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

ÇİP ÜZERİNDE ORGAN ÇALIŞMALARINDA İNTRASELLÜLER ANALİZLER İÇİN MİKROFİLTRASYON GELİŞTİRİLMESİ

AYTAN HUMMATOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2026

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

ÇİP ÜZERİNDE ORGAN ÇALIŞMALARINDA İNTRASELLÜLER ANALİZLER İÇİN MİKROFİLTRASYON GELİŞTİRİLMESİ

AYTAN HUMMATOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HÜSEYİN AVCI

İKİNCİ DANIŞMAN

ÖĞR. GÖR. DR. HAMED GHORBANPOOR

Eskişehir, 2026

Proje No: ESOGÜ BAP FYL-2025-3402; TÜBİTAK 222M468 ve 20AG031

ÖZET

Başlık: Çip Üzerinde Organ Çalışmalarında İntrasellüler Analizler için Mikrofiltrasyon Geliştirilmesi.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, mikrofiltrasyon (MF) sistemi oluşturmak ve optimize ederek hücresel partiküllerin uzaklaştırılması ve hücre içi biyokütlenin etkin şekilde elde edilmesini sağlamaktır. Bu kapsamda Huh-7 ve insan Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin (iWJ-MKH) lizis öncesi ve sonrası olmak üzere iki aşamada filtrelenmiş; lizis öncesinde ayırma kapasitesi, lizis sonrasında ise DNA miktarı ve yoğunluk değişimleri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, geliştirilen MF sisteminin performansını ortaya koymuştur.

Yöntem: Bu tezde, mikroakışkan çip mikrokanallarına entegre edilen nanolifler kullanılarak Huh-7 ve MKH hücrelerinde filtrasyon uygulanmıştır. Hücre lizisi için termal ve kimyasal yöntemler kullanılmış ve etkileri karşılaştırılmıştır. Kimyasal lizis sonrası örnekler MF sisteminden geçirilmiş; filtrasyon öncesi/sonrası yoğunluk ölçümleri alınmış ve DNA miktarı kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Bulgular: iWJ-MKH hücreleri yüksek mezenkimal, düşük hematopoietik belirteç eksprese etmiştir. Poliakrilonitril (PAN) nanolifler nanoskalada çap ve gözenekli yapıya sahiptir. Termal liziste sıcaklık arttıkça yoğunluk yükselmiş, DNA miktarı kontrol grubuna göre düşmüştür. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri, kimyasal lizisin hücre parçalanmasında termal lizise göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Filtrasyon sonrası her iki hücre hattında yoğunluk azalırken, DNA'nın büyük oranda sistemden geçtiği belirlenmiştir.

Sonuç: Nanoliflerle modifiye edilmiş mikroakışkan mikrokanalların hücresel partikülleri etkin şekilde ayırarak DNA izolasyonunda yüksek verim sağladığını göstermiştir. Lizis karşılaştırmasında, belirlenen termal lizis koşullarının hücre bütünlüğünü koruduğu ve DNA veriminin daha düşük olduğu; kimyasal lizisin ise hücre bütünlüğünü bozarak daha yüksek DNA elde edilmesini sağladığı belirlenmiştir. Kimyasal lizis sonrası filtrasyonun yüksek verimlilik sağladığı görülmüş, geliştirilen sistemin Huh-7 ve MKH hücrelerinde uygulanabilir olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Mikroakışkan çip, Filtrasyon, MKH, Huh-7, DNA, Nanolif, Hücre Lizisi

ABSTRACT

Title: Development of Microfiltration for Intracellular Analyses in Organ-on-a-Chip Studies.

Objective: The aim of this study is to optimize a microfiltration (MF) system to remove cellular particles and efficiently obtain intracellular biomass. In this context, Huh-7 and iWJ-MKH cells were filtered in two stages, before and after lysis; separation capacity was evaluated before lysis, and DNA concentration and density changes were evaluated after lysis. The findings revealed the performance of the developed MF system.

Method: In this thesis, filtration was applied to Huh-7 and MKH cells using nanofibers integrated into microfluidic chip microchannels. Thermal and chemical methods were used for cell lysis, and their effects were compared. After chemical lysis, samples were passed through a microfiltration system; pre/post-filtration density measurements were taken, and DNA volume was analyzed in comparison with control groups.

Findings: iWJ-MKH cells expressed high mesenchymal and low hematopoietic markers. PAN nanofibers have a nanoscale diameter and porous structure. In thermal lysis, density increased as temperature increased, and DNA volume decreased compared to the control group. SEM analyses showed that chemical lysis was more effective than thermal lysis for the cell lysis. After filtration, while density decreased in both cell lines, it was determined that a large amount of DNA passed through the system.

Conclusion: This thesis demonstrates that microfluidic microchannels modified with nanofibers effectively isolate the cellular particles, achieving high yields in DNA isolation. In lysis comparisons, thermal lysis was found to preserve cell integrity while yielding lower DNA, while chemical lysis disrupted cell integrity, resulting in higher DNA yields. Filtration after chemical lysis was observed to provide high efficiency, and the developed system was shown to be applicable to Huh-7 and MKH cells.

Keywords: Microfluidic, Chip, MKH, Huh-7, DNA, Nanofiber, Cell Lysis

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI .....
ETİK BEYAN .....
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIMI BEYAN FORMU……..
TEŞEKKÜR .....
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT……**ii**
İÇİNDEKİLER……..**iii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **x**
1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Mikroakışkan Teknolojisi 4
2.1.1. Çip üzeri organ ve çip üzeri laboratuvar platformları 4
2.1.2. Avantajlar ve kısıtlamalar 8
2.2. Filtrasyon Teknolojileri 9
2.2.1. Membran ayırma yöntemleri 10
2.3. Mikroakışkan Çiplerle Filtrasyon Sistemleri 13
2.3.1. Mikroakışkan platformlarda hücre ayırma ve tanı 14
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler 16
2.5. Karaciğer Kanseri 19
2.5.1. HCC hücre hatları 21
2.5.2. Huh-7 hücrelerinin özellikleri ve çalışmalardaki önemi 26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **28**
3.1. Deney Protokolü 28
3.2. Hücrelerin Temini ve Kültüre Edilmesi 29
3.2.1. MKH'lerin deney öncesi canlılık ve proliferasyon testi 30
3.2.2. Hücrelerin karakterizasyonu 30
3.3. Çip Üretiminin Aşamaları 31
3.3.1. Çip tasarımı ve kalıp üretimi 31
3.3.2. Yumuşak litografi yöntemi ile çip üretimi 33

3.4. Elektro- eğirme Yöntemi ile Nanolif Üretimi 34
3.5. Mikrofiltrasyon Platformunun Oluşturulması 35
3.6. Termal ve Kimyasal Hücre Lizis Yöntemlerinin Karşılaştırılması 37
3.6.1. Huh-7 ve MKH hücrelerinin farklı derecelerde lizise maruz bırakılması 37
3.6.2. Huh-7 ve MKH hücrelerinde termal ve kimyasal lizis uygulamalarının hücre morfolojisine etkisinin görsel karşılaştırılması .. 38
3.7. Filtrasyon Çalışmaları 39
3.7.1. MKH ve Huh-7 hücrelerinin mikrofiltrasyon sisteminden geçirilmesi 39
3.7.2. Lizis edilmiş MKH ve Huh-7 hücrelerinin mikrofiltrasyon sisteminden geçirilmesi 40
4. BULGULAR 42
4.1. MKH'lerin Canlılık ve Proliferasyon Analiz Değerlendirilmesi 42
4.2. MKH'lerin Karakterizasyon Sonuçları 43
4.3. Nanoliflerin Karakterizasyon Sonuçları 45
4.4. Termal ve Kimyasal Lizis Uygulamalarının Karşılaştırmalı Sonuçları 46
4.4.1. Yoğunluk ölçümleri ve DNA sonuçlarının karşılaştırılması 46
4.4.2. Lizis işlemlerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkilerinin görsel analizi 50
4.5. MKH ve Huh-7 Hücrelerinin Filtrasyon Deneyinin Mikroskopik Görselleri. 52
4.6. Lizis Edilmiş Huh-7 ve MKH Hücrelerinin Filtrasyon Sonrası DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi 53
4.7. Lizis Edilmiş Huh-7 ve MKH Hücrelerinin Filtrasyon Öncesi ve Sonrası Yoğunluk Ölçümlerinin Sonuçları 55
5. TARTIŞMA 57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 67
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 69
8. EKLER DİZİNİ 75
EK-1. Etik Kurul Onayı
Ek-2. Turnitin Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ 78
10. YAYINLAMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI 79

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. HCC hücre hatları ve özellikleri (Puttahanumantharayappa, Sannappa Gowda et al. 2021). 25

Tablo 4. 1. Mezenkimal Kök Hücrelerin NanoDrop sonuçları. 49

Tablo 4. 2. Huh-7 hücrelerinin NanoDrop sonuçları. 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Membran filtrasyonu yöntemleri (Water Treatment Suppliers). 11

Şekil 2. 2. MKH'lerin hücresel ve moleküler özellikleri. MKH'ler çok yönlülük ve farklı CD belirteçleri sergiler. T hücresi ve B hücresi inhibisyonu yoluyla bağışıklık düzenlemesi ve M2 fenotipinin teşvik edilmesi için mükemmel adaylardır. Farklı büyüme düzenleyici ve inhibitör faktörlerin parakrin salgılanması, diğer hücreleri desteklemek için onlara farklı terapötik özellikler kazandırır (Prakash, Kim et al. 2023). 18

Şekil 2. 3. HCC patogenezini özetleyen şematik gösterim. A) yolunda, normal karaciğerin HBV, HCV, alkol ve aflatoksin gibi etkenlere maruziyeti kronik inflamasyon ve siroz gelişimine yol açar; bu süreçte düşük dereceli displastik nodüller (LGDN) yüksek dereceli displastik nodüllere (HGDN) ilerleyerek HCC oluşumuna katkı sağlar. B) yolunda ise yağlı karaciğer hastalığına bağlı artan oksidatif stres siroza neden olur ve benzer şekilde LGDN'den HGDN'ye ilerleyerek HCC gelişimini destekler. Şekil Biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Coffin and He 2023). 20

Şekil 3. 1. Çalışmanın şematik şekli……...29

Şekil 3. 2. Fotolitografi yöntemi ile kalıp üretiminin gösterimi. 33

Şekil 3. 3. PDMS döküm sürecinin aşamaları sırasıyla gösterimi. 34

Şekil 3. 4. Nanolif üretiminin sırasıyla gösterimi. 35

Şekil 3. 5. MF platformu. a) MF platformunun tasarım şeması ve b) üretim sonrası MF platformunun görünümü. 37

Şekil 4. 1. a) Çözülen V4P4 Mezenkimal Kök Hücrelerin morfolojik kontrollerinden elde edilen faz kontrast mikroskobik görüntüleri. i) MKH hücrelerinin 2.gün mikroskopik görüntüsü; ii) MKH hücrelerinin 3.gün mikroskopik görüntüleri; iii) 4.gün mikroskopik görüntüsü. b) Deneyler için Çözülen tüm V4P4 Mezenkimal Kök Hücrelerin canlılık ve proliferasyon analizi. b, i, ii) Çözülen hücrelerin canlılık analizi için thoma lamı üzerine alınmış ve Tripan blue ile boyanmış ışık mikroskopik örnek görüntüleri. c) Çözülen MKH' lerin çözündürme işlemi sonrasındaki hücre sayıları ile 1. ve 2. pasajlar sonrasında elde edilen hücre miktarları değerlendirilmiştir……42

Şekil 4. 2. iWJ-MKH'lerin kök hücre belirteçleri flow sitometri ile immunofenotipik analizi yapıldığında CD90 (%99.84), CD73 (%90.88), CD44 (%99.95), CD105 (%59.04) ve CD29 (%99.85) pozitifken; HLA-B-C(%0.05), CD69 (%1.36), CD34 (%0.03), CD25 (%0.03), CD19 (%0.07), CD45 (%0.02), CD14 (%0.31), HLA-DR (%0,02) ve CD69 (%1,36) negatif olarak değerlendirilmiştir..... 44

Şekil 4. 3. PAN nanoliflerin karakterizasyonu. Elektro-eğirme parametreleri: Süre 15 dk, iğne-toplayıcı mesafesi 15 cm, akış hızı 0,3 µL/dk, uygulanan voltaj 23,70 kV. a) nanoliflerin SEM görüntüsü (Regulus 10.0 kV 9.4mm x50.0k SE(UL), ölçek çubuğu- 1µm); b) lif çap dağılımı; c) gözenek boyutu dağılımı..... 45

Şekil 4. 4. Lizis optimizasyonu çalışmalarının sonuçları. a) ve b) Termal lizis uygulanan Huh-7 ve MKH hücrelerinin lizis öncesi ve sonrası yoğunluk ölçümleri (Wo/L- lizis uygulanmamış, W/L- lizis uygulanmış), c) ve d) Huh-7 ve MKH hücrelerinde kimyasal lizis (kontrol) ve termal lizis sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları, e) DNA miktarlarının karşılaştırması. 47

Şekil 4. 5. Huh-7 ve MKH hücrelerinin invert faz kontrast mikroskobundan 5x ve 10x büyütmelerde elde edilen özgün görüntüleri ile termal lizis ve kimyasal lizis uygulanmış hücrelere ait görüntüler. Huh-7: a) i, ii: hücrelerin kendi görüntüsü; b) iii, iv: termal lizis uygulanmış hücreler; c) v, vi: kimyasal lizis uygulanmış hücreler. MKH: d) i, ii: hücrelerin kendi görüntüsü; e) iii, iv: termal lizis uygulanmış hücreler; f) v, vi: kimyasal lizis uygulanmış hücreler. 50

Şekil 4. 6. Huh-7 ve MKH hücrelerinin sırasıyla x5.00k ve 2.50k büyütmedeki SEM görüntüleri. Huh-7: a) lizis uygulanmamış hücre: i (Regulus 5.0 kV 9.8mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); ii (Regulus 5.0 kV 9.8mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm), b) termal lizis uygulanmış hücre: iii (Regulus 10.0 kV 13.0mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); iv (Regulus 10.0 kV 13.0mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm), c) kimyasal lizis uygulanmış hücre: v (Regulus 10.0 kV 12.7mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); vi (Regulus 10.0 kV 12.7mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm). MKH: d) lizis uygulanmamış hücre: i (Regulus 5.0 kV 9.8mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); ii (Regulus 5.0 kV 9.8mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm), e) termal lizis uygulanmış hücre: iii (Regulus 5.0 kV 9.9mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); iv (Regulus 5.0 kV 9.9mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10µm), f) kimyasal lizis uygulanmış hücre: v (Regulus 5.0 kV 9.6mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); vi (Regulus 5.0 kV 9.6mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm). 51

Şekil 4. 7. Hücre filtrasyonuna ait 10x büyütmede alınan mikroskobik görüntüler. a) Huh-7 ve b) MKH hücreleri 5000, 10000 ve 20000 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda filtre edilmiştir. i, iii ve v filtrasyon öncesi; ii, iv ve vi filtrasyon sonrası görüntüleri göstermektedir. 53

Şekil 4. 8. a) ile b) Huh-7 ve MKH hücrelerinde filtrasyon öncesi ve sonrası DNA konsantrasyonları. DNA'nın büyük oranda sistemden geçtiği görülmüştür (Huh-7: %80; MKH: %90; *$p<0,05$). 54

Şekil 4. 9. MKH ve Huh-7 hücreleri için filtrasyon öncesi ve sonrası absorbans (λ = 400 nm) değerleri. Filtrasyon sonrası belirgin azalma, örnek yoğunluğunun düştüğünü ve sistemin etkili olduğunu göstermektedir (Huh-7: ~%50; MKH: ~%62; *p<0,05). 55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MKH	:Mezenkimal Kök Hücre
Huh-7	:Karaciğer Karsinom Hücre Hattı
HCC	:Hepatoselüler karsinom
PAN	:Poliakrilonitril
DMF	:Dimetilformamid
MF	:Mikrofiltrasyon
UF	:Ultrafiltrasyon
NF	:Nanofiltrazsyon
RO	:Ters Ozmoz
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskobu
FBS	:Fetal Sığır Serumu
PBS	:Fosfat Salin tamponu
ng	:Nanogram
ml	:Millilitre
µL	:Mikrolitre
PGMEA	:Propilen glikol monoetil eter asetat
İPA	:İzopropil alkol

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde tıbbi tanı ve biyolojik analiz süreçlerinin daha hızlı, hassas ve düşük maliyetli bir şekilde gerçekleştirilmesi amacıyla mikroakışkan çip platformları yaygın olarak kullanılmakta ve geliştirilmektedir. "Çip üzerinde laboratuvar" (Lab-on-a-Chip, LoC) ve "çip üzerinde organ" (Organ-on-a-Chip, OoC) sistemleri, biyolojik ve kimyasal analizlerin minyatür platformlarda gerçekleştirilmesine olanak tanıyan yenilikçi teknolojiler olarak öne çıkmaktadır. Bu sistemler, düşük örnek ve reaktif hacmi ile yüksek verimlilik sağlarken, hücresel ve biyomoleküler etkileşimlerin hassas kontrolüne imkân tanımakta ve organ fonksiyonlarını taklit edebilen mikroçevrelerin oluşturulmasını mümkün kılmaktadır (Zhang, Korolj et al. 2018, Pattanayak, Singh et al. 2021).

Mikroakışkan teknolojisi, genellikle 10–100 µm boyut aralığında tasarlanan mikrokanallar içerisinde sıvı akışının kontrollü bir şekilde yönetilmesine dayanmaktadır. Polidimetilsiloksan (PDMS), silikon, cam ve kuvars gibi malzemeler kullanılarak üretilen bu sistemler, analitik performansı artırırken, taşınabilirlik ve maliyet etkinliği gibi önemli avantajlar sunmaktadır (Pattanayak, Singh et al. 2021). Özellikle OoC sistemleri, doku mühendisliği ve kök hücre biyolojisinin entegrasyonu ile organların fizyolojik özelliklerini taklit eden daha gerçekçi *in vitro* modellerin geliştirilmesine katkı sağlamakta, ilaç geliştirme süreçlerinde güvenilirliği artırmakta ve hayvan deneylerine olan ihtiyacı azaltmaktadır (Zhang, Korolj et al. 2018).

Günümüzde mikroakışkan çiplerin filtrasyon sistemleriyle entegrasyonu, biyomedikal analiz, çevresel izleme ve farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan yenilikçi bir yaklaşımdır. Bu sayede biyolojik numunelerden hücre, biyomolekül ve partiküller yüksek hassasiyetle ayrıştırılabilmekte, tanı ve araştırma süreçlerinin doğruluğu ile verimliliği artmaktadır. Özellikle nanolif bazlı filtrelerle desteklenen mikroakışkan sistemler, düşük maliyetli ve hızlı analiz imkânı sunmaktadır.

Filtrasyon, hedef hücre ve moleküllerin ayrılmasında temel bir yöntem olup, MF bu alanda önemli bir yer tutmaktadır. Mikroüretimli silikon yapılar nükleik asit izolasyonunda kullanılırken, hidroforetik filtrasyon hücrelerin fiziksel özelliklerine göre ayrım sağlar. Bununla birlikte, tıkanma ve yüzey adsorpsiyonu gibi dezavantajlar söz konusu olabilir. Akustik odaklama ise piezoelektrik sistemler aracılığıyla

mikrokanallarda akışı kontrol ederek partikül manipülasyonunda etkili bir alternatif sunmaktadır (Lim, Kouzani et al. 2010).

Nanoteknoloji, son yıllarda büyük bir araştırma ve inovasyon desteği almıştır. Yüksek yüzey alanı-hacim oranları sayesinde nanolifler, filtrasyon verimliliğini önemli ölçüde arttırabilir. Nanolifler, 1 μm'den küçük çaplara sahip olup, elektro-eğirme, melt blowing ve lazer destekli teknikler ile üretilebilirler. Bu malzemeler, MF ve ultrafiltrasyon (UF) uygulamalarında partikül ayrımını optimize ederken, düşük basınç kaybı sağlar. Nanolif bazlı filtreler, bakteri ve virüs gibi patojenlerin giderilmesinde kritik bir rol oynayarak, solunum hastalıklarının yayılmasını önlemeye yardımcı olur (Khude 2017).

Mikroakışkan teknolojileri, başlangıçta biyomoleküler analizler için geliştirilmiş olsa da, günümüzde hücre biyolojisi alanında da önemli bir yer edinmiştir. Özellikle nadir hücrelerin izolasyonu, tanı testlerinin hassasiyetini artıran kritik bir süreçtir. Bu sistemler; HIV tanısında T-lenfositlerin belirlenmesi, sıtma enfeksiyonlarında eritrositlerin ayrılması ve nörodejeneratif hastalık araştırmalarında nöron izolasyonu gibi birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır. Ayrıca kök hücre saflaştırılması ve anne-fetal sağlık takibinde de önemli rol oynamaktadır.

Geleneksel yöntemlere kıyasla mikroakışkan sistemler; düşük numune hacmi, hızlı analiz, yüksek hassasiyet, taşınabilirlik ve maliyet etkinliği gibi avantajlar sunmaktadır. Hücre ayrımı genellikle fiziksel özelliklere dayanmakla birlikte, manyetik, dielektroforetik ve yüzey biyomarkörlerine dayalı afinitesel yöntemler de kullanılmaktadır. Bu teknikler mikroakışkan sistemlerde aktif ve pasif yaklaşımlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Bhagat, Bow et al. 2010).

Günümüzde nanoliflerin filtrasyonda kullanımı üzerine çalşmalar yapılmakta ve geliştirilmektrdir. Yapılan araştırmalarda nanolifler farklı alanlarda filtrasyon amaçlı kullanılmıştır. Literatürde bizim yapmış olduğumuz çalışmaya benzer birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek aşağıdaki çalışmalardır:

Matlock et al. (2016), elektro-eğrilmiş Polivinil alkol (PVA) nanolifler kullanarak *E. coli* hücrelerini mikrokanallarda yoğunlaştırmıştır. Pozitif yüklü nanolifler %87 hücre tutma sağlarken, negatif yüklü ve antikorla modifiye edilen nanolifler %72 spesifik yakalama göstermiştir. Bu sonuçlar, nanoliflerin mikroakışkan sistemlerde etkili bir yoğunlaştırma ve saflaştırma aracı olduğunu ortaya koymaktadır (Matlock-Colangelo, Coon et al. 2016).

Javanifar et al. (2024), *E. coli* lizisi sonrası DNA çözeltisinden hücre duvarlarını uzaklaştırmak için Poliviniliden Florür (PVDF) ve TiO_2/PVDF nanolif membranları kullanmıştır. TiO_2 katkısı ile hidrofilisite ve filtrasyon performansı artmış, membranlar %88 ve %79 hücre tutma verimi göstermiştir. Bu sistem, DNA bazlı analizler için etkili bir filtrasyon yaklaşımı sunmaktadır (Javanifar, Ghorbanpoor et al. 2025).

Javanifar et al. (2025), *E. coli*'nin sudan ayrılması için pozitif yüklü PAN ve Kekik/PAN nanolifleri geliştirmiştir. Kekik katkısı hidrofilite ve antibakteriyel özellikleri artırarak %95,5 hücre tutma verimi sağlamıştır. Bu çalışma, mikroakışkan sistemlerde yüksek verimli ve pratik filtrasyon uygulamalarını desteklemektedir. (Javanifar, Dabagh et al. 2025).

Diğer bir çalışmada ise amoksisilin (AMX) giderimi için $MnFe_2O_4$ ile modifiye edilmiş PVDF membran içeren mikroakışkan çip kullanılmıştır. Elektrosprey ile artırılan yüzey alanı sayesinde %99 giderim verimi elde edilmiş, optik sensörlerle pH ve çözünmüş oksijen takibi yapılarak süreç optimize edilmiştir. Sistem, farmasötik kirleticilerin uzaklaştırılmasında etkili bir çözüm sunmaktadır (Dabagh, Javanifar et al. 2024).

Chen et al. (2022), TPU/PAN karışımından elektro-eğirme ve sıcak baskı ile nanolif membranlar üretmiştir. Bu işlem, gözenek boyutunu küçültüp mekanik dayanımı artırarak %99,99 filtrasyon verimi sağlamıştır. Çalışma, yüksek performanslı ve dayanıklı membranlar için etkili bir yöntem sunmaktadır. (Chen, Wang et al. 2022).

Bu tez çalışmasının amacı, MF sistemi oluşturup optimize ederek hücresel partiküllerin etkin şekilde uzaklaştırılması ve hedeflenen hücre içi biyokütlenin yüksek verimle elde edilmesini sağlamaktır. Bu doğrultuda, Huh-7 ve MKH hücreleri, lizis öncesi ve sonrası olmak üzere iki aşamalı filtrasyon sürecine tabi tutulmuştur.

Çalışmamızda, mikroakışkan çip mikrokanallarına entegre edilen nanolifler kullanılarak filtrasyon gerçekleştirilmiş; hücre lizisi için termal ve kimyasal yöntemler uygulanarak etkileri karşılaştırılmıştır. Filtrasyon performansı, yoğunluk ölçümleri ve DNA miktarının analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroakışkan Teknolojisi

Mikroakışkanlar, mikro ölçekli sıvıların (10^{-6}–10^{-12} L) onlarca ila yüzlerce mikrometre boyutundaki kanallarda hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağlayan bir teknolojidir ve ileri düzeyde olanlar LoC olarak da bilinir. Küçük kanal boyutu, geniş yüzey alanı ve yüksek kütle transferi sayesinde düşük reaktif kullanımı, hızlı karışım ve fiziksel–kimyasal özelliklerin hassas kontrolü gibi avantajlar sunar. Bu sistemler numune hazırlama, reaksiyon, ayırma, tespit ve hücre kültürü gibi temel işlemleri entegre eder (Wu, Liu et al. 2020).

Mikroakışkan sistemlerde "mikro" ifadesi, yapının en az bir boyutunun mikrometre düzeyinde olduğunu belirtir. Bu mikrokanallar, cam ve silikonda fotolitografi-aşındırma gibi yarı iletken üretim yöntemleriyle veya polimerlerde kalıplama, kabartma ve yumuşak litografi teknikleriyle üretilebilir (Chow 2002).

Mikroakışkanlar alanı dört ana kökenden doğmuştur: moleküler analiz, biyosavunma, moleküler biyoloji ve mikroelektronik. İlk gelişim, GC, HPLC ve kılcal elektroforez gibi mikroanalitik tekniklere dayanır; bu yöntemler çok az numune ile yüksek hassasiyet ve çözünürlük sağlamıştır.

İkinci itici güç, Soğuk Savaş sonrası kimyasal ve biyolojik tehditlerin tespiti ihtiyacı olmuş; Savunma İleri Araştırma Projeleri Ajansı (DARPA) destekli programlar akademik mikroakışkan araştırmalarını hızlandırmıştır.

Üçüncü motivasyon, genomik ve moleküler biyolojideki hızlı ilerlemeler sonucu ortaya çıkan yüksek verimli ve hassas analiz gereksinimleridir.

Dördüncü katkı ise mikroelektronik ve Mikro-Elektro-Mekanik Sistemler (MEMS) teknolojilerinden gelmiştir. Başlangıçta silikon ve cam kullanılsa da, biyolojik uygulamalarda daha uygun olan PDMS gibi polimerler öne çıkmıştır.

Günümüzde mikrokanallar, vanalar, pompalar ve karıştırıcılar hızla gelişmiş olsa da, mikroakışkanlar henüz tam entegre, kullanıcı dostu ve yaygın sistemler hâline gelmemiştir. Buna rağmen alan, yüksek potansiyeli nedeniyle geleceğin önemli teknolojilerinden biri olarak görülmektedir (Whitesides 2006).

2.1.1. Çip üzeri organ ve çip üzeri laboratuvar platformları

1990 yılında Manz ve arkadaşları, küçük hacimli kimyasal reaksiyonlar ve analizler için 'miniaturized total chemical analysis systems (μTAS)' kavramını ortaya

koymuştur. Zamanla μTAS, biyoloji ve kimyanın farklı alanlarını da kapsadı. Bilim ve teknolojideki ilerlemelerle birlikte "mikroakışkanlar" terimi benimsendi. Mikroakışkanlar, mikro kanallar içinde akışkanların davranışı ve hassas kontrolüyle ilgilenen bir teknoloji olarak tanımlanır. Bu sistemlerde sıvılar genellikle mikrometre ölçekli kanallarda çok küçük hacimlerde (10^{-6}–10^{-12} L) işlenir (Sosa-Hernández, Villalba-Rodríguez et al. 2018). Bu boyuttaki mikrokanallar geniş bir göreceli yüzey alanına ve dolayısıyla yüksek kütle transferine sahiptir. Mikroakışkanlığın diğer doğal avantajları arasında daha hızlı karıştırma hızları, hacimlerin daha iyi kontrol edilmesi ve düşük reaktif kullanımı ve hızlı tepki gibi diğer özellikler bulunur (Farhang Doost and Srivastava 2024). Böylelikle LoC kavramı, kimyasal analiz için numune hazırlama, ayırma ve tespit süreçlerini tek bir mikrofabrikasyonlu cihazda birleştirmeyi öneren Manz et al. (1990) atfedilir. Lakin bu alandaki ilk çalışma Terry'nin 1975'te geliştirdiği, fakat dönemin bilim dünyasında ilgi görmeyen silikon tabanlı gaz kromatografisidir. Bu erken çalışmaların ardından, alan hızla gelişmiş ve çok sayıda yayın ile konferans ortaya çıkmıştır.

Ticari anlamda ilerleme 1990'ların ortasında, mikroakışkan sistemlere yatırım yapan girişimlerle başlamış; ilk ticari ürün ise 1999'da Caliper Technologies ve Agilent Technologies iş birliğiyle piyasaya sürülmüştür. Ayrıca 2001'de Kraliyet Kimya Derneği, alana özel ilk akademik dergiyi yayımlamıştır (Chow 2002).

Mikroakışkanlar tarihsel olarak yarı iletken işleme teknikleri kullanılarak silikon ve/veya camdan üretilmişlerdir; yumuşak litografi, son zamanlarda polimerlerden üretilmelerini mümkün kılmıştır. Mikroakışkan sistemler, tipik boyutları onlarca mikrometre mertebesinde olan kanallar, valfler, karıştırıcılar ve diğer yapı taşları içerebilir (Neužil, Giselbrecht et al. 2012).

Mikroakışkan teknolojileri, biyosensörleri mikroskopi tabanlı sistemlerle entegre ederek yüksek verimli, çoklu ve paralel analizler yapılmasını sağlar. Otomatik görüntüleme ve gelişmiş veri işleme yöntemleriyle bilgi kalitesi artar. Bu cihazlar, parçacık, biyomolekül, hücre ve mikroorganizmaların izole edilmesi, saflaştırılması ve taşınmasını kolaylaştırır. Henüz gelişmekte olan bir alan olmasına rağmen, mikroakışkan sistemler ilaç keşfi ve geliştirme süreçlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Neužil, Giselbrecht et al. 2012).

Mikroakışkanlarda LoC sistemi, laboratuvar deneylerini minyatürleştirmek için geliştirilmiştir (Sosa-Hernández, Villalba-Rodríguez et al. 2018).

Kapsamlı bir çip üstü laboratuvar, numune işleme, karıştırma, reaksiyon, ayırma ve analit tespiti gibi temel laboratuvar işlevlerini yerine getirmelidir. Bu işlevleri sağlamak için tek bir çip üzerinde farklı standart bileşenler entegre edilir. Çip üstü laboratuvar bileşenleri sekiz ana grupta toplanır: enjektör, hazırlayıcı, taşıyıcı, karıştırıcı, reaktör, ayırıcı, dedektör, kontrolör ve güç kaynağı.

Çip üstü laboratuvar sistemlerinde enjektörler, numune ve reaktifleri mikro veya nanolitre hacimlerde hassas şekilde ileterek analitik işlemlerin kontrolünü sağlar. Akışkanların yönü, hızı ve süresi, aktif veya pasif taşıyıcılar aracılığıyla düzenlenir. Aktif taşıyıcılar (pnömatik, piezoelektrik, termal veya elektrokimyasal mikro pompalar) enerji kullanarak hassas akış sağlar; pasif taşıyıcılar ise difüzyon, yerçekimi veya kılcal kuvvet gibi doğal etkilerle çalışır. Numune hazırlama aşamasında filtrasyon, ön konsantrasyon, hücre lizisi ve türevlendirme gibi işlemler uygulanarak analit dedektöre hazır hâle getirilir.

Mikroakışkan çiplerde mikserler, laminer akış ve kanal geometrisi aracılığıyla sıvıları karıştırır; aktif mikserler manyetik veya ultrasonik kuvvetlerle hızlı karıştırma sağlarken, pasif mikserler spiral, X-şekilli veya çok fazlı tasarımlarla difüzyon yoluyla etkileşimi artırır. Reaktörler, kimyasal veya biyolojik reaksiyonları sensör, ısıtıcı ve aktüatörlerle kontrol eder. Gaz fazlı reaktörler mikrobiyal fermantasyon veya hidrojen üretiminde, sıvı fazlı reaktörler sıvı-sıvı reaksiyonlarda, dolgu yataklı reaktörler ise katalitik reaksiyonlarda yüksek verim sağlar.

Ayırıcılar, karışım veya reaksiyon sonrası analitleri izole eder. Kapiler elektroforez (CE), dielektroforez (DEP), izotakoforez, optik ve manyetik ayırıcılar, kromatografi ve akustik yöntemler çip üstü analizlerde yaygın olarak kullanılır. CE, iyonları yük ve sürtünme farkına göre ayırırken, DEP ve izotakoforez biyolojik örnekleri elektriksel özelliklerine göre sınıflandırır. Optik cımbızlar tek hücre analizi sağlar, manyetik ayırıcılar ise antikor kaplı parçacıklarla hedef molekülleri izole eder.

Dedektörler, analitleri fiziksel sinyalleri elektrik sinyaline dönüştürerek tespit eder. Optik, elektrokimyasal, kütle spektrometrisi ve kapasitif yöntemler yaygın olarak kullanılır. Kontrolörler, çip üzerindeki sensör, aktüatör ve dedektörleri yönetir; veri toplar ve dış cihazlarla iletişim sağlar. Mikrodenetleyici tabanlı çip dışı veya çip üzeri kontrol sistemleri, pompaların, vanaların ve piezoelektrik bileşenlerin hassas şekilde çalışmasını sağlar.

Güç kaynakları ise tüm çip bileşenlerine enerji sağlayan kritik bir birimdir. Taşınabilir sistemlerde genellikle piller kullanılırken, elektroforez ve dielektroforez

gibi yüksek voltaj gerektiren sistemler programlanabilir yüksek voltajlı kaynaklarla desteklenir. Bu sayede çip üstü laboratuvarlar hem kompakt hem de özelleştirilebilir bir yapıya kavuşur (Lim, Kouzani et al. 2010).

Mikroakışkanlar ve biyosensörlerin tamamlayıcı kullanımıyla mümkün hale gelen LoC, uzun süredir laboratuvar tabanlı kimyasal ve biyolojik tekniklerin minyatür, düşük maliyetli analiz cihazlarına entegre edilmesini sağlayacak en kesin yöntemlerden biri — hatta belki de en kesin yöntem — olarak görülmektedir. Bu teknoloji, tıp, çevre ve benzeri çeşitli örnekleme alanlarında taşınabilir tanı uygulamaları için kullanılabilir (Mohammed, Haswell et al. 2015).

Bunun ardından OoC konsepti ortaya çıkmış ve biyoloji ile tıpta hızla ilgi görmüştür. Bu sistemler, taşınabilirlik, düşük maliyet, zaman tasarrufu ve hücre ortamının daha iyi taklit edilmesi gibi avantajlar sunar. OoC platformları, *in vitro* deneylerin daha kontrollü koşullarda yapılmasını sağlar. Ancak, pompalar, inkübatörler ve mikroskoplar gibi ek ekipmanlara ihtiyaç duyar (Sosa-Hernández, Villalba-Rodríguez et al. 2018).

Sıvı manipülasyonu için kullanılan mikroakışkan çiplerden farklı olarak, bu sistem hücre ve doku kültürlerini hücre dışı matriks, biyokimyasal gradyanlar, doku arayüzleri, kan perfüzyonu ve mekanik uyarılar ile entegre ederek organ düzeyinde fizyolojik ortamı *in vitro* olarak yeniden oluşturur. İlk kez tanıtılmasından bu yana önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve akciğer, kalp, bağırsak, deri çipleri gibi çeşitli modeller geliştirilmiştir (Yan, Li et al. 2022).

Bu platformların en dikkat çekici avantajları, çok az dış müdahaleyle çalışabilmeleri, düşük miktarda reaktif kullanmaları ve tek bir çip üzerinde birden fazla laboratuvar işlemini yüksek verimlilikle ve otomatik olarak gerçekleştirebilmeleridir (Maia, Carvalho et al. 2023).

Biyomikroakışkanlar alanı, 1990'ların sonlarında PDMS'in yaygınlaşmasıyla hızla gelişmiştir. 2000'li yılların başında Michael L. Shuler ve ekibi, akciğer–karaciğer gibi çoklu organ etkileşimlerini taklit eden öncü mikroakışkan hücre kültürü sistemleri geliştirmiştir. Bu sistem, hayvan deneylerini destekleyip klinik sonuçları tahmin edebilecek potansiyele sahipti. Sonrasında kan damarı, kas, karaciğer, beyin ve böbrek gibi organ işlevlerini taklit eden birçok çip geliştirildi. 2010'da Donald Ingber "organ-on-a-chip" terimini ortaya attı ve bu teknoloji, doku mühendisliğiyle birleşerek ilaç keşfinde devrim yaratma potansiyeline ulaştı (Zhang, Korolj et al. 2018).

OoC teknolojisi, doku mühendisliği ve mikroakışkanlardaki ilerlemelere dayanarak geliştirilmiştir. Bu teknoloji, insan hücrelerinin elde edilmesi, kültürlenmesi ve olgunlaştırılmasına yönelik bilgi birikimiyle birleşir. Böylece, akışkan, mekanik ve yapısal olarak hassas şekilde kontrol edilebilen mikro ortamlar tasarlanabilir hale gelmiştir (Zhang, Korolj et al. 2018).

Son 40 yılda kapiller test şeridi platformu, esasen klinik tanı ve immünoloji alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmıştır ve düşük maliyetli bir "altın standart" mikroakışkan sistemi hâline gelmiştir. Son dönemde yapılan çalışmalar, özellikle elektrik gerektirmeyen ve görsel olarak okunabilen tek kullanımlık testlerin gelişmekte olan ülkeler için uygun olduğunu göstermektedir. Örneğin gonore ve frengi gibi cinsel yolla bulaşan hastalıklar için hızlı testler ile çevresel örneklerde Legionella tespiti bu platformda başarıyla uygulanmıştır. Bunun yanı sıra, PCR sonrası sonuçların kolloidal altınla işaretlenmiş lateral akış testi üzerinden okunması, agaroz jel gereksinimini ortadan kaldırarak daha basit ve güvenilir sonuç sağlamaktadır (Haeberle and Zengerle 2007).

2.1.2. Avantajlar ve kısıtlamalar

Bu sistemlerin bazı avantajları ve zorlukları bulunmaktadır.

Avantajlarına bakacak olursak, LoC (Lab-on-a-Chip) cihazları, laboratuvar süreçlerini tek bir çipte hızlı, taşınabilir ve otomatik şekilde gerçekleştirebilir. Pahalı laboratuvarlara veya yüksek eğitimli personele ihtiyaç duymaz, kullanıcı dostudur ve özellikle PoC (Point-of-Care) uygulamalarında hızlı ve doğru tanı sağlar. COVID-19 gibi pandemilerde acil teşhis için kritik öneme sahiptir. OoC (Organ-on-a-Chip) platformları ise hücre ve doku mikro ortamını *in vitro* olarak taklit ederek ilaç taraması, hastalık modelleme ve kişiselleştirilmiş tedavi olanağı sunar. Sensörler ve mikroskoplar sayesinde gerçek zamanlı veri toplama ve otomasyon mümkündür. Ayrıca, OoC cihazları hedefli ilaç dağıtımı ve kombinasyonel tedavi denemelerinde, nadir hastalıklar için yeni tedavi yöntemlerinin keşfinde önemli potansiyele sahiptir.

Zorlukları ise LoC ve OoC cihazlarının geliştirilmesinde bazı sınırlamalar vardır. OoC platformlarının düşük verim, kısa çip ömrü, karmaşık örnek hazırlama ve üretim malzemesi ile ilgili sınırlamaları, kavram kanıtlama aşamasında kalmalarına neden olur. Tasarım ve üretim süreçleri karmaşıktır; bazı uygulamalarda uzman hazırlığı ve analiz gerekir. Mikroakışkan sistemlerde kanal tıkanıklığı veya malzeme emilimi gibi teknik sorunlar yaşanabilir. Ticari ve klinik uygulamalarda

yaygınlaşmaları için entegrasyon, otomasyon ve kullanıcı dostu tasarım kritik önemdedir (Azizipour, Avazpour et al. 2020).

2.2. Filtrasyon Teknolojileri

Filtrasyon, başta su arıtımı olmak üzere birçok mühendislik uygulamasında, süspansiyon içerisindeki katı partiküllerin sıvı fazdan ayrılmasında kullanılan temel bir ayırma tekniğidir. Bu işlem sırasında, seyreltik süspansiyonlar granüler yapılar ya da gözenekli membranlar gibi filtre ortamlarından geçirilir; ortam, içindeki partikülleri tutarak yalnızca sıvı fazın geçişine izin verir. Ancak zamanla filtre ortamında biriken maddeler, sistemin tıkanmasına neden olabilir. Böyle durumlarda filtrenin ya temizlenmesi ya da tamamen değiştirilmesi gerekir (Letterman 1987).

Filtrasyonun işleyiş mekanizması iki ana aşamada incelenebilir. İlk aşamada, süspansiyondaki partiküllerin, filtrenin sunduğu katı-sıvı ara yüzeyine — bu, filtre ortamındaki bir tanecik veya daha önce tutulan bir partikül olabilir — yaklaşması sağlanır. İkinci aşamada ise, bu partiküller ilgili yüzeye tutunarak ayrıştırılır (Yao, Habibian et al. 1971).

Filtrasyonda parçacık giderimi, süzme ve süzme dışı mekanizmalarla gerçekleşir. Süzme, parçacık boyutunun gözeneklerden büyük olduğu durumlarda etkilidir ve yüzey kimyasına bağlı değildir. Daha küçük parçacıkların giderimi ise yakalanma, çökelme ve Brown hareketiyle difüzyon yoluyla olur. Büyük parçacıklar yakalanma ve çökelme ile, çok küçük parçacıklar ise Brown hareketiyle difüzyonla tutulur. Parçacık boyutu 1–10 μm (mikrometre) aralığında giderim verimi minimumdur. Giderim verimi, filtre derinliği ve parçacık yoğunluğu arttıkça artar; akış hızı ve gözenek çapı arttıkça azalır (Letterman 1987).

Filtrasyon, akışkan ve partiküllerin ayrılması üzerine kurulu bir işlem olup, mühendislik alanında uzun süredir başarıyla kullanılmaktadır. Bu ayrım işlemi, akışkanın içerisinde bulunan katı partiküllerin, belirli özelliklere sahip bir ortamdan geçirilmesiyle gerçekleştirilir; ortam, partikülleri tutarken sıvının geçişine izin verir. Filtrasyonun farklı sistem ve koşullarda uygulanabilmesi, zamanla birçok farklı filtrasyon türünün ortaya çıkmasına neden olmuştur. Kullanılan filtrasyon mekanizması, ortamın fiziksel yapısı, akış yönü ve sistemin genel özelliklerine bağlı olarak çeşitli filtrasyon teknikleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında “kek filtrasyonu”, “yüzey filtrasyonu”, “derinlik filtrasyonu”, “derin yatak filtrasyonu”, “çapraz akış filtrasyonu”, “aerosol filtrasyonu”, “sıvı filtrasyonu”, “granüler filtrasyon”, “lifli

filtrasyon", "kumaş filtrasyonu", "kartuş filtrasyonu" ve "membran filtrasyonu" gibi türler sayılabilir (Tien 2012).

Bu farklı sınıflandırmalar, filtrasyonun uygulama esnekliğini ve çok yönlü yapısını ortaya koymakta; sistem ihtiyaçlarına en uygun filtrasyon yönteminin seçilmesinde rehberlik etmektedir.

2.2.1. Membran ayırma yöntemleri

Membran ayırma teknolojileri, atıksu arıtımında katı-sıvı ayrımı sağlayan, düşük maliyetli ve kendi kendine oluşabilen sistemlerdir. Süspansiyon halindeki katıların bir destek yüzey üzerinde birikmesiyle oluşur ve fonksiyonel bir membran gibi davranır. Özellikle membran biyoreaktörlerde (MBR) karşılaşılan yüksek maliyet, enerji tüketimi ve membran tıkanması sorunlarına ekonomik ve çevre dostu bir alternatif sunar. Dinamik membranlar (DM) düşük transmembran basıncında çalışır, ucuz destek malzemeleri kullanılabilir ve genellikle kimyasal temizlik gerektirmez.

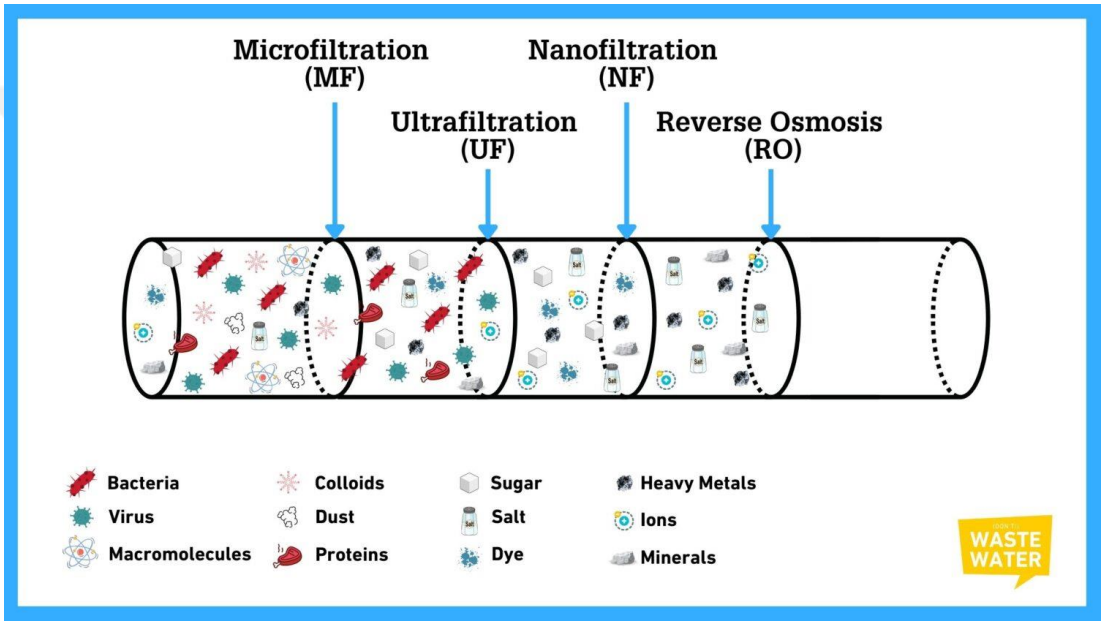
DM teknolojisi ilk kez 1966'da ters ozmoz (RO) sistemlerinde kullanılmış, sonraki yıllarda UF ve MF proseslerine entegre edilerek atıksu arıtımı, yağ-su ayrımı ve organik madde gideriminde başarılı sonuçlar vermiştir. Aerobik ve anaerobik sistemlerde askıda katı madde (SS), biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) gideriminde konvansiyonel membranlara benzer verimlilikler sunmuştur. Düşük yatırım ve işletme maliyetleri nedeniyle özellikle küçük ölçekli tesisler için uygun bir seçenektir.

Ayırma membranları oda sıcaklığında çalışabildiğinden ilaç, gıda ve biyoteknoloji alanlarında; hücre ve protein ayrımı, ısıya duyarlı biyomoleküllerin korunması ve mikroorganizma bütünlüğünün sağlanması açısından avantajlıdır. Küçük gözenek boyutu, yüksek yüzey alanı ve yüksek akış hızına sahip membranlar filtrasyon verimini artırır ve basınç kaybını azaltır (Gonçalves, Costa et al. 2022).

Membran filtrasyonu, farklı ayırma hedeflerine yönelik çok sayıda membran türünün geliştirilmiş olması sayesinde su arıtımından tıbbi uygulamalara ve gıda proseslerine kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ancak akı düşüşü, yoğunlaşma polarizasyonu, fouling, mekanik/kimyasal dayanım ve maliyet gibi sorunlar membran proseslerinin verimliliğini sınırlamaktadır. Avantajlarına bakacak olursak ise, membran ayırma, düşük işlem sıcaklıkları ve düşük uygulanan basınçlar (MF ve UF) kullandığı için çoğunlukla hafif bir işlem tekniği olarak kabul edilir. Bu nedenlerle,

özellikle yüksek enerji tüketimiyle ilgili olan mevcut dünya sorunlarına katkıda bulunması beklenmektedir (Bouhid de Aguiar and Schroën 2020).

Membran ayırma teknikleri genel olarak MF, UF, nanofiltrasyon (NF), RO olarak sınıflandırılır. MF ve UF ön arıtımda, NF küçük moleküllerin gideriminde, RO ise yüksek ayırma kapasitesiyle ileri arıtımda kullanılır. Nanoteknoloji ile geliştirilen yeni nesil membranlar ise daha yüksek geçirgenlik, kirlenme direnci ve fonksiyonel yüzey özellikleri sunarak membran teknolojilerinin performansını artırmaktadır (Ersahin, Ozgun et al. 2012, Cevallos-Mendoza, Amorim et al. 2022).



Şekil 2. 1. Membran filtrasyonu yöntemleri (Water Treatment Suppliers).

Modern UF, 1960'ların sonlarında fraksiyonlama tekniği olarak geliştirilmiş ve zamanla su-atıksu arıtımı, gıda, biyoteknoloji, kimya, tıp ve hücre hasadı gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Shi, Tal et al. 2014). UF, 2–100 nm gözenek boyutuna sahip membranlar kullanılarak basınç altında çalışan ve nanometre ölçeğindeki türlerin boyut eleme mekanizmasıyla ayrılmasını sağlamaktadır. Askıda katı maddeler, doğal organik maddeler, kolloidal parçacıklar ve makromoleküllerin ayrılması ve konsantrasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. UF membranları özellikle 10–1000 kDa aralığındaki proteinlerin saflaştırılmasında, moleküler ağırlık kesme sınırı (MWCO) sayesinde yüksek ayırma verimliliği sunmaktadırlar (Kammakakam and Lai 2023).

NF membranları, UF ile RO arasında yer alan, yaklaşık 1 nm gözenek boyutuna ve 300–500 Da moleküler ağırlık kesme değerine sahip membranlardır. Yüzeylerindeki iyonlaşabilir gruplar nedeniyle hafif yüklü olup, monovalan iyonlara düşük, divalan iyonlara ise yüksek retansiyon gösterirler. Yüksek akı sağlamaları sayesinde su ve atıksu arıtımı, gıda, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayırma mekanizmaları sterik engelleme ve elektrostatik etkileşimlerin birleşimine dayanır. NF membranlarının etkin kullanımı için yapısal ve yüzey özelliklerinin çeşitli karakterizasyon yöntemleriyle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Mohammad, Teow et al. 2015).

RO, günümüzde su arıtımı ve deniz suyunun tuzdan arındırılmasında en yaygın kullanılan membran teknolojisidir. RO prosesinde, ozmotik basıncı aşan bir dış basınç uygulanarak su membranı geçerken tuz, mineral ve iyonlar tutulur. RO membranlarının gözenek boyutları 1 nm' den küçüktür. En yaygın kullanılan RO membranları poliamid ince film kompozit (PA-TFC) membranlar olup, yüksek tuz giderimi ve su akısı sunar. Ancak bu membranlarda geçirgenlik–tuz tutma dengesi, kirlenme ve klor hassasiyeti önemli sınırlayıcı faktörlerdir. RO sistemlerinin performansı su akısı, tuz tutma oranı ve enerji tüketimi ile değerlendirilir; enerji geri kazanım cihazları özellikle deniz suyu RO sistemlerinde enerji tüketimini önemli ölçüde azaltmaktadır (Hailemariam, Woo et al. 2020).

MF, basınçla çalışan membran ayırma teknolojilerinden biridir ve fiziksel ayırma prensibine dayanır. 0,1–5 μm gözenek çapına sahip MF membranları; askıda katı maddeler, patojenler, büyük bakteriler, proteinler ve maya hücreleri gibi mikrometre boyutundaki kirleticilerin uzaklaştırılmasında etkilidir. Düşük hidrodinamik dirençleri sayesinde düşük basınçlarda yüksek akı sağlarlar. Geniş gözenek aralığı MF'nun ilaç, su ve atıksu arıtımı, gıda, biyoteknoloji ve tuzdan arındırma gibi birçok alanda yaygın kullanımına olanak tanır. Bu alandaki son araştırmalar membran kirlenmesi ve performans iyileştirme stratejileri üzerine yoğunlaşmaktadır (Anis, Hashaikeh et al. 2019).

Elektro eğirme tekniğiyle üretilen nanolif membranlar, yüksek gözeneklilikleri, yüksek akı değerleri ve düşük kirlenme eğilimleri sayesinde MF için umut verici malzemelerdir (Wang, Crandall et al. 2017). Lif çapı ve membran kalınlığı, gözeneklilik ve filtrasyon performansını doğrudan etkiler. Bu özellikleri sayesinde nanolif membranlar, biyoteknolojik süreçlerde verimliliği artırma ve maliyetleri

düşürme potansiyeline sahiptir; ancak çoğu çalışmada membran performansını artırmak için katkı maddeleri veya yapısal modifikasyonlara ihtiyaç duyulması üretim sürecini karmaşıklaştırmaktadır. Bu membranlar mükemmel tutma performansı sağlar ve doğrudan MF ortamı olarak kullanılabilir. Daha basit bir membran üretim süreci ve düşük basınçlı filtrasyon işlemi gerçekleştirerek, partikül maddelerin verimli bir şekilde uzaklaştırılması mümkündür (Gonçalves, Costa et al. 2022).

2.3. Mikroakışkan Çiplerle Filtrasyon Sistemleri

1990'lardan itibaren mikroakışkan sistemler, basit kanal yapılarından örnek hazırlama, karıştırma, reaksiyon ve ayırma gibi çoklu birim işlemlerin entegre edildiği karmaşık çiplere doğru evrilmeye başlamıştır. Bu gelişim sürecinde, yarı iletken tabanlı karmaşık üretim tekniklerinden uzaklaşılarak membranlar, fonksiyonel kaplamalar ve adsorban yapılar gibi daha sade entegrasyon yaklaşımları öne çıkmıştır. Yüksek yüzey alanları, biyouyumlu malzemelerle üretilebilmeleri ve ayırma, gaz–sıvı teması, emulsifikasyon, adsorpsiyon ve kataliz gibi çok yönlü işlevler sunmaları nedeniyle membranlar mikroakışkan uygulamalarda giderek artan bir ilgi görmektedir. Mikroakışkan sistemlerde membran seçimi; malzeme özellikleri, gözenek yapısı ve hedef uygulamaya bağlı olarak yapılmalı, gerektiğinde modelleme ve simülasyonlardan yararlanılmalıdır. Bununla birlikte yoğunlaşma polarizasyonu, fouling ve kanal boyunca değişen basınç farkları gibi sınırlamalar dikkate alınmalıdır. Akı azalmasına yol açan mekanizmaların küçük ölçeklerde ve kısa zaman aralıklarında gerçekleşmesi, bu süreçlerin doğrudan incelenmesini zorlaştırmakta; ancak mikroakışkan cihazlar, düşük maliyetleri, tasarım esneklikleri ve yerinde mikroskobik gözlem imkânları sayesinde membran filtrasyon mekanizmalarının araştırılmasında güçlü bir araç sunmaktadır. Gömülü membranlar veya idealize edilmiş gözenek yapıları içeren mikroakışkan sistemler, parçacık etkileşimleri, tıkanma ve kek tabakası oluşumu gibi süreçlerin farklı ölçeklerde anlaşılmasına katkı sağlamakta olup, bu alandaki çalışmaların membran süreçlerinin iyileştirilmesine aktarılması gelecekte önemli fırsatlar sunmaktadır (De Jong, Lammertink et al. 2006, Bouhid de Aguiar and Schroën 2020).

2.3.1. Mikroakışkan platformlarda hücre ayırma ve tanı

Tanısal analizler, hastalıkların erken tanısı, etkin tedavi planlaması ve hastalık yönetiminde merkezi bir role sahiptir. Güncel tıbbın temel hedeflerinden biri, tanı süreçlerini hızlandıran, yüksek hassasiyet sunan ve hasta başında uygulanabilir sistemler geliştirmektir. Bu doğrultuda geliştirilen mikroakışkan mikrototal analiz sistemleri (μTAS), düşük reaktif ve örnek tüketimi, taşınabilirlik, yüksek entegrasyon kabiliyeti ve otomasyon gibi önemli avantajlar sunarak tanısal teknolojilerde güçlü bir alternatif hâline gelmiştir. Ancak bu sistemlerin önündeki en büyük zorluk, karmaşık biyolojik örneklerden hedef analitlerin etkin şekilde ayrıştırılmasını içeren örnek hazırlama basamağıdır. Özellikle tam kan gibi yüksek hücresel içerikli örnekler, mikrokanal tıkanması, pıhtılaşma ve analitik duyarlılığın azalması gibi problemlere yol açabilmektedir. Buna ek olarak, mikroakışkan sistemlerin yüksek yüzey/hacim oranı, özgül olmayan adsorpsiyon problemlerini artırarak analiz performansını olumsuz etkileyebilmektedir. Tüm bu zorluklara rağmen, örnek hazırlama ve analiz adımlarının tek bir çip üzerinde entegre edilmesi; düşük örnek hacmi, yüksek tekrarlanabilirlik ve kullanıcıdan bağımsız otomasyon gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu nedenle mikroakışkan platformlar, gelecekte düşük maliyetli ve entegre tanı sistemlerinin geliştirilmesi açısından büyük bir potansiyele sahiptir (Cui, Rhee et al. 2015).

Karmaşık biyolojik karışımlardan hücrelerin izole edilmesi ve sınıflandırılması, biyoloji, biyoteknoloji ve klinik tıp alanlarında kritik bir gereksinimdir. Hücre sıralama teknikleri, araştırma ve klinik uygulamalarda saf veya zenginleştirilmiş hücre popülasyonlarının elde edilmesini sağlamakta; özellikle dolaşımdaki kanser tümör hücreleri (CTC'ler), hematopoietik kök hücreler (HSC'ler) ve fetal hücreler gibi nadir hücrelerin izolasyonuna olan ihtiyaç, kişiselleştirilmiş tıp ve teranostik yaklaşımların gelişimiyle birlikte hızla artmaktadır. Günümüzde altın standart olarak kabul edilen floresans-aktive hücre sıralama (FACS) ve manyetik hücre sıralama yöntemleri yüksek özgüllük ve hız sunsa da, yüksek maliyet, büyük ve karmaşık cihaz altyapısı, sınırlı klinik ölçeklenebilirlik ve hücre canlılığına zarar verme riski gibi önemli dezavantajlara sahiptir.

Bu sınırlamaları aşmak amacıyla geliştirilen mikroakışkan tabanlı hücre sıralama sistemleri, yeni nesil alternatif platformlar olarak öne çıkmaktadır. Mikroakışkan cihazlar; düşük maliyetli üretim, düşük reaktif tüketimi, yüksek

hassasiyet ve güvenlik avantajları sunarken, hücrelerin algılanması, odaklanması, sayılması, lizisi ve analizinin tek bir çip üzerinde gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır (Shields Iv, Reyes et al. 2015).

Bu kapsamda mikroakışkan hücre sıralama teknolojileri; floresan etiketli, boncuk tabanlı ve etiketsiz yaklaşımlar olmak üzere üç ana kategori altında incelenmekte ve özellikle çok fonksiyonlu, entegre sistemlere yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Her ne kadar bu sistemlerin büyük bir kısmı hâlen prototip aşamasında olsa da, paralelleştirme stratejileri, tıkanma problemlerinin azaltılması ve örnek hazırlama gereksinimlerinin sadeleştirilmesiyle klinik uygulamalara daha uygun hâle gelmeleri beklenmektedir (Sajeesh and Sen 2014).

Biyomedikal araştırmalarda yalnızca hücrelerin değil, aynı zamanda mikropartiküllere bağlı hedef analitlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması da büyük önem taşımaktadır. Bu hedef bileşenler, uygulamaya bağlı olarak orta yoğunlukta ya da çok düşük yoğunluklarda bulunabilmektedir. Geleneksel laboratuvar temelli ayırma yöntemleri ise uzun işlem süreleri, yüksek örnek ve reaktif tüketimi ile kullanıcıya bağlı hatalara açık olmaları nedeniyle sınırlayıcıdır. Lab-on-a-chip (LoC) ve mikroakışkan teknolojiler, bu süreçleri küçük, entegre ve kontrollü platformlara taşıyarak önemli avantajlar sunmaktadır. Laminer akış koşulları sayesinde yüksek ayırma verimi, düşük kayma gerilimi ile hücre canlılığının korunması ve düşük kontaminasyon riski sağlanabilmektedir.

Mikroakışkan sistemlerde hücre ve parçacık ayırma amacıyla filtrasyon, atalet etkileri, deterministik yanal yer değiştirme, sıkıştırılmış akış fraksiyonlama, akustik, dielektroforetik, manyetik ve optik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar, hedef bileşenin yoğunluğuna bağlı olarak ayırma, sıralama veya nadir hücre izolasyonu için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mikroakışkan ayırma sistemlerinin klinik ve ticari uygulamaları önünde hâlen hücre canlılığı, geri kazanım oranı, saflık, yüksek örnek hacimleri için yetersiz akış hızları ve sınırlı deneysel tekrarlanabilirlik gibi engeller bulunmaktadır. Standartlaşma ve ticarileşme süreçlerinin iyileştirilmesi, kullanıcı dostu arayüzlerin geliştirilmesi ve tek kullanımlık çip tasarımları bu teknolojilerin yaygınlaşmasında kritik rol oynayacaktır. Özellikle pasif ve aktif ayırma yöntemlerinin bir arada kullanıldığı hibrit mikroakışkan sistemler, hem yüksek verim hem de yüksek saflık sunma potansiyeliyle geleceğin tanı ve hücre temelli analiz platformları için umut vadetmektedir (Dalili, Samiei et al. 2019).

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Rejeneratif tıp, vücudun kendi onarım kapasitesinin yetersiz kaldığı durumlarda hasarlı doku ve organların fonksiyonel restorasyonunu hedefleyen, hızla gelişen bir tıp alanıdır. Artan organ nakli ihtiyacının karşılanamaması, kök hücre temelli alternatif yaklaşımları ön plana çıkarmıştır. Günümüzde rejeneratif tıp, özellikle kemik ve kıkırdak onarımı başta olmak üzere farklı alanlarda klinik uygulamalara ulaşmış; MKH temelli "hazır" ürünler geliştirilmeye başlanmıştır (Alison, Poulsom et al. 2002, Mahla 2016).

Kök hücreler, asimetrik mitoz süreciyle iki yavru hücreye yol açan, kendini yenileyebilme ve çoklu soy farklılaşması potansiyaline sahip olan olgunlaşmamış öncü hücrelerdir; bu yavru hücrelerden biri kök hücreyle aynıdır, diğeri ise daha olgun hücrelere farklılaşabilir (Krampera, Franchini et al. 2007).

Kök hücreler, doku ve organ sistemleri için temel oluşturur ve konakta hastalık ilerlemesi, gelişim ve doku onarımında farklı görevleri üstlenirler. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler hiyerarşik bir yapı gösterir ve dört gruba ayrılır: unipotent, multipotent, pluripotent ve totipotent (Mahla 2016).

İki temel kök hücre türü bulunmaktadır: embriyonik kök hücreler (ESC) ve yetişkin kök hücreler. ESC'ler blastosistin iç hücre kütlesinden izole edilir ve tümör gelişimi riski ile ilişkilidir. İnsan ESC'lerinin kullanımı bu sebepten dolayı etik ve hukuki tartışmalara sebep olmaktadır. Bu sorunlar yetişkin kök hücrelerde daha azdır. Yetişkin kök hücreler geniş farklılaşma potansiyelleri sayesinde klinik uygulamalar için umut verici bir seçenek haline gelmişlerdir (Ding, Shyu et al. 2011).

Kök hücreler farklılaşma potansiyelleri aralığına göre de sınıflandırılır: Totipotent, Pluripotent, Multipotent ve Unipotent.

En üstte yer alan zigot ve erken bölünme hücreleri totipotenttir; embriyo ve plasentayı oluşturabilirler. Dördüncü günden sonra oluşan blastosistin iç hücre kütlesi (ICM) hücreleri ise pluripotenttir ve üç germ tabakasından köken alan hemen tüm hücrelere farklılaşabilir, ancak plasenta oluşturamaz.

Yetişkin dokularda bulunan multipotent kök hücreler, bulundukları dokuya özgü sınırlı hücre soylarını üretir (örneğin bağırsak veya MSS kök hücreleri). Bazı yetişkin kök hücrelerinin uygun koşullarda transdiferansiyasyon gösterebilmesi, bu

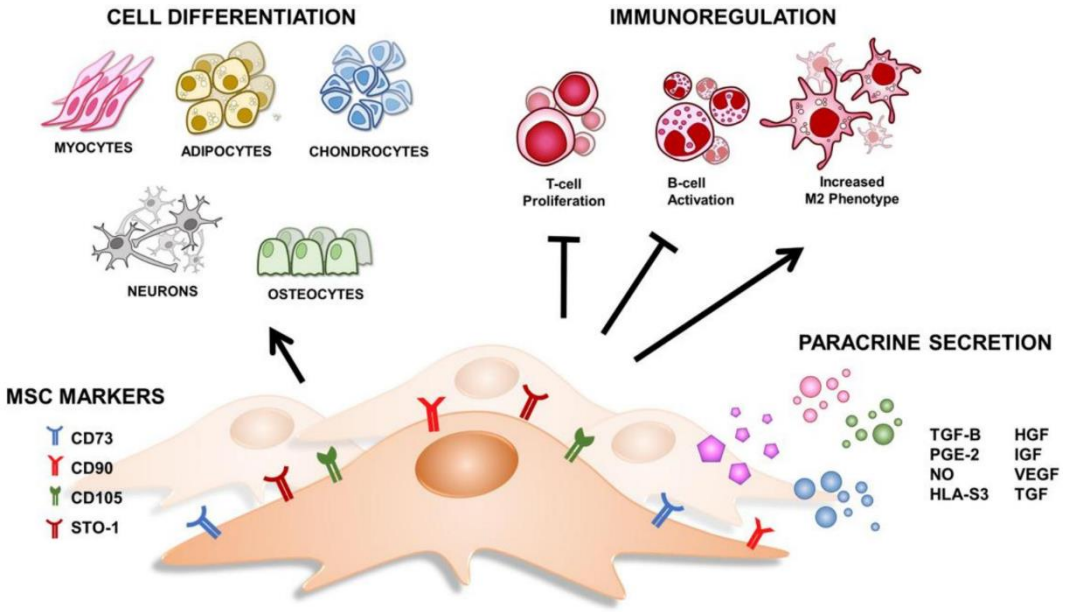
sınıflandırmanın mutlak olmadığını düşündürmektedir. En alt düzeyde yer alan unipotent hücreler ise tek bir hücre tipini oluşturur; epidermal kök hücreler ve bazı hepatositler bu gruba örnektir. Bu hücreler çoğu zaman "belirlenmiş öncü hücreler" olarak tanımlanır ve bazı dokularda sınırlı farklılaşma potansiyeline rağmen yüksek klonal çoğalma kapasitesine sahiptir (Alison, Poulsom et al. 2002, Sobhani, Khanlarkhani et al. 2017).

Alman patolog Julius Cohnheim 1867'de, doku onarımının kan dolaşımından gelen hücrelere bağlı olduğunu öne sürmüştür. Yıllarca göz ardı edilen bu görüş, günümüzde kemik iliğinin yalnızca hematopoetik kök hücreleri değil, aynı zamanda farklı mezenkimal hücre tiplerine dönüşebilen stromal hücreleri de içerdiğinin gösterilmesiyle desteklenmiştir. MKH'ler ilk olarak 1960'larda Alexander Friedenstein tarafından kemik iliğinde tanımlanmış; plastik yüzeylere yapışabilen, iğsi morfolojiye sahip ve kemik, kıkırdak ile yağ dokusuna farklılaşabilen hücreler olarak gösterilmiştir. "MKH" terimi ise 1990'larda Arnold Caplan tarafından ortaya atılmış; Caplan, MKH'lerin *ex vivo* çoğaltılabilirliğini ve immünomodülatör/trofik özelliklerini vurgulayarak klinik kullanımın temelini atmıştır. Kemik iliği kökenli MKH'lerin varlığı, 1970' lerin ikinci yarısında , kemik iliği örneklerinin kültür plastik disklerine ekilmesi ve yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılmasıyla resmen gösterilmiştir. Kemik rejenerasyonunda bilinen ve kullanılan MKH'leri çok yönlü farklılaşma yeteneğine sahip olduklarına dair kanıtlar sayesinde 1990'ların sonunda ön plana çıkmıştır. 2000'li yılların başından ise MKH'lerin otoimmün hastalıklarda faydalı olabilecek immün düzenleyici özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir. MKH olarak adlandırılan bu hücreler, yaşla birlikte azalsalar da ileri yaşlarda bile kemik iliğinde bulunabilmektedir (Kalervo Väänänen 2005, Krampera, Franchini et al. 2007, Pearl, Marleau et al. 2025).

MKH'ler sinir dokusu, yağ dokusu, kemik iliği, amniyotik sıvı, göbek kordonu, plasenta, adet kanı ve hatta diş pulpası gibi kaynaklardan izole edilebilir. Morfolojik olarak, MKH'ler fibroblast görünümündedir. Kendi kendini yenileme kapasiteleri nedeniyle, MKH'ler değişiklik göstermeden birçok kez pasajlanabilir. Kendi kendini yenileme ve kemik, kıkırdak, tendon, yağ, kalp, kas ve kemik iliği stroması gibi mezodermal kökenli çeşitli dokulara çok yönlü farklılaşma yeteneğine sahiptirler. MKH'ler, adipositler, kondrositler, osteoblastlar, miyositler ve nöronlar gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler. MKH'ler, hücresel homeostazın

korunması, yaşlanma, doku hasarı ve inflamatuar hastalıklar dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer alır (Ma, Xie et al. 2014, Kim and Park 2017).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği 2006 yılında, MKH'leri karakterize etmek için bazı biyobelirteçler ve hücre özelliği önerilmiştir ve bu kriterler günümüzdede kabul edilmektedir. Bu belirteçler arasında yüzey antijenleri CD105, CD73 ve CD90 ve hematopoetik belirteçler CD34, CD45, CD14 veya CD11, CD79α veya CD19 ve HLS sınıf II'nin yokluğu yer almaktadır, ilaveten kendini yenileme yeteneği, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik potansiyellere sahip çok potansiyellik, plastik yüzeye tutunma da kullanılan parametreler arasındadır (Bianchi, Sala et al. 2014, Mushahary, Spittler et al. 2018). Aşağıda yer alan Şekil 2. 2.'de MKH'lerin özelliklerinden bahsedilmiştir.



Şekil 2. 2. MKH'lerin hücresel ve moleküler özellikleri. MKH'ler çok yönlülük ve farklı Cluster of Differentiation (CD) belirteçleri sergiler. T hücresi ve B hücresi inhibisyonu yoluyla bağışıklık düzenlemesi ve M2 fenotipinin teşvik edilmesi için mükemmel adaylardır. Farklı büyüme düzenleyici ve inhibitör faktörlerin parakrin salgılanması, diğer hücreleri desteklemek için onlara farklı terapötik özellikler kazandırır (Prakash, Kim et al. 2023).

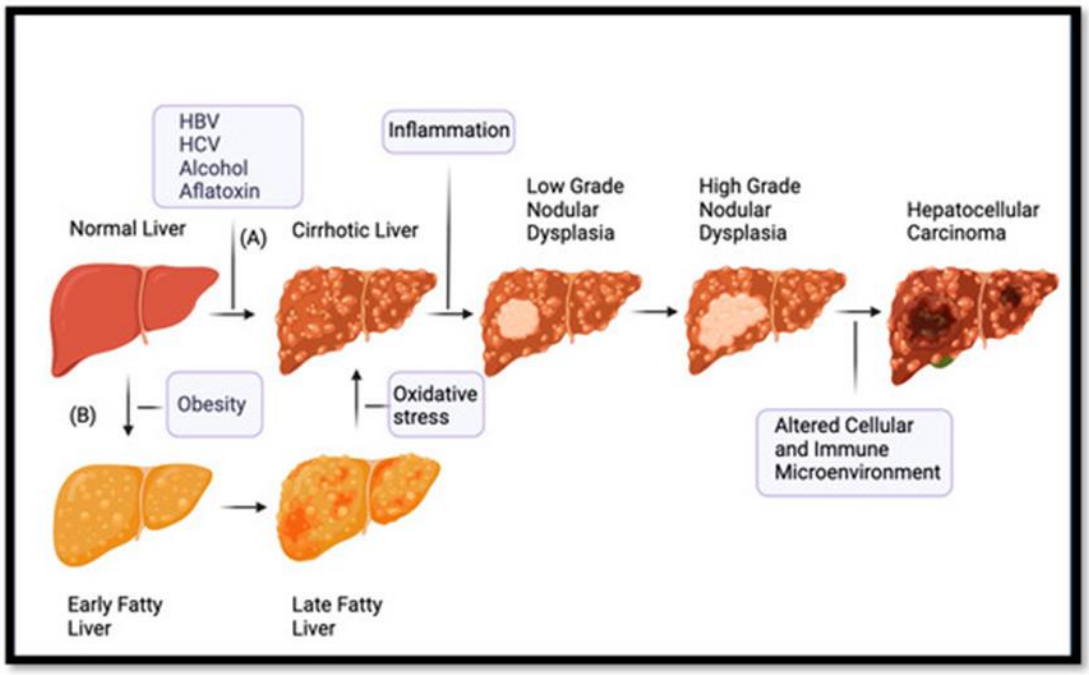
Son on yılda, kök hücreler çok sayıda rahatsızlık için giderek daha fazla terapötik yöntem olarak kullanılmaktadır (Margiana, Markov et al. 2022). Güncel

bulgular, MKH'lerin terapötik etkilerinin yalnızca farklılaşma yeteneklerine bağlı olmadığını, esas etkinin büyük oranda parakrin mekanizmalar tarafından gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Bu hücreler; sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri salgılayarak inflamasyonu düzenlemekte, hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi desteklemekte ve doku onarımını teşvik etmektedir. Ayrıca MKH'ler, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler üzerinde baskılayıcı etki göstererek güçlü immünomodülatör rol oynamakta ve düzenleyici T hücrelerinin indüksiyonunu desteklemektedir. Bu özellikleri, MKH'leri otoimmün hastalıklar ve greft-konakçı hastalığının tedavisi için cazip adaylar hâline getirmiştir. MKH'lerin hasarlı dokulara yönelimi ise kemokinler, adezyon molekülleri ve matriks metalloproteinazların yer aldığı karmaşık bir hedefleme mekanizmasıyla düzenlenmekte olup, inflamatuar mikroçevre bu sürecin etkinliğini belirleyen önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Squillaro, Peluso et al. 2016).

2.5. Karaciğer Kanseri

Primer karaciğer kanseri, dünyada en sık görülen yedinci kanser türü ve kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir. En çok sıklık Asya ve Afrika'da görülür; Moğolistan en yüksek orana sahipken, Çin en fazla vakaya sahiptir. Vakaların %75–90'ını hepatoselüler karsinom (HCC) oluşturur.

HCC bazı yüksek riskli bölgelerde azalırken, Amerika ve Avrupada zamanla artmaktadır. Bu hastalık erkeklerde daha sık görülmektedir. Karaciğer kanserinin başlıca sebeplerine bakacak olursak bunlar siroz, HBV/HCV enfeksiyonları, alkol, obezite ve NASH gibi faktörlerdir. İlaveten aflatoksin B1 maruziyeti, tütün kullanımı ve son yıllarda tanımlanan AAV2 enfeksiyonu da etkenler arasındadır. HBV aşısı ve antiviral tedavilerle korunma mümkündür; riskli bireylerde 6 ayda bir tarama önerilir. Şekil 2. 3.'de HCC oluşumuna yol açan faktörler ve hastalığın ilerleyiş süreci gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. HCC patogenezini özetleyen şematik gösterim. A) yolunda, normal karaciğerin HBV, HCV, alkol ve aflatoksin gibi etkenlere maruziyeti kronik inflamasyon ve siroz gelişimine yol açar; bu süreçte düşük dereceli displastik nodüller (LGDN) yüksek dereceli displastik nodüllere (HGDN) ilerleyerek HCC oluşumuna katkı sağlar. B) yolunda ise yağlı karaciğer hastalığına bağlı artan oksidatif stres siroza neden olur ve benzer şekilde LGDN'den HGDN'ye ilerleyerek HCC gelişimini destekler. Şekil Biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Coffin and He 2023).

HCC'de sık rastlanan genetik değişiklikler TERT, CTNNB1 ve TP53 mutasyonlarıdır. Klinik yönetimde Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sistemi kullanılır. Erken evrede küratif tedaviler mümkünken, ileri evrede tedavi yaşam süresinin sınırlı uzatır. Prognoz genelde kötüdür ve görülme sıklığı ile ölüm oranları birbirine oldukça yakındır. (Bruix, Boix et al. 2004, Balogh, Victor III et al. 2016, Llovet, Zucman-Rossi et al. 2016, McGlynn, Petrick et al. 2021).

Hastalığın doğal seyri ve prognostik faktörlerin bilinmesi, hasta gidişatını öngörmek ve tedavi etkisini değerlendirmek için gereklidir. Erken tanı ve tedavi zamanı yaşam oranının belirgin şekilde arttığı, cerrahi uygulanan hastalarda 5 yıllık sağkalımın %70'i aştığı görülmektedir. HCC'de prognoz yalnızca tümör evresine değil; karaciğer fonksiyonu, hastanın genel durumu ve tedaviye de bağlıdır. Bu

nedenle prognostik değerlendirme tümör evresi, karaciğer yetmezliği, performans durumu ve tedaviyi birlikte içermelidir.

Bu yaklaşıma esasen HCC hastaları dört ana evrede sınıflanır. Erken evrede tek tümör 5 cm'den küçük ya da en fazla üç nodül 3 cm'den küçüktür; rezeksiyon, karaciğer nakli veya ablasyon ile küratif tedavi mümkündür ve 5 yıllık sağkalım %50–75'tir. Orta evrede damar invazyonu ve metastaz yoktur; kemoembolizasyonla 3 yıllık sağkalım %50'ye kadar çıkabilir. İleri evrede semptomlar, damar invazyonu veya uzak yayılım vardır ve 3 yıllık sağkalım yaklaşık %10'dur. Terminal evrede ise ciddi karaciğer yetmezliği ve kötü genel durum mevcuttur; prognoz çok kötüdür ve tedavi seçenekleri sınırlıdır (Bruix and Llovet 2002).

Hepatoselüler karsinom hastalarda çoğunlukla uzun bir süre belirti vermez. Bulgular ortaya çıktığında ise çoğunlukla sarılık, sağ üst karın bölgesinde ağrı, karında sıvı birikimi, halsizlik, iştahsızlık ve kilo kaybı gibi kronik karaciğer hastalığına ait sorunlarla eşlik eder. Son yıllarda özellikle sirozlu bireylerde yapılan düzenli izlem programları ve artan farkındalık sayesinde, hastalık daha sık olarak belirti vermeden saptanmaktadır. Bu nedenle risk grubundaki kişilere altı ayda bir tarama yapılması önerilir ve bunun için yaygın olarak ultrasonografi ile AFP düzeyi birlikte kullanılır. Ancak AFP her hastada yükselmez ve tümör boyutuyla her zaman uyumlu değildir; bu nedenle tek başına güvenilir bir tanı aracı değildir.

Tanı sürecinde klinik değerlendirme ve görüntüleme yöntemleri temel rol oynar. Ultrasonografi ilk basamak tarama yöntemidir, fakat küçük lezyonları saptama gücü sınırlıdır. Şüpheli bulgular saptandığında, kontrastlı çok fazlı BT veya MR ile ayrıntılı inceleme yapılır. HCC için tipik görüntüleme özelliği, arteriyel fazda belirgin kontrast tutulumu ve daha sonraki fazlarda kontrastın kaybolmasıdır. Çok küçük ya da görüntüleme bulguları net olmayan lezyonlarda biyopsi gerekebilir ve malignite dışlanamıyorsa kısa aralıklarla düzenli takip yapılmalıdır (Janevska, Chaloska-Ivanova et al. 2015).

2.5.1. HCC hücre hatları

HCC, dünya genelinde en yaygın primer karaciğer kanseri türlerinden biri olup, yüksek mortalite oranı ile dikkat çekmektedir. Bu nedenle, hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tanı/tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi amacıyla HCC hücre hatları yaygın olarak kullanılmaktadır.

HepG2 hücre hattı, 15 yaşındaki Kafkas kökenli bir erkek çocuğundan alınan primer hepatoblastoma örneğinden türetilmiştir. Bu nedenle daha çok çocukluk çağı karaciğer tümörlerini ve erken hepatik gelişim özelliklerini yansıtır. HBV negatiftir, *in vivo* tümör oluşturma kapasitesi düşüktür ve hücre başına ortalama 55 kromozom içerir.

Fenotipik olarak olgun hepatositlere benzer; albümin sentezi, üre döngüsü aktivitesi ve bazı sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonu belirgindir. Bu özellikleri sayesinde ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında yaygın kullanılır.

Genetik olarak vahşi tip p53 taşır; bu da DNA hasarı, hücre döngüsü ve apoptoz çalışmalarını kolaylaştırır. RAS/RAF/MEK/ERK, JAK/STAT ve Hedgehog yolakları aktiftir. EMT özelliği zayıf, epitel karakteri baskındır ve hepatosit fonksiyonlarını taklit eden *in vitro* modeller için uygundur.

Hep3B hücre hattı, 8 yaşındaki siyah bir erkek çocuğundan alınan primer HCC biyopsisinden izole edilmiştir. HBV pozitiftir ve özellikle HBx proteini ekspresyonu ile karakterizedir. İn vivo tümör oluşturabilir ve hücre başına yaklaşık 60 kromozom içerir.

En önemli özelliği p53 geninin olmamasıdır (null). Bu nedenle DNA hasarı ve ilaçlara yanıt p53-bağımlı değil, alternatif yolaklar üzerinden gelişir. Bu durum Hep3B'yi p53 bağımsız hücre ölümü ve kemorezistans çalışmalarında değerli kılar.

Fenotipik olarak HepG2'ye göre daha az hepatositik, daha mezenkimaldir; EMT belirteçlerini daha fazla ifade eder ve daha agresif, invaziv bir tümör fenotipini temsil eder.

İlaçlara yanıtı HepG2'den belirgin şekilde farklıdır. RAS/RAF/MEK/ERK, JAK/STAT ve Hedgehog yolları aktiftir ancak düzenlenmeleri farklıdır. Hep3B, özellikle HBV ilişkili HCC, p53 eksikliği, EMT ve kemorezistans mekanizmalarının incelenmesi için uygun bir modeldir (Qiu, Xie et al. 2015).

Huh-7 ve türevleri, insan hepatoma dokusundan elde edilmiştir. Hücre hattı 1982 yılında Nakabayashi ve ekibi tarafından, 57 yaşındaki Japon bir erkek hastadan izole edilmiştir. Primer hepatositlere yakın özellikler gösterir ve HCV'nin laboratuvar ortamında çoğaltılmasına elverişlidir. Sürekli bölünebilen, epitel benzeri yapıda ve tümör oluşturabilen bir hücre hattıdır. Albümin, fibrinojen, transferrin ve lipoprotein

gibi plazma proteinlerini sentezler; ayrıca karsinoembriyonik antijenle ilişkili proteinler salgılar.

Akım sitometrisi analizleri CD24, prominin-1 ve EpCAM ekspresyonunu doğrulamıştır. p53 geninde 220. ve 249. kodonlarda mutasyon bulunur; bu durum p53'ün çekirdekte birikmesine yol açar. ERK ve NF-κB sinyal yolları aktiftir. Ortalama bölünme süresi yaklaşık 24 saattir.

THLE-2 ve THLE-3, insan hepatositlerinden türetilmiş ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarıdır. Hücrelere SV40 büyük T-antijen geni aktarılmıştır. Bu genin belirli bir bölgesini taşıyan retroviral vektör, PA317 hücrelerinde çoğaltılarak kullanılmıştır. Her iki hücre hattı da olgun karaciğer epitel hücrelerine benzer özellikler taşır. Tümör oluşturmazlar ve yaklaşık 40 saatte bir bölünürler. Sitokeratin 18, sitokeratin 19 ve albümin üretirler. Aktif sitokrom P450 sistemi sayesinde karsinojenleri metabolize edebilirler; glutatyon S-transferaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler bu süreçte rol alır.

Sk-Hep-1 sürekli bölünebilen bir hücre hattıdır ve 52 yaşındaki Kafkas bir erkek hastanın karaciğer kanserine bağlı asit sıvısından elde edilmiştir. Tümör oluşturma yeteneğine sahiptir ve köken olarak endotelyaldir. HCC araştırmalarında kullanılsa da gen ve protein profili klasik hepatositlerden oldukça farklıdır. Osteoblast, adiposit ve kemik iliği kaynaklı MKH benzeri hücrelere dönüşebilme kapasitesi vardır. Çoğu MKH belirtecini taşırken, albümin, fibrinojen ve alfa-fetoprotein gibi karaciğere özgü genleri eksprese etmez. ERK ve NF-κB yolakları aktiftir. İlginç olarak, endotelyal kökenli olmasına rağmen endotelyal belirteçler saptanmamıştır. Bölünme süresi yaklaşık 30 saattir.

QGY-7703 hücre hattı, Çin'de Şanghay Hücre Biyolojisi Enstitüsü'nde geliştirilmiştir. HCC görülme sıklığının çok yüksek olduğu Qidong bölgesinden, 35 yaşındaki bir kadının primer karaciğer tümöründen izole edilmiştir. Bu bölgede HBV enfeksiyonu ve aflatoksin maruziyeti önemli risk faktörleridir. QGY-7703 hücreleri IGF-II üretir. Asil-protein tioesteraz 2 ile 17β-hidroksisteroid dehidrogenaz 10 proteinleri tümör gelişiminde rol oynar. ERK ve NF-κB sinyal yolları aktiftir. Apoptoz sırasında TGF-β, TNF, FAS, p38 MAPK ve p53 yolakları devreye girer; ancak E-kaderin sentezlenmez. Yaklaşık 20 saatte bir bölünürler.

PLC/PRF/5 ya da Alexander hücre hattı, Dr. J.J. Alexander tarafından Güney Afrika'da oluşturulmuştur. Mozambik kökenli 24 yaşındaki bir erkekten alınan HCC örneğinden elde edilmiştir. Sürekli olarak HBsAg üretir, fakat HBV'nin diğer çoğalma belirteçleri görülmez. c-Myc, c-abl, c-ha-ras, c-fes, c-fms ve c-sis gibi onkogenlerin ekspresyonu HBsAg ile birlikte izlenir. ERK, TGF-β, NF-κB ve Akt/mTOR sinyal yolları aktiftir ve p53 geninde mutasyon bulunur. Hücrelerin bölünme süresi 30–40 saat arasındadır.

SNU-423 hücre hattı, J.G. Park ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Koreli bir erkekten alınan primer HCC dokusundan türetilmiştir. Hücreler çok çekirdekli yapı gösterebilir ve HBV DNA taşır. p53 geninin normal işlevi kaybolmuştur. Genellikle HBV ve IGF ile ilişkili çalışmalar için kullanılır. ERK, TGF-β, NF-κB ve Akt/mTOR yolakları aktiftir. Ortalama bölünme süresi 72 saattir.

FOCUS (Friendship of China and United States) hücre hattı insan karaciğer kanserinden elde edilmiştir. Sarılık öyküsü ve kronik alkol kullanımı olan 63 yaşındaki bir erkek hastadan izole edilmiştir. p53 mRNA'sı saptanmazken, DLC-2 geni eksprese edilir. HBV pozitiftir ve alfa-fetoprotein, fibrinojen, alfa-1-antitripsin ile CEA üretir. Aspartat aminotransferaz ve glukoz-6-fosfataz aktiviteleri ölçülebilir düzeydedir. ERK, TGF-β, NF-κB ve Akt/mTOR yolakları aktiftir. EMT belirteçleri ve alfa-fetoprotein ekspresyonu yoktur. Hücreler yaklaşık 42–48 saatte bir bölünür (Puttahanumantharayappa, Sannappa Gowda et al. 2021). HCC hücre hatlarının özellikleri Tablo 2.1.'de kısaca sunulmuştur.

Tablo 2. 1. HCC hücre hatları ve özellikleri (Puttahanumantharayappa, Sannappa Gowda et al. 2021).

Hücre Hattı Adı	Köken ve Etnik Özellik	Yıl	Morfoloji	Büyüme Özellikleri	Açıklamalar
Hep3B	8 yaşında siyahi erkek	1976	Epitel	Adherent (yapışkan)	HBV genomu mevcut
HepG2	15 yaşında Kafkas kökenli Arjantinli erkek	1975	Epitel	Adherent	HBV genomuna dair kanıt yok
Huh-7	57 yaşında Japon erkek	1982	Epitel	Adherent	HCV negatif
THLE-2 & THLE-3	Primer normal karaciğer hücreleri	1990	Epitel	Adherent	Hücreler SV40 büyük T antijeni ile enfekte
Sk-Hep-1	52 yaşında Kafkas erkek	1971	Endotelyal	Adherent	Endotelyal belirteçler yok
QGY-7703	35 yaşında Çinli kadın	1981	Epitel–Mezenkimal geçiş	Adherent	Aflatoksin kaynaklı HCC
PLC/PRF/5 (Alexander)	24 yaşında Shangaan erkek (Afrika)	1975	Epitel	Adherent	HBsAg varlığı
SNU-423	40 yaşında Koreli erkek	1990	Epitel	Adherent	HBV DNA tespit edildi
FOCUS	60 yaşında erkek	1985	Fibroblast	Adherent	HBV pozitif

2.5.2. Huh-7 hücrelerinin özellikleri ve çalışmalardaki önemi

Huh-7 hücre hattı, 1985 yılında 57 yaşındaki Japon bir erkek hastada gelişen hepatomadan elde edilmiştir ve hasta HCV negatiftir. Bu hücreler, hepatit C virüsünün hücre içinde çoğalabildiği nadir hücre hatlarından biri olduğu için viroloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Huh-7'den türetilen Huh-7.5 klonu ise HCV çalışmalarında daha duyarlı bir modeldir.

Hepatit C virüsü (HCV), dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Enfekte olan kişilerin %70–90'ında virüs temizlenemez ve enfeksiyon kronikleşerek siroz ve hepatoselüler karsinom riskini artırır. HCV'ye karşı koruyucu bir aşı yoktur; mevcut tedavi olan alfa-interferon ve ribavirin kombinasyonu ise yan etkiler ve direnç nedeniyle yeterince etkili değildir.

Huh-7 hücre hattı, HFE geninin α3 bölgesinde mutasyon taşır ve bu mutasyon HFE proteininin hücre zarına taşınmasını bozar. Sonuçta hücre yüzeyinde HFE azalır ve hepsidin üretimi düşer. Bu durum demir metabolizmasını etkiler ve kalıtsal hemokromatozise benzer bir tablo oluşturur. Bu nedenle Huh-7 hücreleri hem viroloji hem de demir metabolizması çalışmalarında önemli bir *in vitro* modeldir (Xun, ZHAO et al. 2008, Vecchi, Montosi et al. 2010).

Sainz Jr, Ten Cate at al. (2009) yapmış oldukları bir çalışmada, RWV biyoreaktöründe kültüre edilen Huh-7 hücrelerinin 3 boyutlu, doku benzeri yapılar oluşturarak klasik 2D kültürlere kıyasla daha hepatosit benzeri özellikler kazandığı gösterilmiştir. Bu koşullarda karaciğere özgü gen ekspresyonu ve hücre polaritesi artarken, HCV girişinde rol oynayan CD81, SR-B1 ve CLDN1 reseptörleri daha fizyolojik bir dağılım sergilemiş ve hücreler farklılaşmış olmalarına rağmen HCV enfeksiyonuna duyarlı kalmıştır. Sonuç olarak, RWV tabanlı 3D Huh-7 kültürü HCV ve ilaç çalışmalarında daha gerçekçi bir *in vitro* model sunmaktadır (Sainz Jr, TenCate et al. 2009).

Bilindiği üzere primer insan hepatositleri (hHeps) ilaç metabolizması için altın standarttır; fakat sınırlı bulunabilirliklerinden dolayı hepatoma hücre hatları alternatif olarak kullanılmaktadır. Lin, Schyschka et al. yapmış oldukları çalışmada beş insan hepatoma hücre hattı incelenmiş, CYP aktivitelerinin hHeps'e kıyasla düşük olduğu, faz II enzim aktivitelerinin ise benzer düzeylere ulaşabildiği gösterilmiştir. Pasajlar boyunca en tutarlı ve hHeps'e en yakın ilaç metabolize edici profil Huh-7 hücrelerinde

gözlenmiş, bu hücre hattı HepG2'ye alternatif bir model olarak sunulmuştur (Lin, Schyschka et al. 2012).

Bir başka çalışmada, gözenekli selüloz boncuklar (CPB) kullanan hibrit yapay karaciğer modeli için uygun hücre hattı araştırılmıştır. Mikrogözenekleri tamamen doldurmayacak şekilde orta düzeyde büyüyen ve aşırı hücre agregasyonuna eğilimli olmayan hücre hattı seçmek amacıyla, HLE, HLF, Hep 3B, PLC/PRF/5, Huh-7 ve HepG2 olmak üzere altı farklı hücre hattının hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin arasında Huh-7 hücreleri, düşük hücre yoğunluğu ile birlikte en yüksek üreogenez, glukoneogenez, amonyak tüketimi ve üre/glukoz üretim aktivitelerini göstermiştir. Bu özellikleri nedeniyle Huh-7 hücreleri, CPB tabanlı yapay karaciğer modelleri için en uygun hücre hattı olarak değerlendirilmiştir (Takagi, Fukuda et al. 1997).

Huh-7 hücreleri son zamanlarda, apoB100 metabolizması ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) sekresyonu üzerine yapılan çalışmalarda alternatif bir insan hepatik model olarak önerilmektedir (Meex, Andreo et al. 2011).

Bu tez kapsamında, nanolif entegreli mikroakışkan çip tabanlı bir MF platformu geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemin performansını değerlendirmek amacıyla, MKH ve Huh-7 hücre hattı kullanılarak iki aşamalı filtrasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

İlk aşamada, hücreler lizis işlemine tabi tutulmadan MF platformundan geçirilerek sistemin hücreleri tutabilme kapasitesi değerlendirilmiş ikinci aşamada ise hücreler lizis edilerek elde edilen hücre lizatları platformdan geçirilerek sistemin hücresel kalıntılar ile DNA'yı birbirinden ayırabilme etkinliği analiz edilmiştir.

Çalışma kapsamında, termal ve kimyasal lizis yöntemleri karşılaştırılmış; elde edilen bulgular doğrultusunda bu yöntemlerin filtrasyon etkinliği değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Protokolü

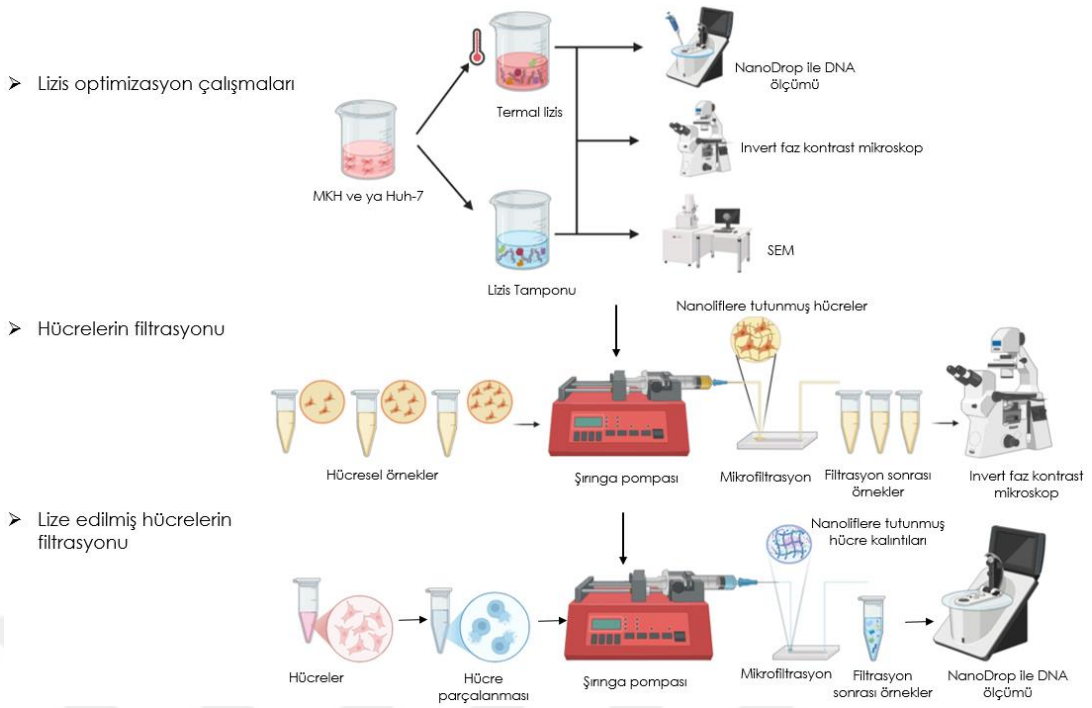
Deneysel çalışma altı temel aşamadan oluşmaktadır: Nanolif üretimi, mikroakışkan çip üretimi, MF platformunun oluşturulması, hücre kültürü çalışmaları, lizis optimizasyonu ve filtrasyon deneyleri.

İlk aşamada nanolif üretim parametreleri optimize edilmiş ve elde edilen nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada mikroakışkan çipin tasarımı yapılmış, tasarıma uygun kalıp üretimi gerçekleştirilmiş ve ardından çip üretim süreci tamamlanmıştır. Üçüncü aşamada ise nanolif filtreler, mikroakışkan çip sistemi ile plazma destekli bonding işlemi kullanılarak entegre edilmiştir ve MF platformu oluşturulmuştur.

Mühendislik aşamalarının tamamlanmasının ardından hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir. Hücre hatları çözdürülerek kültüre alınmış, çoğaltılmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada, hücrelerin termal lizis koşullarının belirlenmesi amacıyla lizis optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmalar şu şekildedir:

1. Hücreler farklı sıcaklık ve süre koşullarında lizise tabi tutulmuş; lizis öncesi ve sonrası optik yoğunluk ölçümleri ile DNA miktarları belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar kimyasal lizis uygulanmış kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır.
2. Termal ve kimyasal lizise uğratılmış hücrelerin morfolojik değişimleri, işlem uygulanmamış hücrelerle karşılaştırılarak invert faz kontrast mikroskobu ve SEM ile görüntülenmiştir.

Son aşamada filtrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Filtrasyon deneylerinin ilk basamağında, lizis uygulanmamış hücre süspansiyonları MF sisteminden geçirilerek sistemin filtrasyon etkinliği değerlendirilmiştir. İkinci basamakta ise hücreler lizis edildikten sonra MF sistemine gönderilmiş, filtrasyon öncesi ve sonrası örneklerde optik yoğunluk ve DNA konsantrasyonu ölçümleri yapılarak filtrasyon performansı analiz edilmiştir. Aşağıda yer alan Şekil 3. 1.'de yapılan çalışma şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 3. 1. Çalışmanın şematik şekli.

3.2. Hücrelerin Temini ve Kültüre Edilmesi

Huh-7 hücre hattı ATCC'den farklı bir proje kapsamında temin edilmiştir; (ATCC HB-8065). Hücreler %10 fötal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), ve %1 oranında penisilin-streptomisin (Invivogen, California, ABD) içeren DMEM-HG besiyeri çözeltisi kullanılarak %5 CO2'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'de (Panasonic, MCO-170M-PE, Japonya) inkübatörde kültürlenmiştir. İki günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır ve hücrelerin morfolojik durumu invert faz kontrast mikroskobunda (Carl Zeiss, Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya) günlük olarak izlenmiştir. Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılmış MKH hücreleri stoktan temin edilmiştir ve yeniden karakterizasyonları yapılmıştır. MKH hücreleri %10 FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ve %1 oranında penisilin-streptomisin (Invivogen, California, ABD) içeren Nutri (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ve Nutri supplement (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) kültür besiyeri eklenerek 75 cm2'lik kültür kabına ekim yapılmlştır, %5 CO2'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'de (Panasonic, MCO-170M-PE, Japonya) inkübatörde kültürlenmiştir.

İki günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücrelerin morfolojik durumu invert faz kontrast mikroskobunda (Carl Zeiss, Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya) günlük olarak izlenmiştir. Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilmiştir.

3.2.1. MKH'lerin deney öncesi canlılık ve proliferasyon testi

Çözündürme işleminin ardından deneysel çalışmalara başlamadan önce hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir. Bu amaçla kriyoprezervasyon koşullarında saklanan hücre vialleri 37 °C su banyosunda kısa sürede çözündürülmüş ve aseptik şartlarda santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Hücre süspansiyonunda bulunan kriyoprotektanın uzaklaştırılması için santrifüj uygulanmış, elde edilen hücre peleti uygun hacimde besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir.

Canlılık analizinde, hücre süspansiyonundan alınan örnekler Trypan Blue çözeltisi ile karıştırılmış ve Thoma lamı kullanılarak canlı ve ölü hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmede, canlı hücrelerin boyayı absorbe etmediği, canlılığını kaybetmiş hücrelerin ise mavi renkte boyandığı esas alınmıştır. Elde edilen sayım sonuçlarından yararlanılarak hücre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

Canlılık analizinin tamamlanmasının ardından hücreler uygun ekim yoğunluğunda kültür flasklarına aktarılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri olarak DMEM F12 ve NutriStem kullanılmıştır. Kültürler, 37 °C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatör ortamında sürdürülmüştür. Kültivasyon süresince hücrelerin morfolojik özellikleri, yüzeye adezyon davranışları ve konfluens seviyeleri düzenli olarak izlenmiştir. Hücreler hedeflenen konfluens düzeyine ulaştığında tripsin-EDTA ile ayrıştırılarak pasajlanmış ve çoğalma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca kültür süreci boyunca belirli aralıklarla besiyeri yenilenmiş, deneylerde kullanılmayan hücreler ise uygun kriyoprezervasyon koşullarında yeniden depolanmıştır.

3.2.2. Hücrelerin karakterizasyonu

iWJ-MKH, uygun kültür koşulları altında çoğaltılmıştır. Pasaj aşamasına ulaşan hücrelerin kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler, Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS; Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile üç kez yıkanmıştır. Hücrelerin kültür yüzeyinden ayrılması amacıyla

%0,25 tripsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) uygulanmış ve hücreler 37 °C'de yaklaşık 3 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop altında doğrulandıktan sonra, tripsinizasyon işlemi serum içeren besiyeri eklenerek durdurulmuştur.

Elde edilen hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) aktarılmış, nazik pipetaj ile homojenize edilmiş ve 300×g'de 5 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücre yüzey antijenlerinin işaretlenmesi amacıyla hücre pelletine %2 fetal sığır serumu (FBS) içeren PBS'den oluşan bağlanma solüsyonundan 100 µL eklenmiş ve üzerine 2 µL spesifik antikor ilave edilmiştir. Karışım +4 °C'de 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler 300 µL PBS ile yeniden süspanse edilerek flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte 3500) analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi NovoExpress yazılımı (Agilent, California, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

İzolasyonun etkinliği, hücre saflığı ve canlılığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen karakterizasyon analizlerinde flow sitometri yöntemi kullanılmıştır. Bu kapsamda hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu; FITC konjugatlı anti-human CD44, CD105, CD73, CD90, CD69 ve CD25 ile PE konjugatlı anti-human CD25, CD19, CD29, CD34, CD14, CD45, HLA-DR ve HLA-A-B-C antikorları (BioLegend, California, ABD; Thorvacs, Ankara) kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.3. Çip Üretiminin Aşamaları

3.3.1. Çip tasarımı ve kalıp üretimi

Çip üretiminin ilk aşamasında AutoCAD programı kullanılarak çip dizaynı gerçekleştirildi. Bu yazılım vasıtasıyla kanal uzunluğu 1cm, derinliği 500 µm, kanal genişliği 1000 µm parametrelerine sahip tek kanallı bir çip tasarlanmıştır.

Çip kalıbı fotolitografi yöntemi ile üretilmiştir. İlk aşamada alt tabaka hazırlığı yapılır, bu aşamada silikon plaka cam petri içerisine alınarak asetonla sonikasyon cihazında (CALISKAN, TR) 3 dk süreyle temizlenmiştir. Ardından aseton uzaklaştırılmış, üzerine etanol eklenerek aynı sonikasyon işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlem, silikon plakanın yüzeyinin etkin şekilde temizlenmesi amacıyla uygulanmıştır. Temizleme işlemi sonrasında silikon plaka nitrojen gazı kullanılarak kurutulmuştur.

İkinci aşama fotorezist kaplama aşamasıdır. Fotolitografi süresince ortamda yalnızca sarı (amber) ışık kullanılmıştır. Spin kaplama (POLOS, Hollanda) cihazı çalıştırılmış, cihazın koruyucu kapağı açılmış ve SU-8 2075 (Nanografi Nano Teknoloji, TR) fotorezist için uygun program seçilmiştir. Cihazın koruyucu kapağının içerisine ve tutucu platformun altına temiz alüminyum folyolar yerleştirilmiş ve düzgün şekilde sabitlenmiştir. Hava kompresörü çalıştırılmış ve vakum sistemi aktif hale getirilmiştir.

Temizlenmiş silikon plaka spin kaplama cihazının tutucusuna yerleştirilmiş ve vakumun tam olarak oturması için 2–3 dk beklenmiştir. Ardından, silikon wafer üzerine yaklaşık 50 mL SU-8 2075 fotorezist dökülmüştür. Silikon plakanın yüzeyinde kabarcık kalmadığından emin olunmuştur. Spin kaplama işlemi başlatılmış ve işlem yaklaşık 2–3 dk sürmüştür.

Bir sonraki aşamada spin kaplama sonrası silikon plaka iki aşamalı olarak ısıtıcıda (Mtops, Güney Kore) bekletilmiştir. İlk aşamada plaka 65 °C'de 3 dk, ikinci aşamada ise 95 °C'de 6 dk bekletilmiştir. İşlem sonrası silikon plaka ısıtıcıdan alınarak cam petri içerisinde oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.

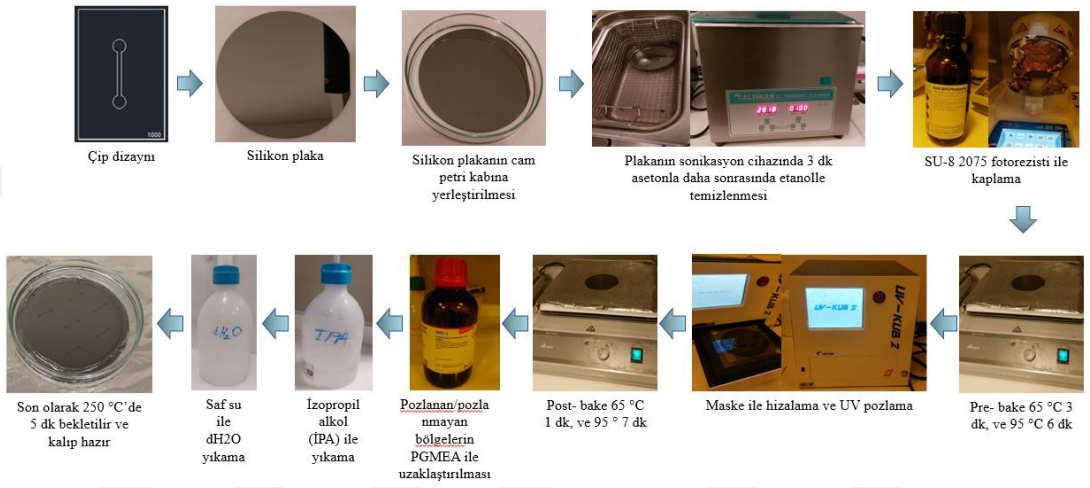
Soğutma işleminin ardından maske hizalama aşamasına geçilmiştir. Silikon plaka petri ile birlikte UV-KUB 2 (Kloe, Fransa) or 6 cihazına yerleştirilmiştir. Plakanın üzeri cihaz içerisinde bulunan kare cam ile kapatılmış ve asetat maske cam üzerine sabitlenerek UV pozlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

İşlem sonrasında plaka 65 °C'de 1 dk, ikinci aşamada ise 95 °C'de 7 dk bekletilmiştir.

Pozlama sonrası geliştirme (developing) işlemi için silikon plaka propilen glikol monoetil eter asetat (PGMEA) (CAS Number: 108-65-6, Sigma- Aldrich, ABD) durulama işlemi için ise izopropil alkol (İPA) (CAS No : 67-63-0 – EC, KimyaLab, TR) ve saf su (dH_2O) ile yıkanmıştır. İlk olarak silikon plaka üzerine yaklaşık 100 mL PGMEA eklenmiş ve kap 3–4 dk süreyle elde nazikçe çalkalanmıştır. Bu aşamada çözücünün keskin kokusu nedeniyle kabin içi hava akışı kullanılmıştır. Aşındırma işleminin yeterliliği, silikon plakanın kenarına İPA damlatılarak kontrol edilmiştir. Eğer beyazımsı süt görünümünde çökelti oluşmamışsa aşındırmanın yeterli olduğu kabul edilmiş ve İPA ile yıkama işlemine geçilmiştir. Çökelti oluşması durumunda

PGMEA ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Son yıkama saf su (dH_2O) ile gerçekleştirilmiştir.

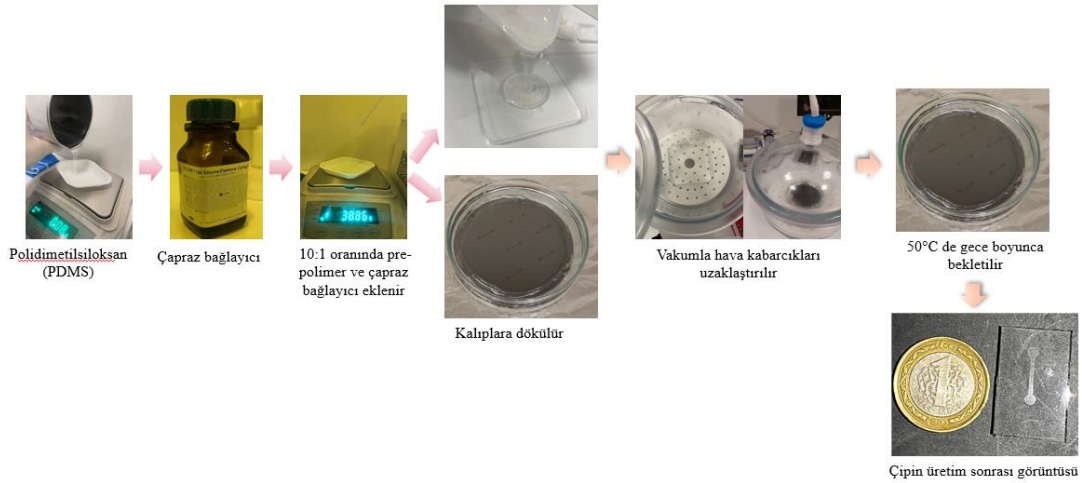
Geliştirme işlemi tamamlanan kalıp nitrojen gazı ile kurutulmuştur. Son aşamada, yapının mekanik dayanımını artırmak amacıyla hard bake işlemi uygulanmış ve kalıp 250 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Şekil 3. 2.'de fotolitografi sürecinin aşamaları sunulmuştur.



Şekil 3. 2. Fotolitografi yöntemi ile kalıp üretiminin gösterimi.

3.3.2. Yumuşak litografi yöntemi ile çip üretimi

Yumuşak litografi yöntemi kullanılarak PDMS (Sylgard 184 silikon elastomer baz ve Sylgard 184 silikon elastomer kürleme ajanı, Dow Corning, ABD) tabakası üretilmiştir. Bu çalışmada, düşük moleküler ağırlıklı Sylgard™ 184 PDMS polimeri (Bileşen A: Mn = 5.8 × 10^3 Da; Bileşen B: Mn = 7.5 × 10^3 Da) kullanılmıştır. Bu amaçla, 27g (4,62 mmol) PDMS (Bileşen A) ve 3g (0,402 mmol) çapraz bağlayıcı (Bileşen B) üst ve alt PDMS mikrokanallarının üretiminde kullanılmıştır. PDMS ve çapraz bağlayıcı karışımı (10:1) 3 dk boyunca karıştırılmış ve kalıba dökülmüştür ve kalıp desikatöre yerleştirilerek 20 dk boyunca vakumlanmıştır. Daha sonra, gece boyunca 50 °C'de bekletilmiş ve mikroakışkan çip, PDMS tabakasının soyulmasıyla üretilmiştir. Kanalların uzunluğu 1 cm, genişliği 1000 µm ve yüksekliği 500 µm teşkil etmiştir. Bir diğer PDMS tabakası ise mikrokanalsız düz bir yüzeye sahip olacak şekilde üretilmiştir (üst tabaka). Şekil 3. 3.'de PDMS döküm sürecinin aşamalarına ait görseller yer almaktadır.



Şekil 3. 3. PDMS döküm sürecinin aşamaları sırasıyla gösterimi.

3.4. Elektro- eğirme Yöntemi ile Nanolif Üretimi

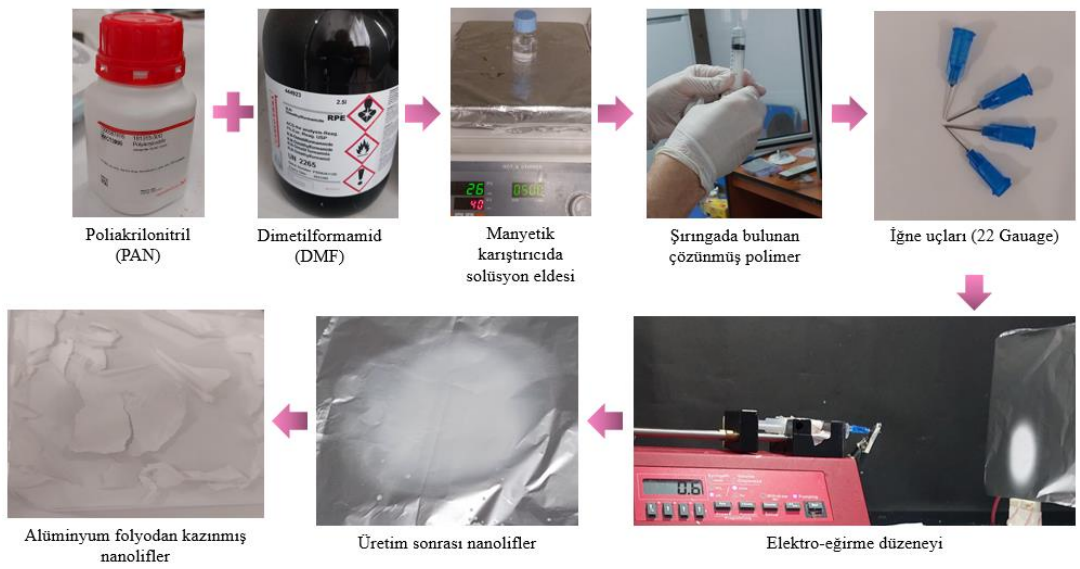
Nanolif üretimi için %14 konsantrasyonda PAN (Mw 150,000 g/mol, 99 % purity, CAS Number: 25014-41-9) polimeri Dimetil Formamid' de (DMF, 99.8 % purity, CAS Number: 68-12-2) çözdürülmüştür. PAN, iyi eğrilebilirliği ve yüksek karbon verimi (>%50) ile birlikte elde edilen karbon nanoliflerin üstün mekanik özellikleri nedeniyle en yaygın kullanılan öncü polimerdir. PAN, beyaz, sentetik ve çok yönlü bir organik polimerdir. Termoplastik olmasına rağmen normal şartlarda erimez. Yüksek kimyasal ve mekanik direnç, termal kararlılık ve karbonizasyon sırasında yüksek karbon verimi gibi avantajlar sunar. Yaygın olarak kullanılan çözücüler arasında alkoller, diklorometan, kloroform, DMF), tetrahidrofuran (THF), aseton, dimetil sülfoksit (DMSO), heksafloroisopropanol (HFIP) ve trifloroetanol bulunmaktadır. Su, yüksek dielektrik sabiti ve dolayısıyla elektrostatik itmeyi azaltması nedeniyle elektro eğirme için uygun bir çözücü değildir. PAN suda çözünmez, DMF, DMAc gibi polar organik çözücülerde çözünür. UV ışınlarına, çoğu organik çözücüye ve aside karşı dayanıklıdır (Xue, Wu et al. 2019).

PAN/DMF'in %14 ağırlıktaki çözeltisi hazırlanmıştır ve berrak bir çözelti elde edilene kadar gece boyunca 40 °C' de manyetik karıştırıcıya bırakılmıştır. Tam çözünmeyi karşılamak için ise 1 saatliğine 50 °C' de karıştırılmıştır.

Nanolif üretimini elektro-eğirme tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Doshi ve Reneker tarafından popülerleştirilen elektro eğirme yöntemi, yüksek bir elektrik alanı

altında polimer çözeltisi jeti püskürtülerek nano ölçekli lifler üretir. Lif oluşumunu sağlamak için çözücünün uygun buhar basıncına, viskoziteye ve yüzey gerilimine sahip olması gerekir. Ayrıca, çözelti iletkenliği, elektrostatik özellikler, elektrik alan şiddeti, yüzey yükü ve iyonlaşma gibi parametreler Taylor konisi oluşumunu ve jet stabilitesini önemli ölçüde etkiler (Sarkar, Gomez et al. 2010).

Hazırlanan PAN çözeltisi 1 mL'lik bir şırıngaya alınarak elektro-eğirme düzeneğindeki şırınga pompasına yerleştirilmiştir. Nanolif üretiminde 22G iğne ucu kullanılmış, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 15 cm olarak ayarlanmıştır. Toplayıcı yüzeyi, alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Anot bağlantısı şırınga iğne ucuna yapılmış ve elektro-eğirme sırasında homojen nanolif dağılımını sağlamak için akış hızı 0,3 mL/dk ve uygulanan voltaj 23,7 kV olarak kontrol edilmiştir. Şekil 3. 4.'de nanolif üretimi sürecinin aşamaları yer almaktadır.



Şekil 3. 4. Nanolif üretiminin sırasıyla gösterimi.

3.5. Mikrofiltrasyon Platformunun Oluşturulması

Mikroakışkan çip ile nanoliflerin entegrasyonu ve MF platformunun oluşturulması, oksijen plazması kullanılarak gerçekleştirilen yüzey aktivasyonu ve bonding işlemi ile sağlanmıştır. Bonding işlemi öncesinde, temiz oda dışında bulunan oksijen kaynağının açık olduğu kontrol edilmiştir.

MF sisteminin oluşturulmasında; cam lamel, tek mikrokanal içeren ve giriş portu 3 mm, çıkış portu 1,5 mm çapında delinmiş PDMS tabaka ile üzerinde mikrokanal bulunmayan ve 1,5 mm çapında giriş deliği açılmış PDMS tabaka

kullanılmıştır. Bu numuneler bonding işlemi yapılmadan önce asetonla temizlenmiş ve nitrojen gazıyla kurutulmuştur.

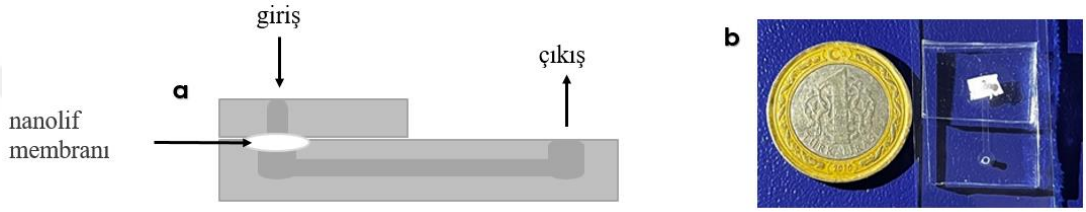
Plazma bonding işlemi temiz oda koşullarında aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

1. Temiz oda içerisinde bulunan küçük siyah oksijen vanası açık konuma getirilmiştir.
2. Oksijen basıncı, ana vana üzerinden 1,5 bar seviyesine ayarlanmıştır.
3. Plazma cihazı (Diener, Almanya) Açma/Kapama düğmesi kullanılarak çalıştırılmıştır.
4. PUMP düğmesine basılarak vakum pompası aktive edilmiştir.
5. Bonding işlemi uygulanacak numuneler hazırlanarak cam tepsi üzerine yerleştirilmiştir.
6. Cihaz kapağı kapatılmış ve vakum etkisiyle kapağın tamamen kapanması beklenmiştir.
7. Plazma süresi, cihaz üzerindeki analog kontrol düğmesi kullanılarak 25 saniyeye (4,15 birim) ayarlanmış; plazma gücü ise 20 W (1,0 birim) olarak belirlenmiştir.
8. Gaz-1 valfi kullanılarak sistem basıncı 0,4 mbar seviyesinde sabitlenmiştir.
9. Basınç kararlı hale geldikten sonra jeneratör düğmesine basılarak plazma prosesi başlatılmıştır. Prosesin aktif olduğunu gösteren kırmızı ışığın yanması beklenmiştir. Kırmızı ışığın yanmaması durumunda sistem basıncının uygun seviyede olmadığı kabul edilmiştir.
10. Ayarlanan plazma süresinin tamamlanmasıyla birlikte kırmızı ışık otomatik olarak sönmüştür.
11. Ventilasyon düğmesine basılarak vakum iptal edilmiş, ardından cihaz kapağı açılarak numuneler çıkartılmıştır.
12. Ardışık deneyler için ventilasyon düğmesi kullanılarak sistem yeniden vakum moduna alınmış ve işlem 5 adımdan itibaren aynı şekilde tekrarlanmıştır.

Mikrokanal yapısını içeren PDMS tabaka, kanal yüzeyi cam lamel ile temas edecek şekilde cam lamel üzerine yapıştırılarak mikroakışkan çipin alt tabanı oluşturulmuştur.

Çipin giriş bölgesine, mikrokanal girişini tamamen örtecek şekilde nanolif tabakası yerleştirilmiştir.

Üzerinde mikrokanal bulunmayan ve 1,5 mm çapında delik açılmış PDMS tabaka, nanolif tabakanın üzerine konumlandırılarak alttaki mikrokanallı PDMS tabaka ile plazma yardımlı bonding işlemi ile birleştirilmiştir. Filtrasyon deneyleri sırasında, akış hattına bağlı pin bu giriş deliğine yerleştirilmiş ve örnekler doğrudan nanolif tabaka üzerinden mikrokanal sistemine yönlendirilmiştir. Şekil 3. 5.'de üretilen MF platformunun şematik gösterimi ve fotoğrafik görüntüsü sunulmaktadır.



Şekil 3. 5. MF platformu. a) MF platformunun tasarım şeması ve b) üretim sonrası MF platformunun görünümü.

3.6. Termal ve Kimyasal Hücre Lizis Yöntemlerinin Karşılaştırılması

3.6.1. Huh-7 ve MKH hücrelerinin farklı derecelerde lizise maruz bırakılması

Huh-7 ve MKH hücreleri ayrı ayrılıkta kültür ortamından tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmış ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Her hücre grubundan 1.500.000 hücre deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Deney düzeni kapsamında, her birinde 100.000 Huh-7 ve ya MKH hücresi içerecek şekilde her iki hücre grubundan toplam 15 adet 2 mL'lik mikro santrifüj tüpü hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüpler, her biri üç tekrar içerecek şekilde beş deney grubuna ayrılmıştır. Gruplar aşağıdaki şekilde kodlanmıştır:

Grup 1: 50 °C (n = 3)

Grup 2: 60 °C (n = 3)

Grup 3: 70 °C (n = 3)

Grup 4: 80 °C (n = 3)

Grup 5: Kontrol grubu – Kimyasal lizis (Lizis Tamponu) (n = 3)

Termal lizis uygulanacak örneklerde, lizis öncesinde hücre süspansiyonlarının yoğunluk ölçümleri densitometre cihazı kullanılarak ölçülmüş ve McFarland değerleri kaydedilmiştir.

Termal lizis işleminde hücreler besiyerleri ile birlikte su banyosuna (NCS, Nükleon, TR) yerleştirilmiştir , ve farklı derecelerde 5 dk boyunca lizis işlemine tabi tutulmuştur.

Termal lizis sonrası tüm örneklerde tekrar densitometrik ölçüm yapılmış ve McFarland değerleri kaydedilmiştir. Ardından tüm gruplar için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kimyasal lizis içeren kontrol grubunda, DNA izolasyon kitinin (NucleoGene Genomic DNA Extraction Kit) içerisinde bulunan lizis tamponu kullanılmış; termal lizis gruplarında ise lizis tamponu aşaması atlanarak izolasyonun sonraki basamaklarına geçilmiştir.

Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu NanoDrop (Thermo Fisher, ABD) spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Sonrasında örnekler −20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2. Huh-7 ve MKH hücrelerinde termal ve kimyasal lizis uygulamalarının hücre morfolojisine etkisinin görsel karşılaştırılması

Huh-7/MK hücrelerinin morfolojisi ve uygulanan işlemlerin etkileri arasındaki farkı görmek için, kontrol grubu hücreler ile termal lizis ve kimyasal lizis uygulanan örnekler invert faz kontrast mikroskobu ve SEM kullanılarak incelenmiş ve görüntüleri elde edilmiştir. Her bir örnekte 1 mL besiyeri içerisinde 100.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu oluşturulmuştur. Örnekler üç farklı işlem grubuna ayrılmıştır. Birinci grup kontrol grubu olarak bırakılmış, herhangi bir işlem uygulanmamıştır. İkinci grup Huh-7'ler için 80 °C'de, MKH'ler için 50 °C'de termal lizis uygulanmıştır. Üçüncü grupun ise lizis tampon ile kimyasal lizisi gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon kitinin içerisinde verilen protokole uygun olarak örnekler 5000×g'de 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pellet 100 µL TE tamponu ile süspanse edilmiştir. Ardından 400 µL lizis tamponu ve 20 µL Proteinaz K eklenmiş ve karışım, su banyosunda 60 °C'de 1 saat süreyle çalkalama rejiminde inkübe edilmiştir. Her bir örnekten 20 µL alınarak invert faz kontrast mikroskobu altında incelenmiştir.

SEM görüntülerinin elde edilmesi amacıyla her örnek için 1.000.000 hücre kullanılmıştır. Huh-7 ve MKH hücre hatları için ayrı ayrı olmak üzere üç deney grubu oluşturulmuştur: kontrol grubu (herhangi bir işlem uygulanmamış hücreler), termal lizis uygulanan hücreler ve kimyasal lizise uğratılan hücreler.

Öncelikle hücreler tripsinizasyon işlemi ile kültür yüzeyinden kaldırılmış, sayımları yapılmış ve her grupta 1.000.000 hücre bulunacak şekilde 1 mL besiyeri içerisine dağıtılmıştır. Termal lizis uygulanan hücreler 80 °C'de 5 dakikalık sürede lizis işlemine maruz bıraklmıştır.

Lizis tamponu ile işleme alınan hücreler ise DNA izolasyon kitinin üretici protokolüne uygun şekilde kimyasal lizise tabi tutulmuştur. Sonrasında tüm örnekler için fiksasyon işlemi uygulanmıştır.

Fiksasyon işlemi için tüm örnekler 10.000×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırılmış ve örnekler 500 µL %2 glutaraldehit/PBS çözeltisi ile fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası örnekler +4°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda örnekler tekrar 10.000×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatan uzaklaştırıldıktan sonra örnekler dPBS ile üç kez yıkanmıştır. Her yıkama adımında örneklere dPBS eklenmiş, 4–5 kez pipetaj yapılmış ve +4°C'de 5 dakika bekletildikten sonra 10.000×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Yıkama işlemi sonrası süpernatan uzaklaştırılmış ve örneklere ozmiyum tetroksit ile ikinci fiksasyon uygulanmıştır. Bu işlem için örnekler +4°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler tekrar dPBS ile üç kez yıkanmıştır.

Yıkama işlemini takiben örnekler, %30, %50, %70, %90, %95 ve %100 etanol serilerinde her biri 10 dakika olmak üzere iki kez dehidratasyona tabi tutulmuştur. Dehidratasyon işlemi sonrası örnekler alüminyum folyo üzerine damlatılarak kurumaya bırakılmıştır.

3.7. Filtrasyon Çalışmaları

3.7.1. MKH ve Huh-7 hücrelerinin mikrofiltrasyon sisteminden geçirilmesi

Huh-7 ve ya MKH hücrelerinin filtrasyonu çalışmasında üç farklı deney grubu oluşturulmuştur. Her deney grubunda farklı hücre sayıları kullanılmış, hücreler kendi besiyerinde süspanse edilmiştir ve her bir örneğin toplam hacmi 300 µL olacak şekilde

hazırlanmıştır. Deney grupları sırasıyla 5000, 10000 ve 20000 hücre içerecek şekilde planlanmıştır.

Hazırlanan örneklerden 20 µL alınarak filtrasyon öncesi hücre yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ardından her bir örnek, hazırlanan MF sisteminden 50 µL/dk geçirilmiş ve filtreyi geçen sıvılar ayrı tüplerde toplanmıştır. Filtrasyon sonrası analiz için her tüpten 20 µL örnek alınarak mikroskop altında incelenmiş ve hücre yoğunluğu değerlendirilmiştir. Elde edilen mikroskobik gözlemler sonucunda, nanolif yapıların hücrelerin büyük bir kısmını tuttuğu ve filtrasyon etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.7.2. Lizis edilmiş MKH ve Huh-7 hücrelerinin mikrofiltrasyon sisteminden geçirilmesi

Bu çalışmada Huh-7 ve MKH hücre hatları lizis edilerek MF sisteminden geçirilmiştir. Her bir hücre hattı için kontrol ve deney olmak üzere iki ayrı grup oluşturulmuş, her grupta 100.000 hücre kullanılacak şekilde örnekler hazırlanmıştır.

Hücreler kültür yüzeyinden kaldırılmış, sayımları gerçekleştirilmiş ve deney grupları için gerekli hücre sayıları alınarak 2 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Hücreler 1 mL besiyeri içerisinde süspanse edildikten sonra, DNA izolasyon kitinin üretici protokolüne uygun olarak lizis işlemi uygulanmıştır.

Lizis işleminin ardından deney grupları kurulan MF sisteminden geçirilmiş, filtreyi geçen sıvılar ayrı tüplerde toplanmıştır. Filtrasyon işlemi sırasında pompa akış hızı 50 µL/dk olarak ayarlanmıştır.

Bir sonraki aşamada, lizise uğratılmış kontrol ve deney gruplarından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Bu deney, hücre DNA'sının MF sisteminden geçişini değerlendirmek amacıyla yapılmış olup, kontrol ve deney gruplarındaki DNA miktarları karşılaştırılmıştır. Bu doğrultuda, DNA'nın filtrasyon sisteminden büyük oranda geçmesi beklenmiştir.

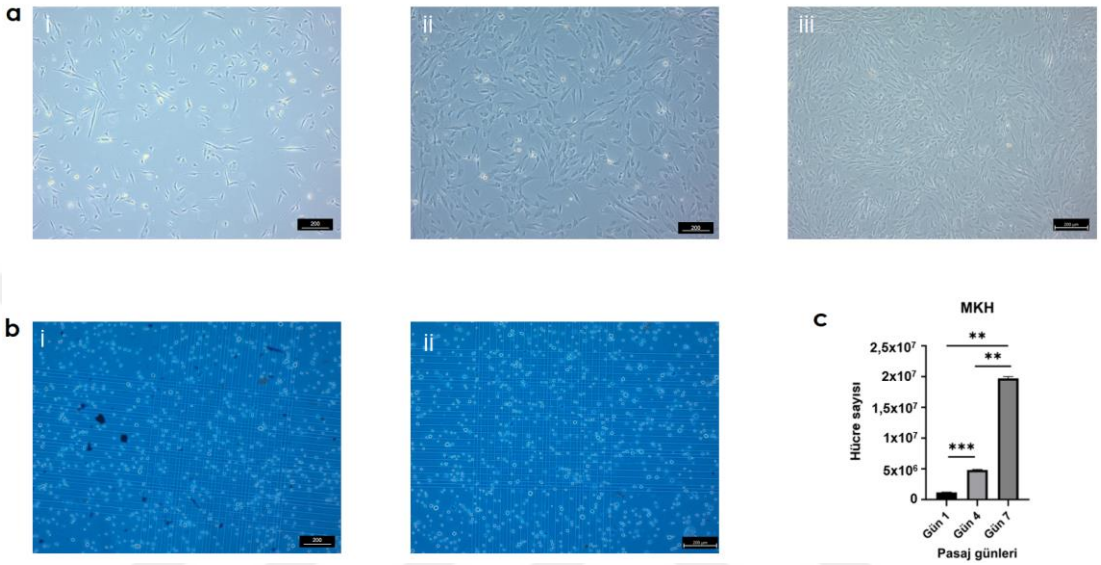
Bir diğer filtrasyon çalışmasında, kontrol ve deney gruplarına ait örneklerin UV-Vis spektrofotometresi ile optik yoğunluk ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen değerler karşılaştırılmıştır. Bu analizde, MF sisteminden geçirilen örneklerde optik yoğunluğun kontrol grubuna kıyasla daha düşük olması beklenmiştir.

Bu kapsamda Huh-7 ve MKH hücre hatları lizis edilerek MF sisteminden geçirilmiştir. Her hücre hattı için kontrol ve deney olmak üzere iki ayrı grup oluşturulmuş ve her grupta 1.000.000 hücre kullanılacak şekilde örnekler hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MKH'lerin Canlılık ve Proliferasyon Analiz Değerlendirilmesi

Kriyoprezervasyon sonrasında çözündürülerek yeniden kültüre alınan iWJ-MKH'lerin morfolojik özellikleri, canlılık düzeyleri ve proliferasyon kapasiteleri incelenmiştir.



Şekil 4. 1. a) Çözülen V4P4 Mezenkimal Kök Hücrelerin morfolojik kontrollerinden elde edilen faz kontrast mikroskobik görüntüleri. i) MKH hücrelerinin 2.gün mikroskopik görüntüsü; ii) MKH hücrelerinin 3.gün mikroskopik görüntüleri; iii) 4.gün mikroskopik görüntüsü. b) Deneyler için Çözülen tüm V4P4 Mezenkimal Kök Hücrelerin canlılık ve proliferasyon analizi. b, i, ii) Çözülen hücrelerin canlılık analizi için thoma lamı üzerine alınmış ve Tripan blue ile boyanmış ışık mikroskopik örnek görüntüleri. c) Çözülen MKH' lerin çözündürme işlemi sonrasındaki hücre sayıları ile 1. ve 2. pasajlar sonrasında elde edilen hücre miktarları değerlendirilmiştir.

Şekil 4.2 a' da ücrelerin kültüre ekilmesini takiben farklı zaman noktalarında alınan mikroskobik görüntüler değerlendirildiğinde, hücrelerin kültür yüzeyine etkin şekilde tutunduğu, proliferatif özelliklerini koruduğu ve mezenkimal kök hücrelere özgü fibroblast benzeri iğsi morfolojilerini muhafaza ettiği belirlenmiştir.

Kültürün ikinci gününde hücrelerin yüzeye adaptasyon sürecinde olduğu, hücre yoğunluğunun nispeten düşük kaldığı ve kültür alanının yaklaşık %25–30'unu kapladığı gözlenmiştir. Üçüncü günde ise hücre sayısında belirgin bir artış meydana

gelmiş, hücrelerin kültür yüzeyinde daha geniş alanlara yayıldığı ve yaklaşık %55-60 konfluens düzeyine ulaştığı tespit edilmiştir. Dördüncü gün görüntülerinde hücre yoğunluğunun önemli ölçüde arttığı, kültür yüzeyinin büyük bölümünün hücrelerle kaplandığı ve konfluens oranının yaklaşık %90-95 seviyelerine yükseldiği görülmüştür. Bu gözlemler, hücrelerin çözündürme işlemi sonrasında büyüme ve çoğalma yeteneklerini koruduğunu göstermektedir.

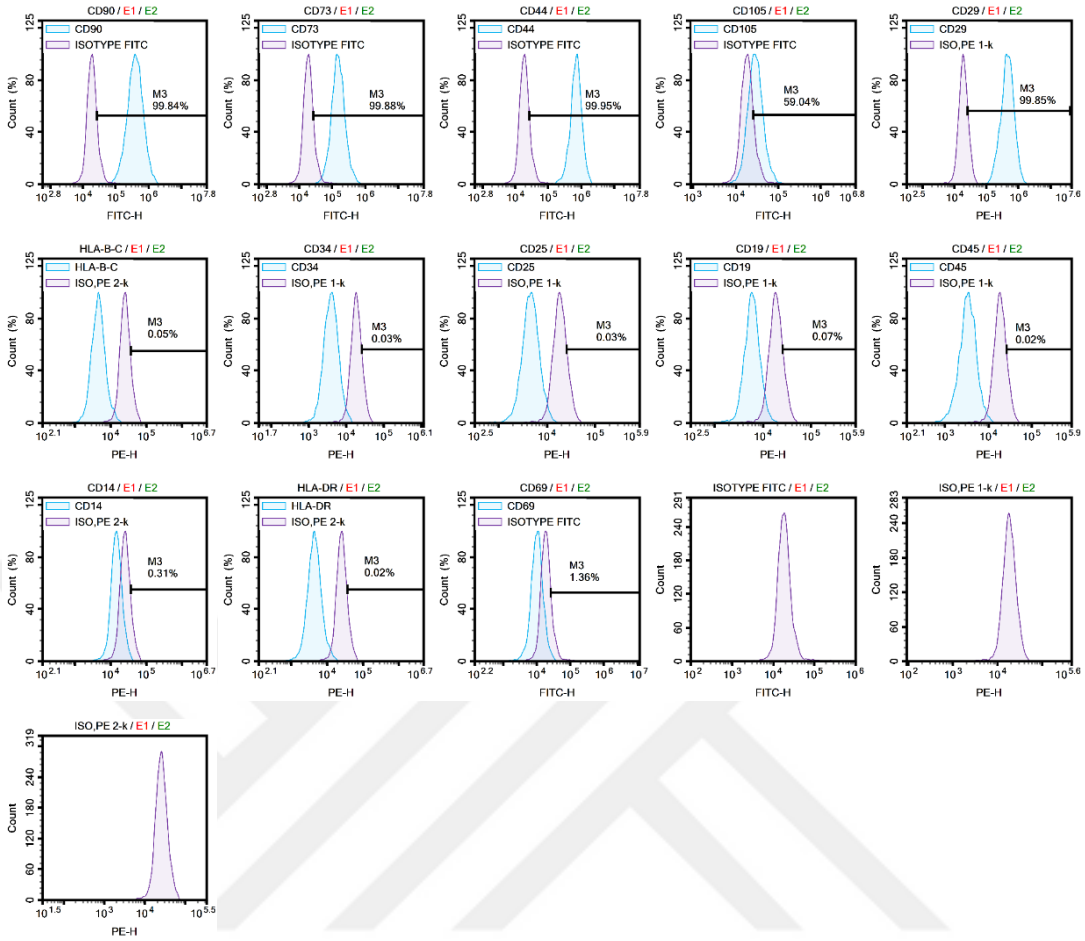
Çözünmüş hücreler Trypan Blue ile boyanmış ve Thoma lamı kullanılarak canlı ve ölü hücre sayımları yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda canlı hücrelerin boyayı dışladığı, canlılığını kaybetmiş hücrelerin ise mavi renkte boyandığı gözlenmiştir. Mikroskobik incelemeler, hücre popülasyonunda canlılık oranının yüksek olduğunu ve hücrelerin sağlıklı şekilde proliferasyon göstermeye devam ettiğini ortaya koymuştur.

Hücre sayımlarından elde edilen veriler incelendiğinde, kültür süresince hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği belirlenmiştir. Kültürün başlangıcında yaklaşık $1{,}2 \times 10^6$ olan hücre sayısı, dördüncü günde yaklaşık $4{,}5 \times 10^6$'ya ulaşmıştır. Yedinci gün sonunda ise hücre sayısının yaklaşık 2×10^7 seviyesine yükseldiği saptanmıştır. İstatistiksel analizler, birinci ve dördüncü günler arasındaki artışın anlamlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca dördüncü ve yedinci günler ile birinci ve yedinci günler arasındaki farkların da anlamlı düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular, kriyoprezervasyondan sonra yeniden canlandırılan iWJ-MKH'lerin yüksek canlılıklarını koruduğunu, kültür koşullarına başarılı bir şekilde adapte olduğunu ve güçlü bir proliferasyon kapasitesi sergilediğini göstermektedir. Hücre sayısında gözlenen yaklaşık 20 katlık artış, uygulanan kültür koşullarının hücre çoğalmasını desteklediğini ve sonraki deneysel aşamalar için yeterli miktarda canlı hücre elde edildiğini ortaya koymaktadır.

4.2. MKH'lerin Karakterizasyon Sonuçları

Çalışma kapsamında insan göbek kordonundan alınan Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu, yüzey belirteçleri temelinde akış sitometrisi yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, hücrelerin immünofenotipik profillerini doğrulamaktadır. Bu analizlerde, iWJ-MKH'lerin fenotipik profili, pozitif ve negatif yüzey belirteçlerinin ekspresyon durumları üzerinden değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 2. iWJ-MKH'lerin kök hücre belirteçleri flow sitometri ile immunofenotipik analizi yapıldığında CD90 (%99.84), CD73 (%90.88), CD44 (%99.95), CD105 (%59.04) ve CD29 (%99.85) pozitifken; HLA-B-C(%0.05), CD69 (%1.36), CD34 (%0.03), CD25 (%0.03), CD19 (%0.07), CD45 (%0.02), CD14 (%0.31), HLA-DR (%0,02) ve CD69 (%1,36) negatif olarak değerlendirilmiştir.

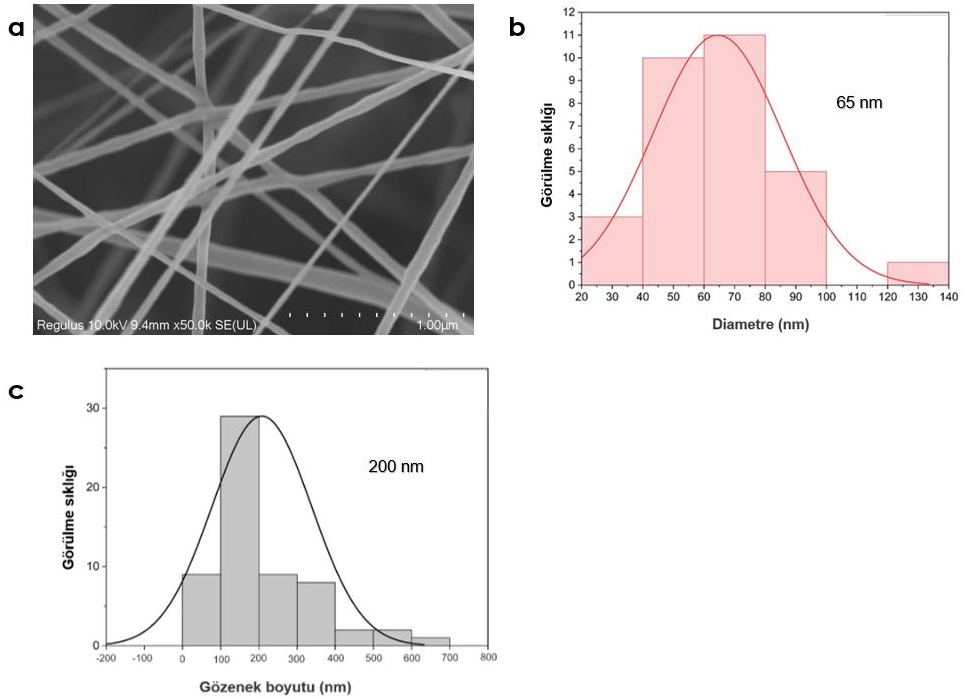
Analiz sonuçlarına göre, kök hücre belirteçlerinden CD90 pozitifliği %99.84, CD73 pozitifliği %90.88, CD44 pozitifliği %99.95, CD105 pozitifliği %59.04 ve CD29 pozitifliği %99.85 olarak değerlendirilmiş ve yüksek oranda ifade edilmiştir. Negatif belirteçlerin oranları ise HLA-B-C(%0.05),CD69 (%1.36), CD34 (%0.03), CD25 (%0.03), CD19 (%0.07), CD45 (%0.02), CD14 (%0.31), HLA-DR (%0,02) ve CD69 (%1,36) olarak belirlenmiş ve iWJ-MKH'lerde bu belirteçlerin ekspresyon seviyeleri oldukça düşük bulunmuştur.

4.3. Nanoliflerin Karakterizasyon Sonuçları

Görüntüleme yöntemleri, özellikle nanolif gibi malzemelerin yapısal değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Optik mikroskopi (OM), SEM, TEM ve AFM gibi teknikler numunenin farklı bölgelerinden görüntü alarak yerel yapıların karşılaştırılmasına olanak tanır.(Širc, Hobzova et al. 2012).

SEM'de görüntü, elektronların numune yüzeyiyle etkileşimi sonucu oluşur. Yüzeyde yük birikimini önlemek için numuneler genellikle iletken bir tabaka ile kaplanır. Yüksek derinlik keskinliği sayesinde SEM, nanoliflerin lif çapı ve gözenek yapısının belirlenmesinde etkili bir yöntemdir (Širc, Hobzova et al. 2012).

Üretilen nanoliflerin morfolojik yapısı, lif dağılımı ve gözenek boyutlarını incelemek amacıyla SEM ile görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri üzerinden lif çapı, gözenek boyutları ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş ve analizler sonucunda nanoliflerin morfolojik özellikleri ve yapısal parametreleri karakterize edilmiştir.



Şekil 4. 3. PAN nanoliflerin karakterizasyonu. Elektro-eğirme parametreleri: Süre 15 dk, iğne-toplayıcı mesafesi 15 cm, akış hızı 0,3 µL/dk, uygulanan voltaj 23,70 kV. a) nanoliflerin SEM görüntüsü (Regulus 10.0 kV 9.4mm x50.0k SE(UL), ölçek çubuğu- 1µm); b) lif çap dağılımı; c) gözenek boyutu dağılımı.

Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen PAN bazlı nanoliflerin morfolojik özellikleri SEM ile incelenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4. 2. a'da sunulmuştur. SEM görüntülerine göre nanoliflerin düzgün, sürekli ve boncuksuz bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Liflerin rastgele yönlenmiş bir ağ yapısı oluşturduğu ve yüzeylerinin pürüzsüz olduğu belirlenmiştir.

Nanoliflerin çap dağılımı analiz edilerek elde edilen histogram Şekil 4. 2. b'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre lif çaplarının 20-140 nm aralığında olduğu ve 60–80 nm aralığında yoğunlaştığı, ortalama lif çapının ise yaklaşık 65 nm olduğu tespit edilmiştir. Lif çapı dağılımının belirli bir aralıkta toplandığı, ancak düşük oranda daha yüksek çap değerlerinin de bulunduğu görülmüştür.

Nanolif matının gözenek boyutu dağılımı Şekil 4. 2. c'de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre gözenek boyutlarının yaklaşık 84 nm ile 800 nm arasında değiştiği, en çok 100-200 nm aralığında olduğu ve ortalama gözenek boyutunun 200 nm civarında olduğu belirlenmiştir. Gözenek boyutu dağılımının geniş bir aralıkta değişim gösterdiği gözlenmiştir.

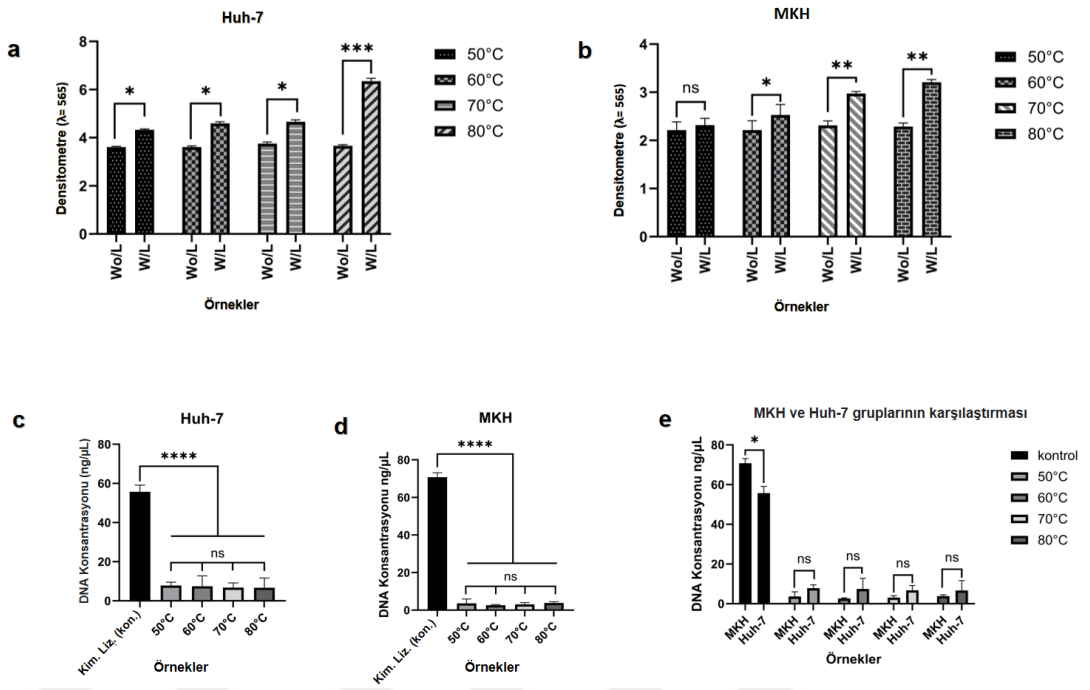
4.4. Termal ve Kimyasal Lizis Uygulamalarının Karşılaştırmalı Sonuçları

4.4.1. Yoğunluk ölçümleri ve DNA sonuçlarının karşılaştırılması

Farklı sıcaklık derecelerinde uygulanan termal lizis işlemlerinin MKH ve Huh-7 hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, lizis öncesi ve lizis sonrası hücre yoğunlukları densitometrik analiz yöntemi ile belirlenmiş ve elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Termal lizis işlemi sonrasında örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'nın konsantrasyon değerleri NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen DNA konsantrasyonları, lizis tamponu kullanılarak kimyasal yöntemle lize edilen kontrol gruplarından izole edilen DNA miktarları ile karşılaştırılmıştır.

Bu karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda, farklı sıcaklık derecelerinde uygulanan termal lizis yönteminin DNA verimi üzerindeki etkisi belirlenmiş ve yöntem, kimyasal lizis ile elde edilen sonuçlar açısından analiz edilmiştir. Bu bulgular, termal lizis parametrelerinin optimize edilmesine yönelik veri sağlamaktadır.



Şekil 4. 4. Lizis optimizasyonu çalışmalarının sonuçları. a) ve b) Termal lizis uygulanan Huh-7 ve MKH hücrelerinin lizis öncesi ve sonrası yoğunluk ölçümleri (Wo/L- lizis uygulanmamış, W/L- lizis uygulanmış), c) ve d) Huh-7 ve MKH hücrelerinde kimyasal lizis (kontrol) ve termal lizis sonrasında elde edilen DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları, e) DNA miktarlarının karşılaştırması.

Şekil 4. 3. a ve b'de sırasıyla MKH ve Huh-7 hücrelerine ait densitometrik (λ=565) analiz sonuçları sunulmuştur. Elde edilen verilere göre, her iki hücre grubunda da termal lizis sonrası ölçülen yoğunluk değerleri, lizis öncesi değerlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Lizis sonrası yoğunluk değerlerinin uygulanan sıcaklık derecesi arttıkça artış gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek yoğunluk değerleri 80 °C uygulanan grupta elde edilmiştir. Bu bulgu, her iki hücre hattında da 80 °C'nin hücre bütünlüğünün bozulması açısından en etkili sıcaklık olduğunu ve lizis verimliliğinin bu derecede maksimum seviyeye ulaştığını göstermektedir.

Şekil 4. 3. c ve d' de Huh-7 ve MKH hücrelerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında uygulanan termal lizis işlemi ile kontrol grubunda kimyasal lizis gerçekleştirilerek elde edilen DNA konsantrasyonları gösterilmektedir.

Huh-7 hücrelerinde kontrol grubunda elde edilen DNA konsantrasyonu yaklaşık 56 ng/µL civarında ölçülürken, termal lizis uygulanan gruplarda DNA konsantrasyonunun belirgin şekilde daha düşük olduğu görülmüştür. 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80°C'de inkübasyon sıcaklıklarında DNA konsantrasyonlarının benzer seviyelerde (yaklaşık 3–8 ng/µL aralığında) olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda kontrol grubu ile termal lizis grupları arasındaki farkın çok yüksek derecede anlamlı olduğu (****, $p < 0.0001$) belirlenmiştir. Termal lizis gruplarının kendi aralarında ise anlamlı fark gözlenmemiştir (ns).

Benzer şekilde MKH hücrelerinde de kontrol grubunda ölçülen DNA konsantrasyonu yaklaşık 71 ng/µL civarında olup, termal lizis uygulanan tüm sıcaklıklarda DNA konsantrasyonunun belirgin şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C sıcaklıklarında elde edilen DNA konsantrasyonlarının 2–4 ng/µL aralığında olduğu ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p < 0.0001$). Termal lizis gruplarının kendi aralarında ise anlamlı fark gözlenmemiştir (ns).

Şekil 4. 3. e'de Huh-7 ve MKH hücre gruplarının karşılaştırmalı DNA konsantrasyon sonuçları verilmiştir. Her iki hücre grubunda da kontrol örneklerinin DNA konsantrasyonlarının termal lizis uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Hücre tipleri arasında kontrol grubunda anlamlı farklılık gözlenirken ($p<0.05$), termal lizis uygulanan sıcaklık gruplarında Huh-7 ve MKH hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (ns).

Aşağıda bulunan Tablo 4. 1. ve Tablo 4. 2' de MKH ve Huh-7 hücrelerinin NanoDrop sonuçları sunulmaktadır. Tablolardan da anlaşıldığı üzere kimyasal lizis uygulanmış gruplar DNA konsantrasyon ve saflığı açısından termal lizis uygulanan gruplara kıyasla daha yüksek DNA konsantrasyonu ve daha uygun saflık oranları göstermiştir. Buda bize kimyasal lizisin yüksek miktarda ve kaliteli DNA elde edilmesi açısından daha uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. 1. Mezenkimal Kök Hücrelerin NanoDrop sonuçları.

MKH	ng/µL	A260/280	A260/230	A260	A280
50 ºC derecede lizis edilen hücreler.	1,1- 1,3 3,3- 3,4 6,2- 6,6	3,97- 2,74 2,50- 2,18 0,83- 0,82	0,46- 0,93 0,68- 0,61 0,18- 0,17	0,02- 0,03) 0,07- 0,07 0,12- 0,13	0,01- 0,01 0,03- 0,03 0,15- 0,16
60 ºC derecede lizis edilen hücreler.	2,6- 2,1 2,7- 2,8 3,1- 2,6	1,75- 1,78 1,36- 1,67 1,40- 1,32	0,40-0,27 0,32- 0,35 0,38- 0,36	0,05- 0,04 0,05-0,06 0,06- 0,05	0,03- 0,02 0,04- 0,03 0,04- 0,04
70 ºC derecede lizis edilen hücreler.	4,4- 3,6 3,2- 3,4 1,9- 1,9	0,74- 0,65 0,87- 0,72 0,83- 0,84	0,13- 0,10 0,12- 0,12 0,15- 0,16	0,09- 0,07 0,06- 0,07 0,04- 0,04	0,12- 0,11 0,07- 0,09 0,05- 0,05
80 ºC derecede lizis edilen hücreler.	4,2- 4,4 3,1- 2,8 4,2- 4,1	0,63- 0,59 0,78- 0,74 0,70- 0,61	0,10- 0,10 0,11- 0,09 0,10- 0,09	0,08- 0,09 0,06- 0,06 0,08- 0,08	0,13- 0,15 0,08- 0,08 0,12- 0,14
Kimyasal lizis (kontrol)	73,1- 73,6 70,2- 71,3 68,1- 68,4	2,06- 2,06 2,00- 2,02 1,95- 2,00	2,19- 2,19 2,15- 2,17 2,17- 2,18	1,46- 1,47 1,43- 1,45 1,42- 1,44	0,71- 0,72 0,74- 0,75 0,73- 0,72

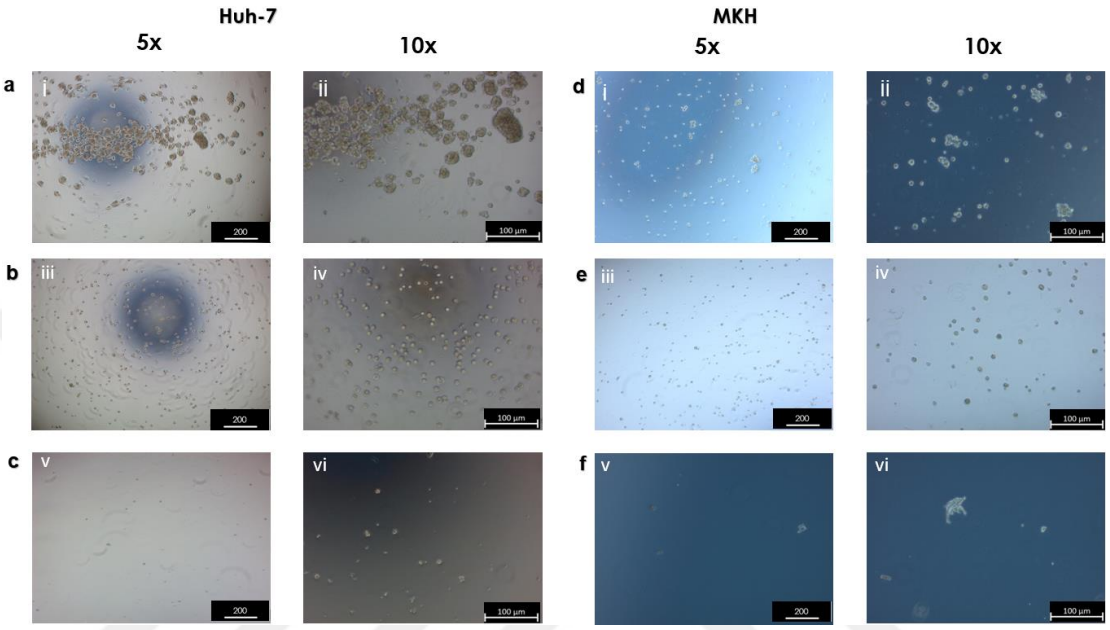
Tablo 4. 2. Huh-7 hücrelerinin NanoDrop sonuçları.

Huh-7	ng/µL	A260/280	A260/230	A260	A280
50 ºC derecede lizis edilen hücreler.	8,3- 9,2 5,1- 6,5 8,7- 9,1	0,54- 0,54 0,59- 0,60 0,52- 0,53	0,07- 0,08 0,09- 0,10 0,09- 0,09	0,17- 0,18 0,10- 0,13 0,17- 0,18	0,30- 0,34 0,17- 0,21 0,33- 0,34
60 ºC derecede lizis edilen hücreler.	5,6- 6,6 13,9- 14 2,1- 2,6	0,62- 0,63 0,52- 0,52 0,62- 0,67	0,09- 0,10 0,09- 0,09 0,13- 0,14	0,11- 0,13 0,28- 0,28 0,04- 0,05	0,18- 0,21 0,53- 0,54 0,07- 0,08
70 ºC derecede lizis edilen hücreler.	9,6- 10 5,5- 5,7 4,5- 5,1	0,56-0,55 0,62- 0,64 0,66- 0,66	0,10- 0,09 0,09- 0,09 0,11- 0,11	0,19- 0,20 0,11- 0,11 0,09- 0,10	0,34- 0,36 0,17- 0,18 0,14- 0,15
80 ºC derecede lizis edilen hücreler.	3,3- 3,8 3,3- 3,6 3,1-3,4	0,71- 0,88 0,65- 0,60 0,87- 0,87	0,21- 0,23 0,12- 0,11 0,16- 0,15	0,06- 0,08 0,07- 0,07 0,06- 0,07	0,09- 0,09 0,10- 0,12 0,07- 0,08
Kimyasal lizis (kontrol)	56,2- 60,4 51,7-52,8 58,7- 54,4	2,01- 2,01 2,03- 2,00 1,97- 1,80	2,26- 2,25 2,26- 2,29 2,23- 1,55	1,19- 1,23 1,21- 1,25 1,16- 1,28	0,59- 0,61 0,60- 0,63 0,59- 0,71

Genel olarak her iki hücre hattında da kimyasal lizis kullanılan kontrol grubunda elde edilen DNA miktarının ve saflığının, yalnızca termal lizis uygulanan gruplara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.4.2. Lizis işlemlerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkilerinin görsel analizi

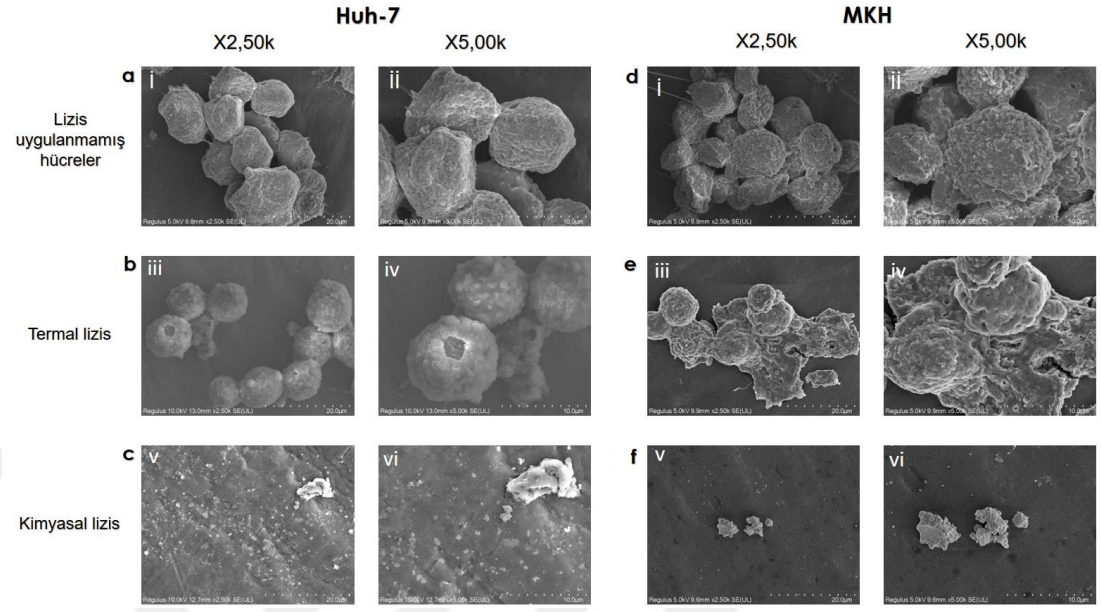
Termal ve kimyasal lizis yöntemlerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, lizis uygulanmış hücreler ile kontrol grubu hücrelerinin görüntüleri SEM ve invert faz kontrast mikroskobu kullanılarak elde edilmiş ve karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.



Şekil 4. 5. Huh-7 ve MKH hücrelerinin invert faz kontrast mikroskobundan 5x ve 10x büyütmelerde elde edilen özgün görüntüleri ile termal lizis ve kimyasal lizis uygulanmış hücrelere ait görüntüler. Huh-7: a) i, ii: hücrelerin kendi görüntüsü; b) iii, iv: termal lizis uygulanmış hücreler; c) v, vi: kimyasal lizis uygulanmış hücreler. MKH: d) i, ii: hücrelerin kendi görüntüsü; e) iii, iv: termal lizis uygulanmış hücreler; f) v, vi: kimyasal lizis uygulanmış hücreler.

Şekil 4. 4.'de gösterildiği üzere, termal lizis uygulanan hücreler ile kontrol grubu arasında morfolojik açıdan belirgin bir farklılık gözlenmemiş, hücresel bütünlüğün büyük ölçüde korunduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda zamana dayalı bir hücre agregasyonu gözlemlenmiştir. Bu bulgu, uygulanan termal lizis koşullarının hücre yapısını bozmakta sınırlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşın, kimyasal lizise maruz bırakılan örneklerde hücre bütünlüğünün kaybolduğu ve görüntü alanında ağırlıklı olarak hücre kalıntılarının bulunduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, kimyasal lizis yönteminin termal lizise kıyasla hücre parçalanması açısından daha yüksek etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Gözlenen morfolojik farklılıkların daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesi amacıyla SEM görüntüleme yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 4. 6. Huh-7 ve MKH hücrelerinin sırasıyla x5.00k ve 2.50k büyütmedeki SEM görüntüleri. Huh-7: a) lizis uygulanmamış hücre: i (Regulus 5.0 kV 9.8mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); ii (Regulus 5.0 kV 9.8mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm), b) termal lizis uygulanmış hücre: iii (Regulus 10.0 kV 13.0mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); iv (Regulus 10.0 kV 13.0mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm), c) kimyasal lizis uygulanmış hücre: v (Regulus 10.0 kV 12.7mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); vi (Regulus 10.0 kV 12.7mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm). MKH: d) lizis uygulanmamış hücre: i (Regulus 5.0 kV 9.8mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); ii (Regulus 5.0 kV 9.8mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm), e) termal lizis uygulanmış hücre: iii (Regulus 5.0 kV 9.9mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); iv (Regulus 5.0 kV 9.9mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10µm), f) kimyasal lizis uygulanmış hücre: v (Regulus 5.0 kV 9.6mm x2.50k SE(UL), ölçek çubuğu- 20.0µm); vi (Regulus 5.0 kV 9.6mm x5.00k SE(UL), ölçek çubuğu- 10.0µm).

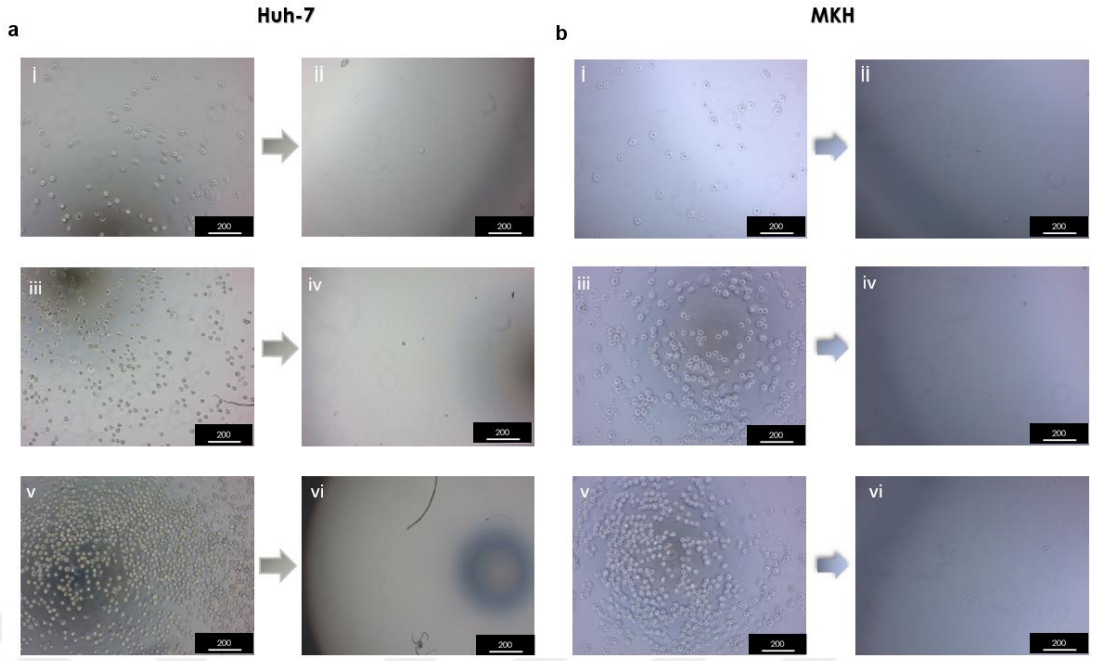
Şekil 4. 5'de hücrelere ait SEM görüntüleri sunulmuştur. a ve d' de karşılaştırma için kontrol görevi gören, bozulmamış hücre morfolojisine sahip, işlem

uygulanmamış Huh- 7 ve MKH hücrelerini göstermektedir. b ve e' de 80°C' de 5 dakikalık süre boyunca ısıya maruz bırakılan Huh- 7 ve MKH hücrelerini göstermektedir; burada hücre büzülmesi, kırışma, por oluşumu, hücre duvarı bütünlüğünün kısmi ve tam kaybı ve hücre zarının eriyip dağılması gibi bazı morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Bu değişiklikler, ısı kaynaklı protein denatürasyonu ve membran kararsızlığı yoluyla etkili lizisi göstermektedir (Membrillo-Hernández, La Mora et al. 1995). c ve f' de, kimyasal lizis işlemi uygulanmış Huh-7 ve MKH hücrelerinde, hücre zarının tamamen parçalandığını ve ortamda sadece farklı boyutlarda hücresel partiküllerin kaldığını göstermektedir. Bu görüntüler kimyasal lizisin ısı işleminden daha etkili olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, termal lizis uygulanan örneklerde hücre bütünlüğünün büyük ölçüde korunduğu, ancak sıcaklığın etkisiyle hücre yüzeyinde yer yer çatlak ve por benzeri yapılar oluştuğu gözlenmiştir. Buna karşın, kimyasal lizis uygulanan grupta hücresel yapının tamamen bozulduğu ve görüntü alanında ağırlıklı olarak hücresel parçacıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra ısı yöntemi ile lizis uygulanan örneklerden elde edilen genomik DNA veriminin kimyasal lizise kıyasla daha düşük olması bu yöntemin kısmi verimliliğini yansıtmaktadır.

4.5. MKH ve Huh-7 Hücrelerinin Filtrasyon Deneyinin Mikroskopik Görselleri

Deney sürecinde farklı hücre yoğunluklarında hazırlanan MKH ve Huh-7 hücre süspansiyonları ayrı ayrı MF sisteminden geçirilmiştir. Filtrasyon işlemi öncesinde ve sonrasında örneklerden mikroskobik görüntüler elde edilmiş ve bu görüntüler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda sistemin hücre tutma ve filtrasyon etkinliği değerlendirilmiş, MF platformunun performansı ortaya konulmuştur.

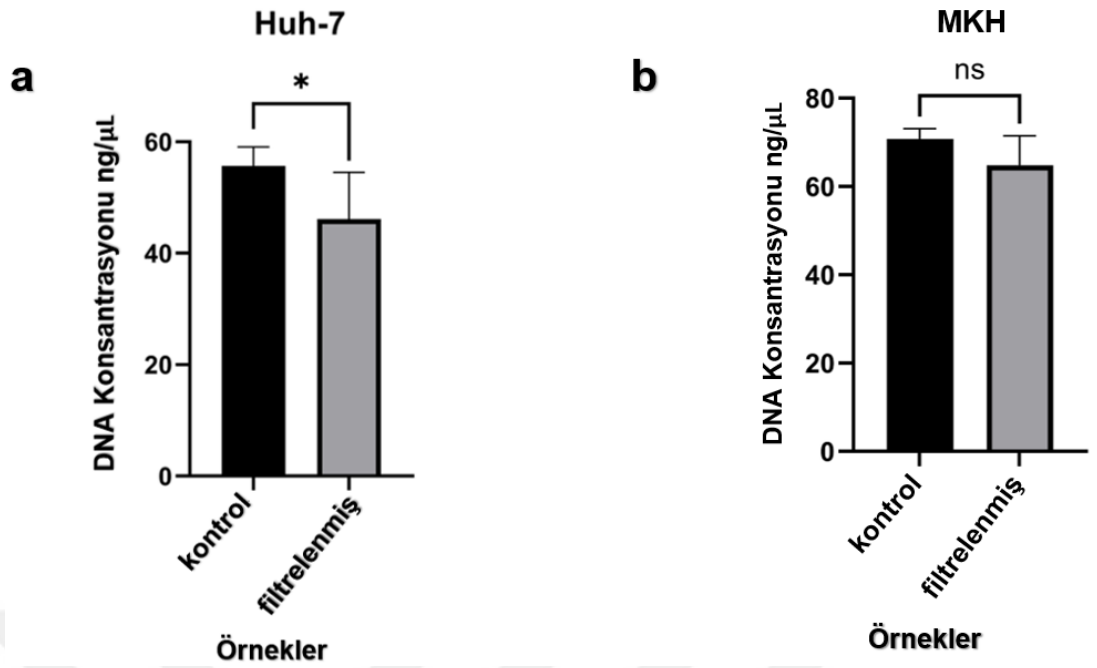


Şekil 4. 7. Hücre filtrasyonuna ait 10x büyütmede alınan mikroskobik görüntüler. a) Huh-7 ve b) MKH hücreleri 5000, 10000 ve 20000 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda filtre edilmiştir. i, iii ve v filtrasyon öncesi; ii, iv ve vi filtrasyon sonrası görüntüleri göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında filtrasyon öncesi ve filtrasyon sonrası hücre yoğunluğu, elde edilen mikroskobik görüntüler üzerinden analiz edilmiştir ve Şekil 4. 6'da gösterilmiştir. Filtrasyon öncesi örneklerde yüksek hücre yoğunluğu gözlenirken, filtrasyon sonrası alınan görüntülerde hücre sayısının belirgin düzeyde azaldığı ve ortamda çok az sayıda hücre kaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, geliştirilen MF sisteminin hücreleri etkin bir şekilde tuttuğunu ve yüksek filtrasyon verimliliğine sahip olduğunu göstermektedir.

4.6. Lizis Edilmiş Huh-7 ve MKH Hücrelerinin Filtrasyon Sonrası DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Yapılmış lizis çalışmalarından sonra kimyasal yöntemin kullanılmasına karar verilmiş ve bir sonraki aşamalara kimyasal lizisle devam edilmiştir. Kimyasal lizis yapılmış 100.000 hücre filtrasyon sisteminden geçirilmiş ve filtrasyon sonrası örneklerin DNA konsantrasyonu sonuçları kontrol gruplarının DNA miktarı ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 8. a) ile b) Huh-7 ve MKH hücrelerinde filtrasyon öncesi ve sonrası DNA konsantrasyonları. DNA'nın büyük oranda sistemden geçtiği görülmüştür (Huh-7: %80; MKH: %90; *p<0,05).

Şekil 4. 7. a ve b' de, Huh-7 ve MKH hücre hatlarına ait filtrasyon öncesi (kontrol) ve filtrasyon sonrası DNA konsantrasyonları karşılaştırmalı olarak sunulmaktadır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, her iki hücre hattında da filtrasyon işlemi sonrasında DNA konsantrasyonunda bir miktar azalma gözlenmesine rağmen, DNA'nın büyük bir kısmının filtrasyon sisteminden geçtiği belirlenmiştir.

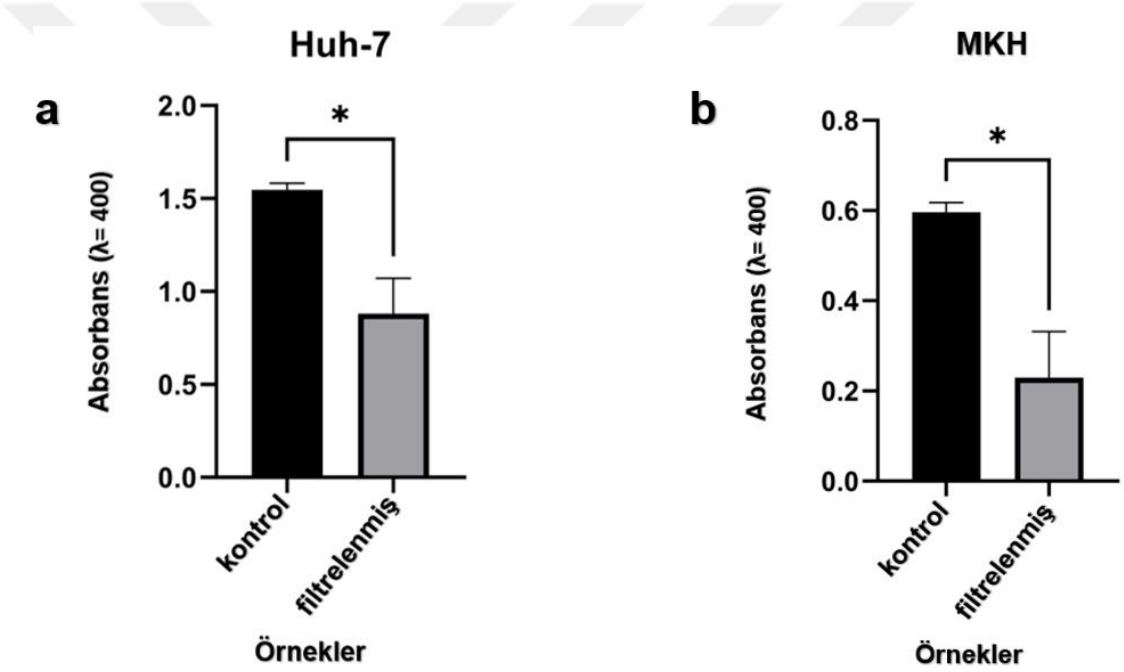
Huh-7 hücre hattında filtrasyon öncesi DNA konsantrasyonu yaklaşık 56 ng/µL civarında iken, filtrasyon sonrası bu değer yaklaşık 46 ng/µL olarak ölçülmüş ve DNA geçiş oranı yaklaşık %80 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda bu farkın anlamlı olduğu görülmüştür (*p<0,05). Buna karşın MKH hücrelerinde filtrasyon öncesi DNA konsantrasyonu yaklaşık 71 ng/µL, filtrasyon sonrası ise 65 ng/µL olarak belirlenmiş ve DNA geçiş oranı yaklaşık %90 olarak hesaplanmıştır ve kontrol ile deney grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (ns). MKH hücrelerinde gözlenen azalma daha sınırlı olup, DNA'nın büyük oranda sistemden geçtiğini göstermektedir.

Bu bulgular, geliştirilen filtrasyon platformunun her iki hücre hattında da yüksek DNA geçirgenliği sağladığını ve özellikle MKH hücrelerinde daha yüksek verimle çalıştığını ortaya koymaktadır. Ayrıca sonuçlar, filtrasyon sisteminin hücresel

lizis sonrası açığa çıkan DNA'nın etkin bir şekilde toplanmasına olanak sağladığını desteklemektedir.

4.7. Lizis Edilmiş Huh-7 ve MKH Hücrelerinin Filtrasyon Öncesi ve Sonrası Yoğunluk Ölçümlerinin Sonuçları

Filtrasyon etkinliğini değerlendirmek amacıyla, eşit hücre sayısı kullanılarak kontrol ve deney grupları oluşturulmuştur. Lizis işlemi sonrasında deney grubuna ait örnekler filtrasyon sisteminden geçirilmiş, ardından elde edilen örneklerin yoğunlukları ölçülerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçları aşağıda bulunan Şekil 4.8.'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 9. MKH ve Huh-7 hücreleri için filtrasyon öncesi ve sonrası absorbans (λ = 400 nm) değerleri. Filtrasyon sonrası belirgin azalma, örnek yoğunluğunun düştüğünü ve sistemin etkili olduğunu göstermektedir (Huh-7: ~%50; MKH: ~%62; *p<0,05).

Şekil 4. 8. a ve b'de Huh-7 ve MKH hücrelerinde filtrasyon öncesi ve sonrası örneklerin yoğunluk ölçümleri (Absorbans, λ = 400 nm) gösterilmektedir.

Huh-7 hücrelerinde filtrasyon öncesi örneklerin absorbans değeri yaklaşık ortalama 1,55 olarak ölçülürken, filtrasyon sonrasında bu değerin ortalama 0,78 seviyesine düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize sistemin Huh-7 hücreleri için

yaklaşık %50 oranda bir filtrasyon gerçekleştirdiğini gösteriyor. Filtrasyon işlemi sonrasında ölçülen absorbans değerindeki bu azalma, örnek yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığını göstermektedir. İstatistiksel analiz sonucunda kontrol ve filtrelenmiş örnekler arasındaki farkın **anlamlı olduğu ($p < 0,05$)* belirlenmiştir.

MKH hücrelerinde ise filtrasyon öncesi örneklerin absorbans değeri yaklaşık 0,60 olarak ölçülmüş, filtrasyon sonrasında bu değerin yaklaşık 0,23 seviyesine düştüğü görülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda MKH hücreleri için filtrasyon oranı yaklaşık %60 olarak hesaplanmıştır. Huh-7 hücrelerinde olduğu gibi MKH hücrelerinde de filtrasyon sonrasında örnek yoğunluğunda belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Yapılan istatistiksel analizde kontrol ve filtrelenmiş örnekler arasındaki farkın **anlamlı olduğu ($p < 0,05$)* tespit edilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, her iki hücre hattında da filtrasyon işlemi sonrasında ölçülen absorbans değerlerinin azalması, filtrasyon sisteminin örnek içerisindeki hücresel veya partiküler bileşenlerin uzaklaştırılmasında etkili olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, iWJ- MKH ve Huh-7 hücreleri kullanılarak geliştirilen nanolif tabanlı MF platformunun performansı; hücre karakterizasyonu, lizis yöntemleri ve filtrasyon verimliliği açısından çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular hem kullanılan hücrelerin doğrulanması hem de geliştirilen sistemin biyomedikal uygulamalara uygunluğu açısından literatür ile uyum göstermektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında gerçekleştirilen immünofenotipik analizler, elde edilen hücrelerin MKH özelliklerini taşıdığını açıkça ortaya koymuştur. International Society for Cellular Therapy tarafından tanımlanan kriterlere göre MKH'lerin CD90, CD73 ve CD105 gibi yüzey belirteçlerini yüksek düzeyde eksprese etmesi ve CD34, CD45 gibi hematopoetik belirteçleri düşük düzeyde göstermesi beklenmektedir (Dominici, Le Blanc et al. 2006, Sensebé, Gadelorge et al. 2013) . Bu çalışmada CD90 (%99,84), CD73 (%90,88), CD44 (%99,95) ve CD29 (%99,85) gibi belirteçlerin yüksek oranlarda pozitif bulunması ve negatif belirteçlerin ihmal edilebilir düzeyde kalması, hücrelerin fenotipik olarak doğru şekilde tanımlandığını göstermektedir. Ancak CD105 ekspresyonunun (%59,04) diğer pozitif belirteçlere kıyasla daha düşük olması dikkat çekmektedir. Literatürde, kültür koşulları, pasaj sayısı ve mikroçevresel faktörlerin yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu etkileyebileceği belirtilmiştir (Anderson, Carrillo-Gálvez et al. 2013). Bu nedenle elde edilen sonuçlar genel olarak kabul edilebilir sınırlar içerisinde değerlendirilmiştir.

Nanoliflerin karakterizasyonuna ilişkin bulgular, elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen yapıların MF uygulamaları için uygun özellikler taşıdığını göstermektedir ve yüksek yüzey alanı, kontrollü porozite sağlayarak filtrasyon performansını artıran kritik parametrelerdir. Literatürde, elektro-eğrilmiş nanoliflerin yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve ayarlanabilir gözenek yapısı sayesinde biyolojik filtrasyon uygulamalarında üstün performans gösterdiği vurgulanmaktadır (Huang, Zhang et al. 2003, Li and Xia 2004, Bhardwaj and Kundu 2010). Ayrıca PAN bazlı nanoliflerin görece kimyasal dayanıklılığı ve mekanik stabilitesi, mikroakışkan sistemlerle entegrasyon açısından avantaj sağlamaktadır (Reneker and Yarin 2008, Lu, Li et al. 2013).

FESEM analizlerine göre elektro-eğirme ile elde edilen nanoliflerin çaplarının 20–140 nm aralığında değiştiği ve 60–80 nm aralığında yoğunlaştığı, ortalama çapın

ise ~65 nm olduğu belirlenmiştir. Bu dağılım, liflerin genel olarak homojen olduğunu, ancak sınırlı sayıda daha kalın liflerin de oluştuğunu göstermektedir. Literatürde, lif çapının çözeltinin viskozitesi ve işlem parametrelerine bağlı olarak artabileceği belirtilmektedir (Henriques, Vidinha et al. 2009).

Gözenek boyutlarının 84–700 nm arasında değişmesi ve özellikle 100–200 nm aralığında yoğunlaşması, ortalama gözenek boyutunun ise ~200 nm olması, nanolif matının yüksek poroziteye sahip olduğunu göstermektedir. Elektro-eğrilmiş yapıların bu özellikleri, filtrasyon uygulamalarında etkin performans sağlamaktadır (Henriques, Vidinha et al. 2009).

Ayrıca, uygun viskoelastik özellikler sayesinde boncuksuz ve düzgün lif morfolojisi elde edilmiştir. Literatürde viskozitenin lif çapı ve dağılımı üzerinde belirleyici olduğu vurgulanmaktadır (Oliveira, Mattoso et al. 2013).

Sonuç olarak, elde edilen nanolif yapısı yüksek yüzey alanı ve kontrollü gözenek dağılımı ile mikrofiltrasyon uygulamaları için uygun olup, geliştirilen sistemin biyomedikal kullanım potansiyelini desteklemektedir. Bununla birlikte, gözenek boyutları SEM analizleri ile nanolif matın serbest (bulk) durumunda elde edilmiş olup, mikroakışkan kanal içerisine entegre edildiğinde yapının fiziksel ve hidrodinamik koşullara bağlı olarak değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Mikrokanal içerisinde akış sırasında oluşan basınç farkı, liflerin yeniden düzenlenmesi, kanal duvarları ile etkileşim ve olası kısmi sıkışma etkileri, lifler arası boşlukların azalmasına ve efektif gözenek boyutunun düşmesine neden olabilmektedir. Ayrıca filtrasyon sürecinde gerçekleşen adsorpsiyon ve kısmi tıkanma etkileri de zamanla gözenek yapısının dinamik olarak daralmasına katkı sağlayabilmektedir. Bu nedenle, SEM ile belirlenen gözenek boyutları sistemin nominal özelliklerini yansıtırken, mikroakışkan sistem içerisindeki gerçek filtrasyon davranışı ‘efektif yani hidrodinamik gözenek boyutu’ ile tanımlanmalı ve deneysel filtrasyon sonuçları ile birlikte ele alınması önemlidir.

Lizis yöntemlerinin karşılaştırılması, çalışmanın en kritik aşamalarından birini oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Huh-7 ve MKH hücre hatlarında uygulanan termal lizis işleminin etkinliği hem densitometrik analiz hem de DNA konsantrasyonu ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, her iki hücre hattında da lizis sonrası yoğunluk değerlerinin lizis öncesine kıyasla arttığını ve bu artışın sıcaklığa

bağlı olarak yükseldiğini göstermektedir. Özellikle 80 °C'de elde edilen en yüksek yoğunluk değerleri, bu sıcaklığın hücre bütünlüğünün bozulması açısından en etkili derece olduğunu ortaya koymaktadır.

Buna karşın DNA konsantrasyonu sonuçları incelendiğinde, kimyasal lizis uygulanan kontrol grubunda elde edilen DNA miktarının, yalnızca termal lizis uygulanan gruplara kıyasla her iki hücre hattında da anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Huh-7 hücrelerinde kontrol grubunda yaklaşık 60 ng/µL civarında ölçülen DNA konsantrasyonu, termal lizis uygulanan gruplarda 3–8 ng/µL aralığında kalmıştır. Benzer şekilde MKH hücrelerinde kontrol grubunda yaklaşık 70 ng/µL civarında olan DNA konsantrasyonu, termal lizis uygulanan tüm sıcaklıklarda 2–4 ng/µL aralığında ölçülmüştür. Termal lizis uygulanan hücrelerin deney grupları kendi içlerinde ve diğer hücrenin deney gruplarıyla karşılaştırılmış ve DNA miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (ns). Bu bulgular, termal lizisin hücre parçalanması açısından tam olarak etkili olmadığını, DNA verimi açısından tek başına yeterli olmadığını göstermektedir.

Literatürde bildirilen benzer bir çalışmada, mikroakışkan bir sistem içerisinde termal lizis koşulları optimize edilmiş ve başlangıçta 90 °C'de 5 dakika olarak belirlenen lizis koşullarının, çip içerisinde uygulamada sorun oluşturduğu için 80 °C'de 2 dakika olarak revize edildiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada sıcaklık artışı ile birlikte DNA konsantrasyonu ve özellikle DNA saflığında artış gözlenmiş; ayrıca lizis sonrası uygulanan MF ve mikroboncuk temelli saflaştırma adımları sayesinde DNA'nın ileri analizler için uygun hale getirildiği rapor edilmiştir. Özellikle saflaştırma uygulanmayan örneklerde PCR başarısının düşük olduğu, buna karşılık filtreleme sonrası tüm örneklerde belirgin PCR bantlarının elde edildiği vurgulanmıştır (Ha, Cho et al. 2011).

Bu literatür bulguları ile mevcut çalışma birlikte değerlendirildiğinde, iki çalışma arasındaki temel farkın yalnızca DNA saflaştırma basamağından değil, aynı zamanda lizis verimliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürdeki sistemde lizis sonrası mikrofiltrasyon ve saflaştırma adımları uygulanarak inhibitör bileşenler uzaklaştırılmış ve DNA kalitesi artırılmıştır (Ha, Cho et al. 2011). Buna karşılık bu çalışmada yalnızca termal lizis uygulanmış olup, elde edilen düşük DNA konsantrasyonlarının temel nedeni, termal lizisin hücrelerin tam olarak parçalanmasını sağlayamaması ve DNA'nın yeterli düzeyde açığa çıkmaması olabilir. Ayrıca yüksek

sıcaklık uygulamaları DNA fragmentasyonuna neden olarak ölçülen DNA miktarını da olumsuz etkileyebilir. Saflaştırma basamağının uygulanmaması ise daha çok DNA kalitesini ve downstream analizleri etkileyebilecek bir faktör olarak değerlendirilmektedir.

Ayrıca literatürde termal lizisin, birçok mikroakışkan cihazda kullanılan bir yöntem olduğu ve yüksek yüzey/hacim oranı sayesinde, ısıyı hızla dağıtarak hücre zarlarını etkili bir şekilde parçaladığı bildirilmiştir (Shehadul Islam, Aryasomayajula et al. 2017). Bu sebepten diğer çalışmada çip içerisinde gerçekleştirilen termal lizis işlemi, hücrelerin daha etkin şekilde parçalanmasına katkı sağlayarak daha yüksek miktarda DNA elde edilmesini etkilemiş olabilir.

Tsong ve Su'nun çalışmasında, hücresel proteinlerin DNA'ya kıyasla termal olarak daha hassas olduğu ve birçok proteinin 40–60°C aralığında denatüre olmaya başladığı bildirilmiştir. Ayrıca yaklaşık 40–45°C'de lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasarın başladığı, 50°C üzerinde ise hücresel enerji üretim mekanizmalarının bozulduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da yüksek sıcaklık uygulamalarının hücre içi protein yapılarında denatürasyona neden olmuş olabileceği düşünülmektedir. Denatüre proteinlerin DNA ile kompleks oluşturarak DNA izolasyon verimini azaltmış olabileceği değerlendirilmektedir.

Literatürde DNA'nın termal açıdan daha stabil olduğu ve nükleozomal yapıların yaklaşık 65°C'de denatüre olmaya başladığı bildirilmektedir. Bu durum, çalışmamızda termal lizis sonrası DNA'nın tamamen kaybolmamasını açıklamaktadır. Ancak yüksek sıcaklık kaynaklı yapısal değişiklikler DNA geri kazanımını olumsuz etkilemiş olabilir.

Termal lizis grupları arasında anlamlı fark bulunmaması, sıcaklık artışının hücresel parçalanmayı tam olarak arttırmaması ve DNA verimini iyileştirmediğini göstermektedir. Buna karşılık kimyasal lizis grubunda daha yüksek DNA verimi elde edilmesi, lizis tamponlarının hücreyi daha kontrollü parçalayarak DNA bütünlüğünü daha iyi korumasıyla ilişkili olabilir (Tsong and SU 1999).

Termal lizis uygulaması sonrasında elde edilen SEM görüntülerinde, hücrelerde bazı morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu görüntüler, bazı hücrelerde membran bütünlüğünün tamamen kaybolmadığı, belirli bölgelerde sürekliliğin kısmen korunduğu ve hücresel içeriğin tamamen dış ortama salınmamış

olma ihtimali ve plazma membranında geçirgenlik artışı ve lokal hasar oluşmasına rağmen nükleer yapının tamamen parçalanmaması nedeniyle DNA'nın tam olarak serbestleşmemiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hücre içeriğinin parçalanmış membran kalıntıları veya denatüre protein agregatları içinde hapsolması da DNA geri kazanımını sınırlamış olabilir. Bunun yanı sıra çalışmadaki hücre miktarı da elde edilmiş DNA konsantrasyonunu ve saflığını etkilemiş olabilir. Literatürde de ifade edildiği üzere, elde edilen tutarsız sonuçlar bazen düşük DNA konsantrasyonlarında protein, RNA ve bazal gürültünün ölçüm üzerindeki etkisinin artmasından kaynaklanmaktadır. DNA konsantrasyonu 5–10 ng/µL'nin altına indiğinde, absorbans temelli saflık oranlarının güvenilirliği belirgin şekilde düşmektedir (Lucena-Aguilar, Sánchez-López et al. 2016).

Sonuç olarak, termal lizis yetersizliği kaliteli ve yeterli miktarda DNA elde etmek için tek başına yeterli olmadığını göstermektedir.

Bu çalışma, termal lizis sonrası uygun bir saflaştırma yönteminin uygulanmasının gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, mikroakışkan sistemlerle entegre edilebilen filtrasyon temelli yaklaşımlar, hem DNA saflığını artırmak hem de analiz verimliliğini iyileştirmek açısından önemli bir potansiyel sunmaktadır. Bu durum, tez kapsamında geliştirilen MF sisteminin gerekliliğini ve bilimsel altyapısını desteklemektedir.

Morfolojik analizler, lizis yöntemlerinin hücre yapısı üzerindeki etkilerini görsel olarak desteklemektedir. Bu çalışmada elde edilen SEM bulguları, literatürde Escherichia coli üzerinde gerçekleştirilen benzer lizis karşılaştırmaları ile büyük ölçüde paralellik göstermektedir. Literatürde, ısı ve kimyasal lizis yöntemlerinin hücre morfolojisi ve DNA verimi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve hücre duvarı hasarının derecesi ile genomik DNA ekstraksiyon verimi arasında doğrudan bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur. Bu bağlamda, kontrol gruplarında hücrelerin doğal morfolojilerini koruduğu, hem mevcut çalışmada Huh-7 ve MKH hücrelerinde hem de literatürde E. coli hücrelerinde benzer şekilde gözlenmiştir.

Termal lizis uygulamalarında her iki çalışmada da hücre büzülmesi, yüzeyde kırışıklıklar ve hücre duvarı bütünlüğünde kısmi bozulmalar gibi benzer morfolojik değişiklikler rapor edilmiştir. Literatürde 95°C'de 10 dakika uygulanan ısı işlemi ile elde edilen bu değişimlerin, bu çalışmada 80°C'de 5 dakika uygulanmasına rağmen

benzer şekilde gözlenmesi, ısıya bağlı protein denatürasyonu ve membran destabilizasyonunun farklı hücre tiplerinde ortak bir etki mekanizmasına sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, her iki çalışmada da termal lizisin hücreleri tamamen parçalamadığı ve bu nedenle yalnızca kısmi lizise yol açtığı açıkça belirtilmiştir. Bu durum, elde edilen DNA veriminin sınırlı kalmasıyla da desteklenmektedir.

Kimyasal lizis sonuçları açısından da güçlü bir uyum söz konusudur. Literatürde E. coli hücrelerinde kimyasal lizisin hücre duvarını tamamen parçalayarak hücresel bütünlüğü ortadan kaldırdığı ve yüksek DNA verimi sağladığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada Huh-7 ve MKH hücrelerinde kimyasal lizis sonrası SEM görüntülerinde hücresel yapıların tamamen kaybolduğu ve yalnızca parçacıkların gözlendiği belirlenmiştir. Bu durum, kimyasal lizisin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde daha etkili bir lizis yöntemi olduğunu ortaya koymaktadır (Dabagh, Javanifar et al. 2025).

Bununla birlikte, iki çalışma arasında hücre tipi farklılığı önemli bir noktadır. Literatürde Gram-negatif bakteriler kullanılırken, bu çalışmada memeli kökenli hücre hatlarının kullanılması, lizis mekanizmalarının hücre duvarı/membran yapısına bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Ancak buna rağmen elde edilen benzer sonuçlar, kimyasal lizisin genel olarak daha yüksek verimli ve güvenilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular literatür ile yüksek düzeyde uyum göstermekte; termal lizisin kısmi hücre hasarına yol açtığı ve düşük DNA verimi sağladığı, buna karşın kimyasal lizisin hücreleri tamamen parçalayarak daha yüksek DNA geri kazanımı sunduğu açıkça ortaya konmaktadır. Bu durum, özellikle mikroakışkan sistemler ve nanolif membran tabanlı filtrasyon uygulamalarında, kimyasal lizisin daha uygun bir yöntem olduğunu destekleyen önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Filtrasyon deneylerinden elde edilen bulgular, geliştirilen nanolif tabanlı sistemin yüksek performansını ortaya koymaktadır. Literatürde nanolif membranların küçük gözenek boyutları sayesinde, sulu çözeltilerden mikron boyutundaki partiküllerin uzaklaştırılmasında oldukça etkili oldukları bilinmektedir. Burada temel mekanizma, süspansiyon halindeki materyallerin, küçük partiküllerin veya hücrelerin

sıvıdan yüksek verimle tutulmasına dayanmaktadır. Ayrıca, nanolif membranların hücre ve partikül tutulumu açısından konvansiyonel membranlara göre daha yüksek verim sağlayabileceği belirtilmektedir (Mei, Wang et al. 2013, Shabafrooz, Mozafari et al. 2014).

Bu çalışmada geliştirilen MF sisteminin hücre yakalama performansı, Huh-7 ve MKH hatları üzerinde farklı hücre konsantrasyonlarında (17, 33 ve 67 hücre/µL) değerlendirilmiştir. Filtrasyon öncesi ve sonrası elde edilen mikroskobik görüntüler incelendiğinde, filtrasyon öncesinde hücrelerin yüksek yoğunlukta bulunduğu, filtrasyon sonrasında ise hücre sayısında belirgin bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durum, sistemin hücreleri etkin bir şekilde tutabildiğini ve yüksek filtrasyon verimliliğine sahip olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, nanoyapıların hücre yakalama performansını artırdığına dair literatür bulgularıyla paralellik göstermektedir. Özellikle elektro-eğirilmiş nanoliflerin, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve kolajenden oluşan doğal hücre dışı matrisin ECM (ekstraselüler matriks) benzeri topografik yapıları sayesinde hücrelerle daha fazla etkileşim alanı oluşturduğu ve böylece hücre adezyonunu artırdığı rapor edilmiştir. Bu nedenle doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalar için daha arzu edilirdir. Bu özellikler, nanoliflerin hücre yakalama uygulamalarında etkin bir platform olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Benzer şekilde, çalışmamızda kullanılan MF sisteminin de hücreleri yüzeyinde tutarak filtrasyon sonrası hücre sayısını azaltması, bu yapısal avantajların bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Literatürde, nanolif tabanlı sistemlerin hedef hücreleri yakalamada özellikle hedefleme molekülleri (antikorlar, aptamerler, ligandlar) ile fonksiyonelleştirildiğinde daha da yüksek verimlilik sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada her ne kadar spesifik bir biyomoleküler hedefleme uygulanmamış olsa da, filtrasyonun mekanik ve yapısal temelli gerçekleştiği ve buna rağmen yüksek hücre tutulumunun elde edilmesi, sistemin fiziksel filtrasyon kapasitesinin güçlü olduğunu göstermektedir. Bu durum, nanoliflerin sadece biyokimyasal değil, aynı zamanda fiziksel özelliklerinin de hücre yakalama üzerinde belirleyici olduğunu ortaya koymaktadır.

Ayrıca, literatürde nanolif destekli mikroakışkan sistemlerin, hücreleri hem statik hem de dinamik koşullarda yüksek verimle yakalayabildiği bildirilmiştir. Dinamik sistemlerde akış hızının hücre yakalama verimini etkilediği ve optimal akış

koşullarında yakalama veriminin arttığı vurgulanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan MF sisteminin de hücre süspansiyonunu etkin bir şekilde filtre etmesi, nanoliflerin akış altında dahi hücreleri tutabilme kapasitesini desteklemektedir (Leung and Ko 2011, Xiao, Shen et al. 2018).

Sonuç olarak, elde edilen mikroskobik görüntüler, geliştirilen MF sisteminin Huh-7 ve MKH hücrelerini yüksek verimle tutabildiğini ve filtrasyon sonrası hücre yoğunluğunda belirgin bir azalma sağladığını göstermektedir. Bu bulgular, nanolif tabanlı yapıların hücre yakalama ve ayrıştırma uygulamalarında etkinliğini ortaya koyan literatür ile uyumludur ve geliştirilen sistemin biyomedikal uygulamalarda, özellikle hücre izolasyonu ve tanısal süreçlerde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada geliştirilen mikroakışkan filtrasyon sistemi, lizis edilmiş Huh-7 ve MKH örneklerinde DNA geçişi ve örnek yoğunluğu açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, sistemin hem DNA geçirgenliği hem de hücresel/partiküler bileşenlerin uzaklaştırılması açısından yüksek performans sergilediğini göstermektedir.

Filtrasyon sonrası DNA konsantrasyonu analizlerinde, Huh-7 hücrelerinde DNA geçiş oranı yaklaşık %80, MKH hücrelerinde ise %90 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, DNA'nın büyük oranda filtrasyon sisteminden geçebildiğini ve sistemin DNA kaybını minimize edecek şekilde çalıştığını ortaya koymaktadır. Absorbans (400 nm) ölçümlerine dayalı filtrasyon verimliliği analizlerinde ise Huh-7 hücreleri için yaklaşık %50, MKH hücreleri için ise yaklaşık %60 oranında örnek yoğunluğu azalması tespit edilmiştir. Bu durum, filtrasyon sisteminin hücresel kalıntılar, membran parçaları ve diğer partiküler bileşenleri etkin şekilde uzaklaştırabildiğini göstermektedir. Literatürde, mikroakışkan sistemlerde absorbans azalmasının filtrasyon etkinliğinin önemli bir göstergesi olduğu ve özellikle nanolif tabanlı sistemlerde partikül tutulmasının yüksek olduğu belirtilmektedir.

Literatür çalışmalarına baktığımızda nanolif membranların DNA geçirgenliği ile ilgili yapılan çalışmalarda da DNA'nın membranlardan geçişine izin verilirken, daha büyük yapılı hücresel bileşenlerin tutulduğu rapor edilmiştir. Örneğin PAN ve TPU temelli nanolif membranların kullanıldığı çalışmalarda DNA geçiş oranlarının yüksek olduğu (PAN: %86,3; TPU: %89,2) ve membranların seçici filtrasyon

davranışı gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca TiO_2 katkısı ile bu oranların %68,4–84,5 aralığına düştüğü ve DNA'nın kısmen membran üzerinde tutulabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda PAN ve PAN/TiO_2 membranları ile yapılan çalışmada bakteriyel yoğunlukta sırasıyla %79,5 ve %87,5 oranında azalma gözlenirken, TPU ve TPU/TiO_2 membranlarında bu değerlerin %73,5 ve %84,5 olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda elde edilen %50–60 aralığındaki yoğunluk azalmasına kıyasla daha yüksek olmakla birlikte, bu farkın bakteriyel sistemler ile ökaryotik hücrelerin yapısal farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum, nanolif membranların gözenek yapısı ve yüzey özelliklerinin DNA gibi küçük biyomoleküllerin geçişine izin verirken, hücresel artıkların tutulmasını sağladığını desteklemektedir (Dabagh, Javanifar et al. 2025).

Benzer şekilde, literatürde bakteriler üzerinde yapılmış olan başka bir çalışmada, PVDF ve TiO_2/PVDF nanolif membranların lizis edilmiş bakterileri yüksek verimle filtrelediği ve DNA geçiş oranlarının %73,9–82,6 aralığında olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada filtrasyon sonrası bakteriyel hücre lizatlarının yoğunluk ölçümlerin de belirgin azalma gözlenmiş ve yaklaşık %79–88 oranında filtrasyon verimliliği elde edilmiştir. Bu değerler, bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde edilen DNA geçiş oranları ile karşılaştırıldığında oldukça uyumludur. Özellikle Huh-7 hücrelerinde gözlenen %80 DNA geçişi, PVDF bazlı membran sistemlerinde rapor edilen değerlerle benzerlik göstermektedir. MKH hücrelerinde elde edilen daha yüksek DNA geçiş oranı (%90) ise, kullanılan hücre tipinin ve lizis etkinliğinin DNA salınımı üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır (Javanifar, Ghorbanpoor et al. 2025).

Bu bulgular, yapmış olduğumuz çalışmadaki DNA geçirgenliği ve partikül azaltımı sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar ayrıca hücre tipine bağlı farklılıkların filtrasyon performansını etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. MKH hücrelerinde DNA geçiş oranının ve filtrasyon verimliliğinin Huh-7 hücrelerine kıyasla daha yüksek olması, hücresel yapı, lizis verimliliği ve DNA salınım dinamiklerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Literatürde de farklı hücre hatlarının lizis davranışlarının ve membran etkileşimlerinin değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu çalışmada geliştirilen mikroakışkan filtrasyon platformu, nanolif membran tabanlı sistemlerle uyumlu şekilde çalışarak

hem hücresel bileşenlerin etkin filtrasyonunu hem de DNA'nın yüksek verimle elde edilmesini sağlamaktadır. Elde edilen bulgular, sistemin DNA tabanlı biyosensör uygulamaları ve çip üzerinde tanı (Lab on a Chip, LoC) platformları için uygun bir altyapı sunduğunu göstermektedir. Ayrıca sonuçlar, nanolif membranların yüzey özellikleri ve gözenek yapısının, seçici filtrasyon ve biyomolekül ayrımı açısından kritik bir rol oynadığını bir kez daha doğrulamaktadır.

Bu çalışmanın en önemli katkısı, partikül tutma ve DNA geçirgenliğini tek bir platformda birleştiren entegre bir MF sistemi geliştirilmiş olmasıdır. Sistem, klasik çok aşamalı izolasyon protokollerine kıyasla daha basit bir iş akışı sunma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Deneylerin yalnızca iki hücre hattı ile gerçekleştirilmiş olması, sistem performansının farklı biyolojik örneklerde değerlendirilmesini gerektirmektedir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda sistemin farklı hücre tipleri ve kompleks biyolojik sıvılar üzerinde test edilmesi, filtrasyon parametrelerinin optimize edilmesi ve çok kanallı mikroakışkan tasarımlarla entegrasyonunun sağlanması, platformun biyomedikal ve tanısal uygulamalardaki kullanım potansiyelini artırabilir. Ayrıca otomasyon ve taşınabilir sistemlerle birleştirilmesi, hızlı ve yerinde analizlere olanak sağlayabilir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular nanolif tabanlı MF platformunun hücre kalıntılarından DNA'nın ayrılması için etkili ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermekte ve sistemin biyomolekül izolasyonu alanında alternatif bir yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, MKH ve Huh-7 hücre hattı kullanılarak geliştirilen nanolif tabanlı mikroakışkan MF platformunun performansı kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, geliştirilen sistemin hücre lizisi sonrası oluşan biyolojik örneklerin işlenmesi, hücresel kalıntıların uzaklaştırılması ve DNA'nın seçici olarak ayrılması açısından etkili ve uygulanabilir bir yaklaşım sunduğunu ortaya koymaktadır.

Burada ilk olarak, immünofenotipik analizler sonucunda kullanılan hücrelerin MKH karakteristiği taşıdığı doğrulanmış ve deneysel modelin güvenilirliği desteklenmiştir. Elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen PAN bazlı nanoliflerin morfolojik özellikleri incelendiğinde, lif çapı ve gözenek dağılımının MF uygulamaları için uygun olduğu belirlenmiş; yüksek yüzey alanı ve kontrol edilebilir porozite sayesinde filtrasyon performansını artıran bir yapı sağlandığı görülmüştür.

Lizis yöntemlerinin karşılaştırılması, hücre parçalanması ve DNA elde edilmesi açısından önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Termal lizisin kısmi olarak hücre zarının bütünlüğünü bozarak hücresel içeriğin serbestleşmesini sağladığı, ancak düşük DNA verimi nedeniyle tek başına yeterli olmadığı belirlenmiştir. Buna karşılık kimyasal lizis yönteminin hücreleri daha etkin şekilde parçalayarak daha yüksek DNA verimi sağladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar SEM görüntüleri ile desteklenmiştir.

Geliştirilen MF platformunun filtrasyon performansı değerlendirildiğinde, sistemin hücresel ve partiküler bileşenleri etkin bir şekilde tutarken DNA'nın yüksek oranda geçişine izin verdiği belirlenmiştir. Huh-7 hücrelerinde %82,1, MKH hücrelerinde ise %91,5 oranında DNA geçişi elde edilmesi, sistemin DNA kaybını minimize eden bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, filtrasyon sonrası örnek yoğunluğunda gözlenen belirgin azalma, hücresel kalıntılar ve diğer partiküllerin etkin şekilde uzaklaştırıldığını ortaya koymaktadır. Bu bulgular, nanolif membranların seçici filtrasyon özelliğini doğrulamakta ve sistemin biyomolekül ayrımı açısından yüksek performans sergilediğini göstermektedir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmada geliştirilen nanolif tabanlı mikroakışkan MF platformunun partikül uzaklaştırma ve DNA geçirgenliğini tek bir sistemde etkili bir şekilde gerçekleştirdiğini sunmaktadır. Bu yönüyle sistem, klasik çok aşamalı DNA izolasyon yöntemlerine alternatif olarak daha hızlı, daha basit

ve daha verimli bir iş akışı sağlama potansiyeline sahiptir. Ayrıca elde edilen bulgular, sistemin özellikle çip üzerinde tanı platformları, biyosensör uygulamaları ve hızlı analiz gerektiren biyomedikal süreçler için potansiyel bir altyapı sunabileceğini göstermektedir.

Bununla birlikte, çalışmanın yalnızca iki hücre hattı ile sınırlı olması, sistemin genellenebilirliği açısından önemli bir kısıt oluşturmaktadır. Bu doğrultuda, gelecekte yapılacak çalışmalarda sistemin farklı hücre tipleri ve kompleks biyolojik örnekler üzerinde test edilmesi önerilmektedir. Ayrıca nanolif yüzeylerinin kimyasal veya biyomoleküler ajanlarla fonksiyonelleştirilmesi, hedef hücrelere özgü seçiciliğin artırılmasına katkı sağlayabilir. Bunlara ek olarak farklı lif çapı ve gözenek boyutuna sahip nanolif yapıların optimize edilerek üretilmesi ve bu yapıların filtrasyon verimi, geçirgenlik ve seçicilik açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi de önerilmektedir. Diğer taraftan, mikroakışkan sistemin çok kanallı tasarımlarla geliştirilmesi, filtrasyon kapasitesinin artırılması ve işlem süresinin azaltılması açısından önemli bir iyileştirme sağlayacaktır.

Bunun yanı sıra, lizis sonrası DNA saflığını artırmak amacıyla sistem içerisine entegre saflaştırma modüllerinin eklenmesi ve elde edilen DNA'nın ileri analizler (qPCR vb.) ile doğrulanması, sistemin analitik güvenilirliğini güçlendirecektir. Sisteminin otomasyon ve taşınabilir cihazlarla entegre edilmesi ise yerinde tanı (point-of-care, PoC) uygulamaları açısından önemli bir avantaj sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma nanolif membran entengreli mikroakışkan sistemlerin biyomolekül izolasyonu alanında etkili ve yenilikçi bir yaklaşım sunduğunu ortaya koymakta; geliştirilen platformun yapılacak optimizasyon ve geliştirmeler ile biyomedikal ve tanısal uygulamalarda geniş bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Alison, M. R., et al. (2002). "An introduction to stem cells." The journal of pathology: a journal of the pathological society of great britain and ireland **197**(4): 419-423.

Anderson, P., et al. (2013). "CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities." PloS one 8(10): e76979.

Anis, S. F., et al. (2019). "Microfiltration membrane processes: A review of research trends over the past decade." Journal of Water Process Engineering **32**: 100941.

Azizipour, N., et al. (2020). "Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip." Micromachines **11**(6): 599.

Balogh, J., et al. (2016). "Hepatocellular carcinoma: a review." Journal of hepatocellular carcinoma: 41-53.

Bhagat, A. A. S., et al. (2010). "Microfluidics for cell separation." Medical & biological engineering & computing **48**(10): 999-1014.

Bhardwaj, N. and S. C. Kundu (2010). "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique." Biotechnology advances **28**(3): 325-347.

Bianchi, F., et al. (2014). "Potential advantages of acute kidney injury management by mesenchymal stem cells." World Journal of Stem Cells **6**(5): 644.

Blake, R. and S. G. Delcourt (1998). "Thermal stability of DNA." Nucleic acids research **26**(14): 3323-3332.

Bouhid de Aguiar, I. and K. Schroën (2020). "Microfluidics used as a tool to understand and optimize membrane filtration processes." Membranes **10**(11): 316.

Bruix, J., et al. (2004). "Focus on hepatocellular carcinoma." Cancer cell **5**(3): 215-219.

Bruix, J. and J. M. Llovet (2002). "Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma." Hepatology **35**(3): 519-524.

Cevallos-Mendoza, J., et al. (2022). "Removal of contaminants from water by membrane filtration: a review." Membranes **12**(6): 570.

Chen, Y., et al. (2022). "Low-temperature welded PAN/TPU composite nanofiber membranes for water filtration." Journal of Water Process Engineering **47**: 102806.

Chow, A. W. (2002). "Lab-on-Chip: Opportunities for chemical engineering." American Institute of Chemical Engineers. AIChE Journal **48**(8): 1590.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Cui, F., et al. (2015). "Microfluidic sample preparation for medical diagnostics." Annual review of biomedical engineering **17**(1): 267-286.

Dabagh, S., et al. (2024). "Electrosprayed MnFe2O4/PVDF membrane integrated microfluidic chip for amoxicillin removal with real-time monitoring of pH and dissolved oxygen." Journal of Environmental Chemical Engineering **12**(6): 114895.

Dabagh, S., et al. (2025). "Effective separation of DNA from bacterial cell walls using nanofibers in a lab on a chip system." Materials Today Chemistry **50**: 103222.

Dalili, A., et al. (2019). "A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: microfluidic approaches." Analyst **144**(1): 87-113.

De Jong, J., et al. (2006). "Membranes and microfluidics: a review." Lab on a Chip **6**(9): 1125-1139.

Ding, D.-C., et al. (2011). "Mesenchymal stem cells." Cell transplantation **20**(1): 5-14.

Dominici, M., et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.

Ersahin, M. E., et al. (2012). "A review on dynamic membrane filtration: materials, applications and future perspectives." Bioresource technology **122**: 196-206.

Farhang Doost, N. and S. K. Srivastava (2024). "A comprehensive review of organ-on-a-chip technology and its applications." Biosensors **14**(5): 225.

Gonçalves, I. S., et al. (2022). "Microfiltration membranes developed from nanofibers via an electrospinning process." Materials Chemistry and Physics **277**: 125509.

Ha, S.-M., et al. (2011). "An integrated microfluidic device for rapid cell lysis and DNA purification of epithelial cell samples." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **11**(5): 4250-4253.

Haeberle, S. and R. Zengerle (2007). "Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications." Lab on a Chip **7**(9): 1094-1110.

Hailemariam, R. H., et al. (2020). "Reverse osmosis membrane fabrication and modification technologies and future trends: A review." Advances in colloid and interface science **276**: 102100.

Huang, Z.-M., et al. (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites." Composites science and technology **63**(15): 2223-2253.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Janevska, D., et al. (2015). "Hepatocellular carcinoma: risk factors, diagnosis and treatment." Open access Macedonian journal of medical sciences **3**(4): 732.

Oliveira, J. E., et al. (2013). "Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: a comparative study." Advances in Materials Science and Engineering **2013**(1): 409572.

Javanifar, R., et al. (2025). "Improved bacterial filtration and DNA retention by a novel microfiltration process including composite membranes." Separation and Purification Technology **357**: 130114.

Kalervo Väänänen, H. (2005). "Mesenchymal stem cells." Annals of medicine **37**(7): 469-479.

Kammakakam, I. and Z. Lai (2023). "Next-generation ultrafiltration membranes: A review of material design, properties, recent progress, and challenges." Chemosphere **316**: 137669.

Khude, P. (2017). "Nanofibers for high efficiency filtration." J. Mater. Sci. Eng **6**(6): 1-10.

Kim, H. J. and J.-S. Park (2017). "Usage of human mesenchymal stem cells in cell-based therapy: advantages and disadvantages." Development & reproduction **21**(1): 1.

Krampera, M., et al. (2007). "Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use." Blood Transfusion **5**(3): 120.

Letterman, R. D. (1987). "An overview of filtration." Journal-American Water Works Association **79**(12): 26-32.

Leung, V. and F. Ko (2011). "Biomedical applications of nanofibers." Polymers for Advanced Technologies **22**(3): 350-365.

Li, D. and Y. Xia (2004). "Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?" Advanced materials **16**(14): 1151-1170.

Lim, Y. C., et al. (2010). "Lab-on-a-chip: a component view." Microsystem Technologies **16**(12): 1995-2015.

Lin, J., et al. (2012). "Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism." Archives of toxicology **86**(1): 87-95.

Llovet, J. M., et al. (2016). "Hepatocellular carcinoma." Nature reviews Disease primers **2**: 16018.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Ma, S., et al. (2014). "Immunobiology of mesenchymal stem cells." Cell Death & Differentiation **21**(2): 216-225.

Mahla, R. S. (2016). "Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics." International journal of cell biology **2016**(1): 6940283.

Maia, R., et al. (2023). "Microneedles in advanced microfluidic systems: A systematic review throughout lab and organ-on-a-chip applications." Pharmaceutics **15**(3): 792.

Margiana, R., et al. (2022). "Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review." Stem Cell Research & Therapy **13**(1): 366.

Matlock-Colangelo, L., et al. (2016). "Functionalized electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibers for on-chip concentration of E. coli cells." Analytical and bioanalytical chemistry **408**(5): 1327-1334.

McGlynn, K. A., et al. (2021). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma." Hepatology **73**: 4-13.

Meex, S. J., et al. (2011). "Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion?[S]." Journal of lipid research **52**(1): 152-158.

Mei, Y., et al. (2013). "Improving filtration performance of electrospun nanofiber mats by a bimodal method." Journal of applied polymer science **128**(2): 1089-1094.

Membrillo-Hernández, J., et al. (1995). "Thermally-induced cell lysis in Escherichia coli K12." Journal of basic microbiology **35**(1): 41-46.

Mohammad, A. W., et al. (2015). "Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects." Desalination **356**: 226-254.

Mohammed, M. I., et al. (2015). "Lab-on-a-chip or Chip-in-a-lab: Challenges of Commercialization Lost in Translation." Procedia Technology **20**: 54-59.

Mushahary, D., et al. (2018). "Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells." Cytometry Part A **93**(1): 19-31.

Neužil, P., et al. (2012). "Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery." Nature reviews Drug discovery **11**(8): 620-632.

Pattanayak, P., et al. (2021). "Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives." Microfluidics and Nanofluidics **25**(12): 99.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Pearl, J. R., et al. (2025). "Hierarchical therapeutic potential in the mesenchymal stem cell landscape." Journal of Translational Medicine **23**(1): 1394.

Puttahanumantharayappa, L. D., et al. (2021). "Origin and properties of hepatocellular carcinoma cell lines." Japanese J Gastroenterol Res **1**(8): 1040.

Qiu, G.-H., et al. (2015). "Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B." Cytotechnology **67**(1): 1-12.

Reneker, D. H. and A. L. Yarin (2008). "Electrospinning jets and polymer nanofibers." Polymer **49**(10): 2387-2425.

Sainz Jr, B., et al. (2009). "Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection." Virology journal **6**(1): 103.

Sajeesh, P. and A. K. Sen (2014). "Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review." Microfluidics and Nanofluidics **17**(1): 1-52.

Sarkar, K., et al. (2010). "Electrospinning to forcespinning™." Materials today **13**(11): 12-14.

Sensebé, L., et al. (2013). "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review." Stem Cell Research & Therapy **4**(3): 66.

Shabafrooz, V., et al. (2014). "Electrospun nanofibers: from filtration membranes to highly specialized tissue engineering scaffolds." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **14**(1): 522-534.

Shi, X., et al. (2014). "Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review." Journal of Water Process Engineering **1**: 121-138.

Shields Iv, C. W., et al. (2015). "Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation." Lab on a Chip **15**(5): 1230-1249.

Širc, J., et al. (2012). "Morphological characterization of nanofibers: methods and application in practice." Journal of Nanomaterials **2012**(1): 327369.

Sobhani, A., et al. (2017). "Multipotent stem cell and current application." Acta Medica Iranica: 6-23.

Sosa-Hernández, J. E., et al. (2018). "Organs-on-a-chip module: a review from the development and applications perspective." Micromachines **9**(10): 536.

Squillaro, T., et al. (2016). "Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update." Cell transplantation **25**(5): 829-848.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Takagi, M., et al. (1997). "Comparison of different hepatocyte cell lines for use in a hybrid artificial liver model." Cytotechnology **24**(1): 39-45.

Tien, C. (2012). Principles of filtration, Elsevier.

Vecchi, C., et al. (2010). "Huh-7: a human “hemochromatotic” cell line." Hepatology **51**(2): 654-659.

Wang, Z., et al. (2017). "Microfiltration performance of electrospun nanofiber membranes with varied fiber diameters and different membrane porosities and thicknesses." Polymer **114**: 64-72.

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

Wu, Q., et al. (2020). "Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects." Biomedical engineering online **19**(1): 9.

Xiao, Y., et al. (2018). "Design of functional electrospun nanofibers for cancer cell capture applications." Journal of Materials Chemistry B **6**(10): 1420-1432.

Xue, J., et al. (2019). "Electrospinning and electrospun nanofibers: methods, materials, and applications." Chemical reviews **119**(8): 5298-5415.

Xun, M., et al. (2008). "Proteomic analysis of HuH-7 cells harboring in vitro-transcribed full-length hepatitis C virus 1b RNA 1." Acta pharmacologica Sinica **29**(6): 720-727.

Yan, J., et al. (2022). "Organ-on-a-chip: A new tool for in vitro research." Biosensors and Bioelectronics **216**: 114626.

Yao, K.-M., et al. (1971). "Water and waste water filtration. Concepts and applications." Environmental science & technology **5**(11): 1105-1112.

Zhang, B., et al. (2018). "Advances in organ-on-a-chip engineering." Nature Reviews Materials **3**(8): 257-278.