

BÖLÜM 5

HÜCRE AYIRMA STRATEJİLERİ

Bakiye GÖKER BAĞCA¹
Çığır BİRAY AVCI²

GİRİŞ

Biyolojik uygulamaların çalışma örnekleri kan, doku ya da tümör kitlesi gibi yüksek heterojeniteye sahip yapılardan oluşmaktadır. Heterojen yapılardaki farklı hücre tiplerinin ya da topluluklarının belirlenebilmesi ve ayrılması (cell sorting) moleküler hücre biyolojisinde, tanı ve tedavi alanlarında kritik öneme sahiptir. Hücreler, boyut, morfoloji, yüzey proteinleri gibi hücre dışı ya da DNA, RNA ve protein molekülü gibi hücre içi özelliklerine göre ayrılabilir. Hücre ayırma stratejileri, farklı özellikteki hücreleri içeren karışık popülasyonları kesin sınırlarla birbirinden ayırmayı ve ayrılan hücrelerin elde edildikleri aşamalarda durumlarını korumayı içeren iki temel basamağı içermektedir. Hücre dışı yapıları, manyetik ya da floresans etiketler kullanarak işaretlemeyi ve ayırmayı sağlayan, akış sitometrisi temelli yaklaşımlar mevcut uygulamalardaki popülerliğini korumakla birlikte; mikroakışkan teknolojilerini etiketsiz hücre ayırma stratejileri ile birleştiren güncel yaklaşımlar taşıdıkları potansiyel ile yeni araştırmalarda yerini almaya başlamıştır.

KONVANSİYONEL HÜCRE AYIRMA STRATEJİLERİ

Konvansiyonel hücre ayırma stratejileri, akış sitometrisinden (flow cytometry) köken alan yöntemlerdir. Konvansiyonel hücre ayırma yöntemleri, temel olarak yüzey antijenleri gibi eksternal yapıları hedefleyen etiket ve işaretçilere bağlı olarak hücre ayırmasını gerçekleştiren “floresans temelli hücre ayırma” ve “manyetik temelli hücre ayırma” yöntemlerini içermektedir (1-3).

AKIŞ SİTOMETRİSİ

Elektrolit çözelti içindeki partikül ve hücrelerin iletkenlik değerlerine bağlı olarak sayılması ve büyüklüklerinin belirlenmesini sağlayan Coulter sayacının 1950’li

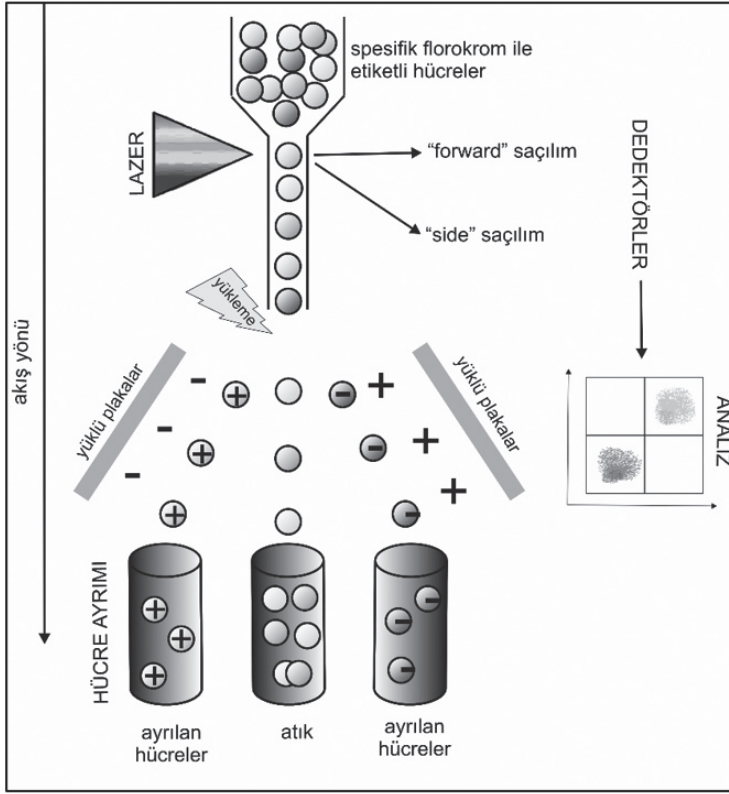
¹ Arş. Gör. Dr., Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., bgbagca@adu.edu.tr

² Doç. Dr., Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., cigir.biray@ege.edu.tr

yılların ortalarında icat edilmesi, bugünün akış sitometrilerinin temelini atarak biyoloji ve tıp alanlarında dönüm noktası olmuştur. Bu öncül sistemde, hücreler basınç aracılığıyla farklı elektrolitlerden oluşan haznelere arasında geçiş yapmakta ve meydana gelen elektrik iletkenlik değeri değişiminin hesaplanması ile hücre sayısının belirlenmesi sağlanmaktadır (4). Günümüzün akış sitometrileri ise farklı ihtiyaçlara yönelik geliştirilen değişken sistemleri içermekle birlikte, genel prensipleri süspansiyon içindeki hücrelerin tek sıra halinde lazer önünden geçirilmesi ile elde edilen sinyalin analizi aracılığıyla, heterojen popülasyon içindeki belirli tipteki hücrelerin ya da hücre popülasyonlarının belirlenmesi ya da saflaştırılarak elde edilmesini içermektedir. Bu sistemler genel olarak; numunenin başlangıç haznesinden okumaların gerçekleştirileceği ve atık ya da ayırım haznesine ulaştırılmasını sağlayan “akışkan (fluidics)” numunenin analizinde kullanılacak ışık sinyalinin üretildiği ve sinyalin alındığı lazer ve filtrelerden oluşan “optik” ve dedektörlerden gelen sinyalleri bilgisayar tarafından okunabilen dijital sinyallere dönüştüren “elektronik” mekanizmalar olarak üç temel bileşeni içermektedir. Ayrıca bu hücrelerin spesifik olarak elde edilmesini sağlayan ayırma (sorting) mekanizmasını içeren sistemler de bulunmaktadır (5). Elde edilen sinyalin analizi aracılığıyla, heterojen popülasyon içindeki bireysel hücrelerden çok sayıda parametreden yararlanarak immüno-fenotipleme, ploidi analizleri, hücre sayımı, apoptotik veya nekrotik hücrelerin ayırımı, hücre döngüsü gibi analizlerin yapılmasına olanak tanınmaktadır.

FLORESANS TEMELLİ HÜCRE AYIRMA

Floresans temelli hücre ayırma, 1960’ların sonlarında, ilgilenilen hücre tipini, komplementer florokrom bağlı antikorları kullanarak etiketleme prensibinden yararlanılarak geliştirilmiştir (Şekil 1). Temel olarak 355 nm ve 800 nm arasındaki ışık spektrumundaki lazerleri kullanmakla birlikte genellikle bu prensibi kullanan cihazlar 405 nm (mor), 488 nm (mavi) ve 640 nm (kırmızı) dalga boylarında işlev göstermektedir. Bu lazerlerin farklı dalga boylarında uyarım- yayılım (excitation-emission) yapabilen florokromlar ile birleştirildiği sistemleri içermektedir (6). Bu sistemde solüsyon içindeki partiküller ışık önünden geçerken ışığın iki farklı dağılım paternini gösteren “side” ve “forward” saçılımları (“scatter”) aracılığıyla sırasıyla boyut ve granülosite özelliklerine göre analiz edilebilmektedir. Ayrıca hücrelerin elektriksel olarak yüklenmesi aracılığıyla ayırım gerçekleştirilmektedir (7).



Şekil 1. Akış sitometrisi kullanılarak floresans temelli hücre ayırma yaklaşımının şemataze görünümü

MANYETİK TEMELLİ HÜCRE AYRIMA

Manyetik temelli hücre ayırma yaklaşımları ilk olarak 1975 yılında eritrositlerin manyetik özellikleri aracılığıyla diğer kan hücrelerinden ayrılabilceğinin keşfi ile başlamıştır. İlgilenilen hücrelerin üzerindeki yüzey belirteçlerine spesifik antikor-konjüge edilmiş manyetik boncuklar hücre ayırımında kullanılmaktadır. Manyetik boncuk taşıyan kolonları içeren daha temel sistemlerin yanı sıra florokromlar ile hibrit şekilde akış sitometrisi ile birlikte kullanımını içeren yaklaşımlar, özellikle hedef hücrenin zenginleştirilebilmesini sağlaması bakımından önemli bir stratejiyi oluşturmaktadır. Bu sistemlerde dış manyetik alanın oluşturduğu kuvvet ile etiketli hücreler toplama ünitesine alınabilmekte ve ileri analizler için kullanılabilir (3, 8, 9).

GÜNCEL HÜCRE AYIRMA STRATEJİLERİ VE MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERİ

Güncel hücre ayırma stratejilerinin temelinde hücrelerin eksternal etiketlere ihtiyaç duymaksızın ayrıştırılmasını sağlayan, mikroakışkan teknolojisi bulunmaktadır. Minyatür cihaz ve reaktörler iki binli yılların başından bu yana ilgi çekmeye başlayan bir alan olmuştur. Genellikle “çip üstündeki laboratuvar” (lab-on-chip) aygıtları içeren mikroakışkan cihazları içeren araştırmalar; örnek hazırlanması, akışkanların taşınması, mikroreaktörler, ayırma sistemleri ve hücre kültürü konularının entegrasyonunu içermektedir. Cihazlar immünolojik testleri, DNA analiz sistemlerini, tanı ya da tedavi seyrinin kontrolü amaçlı görüntülemeyi içeren çeşitli medikal amaçlarla kullanılmaktadır. Mikrocihazlar, makro boyutlardaki eşdeğerlerine göre pek çok avantaja sahiptir. Büyük ve yüksek maliyetli sistemleri küçük ölçeklere sığdıran bu sistemlerin avantajları yüksek performans, esnek tasarım, portatifleşme ve otomasyondur. Ayrıca cihaz boyutunun küçülmesi daha az reaktif ve örnek harcanmasına olanak vererek ekonomik avantaj da sağlamaktadır. Bunun yanında enjekte edilebilir boyut ve yapıda olanlar, *in vivo* kullanım ile gerçek-zamanlı veri eldesine olanak tanımakta, klinik kullanımda ise konvansiyonel yöntemlere göre müdahalede hızını artırma potansiyeli taşımaktadır (10-13).

Çiplerin üretiminde silikon türevi materyallerin yanı sıra polistiren, polivinil klorür, polimetil metakrilat (PMMA), polikarbonat ve polidimetilsiloksan (PDMS) gibi bileşikler yaygın olarak kullanılmakta ve bu materyallerin işlenmesinde fotolitografi, yumuşak litografi, film biriktirme, aşındırma, yapıştırma ve üç boyutlu yazdırma mikrofabrikasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır. Elektronik bileşenlerinin üretim sürecinde yirminci yüzyılın son dönemlerinde ortaya çıkan fotolitografi teknolojisi kullanılmaktadır. Bu teknoloji daha etkin ve daha küçük elektronik cihazların geliştirilmesinde bir kritik bir süreci oluşturmuş, elektronik bileşenlere sahip biyolojik sistemlerin ”biyolojik-mikro-elektro-mekanik-sistemlerinin (MEMS)” ortaya çıkmasını sağlamıştır (14, 15).

ETİKETSİZ HÜCRE AYIRMA STRATEJİLERİ

Güncel uygulamalar, hücre ayırmasını gerçekleştirmek için ekstra etiket kullanımına ihtiyaç duyan yöntemlerin yerine intrinsik biyobelirteçlerin kullanıldığı, mikroakışkan tekniklerine yönelmiştir. Bu yöntemler, ayırma kuvvetleri tarafından manipüle edilebilen, hücre boyutu, şekli, elektriksel kutuplanabilirlik, empedans, yoğunluk, manyetik duyarlılık ve hidrodinamik gibi hücrelerin fiziksel özelliklerini kullanmaktadır (16, 17).

MİKRO- ÖLÇEKLİ FİLTRELER

Hücre ayırımında en yaygın yöntem boyutun kullanıldığı filtrasyon uygulamasıdır. Mikro- ölçekli filtrelerin por boyutlarının tamamen kontrol altında tutulabilir olması bu filtrelerin seperasyonda etkin kullanılmasını sağlamaktadır (18, 19).

HİDRODİNAMİK FİLTRASYON

Şekil ve boyuta bağlı olarak ayırma yapan bir yöntemdir. Akımdaki partiküllerin dışarıdan bir kuvvet etki etmediği sürece akış doğrultusunda hareket edeceği prensibine dayanmaktadır. Sıvı akışı tek başına, giriş ve çıkış kanallarının sayısının, geometrisinin, konfigürasyonun değiştirilmesi ile boyut- tabanlı hücre ayırımı gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemde kullanılan mikroakış kanalı, akışın sıkıştırıldığı bir bölge ya da birden fazla dallanma bölgesi kullanarak ayırımı gerçekleştirilmektedir (20, 21).

DETERMİNİSTİK LATERAL YER DEĞİŞTİRME

Boyuta bağlı olarak ayırım gerçekleştiren bir diğer yöntemdir. Dikey akışta bulunan hücrelerin akış tarafından belirlenen şekilde yer değiştirmesi esasına dayanmaktadır. Kritik boyuttan küçük hücreler, akım doğrultusunda devam ederlerken daha büyük hücreler fraksiyonel bir şekilde istenilen doğrultuda manipüle edilmekte ve ayrılabilirler (22, 23).

AKUSTOFOREZ

Ses alanındaki partiküllerin göçü prensibine dayanmaktadır. Akış içindeki hücrelere akustik alan uygulanması hücreler üzerine akustik radyasyon oluşturmaktadır. Kontrast faktörü olarak adlandırılan bu kuvvet, hücrelerin birbirlerinden veya içinde bulunduğu ortamın yoğunluk ve sıkıştırılabilirlik farkından kaynaklanmaktadır (24, 25).

DİELEKTROFOREZ

Tek tip olmayan elektrik alanda partiküllerin hareketinin kontrolü prensibine dayanmaktadır. Elektrik alanın farklılaşması ile yüklü partiküllerin yanı sıra yüksüz haldeki hücrelerin polarize hale geçirilerek hareket ettirilmesi sağlanmaktadır. Bu sistemde hücreler büyüklük, iletkenlik, elektriksel geçirgenlik, yüzey morfolojisi özelliklerine bağlı olarak ayrılmaktadır (26, 27).

SONUÇ

Akış sitometrisini içeren konvansiyonel yöntemler, yüksek verimlilik, hızlı sonuç eldesi ve çok sayıda farklı uygulama ile elde edilen verilerin çeşitliliği gibi avantajlara sahip olmakla birlikte, kullanılan cihazların kompleks yapısı, kullanıcı uzmanlığını sağlamak için gereken eğitim süresi ve masrafı, sistemlerin yüksek maliyeti ve kullanılan reaktif ve örnek hacminin yüksekliği, antikor ya da florokromların hücre davranışını manipüle edebilir özellikler taşıması gibi kısıtlayıcı faktörlere de sahiptir. Mikroakışkan sistemlerini içeren ve hücrelerin herhangi bir dış etikete ihtiyaç duyulmadan ayrılmasını sağlayan güncel stratejiler ise bu dezavantajların üstesinden gelebilmenin yanında biyouyumlu olarak üretilerek *in vivo* kullanım potansiyeli sunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Krens SF, Heisenberg CP. Cell sorting in development. *Curr Top Dev Biol.* 2011;95:189-213. doi: 10.1016/B978-0-12-385065-2.00006-2. PMID: 21501752.
2. Maes E, Cools N, Willems H, Baggerman G. FACS-Based Proteomics Enables Profiling of Proteins in Rare Cell Populations. *Int J MolSci.* 2020;21(18):6557. Published 2020 Sep 8. doi:10.3390/ijms21186557
3. Shen MJ, Olsthoorn RCL, Zeng Y, Bakkum T, Kros A, Boyle AL. Magnetic-Activated Cell Sorting Using Coiled-Coil Peptides: An Alternative Strategy for Isolating Cells with High Efficiency and Specificity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021;13(10):11621-11630. doi:10.1021/acsaami.0c22185
4. Don M. The Coulter Principle: Foundation of an Industry. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation.* 2003;8(6):72-81. doi:10.1016/s1535-5535(03)00023-6
5. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:147. Published 2019 Jun 18. doi:10.3389/fbioe.2019.00147.
6. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2017 Apr 3;117:5.4.1-5.4.38. doi: 10.1002/cpim.26. PMID: 28369683.
7. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-5.1.11. Published 2018 Feb 21. doi:10.1002/cpim.40
8. Borlido L, Azevedo AM, Roque AC, Aires-Barros MR. Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2013 Dec;31(8):1374-85. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.009. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23747736.
9. Pan J, Wan J. Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain. *J Immunol Methods.* 2020 Nov;486:112834. doi: 10.1016/j.jim.2020.112834. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32810482.
10. Schulte TH, Bardell RL, Weigl BH. Microfluidic technologies in clinical diagnostics. *Clin Chim Acta.* 2002 Jul;321(1-2):1-10. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00093-1. PMID: 12031585.
11. Jayamohan H, Sant HJ, Gale BK. Applications of microfluidics for molecular diagnostics. *Methods Mol Biol.* 2013;949:305-334. doi:10.1007/978-1-62703-134-9_20.
12. Minter, Shelley. (2006). *Microfluidic Techniques: Reviews and Protocols.*
13. Velve-Casquillas G, Le Berre M, Piel M, Tran PT. Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today.* 2010;5(1):28-47. doi:10.1016/j.nantod.2009.12.001.
14. Hou, X., Zhang, Y., Santiago, Gd. et al. Interplay between materials and microfluidics. *Nat Rev Mater* 2, 17016 (2017). <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.16>.

15. Nielsen JB, Hanson RL, Almughamsi HM, Pang C, Fish TR, Woolley AT. Microfluidics: Innovations in Materials and Their Fabrication and Functionalization. *Anal Chem.* 2020;92(1):150-168. doi:10.1021/acs.analchem.9b04986.
16. Squires, Todd & Quake, Stephen. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics.* 77. 10.1103/RevModPhys.77.977.
17. Merrin J. *Frontiers in Microfluidics, a Teaching Resource Review.* Bioengineering (Basel). 2019;6(4):109. Published 2019 Dec 3. doi:10.3390/bioengineering6040109.
18. Ji HM, Samper V, Chen Y, Heng CK, Lim TM, Yobas L. Silicon-based microfilters for whole blood cell separation. *Biomed Microdevices.* 2008 Apr;10(2):251-7. doi: 10.1007/s10544-007-9131-x. PMID: 17914675.
19. Rawal S, Ao Z, Datar RH, Agarwal A. Microfilter-Based Capture and Release of Viable Circulating Tumor Cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1634:93-105. doi: 10.1007/978-1-4939-7144-2_7. PMID: 28819843.
20. Yang S, Undar A, Zahn JD. A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab Chip.* 2006 Jul;6(7):871-80. doi: 10.1039/b516401j. Epub 2006 Apr 19. PMID: 16804591.
21. Yoon K, Jung HW, Chun MS. Two-phase flow in microfluidic-chip design of hydrodynamic filtration for cell particle sorting. *Electrophoresis.* 2020 Jun;41(10-11):1002-1010. doi: 10.1002/elps.201900394. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32097495.
22. McGrath J, Jimenez M, Bridle H. Deterministic lateral displacement for particle separation: a review. *Lab Chip.* 2014 Nov 7;14(21):4139-58. doi: 10.1039/c4lc00939h. PMID: 25212386.
23. Hochstetter A, Vernekar R, Austin RH, Becker H, Beech JP, Fedosov DA, Gompper G, Kim SC, Smith JT, Stolovitzky G, Tegenfeldt JO, Wunsch BH, Zeming KK, Krüger T, Inglis DW. Deterministic Lateral Displacement: Challenges and Perspectives. *ACS Nano.* 2020 Sep 22;14(9):10784-10795. doi: 10.1021/acsnano.0c05186. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32844655.
24. Dual J, Hahn P, Leibacher I, Möller D, Schwarz T, Wang J. Acoustofluidics 19: ultrasonic micro-robotics in cavities: devices and numerical simulation. *Lab Chip.* 2012 Oct 21;12(20):4010-21. doi: 10.1039/c2lc40733g. PMID: 22971740.
25. Nilsson A, Petersson F, Jönsson H, Laurell T. Acoustic control of suspended particles in microfluidic chips. *Lab Chip.* 2004 Apr;4(2):131-5. doi: 10.1039/b313493h. Epub 2004 Feb 9. PMID: 15052353.
26. Alshareef M, Metrakos N, Juarez Perez E, et al. Separation of tumor cells with dielectrophoresis-based microfluidic chip. *Biomicrofluidics.* 2013;7(1):11803. Published 2013 Jan 9. doi:10.1063/1.4774312.
27. Chan JY, Ahmad Kayani AB, Md Ali MA, et al. Dielectrophoresis-based microfluidic platforms for cancer diagnostics. *Biomicrofluidics.* 2018;12(1):011503. Published 2018 Feb 23. doi:10.1063/1.5010158