T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

ÇOK KANALLI MİKROAKIŞKAN ÇİP SİSTEMİNDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN EKİMİ VE YAŞAMSAL TAKİBİ

GASIM RUSTAMLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2026

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

ÇOK KANALLI MİKROAKIŞKAN ÇİP SİSTEMİNDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN EKİMİ VE YAŞAMSAL TAKİBİ

GASIM RUSTAMLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2026

Proje No: ESOGÜ BAP TYL -2025-3450, TUBİTAK 1004-20AG031

ÖZET

Başlık: Çok kanallı mikroakışkan çip sisteminde mezenkimal kök hücrelerin ekimi ve yaşamsal takibi

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, çok kanallı mikroakışkan çip sisteminde insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) ekimi ve yaşamsal takibinin gerçekleştirilmesidir.

Yöntem: Bu çalışmada insan adipoz dokusundan MKH'ler izole edilmiş, kültüre alınmış ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Mikroakışkan çip sisteminde ekilen hücrelerin yaşamsal durumları mikroskopik görüntüleme yöntemleri ile takip edildi; canlı/ölü boyama ve dapi/phalloidin boyama analizleri yapıldı.

Bulgular: Çok kanallı mikroakışkan çip sisteminde iAD-MKH'lerin hem mikrostatik hem de mikroakışkan kültür koşullarında başarılı bir şekilde kültüre edilebildiği gösterildi. Hücrelerin mikroakışkan çip içerisinde hidrojel matriksi içinde canlılığını ve morfolojik bütünlüğünü koruduğu canlı/ölü boyama analizleri ile doğrulanmış; mikroakışkan kültür koşullarında hücre canlılığının mikrostatik kültüre kıyasla nispeten yüksek olduğu belirlendi. DAPI ve Phalloidin boyamaları, hücre çekirdeklerinin düzenli dağılım gösterdiğini ve aktin sitoskeletonunun iyi organize olmuş filamentöz bir yapı sergilediğini göstermiştir.

Sonuç: Bu çalışma kapsamında geliştirilen çok kanallı mikroakışkan çip sistemi, hücre modeli olarak kullanılan iAD-MKH'lerin üç boyutlu mikroçevrede kültürü için uygun bir platform sunmuştur. Elde edilen sonuçlar, mikroakışkan kültür koşullarının hücre canlılığını ve morfolojik bütünlüğü koruduğunu ve mikrostatik kültüre kıyasla daha elverişli bir ortam sağladığını gösterdi. Canlı/ölü, DAPI ve Phalloidin boyama analizleri, hücrelerin çip içerisinde başarılı olduğunu gösterdi. Bu bulgular, geliştirilen çok kanallı mikroakışkan çip sisteminin kök hücre temelli in vitro çalışmalar başta olmak üzere farklı hücreler ve farklı kanallarda hücre ekiminin yapılabileceği ve ileri biyomedikal uygulamalar için kullanılabilir bir model olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücreler, Adipoz doku, Çok kanallı mikroakışkan çip, Mikroakışkan kültür.

ABSTRACT

Title: Seeding and viability monitoring of mesenchymal stem cells in a multi-channel microfluidic chip system

Objective: The aim of this thesis is to perform seeding and vital follow-up of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (iAD-MKHs) in a multi-channel microfluidic chip system.

Methods: In this study, MKHs were isolated from human adipose tissue, cultured, and characterised. The viability of the cells seeded in the microfluidic chip system was monitored using microscopic imaging methods; live/dead staining and DAPI/phalloidin staining analyses were performed.

Results: It has been demonstrated that iAD-MKHs can be successfully cultured in both static and microfluidic culture conditions within a multi-channel microfluidic chip system. Live/dead staining analyses confirmed that the cells maintained their viability and morphological integrity within the hydrogel matrix in the microfluidic chip; cell viability was found to be higher under microfluidic culture conditions compared to static culture. DAPI and Phalloidin staining revealed that the cell nuclei were evenly distributed and the actin cytoskeleton exhibited a well-organised filamentous structure.

Conclusion: The multi-channel microfluidic chip system developed within the scope of this study provided a suitable platform for the culture of iAD-MKH cells, used as cell models, in a three-dimensional microenvironment. The results showed that microfluidic culture conditions preserved cell viability and morphological integrity and provided a more favorable environment compared to static culture. Live/dead, DAPI, and Phalloidin staining analyses demonstrated the successful growth of cells within the chip. These findings demonstrate that the developed multi-channel microfluidic chip system is a usable model for advanced biomedical applications, particularly in stem cell-based in vitro studies, and allows for cell culture in different cells and channels.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Multichannel microfluidic chip, Microfluidic culture.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI .....
ETİK BEYAN.....
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIMI BEYAN FORMU……..
TEŞEKKÜR.....
ÖZET.....i
ABSTRACT ii
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Mikroakışkan Teknoloji ve Çip Üzerinde Organ Sistemleri..... 3
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve Temel Özellikleri 4
2.2.1. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler 5
2.3. Mikroakışkan Çiplerde Hücre Kültürü Uygulamaları 7
2.4. Polidimetilsiloksan (PDMS) ve Biyomedikal Uygulamaları..... 11
2.5. Hidrojellerin Hücre Kültüründe Kullanımı..... 13
2.5.1. Hücre kültüründe kullanılan bazal membran ekstresi (BME) hidrojeli 15
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....17
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 17
3.2. Kullanılan Cihazlar 18
3.3. Deney Protokolü 19
3.3.1. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çözülmesi, kültürü, flow immunofenotipik karakterizasyonu ve çoğaltılması . 20
3.3.2. iAD-MKH'lerin immunofenotipik karakterizasyonu..... 21
3.4. Mikroakışkan Çipin Tasarımı ve Üretimi 22
3.4.1. Fotolitografi süreci 22
3.4.2. PDMS Karışımının hazırlanması ve kürlenmesi 23
3.4.3. PDMS–cam yüzey bağlama (plazma bonding) prosedürü 23

3.5. Hidrojel Hazırlığı 24
3.6. Hücre-Hidrojel Karışımının Hazırlanması ve Çipe Enjeksiyonu 24
3.7. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (Canlı/Ölü Boyama) 25
3.8. Phalloidin ve DAPI Boyama Analizi 26
4. BULGULAR 28
4.1. Mikroakışkan Çipin Tasarım ve Üretimi 28
4.1.1. Mikroakışkan çipin autocad uygulamasından çizimi 28
4.1.2. Fotolitografi yöntemi ile SU-8 mikrokanal kalıbının üretilmesi 29
4.1.3. PDMS–cam bağlama (bonding) sonrası mikroakışkan çip görünümü 30
4.2. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (iAD-MKH) Akış Sitometrisi ile Karakterizasyon Sonuçları 31
4.3. Mikroakışkan Çiplerde Sızdırmazlık Testi Sonuçları 32
4.4. Hidrojel–iAD-MKH Karışımının Kontrol Kültürü Sonuçları 33
4.5. Statik Mikro Kanal Kültür Koşullarında İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Zamana Bağlı Morfolojik ve Analizi 34
4.6. Statik Mikro Kanal Kültür Koşullarında Hücre Canlılığına Ait Canlı/Ölü Boyama Sonuçları 35
4.7. Statik Mikro Kanal Kültür Koşullarında DAPI ve Phalloidin Boyama Analizi 37
4.8. Mikroakışkan Kültür Koşullarında İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Zamana Bağlı Morfolojik Analizi 39
4.9. Mikroakışkan Kültür Koşullarında Hücre Canlılığına Ait Canlı/Ölü Boyama Sonuçları 40
4.10. Mikroakışkan Kültür Koşullarında DAPI ve Phalloidin Boyama Analizi. 42
4.11. Mikrostatik ve Mikroakışkan Kültür Koşullarının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi 43
5. TARTIŞMA 46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 50
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 51
8. EKLER DİZİNİ 57
EK-1. Etik Kurul Kararı
EK- 2. Turnitın Raporu

9. ÖZGEÇMİŞ 60
10.YAYINLAMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI 56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.İnterstisyel akış yönünün tersine çevrilmesine yanıt olarak oluşan anjiyojenik filizlenmenin zaman atlamalı izlemesi. Görüntüler, deneyin başlamasından 60, 84 ve 108 saat sonra çekilmiştir (Kim. S vd 2016). 10

Şekil 2. 2. Mikroakışkan çip sisteminde interstisyel akışın anjiyogenez üzerindeki etkisinin şematik ve deneysel gösterimi. a) Mikroakışkan çipin genel tasarımı, b) çok kanallı mikroakışkan sistemi fibroblast ve endotel iyileştirme ko-kültürü ile mikrovasküler ağ oluşumu ve anjiyojenik tomurcuklanmanın zamana bağlı gelişimi şematik gösterimi, c) arklı zaman noktalarında (0., 2., 3. ve 4. günler) mikrovasküler ağ oluşumunun floresans mikroskop görüntüleri (Kim. S vd 2016). 10

Şekil 2.3. Mikroakışkan çip üretiminde kullanılan Sylgard® 184 polidimetilsiloksan (PDMS) elastomerinin kimyasal yapısının şematik gösterimi. 11

Şekil 3. 1. Çalışmanın grafiksel özeti. iAD-MKH izolasyonu, çoğaltılması ve karakterizasyonu sonrası hidrojel içerisinde hazırlanarak çok kanallı mikroakışkan çip sistemine ekilmesini gösteren deneysel iş akışı. Hücreler, mikroakışkan çiplerde 37 °C ve %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmiş; canlı/ölü ve floresan mikroskopi analizleri ile hücre canlılığı, yayılımı ve morfolojik özellikleri değerlendirilmiştir. 21

Şekil 4. 1. AutoCAD yazılımı kullanılarak oluşturulan mikroakışkan çip tasarımının şematik gösterimi. **a)** 1–6 numaralı kanallar, besiyeri giriş ve çıkış hatlarını; 7–10 numaralı kanallar ise hücre–hidrojel karışımının enjekte edildiği akış hatlarını ifade etmektedir. **b)** Mikroakışkan kanalların boyutsal özellikleri ve geometrik ölçümleri ayrıntılı olarak gösterilmiştir (µm). 29

Şekil 4. 3. Çok kanallı mikroakışkan çipin PDMS tabakasının cam lam üzerine bağlanması (bonding) sonrası elde edilen nihai görünümü. Ölçek çubuğu: 1 cm. 31

Şekil 4. 4. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin akış sitometrik karakterizasyonu. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir. 32

Şekil 4. 5. Mikroçipe enjekte edilen jel testi. Test kapsamında, kullanılan BME Cultrex jel içerisine mavi gıda boyası eklenerek çip kanallarına verilmiştir. Çip, 1 gün süreyle inkübatörde bekletildikten sonra 5× büyütmede mikroskop altında görüntülenmiştir. Kanallarda herhangi bir sızıntı veya yayılma gözlenmediği doğrulanmıştır. (a–d) mikroakışkan çipin farklı kanallarına ait görüntüleri göstermektedir, (e) çipin üstten görünümüdür. 33

Şekil 4. 6. Statik kültür koşullarında, farklı zaman noktalarında (0., 1. ve 4. günler) çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde Cultrex hidrojel matriksi içerisinde kültüre edilen iAD-MKH mikroskobik görüntüleri. Hücreler, üç boyutlu bir kültür ortamı oluşturmak amacıyla Cultrex bazlı hidrojel içerisine gömülmüş ve mikroakışkan çipin her bir ana kanalına (a–d) eşit hacimlerde eklenmiştir. Ortadaki şematik tasarım, dört ana kanalın (a–d) konumlandığı mikroakışkan çip geometrisini ve statik kültür koşullarındaki kanal düzenini göstermektedir. 35

Şekil 4. 7. Statik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) 4. gündeki canlı/ölü boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri (5× büyütme). (a), (b), (c) ve (d) panelleri mikroakışkan çipin farklı kanallarına ait görüntüleri göstermektedir**.** Canlı hücreler Calcein-AM ile yeşil floresan, ölü hücreler ise Propidium Iodide (PI) ile kırmızı floresan sinyal vermektedir. e) Mikroakışkan çipin 1., 2., 3. ve 4. kanallarında hücre canlılık oranlarının (%) karşılaştırmalı analizi. 36

Şekil 4. 8. Statik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH 4. günde gerçekleştirilen Phalloidin ve DAPI boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri. (a, d, g, j) Phalloidin ile boyanmış aktin sitoskeleton görüntüleri (yeşil), (b, e, h, k) DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi) ve (c, f, i, l) birleştirilmiş (merge) görüntüleri göstermektedir. Görüntüler mikroakışkan çipin dört farklı kanalından elde edilmiştir. m) hücrelerin bir mikrokanalda kapladığı alan yüzdesini (kanal doluluk oranı) göstermektedir. Ölçek çubuğu: 100 µm. 38

Şekil 4. 9. Mikroakışkan kültür koşullarında, farklı zaman noktalarında (0., 1. ve 4. günler) çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde Cultrex hidrojel matriksi içerisinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) mikroskobik görüntüleri. Hücreler, üç boyutlu bir kültür ortamı oluşturmak amacıyla Cultrex bazlı hidrojel içerisine gömülmüş ve mikroakışkan çipin her bir ana kanalına (a–d) eşit hacimlerde eklenmiştir. Ortadaki şematik tasarım, dört ana kanalın (a–d) konumlandığı mikroakışkan çip geometrisini ve statik kültür koşullarındaki kanal düzenini göstermektedir. 39

Şekil 4. 10. Mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) 4. günde canlı/ölü (Live/Dead) boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri (5× büyütme). Canlı hücreler Calcein-AM ile yeşil floresan, ölü hücreler ise Propidium Iodide (PI) ile kırmızı floresan sinyal vermektedir. (a–d) Mikroakışkan çipin farklı kanallarından elde edilen görüntüleri göstermektedir. e) Mikroakışkan çipin 1., 2., 3. ve 4. kanallarında hücre canlılık oranlarının (%) karşılaştırmalı analizi. 41

Şekil 4. 11. Mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) 4. günde gerçekleştirilen Phalloidin ve DAPI boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri. (a, d, g, j) Phalloidin ile boyanmış aktin sitoskeleton görüntüleri (yeşil), (b, e, h, k) DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi) ve (c, f, i, l) birleştirilmiş (merge) görüntüleri göstermektedir. Görüntüler mikroakışkan çipin dört farklı kanalından elde edilmiştir. m) hücrelerin bir mikrokanalda kapladığı alan yüzdesini (kanal doluluk oranı) göstermektedir. Ölçek çubuğu: 100 µm. 43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MKH	: Mezenkimal kök hücre
iAD-MKH	: İnsan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre
PDMS	: Polidimetilsiloksan
AT	: Adipoz doku
Atvis	: Viseral yağ dokusu
Atsub	: Deri altı yağ dokusu
2B	: İki boyutlu
3B	: Üç boyutlu
PVA	:Polivinil alkol
PEG	:Polietilen glikol
HA	: Hiyalüronik asit
BME	: Bazal Membran Ekstresi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), kendini yenileme kapasitesine sahip, osteojenik, kondrojenik, adipojenik mezodermal soy hücrelerine ve diğer ektodermal soy hücrelerine farklılaşabilen, plastik yüzeye yapışma özelliği olan günümüzde yaygın olarak araştırılan bir hücre popülasyonudur (Li, Z vd., 2019). MKH'ler bunun yanı sıra düşük immünojenisite ve güçlü immünomodülasyon potansiyeline sahiptir. MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu, dermal doku, omurlar arası disk, amniyotik sıvı, çeşitli diş dokuları, insan plasentası ve göbek kordonu kanı gibi birçok dokudan izole edilebilir. MKH'ler doku homeostazının korunmasında ve rejeneratif tıpta potansiyel uygulama imkanlarına sahiptir. Bu hücrelerin, kıkırdak ve kemik onarımı, cilt yarası iyileşmesi, nöronal rejenerasyon, kalp rejenerasyonu ve greft-karşı konak hastalığı tedavisi de dahil olmak üzere bağışıklık sistemi bozuklukları tedavisi gibi klinik uygulamalarda kullanımı araştırılmaktadır. Ancak, farklı dokulardan elde edilen MKH'lerin doğal özellikleri ve işlevleri heterojendir (Liu vd., 2022)).

Yağ dokusundan izole edilen kök hücreler (iAD-MKH'ler) minimal invaziv yöntemlerle elde edilebilmesi, yüksek hücre izolasyon verimi sağlaması ve geniş farklılaşma kapasitesine sahip olması nedeniyle klinik araştırmalarda tercih edilmektedir. Ektodermik ve endodermik germinal katmanlara farklılaşmalarıyla, rejeneratif tıpta doku mühendisliği stratejilerinin geliştirilmesinde potansiyel bir avantaj sağlamaktadırlar (Si, Z vd., 2019 ; Mazini, L vd., 2019).

Milimetrik ölçülerin altında, mikro (μ) ve nano (n) hacim ve boyutlarda, yüzey kuvvetlerinin hakimiyetinde akışkanların davranışlarını ve bu davranışların hassas bir şekilde kontrolünü ifade eden mikroakışkan sistemler, hücresel mikro ortamları hassas bir şekilde kontrol etmek için güçlü bir araca dönüşmüştür. Sıvıları mikrometre ölçeğinde manipüle etme yeteneği, doku ve organların fizyolojik koşullarını taklit eden karmaşık sistemlerin oluşturulmasına olanak tanır. Bu teknoloji, kök hücre davranışının daha derinlemesine anlaşılmasını kolaylaştırarak rejeneratif tıp yaklaşımlarında önemli bir yer almaktadır (Torkay, G. ve Bal Öztürk, 2024; Rajalekshmi, 2025).

Mikroakışkan teknolojisi, ilaç keşfi, gıda teknolojisi, elektroforez, PCR, kimyasal sentez, proteomik, doku mühendisliği, tıbbi teşhis, tek hücre çalışmaları ve mikrodizi sistemleri gibi çoğu alanda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir.

Mikroakışkan cihazlar, aynı anda deneyin maliyetini düşüren az miktarda örnek ve reaktif tüketme, yüksek verim ve doğru sonuçlar üretme kapasitesiyle yüksek biyomedikal analiz ve teşhis potansiyeline sahiptir (Upadhyaya ve Selvaganapathy vd., 2010). Biyomedikal bilimler alanında, bu çipler esas olarak patojenlerin teşhisi, kanser taraması, kardiyovasküler olayların izlenmesi, ölümcül kan enfeksiyonlarının tespiti, genetik analizler, vb. için kullanılır (Pattanayak vd., 2021).

Günümüzde mikroakışkan teknolojisi hücre kültürü, hastalık teşhisi, tek hücre analizi, ilaç taraması, metabonomik, proteomik, doku mühendisliği ve diğer biyolojik uygulamalar gibi çok sayıda alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroakışkan teknolojilerinin kök hücre ve analiz yöntemleriyle birleştirilmesi, kök hücre tedavisinin geniş pratik uygulamaları için olanak sağlamaktadır. Şimdi kök hücre ayırma, desen oluşturma, kültür, farklılaştırma, doku mühendisliği, organ rekonstrüksiyonu ve klinik terapiler gibi kök hücre araştırmaları için mikroakışkan cihazların uygulanmasına odaklanan daha fazla araştırma çabası bulunmaktadır (Zhang, J vd., 2017). Son yıllarda, doku ve organ düzeyindeki fizyolojik süreçleri taklit etmek üzere tasarlanan ve canlı hücrelerin sürekli perfüze edilen mikroakışkan odacıklarda kültürlenmesine dayanan çip üzerinde organ, 'organ-on-a-chip', konsepti, biyomedikal araştırmalarda önemli bir model sistem olarak giderek daha fazla ilgi görmektedir. Mikroakışkan teknolojilerindeki ilerlemeler, bir mikroçip üzerinde organ modeli oluşturmanın yanı sıra, farklı organ modellerini birbirine bağlayarak çoklu organ sistemleri oluşturmayı da mümkün kılarken, kök hücreden türetilen spesifik organ hücreleri, insan birincil hücreleri için mükemmel alternatifler olabilir (Wysoczański vd., 2024).

Bu tez çalısmasının amacı, özellikle son zamanlarda önemi hızla artan çok kanalli mikroakıskan sisteminde çip üzerinde organ çalışmalarına katkı sunmak amacı ile insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) model hücre olarak kullanılarak ekimi ve yaşamsal takibinin gerçekleştirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroakışkan Teknoloji ve Çip Üzerinde Organ Sistemleri

Mikroakışkan küçük (10^{-6} ila 10^{-9} litre) hacimlerdeki sıvıları, mikrometre boyutundaki kanallar kullanarak işleyen veya yöneten sistemlerin bilimi ve teknolojisidir. Bu işlem, onlarca mikrometre boyutlarındaki kanallar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Mikroakışkan teknolojilerinin ilk uygulamaları analiz alanında olmuştur. Bu teknolojiler, çok küçük miktarlarda örnek ve reaktif kullanabilme, yüksek çözünürlük ve hassasiyetle ayırma ve tespit işlemleri yapabilme, düşük maliyet, kısa analiz süreleri ve küçük boyutlu analitik cihazlar geliştirme gibi birçok avantaj sunmaktadır (Whitesides, 2006)).

Mikroakışkan teknolojilerinin büyük avantajları olsa da, depolama, uygun kullanım ve testlerin kalite kontrolü hala karşılanmamış zorluklardır. Örneğin, ışık, nem ve sıcaklık gibi dış etkenler bu testlerin performansını potansiyel olarak engeller ve bu nedenle, eğitimli ve deneyimli personel tarafından gerçekleştirilen düzenli kalibrasyonlar, teknik servis ve bakım yoluyla kapsamlı bir şekilde kontrol edilmeleri gerekir; bu da potansiyel olarak maliyetlerini ve karmaşıklıklarını artırır ve ayrıca kaynak kısıtlı ortamlarda kullanımlarını sınırlar (Akceoglu vd., 2021).

Mikroakışkan cihazlar için, endüstriyel seri üretim veya araştırma laboratuvarları için hızlı prototipleme gibi nihai hedeflere bağlı olarak farklı avantajlara sahip birden fazla üretim yöntemi mevcuttur (Sollier vd., 2011).

Yumuşak litografi, biyomedikal mikroakışkan cihazların üretiminde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, elastomerik polimerlerin işlenmesine ve polidimetilsiloksan (PDMS) tabanlı yapılar aracılığıyla yüzeylerin desenlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Yumuşak litografi yöntemi; sert bir ana kalıbın hazırlanması, sıvı polimerin kalıba dökülmesi, ısıl kürleme yoluyla sertleştirilmesi ve ardından polimerin kalıptan ayrılması adımlarını içermektedir. Bu yöntemin başlıca avantajları arasında; yüksek çözünürlüklü kopyaların elde edilebilmesi, geleneksel fotolitografi yöntemine kıyasla daha düşük maliyet ve daha hızlı üretim süreci, çok katmanlı yapılar oluşturularak karmaşık üç boyutlu akış ve basınç kontrollü hatların üretilebilmesi ile yüksek esneklik ve optik geçirgenlik özelliklerine sahip tasarımlar geliştirme imkânı yer almaktadır. Ancak yöntemin bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Özellikle kullanılan malzemelerin yumuşak olması

nedeniyle, döküm kalıptan çıkarma sırasında desen deformasyonu meydana gelebilmektedir. Ayrıca, yumuşak litografi yarı temiz oda koşulları gerektiren bir süreçtir ve sert kalıbın üretilmesi için maliyetli fotolitografi tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır (Niculescu vd., 2021).

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler ve Temel Özellikleri

Kök hücrelerin iki temel özelliği vardır: Farklı hücre soylarına farklılaşabilme yeteneği ve kendini yenileyebilme kapasitesi. İki ana kök hücre tipi tanımlanmıştır: embriyonik kök hücreler (EKH) ve erişkin kök hücreler. EKH'ler, blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir ve tümör oluşumu ile ilişkilidir. İnsan EKH'lerinin kullanımı yasal ve etik açıdan çeşitli tartışmaları beraberinde getirmektedir. Bu sorunlar erişkin kök hücrelerde daha az belirgindir. Erişkin kök hücreler, çok yönlü farklılaşma potansiyeline (multipotensi) sahiptir ve bu özellikleri onları klinik uygulamalar için cazip bir seçenek haline getirmektedir (Ding vd., 2011).

MKH'lerin multipotensisi ilk olarak kemik iliği stromasından elde edilen hücrelerde tanımlanmış, bu hücrelerin ektopik transplantasyon sonrası kemik oluşturabilme kapasitesi gösterilmiş ve "koloni oluşturan fibroblast birimleri" olarak adlandırılmıştır. 1991 yılında MKH'lerin kendini yenileyebilme ve kemik ile kıkırdak progenilerini oluşturabilme özelliği ortaya konmuş ve bu hücreler "mezenkimal kök hücreler" olarak adlandırılmıştır. İnsan MKH'leri (iMKH), yapışma bağımlı büyüme özellikleri, çeşitli yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ve üçlü farklılaşma potansiyelleri (adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hatlara) ile sistematik olarak tanımlanmıştır (Wang vd., 2022).

Bugüne kadar herhangi bir dokuya veya gelişim aşamasına özgü belirli bir MKH belirteci tanımlanamamıştır. Memeli türlerinden in vitro genişletilmiş MKH'lerin tanımlanması esasen fibroblast benzeri morfolojiye, belirli yüzey belirteçlerinin ekspresyonuna (pozitif: CD29, CD51, CD73, CD90 ve CD105; negatif: CD31, CD34 ve CD45) ve osteoblast, adiposit ile kondrositlere sınırlı farklılaşma kapasitelerine dayanmaktadır. Bu özellikler neredeyse tüm dokulardan elde edilen MKH'lerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mafi vd., 2011).

Klinik uygulamalarda kullanılan insan mezenkimal kök hücrelerinin birçok kaynağı bulunmaktadır. Bu kaynaklar iki grupta incelenmektedir: Erişkin dokulardan elde edilen MKH'ler (kemik iliği, adipoz doku, periferik kan ve dental pulpa) ve

neonatal dokulardan elde edilen MKH'ler (plasenta, amniyon ve göbek kordonu). Klinik çalışmalarda en yaygın kullanılan MKH kaynağı kemik iliğidir. Ancak doğumla ilişkili dokulardan elde edilen MKH'ler, yüksek proliferatif kapasite, uzun yaşam süresi ve farklılaşma potansiyeli gibi dikkat çekici biyolojik özelliklere sahip olabilmektedir (Rodríguez-Fuentes vd., 2021).

Son on yılda kök hücreler, çok sayıda hastalık için tedavi edici bir yöntem olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Geleneksel olarak hematopoetik hastalıklar için uygulanan kök hücre tedavisi, artık hematolojik olmayan hastalıkların tedavisi için de kullanılmaktadır (Fugger vd., 2020).

MKH'ler hücre-hücre temasları ve çözünür faktör üretimi yoluyla bağışıklık sistemini baskılama ve tolere etmede oldukça yeteneklidir. MKH'lerin inflamatuvar sinyallere ve hasarlı dokulara doğru göç etme yeteneği onları terapötikler için mükemmel bir vektör yapar (Mishra vd., 2020).

MKH'ler, progenitör hücreleri ve hasarlı hücrelerin iyileşmesini uyarmak için hücre ve matris yeniden şekillenmesini indükleyen çoklu trofik faktörler içerir. MKH'ler miyofibroblastları azaltabilir ve yaralı dokuların fibrotik aktivitesini tersine çevirebilir. Dahası, bu hücreler VEGF, IGF-1 ve doku fonksiyonunun iyileşmesine katılan anti-inflamatuar faktörler dahil olmak üzere pro-anjiyojenik faktörler salgılar (Margiana vd., 2022).

Biriken kanıtlar, MKH'lerin farklılaşma multipotensileri, kendini yenileme kapasiteleri, uzun süreli ex vivo proliferasyon özellikleri, parakrin potansiyelleri ve immün düzenleyici etkileri sayesinde hücre tedavisi ve insan dokularının yeniden yapılanması için umut verici bir seçenek sunduğunu göstermektedir. Ayrıca MKH'ler, diğer kök hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını destekleme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler, doku rejenerasyonunda kritik rol oynayan biyoaktif moleküller salgılayabilmektedir. Bu özellikler, kemik, sinir, akciğer, karaciğer, kalp, böbrek gibi birçok organı etkileyen hastalıkların tedavisinde ilerlemeler sağlamaktadır (Gnecchi vd., 2008).

2.2.1. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Çok yönlü, dinamik ve karmaşık bir doku olan yağ dokusu, artık sistemik metabolik homeostazın korunmasında önemli bir rol oynayan hayati bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir (Tseng, 2023).

Yağ dokusu (AD), embriyonik gelişim sırasında mezodermden türetilir ve vücutta bulunan her memeli türünde bulunur ve işlevsel olarak iki kategoriye ayrılır: beyaz ve kahverengi. Kahverengi AD birikimleri enerji üretiminden sorumludur ve fetal ve neonatal yaşam için tipiktir. Kahverengi AD, yetişkin yaşamda, birincil işlevi enerji rezervi (lipit depolaması yoluyla), ısı yalıtımı ve hormonal faktörlerin üretimi olan beyaz AD'ye dönüştürülür. Ayrıca, beyaz AD, kaynaklandığı vücut bölgelerine göre viseral yağ dokusu (ADvis) ve deri altı yağ dokusu (ADsub) olarak sınıflandırılabilir. ADvis, bağırsak, mide, karaciğer ve pankreas gibi organlarda yerleşirken, ADsub karın, kalça ve uyluklarda daha fazla bulunur (Ong vd., 2014).

Adipoz doku, esas olarak ekstrasellüler matriks, olgun adipositler ve stromal vasküler fraksiyondan (SVF) oluşan, oldukça dinamik ve karmaşık bir endokrin organdır. SVF içerisinde adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AD-MKH'ler), preadipositler, perisitler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar, hematopoetik hücreler ve immün hücreler bulunmaktadır (Al-Ghadban & Bunnell, 2020).

iAD-MKH'ler, etik sınırlamaları olmadığı ve minimal invaziv prosedürler yoluyla erişilebilir bir kaynak olan AD'den izole edilmeleri mümkün olduğu için tıbbi araştırmalarda büyük ilgi gören bir hücre popülasyonudur (Fraser vd., 2006).

Rodbell (1966) , ADKH'leri izole etmek için ilk kez basit bir protokol geliştirmiş ve bunu ileri araştırmalar için temel protokol olarak sunmuştur. Kısaca, AD sıçanlardan elde edilmiş ve küçük parçalara ayrılmıştır. Ardından, doku parçaları eritrositleri uzaklaştırmak için birkaç kez yıkanmış ve kolajenazda inkübe edilerek sindirilmiştir. Sindirilen dokular, hücre peletlerini üstteki çözeltiden ayırmak için santrifüjlenmiş ve hücresel birikintiler, hücre stresini azaltmak ve onları beslemek için her 12-24 saatte bir yenilenen FBS içeren kültür ortamında inkübe edilmiştir (Khazaei vd., 2022).

Adipoz doku kaynaklı kök hücreler (iAD-KH), ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli hücre soylarına farklılaşma açısından büyük bir potansiyele sahiptir. ADKH’lerin belirli hücre soylarına yönlendirilmesi için kimyasal, biyomekanik ve hücre temelli (ko-kültür, koşullandırılmış besi yeri) çeşitli farklılaşma stratejileri önerilmiştir. Bu stratejiler, ADKH’lerin morfolojisinde, gen

ekspresyonunda ve fonksiyonlarında kalıcı değişiklikler oluşturmayı hedeflemektedir (Li vd., 2013).

Kültür ve in vitro çoğaltma, klinik öncesi ve klinik uygulamalar için istenen miktarlarda saf ve homojen bir ADKH popülasyonu sağlar. MKH çoğaltımı için temel bileşik olarak kullanılan genel kültür ortamları arasında α-minimal esansiyel ortam (α-MEM), Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı (DMEM), Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı/Ham'ın F12'si (DMEM/F-12) bulunur ve %10-20 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik ile desteklenir. Epidermal büyüme faktörleri (EGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) gibi bazı büyüme faktörleri, MKH'lerin çoğalma hızını artırır (Tarte vd., 2010).

2.3. Mikroakışkan Çiplerde Hücre Kültürü Uygulamaları

Hücre ko-kültür teknolojisi, hücreler arasındaki iletişim mekanizmasını incelemeyi ve hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz ve diğer hücresel aktiviteler gibi süreçlerde yer alan etkileşimleri ve düzenleyici mekanizmaları daha iyi ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır. Bu, karmaşık organizma ortamının simüle edilmesiyle sağlanır. Bu tür çalışmalar, çok hücreli organizmaların fizyolojik ve patolojik süreçlerini anlamak için büyük önem taşımaktadır. Gelişmekte olan bir hücre kültürü teknolojisi olan mikroakışkan çiplere dayanan 3B hücre ko-kültür teknolojisi, hücre ko-kültürünü verimli, hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleştirebilir. Bu, mikroakışkan çiplerin benzersiz mikrokanal yapıları ve akış karakteristiklerinden yararlanılarak gerçekleştirilir. Bu teknoloji, hücre büyümesinin doğal mikro ortamını simüle ederek hücreler arası iletişimi incelemek için yeni bir teknik platform sağlayabilir (Li vd., 2024).

Hücre kültürü için geleneksel in vitro yöntemler günümüzde iyi standartlaştırılmıştır ve herhangi bir sorun olmadan her hücre tipinin çoğunun büyümesine olanak tanır. Ancak son yıllarda, daha ucuz ve daha az emek gerektiren yöntemler bulma ihtiyacı giderek yaygınlaşmıştır. Gerçekten de, in vitro kültürleme hem pahalıdır, yüksek miktarda numune ve reaktif gerektirir hem de gereken birkaç manuel pipetleme adımı düşünüldüğünde zaman alıcıdır. Bu nedenle, hücreleri mikroskobik ölçekte kültürleme olasılığı bilim camiasında giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Gerçekten de, mikroakışkan teknolojisi, mikrokültür sistemlerinin

geleneksel petri kaplarının ve şişelerinin yerini almasına olanak tanır (Torino vd., 2018).

Mikroakışkan cihazlarda hücre kültürü yapmak, biyoloji, biyokimya, fizik ve mühendislik gibi birden fazla disiplini kapsayan belirli temel prensiplerin anlaşılmasını gerektirir. İlk olarak, *in vivo* koşulları daha yakından taklit eden *in vitro* modeller geliştirmeye yardımcı olmak için hücresel mikroçevrenin temel unsurları hakkında bilgi sahibi olmak gerekir. İkinci olarak, yöntemlerin makro ölçekten mikro ölçeğe aktarılmasına yardımcı olmak için hücre kültürü tekniklerine hakim olmak zorunludur. Üçüncü olarak, mikroakışkanlar konusunda güçlü bir geçmişe ve mikro ölçek teknolojisindeki son gelişmelerin farkında olmak önemlidir, böylece araçlar amaçlanan uygulamalara uygun şekilde tasarlanabilir (Young & Beebe, 2010).

Mikroakışkan hücre kültürü, makroskobik kültüre, yani flakonlarda, kaplarda ve kuyulu plakalarda kültüre göre önemli avantajlara sahiptir. Mikroakışkan cihazların tasarımında büyük bir esneklik vardır, bu da bireysel hücre tiplerinin ihtiyaçlarına göre uyarlanabilir ve hücresel ortak kültürler aynı çip üzerinde uygulanabilir (Yeo vd., 2011).

Mikroakışkan hücre kültürünün avantajları arasında, örneğin sürekli perfüzyon kültürü veya kimyasal gradyanlar oluşturarak bir hücrenin doğal mikro ortamını daha yakından taklit etme ve otomasyon, paralelleştirme, çip üzerinde analiz veya akış aşağı analitik kimya platformlarına doğrudan bağlantı yoluyla düşük sayıda hücreyi veya tek hücreleri yüksek zamansal ve/veya mekansal çözünürlükte inceleme yeteneği bulunur. Aynı zamanda, mikroakışkan hücre kültürü, reaktif tüketimini, kontaminasyon riskini azaltır ve verimli yüksek verimli deneyler sunar (Halldorsson vd., 2015).

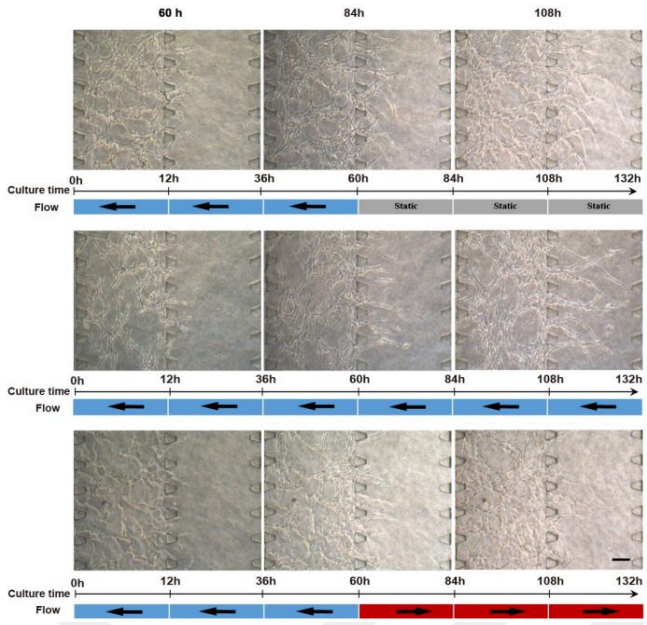
Mikroakışkan bir sistem hücresel mikroçevreyi taklit etme yeteneğine sahip olduğundan, biyolojik yollar bu platformda yüksek verimli bir şekilde incelenebilir. Örneğin, mikroakışkan sistemler hücre fenotipi ve davranışının araştırılabilmesi için hücre dışı bir ortamda uyarı faktörünü kontrol etmek için kullanılabilir. Tipik olarak, kayma geriliminin hücre büyümesi, farklılaşması ve göçü üzerindeki etkisi farklı akış hızlarını kontrol ederek incelenebilir (Gray vd., 2002).

Son yıllarda, mikroakışkan sistemlerde kök hücreler için çeşitli uygulamalar ortaya çıkmıştır. Mikroakışkanda kök hücre sistemleri, kök hücre tiplerine göre kategorize edilmiştir (Wu vd., 2011).

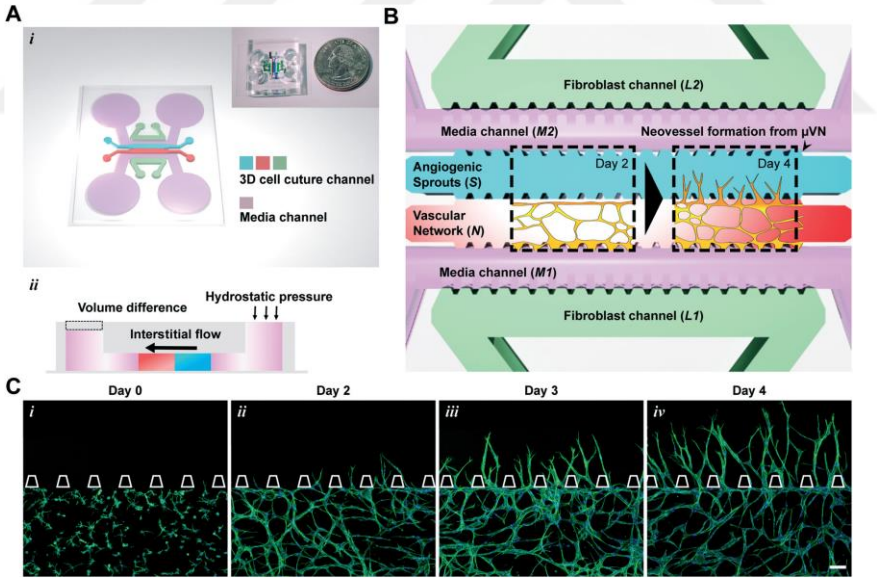
Şimdi kök hücre ayırma, desen oluşturma, kültür, farklılaştırma, doku mühendisliği, organ rekonstrüksiyonu ve klinik terapiler gibi kök hücre araştırmaları için mikroakışkan cihazların uygulanmasına odaklanan daha fazla araştırma çabası bulunmaktadır. Özellikle, doku veya organ düzeyinde fizyolojiyi simüle etmek üzere düzenlenmiş canlı hücrelere sahip sürekli perfüze edilmiş odalar içeren bir mikroakışkan hücre kültürü platformu olan çip üzerinde organ konsepti giderek daha popüler hale gelmektedir (Bhatia & Ingber, 2014).

Mikroakışkan teknolojilerindeki ilerlemeler, bir mikroçip üzerinde organ modeli oluşturmanın yanı sıra, farklı organ modellerini birbirine bağlayarak çoklu organ sistemleri oluşturmayı da mümkün kılarken, kök hücreden türetilen spesifik organ hücreleri, insan birincil hücreleri için mükemmel alternatifler olabilir. Mikroakışkan teknolojileri ve kök hücrelerin birleşimi, istenildiği takdirde çok yönlü çip üzerinde organ sistemlerine doğru büyük bir potansiyel taşımaktadır. Farklı çalışmalar, mikroakışkan cihazların kök hücre analizi ve araştırmalarındaki önemli rolünü farklı bakış açılarından incelemiştir (Titmarsh vd., 2014).

Bu kapsamda, Kim ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mikroakışkan tabanlı üç boyutlu bir hücre kültürü modeli geliştirilerek interstisyel akışın (IF) endotel hücrelerinin morfogenezi ve anjiyojenik davranışları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Geliştirilen mikroakışkan çip sistemi, hücre kültürü kanalları ile besiyeri kanallarının ayrıldığı ve hidrostatik basınç farkı ile kontrollü interstisyel akışın oluşturulabildiği çok kanallı bir yapıdan oluşmaktadır. Bu sistemde, insan endotel hücreleri stromal fibroblastlar ile birlikte üç boyutlu matriks içerisinde ko-kültüre edilerek, fizyolojik mikrovasküler ağ oluşumu taklit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, interstisyel akışın varlığında endotel hücrelerinin organize olarak birbirine bağlı mikrovasküler ağ yapıları oluşturduğunu ve bu sürecin statik koşullara kıyasla belirgin şekilde hızlandığını göstermiştir (Kim. S vd 2016).



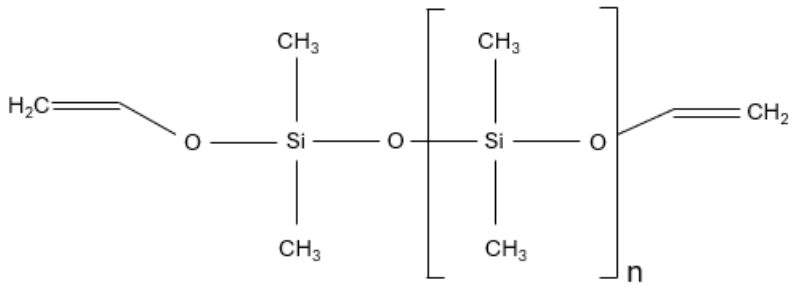
Şekil 2. 1. İnterstisyel akış yönünün tersine çevrilmesine yanıt olarak oluşan anjiyojenik filizlenmenin zaman atlamalı izlemesi. Görüntüler, deneyin başlamasından 60, 84 ve 108 saat sonra çekilmiştir *(Kim. S vd 2016).*



Şekil 2. 2. Mikroakışkan çip sisteminde interstisyel akışın anjiyogenez üzerindeki etkisinin şematik ve deneysel gösterimi. a) Mikroakışkan çipin genel tasarımı, b) çok kanallı mikroakışkan sistemi fibroblast ve endotel iyileştirme ko-kültürü ile mikrovasküler ağ oluşumu ve anjiyojenik tomurcuklanmanın zamana bağlı gelişimi şematik gösterimi, c) farklı zaman noktalarında (0., 2., 3. ve 4. günler) mikrovasküler ağ oluşumunun floresans mikroskop görüntüleri (Kim. S vd 2016).

2.4. Polidimetilsiloksan (PDMS) ve Biyomedikal Uygulamaları

Polidimetilsiloksan (PDMS), fizyolojik kayıtsızlık, biyolojik bozunmaya karşı mükemmel direnç, biyouyumluluk, kimyasal kararlılık, gaz geçirgenliği, iyi mekanik özellikler, mükemmel optik şeffaflık ve replika kalıplama ile basit üretim dahil olmak üzere biyomedikal uygulamalar için ilginç özelliklere sahip bir elastomerik polimerdir (Van Poll vd., 2007).



Şekil 2.3. Mikroakışkan çip üretiminde kullanılan Sylgard® 184 polidimetilsiloksan (PDMS) elastomerinin kimyasal yapısının şematik gösterimi.

Bu özellikler nedeniyle, PDMS yaygın olarak mikropompalarda, kateter yüzeylerinde, pansumanlarda ve bandajlarda, mikrovalflerde, optik sistemlerde, hastalıkların in vitro çalışmasında, implantlarda, mikroakışkanlarda ve fotonikte kullanılmıştır. Üstelik, yumuşak litografi teknolojisi, mikroelektromekanik sistemler (MEMS) uygulamalarında ve mikroakışkan bileşenlerde PDMS kullanımını teşvik etmiştir. Mikro temaslı baskı, replika kalıplama, mikro transfer kalıplama, kılcallarda mikro kalıplama ve çözücü destekli mikro kalıplama gibi yumuşak litografi teknikleri genellikle, desenlerin sonraki bir alt tabakaya aktarılması için nano ve mikro yapıları içeren elastomerik bir damga veya kalıp oluşturmak için PDMS kullanımını gerektirir (Miranda vd., 2021).

Mikro cihazların üretiminde tipik olarak silikon, cam ve polimerler kullanılmaktadır. Silikon, yüksek ısıl iletkenliği ve gelişmiş üretim teknolojilerinin mevcut olması nedeniyle; cam, optik geçirgenliği sebebiyle; polimerler ise düşük maliyetleri, optik saydamlıkları ve esneklikleri sayesinde tercih edilmektedir. Cam ve silikona kıyasla, PDMS en umut verici elastomerden biri olarak öne çıkmaktadır.

Bunun nedeni, cam ve silikonun yüksek üretim maliyetine sahip olmaları, daha fazla iş gücü gerektirmeleri ve yapısal olarak rijit olmalarıdır. PDMS'in değişken elastikiyet özelliği de tıbbi uygulamalarda önemli bir avantaj sağlamaktadır (Berthier vd., 2012).

Hücre biyolojisinde PDMS mikroakışkan cihazlarının temel dezavantajı, içsel yüksek yüzey hidrofobisitesidir. Hidrofobik yapısı nedeniyle, PDMS yüzeyi sulu çözücü ile zayıf ıslanabilirliğe sahiptir (Sia & Whitesides, 2003).

Bununla birlikte, mikrokanallarda gerçekleştirilen biyolojik deneylerin çoğu sulu bir çözeltiye veya organik ve sulu çözeltilerin bir karışımına ihtiyaç duyar. Hücresel bağlanma, PDMS'nin fizikokimyasal özelliklerinden güçlü bir şekilde etkilenirken, bağlanma hücre tiplerine bağlı olarak değişebilir (Jastrzebska vd., 2018).

Dahası, hidrofobisite, hücre ortamında bulunan veya PDMS yüzeyindeki hücrelerden salgılanan spesifik olmayan küçük moleküllerin ve biyomoleküllerin emilimine/adsorpsiyonuna yol açabilir. Biyomoleküllerin ve salgılanan çözünür faktörlerin tükenmesi nedeniyle hücre sinyallemesi ve davranışı büyük ölçüde etkilenebilir (Tanyeri & Tay, 2018).

Mikroakışkan cihazların imalatında kullanılan çeşitli polimerler arasında polimetil metakrilat (PMMA), polikarbonat (PC), polivinil klorür (PVC), poliimid (PI), siklik olefin polimerleri ailesi (COC) ve polistiren (PS) bulunmaktadır. Bununla birlikte, mikroakışkan uygulamaları için en yaygın kullanılan polimer PDMS'dir. Bu malzeme, hem akademik hem de endüstriyel uygulamalar için dünya çapında mikroakışkanlar için kullanılmaktadır. Bu, esas olarak üretim sürecinin kolaylığından kaynaklanmaktadır (Torino vd., 2018).

PDMS mikroakışkan cihazlarının üretimi için yumuşak litografi, mürekkep püskürtmeli baskı ve doğrudan yazma gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmıştır . Bunlar arasında yumuşak litografi, hücre kültürü için PDMS çip üretiminde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Yumuşak litografi, çeşitli desenlere ve yüksek optik şeffaflığa sahip mikro kanalların basit ama sağlam bir üretimini sağlar (Akther vd., 2020).

PDMS'nin hücre kültürü için kullanımı uzun vadeli çalışmalarda sıklıkla çeşitli zorluklar ortaya çıkarır. PDMS'nin içsel yüksek yüzey hidrofobisitesi, birçok çalışma tarafından zayıf hücre yapışmasına, hücre adacıkları oluşturmasına ve ayrışmasına neden olan birincil faktör olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, uzun vadeli hücre

çalışmalarını kolaylaştırmak için PDMS'nin yüzey biyouyumluluğunun iyileştirilmesine büyük talep vardır (Chuah vd., 2015).

2.5. Hidrojellerin Hücre Kültüründe Kullanımı

Hidrojeller, $–NH_2$, –COOH, –OH, $–CONH_2$, –CONH ve $–SO_3H$ gibi hidrofilik grupları sayesinde büyük miktarda suyu emebilen ve su içerisinde şişebilen üç boyutlu (3B) ağ yapılarından oluşmaktadır. Bu ağ genellikle çapraz bağlı polimer zincirlerinden meydana gelir ve bazı durumlarda çapraz bağlı kolloidal kümeler aracılığıyla da oluşturulabilir. Hidrojellerin esnek ve yumuşak yapısı, yüksek su tutma kapasitelerinin bir sonucudur. Doğal veya sentetik polimer zincirlerinin kimyasal ya da fiziksel olarak çapraz bağlanmasıyla farklı özelliklerde hidrojeller tasarlanabilmektedir. Yüksek su içeriği, yumuşak yapısı ve gözenekli morfolojileri sayesinde hidrojeller, canlı dokulara büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Ho vd., 2022).

Hidrojellerin özellikleri (örneğin, şişme-şişmeme oranı, sertlik, parçalanabilirlik, mekanik boyut) hidrofilik ve hidrofobik oranları, başlatıcı veya polimer konsantrasyonlarını ve reaksiyon koşullarını (zaman, sıcaklık, kap, vb.) değiştirerek ayarlanabilir. Hidrojellerin biyomedikal uygulaması, enfeksiyondan sonra yerinde jelleşme ve hidrojelin uyaranlara duyarlılığı nedeniyle yüzey ortamıyla sınırlı değildir (Lin vd., 2021).

Hidrojellerin sınıflandırılması, kaynaklarına, bileşimlerine, çevresel uyaranlara, çapraz bağlanmalarına, özelliklerine, yapılandırmalarına ve iyonik yüklerine bağlıdır. Hidrojeller, polimer zincirlerinin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Hidrojel kaynakları doğal, sentetik veya yarı sentetik polimerler olarak ayrılabilir. Polimer kaynağı içinde hidrojeller, doğal, sentetik veya yarı polimer hidrojeller olarak adlandırılabilir. Doğal olarak elde edilen hidrojeller (doğal hidrojeller) selüloz, kitosan, kolajen, aljinat, agaroz, hiyaluronik asit, jelatin ve fibrin vb. içerir. Bunlar doğal biyouyumluluk, biyoaktivite ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahiptir, ancak nispeten zayıf stabilite ve mekanik mukavemete sahiptir (Baker vd., 1992; Benwood vd., 2021).

Sentetik hidrojeller sentetik polimerlerden üretilir. Bu polimerler, polivinil alkol (PVA), polietilen glikol (PEG), polietilen oksit (PEO), poli-2-hidroksietil metakrilat (PHEMA), poli-N-izopropil akrilamid (PNIPAM), poliakrilik asit (PAA) ve

poliakrilamid (PAAM) gibi bir monomerin polimerizasyonu yoluyla hazırlanan insan yapımı polimerlerdir (Bashir vd., 2020).

Yarı sentetik polimerler, yarı hidrojellerin hazırlanması için malzemeler olarak kimyasal olarak modifiye edilmiş doğal polimerler veya doğal ve sentetik polimerlerin bir kombinasyonudur. Kimyasal olarak modifiye edilmiş doğal polimerlere örnek olarak metakriloil modifiye edilmiş jelatin (GelMA) veya akrilat modifiye edilmiş hiyaluronik asit (AcHyA) verilebilir (Van Den Bulcke vd., 2000).

Hidrojeller, biyolojik sıvıya ek olarak suyu emebilen bir 3B yapıya ve hidrofilik bir polimer ağına sahiptir. Böylece, hücreleri kapsüllemek için kullanılabilen hücre dışı matrise (ECM) benzeyen yumuşak ve ıslak 3B yapıyı oluşturabilirler. Bu, 3 boyutlu hücre kültürleri için iskelelerin uygulanmasında giderek daha fazla ilgi gören hidrojellerin ortaya çıkmasına neden olur (Jose vd., 2020).

Sentetik hidrojeller, 3-boyutlu hücre kültürlerinde çeşitli hücre tipleri için yapısal destek sağlamak üzere iyi mekanik mukavemete sahiptir. Bu PVA ve PEG hidrojelleri, biyouyumluluğu (canlı doku için adaptasyon ve toksik olmama), immünojenitesinin olmaması ve ayarlanabilir sertliği nedeniyle 3 boyutlu iskele için yaygın olarak kullanılır (Zhu vd., 2010).

Hem doğal hem de sentetik hidrojeller 3 boyutlu hücre kültürlerinde avantajlarını yaygın olarak göstermiş olsalar da, bu hidrojellerin bazı dezavantajları da vardır. Hızlı bozunma, zayıf stabilite ve zayıf mekanik mukavemet doğal hidrojellerin dezavantajlarıdır; sentetik hidrojeller ise biyolojik olarak inerttir ve endojen faktörlerden yoksundur. Yarı sentetik hidrojeller, doğal ve sentetik polimerlerin bir kombinasyonunu içerir. Bu kombinasyon, 3 boyutlu hücre kültürlerinde doğal ve sentetik hidrojellerin bireysel dezavantajlarını iyileştirir (Van Den Bulcke vd., 2000).

Hidrojeller, yalnızca hücre kültürü uygulamalarıyla sınırlı kalmayıp; ilaç salınım sistemleri, yara iyileşmesini destekleyen biyomalzemeler ve doku mühendisliği gibi birçok biyomedikal alanda geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir (Cascone & Lamberti, 2020).

Polimerler, ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında en umut vadeden maddelerden biridir. Polimerler, polimerik miseller, polimerik veziküller ve hidrojeller dahil olmak üzere çeşitli nanoyapılar için hazırlanabilir. Bu nanoyapılar, ilaç taşıyıcılığı için mükemmeldir. Hidrojellere olan ilginin artması, polimerik kısımların

uyaranlara duyarlı özellikleri nedeniyle akıllı hidrojellere odaklanmıştır (Chung vd., 2021).

Hidrojeller düzensiz şekilli yaraları doldurabilen püskürtülebilir veya enjekte edilebilir bir yara pansumanı olarak uygulanabilir. Ayrıca doğal hücre dışı matris, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve ayarlanabilir özellikler (şekil, jel durumu ve mekanik güç gibi) ile benzer özellikler sunarlar. Hidrojellerin bu avantajları, farklı yara tipleri için farklı pansumanlar için hidrojellerin geliştirilmesini simüle edebilir. Son zamanlarda, fonksiyonel hidrojeller yara pansuman araştırmalarında büyük ilgi görmektedir. Bu hidrojeller, antibakteriyel özellikler, kan pıhtılaşmasını teşvik etme veya kan yenilenmesini destekleme gibi yüksek performanslı biyolojik aktiviteler sergileyebilir (Liang vd., 2021).

Bir hidrojel iskele, sinirlerin, kalp dokusunun, kıkırdağın ve kemiğin doku yenilenmesinde faydalı olabilir. Örneğin, kolajen-kitosanın 3B baskısı, yara izi ve boşluk oluşumunu azaltmada faydalıdır ve bir hayvan modelinde test edildiğinde sinir liflerinin yenilenmesinin yanı sıra işlevsel iyileşmeyi de iyileştirebilir. Başka bir örnek, aljinat ve fibrin ile birleştirilmiş HA'dır. Bu, periferik sinir dokusu yenilenmesinde 3B baskının bir mürekkep bileşeni olarak uygulanmıştır (Ning vd., 2019; Sun vd., 2019).

2.5.1. Hücre kültüründe kullanılan bazal membran ekstresi (BME) hidrojeli

Bazal membran ekstraktı (BME), Matrigel® ile aynı biyolojik kökene sahip olup, Matrigel türleri arasında yer alan bir hidrojel matriksidir. Matrigel, Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare tümöründen elde edilen bir bazal membran ekstresi (BME) örneğidir. BME bileşenleri arasında laminin, kollajen IV, entaktin, heparan sülfat ve proteoglikanların yanı sıra biyolojik olarak aktif peptitler ve büyüme faktörleri bulunur (Kleinman & Martin, 2005).

Hücre tipine veya malignite durumuna bağlı olarak, hücreler BME üzerinde kültürlendiğinde çoğalabilir veya farklılaşabilir. Hücreler ayrıca, BME'nin üstüne veya içine ekilmelerine bağlı olarak değişen derecelerde farklılaşırlar (Kleinman vd., 1998).

Matrigel'de çeşitli büyüme faktörlerinin saptanması ile bunlar arasında temel fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü 1, dönüştürücü büyüme faktörü beta, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve sinir büyüme faktörü yer almaktadır (Vukicevic vd., 1992).

Matrigel'in ana protein bileşenleri olan laminin (800.000 Da), kollajen IV (540.000 Da) ve enaktin (158.000 Da), çoğu protein büyüme faktörünün ortalama boyutundan (<45.000 Da) önemli ölçüde daha büyüktür. Matrigel'in önemli bir uygulama alanı, insan embriyonik kök hücrelerinin büyümesidir. Matrigel, muhtemelen hücre-hücre dışı matris etkileşimlerini taklit ederek, kanser ve kök hücre kültüründe ECM'yi taklit etmek için kullanılır. Matrigel'in, kendini yenileme ve çok yönlülüğü koruma yeteneği nedeniyle kök hücre kültürü için optimal bir matris olduğu gösterilmiştir. Matrigel'in kök hücrelerin farklılaşmamış durumda kalmasına nasıl yardımcı olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Bu anlayış eksikliğine katkıda bulunan bir faktör, ECM'nin analizindeki zorluktur. Matrigel'in hücre kültürü ve kanser araştırmalarında yaygın kullanımı nedeniyle, bileşiminin belirlenmesi kritik önem taşımaktadır (Hughes vd., 2010). Genellikle 10–15 mg/ml ortam konsantrasyonunda dondurulmuş bir çözelti olarak saklanır, 4 °C'de bir gece boyunca çözülür ve 24–37ºC'de 30 dakika içinde jel haline gelir. Jel, soğutulduğunda kolayca tekrar çözünmez. Hücreler genellikle jel haline getirilmiş malzemenin üzerine yerleştirilir, ancak jel haline gelmeden önce matrisle karıştırılabilir. Birçok hücre hattı ve primer hücre, bu matrise maruz kaldıklarında çoğalmaz, ancak farklılaşır. Matrigel üzerindeki hücrelerin hem morfolojisi hem de ifade ettikleri genler, daha farklılaşmış bir fenotipi yansıtır (Hadley vd., 1985).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aşağıda deneysel çalışmalar esnasında kullanılan kimyasal ve sarflara ait bilgiler bulunmaktadır.

Fetal bovine serum (FBS)	: FBS-12A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Primocin	: ant-pm-2, İnvivogen, California, ABD
Stabil Glutamin	: STA-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Dulbecco's phosphate buffered saline	: PBS-1A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Tripsin-EDTA	: 25200056, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD
FITC anti-human CD44	: 338804, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD90	: 19-04400-10, PluriSelect, Leipzig, Almanya
FITC anti-human CD73	: 344016, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD105	: 323204, Biolegend, California, ABD

PE anti-human CD25	: BSA-1S, Biolegend, California, ABD
PE anti-human CD19	: 302208, Biolegend, California, ABD
PE anti-human CD29	: 303004, Biolegend, California, ABD
PE anti-human CD34	: 343506, Biolegend, California, ABD
PE anti-human CD14	: 301806, Biolegend, California, ABD
PE anti-human HLA-DR	: 307606, Biolegend, California, ABD
PE anti-human HLA-A-B-C	: 311406, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD69	: 310904, Biolegend, California, ABD
PE anti-human CD45	: 304008, Biolegend, California, ABD

3.2. Kullanılan Cihazlar

Aşağıda deneysel çalışmalar esnasında kullanılan cihazlara ait bilgiler bulunmaktadır.

CO_2/O_2- çok gazlı inkübator	: Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya
-150°C derin dondurucu	: Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya

Floresan ataçmanlı inverted mikroskop	: Carl Zeıss Axıo Observer D1, Oberkochen, Almanya
Flow sitometri cihazı	: Agilent Novacyte 3500, Kaliforniya, ABD
Floresan ataşmanlı araştırma mikroskobu	: Leica DM2500, Wetzlar Almanya
Işık mikroskobu	: Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya
Otomatik pipet seti	: Eppendorf, Research® plus, Hamburg Almanya
Masaüstü soğutmalı santrifüj	: Hettich Rotına 380R, Westphalian, Almanya
Çalkalamalı su banyosu	: JeioTech BS-11, Seul, Kore
Şarjlı pipetör	: Rainin PX-100 EU, Kaliforniya, ABD
Kit saklama dolabı (+4/-20°C)	: Panasonic MPR-414F-PE, Kadoma, Japonya
Sitosantrifüj	: THARMAC CellS in I, Limburg an der Lahn, Almanya
Bilgisayar	: Lenovo Ideapad 310, Çin

3.3. Deney Protokolü

Bu tez çalışması insan ya da hayvan bedeni dışında (hücre kültürü ortamında) gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 10.11.2025 tarihli ve E-25403353-050.04-

250194537 sayılı, 34 numaralı etik kurul onayı kapsamında gerçekleştirilmiş olup, insan kaynaklı dokulardan izole edilen hücreler kullanılmıştır.

Deney grupları

Çalışmamız kapsamında, insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAD-MKH), uygun kültür koşullarında çoğaltılıp karakterize edildikten sonra, hidrojel matrisi ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Elde edilen hücre–hidrojel süspansiyonu, steril koşullar altında çok kanallı mikroakışkan çipin kanallarına enjekte edilmiştir. Hücre ekimi tamamlandıktan sonra çipler, 37 °C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren nem kontrollü inkübatöre yerleştirilmiştir.

1. Grup (kontrol grubu): Hücre–hidrojel karışımının mikroakışkan çipe enjekte edilerek mikrostatik koşullarda kültüre edildiği sistem

2. Grup (deney grubu): Aynı hücre–hidrojel karışımının mikroakışkan çipe enjekte edilip peristaltik pompa ile dinamik akış koşullarında kültüre edildiği sistem

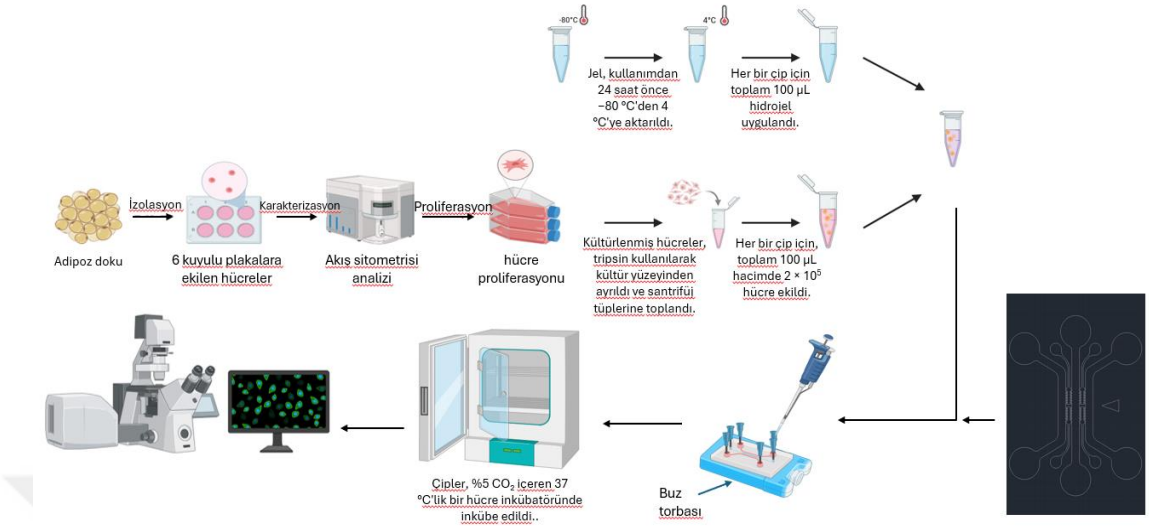
3.3.1. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çözülmesi, kültürü, flow immunofenotipik karakterizasyonu ve çoğaltılması

Çalışmamızda, etik kurul onamı alınmış sağlıklı gönüllülerden liposakşın işlemi sonrası tıbbi atık olarak elde edilen adipoz dokulardan (n=3), enzimatik yöntemle izole edilen, üçüncü pasaja kadar çoğaltılarak mezenkimal kök hücre özellikleri açısından karakterize edilen ve kriyoprezervasyon yöntemi ile hücre bankasında depolanan iAD-MKH kullanılmıştır.

Deney gruplarında, kriyoprezervasyon sonrası çözdürülen ve uygun kültür koşullarında çoğaltılarak deneylerde kullanılacak hücre yoğunluğuna ulaştırılan iAD-MKH kullanıldı. Çalışmada yalnızca 3. ile 7. pasajlar arasında elde edilen hücreler tercih edildi. iAD-MKH'ler kriyoprotektan ajanlardan arındırılmalarını takiben kültür ortamına aktarılmış ve deneysel uygulamalara uygun hale gelmeleri için çoğaltma işlemleri gerçekleştirildi.

Kriyoprezervasyon ve çözme süreçlerinin hücreler üzerinde olası etkilerini belirlemek amacıyla, çözdürme işleminden sonraki ilk 24 saat içerisinde hücre canlılığı değerlendirildi. Çözme sonrası hücre canlılığını değerlendirmek için tripan mavisi boyaması yapılarak Thoma lamı üzerinde sayım gerçekleştirildi ve hücrelerin

immünofenotipik durumları flow sitometri ile doğrulandı. Şekil 3.1.'de yaptığımız çalışmanın grafiksel özeti bulunmaktadır.



Şekil 3. 1. Çalışmanın grafiksel özeti. iAD-MKH izolasyonu, çoğaltılması ve karakterizasyonu sonrası hidrojel içerisinde hazırlanarak çok kanallı mikroakışkan çip sistemine ekilmesini gösteren deneysel iş akışı. Hücreler, mikroakışkan çiplerde 37 °C ve %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmiş; canlı/ölü ve floresan mikroskopi analizleri ile hücre canlılığı, yayılımı ve morfolojik özellikleri değerlendirilmiştir.

3.3.2. iAD-MKH'lerin immunofenotipik karakterizasyonu

İzole edilen iAD-MKH'ler, dördüncü pasaja kadar çoğaltıldıktan sonra karakterizasyon için hazırlandı. Pasaja ulaşan hücrelerin eski besiyeri uzaklaştırılmış, ardından hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen dPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile iki kez yıkandı. Yıkama işlemini takiben hücreler %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) ile yüzeyden ayrılmış ve tripsin aktivitesi, serum içeren besiyeri eklenerek nötralize edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 310xg'de 4 dakika santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edilerek toplanmış, süpernatant uzaklaştırılmış ve soğuk PBS ile tekrar yıkanmıştır.

Flow sitometri analizi için hücre pelletine bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve ilgili yüzey belirteci antikorları eklenmiş, hücreler 4°C'de 20 dakika inkübe

edildi. İnkübasyon sonrası PBS ilave edilerek hücreler flow sitometri cihazında okutuldu (Agilent Novacyte 3500). Veriler NovoExpress yazılımı kullanılarak analiz edildi. İzolasyonun başarı düzeyi ve hücre popülasyonunun saf/uygun özellikler taşıyıp taşımadığı, karakteristik MKH pozitif (CD44, CD73, CD90, CD105 vb.) ve negatif (CD14, CD19, CD25, CD34, CD45, HLA-DR vb.) belirteçlerin değerlendirilmesiyle doğrulandı.

3.4. Mikroakışkan Çipin Tasarımı ve Üretimi

Bu mikroakışkan çip, literatürde tanımlanmış ve çoklu hücre tiplerinin yüzeylerde veya hidrojel içerisinde mikroakışkan sistemlerinin temel olarak çalıştırılmasını sağlayan olanaklar sağlanmıştır. Buradaki dizayn, Shin ve ark. (2012) tarafından detaylandırılmış mikroakışkan çip modeli referans alınarak oluşturulmuştur (Shin. Y vd 2012).

Çip tasarımının ilk aşamasında kanal geometrileri, akış hattı düzeni ve hücre–hidrojel uygulama bölgeleri AutoCAD yazılımı ile modellendi. Tasarımı takiben fotolitografi yöntemi kullanılarak silikon bazlı bir master kalıp oluşturulmuş, ardından polidimetilsiloksan (PDMS) karışımı master kalıp üzerine dökülerek mikrokanal yapısının oluşturulması sağlandı. Kürlenme işlemi sonrası PDMS tabakası kalıptan çıkarılmış, giriş–çıkış portları açılmış ve çip, plazma bağlama yöntemi ile cam yüzeye kapatılarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.4.1. Fotolitografi süreci

Mikroakışkan çipte yer alan mikrokanal yapılarını oluşturmak amacıyla, fotolitografi süreci uygulanmıştır. Bu kapsamda, SU-8 3050 negatif fotorezist (MicroChem Corp., Westborough, MA, ABD), yüzeyi tek taraflı cilalanmış 4 inç çapındaki silikon wafer (University Wafer Inc., Boston, MA, ABD) üzerine spin kaplama yöntemi ile homojen olarak kaplanıldı. Kaplama işlemi, spin coater cihazı kullanılarak 1000 rpm hızda gerçekleştirildi ve böylece mikrokanal yapıları için uygun bir fotorezist tabakası elde edildi.

Fotorezist ile kaplanan silikon wafer, mikroakışkan çip tasarımına ait kanal geometrilerini içeren optik maske yardımıyla Mask Aligner UV-litografi sistemi (Midas System Co., Ltd., Daejeon, Kore; MDA-60MS, 4") kullanılarak ultraviyole (UV) ışığına maruz bırakıldı. Bu adımda, maske üzerindeki desenlerin fotorezist tabakaya doğru ve net bir şekilde aktarılması sağlandı. UV maruziyetinin ardından,

fotorezistin kimyasal olarak seçici şekilde çözünmesini sağlamak amacıyla SU-8 geliştirici çözeltisi (MicroChem Corp.) kullanılarak geliştirme işlemi yapıldı. Geliştirme süreci sonunda, tasarlanan mikrokanal geometrileri silikon wafer üzerinde yüksek çözünürlükte elde edildi.

3.4.2. PDMS Karışımının hazırlanması ve kürlenmesi

Mikrofabrikasyon sürecinin tamamlanmasının ardından, mikrokanal yapılarının elde edilmesi amacıyla fotolitografi ile hazırlanan SU-8 master kalıplar PDMS döküm işlemi için kullanıldı. Bu kapsamda, PDMS prepolimer baz ve kürleme ajanı, üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10:1 (ağırlık/ağırlık) oranında tartılarak alınmış ve homojen bir karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 5 dakika boyunca dikkatlice karıştırıldı. Karışım sırasında hava kabarcığı oluşumunu en aza indirmek amacıyla yavaş ve kontrollü bir karıştırma prosedürü uygulandı.

Hazırlanan PDMS karışımı, SU-8 master kalıbın üzerine döküldükten sonra mikrokanal yapıları tam olarak dolduruldu. Döküm işlemi sonrası, karışım içerisinde oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması amacıyla, vakumlu desikatör altında degazasyon işlemi yapıldı. Gazı giderilen PDMS, daha sonra 100 °C sıcaklıktaki fırında yaklaşık 2 saat süreyle kürlenmeye bırakıldı.

Kürlenme işleminin tamamlanmasının ardından, PDMS tabakası dikkatlice kalıptan çıkarıldı, mikroakışkan çip geometrisine uygun şekilde kesilerek şekillendirildi. Son aşamada, mikrokanalların giriş ve çıkışları uygun çapta panç kullanılarak açıldı.

3.4.3. PDMS–cam yüzey bağlama (plazma bonding) prosedürü

Cam mikrokanal bağlama işlemi, PDMS tabakasının kürlenme sürecinin tamamlanmasının ardından, PDMS mikrokanalların SU-8 master kalıptan dikkatlice ayrılması sonrasında yapıldı. Bağlama işleminden önce, PDMS mikrokanal yüzeyi ve ince cam lam, yüzey aktivasyonunun sağlanması amacıyla oksijen plazma jeneratöründe yaklaşık 1 dakika süreyle oksijen plazmasına maruz bırakıldı. Bu işlem ile her iki yüzeyde hidrofilik grupların oluşması sağlanarak bağlanma verimliliği artırılmıştır.

Plazma ile aktive edilen PDMS ve cam yüzeyler, mikrokanal yapıları doğru şekilde hizalanacak biçimde dikkatlice bir araya getirildi ve hafif basınç uygulanarak temas ettirildi. Ardından, yüzeyler arasında kalıcı ve güçlü bir bağlanma elde

edilebilmesi amacıyla, bağlanmış yapılar 100°C sıcaklıktaki fırında 2 saat süreyle inküba edildi. Bu işlemin sonunda kapalı mikrokanal topolojilerine sahip, kullanıma hazır mikroakışkan çipler elde edildi.

Bağlama ve üretim kalitesinin değerlendirilmesi için, bağlama işleminden sonra sızıntı testleri gerçekleştirildi. Bu kapsamda, çalışma sıvısı mikrokanallar içerisine verildi ve kanallar ışık mikroskobu altında incelenerek PDMS ile cam yüzeyler arasında herhangi bir sıvı sızıntısı olup olmadığı görsel olarak değerlendirildi.

3.5. Hidrojel Hazırlığı

Bu çalışmada hidrojel matriksi olarak Bazal Membran Ekstresi (BME) (Cultrex®) jel kullanıldı. BME jelin tercih edilmesinin temel nedeni, sıcaklığa duyarlı fiziksel özellikler göstermesidir. Jel, düşük sıcaklıklarda sıvı formda bulunmakta, 37 °C'de ise hızlı bir şekilde polimerize olarak jel yapısına dönüşmektedir. Bu özellik, mikroakışkan çiplerin 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edildiği hücre kültürü uygulamaları için BME'yi uygun bir hidrojel matriksi haline getirmektedir.

BME jel, hücrelerin üç boyutlu (3B) bir mikroçevrede tutunmasını, yayılmasını ve yaşamsal aktivitelerini sürdürebilmesini destekleyen laminin, kollajen IV ve entaktin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerini içermektedir. Bu yapısal ve biyokimyasal özellikleri sayesinde, mezenkimal kök hücrelerin canlılığı ve morfolojik bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır.

Üretici firma önerileri doğrultusunda, BME jel −70 °C'nin altında depolandı. Hücre ekimi öncesinde jelin kontrollü bir şekilde çözünmesini sağlamak için, kullanımından yaklaşık 24 saat önce −80 °C'den alınarak +4 °C'de bekletildi. Tüm hazırlık ve hücre–jel karıştırma işlemleri, jelin erken polimerizasyonunu önlemek amacıyla soğuk zincir korunarak gerçekleştirildi.

3.6. Hücre-Hidrojel Karışımının Hazırlanması ve Çipe Enjeksiyonu

Kültür edilmiş insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAD-MKH), deneysel uygulamalar öncesinde %0,25 tripsin-EDTA kullanılarak kültür yüzeyinden ayrıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu santrifüj işlemi sonrasında yeniden süspanse edildi ve tripan mavisi boyama yöntemi ile hücre canlılığı ve sayımı gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılmak üzere hücre yoğunluğu 1 mL'de 2 x 10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı.

Hücre–hidrojel karışımının hazırlanması aşamasında, her bir mikrokanal için 25 µL hücre süspansiyonu ile 25 µL saf Cultrex® Bazal Membran Ekstresi (BME) hidrojeli birleştirildi. Karışım, hücrelerin homojen dağılımını sağlamak amacıyla mikropipet yardımıyla yavaş ve tekrarlı pipetleme işlemi uygulanarak dikkatlice karıştırıldı. Hidrojelin erken polimerizasyonunu önlemek amacıyla, hücre süspansiyonu, BME hidrojeli, pipet uçları ve mikroakışkan çipler enjeksiyon öncesinde +4 °C'de soğutuldu. Hücre–hidrojel karışımının mikrokanallara aktarımı öncesinde, mikroakışkan çiplerin kanal girişlerine steril mikro pipet uçları yerleştirildi. Hazırlanan karışım, ters ışık mikroskobu altında manuel parmak basıncı uygulanarak mikrokanallara yavaş ve kontrollü bir şekilde enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi sırasında kanalların tıkanmasını önlemek ve hücrelerin kanal boyunca eşit dağılımını sağlamak amacıyla enjeksiyon düşük hızda gerçekleştirildi. Hücre–hidrojel karışımının mikrokanallara dağılımı ve kanal doluluk durumu enjeksiyon sonrasında mikroskop altında görsel olarak kontrol edildi. Hücre–hidrojel enjeksiyonunun ardından, hidrojelde hücrelerin stabilizasyonu ve jel polimerizasyonunun tamamlanması amacıyla mikroakışkan çipler 37 °C'de 60 dakika süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda besiyeri uygulamasına geçildi. Mikrostatik kültür grubunda, besiyeri giriş kanallarına kültür ortamı manuel uygulanarak verildi. Mikroakışkan kültür grubunda ise besiyeri, peristaltik pompa sistemi kullanılarak 2 µL/dk akış hızında mikrokanallara sürekli olarak sağlandı. Tüm deney gruplarına ait mikroakışkan çipler, %5 CO_2 içeren 37 °C koşullarında hücre inkübatöründe inkübasyona bırakıldı.

Hücre–hidrojel karışımı, her bir mikrokanal için eşit hacimlerde (1:1 oranında) hazırlanmış ve toplam 50 µL olacak şekilde mikrokanallara enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi sırasında erken jelasyonun önlenmesi amacıyla tüm materyaller soğuk koşullarda tutulmuş ve enjeksiyon düşük hızda gerçekleştirildi. Hücrelerin hidrojel içerisindeki dağılımı ve kanal doluluk durumu enjeksiyon sonrasında mikroskop altında kontrol edildi. Tüm işlemler steril koşullar altında yapıldı.

3.7. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (Canlı/Ölü Boyama)

Hücre canlılığının hem mikrostatik hem de mikroakışkan (dinamik) kültür koşullarında morfolojik düzeyde değerlendirilmesi amacıyla Canlı/Ölü Boyama Kiti (Live or Dead™ Fixable Dead Cell Staining Kit, ATT Bioquest) kullanıldı. Bu yöntem kapsamında, canlı hücreler yeşil floresan sinyal veren Calcein-AM ile, ölü hücreler ise kırmızı floresan sinyal oluşturan Propidium Iodide (PI) ile işaretlendi.

İnkübasyon süresinin sonunda, örnekler mikroakışkan çiplerin besiyeri kanallarına yerleştirilen steril mikro pipet uçları aracılığıyla, manuel ve yavaş parmak basıncı uygulanarak öncelikle 1x PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra Calcein-AM ve PI içeren boyama çözeltisi aynı yöntemle mikrokanallara eklenmiştir. Boyama işlemi, 37 °C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren ve nem kontrollü ortamda, karanlık koşullarda 30 dakika inkübe edilmiştir.Boyama işlemlerinin tamamı, hücreler mikroakışkan çip içerisinde kültürlenmiş haldeyken gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerin canlılık durumu ve morfolojik özellikleri, ters floresan mikroskop (ZEISS Axio Observer D1) kullanılarak görüntülendi.

3.8. Phalloidin ve DAPI Boyama Analizi

Mikroakışkan çip sistemi içerisinde üç boyutlu kültür koşullarında kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) hücresel morfolojilerinin, aktin sitoskeleton organizasyonlarının ve çekirdek morfolojilerinin değerlendirilmesi amacıyla DAPI ve Phalloidin çift floresan boyama analizi gerçekleştirildi. Bu yöntem sayesinde hücrelerin mikroçevreye adaptasyonu, yayılım özellikleri ve sitoskeletal bütünlüğü morfolojik düzeyde analiz edildi.

Tüm boyama basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş olup, mikroakışkan çip içerisindeki akışkan değişimleri ve reaktif uygulamaları peristaltik pompa yardımıyla sağlanmıştır. Boyama sürecinde kullanılan tüm çözeltiler, mikroakışkan çipin besiyeri kanalları üzerinden sabit 2 µL/dk akış hızı ile çip içerisine verildi. Bu sayede hidrojel yapı ve hücrelerin yerinden oynaması önlenmiş ve kontrollü bir sıvı değişimi sağlandı.

Boyama işlemine başlanmadan önce, mikroakışkan çip içerisinde bulunan kültür ortamının ve hücresel artıkların uzaklaştırılması amacıyla örnekler 1 x PBS ile 10 dakika boyunca yıkandı. Bu yıkama basamağı, hem ortam kalıntılarının uzaklaştırılması hem de sonraki kimyasal işlemlerin etkinliğinin artırılması amacıyla uygulandı.

Ardından hücresel yapıların korunması ve hücrelerin morfolojik özelliklerinin sabitlenmesi amacıyla fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla çip içerisine %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi verilmiş ve örnekler 15 dakika süreyle inkübe edildi. Fiksasyon basamağını takiben, hücre zarının geçirgenliğinin artırılması ve boyaların

hücre içi yapılara ulaşabilmesi için %0,1 Triton X-100 içeren permeabilizasyon çözeltisi çipe verilmiş ve 15 dakika süreyle uygulandı.

Permeabilizasyon işleminin ardından, non-spesifik bağlanmaları azaltmak ve arka plan floresansını minimize etmek amacıyla hücreler %1 BSA (Bovine Serum Albumin) içeren bloklama çözeltisi ile 30 dakika boyunca inkübe edildi.

Bloklama basamağını takiben, aktin sitoskeletonunun boyanması amacıyla Phalloidin boyası çip içerisine verildi ve örnekler karanlık koşullarda 30 dakika süreyle inkübe edildi. Bu basamak sayesinde hücrelerin filamentöz aktin (F-aktin) yapıları spesifik olarak işaretlendi. Daha sonra hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi amacıyla DAPI boyası yine karanlık ortamda uygulanmış ve 10 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi.

Boyama işlemlerinin tamamlanmasının ardından, fazla boya kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla örnekler PBS ile yıkanmış ve mikroakışkan çip içerisindeki hücreler floresan mikroskop kullanılarak uygun filtre setleri altında görüntülendi. Elde edilen görüntüler, hücrelerin morfolojik yapılarının, sitoskeletal organizasyonlarının ve çekirdek dağılımlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

4. BULGULAR

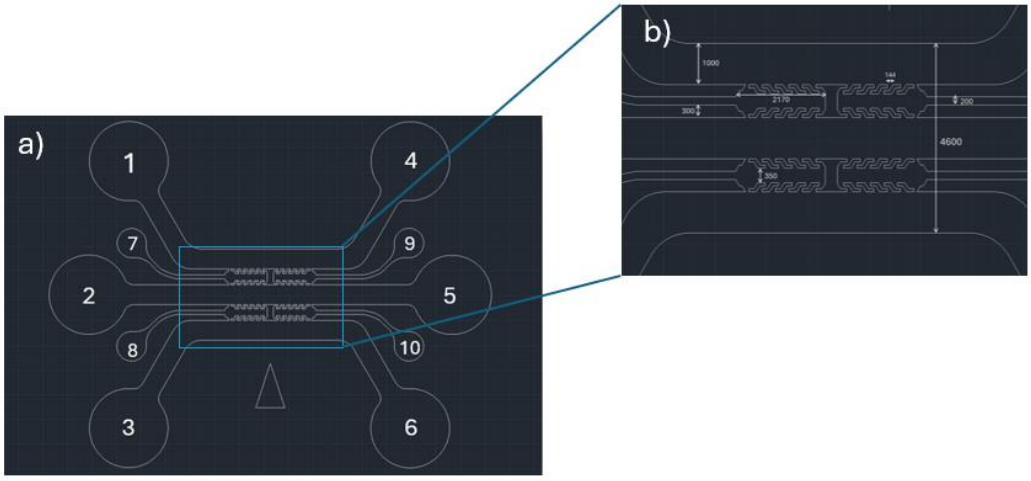
4.1. Mikroakışkan Çipin Tasarım ve Üretimi

4.1.1. Mikroakışkan çipin autocad uygulamasından çizimi

Çalışmamızda kullanılan çok kanallı mikroakışkan çipin geometrik tasarımı AutoCAD yazılımı kullanılarak yapıldı. Tasarlanan çip, hücre-hidrojel karışımının kontrollü bir şekilde ekimine ve uzun süreli kültürüne uygun şekilde çok kanala sahiptir. Çip tasarımında, 4 ana kültür kanalı ve 3 besiyer kanalı mövcuttur. Her kanalın giriş ve çıkış portları vardır.

AutoCAD yazılımında hazırlanan çizimde, her bir ana kanalın genişliği, uzunluğu ve birbirleriyle olan ilişkileri simetrik ve eşit olacak şekilde düzenlendi. Kanalların geometrisi, hidrojel içerisinde üç boyutlu hücre kültürüne uygun olacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 4.1.).

Tasarım aşamasında, hücre ekimi, besiyeri akışı ve görüntüleme işlemlerinin rahatlıkla yapılabilmesi için, çipin genel boyutu,kanallarının boyutu, giriş-çıkış portlarının konumları uygun şekilde ayarlanmıştır. AutoCAD uygulamasında yapılan bu çizim, fotolitografi ile SU-8 kalıbının üretilmesinde maske tasarımı olarak kullanıldı.



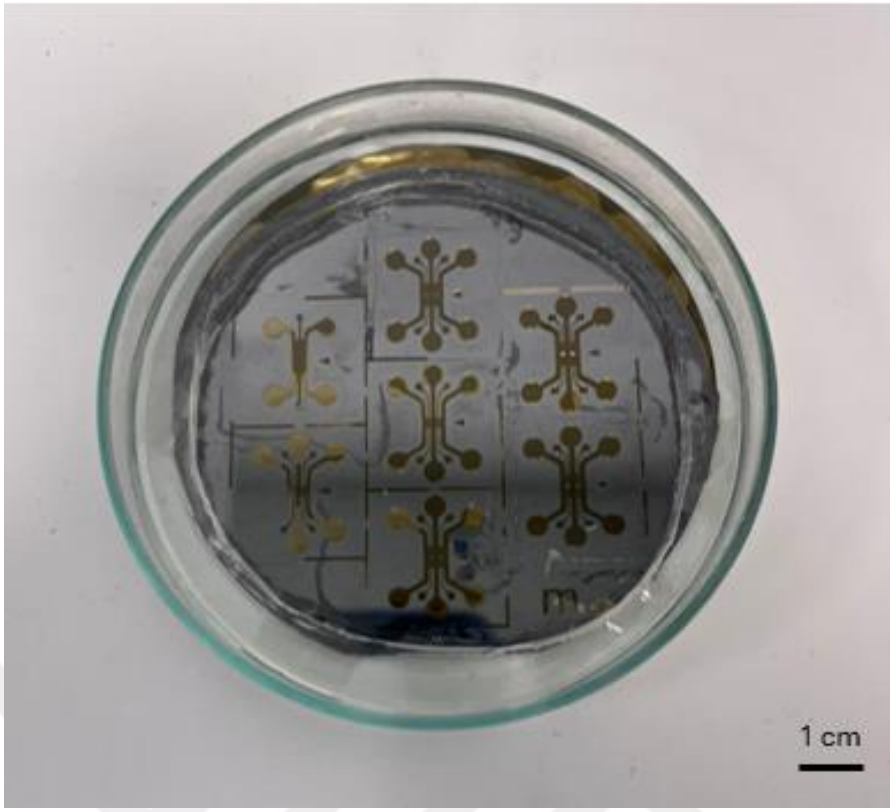
Şekil 4. 1. AutoCAD yazılımı kullanılarak oluşturulan mikroakışkan çip tasarımının şematik gösterimi. **a)** 1–6 numaralı kanallar, besiyeri giriş ve çıkış hatlarını; 7–10 numaralı kanallar ise hücre–hidrojel karışımının enjekte edildiği akış hatlarını ifade etmektedir. **b)** Mikroakışkan kanalların boyutsal özellikleri ve geometrik ölçümleri ayrıntılı olarak gösterilmiştir (µm).

4.1.2. Fotolitografi yöntemi ile SU-8 mikrokanal kalıbının üretilmesi

Bu çalışmada, mikroakışkan çip üretiminde kullanılan fotolitografi yöntemi ile SU-8 esaslı mikrokanal kalıbı başarıyla elde edildi. Tasarlanan mikrokanal geometrisine uygun olarak hazırlanan maske kullanıldı ve üretilen SU-8 kalıbın, kanal yapılarının düzgün, net sınırlara sahiptir.

Üretilen kalıp üzerinde mikrokanalların, tasarlanan geometrik boyutlarla uyumlu oldu ve kanal kenarlarının keskin hatlara sahiptir. Kalıp yüzeyinde herhangi bir çökme, çatlama veya yapısal bozulma oluşmadı (Şekil 4.2.).

Hazırlanan SU-8 kalıp kullanılarak elde edilen PDMS replikasının, kalıp üzerindeki mikrokanal yapıları doğru şekilde kopyaladı ve kanal detaylarının tamamen PDMS yüzeyine aktarıldı. PDMS yapının kalıptan bütünlüğü bozulmadan ayrıldı ve mikrokanal geometrisinin korunarak başarıyla elde edildiği görüldü.



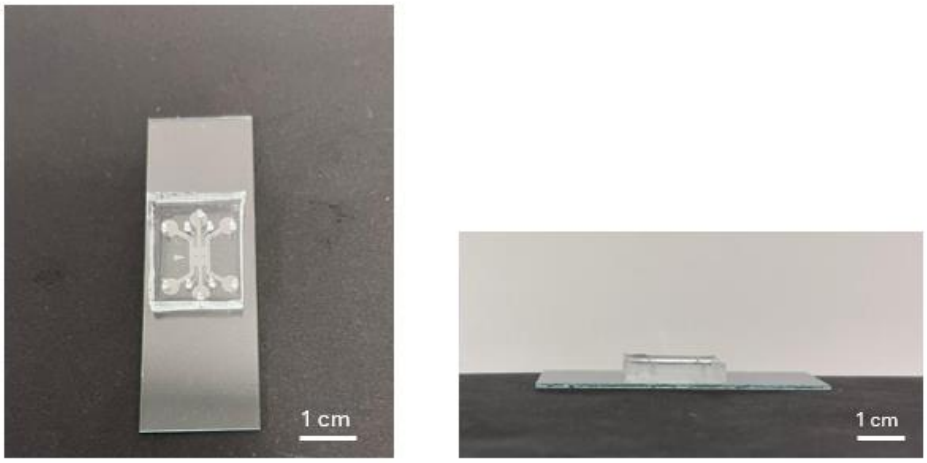
Şekil 4. 2. Fotolitografi yöntemi kullanılarak üretilen SU-8 mikrokanal kalıbının son hali. Ölçek çubuğu: 1 cm.

4.1.3. PDMS–cam bağlama (bonding) sonrası mikroakışkan çip görünümü

SU-8 kalıp kullanılarak elde edilen PDMS mikrokanal yapısı ile cam yüzey arasında oksijen plazma yöntemi kullanılarak bağlama işlemi yapıldı. Bağlama işlemi sonrasında mikroakışkan çipin, sızdırmaz, bütünlüğü korunmuş ve kullanıma hazır bir yapı oluşturuldu.

Bağlama işlemi sonrasında mikroakışkan çipin optik şeffaflığının korunduğu, yapısal bütünlüğünde herhangi bir bozulma meydana gelmediği; sızdırmazlık kaybı, çökme veya deformasyon oluşmadığı tespit edilmiştir.

Üretilen mikroakışkan çipin giriş ve çıkış portlarının açık ve işlevsel olduğu, sıvı transferine uygun şekilde çalıştığı ve yapısal bütünlüğünün üretim sonrası aşamalarda da bir sorun olmadığı gözükdü. Ayrıca, çip üzerinde herhangi bir hava kabarcığı, ayrılma veya sızıntıya neden olabilecek yapısal kusur gözlenmemiştir. Üstten görünümde mikrokanal yapılarının bütünlüğünün korunduğu, yan görünümde ise PDMS tabakanın cam yüzeye homojen şekilde yapıştığı görülmektedir (Şekil 4.3.).



Şekil 4. 3. Çok kanallı mikroakışkan çipin PDMS tabakasının cam lam üzerine bağlanması (bonding) sonrası elde edilen nihai görünümü. Ölçek çubuğu: 1 cm.

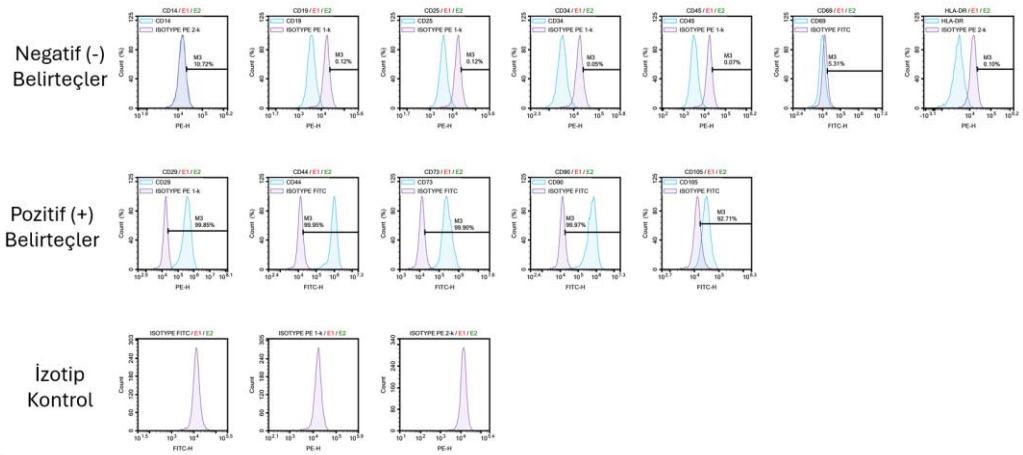
Oluşturulan mikroakışkan çipte kanal boyutları şu şekildedir: Medium kanallarının genişliği 1000 µm olarak tasarlandı. Hücre–hidrojel karışımının bulunduğu kanalın genişliği 350 µm ve uzunluğu 2170 µm olup, bu kanalın giriş bölgesinin genişliği 200 µm'dir. Ayrıca, kanallar arasında yer alan bariyer yapıları arasındaki mesafe 144 µm olarak belirlendi.

4.2. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (iAD-MKH) Akış Sitometrisi ile Karakterizasyon Sonuçları

Çalışmada kullanılan insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) fenotipik karakterizasyonu akış sitometrisi yöntemi ile gerçekleştirildi. Hücrelerin donma-çözme işleminden sonra bu işlemlerden etkilenip etkilenmediğinin doğrulanması için negatif ve pozitif yüzey belirteçleri analiz edildi. MKH'lerin ortalama canlılık oranının yaklaşık %90 düzeyinde olduğu belirlendi.

Uluslararası kabul görmüş mezenkimal kök hücre (MKH) tanımlama kriterlerine uygun olarak gerçekleştirilen akış sitometrisi analizlerinde, hücrelerin CD105 (%92,71), CD90 (%99,97), CD73 (%99,90), CD44 (%99,95) ve CD29 (%99,85) belirteçleri açısından yüksek oranda pozitif ekspresyon gösterdiği; buna karşılık CD69

(%5,31), CD45 (%0,07) ve HLA-DR (%0,10) belirteçlerinin ise negatif düzeyde eksprese edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

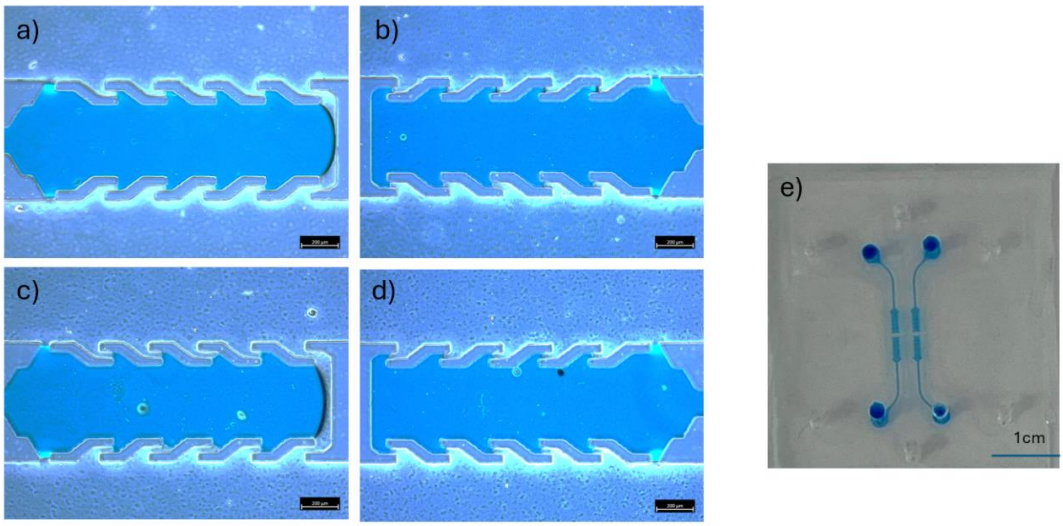


Şekil 4. 4. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin akış sitometrik karakterizasyonu. Histogramda hedef antikorlar mavi ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor ile gösterilmiştir.

4.3. Mikroakışkan Çiplerde Sızdırmazlık Testi Sonuçları

Üretilen mikroakışkan çiplerin sızdırmazlık özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla sızıntı testi yapıldı. Bu kapsamda, BME Cultrex jel içerisine mavi gıda boyası eklenerek hazırlanan karışım, mikroakışkan çipin kanallarına verildi. Çip, 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında 1 gün süreyle inkübatörde bekletildi.

Elde edilen mikroskobik görüntülerde boyanın yalnızca kanal sınırları içerisinde kaldığı, kanal duvarları boyunca herhangi bir sızıntı, yayılma gözükmedi. Ayrıca, kanallarda yapısal bir deformasyon, çökme veya ayrılma olmadı (Şekil 4.5.). Sonuç olarak, mikroakışkan çipin başarılı bir şekilde yapıldığını ve deneysel uygulamalar için yeterli sızdırmazlığa sahip olduğunu göstermektedir.

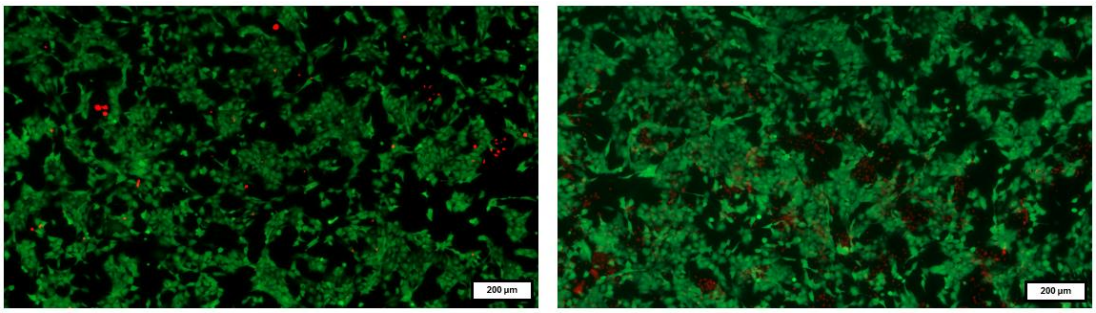


Şekil 4. 5. Mikroçipe enjekte edilen jel testi. Test kapsamında, kullanılan BME Cultrex jel içerisine mavi gıda boyası eklenerek çip kanallarına verilmiştir. Çip, 1 gün süreyle inkübatörde bekletildikten sonra 5× büyütmede mikroskop altında görüntülenmiştir. Kanallarda herhangi bir sızıntı veya yayılma gözlenmediği doğrulanmıştır. (a–d) mikroakışkan çipin farklı kanallarına ait görüntüleri göstermektedir, (e) çipin üstten görünümüdür.

4.4. Hidrojel–iAD-MKH Karışımının Kontrol Kültürü Sonuçları

Çip modeline kontrol grubu oluşturmak amacıyla, hidrojel (BME Cultrex) ve hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. Bu kapsamda, 100 µL hidrojel içerisine, 100 µL besiyeri içerisinde süspanse edilmiş toplam 20.000 iAD-MKH eklendi. Hazırlanan hücre–hidrojel karışımı 96-well plakanın kuyucuklarına aktarıldı ve hidrojelin polimerizasyonunun sağlanması amacıyla 1 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Hidrojel sertleşmesinin ardından kuyucukların üzerine uygun miktarda besiyeri eklendi ve hücreler 4 gün boyunca standart hücre kültürü koşullarında inkübe edildi.

Kültürün 4. gününün sonunda hücre canlılığı, Live/Dead boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Floresan mikroskop analizleri sonucunda, hidrojel içerisinde kültüre edilen hücrelerin canlılık oranının yaklaşık %75–80 aralığında olduğu belirlendi.

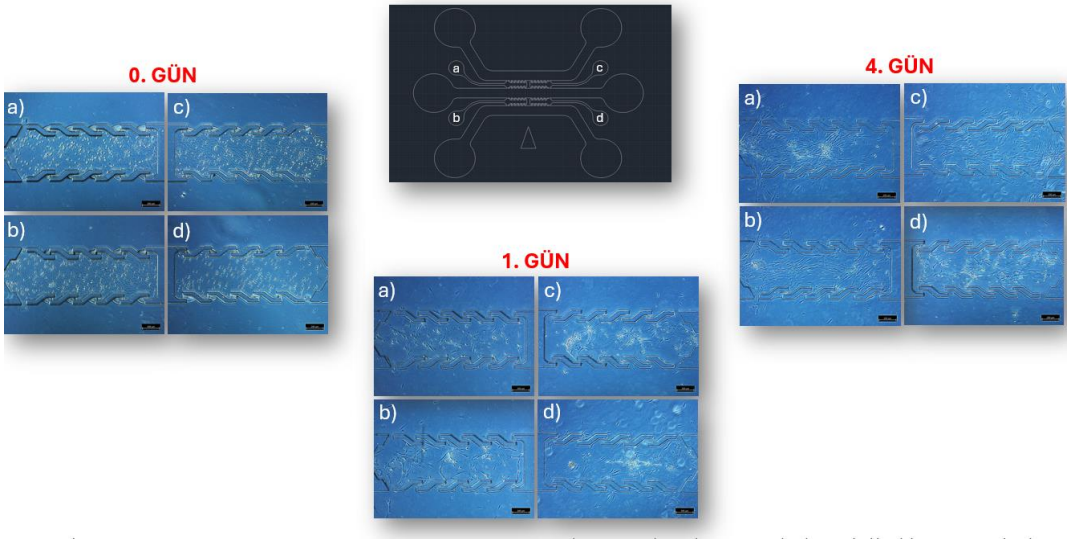


Şekil 4. 6. Hidrojel içerisinde kültüre edilen iAD-MKH'lerin kültürün 4. gününde gerçekleştirilen Canlı/Ölü (Live/Dead) boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri (sağ ve sol). Canlı hücreler Calcein-AM boyası ile yeşil, ölü hücreler ise Propidium Iodide (PI) boyası ile kırmızı floresan olarak görüntülenmiştir. Ölçek çubuğu: 200 µm.

4.5. Mikrostatik Kültür Koşullarında İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Zamana Bağlı Morfolojik ve Analizi

Mikrostatik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) zamana bağlı morfolojik değişimleri ve proliferasyon davranışları 0, 1 ve 4 günlerde mikroskobik görüntüleme ve hücre sayımı ile değerlendirildi

0. günde, çip kanalları içerisinde belirli bir hücre yoğunluğu tespit edildi. Kültürün 1. gününde ortalama hücre sayısında bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın, ekim sonrası hücrelerin bir kısmının yüzeye tutunamaması ve ortam değişimi sırasında besiyerine karışarak ortamdan uzaklaşması nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, yüzeye tutunan hücrelerin zamanla proliferasyona başladığı gözlemlendi. Proliferasyonun devam ettiği ve 4. günde hücre sayısında belirgin bir artış olduğu tespit edildi (Şekil 4.6.).



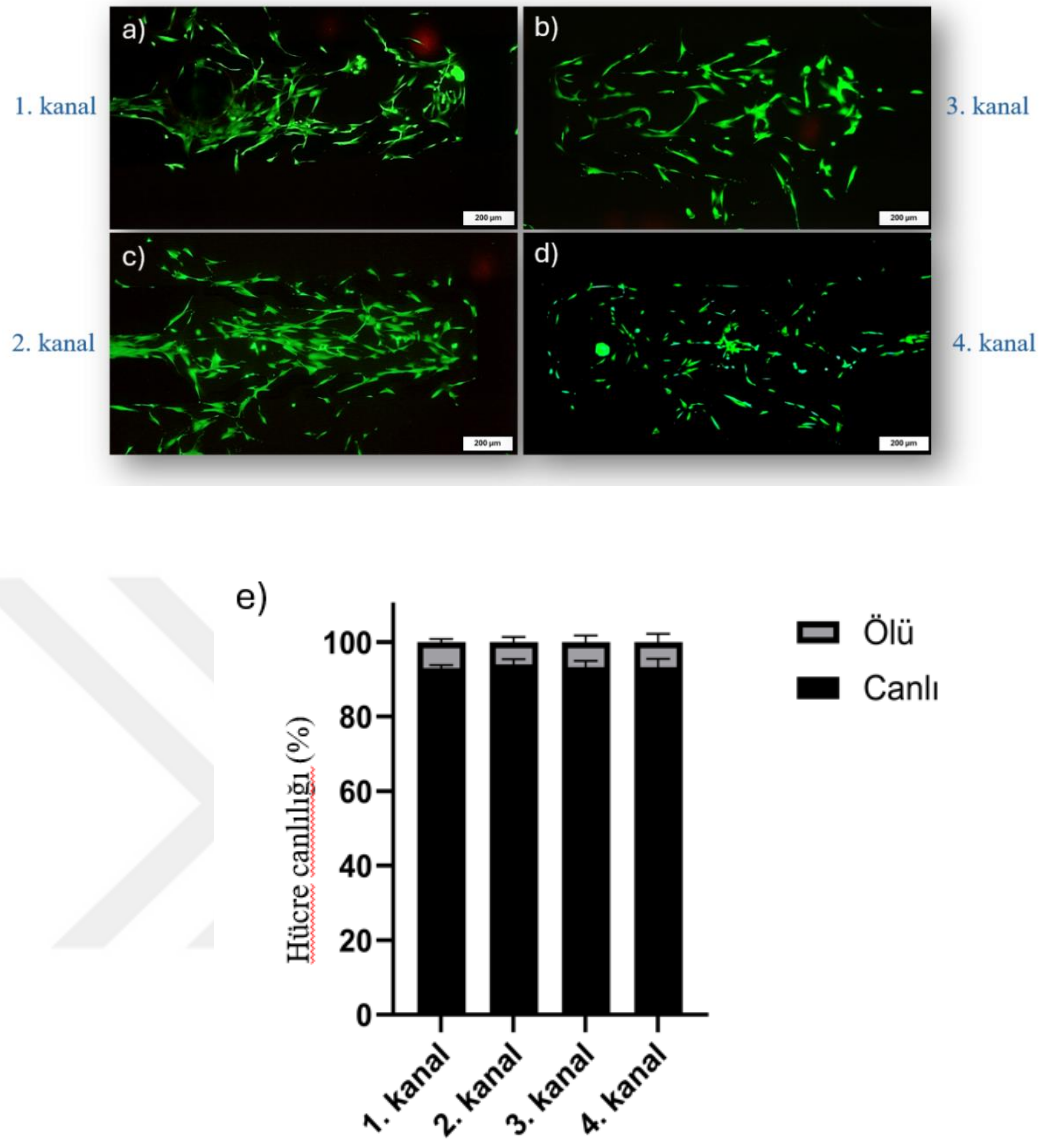
Şekil 4. 7. Mikrostatik kültür koşullarında, farklı zaman noktalarında (0., 1. ve 4. günler) çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde Cultrex hidrojel matriksi içerisinde kültüre edilen iAD-MKH mikroskobik görüntüleri. Hücreler, üç boyutlu bir kültür ortamı oluşturmak amacıyla Cultrex bazlı hidrojel içerisine gömülmüş ve mikroakışkan çipin her bir ana kanalına (a–d) eşit hacimlerde eklenmiştir. Ortadaki şematik tasarım, dört ana kanalın (a–d) konumlandığı mikroakışkan çip geometrisini ve mikrostatik kültür koşullarındaki kanal düzenini göstermektedir.

4.6. Mikrostatik Kültür Koşullarında Hücre Canlılığına Ait Canlı/Ölü Boyama Sonuçları

Mikrostatik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH canlılığı, kültürün 4. gününde canlı/ölü boyama yöntemi analiz edildi. Hücre canlılığı analizi için Calcein-AM ve Propidium Iodide (PI) floresan boyaları kullanıldı. Floresan mikroskopta canlı hücreler yeşil ışınma verirken, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreler kırmızı ışınma sergilemektedir.

Floresan mikroskop görüntülerinde hücrelerin büyük çoğunluğunun Calcein-AM ile pozitif boyanarak, yoğun şekilde yeşil floresan sinyal verdiği gözlemlendi. PI ile boyanan kırmızı floresan sinyal veren hücre sayısının oldukça az olduğu görülmüştür.

Mikrostatik kültür koşullarında hücre canlılık oranının yaklaşık %95–100 aralığında, ölü hücre oranı ise düşük seviyede tespit edildi (Şekıl 4.7.).



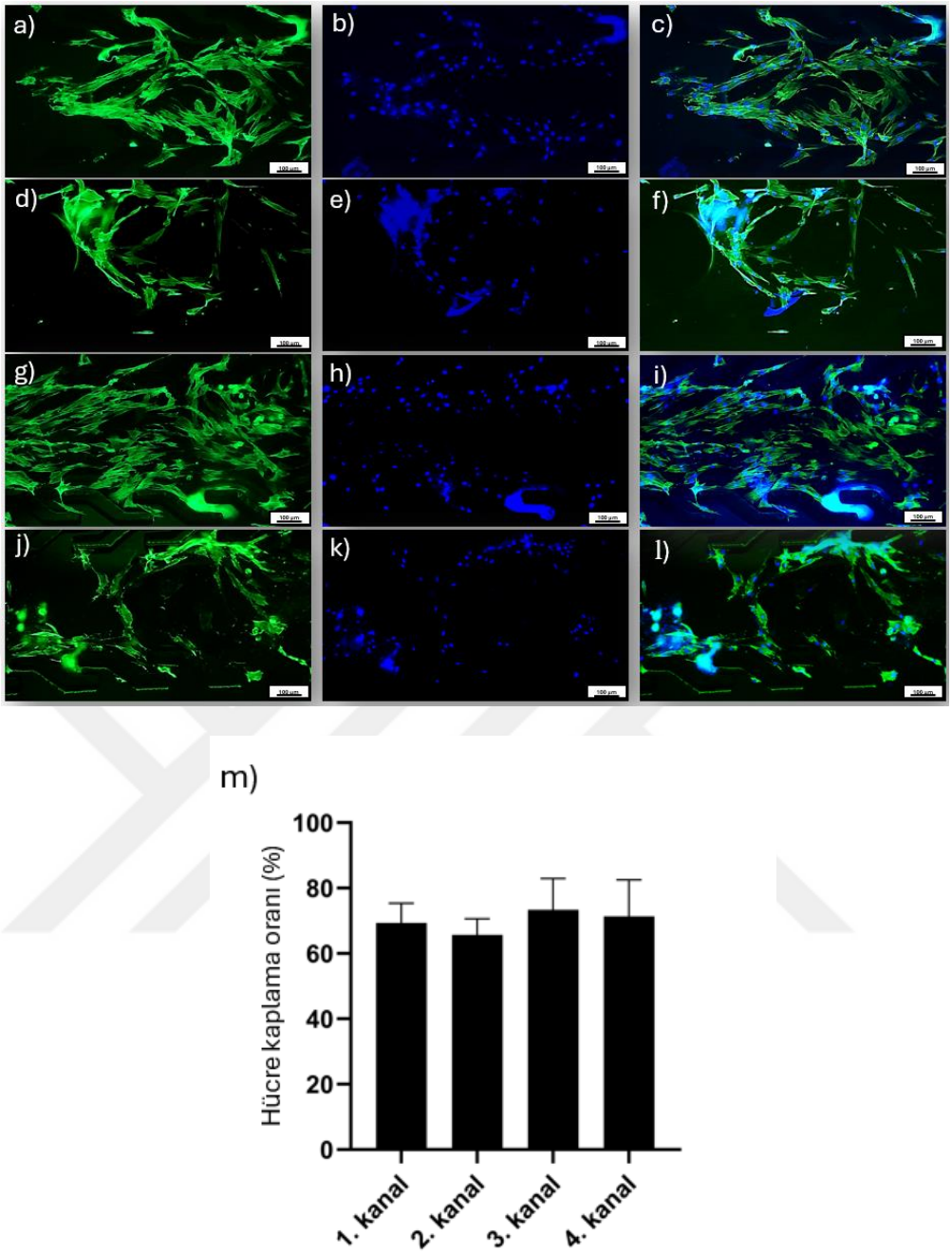
Şekil 4. 8. Mikrostatik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) 4. gündeki canlı/ölü boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri (5× büyütme). (a), (b), (c) ve (d) panelleri mikroakışkan çipin farklı kanallarına ait görüntüleri göstermektedir**.** Canlı hücreler Calcein-AM ile yeşil floresan, ölü hücreler ise Propidium Iodide (PI) ile kırmızı floresan sinyal vermektedir. e) Mikroakışkan çipin 1., 2., 3. ve 4. kanallarında hücre canlılık oranlarının (%) karşılaştırmalı analizi.

4.7. Mikrostatik Kültür Koşullarında DAPI ve Phalloidin Boyama Analizi

Mikrostatik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) hücresel morfolojileri kültürün 4. gününde DAPI ve Phalloidin boyama analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.8.).

Phalloidin boyaması ile aktin sitoskeletonunun hücreler içerisinde belirgin şekilde organize olduğu ve hücrelerin tipik fibroblast benzeri, uzamış ve iğsi morfoloji sergilediği gözlemlendi. DAPI boyaması ile hücre çekirdeklerinin düzenli, bütünlüğünü koruyan ve homojen bir dağılım gösterdiği tespit edildi. Birleştirilmiş (merge) görüntülerde, çekirdek ve sitoskeletal yapıların uyumlu bir şekilde organize olduğu ve hücrelerin çip yüzeyine güçlü şekilde tutunduğu gözükdü.

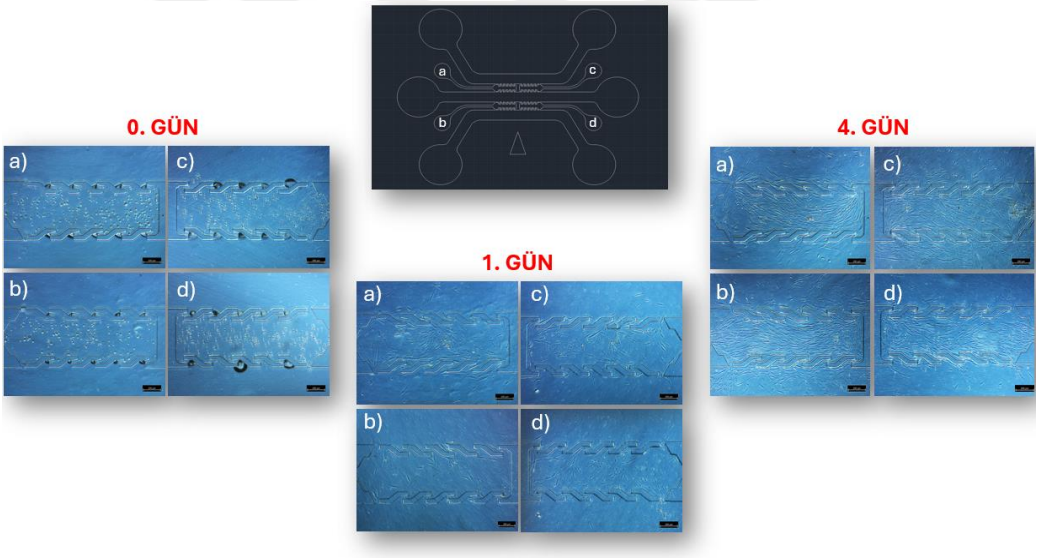
Bu bulgular, mikroakışkan çip ortamında kültüre edilen iAD-MKH'lerin canlılığını ve yapısal bütünlüğünü koruyarak uygun şekilde yayılım ve tutunma gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 9. Mikrostatik kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH 4. günde gerçekleştirilen Phalloidin ve DAPI boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri. (a, d, g, j) Phalloidin ile boyanmış aktin sitoskeleton görüntüleri (yeşil), (b, e, h, k) DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi) ve (c, f, i, l) birleştirilmiş (merge) görüntüleri göstermektedir. Görüntüler mikroakışkan çipin dört farklı kanalından elde edilmiştir. m) hücrelerin bir mikrokanalda kapladığı alan yüzdesini (kanal doluluk oranı) göstermektedir. Ölçek çubuğu: 100 µm.

4.8. Mikroakışkan Kültür Koşullarında İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Zamana Bağlı Morfolojik Analizi

Mikroakışkan kültür koşullarında iAD-MKH'lerin zamana bağlı morfolojik değişimleri floresan ve faz kontrast mikroskop görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Şekillerde mikroakışkan çip üzerinde 0., 1. ve 4. günlere ait hücre görüntüleri sunulmaktadır. Kültürün başlangıcında (0. gün) hidrojel matriksi içerisinde homojen dağılım gösteren hücreler belirli bir yoğunlukta tespit edildi. Kültürün 1. gününde, hücrelerin yüzeye tutunma ve ortama adaptasyon sürecine bağlı olarak hücre sayısında azalma gözlemlendi. Takip eden süreçte mikroakışkan ortamda kültüre edilen hücrelerin proliferasyon gösterdiği ve 4. günde hücre sayısında belirgin bir artış olduğu belirlendi. (Şekil 4.9.).



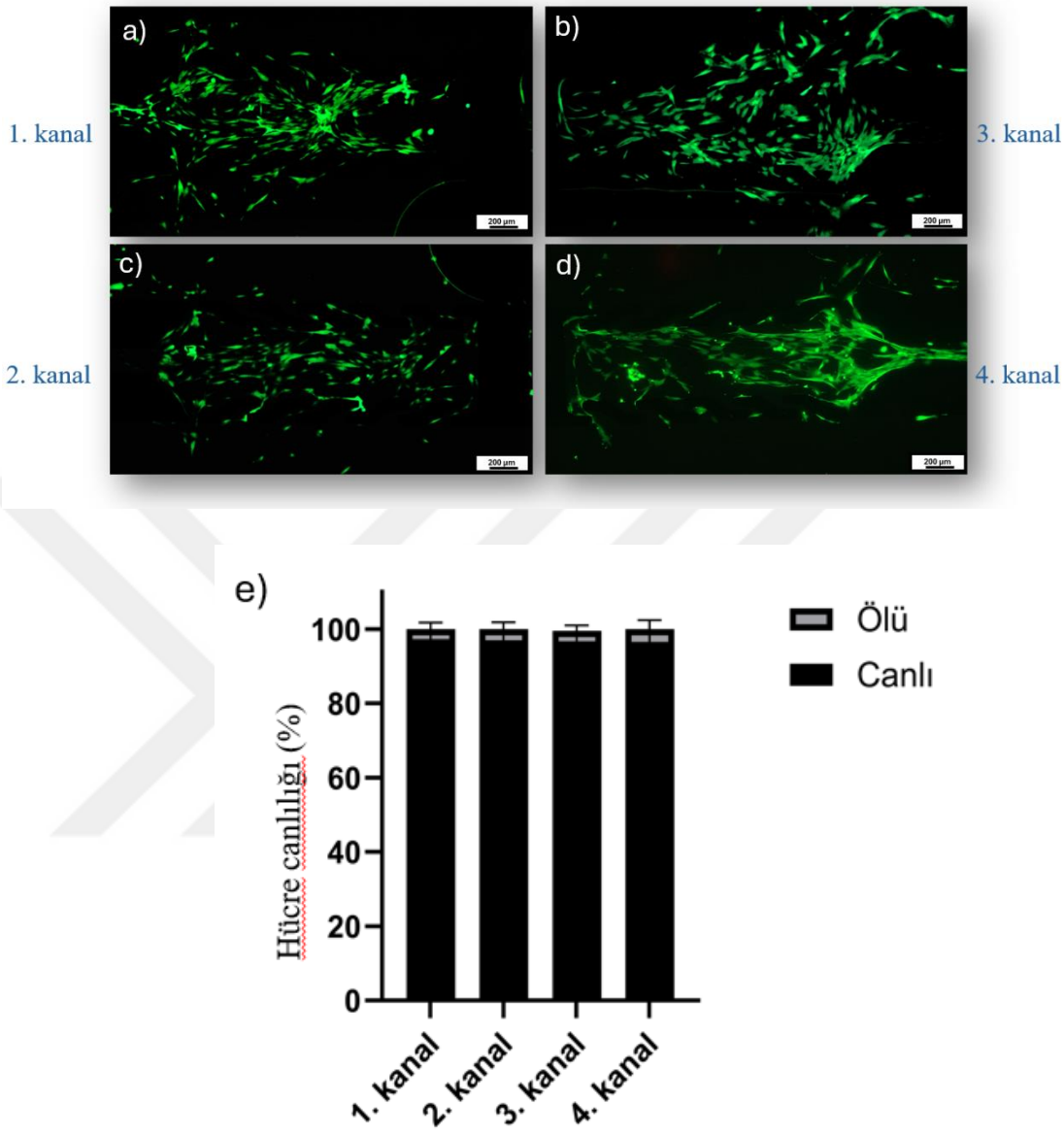
Şekil 4. 10. Mikroakışkan kültür koşullarında, farklı zaman noktalarında (0., 1. ve 4. günler) çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde Cultrex hidrojel matriksi içerisinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) mikroskobik görüntüleri. Hücreler, üç boyutlu bir kültür ortamı oluşturmak amacıyla Cultrex bazlı hidrojel içerisine gömülmüş ve mikroakışkan çipin her bir ana kanalına (a–d) eşit hacimlerde eklenmiştir. Ortadaki şematik tasarım, dört ana kanalın (a–d) konumlandığı mikroakışkan çip geometrisini ve mikrostatik kültür koşullarındaki kanal düzenini göstermektedir.

Morfolojik incelemelerde, mikroakışkan çip ortamında kültüre edilen hücrelerin zamanla yayılım gösterdiği ve kültür süresinin ilerlemesiyle daha belirgin hücresel organizasyon sergilediği gözlenmiştir.

4.9. Mikroakışkan Kültür Koşullarında Hücre Canlılığına Ait Canlı/Ölü Boyama Sonuçları

Mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH'lerin canlılığı, kültürün 4. gününde canlı/ölü boyama analiz edildi. Hücre canlılığı analizi için Calcein-AM ve Propidium Iodide (PI) floresan boyaları kullanıldı. Floresan mikroskopta canlı hücreler yeşil ışınma verirken, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreler kırmızı ışınma sergilemektedir.

Floresan mikroskop görüntülerinde hücrelerin büyük çoğunluğunun Calcein-AM ile pozitif boyanarak, yoğun şekilde yeşil floresan sinyal verdiği gözlemlendi. PI ile boyanan kırmızı floresan sinyal veren hücre sayısının oldukça az olduğu görülmüştür. Mikroakışkan kültür koşullarında hücre canlılık oranının yaklaşık %99–100 aralığında, ölü hücre oranı ise düşük seviyede tespit edildi (Şekil 4.10.).



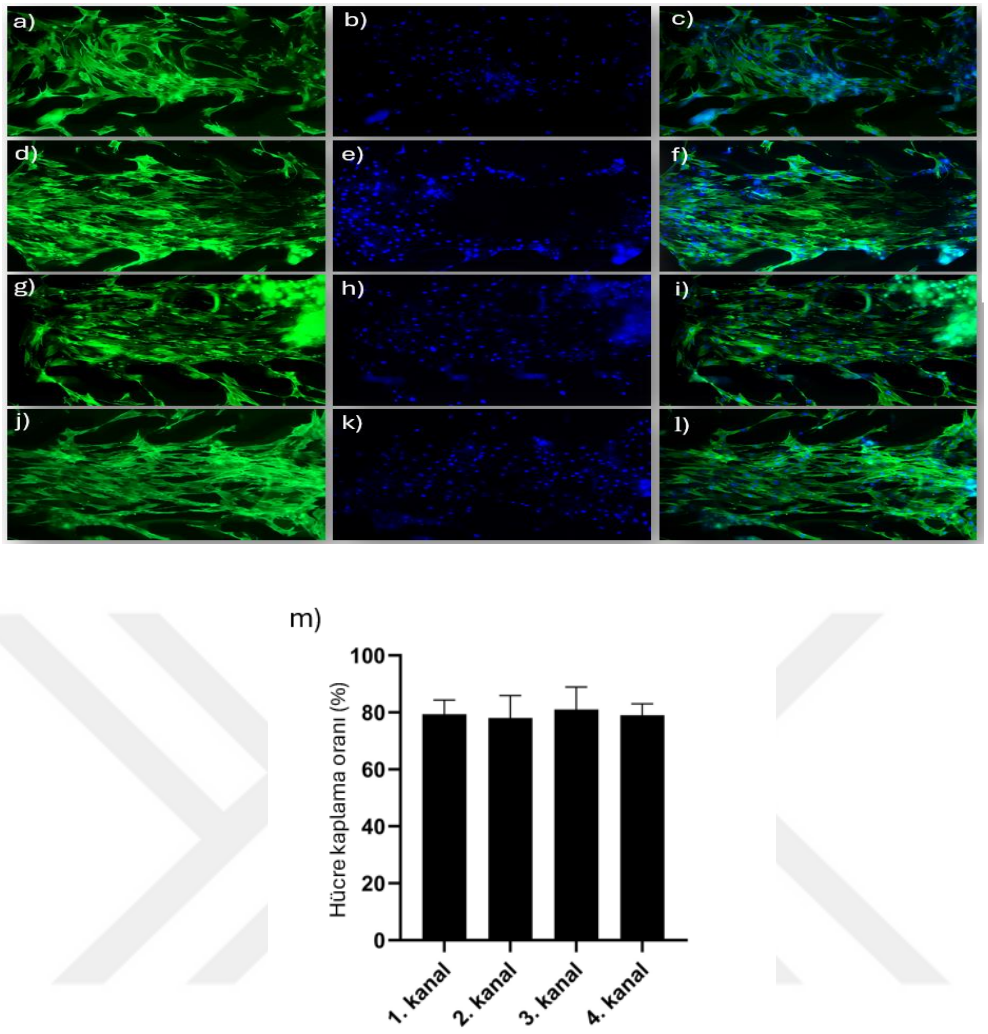
Şekil 4. 6. Mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) 4. günde canlı/ölü (Live/Dead) boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri (5× büyütme). Canlı hücreler Calcein-AM ile yeşil floresan, ölü hücreler ise Propidium Iodide (PI) ile kırmızı floresan sinyal vermektedir. (a–d) Mikroakışkan çipin farklı kanallarından elde edilen görüntüleri göstermektedir. e) Mikroakışkan çipin 1., 2., 3. ve 4. kanallarında hücre canlılık oranlarının (%) karşılaştırmalı analizi.

4.10. Mikroakışkan Kültür Koşullarında DAPI ve Phalloidin Boyama Analizi

Mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH'lerin hücresel morfolojileri kültürün 4. gününde DAPI ve Phalloidin boyama analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.).

Elde edilen floresan mikroskop görüntülerinde hücrelerin mikrokanallar boyunca yoğun şekilde tutunduğu ve yayılımını gösterdi. Phalloidin boyaması ile aktin filamentlerinin hücre boyunca uzandığı, hücrelerin uzun, iğsi ve fibroblast benzeri bir morfoloji sergilediği belirlendi. DAPI boyaması, çekirdeklerin düzenli dağılım gösterdiğini ve hücre yoğunluğunun kanallar boyunca homojen olduğunu gösterdi.

Bu bulgular, mikroakışkan çip ortamında kültüre edilen iAD-MKH'lerin yüksek canlılıklarını ve yapısal bütünlüklerini koruyarak uygun biçimde yayıldıklarını ve yüzeye etkili şekilde tutunduklarını ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 7. Mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAD-MKH) 4. günde gerçekleştirilen Phalloidin ve DAPI boyama analizine ait floresan mikroskop görüntüleri. (a, d, g, j) Phalloidin ile boyanmış aktin sitoskeleton görüntüleri (yeşil), (b, e, h, k) DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (mavi) ve (c, f, i, l) birleştirilmiş (merge) görüntüleri göstermektedir. Görüntüler mikroakışkan çipin dört farklı kanalından elde edilmiştir. m) hücrelerin bir mikrokanalda kapladığı alan yüzdesini (kanal doluluk oranı) göstermektedir. Ölçek çubuğu: 100 µm.

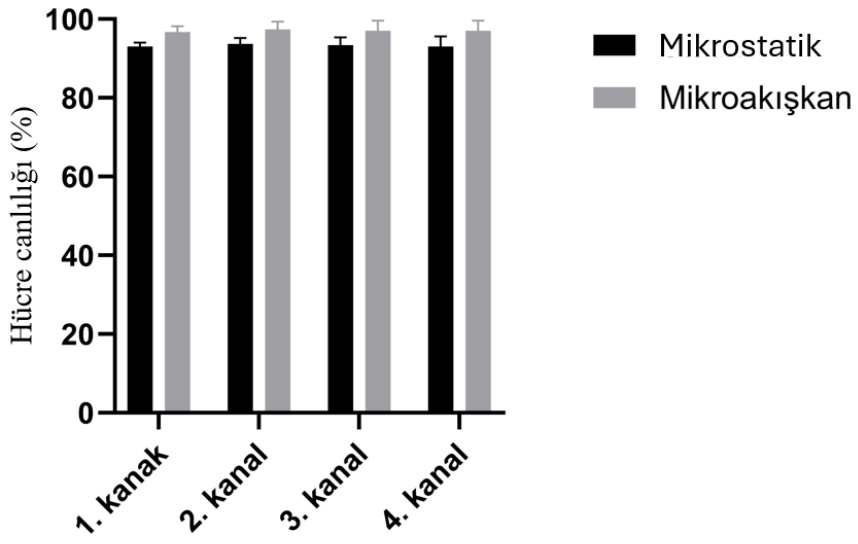
4.11. Mikrostatik ve Mikroakışkan Kültür Koşullarının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Mikrostatik ve mikroakışkan kültür koşullarında iAD-MKH'lerin canlılığı ve morfolojik özellikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Canlı/ölü boyama analizi

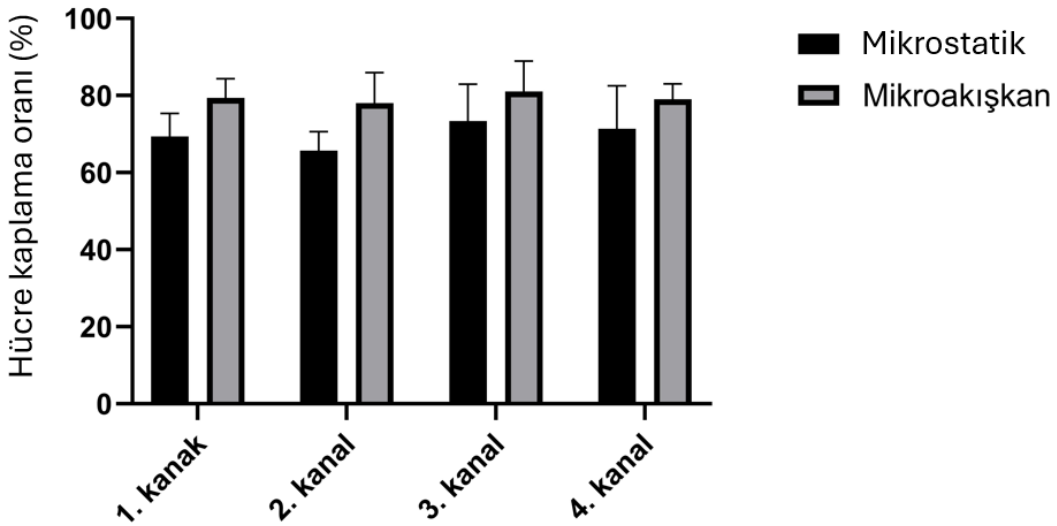
sonuçlarına göre her iki kültür koşulunda da hücrelerin yüksek oranda canlılığını koruduğu tespit edildi. Bununla birlikte, mikroakışkan çip ortamında kültüre edilen hücrelerde canlılık oranının statik kültüre kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi (mikrostatik kültür ≈ %95, mikroakışkan kültür ≈ %99).

Floresan mikroskopi görüntülerinde mikroakışkan kültür koşullarında hücrelerin çip yüzeyine homojen şekilde dağıldığı ve daha belirgin hücresel yayılım gösterdi. DAPI ve Phalloidin boyamaları, mikroakışkan sistemde kültüre edilen hücrelerde çekirdek bütünlüğünün korunduğunu ve aktin sitoskeletonunun düzenli bir organizasyon sergilediğini ortaya koydu. Mikrostatik kültür koşullarında da benzer morfolojik özellikler izlenmekle birlikte, mikroakışkan ortamın hücre tutunması ve yayılımı açısından daha elverişli bir mikroçevre sağladığı değerlendirildi.

Elde edilen bu bulgular, mikroakışkan çip sisteminin iAD-MKH kültürü için uygun bir platform sunduğunu ve hücre canlılığı ile morfolojik bütünlüğün korunmasında mikrostatik kültüre kıyasla avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.13. Mikrostatik ve mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip kültürü üzerinde elde edilen iAD-MKH'lerin hücre canlılığı sonuçları. Canlı/Ölü boyama analizi sonucu, 1., 2., 3. ve 4. kanallarda mikroakışkan kültür grupları hücre canlılığının mikrostatik kültüre kıyasla daha yüksek belirlenmiştir. Siyah sütunlar mikrostatik kültür, gri sütunlar ise mikroakışkan olarak temsil edilmektedir. Veriler yüzde (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.14. Mikrostatik ve mikroakışkan kültür koşullarında çok kanallı mikroakışkan çip üzerinde kültürlenen iAD-MKH'lerin hücre kaplama oranlarının karşılanması. Grafik, 1., 2., 3. ve 4. kanallarda kusursuz yüzey kaplama yüzdelerini göstermektedir. Mikroakışkan kültür grubundaki tüm kanallarda hücre kaplama mikrostatik kültürden daha yüksek olduğu belirlendi. Veriler yüzde (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Mikroakışkan sistemler, 2B hücre kültürlerine kıyasla daha az reaktif tüketimi, kontrollü mikroçevre koşulları ve fizyolojik ortama daha yakın kültür imkanı nedeniyle son yıllarda doku mühendisliği ve hücre biyolojisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Sart vd., 2022).

Fotolitografi yöntemi ile üretilen SU-8 master kalıbın yüksek geometrik doğrulukta elde edilmesi, mikrokanalların istenilen boyut ve şekilde üretilebilmesini sağlamıştır. SU-8 bazlı kalıp kullanımı, literatürde mikroakışkan çip üretimi için en uygun yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Vanderpoorten vd., 2019). Bu çalışmada da SU-8 kalıp üzerinden üretilen PDMS yapının kanalları yüksek çözünürlükte ve deformasyonsuz olmuştur.

PDMS–cam ile bağlanma (bonding) işlemi sonrasında elde edilen çiplerin şeffaflığını koruduğu, kanal yapılarında çökme, deformasyon veya sızdırma oluşmadığı tespit edildi. PDMS'in optik şeffaflığı ve biyouyumluluğu, floresan mikroskopi uygulamaları için önemli bir avantaj sağlamaktadır (Torino, S ve ark., 2018).

Bu çalışmada üretilen çok kanallı mikroakışkan çip sisteminin yapısal güvenilirliğini ve deney koşullarına uygun olabilirliğini değerlendirmek amacıyla sızdırmazlık testi yapıldı. Test kapsamında mikrokanallara BME (Cultrex®) jel içine karıştırılan mavi gıda boyası verildi ve çip 24 saat süreyle inkübatörde bekletildi. Yapılan mikroskobik incelemelerde, mikrokanal sınırları boyunca boyanın kanallar dışına çıkmadığı, PDMS–cam ara yüzeyinde sızıntı veya kanal yapısında bozulma görülmedi. Ayrıca, çip yapısında deformasyon, çökme veya optik şeffaflık kaybı gibi sorunlara rastlanmadı.

Güncel literatürde, PDMS ve benzeri elastomerik mikroakışkan çiplerin bağlama kalitesi ve sızdırmazlık davranışı üzerine yapılan çalışmalar, sızdırmazlık testlerinin özellikle uzun süreli akış ve hücre kültürü koşulları altında cihaz performansı açısından kritik olduğunu vurgulamaktadır. Borók ve arkadaşlarının derlemesinde, PDMS ile farklı malzemeler arasındaki bağlama tekniklerinin mikrokanal stabilitesi ve sızdırmazlık üzerindeki etkileri ayrıntılı şekilde değerlendirilmiştir, bu da çip üretiminde yüzey aktivasyonu ve bağlama kalitesinin deneyin başarısında önemli olduğunu göstermektedir (Borók vd., 2021).

Başka bir güncel çalışma, mikroakışkan çip tasarımının ve üretim süreçlerinin sızdırmazlık davranışını doğrudan etkilediğini rapor ederek, çip yapısının mikroakışkan ortamda stabil kalması için uygun üretim ve bağlama stratejilerinin benimsenmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Cameron vd, 2022).

Bu çalışmada elde edilen sızdırmazlık bulguları, güncel literatürde bildirilen başarılı mikroakışkan çip üretim ve bağlama protokolleri ile uyumlu olup, geliştirilen mikroakışkan platformun deneysel uygulamalar için güvenli, stabil ve sızdırmaz bir mikroçevre sunduğunu göstermektedir.

Hidrojelin hücre canlılığını destekleme kapasitesini değerlendirmek amacıyla, iAD-MKH'ler hidrojel içerisinde üç boyutlu olarak kültüre edilmiş ve kültürün 4. gününde Live/Dead boyama analizi gerçekleştirildi. Live/Dead boyama analizi sonucunda hücre canlılığının yaklaşık %75–80 düzeyinde olduğu gözlemlendi. Bu durum, kullanılan hidrojelin hücreler için üç boyutlu bir destek matriksi sağlayarak hücre yaşamını sürdürebildiğini göstermektedir. Bu bulgu, bazal membran ekstraktı temelli hidrojellerin hücreler için uygun bir üç boyutlu mikroçevre sağlayabildiğini bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (Xu.S vd 2024).

Bununla birlikte, hidrojel içerisinde statik koşullarda gerçekleştirilen kültürde besin maddeleri ve oksijenin yalnızca difüzyon yoluyla taşınması, metabolik atıkların ortamdan uzaklaştırılmasının sınırlı kalmasına neden olmuş olabilir. Nitekim mikroakışkan kültür grubunda elde edilen daha yüksek hücre canlılığı sonuçları, dinamik akış koşullarının hücrelere daha uygun bir mikroçevre sağladığını ve hücre canlılığının korunmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

Mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH canlılığı, kültürün 4. gününde Canlı/Ölü boyama yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla, canlı hücrelerde esteraz aktivitesi sonucu yeşil floresan veren Calcein-AM ve membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin çekirdeğine bağlanarak kırmızı floresan sinyal oluşturan Propidium Iodide (PI) floresan boyaları kullanıldı. Floresan mikroskop altında elde edilen görüntülerin değerlendirilmesi sonucunda, mikrostatik kültür koşullarında hücre canlılığının yaklaşık %95 düzeyinde olduğu belirlenirken, mikroakışkan kültür koşullarında bu oranın yaklaşık %99'a ulaştığı saptanmıştır. Bu bulgular, mikroakışkan çip ortamının hücreler için daha uygun ve

kontrollü bir mikroçevre sağladığını, hücre canlılığını yüksek oranda koruduğunu ve mikrostatik kültüre kıyasla daha elverişli bir kültür ortamı sunduğunu göstermektedir.

Literatürde benzer şekilde, Jeong Hwa Kim ve arkadaşları tarafından mikroakışkan çip sisteminde insan hepatosellüler karsinom hücreleri (HepG2) kültüre edilmiş ve hücre canlılığının değerlendirilmesi amacıyla canlı olarak Calcein-AM, ölü hücreler ise Ethidium Homodimer-1 ile boyanmıştır. Sonuç olarak hücre canlılığının yaklaşık %95 olduğu rapor edilmiştir (Kim vd., 2019).

Bizim çalışmamızda elde edilen canlılık oranlarının, literatürlerdeki bu değerlerle uyumlu olduğu ve özellikle mikroakışkan kültür koşullarında daha yüksek bir canlılıklara ulaşılması, kullandığımız çip sisteminin uygun ve biyouyumlu olduğunu göstermektedir.

Mikroakışkan çip üzerinde kültüre edilen iAD-MKH'lerin morfolojik özellikleri ve sitoskeletal organizasyonu, kültürün 4. gününde DAPI/Phalloidin boyama yöntemi ile değerlendirildi. Hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi amacıyla DAPI boyası kullanılırken, aktin filamentlerinin organizasyonunu belirlemek için Phalloidin ile boyama gerçekleştirildi. Elde edilen floresan mikroskop görüntülerinin incelenmesi sonucunda, her iki kültür koşulunda da hücrelerin yüzeye tutunabildiği ve karakteristik morfolojilerini koruduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, mikroakışkan kültür koşullarında hücrelerin daha belirgin şekilde yayılım gösterdiği, aktin filament organizasyonunun daha düzenli olduğu ve hücreler arası etkileşimin arttığı tespit edildi. Mikrostatik kültür koşullarında ise hücre yayılımının daha sınırlı olduğu ve sitoskeletal organizasyonun nispeten daha düzensiz olduğu gözlemlendi. Bu bulgular, mikroakışkan sistemin hücre adezyonu, yayılımı ve morfolojik organizasyonu açısından daha uygun bir mikroçevre sağladığını ortaya koymaktadır.

Literatürde, 2023 yılında yayımlanan ve stromal ile pankreas kanseri hücreleri arasındaki iletişimi sağlayan PDAC-on-chip çalışması, mikroakışkan platformda kültüre edilen morfolojik değerlendirilmesi amacıyla DAPI ve Phalloidin boyamaları kullanılmış ve hücresel morfolojisi ile aktin sitoskeletonunun düzenli olarak organize edilmiştir. Hücrelerin uygun şekilde yayıldığı ve ince yapılarının iyi korunduğu rapor edilmiştir (Sgarminato vd., 2023).

Kim ve arkadaşları (2016), çok kanallı mikroakışkan bir çip sistemi kullanarak 3B hücre kültürü ortamında interstisyel akışın endotelyal hücre davranışları üzerindeki

etkisini incelemişlerdir. Geliştirilen modelde, hücrelerin hidrojel içerisinde organize olarak mikrovasküler ağ yapıları oluşturduğu ve zamanla anjiyojenik tomurcuklanma gösterdiği rapor edilmiştir. Çalışmada özellikle mikroakışkan akış koşullarının hücre morfolojisi, organizasyonu ve fenotipi üzerinde belirleyici bir rol oynadığı vurgulanmıştır. Ayrıca, interstisyel akışın varlığında vasküler yapı oluşumunun hızlandığı ve hücresel yeniden yapılanmanın dinamik olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu bulgular, bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Nitekim mikroakışkan kültür koşullarında hücrelerin daha düzenli bir organizasyon sergilediği, aktin sitoskeletonunun (Phalloidin boyama) daha belirgin olduğu ve hücre çekirdeklerinin (DAPI boyama) homojen dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Buna karşılık statik kültür koşullarında hücresel organizasyonun daha sınırlı olduğu değerlendirilmiştir.(Kim. S vd 2016)

Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular da bu literatürlerle uyumlu olup, mikroakışkan çip ortamının iAD-MKH seçeneklerinin morfolojik bütünlüğünü ve sitoskeletal organizasyonunu korumak için uygun bir mikroçevre gösterdiğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, insan adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin üç boyutlu kültürü için çok kanallı bir mikroakışkan çip sistemi tasarlanıp, üretilerek biyolojik açıdan değerlendirildi. AutoCAD uygulamasıyla tasarlanan mikroakışkan çip, fotolitografi yöntemi ile SU-8 mikrokanal kalıbı oluşturularak PDMS kullanımıyla başarıyla üretildi ve cam yüzey ile bağlandı.

iAD-MKH'lerin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Mezenkimal kök hücre fenotipine uygun olarak CD73, CD90, CD105, CD44 ve CD29 belirteçlerini yüksek oranda eksprese ettiği, hematopoetik belirteçlerin ise negatif olduğu belirlendi.

Mikrostatik ve mikroakışkan kültür koşulları altında saklanan hücre canlılığı analizlerinde, canlı/ölü boyama yöntemi kullanıldı ve her iki kültür koşulunda da yüksek hücre canlılığı tespit edildi. Mikroakışkan kültür koşullarında elde edilen daha yüksek canlılık oranları, kontrollü mikroçevre ve sürekli besin değişiminin hücre sağkalımı üzerindeki olumlu sonuçlar ortaya çıktı. DAPI ve Phalloidin boyamaları ile yapılan morfolojik analizlerde, hücre çekirdeklerinin düzenli dağılım gösterdiği ve aktin sitoskeletonunun iyi organize olmuş filamentöz bir yapı sergilediği belirlendi. Elde edilen tüm bulgular, mikroakışkan çip sistemi iAD-MKH'lerin üç boyutlu kültür ve uzun süreli takibi için uygun bir platform sağladığını göstermektedir.

Bu mikroakışkan çip sistemi, iAD-MKH'lerin kısa süreli kültür ve canlılık analizleri için uygun koşullara sahiptir. Gelecekteki mikroakışkan çip ortamında daha uzun süre kültüre edilerek farklılaşma potansiyelleri (osteojenik, adipogenik ve kondrojenik) değerlendirilebilir. Ayrıca mikroakışkan çip sisteminin farklı hücre türleri ile kullanılması mümkündür. Bu çok kanallı çip modelinde dört farklı hücre türü aynı anda kültür edilebilir. Aynı zamanda mikroakışkan çip üzerinde ilaç uygulamalarının gerçekleştirilmesi ve hücre canlılığı ile morfolojisi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, ilaç tarama ve dayanıklılık çalışmaları için kullanılma potansiyeline sahiptir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Akceoglu, G. A., Saylan, Y., & Inci, F. (2021). Point-of-care diagnostics: A snapshot of microfluidics in point-of-care diagnostics: Multifaceted integrity with materials and sensors. *Advanced Materials Technologies, 6*(7), 2170037.

Akther, F., Yakob, S. B., Nguyen, N.-T., & Ta, H. T. (2020). Surface modification techniques for endothelial cell seeding in PDMS microfluidic devices. *Biosensors, 10*(11), 182.

Al-Ghadban, S., & Bunnell, B. A. (2020). Adipose tissue-derived stem cells: Immunomodulatory effects and therapeutic potential. *Physiology, 35*(2), 125–133.

Baker, J. P., Stephens, D. R., Blanch, H. W., & Prausnitz, J. M. (1992). Swelling equilibria for acrylamide-based polyampholyte hydrogels. *Macromolecules, 25*(7), 1955–1958.

Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A., Mujtaba, M., Alghamdi, N., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and applications. *Polymers, 12*(11), 2702.

Benwood, C., Chrenek, J., Kirsch, R. L., Masri, N. Z., Richards, H., Teetzen, K., & Willerth, S. M. (2021). Natural biomaterials and their use as bioinks for printing tissues. *Bioengineering, 8*(2), 27.

Berthier, E., Young, E. W., & Beebe, D. (2012). Engineers are from PDMS-land, biologists are from polystyrenia. *Lab on a Chip, 12*(7), 1224–1237.

Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology, 32*(8), 760–772.

Borók, A., Laboda, K., & Bonyár, A. (2021). PDMS bonding technologies for microfluidic applications: A review. *Biosensors, 11*(8), 292.

Cameron, T. C., Randhawa, A., Grist, S. M., Bennet, T., Hua, J., Alde, L. G., Caffrey, T. M., Wellington, C. L., & Cheung, K. C. (2022). PDMS organ-on-chip design and fabrication: Strategies for improving fluidic integration and chip robustness. *Micromachines, 13*(10), 1573.

Cascone, S., & Lamberti, G. (2020). Hydrogel-based commercial products for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics, 573*, 118803.

Chuah, Y. J., Koh, Y. T., Lim, K., Menon, N. V., Wu, Y., & Kang, Y. (2015). Simple surface engineering of polydimethylsiloxane with polydopamine for stabilized mesenchymal stem cell adhesion. *Scientific Reports, 5*, 18162.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Chung, T.-W., Tyan, Y.-C., Lin, S.-W., Yang, M.-H., Liu, Y.-H., & Wang, R.-P. (2021). Developing photothermal-responsive and anti-oxidative silk/dopamine nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules, 185*, 122–133.

Ding, D.-C., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation, 20*(1), 5–14.

Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., & Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology, 24*(4), 150–154.

Fugger, L., Jensen, L. T., & Rossjohn, J. (2020). Challenges, progress, and prospects of developing therapies to treat autoimmune diseases. Cell, 181(1), 63-80.

Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., & Dzau, V. J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research, 103*(11), 1204–1219.

Gray, B. L., Lieu, D. K., Collins, S. D., Smith, R. L., & Barakat, A. I. (2002). Microchannel platform for the study of endothelial cell shape and function. *Biomedical Microdevices, 4*(1), 9–16.

Hadley, M. A., Byers, S. W., Suárez-Quian, C. A., Kleinman, H. K., & Dym, M. (1985). Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation. *The Journal of Cell Biology, 101*(4), 1511–1522.

Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., & Fleming, R. M. (2015). Advantages and challenges of microfluidic cell culture in PDMS devices. *Biosensors and Bioelectronics, 63*, 218–231.

Ho, T.-C., Chang, C.-C., Chan, H.-P., Chung, T.-W., Shu, C.-W., Chuang, K.-P., Duh, T.-H., Yang, M.-H., & Tyan, Y.-C. (2022). Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules, 27*(9), 2902.

Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics, 10*(9), 1886–1890.

Jastrzebska, E., Zuchowska, A., Flis, S., Sokolowska, P., Bulka, M., Dybko, A., & Brzozka, Z. (2018). Biological characterization of modified PDMS surfaces. *Biomicrofluidics, 12*(4).

Jose, G., Shalumon, K., & Chen, J.-P. (2020). Natural polymers based hydrogels for cell culture applications. *Current Medicinal Chemistry, 27*(16), 2734–2776.

Khazaei, S., Keshavarz, G., Bozorgi, A., Nazari, H., & Khazaei, M. (2022). Adipose tissue-derived stem cells: Isolation and differentiation methods. *Cell and Tissue Banking, 23*(1), 1–16.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kim, J. H., Park, J. Y., Jin, S., Yoon, S., Kwak, J.-Y., & Jeong, Y. H. (2019). A microfluidic chip embracing a nanofiber scaffold. *Nanomaterials, 9*(4), 588.

Kim, S., Chung, M., Ahn, J., Lee, S., & Jeon, N. L. (2016). Interstitial flow regulates the angiogenic response and phenotype of endothelial cells in a 3D culture model. *Lab on a Chip, 16*(21), 4189-4199.

Kleinman, H. K. (1998). Preparation of gelled substrates. *Current Protocols in Cell Biology*, 10.13.1–10.13.19.

Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology, 15*(5), 378–386.

Li, C., He, W., Song, Y., Zhang, X., Sun, J., & Zhou, Z. (2024). Advances of 3D cell co-culture technology based on microfluidic chips. *Biosensors, 14*(7), 336.

Li, W., Li, K., Wei, W., & Ding, S. (2013). Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell, 13*(3), 270–283.

Li, Z., Hu, X., & Zhong, J. F. (2019). Mesenchymal stem cells: characteristics, function, and application. Stem cells international, 2019, 8106818.

Liang, Y., He, J., & Guo, B. (2021). Functional hydrogels as wound dressing. *ACS Nano, 15*(8), 12687–12722.

Lin, C.-Y., Battistoni, C. M., & Liu, J. C. (2021). Redox-responsive hydrogels. *Biomacromolecules, 22*(12), 5270–5280.

Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. Stem cell research & therapy, 13(1), 429.

Mafi, P., Hindocha, S., Mafi, R., Griffin, M., & Khan, W. (2011). Adult mesenchymal stem cells. *The Open Orthopaedics Journal, 5*, 253.

Margiana, R., Markov, A., Zekiy, A. O., et al. (2022). Clinical application of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy, 13*(1), 366.

Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., & Malka, G. (2019). Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MKHs). International journal of molecular sciences, 20(10), 2523.

Miranda, I., Souza, A., Sousa, P., Ribeiro, J., Castanheira, E. M., Lima, R., & Minas, G. (2021). Properties and applications of PDMS. *Journal of Functional Biomaterials, 13*(1), 2.

Mishra, V. K., Shih, H.-H., Parveen, F., et al. (2020). Therapeutic significance of mesenchymal stem cells. *Cells, 9*(5), 1145.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Niculescu, A.-G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and applications of microfluidic devices. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(4), 2011.

Ning, L., Zhu, N., Mohabatpour, F., Sarker, M., Schreyer, D. J., & Chen, X. (2019). Bioprinting Schwann cell-laden scaffolds from low-viscosity hydrogel compositions. Journal of Materials Chemistry B, 7(29), 4538-4551.

Ong, W. K., Tan, C. S., Chan, K. L., et al. (2014). Cell-surface markers of adipose-derived stem cells. *Stem Cell Reports, 2*(2), 171–179.

Pattanayak, P., Singh, S. K., Gulati, M., Vishwas, S., Kapoor, B., Chellappan, D. K., Anand, K., Gupta, G., Jha, N. K., & Gupta, P. K. (2021). Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives. Microfluidics and nanofluidics, 25(12), 99.

Rajalekshmi, R., & Agrawal, D. K. (2025). Synergistic potential of stem cells and microfluidics in regenerative medicine. Molecular and Cellular Biochemistry, 480(3), 1481-1493.

Rodríguez-Fuentes, D. E., Fernández-Garza, L. E., Samia-Meza, J. A., et al. (2021). Mesenchymal stem cells clinical applications. *Archives of Medical Research, 52*(1), 93–101.

Sart, S., Ronteix, G., Jain, S., Amselem, G., & Baroud, C. N. (2022). Cell culture in microfluidic droplets. *Chemical Reviews, 122*(7), 7061–7096.

Sgarminato, V., Marasso, S. L., Cocuzza, M., et al. (2023). PDAC-on-chip modeling. *Biomaterials Science, 11*(1), 208–224.

Shin, Y., Han, S., Jeon, J. S., Yamamoto, K., Zervantonakis, I. K., Sudo, R., ... & Chung, S. (2012). Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nature protocols*, *7*(7), 1247-1259.

Si, Z., Wang, X., Sun, C., Kang, Y., Xu, J., Wang, X., & Hui, Y. (2019). Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. Biomedicine & Pharmacotherapy, 114, 108765.

Sia, S. K., & Whitesides, G. M. (2003). Microfluidic devices fabricated in PDMS. *Electrophoresis, 24*(21), 3563–3576.

Sollier, E., Murray, C., Maoddi, P., & Di Carlo, D. (2011). Rapid prototyping polymers. *Lab on a Chip, 11*(22), 3752–3765.

Sun, Y., Yang, C., Zhu, X., et al. (2019). 3D printing collagen/chitosan scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 107*(9), 1898–1908.

7.KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Tanyeri, M., & Tay, S. (2018). Viable cell culture in PDMS-based microfluidics. *Methods in Cell Biology, 148*, 3–33.

Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.-J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., & Splingard, M. (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 115(8), 1549-1553.

Titmarsh, D. M., Chen, H., Glass, N. R., & Cooper-White, J. J. (2014). Microfluidic technology platforms. *Stem Cells Translational Medicine, 3*(1), 81–90.

Torino, S., Corrado, B., Iodice, M., & Coppola, G. (2018). PDMS-based microfluidic devices for cell culture. *Inventions, 3*(3), 65.

Tseng, Y.-H. (2023). Adipose tissue in communication. *Nature Reviews Endocrinology, 19*(2), 70–71.

Upadhyaya, S., & Selvaganapathy, P. R. (2010). Microfluidic devices for cell based high throughput screening. Lab on a Chip, 10(3), 341-348.

Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M., & Berghmans, H. (2000). Gelatin hydrogels. *Biomacromolecules, 1*(1), 31–38.

Van Poll, M. L., Zhou, F., Ramstedt, M., Hu, L., & Huck, W. T. (2007). Chemical micropatterning of PDMS. *Angewandte Chemie International Edition, 46*(35), 6634–6637.

Vanderpoorten, O., Peter, Q., Challa, P. K., Keyser, U. F., Baumberg, J., Kaminski, C. F., & Knowles, T. P. (2019). Scalable integration of nano-, and microfluidics with hybrid two-photon lithography. Microsystems & nanoengineering, 5(1), 40.

Vukicevic, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., et al. (1992). Growth factors in Matrigel. *Experimental Cell Research, 202*(1), 1–8.

Vuorenpää, H., Ohlsbom, R., Tornberg, K., Kalke, E., Sheard, J., Kallio¹, P., ... & Biomedicals, U. P. M. Seven-day 3D stem cell culture under active flow in Organ-on-Chip with GrowDex®-T.

Wang, Y., Fang, J., Liu, B., Shao, C., & Shi, Y. (2022). Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. Cell stem cell, 29(11), 1515-1530.

Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. nature, 442(7101), 368-373.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Wu, H.-W., Lin, C.-C., & Lee, G.-B. (2011). Stem cells in microfluidics. *Biomicrofluidics, 5*(1).

Wysoczański, B., Świątek, M., & Wójcik-Gładysz, A. (2024). Organ-on-a-Chip Models—New Possibilities in Experimental Science and Disease Modeling. Biomolecules, 14(12), 1569.

Yeo, L. Y., Chang, H. C., Chan, P. P., & Friend, J. R. (2011). Microfluidic devices for bioapplications. *Small, 7*(1), 12–48.

Young, E. W., & Beebe, D. J. (2010). Fundamentals of microfluidic cell culture. *Chemical Society Reviews, 39*(3), 1036–1048.

Zhang, J., Wei, X., Zeng, R., Xu, F., & Li, X. (2017). Stem cell culture and differentiation in microfluidic devices toward organ-on-a-chip. Future science OA, 3(2), FSO187.

Zhu, J. (2010). Bioactive modification of PEG hydrogels. *Biomaterials, 31*(17), 4639–4656.