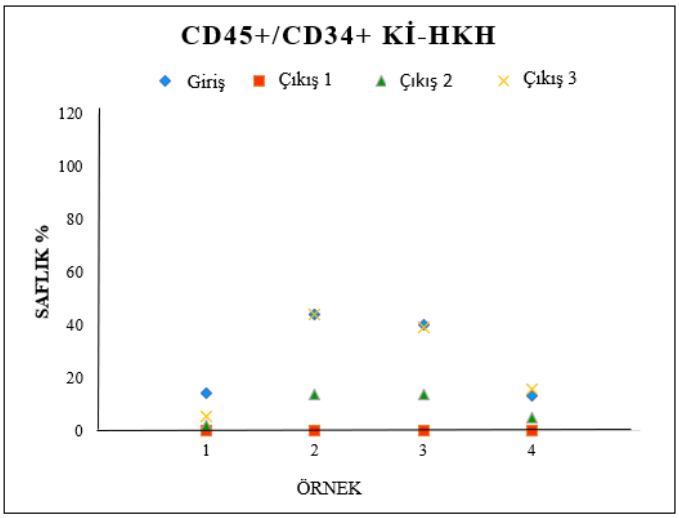
Şekil 4-11: Sunflower tasarımlı mikrokanalın izolasyon verimlilik değerleri a) AfM-MNH ve AfM-HKH geri kazanım oranı (n=6). b) Kİ-MNH ve Kİ-HKH geri kazanım oranı (n=4) c) PK-MNH geri kazanım oranı (n=3). MNH'ler 0,7 ml/dk akış hızında izole edildi.

Şekil 4-11'de hedef hücrelere ait akış sitometri sonuçlarına göre geri kazanım oranları görülmektedir. Buna göre Şekil 4-11 a'da, Çıkış 3'te CD45(+) AfM-MNH

değeri %81,15 ile %97,7 oranları arasında değerlere sahip iken, CD45(+)/CD34(+) AfM-HKH değerleri de %81,28 ile %98,15 oranları arasında değerlere sahipti. Şekil 4-11 b gösterildiği gibi, Çıkış 3'te CD45(+) Kİ-MNH değeri %96,73 ile %99,12 oranları arasında değişti ve CD45(+)/CD34(+) Kİ-HKH'ye ait değerler de %97,89 ile %99,57 oranları arasında tespit edildi. Yukarıda verilen değerler 0,7 ml/dk infüzyonu sonucu ile toplanan hücrelere aittir. Normal periferik kanda CD34 pozitif hematopoetik kök hücre bulunmamaktadır, bu nedenle tablo ve grafikte sadece MNH değeri verildi.



(a)



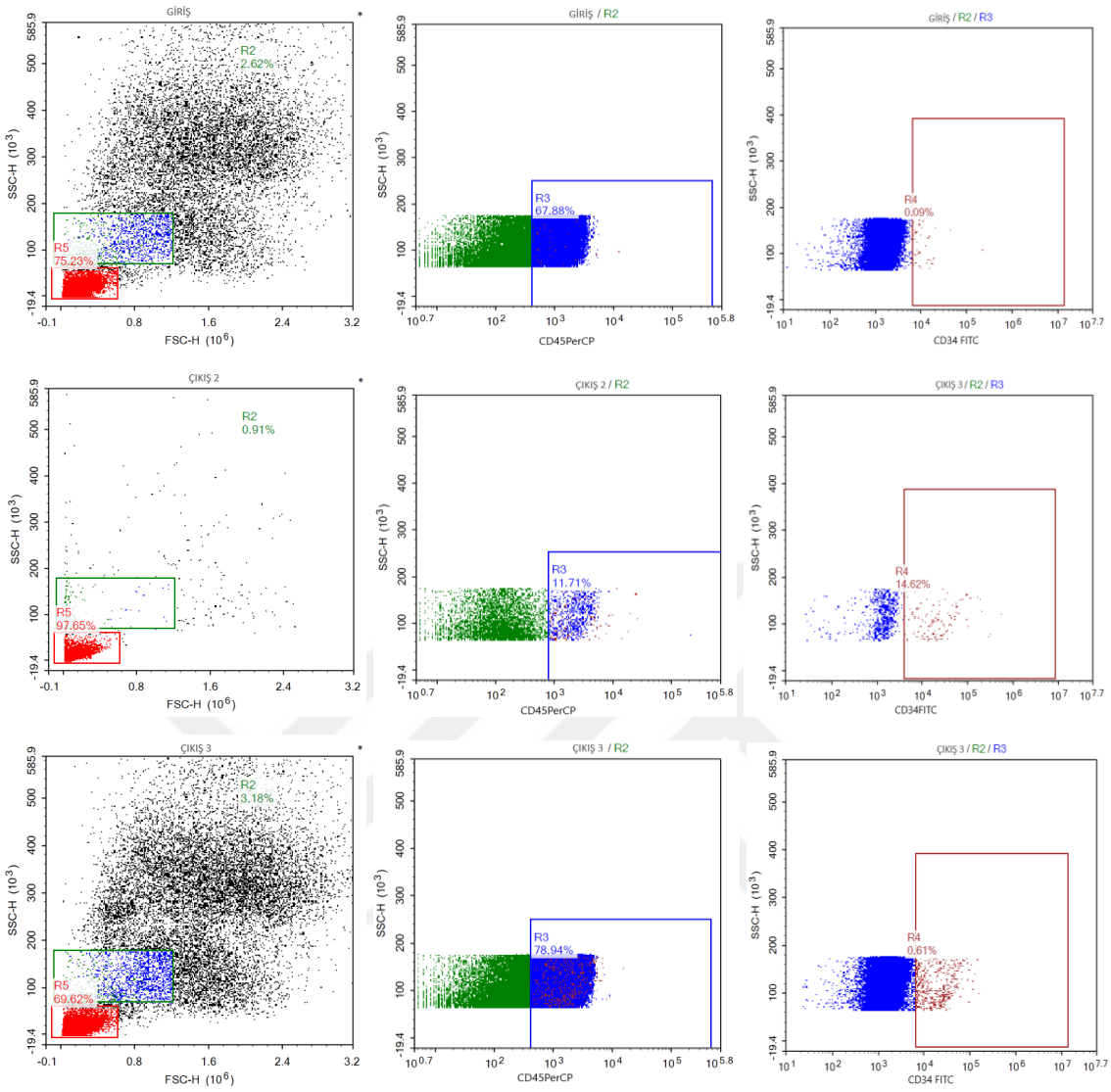
(b)

Şekil 4-12: Sunflower tasarımlı mikrokanalda hematopoetik kök hücre saflık değeri a) Aferez ürünü hematopoetik kök hücre saflık değeri (n=6) b) Kemik iliği hematopoetik kök hücre saflık değeri (n=4).

Şekil 4-12'de belirtildiği gibi, Sunflower tasarımlı mikrokanaldan geçirilen sonra elde edilen CD45 (+)/CD34 (+) HKH saflık düzeyi akış sitometri ile tespit edildi. Buna göre Şekil 4-12 a'da, mikrokanaldan geçirilmeden önce (giriş), AfM-HKH

ortalama saflık değeri %21,2; hücre süspansiyonu mikrokanala infüze edildikten sonra Çıkış 2'de %8,1 ve Çıkış 3'te %21,7 olarak belirlendi. Şekil 4-12 b'de ise Kİ-HKH ortalama saflık değeri mikrokanaldan geçirilmeden önce (giriş) %27,9, Çıkış 2'de %8,7 ve Çıkış 3'de %26 olarak tespit edildi. Her iki üründe de Çıkış 1'de hücre gözlenmedi.

Mononükleer hücre alt gruplarından bir diğeri de VSEL kök hücrelerdir. VSEL kök hücrelerin saflaştırılması ya da zenginleştirilmesi için AfM-MNH'ler Sunflower tasarımlı mikrokanaldan geçirildikten sonra her çıkışta konsantre olan hücrelerde VSEL kök hücre markırları incelendi. Bu mikrokanalda, VSEL kök hücre izolasyonu için sadece aferez materyali kullanıldı. Kemik iliği ve periferik kan ürünleri antikor kısıtlılığı nedeniyle çalışılamadı.



Şekil 4-13: VSEL kök hücrelere ait akış sitometri kapılama stratejisi.

Şekil 4-13'te, VSEL kök hücreler için akış sitometri kapılama stratejisi verilmiştir. Şekle göre R2 kapıda, literatürde yapılan araştırmalara göre VSEL kök hücreler eritrositlerin kapılandığı bölgede bulunmaktadır ve bu hücrelerde CD45 antikoru eksprese edilmezken, CD34 antikoru eksprese edilmektedir (Sovalat ve ark. 2011; Barriga ve ark. 2012).

Tablo 4-4: VSEL kök hücrelerin ortalama geri kazanım oranı

Grup	GKO % X±S.S	Max-Min Değerler
Çıkış 2	12,08±8,7	3,12-20,51
Çıkış 3	87,91±8,7	79,49-96,88

X: Ortalama değer, S.S:Standart sapma

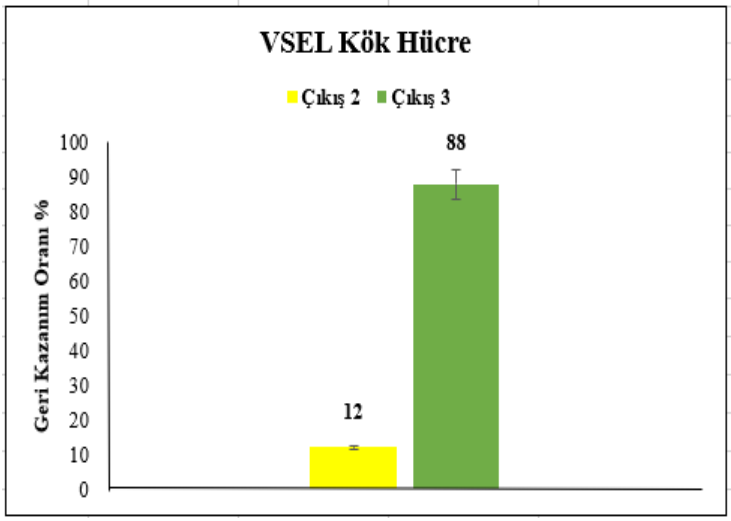
Tablo 4-4'te VSEL kök hücrelerin geri kazanım oranı (GKO) verilmiştir. Tabloya göre Çıkış 2'de minimum GKO %3,12 iken maksimum değer ise %20,51 idi. GKO Çıkış 3'te ise minimum yaklaşık %80 iken maksimum %96,8 olarak tespit edildi (n=3).

Tablo 4-5. VSEL kök hücrelerin ortalama saflık düzeyi

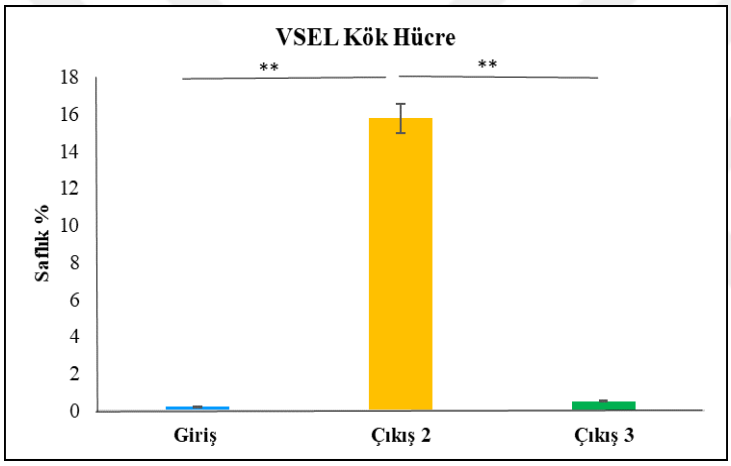
Grup	Saflık % X±S.S	Max-Min Değerler	p değeri
Giriş	0,22±0,11	0,09-0,30	0.004
Çıkış 2	15,76±5,9	10,43-22,25	
Çıkış 3	0,51±0,3	0,16-0,76	

X:Ortalama değer, S.S:Standart sapma

Tablo 4-5'te VSEL kök hücrelere ait ortalama saflık düzeyi gösterilmiştir. Buna göre saflık değeri mikrokanalın girişinde %0,09-%0,30 değerler arasında, Çıkış 2'de %10,43-%22,25 ve Çıkış 3'te %0,16-%0,76 değerler arasında idi.



(a)

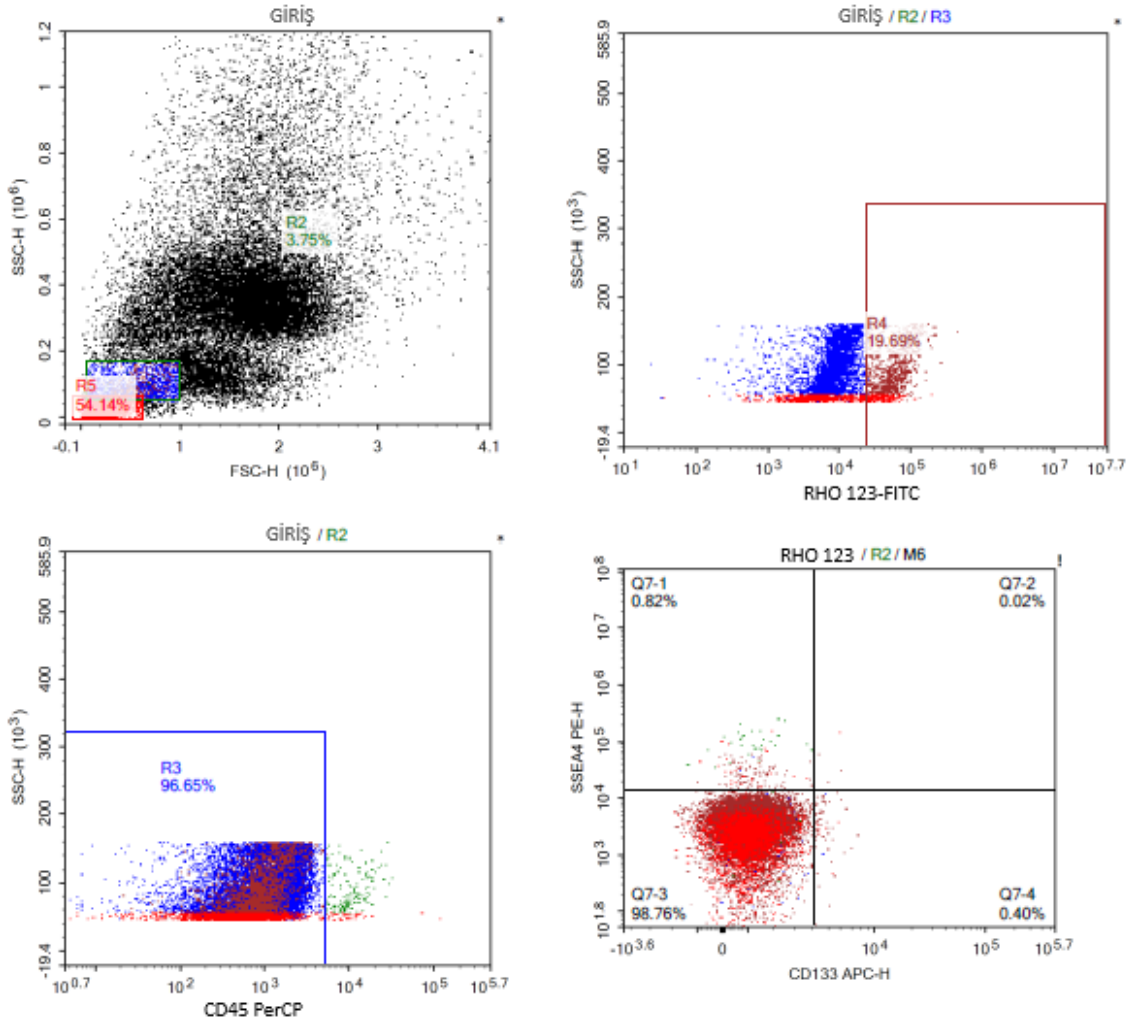


(b)

Şekil 4-14: VSEL kök hücrelerin akış sitometri analizine göre ortalama geri kazanım oranı ve saflık düzeyi a) Ortalama geri kazanım oranı b) Ortalama saflık düzeyi (** $p<0.01$, n=3).

Şekil 4-14'te VSEL kök hücrelerin GKO ve ortalama saflık düzeyi verilmiştir. Şekil 4-14 a'da Çıkış 2 ve Çıkış 3'te sırasıyla GKO, %12,08±8,7 ve %87,91±8,7 olarak saptandı. Çıkış 1'de hücre çıkışı gözlenmedi. Şekil 4-14 b'de gösterildiği gibi VSEL kök hücrelere ait ortalama saflık düzeyi girişte 0,22±0,11 iken; Çıkış 2 ve Çıkış 3'te sırasıyla 15,76±5,9 ve 0,51±0,3 olarak tespit edildi. Çıkış 2'de VSEL kök hücre saflığı, Giriş ve Çıkış 3'e göre önemli düzeyde daha yüksek olarak belirlendi ($p<0.01$).

VSEL kök hücrelerin karakterizasyonunda aynı örneklerde Şekil 4-13'teki R2 ve R3 popülasyonda rodamin $123^{sönük}$ ve pirimitif hücre markırları da incelendi.



Şekil 4-15: VSEL kök hücrelerde rodamin 123^{sönük} popülasyona ait akış sitometri kapılama stratejisi. Rho 123: Rodamin 123.

Şekil 4-15'te VSEL kök hücrelerin karakterizasyonu için rodamin 123^{sönük} popülasyona ait akış sitometri kapılama stratejisi gösterilmiştir. Şekle göre R2 total kapıda VSEL kök hücrelerin bulunduğu alandır. R3 kapıda CD45 negatif VSEL kök hücre popülasyonu tarandıktan sonra bu popülasyonda rho123 seviyesi için R4 bölgede kapılandı. Son olarak R2/R3/R4 rho 123 ^{sönük} VSEL kök hücre markırlarından SSEA-4 ve CD133 değerleri incelendi.

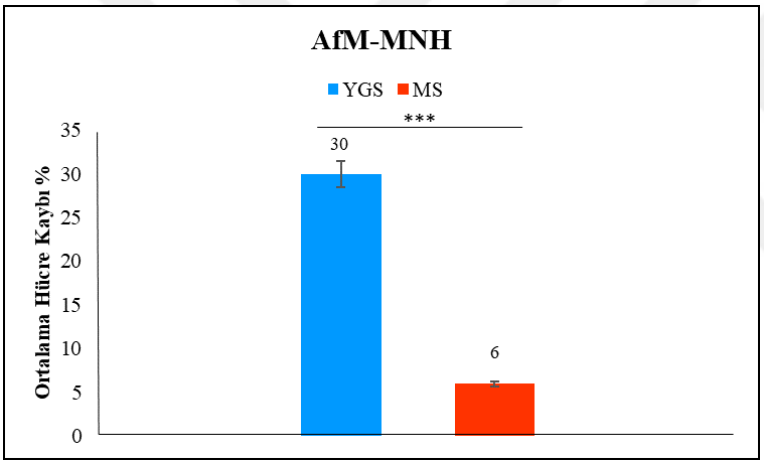
Tablo 4-6: VSEL kök hücrelerde Rodamin 123 ^{sönük}, SSEA-4 ve CD133 pozitif ortalama değerleri

	Rodamin 123 %	**SSEA-4 %**	**CD133 %**
Giriş	19,69	0,84	0,42
Çıkış 2	22,32	1,86	0,54
Çıkış 3	20,40	0,56	0,23

Tablo 4-6'de, CD45 negatif ve rodamin 123^{sönük} VSEL kök hücrelerde, SSEA-4 ve CD133 pirimitif markır değerleri verilmektedir. Buna göre, mikrokanalda giriş ve çıkışlarda CD45 negatif VSEL kök hücrelerde rodamin 123 değeri benzerdi, ortalama %20,8 idi. SSEA-4 değerine baktığımızda Çıkış 2'de, Giriş ve Çıkış 3'e göre yüksekti ve değeri ortalama %1,86 idi. Giriş ve Çıkış 3'te sırasıyla ortalama %0,84 ve %0,56 olarak saptandı. CD133 değeri Giriş ve Çıkış 2'de benzerdi, sırasıyla ortalama %0,42 ve %0,54 olarak belirlendi. Çıkış 3'te CD133 değeri ise ortalama %0,23 idi.

4.3.3. Mikroakışkan Sistemde Hücre Kaybı Seviyesi

Hücre kaybı seviyesi, mikrokanal performansını değerlendirmede önemli kriterlerden biridir.



Şekil 4-16: İki farklı izolasyon tekniğinde AfM-MNH hücre kaybı düzeyi (*** p<0.0001, n=6). YGS: Yoğunluk Gradyanlı Santrifüjleme ve MS: Mikroakışkan Sistem.

Şekil 4-16'da, AfM-MNH hücre kaybı düzeyi gösterilmiştir. Şekilde gösterildiği gibi, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme (YGS)'nin neden olduğu hücre kaybı, ortalama %29,9±11,6 iken, mikroakışkan sistemde hücre kaybı ortalama %6,3±2,5 idi. Buna göre, hücre kaybı mikroakışkan sistemde, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme tekniğine göre önemli ölçüde daha düşük tespit edildi (p<0.0001).

5. TARTIŞMA

İnsan vücudu, vücut sıvılarında dolaşan farklı türde hücrelere sahiptir. Araştırmacılar, bu sıvılardaki hücrelerin sayısını, kalitesini ve tipini analiz ederek bireyin sağlık veya hastalık durumu hakkındaki önemli bilgileri elde ederler. Dokular, organlar ve sistemler arasındaki karmaşık fonksiyonel etkileşimleri anlamak için heterojen bir karışımdaki hücrelerin (özelliklerine veya türüne göre) izolasyonu ile klinik teşhis, izleme, terapötiklerin etkisini anlama veya biyomoleküler analiz gibi birçok işlemin yapılması mümkündür (Gossett ve ark. 2010). Bu çalışmada, rejeneratif amaçla kullanılma potansiyeli olan hücre kaynaklarından, kolay, ve hızlı bir şekilde ayrıştırma yapabilen bir mikroakışkan sistem ile mononükleer ve VSEL kök hücrelerin daha verimli saflaştırılmasını araştırdık.

İnsan kanında yaklaşık %0,1 gibi oldukça düşük bir orana sahip olan beyaz kan hücreleri (lökosit), patojenlere karşı bağışıklık tepkilerinde önemli bir rol oynar (Jundi ve ark. 2019; Urbansky ve ark. 2019). Bu hücrelerdeki anormallikler; bulaşıcı hastalıklarda (Wu ve ark. 2012), otoimmün hastalıklarda (Du ve ark. 2017) ve bazı kanserlerde (Martens ve ark. 2018) kritik öneme sahiptir. Ayrıca taşıdıkları genetik materyaller, birçok klinik hastalığın kana dayalı teşhisi için onları potansiyel bir biyobelirteç yapar (Fridley ve ark. 2014). Lenfositler ve monositler gibi hücrelerden oluşan mononükleer hücreler bir tür beyaz kan hücresidir. Bu hücrelerin birçoğu tüm kan hücrelerinin %0,06'sından daha azını oluşturur. MNH'ler oldukça düşük olmalarından dolayı araştırma ve klinik uygulamalar için zenginleştirilmeleri gerekir (Henrikson ve ark. 1997). Ayrıca MNH'lerin, periferik kanda lökositlerden yaklaşık 1000 kat daha fazla bulunan eritrositlerden (Pierigè ve ark. 2008) temizlenmesi etkili ve güvenilir bir değerlendirmenin temel unsurudur. Kan hücrelerinin ayrıştırılması için bazı geleneksel yöntemler mevcuttur. MNH'lerin zenginleştirilmesi genellikle yoğunluk gradyanlı santrifüjleme tekniğiyle yapılır. Bununla birlikte eritrosit lizis ve yoğunluk gradyanlı santrifüjleme yöntemleri birlikte kullanılarak da zenginleştirilir (Lee W. ve ark. 2016). Eritrosit lizis yönteminde eritrositlerin parçalanmasıyla hemoglobin serbest bırakılır. Bu durum kimyasal interferansa ve PCR tabanlı testin performansının düşmesine neden olur (Al-Soud ve ark. 2001). Yoğunluk gradyanlı santrifüjlemede eritrositler, MNH'lerden tam olarak uzaklaştıralamayabilir. Bundan dolayı hedef hücrelerin eritrositlerden uygun bir teknikle temizlenmesi çok önemlidir.

Kanda hedef hücrelerin ayrıştırılması için floresanla aktifleştirilmiş hücre ayırma (FACS), manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre ayırma (MACS), yoğunluk gradyanlı santrifüjleme, dielektroforez ve afinite kromatografisi gibi genellikle klinikte kullanılan birçok geleneksel yöntem vardır (Yousuff ve ark. 2017; Rahmanian ve ark. 2017). Bu yöntemlerin, büyük ölçekli numune gereksinimi, yüksek reaktif tüketimi, numunelerin çapraz kontaminasyonu, pahalı ve gelişmiş ekipman (Yousuff ve ark. 2017), uzman personel ihtiyacı ile enerji ve zaman alıcı olması (Rahmanian ve ark. 2017) gibi bazı dezavantajları vardır. Ayrıca bu yöntemler, özellikle nötrofiller ve makrofajlar gibi hassas hücrelerde ex vivo hücre aktivasyonuna yol açabilir (Jundi ve ark. 2019). Mikroakışkanlar geleneksel yöntemlere alternatif olarak bu sınırlamaların üstesinden geldiği bildirilmiştir. Son on yılda, bu sistemler hücre saflaştırmada etkili bir araştırma alanı olmuştur (Zhu ve Murty 2014). Bu sistemler ile hücrelerin boyut, deforme olabilirlik, hücre yapışması, şekil ve elektrik yükleri gibi özelliklerinden yararlanılarak saflaştırma gerçekleştirilir (Yousuff ve ark. 2017). Bu hücresel özelliklerin kullanılmasıyla aktif ve pasif mikroakışkan cihazlar geliştirilmektedir. Bu cihazlar elektroforez (Qiao ve ark. 2016), dielektroforez (Zhang H. ve ark. 2019), manyetoforetik (Dagher ve ark. 2021) ve ultrasonik akustik ayırma (Wesera ve ark. 2020) gibi aktif tekniklerden ve sıkıştırılmış akış parçalama (Yamada ve ark. 2004), hidrodinamik kromatografi (Yamada ve Seki 2005), çöktürme (sedimantasyon) (Huh ve ark. 2007) ve ataletsel odaklama (Zhang J. 2017) gibi pasif tekniklerden oluşmaktadır. Aktif tekniklerde, harici olarak uygulanan kuvvetler hücrelerin canlılığını bozabilir ve morfolojisini değiştirebilirken, pasif tekniklerde ise herhangi bir kuvvet uygulanmadığından böyle olumsuz etkilerin oluşma olasılığı düşüktür (Sonmez ve ark. 2017).

Farklı kanal tasarımları ve teknikleri ile kan hücreleri izole edilmiştir (Nam ve ark. 2019; Jeon ve ark. 2020; Kung ve ark. 2021). Mikroakışkan yöntemler arasında en avantajlısı ataletsel teknikler olabilir. Ataletsel kuvveti kullanan geleneksel etiketsiz hücre ayırma tekniklerinin, hızlı akış hızının avantajları olduğu ve ataletsel kuvvetlerin uygulanmasıyla mekanik stres ve hücre hasarı gibi diğer mikroakışkan cihazlarda meydana gelebilecek etkilerin azaltıldığı hücrenin işlevi ve özelliklerinin korunduğu vurgulanmaktadır. Optimum akış hızı altında, ataletsel kaldırma kuvveti ve Dean sürükleme kuvveti arasındaki denge ile küçük mikro küreler ve büyük mikrokürelerin tek akışlı odaklanması kolaylaşmaktadır. (Gao ve ark. 2019). Pasif ayırma yaklaşımları

arasında ataletsel mikroakışkanlar hassasiyet, basitlik ve yüksek verim nedeniyle gittikçe daha popüler olmaktadır (Özbey ve ark. 2018). Ataletsel mikroakışkanların en popüler uygulamalarından biri de hücre ayrıştırmadır (Gao ve ark. 2019).

Literatür incelemesinde ataletsel mikroakışkan sistemle çeşitli hücrelerin ayrıştırabildiği gösterilmiştir. 2009 yılında Roda ve arkadaşları insan mezenkimal kök hücrelerini, fetal membrandan ve amniyonik membrandan türetilmiş epitelyal hücrelerden, yerçekimsel Alan Akışı Fraksiyonu (FFF) ile izole etmiştir. Hur ve arkadaşları (2010) düz kanallı ataletsel mikroçip kullanarak seyreltilmiş tam kanda otomatik olarak eritrosit ve lökosit sayımı yapmış ve ham görüntülerin görsel incelemesine kıyasla yüksek duyarlılık ve özgüllük (%86-97) elde etmişlerdir. Yine ataletsel ve hidromekanik prensipler ile DTH ayrıştırması yapılan bir çalışmada, ortalama >=%90 verimlilik, %84,96'a kadar saflık ile DTH'ler elde edilmiş ve tüm hücrelerin canlılığı >%95 olarak saptanmıştır. Ayrıca bu önerilen yöntemle hücre ayrıştırmasının başarılı olduğu ve yöntemin son derece düşük maliyetli ve kolay manipüle edildiği ifade edilmiştir (Gao ve ark. 2019). Kanser hücre hatlarının eğrisel mikrokanallarda ataletsel odaklanması ile ilgili yapılan başka bir çalışmada hücre ölümü veya hasarı önlenirken ataletsel mikroakışkanlar ve Dean akış fiziği avantajlarından yararlanılıp simetrik olarak kavisli kanallarda sürekli, yüksek verimli, etiketsiz ve paralelleştirilebilir ve boyuta dayalı hücre sınıflaması yapılmıştır (Özbey ve ark. 2019). Literatür araştırmalarımıza göre çalışmamızda, avantajlı olduğu ispatlanmış ataletsel mikroakışkanlar yöntemini tercih ettik. Bu verilerden yola çıkarak L.Trabzon ve grubu tarafından 2017'de geliştirilen Sunflower tasarımlı mikroakışkan sistem ile farklı hematolojik ürünlere ait mononükleer hücre ve VSEL kök hücre ayrıştırma performansını inceledik.

Kanal boyutu, spiral döngü sayısı ve farklı çıkış geometrisine bağlı olarak mikro cihazların ayırma performansı değişebilir. Farklı kanal tasarımlarına ve hücre ayırma konseptine sahip çeşitli ataletsel mikroakışkan cihazlar ile lökositler ayrıştırılmıştır. Wu ve ark. (2012) yamuk kesitli bir spiral ataletsel mikroakışkan cihaz sunmuş, ~%98,4 geri kazanım oranı ile lökositleri (%99,4 granülositler ve %92,4 mononükleer lökositler) elde etmiştir. Başka bir çalışma, durağan odaklı bir mikroakışkan ile monositleri %43 saflıkta ve lenfositleri %91 saflıkta ayırabildiğini raporlamıştır (Ramachandraiah ve ark. 2017). Zhang J. (2017), incelediği kanal tasarımında lökosit

saflığının %48,1 olduğunu ve serpentine mikrokanallı bir cihazla ayırma verimliliğinin >%90 olduğunu bildirmektedir. Yine başka bir kanal konseptinde, hidrodinamik ve ataletsel kuvvetleri kullanılarak %93,2'lik bir geri kazanım oranı ile lökositlerin tam kandan ayrıldığı bildirilmektedir (Lombodorj ve ark. 2020). L.Trabzon ve grubu (2017), geliştirdikleri yeni mikrokanal tasarımın partikül odaklamada; kararlı odak çizgisi, odak çizgisi genişliği, verim ve esnek akış hızı seçimi bakımından üstün özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, ~%95 verimlilik ile HL-60 hücrelerini başarılı şekilde ayrıştırmışlardır. Yaptığımız çalışmada Sunflower tasarımlı mikrokanalda MNH'lerin ayrışma verimliliği ortalama %97,52 olarak tespit edildi. Hedef hücreler olan; AfM-MNH, Kİ-MNH ve PK-MNH mikrokanalın 3. Çıkış'ında toplandığı saptandı (Şekil 4-6). Elde ettiğimiz sonuçlara göre Kİ-MNH'ler %97,96 verimlilikle geri kazanılırken, PK-MNH'ler %98,36 verimlilikle hedef çıkışta toplandı. AfM-MNH için; beş örnekte, ortalama geri kazanım oranı % 96,26 idi. Ancak 6. örnekte bu değer %81,15 gibi bir düşük oranda çıktı. Bu durum, mikrokanal bağlantı borularının (tubing) ve mikrokanal sisteminin yetersiz düzeyde yıkanması sebebiyle gelişmiş olduğu ya da kanal sisteminde hava kabarcıklarının gözden kaçmış olabildiği düşünülmektedir. Bu durumlarda, mikrokanal sisteminde hücreler birikerek hücre odaklanması bozabilir. Bu sorun, yeterli yıkama adımları ile kolayca çözülebilir.

Ataletsel odaklama; partikül veya hücre yapısına, yoğunluğuna veya tipine bağlı değildir. Odaklanma süreci; kanal boyutu, eğriliği ve yapısı, partikül veya hücrelerin boyutu ve konsantrasyonu ile akış hızından etkilenir (Sonmez ve ark. 2017). Mevcut çalışmada farklı hematolojik ürünlerdeki MNH'lerin boyut dağılımlarının benzer olduğunu ve hücrelerin ortalama çapının 13,4 μm; eritrosit çapının ortalama 8,4 μm, K562 hücrelerin ortalama 25 μm ve jurkat hücrelerin ortalama 21 μm olduğunu belirledik (Şekil 4-2). Buna göre mikrokanal optimizasyonunda kullanılan hematopoetik hücre serilerinden saf K562 hücre ile jurkat hücreleri Çıkış 1'de toplanırken, MNH'ler Çıkış 3'te toplanmıştır. MNH ile hücre serilerinin farklı çıkışlarda birikmesindeki faktör, hücre boyutu farklılığına ek olarak süspansiyondaki hücre çeşitliliğinin de etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın verilerine göre; benzer boyuta sahip MNH'ler bir çıkışta (Çıkış 3) konsantre olurken, eritrositler başka bir çıkışta (Çıkış 2) toplandı (Şekil 4-9 a). MNH'lerin Çıkış 3'te, ortalama geri kazanım oranı %95,27 olarak ve ortalama saflık değeri %83.87±3.4 olarak saptandı. Bu hücrelerin saflık değeri Çıkış 3'te, Giriş ve Çıkış 2'ye göre önemli ölçüde yüksek bir değerde tespit edildi (Şekil 4-9 c, $p<0.0001$).

Buna ek olarak, 3. Çıkış'ta toplanan HKH'lerin ortalama saflık değeri mikrokanal giriş ve çıkışlarda istatistiksel olarak farklı olmadığı tespit edildi (Şekil 4-12).

VSEL kök hücrelerin pluripotent özellikte olması ve tümör gelişimine neden olmaması (Zuba-Surma ve ark. 2008); embriyonik üç germ tabakasına farklılaşma yeteneğine sahip olması ve bütün dokuların kök hücre havuzunu oluşturması sebebiyle (Bhartiya ve ark. 2017) gelecekte tedavide yer alması açısından umut vadetmektedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar bunu desteklemektedir. Zuba-Surma ve arkadaşları (2011) miyokard enfarktüsünü modelleyen hayvan deneyinde VSEL kök hücrelerin transplantasyonundan sonra sol ventrikül fonksiyonları ve miyosit hipertrofisinde düzelme izlendiğini bildirmiştir. Taichman ve arkadaşları (2010) izole edilmiş VSEL kök hücrelerin, in vivo mezenkimal soylara farklılaşabildiğini ve kemik dokular üretebildiğini saptamışlardır. Kassmer ve arkadaşlarının (2013), fare kemik iliğinden izole edilen VSEL kök hücrelerle ilgili yaptığı çalışmada, nakledilen bu hücrelerin akciğer epitelinin yenilenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Yine bir çalışmada, doğrudan karbon tetrakloritle indüklenen hasarlı karaciğerlere VSEL kök hücrelerin transplantasyonu ile, serum Alanin Transaminaz ve Aspartat Aminotransferaz seviyesinin önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir (Chen ve ark. 2015). Buna ek olarak, VSEL kök hücrelerin üreme hücrelerin gelişimi üzerindeki etkisinin incelendiği görülmektedir. Bir çalışmada, kemoterapiden sonra VSEL kök hücrelerin spontan olarak sperme dönüştüğü bildirilmiştir (Anand ve ark. 2015). Başka bir çalışmada, yumurtalık yetmezliğinde otolog mezenkimal hücrelerin nakledilmesinden sonra sağlıklı bir bebeğin dünyaya geldiği raporlanmaktadır; bunu nakledilen bu kök hücrelerin, ovumda bulunan endojen VSEL kök hücreleri desteklemesiyle muhtemel olduğu belirtilmektedir (Edessy ve ark. 2016). Bu veriler, infertilite de VSEL kök hücrelerin umut verici olabileceğini göstermektedir.

Yukarıdaki araştırmaların sonuçlarına baktığımızda doku rejenerasyonunda ve hücresel fonksiyonunun düzelmesinde VSEL kök hücrelerin büyük katkı sağladığı görülmektedir. Ancak bu hücreler, dokularda ve kanda oldukça düşük oranda bulunmaktadır (Kucia ve ark. 2005; Wojakowski ve ark. 2009; Kotowski ve ark. 2012). Bu nedenle bu nadir hücrelerin yüksek verim ve saflıkla uygun bir izolasyon tekniği ile elde edilmesi gerekir. Günümüze kadar VSEL kök hücreler, klasik yöntemlerle elde edilmiştir. Bunlar yoğunluk gradyanlı santrifüjleme (Jamiołkowska-Sztabkowska ve

ark. 2022), FACS (Kucia ve ark. 2006; Virant-Klun ve ark. 2013; Suszynska ve ark. 2014; Labedz-Maslowska ve ark. 2016; Leppik ve ark. 2020; Ciechanowicz ve ark. 2021), MACS (Parte ve ark. 2014; Guerin ve ark. 2017), yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile birlikte manyetik mikroboncukla ayırma (Monti ve ark. 2017; Gounari ve ark. 2019) şeklinde sıralanabilir. Bu klasik yöntemlere ait bazı dezavantajlar olduğu çalışmanın 2. bölümünde belirtilmişti. Şuana kadar klasik izolasyon yöntemine alternatif olduğu düşünülen mikroakışkan sistem ile VSEL kök hücreler saflaştırılmamıştır. Bu çalışmada ilk olarak yeni bir mikroakışkan sistemde yüksek saflıkta VSEL kök hücreler (mononükleer hücre katmanında zenginleştirilen) elde edildi. Çalışmamızda Sunflower tasarımlı mikrokanal hücre ayrıştırma sisteminde CD45(-)/CD34(+) VSEL kök hücreler, Çıkış 2'de ortalama %12,08±8,7, Çıkış 3'te ise ortalama %87,91±8,7 oranla toplandı (Tablo 4-4). Bu çıkışlarda CD45(-)/CD34(+) VSEL kök hücrelerin saflığını incelediğimizde, Girişte %0,22±0,11 iken; Çıkış 2 ve Çıkış 3'te sırasıyla %15,76±5,9 ve %0,51±0,3 idi (Tablo 4-5). Çıkış 2'de VSEL kök hücre saflığı, Giriş ve Çıkış 3'e göre önemli düzeyde daha yüksek olarak belirlendi ($p<0.01$) (Şekil 4-14 b).

Sunflower tasarımlı mikrokanalda VSEL kök hücrelerin verimlilik ve saflık düzeyi bakıldıktan sonra, bu hücrelerde rodamin 123 tutulumu ve SSEA-4 ile CD133 yüzey markırları düzeyi incelendi. Rodamin 123 ilk olarak, negatif membran potansiyelleriyle orantılı olarak mitokondriye bağlanan mitokondriyal membrana özgü bir boyadır (Johnson ve ark. 1980). Rodamin 123, uzun vadeli transplant potansiyeline sahip ilkel, metabolik olarak inaktif, nispeten sakin primitif kök hücrelerde sönük fenotip gösterir (Bertoncello ve ark. 1985). Bu floresan boya, metabolik olarak aktif hücrelerde birikir. Hematopoetik hücrelerde mitokondri sayısı azdır. Düşük metabolik hıza sahip hücrelerde rho123 birikimi düşük iken, daha fazla farklılaşmış ve yüksek bir metabolik hıza sahip hücrelerde ise daha fazla rho123 birikir (Ratajczak ve ark. 1998). Rho 123 düşük birikim durumunda sönük fenotip gösterirken, fazla birikim durumda ise parlak fenotip gösterir. Carvalho ve ark. (2009) CD34 pozitif hücreler ve bunların alt popülasyonlarının karakterizasyonu ile ilgili yaptığı bir çalışmada, mononükleer hücrelerde %80'den fazla oranda rho 123 biriktiğini, daha ilkel CD34 pozitif hücrelerde ise daha az oranda rho 123 birikimi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki verilere göre; CD45 negatif hücrelerde rho 123 birikimini incelediğimizde giriş ve çıkışlarda benzerdi ortalama %20,8 idi. Bu değer rho $123^{\text{sönük}}$ olarak tanımlandı. Buna göre Çıkış

2’de, CD45 negatif ve rodamin $123^{sönük}$ VSEL kök hücrelerde, SSEA-4 ortalama değeri %1,86 idi ve Giriş ile Çıkış 3’e göre daha yüksek bir değer sahipti. CD133 değeri Giriş ve Çıkış 2’de benzerdi, sırasıyla ortalama %0,42 ve %0,54 olarak belirlendi. Çıkış 3’te CD133 değeri ise ortalama %0,23 olarak saptandı (Tablo 4-6). Bu sonuçlara göre CD45(-)/CD34(+)/Rodamin $123^{sönük}$/SSEA-4(+)/CD133(+) VSEL kök hücreler Sunflower tasarımlı mikrokanalın 2. çıkışında yüksek saflıkla elde edilebildiği söylenebilir.

Canlı hücrelerin mikrokanaldaki odaklanma davranışı sadece hücrenin boyutuna değil, deformabilite özelliğine de bağlıdır (Sonmez 2017). Disk şeklinde görünüme sahip eritrositler, yüksek deformabilite özelliğe sahiptir. Bu özellik sayesinde eritrositler kan hücrelerinden ayrıştırılabilmektedir (Kim ve ark. 2016). Daha önce yapılan araştırmalara göre, partiküllerin deformabilite özelliği arttıkça odaklanma çizgisinin, mikrokanalın merkezine yaklaştığı bildirilmiştir (Martel ve ark. 2014; Zhang J. 2017). Urbansky ve ark. (2019) çalışmalarında akustoforez mikroakışkan sistemi kullanarak, eritrositleri > %99,95'lik bir oranla merkez çıkışta WBC'leri ise > %43'lük bir geri kazanım oranı ile yan çıkışta toplandığını saptamışlardır. Bizde çalışmada benzer sonuçlar elde ettik. Verilerimiz, eritrositlerin yaklaşık %80 oranında merkezi çıkışta (Çıkış 2) toplandığını gösterdi (Şekil 4-9 a). Görüldüğü üzere eritrositler ile benzer boyuta sahip VSEL kök hücreler de mikrokanalın 2. Çıkışında yüksek bir saflıkla toplandı. Bu sonuç Bhartiya ve arkadaşları (2012) tarafından saptanan VSEL kök hücrelerin fikol ile tabakalamada eritrositlerin bulunduğu en alt katmanda olduğu bilgisini desteklemektedir.

Sunflower tasarımlı mikrokanal hücre ayrıştırma sistemi perfomansı için hücre canlılık ve kayıp değerleri de incelendi. Elde edilen hücrelerin transplantasyon amacıyla kullanımı veya hücre kültürü gibi işlemler için hücrelerin canlı olması gerekir. Hücre ayrıştırma yöntemlerinde canlılık düzeyi değişkenlik gösterebilir. Ficoll-Paque ile yoğunluk gradyanlı santrifüjleme, eritrosit lizis ve immünomanyetik mikroboncuk ayırma gibi geleneksel yöntemlerin hücre canlılığını etkileyebileceği raporlanmaktadır (Keong ve ark. 2007). Ancak mikroakışkan sistemle hücre izolasyonu yapılan çalışmalarda, hücre canlılığında minimal değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Gurkan ve ark. 2011; Lenshof ve ark. 2014). Sonmez ve ark. (2017), çalışmamızda incelediğimiz Sunflower tasarımlı mikrokanal ile HL-60 hücre serisi başarılı şekilde eritrosit hücre

süspansiyonundan izole etmiş ve canlılığın etkilenmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, hücre canlılığı tripan mavisi boyasıyla hemositometre ile herhangi bir işleme (antikor boyaması, %1 formaldehitte fikse etme, eritrosit lizis vs) tabi tutulmadan önce değerlendirildi. Ataletsel mikroakışkan ayrımından önce ve sonra MNH'lerin canlılığı benzerdi ve ortalama %96,1±3,4 olarak saptandı ($p>0,05$). Akış sitometri analizi yapılan hücrelerde %1 formalaldehitle fikse edildiğinden, hücrelerin canlılık düzeyi değerlendirilemedi. Bazı çalışmalarda farklı yıkama adımlarının (van Beem ve ark. 2008) ve yoğunluk gradyanlı santrifüjlemenin (Pösel ve ark. 2012) kan hücrelerinin kaybına neden olduğu açıklanmıştır. Ancak mikroakışkan ayırma veya zenginleştirme sistemlerinde hücre kaybı minimum seviyededir (Huang ve ark. 2021). Bu nedenle mikroakışkan sistem ile izolasyon tekniğinin hücre kaybı üzerindeki etkisini inceledik. Buna göre, hücre kaybı MS'de, YGS'ye göre önemli ölçüde daha düşüktü ($p<0.0001$). YGS'nin neden olduğu hücre kaybı, ortalama %29,9±11,6 iken, mikroakışkan sistemde hücre kaybı ortalama %6,3±2,5 olarak belirlendi (Şekil 4-16). Bu bulgulara göre, önerdiğimiz mikroakışkan hücre ayırma sistemi, istenilen hücreleri heterojen bir süspansiyondan ayırmada, hedef hücreleri zenginleştirmede ve yüksek canlılık oranı nedeniyle de güvenli bir şekilde transplante edilmesine elverişli olduğu söylenebilir.

SONUÇ: Ataletsel kuvveti kullanan hücre ayırma tekniklerinde; hızlı akış hızının avantajları olduğu, mekanik stres ve hücre hasarı gibi diğer mikroakışkan cihazlarda meydana gelebilecek etkilerin azaltıldığı ve hücresel işlevlerin korunduğu vurgulanmaktadır. Optimum akış hızı altında, ataletsel kaldırma kuvveti ve dean sürükleme kuvveti arasındaki denge, mikro partiküllerin tek akışlı odaklanmasını kolaylaştırmaktadır. (Gao ve ark. 2019). Bu çalışmada, ataletsel bazlı Sunflower tasarımlı mikrokanal kullanılarak canlı mononükleer hücreleri (CD45+ hücreleri ve CD45+/CD34+ hücreleri) ve VSEL kök hücreleri (CD45-/CD34+/Rho $123^{sönük}$/SSEA-4+/CD133+) yüksek geri kazanım ve saflaştırma ile izole edebildik. Sunflower tasarımlı mikrokanalda Çıkış 3'te, farklı hematolojik ürünlerden elde edilen MNH'ler için ayırma verimliliğinin ortalama %97,52 ve saflık düzeyinin ortalama %84 olduğunu, Çıkış 2'de VSEL kök hücrelerin saflık düzeyi %15,76 olarak saptandı. Bu hücrelerin canlılık oranı %96'ya ulaştı ve bu sistemlerde hücrelerin kayıp oranı sadece %6 oldu. Ataletsel bazlı Sunflower tasarımlı mikrokanal ayırma tekniği; sürekli işleme, yüksek akış hızı (0,7 ml/dk), otomasyon için işlem prosedürlerini basitleştirme ve kanalda tıkanma sorunu

olmaması gibi avantajlara sahiptir. Ek olarak, bu teknik, bir akış sitometride MNH'lerin ve kök hücre alt grupların doğrudan analizi kolaylaştırabilir ve manipülasyon işlem sayısını azaltabilir. Ayrıca çalışmada VSEL kök hücre karakterizasyonunda kullandığımız rho 123, daha multipotent olan VSEL kök hücreleri tanımlamak için yararlı bir yöntem olabilir. Özetle bu tez çalışmasında kullandığımız, Prof. Dr. Levent Trabzon tarafından dizayn edilmiş ve patentlenen (US Patent 11,161,113 B2) mikroakışkan sistemin (Sunflower), MNH ve VSEL kök hücreler için yüksek verimlilik ve saflıkla elde edilmesini sağlayan biyo-uyumlu ve hızlı sonuç veren ucuz bir yöntem olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Al-Soud, W.A. ve Radstro, P.J. (2001). Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells, Clin. Microbiol, 39 (2), 485−493.
2. Almendros, I., Carreras, A., Montserrat, J.M., Gozal, D., Navajas, D. ve Farre, R. (2012). Potential role of adult stem cells in obstructive sleep apnea, Front Neurol., 3, 112.
3. Altinagac, E., Kizil, H. ve Trabzon, L. (2015). Biological particle manipulation: an example of Jurkat enrichment, Micro & Nano Letters, 10, 550-3.
4. Anand, S., Patel, H. ve Bhartiya, D. (2015). Chemoablated mouse seminiferous tubular cells enriched for very small embryonic-like stem cells undergo spontaneous spermatogenesis in vitro. Reprod Biol Endocrinol, 13, 33.
5. Annette, W.C. ve Lynda, J. (1985). Applications of Fluorochromes to Pollen Biology. (DAPI) As Vital Stains And For Quantitation Of Nuclear DNA I. Mıthramycın and 4',6-Diamidino-P-Phenylindole. Stain Technol., 60 (3),145-154.
6. Asmolov, ES. (1999). The inertial lift on a spherical particle in a plane poiseuille flow at large channel reynolds number , J. Fluid Mech., 381, 6387.
7. Barky, A.R.E., Ali, E.M.M. ve Mohamed, T.M. (2017). Stem cells, classifications and their clinical applications. American Journal of Pharmacology, 1 (1), 001-007.
8. Barriga, F., Ramirez, P., Wietstruck, A. ve Rojas, N. (2012). Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. Biol Res., 45, 307-316.
9. Berryman, D.E. ve List, E.O. (2017). Growth hormone's effect on adipose tissue: quality versus quantity. Int. J. Mol. Sci., 18, 1621.
10. Bertoncello, I., Hodgson, G. S. ve Bradley, T. R. (1985). Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells. I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine 123 fluorescence. Exp. Hematol., 13, 999–1006.
11. Bhagat, A.A.S., Kuntaegowdanahalli, S.S. ve Papautsky, I. (2008). Continuous particle separation in spiral microchannels using Dean flows and differential migration. Lab Chip, 8 (11), 1906–1914.
12. Bhartiya, D., Shaikh, A., Anand, S., Patel, H., Kapoor, S., Sriraman, K. ve ark. (2017). Endogenous, very small embryonic-like stem cells: critical review, therapeutic potential and a look ahead. Human Reproduction Update, 23(1), 41–76.

13. Bhartiya, D., Shaikh, A., Nagvenkar, P., Kasiviswananthan, S., Prasad., P., Pawani, H. ve ark. (2012). Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. Stem Cell and Development, 21 (1), 1-6.

14. Bibber, B., Sinha, G., Lobba, A.R., Greco, S.J. ve Rameshwar, P.A. (2013). Review of stem cell translation and potential confounds by cancer stem cells. Stem Cells Int, 241048, 1-8.

15. Bruun, K., Schermer, E., Sivendra, A., Valaik, E., Wise, RB., Said, R. ve ark. (2018). Therapeutic applications of adipose-derived stem cells in cardiovascular disease. Am J Stem Cells, 7 (4), 94-103.

16. Cadirci, S., Ince, D., Ghanem, I., Birol, S.Z., Trabzon, L. ve Turhan, H. (2018). Experimental and numerical investigation on particle-particle interaction of multi-particle separation in an alternating and repetitive microchannel. Microsystem Technologies, 25 (1), 307–31.

17. Caffiyar, M.Y., Eric Tatt Wei Ho, Ismail Hussain K. and Nor Hisham B. Hamid .(2017). Microfluidic platform for cell isolation and manipulation based on cell properties. Micromachines. 8 (15), 1-26.

18. Carvalho, J.M., Knabben de Souza, M., Buccheri, V., Rubens, C.V., Kerbauy, J. ve Rodrigues de Oliveira, JS. (2009). CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. Sao Paulo Med J.127 (1),12-8.

19. Cavaleri, F. ve Schöler, H. (2009). Molecular Basis of Pluripotency. In: Lanza R, editor. Essential of Stem Cell Biology. San Diago: Academic Press, 39-60.

20. Chen, Q., Wu, J., Zhuang, Q., Lin, X., Zhang, J. ve Lin, J-M., (2013). Microfluidic isolation of highly pure embryonic stem cells using feeder-separated co-culture system. Scientific, 3 (2433), 1-6.

21. Chen, Z.H., Lv, X., Dai, H., Liu, C., Lou, D., Chen, R. ve Zou, G.M. (2015). Hepatic regenerative potential of mouse bone marrow very small embryonic-like stem cells. J Cell Physiol, 230,1852–1861.

22. Chhabra P, Brayman KL. (2013). Stem cell therapy to cure type1 diabetes: from hype to hope. Stem Cells Transl Med., 2(5), 328-36.

23. Ciechanowicz, A.K., Sielatycka, K., Cymer, M., Skoda, M., Suszyńska, M., Bujko, K. ve ark (2021). Bone marrow-derived VSELs engraft as lung epithelial progenitor cells after bleomycin-induced lung injury. Cells, 10(7), 1570.

24. Çelik, D.D. 2014. Çeşitli Hematopoetik kaynaklardan çok küçük embriyonik (VSEL) kök hücrelerin elde edilmesi ve tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, 1-72.

25. Dagher, S., Hilal-Alnaqbi, A., Khashan, S. ve Alazzam, A. (2021). Magnetophoretic separation in microfluidic system. Pages, 47 (6), 1295-1300.

26. Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins, R.G. ve Toner, M. (2007). Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 104,18892–7.

27. Diogo, M.M., Silva, C.L. ve Cabral, J.M.S. Chapter 7: Separation technologies for stem cell bioprocessing. İçinde: Mohamed Al-Rubeai, Mariam Naciri, editors. Stem Cells and Cell Therapy. Dordrecht: Springer; 2014. p. 157-181.

28. Du, J., Chen, S., Shi, J., Zhu, X., Ying, H. ve Zhang, Y. (2017). The association between the lymphocyte-monocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis. Clin. Rheumatol, 36, 2689−2695.

29. Düven, G., Çetin, B., ve Kışla, D. (2018). Çip-Üstü-Laboratuvar (ÇÜL) teknolojisinin gıda mikrobiyolojisindeki uygulamaları. Akademik Gıda,16(1), 78-87.

30. Edessy, M., Hosni, H.N., Shady, Y., Waf, Y., Bakr, S. ve Kamel, M. (2016). Autologous stem cells therapy, the first baby of idiopathic premature ovarian failure. Acta Medica International, 3, 19–23.

31. Erdem-Kuruca, S., Celik, D.D, Demirel, G. ve Ozerkan, D. (2019). Characterization and isolation of very small embryonic-like (VSEL) stem cells obtained from human peripheral blood. Stem Cell Rev Rep., 15(5), 730-742.

32. Ertl, P., Sticker, D., Charwat, V., Kasper, C. ve Gunter, L. (2014). Lab-on-a-chip technologies for stem cell analysis. Trends in Biotechnology, 32 (5), 245-253.

33. Fattahi, Z. ve Hasanzadeh, M. (2022). Nanotechnology-assisted microfluidic systems for chemical sensing, biosensing, and bioanalysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 152,116637.

34. Fridley, B.L., Armasu, S.M., Cicek, M.S., Larson, M.C., Wang, C., Winham, S.J. ve ark. (2014). Methylation of leukocyte DNA and ovarian cancer: Relationships with disease status and outcome. BMC Med. Genomics, 7, 21–32.

35. Fung, WT., Beyzavi, A., Abgrall, P., Nguyen, NT. ve Li, HY. (2009). Microfluidic platform for controlling the differentiation of embryoid bodies. Lab Chip. 7, 9(17), 2591-5.

36. Gao, R., Cheng, L., Wang, S., Bi, X., Wang, X., Wang, R. ve ark. (2019). Efficient separation of tumor cells from untreated whole blood using a novel multistage hydrodynamic focusing microfluidics. Talanta, 120261, 1-8.

37. Genç, Y. (2015). Simulation of continous polystyrene partıcle manipulation with dielectrophoresis using Comsol. Istanbul Technical University, Institute of Science Engineering and Technology, Department of Nanoscience and Nanoengineering, Istanbul, p. 25-26.

38. Girlovanu, M., Susman, S., Soritau, O., Rus-Ciuca, D., Melincovici, C., Constantin, A.M. ve Mihu, CM. (2015). Stem cells-biological update and cell therapy progress. Clujul medical, 88 (3), 265.

39. Gossett, D.R. ve Di Carlo, D. (2009). Particle focusing mechanisms in curving confined flows, Anal Chem, 81(20), 8459–8465.

40. Gossett, D.R., Weaver, W.M., Mach, A.J., Hur, S.C., Tse, H.T.K., Lee, W. ve ark. (2010). Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. Anal. Bioanal. Chem., 397, 3249–3267.

41. Gou, Y., Jia, Y., Wang, P. ve Sun, C. (2018). Progress of inertial microfluidics in principle and application, Sensors (Basel), 18 (6),1762.

42. Gounari, E., Daniilidis, A., Tsagias, N., Michopoulou, A., Kouzi, K. ve Koliakos, G. (2019). Isolation of a novel embryonic stem cell cord blood-derived population with in vitro hematopoietic capacity in the presence of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy, 21(2), 246-259.

43. Guerin, C.L., Rossi, E., Saubamea, B., Cras, A., Mignon, V., Silvestre, J.S. ve ark (2017). Human very small embryonic-like cells support vascular maturation and therapeutic revascularization induced by endothelial progenitor cells. Stem Cell Rev Rep., 13(4), 552-560.

44. Guo, L., Feng, J., Fang, Z., Xu, J. ve Lu, X. (2015). Application of microfluidic ”lab-on-a-chip” for the detection of mycotoxins in foods. Trends in Food Science & Technology, 46, 252-263.

45. Gurkan, U.A., Anand, T., Tas, H., Elkan, D., Akay, A., Kelesa, H.O. ve Demir, U. (2011). Controlled viable release of selectively captured label-free cells in microchannels. Lab Chip, 11, 3979-3989.

46. Gwak, H., Kim, J., Kashefi-Kheyrabadi, L., Kwak, B., Kyung-A Hyun ve Hyo-Il Jung. (2018). Progress in circulating tumor cell research using microfluidic devices. Micromachines, 9 (7), 353.

47. Halasa, M., Baskiewicz-Masiuk, M., Dabrkomska, E. ve Machalinski, B. (2008). An efficient two-step method to purify very small embryonic-like (VSEL) stem cells from umbilical cord blood. Folia Histochemical Cytobiology, 46 (2), 239- 243.

48. He, Q., Li, J., Bettiol, E. ve Jaconi, M.E. (2003). Embryonic Stem Cells: New possible therapy for degenerative diseases that affect elderly people. Journal of Gerontology, 58A (3), 279–287.

49. Henrikson, R.C., Mazurkiewicz, J.E. ve Kaye, G.I. (1997). Histology. Lippincott Williams & Wilkins, 518 cilt. Albany, New York. p.143-151.

50. Herzog, E.L., Chai, L. ve Krause, D.S (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood, 102, 3483-3493.

51. Horobin, RW., Stockert, JC. ve Zhang, H. (2022). Reactive dyes for living cells: Applications, artefacts, and some comparisons with textile dyeing. Coloration Technology, 138:3–15.

52. Hoeve MA, De Sousa, PA, Willoughby NA. Chapter: 5. Challenges of scale-up of cell separation and purification techniques: 5.3.3.1. Centrifugal Counterflow Elutriation (CCE). In: Connon Che J, editor. Bioprocessing for Cell- Based Therapies. UK: John Wiley & Sons; 2017. p. 138-140.

53. Hosokawa, M., Kenmotsu, H., Koh, Y., Yoshino, T., Yoshikawa T. ve Naito, T. (2013). Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system. PloS One, 8 (6), 1-9.

54. Huang, C., Zhang, H., Han, S-I. ve Han, A. (2021). Cell washing and solution exchange in droplet microfluidic systems. Anal. Chem., 93, 8622−8630.

55. Huh, D., Bahng, J.H., Ling, Y., Wei, H.H., Kripfgans, O.D, Fowlkes, J.B., ve ark. (2007). Gravity-driven microfluidic particle sorting device with hydrodynamic separation amplification. Anal. Chem., 79, 1369–76.

56. Hur, S.C., Tse, H.T.K. ve Di Carlo, D. (2010). Sheathless inertial cell ordering for extreme throughput flow cytometry. Lab Chip. 10, 274–280.

57. Jamiołkowska-Sztabkowska, M., Grubczak, K., Starosz, A., Krętowska-Grunwald, A., Krętowska, M., Parfienowicz, Z. ve ark. (2022). Circulating hematopoietic (HSC) and Very-Small Embryonic like (VSEL) stem cells in newly diagnosed childhood diabetes type 1-novel parameters of beta cell destruction/regeneration balance and possible prognostic factors of future disease course. Stem Cell Rev Rep., 18(5), 1657-1667.

58. Jeon, H., Jundi, B. Choi, K., Ryu, H., Levy, B.D., Lim, G. ve ark. (2020). Fully-automated and field-deployable blood leukocyte separation platform using multidimensional double spiral (MDDS) inertial microfluidics. Lab Chip., 20, 3612–3624.

59. Johnson, L. V., Walsh, M. L., ve Chen, L. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 990–994.

60. Jones, R., Lebkowski, L. ve Mcniece, I. (2010). Stem cells. Biol Blood Marrow Transplatan, 16, 115-118.

61. Jundi, B., Ryu, H., Lee, D-H., Abdulnour, R.E., Engstrom, B.D., Duvall,M.G. ve ark. (2019). Leukocyte function assessed via serial microlitre sampling of peripheral blood from sepsis patients correlates with disease severity. Nature Biomedical Engineering, 3, 961–973.

62. Kassmer SH, Jin H, Zhang PX, Bruscia EM, Heydari K, Lee JH. ve ark. (2013). Very small embryonic-like stem cells from the murine bone marrow differentiate into epithelial cells of the lung. Stem Cells; 31, 2759–2766.

63. Kaufman, D.S. (2009). Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells, Blood, 114(17), 3513-3521.

64. Keong, C.K., Nadarajah, V.D. ve Lee T.J. (2007). Development of a purification method of pure primary lymphocytes for cell viability assays. Malays J Med Sci., 14 (1), 38-45. PMID: 22593650; PMCID: PMC3351216.

65. Kim, B., Choi, Y.J., Seo, H., Shin, E.U. ve Choi,S. (2016). Deterministic migration-based separation of white blood cells. Small, 12 (37), 5159 -5168.

66. Kim, G-Y., Han, J-I. ve Park, J-K. (2018). Inertial microfluidics-based cell sorting, BioChip Journal, 12 (4), 257–267.

67. Kim, Y., Jeong, J., Kang, H., Lim, J., Heo, J., Ratajczak, J. ve ark. (2014). The molecular nature of very small embryonic-like stem cells in adult tissues. International Journal of Stem Cells, 7 (2), 55-61.

68. Kotowski, M., Safranow. K., Kawa, M.P., Lewandowska, J., Kłos, P., Dziedziejko, V. ve ark. (2012). Circulating hematopoietic stem cell count is a valuable predictor of prematurity complications in preterm new borns. BMC Pediatr. , 12, 148.

69. Kucia, M., Reca, R., Campbell, F.R., Zuba-Surma, E., Majka, M., Ratajcsak, J. ve ark. (2006). A population of very embryonic-like (VSEL) CXCR4+ SSEA-1+ Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. Leukemia, 20, 857-869.

70. Kucia, M., Reca, R., Jala, V.R., Dawn, B., Ratajczak, J. ve Ratajczak, M.Z. (2005). Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. Leukemia, 19, 1118–1127.

71. Kucia, M., Wysoczynski, M., Wu, W., Zuba-Surma, E.K., Ratajczak, J. ve Ratajczak, M.Z. (2008). Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. Stem Cells, 26, 2083-2092.

72. Kung, Y.C. Niazibc, K.R. ve Chiou, P.Y. (2021). Tunnel dielectrophoresis for ultra-high precision size-based cell separation. Lab Chip., 21, 1049-1060.

73. Labedz-Maslowska, A., Kamycka, E., Bobis-Wozowicz, S., Madeja, Z. ve Zuba-Surma, E.K. (2016). Identification of new rat bone marrow-derived population of very small stem cell with oct-4a and nanog expression by flow cytometric platforms. Stem Cells Int., v2016, 5069857.

74. Lanfer, B., Seib, F.P., Freudenberg, U., Stamov, D., Bley, T., Bornhäuser, M. ve Werner, C. (2009). The growth and differentiation of mesenchymal stem and progenitor cells cultured on aligned collagen matrices. Biomaterials. 30 (30), 5950-8.

75. Lee, L.M., Rosano, J.M., Wang, Y., Klarmann, G.J. Garson, C.J., Prabhakarpandian, B., Pant, K., Alvarezcd, L.M. ve Laief, E. Label-free mesenchymal stem cell enrichment from bone marrow samples by inertial microfluidics. Anal. Methods, 2018, 10, 713.

76. Lee, W., Carlo, P. ve Tseng, D.D. (2016). Microtechnology for cell manipulation and sorting. Springer, p. 1-255.

77. Lenshof, A., Jamal, A., Dykes, J., Urbansky, A., Astrand-Grundström, I., Laurell, T., ve Scheding, S. (2014). Efficient purification of CD4+ lymphocytes from peripheral blood progenitor cell products using affinity bead acoustophoresis. Cytometry A 85, 933–941.

78. Leppik, L., Sielatycka, K., Henrich, D., Han, Z., Wang, H., Eischen-Loges, M.J. ve ark. (2020). Role of adult tissue-derived pluripotent stem cells in bone regeneration. Stem Cell Rev Rep., 16 (1), 198-211.

79. Lombodorj, B., Tseng, H.C., Chang, H.Y., Lu,Y.W., Tumurpurev, N. ve ark. (2020). High-throughput white blood cell (leukocyte) enrichment from whole blood using hydrodynamic and inertial forces. Micromachines, 11, 275.

80. Lopes, C., Cristóvão, J., Silvério, V., Lino, P.R. ve Fonte, P. (2022). Microfluidic production of mRNA-loaded lipid nanoparticles for vaccine applications. Expert Opinion on Drug Delivery, 19 (10), 1381-1395.

81. Lv, P., Tang, Z., Liang, X., Guo, M., ve Han, R.P.S. (2013). Spatially gradated segregation and recovery of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. Biomicrofluidics, 7 (3), 1-9.

82. Martel, J.M. ve Toner, M .(2014). Inertial focusing in microfluidics. Annual review of Biomedical Engineering, 16, 371-96.

83. Martens, A., Wistuba-Hamprecht, K., Yuan, J., Postow, M.A., Wong, P. ve Capone, M. (2018). Increases in absolute lymphocytes and circulating CD4+ and CD8+ T cells are associated with positive clinical outcome of melanoma patients treated with Ipilimumab. Clin. Cancer Res., 22, 4848−4858.

84. Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., ve Malka, G. (2019). Regenerative capacity of adipose derived stem cells (adscs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). Int J Mol Sci., 20(10), 2523.

85. Mitalipov, S. ve Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. Engineering of Stem Cells, 114, 185–199.

86. Mohameda, H., Murraya, M., Turner, J.N. ve Caggana, M., (2009). Isolation of tumor cells using size and deformation. Journal of Chromatography A, 1216, 8289–8295.

87. Monti, M., Imberti, B., Bianchi, N., Pezzotta, A., Morigi, M., Del Fante, C., ve ark. (2017). A Novel Method for isolation of pluripotent stem cells from human umbilical cord blood. Stem Cells Dev., 26 (17), 1258-1269.

88. Morrison, S.J. ve Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature, 441, 1068–1074.

89. Mundra, V., Gerling, I.C. ve Mahato, R.I. (2012). Mesenchymal stem cell-based therapy. Mol Pharm, 10, 77-89.

90. Müller-Sieburg C.E., Cho R.H., Thoman M., Adkins B., Sieburg H.B. (2002). Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood, 100, 1302-9.

91. Nam, J., Yoon, J., Kim, J., Jang, W.S. ve Lim, C.S. (2019). Continuous erythrocyte removal and leukocyte separation from whole blood based on viscoelastic cell focusing and the margination phenomenon. Journal of Chromatography A, 1-35.

92. Ng, A.P. Ve Alexander W.S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. Cell Death Discov., 3, 17002.

93. Okada, S. Nakauchi, H., Nagayoşi, K., Nishikawa, S-l., Miura, Y. ve Suda, T. (1992). In vivo and in vitro stem cell function of c-kit-and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. Blood, 80, 3044–50.

94. Oksak, N. ve Kuruca, D.S. (2021). Hematopoetik kök hücre izolasyonunda güncel yöntemler. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, J Ist Faculty Med., 84(3), 415-24.

95. Ookawara, S., Higashi, R., Street, D. and Ogawa, K. (2004). Feasibility study on concentration of slurry and classification of contained particles by microchannel. Chem. Eng. Sc., 101, 171-8.

96. Oyar, P. (2016). Dental kök hücre kaynakları ve kemik doku rejenerasyonunda kullanılma potansiyelleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 26 (15), 96-101.

97. Özbey, A., Karimzadehkhouei, M., Bayrak, O. ve Kosar, A. (2018). Inertial focusing of microparticles in curvilinear microchannels with different curvature angles. Microfluidics and Nanofluidics, 22:62, 1-16.

98. Özbey, A., Karimzadehkhouei, M., Kocaturk, NM., Erbil Bilir, S., Kutlu, Ö., Gozuacik, D., ve ark. (2019.) Inertial focusing of cancer cell lines in curvilinear microchannels. Micro and Nano Engineering, 2, 53–63.

99. Park, J.Y., Hwang, C.M. ve Lee, S.H. (2007). Gradient generation by an osmotic pump and the behavior of human mesenchymal stem cells under the fetal bovine serum concentration gradient. Lab Chip., 7(12), 1673-80.

100. Parte, S., Bhartiya, D., Patel, H., Daithankar, V., Chauhan, A., Zaveri, K. ve ark (2014). Dynamics associated with spontaneous differentiation of ovarian stem cells in vitro. Journal of Ovarian Research, 7, 25.

101. Perutelli, P., Catellani, S., Scarso, L., Cornaglia-Ferraris, P. ve Dini, G. (1999). Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. Vox Sanguinis, 76, 237-240.

102. Pethig, R., Menachery, A., Pells, S., ve De Sousa, P. (2010). Dielectrophoresis: a review of applications for stem cell research. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 182581.

103. Pierigè, F., Serafini, S., Rossi, L. M. ve Magnani, M. (2008). Cell-based drug delivery. Adv Drug Deliv Rev., 60(2), 286–295.

104. Plouffe, B.D. ve Murthy, S.K. (2014). Perspective on Microfluidic Cell Separation: A Solved Problem?, Anal. Chem., 86, 11481−11488.

105. Pösel, C., Möller, K., Fröhlich, W., Schulz, I., Boltze J, ve ark. (2012). Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. PLoS ONE 7(12), e50293.

106. Puneeth, S.B., Kulkarni, M.B. ve Goe l, S.(2021). Microfluidic viscometers for biochemical and biomedical applications: a review. Eng. Res. Express, 3 (2), 022003.

107. Prokhorova, T.A., Harkness, L.M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schroder, H.D., Burns, J.S. ve Kassem, M. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells ıs site dependent and enhanced by the presence of matrigel. Stem Cells And Development, 18 (1), 47-54.

108. Qiao, W., Wang, C., Ding, Z., Song, J, Wei, X. ve Lo, Y.H. (2016). A two-stage electrophoretic microfluidic device for nucleic acid collection and enrichment. Microfluid. Nanofluid. 20, 77.

109. Rahmanian, N., Bozorgmehr, M., Torabi, M., Akbari, A., ve Zarnani, A.H. (2017). Cell separation: Potentials and pitfalls. Prep Biochem Biotechnol, 47 (1), 38-51.

110. Ramachandraiah, H., Svahn, H.A. ve Russom, A. (2017). Inertial microfluidics combined with selective cell lysis for high throughput separation of nucleated cells from whole blood. RSC Adv., 7, 29505–29514.

111. Rajabzadeh, N., Fathi, E., ve Farahzadi, R. (2019). Stem cell-based regenerative medicine. stem cell investigation. Stem Cell Investig, 6,18.

112. Rajpoot, S. ve Tewari, G. (2018). Review Article Review on stem cells: basics classification and applications. international journal of pharmaceutical sciences. Review and Research, 49 (2), 48-52.

113. Ratajczak, M.Z., Pletcher, C.H., Marlicz, W., Machalinski, B., Moore, J., Wasik, M. ve ark. (1998). CD34+, kit+, rhodamine 123 (low) phenotype identifies a marrow cell population highly enriched for human hematopoietic stem cells. Leukemia, 12 (6), 942-50.

114. Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Shin, D., Ratajczak, J. ve Kucia, M. (2008). Very Small Embryonic-Like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity. Experimental Gerontology, 43, 1009-1017.

115. Rocha, V., Gluckman, E. ve Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Grup. (2006). Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 12, 34-41.

116. Roda, B., Lanzoni, G., Alviano, F., Zattoni, A., Costa, R., Di Carlo, A., ve ark. (2009). A novel stem cell tag-less sorting method. Stem Cell Rev and Rep., 5, 420–427.

117. Rossi, L., Challen, G.A., Sirin, O., Lin, K.K. ve Goodell, M.A.(2011). Hematopoietic stem cell characterization and isolation. Methods Mol Biol., 750,47-59.

118. Sada, T.S. (2022).The Potential of stem cells in regenerative medicine, diseases therapeutics and research. Cell Biology, 10 (1), 1-15.

119. Sakamoto, C., Yamaguchi, N., Yamada, M., Nagase, H., Seki, M. ve Nasu, M., (2007). Rapid quantification of bacterial cells in potable water using a simplified microfluidic device. Journal of Microbiological Methods, 68, 643-647.

120. Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 51, 1–28.

121. Sonmez, U., Jaber, S. ve Trabzon, L. (2017). Super-enhanced particle focusing in a novel microchannel geometry using inertial microfluidics. Journal of Micromechanics and Microengineering, 27 (6), 065003, 1-10.

122. Sovalat, H., Scrofani, M., Eidenschenk, A., Pasquet, S., Rimelen, V. ve Henon, P. (2011). Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34+/CD133+/CXCR4+/ Lin-CD45- cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. Experimental Hematology, 39, 495-505.

123. Suszynska, M., Poniewierska-Baran, A., Gunjal, P., Ratajczak, J., Marycz, K., Kakar, S.S. ve ark. (2014). Expression of the erythropoietin receptor by germline-derived cells - further support for a potential developmental link between the germline and hematopoiesis. Journal of Ovarian Research, 7, 66.

124. Taichman, R.S, Wang, Z., Shiozawa, Y., Jung, Y., Song, J., Balduino, A., ve ark. (2010). Prospective identification and skeletal localization of cells capable of multilineage differentiation in vivo. Stem Cells Dev; 19, 1557–1570.

125. Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126, 663-76.

126. Theron, M., Hesketh, R.L., Subramanian, S. ve Rayner, J.C. (2010). An adaptable twocolor flow cytometric assay to quantitate the invasion of erythrocytes by plasmodium falciparum parasites. Cytometry A, 77,1067–74

127. Thomas, T.E., Miller, C.L. ve Eaves, C.J. (1999) Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. Methods ,17(3), 202–218.

128. Trewhitt, K.G. (2001). Bone Marrow Aspiration and Biopsy: Collection and Interpretation. Oncol Nurs Forum, 28 (9), 1409-17.

129. TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. 1. Baskı, Ankara, TÜBA, 2009, p. 41.

130. Urbansky, A., Olm, F., Scheding, S., Laurell,T. ve Lenshof, A. (2019). Label-free separation of leukocyte subpopulations using high throughput multiplex acoustophoresis. Lab Chip., 19, 1406–1416.

131. van Beem, R.T., Hirsch, A., Lommerse, I.M., Zwaginga, J.J., Noort, W.A. ve ark. (2008). Recovery and functional activity of mononuclear bone marrow and peripheral blood cells after different cell isolation protocols used in clinical trials for cell therapy after acute myocardial infarction. Euro Intervention 4, 133–138.

132. Villa-Diaz, LG., Torisawa, YS., Uchida, T., Ding, J., Nogueira-de-Souza, NC., O'Shea, KS., ve ark. (2009). Microfluidic culture of single human embryonic stem cell colonies. Lab Chip. 21, 9 (12),1749-55.

133. Virant-Klun, I., Stimpfel, M., Cvjeticanin, B. Vrtacnik-Bokal, E. ve Skutella, T. (2013). Small SSEA-4-positive cells from human ovarian cell cultures: related to embryonic stem cells and germinal lineage?, J Ovarian Res., 6, 24.

134. Volarevic, V., Markovic, B.S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N. ve ark. (2018). Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. International Journal of Medical Sciences, 15(1), 36–45.

135. Walters, L. (2004). Human embryonic stem cell research: an intercultural perspective. Kennedy Institute of Ethics Journal, 14 (1), 3-38.

136. Warkiani, M.E., Tay, A.K.P., Guan, G. ve Han, J. (2015). Membrane-less microfiltration using inertial microfluidics. Sci. Rep., 5, 11018.

137. Wen-Ming, L., Li, L., Li, R., Jian-Chun, W., Qin, T., Xue-Qin, W. ve ark. (2012). Diversification of microfluidic chip for applications in cell based bioanalysis. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 40(1), 24-31.

138. Wesera, R., Winklera, A., Weihnacht, M., Menzela, S. ve Schmidt, H. (2020). The complexity of surface acoustic wave fields used for microfluidic applications. Ultrasonics, 106,106160.

139. Wojakowski, W., Tendera, M., Kucia, M., Zuba-Surma, E., Paczkowska, E., Ciosek, J. ve ark. (2009). Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol., 53 (1), 1-9.

140. Wu, L., Guan, G., Hou, H.W., Bhagat, A.A.S. ve Han. J. (2012). Separation of leukocytes from blood using spiral channel with trapezoid cross-section. Anal. Chem., 84, 9324–9331.

141. Yamada, M. ve Seki, M. (2005). Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. Lab Chip., 5, 1233–9.

142. Yamada, M., Nakashima, M. ve Seki, M. (2004). Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel, Anal. Chem., 76, 5465–7.

143. Yousuff, C.M., Wei-Ho, E.T., Ismail Hussain, K. ve Hamid, N.H.B. (2017). Microfluidic platform for cell isolation and manipulation based on cell properties. Micromachines, 8 (15), 1-26.

144. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. ve Rybak, z. (2019). Stem cells: past, present, and future. Stem Cell Res Ther 10, 68, 1-22.

145. Zhang, C.L., Huang, T., Wu, B.L., He, W.X. ve Liu, D. (2017). Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. Oncotarget ;8 (43), 75756-66.

146. Zhang, H., Chang, H., ve Neuzil, P. (2019). DEP-on-a-Chip: Dielectrophoresis applied to microfluidic platforms. Micromachines,10, 423.

147. Zhang, J. (2017). High-throughput separation of white blood cells from whole blood using inertial microfluidics. IEEE Transactions On Biomedical Circuits And Systems. 1-9.

148. Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., ve ark. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. Nat Med., 20, 1321–6.

149. Zhou, W., Kang, H.C., O'Grady O, Chambers, K.M., Dubbels, B., Melquist, P., ve ark. (2016). CellTraceTM far red & CellTrackerTM deep red – long term live. cell tracking for flow cytometry and fluorescence microscopy. J Biol Methods, 3:7.

150. Zhu, B. ve Murthy, S.K. (2014). Stem cell separation technologies. CurrOpin Chem Eng., 2 (1), 3-7.

151. Zhu, S., Wu, D., Han, Y., Wang, C., Xiang, N. ve Ni, Z. (2020). Inertial microfluidic cube for automatic and fast extraction of white blood cells from whole blood. Lab Chip., 20, 244– 52.

152. Zuba-Surma, E.K, Kucia, M., Dawn, B., Guo, Y., Ratajczak, M.Z. and Bolli, R. (2008). Bone marrow-derived pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs) are mobilized after acute myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. 44, 865–873.

153. Zuba-Surma, E.K., Kucia, M., Ratajczak, J. ve Patajczak, M.Z. (2009). Small stem cells in adult tissues: Very small embryonic-like stem cells (VSELs), Stand up. Cytometry, 75 (1), 4-13.

154. Zuba-Surma, E.K., Wojakowski, W., Ratajczak, M.Z. ve Dawn, B. (2011). Very Small Embryonic-Like Stem Cells: Biology and therapeutic potential for heart repair. Antioxidants & Redox Signaling. 15 (7), 1821-34.

HAM VERILER

FORMLAR

VERİ FORMU

Bu çalışmada **'Mikrofluidik Sistemlerde Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu''** araştırılacaktır.

Belirtilen konu hakkındaki bilgilerinizi veri formu aracılığı ile çalışmamıza aktarırsanız seviniriz. Vereceğiniz bilgiler kesinlikle gizli tutulacak ve sadece çalışmamızda veri olarak kullanılacaktır. Gösterdiğiniz özen ve ayırdığınız zaman için teşekkür ederim.

Araştırmacı

Nilgün OKŞAK

1. **Yaşınız:……..**
2. **Vücut ağırlığınız (kg)**:……
3. **Boy uzunluğunuz (cm)**:……
4. **BKİ**:…….
5. **Cinsiyetiniz:** 1) Kadın 2) Erkek
6. **Medeni Durumunuz** 1) Bekar 2) Evli 3) Dul/Boşanmış
7. **Kan gurubunuz:** 1) ORh- 2) ORh+ 3) ARh- 4) ARh+ 5) BRh- 6) BRh+ 7) (AB)Rh - 8) (AB)Rh+
8. **Eğitim Durumunuz:**
   1) Okur-yazar değil 2) Okur-yazar 3) İlkokul 4) Ortaokul 5) Lise 6) Lisans 7) Lisansüstü
9. **Mesleğiniz:** 1) Çalışmıyorum 2) Çalışıyorum (Mesleğinizi yazınız):……
10. **Sigara içiyor musunuz?**
    1) Evet 2)Hayır
11. **Madde (Uyuşturucu, alkol v.s.) kullanıyor musunuz?**
    1) Evet 2)Hayır
12. **Kronik hastalığınız (Şeker Hastalığı, Yüksek Tansiyon, Kalp Yetmezliği, Böbrek Yetmezliği vs.) var mı?**
    1) Evet 2)Hayır
13. **Herhangi bir kan hastalığınız (Lösemi, kansızlık, kemik iliği yetmezliği vs) var mı?**
    1) Evet 2)Hayır
14. **Herhangi bir enfeksiyonel hastalığınız (Hepatit, Sifilis (frengi), AIDS, Zatüre vs.) var mı?**
    1) Evet 2)Hayır
15. **Herhangi bir allerjiniz (ilaç, besin, lateks vs.) var mı?**
    1) Evet (Belirtiniz):…… 2)Hayır
16. **Kan bağışında bulunuyor musunuz?**
    1) Evet (ise 15. soruyu cevaplayınız) 2)Hayır
17. **Yılda kaç kez kan bağışında bulunuyorsunuz?**
    1) 1 kez/yıl 2) 2 kez/yıl 3) 3 kez/yıl 4) 4 kez/ yıl

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Sayın Bay/Bayan,

Size İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmekte olan "**Mikrofluidik Sistemlerde Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu**" adlı araştırmamız hakkında bilgi vermek üzere ulaşmış durumdayız ve sizi bu araştırmaya davet etmek istiyorum. Bu kararı bugün vermek zorunda değilsiniz. Karar vermeden önce kendinizi rahat hissettiğiniz kişilerle araştırma hakkında görüşebilirsiniz.

Bilgilendirme sırasında anlamakta zorlandığınız sözcükler olduğunda lütfen açıklama yapabilmem için beni durdurun. Daha sonra başka sorularınız olduğunda bana, araştırmada görevli hekime ya da görevlilere de sorabilirsiniz.

Kan ürünleri, kan hastalıkları (talasemi, lösemi, lenfoma vs.), şeker hastalığı, kalp, eklem ve sinir sistemi hastalıkları ile diğer kanser türlerinin tedavisinde tercih edilen kök hücre kaynağıdır. Sizden alacağımız numune yapacağımız kök hücre araştırmasında kullanılacaktır. Kök hücreler günümüzde tedavisi olmayan hastalıklara karşı yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesinde, var olan tedavilerin verimini arttırmada büyük öneme sahiptir. Yetişkinlerde kök hücrelerin varlığı birçok dokuda kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamız, kan dokusunda var olduğu düşünülen ve embriyonik benzeri olan kök hücreleri izole etmeyi amaçlamaktadır.

Size öncelikle yaş, boy, vücut ağırlığı ve hastalık olup olmadığına dair birkaç soru sorulacak ardından sizden uygun teknikle 10ml'lik kan alınacak ve ekstra bir işlem yapılmayacaktır. Dolayısıyla araştırma nedeniyle size herhangi bir zarar verilmeyecek ve herhangi ilaç ya da madde kullanılmayacaktır. Bu araştırmadaki bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır. Sizden araştırma esnasında ya da neticesinde herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız durumunda size ek bir ücret de verilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmayı kabul etmeyebilir ya da daha sonradan katılmaktan vazgeçebilirsiniz.

Bu metni tam olarak okuyup anladığınıza ve çalışmada gönüllü olarak yer almayı kabul ettiğinize dair aşağıdaki boş yerleri lütfen doldurunuz.

Bu araştırmada yer almanızdan ötürü teşekkür eder, size sağlıklı bir yaşam dileriz.

Sorumlu Araştırmacının Adı Soyadı: Prof. Dr. Serap Erdem Kuruca
Kuruluş Adı: İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD.
Destekleyici Kuruluş: İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarih:…../…../……..
İmza:

Sayın Nilgün Okşak tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam araştırmacı ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Nilgün Okşak'ı, aşağıda belirtilen telefon numarasından ve adresten ulaşacağımı biliyorum.

GSM: 05412905062 Adres: İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji ABD.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün /Katılımcının
Adı-soyadı:
Telefonu:
Adresi:
Tarih (Gün/ay/yıl):
İmzası:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin
Adı-soyadı:
Telefonu:
Adres:
İmzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının
Adı-soyadı:
Telefon:
Adres:
İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin
Adı-soyadı:
Görevi:
Telefon:
Adres:
İmzası:

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİKROFLUİDİK SİSTEMLERDE HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%11	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%4
3	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
8	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1
	Submitted to Ankara University	