

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF-7 KANSER HÜCRELERİNİN ANTİKOR TABANLI
MİKROKANALLAR İÇERİSİNDE YAKALANMASI VE
İNCELENMESİ

GÖZDE DERELİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2014

**MCF-7 KANSER HÜCRELERİNİN ANTİKOR TABANLI
MİKROKANALLAR İÇERİSİNDE YAKALANMASI VE
İNCELENMESİ**

**ANTIBODY BASED CAPTURE AND DETECTION OF
MCF-7 TUMOR CELLS USING MICROCHANNELS**

GÖZDE DERELİ

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

2014

“MCF-7 KANSER HÜCRELERİNİN ANTİKOR TABANLI MİKROKANALLAR İÇERİSİNDE YAKALANMASI VE İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından, 15/09/2014 tarihinde, **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Feride İffet ŞAHİN

Üye (Danışman) Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

ONAY
... / 09 /2014

Prof. Dr. Emin AKATA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince beni eğiten ve yol gösteren değerli Hocam Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK'a

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresinde daima yol gösterici olan ve tez çalışmalarımda değerli bilgilerini bana aktaran Hocam Öğr. Gör. Mehmet YÜKSEKKAYA'ya

Tez çalışmamın şekillenmesi için çok değerli bilgi birikimini paylaşan Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Yunus Kasım TERZİ'ye

Tüm yardımları için arkadaşım Araş. Gör. Erdem HABERAL'a

Tez çalışmalarım kapsamında laboratuvarlarında çalışma imkanı sunarak değerli bilgilerini bana aktaran Hacettepe Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli Hocam Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR'a

Bu çalışmada emeği geçen tüm Başkent Üniversitesi Ailesi Bireylerine

Ve;

Hayatım boyunca bana destek olarak ayakta durmamı sağlayan, emeklerini esirgemeyen, Ülkeme faydalı bir birey olarak yetişmemi sağlayan tüm değerli Aile Büyüklerime

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZ

MCF-7 KANSER HÜCRELERİNİN ANTİKOR TABANLI MİKROKANALLAR İÇERİSİNDE YAKALANMASI VE İNCELENMESİ

Gözde DERELİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Kanser Dünya’da olduğu gibi Türkiye’de de ölümlerin başlıca sebebidir. Dünyadaki nüfus artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak kanser artış hızı yükselmiştir. Uluslararası Kanser Ajansı özellikle meme kanserindeki artışa dikkat çekmiştir. Meme kanseri kadın kanserleri içerisinde en fazla görülen ve en fazla ölüme sebep olan kanserdir. Bugün Dünya’da kadın kanser hastalarının 4’ünden 1’i meme kanseridir. Bu nedenlerle, kanserin erken teşhisi; metastaz gerçekleşmeden kanser hücrelerinin kanda veya vücut sıvılarındaki dolaşimleri esnasında tespit edilmesi çok önemlidir. Dolaşımdaki kanser hücrelerinin tespiti için bir test yapmak diğer klasik yöntemlere göre daha az invaziv, daha duyarlı, hızlı, az maliyetli ve daha az zaman alıcı bir yöntem olabilir. Bu amaçlar doğrultusunda, çalışma kapsamında, dolaşımdaki kanser hücrelerinin tespitinin araştırılması için mikroçipler üretilmiş, bu mikroçipler içerisine yüzey modifikasyonu uygulanarak meme kanseri hücrelerinde bulunan EpCAM yüzey belirteciye özgül anti-EpCAM antikorsu ile kaplanmıştır. Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinin PBS ve kan ile karıştırılarak mikroçipler içerisinde yakalanması hedeflenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, mikroçipler Floresan mikroskobu ile incelenmiştir. Mikrokanallar içerisinde MCF-7 hücreleri yakalanmıştır. Deneyler tekrarlanarak yöntemin çalışma amacına özgül olduğu ve güvenilirliği doğrulanmıştır. Yakalama etkinliği ortalamalarının PBS için 76 ± 11 , kan için 65 ± 5 olduğu, yapılan istatistik çalışmasıyla farklı hücre konsantrasyonları deneylerinin mikrokanallar içerisinde hücre yakalama etkinlikleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: CTC, meme kanseri, MCF-7, mikroçip, anti-EpCAM

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

ABSTRACT

ANTIBODY BASED CAPTURE AND DETECTION OF MCF-7 TUMOR CELLS USING MICROCHANNELS

Gözde DERELİ

Başkent University Institute Of Science And Engineering

The Department Of Biomedical Engineering

Cancer continues to be the leading cause of death in Turkey as in the World. The incidence of cancer has increased depending on population growth and population aging in the World. The International Cancer Agency has drawn attention in particular to the increase in breast cancer. Breast cancer is the most common in women cancers and the first reason of death. Today, in the World, 1 of 4 female cancer patients is a breast cancer patient. For these reasons, early diagnosis of cancer and detection of cancer cells in blood or body liquids are very important. A test for detection of circulating tumor cells can be much more sensitive, fast; less invasive, costly and less time consuming. In this study, microchips have been produced to investigate the detection of circulating tumor cells. A surface modification has been applied in microchip channels and these microchannels have been coated with an anti-EpCAM antibody which is specific to the biomarker of breast cancer cells. Capturing MCF-7 breast cancer cells, a cell line of breast cancer, in microchannels is the aim of this study. For this purpose, MCF-7 cells, spiked in PBS and blood, were injected into the channels. At the end of the experiments, the microchips were examined by Fluorescence microscopy. It is found that MCF-7 cells have been captured in microchannels and capture efficiencies are 76 ± 11 (in PBS concentrations) and 65 ± 5 (in blood concentrations). The study reliability and specificity have been verified by repeating the experiments. ANOVA Test (SPSS) has been applied for the study reliability and it is also found that the experiments with different concentrations have not caused a significant effect on capture efficiency.

Keywords: CTC, breast cancer, MCF-7, microchip, anti-EpCAM

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

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Amacı	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kanser	4
2.2 Dolaşımdaki Kanser Hücreleri (CTC-Circulating Tumor Cell).....	7
2.3 Kanserin Biyokimyasal Belirteçleri.....	9
2.3.1 Epitel hücre adhezyon molekülü-EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)	10
2.4 Meme Kanseri.....	11
2.4.1 Meme kanseri teşhis yöntemleri	13
2.4.2 Meme kanseri hücre hatları	14
2.5 CTC İzolasyon Yöntemleri	15
2.5.1 Fiziksel özelliklere dayalı yöntemler	15
2.5.1.1 Yoğunluk farkı ile izolasyon	15
2.5.1.2 Boyut ve mekanik esnekliğe dayalı izolasyon	16
2.5.1.3 Dielektrik özelliklere dayalı izolasyon	24
2.5.2 Nükleik asit temelli yöntemler	25
2.5.3 Antikor temelli yöntemler	26
2.5.3.1 İmmunomanyetik methodlar	26
2.5.3.2 Bağlanma-yapışmaya dayalı izolasyon	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1 Deneyde Kullanılan Kimyasallar	39
3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar	39
3.3 Mikrokanal Tasarımı	39

3.4	Çip Yapımı	43
3.5	Yüzey Kimyası	47
3.6	Kanallara Antikor ve Hücre Enjeksiyonu.....	48
3.7	Hücre Boyama, Görüntüleme ve Sayım	48
4.	DENEYLER.....	50
4.1	PBS İçerisinde Farklı Hücre Konsantrasyonlarında Deneyler ...	50
4.2	Kan İçerisinde Farklı MCF-7 Hücre Konsantrasyonlarında Deneyler	59
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Kanserin oluşumu ve metastaz 7
Şekil 2.2	Dolaşımdaki kanser hücresi 8
Şekil 2.3	CTC izolasyon yöntemleri..... 15
Şekil 2.4	ISET cihazı 17
Şekil 2.5	İz-Oyma tipi membran 17
Şekil 2.6	Mikroakışkan çip 18
Şekil 2.7	Mikroakışkan içerisinde daralan kanal yapısı 19
Şekil 2.8	Üçlü mikrosütunlar ile oluşturulmuş yarım ay yakalama yapıları 20
Şekil 2.9	Mikrosıvı akış ayırıştırması 20
Şekil 2.10	Çoklu orifis akış ayırıştırma 22
Şekil 2.11	CellSearch cihazı 27
Şekil 2.12	İmmunomanyetik tabanlı mikrosıvı çip 29
Şekil 2.13	LiquidBiopsy platformu 30
Şekil 2.14	CTC çip..... 35
Şekil 2.15	HB çip 36
Şekil 2.16	CTC-ichip..... 37
Şekil 3.1	Deneylerde kullanılan mikrokanal tasarımı (DSA)..... 40
Şekil 3.2	DSA' nın yerleştirildiği boşluklu PMMA yüzeyi 41
Şekil 3.3	DSA kesimi için çoklu CoralDraw çizimi 42
Şekil 3.4	0.7-1.2 mm ebatlarında eliptik deliklerin coreldraw çizimi 43
Şekil 3.5	Çip yapımı 44
Şekil 3.6	Kanal çalışırlığı boyama deneyleri..... 45
Şekil 3.7	Kanal çalışırlığı yıkama deneyleri..... 46
Şekil 3.8	Yüzey kimyası uygun hale getirilen çipler..... 47
Şekil 4.1	MCF-7 hücreleri ışık filtresi görüntüleri (1000 büyütme)..... 52
Şekil 4.2	Kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin DAPI filtre ile görüntüleri (200 büyütme) 52
Şekil 4.3	Kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin Alexa Fluor 488 filtre ile görüntüleri (200 büyütme) 53

Şekil 4.4	Kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (200 büyütme)	53
Şekil 4.5	Örtüştürülmüş hücre görüntüleri (200 büyütme).....	54
Şekil 4.6	500000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 Büyütme)	56
Şekil 4.7	250000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 büyütme)	57
Şekil 4.8	100000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (100 büyütme)	58
Şekil 4.9	Kontrol deneyi yapılan çipten DAPI ve ışık filtresi ile bir görüntü (200 büyütme)	60
Şekil 4.10	Kan içerisinde kanallarda yakalanan MCF-7 hücreleri DAPI filtre görüntüleri (200 büyütme)	62
Şekil 4.11	Kan içerisinde kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin Alexa Fluor filtre görüntüleri (200 büyütme)	62
Şekil 4.12	Kan içerisinde kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (200 büyütme).....	63
Şekil 4.13	50000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (100 büyütme)	65
Şekil 4.14	20000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 büyütme)	66
Şekil 4.15	10000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 büyütme)	67

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Kanserin biyokimyasal belirteçleri	10
Tablo 2.2 Kanseri evreleri	13
Tablo 3.1 Lazer kesim PMMA delik parametreleri.....	40
Tablo 3.2 Kazıma için kesim parametreleri	41
Tablo 3.3 DSA için kesim parametreleri	42
Tablo 4.1 PBS içerisinde farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücre yakalama etkinlikleri.....	51
Tablo 4.2 Kan içerisinde farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücre yakalama etkinlikleri.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

3-MPS	(3-Mercaptopropyl Trimethoxylane)
BSA	Sığır Albumin Serumu (Bovine Serum Albumin)
CTC	Dolaşımdaki Kansere Hücreleri (Circulating Tumor Cell)
DAPI	(4,6 Diamino-2-Phenylindole Dihydrochloride Hydra)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EMT	Epitel-Mezenkimal Dönüşüm
EPCAM	Epitel Hücre Adhezyon Molekölü (Epithelial Cell Adhesion Molecule)
GF	Büyüme Faktörü (Growth Factor)
GMBS	(Maleimidobutyryloxysuccinimide Ester)
MET	Mezenkimal-Epitel Dönüşüm
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NHD	Normal Sağlıklı Donör (Normal Healthy Donor)
PBS	Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

1. GİRİŞ

Türkiye'de yaklaşık 400 bin kanser vakası bulunmakta ve bu rakam günden güne artmaktadır. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre her yıl 140 bin kişi kanserden hayatını kaybetmektedir. Bu rakamın önümüzdeki 20 yılda 500 bine çıkacağı tahmin edilmektedir. Her yıl ortalama 150 bin yeni kanser tanısı konulmaktadır. Kayıtlı verilerin tam olarak gerçeği yansıtmadığı, insidansın aslında çok daha yüksek olduğu ve kanserli hasta sayısının artışının her yıl %1-2 olduğu kabul edildiğinde bu sayının önümüzdeki 20 yıl içerisinde 1,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Rakamlar düşünüldüğünde kanser hastalarında erken teşhisin, hücrelerin kanda veya vücut sıvılarındaki dolaşimleri esnasında tespit edilmesinin ne denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Tüm çabalara rağmen kanser hala dünya genelindeki ölümlerin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir. 2008 yılındaki verilere göre 7.6 milyon kanser vakası görülmüş (%13' ü ölümlle sonuçlanmış) ve bu sayının 2030'da 13 milyonu geçeceği tahmin edilmektedir [1][2]. 2013 yılı içerisinde Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.660.290 yeni kanser vakası görülürken bunların 580.350'si ölümlle sonuçlanmıştır. Yine Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 yılı içerisinde 1.665.540 yeni kanser vakası görülürken ölümlle sonuçlanan 585.720 kanser vakası vardır. [3]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bu ölümlerin en az %30' u önlenelirdir. İkincil metastazları önleyebilecek birincil tümörün erken teşhisi ve metastatik kansere karşı daha etkili tedavilerin geliştirilmesi kanserle savaşın kazanılmasında anahtar faktörlerdir. [4]

Kanser hastalarının tedavisinde önemli kaygılardan biri de kanser hücrelerinin diğer dokulara olası yayılımının (metastaz) hemen tespit edilmesi sorunudur. Metastatik lezyonlar belirlenebilir ve anatomik olarak ulaşılabilir olsalar dahi bu lezyonlara düzenli birçok biyopsi uygulamak pratik bir yöntem değildir. Bu nedenle; birincil ya da metastatik tümörlerden orijin alıp, yumuşak dokuya atlayarak buradan dolaşıma katılan dolaşımdaki kanser hücrelerinin (CTC-Circulating Tumor Cells) tespiti kanserin teşhisi ya da prognozu için önemli bir basamaktır. CTClerin

varlığı meme, prostat ve kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok önemli kanser türünde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. [5]

Dolaşımdaki tümör hücrelerini tespit için bir kan testi yapmak, doku biyopsileri ve kemik iliği aspirasyonları gibi daha klasik yöntemlerle kanserin olası yayılma derecesini belirlemeye göre hastaya daha az rahatsızlık veren bir işlemdir. Dolaşımdaki kanser hücrelerinin ölçümü mamografi ve kemik taramaları benzeri diğer prosedürlere göre daha duyarlı, hızlı, daha düşük maliyetli ve daha az zaman alıcı bir yöntem olabilir.

1.1 Çalışmanın Amacı

Dolaşımdaki kanser hücrelerine ilişkin en geniş çaplı çalışma meme kanseri hastalarında yürütülmüş olmasına rağmen araştırmacılar melanomlar, prostat, kolorektal ve akciğer kanserlerinde de bu hücreleri aramaktadır. Bu çalışmalar bu hücrelerin kan düzeylerinin yükselmesinin metastatik kanseri öngörmeye önemli bir rol oynayabildiğini göstermiştir. Bu tip testlerin yeni tanı konmuş hastalarda gidişatı(prognoz) tahmininde yararlı olabildiğine ilişkin kanıtlar da mevcuttur.

Kanda çok az sayıda kanser hücresi bulunmaktadır (10^7 kan hücresinin içerisinde 10^1 dan daha az kanser hücresi). Bu hücreleri tespit ve izole etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler karmaşık bir filtreleme sistemi kullanarak hücrelerin fiziksel yöntemlerle ayrıştırılması, monoklonal antikorların kullanıldığı değişik immünolojik teknikler, immünolojik tekniklerle mikrodizilim teknolojisinin kombinasyonu, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) benzeri moleküler prosedürleri içermektedir. Tez önerisinin hedefi mikroakışkan çip teknolojisi ile antikor tabanlı ayrıştırma yöntemlerini bir araya getirip CTC'leri kandan izole ederek analiz etmektir. Tez çalışmaları başlıca dört ana bölümden oluşmaktadır:

- (i) Mikroakışkan çip yapımı
- (ii) Çiplerin yüzey modifikasyonu
- (iii) Hücrelerin, kanın çipler içerisinde işlenerek floresan boyama ile işaretlenmesi
- (iv) İzole edilip işaretlenen hücrelerin görüntüleme teknikleri ile sayımı ve incelenmesi

Tez çalışmaları kapsamında CTC'lerin kandan ayrıştırılması ile:

- (i) Kanserın tekrarlaması ya da ilerlemesi riskinin tahmini
- (ii) Terapilerin sınıflandırılması ve gerçek zamanlı izlenmesi
- (iii) Terapötik hedeflerin ve direnç mekanizmalarının tanımlanması
- (iv) Kanser hastalarında metastatik gelişimi anlamak gibi sonuçlar sağlanacaktır.[6]

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, hücrelerde DNA hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz, anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Kanser hücreleri çoğalarak kana ve lenf sıvısına karışıp vücudun diğer kısımlarına yayılır ve yeni tümör odaklarının oluşmasına yol açarlar. Başka doku ve organlarda oluşan bu tümör odakları metastaz olarak isimlendirilir. Başlıca iki tümör türü vardır:

1. İyi Huylu Tümörler: Bu tip tümörlerin metastaz yeteneği yoktur. Bunlar ilerlemeyen hastalıklardır. Birçok iyi huylu tümör insan sağlığına zararsız olsa da negatif sağlık etkileri hala görülmektedir. İyi huylu tümörler tipik olarak etraflarında, kötü huylu davranma yeteneklerini inhibe eden fibröz bir kılıf ile kaplıdır.
2. Kötü Huylu Tümörler: Bu tümörler hızla çoğalır ve bulundukları bölgeden yan dokulara geçişler yaparlar. Vücudun başka bölgelerine atlama ve metastaz gerçekleştirebilirler. Bulundukları doku koşulları, hücre tipi ve orijinlerine göre isimlendirilirler.

Kanserin oluşumu ve yayılması karmaşık bir süreçtir ve tamamen anlaşılamamıştır. Kanser, kalıtsal mutasyonlar, hormonlar gibi iç uyaranlarla veya tütün, radyasyon gibi çevresel, edinilmiş faktörlerden kaynaklanarak malign hücrelerin içinde bulunduğu mutasyonların kümülatif birikimi sonucu oluşur. Vakaların çoğunda mortalite ile ilişkili görülen primer tümör değil, metastazlardır. Örneğin, lokalize ve metastatik prostat kanseri olan hastalar için ortalama 5 yıllık sağkalım oranı %100 ve %28' dir (Amerikan Kanser Derneği, 2013). Genellikle primer tümör oluşumu ve sonraki metastazın dahil olduğu karsinogenez, dört geniş kategoride özetlenebilen Darwinci süreci olarak kabul edilebilir.

- 1) Primer tümör formasyonu ve büyümesi: Primer tümör formasyonunda, mutasyonlar apoptozu-programlı hücre ölümünü- baskılayarak mitotik hücrelerin anormal bir şekilde bölünmesine ve hücre ölümünün kaçırılmasına veya katı tümör

formasyonuna sebep olan otofajik ve nekrotik mekanizmaların regülasyonuna sebep olur. Büyüyen primer tumor kesin bir boyuta ulaştığı zaman bölünen mutant hücreler hızlı bir şekilde ulaşılabilir besin kaynağı ve oksijen oranını aşar ve HIF ler ile tetiklenen neovaskülarizasyona sebep olur. HIF ler tumor hücrelerinde diğer kontrol yollarıyla beraber GF ekspresyonunu kontrol eder; VEGF, anjiopoetin 1 ve 2 gibi anjiogenezisi uyaran faktörlerin sentezini tetikler [7], [8].

2) Epitel-mezenkimal dönüşüm ve intravazasyon-damar içine girme: HIF aktivasyonu, anjiogenin ekspresyonu ve diğer faktörlerin, çeşitli pleiotropik etkiler yoluyla E-kaderin'in azaltılmış ifadesine neden olduğu gösterilmiştir. E- kaderin seviyesinin düşmesi hücre-hücre adezyonunu azaltır ve tümör hücresinin hareket yeteneğini artırır [8], [9]. Bu, tümör hücrelerinde fenotipik bir değişime sebep olan ve metastatik kaskadda önemli bir aşama olan epitel-mezenkimal dönüşümde kritik bir olaydır. Kanseri hücrelerindeki bu göreceli fenotipik değişiklikler tam olarak anlaşılmasa da hücre-ekstrasellüler matriks yapışma moleküllerinin değişken ekspresyonu (örneğin, integrinler), epitelyal belirteçlerin (örneğin, sitokeratin) baskılanması ve mezenkimal belirteçlerin (örneğin, vimentin) uyarılması ile karakterize edilir [10].

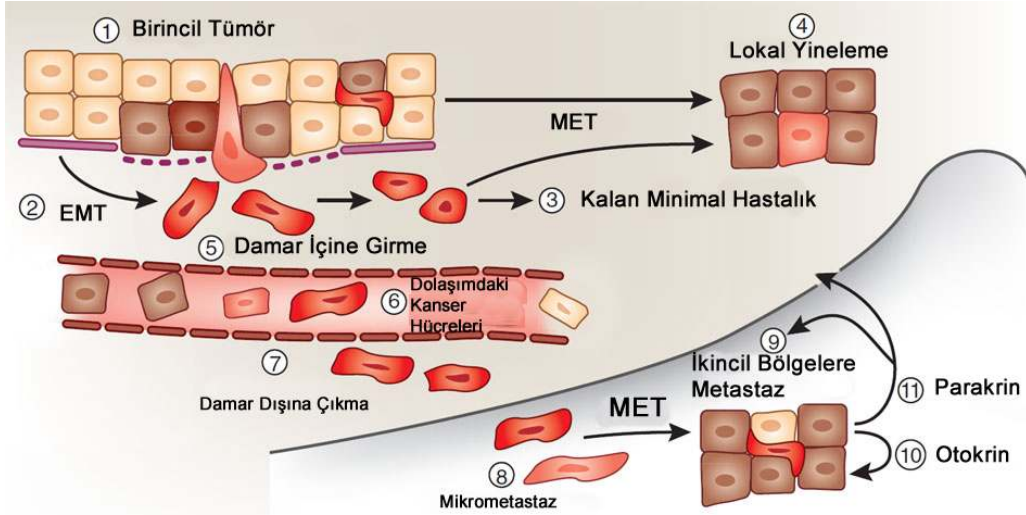
Metastatik kanser hücrelerindeki epitel-mezenkimal transizyon oldukça kompleks ve hala tam olarak anlaşılamamasına rağmen bu dönüşümün metastaz için önemli bir gösterge olduğuna ve CSC ve belki de çoklu ilaç direnci (ÇİD) ile yakın ilişkide olduğuna inanılmaktadır [11]–[14]. Epitel-mezenkimal dönüşümün CSC olmayan türlerde CSC'yi uyardığı ileri sürülmektedir [15].

Epitel-mezenkimal transizyon sürecinin ardından kanser hücreleri tümör dokusundan ayrılıp komşu dokulara göç eden (lokal invazyon) hareketli ve invaziv bir fenotip sergiler. Bazı kanser hücrelerinin bu invaziv fenotipi, bazal membranı, hücreler arası mesafeyi ve anjiogenez sonucu oluşmuş yeni damarların endotel bariyerini aşarak dolaşıma katılmasına yardım eder. İntravazasyon olarak bilinen bu süreç kanser hücrelerinin lokalize veya uzak metastazı başlatmasına izin verir. Bu kötü vurgulayıcı durum, intravazasyonun primer tümör tespit edilmeden önce oluşabileceğini gösterir. Son zamanlarda epitel-mezenkimal transizyon ve

yayılımının kanser öncesi dönemde primer tumor tespit edilmeden önce olduğu bir pankreatik kanser modelinde gösterilmiştir [16].

3) Kanserın Hematojen Yayılımı: Kanser hücreleri bir kez dolaşıma katıldığında anoikis olarak bilinen uygunsuz hücre-matriks etkileşimine sebep olur. Dolaşımda çoğalmadıkları düşünülen CTC'lerin değişik boyut ve moleküler adezyona sahip olmalarına bağlı olarak özgül organların kapiller yataklarında durdurulana kadar dolaşımda kaldıkları düşünülür. Çoğu ikincil (seconder) tümörün kanser hücrelerinin yüzdüğü lenf damarlarının bulunduğu lenf nodlarından bağımsız olarak organlarda (kemik, karaciğer ve akciğer) oluştuğuna dikkat edilmelidir. Bu, eğer kanser hücreleri sadece lenf damarları girer, bir lenf düğümüne ulaşır ve orada sınırlı metastazı kurar ise bu lezyonlar daha sonra kan dolaşımı içine diğer tümör hücrelerini döker anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, kan dolaşımı ile taşınan kanser hücreleri (CTC) ölümcül metastatik malignansilerin büyük çoğunluğu ile ilişkilidir.

4) Ekstravazasyon- damar dışına çıkma- ve ikincil tümör formasyonu: Kapiller yatakta yakalanan tümör hücreleri endotelial hücre tabakasını penetre eder ve interstisyum-hücreler arası boşluk ve parankimi geçerek konak hücreye ulaşır [17], [18]. Ardından kanser hücreleri epitel-mezenkimal transizyonun aksine epitelyal hücrelerin tekrar görüldüğü ve konak organın invaze edildiği anlamına gelen mezenkimal-epitelyal dönüşüm olarak adlandırılan başka bir fenotipik değişime gider. EMT'de olduğu gibi MET de tam olarak anlaşılamamıştır ve farklı moleküler mekanizmalar öne sürülmüş olup hala araştırılmaktadır.

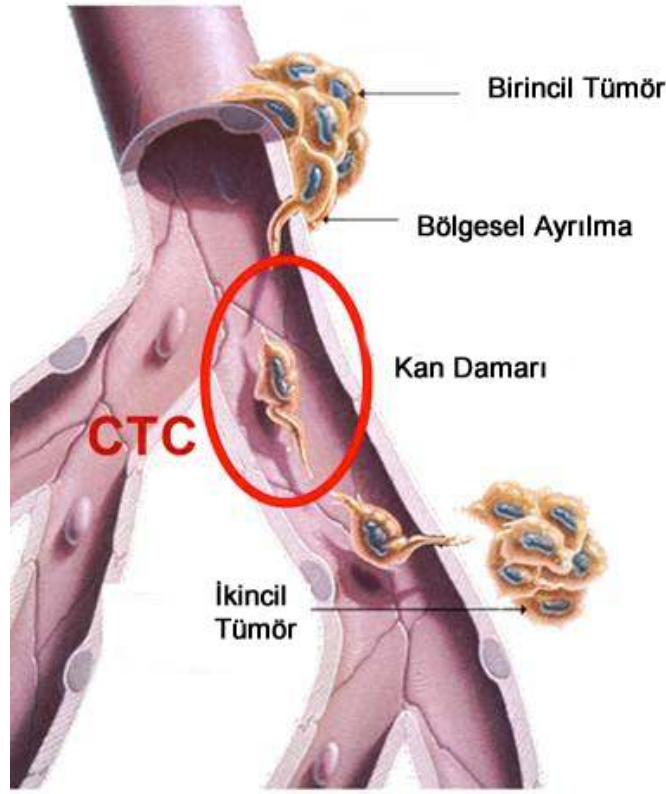


Şekil 2.1 Kanserin oluşumu ve metastaz

Kanser hücrelerinin ikincil organda yeni bir çevrede çoğalma yeteneğini yeniden kazanması hücrenin moleküler yapılanması, yeni çevresi ve çevre ile iletişimini içeren, bilinen ve bilinmeyen birçok şarta bağlıdır. Bu üç faktör toplu olarak kanser hücrelerinin yerleştiği organda büyüme faktörlerinin sentezi ile 0.2 mm den büyük ancak 2 mm den küçük olan ikincil mikrometastazların oluşup oluşmayacağını belirler. Bazı in-vivo fare çalışmalarında mikrometastazın, kanser hücresi damar yatağında durdurulduğunda intravasküler alanda iken başladığı gösterilmiştir. Bir mikrometastaz, anjiogenezin oluşumu ile yeterli oksijen ve besin kaynağına ulaştığında makrometastaza (2 mm den büyük) dönüşebilir [19].

2.2 Dolaşımdaki Kanser Hücreleri (CTC-Circulating Tumor Cell)

Dolaşımdaki kanser hücreleri (CTC) birincil tümör hücresinden ayrılarak dolaşıma katılan ve diğer organlara ulaşabilen hücrelerdir. CTClerin varlığı ilk olarak Avustralyalı fizikçi Thomas Ashworth tarafından 1869 yılında, meme kanseri erkek bir hastanın kanı mikroskopla gözlenerek tanımlandı. 20 yıl sonra, Steve Paget, Lancet'in ilk sayısında "tohum ve toprak hipotezi" ni, yıllar sonra Fidler tarafından yeniden gözden geçirilen "Metastaz, seçilmiş kanser hücreleri (tohum) ve belirli organ mikroçevreleri (toprak) arasındaki geçişe bağlıdır." hipotezine göre açıkladı. [20].



Şekil 2.2 Dolaşımdaki kanser hücresi

Operasyon öncesi birincil ve ikincil tümör dokusundan dolaşıma kanser hücresi saçılabilirdiği gibi operasyon sonrası kalan minimal rezidüel dokudan (MRD) da dolaşıma CTC ler geçmeye devam edebilir. Dolaşıma katılmalarından ve daha önce anlatılan çerçeveden bağımsız olarak CTC lerin farklı bir kaderi de olabilir:

1. Dolaşımda iken anoikis, bağışıklık düzenlenmesi ile dağılma veya atıl duruma dönüşebilir.
2. Damar dışına çıkmanın ardından hücre ölümü gerçekleşebilir.
3. Agresif proliferasyon haricinde gizli mikrometastaz formuna dönüşüp uzun yıllar sessiz kalabilir.(5-25 yıl)
4. Başarılı malign makrometastaz geliştirebilir.

Kanser hastalarının periferik kanından ya kemik iliğinden izole edilmiş tümör hücrelerinin değerlendirilmesi onkolojik araştırmalarda çok önemli bir odak noktası olmuştur. Metastatik kaskattaki hematojen yayılımın önemine 19. yüzyılda birçok

araştırmacı tarafından değinilmiştir. 1889’ da, Paget tohum ve toprak hipotezini geliştirerek kanser hücresleri ve ikincil yerleşim bölgelerinin mikroçevreleri arasındaki ilişkiye dikkat çekmiştir. Son yıllarda kemik iliği, periferik kan ve lenf nodlarındaki tek kanser hücrelerini belirlemek ve karakterize etmek amacıyla birçok protokol belirtilmiş ve meme kanserindeki bu hücrelerin klinik ilişkilerini araştırmak için klinik çalışmalar yapılmaktadır.

2.3 Kanserin Biyokimyasal Belirteçleri

Kanser biyobelirteçleri DNA, mRNA, proteinler, metabolitler olabilir. Bunların dışında apoptozis, angiogenesis ve çoğalma gibi süreçler de biyobelirteçler olarak adlandırılabilir.

Belirteçler, kanser ya da inflamasyon gibi ilgili diğer koşulların varlığında, tümörün kendisi tarafından ya da diğer dokular tarafından üretilebilir. Bu biyobelirteçler sıvıların, dokuların ya da hücre dizilerinin içerisinde çeşitlilikle bulunabilirler. Kanser belirteçleri řu amaçlarla kullanılabilir:

1. Genel popülasyonu görüntülemek
2. Semptomatik hastalarda teşhislerde değişkenlik
3. Kanserin klinik olarak sınıflandırılması
4. Tümörün hacmini tahmin etmede
5. Tedaviye cevabın ölçülmesinde
6. Görüntüleme sayesinde hastalığın tekrarlanmasının tayini
7. Hastalığın ilerlemesinin prognostik indikatörü olarak kullanılabilir.

Çok sayıda değişik tipte ve formda tümör belirteci mevcuttur. Hormonlar; enzimler, glikoproteinler, onkofetal antijen ve reseptörler gibi proteinlerin fonksiyonel altgrupları belirteçlerdir. Bunların yanında, kanserlerdeki genetik mutasyonlar, yükselmeler veya yer değişiklikleri, genetik işaretler olan mikrodizilimlerdeki değişiklikler gibi diğer değişiklikler de belirteç olarak adlandırılabilir. [21]

İdeal bir tümör belirteci kolaylıkla ölçülebilmeli, yüksek hassasiyet ve özgüllükle çalışılabilmesi ve güvenilir olmalıdır. Klinik çalışmalarda az sayıda belirteç rutin kullanıma girmiş olup, kısıtlı sayıda kanser tipi için çalışılmaktadır. Kanser vakalarında bu belirteçler görüntüleme sonuçlarıyla konjuge olup, klinik karar verilmeden önce biyopsi ve klinik patolojik bilgilerle beraber değerlendirilir.

Tablo 2.1 Kanser biyokimyasal belirteçleri

Tümör Belirteci	Kanser Tipi	Keşif Yılı
Alfa-fetoprotein	Karaciğer Kanseri	1963
Kalsitonin	Tiroid Kanseri	1970
CA125	Yumurtalık Kanseri	1981
CA15-3	Meme Kanseri	1984-5
CA19-9	Pankreas Kanseri	1979
Karsinoembriyonik antijen	Kolon Kanseri	1965
ER ve PgR	Meme Kanseri	1970
HER2	Meme Kanseri	1985-6
İnsan koryon gonadotropin- β	Testis Kanseri	1938
Prostat spesifik antijen (PSA)	Prostat Kanseri	1979
Tiroglobulin	Tiroid Kanseri	1956
EPCAM	Kolon, Prostat, Meme kanseri	1979

2.3.1 Epitel hücre adhezyon molekülü-EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)

EpCAM (epitel hücresi yapışma molekülü), kolon ve diğer epitelyal karsinomlarda yüksek ifade edildiği bilinen bir hücre yüzey molekülüdür. EpCAM, hücre-hücre adhezyonu ile ilgili olup çok sayıda klinik çalışmada antikör tedavisinin hedefi olmuştur.

Yapılan bir çalışmada, meme kanseri gen terapisinde yeni bir hedef olarak EpCAM değerini değerlendirmede, normal meme dokusunda, primer ve metastatik meme kanserlerinde, EpCAM mRNA ekspresyonu seviyesini ölçmek için gerçek zamanlı bir ters transkripsiyon-PCR uygulanmıştır. Sonuç olarak primer ve metastatik

meme kanserinde EpCAM in 100-1000 kat fazla eksprese edildiği saptanmıştır [22].

EpCAM iki epidermal büyüme faktörü benzeri hücre dışı alandan, bir sisteinden fakir bölge, bir transmembran alanı ve kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşan Mr 40,000, tip I transmembran glikoproteinidir. Bu, kromozom 4'ün uzun kolunda yer alan GA733-2 geni tarafından kodlanır [23].

EpCAM in proliferasyonu artırma mekanizması ve invaziv potansiyel artışı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Adezyon moleküllerinin, hücre kaderi, farklılaşma ve diğer biyolojik özelliklerin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. EPCAM kalsiyumdan bağımsız bir homotipik hücreler arası yapışma molekülü olarak işlev görür. Hücre, hücreler arası yapışma etkileşimi, hücre agregasyonu, hücre saçılmasının önlenmesi ve hücre ayrımı aşamalarında eksik olan yapışma özelliklerini, EpCAM hücre içinde sentezlendiğinde sergilemektedir. Bu yapışma özelliklerine bağlı olarak EpCAM in metastazı inhibe ettiği ve daha iyi bir prognozla ilişkili olduğu düşünülebilir [24].

2.4 Meme Kanseri

Meme kanseri kötü huylu bir tümör olup memeteki hücrelerden köken alır. Meme kanserinin en yaygın türü, meme loblarından meme ucuna süt taşıyan ince kanallar olan süt kanallarında başlayan tümörlerdir. Meme kanallarından kaynaklanan bu kanser türüne duktal kanser adı verilmiştir. Diğer bir yaygın tipi süt üreten bezlerde oluşan lobüler tümörlerdir. Ayrıca diğer dokulardan kaynaklanan, daha nadir görülen medüller, tübüler, müsinöz gibi tipleri de vardır. İnvaziv meme kanseri, meme kanallarında ya da loblarda oluşarak çevredeki normal dokuya atlayan tümör türüdür. Yağ doku veya lobların olmadığı bölgelerde tümör oluşumu çok nadir bir olaydır. Meme kanseri erkeklerde nadir olmak üzere kadın ve erkek cinsiyetlerinde görülebilen bir kanser türüdür.

Meme kanserinin klinik aşamaları vardır. Bu klinik aşamalar original tümörün boyutu (T), lenf nodları (N) ve metastaz (M) kriterleri ile sınıflandırılır ve derecelendirilir. Buna “TNM Kriteri” denir.[25]

1. T= Birincil Tumor

Tis= Hücre içi karsinom

T1= 2cm çapından küçük

T2= Çapı 2-5 cm arasında

T3= 5 cm'den büyük çaplı

T4= Herhangi bir boyutta; ancak tüm cilde veya meme duvarına yayılmış

2. N= Bölgesel lenf nodu

N0= Herhangi bir bölgeyle ilişkili değil

N1= Yakın bölgedeki lenf nodlarına metastaz

N2= Fikse/gruplaşmış metastaz

N3= İnternal mammaryal lenf nodlarında metastaz

3. M= Uzak Metastaz

M0= Uzak metastaz yok

M1= Uzak metastaz var

Tablo 2.2 Kanseri evreleri

Evre	T(Tumör)	N(Nod)	M(Metastaz)
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II A	T0	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre III B	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre III C	T0/T1/T2/T3/T4	N3	M0
Evre IV	T0/T1/T2/T3/T4	N0/N1/N2	M1

Meme kanseri oluşumu çok hızlı bir süreç değildir. Tümör ortalama 5-7 yılda 1 cm büyüklüğe ulaşır. Yayılımı öncelikle lenf kanalları ile koltuk altı lenf bezlerine ve buradan daha sonra kan yoluyla kemik ve karaciğer gibi uzak dokulara doğru gerçekleşir. Tümörün yayılımını tespit etmek için evreleme yapıp tedaviye karar verilir. Tablo 2.2'ye göre 4 evreden bahsedilebilir. Evre I, II ve bazı evre III tümörler erken evre hastalıktır. Evre III tümörlerinin bir kısmı ve evre IV tümörleri ileri evre olarak sınıflandırılır.

2.4.1 Meme kanseri teşhis yöntemleri

- Elle Muayene
- Mamogram
- Sonogram
- Termografi
- Transilüminasyon Zeromamografi

- Bilgisayarlı Aksiyal Tomografi
- Manyetik Rezonans Görüntüleme
- Biyopsi

2.4.2 Meme kanseri hücre hatları

Meme kanseri hücre hatları, kanserin ilerleme sürecinde gerçekleşen çoğalma, apoptozis ve göç gibi mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için araştırma amaçlı kullanılırlar. Bu modellerin kullanımı genler ve söz konusu mekanizma süreçlerini düzenleyen sinyal yolları hakkında birçok bilgi edinilmesini sağlamıştır.

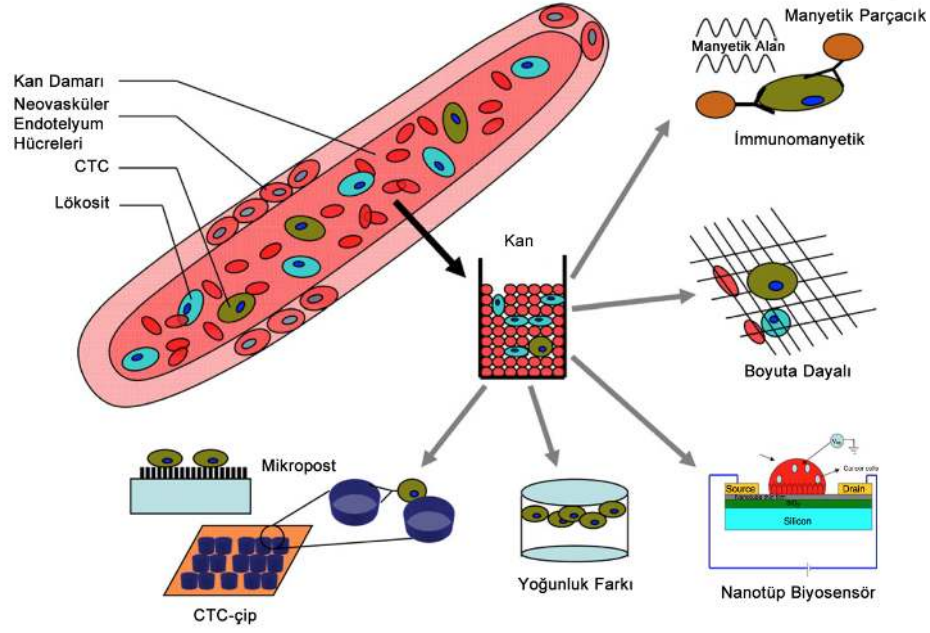
Daha önceden belirlenmiş hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilmekte, genetik muamelelere göreceli olarak uyumlu, iyi tanımlanmış deneysel koşullar altında tekrar üretilebilir ve görülebilir, sayılabilir sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Kemirgenlerden alınan hücrelerle karşılaştırıldığında, organizmalar arasındaki temel farklılıklardan ötürü insan hücreleri insan hastalıklarıyla daha ilgili olduğundan daha sıklıkla tercih edilirler.

MCF-7 Hücre hattı 1970 yılında, 69 yaşında Frances Mallon isimli Beyaz Avrupalı bir kadından izole edilmiştir. Hücreleri meme kanseri hakkında yapılan birçok araştırma için büyük bir bilgi kaynağı oluşturmaktadır. [26]

MCF-7 adlandırması, Michigan Kanseri Kuruluşu'nun (Michigan Cancer Foundation) baş harflerinden oluşturulmuştur. [27] MCF-7 hücre hattından önce kanser araştırmacıları için, birkaç aydan fazla süre yaşayabilen bir memeli hücre hattı elde etmek pek mümkün olmamıştır. Bu hücre hattı sitoplazmik estrogen reseptörleri aracılığıyla estradiol işleyebilmek gibi bir özelliğe sahip olmasını sağlayan memeli epitellerinde bulunan birçok karakteristik özelliği kaybetmemiştir. Tümör nekroz faktör alfa (TNF Alpha) MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini engellemektedir; ancak anti-estrogenler ile muamele insulin büyüme faktörü bağlanma proteinlerinin salgısını düzenleyebilir.

2.5 CTC İzolasyon Yöntemleri

CTC izolasyon yöntemleri CTC'lerin diğer hemotopoetik hücrelerden farklı olan özelliklerine dayanan geniş bir teknoloji paneli içerir. Bunlar, CTC'lerin işaretlendirme gerektirmeyen fiziksel özelliklerine ve immünolojik prosedürlerin kullanıldığı biyolojik özelliklerine dayalı yöntemlerdir.



Şekil 2.3 CTC izolasyon yöntemleri

2.5.1 Fiziksel özelliklere dayalı yöntemler

Fiziksel özelliklere dayalı yöntemler CTC'lerin boyut, esneklik, mekanik özellikler, dielektrik özelliklerden faydalanarak CTC'lerin yüzeyden bağımsız olarak ayrıştırılmalarını sağlayan yöntemlerdir.

2.5.1.1 Yoğunluk farkı ile izolasyon

Bu yöntemde hastaların kan örnekleri içerisindeki hedef hücreler hücre ayırma medyumu kullanılarak santrifüjleme ile ayrılır. CTC'leri ayırmak için genellikle

kullanılan medyum “Ficoll”dür. [28] Antikoagülanlı tüm kan direkt santrifüj tüplerine eklenir. Santrifüjden sonra eritrosit, nötrofil; epitel hücreler, tümör hücreleri, monosit ve lenfosit gibi tek çekirdekli hücreler test tüpleri içerisinde hücre yoğunluk farklarından dolayı farklı katmanlara ayrılır. Tümör hücreleri, bu hücrelerin içinde yoğunlukları en düşük hücreler olduğundan en üst katmanda birikecektir.

OncoQuick Plus kitlerinin kullanımı bu yöntemde çok yaygın olup, ayırma etkinliğini geliştirir ve hassasiyeti artırır. Kit bir steril santrifüj tüpü, bir poroz bariyer ve ayırma medyumundan oluşur. Her ikisinde de tümör hücrelerinin elde edilmesi %70-%90 oranında verimlidir. [29] Hücreleri ayırmadaki göreceli düşük hassasiyet, diğer hücrelerin kontaminasyonu ve tümör hücrelerinin önemli bir kısmının kaybı bu methodun başlıca kısıtlamalarıdır. Yine de bu method floresan ile aktive edilmiş hücre sıralanması (FACS-Fluoresans Activated Cell Sorting) veya immunomanyetik küreler kullanarak hücre ayrılması gibi daha özgül yaklaşımlara öncü bir adım olarak kullanılabilir.

2.5.1.2 Boyut ve mekanik esnekliğe dayalı izolasyon

Dolaşım içerisindeki kanser hücrelerinin (CTC) boyutları ~20-30 μm dir. Diğer hücrelerin boyutlarının ~8-12 μm olduğu düşünüldüğünde CTC’ler bu hücrelerden daha büyüktür. Hücreler arasındaki bu farktan yararlanarak:

- ▶ Membran Filtreler
- ▶ Mikroakışkan Çipler
- ▶ Hidrodinamik Metodlar

kullanılmaktadır.

Membran filtreler

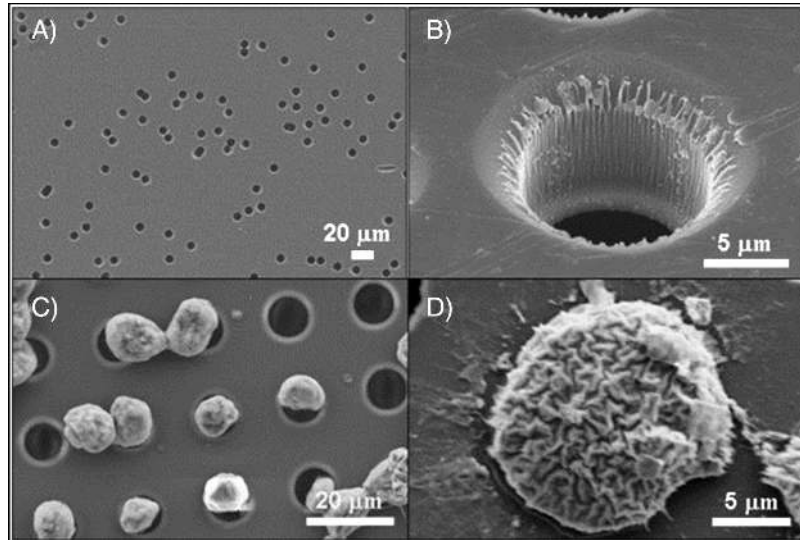
İz-oyma (Track-etched) teknolojisi ile üretilmiş, genellikle polikarbonat malzeme kullanılan filtrelerdir. Filtrenin avantajı tasarımın basit olup kullanımının kolay olmasıdır. Bu yöntem kapsamında kullanılan bir cihaz ISET (Isolation by size of

epithelial tumor cells) bulunmaktadır. Bu cihaz epitel tümör hücrelerinin büyüklüklerine göre izolasyonuna olanak vermektedir. [30]



Şekil 2.4 ISET cihazı

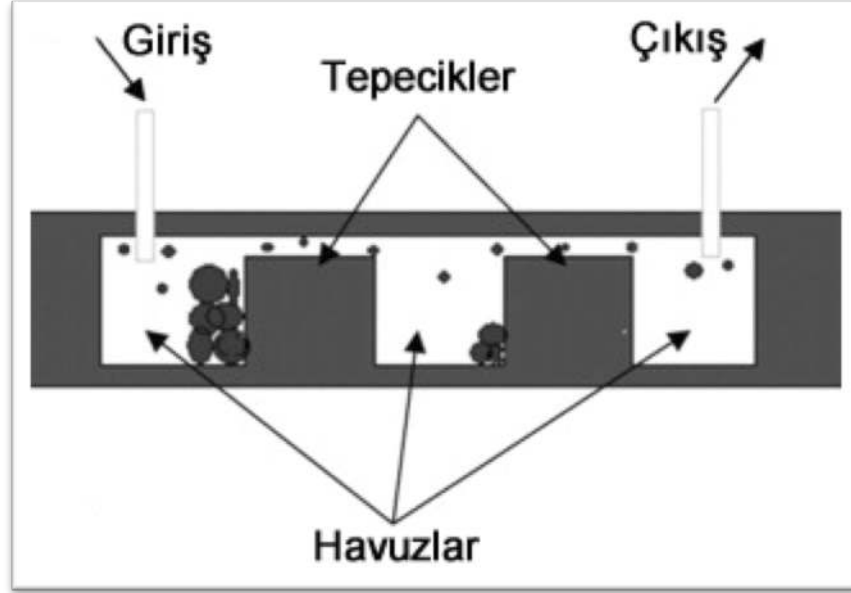
Kanın filtrasyonu ile CTC sayımı yapılmaktadır. İz oyma tipi membran (Track-etch-type membran) kullanılan yöntemde 8 μm çaplı silindirik porlar bulunmaktadır. Belirtilen gözenek çapından daha büyük partiküller için bu filtre bir tutulma gösterir. Tasarımın dezavantajı üzerinde bulunan 8 μm çaplı porların füzyonu sonucu bu boyutların büyüyerek CTC ler için bir kaçış yolu oluşturmaktadır. Bu nedenle bu yöntem CTC yakalama yöntemleri içerisinde yüksek saflık sağlayamamaktadır.



Şekil 2.5 İz-Oyma tipi membran [4]

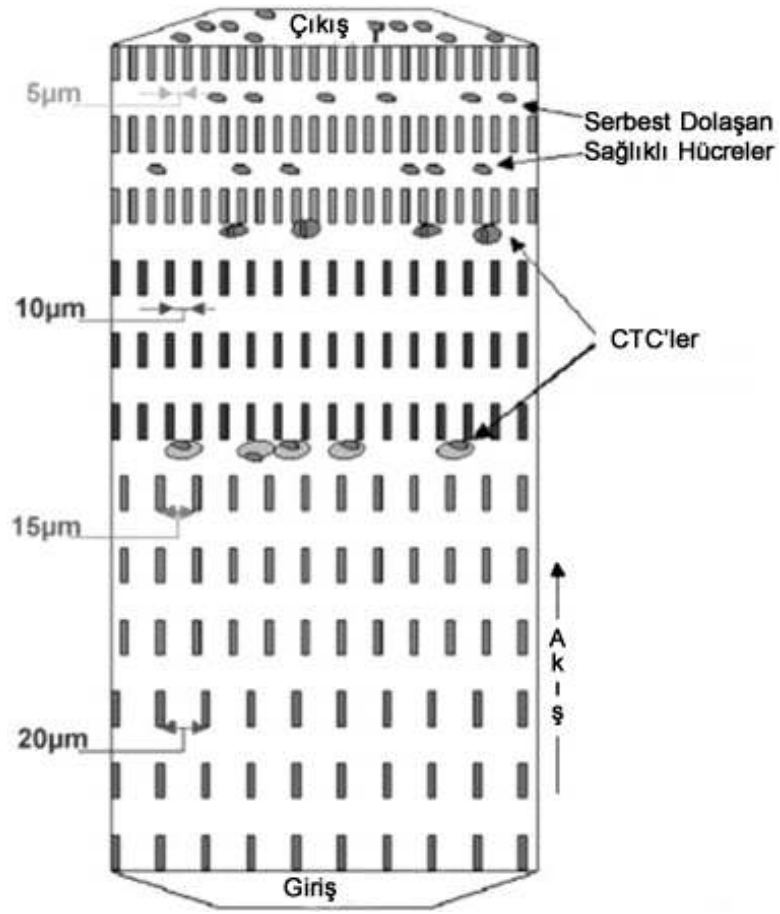
Mikroakışkan çipler

Bu yöntemde laminar akış sağlayan mikrokanallar bulunmaktadır. Kan hücreleri küçük ve şekil değiştirebilir olduğundan mikrokanallar içerisindeki bariyerleri aşarken CTC' ler diğer hücrelerden daha büyük ve sert olduklarından kanallar içerisindeki tasarım sayesinde yakalanırlar.



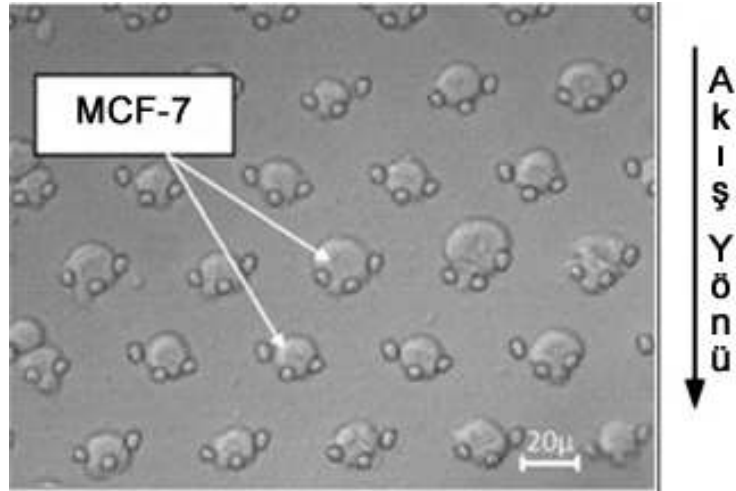
Şekil 2.6 Mikroakışkan çip [4]

Kanalların üst yüzeylerinde kalan açıklıkları mikron düzeyindeki engellerle giderek daraltılırsa değişik büyüklüklerdeki değişik kanser hücreleri cihazın farklı yerlerinde yakalanabilirler.



Şekil 2.7 Mikroakışkan içerisinde daralan kanal yapısı [4]

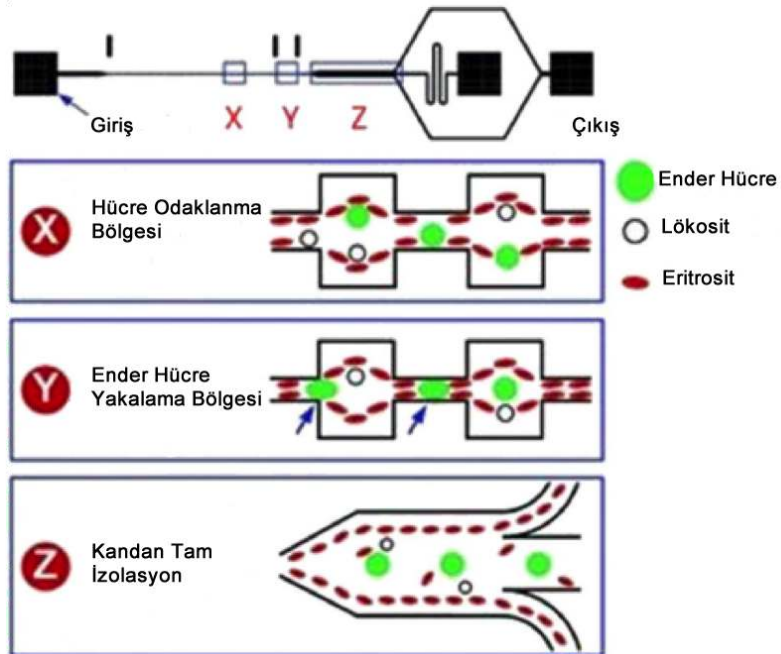
Üçlü mikro sütunlar kullanılarak yarım ay şeklinde oluşturulmuş yapılar ile daha efektif bir yakalanma sağlanabilir. Bu yapı daha yüksek akış hızı sağlar. Böylece; hücrelerin yığılması sonucu kanalın tıkanması ve çok yakın yerleştirilen engellerin oluşturduğu yığın yapılardan kaçınılmış olunur. Ayrıca dizayn, her engelde bir ya da iki CTC takıldığından görsel olarak sayıma ve pratik analize izin vermektedir. Akışı ters yöne çevirerek CTC'ler kolayca sökülüp kültüre edilebilir. [31]



Şekil 2.8 Üçlü mikrosütunlar ile oluşturulmuş yarım ay yakalama yapıları [4]

Mikrosıvı akış ayırıştırması

Hidrodinamik fokus etkileriyle kısıtlı akışı kombinleyen bir yöntemdir. Mikrokanalın daralıp genişleyen yapısıyla beraber pasif kuvvetler, akış içerisinde küçük hücrelerin kanalın duvarlarına yakın; büyük hücrelerin ise orta hatta hareket etmesine neden olur.



Şekil 2.9 Mikrosıvı akış ayırıştırması [4]

Akış önce V-şekilli daha geniş bir bölgeye girer. Pasif kuvvetler küçük hücreleri kanal duvarlarına yakın tutarken hidrodinamik kuvvetler CTC'lerin düz yörüngelerinde kalmalarını sağlar. Böylece CTC'ler özel dizayn edilmiş çıkışlarda toplanırlar. İzolasyon saflığını artırmak için bu çıkışlara seri bağlanmış cihazlarla örnek yeniden işlenebilir.

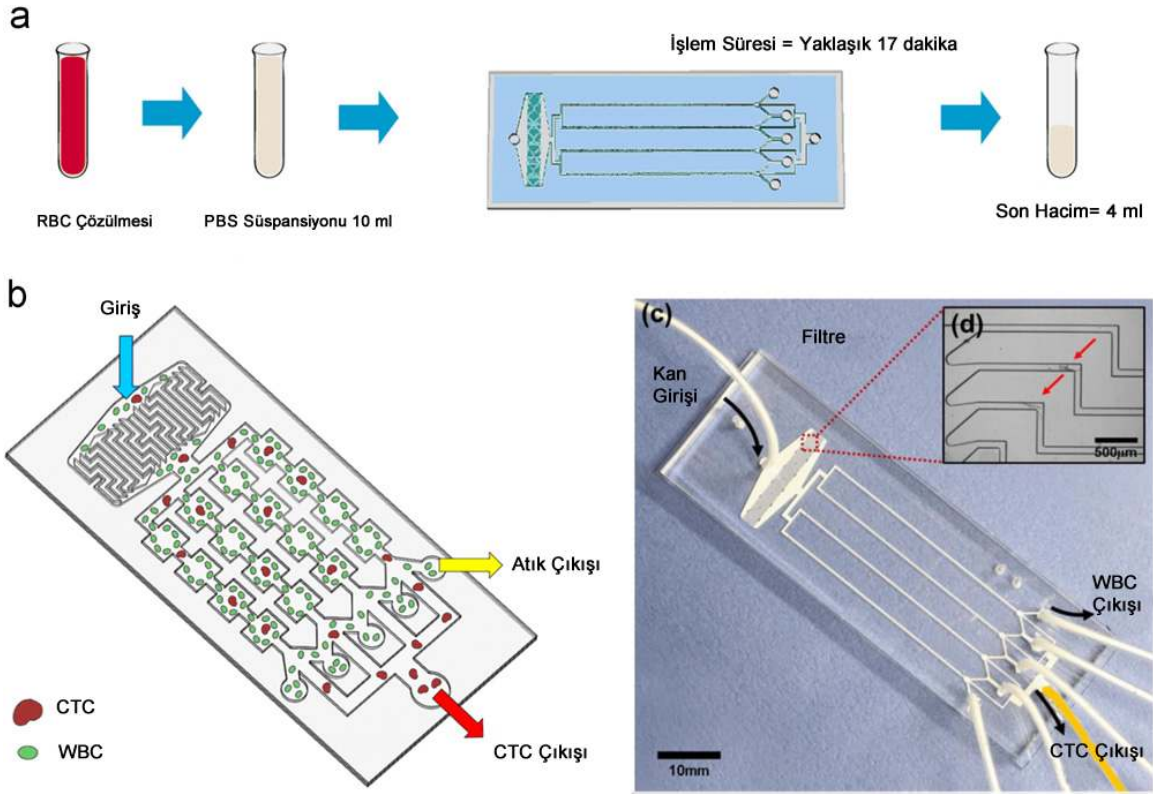
Yeni geliştirilen bir teknoloji olan mikrofiltrasyon cihazı dolaşımdaki kanser hücrelerinin hem yakalanmasına hem de genetik analizinin yapılmasına olanak sağlamaktadır. ScreenCell isimli mikrocihaz hücrelerin %80-82 oranında geri dönüşünü sağlamaktadır. [30] Avantajı; izole edilen hücreler, daha sonraki morfolojik ve genetik analizler için gerekli olan özgül yüzey antijen veya markerlarının zarar görmemesidir. Dezavantajı ise işlenen tümör hücrelerinin yaklaşık %26' sı kaybedilmektedir.

Antikor destekli boyuta dayalı yaklaşım

Bu yaklaşımda kanser hücreleri özgül yüzey antijenlerine bağlanabilen mikroküreler ile kaplanmıştır. Böylece boyutları büyütülmüş olan hücrelerin diğer hücreler ile karışmasının önüne geçilmiştir. Yöntemin diğer bir avantajı ise inceleme yapabilmek için katı mikrokürelerle kaplanan kanser hücrelerinin deformasyonunun önüne geçilmesidir. Yakalanan hücreler üzerindeki, boyuta bağlı olarak hidrodinamik kesmeler azaldığından hücre izlenebilirliği artırılmıştır.[32]

Çoklu orifis akış ayırıştırma (multi-orifice flow fractionation (MOFF))

Bu yöntemde partiküller, daralıp genişleyen bir seri mikro yapı ile oluşturulan mikrokanal duvarları boyunca, eylemsizlik kuvvetine bağlı olarak büyüklüklerine göre yoğunlaşmaktadır. Sistemin çalışması yüzeyden bağımsız olarak dizayn edilmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada operasyonel akış hızı 100-300 µl/dk arasında ayarlanabilmektedir. 4 adet çoklu orifis akış ayırıştırma kanalı yan yana getirilerek paralel MOFF oluşturulmuştur. Amaç; 30 dakika içerisinde ,7.5 ml'den daha fazla örnek ile çalışıp 0.6 ml/dk gibi yüksek bir çıkış elde etmektir. [33]



Şekil 2.10 Çoklu orifis akış ayırıştırma [34]

Standart MOFF cihazında çalışma süresi uzun olduğundan ve çok örnekle çalışılamamasından dolayı sistem geliştirilerek birden fazla kanal paralel olarak bağlanmıştır. Sistem genel olarak bir giriş, bir filtre, 4 paralel çoklu orifis bölümü ve çıkışlardan oluşmaktadır. Çoklu orifis bölümleri daralan kanallar ve genişleyen bölmeler içermektedir. Yapılan çalışma kapsamında Hyun ve arkadaşları kritik kanal uzunluğunu 80 orifis uzunluğuna eşit kabul etmiştir. [34] Kanallar içerisindeki parçacığın davranışı partikülün Reynolds sayısı ile ilişkilidir. (Akışkanın eylemsizlik kuvvetlerinin viskozite kuvvetlerine oranıdır.)

$$Re_p = Re_c \frac{d^2}{D_h^2} = \frac{\rho U_m d^2}{\mu D_h} \quad (2.1)$$

- Rec = kanalın Reynolds sayısı
- d = partikülün çapı
- D_h = kanalın hidrolik çapı
- U_m = kanaldaki maksimum akış hızı
- ρ = akışkanın yoğunluğu
- μ = akışkanın dinamik viskozitesi

Yapılan bir çalışmada ; $Rec = 70$, daralan kanalların kalınlığı $60 \mu m$, uzunluğu $150 \mu m$, genişleyen kanalların kalınlığı da uzunluğu da $300 \mu m$, mikrokanal derinliği $60 \mu m$ olarak belirlenmiştir. [35] Cihazın ayırma etkinliğinin tespiti için hematolojik hücrelerle meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Sağlıklı hastalardan alınan kandan hematolojik hücreler yoğunluk farkı ile ayrıştırılmıştır. Beyaz kan hücreleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri PBS içerisinde aynı konsantrasyonda karıştırılmıştır. Hücrelerin büyüklük ve konsantrasyonları hücre sayacı ile ölçülmektedir. (Scepter 2.0, MilliporeCo.)

Sistemin tasarımında iki şırınga pompası mikrokanal içerisindeki sürekli ve stabil akışı sağlamak için kullanılmıştır. Şırıngalar silikon tüpler kullanılarak biri hazırlanan örneğin verilmesi için girişe diğeri de geri çekme için çıkışa bağlanmıştır. Giriş akış hızı, daralan kanalın Reynolds sayısı 70 alınarak $600 \mu l/dk$ olarak belirlenirken, çıkış hızı CTC geri dönüşünü artırmak için giriş akış hızının $\%40'$ ına ayarlanarak $240 \mu l/dk$ olarak belirlenmiştir. Örnek , epitel hücreleri belirlemek için pan-cytokeratin ile; lökositleri belirlemek için anti-CD45 ile işaretleniyor. Çekirdek DAPI (diamino fenilindol-çift sarmallı DNA boyama) ile işaretlenmiştir.

S-MOFF, büyük örnekler ile kısa sürelerde yüksek çıkışlarla çalışmamaktadır. CTC ayrımı yaklaşık 52 saat sürmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak ve ayrımı etkin hale getirmek için 4 adet s-MOFF'u birbirine paralel bağlarken çıkışı zenginleştirmek için de kırmızı kan hücrelerini kimyasal olarak uzaklaştırma amaçlı

hemoliz tamponu kullanılmıştır. İlk olarak filtre tasarımı yapılmış, filtresiz çalışma ömrü yaklaşık 5 dakika olarak belirlenmiştir. Kanal dizaynı lineer hızı düşürürken 90 derecelik dönüşler yabancı atıkların akışa katılmasını engellemektedir. Filtre kullanımı 1 saatten fazla süre hiçbir hücre hasarına yol açmadan sistemin çalışmasını sağlamaktadır. Her bir MOFF kanalı üç çıkışa bölünmüştür. Ortadaki kanal CTC' ler diğer ikisi ise WBC' ler içindir. CTC çıkışları tekrar tek bir çıkış olacak şekilde toplanmıştır. Kanallardan ayrılan dallar akış direncini düşürmek amacıyla cihazın dışında cihazın içinden daha kısa tutulmuştur. Geliştirme için bilgisayar simülasyonları yapılmış ve kanal uzunluğu ile akış direnci ayarlanarak akış hızının kanalın iki tarafında da aynı olması sağlanmıştır. WBC'ler CTC'lerden küçük olduğundan eylemsizlik kaldırma kuvvetinden daha az etkilenip direk çıkışa giderken CTC'ler kanalın orta noktasına fokuslanmaktadır. Girişten 10 ml örnek enjekte edildiğinde çıkışta 4 ml CTC ve 6 ml artık hacim görülmektedir. İşlem koşulları optimize edildikten sonra metastatik meme kanseri hastalarından alınan kan örnekleri ile çalışılıp p-MOFF'dan geçen örnek ince bir cam üzerinde toplanarak boya ile işaretleniyor. Analiz için kriter: DAPI +, EpCAM +, CD45 – bir boyanma görülmesidir. Hyun ve arkadaşları tarafından sonuçlarda farklılık araştırması için EpCAM yerine cytokeratin kullanılmış ve aynı sonuçlar elde edilebilmiştir. Hücre büyüklükleri ve şekilleri de karşılaştırılmıştır.

2.5.1.3 Dielektrik özelliklere dayalı izolasyon

Hücreler dielektrik olarak adlandırılabilir. Bu, elektriksel olarak nötr ancak polarize olabilirler anlamına gelmektedir. Bir elektrik alan içinde, hücrelerde elektrik dipol momentleri oluşur. Bu momentlerin büyüklük ve yönleri hücrelerin elektrokinetik özelliklerine bağlıdır.

Değişik hücreler uzaysal homojen olmayan bir AC alana maruz kaldıklarında alanın frekans ve genliğine, hücrenin ve taşıyıcı alanın dielektrik özelliklerine bağlı olarak değişik elektrokinetik kuvvetlere maruz kalacaklardır.

Elektroforez ve dielektroforez

Dielektroforez kuvveti mesafe skalasıyla ters orantılıdır; ki bu durumda mikrosıvı elektronik cihazlarıyla entegre olarak çok etkilidir. Bu yöntemi geliştirebilmek adına tabanında düzenli bir AC alan oluşturabilmek için elektrot dizilerinin bulunduğu bir kanal ile dielektroforeze dayalı bir izolasyon sistemi oluşturulmuştur. İzolasyon iki yöntemle olabilir :

1. Aktif dielektroforez kuvveti ile CTC'leri elektrotlar üzerinde yakalamak.
2. Ortam içerisinde itici dielektroforez kuvvetini , yerçekimini ve hidrodinamik kuvvetleri balanslamak.

2.5.2 Nükleik asit temelli yöntemler

Araştırmacılar bu yöntemlerden farklı olarak kanser hücrelerindeki ters transkripsiyon polimer zincir reaksiyonunda (RT-PCR) eksprese edilen özgül mRNA' yı tespit etmişlerdir. Sonuçlar pozitif ise bu durumun indirekt olarak CTC varlığına işaret ettiği düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışma kapsamında karaciğer kanseri CTC belirteçleri olarak seçilen mRNA primerlerinin özgüllüğü sonuçların güvenilirliği açısından çok önemli görülmüştür. Bu belirteçler: α -fetoprotein (AFP), glypican-3 (sitotoksik T lenfosit), sitokeratin 18-19, snail, insan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) dir. Hücreden bağımsız DNA'ların (cf-DNA) serum seviyelerinin, serum aminotransferaz seviyeleriyle ve HCC'li Hepatit C hastalarının (HCV) kanındaki nötrofil ve lökosit sayıları ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Bu nedenle kür tedavisi alan HCC'li HCV hastalarındaki cf-DNA miktarının önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir. [36]

Bu yöntemde kan dolaşımındaki serbest DNA'lar ve RT-PCR dizilimlerinin varlığı nedeniyle yanlış bir pozitiflik görülebilir; ancak AFP varlığı ileri bir metastaz ya da transplantasyon sonrası kanserin tekrarlandığını göstermektedir. miRNA'lar hastalığın ilerlemesi ya da gerilemesi, metastaz ve prognozunda belirteçtir.

Nükleotid saptanması metastaz ve prognozun belirlenmesi açısından önemli bir klinik değere sahip olsa da CTC'lerin saptanması için yeterli bir yöntem değildir. CTC'ler diğer yöntemlerle saptandıktan sonra mRNA seviyelerinin takibi daha sonraki prognozu ve izole edilen tümör hücrelerinin fenotipik özelliklerini belirlemek için kullanılabilir.

2.5.3 Antikor temelli yöntemler

Antikor-antijen özgül bağlanma temeline dayanır. CTC'lerin bağlanıp yakalandığı özel bir matriks kullanılır. Bu matriks iki şekilde olabilir :

1. Manyetik parçacıklar
2. Mikrokanal içerisinde modifiye edilmiş bir yüzey

2.5.3.1 İmmunomanyetik methodlar

Yüzeyine antikor konjuge edilmiş manyetik mikroküreler ile CTC'ler etiketlenir. Bu yöntemde üç faktör önemlidir:

1. Hedef antijenin özgüllüğü ve ilgili antikor ile bağlanma kalitesi
2. Manyetik parçacıkların ve immunomanyetik etiketlemenin etkinliği
3. Etiketli hücrelerin izolasyonu için ayırma mekanizması

Makro düzey ayırma yapıları

Makro düzey yapılar yüksek bir çıkış sunar ve genellikle zenginleştirme adımı olarak kullanılırlar. Etiketlenmiş tüm örnek bir manyetik alana maruz bırakılır. Böylece etiketlenmiş olan hücreler manyetik akış yoğunluğunun yüksek olduğu özgül bir bölgede toplanırlar. Bu yöneme alternative olarak sürekli akışta ayırma methodu kullanılabilir. Örnek ayırma modülü içerisinde sürekli olarak işlenir. İki türlü olur:

1. Manyetik olarak aktive edilmiş bir filtre ile, etiketlenmiş hücreler yakalanır ve alıkonur.

2. Magnetoferez prensibi kullanılarak akış içerisinde etiketlenmiş hücreler saptırılır ve dizayn edilmiş özel çıkışlarda toplanır. [37]

CellSearch

FDA (Food and Drug Administration) onaylı tek CTC sayma sistemidir. Hassaslık, doğruluk ve tekrar üretilebilirlik açısından analitik olarak doğrulanmıştır. CTC sayımının, CellSearch kullanılarak metastatik meme [38], [39], prostat [40] ve kolon [41] kanseri için prognostik belirteç olduğu birçok prospektif çalışmada belirtilmiştir. CellSearch ile CTC sayımı en çok kullanılan method olmasına rağmen özellikle yakalama hassasiyeti ve klinik bulgularla beraber tedavi kararlarını etkileyen bilgiler içermesi yöntemin sınırlamalarındandır. Örneğin küçük olmayan akciğer kanseri hücrelerine sahip hastalarının sadece %10' unun kanında (7.5 ml) 5'ten fazla CTC hücresinin varlığına rastlanması kötü prognoz ile ilişkilendirilir. Bu durum hasta yönetiminde etkili olmaktan çok uzak bir hassasiyettir. [42]



Şekil 2.11 CellSearch cihazı

İmmüno manyetik örnek zenginleştirme ile sitometre yöntemlerini kombinleyen sistem, örnek hazırlama ve hücre etiketlemesi için otomatik bir modül kullanır. Epitel hücre kaynaklı tümör hücrelerinin yüzeyinin EpCAM için pozitif olmasından yararlanır. Manyetik küreler EpCAM antikoru ile kaplanır. Floresan-konjuge antikörler ile işaretlenir. Bu method, meme, kolon ve prostat kanseri için standart

bir yöntem olarak belirlense de HCC gibi diğer kanser türleri için özgül değildir. Kolorektal ve akciğer kanserleri için klinik çalışmalar devam etmektedir.

CTC' ler için sitokeratin; lökositler için CD45; hücre görünürlüğü için DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) gibi özgül belirteçler kullanılır. Zenginleştirilmiş örnek manyetik bir kartuşa transfer edilir. Bu kartuş da dört renkli otomatik dijital mikroskoba yüklenir. Yükleme yapıldığı anda kartuş aktive olur ve manyetik EPCAM işaretli hücrelerin kartuşun yüzeylerine doğru göçü sağlanır. Floresan aktive olduğu için yarı otomatik, 4 renkli floresan mikroskobu ile epitel hücreler belirlenerek izlenebilir. [43]

Dolaşımdaki kanser hücrelerini tespit etmek için kullanılan CellSearch sisteminin çalışılabilirliği yoğun bir klinik test programıyla doğrulanmıştır. Bu teknoloji meme kanserinde CTC' nin prognostik bağlantısını açıklayan klinik dataların çok büyük bir bölümünü oluşturmaktadır.

MagSweeper

Manyetik çubukların bağlı olduğu robotik kollu bir sistemdir. Çubuklar diğer kan hücrelerinin yapışma olasılığını azaltmak için çok ince bir plastikte kaplanmıştır. Sistem birkaç kuyudan oluşur ve manyetik çubuk bu kuyular içinde hareket eder. Hedeflenmeyen hücrelerin uzaklaştırılması yıkama ve salınım kuyularında hidrodinamik kuvvetler etkisiyle gerçekleşir. Çubukların bu kuyular içindeki hızı ve yörüngeleri optimize edilerek kısa sürede yüksek hacimlerde çalışma, yüksek dönüş ve saflık gibi avantajlar sağlanmıştır. [44]

Mikro düzey ayırma yapıları

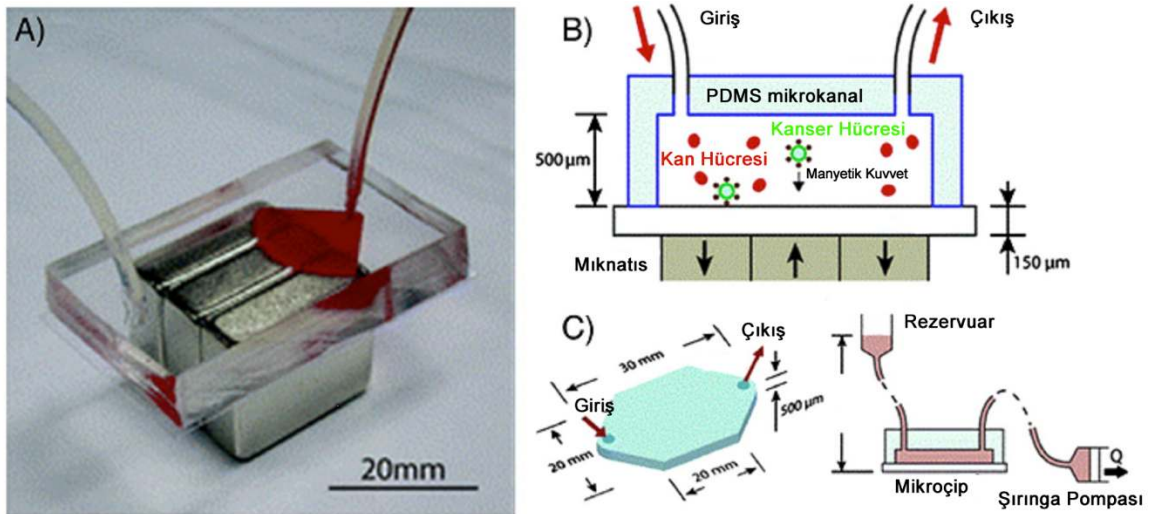
Bu yöntemde mikrofabrikasyon ve mikrosıvı teknolojilerinin avantajlarından faydalanılmıştır. Çalışma için küçük bir alan yeterlidir; çünkü manyetik kuvvete yakın bölgede oluşturulan kuvvetli manyetik akış yoğunluğu kullanılarak efektif bir izolasyon sağlanır. İmmunomanyetik mikrosıvı çip içerisindeki izolasyonun etkinliği, etiketli hücrelerin üzerindeki manyetik ve hidrodinamik kuvvetlerin dengelenmesi ile sağlanmaktadır. Mikrokanal içerisindeki laminar akışın

dinamikleri kontrol edilebilirdir. Böylece işaretli hücreler yüksek manyetik akış yoğunluğunun olduğu bölgede yakalanırken de akış içerisinde özgül bir bölgeye yönlendirilip orada toplanırken de üzerine etkiyen net kuvvet ayarlanabilirdir.

Mikrosıvı çip

Sabit bir mıknatıs üzerindeki dikdörtgen bir mikrokanaldan oluşur. Örnek kanalda ilerlerken bitişik mıknatıs, EPCAM işaretli kanser hücrelerini çeker ve mikrokanalın tabanında sabitler. [45]

Diğer bir yöntem ise; çipin duvarlarında küçük kare kuyucuklar oluşturup sabit mıknatısı yan duvarlardan uygulamaktır. Böylece işaretli hücreler manyetik alan etkisiyle akış içerisinde duvar kenarlarına yönlenererek bu kuyucuklarda yakalanabilir. Diğer yöntemden avantajı yakalanan hücrelerin hedeflenmeyen kesme gerilimlerinin burada olmamasıdır.



Şekil 2.12 İmmunomanyetik tabanlı mikrosıvı çip [30]

Micro hall dedektör

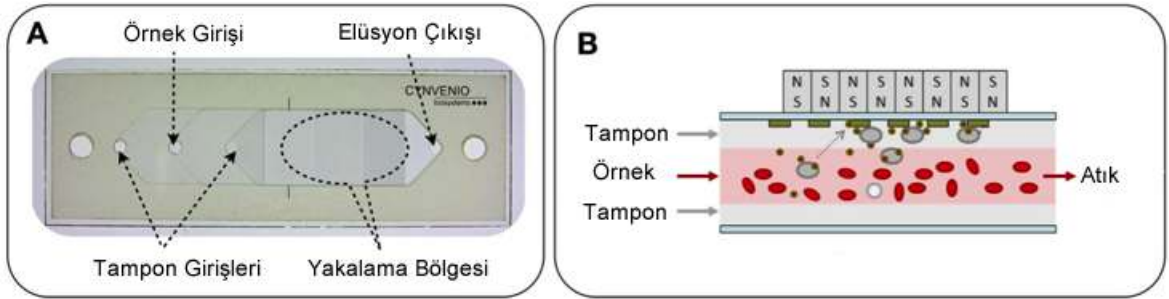
Mikrokanal tabanına entegre edilen dedektörler var. Bunlar hücreler akış içerisinde ilerlerken her bir sensör tarafından bir voltaj değeri oluşturuluyor. Bağımsız dedektörlerle toplanan sinyaller incelendiğinde yalnız CTC'ler sayılmıyor. Aynı

zamanda hücre başına düşen manyetik parçacıklar da belirleniyor. Bu sayede hücre yüzeyindeki bir veya daha fazla belirteç de belirlenmiş oluyor.[46]

Sıvı biyopsi (Liquidbiopsy)

CTClerin hızlı ve sağlam olarak elde edilerek doğrudan moleküler analizini sağlayan otomatik sıvıbiyopsi platformudur. Bu platform hedef popülasyonların moleküler analiz için yeterli saflıkta elde edilmesini birtakım araçlar kullanarak gerçekleştirir. Moleküler analiz; CTC analizini acileyete göre sıralayan basit diagnostik bir araçtan genetik materyale erişim sağlayarak moleküler profilini çıkaran ve gerekli tedaviyi uygulamayı yönlendirebilecek bir kapasiteye sahiptir.

Sistemin akışkan geometrileri elektromanyetik a sınıfı baskılama cihazı ile oluşturulmuştur. Katmanlar hidrofilik polyester film ve yapıştırıcı ile boşluklar oluşturularak elde edilmiştir. Katmanlar daha sonra üst üste yığılarak ve belli noktalardan hizalanarak mikrosıvı kanallar elde edilmiştir. Polyester çok az düzeyde otofloresans ve optik olarak transparandır. Her bir akış hücresi cam slayt üzerine yapıştırılır ve slaytların yerleşimi kontrol edilir. [47]



Şekil 2.13 LiquidBiopsy platformu [47]

Hücre kültürü deneylerinde sabitlenmiş MCF7, HCC1419, H1650, BT20 veya SK-Mel-28 hücreleri kontrol kanına eklenir. Manyetik sıvı, imaj streptavidin kürelerinin titre edilmiş %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) besiyerine biotinlenmiş anti-EpCAM, anti- Her2, anti-MelCAM, anti-Muc1 veya anti-Trop2 eklenmesi ile hazırlanır.

Sıvı biyopsi platformunda CTC eldesi tüm kanın sıvı fazda manyetik sıvı ile işaretlenmesi ve CTC' lerin akış hücresinde yüksek hızda ayrılması ile gerçekleştirilir. Hedef olan nadir hücrelerin verimli olarak ayrılabilmesi için:

- Kan alma veya kırmızı kan hücresi eliminasyonu gibi elde edilme basamakları kısaltılmalı
- İşaretlenmiş hedef hücrelerin ayrıştırılması maksimize edilmeli
- Cihaz yüzeylerine hedef olmayan hücrelerin özgül olmayan bağlanması azaltılmalı
- Örneğin transferinde meydana gelebilecek kayıpları engellemek için ayrıştırma ve sınıflandırma aynı odacıkta gerçekleştirilmeli
- Elde edilen bu az sayıda hücrenin daha sonra tekrar analiz edilebilmeleri için kolaylıkla kullanımı mümkün olmalıdır.

Bu sebeplerle CTC akış hücresi standart patoloji slaytına yakın bir formda ve görüntülemeye olanak verecek şekilde tasarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış tampon çözeltilerin çok katmanlı şekilde akışı ile hedef olmayan hücrelerin odacık yüzeylerine özgül olmayan bağlanması engellenmiştir. [47]

Bu magnetoforetik ayrıştırmanın hedef hücreleri eldesinin değerlendirilmesi için birçok kontrol örneği işlenmiş ve Epcam antikoru kullanılarak tam kandan hedef hücrelerin ayrıştırılma verimlilikleri ve saflık dereceleri incelenmiştir. EpCAM reseptörlerinin yüksekliği sebebiyle MCF7, HCC1419 ve A549 tümör hücre hatları seçilmiştir. Akış sitometrisi epcam reseptörlerinin 30 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Tümör hücre hatları sağlıklı donörün kanı (NHD kan-Normal Healthy Donor) içerisine mililitrede 10, 50 ve 100'er EpCAM eksprese eden hücreler olarak hazırlanmış ve 2 ml örnekler ile CTC akış hücresinde denenmiştir. HCC1419 ve MCF7 gibi orta ve yüksek düzeyde EpCAM eksprese eden hücrelerde antijen yoğunluğu hedef hücreleri yakalamak için yeterli olmuş ve test edilen yoğunluklarda ortalama %98 verimlilik elde edilmiştir. A549 hücreleri MCF7 den 30 kat daha az EpCAM eksprese eder ve %19-%29 verimlilik ile yakalanmışlardır. Bir partikülün manyetizasyon doygunluğu değişkendir ve sahip olduğu reseptör sayısı ve buralara bağlanabilecek manyetik akışkan ile orantılıdır.

CTC yakalamak için EpCAM en çok tercih edilen antikordur ancak bütün epitel kanser türlerinde yüksek oranda eksprese edilmez ve melanoma gibi epitel olmayan kanser türlerinde hücre yakalamak için kullanılamaz. Sistemin çok yönlü olması için bu platform manyetik küreler ile yakalayıcı antikor arasında streptavidin/biotin bağı kullanmaktadır.

Otomatikleştirilmiş birkaç platformun üretilmesi ile sıvıbiyopsi platformunun perifer kandan CTC izolasyonun ve sayılmasının, performans karakterizasyonunun titiz bir şekilde validasyonunun gerçekleştirilmesi mümkün olmuştur. Bu validasyonun gerçekleştirilebilmesi için CTC'ler EpCAM, CK, CD452 hücreleri olarak belirlenmiştir. Validasyonda kullanılan hücre hattı MCF7 (breast adenocarcinoma) ve H1650 (lung adenocarcinoma) dir. Platformun en yüksek performansının belirlenebilmesi için yüksek miktarda epcam ve sitokeratin eksprese eden bu iki hücre hattı seçilmiştir.

Sıvı biyopsi platformunun bazal performans karakteristiği NHD kana ml'de 3ten 900 hücreye 3'er kat artan konsantrasyonlarda MCF7 ve H1650 hücrelerinin eklenmesi ile yüzde hata varyasyon katsayıları ölçülmüştür. Bu aralığın seçilme nedeni, süregelen kanser hasta örneklerinde gözlenen test edilen aralığı aşmasıdır. 9-90 hücre/ml konsantrasyonunda MCF7 hücreleri için % hata, %30' dan azdır ancak doğruluğun bir ölçümü olan %cv (coefficient of variation-varyasyon katsayısı), 90 hücre/ml dışında bütün konsantrasyonlar için %30dan yüksektir. Yüksek %hata ve %cv MCF7 hücrelerinin kümelenmesinden ve konsantrasyonlar hazırlanırken meydana gelebilecek %10' luk varyasyondan kaynaklanmıştır. [47]

MCF7 kümelenmesinden oluşabilecek sayım hataları daha monodispers olan H1650 hücre hattı ile araştırılmış; sonuçta hem doğruluk hem hassasiyette gözle görülür gelişim görülmüştür. % hata %20' lere ve 9-90 hücre/ml daha da aşağılara %cv tüm konsantrasyonlarda %25' ten aşağılara düşmüştür. Bu göstermiştir ki hedef hücrelerin kümelenme yönelimi platformun doğruluk ve hassasiyetinde oldukça etkilidir. Sıvı biyopsi platform minimum işlem ile CTC' leri tam kandan izole edebilen ve saflaştıran yüksek verimli bir sistemdir.

Sıvı biyopsi akış hücresi, standart bir mikroskop ile analiz edilebilir ve hücreler kolaylıkla diğer yöntemlerle analiz için elde edilebilir. Platform monodispers H1650 hücrelerinin ortalama %70' ini, %20' den düşük %hata ve NHD kanda 9-300 hücre/ml konsantrasyon aralığında %25' den az %cv ile elde edebilir. Kümelenen MCF7 hücreleri için ise 9-90 hücre/ml konsantrasyon aralığında ortalama %78' ini %30' dan düşük %hata ile elde edebilir. Her iki hücre tipi için de belirtilen aralıkta elde edilmeleri yüksek oranda doğrusaldır.

2.5.3.2 Bağlanma-yapışmaya dayalı izolasyon

CTC'lerin, biyokimyasal ve topografik olarak modifiye edilmiş bağlanma yüzeylerine afinite özelliklerine dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemler kapsamında antikör kaplı yüzeylerin topografik modifiyeleri ile yüzeylere hücre yapışmasının 10 kata kadar artırılabilirdiği görülmüştür. İmmunomanyetik methodlara karşın bu yöntemde izolasyon işlemi öncesi hücrelere herhangi bir işaretleme yapmak gerekmemektedir.

Çalışmalar statik ve sürekli akış içerisinde yapılabilmektedir. Durağan modelde; örnek yakalanma yüzeyinde bir süre inkübe edilir. Yüzeye yapışmayan, hedeflenmeyen hücreler yıkandığında CTC'ler yüzeye yapışmış olarak kalacaktır. Sürekli akış yaklaşımı ile hassasiyet ve seçicilik artırılabilir. Akış dinamikleri ayarlanarak hedef hücrelerin yakalanma yüzeyi ile etkili teması sağlanırken hedeflenmeyen hücrelerin yapışması hidrodinamik kesme kuvveti ile önlenir.

Bir mikrosıvı çip içerisindeki hedef hücrelerin yakalanma yüzeyine yapışması hidrodinamik kuvvetler, bağlayıcı-reseptör bağlarının dinamikleri ve afinitesi arasındaki dengeye bağlıdır. [48], [49]

Yapışma etkinliği üç koşula daha bağlıdır:

1. Mikrokanalın Reynolds sayısı
2. Hücre-yüzey çarpışma frekansı
3. Çarpışmayı takiben olabilecek yapışma

Akış hızı ve çarpışma hızı izolasyon sürecini etkiler. İkisi de yakalanma yüzeyinin efektif bölgelerini genişleterek artırılabilir. Örnek, içi CTC'lere karşı bir antikor ile kaplanmış düz mikrokanalda ilerler. Burada yüksek hızlı laminar akışlar yüzey-hücre çarpışmasını engeller. Hız düşürülerek hücrelerin düşmesi ve antikor kaplı yüzeye oturması sağlanır. Ancak çok düşük hızlar da izolasyonun etkinliğini düşüreceğinden, pasif karıştırma mekanizması ile mikrokanaldaki laminar akış kesilerek hücrelerin difüzyon hareketleri artırılmıştır. Çarpışma frekansı iki yöntemle daha artırılabilir:

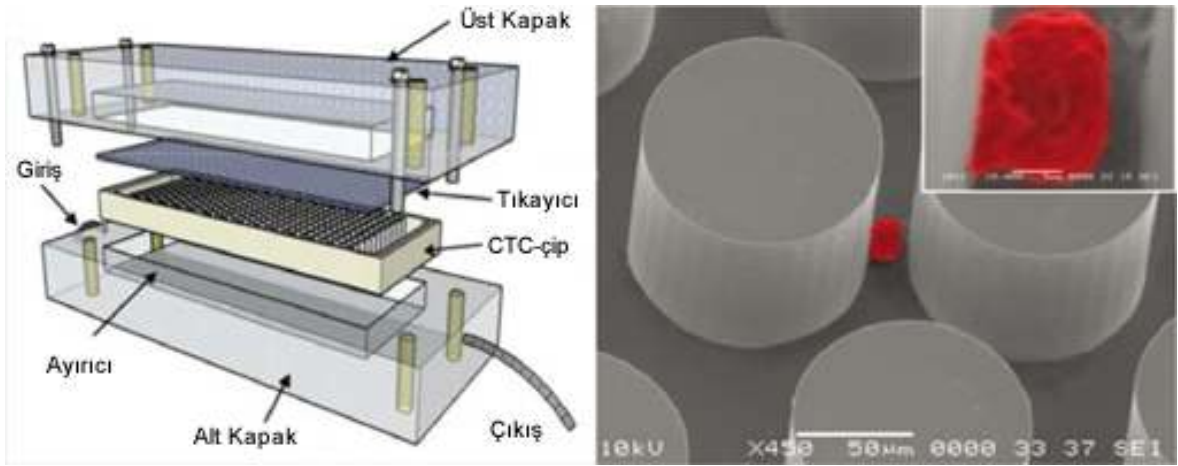
1. Mikrokanal için sinüzoidal bir tasarım oluşturmak.
2. 3 boyutlu yapılar kullanarak efektif yüzey bölgesini genişletmek. [4]

CTC-çip

Bu yaklaşımla avidin kaplanmış mikroküreler bir mikrokanal içerisine gönderiliyor ve biotinlenmiş antikor işaretli hücrelere bağlanıyor. Örnek çipin üzerinden aktığı zaman buradaki antikorlar yüzey antijenlerini tanıyor ve bunlara bağlanıyor. Sonuçlar çipe bağlanan hücre sayıları ile ölçülüyor.

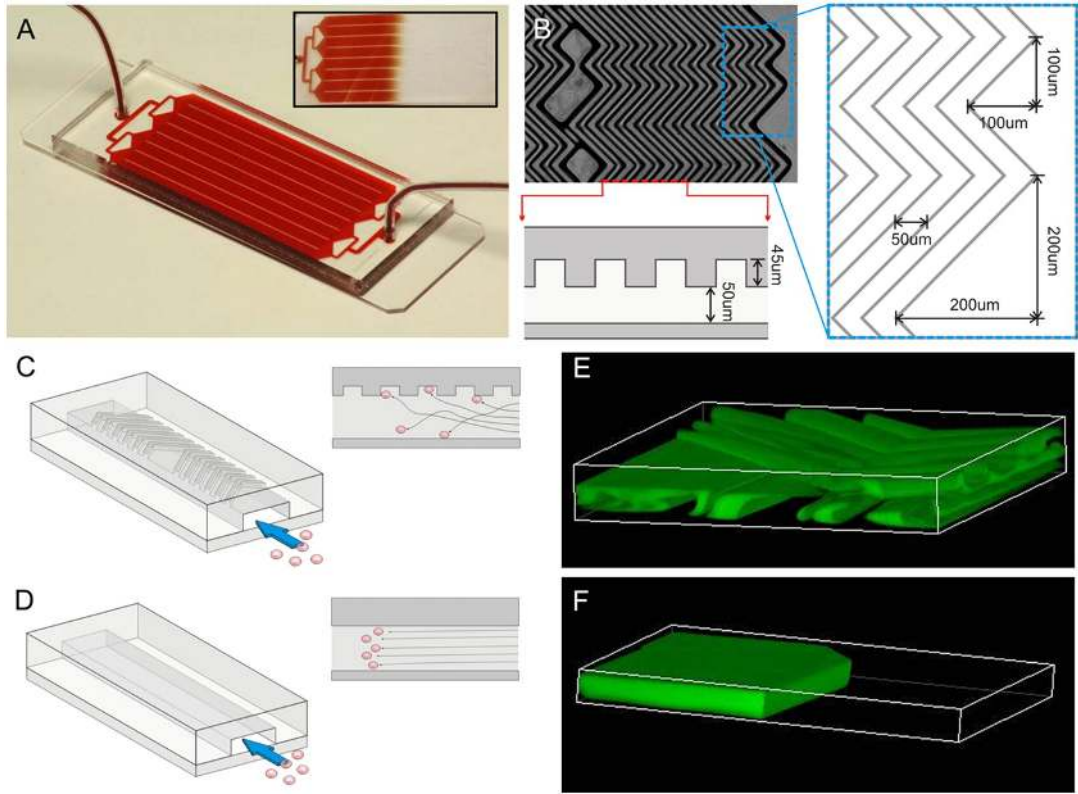
Nagrath ve çalışma arkadaşları [50], direk tam kan işlenmesini sağlayan, 78000 silikon mikropilar dizisi içeren, EpCAM'i hedefleyen antikorlar ile fonksiyonlandırılmış bir mikroçip geliştirdiler. Mikropilar geometrisi 2.5 mL / saat 'lık bir verim ile işlenirken $\geq 60\%$ bir yakalama etkinliği ve yaklaşık 50% 'lık saflıkta bir son örnek ile sonuçlanan, potansiyel temas (970 mm²) için büyük bir toplam yüzey alanı sağlar. Bu CTC çip, çeşitli metastatik kanser tiplerindeki hastaların 116'sından alınan kan örneklerinin 115'indeki CTCleri zenginleştirmek ve tespit etmek için kullanıldı.

Benzer bir mikropilar yaklaşım prostat spesifik zar antijeni (PSMA) hedefleyen antikorlar ile kaplanmış "geometrik olarak geliştirilmiş bir diferansiyel immünolojik yakalama" mikroçipi üzerinde uygulanmıştır. Bu mikroçip ile 85% yakalama verimi ve 68% saflık elde edilmiştir ve CTCleri 18-20 prostat kanseri hastası örneğinden belirlenmiştir. [51]



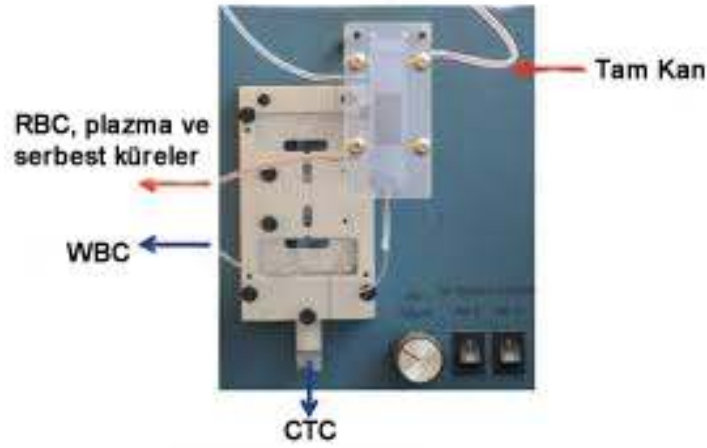
Şekil 2.14 CTC çip [31]

İlk nesil CTC-çipin fabrikasyon zorluklarının üstesinden gelmek için, Stott ve diğerleri [52], girdaplar oluşturularak mikroakışkan karışımını yükselten, geliştirilmiş ikinci nesil balıksırtı çipi (Herringbone Chip) üretmişlerdir. Burada, söz konusu yakalama antikorlar cihazın alt yüzeyi boyunca balık şekilli oluklara konjugedir ve akış desenleri artan yüzey-hücre teması ile sonuçlanmıştır. CTC'ler ve mikrokümeler ve EPCAM için özgül antikorler kullanılarak %91,8' e yükseltilen yakalama verimliliği 15 prostat kanseri hastasının 14' ünde belirlenmiştir.



Şekil 2.15 HB çip [52]

Daha yakın zamanlarda, daha fazla analiz için CTC alınmasını kolaylaştırmak amacıyla, Ozkumur ve diğerleri [53], hidrodinamik odaklama ve boyuta dayalı bir zenginleştirme aşamasının ardından lökosit tükenmesi ya da pozitif anti-EpCAM CTC ayrıştırmasını sağlayan bir “CTC-iChip” geliştirdi. Bu çalışma sonucunda %0,02-42 aralığında değişen saflık ile, en fazla %98.6 yüksek yakalama verimi bildirdiler. CTCler CellSearch kullanılarak 42 örneğin 29’ u ile karşılaştırıldığında 42 metastatik kanser hastası örneğinin 29’ unda tespit edilmiştir.



Şekil 2.16 CTC-ichip [53]

Çip Üretiminin Çeşitlendirilmesi:

- Silikon yerine PDMS gibi değişik malzemeler kullanılabilir.
- Mikropost sayıları ve dağılımları değiştirilebilir.
- Değişik bağlayıcı ve reseptörler kullanılabilir.
- Streptavidin-biotin afinitesinden yararlanılarak hücreler biotinlenmiş kokteyl antikorlar ile yakalanabilir.
- Yüzeyi çeşitlendirirken uzun işlemlerden kaçınmak için mikrokanal içerisinde mikroküreler ile yakalama yatakları oluşturulabilir.(Örneğin mikrokanalın tabanına dikey olarak istiflenmiş mikroküreler kullanılabilir.)

AdnaTest

Ticari olarak temin edilebilen diğer sistem, yarı nicel RT-PCR tabanlı AdnaTestBreastCancer (AdnaGen AG, Langenhagen, Germany) dir. CTCler anti-MUC1 ve anti-EpCAM antikorları ile işaretlenmiş immunomanyetik küreler ile zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme aşamasından sonra, 3 belirtecin (GA 73.3, EpCAM and HER2) mRNAsı multipleks bir PCR yapılarak artırılmıştır. CellSearch ve AdnaTest sonuçları arasında %70–%90 bir uyum oranı bildirilmiştir. CTC tespiti ve karakterizasyonu için farklı yöntemleri karşılaştırmak için ileriye dönük çok merkezli bir çalışma başlatılmıştır. [54] Aktas ve diğerleri [20], ticari olarak temin

edilebilen bu kiti kullanarak, CTC'lerdeki EpCAM, mucin-1 (MUC1) ve HER2 kopyalarını tespit ettiler ve metastatik meme kanserli hastalarda CTClerin önemli bir kısmının EMT ve kök hücre tümörü karakteristiği gösterdiğini buldular.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Deneyin gerçekleştirilme aşamalarında kullanılan kimyasallar ; PBS tablet (Phosphate Buffered Saline-100 Tablet) (Sigma Aldrich, ABD), DMSO (Dimethyl Sulfoxide 950 ml) (Thermo Scientific, ABD), 3-MPS (3-Mercaptopropyl Trimethoxylane-%95) (Sigma Aldrich, ABD), BSA (Albumin Bovine Serum)(Merck, ALMANYA), Paraformaldehit (%16 Formaldehyde solution(w/v)-Methanol Free-10x10 ampule) (Thermo Scientific, ABD), DAPI (4,6 Diamino-2-Phenylindole dihydrochloride hydra)(Sigma Aldrich, ABD), GMBS (N-gamma-Maleimidobutyl-oxysuccinimide ester, 50 mg) (Thermo Scientific, ABD), Neutravidin Protein (Thermo Scientific, ABD), Alexa Fluor 488 Anti-Human CD326(Epcam) Antibody (Biolegend, ABD), Epithelial specific Antigen Monoclonal Antibody (Abcam, ABD)

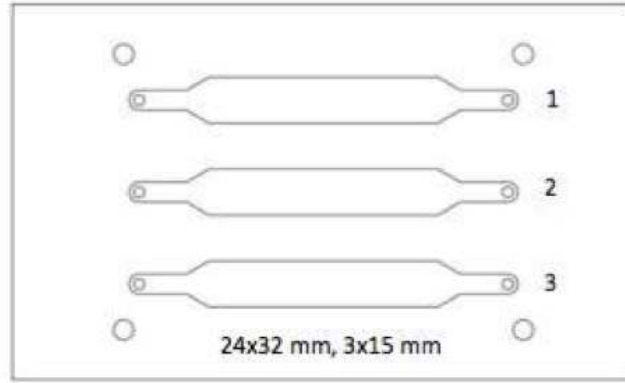
3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deney aşamalarında kullanılan cihazlar; lazer kesim cihazı (laser cutter-PARTNER HS-Z1590), biyolojik güvenlik kabini (Nüve, Türkiye) , ultrasaf su cihazı (Millipore ,Fransa) , ultrasonik banyo (Kudos, Çin) , terazi (Sartoriusi Almanya), vortex (DragonLab, Çin), otomatik pipetler (eppendorf , Almanya), plazma uygulama cihazı (Diener Pica, Almanya), Floresan ve ışık mikroskobu (Olympus IX70-S8F)

Deneylerde kullanılan diğer malzemeler: PMMA (polymethilmetachrilate), DSA (double sided adhesive), cam slaytlar, otomatik pipet uçları, beherler, şaleler ve cımbızlardır.

3.3 Mikrokanal Tasarımı

Mikrokanallar için önce PMMA (polymethilmetachrilate) ve DSA (double sided adhesive-çift taraflı yapışkan) kanal tasarımına uygun olarak hazırlanır. PMMA ve DSA kesimi için lazer kesici cihaz kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Deneylerde kullanılan mikrokanal tasarımı (DSA)

Çipler üç kanallı olarak üç katmanlı tasarlanmıştır. Kanal uzunlukları 15 mm; genişlikleri 3 mm olarak belirlenmiştir. Kanalların derinliği PMMA ve cam slaytlar arasında bulunan çift taraflı yapıştırıcı olarak bilinen DSA'in kalınlığı ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan DSA kalınlığı 50 μm ' dir.

İlk olarak PMMA lazer kesici cihazın içerisine uygun konumda yerleştirilir. CoralDraw'da yapılan çizimler cihaza yüklenir ve kesim işlemi yapılır. PMMA üzerindeki delik kesimini standardize etmek için çalışma kapsamında birçok parametre denenmiştir.

Tablo 3.1 Lazer kesim PMMA delik parametreleri

Deney No	Hız	Dönme Gücü	Normal Güç
1	15	40	40
2	20	40	40
3	30	40	40
4	15	20	20
5	30	20	20
6	20	60	60
7	30	60	60
8	4	30	30
9	2	20	20
10	4	20	20

Sonuçlar görsel olarak değerlendirilerek en uygun parametre değeri seçilmiştir. Görsel değerlendirme, delik çevrelerinde yanık veya sıçramaların oluşup oluşmadığı, kesimin düzgün ya da traşlı olup olmadığı gibi sonuçlar incelenerek yapılmıştır. Delikler için “hız-dönme gücü-normal güç” için sırasıyla “4 30 30” değerlerine karar verilmiştir (Deney No: 8).

Tablo 3.2 Kazıma için kesim parametreleri

Deney No	Hız	Güç	Derinlik
1	150	10	0.1
2	150	10	0.05

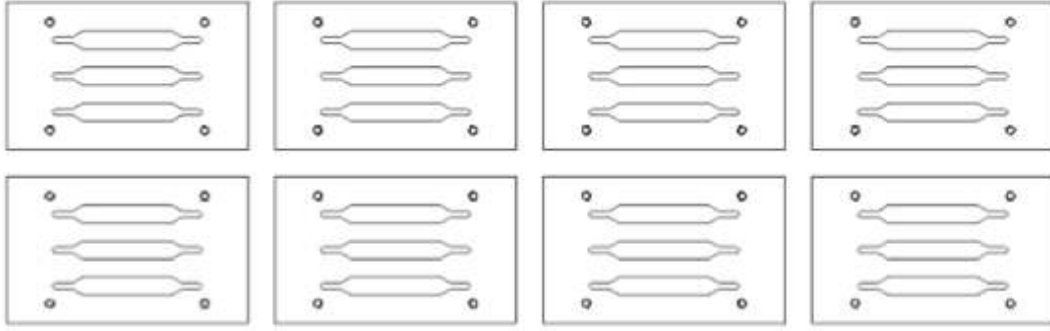
PMMA üzerine yazılan belirleyici yazılar için “engrave” modu seçilmiştir. Hızı ve gücü sırasıyla “150 10” olacak şekilde ayarlanmıştır. Derinlik “0.05” olarak ayarlanmıştır (Deney No: 2).

PMMA çerçeve kesimi için hız, güç ve dönem gücü parametreleri sırası ile “25 60 60” olarak seçilmiştir. (Düşük hızlarda lazerin PMMA’yı istenilen şekilde ve düzgünlükte kesemediği görülmüştür.)



Şekil 3.2 DSA' nın yerleştirildiği boşluklu PMMA yüzeyi

PMMA kesiminde belli bir standarda ulaşıldıktan sonra DSA kesimine geçilmiştir. DSA kesiminde cihaz ızgara yüzeyi düzgün olmadığı için PMMA dan oluşan DSA çerçevesi yapılmıştır.(Şekil 3.2)



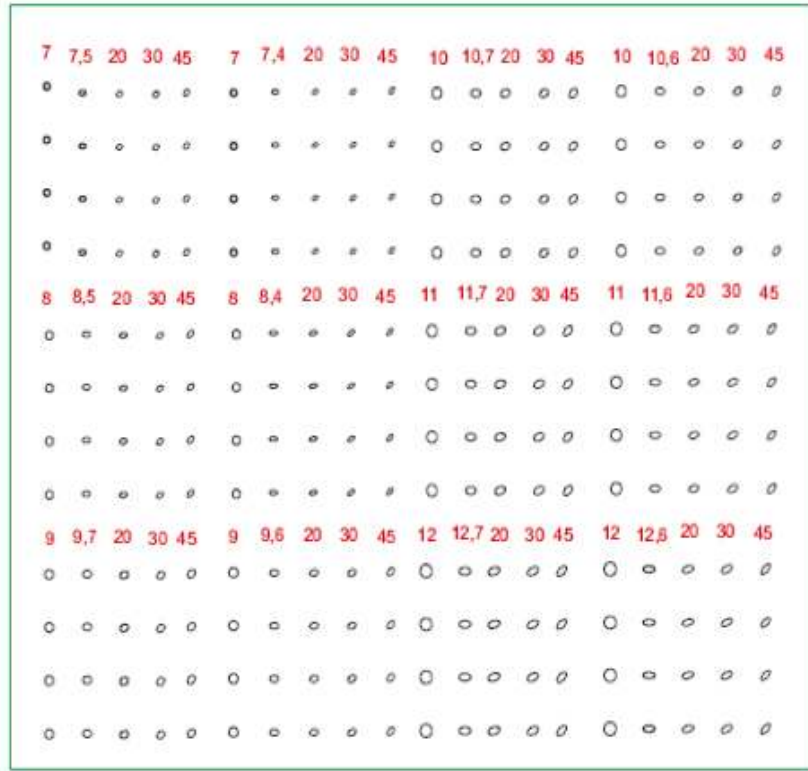
Şekil 3.3 DSA kesimi için çoklu CoralDraw çizimi

DSA' lar aynı panel üzerinde çok sayıda çalışıldığında hafif bir malzeme olması nedeniyle birbirlerinin üzerine düşerek yanmaya sebep olmaktadır. Bunun için mümkün olduğunca az sayıda çalışılmalıdır.

Tablo 3.3 DSA için kesim parametreleri

Deney No	Hız	Dönme Gücü	Normal Güç
1	80	20	20
2	40	20	20
3	40	10	10
4	30	20	20
5	30	15	15
6	20	20	20
7	20	15	15
8	20	10	10

DSA için yapılan çalışmalarda düşük hızlar seçildiğinde kanal çevresinde yanıklar olduğu görüldüğünden yüksek hız değerlerinden başlayarak düşük hız değerlerine kadar birçok değer denenmiştir. DSA ince bir malzeme olduğundan üzerinde oluşan yanıklar ve hızdan kaynaklanabilecek yamuk kesimler göz önünde bulundurulduğunda DSA için en uygun kesim parametrelerinin , “Hız- Dönme gücü-Normal Güç” sırası ile, “20 10 10” olması gerektiği belirlendi.(Deney No: 8)

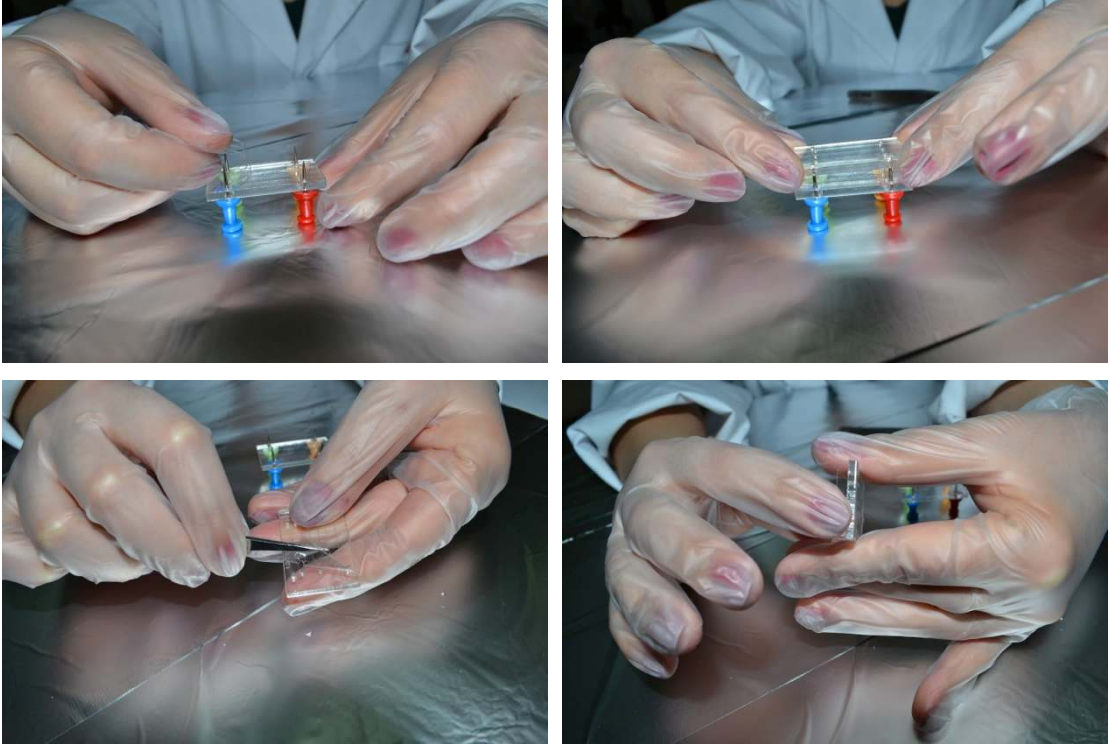


Şekil 3.4 0.7-1.2 mm ebatlarında eliptik deliklerin coreldraw çizimi

Delik kesimlerinde karşılaşılan problemlerden bir tanesi düz açı ile kesilen deliklerin eliptik olarak gözlenmesiydi. Bu problemi gidermek için delik çizimlerinin açılandırılması denendi (20-30-45 derecelik açılar). Kesilen PMMA ler incelendiğinde 45 lik açı verilmiş eliptik deliğin pipetleme işlemi için istenilen özelliklerde olduğu gözlemlendi. Sonuçlar görsel olarak değerlendirildiğinde 0.8mm;0.5mm çapında 45 derecelik eliptik delik seçeneğine karar verildi.

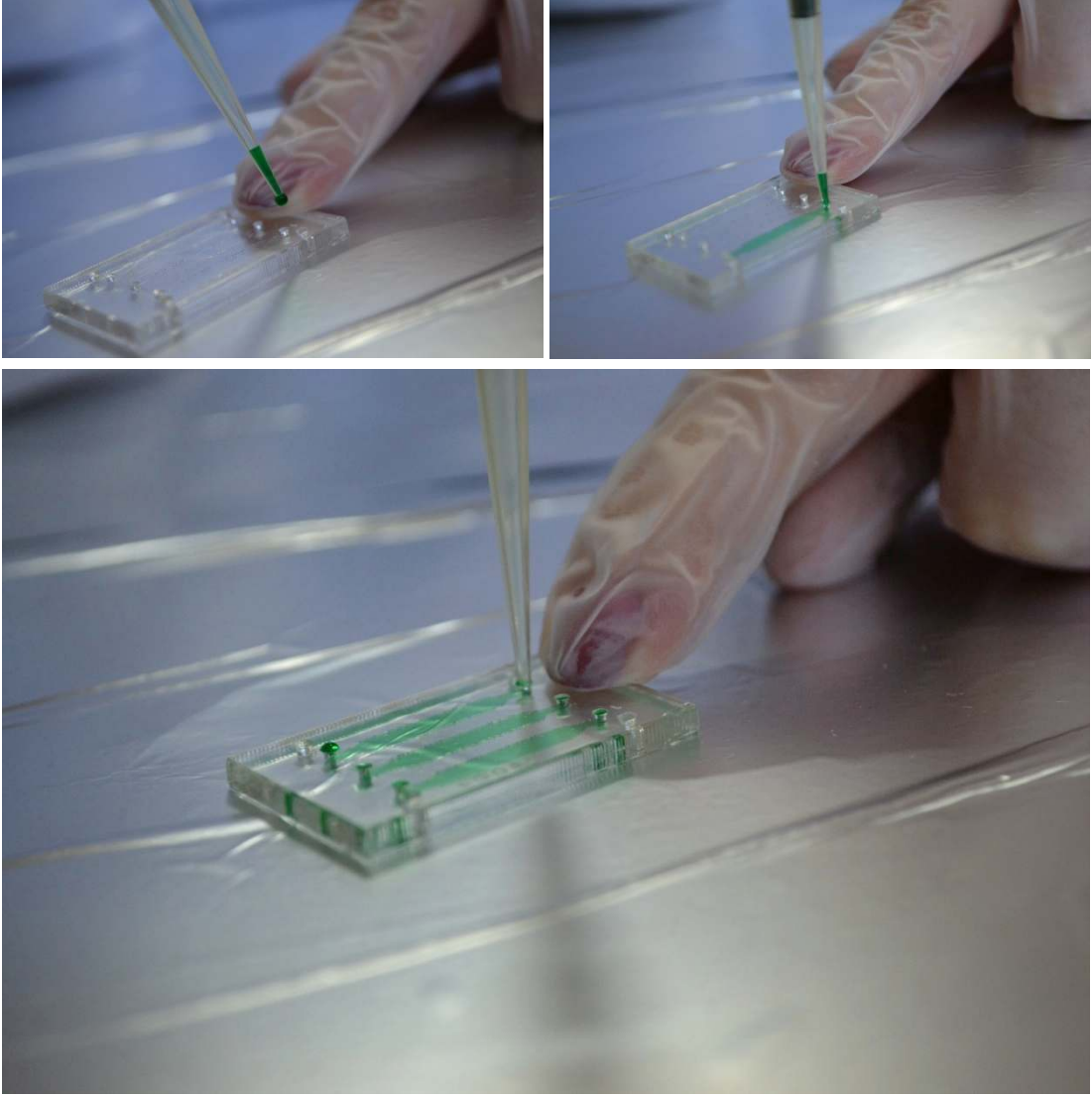
3.4 Çip Yapımı

PMMA ve DSA'ler karar verilen optimizasyon parametrelerine uygun olarak kesildikten sonra çip yapım aşamasına geçilmiştir.



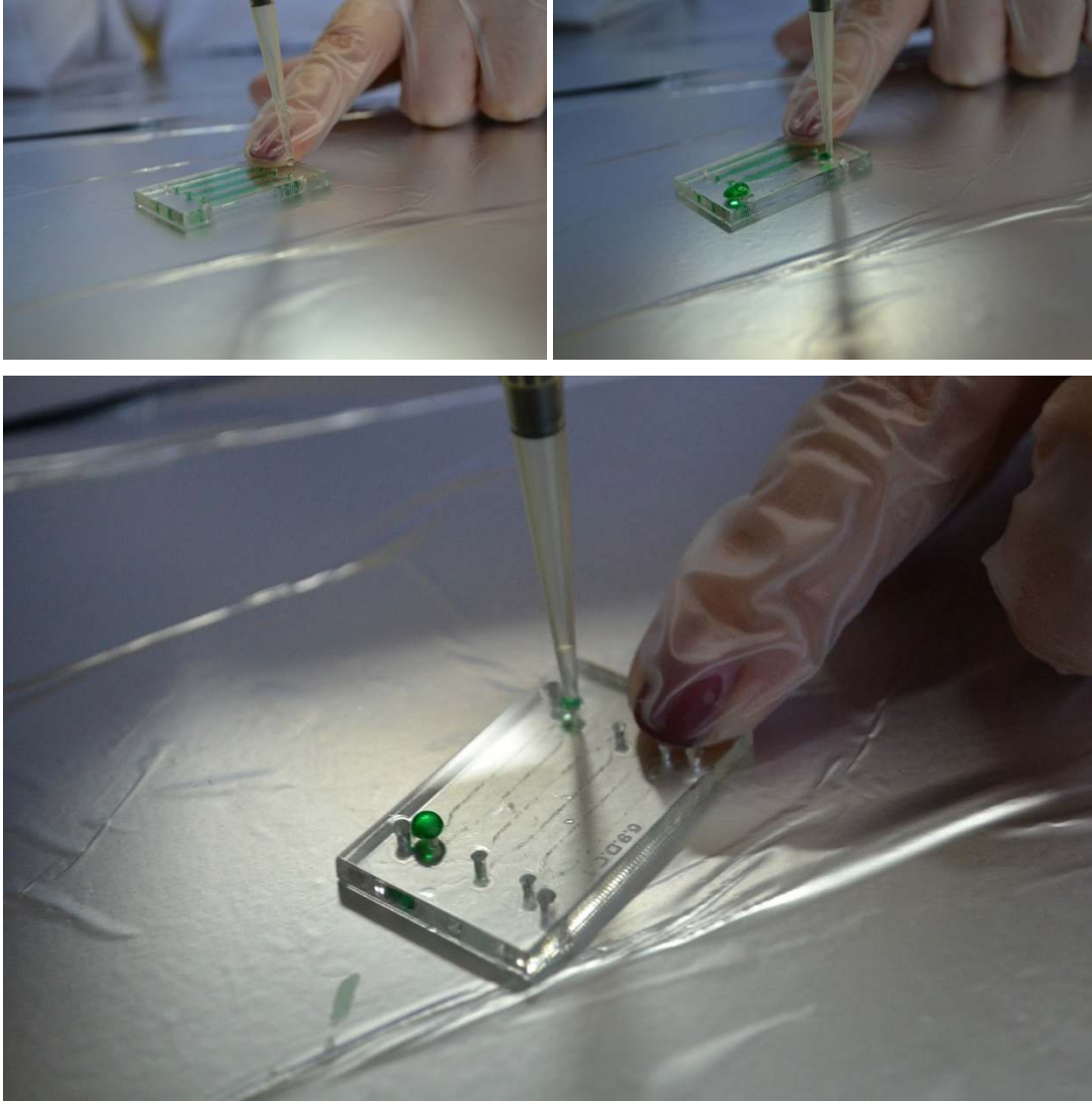
Şekil 3.5 Çip yapımı

Kesilen DSA, bir tarafı soyularak çip yapımı için hazırlanan iskenenin üzerine yerleştirilir. Hazırlanan PMMA DSA ile hizalanarak üzerine yapıştırılır. Birbirine yapıştırılmış PMMA ve DSA iskeleden kaldırılarak DSA'in diğer tarafı soyulur. Bölüm 3.5'te anlatılan yüzey kimyasına uygun olarak hazırlanmış cam slayt DSA'in diğer tarafına yapıştırılarak 3 katlı ve 3 boyutlu olarak tasarlanmış çip hazır hale getirilir. Hazırlanan çiplerde deneyler gerçekleştirilmeden önce kanalların çalışırılığını kontrol etmek amacıyla boya ve PBS ile boyama-yıkama deneyleri yapılmıştır. (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7)



Şekil 3.6 Kanal çalışırılığı boyama deneyleri

Boyama deneyleri esnasında herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Otomatik pipet uçları PMMA üzerindeki giriş deliklerine tam olarak oturmuş, sıvının kanalda ilerleyişi sırasında DSA ile oluşturulan üç boyutlu kanalın dışına taşma görülmemiştir.



Şekil 3.7 Kanal çalışırılığı yıkama deneyleri

Hazırlanan çiplerde boyama deneylerinden sonra yapılan yıkama deneylerinde de herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Kanal PBS ile yıkandığında içerisindeki boyama sıvısı PMMA üzerindeki çıkış deliklerinden çıkmıştır. Yıkama adımları tekrarlanarak boyanın çip içerisinden tamamen temizlendiği yıkama tekrarı sayısına karar verilmiştir.

3.5 Yüzey Kimyası

PMMA'ler kesildikten sonra temizlik aşamasına geçilir. PMMA'ler etanol ile ultrasonik banyoda sonike edilerek temizlenir ve N₂ gazı ile kurutulur. DSA filminin yapışkan iki yüzünden biri soyulur ve PMMA'in temiz kısmına kanal girişleri PMMA üzerindeki giriş ve çıkış delikleri ile denk gelecek şekilde yapıştırılır. Cam slaytlar şale içerisine yerleştirilerek ultrasonik banyo ile sonike edilir. Sonikasyon sonrası saf su ile durulanır, N₂ gazı ile kurutularak petri kaplarına dizilir. Kurutulan cam slaytlar yüzeyinde, oksijen plazma cihazı kullanılarak OH grupları oluşturulur.

Plazma muamelesi sonrasında yüzey kimyasına geçilir. Petri kaplarına yerleştirilen cam slaytların plazma muamelesi uygulanan yüzeyine 3MPS çözeltisi dökülür. Gerekli inkübasyon süresi sonunda etanol ile yıkanan yüzeyler, PMMA üzerine yapıştırılan DSA'in diğer yüzeyi soyularak birbirine yapıştırılır. Bu işlem sonrasında hazır hale gelen mikrokanallara GMBS çözeltisi mikropipetler yardımı ile enjekte edilir. Inkübasyon süresi sonunda kanallara Neutravidin çözeltisi enjekte edilerek 1(bir) gece beklenir. Yapılan bu işlemler sonrasında mikrokanallar, biotinlenmiş antikorler ile MCF-7 hücrelerinin yakalanması için yüzey kimyası uygun hale getirilmiş olur.



Şekil 3.8 Yüzey kimyası uygun hale getirilen çipler

3.6 Kanallara Antikor ve Hücre Enjeksiyonu

Yüzey kimyası gerçekleştirilen kanallara biotinlenmiş anti-EPCAM antikorsi enjekte edilir. Neutravidin-biotin bağlanması için gerekli inkübasyon süresi sonunda kanallar yıkanarak yüzeye bağlanmayan tüm kimyasalın kanal dışına çıkışı sağlanır. Kanallara hücre enjeksiyonu öncesinde, yüzeyde kalan boşlukların özgül olmayan bağlanmalara neden olmaması amacıyla kanallar BSA ile muamele edilir. BSA, yüzey üzerindeki bu boşlukları doldurarak hücrelerin, yüzey belirteçlerine özgül olmayan bölgelere bağlanmalarını engelleyecektir.

Kanal içerisinde antikorler ile kaplanmış yüzey oluşturulduktan sonra MCF-7 meme kanseri hücreleri kanallara mikropipet yardımıyla enjekte edilir. Hücre yüzeyinde bulunan belirteçler ile antikorlerin tanıma ve bağlanması için gerekli inkübasyon süresi beklenir. Bu süre sonunda kanallar PBS ile yıkanarak bağlanmayan hücreler kanal dışına çıkarılır. MCF-7 hücre yüzeyinde bulunan EPCAM'e özgül biotinlenmiş antikor ile kaplanan yüzeyde gerçekleşen hücre tutunmalarını sabitlemek amacıyla, kanallara paraformaldehit muamelesi uygulanır. Paraformaldehit, yüzeye tutunan bu hücreleri sabit tutarak hücre boyama ve görüntüleme, sayım aşamalarında hücrenin kanal dışına çıkışını engelleyecektir.

3.7 Hücre Boyama, Görüntüleme ve Sayım

Kanal yüzeyine tutunan hücreler paraformaldehit kullanılarak sabitlendikten sonra hücre boyama çözeltisi hazırlanarak kanallara enjekte edilir. Hücre boyama çözeltisi içerisinde MCF-7 hücre yüzeyinde EPCAM'e özgül Alexa Fluor anti-EPCAM antikorsi ve hücre çekirdeklerini boyamak için DAPI bulunmaktadır. İki ayrı boyama kullanılmasının nedeni görüntüleme esnasında doğrulama yapılarak çalışmanın güvenilirliğini artırabilmektir. Hücre boyama çözeltisi muamelesinden sonra boyama etkinliğini artırabilmek için mikrokanallar 1(bir) gece inkübe edilir.

Mikrokanallar içerisinde hücre boyama işleminden sonra hücreleri görüntüleme aşamasına geçilir. Kanallar Floresan ataçmanlı bir araştırma mikroskobu

yardımıyla görüntülenir. Mikroskop üzerinde bulunan 4(dört) adet filtreden ikisi (DAPI ve Alexa Fluor 488) ve mikroskobun normal ışık mikroskobu modu kullanılarak görüntüler alınmaktadır. Kanal yüzeyine tutunan hücrelerin çekirdekleri DAPI ile boyanmış ve hücre zarı Alexa Fluor 488 ile boyanmış olduğundan beklenildiği gibi bu iki filtrenin görüntüleri birbiri ile örtüşmektedir.

Kanallar içerisinde bulunan hücrelerin sayımı için üç yöntem vardır:

1. Kanalı boydan boya tarayarak eşzamanlı olarak hücreleri saymak
2. Kanalin her iki filtre ile(doğrulama yapabilmek amacıyla) tüm kolonlarından fotoğraf alınarak daha sonra bu fotoğraflar üzerinden saymak
3. Kanal içindeki hücre dağılımları homojen gözleniyorsa kanal boyunca birbirine eşit uzaklıklarda noktalarda kanalın kolon fotoğraflarını çekerek daha sonra bu fotoğraflar üzerinden saymak (Kanalın başı ortası ve sonu olarak 3 kolon ya da bu noktalardan ikişer kolon alınarak 6 sütunluk veri toplanabilir.)

Kanallarda hücre yakalanması, görüntülenmesi ve sayımı detaylı olarak DENEYLER bölümünde anlatılarak SONUÇ bölümünde tartışılacaktır.

4. DENEYLER

4.1 PBS İçerisinde Farklı Hücre Konsantrasyonlarında Deneyler

MCF-7 hücreleri 1000000 hücre/ml olacak şekilde besiyerleri eklenmiş tüpler içerisinde Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik A.B.D.'den temin edilmiştir. Temin edilen hücreler PBS ile seyreltilerek 500000 hücre/ml, 250000 hücre/ml, 100000 hücre/ml ve 50000 hücre/ml olmak üzere dört farklı konsantrasyon çalışılmıştır.

Her bir ip 3() kanaldan oluşmaktadır; ancak her bir konsantrasyon değeri için 4(dört) kanal kullanılmıştır. (Doğrulama için 3() kanal yeterli olmasına rağmen yaşanabilecek deney aksaklıklarına karşın her bir konsantrasyon değeri için bir kanal fazladan çalışılmıştır.)

Deneylerde 1(bir) adet kontrol çipi kullanılmıştır. Yapılan kontrol deneyinde kanal içerisine yüzey modifikasyonu yapılmış; ancak yüzey anti-EpCAM antikor ile kaplanmamıtır. MCF-7 hücreleri kanal içerisine gönderilerek inkübasyon süresi beklenmiş, kanallar yıkanmış ve paraformaldehit ile muamele edilmiştir. Deney sonucunda alınan görüntülerde kanallarda hiçbir hücreye rastlanmamış olup yöntemin antikor tabanlı bir yöntem olması sebebiyle çalışmamıza özgül olduğu doğrulanmıştır.

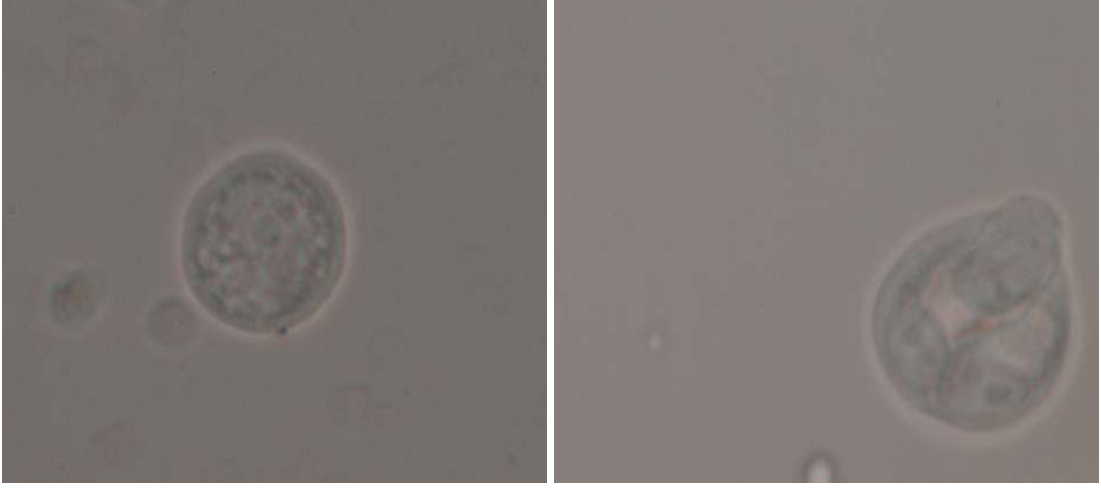
Yapılan hesaplamalar sonucu (Kanal hacmi 2.52 μ l'dir) kanallarda yakalanması beklenen MCF-7 hücre sayıları aşağıda belirtilmiştir (%100 etkinlik için):

- 500000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 1260 MCF-7 Hücresi
- 250000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 630 MCF-7 Hücresi
- 100000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 252 MCF-7 Hücresi
- 50000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda : 126 MCF-7 Hücresi

Tablo 4.1 PBS içerisinde farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücre yakalama etkinlikleri

konsantrasyon	kanal no	hücre sayısı	etkinlik(%)
500000 hücre/ml	c27/k1	800	64
	c27/k2	965	77
	c27/k3	710	56
	c33/k3	940	75
250000 hücre/ml	c14/k1	510	81
	c14/k2	220	35
	c14/k3	475	75
	c30/k1	420	67
100000 hücre/ml	c28/k1	177	70
	c28/k2	168	67
	c28/k3	192	76
50000 hücre/ml	c44/k1	130	103
	c44/k2	105	83
	c44/k3	120	95
	c30/k3	105	83

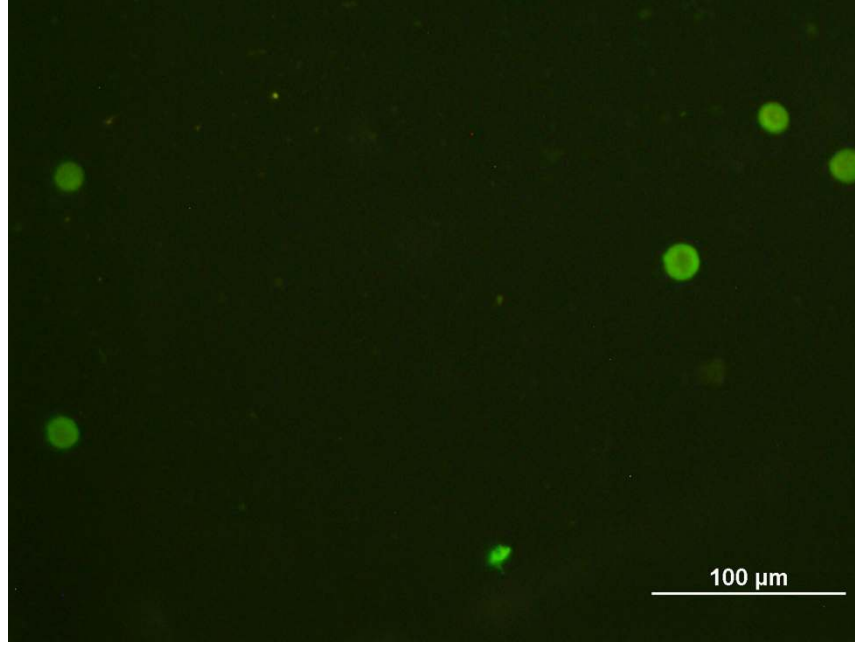
Farklı konsantrasyonlarda çalışılan çiplerin her bir kanalında yakalanan MCF-7 hücre sayısı tabloda görülmektedir. Yakalanan hücre sayısı hesaplamaları Fluoresan ataçmanlı araştırma mikroskopunda DAPI ve Alexa Fluor filtreleri kullanılarak, bu görüntü modlarında çekilen fotoğraflar üzerinden sayılarak yapılmıştır. Kanalların fotoğrafları çekilmeden önce boydan boya incelenmiş, kanallardaki MCF-7 hücre dağılımlarının homojen olması sebebiyle üç kolon fotoğraf çekilmesine karar verilmiştir. Bir kanalda toplam 15 (onbeş) adet kolon vardır. 3 (üç) kolon olarak çekilen fotoğraf üzerinde yapılan hücre sayımı neticesinde bulunan sayı 15 (onbeş) kolon için oranlanıp tekrar hesaplanarak Tablo 4.1'e yazılmıştır. Tablo 4.1'de etkinlik değerleri %70' in üzerindedir (her bir konsantrasyon için ortalama etkinlik değerleri %72-87 arasında).



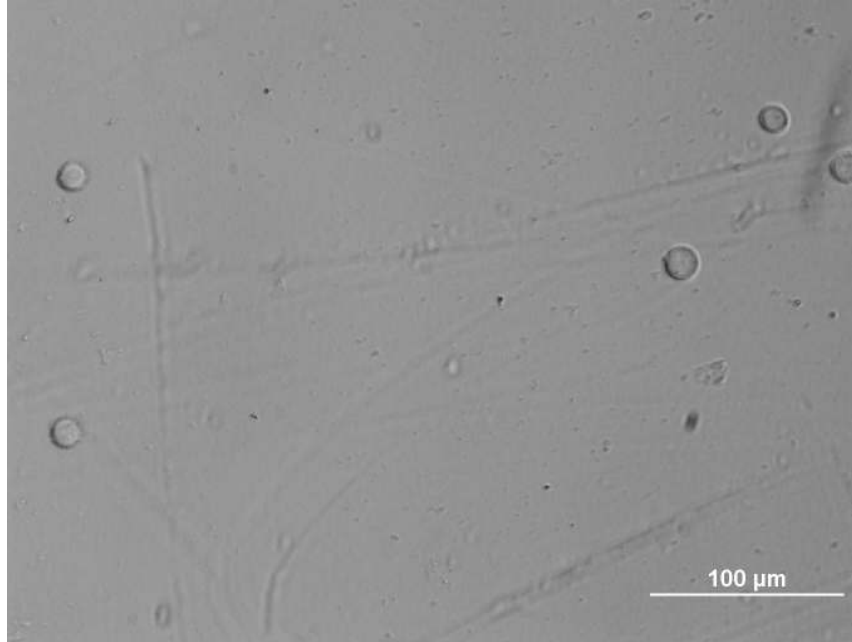
Şekil 4.1 MCF-7 hücreleri ışık filtresi görüntüleri (1000 büyütme)



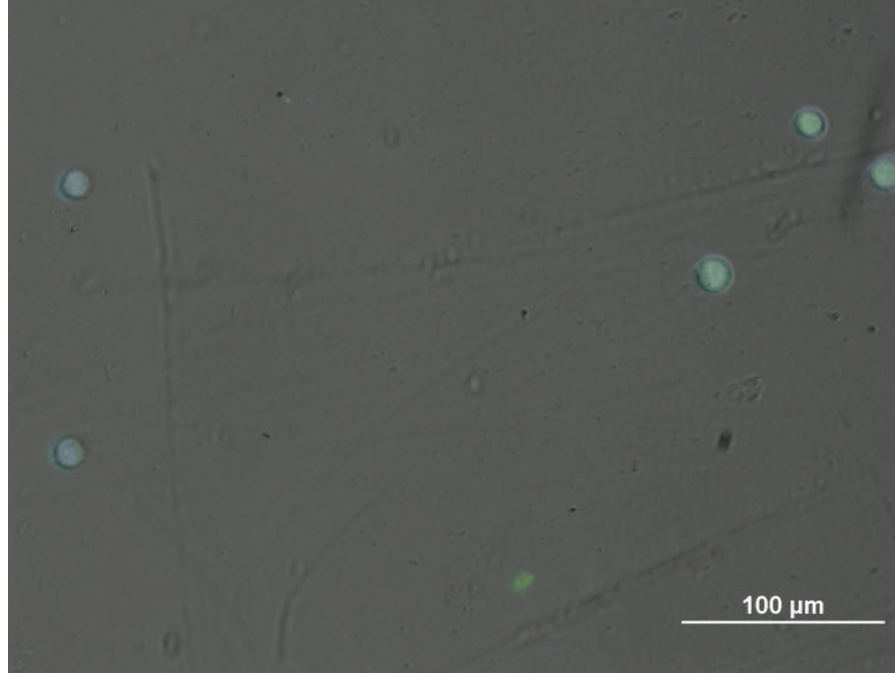
Şekil 4.2 Kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin DAPI filtre ile görüntüleri (200 büyütme)



Şekil 4.3 Kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin Alexa Fluor 488 filtre ile görüntüleri (200 büyütme)

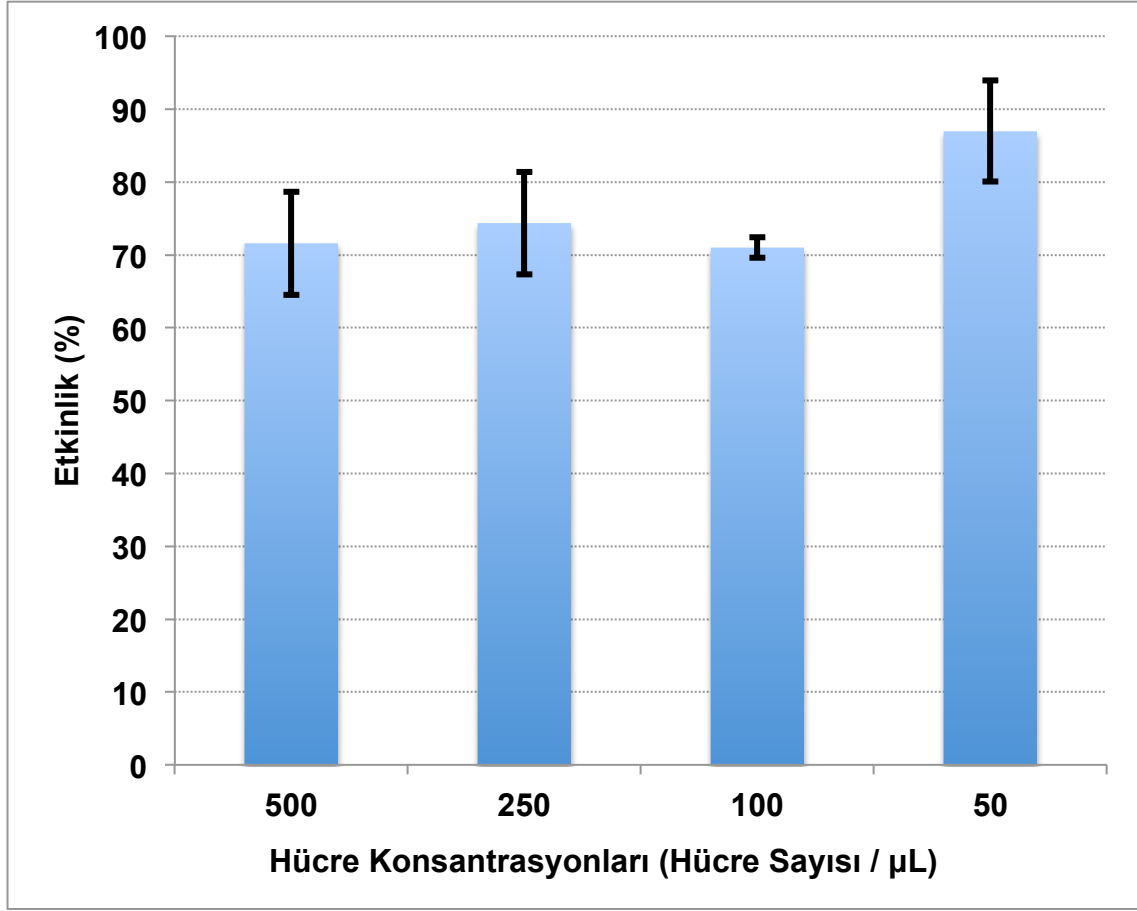


Şekil 4.4 Kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (200 büyütme)



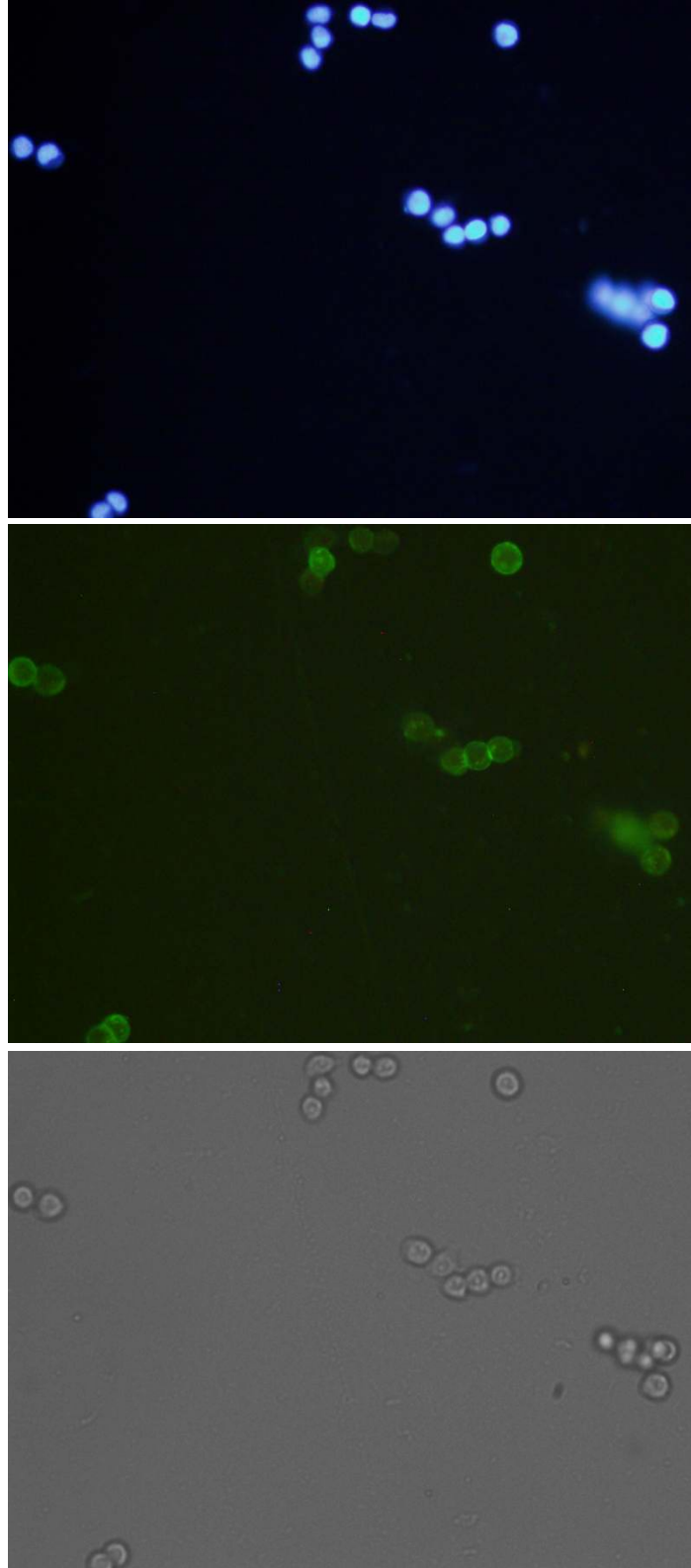
Şekil 4.5 Örtüştürülmüş hücre görüntüleri (200 büyütme)

Şekil 4.4'te kanalın aynı noktasında DAPI, Alexa Fluor ve ışık mikroskopunda elde edilen üç farklı fotoğraf örtüştürülmüştür. Açıkça görüldüğü üzere kanalın aynı noktasında üç farklı filtre ile alınan görüntüler birbirleri ile aynı olup kanal içerisinde özgül olarak MCF-7 hücrelerinin yakalandığına kuvvetli bir işarettir. Görüntülerden herhangi biri üzerinde başka bir hücre görülmemektedir. Yani DAPI ile çekirdekleri boyanmış olan hücrelerin, EpCAM özgül boyama antikoru ile boyanmış olduğu Alexa Fluor filtresi ile doğrulanmış ve ışık mikroskopuyla bakıldığında yine MCF-7 hücrelerinden başka bir hücreye rastlanmadığı görülmüştür.

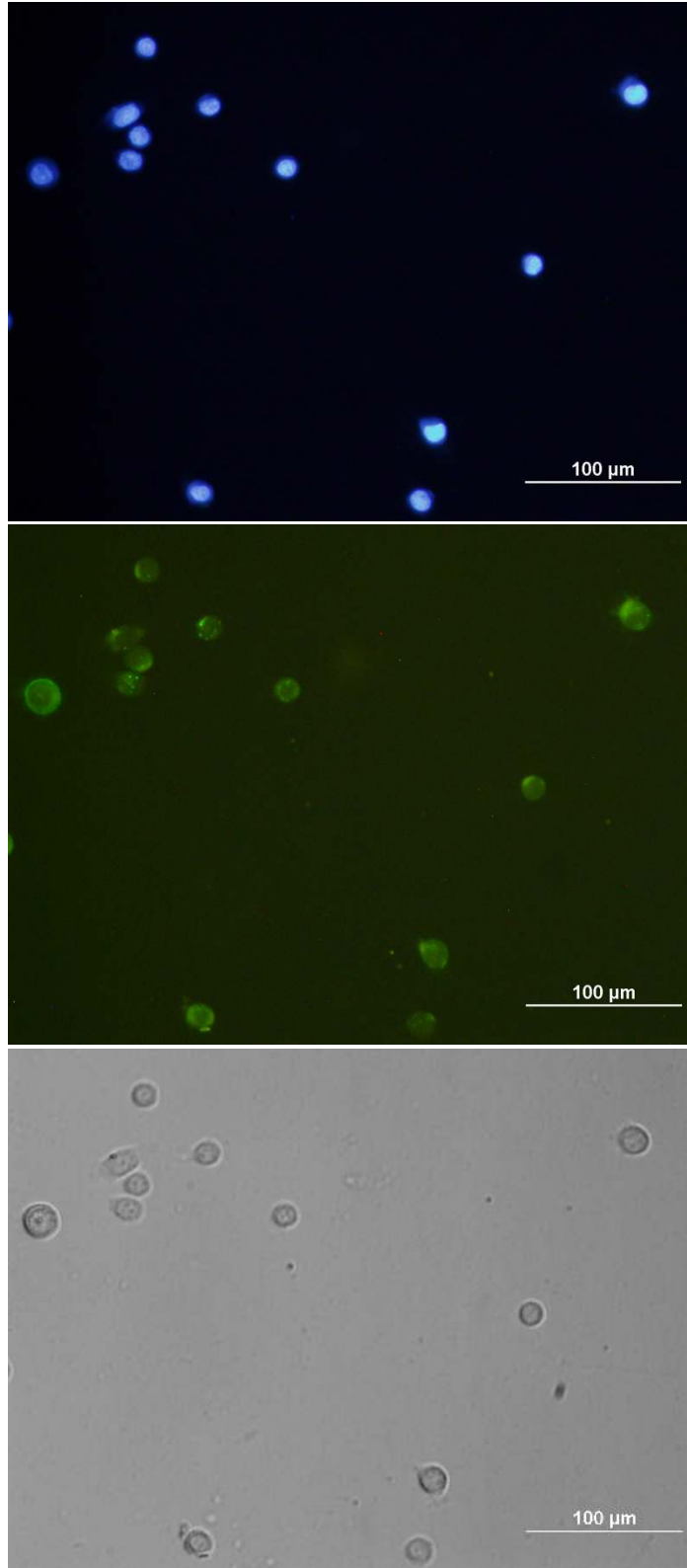


Grafik 4.1 PBS içerisinde farklı hücre konsantrasyonlarında yakalama etkinlikleri

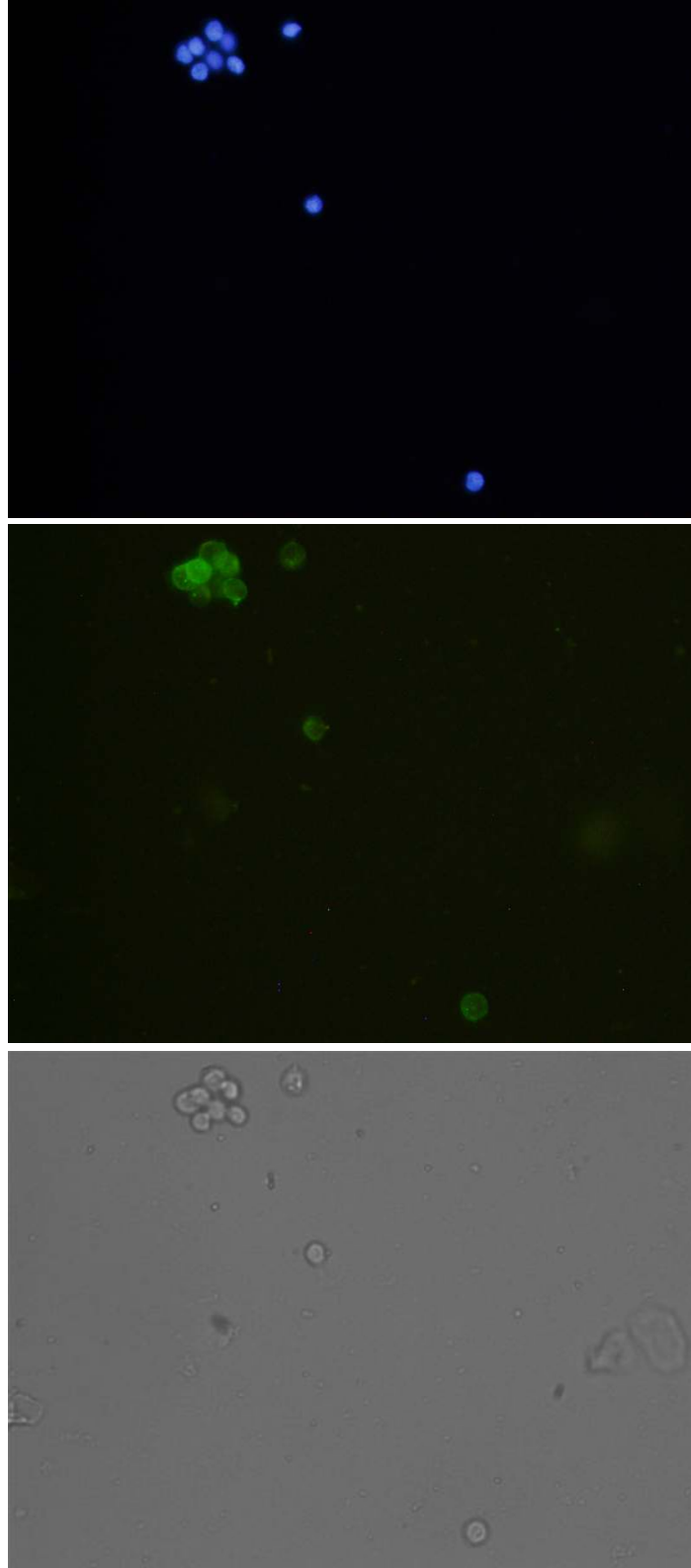
Tablo 4.1’ deki etkinlik değerlerinin ortalamaları alınarak hazırlanan Grafik 4.1’de de açıkça görülmektedir ki hücre konsantrasyonlarını değiştirmek kanallarda yakalanan hücre sayıları için etkinlik değerlerini önemli ölçüde etkilememektedir. Grafik üzerindeki barlar standart hatayı göstermektedir. Sonuçlar arasındaki farklılıkların incelenmesi için SPSS bilgisayar programı kullanılarak ANOVA testi uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmaların yapılması için ANOVA’ dan sonra Tukey testi uygulanmış ve p değeri 0,05’ ten büyük çıkmıştır ($p=0,06>0,05$). Farklı konsantrasyonlarda yapılan deneylerin yakalama etkinlikleri üzerinde yarattığı farklılıkların anlamsız olduğu sonucu değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6 500000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 Büyütme)



Şekil 4.7 250000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 büyütme)

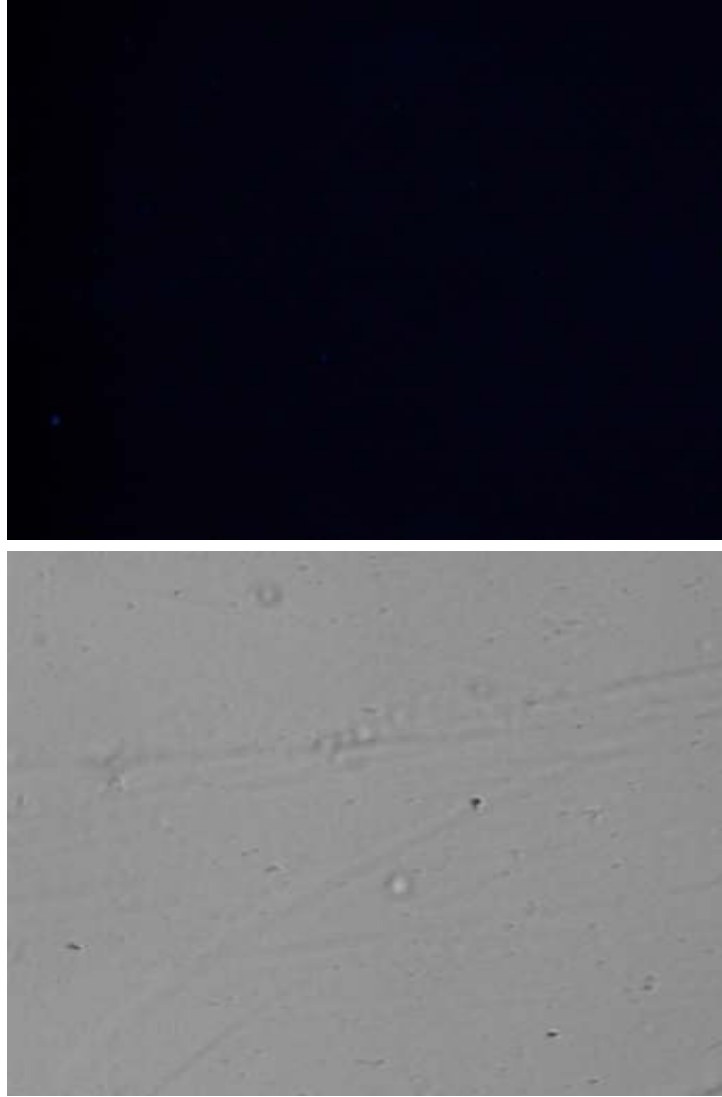


Şekil 4.8 100000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (100 büyütme)

4.2 Kan İçerisinde Farklı MCF-7 Hücre Konsantrasyonlarında Deneyler

MCF-7 hücreleri 1000000 hücre/ml olacak şekilde besiyerleri eklenmiş tüpler içerisinde Başkent Üniversitesi Genetik Bilimler A.B.D.'nden temin edilmiştir. Temin edilen hücreler, kanser hastası olmayan sağlıklı kadın bireylerden alınan kan kullanılarak seyreltilip 250000 hücre/ml, 100000 hücre/ml, 50000 hücre/ml, 20000 hücre/ml, 10000 hücre/ml ve 5000 hücre/ml konsantrasyon değerleri elde edilmiştir.

Her bir konsantrasyon değeri için yine 4 (dört) kanal çalışarak 8 çip ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyde 1 (bir) adet kontrol çipi kullanılmıştır. Kontrol çipinde yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş ancak anti-EPCAM antikor kullanılmamıştır. Sonuçlar beklendiği üzere kanallarda MCF-7 hücrelerine rastlanmamasıdır. Işık mikroskobu ile yapılan kontrollerde de kanallardan birkaç tanesinde duvarlarına yakın bölgelerde az sayıda (birkaç tane) eritrosit görülmüştür.



Şekil 4.9 Kontrol deneyi yapılan çipten DAPI ve ışık filtresi ile bir görüntü
(200 büyütme)

Kanallarda yakalanması beklenen MCF-7 hücre sayıları aşağıda belirtilmiştir
(%100 etkinlik için):

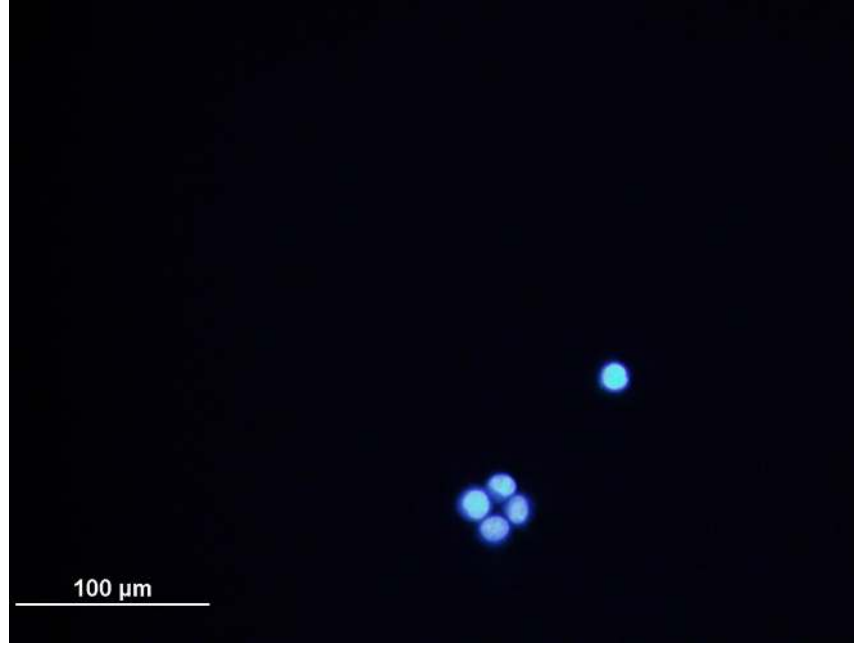
- 250000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 630 MCF-7 Hücresi
- 100000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 252 MCF-7 Hücresi
- 50000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 126 MCF-7 Hücresi
- 20000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 50 MCF-7 Hücresi

- 10000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 25 MCF-7 Hücresi
- 5000 hücre/ml konsantrasyon için bir kanalda: 12 MCF-7 Hücresi

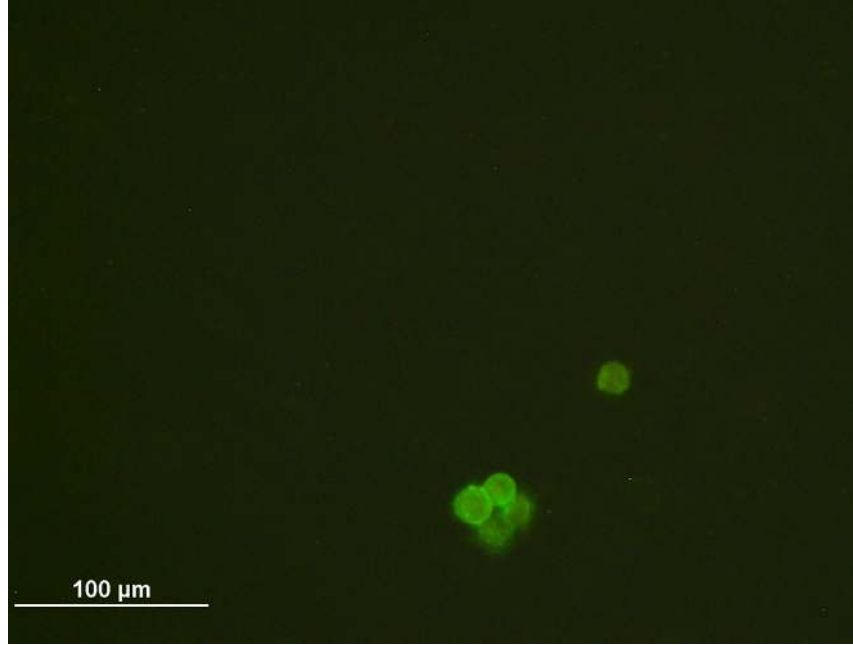
Tablo 4.2 Kan içerisinde farklı konsantrasyonlarda MCF-7 hücre yakalama etkinlikleri

konsantrasyon	kanal no	hücre sayısı	etkinlik
250000hücre/ml	c20/k1	450	69
	c20/k2	335	53
	c20/k3	375	58
	c47/k1	258	41
100000hücre/ml	c45/k1	159	63
	c45/k2	176	70
	c45/k3	182	72
50000hücre/ml	c3/k1	87	69
	c3/k2	78	62
	c3/k3	36	29
	c47/k3	90	71
20000hücre/ml	c6/k1	32	64
	c6/k2	35	70
	c6/k3	29	58
	c7/k1	30	60
10000hücre/ml	c4/k1	16	64
	c4/k2	17	68
	c4/k3	18	72
	c7/k2	20	80
5000hücre/ml	c8/k1	8	67
	c8/k2	2	17
	c8/k3	8	67
	c7/k3	7	58

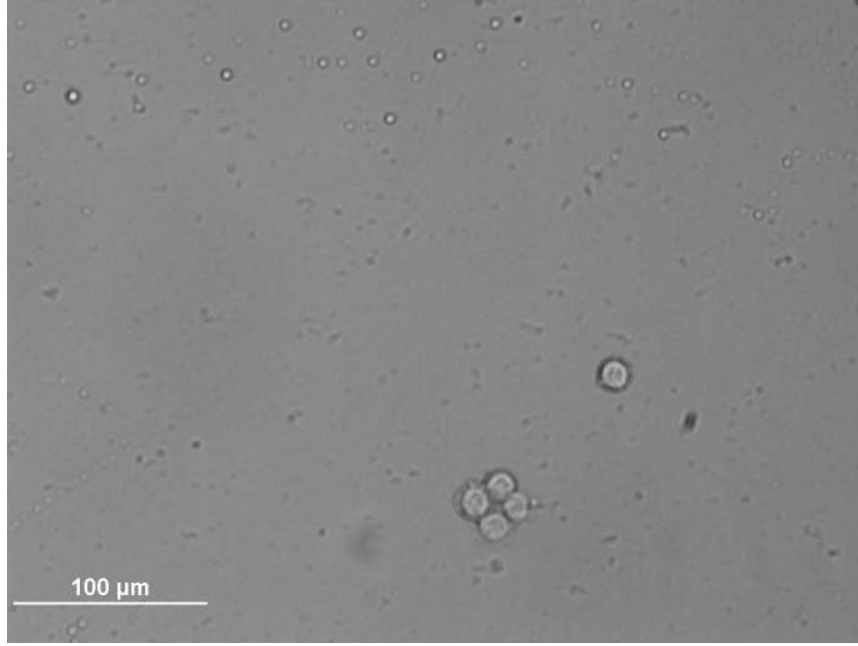
Çalışılan konsantrasyonlarda çiplerin her bir kanalında yakalanan MCF-7 hücre sayıları Tablo 4.2’de görülmektedir. Kanallarda hücre sayımı mikroskop ile analiz esnasında görsel olarak sayılmıştır. Yüksek konsantrasyon değerlerinde örneklem yöntemiyle seçilen kanalların bütün sütun ve satırlarının fotoğrafları çekilmiş, göz ile yapılan sayım fotoğraflar üzerinden tekrar yapılarak doğrulanmıştır.



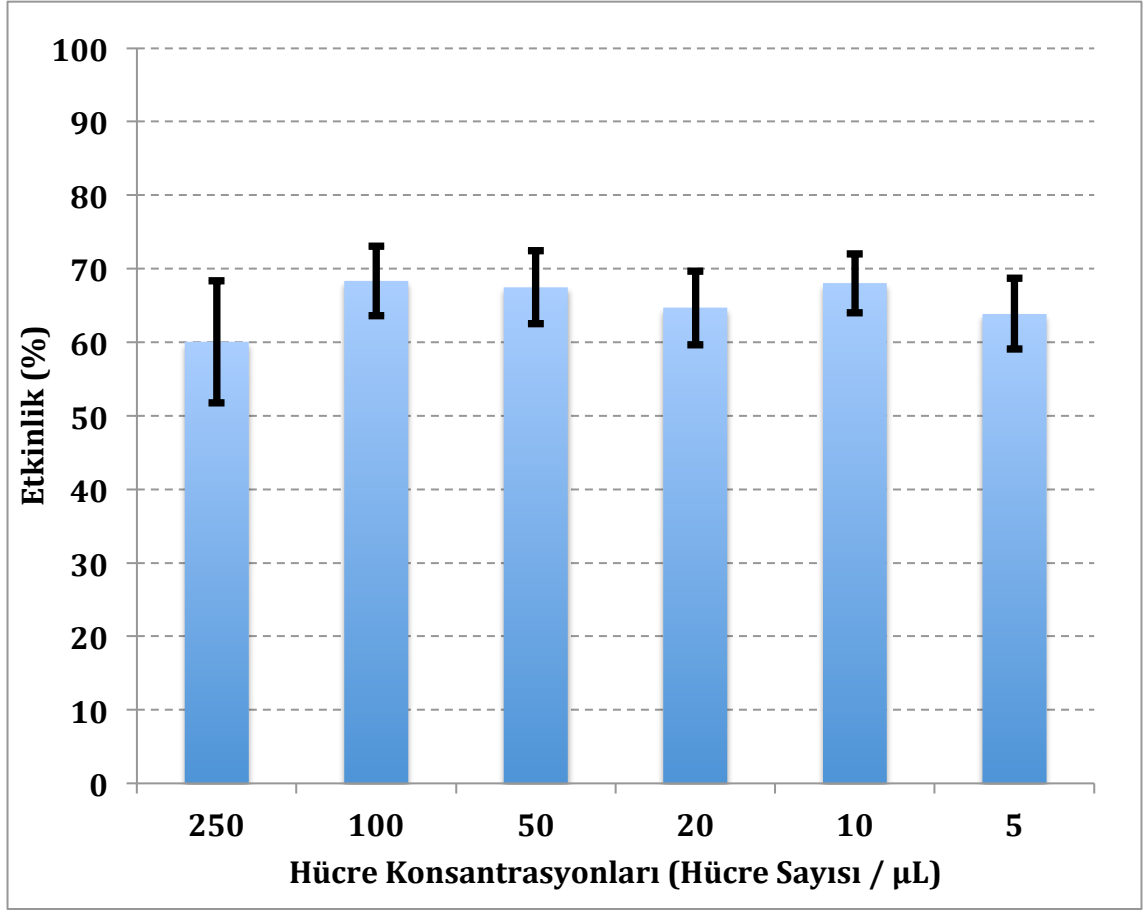
Şekil 4.10 Kan içerisinde kanallarda yakalanan MCF-7 hücreleri DAPI filtre görüntüleri (200 büyütme)



Şekil 4.11 Kan içerisinde kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin Alexa Fluor filtre görüntüleri (200 büyütme)

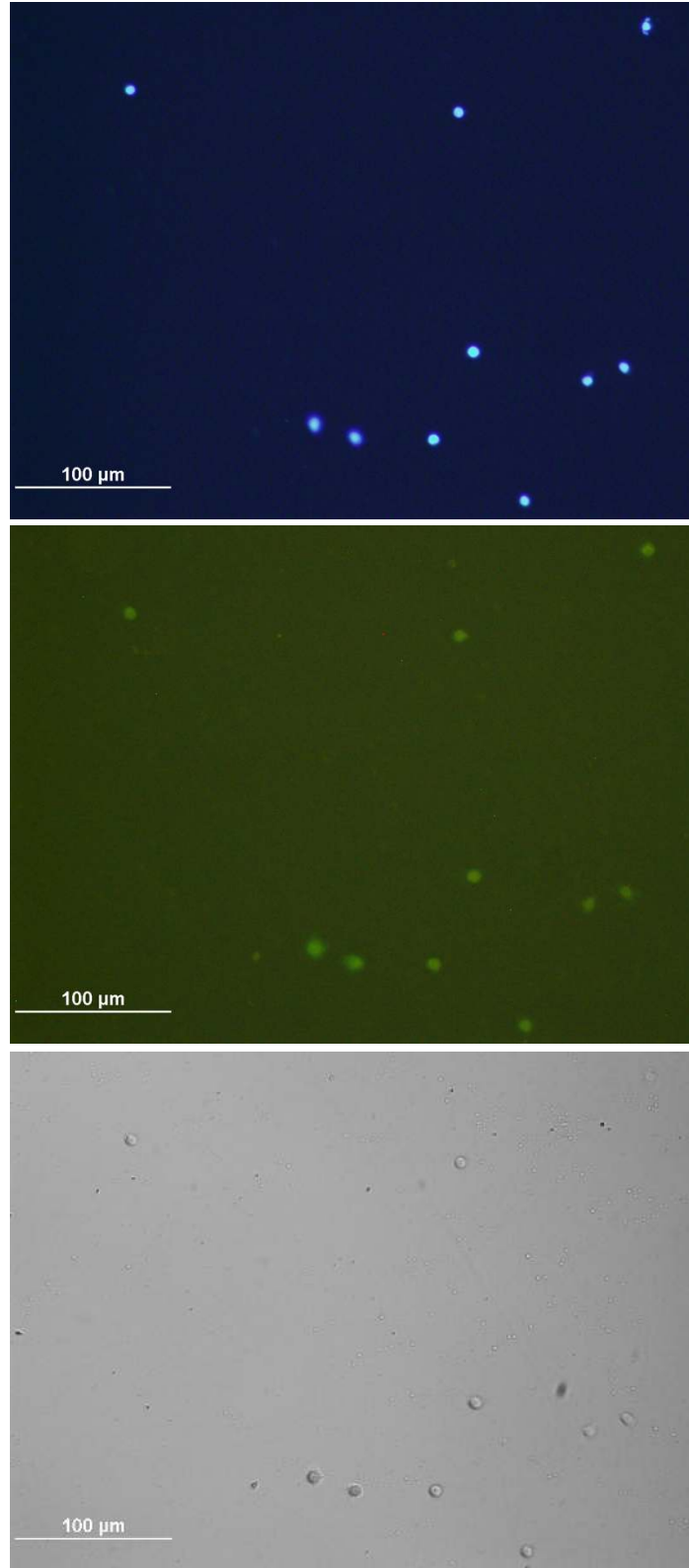


Şekil 4.12 Kan içerisinde kanallarda yakalanan MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (200 büyütme)

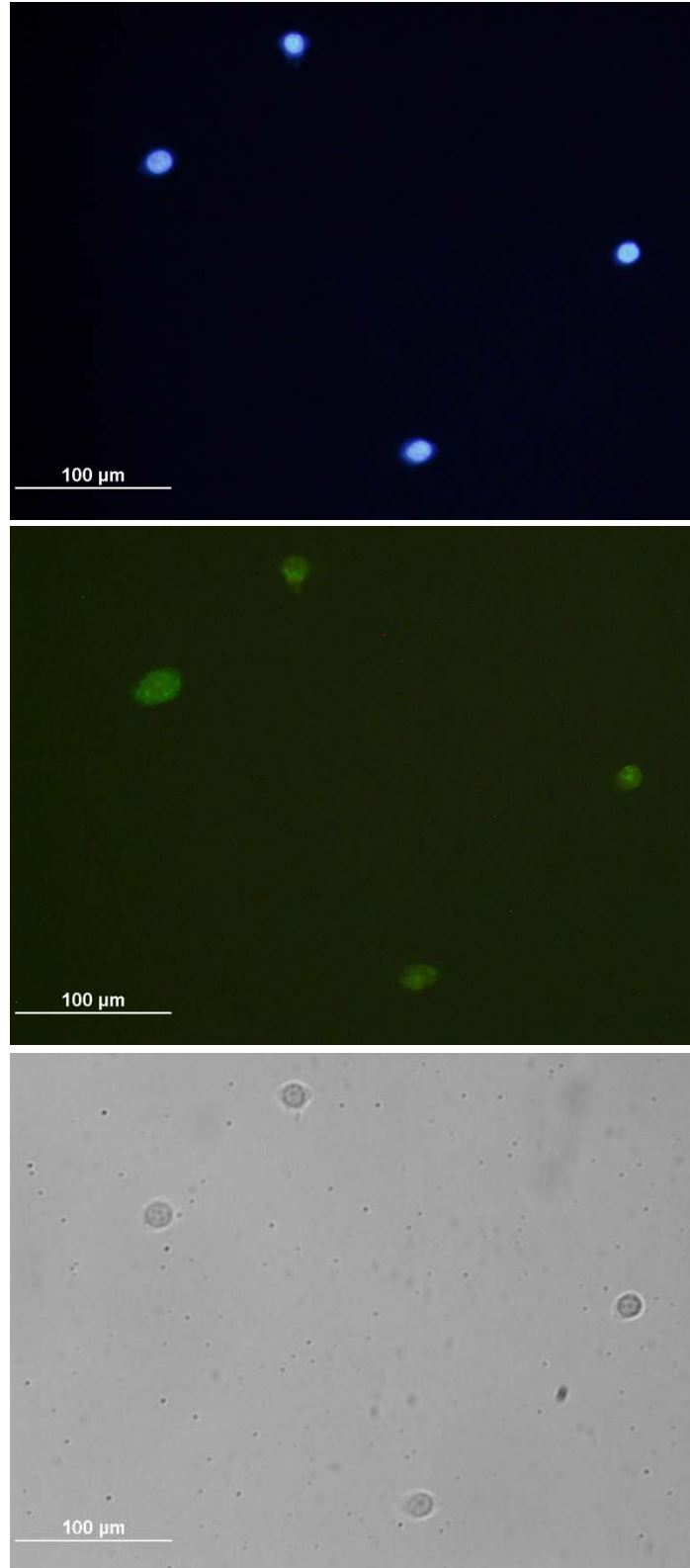


Grafik 4.2 Kan içerisinde değişik hücre konsantrasyonlarında yakalama etkinlikleri

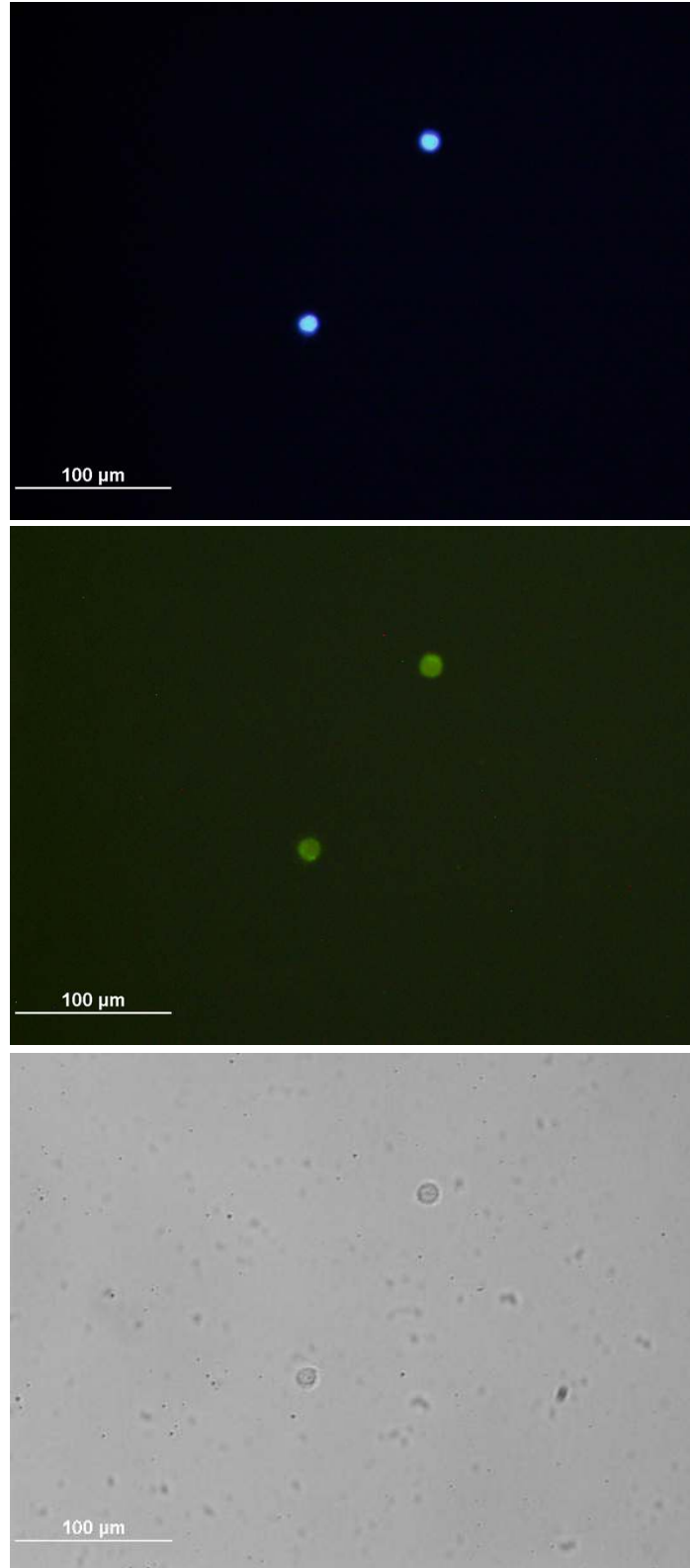
Grafik 4.2’de kanla karıştırılmış farklı MCF-7 hücre konsantrasyonlarında mikrokanallar içerisinde yakalanan hücre sayılarının ortalama değerleri alınarak oluşturulmuş yakalama etkinlikleri görülmektedir. Grafik üzerindeki barlar standart hatayı göstermektedir. Etkinlik değerleri %60-68 arasında olup farklı hücre konsantrasyonlarıyla yapılan deneylerin yakalama etkinlikleri üzerinde önemli bir değişiklik yaratmadığı gözlenmiştir. Sonuçlar arasındaki farklılıkların incelenmesi için SPSS bilgisayar programı kullanılarak ANOVA testi uygulanmıştır. P değeri 0,05’ ten büyük çıktığından ($p=0,18>0,05$) farklı konsantrasyonlarda yapılan deneylerin yakalama etkinlikleri üzerindeki farkı anlamsız olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.13 50000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (100 büyütme)



Şekil 4.14 20000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 büyütme)



Şekil 4.15 10000 hücre/ml konsantrasyonda DAPI-Alexa Fluor-ışık filtreleri ile çekilen kanal görüntüleri (200 büyütme)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Dolaşımdaki ender kanser hücrelerinin mikrokanallar içerisinde antikor tabanlı yöntemler ile yakalanması amacıyla yapılan deneyler biyomedikal araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deney aşamaları çevresel faktörleri sabit tutmak amacıyla aynı laboratuvarında, biyolojik güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince, kanser hücreleri ve kan ile çalışıldığından, kişisel korunma amaçlı eldiven, gözlük, önlük ve maske gibi ekipmanlar kullanılmıştır. Deneyler kapsamında üretilen çipler, bu çiplerin PMMA'lerin temizlenme aşamasından araştırma mikroskobu ile inceleme ve hücre sayımı aşamasına kadar ortam koşullarından etkilenmemesi için steril petri kapları içerisinde karanlık ortamda saklanmıştır.

Çalışma kapsamında yapılan deneylerde, mikrokanallar içerisinde meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri yakalanmıştır. Deneyler, temin edilen 1000000 hücre/ml konsantrasyondaki süspansiyonlar seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. PBS ile seyreltilmiş farklı hücre konsantrasyonlarında (50000 hücre/ml ila 500000 hücre/ml), kanallar içerisinde %70'in üzerinde yakalama etkinlikleri görülmüştür (%72-%87). 1000000 hücre/ml konsantrasyonda gerçekleştirilen deneylerde kanallar içerisinde MCF-7 hücrelerinin agregasyona meyilli olduğu, kanalların farklı noktalarında MCF-7 hücre yığın yapıları bulunduğu gözlenmiştir. Tek konsantrasyon değerinde yapılan bu ilk deneylerde kanalların araştırma mikroskobu ile incelenmesi ve kanallardaki hücre sayımı sonuçlarının değerlendirilmesi ile MCF-7 hücre süspansiyonu içerisinde hücrelerin birbirine yapışmasının çalışmanın önemli bir kısıtı olduğuna karar verilmiştir. Bu kısıtlamayı ortadan kaldırmak amacıyla ilk süspansiyon ve her bir seyreltme aşaması sonrasında elde edilen süspansiyonlar kanallara enjekte edilmeden önce vortekste karıştırılarak, hücrelerin süspansiyon içerisinde ve kanallara enjeksiyonu sırasında homojen dağılımları sağlanmaya çalışılmıştır. Kan ile seyreltilmiş farklı hücre konsantrasyonlarında (5000 hücre/ml ila 250000 hücre/ml) ise yakalama etkinlikleri %60' ın üzerindedir (%60-%68). Literatür ile yapılan karşılaştırmalarla elde edilen bu etkinlik değerleri oldukça başarılıdır.

Mikrokanallar içerisindeki MCF-7 hücre yakalama etkinlikleri ile oluşturulan veri setleri SPSS bilgisayar programı ile işlenerek istatistik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere ANOVA testi uygulanmıştır. Sonuç çıktısında kan ve PBS içerisinde farklı konsantrasyonlarda gerçekleştirilen deneylerin yakalama etkinlikleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Mikrokanalların Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu ile incelenmesi sonucunda kanallarda MCF-7 hücreleri dışında herhangi bir hücre türüne rastlanmamıştır. Çalışma sonucunda kanallarda %100 saflıkta MCF-7 hücreleri yakalanmıştır. Yakalanan MCF-7 hücrelerinin mikroskop ile alınan DAPI, Alexa Fluor ve ışık filtresi görüntüleri karşılaştırıldığında çekirdekleri boyanan hücrelerinin Alexa Fluor boyama ile görüntülenen hücrelerle aynı olduğu görülmüştür. Doğrulama amacıyla üç filtre ile alınan görüntüler örtüştürülerek MCF-7 hücre görüntülerinin üst üste çakıştığı, herhangi bir filtre ile alınan görüntüde örtüşmeyen bir hücrenin bulunmadığı gözlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda yapılan her bir deney grubunda bir kontrol çipi kullanılmıştır. Kontrol parametresi olarak kanallara MCF-7 hücre yüzey belirteci olan EpCAM'e özgül anti-EpCAM antikor enjeksiyonu yapılmamış, deneyin diğer tüm aşamaları gerçekleştirilmiştir. Kanallara enjekte edilen hücre konsantrasyonları, gerçekleştirilen deney grubunun en yüksek konsantrasyonu seçilerek bu konsantrasyonda süspansiyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kontrol çiplerinin Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu ile incelenmesi neticesinde kanallarda MCF-7 hücrelerine rastlanmamıştır. Bu veri ile, çalışma kapsamında kanallarda hücre yakalamak için kullanılan bu yöntemin çalışma amacına özgül olduğu sonucu elde edilmiştir. Kanallar içerisinde hedef olan MCF-7 hücreleri yüksek saflık ve etkinlik değerlerinde yakalanmış; MCF-7 hücreleri dışındaki hedef olmayan diğer hücrelere kanalların incelenmesi esnasında rastlanmamıştır.

Literatür taraması yapıldığında CTC izolasyon yöntemlerinin içinde en efektif olanı antikor tabanlı yöntemlerdir. Bu yöntemin mikrosıvı teknolojileri kullanıldığında

daha çok geliştirilebilir olduğu elde edilen sonuçlar arasındadır. Afinite ve antikor-antijen özgüllüğü gibi kavramlar izolasyonda yüksek saflık ve hassasiyeti beraberinde getirmiştir. Örnek hazırlanması sırasında adımların azaltılması ile hücre kayıpları engellenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar geliştirilerek kanserin erken tanısında ve tedavi sürecinin daha hassas takibinde efektif bir yöntem olacağı öngörülmektedir. Ancak bilinen CTC altgruplarının da çok fazla olması nedeniyle daha yüksek bir yakalanma oranı ve güvenilirlik için kokteyl antikor karışımları kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] J. Ferlay, H.-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin, "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.," *Int. J. Cancer*, vol. 127, no. 12, pp. 2893–917, Dec. 2010.
- [2] C. Desantis, R. Siegel, P. Bandi, and A. Jemal, "Breast Cancer Statistics , 2011," vol. 61, no. 6, pp. 409–418, 2011.
- [3] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, "Cancer Statistics , 2014," vol. 64, no. 1, pp. 9–29, 2014.
- [4] H. Esmaeilsabzali, T. V Beischlag, M. E. Cox, A. M. Parameswaran, and E. J. Park, "Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 7, pp. 1063–84, Nov. 2013.
- [5] R. Harouaka, Z. Kang, S.-Y. Zheng, and L. Cao, "Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 141, no. 2, pp. 209–21, Feb. 2014.
- [6] C. Alix-Panabières and K. Pantel, "Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.," *Clin. Chem.*, vol. 59, no. 1, pp. 110–8, Jan. 2013.
- [7] P. Carmeliet and R. K. Jain, "diseases," pp. 249–257, 2000.
- [8] J. Pouyssegur, F. Dayan, and N. M. Mazure, "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression.," *Nature*, vol. 441, no. 7092, pp. 437–43, May 2006.
- [9] Y. Kang and J. Massagué, "Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.," *Cell*, vol. 118, no. 3, pp. 277–9, Aug. 2004.
- [10] J. J. Christiansen and A. K. Rajasekaran, "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 17, pp. 8319–26, Sep. 2006.
- [11] A. Gradilone, C. Raimondi, C. Nicolazzo, A. Petracca, O. Gandini, B. Vincenzi, G. Naso, A. M. Aglianò, E. Cortesi, and P. Gazzaniga, "Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 15, no. 5, pp. 1066–70, May 2011.

- [12] D. Kong, Y. Li, Z. Wang, and F. H. Sarkar, "Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 716–29, Feb. 2011.
- [13] A. V Salnikov, L. Liu, M. Platen, J. Gladkich, O. Salnikova, E. Ryschich, J. Mattern, G. Moldenhauer, J. Werner, P. Schemmer, M. W. Büchler, and I. Herr, "Hypoxia induces EMT in low and highly aggressive pancreatic tumor cells but only cells with cancer stem cell characteristics acquire pronounced migratory potential.," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, p. e46391, Jan. 2012.
- [14] C. Scheel and R. a Weinberg, "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links.," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 22, no. 5–6, pp. 396–403, Oct. 2012.
- [15] C. L. Chaffer and R. a Weinberg, "A perspective on cancer cell metastasis.," *Science*, vol. 331, no. 6024, pp. 1559–64, Mar. 2011.
- [16] A. D. Rhim, E. T. Mirek, N. M. Aiello, A. Maitra, M. Jennifer, F. Mccallister, M. Reichert, G. L. Beatty, K. Anil, R. H. Vonderheide, S. D. Leach, and B. Z. Stanger, "NIH Public Access," vol. 148, pp. 349–361, 2013.
- [17] P. Gassmann and J. Haier, "The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 25, no. 2, pp. 171–81, Jan. 2008.
- [18] D. Hanahan, R. A. Weinberg, and S. Francisco, "The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco," vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [19] G. P. Gupta and J. Massagué, "Cancer metastasis: building a framework.," *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 679–95, Nov. 2006.
- [20] E. S. Lianidou and A. Markou, "Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges.," *Clin. Chem.*, vol. 57, no. 9, pp. 1242–55, Sep. 2011.
- [21] V. Kulasingam and E. P. Diamandis, "Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies.," *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 5, no. 10, pp. 588–99, Oct. 2008.

- [22] W. A. Osta, Y. Chen, K. Mikhitarian, M. Mitas, M. Salem, Y. A. Hannun, D. J. Cole, and W. E. Gillanders, "EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy," pp. 5818–5824, 2004.
- [23] S. V Litvinov, M. P. Velders, H. a Bakker, G. J. Fleuren, and S. O. Warnaar, "Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.," *J. Cell Biol.*, vol. 125, no. 2, pp. 437–46, Apr. 1994.
- [24] S. Basak, D. Speicher, S. Eck, W. Wunner, G. Maul, M. S. Simmons, and D. Herlyn, "No Title," vol. 90, no. 9, pp. 691–697, 1998.
- [25] S. E. Singletary and J. L. Connolly, "Breast Cancer Staging : Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual," vol. 56, no. 1, pp. 37–47, 2006.
- [26] A. S. Levenson and V. C. Jordan, "MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line '," pp. 3071–3078, 1997.
- [27] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan, "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1409–16, Nov. 1973.
- [28] J. Guo, F. Yao, Y. Lou, C. Xu, B. Xiao, W. Zhou, J. Chen, Y. Hu, and Z. Liu, "Detecting carcinoma cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma by immunomagnetic beads and rt-PCR.," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 41, no. 8, pp. 783–8, Sep. 2007.
- [29] R. Königsberg, E. Obermayr, G. Bises, G. Pfeiler, M. Gneist, F. Wrba, M. de Santis, R. Zeillinger, M. Hudc, and C. Dittrich, "Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients.," *Acta Oncol.*, vol. 50, no. 5, pp. 700–10, Jun. 2011.
- [30] I. Desitter, B. S. Guerrouahen, N. Benali-Furet, J. Wechsler, P. a Jänne, Y. Kuang, M. Yanagita, L. Wang, J. a Berkowitz, R. J. Distel, and Y. E. Cayre, "A new device for rapid isolation by size and characterization of rare

- circulating tumor cells.,” *Anticancer Res.*, vol. 31, no. 2, pp. 427–41, Feb. 2011.
- [31] A. A. S. Bhagat, H. Bow, H. W. Hou, S. J. Tan, J. Han, and C. T. Lim, “Microfluidics for cell separation.,” *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 48, no. 10, pp. 999–1014, Oct. 2010.
 - [32] S. Kim, S.-I. Han, M.-J. Park, C.-W. Jeon, Y.-D. Joo, I.-H. Choi, and K.-H. Han, “Circulating tumor cell microseparator based on lateral magnetophoresis and immunomagnetic nanobeads.,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 5, pp. 2779–86, Mar. 2013.
 - [33] J.-S. Park, S.-H. Song, and H.-I. Jung, “Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels.,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 7, pp. 939–48, Apr. 2009.
 - [34] K.-A. Hyun, K. Kwon, H. Han, S.-I. Kim, and H.-I. Jung, “Microfluidic flow fractionation device for label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) from breast cancer patients.,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 206–12, Feb. 2013.
 - [35] H.-S. Moon, K. Kwon, S.-I. Kim, H. Han, J. Sohn, S. Lee, and H.-I. Jung, “Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP).,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1118–25, Mar. 2011.
 - [36] L.-J. Wu, Y.-D. Pan, X.-Y. Pei, H. Chen, S. Nguyen, A. Kashyap, J. Liu, and J. Wu, “Capturing circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma.,” *Cancer Lett.*, vol. 326, no. 1, pp. 17–22, Dec. 2012.
 - [37] T. Schneider, L. R. Moore, Y. Jing, S. Haam, P. S. Williams, A. J. Fleischman, S. Roy, J. J. Chalmers, and M. Zborowski, “Continuous flow magnetic cell fractionation based on antigen expression level.,” *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 68, no. 1, pp. 1–21, Jul. 2006.
 - [38] M. Cristofanilli, “Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.,” *Semin. Oncol.*, vol. 33, no. 3 Suppl 9, pp. S9–14, Jun. 2006.

- [39] A. M. Sieuwerts, J. Kraan, J. Bolt, P. van der Spoel, F. Elstrodt, M. Schutte, J. W. M. Martens, J.-W. Gratama, S. Sleijfer, and J. a Foekens, "Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 101, no. 1, pp. 61–6, Jan. 2009.
- [40] J. S. de Bono, H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, H. Tissing, G. V Doyle, L. W. W. M. Terstappen, K. J. Pienta, and D. Raghavan, "Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 19, pp. 6302–9, Oct. 2008.
- [41] S. J. Cohen, C. J. a Punt, N. Iannotti, B. H. Saidman, K. D. Sabbath, N. Y. Gabrail, J. Picus, M. a Morse, E. Mitchell, M. C. Miller, G. V Doyle, H. Tissing, L. W. M. M. Terstappen, and N. J. Meropol, "Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer.," *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 7, pp. 1223–9, Jul. 2009.
- [42] M. G. Krebs, R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, J.-M. Hou, A. Greystoke, T. H. Ward, R. Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, and F. H. Blackhall, "Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 12, pp. 1556–63, Apr. 2011.
- [43] M. C. Miller, G. V Doyle, and L. W. M. M. Terstappen, "Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer.," *J. Oncol.*, vol. 2010, p. 617421, Jan. 2010.
- [44] G. M. Cann, Z. G. Gulzar, S. Cooper, R. Li, S. Luo, M. Tat, S. Stuart, G. Schroth, S. Srinivas, M. Ronaghi, J. D. Brooks, and A. H. Talasaz, "mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer.," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, p. e49144, Jan. 2012.

- [45] K. Hoshino, Y.-Y. Huang, N. Lane, M. Huebschman, J. W. Uhr, E. P. Frenkel, and X. Zhang, "Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells.," *Lab Chip*, vol. 11, no. 20, pp. 3449–57, Oct. 2011.
- [46] D. Issadore, J. Chung, H. Shao, M. Liong, A. A. Ghazani, C. M. Castro, R. Weissleder, and H. Lee, "Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 141, p. 141ra92, Jul. 2012.
- [47] J. P. Winer-Jones, B. Vahidi, N. Arquilevich, C. Fang, S. Ferguson, D. Harkins, C. Hill, E. Klem, P. C. Pagano, C. Peasley, J. Romero, R. Shartle, R. C. Vasko, W. M. Strauss, and P. W. Dempsey, "Circulating tumor cells: clinically relevant molecular access based on a novel CTC flow cell.," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e86717, Jan. 2014.
- [48] T. Cells, B. Microchannels, L. S. Cheung, X. Zheng, L. Wang, R. Guzman, J. A. Schroeder, R. L. Heimark, J. C. Baygents, and Y. Zohar, "Kinematics of Specifically Captured Circulating," vol. 19, no. 4, pp. 752–763, 2010.
- [49] J. P. Smith, A. C. Barbati, S. M. Santana, J. P. Gleghorn, and J. Brian, "NIH Public Access," vol. 33, no. 21, pp. 1–21, 2013.
- [50] S. Nagrath, L. V Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. a Haber, and M. Toner, "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.," *Nature*, vol. 450, no. 7173, pp. 1235–9, Dec. 2007.
- [51] J. P. Gleghorn, E. D. Pratt, D. Denning, H. Liu, N. H. Bander, S. T. Tagawa, D. M. Nanus, P. A. Giannakakou, and B. J. Kirby, "Capture of circulating tumor cells from whole blood of prostate cancer patients using geometrically enhanced differential immunocapture (GEDI) and a prostate-specific antibody.," *Lab Chip*, vol. 10, no. 1, pp. 27–9, Jan. 2010.
- [52] S. L. Stott, C.-H. Hsu, D. I. Tsukrov, M. Yu, D. T. Miyamoto, B. A. Waltman, S. M. Rothenberg, A. M. Shah, M. E. Smas, G. K. Korir, F. P. Floyd, A. J. Gilman, J. B. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, L. V

- Sequist, R. J. Lee, K. J. Isselbacher, S. Maheswaran, D. A. Haber, and M. Toner, "Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 43, pp. 18392–7, Oct. 2010.
- [53] E. Ozkumur, A. M. Shah, J. C. Ciciliano, B. L. Emmink, D. T. Miyamoto, E. Brachtel, M. Yu, P. Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, S. L. Stott, N. M. Karabacak, T. A. Barber, J. R. Walsh, K. Smith, P. S. Spuhler, J. P. Sullivan, R. J. Lee, D. T. Ting, X. Luo, A. T. Shaw, A. Bardia, L. V. Sequist, D. N. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber, and M. Toner, "Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 179, p. 179ra47, Apr. 2013.
- [54] M. Banys, V. Müller, C. Melcher, B. Aktas, S. Kasimir-Bauer, C. Hagenbeck, A. Hartkopf, and T. Fehm, "Circulating tumor cells in breast cancer.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 423, pp. 39–45, Aug. 2013.