

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HT-29 KANSER HÜCRELERİNİN METASTAZ TAKİBİ İÇİN
MİKRO KANALLARDA TESPİTİ VE SAYILMASI

SILA YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2014

**HT-29 KANSER HÜCRELERİNİN METASTAZ TAKİBİ İÇİN
MİKRO KANALLARDA TESPİTİ VE SAYILMASI**

**DETECTION AND COUNTING OF HT-29 CANCER CELLS
IN MICRO CHANNELS FOR METASTASIS FOLLOW-UP**

SILA YILMAZ

Başkent Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

“HT-29 Kanser Hücrelerinin Metastaz Takibi için Mikro Kanallarda Tespiti ve Sayılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından, 15/09/2014 tarihinde, **BIYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Erhan KIZILTAN

 ye(Danışman)

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

 ye

Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR

ONAY

/ 09 /2014

Prof. Dr. Emin AKATA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince beni eğiten, geliştiren ve yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Mustafa Kocakulak'a

Bütün sorularımı sabırla cevaplayan, pratik bilgi birikimi geliştirmemi sağlayan, eş danışmanım Öğretim Görevlisi Mehmet Yüksekaya'ya

Tez çalışmalarım süresince Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nün tüm imkanlarını bana sunan değerli Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar'a

Çalışmamın hücre kültürü aşamalarını kendi laboratuvarından sağlayan, bilgi ve deneyimiyle yol gösteren değerli Prof. Dr. Feride İffet Şahin'e

Yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli Araş. Gör. Orhan Erdem Haberal'a

Deltamed Arge'nin sunmuş olduğu hizmetlerden yaralanmamı sağlayan, birlikte çalışmaktan zevk aldığım DeltamedArge çalışanlarına

Tez projemi destekleyerek bana maddi olanak sağlayan, Başkent Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'na

Bu çalışmada emeği geçen tüm Başkent Üniversitesi Ailesi Bireylerine

Ve;

Hayatın en zor dönemeçlerinde destekleri ile beni yolda tutan, emeklerini esirgemeyen, ülkeme hizmet etmek için yetişmemi sağlayan tüm değerli Aile Büyüklerime

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZ

HT-29 KANSER HÜCRELERİNİN METASTAZ TAKİBİ İÇİN MİKRO KANALLARDA TESPİTİ VE SAYILMASI

Sıla YILMAZ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Kanserden ölümlerin sebebi bir çok durumda metastazlar olup, temel olarak tümörler değildir. Primer tümör dışına yayılmadan önce hastaya kanser teşhisi konulduğu zaman hastanın hayatta kalma şansı artar. Metastazın ne zaman ve nasıl başladığı, açık değildir. Tümör hücrelerinin lenf bezi sistemi ile yayıldığı ve kan dolaşımına katıldığı bilinmektedir. CTC'ler tümörden ayrılıp kan dolaşımı içerisinde az sayıda bulunan tümör hücreleridir ve CTC'leri ayırmak zor bir hedeftir. Piyasada bulunan, CTC'lere yönelik tek kan testi sadece hücrelerin sayımında kullanılmaktadır. Ancak doktorların uygun tedavi şeklini seçmek için analiz edeceği kadar hücre saptanamamaktadır. Bu çalışmada, tasarlanan sistem sayesinde milyarlarca sağlıklı hücre arasında tek bir CTC tespit edilebilmektedir. Bir çeşit sıvı biyopsi olarak da düşünülebilecek bu sistemde bir mikroçip kullanılmaktadır. Mikroçip yüzeyi tümör hücrelerine özgün olarak bağlanan antikorlarla kaplanmıştır. HT-29 hücre kültürü kullanılmış ve kan ile karıştırılmıştır. Kan çip yüzeyi ile etkileştiğinde içerisindeki kanserli hücreler alıkonulmaktadır. Tasarım sayesinde CTC'ler tespit edilebilir ve sayılabilmektedir. Deney sonuçlarında 1.5 dakika boyunca uygulanan oksijen plazma süresinin hücre yakalama etkinliği açısından en yüksek değeri gösterdiği belirlenmiştir (66 ± 8). Kan içerisinde 5, 10, 25, 50, 100, 500 konsantrasyonlarında bulunan HT-29 hücrelerinin yakalanma etkinliği genel olarak 65 ± 6 olarak belirlenmiştir. CTC'lerin metastaz oluşturmadan önce tespiti ve sayılması; hastalığın seyrinin takibinde, kişiye özel tedavi protokollerinin geliştirilmesinde ve metastazik tümörleri hedefleyecek yeni ilaçların geliştirilmesinde faydalı olacaktır. Böylece geleneksel kemoterapinin yıkıcı ve maliyetli tedavi yöntemine alternatif sağlanarak, bireylerin sağlıklı yaşam süresini uzatılabilir.

Anahtar Kelimeler: Kanda dolaşan tümör hücreleri, metastaz, mikroçip

Danışman: Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı.

ABSTRACT

DETECION AND COUNTING OF HT-29 CANCER CELLS IN MICRO CHANNELS FOR METASTASIS FOLLOW-UP

Sıla YILMAZ

Başkent University Institute Of Science And Engineering

The Department Of Biomedical Engineering

In many cases metastases is the reason of death not tumors itself. When a patient is diagnosed with cancer before primary tumor spreads out chance of survival of patient increases. It is not clear when and how the metastasis starts, which factors trigger it. However it is known that tumor cells spread through adenoids and as a result they enter into blood circulation. These tumor cells are called circulating tumor cells (CTC). The only available blood test for CTC in the market is used for cell count but since the CTC's are rare there is not enough cells for Doctor's to analyze and to choose appropriate treatment method. In this thesis work a system that can detect a few CTC's among billions of healty cell is designed. Amicrochip is used in this test that can be considered as a kind of fluid biopsy. Surface of microchip is coated with antibodies, which bind to tumor cells. HT-29 cell line is used and cell are spiked in blood in order to simulate CTC in blood. When blood interacts with the microchip surface cancerous cells with in the blood are withheld so both cancerous blood cells and their count can be determined. In the test results it showed that applying 1.5 minutes of oxygen plasma treatment has the maximum cell capture efficiency with the value of $66\% \pm 8$. For HT-29 cells spiked in blood at 5,10,25,50,100,500, cells in uL concentrations the CTC capture efficiency was determined as $65\% \pm 8$ overall. Detection and counting of CTC's before causing metastases can be useful; in follow ups, developing personel treatment protocols and developing new medicine targeting metastatic tumors. By this there can be alternative for destructive and costly traditional chemotherapy while prolonging the life of individuals and enhancing the life quality of society.

Keywords: Circulating tumor cells, metastasis, microchip

Advisor: Prof Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent University, Department Of Biomedical Engineering.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kolon Kanseri.....	4
2.3. Metastaz, Dolaşan tümör hücreleri.....	7
2.4. CTC Belirlenmesi Ve İzole Edilmesi: Yöntemler Ve Aletler	9
2.4.1. Nükleik aside dayalı yöntemler.....	11
2.4.2. Fiziksel özelliklere dayalı yöntemler	13
2.4.2.1. <u>Boyut ve mekanik esnekliğe dayalı olarak CTC' lerin izole edilmesi</u> 13	
2.4.2.2. <u>CTC lerin elektrokinetik olarak izolasyonu</u>	18
2.4.3. Antikora dayalı yöntemler.....	20
2.4.3.1. <u>İmmunositokimyasal (ICC) yöntemler</u>	21
2.4.3.2. <u>İmmunomanyetik yöntemler</u>	23
2.4.3.3. <u>Adhezyon temelli yöntemler</u>	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar.....	36
3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	36

3.3. Yöntem.....	37
3.3.1. Mikrokanal tasarımı ve üretimi	37
3.3.1.1. <u>PMMA için Lazer kesici parametre optimizasyonu</u>	39
3.3.1.2. <u>DSA için Lazer kesici parametre optimizasyonu</u>	39
3.3.2. Temizlik	40
3.3.2.1. <u>PMMA temizliği</u>	40
3.3.2.2. <u>Cam slaytların temizliği</u>	40
3.3.3. Cam slaytta yüzey kimyası	41
3.3.3.1. <u>Hidroksil grupların oluşturulması</u>	41
3.3.3.2. <u>3MPS immobilizasyonu</u>	45
3.3.4. Çip yapımı	45
3.3.5. Kanallarda yüzey kimyası.....	46
3.3.5.1. <u>GMBS immobilizasyonu</u>	46
3.3.5.2. <u>NeutrAvidin immobilizasyonu</u>	46
3.3.5.3. <u>Antikor immobilizasyonu</u>	47
3.3.5.4. <u>Bovine Serum Albumin bloklaması</u>	47
3.3.5.5. <u>Mikrokanallara hücre verilmesi</u>	47
3.3.5.6. <u>Paraformaldehit ile sabitleme</u>	47
3.3.5.7. <u>Boyama</u>	47
3.3.6. Floresan ve Işık Mikroskobu ile görüntüleme ve hücre sayımı	48
4. DENEY AŞAMASI	50
4.1. Yüzey Kimyası Optimizasyonu.....	50
4.1.1. Plazma aktivasyonu deneyi.....	50
4.1.2. Hücre yakalama ve sayım deneyleri.....	52

4.1.2.1. <u>PBS içinde farklı hücre konsantrasyonlarında yapılan çalışmalar</u>	52
4.1.2.2. <u>Kan içinde farklı hücre konsantrasyonlarında yapılan çalışmalar</u>	56
5. SONUÇ VE YORUM	60
KAYNAKLAR LİSTESİ	62

ŞEKİLLER

Şekil 2.1	Kolon.....	5
Şekil 2.2	Kolorektal kanseri evreleri.....	6
Şekil 2.3	Kolon kanseri hücreleri (HT-29).....	6
Şekil 2.4	Metastazın oluşumu [129].....	8
Şekil 2.5	Metastatik karsinoma hastalarının kanı içerisinde tümör hücrelerinin kümülatif dağılımı[127].....	9
Şekil 2.6	Membranların taramalı elektron mikroskop görüntüleri [19].....	14
Şekil 2.7	Pool dam çipinin şeması [126].	15
Şekil 2.8	(A-B) Spiral mikro kanalın planı, (C) Boyuta dayalı izolasyon için kullanılan aletin planı [128]	17
Şekil 2.9	Elektrotasyon ve dielektroforez [50].....	19
Şekil 2.10	Kolorektal ve overiyen kanser hastalarından, belirlenen CTC' lerin otomatik kantitatif FISH analizi [58].....	22
Şekil 2.11	İmmüno manyetik etiketleme için direk ve dolaylı yöntemler [73]	25
Şekil 2.12	Kanser hücrelerinin immüno manyetik izolasyonu için kullanılan mikrosivri çip [93].....	28
Şekil 2.13	Bir mikrokanalda manyeto foretik olarak yer değiştirme ile kanser hücrelerinin izole edilmesi[97].....	29
Şekil 2.14	(A) Laminar akış düzeneği, (B) Pasif karıştırma mekanizması akış düzeneği, (C) Mikropostların dahil edilmesiyle etkin yakalama yüzeyinin artırılması, (D) Mikropostların değiştirilmiş geometrik ve konumsal konfigürasyonu [116;121]	32
Şekil 3.1	Çip tasarımı için Coreldraw programı kullanımı	38
Şekil 3.2	Çip tasarımı	39
Şekil 3.3	DSA koruyucusunun çıkartılması.....	41
Şekil 3.4	Plazma yüzey aktivasyonu işlem basamakları[130].....	42
Şekil 3.5	Düşük basınç, yüksek frekans plazma sistemi.....	43
Şekil 3.6	Cam slaytlar cam tutacaklar üzerine yerleştirilir.....	43

Şekil 3.7 Cam tutacaklar üzerine yerleştirilen cam slaytlar plazma odasına yerleştirilir.....	44
Şekil 3.8 Plazma oda basıncının düşmesi için ortama sıvı azot gazı eklenmesi.....	44
Şekil 3.9 Plazma başlama anı.....	45
Şekil 3.10 Yüzey kimyası işlem basamakları (3MPS-GMBS-NeutrAvidin).....	46
Şekil 3.11 Floresan mikroskobu çalışma prensibi.....	48
Şekil 4.1 Plazma aktivasyon sürelerine karşılık hücrelerin yakalanma etkinliği (n=çalışılan kanal sayısı)	51
Şekil 4.2 PBS ile seyreltilmiş hücre konsantrasyonlarına karşılık hücrelerin kanallarda yakalanma etkinliği	54
Şekil 4.3 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü.	54
Şekil 4.4 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü.	55
Şekil 4.5 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü	55
Şekil 4.6 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü (D) Çakıştırılmış görüntü.	56
Şekil 4.7 Kan içerisinde farklı konsantrasyonlarda bulunan hücrelerin kanallarda yakalanma etkinliği	58
Şekil 4.8 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü (D) Çakıştırılmış görüntü.	59
Şekil 4.9 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü	59

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1	Kanser hastalarında test edilen seçili CTC belirleme teknolojileri.....	33
Çizelge 4.1	Uygulanan plazma sürelerine karşılık kanallarda yakalanan hücre sayıları(100 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonu).....	51
Çizelge 4.2	PBS ile seyreltilmiş farklı hücre konsantrasyonlarının kanallarda yakalanma etkinliği	53
Çizelge 4.3	Kanallarda görüntülenen hücre sayıları, etkinlik değerleri	58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

3MPS	(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate saline
ADM	Otomatik dijital mikroskopi
BSA	Bovine albumin serum
CAM	Hücre-adezyon molekülü
CHU	Centre Hospitaliers Universitaires
CK	Sitokeratin
CSC	Kanser kök hücresi
CT	Bilgisayar tomografi
CTC	Dolaşıma katılan tumor hücreleri
DAPI	4',6 -diamidino-2-phenylindole
DEP	Dielektroforesiz
DMSO	Dimetil sulfoksit
DSA	Çift taraflı bant
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
EpCAM	Epitelyal hücre adhezyon molekülü
EPISPOT	Epitel immunospot
EtOH	Etilalkol
FAST	Fibre-optik array sken teknolojisi
FISH	Florasan in situ hibridizasyonu
GEDI	Geometrik olarak geliştirilmiş diferansiyel immunoyakalama
GMBS	<i>N</i> -(<i>Y</i> -Maleimidobutyryloxy) succinimide ester
HBCTC-Çip	Herringbone CTC çip
HD-CTC	Yüksek belirleme-CTC analizi
ICC	İmmünohistokimya
ISSET	Epitel tümör hücrelerinin büyüklüğü ile izole edilmesi
MDF	Manyetik akış yoğunluğu
MMP	Matriksmetaloproteinaz
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PET-CT	Pozitron emisyon tomografi

PMMA	Poli metil metakrilat
PSA	Prostata-özel antijen
PSMA	Prostata-özel membran antijeni
RT-PCR	Reverz transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
UCLA	University College of Los Angeles
µpCTC-Çip	Mikropost CTC-Çip

1. GİRİŞ

Kanser dünyada görülen ölümlerin üçüncü sebebi olup ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde ölümün birinci sebeplerindendir [1]. Kanserden ölümlerin sebebi bir çok durumda metastazlar olup, temel olarak tümörler değildir. Primer tümör dışına yayılmadan önce hastaya kanser teşhisi konulduğu zaman hastanın hayatta kalma şansı artar. Ancak metastaz olmadan önce primer tümörü seçme işlemi zordur. Fiziksel muayene, MRI, PET, CT, Röntgen ve ultrason gibi geleneksel görüntüleme yöntemleri daha küçük metastazları algılamak için yeterli olmayan algılama sınırlarına sahiptir. Bu algılama sınırı, küçük lezyon veya mikrometastazları seçme işlemini zor hale getirir. Metastazın kesin olarak ne zaman ve nasıl başladığı ve hangi faktörlerin işlemi tetiklediği açık değildir. Ancak tümör hücrelerinin lenf bezi sistemi ile yayıldığı ve bunun sonucunda kan dolaşımına karıştığı veya doğrudan kana döküldüğü bilinmektedir. Dolaşan tümör hücreleri (CTC), primer tümörden damarlara dökülen ve kan akışında dolaşan hücrelerdir. Dolayısıyla CTC'ler, uzak organlarda ek tümörlerin daha sonra büyümeleri için (metastaz) tohumları oluştururlar ve kanserle ilgili ölümlerin çoğunluğundan sorumlu olan bir mekanizmayı tetiklerler. Dolayısıyla kanda dolaşan tümör hücrelerini tespit edip sayımını gerçekleştirmek önemlidir.

İlgili biyolojik kavramların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmak için, kanser oluşumu, diğer organlara yayılması ve CTC'lerin bu sürece nasıl katkıda bulunduğunu basitleştirilmiş bir şekilde anlatılmıştır.

Tez raporunun ilk kısmında mikroçip tasarımı ve üretiminden, ikinci kısımda yüzey kimyası uygulanmış kanallarda HT-29 hücrelerinin yakalanabilirliğinden, son kısımda ise kanalların mikroskopta görüntülenmesinden, elde edilen görüntülerden hücrelerin sayılmasından ve görüntüleme sonuçlarının değerlendirilmesinden bahsedilmiştir.

1.1 Çalışmanın Amacı

Günümüzde kanser tedavisinin önündeki en büyük engellerden biri kandaki 'ender' kanser hücrelerinin tespitidir. CTC'lerin biyolojik özelliklerinin anlaşılması için ortaya koyulan çabalar, karsinomanın metastatik yayılımında, dolaşan tümör hücrelerinin rolünü ortaya koymuştur. Ancak bu dolaşan tümör hücrelerinin, tümör kitleleri içindeki hücrelerin moleküler özelliklerini yansıttığı sadece son zamanlarda gösterilmiştir. Dolayısıyla CTC'ler metastazın faaliyetteki halini ortaya koyan, hastanın hastalık durumu hakkında canlı bilgi sağlayan, "sıvı biyopsi" olarak düşünülebilir. Kanın erişilebilirliği ve alınmasının kolaylığından dolayı, CTC'lerin analizi, kanserin erken safha belirlenmesinde, neoplastik ilerlemede ve hastalığın nüksetmenin izlenmesinde önemli bir araç olabilir.

Tezin hedefi kanda CTC varlığını tespit edebilen bir mikroçip tasarlanmasıdır. Tasarlanan mikroçipin en önemli özelliği, güvenilir olması ve hastalığın birçok noktasında uygulanabilir olmasıdır. Bunun aksine, katı tümörlerin analizi hastaların uyumunu şiddetle sınırlayan invazif prosedürleri gerekli kılar.

Tasarlanacak sistem ile metastazın engellenmesi, hali hazırda uygulanan kemoterapi ve diğer tedavi yöntemlerinin olumsuz etkileri ortadan kaldırılarak hastanın yaşam süresini ve kalitesini artırmak, uzun vadede ülke genelindeki kanserli hasta sayısının artışını engellemek amaçlanmaktadır.

Ayrıca, hastalığın gelişiminin zaman içinde gözlemlenmesi olasılığı, uygun tedavi değişikliklerinin geliştirilmesine de olanak sağlayacaktır.

Tez 3 aşamadan oluşmaktadır. 1. aşamada mikrokanallardan oluşan mikroçip üretilmiş, 2. aşamada oluşturulan mikrokanallarda NeutrAvidin tabanlı yüzey kimyası oluşturulmuş, 3. aşamada mikrokanallara verilen hücre örneklerinden kanallarda tutunan CTC hücreleri florasan mikroskopu yardımıyla görüntülenmiş ve çekilen görüntülerden yüzeye tutunan CTC'lerin sayıları ve kanallarda yakalanma etkinlikleri hesaplanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser; bir hücre hastalığıdır. İnsan vücudu milyonlarca hücreden oluşur. Büyüyebilmek, ölü hücreleri yenilemek ya da yaralanma sonucu zedelenmiş hücreleri onarmak amacıyla vücudumuz sürekli yeni hücreler üretmektedir. Kanseri en kısa tanımla, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki ve hatta uzaklarında bulunan doku ve organları işgal eder ve bu bölgelerde işlevsel bozukluklara yol açarlar. Kanserden ölüm oranlarının yüksek olması konunun önemini daha da artırmaktadır.

Genler, hücrelerin işlevlerini yönlendiren parçalardır. Hücreler, bazı genlerden aldığı bilgi ve komutlara uygun olarak çoğalırlar. Kanser bozuk genler yol açar. Genlerin yapıları aşırı güneş ışınları, sigara içme ya da yediğimiz yiyecekler gibi faktörler sebebiyle değişir. Hücrelerin çoğalacağı ve öleceği zamanı normal genler belirler. Bu, vücudumuzda sürekli olan bir olaydır. Ancak bozuk genler bazen hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olur ya da ölmesi gereken hücrelerin ölümünü engeller. Bu fazla olan hücreler, çoğalmaya devam ederek tümör olarak adlandırılan kitleleri oluştururlar [129].

Normal hücre döngüsü, hücrenin birebir kopyasının oluştuğu kritik bir işlemdir. Birçok kanser türünde hücrenin büyüme ve bölünme sürecinde ortaya çıkan mutasyonlar etkin rol oynar. Yaşlanan hücrelerin ölümü üzerine hücre bölünmesi zorunlu hale gelir. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ve hücre çoğalması arasındaki denge kansere yol açan genler (onkogen) tarafından bozulabilir. Onkogenler; hücre çoğalması, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi olayları kontrol eden ve protoonkogen olarak bilinen normal hücre genlerinin mutasyona uğramış halleridir. Tümör baskılayıcı genler, normal bir hücrenin tümör hücrene dönüşme ihtimalini azaltır.

Kanser tedavisinde kullanılan başlıca mevcut yöntemler; cerrahi işlemler, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi ve lazer tedavisi olarak sıralanabilir. Kanser tedavisinde en sık başvuru tedavi şekli; tümörün uzaklaştırılmasını sağlayan cerrahi yöntemleri kapsar. Bu, yayılım yapmamış birçok

kanser için iyi bir tedavi seçeneğidir. Eğer kanser ilerlemişse ya da çevre dokulara yayılmışsa; cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi birlikte uygulanabilir. Radyasyon tedavisi; kanser tedavisinde X ışınları, gama ışınları ve elektronlar gibi iyonize ışınların kullanılmasını içerir. Bu ışınlar; kanserli hücreyi tahrip ederek etki etmektedirler. İmmünoterapi, BCG aşısı, interlökin ve interferonlar gibi biyolojik moleküller kullanılarak bağışıklık sisteminin uyarılmasıdır. Hormon tedavisi ise; hormon sekresyonuna bağlı gelişen meme ve prostat kanseri gibi kanserlerde özel bazı hormonların kullanımıyla uygulanan tedavidir. Lazer tedavisi ise, cerrahi müdahalelerde yararlı olabilmektedir. Kemoterapi ise, kanserin ilaçla tedavisi demektir. Kanser kemoterapisi, yerleşmiş bir tedavi yöntemidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar, kanserli hücrelerin çoğalmalarını durdurmakta ve yok etmektedir. Ancak; bu ilaçlar vücuttaki normal hücrelere de etki edebilir ve ciddi yan etkilere yol açabilirler.

2.2 Kolon Kanseri

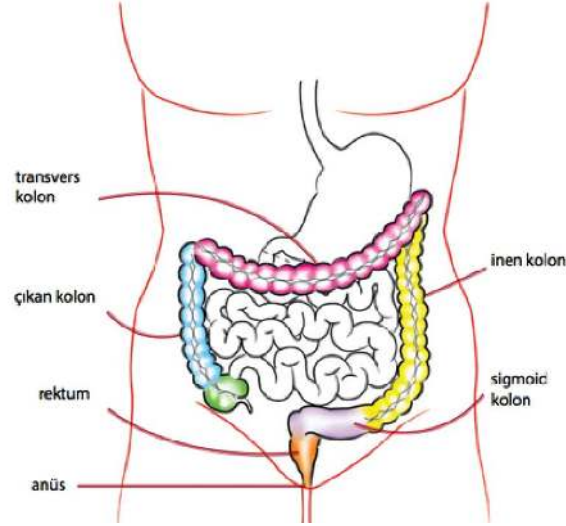
Kolon ve rektum sindirim sisteminin bir parçasıdır; kalın bağırsak denilen uzun ve kaslı bir tüpü oluştururlar (Şekil 2.1). Kolon, kalın bağırsağın ilk 140-150 cm'si ve rektum geri kalan 15 cm'sidir. Kısmen sindirilmiş yiyecek kolona ince bağırsaktan girer. Kolon yiyecekten suyu ve besinleri alır ve geri kalanını atık (dışkı) haline getirir. Besinlerin büyük bir bölümü sindirildikten sonra geriye kalan atık kolona ulaşır. Kolonun temel işlevi difüzyondur. Atık kolondan geçerek rektuma varır ve daha sonra vücuttan anüs yoluyla atılır.

Kolorektal kanser kolonun ya da rektumun dışına yayıldığında, kanser hücreleri sıklıkla lenf düğümlerinin yakınlarında bulunur. Eğer kanser hücreleri bu nodüllere ulaştıysa, diğer lenf düğümlerine ya da organlara da yayılmış olabilir. Kolorektal kanser hücreleri büyük sıklıkla karaciğere yayılabilir.

Kolorektal kanserin gelişim nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Araştırmalar, belli risk faktörlerinin kansere yakalanma olasılığını artırdığını göstermiştir. Kolorektal kanserlerin %95 i poliplerden oluşur.

Polipler bağırsağın iç yüzeyini döşeyen mukoza olarak adlandırılan yapıdan çıkan tomurcuklardır. Çoğu polip iyi huyludur genellikle kansere dönüşmez, ancak

kolonoskopi ile çıkartılmaları, kolorektal kanser gelişimini belirgin olarak azaltmaktadır. Bu nedenle kolon kanseri önlenabilir bir hastalıktır.



Şekil 2.1 Kolon

50 yaş üstü olmak, kolorektal polipler, kolorektal kanserde aile öyküsü, genetik değişiklikler, kişisel kanser öyküsü, ülseratif kolit ya da crohn hastalığı, diyet, sigara kullanımı kolorektal kanser için çalışmalarda belirtilen risk faktörleridir.

Doktorlar kolorektal kanseri şu evrelerde tanımlamaktadır (Şekil 2.2);

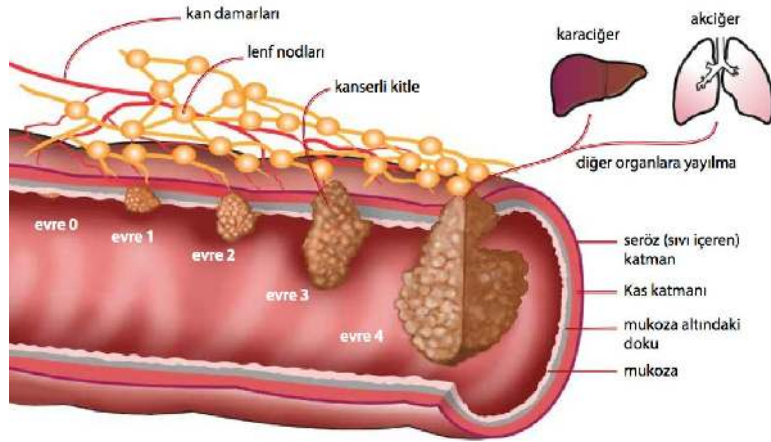
Evre 0 Kanser kolon ya da rektumun sadece en iç tabakasında bulunmuştur. Karsinoma in situ bu evredeki kolorektal kanserin bir diğer adıdır.

Evre 1 Tümör kolonun ya da rektumun iç duvarında gelişmiştir. Tümör duvarı geçmemiştir.

Evre 2 Tümör kolon ya da rektum duvarında ve duvarın içinde daha derin bir şekilde hatta duvar boyunca yayılmıştır. Yakınlarındaki dokuları ele geçirmiş olabilir fakat kanser hücreleri lenf nodüllerine sıçramamıştır.

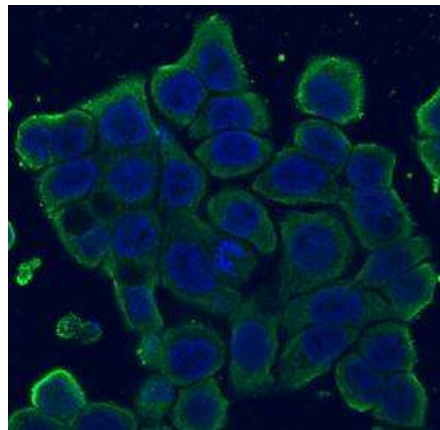
Evre 3 Kanser yakınlarındaki lenf nodüllerine sıçramış fakat vücudun diğer bölümlerine sıçramamıştır.

Evre 4 Kanser vücudun diğer bölgelerine sıçramıştır, örneğin karaciğer ve akciğer gibi.



Şekil 2.2 Kolorektal kanseri evreleri.

Tez çalışmasında insan kolon kanseri hücre hatlarından biri olan HT29 (ATTC No: HTB-38) (Şekil 2.3) hücreleri ile çalışılmıştır. Bu hücre dizisi 1964 yılında, kolorektal adenokarsinoması olan 44 yaşındaki beyaz bir kadının primer tümöründen oluşturulmuştur. HT-29, epitelyum morfolojisi ile insan kolorektal adenokarsinoma hücre dizisidir. Kolorektal kanser için ksenograft tümör modeli olmaya ilaveten, HT-29 hücre dizisi, bağırsak hücreleri tarafından emilim, transport ve sekresyonu çalışmak için in vitro model olarak da kullanılır. Standart kültür koşulları altında, bu hücreler polarize olmamış, farklılaştırılmamış çoklu tabaka olarak büyürler. Kültür koşullarının değiştirilmesi veya hücrelerin çeşitli indükleyici ile muamelesi, farklılaşmış ve polarize olmuş morfoloji ile sonuçlanır.



Şekil 2.3 Kolon kanseri hücreleri (HT-29)

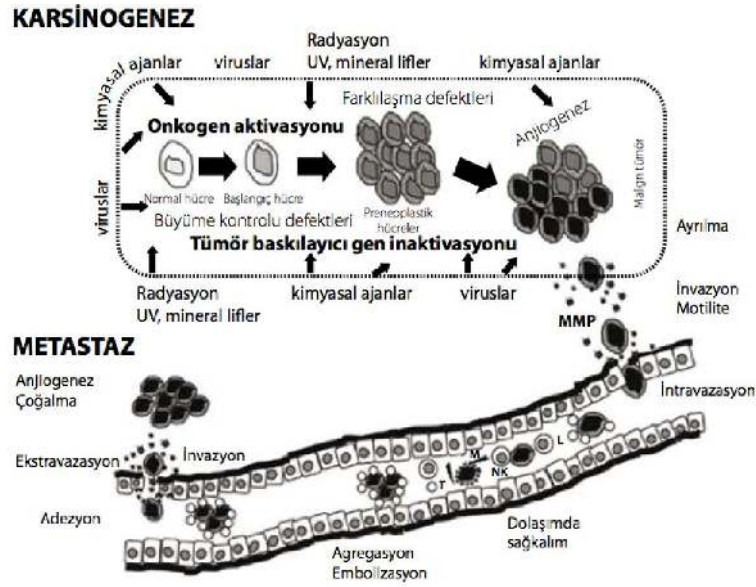
2.3 Metastaz, Dolaşan tümör hücreleri

Metastaz, kanserin bir organdan, doğrudan bağlantısı olmayan diğer bir organa taşınması olarak tanımlanır. Kötü huylu kanserin en belirgin klinik özelliklerindendir. Kanser hücreleri birincil bölgeden kan yoluyla ya da lenf sistemi aracılığıyla çevre dokulara yayılım yapar. Yayılan tümörler artık metastatik tümördür. Ama kökeni birincil dokudaki hücrelerdir. Bu tümörlerin yayılışı sıklıkla birincil bölgedeki lenf düğümleri aracılığıyla olur. Yeni damar oluşumunu takiben birincil tümör bölgesindeki hücre tutunması azalır ve hücrelerden bazıları serbest kalır. Serbest kalan bu hücreler, tümörü çevreleyen stroma içine invaze olarak dolaşıma veya lenf sistemine katılırlar. Sisteme giriş sonrası, dolaşımda hayatta kalabilen hücreler uzak bölgelerdeki organların kapiller yatağında tutulma gerçekleştirirler. Bu aşamadan sonra, serbest hücre penetre olur ve bulunduğu kan veya lenf damarından dışarıya doğru akışı gerçekleşir. Son olarak, yeni oluşan tümör, gelişmek için yeni kan damarları oluşumunu tetikler ve ikincil kanseri oluşturur.

Dolaşan tümör hücreleri (CTC) primer tümörden damarlara dökülen ve kan akışında dolaşan hücrelerdir. Dolayısıyla CTC'ler, önemli uzak organlarda ek tümörlerin daha sonra büyümeleri için metastaz tohumları oluştururlar. Kanserle ilgili ölümlerin çoğunluğundan sorumlu olan bir mekanizmayı tetiklerler.

CTC'ler ilk defa 1869 yılında Thomas Ashworth tarafından metastatik kanseri olan bir hastanın kanında gözlemlenmiştir. Modern kanser araştırmaları, CTC'lerin, temel tümörde klonlardan ortaya çıktığını göstermiştir. CTC'lerin biyolojik özelliklerinin anlaşılması için ortaya koyulan çabalar, karsinomanın metastatik yayılımında, dolaşan tümör hücrelerinin önemli rolünü ortaya koymuştur. Ancak bu dolaşan tümör hücrelerinin, tümör kitleleri içindeki hücrelerin moleküler özelliklerini yansıttığı sadece son zamanlarda gösterilmiştir. Dolayısıyla CTC'ler, metastasin faaliyetteki halini ortaya koyan, hastanın hastalık durumu hakkında canlı bilgi sağlayan, "sıvı biyopsi" olarak düşünülebilir. Kanın erişilebilirliği ve alınmasının kolaylığından dolayı CTC'lerin analizi kanserin erken safhada belirlenmesinde, neoplastik ilerlemesinde ve nüksetmenin izlenmesinde önemli bir araç olabilir.

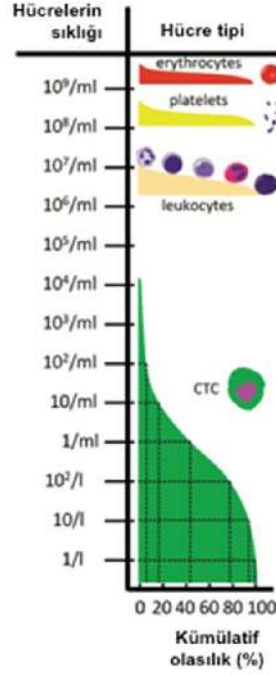
Kan içerisinde dolaşan tümör hücreleri prensip olarak vücudun çoğu bölgelerine ulaşabilirler. Ancak farklı kanser türleri farklı bölgelerde metastaz oluşturur. Örneğin meme kanseri genel olarak karaciğer, akciğer ve kemiklerde metastaz olur iken, prostat kanseri genel olarak kemik içerisinde metastaz olur. Bu tercih iki proses ile yönetilir. İlki mekanik doğadan kaynaklanmakta olup CTC'ler karşılaştıkları ilk kılcal yataklarda tutulmaktadır. İkincisi ise daha çok biyolojik kaynaklı olup, CTC'ler kan akışının dışına çıkabilir ve çıktıkları ortam onların büyümesi için uygun olursa metastaza uğrayabilir.



Şekil 2.4 Metastazın oluşumu [129]

CTC'lerin belirlenmesi önemlidir. Fakat sayıları çok düşük olabildiğinden dolayı, bu hücreler kolaylıkla belirlenemezler [2]. Aslında temel tümörden ayrılabilen hücreler arasında sadece %0.01'inin metastaz yapabildiği hesaplanmıştır [3].

Dolaşan tümör hücreleri, metastatik hastalığı olan hastaların tam kanında mililitre başına 1-10 katlarında bulunmuştur [4]. Karşılaştırma için, bir mm³ kanda 7 bin beyaz kan hücresi ve 5 milyon kırmızı kan hücresi bulunur (Şekil 2.5'e bakınız). Bu düşük sıklık, kanser hücrelerinin tanımlanmasında güçlük yaratır. CTC'lerin biyolojik özelliklerinin anlaşılmasındaki temel öge, bunların önemli sayılarda izole edilmesidir (zenginleştirme basamağı). Bu da CTC'lerin moleküler, morfolojik ve fonksiyonel analizi için ileri düzey teknolojilerin ve yaklaşımların geliştirilmesini vurgular.



Şekil 2.5 Metastatik karsinoma hastalarının kanı içerisinde tümör hücrelerinin kümülatif dağılımı[127]

Şimdiye kadar, CTC'ler birkaç epitelyum kanserinde belirlenmiştir (meme, prostat, akciğer ve kolon) [5][6][7][8] ve klinik kanıtlar, metastatik lezyonları olan hastaların CTC'lerinin izole edilmesinin daha kolay olduğuna işaret ederler.

2.4 CTC Belirlenmesi Ve İzole Edilmesi: Yöntemler Ve Aletler

CTC'lerin belirlenmesi ve izole edilmesini iki faktör zor kılar:

- CTC'ler kanser hastalarının dolaşımında nadirdir
- bu hücreleri diğer kan hücrelerinden güvenilir ve verimli şekilde ayırt etmek için bir işaretleyici yoktur.

Burada, belirleme kelimesi bir örnekte CTC'lerin doğrudan veya dolaylı tanımlanmasını ifade ederken, izolasyon kelimesi bir örnekte CTC'lerin diğer hücrelerden verimli şekilde ayrılmasını ifade eder. CTC belirleme ve izolasyon yöntemleri üç ana kategoride sınıflandırılmıştır.

Bunlar;

- nükleik aside dayalı,
- fiziksel özelliklere dayalı ve
- antikora dayalı yöntemlerdir.

Bu geniş sınıflama altında, birkaç önemli sistem tanımlanabilir ve bunlar bu kısmın sonunda anlatılacaktır.

CTC'lerin, kan hücreleriyle karşılaştırıldığında aşırı derecede düşük sıklığından dolayı (örneğin beyaz kan hücreleri (7×10^3 hücre/mm³), kırmızı kan hücreleri (5×10^6 hücre/mm³) ve plateletler (3×10^5 hücre/mm³)) bazı CTC belirleme ve izolasyon yöntemlerinden önce bir zenginleştirme basamağı gerekebilir. Zenginleştirme bir ön örnek hazırlama basamağı olarak düşünülmelidir. Bu basamakta CTC'lerin konsantrasyonunu örnekte geliştirmek için kan hücrelerinin büyük kısmı çıkarılmıştır. Zenginleştirilen örnek daha sonra CTC'lerin belirlenmesi veya izolasyonu için daha bir çok işlem den geçirilecektir.

Örnek zenginleştirilmesi için genel yöntemlerin arasında

- santrifügasyonun yoğunluk gradyanı,
- kırmızı kan hücresi lizisi (hemoliz),
- pozitif veya negatif immunomanyetik ayırma ve
- büyüklüğe dayalı filtrasyon vardır.

İlk iki yöntem örnekten kırmızı kan hücrelerini ve trombositleri elimine eder ve sonraki basamaklarda CTC'leri ve beyaz kan hücrelerini bırakır.

Santrifügasyonun yoğunluk gradyanı, CTC'lerin ve çekirdekli kan hücrelerinin (örneğin beyaz kan hücresi) düşük yoğunluğuna dayalıdır. Benzer yoğunluğu olan bu hücreleri diğer kan yapılarından ayırmak için kullanır.

Santrifügasyonla bir diğer örnek zenginleştirilmesi, örnekten kırmızı kan hücreleri ve beyaz kan hücrelerini çıkaran RosetteSep ile mümkündür (STEMCELL TEch., BC, Kanada). Kırmızı kan hücrelerini ve beyaz kan hücrelerini birbirine özel olarak bağlayan antikör karışımı, birçok kırmızı kan hücresi ve beyaz kan hücresi içeren hücre rozetlerini (toplulukları) oluşturmak için kullanılır.

Bu toplulukların yoğunluğunun yüksek olmasından dolayı bunlar CTC'lerden verimli şekilde ayrılabilirler.

Örnek zenginleştirilmesi ayrıca kırmızı kan hücresi lizisi ile de yapılabilir. Ancak bu süreç sırasında CTC kayıpları olması santrifügasyonun yoğunluk gradyanı ile kırmızı kan hücresi lizisi arasındaki bir karşılaştırmada ikinci yaklaşımın tercih edilmesine yol açar [9].

Hem kırmızı kan hücrelerini hem de beyaz kan hücrelerini elde etmek için uygulanan immunomanyetik ve büyüklüğe dayalı yöntemlerin kullanılmasıyla da üstün zenginleştirme sonuçları elde edilebilir.

Tipik bir CTC belirleme ve izolasyon sisteminin performansı aşağıda belirtilen parametrelerin kullanılmasıyla ideal olarak değerlendirilebilir. Bunlar:

- Kurtarma oranı (veya belirleme/izolasyon hassaslığı): bir örnekte belirlenmiş veya izole edilmiş CTC'lerin mevcut olan bütün CTC'lere oranıdır. Ayrıca belirlenebilen veya izole edilebilen CTC'lerin örnek başına en küçük sayısını belirlemek de gereklidir. Bu özellikle, temel tümörün ve metastazın erken tanısı için önemlidir.
- Saflık oranı (veya belirleme/izolasyon özelliği): bir örnekten belirlenmiş veya izole edilmiş CTC'lerin bütün belirlenmiş veya izole edilmiş hücrelere oranıdır.
- Zenginleştirme oranı: CTC zenginleştirilmesinden önceki ve sonraki CTC sayılarının kan hücrelerine oranıdır.
- Verimlilik: örneğin işlendiği hızdır. Verim, asıl olarak birim zaman için işlenen hücrelerin sayısı olarak rapor edilmiştir. Mikroakışkan biyoçipler gibi sürekli akışkan sistemler için verim, volümetrik akış oranı olarak rapor edilir. Bu orandan ayrıca işlenmiş hücrelerin sayısı da hesaplanabilir.
- Canlılık: Bir örnekten canlı olarak elde edilmiş CTC'lerin izole edilmiş bütün CTC'lere olan oranıdır.

2.4.1 Nükleik aside dayalı yöntemler

Nükleik aside dayalı yöntemler, CTC'lerin varlığını dolaylı olarak belirlemek için örnekte belli DNA veya mRNA moleküllerini tanımlar. Bu amaçla, zenginleştirilmiş örnekten elde edilen ve sözde CTC'ye özel genlerle ilgili, bilinen DNA veya mRNA

(yani cDNA) moleküllerini hedeflemek için belli primerler polimeraz zincir reaksiyonunda uygulanır. Bu genler doku, organ veya tümöre özel proteinler veya polipeptidleri kodlar veya daha özel olarak, kanser hücrelerinde bulunan bilinen mutasyonları, translokasyonları ve metilasyon kalıplarını içerirler [10;11].

Polimeraz zincir reaksiyonun temel çoğaltma ilkesi sayesinde, nükleik aside dayalı yaklaşım, CTC belirlenmesi için en yüksek hassaslı ı sunar. Polimeraz zincir reaksiyonu, örnekte aşırı derecede küçük miktardaki işaretleyicilerden sinyali verimli şekilde alabilir. Bu da tek bir CTC'nin büyük bir örnek hacminde belirlenebileceği anlamına gelir ( rne in, $5-10 \times 10^6$ çekirdekli kan hücresinde veya $>5\text{mL}$ kanda 1 CTC). CTC belirlenmesi, mRNA moleküllerini kullanarak daha etkindir.

Benzer şekilde, reverz transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), CTC'lerin nükleik aside dayalı belirlenmesi için uygulanan temel tekniktir. Çoklu RT-PCR analizleri, örneğin aynı anda çoklu transkriptlerin ekspresyonunun  l  lebildi i tekniktir. AdnaTest kitleri (AdnaGen, Almanya) bu amaç için kullanılmaktadır [12]. CTC'lerin genetik heterojenliği düşünüldüğünde, çoklu polimeraz zincir reaksiyonu analizi gelişmiş hassaslık ve özgünlük oranları sağlayabilir.

Nükleik aside dayalı yaklaşımın verimini belirleyecek önemli bir faktör, seçilmiş işaretleyicinin  zg nl   d r. Karsinomalar veya epitel dokuların kanserleri, bütün kanser ölümlerinin %85'ini oluşturur. Epitele  zg n genler, örneğin tam kanda normal olarak olmaması gereken farklı sitokeratin alt türlerini (epitele özel intrasitoplasmik protein) ve EpCAM'ı (hücre yüzü glikoproteini) kodlayan genler, dokuya özel işaretleyicilerin kullanılanları arasındadır.

Nükleik aside dayalı CTC belirlemesi etkileyici hassaslık sunar. Ancak  zg nl    bu yaklaşımın genel doğruluğunu azaltır. Doku ve organa özel işaretleyicilerden gelen yanlış pozitif sinyaller; enflamasyon, invazif tanı biyopsileri ve tümör rezeksiyon ameliyatları sırasında dolaşıma girmiş olan az sayıdaki kanser olmayan hücrelerden kaynaklanabilir [13]. Ayrıca, şimdiye kadar uygulanmış işaretleyicilerden hiçbiri tam olarak CTC'ye özgün değildir ve araştırmalar bunların ayrıca kan hücrelerinde de belirlenebilece ini teyit etmiştir. Örneğin, CTC belirlenmesi için kullanılan temel bir işaretleyici olan CK-19 ekspresyonu immün hücrelerde de gözlenmiştir [14]. Bu yöntemlerin özgünlüğünü etkileyen diğer bir konu yüksek hassaslıklarından ortaya

ıkar. Örnekteki küçük miktardaki mRNA veya DNA bu teknikle olası olarak belirlenebildiğinden dolayı, meşru olmayan transkripsiyonlar yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir.

2.4.2 Fiziksel özelliklere dayalı yöntemler

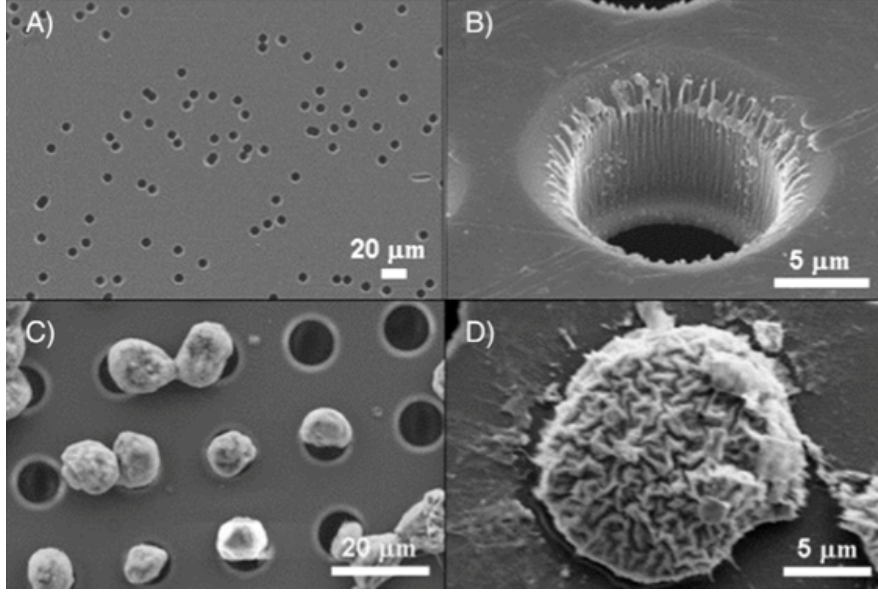
Kandan CTC'lerin izole edilmesinde yoğunluk, boyut, mekanik esneklik ve dielektrik özellikler gibi fiziksel özelliklerden yararlanılabilir.

2.4.2.1 Boyut ve mekanik esnekliğe dayalı olarak CTC'lerin izole edilmesi

Boyuta dayalı izolasyon, kan hücreleriyle karşılaştırıldığında (~ 8–12 µm), CTC'lerin büyük boyutlarına (~ 20–30 µm) dayanır.

En basit şekilde, boyuta dayalı CTC izolasyonu, ticari ISET'lerde (Rarecells, Paris, Fransa) sabit CTC izolasyonu için, ScreenCell sistemlerinde (ScreenCell, Paris, Fransa) ise canlı CTC izolasyonu için kullanılır. Bu işem iz dağlama (track-etched) polikarbon filtrelerinin kullanımıyla yapılır [15;16]. Filtre rastgele dağıtılmış 8 µm çapında delikleri olan bir zardır. Bu delikler kan bileşenlerinin geçmesine izin verirken sözde daha büyük olan CTC'leri tutarlar. Hücreler sıklıkla yapıları bozulmamış olarak kalırlar. Bu daha sonra yapılacak olan morfolojik veya moleküler analizlerine yardımcı olur [15;17;16]. Ancak iz dağlama membranlarının üretilmesinde kullanılan süreç nedeniyle membranlardaki deliklerin dağılma kalıbı rastlantısaldır ve CTC'ler için kaçma yollarını oluşturmak üzere deliklerin birleşmesiyle sonuçlanabilir (şekil 2.6A'ya bakınız). Deliklerin kontrollü dağılımı, boyutu ve geometrisi ile mikro filtreler inşa etmek üzere mikrofabrikasyon (mikro üretim) teknikleri kullanılmaktadır. (şekil 2.6) [18;19;20].

Basit ve kullanımı kolay olsa da membran filtreleri yüksek saflık sağlamaz. Aynı şekilde birçok kan hücresinin elde edilmesine de izin vermez (rneğın 1-mL örnekten 3000 beyaz kan hücreleri [18]).



Şekil 2.6 Membranların taramalı elektron mikroskop görüntüleri [19]

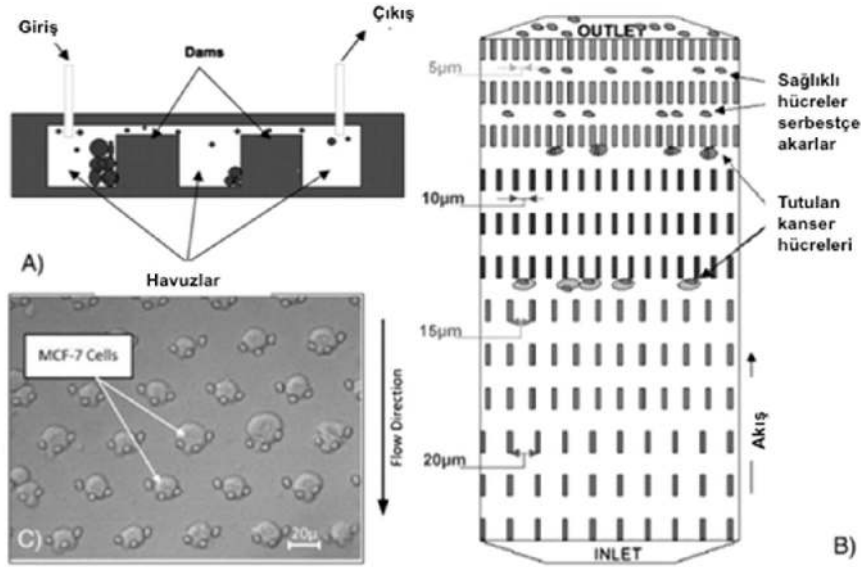
Boyut farklılığına ilaveten, CTC'lerin ve kan hücrelerinin mekanik özelliklerindeki farklılık da bu ayırım metodunda sıklıkla kullanılır. Kan hücrelerinin kalıtsal olarak şekillerini değiştirmesi ve daha küçük boyutlarda olmaları, onların mikron büyüklüğündeki engellerden (yani kılcal damarlardan) kolaylıkla geçmesine izin verir [21;22]. Daha büyük ve sağlam olan CTC'ler bu şekilde yakalanabilir. Bu ilkenin gerçekleştirilmesi için birkaç yöntem önerilmiştir (Şekil 2.7'ye bakınız). Örneğin, mikron büyüklüğündeki boşluklarla birbirine bağlanmış olan bir dizi havuz içeren bir pool-dam sisteminde (Şekil 2.7A), her boşluğun genişliği tasarlanabilir. Böylece beyaz kan hücreleri ve kırmızı kan hücreleri kurulu baraj tarafından filtrelenebilir ve CTC'ler ilgili havuzlarda yakalanır [23].

Çalışmalardaki umut verici sonuçlara rağmen bu yaklaşım kanda düşük sayıda bulunan kanser hücrelerinin izolasyonu için daha fazla araştırılmalıdır. Bir başka araştırmada, geniş bir mikro kanaldan yapılmış mikro sıvı çipinin (60mm x 30mm x 20μm) tabanı, birbirini izleyen azalan açıklıklarla (yani 20, 15, 10 ve 5μm) tasarlanmıştır (Şekil 2.7B) [24]. Farklı boyutları olan farklı kanser hücrelerinin, alet boyunca farklı yerlerde yakalanabileceği ve kan hücrelerinin çoğunluğunun bu açıklıklardan geçebileceği gösterilmiştir.

Tam kandan CTC'lerin elde edilmesi için daha verimli bir yöntem olan büyüklüğe dayalı mikro sıvı yaklaşımında, üç komşu mikro sütundan yapılmış ay şekilli tuzaklar

kullanılmaktadır (Şekil 2.7C'ye bakınız) [25;26]. Bu tür bir tasarım, daha yüksek akış oranlarına izin verir. Hücrelerin ve diğer birikintilerin birikmesiyle kanalın tıkanmasını engeller.

Daha önemlisi, önerilen tasarım her tuzak başına tek veya çift CTC'lerin izolasyonunu sağlar. Akış yönünü değiştirerek, yakalanan hücreler geri elde edilir ve bunların kültürü başarıyla yapılabilir. Bu da bu aletin canlı CTC'lerin izole edilmesindeki becerisini gösterir. Bu teknoloji, 5 kanser hastasının küçük bir grubundan CTC'lerin izole edilmesinde başarıyla kullanılmaktadır ve son zamanlarda Clearbridge Biomedics tarafından CTChip® adı altında pazarlanmıştır.



Şekil 2.7 Pool dam çipinin şeması [126].

Bir mikro kanalda hücelere işleyen, boyuta dayalı hidrodinamik güçlerden de, CTC izolasyonunda da yararlanılabilir. Örneğin, bir mikro kanalın her iki yanında yan haznelerde vortekslerin oluşumu, CTC'lerin izolasyonu için araştırılmaktadır [27]. Örnek mikrokanalda akarken iki temel hidro dinamik gücün etkileşimi (yani kayma gradyan itme etkisi ve duvar itme etkisi) büyük kanser hücrelerini vortekslerin içine iter. Fakat küçük kan hücrelerinin yörüngesini etkilemez. Bu yöntem için geri kazanım oranı, teorik olarak hedef hücrenin büyüklüğüyle ve mikro kanaldaki Reynold sayısı ile ilgilidir. Bu alet oldukça yüksek bir verimlilik (4 mL/dak), kabul edilebilir bir saflık

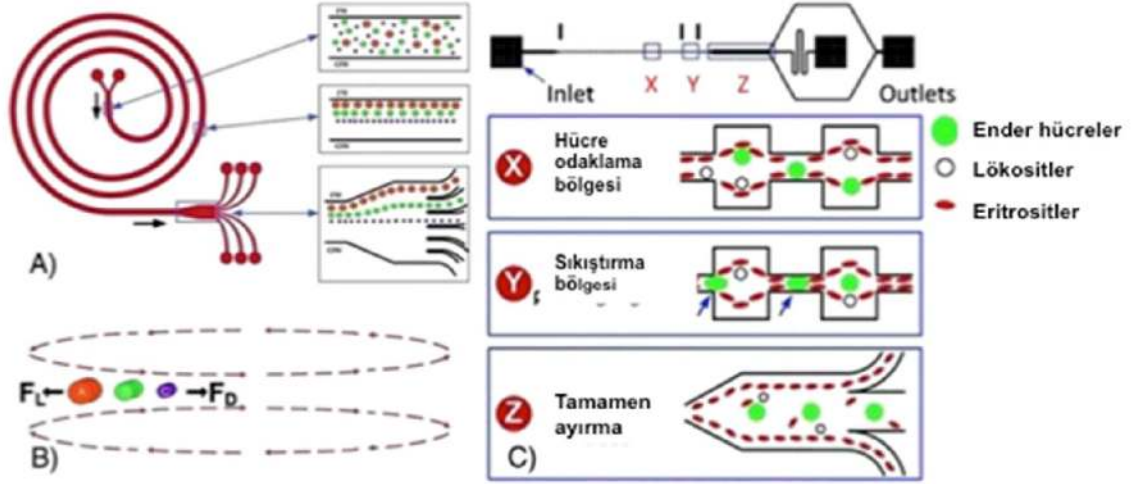
(%85) sağlar. Mikro kanal genişliğinin Reynolds sayısı ile ayarlanmasıyla (yani akış hızı), mikro kanalın genişliği boyunca farklı yerlere farklı hücreler göç edecektir. Daha sonra, belirtilmiş çıkışlarda izole edilebilirler (Şekil 2.8 A ve B). Bu yaklaşımın kullanımı ile, sulandırılmış kan örneklerinden sırasıyla %96 kanser ve %92 kan hücreleri izole edilmiştir [28]. Bu yöntem ayrıca klinik bir araştırmada uygulanmıştır. CTC'ler metastatik akciğer kanseri olan 20 hastanın tamamından izole edilmiştir ve 20 sağlıklı örnek için sonuçlar negative çıkmıştır [29].

Eylemsizlik kaldırma kuvveti hücreler üstünde, bir dizi kasılma-genişleme özellikleriyle birlikte, küçük kan hücreleriyle büyük kanser hücrelerinin yakınında kısık akış oluşturmak için etkiye bulunur (Şekil 2.8 C). Kısık akış V-şekilli bölgeye girdiğinde, eylemsizlik kaldırma kuvveti, daha küçük kan hücrelerini yan duvarlarda tutar. Daha büyük olan CTC ler eylemsizlik hidrodinamik gücünün etkisiyle belirtilen çıkışta toplanıncaya kadar düz bir hatta devam ederler (geri kazanım oranı: %80-90) [30;31]. Hedef kanser hücreleri bu yaklaşımda fiziksel olarak yakalanmadığından (Şekil 2.8 C'ye bakınız) izolasyonun saflığını geliştirmek için seri olarak bağlantılı olan cihazlarda yeniden işlemiden geçirilebilir [30]). Bu yaklaşımın kullanımıyla, CTC'ler %79'luk hassaslıkla klinik kan örneklerinden izole edilmiştir (n=24) [31].

CTC'lerin boyuta dayalı izolasyonu basit ve etiketsiz olsa da, bir biyoışaretleyici olarak büyüklüğün özel olmaması, bu yaklaşımın verimliliğini etkileyebilir. CTC'lerin morfolojik analizi, bu hücrelerin yuvarlak veya oval şekilleri ile morfolojik olarak heterojen olduğu ve 4 um ile 30 um arasında büyüklükte olduğunu göstermiştir [32].

Boyuta dayalı yöntemlerin çoğunluğu deneysel olarak optimize edilmiştir ve kanser hücresi dizisinin büyüklüğüne dayalıdır. Ancak bu hücreler morfolojik olarak daha homojendir ve genellikle CTC'lerden daha büyük olma eğilimleri vardır [33]. Yanlış pozitif oranları da artabilirler.

Çünkü lökositler CTC'ler kadar büyük olabilir [34]. Ayrıca, temel tümör hücreleri ve metastatik tümör hücreleri üstündeki biyomekanik araştırmalar, sert sitoskeletin yıkılması dolayısıyla (asıl olarak EMT sırasında) kanser hücrelerinin daha esnek hale geldiklerini belirtmektedir [35;36;37;38]. Dolayısıyla, boyut/deformasyona dayalı yöntemlerde CTC'lerin izole edilmesi için kullanılan temel ilke, daha invazif belki de metastaz başlatan CTC'leri veya CSC'leri göz ardı etmektir [39].



Şekil 2.8 (A-B) Spiral mikro kanalın planı, (C) Boyuta dayalı izolasyon için kullanılan aletin planı [128]

Son olarak, boyuta dayalı yöntemlerde yakalanan CTC'ler oldukça yüksek mekanik strese maruz kaldığından izole edilmiş CTC'lerin incelenmesinde bu mekanik stresin hücrelerin normal işlevlerini değiştirdiği gözlemlenmiştir[40].

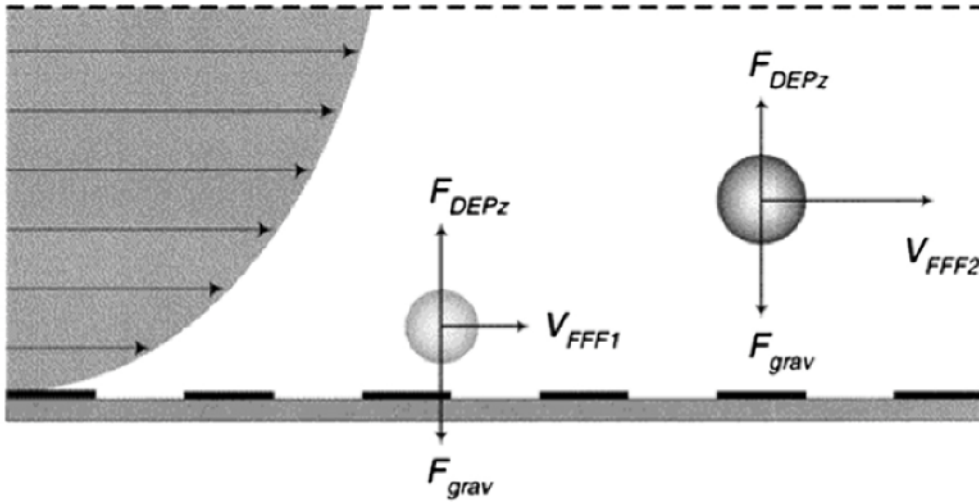
Son zamanlarda, CTC'lerin büyüklük heterojenliğini ve beyaz kan hücreleri ile örtüşmesini ele almak için, kanser hücreleri yüzey antijenlerine (örneğin EpCAM) bağlı olan mikro boncuklarla etiketlenirler. Bu etiketleme, hücre yüzeyinde bir mikro boncuk tabakası oluşturarak kanser hücrelerinin büyüklüğünü arttıracak ve hedef olmayan hücrelerin büyüklüğü için açık bir ayırım oluşturmada yardımcı olacaktır. Ayrıca kanser hücrelerinin katı mikro boncuklarla etiketlendirmesinin hücre deformasyonunu azaltacağı ve geri kazanım oranını arttıracacağı önerilmiştir (örneğin, %20'ye karşı %92). Ancak, hedef hücrelerinin üniform yüzey etiketlenmesi uygulamada başarılamayabilir. Bu da bu yaklaşımda uygulanan ana varsayımı etkileyebilir.

2.4.2.2 CTC lerin elektrokinetik olarak izolasyonu

Hücreler dielektrik partiküller olarak düşünülebilir. Bu hücrelerin elektrik olarak nötr fakat polarize olabilir olduğu anlamına gelir [41]. Dolayısıyla, bir elektrik alanda bulunurlarken (DC veya AC), elektrik dipol momentlerinin yönü, hücrelerin dielektrik özelliklerine bağlıdır. Fenotiplerine, fizyolojik durumlarına ve morfolojilerine bağlı olarak farklı hücrelerin farklı dielektrik özellikleri olacaktır. Bu da CTC'lerin elektrokinetik izolasyonu için uygulanan temel ilkedir [42;43;44]. Uygulamada, farklı hücreler mekaniksel olarak homojen olmayan AC alanına maruz kaldığında, hücrelerin ve taşıyan medyumun dielektrik özelliklerine ve alanın genliğine ve frekansına bağlı olarak, farklı elektronik güçleri yaşayacaklardır. Bu güçler, elektrorotasyon ile (yani döner bir AC alanında hücrelerin dönme hareketi) ve dielektroforez (DEP); (yani, üniform olmayan AC alanında itici veya çekici dönüşümsel hareket) ile hücrelerin nitelendirilmesi ve izolasyonu için kullanılabilir [45;46].

DEP gücü, uzunluk ölçeğine ters orantılıdır. Entegre mikro sıvı elektronik aletlerinin kullanımı ile mikro ölçekte hücre izolasyonu için daha etkilidir [47;48].

Buna göre, kanser hücrelerinin DEP dayalı izolasyonunda kullanılan cihazlar için genel bir tasarım, mikro ölçekli hazne veya üniform olmayan AC alanını oluşturmak için tabanında elektrot dizileri olan kanalı içerir. İzolasyon ya çekici DEP gücü tarafından elektrotta kanser hücrelerinin yakalanması ile veya itici DEP gücü ve yer çekimi ve hidrodinamik güçlerin (DEP/G-FFF) dengelenmesi ile medyum içinde kanser hücrelerinin immobilize hale getirilmesi ile yapılabilir (Şekil 2.9'A bakınız) [49;50]. Bu yöntemlerin kullanımı ile, karmaşık hücre örneklerinden kanser hücrelerinin DEP dayalı izolasyonu gösterilmiştir ve farklı kanser hücresi konsantrasyonları ile (örneğin, bir kanser hücresi, 3×10^5 kan hücresi ile karıştırıldığında) örnekler için yüksek geri kazanım ve saflık oranları (N %95) rapor edilmiştir [49;51;50]. Canlılık testleri, bu yöntemde uygulanan, oldukça yüksek güçteki elektrik alanlarının ($N 2.5 \times 10^4$ V/m) invazif olmayışını onaylamıştır. Yine de, yukarıdaki yöntemlerle ilgi temel dezavantaj, bunların düşük verimliliğidir. Farklı hücreler DEP'in toplu etkisi ve yerçekimi ile belirlenmiş (FDEPz ve Fgrav), ve farklı yüksekliklere kaldırılmışlardır.



Şekil 2.9 Elektrorotasyon ve dielektroforez [50]

Hücreler eşitliklerine ulaştıktan sonra, farklı yüksekliklerde ($V_{FFF2} > V_{FFF1}$) farklı velosite profillerine sahip olan parabolik laminar akış, aynı verimde fakat farklı zamanlarda hücreleri toplar. Daha hızlı profilin içindeki hücreler (V_{FFF2}) önce toplanır, ardından daha yavaş profilin içinde bulunan hücreler gelir (V_{FFF1}).

Bu konuyu ele almak için, daha büyük hacimleri (4.5mL'ye kadar) işlemeye kapasitesi olan, daha büyük bir haznesi olan bir alet geliştirilmiştir [52]. Ancak, bu aletin hassaslığı yüksek hacimler için önemli ölçüde azalmıştır. Örneğin, $\sim 5 \times 10^6$ kan hücreleri ile karıştırılmış kanser hücreleri içeren 4.5 mL örnek için (1:1000 oran), geri kazanım oranı %10'a düşmüştür. Çünkü kanser hücrelerinin çoğu, kan hücreleri ile birlikte ayrılmıştır. Örnek hacmi 9 kat azaldığında (yani, 100 kanser hücresi $\sim 2 \times 10^5$ kan hücresi ile karışmış), geri kazanım oranı %92'ye çıkmıştır. Daha verimli olan sürekli akış mikro sıvı yaklaşımları son zamanlarda rapor edilmiştir. Bir çalışmada, DEP modülü, büyüklüğe dayalı hidrodinamik adımla entegre olmuştur. Bu, fazla kan hücrelerinin ortadan kaldırılması için zenginleştirme safhası olarak uygulanmaktadır [53]. Kan hücrelerini ortadan kaldırmak için ayrı bir ayrışma akışını uygulayan bir diğer yaklaşımda da, kanser hücreleri haznenin içinde düşük ağırlıklarda çekici DEP alanında kalmış ve ayrı bir çıkışta toplanmışlardır [54]. Bu tasarıma dayalı olarak, ticarileşmiş alet ApoStream™ (ApoCell Inc., TX, ABD) çeşitli konsantrasyonlarda kan ile karıştırılmış kanser hücrelerinin $\sim 70\%$ 'i geri kazanılmıştır.

CTC'lerin DEP dayalı izolasyonu etiketsizdir ve canlı hücreleri sağlar. Fakat uygulamada bazı faktörler uygulanmalarını etkileyebilir. Örneğin, hücrelerin dielektrik özellikleri iyon sızıntısı dolayısıyla giderek değişebilir ve bu da izolasyonun, örnek işlemi başladıktan sonra kısa bir süre içinde tamamlanması gerektiği anlamına gelir [52]. CTC izolasyonu ve analizleri için büyük örnek hacimleri gerekli olduğundan, şimdiye kadar başarılan oldukça yavaş örnek işleme oranlarından dolayı bu kolay bir iş değildir.

2.4.3 Antikora dayalı yöntemler

Antikora dayalı yöntemler tek bir biyokimyasal ilkeye dayalı olarak, yani antikor-antijen özel bağlanması olarak belirlenmiştir. Bu yöntemler, hem CTC belirlenmesi ve hem de izolasyonu için en genel ve etkin yaklaşımlardır. Antikora dayalı belirleme, asıl olarak hücrelerin görsel incelenmesi ile ICC'yi kasteder. Ancak diğer görsel olmayan belirleme teknikleri, örneğin Raman spektroskopisi, fotoakustik flowmetri ve NMR (nükleer manyetik rezonans) de araştırılmıştır. Antikora dayalı CTC izolasyonu antikor-yöneltirilmiş bir "matris" kullanarak yapılır. CTC'ler matrise özel olarak bağlanır. Matris iki temel şekilde olabilir: manyetik partiküller veya bir küvet içinde (çoğunlukla bir mikro kanal) değiştirilmiş yüzey. Literatürde, izolasyon matrislerinin genel şekilleri rapor edilmiştir. Örneğin, yüzeyleri antikorlar ile kaplanmış kimyasal olarak güçlendirilmiş nanomotorlar (yani matrisler) kanser hücresi izolasyonu için araştırılmıştır. İlke olarak, nanomotor bir küvet olarak davranır ve dolaşan bir kanser hücresini seçici olarak alır ve belirli bir varış noktasına taşır. Ancak, kanın kimyasal kompozisyonu ve hedef olmayan hücrelerin yüksek izolasyonu için kullanılabilmesinden önce daha fazla geliştirilmesi gereklidir. Antikora dayalı izolasyon yöntemlerinin uygulandığı ilkenin özgünlüğü ele alındığında, bunlar teorik olarak CTC'lerin belirlenmesi ve izolasyonunu başarır. Ancak, CTC'ler için gerçekten özel yüzey antijeninin olmaması dolayısıyla, bu uygulamada güvenilir olarak başarılmamıştır. Burada, CTC'lerin belirlenmesi ve/veya izolasyonu için antikora dayalı yöntemler immunositokimya, immunomanyetik ve adezyona dayalı yöntemler olarak sınıflandırılır ve aşağıdaki alt bölümlerde incelenmiştir.

Herhangi bir antikora dayalı yöntemin uygulanması, geniş ölçüde kullandığı antijene dayanır. CTC'lerin belirlenmesi veya izolasyonu için çeşitli antijenlerden yararlanılır. Bunların arasında EpCAM ve Sitokeratinin farklı alt türleri en sık kullanılan

işaretleyicilerdir. Ancak çoğu araştırmalar, EMT sürecinin bir sonucu olarak CTC'lerin hepsinin bu işaretleyicileri ekspres etmediklerini teyit etmiştir. EMT sürecinin CSC'lerle ilgili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu işaretleyicilere dayalı olan herhangi bir yöntemin bu önemli CTC alt popülasyonunu yok saydığı olasıdır. Ancak, bu tür epitelyum işaretleyicilerini kullanarak belirlenen CTC'lerin seyir değeri birkaç klinik araştırmada gösterildiğinden dolayı, bu hücrelerin (yani EpCAM+ ve/veya CK+) daha önemli metastaz başlatan hücrelerin veya CSC'lerin yerini tutucuları olduğu varsayılabilir. Birkaç organ veya tümöre özel işaretleyiciler, örneğin CEA, EGFR, PSA, HER-2, MUC-1, EphB4, IGF-1 R, cadherin-11 ve TAG-72 da CTC'lerin antikora dayalı belirlenmesi ve izolasyonunda rapor edilmiştir. Kısacası, mevcut literatür şimdiye kadar rapor edilen işaretleyicilerden hiçbirinin, bütün CTC'lerin etkin belirlenmesi ve izolasyonu için gerekli olan ideal performansı (yani, yüksek ekspresyon ve özgünlük) göstermediğini ileri sürer.

2.4.3.1 İmmunositokimyasal (ICC) yöntemler

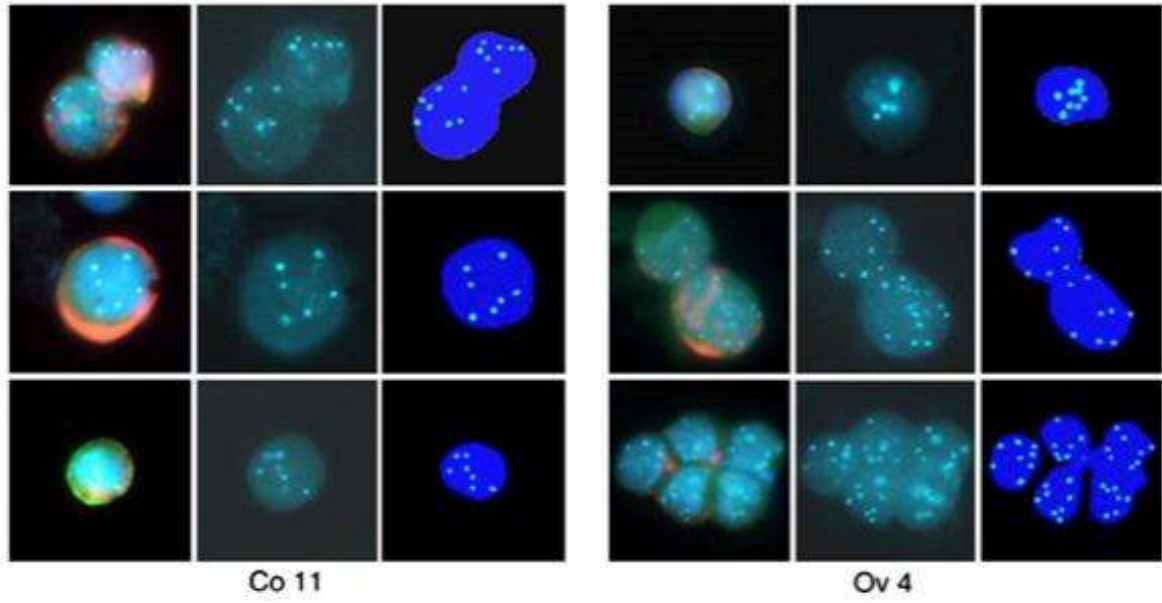
ICC ile CTC belirlenmesi antikor etiketli hedef hücreleri bulmak için zenginleştirilmiş örneğin doğrudan görsel incelenmesini sağlar. CTC çoğunlukla CK+/DAPI+/CD45-intakt hücre olarak tanımlanır. Özellikle, CD45 negatifliği CTC belirleme özgünlüğünü arttırmak için kullanılır. Nükleer boya olarak DAPI kullanılır. İlke olarak, CTC belirlenmesi için ICC en güvenilir ve özel yöntem olarak düşünülebilir, ancak ideal performans uygulamada başarısız olabilir. İşaretleyicilerin hassaslığına ve özgünlüğüne ek olarak, hücreleri sorgulamak için uygulanan optik tekniklerin verimliliği ICC yöntemlerinin performansını etkiler. Genel olarak, bu amaç için iki temel yaklaşım düşünülebilir, bunlar flow sitometri ve imaj sitometrisidir.

Floresens aktive edilmiş hücre ayırma (FACS) içeren flow sitometrinin ilkesi, genellikle immunofloresen olarak etiketlendirilmiş CTC'lerin belirlenmesi, sayımı ve ayrımı için uygulanmıştır. Ancak flow sitometri CTC'lerin belirlenmesi için gerekli olan yüksek hassaslığı tutarlı biçimde sunmamıştır. Bu durum teknik sınırlamalar ve antijen ekspresyonundaki varyasyonlardan kaynaklanabilir.

İmaj sitometrisi ile CTC belirlenmesi daha popülerdir ve asıl olarak immunofloresens mikroskopisine başvurur [55]. İmaj sitometrisinin asıl avantajı, birkaç işaretleyiciyi içermesi olasılığıdır. Ayrıca bir diğer avantaj belirleme özgünlüğünü geliştiren farklı

moleküler (yani FISH) veya sitomorfolojik (yani N/C oranı) analizlerin prosedüre dahil edilmesidir [56].

Dolayısıyla, çeşitli ADM sistemleri bu amaç için uygulanmıştır. Manuelden daha fazla verim ve tekrarlanabilirliğe ek olarak, ADM sistemleri imaj verilerinin bilgisayarlı proses sonrası analizini sunabilir (Bakınız şekil 2.10) [57;58;59].



Şekil 2.10 Kolorektal ve ovaryan kanser hastalarından, belirlenen CTC'lerin otomatik kantitatif FISH analizi [58]

Şekil 2.10 da, sol kolon, EpCAM (yeşil), CK-7/8 (Cy5) ve DAPI (mavi) için etiketlenmiş, 100x büyütmede, belirlenen CTC'leri tanımlamaktadır. Orta kolon, her CTC'nin nükleusu içinde kromozom (noktalar) için FISH sonuçlarını gösterir. Noktaların otomatik sayımına dayanarak sistem, belirlenen CTC'lerin kimliğini onaylar.

İmaj sitometrisi ile CTC belirlemesi, CellSearch sistemi (Veridex, NJ, ABD) tarafından da uygulanan popüler bir yaklaşımdır ve CTC belirlemesi için klinik olarak onaylanmış tek analizdir. Zenginleştirme basamağını atlayarak ve örnekteki bütün çekirdekli hücreleri inceleyerek, bir diğer imaj sitometri sistemi, HD-CTC analizi son zamanlarda yaklaşık olarak %99 belirleme hassaslığını başarmıştır [60]. Metastatik karsinoması olan 15 hastayı içeren başa baş bir karşılaştırma, sırasıyla 14 ve 5

hastada 7.5mL kan örneğinden HD-CTC ve CellSearch analizlerinin ≥ 2 CTC belirleyebileceğini göstermiştir. Ayrıca, HD-CTC analizi tarafından belirlenen ortalama CTC sayısı CellSearch sisteminkinden çok daha yüksek olmuştur (100 kata kadar). Örnek hiçbir zenginleştirme sürecine tabi olmadığından, bu yöntem ayrıca bazı örneklerde CTC kümeleşmelerini belirleyebilmiştir [61]. Bu dolaşan kümelerin tümör yapısından mı ayrıldığı veya CTC'lerin kan damarlarının endotel duvarına bağlanmasından sonra mı oluştuğu bilinmemektedir. Ancak, bunların yüksek klinik önemi olabilir [61].

2.4.3.2 İmmunomanyetik yöntemler

Deoksihemoglobin kırmızı kan hücreleri hariç, neredeyse bütün hücreler ya diamanyetik ya da çok zayıf manyetiktir [62]. Dolayısıyla manyetik bir alan, manyetik özellikleri seçici olarak değiştirilmişse, CTC'lerin kandan verimli şekilde izole edilmesi için kullanılabilir. Bu amaçla, antikor-konjuge manyetik mikro boncuklar (çap: 0.5-5µm) veya belli bir yüzey antijenine sıklıkla bağlanan nanopartiküller (çap: 50-250 nm) kullanarak CTC'ler etiketlendirilebilir. Kısa bir inkübasyon süresinden sonra (~ 30 dk) örnek, üniform olmayan bir manyetik alana maruz kalır. Bu da etiketlenmiş hücrelerin daha yüksek MFD bölgelerine doğru göç etmelerini ve burada yakalanmalarını sağlar. Membran geçirgenliğine neden olan intraselüler etiketleme dışında, immuno manyetik yöntemler canlı ve yapısı bozulmamış hücreler sağlar. Çünkü manyetik etiketler biyolojik fonksiyona (örneğin, gen ekspresyon profili) [63] veya hücrelerin optik özelliklerine (nano partiküller kullanıldığında) karışmazlar. Gerekğinde immuno manyetik etiketler, enzimatik veya immunolojik yöntemler kullanarak iptal edilebilir [64;65].

Bir immuno manyetik yöntemin performansı, üç faktörle belirlenir. Bunlar

- a) hedef antijenin ekspresyonun özgün olması ve bağlandığı antikora bağlanma kalitesi,
- b) immuno manyetik etiketleme sürecinin ve manyetik partiküllerin verimliliği
- c) etiketlenmiş hücrelerin izole edilmesi için tasarlanan ayırım mekanizmasıdır.

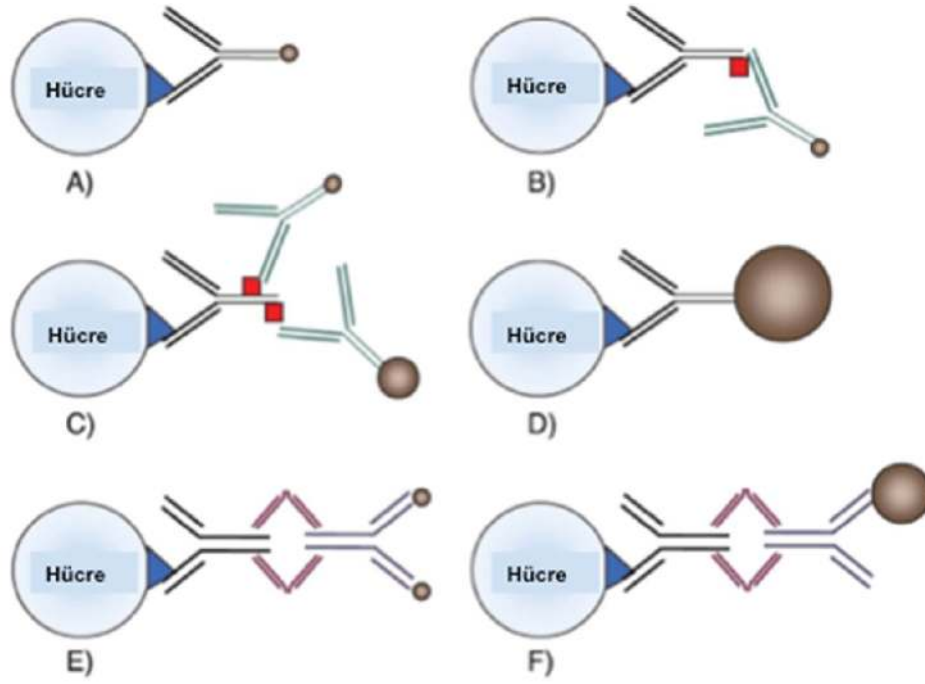
Aşırı ekspres olmuş yüzey antijeni, immuno manyetik partiküllerin alımını artırabilir. Bu da hücreler üstünde etkili olan manyetik gücü yaratır ve izolasyonlarını kolaylaştırır. EpCAM sıklıkla bu amaç için kullanılmaktadır. Ancak, daha önce de

açıklandığı gibi, EpCAM'in ekspresyonu CTC alt popülasyonları arasında değişiklik gösterebilir [66]. İdeal bir işaretleyici bulunmadığından, bu konunun üstesinden gelecek bir yaklaşım, hedef çoklu antijenlerine bir "kokteyl" antikorların kullanımınıdır [67;68; 69;70;71]. CTC'lerin fenotipinden bağımsız olan diğer bir yaklaşım, örnekten beyaz kan hücrelerinin manyetik olarak uzaklaştırılması için özgün işaretleyicilerin (örneğin CD45 veya CD61) kullanımı ve kırmızı kan hücrelerinin parçalanması ile CTC lerin negatif olarak izole etmektedir [72;73;74]. Bu tür bir yaklaşım CTC'leri dokunulmamış halde bırakır. Ancak, beyaz kan hücreleri CTC'leri sayısal olarak geçtiğinden, kabul edilebilir bir saflık elde etmek için, ayırım yönteminin çok yüksek bir geri kazanım oranı olmalıdır. Diğer bir deyişle, kazanılmamış beyaz kan hücrelerinin küçük bir oranı bile, arka plandaki hücrelerin fazla sayısı demek olacak ve saflığı azaltacaktır.

Hedef antijene ve onun antikoruna ilaveten, hem etiketleme protokolü (yani doğrudan veya dolaylı etiketleme ve reaktifler) hem de manyetik partiküller (yani büyüklükleri ve kompozisyonu), immuno manyetik yöntemlerin performansını etkileyecektir [75;76;73]. Birincil antikor ile manyetik partiküllerin arasındaki bağlantı, ikincil antikorlar aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak başarılabilir. Bu antikorlar manyetik partiküllere zaten bağlanmıştır ve birincil antikorda özgün bir epitopa özel olarak bağlanabilir (Şekil 2.11'e bakınız). Doğrudan (tek adım) yöntemi ile karşılaştırıldığında, dolaylı (iki adım) yaklaşımı, potansiyel olarak daha yüksek etiketleme verimi sağlayabilir (yani, hücre başına manyetik partikül). Örneğin, etiketleme veriminde 15 kata kadar bir artış, uygun kimya uygulandığında dolaylı bir yaklaşım için gözlemlenmiştir [77]. Dolaylı bir yöntemin gelişmiş performansı, birincil antikora bağlanan birkaç ikincil antikor aracılığıyla, bir manyetik partiküle bağlanan her birincil antikorun becerisi ile ilgili olabilir (Şekil 2.11 C'ye bakınız). Manyetik partiküllerin boyutu da genel verimi etkileyebilir [75]. Daha büyük partiküller (~ 4.5 µm) de yaratabilecekleri daha büyük momentum nedeniyle membranı parçalayarak hücrelere zarar verebilirler [76].

A ve D protokolleri, manyetik olarak etiketlenirilmiş birincil antikorların kullanımı ile doğrudan etiketlenmeyi göstermektedir. B ve C protokolleri, bir yüzey antijenine bağlanmış olan haptene konjuge birincil antikora bağlanan, manyetik olarak etiketlenirilmiş ikincil antikorların kullanımı ile dolaylı etiketlendirmeyi

tanımlamaktadır. E ve F protokolleri, yüzey antijenine ve manyetik partiküllerde bir reseptöre (sıklıkla dekstran) bağlanan tetramerik antikor kompleksi (TAC) yapılarının kullanımı ile diğer bir dolaylı etiketleme yaklaşımını temsil etmektedir.



Şekil 2.11 İmmuno manyetik etiketleme için direk ve dolaylı yöntemler [73]

Makro-ölçekte ayırım yapıları

İmmuno manyetik bir yaklaşımın performansını önemli ölçüde etkileyen üçüncü bir faktör, etiketli hücreleri izole etmekte kullanılan manyetik ayırım mekanizmasıdır. Genel olarak, ayırım makro veya mikro ölçeklerde yapılabilir. Makro ölçek yöntemleri daha yüksek ürün sunar ve sıklıkla zenginleştirme amaçları için uygulanmaktadır. Kümeye yönelik yaklaşımda, etiketlenmiş bütün örnek manyetik alana tabi tutulur ve bu da etiketlenmiş hücrelerin daha yüksek MFD bölgelerine göçü ile sonuçlanır [78]. Bu kavrama dayalı olarak farklı mekanizmalar tasarlanmıştır, kalıcı bir mıknatısın yanına yerleştirilen basit bir test tüpünden, (örneğin, EasySep™, STEMCELL Tech.,

BC, Kanada) daha karmaşık yapılmış platformlara kadar (örneğin, CellSearch® sistemi). Daha yüksek hacimleri verimli olarak işleyen bir diğer alternatif yaklaşım, sürekli akış ayırımıdır. Burada örnek sürekli olarak ayırım modülüne verilir. Bu modül, etiketli hücreleri yakalamak ve tutmak için (MACS®, Miltenyi Biotec Ltd., Almanya) ya manyetik olarak aktive olmuş filtreyi içerir (yani, çelik yün kolonlar) ya da manyetoforez ilkesini kullanarak akış içinde etiketli hücreleri seçici olarak saptırır. Bunları belirlenmiş çıkışlarda toplar [74]. Bu iki genel moda dayalı olarak, birkaç manyetik zenginleştirme sistemi geliştirilmiş ve pazarlanmıştır. Bunlar Zborowski ve Chalmers tarafından incelenmiştir [79].

CellSearch sistemi immuno manyetik örnek zenginleştirme ve imaj sitometrisini birleştirerek, FDA tarafından onaylanmış tek platformdur. Bu platform CTC'lerin meme, prostat ve kolorektal kanser hastalarında belirlenmesi ve sayımı içindir [80;81;82]. Bu sistemde örnek hazırlanması ve hücre etiketlendirmesi otomatik bir modülün kullanımıyla yapılır. Zenginleştirilmiş etiketli örnek (örn., 7.5 mL kan örneğinden ekstre edilmiş ~ 300 µL) , dört renkli ADM'ye yüklenmiş manyetik kartuşa aktarılır. Yüklendiğinde, manyetik kartuş aktive olur ve manyetik olarak EpCAM-etiketli hücrelerin göç etmesine ve kartuşun yüzeyine bağlanmasına neden olur. Kartuş daha sonra farklı etiketler için ayrı olarak taranır. Son doğrulama için belirleme sonuçları bir operatör tarafından incelenmelidir. Bu sistem için yüksek derecede tekrarlanabilirlik ve inter veya intra analiz uyumu bildirilmiştir [80;83]. CellSearch® sistemi büyük ölçekte klinik araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu araştırmalar, CTC'lerin klinik kullanımı hakkında mevcut verilerin çoğunluğu ile ilgilidir [81;84;85;86;87;82].

CellSearch® analizi genel olarak CTC'leri sağlıklı kan örneklerinde belirlemez. CTC-pozitif hastaların sayısı ve bu hastalarda belirlenen CTC'lerin frekansı düşüktür. Örneğin, farklı metastatik karsinoması olan 808 hasta arasından, sadece %41.7'sinde 7.5 mL örnek başına 5 CTC vardır [82]. Bu azalmış belirleme hassaslığı sadece EpCAM'i seçen immuno manyetik zenginleştirme basamağında ortaya çıkar [87;88]. 48 meme kanseri hastasını ele alan karşılaştırmalı bir araştırmada, immuno manyetik zenginleştirme basamağı için EpCAM ile birlikte CK kullanımının, geri kazanım oranını %20'ye kadar arttırılabileceği bildirilmiştir [89]. İmmuno manyetik

zenginleştirmenin hem anti EpCAM ve hem de anti CD146 antitabillerinin kullanımıyla yapılması hakkında benzer sonuçlar bildirilmiştir.

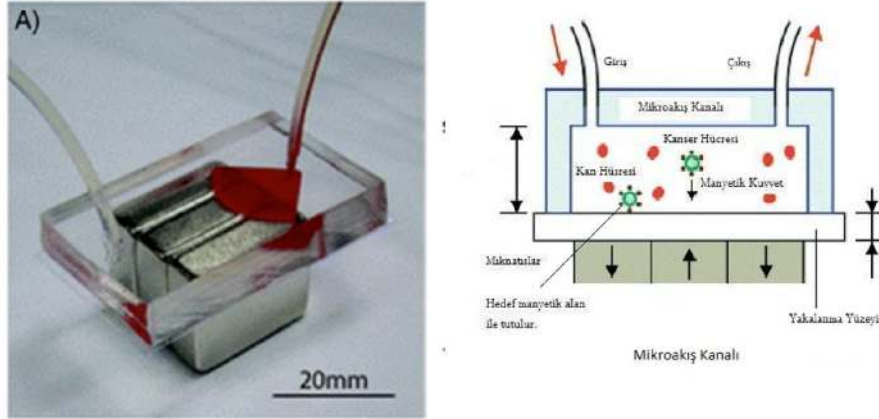
Mimumum 1 mL kan hacminde bulunan tek kanser hücresinin izole edilmesi bu tür makro ölçekli yöntemlerle başarsa da, ortalaması yaklaşık %50-60 olan rapor edilmiş geri kazanım oranlarında (%10-90) önemli değışiklikler gözlemlenebilir [90;91;92].

Mikro ölçekte ayırım yapıları

CTC'lerin mikro ölçekte immuno manyetik yakalanması, bir dizi kalıcı mıknatısın üstüne dikdörtgen şekilli mikro kanalın basitçe yerleştirilmesiyle yapılabilir (Şekil 2.12'ye bakınız) [93]. Örnek, mikro kanalda akarken, traktlarda komşu mıknatıslar arasında MFD gradyanı oluşur ve mikro kanal tabanında EpCAM etiketli kanser hücrelerini sabitler (Şekil 2.12 B'ye bakınız). Akış oranını ve etiketleme sürecini en iyi düzeye getirerek, bu basit yöntem 10 hücre/mL başına kadar düşük konsantrasyonlarda tam kanda kanser hücrelerinin ~% 86'sını izole etmiştir [93]. Bir diğer tasarım, CTC'leri murin kanser modellerinden izole etmek için, yan duvarlarında birkaç kare şekilli girintileri olan düz bir mikro kanalı içerir [94]. Çipin yanında yerleştirilen kalıcı bir mıknatısla yaratılan manyetik alan gradyanı, EpCAM etiketli hücreleri yan duvara doğru çeker ve burada hücreler mikro olarak oluşturulmuş girintilere girerler ve takılırlar. İzole edilmiş hücrelerin hapsedilmesi için bu yan haznelerin kullanımı, önceki alette yakalanmış hücreler tarafından yaşanan, genel olarak istenmeyen kesme gerilimini engeller.

Kanser hücrelerinin mikro manyeto foretik izolasyonu, akan etiketli hücrelerin seçici olarak saptırılması ve toplanması için gerekli olan MFD gradyanını üretmek için, bir mikro kanalın içinde mikro olarak oluşturulmuş mıknatıs yoğunlaştırıcıların dahil edilmesiyle yapılabilir [95;96].

Bu yaklaşımda manyetik ve hidro dinamik güçlere hükmeden eşitlik yüzünden, bu yaklaşım, yüksek akış oranlarında işleyebilir (örn. 270 μ L/dk) [97]). Bu tür bir tasarımın kullanımıyla, altı hastanın oluşturduğu küçük bir grupta, kanser hücrelerinin ve ayrıca CTC'lerin %90'ının yüksek özgünlükle izolasyonu (N %95 saflık) son zamanlarda rapor edilmiştir [96].

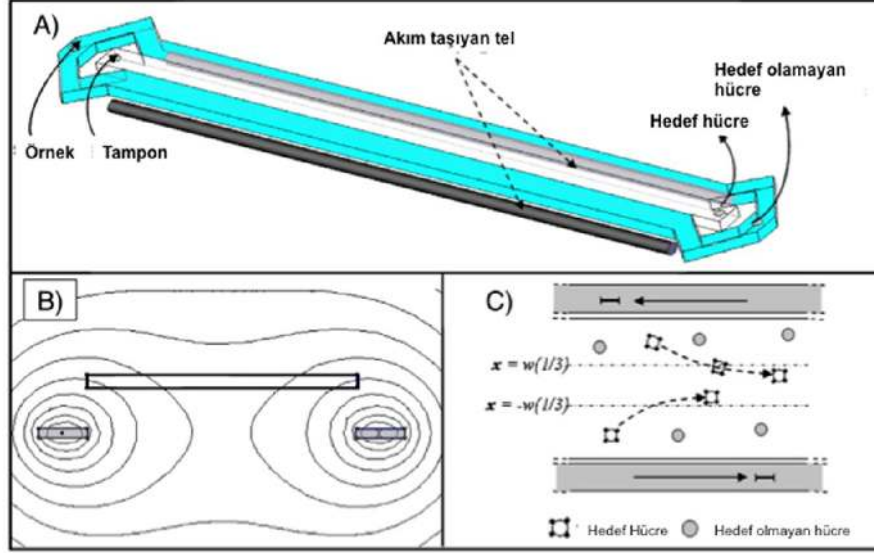


Şekil 2.12 Kanser hücrelerinin immune manyetik izolasyonu için kullanılan mikrosıvı çip [93]

Her iki tarafında iki akım taşıyan telin olduğu düz bir mikro kanalı içeren alternatif bir manyetik foretik yaklaşım, Plouffe ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [97] (Şekil 2.13). Mikro kanallarda laminar akışı kullanarak, mikro kanalın merkezinde bir tamponu verimli şekilde kaplayarak, örnek iki akıntıya verimli şekilde ayrılmıştır. Tellere akım verildiğinde, manyetik bir alan yaratılır ve bu da etiketli hücreleri, her iki örnek akıntısından tampon toplama akımına hareket etmesine zorlar (sırasıyla geri kazanım ve saflık oranları ~ %88 ve ~% 81).

CTC'lerin verimli şekilde izolasyonuna ilaveten, immuno manyetik partiküllerin izole edilmiş CTC'lerin sayımı ve nitelendirilmesi için bir araç olarak kullanılabileceğini belirtmek gerekir. Örneğin, CTC'lerin yüksek verimde (10^7 hücre/dk) belirlenmesi, sayımı ve nitelendirilmesi, Micro-Hall Dedektör (μ HD) adı verilen entegre bir çipin kullanımıyla yapılır (μ HD) [98]. İmmuno manyetik olarak etiketlenilmiş hücreler, mikro kanal tabanında entegre olmuş mikro Hall dedektörlerinin sıraları üstünden akar, her bir sensör aracılığıyla bir Hall voltaj pulsu (titreşimi) yaratılır. Her bir sensörden toplanan sinyallerin işlenmesi ile, sadece CTC'ler belirlenip sayılamaz, ayrıca bir veya daha fazla işaretleyicinin ekspresyonu ile ilgili olabilecek, hücre başına manyetik partikül yükü de tek hücre seviyesinde sayılabilir.

CTC'lerin immuno manyetik mikro sıvı belirlemesi ve izolasyonu, gelecekte CTC'lerin verimli şekilde belirlenmesi, sayımı, nitelendirilmesi ve izolasyonu için entegre aletlerin gelişmesi için büyük bir potansiyele sahiptir.[99]



Şekil 2.13 Bir mikrokanalda manyeto foretik olarak yer değiştirme ile kanser hücrelerinin izole edilmesi[97]

2.4.3.3 Adezyon temelli yöntemler

Adezyona dayalı yöntemler, biyokimyasal ve nadiren topografik özellikleri değiştirilmiş olan yüzeylerde CTC leri yakalama ilkesine dayanır. Antikor kaplanmış bir yüzeyin topografik özelliklerinin değiştirilmesinin, hücre adezyonunu 10 kata kadar geliştirdiği gösterilmiştir. Bunu, hücre canlılığını tehlikeye atmadan, nano yapı yüzeyi ile membran özellikleri arasındaki yerel etkileşimlerle yapar [100]. İmmuno manyetik yöntemlerin tersine, CTC'lerin adezyona dayalı izolasyonu, izolasyon sürecinden önce hücrelerin etiketlenilmesini gerektirmez. Adezyona dayalı CTC izolasyonu, statik (kümesel) veya sürekli akış mikro sıvı modları tarafından yapılabilir. Ancak ikinci yaklaşım daha verimli ve yaygındır [101;102]. Statik adezyona dayalı analizlerde, örnek ilk önce belli bir süre için yakalama yüzeyinde inkübe edilir. Daha sonra, yapışmayan sözde hedef olmayan hücreler akıp giderler ve yüzeye bağlanmış

CTC'leri geride bırakırlar. Bu yaklaşımda, CTC'lerin belirlenmesi ve izole edilmesi için özel kollajen kaplı yüzey uygulanmaktadır [103;104;105].

Adezyona dayalı yöntemlerin hassaslığı ve seçiciliği, sürekli akış mikro sıvı yaklaşımlarının kullanımı ile geliştirilebilir. Bu yaklaşımlarda akış dinamikleri öyle şekilde ayarlanır ki hedef hücreler yakalama yüzeyi ile etkin şekilde etkileşimde bulunabilsinler. Bu arada özgün olmayan etkileşimler hidro dinamik güç tarafından engellenir. Bir mikro sıvı aletin yakalama yüzeyine hedef hücrelerin adezyonu, hidrodinamik güç ile ligand-reseptör bağlanmasının ilgisi ve dinamikleri arasındaki denge ile nitelendirilir [106;107;102].

Benzer şekilde, sıklıkla birbiriyle ilgili parametreler adezyon verimini etkiler. Bunlar: mikro kanalın Reynolds numarası (yani akış oranı), hücre-yüzey çarpışma frekansı ve bir çarpışmanın ardından hücre adezyon olasılığı [101;108;109;110]. Akış oranı, çarpışma süresini, ayrıca frekansını etkiler. Bunların ikisi de yakalama yüzeyinin etkin alanını genişleterek artırılabilir [111;112]. Akış oranı hem hedef ve hem de hedef olmayan hücreler üstünde etkili olan hidrodinamik kesimi de etkiler. İdeal olarak, bunun makul bir verim ve saflık elde etmek için yeterince yüksek olması gerekir. Bu arada geri kazanım oranı ve hücre canlılığı tehlikeye atılmamalıdır [113;108]. Bir çarpışmanın ardından bağ oluşumunun olasılığı, reseptör-ligand bağının ilgisi ve dinamiklerine bağlıdır. Reseptörün CTC'lerin üstünde ekspresyonuna ve yakalama yüzeyini kaplayan ligandların konsantrasyonuna ve bağlanma yerlerinin yönelişlerine de bağlıdır [109;114;110].

CTC'lerin mikro sıvı adezyonuna dayalı izolasyonu, örneğin düz bir mikrokanaldan akıtılmasıyla başarılabılır. Bu kanalın iç yüzeyi, CTC' lere karşı antikör ile kaplanmıştır. Ancak bu tür bir mikrokanalda oluşturulan yüksek orandaki laminar akıntılar, hücre yüzeyi çarpışmasını engeller (Şekil 2.14 A'ya bakınız). Dolayısıyla, mikrokanalın antikör kaplı yüzeyinde hücrelerin düşmesini ve yuvarlanmasını sağlamak için akış oranı önemli ölçüde azaltılmalıdır (örn. 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) [115]. Ancak bu tür düşük akış oranları uygulamada kullanılamaz. Bu konuyu ele almak için, düz bir mikrokanalda laminar akışı bozmak ve pratik akış oranlarında difüze hareketi arttırmak için pasif bir karıştırma mekanizması uygulanabilir (Şekil 2.14 B) [116]. EpCAM'e karşı bir antikörün kullanımıyla, bu tasarım için yüksek geri kazanım oranı (%91.8) elde edilir.

Çarpışmaların frekansını arttırmak için bir diğer yaklaşım, mikrokanal için eğrisel (yani sinüs biçimli) tasarım uygulamaktır [113]. Akış oranına bakmaksızın, bu tür bir tasarımda akışa hükmeden dinamikler, hücreleri antikor kaplanmış yan duvarlara doğru saptırır ve hassaslıktan vazgeçmeden yüksek verime izin verir. Bu tasarıma dayalı olarak, duvarları anti EpCAM antikor veya anti PSMA aptameri ile kaplanmış olan, birkaç paralel mikro kanaldan oluşmuş mikro sıvı çipi geliştirilmiştir. Karıştırılan kan örneklerinden farklı kanser hücresi dizilerini izole etmek için kullanılmaktadır [117;118]. Bütün hücre dizileri için bu yöntem >%90 yakalama verimi ve ~ %100 saflık sağlamıştır. Adezyon verimi, eğer mikro kanalda düz bir yüzey yerine nano yapıli antikor kaplı yüzey kullanılırsa daha fazla geliştirilebilir [119]. Bu tür bir substratın kullanımıyla, kan hücreleri ile karıştırılan kanser hücrelerinin >%95'i yeniden kazanılır.

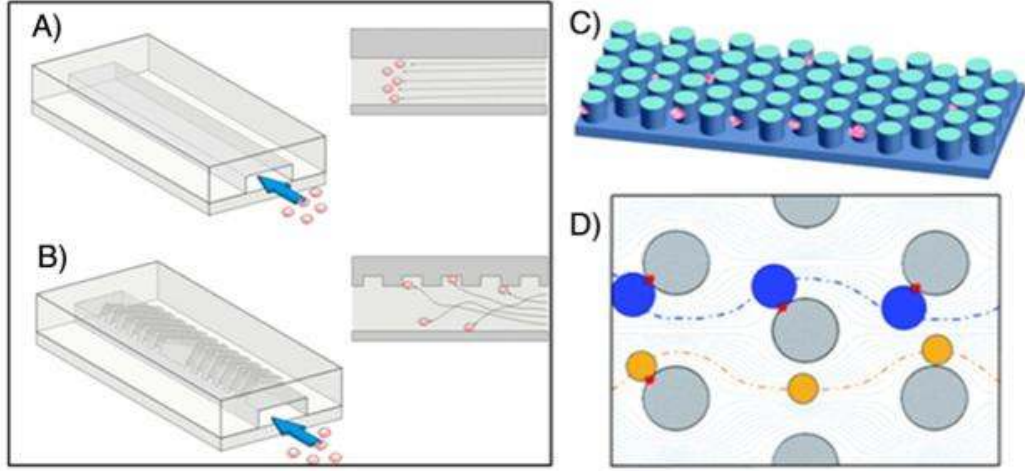
CellSearch sistemi ile karşılaştırıldığında, bu alet, hem yerel ve hem de metastatik karsinomları olan hastaların birçoğunda daha fazla CTC belirlemiştir (ortalama 4'e karşı 7.5 mL başına 24 CTC) (sırasıyla, 8'e karşı 26 hastadan 20'si) [119].

Çarpışma frekansı da mikro kanal içindeki 3D yapılarının (yani mikropostların) kullanımı ve etkin yüzey alanının genişletilmesiyle artırılabilir (Şekil 2.14 C). Bu yaklaşım ilk önce CTC-Çipte tanıtılmıştır. Bu, EpCAM'e karşı aktive edilmiş olan 78,000 tane mikropost dizisini içeren geniş bir silikona bağlı mikrokanaıldır [120]. Bu tasarımın kullanımı ile, karıştırılmış tam kan örneklerinden ~ %60 kanser hücresi geri kazanılmıştır. Mikropostların hizalanmasını daha fazla geliştirilerek, kan hücreleri ile mikropostlar arasında minimum çarpma başarılmış ve CTC-mikropost çarpışmalarının frekansı en yüksek hale getirilmiştir (Şekil 2.14 D'ye bakınız) [121].

Mikropost sağlanmış immuno elde etmenin diğer varyasyonları son zamanlarda geliştirilmiştir. Bunların arasında farklı malzemeler (örn, a PDMS-dayalı çip [122]), farklı mikropost büyüklüğü ve dağılımları [109], veya farklı ligandlar ve reseptörler (örn. antikorların yerine oligonucleotide aptamerleri kullanarak veya streptavidin-biotin ilgisinin kullanımı [109]) vardır.

Özellikle, CTC'lerin adezyona dayalı izolasyonu için streptavidin–biotin ilgisi, yeniden kazanım oranını potansiyel olarak artırılabilir.

Çünkü hedef hücreleri, biotinleştirilmiş antikorların bir kokteylinin kullanımı ile çoklu yüzey antijenlerine karşı etiketlendirilebilir.



Şekil 2.14 (A) Laminar akış düzeneği, (B) Pasif karıştırma mekanizması akış düzeneği, (C) Mikropostların dahil edilmesiyle etkin yakalama yüzeyinin artırılması, (D) Mikropostların değiştirilmiş geometrik ve konumsal konfigürasyonu [116;121]

Antikorların karışımının ve böyle bir yüzey türevlendirmesinin kullanımı, sadece geri kazanım oranını birkaç kat arttırmamış ayrıca CK negatif CTC'ler de verimli şekilde elde edilmesini sağlamıştır [123]. OnQChip™ (On-Q-ity, MA, ABD) ve CEE™ çip (Biocept Laboratories, CA, ABD), CTC'lerin adezyona dayalı izolasyonu için mikropost tasarımı uygulayan iki ticari mikro sıvı cihazıdır.

Çizelge 2.1 Kanser hastalarında test edilen seçili CTC belirleme teknolojileri [124]

Hücre yüzeyi antijenlerinin kullanımı ile pozitif seçim	CTC zenginleştirme ve belirlemenin temelleri	Deney örnekleri (Üretici)
İmmunomanyetik boncuklar	EpCAM'e dayalı immunomanyetik seçim; bir seri gen için (MUC1, HER2, EPCAM) CK+/CD45– hücreleri veya RT-PCR için immuno floresens	CellSearch® (Veridex, ABD),37 AdnaTest (AdnaGen, Almanya)46
Mikro sıvısal mikropost çipi	EpCAM'e dayalı veya PSMA'ya dayalı seçim; CK+/CD45–, PSA+/CD45–, veya PSMA+/CD45– hücreleri için immünofloresens, veya seçili genler için RT-PCR	µpCTC-Chip (MGH, ABD),51 GEDI (Cornell Üniversitesi, USA)54
Mikro sıvısal karıştırma çipi	EpCAM veya diğer tümöre özel markırlara dayalı olarak seçim; seçili tümör markırları için immünofloresens (örneğin CK, PSA, ve PMSA), veya seçili genler için RT-PCR	HBCTC-Chip (MGH, ABD)52
Mikro sıvısal durgun odaklanma çipi	EpCAM'e dayalı seçim; seçili tümör markırları için immüno floresens (CK, PSA, ve PSMA)	posCTC-iChip (MGH, ABD)36
Kalıplı silikon nanowire mikro sıvısal çip	EpCAM'e dayalı seçim; CK+/CD45– hücreleri için immünofloresens	NanoVelcro (UCLA, ABD)53
İmmünomanyetik süpürücü	EpCAM'e dayalı immünomanyetik seçim; CK+/CD45– hücreleri için immünofloresens, veya seçili genler için RT-PCR	MagSweeper (Stanford Üniversitesi, ABD)47
Karışmayan faz filtrasyonu	EpCAM'e dayalı immünomanyetik seçim; CK+/CD45– hücreleri için immünofloresens	VeriFAST (University of Wisconsin, ABD)50

Hücre yüzeyi antijenlerinin kullanımı ile negatif seçim		
Mikro sıvısal durgun odaklanma çipi	CD45+ hücrelerinin tüketimi; seçili tümör markırları için (CK, PSA, ve PSMA) immüno Floresens; seçili genler için RT-PCR	negCTC-i Çip (MGH, ABD)36
Mikro sıvısal negatif seçim	Toplu hematopoetik hücrenin ortadan kaldırılması, ardından CD45+ hücrelerinin tüketimi; CK+/CD45- hücreler için immunofloresens	Microfluidic Cell Concentrator55
Diğer biyolojik yaklaşımlar		
Canlı CTC'lerden bırakılan proteinlerin belirlenmesi	CD45+ hücre tüketiminden sonra kısa süreli hücre kültürü; MUC1, PSA, veya CK-19 için immüno Floresens	EPISPOT (CHU, France & UKE, Germany)56
CAM alınımları	Density-gradient santrifügasyonu, kısa süreli kültür; hücre yüzeyi markırları için immüno Floresens	CAM Vita-Assay™ (Vitatex, ABD)57
Tam kan nükleuslu hücrelerde RT-PCR	Gen panelleri (örneğin <i>KLK3</i> , <i>KLK2</i> , <i>HOXB13</i> , <i>GRHL2</i> , ve <i>FOXA1</i>) için RT-PCR	PAXgene Kan RNA tüpü ve RT-PCR69
Büyükliğe dayalı ayırım	Hücre büyüklüğüne dayalı filtrasyon; immunofloresens veya FISH	ISET® (RARECELLS, France),61 CTC Membran Mikro filtresi (University of Miami, ABD)63
Dielektrik alan akış fractionation (DFFF)	İzole edilmiş hücrelere elektrik alanının uygulanması; tümöre özel markırlar için immüno Floresens	ApoStream® (ApoCell, ABD)60

Diğer yaklaşımlar		
Fibre-optik array sken teknolojisi (FAST) sitometrisi	RBC lizisi ve density-gradient santrifügasyonu; CK, PSMA, veya diğer tümör hücresi markırları için immünofloresens	Epic HD-CTC Analizi (Epic Sciences, ABD) ⁷¹
Lazer-sken sitometrisi	RBC lizisi; EpCAM+/CD45– hücreleri için immünofloresens	Maintrac® (Simfo, Almanya) ⁷²
Hastanın damarına işlevselleştirilmiş nanodetektör verilmesi	EpCAM'e dayalı seçim; EpCAM veya CK için immünofloresens	CellCollector™ (GILUPI, Almanya) ⁷³

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Deneyin gerçekleştirilme aşamalarında kullanılan kimyasallar ; PBS (Phosphate buffered saline-100 tablet) (Sigma ALDRICK), DMSO(Dimethyl Sulfoxide 950 ml) (Thermo Scientific) , Paraformaldehit (16% Formaldehyde solutin(w/v)-Methanol free-10x10 ml ampül (Thermo Scientific), Ethanol (Sigma Aldrick), 3MPS (3-Mercaptopropyl)Trimethoxylane-95% (Sigma Aldrick), Alexa Flour 488 anti-human CD326,Ep-CAM(Biolegend), 4-6 Diamino-2-Phenylindole dihydrochloride hydra(Sigma ALDRICK), NeutrAvidin 10 mg(Thermo Scientific), Epithelial specific antigen monoclonal antibody 500 uL(Thermo Scientific), GMBS 50 MG(Thermo Scientific), RBS Lysing Buffer 100 mL (Sigma ALDRICK), NeutrAvidin Florescein Conjugated (Thermo Scientific) , Edta Molecular Biology Reagent Disodium 500 gr(Applichem), Albumin Bovine Serum(Merck).

3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları şu şekilde açıklanabilir: PMMA ve cam slaytların temizliği için Ultrasonik Banyo (Dandelin Sonaex, Almanya), yüzey kimyası için hazırlanan çözeltilerin karışım değerlerini ayarlamak için Hassas Terazî (Sartorius, Almanya), Ultra Saf Su Cihazı (Milipore, Fransa), cam slaytların yüzeyinde OH grupları oluşturmak için kullanılan Plazma Uygulama Cihazı (Diener Pica modeli, Almanya), kanallara sıvı pipetleme işlemi için Otomatik Pipetler (Eppendorf, Almanya), kanalların görüntülenmesi için Floresan ve Işık Mikroskobu (Olympus, IX70-S8F), PMMA ve DSA kesimi Lazer kesim cihazı (HS-Z1590) , hücre kümelenmelerini engellemek için Vortex (Labnet, Almanya) kullanılmıştır.

3.3 Yöntem

Tez çalışmasında antikora dayalı CTC belirleme yöntemi tercih edilmiştir. Tasarlanan mikrokanallarda antikor tabanlı yüzey kimyası uygulanmış ve kanallarda hücre yakalanma etkinliğine bakılmıştır. Cam slaytların, DSA ve PMMA ile birlikte, CTC teşhisinde kullanılabilecek bir mikroçip haline gelebilmesi için birtakım işlemlerden geçmeleri ve yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu işlemler yüzey temizliği, yüzey aktivasyonu ve yüzeyde fonksiyonel gruplar oluşturulması olarak sıralanabilir. Fonksiyonel grupların oluşturulmasını takiben tanıyıcı ligand yüzeye immobilize edilir. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesine ait izlenecek işlemler şu şekildedir:

3.3.1 Mikrokanal tasarımı ve üretimi

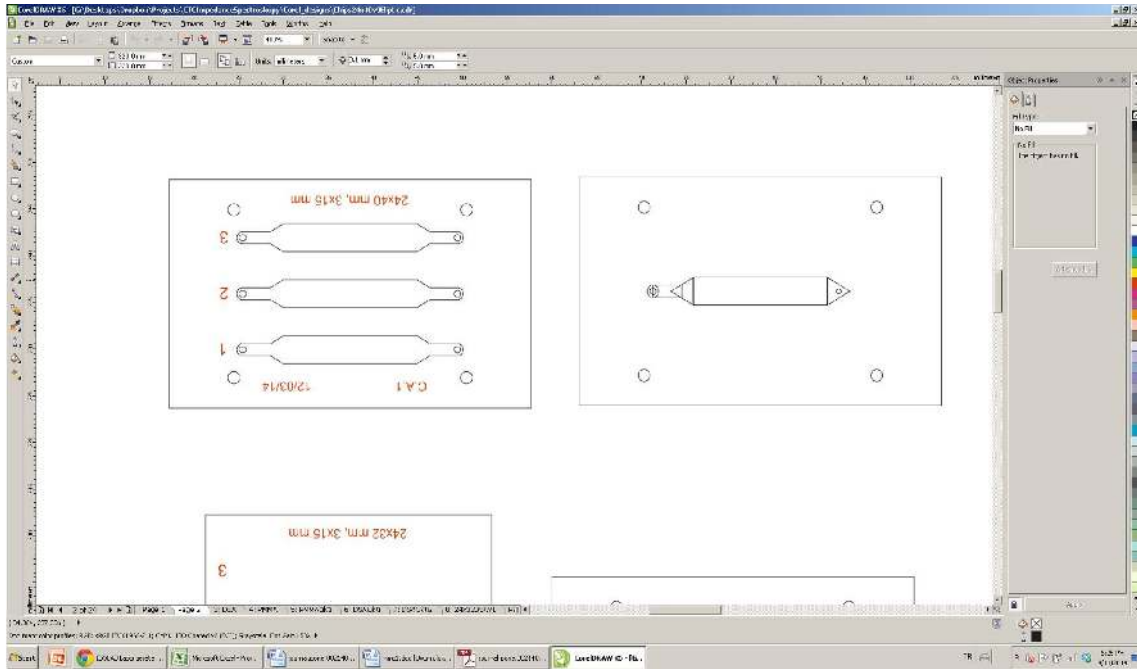
Mikrokanal teknolojisi çok çeşitli kimyasal işlemler ya da analiz için kullanılan bir teknolojidir. Analitik kimyanın yaşam bilimleri için ince tanımlanmış özellikleri, düşük hacimle son derece hassas ölçüm ve otomatik analiz gerektiren özelliklerdir. Mikrokanal teknolojisi ölçüde tarama ve çeşitli kimyasal reaktifler ve parametreleri doğrularken analiz süresinin ve maliyetinin daha düşük tutulabildiğini göstererek bu ihtiyacı karşıladığını kanıtlamıştır. Tipik olarak, mikroçiplerde mikro kanallar taş baskı işlemi kullanılarak imal edilmektedir.

Böyle mikroçiplerde mikrokanallar ve ana bileşenleri, reaksiyon bölmeleri ve düzenleyici bileşenlerin sırayla tepkime, ayırma ve saptama sürekli bir süreç sağlamak için tek bir çipte sıralı entegresiyle imal edilmektedir.

Geleneksel MEMS cihazlar geliştirmek için , silikon ve cam gibi inorganik malzemeler kullanılmaktadır, organik alt-tabaka malzemeleri çoğu zaman döküm ve kalıplama kullanılarak çeşitli şekillerde oluşturulabilir. Ancak projede mikrokanal tasarımında kullandığımız Poli Metil Meta Akrilat (PMMA) malzemenin yüksek şeffaflık ve parlaklık sahibi olan, yüksek kalite standartlarına sahip çekme akrilik levha olması, optik saydamlık göstermesi, mekanik deforme olmaması, non-toksitesitesi, termoforming ve vakum için uygunluğu, UV dayanıklılığı ve lazer CNC ve sıcak kesme gibi uygulamalarda sorunsuz kullanılabilirliği, çatlama yapmaması mikroakışkan cihazlar için oldukça uygun özellikte olduğunu göstermektedir.

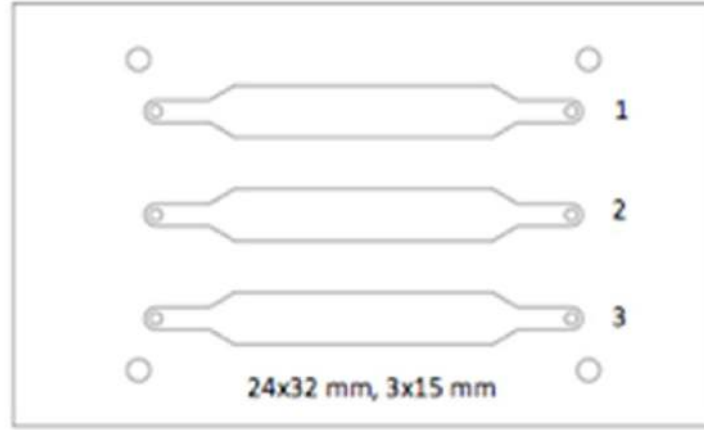
Mikroçip yapılırken hem katmanları birbirine yapıştırmak hemde mikrokanalları oluşturmak için çift taraflı bant özelliği gösteren DSA pürüzsüz veya şeffaf yüzeyleri yapıştırmak için optik olarak kullanılan şeffaf bir yapıştırıcıdır. Temiz oda kaplama süreci yaygın yapıştırıcı hatalarını ortadan kaldırır (örneğin, kabarcık, kir veya jel olmaz), %99+ ışık iletimi (yansıma kayıpları için düzeltildiğinde) sağlar, uzun süre dayanıklı uygulamalar için yüksek sıcaklık, nem ve UV ışığı dayanımı gösterir. Bu özellikleri ve ince oluşu mikrokanalların oluşturulması için en uygun özellikte olduğunu göstermektedir.

Lazer kesim cihazının verdiği hataların tespiti için öncelikle cihazın optimizasyonu yapılmıştır. Aşağıdaki şekilde bir tasarım gerçekleştirilmiş ve PMMA üzerinde denenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Çip tasarımı için Coreldraw programı kullanımı

Çipler üç kanallı olarak tasarlanmıştır. Kanal uzunlukları 15 mm; genişlikleri 3 mm olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2 Çip tasarımı

3.3.1.1 PMMA için Lazer kesici parametre optimizasyonu

PMMA ve DSA kesimleri için Üniversitemiz bünyesinde İş Etüdü laboratuvarında bulunan lazer kesim cihazı kullanılmıştır. İlk olarak PMMA üzerinde delik kesimleri denenmiştir. Delik kesimini standardize etmek için çeşitli kesim parametreleri kullanılmıştır.

Delik kesimlerinde karşılaşılan problemlerden bir tanesi düz açı ile kesilen deliklerin eliptik olarak gözlenmesiydi. Bu problemi gidermek için delik çizimlerinin açıldırılması denenmiştir (20-30-45 derecelik açılar). Kesilen PMMA ler incelendiğinde 45 lik açı verilmiş eliptik deliğin pipetleme işlemi için istenilen özelliklerde olduğu gözlenmiştir. Bu işlemlerden sonra deliklerin geometrik olarak optimizasyonu için çalışılmıştır. Sonuçlar görsel olarak değerlendirildiğinde 0.8mm; 0.5mm çapında 45 derecelik eliptik delik seçeneğine karar verilmiştir.

3.3.1.2 DSA için Lazer kesici parametre optimizasyonu

PMMA kesiminde belli bir standarda ulaşıldıktan sonra DSA kesimine geçilmiştir. DSA için yapılan çalışmalarda düşük hızlar seçildiğinde kanal çevresinde yanıklar olduğu görülmüştür. Yüksek hız değerlerinden başlayarak düşük hız değerlerine kadar birçok değer denenmiştir.

Karar verilen parametlerde PMMA ve DSA lar kesildikten sonra ip yapımı aşamasına geçilmiştir. Ancak ip yapımı öncesinde kesilen PMMA ların ve cam slaytların temizlenmesi gerekmektedir.

3.3.2 Temizlik

ip yapımına başlanmadan önce PMMA ve cam slaytların temizlenmesi gerekmektedir.

3.3.2.1 PMMA temizliğı

PMMA ların teker teker yerleştirilebileceğı cam bir kap olan şale içerisine 4 adet PMMA dizilmiş ve üzerine %70 Etil alkol özeltisi PMMA ların tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklenmiştir. 15 dakika süre ile 35 kHz frekansta en yüksek seviyede ultrasonik banyoda yıkanmıştır. Temizlenen PMMA lar içi saf su dolu ile doldurulmuş beherler içerisine daldırıp çıkarılarak durulanmıştır. Durulanan PMMA lar N₂ gazı ile kurutulmuştur ve petri kaplarına yerleştirilmiştir.

3.3.2.2 Cam slaytların temizliğı

Şale içerisine 4 adet cam slayt dizilmiş ve üzerine %70 Etil alkol çözelti cam slaytların tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklenmiştir. 15 dakika süre ile 35 kHz frekansta en yüksek seviyede ultrasonik banyoda yıkanmıştır. Temizlenen cam slaytlar içi saf su dolu ile doldurulmuş beherler içerisine daldırıp çıkarılarak durulanmıştır. Durulanmış cam slaytlar N₂ gazı ile kurutulmuştur ve petri kaplarına yerleştirilmiştir.

PMMA ve cam slaytların temizlenmesinin ardından ip yapımına geçilmiştir. DSA nın tek yüzündeki koruyucu çıkarılmıştır (Şekil 3.3). PMMA in yazıları tavana bakacak şekilde DSA nın koruyucusunun çıkarıldığı tarafa yapıştırılır.

Oluşabilecek hava kabarcıkları el yardımıyla engellenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.3 DSA koruyucusunun çıkartılması

3.3.3 Cam slaytta yüzey kimyası

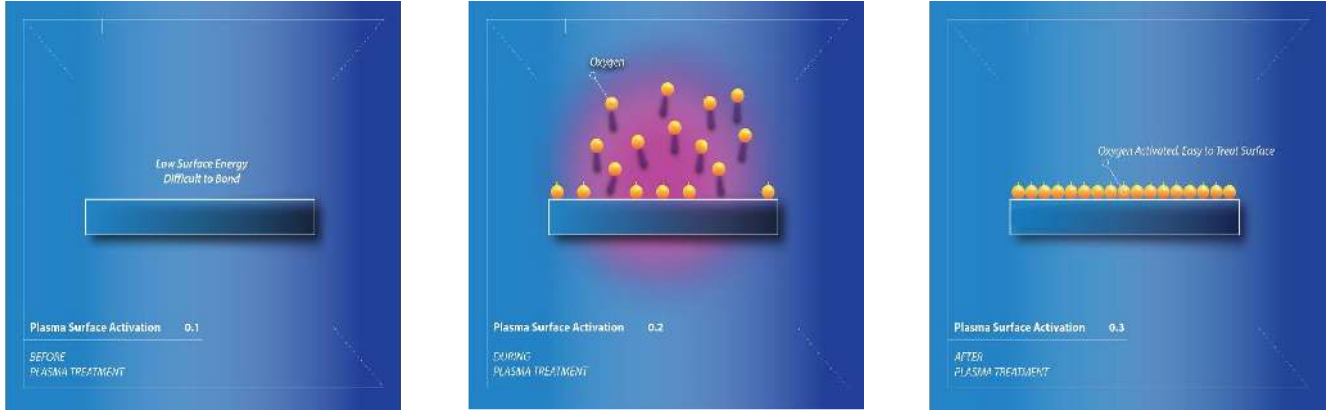
Mikro kanalların hücre yakalama amacı ile kullanılabilmesi için kanalın son bölümünü oluşturan cam slaytların birtakım işlemlerden geçirilmeleri ve yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu işlemler; yüzey temizliği, yüzey aktivasyonu ve yüzeyde fonksiyonel gruplar oluşturulması olarak sıralanabilir. Fonksiyonel gruplarının oluşturulmasını takiben tanıyıcı ligand yüzeye immobilize edilir. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesine ait yöntem şu şekildedir; hidroksil gruplarının oluşturulması (plazma aktivasyonu ile), 3MPS İmmobilizasyonu olarak alt bölümlere ayrılabilir.

3.3.3.1 Hidroksil grupların oluşturulması

Yüzey modifikasyon çalışmalarının ilk aşamasında cam slayt üzerinde fonksiyonel OH gruplarının oluşturulması amacıyla cam slaytlar oksijen plazma muamelesine tutulmuştur.

Plazmadan gelen aktif oksijen türleri ve UV radyasyonu yüzeyde bulunan silikon bağlarını ayırır. Bunlar vakum sistemi ile pompalanarak atılır. Plazmadan gelen aktif

oksijen türleri metaryelin aktif yüzey alanlarına bağlanarak oldukça aktif bir yüzey oluştururlar (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Plazma yüzey aktivasyonu işlem basamakları [130]

Bu işlem DeltamedArge firmasında bulunan, Diener elektronik e ait Pica modeli, düşük basınç yüksek frekans plazma sistemi (Şekil 3.5) ile yapılmıştır.

İşlem şu şekilde gerçekleştirilmektedir:

Öncelikle O_2 gazı tüpünün vanası açılır. Cam tutacaklar üzerine cam slaytlar yerleştirilir ve plazma odasına konulur (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Önce cihazın kapağı kapatılır ve valf sıkıştırılır ve pompa açılır.

Reaktör içi basıncın 0.18 mbar a kadar düşmesi beklenir. Bu içerdeki havanın boşalması anlamına gelir. Basıncı düşürmek için ortama sıvı azot gazı eklenir (Şekil 3.8). Daha sonra O_2 , cihaz içi basınç 0,2-0,3 mbar olacak şekilde sisteme beslenir.

Oksijen plazma parametreleri olan güç ve frekans sırasıyla 30 watt ve 13,56 Mhz olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.5 Düşük basınç, yüksek frekans plazma sistemi



Şekil 3.6 Cam slaytların cam tutucaklar üzerine yerleştirilir.



Şekil 3.7 Cam tutucaklar üzerine yerleştirilen slaytlar plazma odasına yerleştirilir.



Şekil 3.8 Plazma oda basıncının düşmesi için ortama sıvı azot gazı eklenmesi

Yaklaşık 15 saniye sonra, plazma açılır ve beyaz ışık görene kadar beklenir (Şekil 3.9). Beyaz ışığı gördükten sonra cam slaytları 1.5 dakikalığına inkübe edilir. Daha sonra pompa ve plazma kapatılır. Kapak açılır ve camlar alınır (muamele edilen yüzeyi unutulmamalıdır). Muamele edilen yüzey tavana bakacak şekilde cam slaytlar petri kabının bölmelerine yerleştirilir. Plazma muamelesinden sonra, derhal yüzey kimyasına başlanmalıdır.



Şekil 3.9 Plazma başlama anı

3.3.3.2 3MPS immobilizasyonu

Cam slaytların yüzeyinde oluşturulan fonksiyonel OH gruplarına, 3MPS immobilizasyonu ile yüzeyde yeni fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Deney öncesinde hazırlanan ve etil alkol ile seyreltilen 8mL lik 3MPS çözeltisi, 4 bölmeli petri kabının her bir bölmesine 2 mL oranında cam slaytların işlenen yüzeylerine eklenmiştir. Hava almayan aynı zamanda karanlık bir ortama sahip olmak için petri kap şeffaf film ve alimünyum folyo ile kaplanmıştır. Bir saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletilen cam slaytlar 1 mL saf EtOH ile yıkanmıştır. 2-3 dakika cam slaytların kuruması için beklenir.

3.3.4 Çip yapımı

DSA filminin ikinci tarafı soyulur ve cam slaytın plazma muamelesi görmüş yüzü DSA'nın yapışkan yüzeyine gelecek şekilde birleştirilir. Oluşabilecek hava kabarcıkları ortadan kaldırılır.

3.3.5 Kanallarda yüzey kimyası

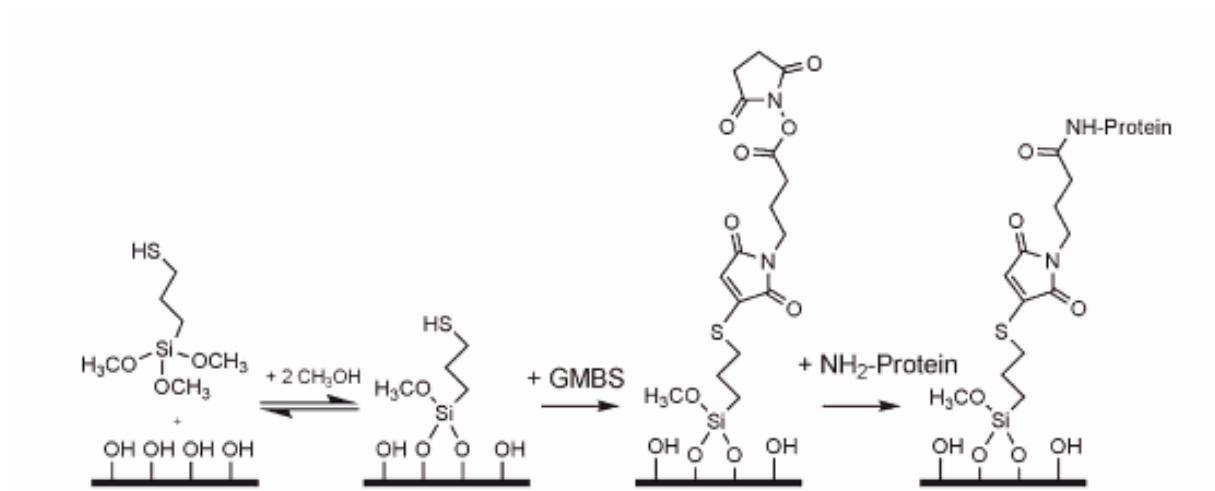
Bu işlemlerin gerçekleştirilmesine ait yöntem şu şekildedir: NeutrAvidin immobilizasyonu, antikor immobilizasyonu, bovine serum albumin ile bloklama, p-zaraformaldehit ile sabitleme ve son olarak boyama olarak belirlenmiştir.

3.3.5.1 GMBS immobilizasyonu

Çip yapımı tamamlandıktan sonra kanallar PBS ile yıkanır, böylece kanalların çalıştığından emin olunur. Herbir kanala 20uL GMBS çözeltisi doldurulur. Bu işlem karanlıkta yapılmalıdır. Petri kutularına yerleştirilen çipler 45 dakika inkübe edilir.

3.3.5.2 NeutrAvidin immobilizasyonu

GMBS ile işlenen kanallar PBS ile yıkanır. 20 uL NeutrAvidin çözeltisi oda sıcaklığında kanallara yavaşça doldurulur. Aşağıda tanımlanan (Şekil 3.9) yüzey işlevselleştirilme protokolü NeutrAvidin'in mikro akışkan kanal yüzeylerine kovalent bir şekilde bağlanmasıdır. Proteinin yüzeye kovalent olarak bağlanması cihazın yüzeyine biyotinlenmiş antibodinin bağlanması için çok kararlı bir yöntem oluşturur. Petri kutularına yerleştirilen çipler +4°C'de 1 gece sabaha kadar bekletilir.



Şekil 3.10 Yüzey kimyası basamakları (3MPS-GMBS-NeutrAvidin)

3.3.5.3 Antikor immobilizasyonu

NeutrAvidin ile işlenen ve bir gece bekletilen kanallar yıkanır. Bu işlem basamağının amacı CTC lerin kanallarda yakalanmasıdır. Anti-HT29 antikor çözeltisi yavaşça kanallara doldurulur. Petri kutularına çipler yerleştirilir ve alüminyum folyo ile kapatılır. +4°C'de 45 dakikalığına inkübe edilir. Yine yavaşça kanallara 10uL Anti-HT29 antikor çözeltisi doldurulur. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda kanallar yıkanır.

3.3.5.4 Bovine Serum Albumin bloklaması

Yakalama antikorunun tutunmadığı yerleri bloklamak için kanallara BSA doldurulur. 20 µL %1w/v luk BSA kanallara yavaşça doldurulur. Oda sıcaklığında 30 dakikalığına inkübe edilir. Kanallar yıkanır. Kanallarda buharlaşma olmamasını garanti etmek için çipler PBS'e kısmen batırılır.

3.3.5.5 Mikrokanallara hücre verilmesi

Bu aşamada Başkent Üniversitesi Gen Bilimleri Enstitüsü'nden 1milyon/mL konsantrasyonda alınan HT-29 hücreleri kanallara doldurulacaktır. 20 uL HT-29 hücresi kanallara doldurulur. Çipler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. Kanallar yıkanır.

3.3.5.6 Paraformaldehit ile sabitleme

Hücre sabitleme için, kanallara yavaşça 20 µL %2 lik Paraformaldehit çözeltisi pipet ile konulur. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra kanallar yıkanır.

3.3.5.7 Boyama

Yakalanan hücrelerin görüntülenebilmesi için kanallara boyama antikorı doldurulur. 10 µL hücre boyama çözeltisi kanallara doldurulur. Bu işlem karanlıkta yapılmalıdır. En az 90 dakika +4°C'de inkübe edilir (1 gece bekleme daha iyi boyama sonucu sağlar). Çipler görüntülemeye gitmeden önce yıkanır.

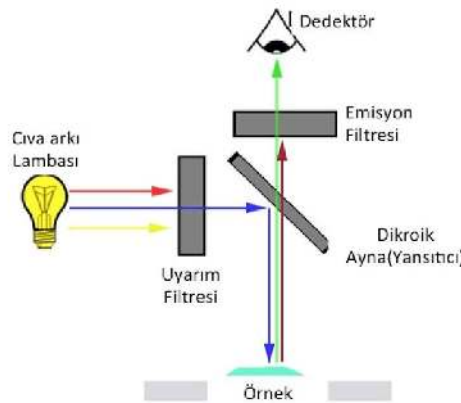
3.3.6 Floresan ve Işık Mikroskobu ile görüntüleme ve hücre sayımı

Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi bünyesinde istenilen özelliklere ve filtrelere sahip bir mikroskop bulunmadığından Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında bulunan floresan mikroskobu kullanılmıştır.

Cihaz amaca uygun olarak Floresan mikroskobu veya normal ışık mikroskobu olarak kullanılır.

Işık mikroskobunun sahip olduğu özelliklere ek olarak normal ışık mikroskobu teknikleri ile görüntülenemeyen objelerin, floresan özelliği olan boya maddeleri kullanılarak (DAPI, FITC, Rhodamine, Texas red v.b.) incelenmesine olanak sağlar.

Floresan boyamanın yapıldığı preparat üzerine uygun dalga boyunda ışık gönderilerek floresan maddenin uyarılması ve yansıyan ışığın analiz edilmesi prensibi ile çalışır. (Şekil 3.10)



Şekil 3.11 Floresan mikroskobu çalışma prensibi

Filtreler aracılığı ile çalışılacak uygun filtre seçilir. (Alexa488 ,FITC için mavi; CY3,TRITC için yeşil, DAPI için UV) Deneyler için 2 dalga boyu önemlidir.

WU filtresi :(açık mavi)ile DAPI boyamalar gözükcektir.

WB filtresi :(koyu mavi) ile AlexaFlour488 boyamalar gözükcektir.

Hücre sayma işlemi için örnekleme metodu kullanılmıştır. Toplamda bir kanal 100x büyütmede 15 sütun, 5 satırdan oluşmaktadır. Bu yüzden bütün kanalı temsil eden 3 sütun seçilmiştir. Bu 3 sütun genel olarak hücrelerin homojen dağıldığı: kanal girişi, kanalın orta bölümü ve kanal çıkışı olarak seçilmiştir. Bu 3 sütundan çekilen görüntülerden hücreler sayılmış ve tüm kanalda olabilecek hücre sayısı hesaplanmıştır. İncelemelerde sayma işlemleri için görüntüler 100x büyütmeye getirilerek alınmıştır. Özel çekim görüntüler ise 200x büyütmede çekilmiştir.

Hesaplama şu şekilde yapılmaktadır:

Kanaldaki olası hücre sayısı=

$$\frac{3 \text{ sütunun çekilen görüntülerinden sayılan hücre sayısı} \times 15}{3}$$

Bu işlem bir kanalda bulunması gereken hücre sayısını vermektedir.

Yapılan deneylerin tümünde hücrelerin kanallarda yakalanma etkinliğine bakılmıştır. Etkinlik değeri hesaplaması ise şu şekilde yapılmaktadır:

Örneğin ilk deney için kanala 1 milyon/mL hücre basılmıştır. Ancak kanala basılan sıvı miktarı 20 ul dir. Bu yüzden 1milyon/mL hücrenin bulunduğu besiyerli tüpten çekilen 20 ul için de yaklaşık 20 bin hücrenin bulunması beklenmektedir.

Bir kanal hacmi:

Kanal uzunluğu 15 mm, kanal genişliği 3 mm ve DSA kalınlığı 50 um dir. Ancak lazer kesim cihazının hassas olmayışından dolayı kanal uzunluğu 15,3 mm genişliği ise 3,3 mm olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla hacim:

$$15,3 \text{ mm} \times 3,3 \text{ mm} \times 0,05 \text{ um}$$

olarak hesaplanmıştır.

Kanalların hacmi 2,52 uL olduğundan

20 uL de	20 bin/mL hücre
2,52 uL de	2520 hücre

bulunması gerekmektedir.

Yakalanma etkinliği ise şu şekilde hesaplanmıştır:

Eğer %100 etkinlik olmuş olsaydı 2520 hücre olacaktı. Doğru orantıdan % olarak etkinlik hesaplanmıştır.

4. DENEY AşAMASI

4.1 Yüzey Kimyası Optimizasyonu

Yüzey kimyasında kullanılan malzemelerin uygulanma miktarı, süreleri ve koşullarının optimize edilmesi gerekir. Bu nedenle optimizasyon deneyleri planlanmıştır. Öncelikle plazma aktivasyonu optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.1.1 Plazma aktivasyonu deneyi

Deneylere ilk olarak, yüzey kimyasının ilk adımı olan, cam slaytlar üzerinde oluşturulacak plazma aktivasyonunun (hidroksil grupları oluşturması) uygulanma süresi ile başlanmıştır. Bu yöntemle uygulanan plazma sürelerine karşılık kanallardaki hücre yakalama oranlarına bakılmış, optimum plazma süresinin kaç dakika olduğuna karar verilmiştir.

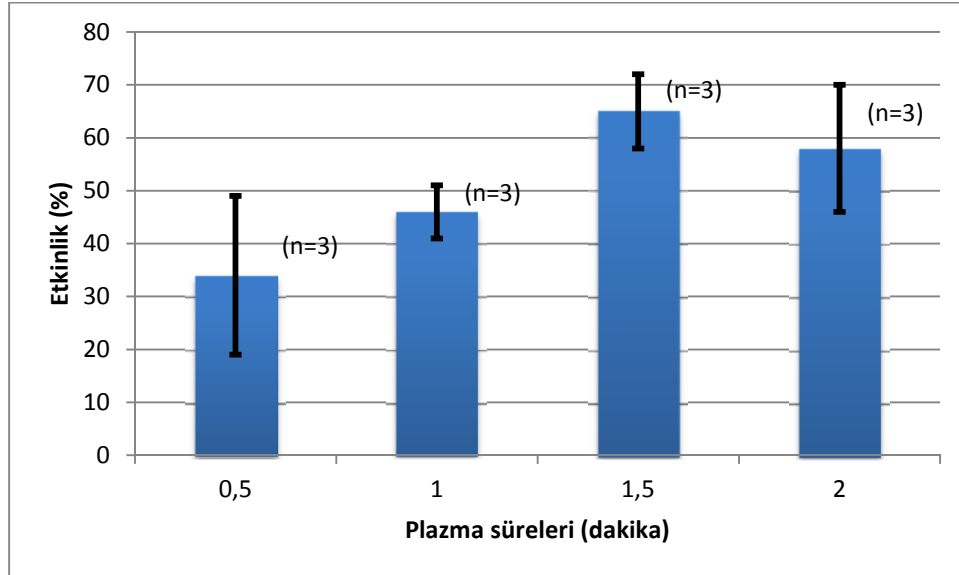
0.5, 1, 1.5, 2 dakika olmak üzere 4 farklı işlem süresi için cam slaytlar plazmaya maruz bırakılmıştır. Toplamda 4 ip (12 kanal) üzerinde çalışılmıştır. Kanallara 100 bin/mL konsantrasyona sahip HT-29 hücreleri doldurulmuştur. 100 bin/mL hücre konsantrasyonun basıldığı kanallarda, kanal hacmine göre uL de 252 hücre bulunmalıdır.

Yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgededir (izelge 4.1).

Kanallardaki hücreler daha önceden bahsedildiği gibi florasan mikroskobu yardımıyla çekilen görüntülerden sayılmıştır. Her bir plazma süresi için kanallarda yakalanan hücre sayılarının etkinlik değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1 Uygulanan plazma sürelerine karşılık kanallarda yakalanan hücre sayıları(100 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonu)

Plazma Süresi	Kanal No	Yakalanan Hücre Sayısı	Etkinlik(%)
0,5 dk.	Kanal 1	50	20
	Kanal 2	125	50
	Kanal 3	80	32
	Ortalama		34
	Standart Sapma		15
1 dk.	Kanal 1	110	44
	Kanal 2	130	52
	Kanal 3	110	44
	Ortalama		46
	Standart Sapma		5
1,5 dk.	Kanal 1	180	71
	Kanal 2	145	58
	Kanal 3	165	65
	Ortalama		65
	Standart Sapma		7
2 dk.	Kanal 1	120	48
	Kanal 2	140	56
	Kanal 3	180	71
	Ortalama		58
	Standart Sapma		12



Şekil 4.1 Plazma aktivasyon sürelerine karşılık hücrelerin yakalanma etkinliği (n=çalışılan kanal sayısı)

4.1.2 Hücre yakalama ve sayım deneyleri

4.1.2.1 PBS içinde farklı hücre konsantrasyonlarında yapılan çalışmalar

Plazma süresi belirlendikten sonra kanallarda farklı hücre konsantrasyonlarının yakalanma etkinliğine bakılmıştır. Deneyde toplamda 10 çip (28 kanal) üzerinde çalışılmıştır. Ancak kanallardan iki tanesi çalışmamıştır. (Glass slayt, DSA ya yapıştırılma esnasında kırılmıştır.)

Bu 10 çipin bir tanesi kontrol çipi olarak seçilmiş ve yüzey kimyası protokolunun aşamalarından biri olan antikör immobilizasyonu adımı uygulanmamıştır. Bu kanallarda hiç hücre görülmemesi beklenmektedir. Bütün kanal taraması sonucu hiç hücre gözlenmediği doğrulanmıştır. Çalışılan 25 kanaldan 9 tanesine 1milyon/mL konsantrasyona sahip HT-29 hücresi doldurulmuştur. Diğer konsantrasyon değerleri ise (500 bin/mL HT-29 hücresi, 250 bin/mL HT-29 hücresi, 100 bin/mL HT-29 hücresi, 50 bin/mL HT-29 hücresi) 4 er kanalda olacak şekilde pipetlenmiştir. Kanalda bulunması gereken hücre sayıları ilk deneydeki hesaplamalardan yararlanılarak bulunmuştur.

mL de 1 milyon hücrenin doldurulduğu kanalda, kanal hacmimize göre yaklaşık olarak 2520 hücre,

mL de 500 bin hücrenin doldurulduğu kanalda, kanal hacmimize göre yaklaşık olarak 1260 hücre,

mL de 250 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 630 hücre,

mL de 100 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 252 hücre,

mL de 50 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 126 hücre bulunması gerektiği hesaplanmıştır.

Yapılan özel çekimler aşağıda verilmiştir. Genel olarak kanallardaki yakalanma oranlarına bakıldığında

1milyon hücre için etkinliğin $\%88\pm6$ arasında olduğu

500 bin hücre için $\%73\pm3$ olduğu

250 bin hücre için $\%73\pm9$

100 bin hücre için %62±4

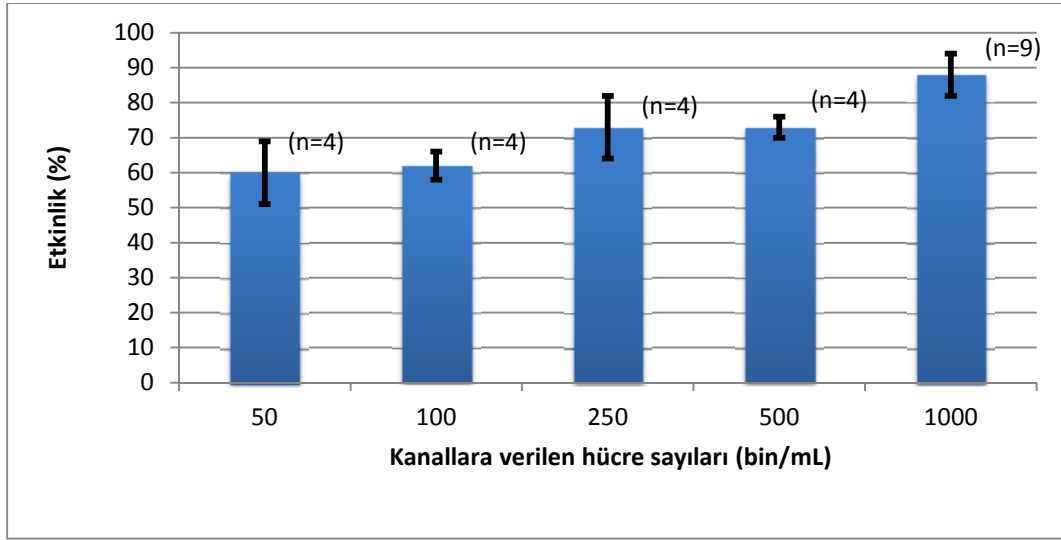
50 bin hücre için %60±9 olduğu gözlenmiştir.

Aşağıdaki çizelgede sonuçlar verilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: PBS ile seyreltilmiş farklı hücre konsantrasyonlarının kanallarda yakalanma etkinliği

Hücre Sayısı	Kanal No	Yakalanan hücre sayısı	Etkinlik(%)
1milyon/mL hücre	Kanal 1	2285	91
	Kanal 2	2280	90
	Kanal 3	2170	86
	Kanal 4	2355	93
	Kanal 5	1980	79
	Kanal 6	2098	83
	Kanal 7	2480	98
	Kanal 8	2185	87
	Kanal 9	2160	86
	Ortalama		88
	Standart sapma		6
500 bin/mL hücre	Kanal 1	890	71
	Kanal 2	914	73
	Kanal 3	980	78
	Kanal 4	905	72
	Ortalama		73
	Standart sapma		3
250 bin/mL hücre	Kanal 1	425	67
	Kanal 2	480	76
	Kanal 3	400	63
	Kanal 4	525	83
	Ortalama		73
	Standart sapma		9
100 bin/mL hücre	Kanal 1	145	58
	Kanal 2	150	60
	Kanal 3	165	65
	Kanal 4	160	63
	Ortalama		62
	Standart sapma		4
50 bin/mL hücre	Kanal 1	90	71
	Kanal 2	75	60
	Kanal 3	70	56
	Kanal 4	65	52
	Ortalama		60
	Standart sapma		9

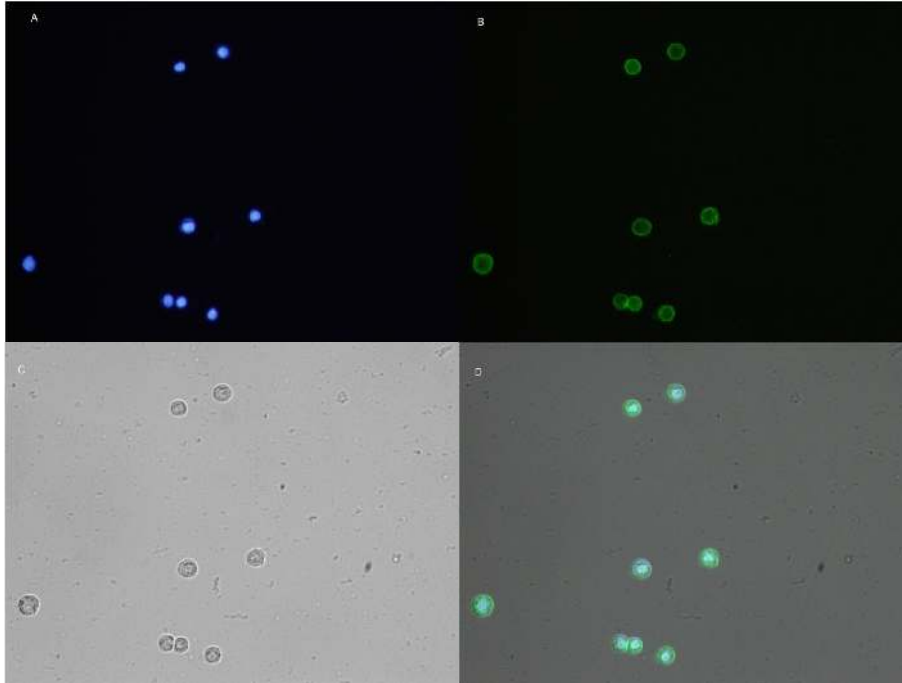
Sonuçlara ait grafik (Şekil 4.2) verilmiştir.



Şekil 4.2 PBS ile seyreltilmiş hücre konsantrasyonlarına karşılık hücrelerin kanallarda yakalanma etkinliği

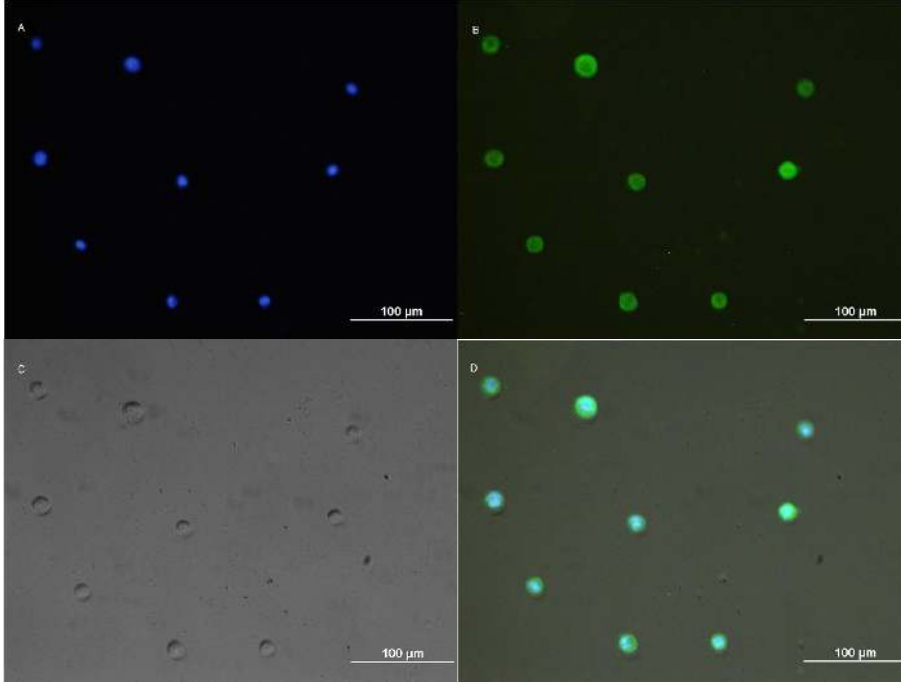
Hücre görüntüleri

1 milyon /mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip karışımın doldurulduğu kanaldan çekilen görüntüler Şekil 4.3 te gösterilmiştir.



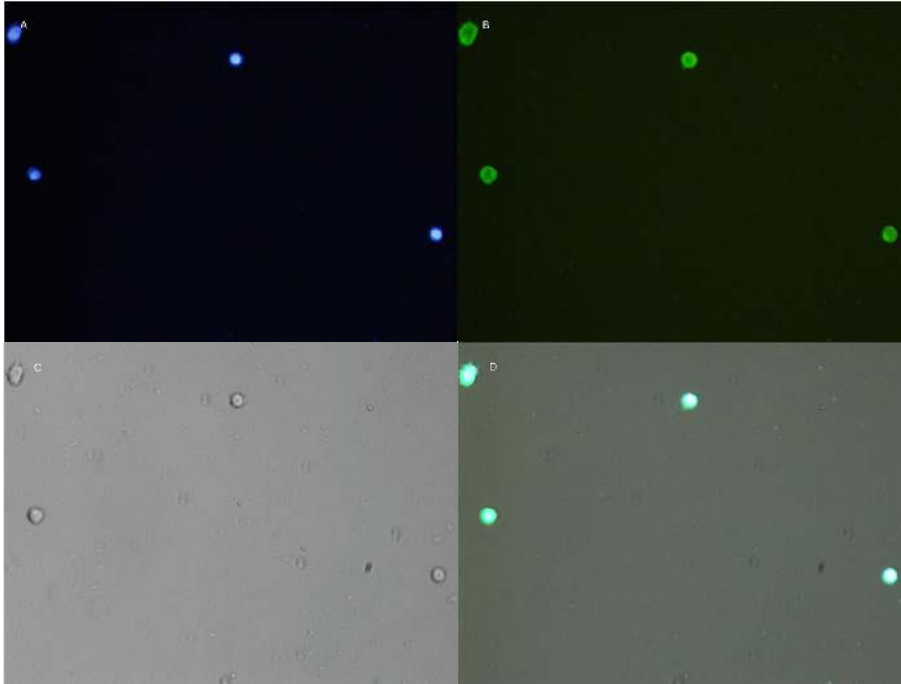
Şekil 4.3 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü.

500 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip karışımın doldurulduğu kanaldan çekilen görüntüler Şekil 4.4 te gösterilmiştir.



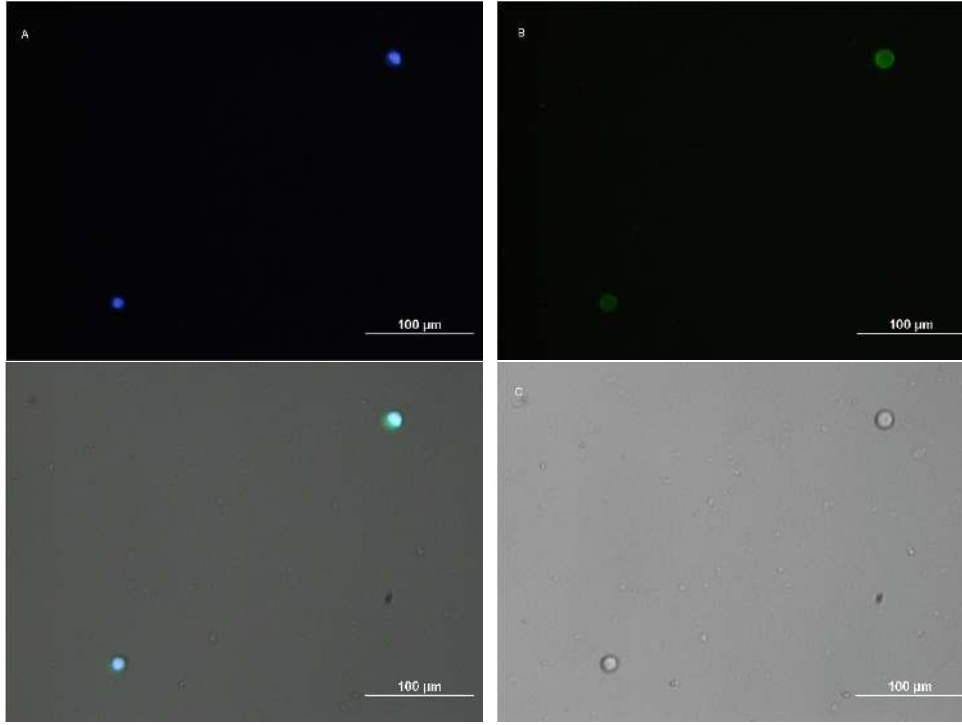
Şekil 4.4 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü.

100 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip karışımın doldurulduğu kanaldan çekilen görüntüler Şekil 4.5 te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 fiiltresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü

50 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip karışımın doldurulduğu kanaldan çekilen görüntüler Şekil 4. 6 da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü (D) Çakıştırılmış görüntü.

4.1.2.2 Kan içinde farklı hücre konsantrasyonlarında yapılan çalışmalar

Bu deneyde toplamda 9 çip (27 kanal) üzerinde çalışılmıştır. Çiplerden 8 tanesinde farklı konsantrasyonlarda HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip kan ile karışımlar denenirken, geriye kalan 1 tanesi ise kontrol çipi olarak kullanılmıştır.

Kontrol çipinde yüzey kimyası protokolünün 5. aşaması olan kanallara yakalama antikorunun basımı gerçekleştirilmemiştir. Kontrol çipinin kullanılma amacı yüzey kimyasının etkinliğini ortaya koymaktır. Kanallara antikor uygulama basamağı atlanmış ve kanallara 250 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip kan ile karıştırılmış hücreler doldurulmuştur. Görüntüleme esnasında kontrol çipinin kanallarında hücreye rastlanmamıştır.

Her bir konsantrasyon değeri 4 kanala uygulanmak koşulu ile toplamda 5 konsantrasyon değeri denenmiştir (250 bin/mL HT-29 hücresi, 100 bin/mL HT-29 hücresi, 50 bin/mL HT-29 hücresi, 20 bin/mL HT-29 hücresi, 10 bin/mL HT-29 hücresi, 5 bin/mL HT-29 hücresi)

Kanalda bulunması gereken hücre sayıları ilk deneydeki hesaplamalardan yararlanılarak bulunmuştur.

mL de 250 bin hücrenin doldurulduğu kanalda kanal hacmimize göre yaklaşık olarak 630 hücre,

mL de 100 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 252 hücre,

mL de 50 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 126 hücre,

mL de 20 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 50 hücre,

mL de 10 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 25 hücre,

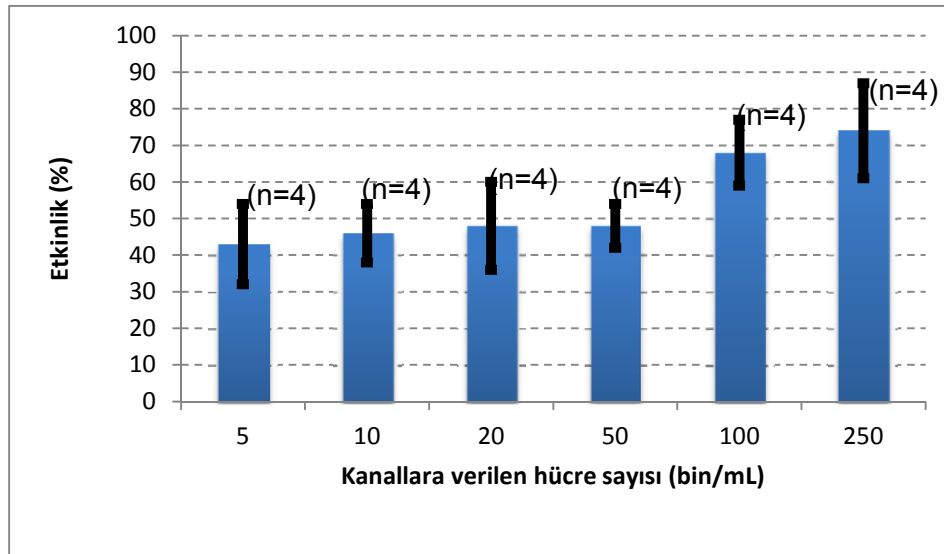
mL de 5 bin hücrenin doldurulduğu kanalda yaklaşık olarak 12 hücre bulunması gerektiği hesaplanmıştır.

Deney sonucu her bir konsantrasyon değeri için kanallarda görülen hücre sayıları, etkinlik değeri, etkinlik değerleri ortalaması ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Hücre sayımlarında yüksek konsantrasyonlar (250 bin/mL ve 100 bin/mL) için ilk iki deneyde kullanılan örnekleme yöntemi kullanılmıştır. Aynı şekilde 3 sütunun görüntüleri çekilmiş ve daha sonra görüntülerden hücreleri sayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha düşük konsantrasyon değerlerinde ise bütün kanal taranmış ve göz ile sayım gerçekleştirilmiştir. Bir önceki deneyden farklı olarak burada hücrelerin hem DAPI hem de AF-488 filtreleri ile görüntüleri çekilmiştir. Görüntüler birbirleri ile eşleşmektedir. Diğer kan hücrelerinin kanallarda görüntülenmemesi kanal yıkamasının iyi yapıldığının bir göstergesidir.

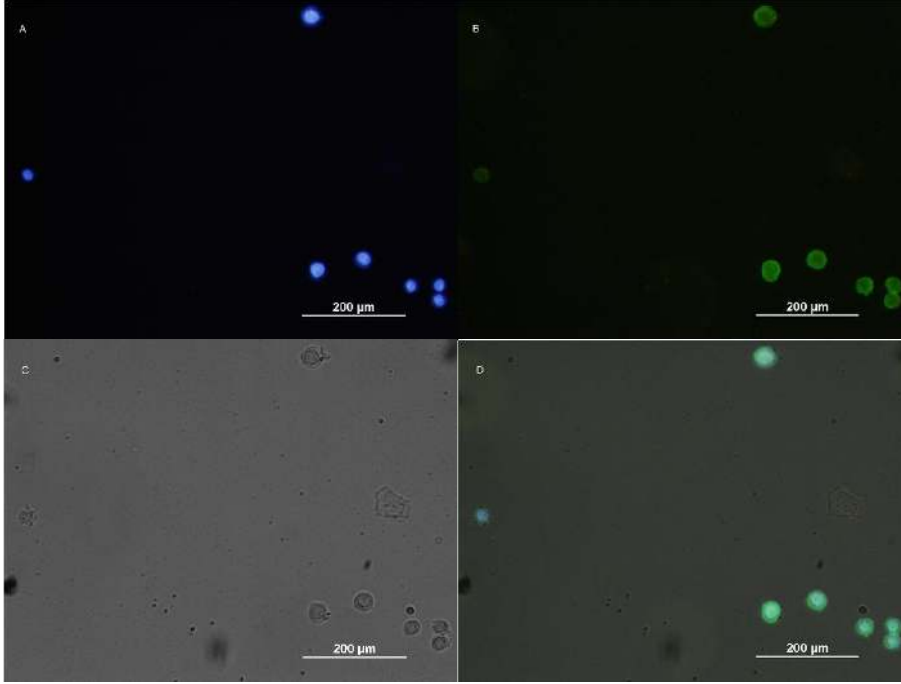
Çizelge 4.3 Kanallarda görüntülenen hücre sayıları, etkinlik değerleri

Hücre Sayısı	Kanal No	Yakalanan Hücre sayısı	Etkinlik(%)
250 bin/mL hücre	Kanal 1	560	89
	Kanal 2	360	57
	Kanal 3	495	79
	Kanal 4	445	71
	Ortalama		74
	Standart sapma		13
100 bin/mL hücre	Kanal 1	196	78
	Kanal 2	146	58
	Kanal 3	188	75
	Kanal 4	158	63
	Ortalama		68
	Standart sapma		9
50 bin/mL hücre	Kanal 1	65	52
	Kanal 2	55	44
	Kanal 3	52	41
	Kanal 4	68	54
	Ortalama		48
	Standart sapma		6
20 bin/mL hücre	Kanal 1	20	40
	Kanal 2	25	50
	Kanal 3	18	36
	Kanal 4	32	64
	Ortalama		48
	Standart sapma		12
10 bin/mL hücre	Kanal 1	11	44
	Kanal 2	9	36
	Kanal 3	14	56
	Kanal 4	12	48
	Ortalama		46
	Standart sapma		8
5 bin/mL hücre	Kanal 1	5	42
	Kanal 2	7	58
	Kanal 3	4	33
	Kanal 4	5	42
	Ortalama		44
	Standart sapma		10



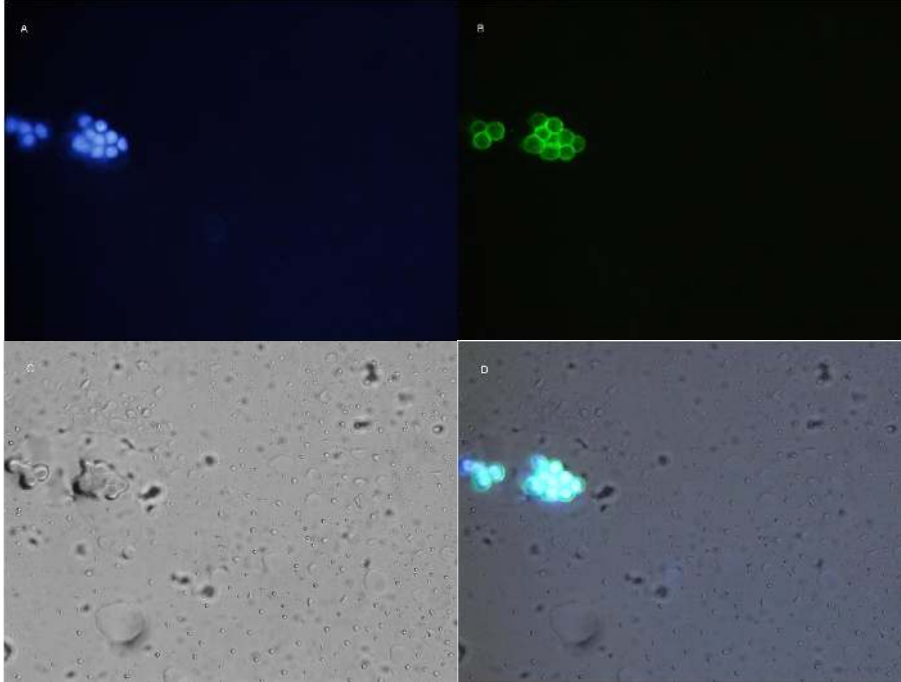
Şekil 4.7 Kan içerisinde farklı konsantrasyonlarda bulunan hücrelerin kanallarda yakalanma etkinliği

250 bin /mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip kan ile karıştırılmış hücrelerin doldurulduğu kanaldan çekilmiş görüntüler Şekil 4.8 de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü (D) Çakıştırılmış görüntü.

100 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip kan ile karıştırılmış hücrelerin doldurulduğu kanaldan çekilmiş görüntüler Şekil 4.9 da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 200x büyütmede (A) DAPI filtresi ile çekilmiş görüntü, (B) AF-488 filtresi ile çekilmiş görüntü, (C) Işık mikroskobu görüntüsü, (D) Çakıştırılmış görüntü

5. SONUÇ VE YORUM

Tez çalışması 3 farklı deney aşamasından oluşmaktadır. Birinci deney olan plazma aktivasyonu deneyinde 4 farklı plazma süresi denenmiş ve 1.5 dakika boyunca uygulanan oksijen plazma süresinin hücre yakalama etkinliği açısından en yüksek değeri gösterdiği belirlenmiştir (66 ± 8). Bu yüzden bundan sonra yapılan deneylerde plazma süresi 1.5 dakika olarak kabul edilmiştir.

İkinci deney olan PBS ile seyreltme deneyinde yakalama etkinliğinin, HT-29 hücre konsantrasyonunun yüksek olduğu değerlerde daha yüksek olduğu, konsantrasyon değeri düştükçe etkinliğin de düştüğü gözlenmektedir. Ancak genel olarak konsantrasyonlar kendi içinde değerlendirildiğinde kanallardaki etkinlik değerleri arasında uyumluluk gözlenmiştir. Tüm konsantrasyonlar göz önüne alındığında etkinliğin %60-%85 arasında olduğu gözlenmiştir.

Kan ile seyreltme deneylerinde de konsantrasyonla birlikte etkinliğinde düştüğü gözlenmiştir. Ancak 5 bin/mL HT-29 hücre konsantrasyonuna sahip değerlerde kanallarda hücreye rastlanması bu ender hücrelerin düşük konsantrasyon değerlerinde de yakalanabildiğini göstermiştir. Daha düşük konsantrasyon değerleride ileride denenecektir.

Kan ile seyreltme deneylerinde kanalları 40 uL ile 3 defa yıkanmanın kanalda tutunması beklenen diğer kan hücrelerinin (örneğin eritrositlerin) tutunmadığı, bu yıkama değerinin optimum değer olduğunu göstermiştir.

Her üç deneyde de hücrelerin kanallarda yakalanma etkinliğinin ortalamasına ve standart sapmasına bakılmıştır.

Tasarımın 3 kanallı olması çoklu seyreltme serilerinin analizi için yüksek tekrarlanabilirlik sağlamıştır.

Her iki seyreltme deneyinde de konsantrasyon değerlerinin hazırlandığı eppendorf tüplerin kanallara doldurulmadan önce vortexte karıştırılmasının hücre kümelenmelerini engellediği görülmüştür.

Kontrol çiplerinde hücreye rastlanmaması kullanılan yüzey kimyasının doğru çalıştığının bir göstergesidir.

Sonuç olarak CTC sayımı anti metastaz terapilerin verimliliğini değerlendirmek için kullanılabilir. Diğer bir deyişle, gerekli hassasiyet ve özellikten genellikle yoksun olan serolojik belirteçlerin kullanılması yerine veya radyografik görüntüleme kullanarak belli bir tedaviye yanıtı belirlemek için birkaç aya kadar bekleme yerine, CTC miktarlarının düzenli izlenmesi, tedavi yanıtının değerlendirilmesi için hızlı ve doğru bir yöntem olarak önerilmiştir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.
- [2] Ghossein, R. A., Bhattacharya, S., & Rosai, J. (1999). Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 5(8), 1950-1960.
- [3] Zhe, X., Cher, M. L., & Bonfil, R. D. (2011). Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *American journal of cancer research*, 1(6), 740.
- [4] Miller, M. C., Doyle, G. V., & Terstappen, L. W. (2009). Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *Journal of oncology*, 2010.
- [5] Swaby, R. F., & Cristofanilli, M. (2011). Circulating tumor cells in breast cancer: a tool whose time has come of age. *BMC medicine*, 9(1), 43.
- [6] Danila, D. C., Fleisher, M., & Scher, H. I. (2011). Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(12), 3903-3912.
- [7] Tanaka, F., Yoneda, K., Kondo, N., Hashimoto, M., Takuwa, T., Matsumoto, S., ... & Hasegawa, S. (2009). Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(22), 6980-6986.
- [8] Negin, B. P., & Cohen, S. J. (2010). Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Current treatment options in oncology*, 11(1-2), 1-13.
- [9] Pachmann, K., Clement, J. H., Schneider, C. P., Willen, B., Camara, O., Pachmann, U., & Höffken, K. (2005). Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 43(6), 617-627.
- [10] Riethdorf, S., Wikman, H., & Pantel, K. (2008). Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *International journal of cancer*, 123(9), 1991-2006.
- [11] Sidransky, D. (1997). Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science*, 278(5340), 1054-1058.
- [12] Markou, A., Strati, A., Malamos, N., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S.

- (2011). Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clinical chemistry*, 57(3), 421-430.
- [13] Crisan, D., Ruark, D. S., Decker, D. A., Drevon, A. M., & Dicarlo, R. G. (2000). Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease. *Molecular Diagnosis*, 5(1), 33-38.
- [14] Pantel, K., Brakenhoff, R. H., & Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 329-340.
- [15] Desitter, I., Guerrouahen, B. S., Benali-Furet, N., Wechsler, J., Jaenne, P. A., Kuang, Y., ... & Cayre, Y. E. (2011). A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer research*, 31(2), 427-441.
- [16] Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schütze, K., ... & Paterlini-Bréchet, P. (2000). Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *The American journal of pathology*, 156(1), 57-63.
- [17] Hofman, V. J., Ilie, M. I., Bonnetaud, C., Selva, E., Long, E., Molina, T., ... & Hofman, P. M. (2011). Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method promises and pitfalls. *American journal of clinical pathology*, 135(1), 146-156.
- [18] Hosokawa, M., Hayata, T., Fukuda, Y., Arakaki, A., Yoshino, T., Tanaka, T., & Matsunaga, T. (2010). Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells. *Analytical chemistry*, 82(15), 6629-6635.
- [19] Zheng, S., Lin, H., Liu, J. Q., Balic, M., Datar, R., Cote, R. J., & Tai, Y. C. (2007). Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *Journal of Chromatography A*, 1162(2), 154-161.
- [20] Zheng, X., Cheung, L. S. L., Schroeder, J. A., Jiang, L., & Zohar, Y. (2011). A high-performance microsystem for isolating circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 11(19), 3269-3276.
- [21] Shelby, J. P., White, J., Ganesan, K., Rathod, P. K., & Chiu, D. T. (2003). A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14618-14622.

- [22] Yap, B., & Kamm, R. D. (2005). Mechanical deformation of neutrophils into narrow channels induces pseudopod projection and changes in biomechanical properties. *Journal of Applied Physiology*, 98(5), 1930-1939.
- [23] Chen, Z., Zhang, S., Tang, Z., Xiao, P., Guo, X., & Lu, Z. (2006). Pool–dam structure based microfluidic devices for filtering tumor cells from blood mixtures. *Surface and interface analysis*, 38(6), 996-1003.
- [24] Mohamed, H., Murray, M., Turner, J. N., & Caggana, M. (2009). Isolation of tumor cells using size and deformation. *Journal of Chromatography A*, 1216(47), 8289-8295.
- [25] Tan, S. J., Yobas, L., Lee, G. Y. H., Ong, C. N., & Lim, C. T. (2009). Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomedical microdevices*, 11(4), 883-892.
- [26] Tan, S. J., Lakshmi, R. L., Chen, P., Lim, W. T., Yobas, L., & Lim, C. T. (2010). Versatile label free biochip for the detection of circulating tumor cells from peripheral blood in cancer patients. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1701-1705.
- [27] Hur, S. C., Mach, A. J., & Di Carlo, D. (2011). High-throughput size-based rare cell enrichment using microscale vortices. *Biomicrofluidics*, 5(2), 022206.
- [28] Sun, J., Li, M., Liu, C., Zhang, Y., Liu, D., Liu, W., & Jiang, X. (2012). Double spiral microchannel for label-free tumor cell separation and enrichment. *Lab on a chip*, 12(20), 3952-3960.
- [29] Hou, H. W., Warkiani, M. E., Khoo, B. L., Li, Z. R., Soo, R. A., Tan, D. S. W., ... & Lim, C. T. (2013). Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Scientific reports*, 3.
- [30] Bhagat, A. A. S., Hou, H. W., Li, L. D., Lim, C. T., & Han, J. (2011). Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation. *Lab on a Chip*, 11(11), 1870-1878.
- [31] Hyun, K. A., Kwon, K., Han, H., Kim, S. I., & Jung, H. I. (2013). Microfluidic flow fractionation device for label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) from breast cancer patients. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 206-212.
- [32] Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., ... & Terstappen, L. W. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with

nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 6897-6904.

- [33] Fehm, T., Solomayer, E. F., Meng, S., Tucker, T., Lane, N., Wang, J., & Gebauer, G. (2005). Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*, 7(2), 171-185.
- [34] Alunni-Fabbroni, M., & Sandri, M. T. (2010). Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*, 50(4), 289-297.
- [35] Cross, S. E., Jin, Y. S., Rao, J., & Gimzewski, J. K. (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature nanotechnology*, 2(12), 780-783.
- [36] Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., & Bilby, C. (2005). Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophysical journal*, 88(5), 3689-3698.
- [37] Hayes, D. F., & Smerage, J. (2008). Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer?. *Clinical Cancer Research*, 14(12), 3646-3650.
- [38] Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, 55(12), 3989-4014.
- [39] Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564.
- [40] Kuo, J. S., Zhao, Y., Schiro, P. G., Ng, L., Lim, D. S., Shelby, J. P., & Chiu, D. T. (2010). Deformability considerations in filtration of biological cells. *Lab on a Chip*, 10(7), 837-842.
- [41] Gascoyne, P. R., & Vykoukal, J. (2002). Particle separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 23(13), 1973.
- [42] Broche, L. M., Bhadal, N., Lewis, M. P., Porter, S., Hughes, M. P., & Labeed, F. H. (2007). Early detection of oral cancer—Is dielectrophoresis the answer?. *Oral oncology*, 43(2), 199-203.
- [43] Pethig, R. (1996). Dielectrophoresis: using inhomogeneous AC electrical fields to separate and manipulate cells. *Critical Reviews in Biotechnology*, 16(4), 331-348.

- [44] Pratt, E. D., Huang, C., Hawkins, B. G., Gleghorn, J. P., & Kirby, B. J. (2011). Rare cell capture in microfluidic devices. *Chemical engineering science*, 66(7), 1508-1522.
- [45] Cen, E. G., Dalton, C., Li, Y., Adamia, S., Pilarski, L. M., & Kaler, K. V. (2004). A combined dielectrophoresis, traveling wave dielectrophoresis and electrorotation microchip for the manipulation and characterization of human malignant cells. *Journal of microbiological methods*, 58(3), 387-401.
- [46] Fiedler, S., Shirley, S. G., Schnelle, T., & Fuhr, G. (1998). Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Analytical chemistry*, 70(9), 1909-1915.
- [47] Cheng, J., Sheldon, E. L., Wu, L., Heller, M. J., & O'Connell, J. P. (1998). Isolation of cultured cervical carcinoma cells mixed with peripheral blood cells on a bioelectronic chip. *Analytical chemistry*, 70(11), 2321-2326.
- [48] Gonzalez, C. F., & Remcho, V. T. (2005). Harnessing dielectric forces for separations of cells, fine particles and macromolecules. *Journal of Chromatography A*, 1079(1), 59-68
- [49] Becker, F. F., Wang, X. B., Huang, Y., Pethig, R., Vykoukal, J., & Gascoyne, P. R. (1995). Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(3), 860-864.
- [50] Yang, J., Huang, Y., Wang, X. B., Becker, F. F., & Gascoyne, P. R. (1999). Cell separation on microfabricated electrodes using dielectrophoretic/gravitational field-flow fractionation. *Analytical Chemistry*, 71(5), 911-918.
- [51] Gascoyne, P. R., Wang, X. B., Huang, Y., & Becker, F. F. (1997). Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood. *Industry Applications, IEEE Transactions on*, 33(3), 670-678.
- [52] Gascoyne, P. R., Noshari, J., Anderson, T. J., & Becker, F. F. (2009). Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 30(8), 1388-1398.
- [53] Moon, H. S., Kwon, K., Kim, S. I., Han, H., Sohn, J., Lee, S., & Jung, H. I. (2011). Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). *Lab on a Chip*, 11(6), 1118-1125.

- [54] Gupta, V., Jafferji, I., Garza, M., Melnikova, V. O., Hasegawa, D. K., Pethig, R., & Davis, D. W. (2012). ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 6(2), 024133.
- [55] Lowes, L. E., Goodale, D., Keeney, M., & Allan, A. L. (2011). Image cytometry analysis of circulating tumor cells. *Methods Cell Biol*, 102, 261-290.
- [56] Attard, G., Swennenhuis, J. F., Olmos, D., Reid, A. H., Vickers, E., A'Hern, R., & de Bono, J. S. (2009). Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 69(7), 2912-2918.
- [57] Kraeft, S. K., Sutherland, R., Gravelin, L., Hu, G. H., Ferland, L. H., Richardson, P., & Chen, L. B. (2000). Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clinical cancer research*, 6(2), 434-442.
- [58] Ntouroupi, T. G., Ashraf, S. Q., McGregor, S. B., Turney, B. W., Seppo, A., Kim, Y., ... & Bodmer, W. F. (2008). Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *British journal of cancer*, 99(5), 789-795.
- [59] Scholtens, T. M., Schreuder, F., Ligthart, S. T., Swennenhuis, J. F., Greve, J., & Terstappen, L. W. (2012). Automated identification of circulating tumor cells by image cytometry. *Cytometry Part A*, 81(2), 138-148.
- [60] Marrinucci, D., Bethel, K., Kolatkar, A., Luttgen, M. S., Malchiodi, M., Baehring, F. & Kuhn, P. (2012). Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Physical biology*, 9(1), 016003.
- [61] Cho, E. H., Wendel, M., Luttgen, M., Yoshioka, C., Marrinucci, D., Lazar, D. & Kuhn, P. (2012). Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. *Physical biology*, 9(1), 016001.
- [62] Sheng, W., Chen, T., Kamath, R., Xiong, X., Tan, W., & Fan, Z. H. (2012). Aptamer-enabled efficient isolation of cancer cells from whole blood using a microfluidic device. *Analytical chemistry*, 84(9), 4199-4206.
- [63] Talasaz, A. H., Powell, A. A., Huber, D. E., Berbee, J. G., Roh, K. H., Yu, W., ... & Davis, R. W. (2009). Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3970-

- [64] Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2), 231-238.
- [65] Šafařík, I., & Šafaříková, M. (1999). Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1), 33-53.
- [66] Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Tsinberg, P., Coutts, S. M., Zomorodi, M., Pham, T., ... & Pircher, T. J. (2011). Detection of EpCAM-negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood. *Journal of oncology*, 2011.
- [67] Deng, G., Herrler, M., Burgess, D., Manna, E., Krag, D., & Burke, J. F. (2008). Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast cancer res*, 10(4), R69.
- [68] Ghazani, A. A., Castro, C. M., Gorbato, R., Lee, H., & Weissleder, R. (2012). Sensitive and Direct Detection of Circulating Tumor Cells by Multimarker-Nuclear Magnetic Resonance. *Neoplasia*, 14(5), 388-IN2.
- [69] Hager, G., Cacsire-Castillo Tong, D., Schiebel, I., Rezniczek, G. A., Watrowski, R., Speiser, P., & Zeillinger, R. (2005). The use of a panel of monoclonal antibodies to enrich circulating breast cancer cells facilitates their detection. *Gynecologic oncology*, 98(2), 211-216.
- [70] Krüger, W., Datta, C., Badbaran, A., Tögel, F., Gutensohn, K., Carrero, I., & Zander, A. R. (2000). Immunomagnetic tumor cell selection—implications for the detection of disseminated cancer cells. *Transfusion*, 40(12), 1489-1493.
- [71] Zieglschmid, V., Hollmann, C., Gutierrez, B., Alberti, W., Strothoff, D., Gross, E., & Böcher, O. (2005). Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer research*, 25(3A), 1803-1810.
- [72] Liu, Z., Fusi, A., Klopocki, E., Schmitt, A., Tinhofer, I., Nonnenmacher, A., & Keilholz, U. (2011). Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *Journal of translational medicine*, 9(1), 70.
- [73] Yang, L., Lang, J. C., Balasubramanian, P., Jatana, K. R., Schuller, D., Agrawal, A., ... & Chalmers, J. J. (2009). Optimization of an enrichment

process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnology and bioengineering*, 102(2), 521-534.

- [74] Zborowski, M., & Chalmers, J. J. (2011). Rare cell separation and analysis by magnetic sorting. *Analytical chemistry*, 83(21), 8050-8056.
- [75] McCloskey, K. E., Chalmers, J. J., & Zborowski, M. (2003). Magnetic cell separation: characterization of magnetophoretic mobility. *Analytical chemistry*, 75(24), 6868-6874.
- [76] Sieben, S., Bergemann, C., Lübke, A., Brockmann, B., & Rescheleit, D. (2001). Comparison of different particles and methods for magnetic isolation of circulating tumor cells. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 225(1), 175-179.
- [77] Haun, J. B., Devaraj, N. K., Hilderbrand, S. A., Lee, H., & Weissleder, R. (2010). Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection. *Nature nanotechnology*, 5(9), 660-665.
- [78] Liberti, P. A., Rao, C. G., & Terstappen, L. W. (2001). Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 225(1), 301-307.
- [79] Zborowski M, Chalmers J. (2007) Commercial magnetic cell separation instruments and reagents. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Oxford: Elsevier B.V., Amsterdam;. p. 265–92.
- [80] Alix-Panabières, C., Vendrell, J. P., Pellé, O., Rebillard, X., Riethdorf, S., Müller, V., & Pantel, K. (2007). Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clinical chemistry*, 53(3), 537-539.
- [81] Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., & Terstappen, L. W. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 6897-6904.
- [82] Miller, M. C., Doyle, G. V., & Terstappen, L. W. (2009). Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *Journal of oncology*, 2010. [4]
- [83] Flores, L. M., Kindelberger, D. W., Ligon, A. H., Capelletti, M., Fiorentino, M.,

- Loda, M., & Krop, I. E. (2010). Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer. *British journal of cancer*, 102(10), 1495-1502.
- [84] Cohen, S. J., Punt, C. J., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., ... & Meropol, N. J. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(19), 3213-3221.
- [85] Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., ... & Hayes, D. F. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(8), 781-791.
- [86] Kraan, J., Sleijfer, S., Strijbos, M. H., Ignatiadis, M., Peeters, D., Pierga, J. Y., & Gratama, J. W. (2011). External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch® system: a feasibility study. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 80(2), 112-118.
- [87] Krebs MG, Hou J-M, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. (2012) Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker- dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* ;7:306–15.
- [88] Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., ... & Pantel, K. (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 920-928.
- [89] Deng, G., Herrler, M., Burgess, D., Manna, E., Krag, D., & Burke, J. F. (2008). Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast cancer res*, 10(4), R69.
- [90] Lara, O., Tong, X., Zborowski, M., & Chalmers, J. J. (2004). Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Experimental hematology*, 32(10), 891-904.
- [91] O'Hara, S. M., Moreno, J. G., Zweitzig, D. R., Gross, S., Gomella, L. G., & Terstappen, L. W. (2004). Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. *Clinical chemistry*, 50(5), 826-835.

- [92] Zigeuner, R. E., Riesenberger, R., Pohla, H., Hofstetter, A., & Oberneder, R. (2003). Isolation of circulating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry in vitro. *The Journal of urology*, 169(2), 701-705.
- [93] Hoshino, K., Huang, Y. Y., Lane, N., Huebschman, M., Uhr, J. W., Frenkel, E. P., & Zhang, X. (2011). Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 11(20), 3449-3457.
- [94] Kang, J. H., Krause, S., Tobin, H., Mammoto, A., Kanapathipillai, M., & Ingber, D. E. (2012). A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 12(12), 2175-2181.
- [95] Forbes, T. P., & Forry, S. P. (2012). Microfluidic magnetophoretic separations of immunomagnetically labeled rare mammalian cells. *Lab on a Chip*, 12(8), 1471-1479.
- [96] Kim, S., Han, S. I., Park, M. J., Jeon, C. W., Joo, Y. D., Choi, I. H., & Han, K. H. (2013). Circulating tumor cell microseparator based on lateral magnetophoresis and immunomagnetic nanobeads. *Analytical chemistry*, 85(5), 2779-2786.
- [97] Plouffe, B. D., Mahalanabis, M., Lewis, L. H., Klapperich, C. M., & Murthy, S. K. (2012). Clinically relevant microfluidic magnetophoretic isolation of rare-cell populations for diagnostic and therapeutic monitoring applications. *Analytical chemistry*, 84(3), 1336-1344.
- [98] Issadore, D., Chung, J., Shao, H., Liong, M., Ghazani, A. A., Castro, C. M., ... & Lee, H. (2012). Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector. *Science translational medicine*, 4(141), 141ra92-141ra92.
- [99] Lin, M. X., Hyun, K. A., Moon, H. S., Sim, T. S., Lee, J. G., Park, J. C., ... & Jung, H. I. (2013). Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 63-67.
- [100] Wang, S., Wang, H., Jiao, J., Chen, K. J., Owens, G. E., Kamei, K. I., ... & Tseng, H. R. (2009). Three-Dimensional Nanostructured Substrates toward Efficient Capture of Circulating Tumor Cells. *Angewandte Chemie*, 121(47), 9132-9135.

- [101] Didar, T. F., & Tabrizian, M. (2010). Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab on a Chip*, 10(22), 3043-3053.
- [102] Smith, J. P., Barbati, A. C., Santana, S. M., Gleghorn, J. P., & Kirby, B. J. (2012). Microfluidic transport in microdevices for rare cell capture. *Electrophoresis*, 33(21), 3133-3142.
- [103] Fan, T., Zhao, Q., Chen, J. J., Chen, W. T., & Pearl, M. L. (2009). Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 112(1), 185-191.
- [104] Lu, J., Fan, T., Zhao, Q., Zeng, W., Zaslavsky, E., Chen, J. J., & Chen, W. T. (2010). Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *International Journal of Cancer*, 126(3), 669-683.
- [105] Paris, P. L., Kobayashi, Y., Zhao, Q., Zeng, W., Sridharan, S., Fan, T., & Rosenberg, J. (2009). Functional phenotyping and genotyping of circulating tumor cells from patients with castration resistant prostate cancer. *Cancer letters*, 277(2), 164-173.
- [106] Cheung, L. S., Zheng, X., Wang, L., Guzman, R., Schroeder, J. A., Heimark, R. L., ... & Zohar, Y. (2010). Kinematics of specifically captured circulating tumor cells in bio-functionalized Microchannels. *Microelectromechanical Systems, Journal of*, 19(4), 752-763.
- [107] Cheung, L. S. L., Zheng, X., Wang, L., Baygents, J. C., Guzman, R., Schroeder, J. A., ... & Zohar, Y. (2011). Adhesion dynamics of circulating tumor cells under shear flow in a bio-functionalized microchannel. *Journal of micromechanics and microengineering*, 21(5), 054033.
- [108] Mittal, S., Wong, I. Y., Deen, W. M., & Toner, M. (2012). Antibody-functionalized fluid-permeable surfaces for rolling cell capture at high flow rates. *Biophysical journal*, 102(4), 721-730.
- [109] Dickson, M. N., Tsinberg, P., Tang, Z., Bischoff, F. Z., Wilson, T., & Leonard, E. F. (2011). Efficient capture of circulating tumor cells with a novel immunocytochemical microfluidic device. *Biomicrofluidics*, 5(3), 034119.
- [110] Zheng, X., Cheung, L. S. L., Schroeder, J. A., Jiang, L., & Zohar, Y. (2011). Cell receptor and surface ligand density effects on dynamic states of adhering circulating tumor cells. *Lab on a chip*, 11(20), 3431-3439.

- [111] Chang, K. C., & Hammer, D. A. (1999). The forward rate of binding of surface-tethered reactants: effect of relative motion between two surfaces. *Biophysical journal*, 76(3), 1280-1292.
- [112] Wan, Y., Tan, J., Asghar, W., Kim, Y. T., Liu, Y., & Iqbal, S. M. (2011). Velocity effect on aptamer-based circulating tumor cell isolation in microfluidic devices. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(47), 13891-13896.
- [113] Adams, A. A., Okagbare, P. I., Feng, J., Hupert, M. L., Patterson, D., Göttert, J., & Soper, S. A. (2008). Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 130(27), 8633-8641.
- [114] Santana, S. M., Liu, H., Bander, N. H., Gleghorn, J. P., & Kirby, B. J. (2012). Immunocapture of prostate cancer cells by use of anti-PSMA antibodies in microdevices. *Biomedical microdevices*, 14(2), 401-407.
- [115] Zheng, X., Cheung, L. S. L., Schroeder, J. A., Jiang, L., & Zohar, Y. (2011). A high-performance microsystem for isolating circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 11(19), 3269-3276.
- [116] Stott, S. L., Hsu, C. H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., Waltman, B. A., ... & Toner, M. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18392-18397.
- [117] Dharmasiri, U., Balamurugan, S., Adams, A. A., Okagbare, P. I., Obubuafo, A., & Soper, S. A. (2009). Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device. *Electrophoresis*, 30(18), 3289-3300.
- [118] Dharmasiri, U., Njoroge, S. K., Witek, M. A., Adebisi, M. G., Kamande, J. W., Hupert, M. L., ... & Soper, S. A. (2011). High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system. *Analytical chemistry*, 83(6), 2301-2309.
- [119] Wang, S., Liu, K., Liu, J., Yu, Z. T. F., Xu, X., Zhao, L., & Tseng, H. R. (2011). Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers.

- [120] Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., ... & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450(7173), 1235-1239.
- [121] Gleghorn, J. P., Pratt, E. D., Denning, D., Liu, H., Bander, N. H., Tagawa, S. T., ... & Kirby, B. J. (2010). Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) and a prostate-specific antibody. *Lab on a Chip*, 10(1), 27-29.
- [122] Kurkuri, M. D., Al-Ejeh, F., Shi, J. Y., Palms, D., Prestidge, C., Griesser, H. J. & Thierry, B. (2011). Plasma functionalized PDMS microfluidic chips: towards point-of-care capture of circulating tumor cells. *Journal of Materials Chemistry*, 21(24), 8841-8848.
- [123] Pecot, C. V., Bischoff, F. Z., Mayer, J. A., Wong, K. L., Pham, T., Bottsford-Miller, J., ... & Sood, A. K. (2011). A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer discovery*, 1(7), 580-586.
- [124] David T. M., Lecia V. S., Richard J. L. Circulating tumor cells-monitoring treatment response in prostate cancer, Advance online publication, doi:10.1038/nrclinonc.2014,82
- [125] Esmaeilsabzali, H., Beischlag, T. V., Cox, M. E., Parameswaran, A. M., & Park, E. J. (2013). Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods. *Biotechnology advances*, 31(7), 1063-1084.
- [126] Chen, Z., Zhang, S., Tang, Z., Xiao, P., Guo, X., & Lu, Z. (2006). Pool-dam structure based microfluidic devices for filtering tumor cells from blood mixtures. *Surface and interface analysis*, 38(6), 996-1003.
- [127] Ligthart, S. T. (2012). *Redefining circulating tumor cells by image processing*. Universiteit Twente.
- [128] Bhagat, A. A. S., Hou, H. W., Li, L. D., Lim, C. T., & Han, J. (2011). Pinched flow coupled shear-modulated inertial microfluidics for high-throughput rare blood cell separation. *Lab on a Chip*, 11(11), 1870-1878.
- [129] İçli F, Akbulut H. Onkolojiye □ Giriş. İn.iliğin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G ve ark.; eds.İçH astalıkları.Güneş Kitapevi;2005:2007- 2014.
- [130] <http://plasmamatreatment.co.uk/henniker-plasma-technology>

