

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SAFLAŞTIRMASI İÇİN
MANYETİK YÜKLÜ NANOSORBENTLERİN ÜRETİMİ**

**PRODUCTION OF MAGNETICALLY LOADED
NANOSORBENTS FOR ISOLATION OF MESENCHYMAL
STEM CELL**

SEDAT ODABAŞ

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2006

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SAFLAŞTIRMASI İÇİN MANYETİK YÜKLÜ NANOSORBENTLERİN ÜRETİMİ

Sedat Odabaş

ÖZ

Rejeneratif tıbbın gelişmesine paralel olarak kök hücre kullanılan tedavilere ilgi hızla artmaktadır. Diğer kök hücrelerin sahip oldukları özelliklerin yanında, ek olarak trans-farklılaşma kapasiteleri nedeniyle mezenkimal kök hücreler diğerlerine göre çok daha fazla ilgi çekmektedir. Kemik iliği, kordon kanı, çevre kanı gibi hücre kaynaklarında mezenkimal hücre miktarı düşüktür, ancak bunlar uygun yöntemler ile izole edilebilir; sayılarının artırılması için hücre kültür ortamlarında *in vitro* kültürleri yapılabilir; kemik, kırık, vb. gibi çeşitli dokuların onarımında kullanılmak üzere farklılaşmaları sağlanabilir. Kök hücre ayrılması ve hücre kültürü için çeşitli protokoller uygulanmaktadır, ki bunların birçoğunda manyetik yüklü spesifik sorbentler yer almaktadır. Hem mikron hem de nanometre boyutlarında manyetik partiküller ticari olarak mevcuttur. Yapılan çalışmada hücre süspansiyonların mezenkimal kök hücreleri saflaştırmak amacıyla manyetik yüklü polimerik nanosorbentlerin üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk önce manyetit Fe_3O_4 partiküller 70-500nm aralığında ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen manyetit nanopartiküller kullanılarak daha sonra mikroemülsiyon polimerizasyonu ile MMA/AAC kaplı nanopartiküller, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile PEG/MA kaplı nanopartiküller 150-500nm boy aralığında sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin hücre üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu Zeta Sizer, XRD, DSC ile yapılmış VSM ile manyetik özellikleri belirlenmiştir. Sentezlenen karboksilik asit (-COOH) fonksiyonel uç taşıyan MMA/AAC nanopartiküllere, optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında mezenkimal kök hücre özgün CD 105 ve CD 73 antibadileri kovalent olarak bağlanarak mezenkimal kök hücreleri uygun kaynaklardan saflaştırılmasını sağlayacak nanosorbentler elde edilmiştir. Hem üretilen nanosorbentler hem de ticari örnek (MACS CD 105 Microbeads) ile hem akışlı manyetik ayırıcı sistemlerde hem de kesikli çöktürmeli manyetik ayırıcı sistemlerde

hücre süspansiyonundan saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar akışlı hücre ölçer ile analiz edilmiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında çeşitli kaynaklarda mezenkimal kök hücrelerin saflaştırılmasını sağlayacak, ticari ile rekabet edebilecek, hem kesikli-çöktürmeli hem de akışlı manyetik ayırma sistemlerinde kullanılabilen manyetik yüklü PMMA/AAC bazlı nanosorbentler üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Manyetik nanosorbentler, polimerizasyon, saflaştırma, mezenkimal kök hücre.

Danışman: Prof.Dr. Erhan PİŞKİN, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

PRODUCTION OF MAGNETICALLY LOADED NANOSORBENTS FOR ISOLATION OF MESENCHYMAL STEM CELL

Sedat Odabaş

ABSTRACT

As the use of regenerative medicine rapidly increases, mesenchymal stem cells are attracting much attention, more than other stem cells due to their rapid availability and transdifferentiation capacity. The number of mesenchymal cells are few in the cord blood, bone marrow and peripheral blood however, they may be isolated accordingly; cell-cultured *in vitro* to increase their number; and differentiated to different cells to apply in the repair/reconstruction of several tissues including bone and cartilage. There are several isolation and cell-culturing protocols in which mainly magnetically loaded sorbents are used for specific separation of stem cells. There are commercially available magnetic beads are used today both in micron and nanometer size ranges. This study aims to develop alternative magnetically loaded nanoparticles carrying specific ligands (CD105 ve CD73 antibodies) for separation of mesenchymal stem cells from cell suspensions. In the first part, super-paramagnetic magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles, between 70-500 nm in range, are produced by co-precipitation method. MMA/AAc coated nanoparticles were synthesized by microemulsion polymerization, and PEG/MA coated nanoparticles were synthesized by emulsifier free emulsion polymerization with the range of 150-500 nm. Cytotoxic effects of the nanoparticles both PEG/MA and MMA/AAc coated, were determined by MTT assay. Nanoparticles that synthesized were characterized by FTIR, DSC, XRD and VSM. Magnetically loaded nanosorbents for isolation of Mesenchymal stem cells from cell sources, were prepared by covalent bonding of CD 105 and CD 73 mesenchymal stem cell specific antibodies to the synthesized nanoparticles that carries functional group (-COOH) on their surfaces according to optimization outcomes. Both produced nanosorbents and commercial microbeads (MACS/Miltenyi CD 105 Microbeads) were used in flow-through and batch magnetic separators for isolation of mesenchymal stem cell from cell suspension and the results were analyzed by Flow Cytometry.

With this study, magnetically loaded PMMA/AAC nanosorbents for isolation of mesenchymal stem cell from cell suspensions, and can be use in both flow-through and batch magnetic separators, were produced.

Key Words: Magnetic nanosorbents, polymerization, isolation, mesenchymal stem cell.

Advisor: Prof. Dr. Erhan PİŞKİN, Hacettepe University, Chemical Engineering Department.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında sahip olduğu, bilgi ve tecrübe ile bana yol gösteren; çok değerli hocam Prof. Dr. Erhan Bişkin'e,

Sahip olduğu deneyim ve bilgiyi bu çalışmaya yönlendiren ve çalışmanın ortaya çıkmasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel'e

Tez süresince çalışmalarında bilfiil yer alan Filiz ve Dr. Güldem Güven'e

Sorunlara getirdikleri çözümler ile bana çalışılabilir bir ortam yaratan Sevil, Ceyhan, Tolga ve Işın'a

Tüm pratik uygulamarda çalışmalarına destek olan Okan Yayla ve Melike Aktaş başta olmak üzere tüm Genkord çalışanlarına, Selda ve Sedaya,

Her zaman yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Alper, Melisa, Murat, Oğuzhan, Yülser, Oğulcan, Memed, Sinan, Nimet ve Halil'e

İyi ve kötü günde benim yanımda olarak beni motive eden, desteğini her zaman hissettiğim çok SEVGİLİ AYNUK'a

Bu çalışma dahil olmak üzere tüm hayatım boyunca her zaman benim yanımda olup desteklerini esirgemeyen ÇOK DEĞERLİ AİLEM'e

Teşekkür ederim;

SEDAT ODABAŞ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZERGERLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. TEMEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücre Tanımı.....	4
2.1.1. Kendi Kendini Yenileme.....	4
2.1.2. Klonlaşma.....	4
2.1.3. Farklılaşma	5
2.1.3.1. Totipotent hücreler	5
2.1.3.2. Pluripotent hücreler	5
2.1.3.3. Multipotent hücreler	5
2.1.3.4. Unipotent hücreler	6
2.1.4. Embriyonik Kök Hücreler	6
2.1.5. Yetişkin Kök Hücreler	8
2.2. Küçük Partiküllerin ve Manyetizma	11
2.2.1. Tek domainli partiküller.....	11
2.2.2. Süperparamanyetizma.....	12
2.2.3. Ferrosivılar.....	12
2.2.4 Manyetik Nanopartiküller.....	13

2.2.4.1. Demir oksitler.....	14
2.2.4.2. Manyetit.....	15
2.2.5 Manyetit Nanopartikülleri Sentezleme Metotları.....	16
2.2.5.1. Boyut küçültme prosesi.....	16
2.2.5.2. İkili çöktürme yöntemiyle manyetit sentezi.....	16
2.2.6. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküller.....	17
2.2.6.1. Polimer partiküllerin yüzeyine manyetit partiküllerin adsorpsiyon..	17
2.2.6.2. Manyetit partiküllerinin polimerle kaplanması.....	17
2.2.6.3. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu.....	18
2.2.6.4. Monomer/ Su mikroemülsiyonları.....	19
2.2.6.5. Mikroemülsiyon polimerizasyonu mekanizması.....	20
2.3. Hücre İzolasyonunda Manyetik Ayırım Teknikleri	21
2.3.1. Manyetik Ayırım Sistemlerinin Temeli	22
2.3.2. Hücrelerin Manyetik Ayırımını İçin Gerekli Donanımlar	23
2.3.2.1. Manyetik etiketleme ajanı	23
2.3.2.2. Manyetik ve süperparamanyetik partiküller	24
2.3.2.3. Kolloyidal manyetik etiketler	26
2.3.2.4. Manyetolipozomlar	26
2.3.2.5. Moleküler manyetik işaretler	27
2.3.3. Manyetik Ayırıcılar	28
2.3.3.1. Kesikli manyetik ayırıcılar	28
2.3.3.2. Kesintisiz akışlı manyetik ayırıcılar	28
2.3.3.3. Manyetik kararlı akışkan yataklar	31
2.3.4. Hücrelerde Manyetik Ayırım Uygulanan Yöntemler	32
2.3.4.1. Doğrudan ve Dolaylı Ayırım Metodları	32
2.3.4.1.1. Negatif ve Pozitif seçim metodları	33
2.3.5. İmmünomanyetik Ayırım	33
2.4. Akışlı Hücre Ölçer ile Hücre Özelliklerinin Belirlenmesi	35

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.1. Manyetit Nanopartikül Üretimi.....	38
3.2. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Üretimi.....	40
3.2.1. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküllerin Mikroemülsiyon Polimerizasyonu ile Üretimi	40
3.2.1.1. Kullanılan maddeler.....	40
3.2.1.2. Mikroemülsiyon polimerizasyonu.....	40
3.2.2. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküllerin Yüzey Aktif Madde İçermeyen Emülsiyon Polimerizasyonu ile Üretimi	42
3.2.2.1. Kullanılan maddeler.....	42
3.2.2.2. Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu.....	42
3.3. Nanopartikül Karakterizasyonu	42
3.4. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküllerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi ...	44
3.5. Mezenkimal Kök Hücreye Özgün Manyetik Yüklü Polimerik..... Nanopartiküllerin Modifikasyonu.	45
3.6. Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırılması İçin Modifiye Nanopartiküllerin Pratikte Uygulanması ve Ticari Örnekler ile Karşılaştırılması	47
3.7. Akıllı Hücre Ölçer Sitometri (Flow Cytometry) Analizi	48
4.SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI	49
4.1. Manyetit Nanopartiküller	49
4.1.1. Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	50
4.1.1.1. FTIR analizi.....	50
4.1.1.2. X-Işını kırılması analizi.....	51
4.1.1.3. DSC analizi.....	53
4.1.1.4. Manyetometre ile manyetik özelliklerinin belirlenmesi.....	54
4.2. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküller.....	55
4.2.1. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Sitotoksitesitesi.....	56

4.2.2. Nanopartikül Karakterizasyonu	60
4.2.2.1. FTIR analizi.....	60
4.2.2.2. DSC analizi.....	63
4.2.2.5. Manyetometre ile manyetik özelliklerinin belirlenmesi.....	65
4.3. Nanosorbentler ile Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırılması	66
4.3.1. Reaksiyon Süresinin Bağlanma Üzerindeki Etkisi	66
4.3.2. Nanopartikül Büyüklüğünün Bağlanma Üzerindeki Etkisi	67
4.3.4. Nanopartikül Konsanrasyonunun Bağlanma Üzerindeki Etkisi.....	68
4.3.5. Antibadi Konsanrasyonunun Bağlanma Üzerindeki Etkisi	69
4.4. Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırması için Nanosorbentlerin Üretimi.....	71
4.5. Nanosorbentler ile Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırması	71
4.5.1. Saflaştırma Öncesi Hücre Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi	72
4.5.2. Akışlı Manyetik Ayırma Sistemi ile Saflaştırma İşlemi	74
4.5.3. Çöktürmeli Manyetik Ayırma Sisteminde Saflaştırma İşlemi	77
5.SONUÇLAR.....	82
6. KAYNAKLAR.....	85
EKLER.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Embiyonik kök hücre izolasyonunu ve kültürü.....	7
Şekil 2.2. Kemik iliği stroma hücreleri farklılaşma özellikleri.....	10
Şekil 2.3. Manyetitin ters spinal kristal yapısı.....	16
Şekil 2.4. Kesikli manyetik çöktürmeli sistemler	30
Şekil 2.5. Akışlı manyetik ayırma sistemleri	32
Şekil 3.1. Nanopartikül üretim deney düzeneği.....	39
Şekil 3.2. Kovalent bağlanma mekanizması	46
Şekil 4.1. Manyetit nanopartikülünün FTIR spektrumuna ait bir örnek	51
Şekil 4.2. Manyetit nanopartiküllerinin tipik bir XRD spekturumu	52
Şekil 4.3. Manyetit nanopartiküllerinin tipik bir DSC termogramı	53
Şekil 4.4. Manyetit partiküllerinin mıknatıslık eğrileri	54
Şekil 4.5. Sentezlenen manyetik özellikte polimerik partiküllerin Zeta sonuçları ...	57
Şekil 4.6. Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin mezenkimal kök hücreler	59
üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması için yapılan MTT testi sonucu	
Şekil 4.7. FTIR spekturumları:	62
(A) PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin;	
(B) Manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin	
Şekil 4.8. DSC termogramları: (A) PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin;	64
(B) Manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin	
Şekil 4.9. Mıknatıslık eğrileri: (A) manyetit (Fe ₃ O ₄) nanopartikülünün	65
(B) manyetik yüklü PMMA/AAc- 90/10 kopolimerinin	
Şekil 4.10. Reaksiyon süresinin bağlanma üzerindeki etkisi	67

Şekil 4.11 Nanopartikül büyüklüğünün bağlanma üzerindeki etkisi	68
Şekil 4.12. Nanopartikül konsantrasyonunun bağlanma üzerindeki etkisi	69
Şekil 4.13. Antibadi konsantrasyon bağlanma üzerindeki etkisi	70
Şekil 4.14. Saflaştırma öncesi hücre özelliklerinin analizi	72
Şekil 4.15. Saflaştırma öncesi hücre süspansiyonunda	73
(A) CD 105 (B) CD 73 analizi sonucu	
Şekil 4.16. Şekil 4.16. Akışlı manyetik ayırma sisteminde	76
saflaştırma sonrası akışlı hücre ölçer analiz sonuçları	
Şekil 4.17. Çöktürmeli manyetik ayırma sisteminde saflaştırma sonrası	78
akışlı hücre ölçer analiz sonuçları	
Şekil 4.18. Saflaştırma işlemleri ile ilgili özet sonuçları	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Küresel partiküllerin maksimum tek domain boyu	11
Çizelge 2.2. Geçiş metalleri ve metal oksitlerin manyetik özellikleri	13
Çizelge 2.3. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri	14
Çizelge 2.4. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri	15
Çizelge 2.5. Mikron boyutlu manyetik partiküllere ticari örnekler	25
Çizelge 2.6. Nano boyutlu koloidal manyetik partiküllere ticari örnekler	26
Çizelge 2.7. Kesikli manyetik ayırıcı sistemlerden ticari örnekler	29
Çizelge 2.8. Kesintisiz akışlı manyetik ayırıcı sistemlerden ticari örnekler	31
Çizelge 4.1. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen partikül özellikleri	49
Çizelge 4.2. Manyetit nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen	50
karakteristik pikler	
Çizelge 4.3. XRD spektrumundaki “d” değerleri ile kübik manyetit	52
için ASTM kartındaki “d” değerleri.	
Çizelge 4.4. Sentezlenen manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin özellikleri ..	56
Çizelge 4.5. PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda	60
görülen karakteristik pikler	
Çizelge 4.6. Manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR	61
spektrumunda görülen karakteristik pikleri	
Çizelge 4.7. PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin ve manyetit yüklü	62
PMMA/AAc -90/10 kopolimerinin camsı geçiş (T_g) , erime (T_m) ve bozunma (T_d) sıcaklıkları	

Çizelge 4.8. Saflaştırma öncesi CD 105 (+) ve CD 73 (+) hücre değerleri 73

Çizelge 4.9. Akışlı manyetik kolonda saflaştırma işlemi 75

sonucunda elde edilen hücrelerde CD 105 ve CD 73 pozitif

hücre analizi sonucu

Çizelge 4.10. Saflaştırma işlemleri öncesi ve sonrasında 79

elde edilen hücrelerde CD 105 ve CD 73 pozitif hücre analizi sonuçları

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAc	Akrilik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
KPS	Potasyum per sülfat
MMA	Metilmetakrilat
MSC	Mezenkimal kök hücre
m-PMMA/AAc	Manyetit yüklü metil metakrilat –akrilik asit kopolimeri
Ms	Doygunluk mıknatıslığı
PE	Fikoeritrin
PEG-MA	Polietilenglikol metakrilat
PMMA/AAc	Metil metakrilat –akrilik asit kopolimeri
PMMA/PEG-MA	Metil metakrilat-polietilen glikol metakrilat kopolimeri
SDS	Sodyumdodesil sülfat
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı
TMAOH	Tetrametil amonyumhidroksit
V-50	2-2'-Azobis (2-amidinopropan)dihidroklorit

1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI

Vücudumuz kök hücrelerinin farklılaşması ile oluşan bir organizmadır. Dolayısıyla kök hücrelerin üstün rejenerasyon ve farklılaşabilme yeteneklerinin çeşitli nedenler ve hastalıklar sonucu ortaya çıkan birçok organ, doku ve hücre kaybında; kaybın giderilmesi, dokunun yeniden oluşturulması ve hastalığın ortadan kaldırılması için kullanılabileceği gerçeği birçok araştırmacının/uygulayıcının ilgisini hızla çekmiş ve özellikle kemik iliği nakilleri ile başlayan, farklı kök hücre kaynaklarını kullanan, artan hızla devam eden yoğun araştırma ve uygulamalar ortaya çıkmış, “rejenaratif tıp” kavramı gelişmiştir (Keller, 2002).

Son yıllarda yetişkin kök hücre çalışmalarında mezenkimal kök hücreler öne çıkmıştır. Bu hücreler kemik iliğinde heterojen yapı gösteren stroma hücreleridir. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, göbek kordonu, çevre kanı, amniyotik sıvı gibi birçok kaynaktan elde edilebilmektedir (Javazon, Tsai, 2004) Bu hücreler yüksek farklılaşma kapasitesine sahiptir ve hem kaynak aldıkları dokudaki hücrelere (normal farklılaşma) hem de kökenleri dışındaki hücre gruplarına farklılaşabilmektedirler.

Kök hücrelerin tedavi amaçlı kullanılması için temel kriter, hastanın ağırlığı ile orantılı olarak yeterli sayıda hücre olmasıdır. Kök hücrelerin gerekli sayıda eldesi için yüksek verimle çalışan ayırma sistemlerine ve hücre kültür ortamlarında özellikleri değiştirilmeden sayılarının çoğaltılmasına (üretimine) gereksinim vardır. Her iki adım için de uygulanan protokoller vardır, ancak yeterli değildir ve yoğun bir şekilde alternatifleri aranmakta ve mevcutlar geliştirmeye çalışılmaktadır (Baksh, 2004).

Manyetik yüklü sorbentlerin hücre ayırmasında kullanımı özellikle son 10-15 yılda yoğun bir şekilde uygulanmaya başlamıştır. Bunun en önemli nedeni bu manyetik partiküllerin uygulanmasının kolay/hızlı olması, ve kan, doku homojenatları, kültür ortamları, vb. gibi hücre, mikroorganizma ve diğer biyolojik moleküllerin bulunduğu ortamlardan doğrudan ayrılmayı sağlamasıdır (Lea, 1988; Keller, 2002). Manyetotaktik bakteriler ve eritrositlerde olduğu gibi manyetik partiküller, (örneğin

magnetit, Fe_3O_4) doğrudan bakteri ve hücre ile etkileştirilip ayrılabilir. Ancak, sunulan araştırmada da olduğu gibi, birçok örnekte uygulanan yöntemde esas olarak manyetik yüklü yüzeylerinde hücreleri (hücrelerin yüzeylerindeki reseptörleri) özgün olarak tanıma yeteneğine sahip genellikle monoklonal antibadi içeren polimerik partiküller kullanılmaktadır. Bu partiküller ayrılacak hücrelerin bulunduğu ortamla inkübe edilmekte ve oluşan kompleksler genellikle manyetik alan yaratılabilen bir akışkan yataktan geçirilerek tutulmakta, çeşitli kereler yıkama yapıldıktan sonra, değişik teknikler kullanılarak hücreler manyetik partiküllerden ayrılmaktadır.

Hücrelerin manyetik esaslı sistemler ile ayrılmasında/saflaştırılmasında manyetik sorbentlerin çoğu polistiren esaslı, mikron ve nano boyutludur. Çok basit ve ucuz laboratuvar boyutlu sistemlerden çok daha karmaşık ancak kullanımı zor ve pahalı sistemler ticari olarak temin etmek mümkündür (Safarik, 1997). Genellikle kesikli ve akışlı sistemler kullanılmaktadır. Ancak özet olarak kesikli sistemlerin laboratuvar çalışmaları için uygun olduğu, teknolojik boyutlarda yüksek kapasiteler ile üretim söz konusu olduğunda akışlı sistemlerin tercih edildiği görülmektedir.

Yüzeylerinde taşıdıkları aktive edilebilen gruplar çoğunlukla $-COOH$, $-NH_2$ ve $-OH$ dir. Çeşitli biyoligandlar (antibadılar, strepdauidin, avidin, Protein A, Protein G, biyotin, vb.) immobilize formlarını da satın almak mümkündür. Üreticilerin çoğunluğu ABD kaynaklıdır. Hücre ayırmasında kullanılacak ideal bir manyetik partikülün şu özellikleri taşıması beklenir: hücreleri spesifik olmayan şekilde bağlamıyor; ligand üzerinden spesifik bağlanma oluşuyor; hücreleri hızlı ve etkin bağlıyor, fagosite edilmiyor; depolamada ve uygulamada biyolojik ligand sızması az/yok; kimyasal olarak kararlı; manyetik alan uygulandıktan sonra manyetik remenasansı düşük; ortamda yığın oluşturmuyor; hücrelerden ayrılması kolay. Ticari ürünler karşılaştırıldığında bu özellikler yönünden avantajlı ve dezavantajlı yönleri olduğu, ancak çoğunun bu kriterleri yerine getirdiği söylenebilir. Geniş yüzey alanları nedeniyle nanopartiküllerin daha başarılı olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca uygulanması gereken manyetik alan şiddeti de çok daha az olduğu için manyetik ayırma sistemleri daha basit ve ucuzdur.

Sunulan çalışmada, hücre süspansiyonlarından mezenkimal kök hücrelerinin doğrudan ayrılmasını sağlayacak, ticari örneklere alternatif 50-1000nm aralığında manyetik yüklü özel monoklonal antikorlar taşıyan nanosorbentlerin üretimi ve bunların ayrılmasında kullanılacak manyetik ayırma sistemlerinin tasarımı/üretimi ve bu yaklaşımla mezenkimal kök hücreyi ayırımını sağlayacak protokollerin oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle farklı boylarda manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküller MMA/AAC ve PEG/MA ile kaplanarak değişik boyutlarda polimerik nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen polimerik nanopartiküller karakterize edilmiştir ve daha sonra yüzeylerine sahip oldukları fonksiyonel gruplar üzerinden mezenkimal kök hücre zgn CD 105 ve CD 73 monoklonal antibadiler immobilize edilmiştir. Çalışma kapsamında bu immobilizasyon için optimum koşullar incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında iki farklı manyetik ayırma sistemi kullanılarak mezenkimal kök hücreler, hücre süspansiyonlarından saflaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ticari örnekler ile karşılaştırılmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre Tanımı

Her ne kadar bugün kök hücre tanımı yapılmasında bilim dünyasında çeşitli karmaşıklıklar olsada üzerinde uzlaşmaya varılan bir kaç terimi tez kapsamında açıklamak gerekmektedir. Bir kök hücre, kaynağı ister embriyo, ister fetüs, ister yetişkin olsun belirli şartlar altında organizmanın yaşamı boyunca kendi kendine çoğalarak, embriyonik kök hücrelerde olduğu gibi, organları ve dokuları meydana getiren ya da yetişkin kök hücrelerde olduğu gibi, bu organ ve dokulardaki hasarların tamirinde rol oynayan hücrelerdir. Bu hücrelerin özellikle laboratuvar çalışmaları ile elde edilen sonuçlara göre sınırsız olarak bölünebildikleri saptanmıştır.

Kök hücrelerin sahip oldukları bazı özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

2.1.1. Kendi-Kendini Yenileme

Kendi kendini yenileme terimi hücrenin üreme faaliyetleri ile ilgili olup, kök hücreler bu faaliyetleri bakımından ölümsüz, sürekli ve limitsiz bölünme yeteneklerine sahip olarak değerlendirilebilirler. Houck ve arkadaşlarının yaptığı in-vitro çalışmalarda (Houck, 1971) çeşitli somatik hücrelerin en fazla 80 ikilenme gösterdiği, daha sonra üremenin yaşlanma ve replikatif kısıtlamalar sonucunda sınırlandığı gösterilmiştir. Bu nedenlerle sınırsız kendini yenileme yeteneğine sahip olan bir kök hücrenin onkojenik transformasyon olmadan en az 160 ikilenme göstermesi gerekmektedir.

2.1.2 Klonlaşma

Klonlaşma bir kök hücrenin sahip olması gereken önemli özelliklerden birisi olarak değerlendirilmektedir. Klonlaşma bir hücrenin aynı yapıda birden fazla hücreyi üretme kapasitesi olarak adlandırılmaktadır. Klonlaşma özelliği ile hücreler homojen formda hücre grupları oluşturabilmektedir. Bu özellik bir hücre hattı oluşumunda kritik parametredir (Handbook of Stem Cells, Volume 2).

2.1.3 Farklılaşma

Kök hücreler kendi kendini yenileme ve doku ve organ yapılarını oluşturabilecek yeni hücrelere farklılaşabilme yetisine sahip hücreler olarak tanımlanabilmeleri yönünde kullanılan bu basit ama yaygın tanım, embriyonik ve fetus kaynaklı kök hücreler için sürekli olarak geçerli olabilmektedir fakat sınırlı farklılaşma ve kendini yenileme kapasitesine sahip olan yetişkin kök hücreler için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle kök hücreleri tanımlarken göz önünde bulunması gereken diğer bir terim potensiyeldir. Yani bir kök hücrenin farklılaşma potensiyelidir. Bu özelliğe bağlı olarak kök hücreler çeşitli sınıflandırmalara ayrılırlar.

2.1.3.1 Totipotent hücreler

Embriyonun döllemeden sonraki 4. gününe kadar oluşan hücrelere “totipotent hücreler” adı verilmektedir. Esasen spermin yumurtayı döllemesi ile oluşan tek hücreli embriyo ilk totipotent hücre olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler tüm organizmanın yapılarını ve ayrıca plasenta gibi ekstraembriyonik yapıları oluşturabilecek yeteneğe sahiptirler.

2.1.3.2 Pluripotent kök hücreler

Bir pluripotent kök hücre embriyonun üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektoderme ait hücrelere farklılaşabilme yeteneğindeki hücrelerdir. Bu hücreler sahip oldukları özellikle bir canlıyı tümünden oluşturabilecekleri kabul edilmektedir. Bu hücreler ekstraembriyonik tabakaları oluşturamazlar ve bu özellikleri ile totipotent hücrelerden ayrılırlar. Yapılan çalışmalarda erken dönem insan embriyolarından alınan hücreler ile fetus dokusunda gonad kökenli hücrelerin pluripotent kök hücre oldukları gösterilmiştir.

2.1.3.3 Multipotent kök hücreler

Bir multipotent kök hücre kendi kökeninde bulunan hücre ve doku gruplarına farklılaşabilme özelliği gösteren hücrelerdir. Örnek vermek gerekirse kan kökenli

kök hücreler sadece kan hücrelerine farklılaşma göstermektedirler. Bu hücreler sınırlı farklılaşabilme kapasitesine sahip olmalarına rağmen çok sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedirler.

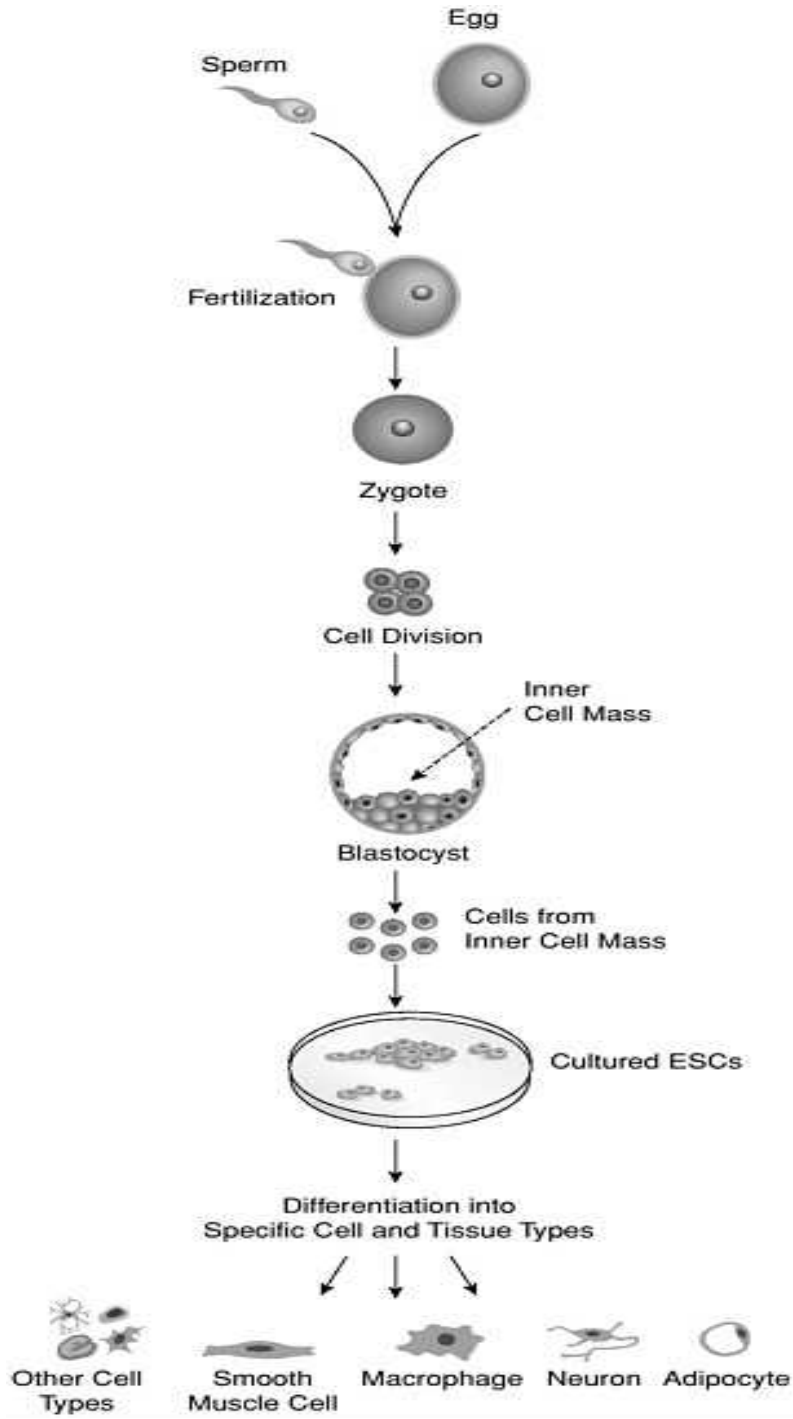
2.1.3.4 Unipotent hücreler

Bu hücreler yalnız bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir. Deri kök hücreleri unipotent hücre grubuna örnek verilebilir.

Kök hücrelerin sahip olduğu özellikler kaynak aldıkları yerler ile ilişkilidir. Özellikler son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte organizmanın çeşitli gelişim evrelerinden ve çok sayıda organ ve dokudan kök hücre izole edilmesi başarılmıştır. Kök hücreler köken aldıkları kaynağa göre temelde 2 gruba ayrılmaktadırlar. Bu iki gruptaki kök hücrelerin temel özellikleri birbirinden farklılık gösterebilmektedir.

2.1.4. Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler 5-6 günlük erken dönem embriyo formu olan blastositin iç hücre kitlesinden elde edilmektedirler. Bu iç hücre kitlesinde yaklaşık olarak 200 hücre bulunabilmektedir. (National Academy Press,ISBN 0-309-07630-7,2001) . Bu hücrelerin temel karakteristik özellikleri arasında kendi kendini yenileme, in vivo ve in vitro koşullarda çok yönlü farklılaşma, normal karyotipte klon oluşturabilme, iyi hazırlanmış kültür koşullarında çok iyi büyüme göstermeleri sayılabilir. Bu özellikler in vivo hayvan deneyleri ile tayin edilmiştir ve bu hücrelerin embriyonun 3 germ tabakasını ve germ hattı kimerik yapıları oluşturduğu saptanmıştır. Bu hücrelerim embriyoid yapılar ve teratoma oluşturma potensiyelleri çok yüksektir. Bu nedenle in vivo insan çalışmaları yapılamadığından ilgili özelliklerin insan embriyonik kök hücreleri ile birebir örtüştüğünü söylemek için in-vitro çalışmalardan elde edilen moleküler işaret sonuçlarını karşılaştırmak gerekmektedir. Brivanlou ve ark. yaptığı moleküler işaretlerin tayini çalışması ile insan embriyonik kök hücrelerin özellikleri belirlenmiştir. (Brivanlou, 2003) Şekil 2.1'de Embriyonik kök hücre izolasyonunu ve kültürünü şematik olarak göstermektedir.



National academy press Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine (2002) Copyright © 2003 p15.

Şekil 2.1. Embiyonik kök hücre izolasyonunu ve kültürü

2.1.5. Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler embriyonik kök hücrelerden farklı olarak multipotent özellikle, kısıtlı farklılaşma özelliğine sahip bunu yanında kök hücre kriterleri olan farklılaşma , kendi kendini yenileme ve klonlaşma özellikleri gösteren hücrelerdir. Özellikle yetişkin kök hücreler vücutta buldukları bölgede onarım ve yenileme görevindeki hücrelerdir. Kemik iliği nakilleri ile başlayan kök hücre çalışmalarında en çok çalışılan kök hücre grubu hematopoiyetik kök hücrelerdir. Bunun yanında kemik iliği stromasından kaynaklı mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, epitelial kök hücreler gibi çeşitli kaynaklar elde edilen yetişkin kök hücrelerde mevcuttur.

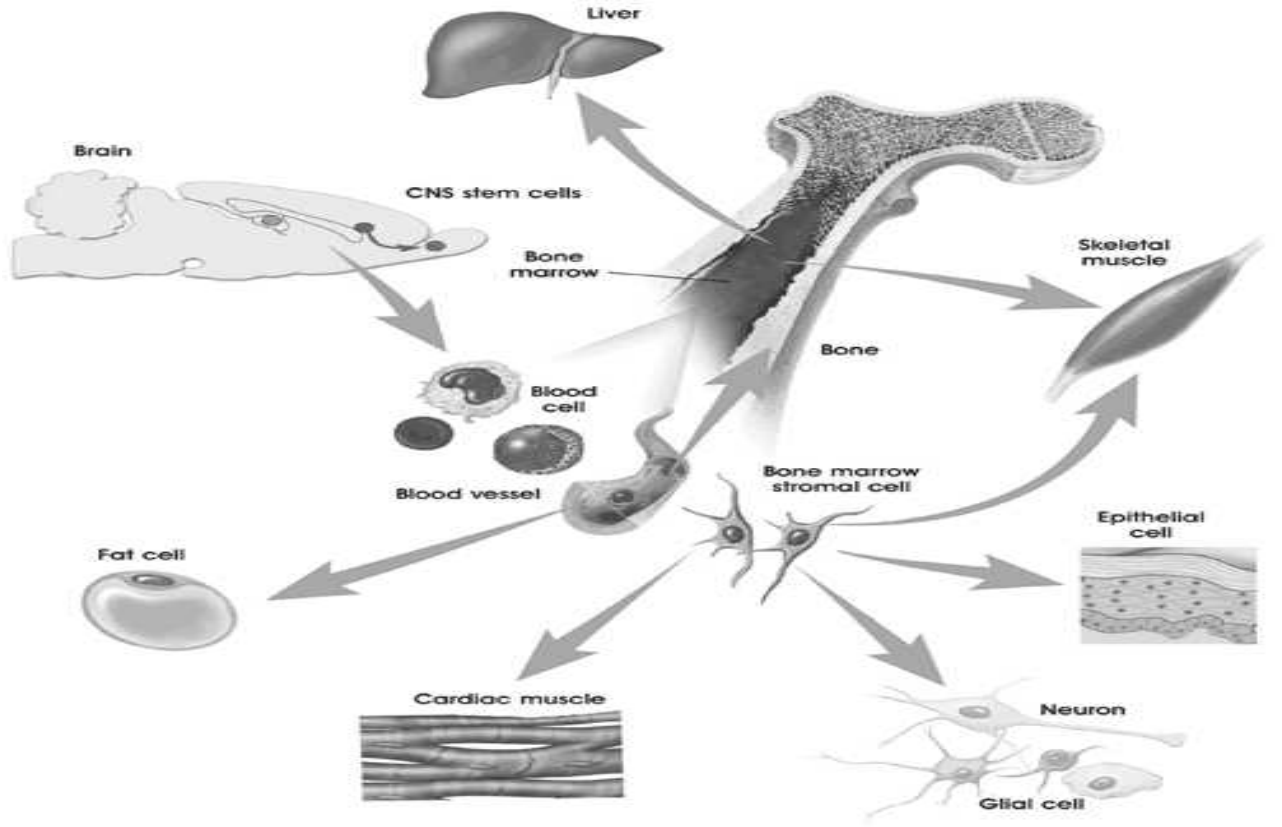
Her ne kadar yetişkin kök hücrelerin genel olarak kendi kökenlerindeki hücrelere farklılaşma eğiliminde oldukları düşünülse de son yıllarda yapılan çalışmalarda belirli kök hücrelerin hem kendi kökenlerindeki kök hücreler (normal farklılaşma) hem de kendi kökenleri dışındaki hücrelere (trans farklılaşma) farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin kısıtlı olmayıp esnek ve geri dönüşümlü olduğu bu farklılaşma olgusuna “plastisite” adı verilmektedir. Özellikle kemik iliği kökenli kök hücreler ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin miyoblastlara (Ferrari, 1998), endotel hücrelerine (Rafii,1994; Asahara, 1997; Lin, 2000), karaciğer ve akciğer hücrelerine (Petersen, 1999; Theise ve Lagasse 2000) ve hatta sinir dokusuna (Mezey, 2000; Krause, 2001) farklılaşabildiği gösterilmiştir.

Son yıllarda hematopoiyetik kök hücreler ile yapılan çalışmaların yanında esasen kemik iliğinde heterojen yapı gösteren stroma hücreleri olan mezenkimal kök hücreler de ön plana çıkmışlardır. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, göbek kordonu, çevre kanı, amniyotik sıvı gibi birçok kaynaktan elde edilebilmektedir. (Javazon ve Tsai 2004). Bu hücreler yüksek farklılaşma kapasitesine yanında, hem kaynak aldıkları dokudaki hücrelere (normal farklılaşma) hem de kökenleri dışındaki hücrelere farklılaşabilmektedirler (“plasticity”) (Keller, 2002). Dominici ve ark. yaptıkları çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin uygun bir hidroksiapatit/trikalsiyumfosfat matriks üzerinde üretildiğinde kaynak aldıkları kemik hücreleri olan osteoblastlara ya da kıkırdak hücreleri olan kondrositlere

farklılaşmaktadırlar (Dominici, 2001). Lee ve ark. ve Javazon ve ark değişik zamanlarda yaptıkları çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerinin kalp kası, sinir hücresi, karaciğer dokuları gibi embriyonik gelişmede aynı tabakadan köken almayan hücre ve doku gruplarına da farklılaşabildikleri de gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin sahip oldukları bu farklılaşma özellikleri Şekil 2.2.'de şematik olarak gösterilmektedir.

Klinik çalışmalar göstermektedirki asıl olarak kemik iliği kökenli bu hücreleri kemik iliği aspirasyonu ile elde etmek mümkündür ve kemik iliğindeki toplam çekirdekli hücre sayısının yaklaşık %0,001'ni oluştururlar. Standart hücre kültürlerinde *in vitro* olarak çoğaltılabilmektedirler (Pittenger., 1999). Mezenkimal kök hücreleri, hücre popülasyonlarında tanımlayabilmek için çok çeşitli monoklonal antiserumlar bulunmaktadır. Bu hücreler genel olarak TGF- β üzerindeki epitop bölgesi olan CD 105 ile özgün olarak bağlanan SH2 pozitif hücrelerdir. Bu özellik kullanılarak hücrelerin immünomanyetik ayırımı sağlanabilmektedir (Cheifetz., 1992) . Aynı zamanda bu hücreler membrana bağlı ekto-5-nükleotidaz epitopuna (CD 73) özgün olarak bağlanan SH-3 ve SH-4 pozitif hücrelerdir (Barry, 2001). Bu özgün yüzey özellikleri dışında mezenkimal kök hücreler CD 10, CD 14, CD 31, CD 34, CD 45, CD 133 ve MHC Sınıf II negatif CD 29, CD 44, CD 90, CD146, CD 166 ve MHC Sınıf I pozitif yüzey özellikleri ile de karakterize edilirler. (Baksh, Javazon, Tsai, Wang, 2004)

Mezenkimal kök hücrelerin önemli bir özelliği, "immune privilege" hücreler olmalarıdır. Bu nedenle *in vivo* veya *in vitro* koşullarda immun yanıt oluşturmadıkları, dolayısıyla klinik olarak immun baskılayıcılara gerek kalmadan kullanılabilecekleri önemle not edilen bir husustur.



© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibluk, Caitlin Duckwell

Şekil 2.2. Kemik iliği stroma hücreleri farklılaşma özellikleri

2.2. Küçük Partiküller ve Manyetizma

2.2.1. Tek Domainli Partiküller

Partiküller domain adı verilen manyetik birimler içeren küçük bölgeler içerirler. Bir domain boyu yaklaşık 0.05 ile 0.5 μm arasında ve her bir maddenin kendine özgü özelliklerine bağlıdır. Tek tek domainler arası manyetik momentinin dönme yönünü içeren birbirine komşu iki domain arasındaki sınır, domain duvarı olarak adlandırılır. Bir domain duvarı yaklaşık birkaç angstrom (Å) kalınlığındadır. Bir partikülün boyu küçüldükçe partikül başına düşen manyetik domainlerin sayısı bir domain duvarı oluşturmak için uygun olmayan limitlere kadar düşmektedir (Ozaki., 2000).

Çizelge 2.1 Küresel partiküllerin maksimum tek domain boyu

Materyaller	Ds(nm)
Fe	14
Co	70
Ni	55
Fe ₃ O ₄	128
γ -Fe ₂ O ₃	166

1930'da Frenkel ve Dorfman ilk olarak kritik çapın altındaki boyda bulunan partiküllerin tek domain yapısını göz önünde bulunduran teorileri formüleştirmişlerdir. Bu kritik boy aralığındaki nanopartiküller tek domain maddelerdir. (Çizelge 2.1). Bir manyetik alan uygulandığında spinler yönelir ve sonraki manyetik doyumluk benzer yığın materyallerine göre daha düşük manyetik alanlarda elde edilir. Manyetik alan azaldığında, mıknatıslığı giderme spinlerin düzenli dönmelerine bağlıdır ve büyük bir zorlayıcı güç (H_c) gerekir. Tek domainli partiküllerdeki bu zorlayıcı gücün büyük olması küresel olmayan partiküller için şekil anizotropisinden ve manyetokristallinden kaynaklanmaktadır.

2.2.2. Süperparamanyetizma

Tek domain bir partikül deneysel sıcaklıklarda mıknatıslık dengesine çok kısa sürede geliyorsa bu partiküller süperparamanyetik olarak adlandırılırlar (Ozaki, M., 2000). Dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında bu partiküllerin manyetik momentleri partikül hareket ve dönmesiyle uygulanan alan yönünde dizilirler. Alan uzaklaştırıldığında ise bu yönlenmiş olan manyetik momentlerin rastgele dizilimleri (gevşeme zamanı) yaklaşık 100 saniyedir. Partiküllerin gevşeme zamanı 100 saniyeden büyük olduğunda ya da Çizelge 2.1 'de verilen kritik değerlerden boyu daha büyük olduğunda partikül bloke olmuş denir. Maddenin bloke olduğu sıcaklığa "bloking" sıcaklığı (T_B) denir. T_B sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda partikül anizotropisi momentin serbest hareketini bloke eder. T_B sıcaklığının üstünde ise uygulanan manyetik alanda moment serbest olarak dizilir ve süperparamanyetiklik gözlenir.

Nanopartiküllerin süperparamanyetik yapısı, uygulanan alan uzaklaştırıldığında Brownian hareketi ve Néel dönmesiyle yönetilen dizilmiş spinlerin rastgele diziliminden ortaya çıkmaktadır. Brownian hareketi ve Néel dönmesi, partikül ve spin dönmesi nedeniyle manyetik gevşeme mekanizmasıdır. Néel dönmesi partiküldeki mıknatıslık momenti yada vektörünün yönelmesiyle oluşmaktadır.

Bir partikül tek aksenal anizotropisiyle sıfır zorlayıcı güç gösterdiğinde süperparamanyetizim durumu gözlenir yani süperparamanyetik partiküller histerisis eğrisi göstermezler (Sorensen, 2001).

2.2.3. Ferrosıvılar

Bir taşıyıcı sıvı içinde dağıtılmış süperparamanyetik partiküller ferrosıvılar (ferrofluid) olarak adlandırılmaktadır. Kararlı bir ferrosıvı süperparamanyetik partiküller, bir taşıyıcı sıvı ve bir yüzey aktif madde içermektedir. Ferrosıvılar doğal olarak bulunmazlar ve ilk olarak 1960 yılında tanımlanmışlardır.

2.2.4. Manyetik Nanopartiküller

Bir sıvı içerisinde süperparamanyetik dispersiyonlar oluşturan manyetik partiküller 1'den 100 nm boyuna kadar değişen skalada metal ve metal oksitlerden oluşmaktadır. Bu metal ve metal oksitler Ni, Co, Fe, Fe₃O₄ ve Fe₂O₃'den oluşmaktadır.

Çizelge 2.2. Geçiş metalleri ve metal oksitlerin manyetik özellikleri

Maddeler	Doymunluk Mıknatıslığı (Ms) (emu/cm ⁻³) 298 K	Curie Sıcaklığı (K)
Ni	485	631
Co (Kübik)	1400-1422	1404
Fe (Kübik)	1700-1714	1043
Γ-Fe ₂ O ₃	394	820-986
FeO.Fe ₂ O ₃	480-500	858
MnO. Fe ₂ O ₃	410	573
CoO. Fe ₂ O ₃	400	793
NiO. Fe ₂ O ₃	270	858
CuO. Fe ₂ O ₃	135	728

Bu geçiş metalleri oldukça toksik ve oksitlenmeye çok duyarlıdır. Ni, Co ve Fe atmosfer koşulları altında antiferromanyetik özellik gösteren NiO, CoO ve FeO alaşımlarına oksitlenmektedir. Neredeyse nanopartiküllerin büyük yüzey alanı nedeniyle önemli bir problem olan oksidasyon mekanizmasını önlemek için sentetik ve/veya fiziksel bir metot yoktur. Demir oksitler, düşük doymunluk mıknatıslığı değerlerine sahip olmalarına rağmen, diğer metallere göre daha az okside olmaktadır (Sorensen ,2001).

2.2.4.1. Demir oksitler

Demir oksitler farklı manyetik özellikler ile değişik kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır. Ferrimanyetizma gösteren bu ilginç materyaller γ -Fe₂O₃ , Fe₃O₄, MO.Fe₂O₃ (M=Co, Mn, Ni veya Cu) gibi demir oksitlerdir. Ferrimanyetik demir oksitler geçiş metalleri gibi ferromanyetik metallere daha küçük bir manyetik cevap özelliği gösterirler. Fakat, demir oksitler oksidasyona daha az duyarlı ve bu nedenle kararlı manyetik etkilerini korumaktadırlar.

Çizelge 2.3. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri

Mineral	Formül	Manyetik Özellik
Goethite	α -FeOOH	Antiferromanyetik
Akaganéite	β -FeOOH	Antiferromanyetik
Lepidocrocite	γ - FeOOH	Antiferromanyetik
Feroksait	δ - FeOOH	Ferrimanyetik
Ferrihidrit	Fe ₅ HO ₈ .4H ₂ O	Antiferromanyetik
Hematit	α -Fe ₂ O ₃	Zayıf ferrimanyetik
Maghemit	γ -Fe ₂ O ₃	Ferrimanyetik
Manyetit	Fe ₃ O ₄	Ferrimanyetik

Manyetit (Fe₃O₄) ve maghemit (γ -Fe₂O₃) en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir. MO. Fe₂O₃ metal karışımı ferritler, çeşitli fiziksel ve manyetik özelliklere sahiptirler ve partikül şekli ve tek domain yapısı nedeniyle elektronik uygulamalar için geliştirilmiştir.

Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir (Çizelge 2.4.). Her ikisinde ferrimanyetik özellik gösterir. Fakat maghemit daha düşük doygunluk mıknatıslığına sahiptir. Bunların manyetik cevapları alt örgü etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Maghemit (γ -Fe₂O₃) sadece Fe³⁺ iyonlarından oluşmaktadır. Kristal yapısında Fe³⁺ iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısında oktahedral düzenlenmiştir. Manyetit ise (FeO.Fe₂O₃), 1:2 molar oranında Fe³⁺ ve

Fe²⁺ iyonlarından oluşmaktadır. Fe³⁺ iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı oktahedral ve Fe²⁺ iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir.

Çizelge 2.4. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri

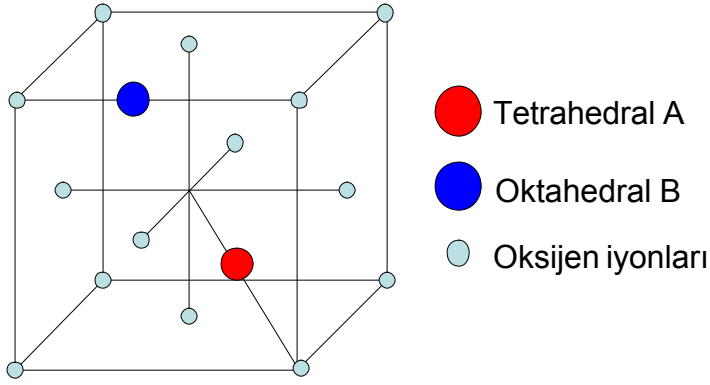
	Kristal yapısı	Hücre boyutu (nm)	Renk	Doygunluk miktatılığı	Curie sıcaklığı
Manyetit	Kübik	a ₀ =0.839	Siyah	90-98	850
Maghemit	Kübik tetragonal	a ₀ =0.834	Kırmızı kahve	76-81	820-986

Her ikisinde curie sıcaklığı (T_c) oldukça yüksek olması nedeniyle farklı manyetik cevap uygulamalarında kullanılabilirler. Fakat maghemitin 713 K'in üzerindeki sıcaklıklarda Hematite dönüşmesi nedeniyle curie sıcaklığının (T_c) ölçümü zordur. Her iki demir oksit yapısı ferrimanyetik olması ve aynı mekanizma ile bir sıvı içersinde stabilize edilmesi nedeniyle literatürde eşit gösterilmektedir (Cornell, R., 1996).

2.2.4.2. Manyetit

Manyetit kristal yapısı

Manyetit (Fe₃O₄), oksijen iyonlarının her üç eksen boyunca birbirine karşı gelen pozisyonlarda küp içersinde düzenli yerleştiği kübik birim hücre merkezi şekil ile bir ters spinel kristal yapısına sahiptir. Birim hücre, 32 O²⁻ anyonu 16 Fe³⁺ katyonu ve 8 Fe²⁺ katyonları olmak üzere 56 atomdan oluşmaktadır. Manyetitin kimyasal formülü Fe₃O₄, fakat FeO.Fe₂O₃ olarak tanımlanmaktadır. Ters spinel yapı Fe³⁺ iyonlarının yarısı tetrahedral, geri kalan Fe³⁺ iyonları ve Fe²⁺ iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir (Cornell, R., 1996; Brabers ,V., 1995).



Şekil 2.3. Manyetit ters spinal kristal yapısı

2.2.5 Manyetit Nanopartikülleri Sentezleme Metotları

Manyetit ve maghemit nanopartiküllerin sentetik metotlarla oluşturulması için literatürde farklı birçok yöntem bulunmaktadır. Manyetit, boyut küçültme ve sulu çöktürme olmak üzere sentetik olarak iki şekilde sentezlenmektedir. Manyetitin çöktürme yöntemiyle sentezlenmesi genel olarak demir iki ve üç hidrat tuzlarının güçlü bir bazla çöktürülmesi temeline dayanmaktadır.

2.2.5.1. Boyut küçültme prosesi

1960'lı yıllarda Papel tarafından geliştirilen küre öğütme değirmeni (ball mill grinding), mikron boyutundaki manyetit partikülleri yaklaşık 10 nm çapında partiküllere dönüştürülmesinde kullanılan ilk metottur. Bu yöntemle nanopartiküller oluşturmak için 500-1000 saat gibi uzun bir öğütme periyodu gerektiği için sulu çöktürme metotları bu yöntemin yerini almıştır.

2.2.5.2. İkili çöktürme yöntemiyle manyetit sentezi

1990 'lı yıllardan beri manyetit, Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının bir baz ile çöktürülmesiyle oluşturulmaktadır. Manyetit oluşumu bu kadar eski tarihlerden beri bilinmesine rağmen kesin oluşum mekanizması halen bilinmemektedir. Oluşum mekanizması ile ilgili bir genel teori, Fe^{2+} tuzunun $Fe(OH)_2$ 'e hidroliz olup manyetit oluşturmak için hidroksitlerle reaksiyona girdiğini ileri sürmektedir (Blesa,1989; Tamavra,

1989). Hidratlı Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları arasındaki reaksiyonların belirsizliğine rağmen birçok araştırmacı kübik ters spinel kristal yapının elde edilmesinde çekirdeklenme ve kristal geliştirme mekanizmalarının etkilerini araştırmışlardır. Birinci basamağın ardından kristal geliştirmeyle monodispers partiküller oluşturmak için çözelti içinde iyonların çekirdeklenmesinde tedbirli olunması gerektiğini bildirmişlerdir. Deneysel çözelti koşullarının kristal geliştirme basamağı sürecini etkilediği belirtilmektedir (Cornell, 1991; Gribov, 1990).

2.2.6. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküller

Mikron ve mikronaltı manyetik yüklü polimerik partiküller, polimerizasyon sırasında polimer partiküllerin içine demir oksit partiküllerin katılması ve polimer partikül yüzeylerine demir oksit nanopartiküllerinin adsorplanması olmak üzere iki şekilde oluşturulmaktadır. Bu sistemlerde manyetik yüklü yada polimerle kaplı partiküllerin toplam partikül boyu büyüktür.

2.2.6.1. Polimer partiküllerin yüzeyine manyetit partiküllerin adsorpsiyonu

Polimer kürelerinin yüzeyine manyetit nanopartiküllerinin adsorpsiyonuyla manyetik kompozit sistemler elde edilmektedir. Bu sistemler literatürde bulunan manyetik mikrokürelerin bir tipidir. Sitratla stabilize edilmiş manyetitin polistiren (PS), polistiren/poli(izopropilakrilamid) (p(S/NIPAM) çekirdek/kabuk) ve poli(izopropilakrilamid) p(NIPAM) küreleri üzerine adsorpsiyonu ile oluşan partiküller manyetik polimer kompozitlerine birer örnektir. Bu metot, Furuzawa tarafından yapılmış ön çalışmaya dayanmakta ve 1) anyonik demir oksit ve kationik lateks partiküllerin sentezlenmesi 2) polimer çekirdek partiküllerinin yüzeyine anyonik demir oksit partiküllerinin adsorpsiyonu 3) çekirdek latekslerinin üzerine manyetik kaplı partiküllerinin kapsüle edilmesini içermektedir.

2.2.6.2. Manyetit partiküllerinin polimerle kaplanması

Polimerizasyon sırasında manyetitin polimer partiküllerinin içine katılması genellikle manyetik kompozit olarak adlandırılır. Literatürde bu şekilde hazırlanan manyetik yüklü polimer partiküllerine birçok örnekler bulunmaktadır.

Manyetik nanopartiküllerin polimerle kaplanmasında en çok kullanılan yöntem manyetik partiküllerin etrafında monomerlerin süspansiyon, miniemülsiyon, dispersiyon, ters mikroemülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonu gibi çeşitli yöntemlerle polimerleştirilmesine dayanmaktadır. Dispersiyon, süspansiyon polimerizasyonlarıyla mikron boyutunda partiküller elde edilirken mikroemülsiyon polimerizasyonu ile nano boyutta manyetik yüklü polimerik partiküller elde edilmiştir.

2.2.6.3. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon, miniemülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyon yöntemleri, sulu veya organik fazda dispers durumda polimerik partiküllerin (10-1000nm) bulunduğu latekslerin üretiminde kullanılan polimerizasyon yöntemleridir (Piirma ve ark., 1982). Mikroemülsiyon polimerizasyonunda genellikle 50 nm den daha küçük partiküller (“nanopartiküller”) içeren lateksler elde edilir. Bu yöntemde hızlı polimerizasyon reaksiyonlarıyla yüksek molekül ağırlıklarına (birkaç milyon mertebesinde) ulaşılır. Partikül boyu nedeniyle mikroemülsiyon lateksleri, emülsiyon ve miniemülsiyonun tersine şeffaf ve uçuk mavimsi renktedir. Bu latekslerin kontrollü çapraz bağlama yöntemleri ile gözenekli katılara da dönüştürülmesi mümkündür (Candau, 1987; 1992).

Mikroemülsiyon lateksleri termodinamikçe kararlı, optik olarak geçirgen dispersiyonlardır ve polimerik partiküller, dağıtma ortamı (örneğin su) ve yüzey aktif maddeler içerirler. Elde edilen kararlılık, çok düşük arayüzey geriliminden kaynaklanır. Çoğu kez, düşük ara yüzey gerilimini sağlamak için bir yardımcı yüzey aktif madde (örneğin alkoller) eklenmesi gerekir. Bu husus aslında mikroemülsiyonun dezavantajı olarak kabul edilir. Burada, emülsiyona göre çok daha fazla yüzey aktif madde kullanılır ki bu da ara yüzeyin kirlenmesine yol açar.

Mikroemülsiyon polimerizasyonunda genelde suda çözünmeyen veya az çözünen monomerler su ortamında dağıtılır. Suda çözünen monomerler için bunun tersi yani monomerin bir apolar organik fazda dağıtılması söz konusudur. Burada yüzey aktif maddenin türü ve miktarı önemlidir. Monomer türüne göre çeşitli yüzey aktif maddeler karıştırılarak, termodinamik olarak kararlı mikroemülsiyonlar kolaylıkla oluşturmak ve bunlara uygun başlatıcılar (suda veya organik fazda, monomerde

çözünen) kullanılarak nanopartikül lateksleri üretmek mümkündür (Friberg ve Bothorel,1986).

2.2.6.4. Monomer/ Su mikroemülsiyonları

İlk olarak monomer/su mikroemülsiyonuyla metil metakrilat (MMA) ve metil akrilatı (MA) polimerleştirmek 1980 yılında denenmiştir (Stoffer ve Bone, 1980). Fakat polimerizasyon sırasında faz ayrımı nedeniyle başarı sağlanamamıştır. Daha sonra çok az miktarda stireni (%1.9), %1.9 setilmetil amonyum bromür (CTAB) ve yaklaşık %1 hekzanol ile stabilize etmişler ve monomer /su mikroemülsiyonu ile polimerleştirme gerçekleştirilmiştir (Atik ve Thomas, 1981). Düşük stiren içeriği daha sonra, ağırlıkça %6-10 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve çok az miktarda 1-pentanol kullanılarak ağırlıkça %3-6'ya çıkarılmıştır. Ayrıca stiren ve/veya MMA mikroemülsiyon polimerizasyonu, UV laser başlatıcı, foto-redoks polimerizasyonu ve Raman spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir (Holderoff, 1990; Feng ve ark., 1990).

Bu sistemlerde kararlı polistiren (PS) mikrolateksler üretmek için yüzey aktif stiren içerikli monomer/su mikroemülsiyonlarda faz ayrımı veya polimerin çökmesi görülmüştür. Sonuç lateksin kararlılığı, polimer ve yardımcı yüzey aktif madde uyumsuzluğu olarak yorumlanmıştır (Gan ve ark., 1983). Mikroemülsiyon reçetelerinde yardımcı yüzey aktif madde olarak kullanılan alkoller polimeri çözmezken, monomer için çözücü oldukları not edilmelidir.

Monomer/su mikroemülsiyon polimerizasyonunu yardımcı yüzey aktif madde kullanılmayan sistemde çalışmak daha az karışıktır. Son yıllarda çalışılan birçok MMA veya stiren mikroemülsiyonlarında dodesiltrimetilamonyum bromür (DTAB), setilmetilamonyum bromür (CTAB), setiltrimetilamonyum klorür (STAC) ve oksidesiltrimetilamonyum klorür (OTAC) gibi katyonik yüzey aktif maddeler kullanılmıştır.

2.2.6.5. Mikroemülsiyon polimerizasyonu mekanizması

Mikroemülsiyon polimerizasyonundaki mekanizmayı daha iyi anlamak için, emülsiyona göre kullanılan monomer konsantrasyonunun çok az ve yüzey aktif madde konsantrasyonunun çok yüksek olduğu hatırlanmalıdır. Monomer/ yüzey aktif madde ağırlık oranı, klasik emülsiyonda olan 30-60 değerlerine karşılık mikroemülsiyonda yaklaşık 0.3-1.0 civarındadır.

İki fark, başlangıç sistemlerinin yapısından kaynaklanır. Klasik emülsiyonda, monomer büyük monomer damlacıkları içinde ($d=1-10 \mu\text{m}$) ve küçük miseller içinde ($d=5-10 \mu\text{m}$) yerleşmiş ve sürekli fazda kısmen çözünmüştür. Mikroemülsiyon polimerizasyonunda ise, monomer şişmiş miseller ($d=5-10 \text{nm}$) içinde çözünür. Mikroemülsiyon dinamik karakterine ilave edilen bu özellikler, emülsiyon ile olan farkını ortaya çıkarır.

Birinci basamakta polimerizasyon, başlatıcı radikallerinin mikroemülsiyon damlacığının içine girmesiyle veya homonükleasyonla başlatılır. Daha sonra polimerik partiküllerin büyümesi, partiküller arasında çarpışmalar veya sürekli faza monomer transferi ile devam eder. Son basamakta partikül içi zincir uzamasının sonlanmasıyla polimerizasyon biter. Sonuç lateks ortamı, polimerik partiküllerden ($d=40 \text{nm}$) ve küçük boş miseller ($d=3\text{nm}$)'den ibarettir.

Partikül büyümesinin ve yüksek miktarda yüzey aktif madde kullanılması sonucu, reaksiyon karışımında aynı boyutta küçük miseller her zaman mevcuttur. Çekirdeklenmiş polimerik partiküllere göre bu miseller yüksek toplam ara yüzey alanları şunu kanıtlar ki, miseller sürekli fazda üretilen radikaller tercihen yakalamaktadır. Bundan dolayı, tek bir basamakta oluşan herbir partikül, sürekli partikül çekirdeklenmesi prosesine uyar. Bu mekanizma, TEM deneyleriyle kanıtlanmıştır. Bu davranış, klasik emülsiyon polimerizasyonunda gözlenenden farklıdır. Çünkü klasik emülsiyon polimerizasyonunda ilk nükleasyon basamağını (I. aralık), sabit partikül sayısında partikül büyümesi (II. Aralık) takip eder.

2.3. Hücre İzolasyonunda Manyetik Ayırım Teknikleri

Hücre kaynaklı tedavi sistemlerinin gelişmesine paralel olarak, bu tedavilerde kullanılması planlanan hücre sayısında artmaktadır. Esasen bireyin ağırlık, yaş gibi fiziksel özelliklerine bağlı olan toplam hücre gereksinimi, tedavisi düşünülen hastalık için değişiklik gösterebilmektedir. Manyetizma uzun yıllardır hücre izolasyon çalışmalarında önemli rol almıştır. Manyetizma çalışmaları ile manyetik örneklerin manyetik olmayanlardan ayrılması sağlanabilmektedir.

İlk uygulamalar 1970 yıllarda kısıtlı olanaklar ile başlamış ve özellikle son yıllarda yeni manyetik partikül sentez tekniklerinin geliştirilmesi ile gelişerek çok çeşitli ayırım tekniklerinin ortaya çıkması sağlanmıştır. Hücre ayırımında manyetik tekniklerinin kullanılmasının diğer teknikler ile kıyaslandığında çok çeşitli avantajları vardır. Bu teknik ile hedef hücrelerin kan, kemik iliği, doku homojenati, dışkı, su ve gıda gibi örneklerden doğrudan ayrımı, kromotografik ve elektroforik göç yöntemleri ile kıyaslandığında hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilir. Manyetik partikül ile manyetik olmayan partiküllerin, manyetik alan etkisindeki davranışları temelde yüksek seçicilik ile ayırma izin vermektedir. Santrifüj ve filtrasyon yöntemleri ile ayırma işlemlerine kıyasla, bağlanma ve sökme esnasındaki gerinim kuvvetlerinin az olması manyetik teknikler ile ayırmanın daha kolay olmasını sağlamaktadır. Ayrıca manyetik tekniklerde kullanılan tampon sistemlerinin kolay olması ve yıkama işlemlerinin basitliği ve azlığı nedeni ile işlem süresi oldukça kısalmaktadır. Geleneksel akışlı hücre ölçer (Flow cytometry) metodlarına kıyasla ilgili hücrenin seçimi ve saflaştırılmasında ölçek büyütme mümkündür. Hem lab ölçeği hem de orta ölçekli otomatik manyetik ayırma sistemlerinde elde edilen hücreler değişikliğe uğramamış, saf ve canlı hücrelerdir. İşlemin sürdürülebilmesi açısından karışık protokollere ve pahalı yan ekipmanlara gereksinim duyulmamaktadır.

Manyetik hücre ayırma sistemleri konusunda literatürde çok çeşitli çalışmalar bulunabilmektedir. Safarik ve ark. ve Olsvik ve ark. yaptıkları çalışmalarda bu tekniğin mikrobiyoloji alanında uygulamaları gösterilmiştir. (Safarik, 1995; Olsvik, 1995) Lea ve ark. ticari Dynabeads manyetik partiküllerini kullanarak lenfositlerin fonksiyonlarını araştırmıştır (Lea, 1988) Rye ve ark. karbohidrat kaplı manyetik

partiküller ile karbohidrat bağlanma molekülleri eksprese eden hücreleri ortamdan izole etmeyi başarmıştır. Olsvik ve Schmid polimerik manyetik partikülleri kullanarak immüno affinite sistemi ile hücre ayrıştırması gerçekleştirmiştir.

2.3.1. Manyetik Ayırım Sistemlerinin Temeli

Genel olarak hücre ayırımında kullanılan manyetik ayırma sistemleri iki tiptedir. Birinci tipte hücreler içsel manyetik hareketler gösterdikleri için ayırimda herhangi bir müdahaleye gereksinim duyulmamaktadır. Doğada bu özellikte sadece iki hücre tipi bulunmaktadır. Bunlar yüksek konsantrasyonda paramanyetik hemaglobin içeren eritrositler (kırmızı kan hücreleri) ve içlerinde küçük manyetik partiküller bulunduran manyetotaktik bakterilerdir. İkinci tip ayırma sistemlerinde bir ya da daha fazla manyetik olmayan bileşen içeren karışım manyetik etiketler ile işaretlenir. Böylece işaretlenen bileşenin ortam arasında manyetik fark yaratılarak ayrılması sağlanır. Manyetik etiketlemede doğada çok çeşitli bulunan afinite ligandları hücre yüzeyinde bulunan hedef moleküller ile etkileşir. Genel olarak hücre yüzeyindeki antijen bölgelerine özgün antikolar kullanılmaktadır.

Manyetik ayırım prosesi ise çeşitli formlarda tasarlanmış manyetik ayırıcılar ile gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin bu ayırıcı sistemlerde buldukları ortamlardan saflaştırılması 3 temel adımda uygulanmaktadır.

- 1) İstenen hücreyi içeren örnek süspansiyonu manyetik etiketler ile karıştırılır. Bu aşamada manyetik etiketler ile hedef hücreler arasında etkileşim ve bağlanma için 30-60 dakika arasında bir inkübasyon zamanı beklenir. Daha sonra manyetik kompleksi içeren ortam manyetik ayırıcı kullanılarak ortamdaki ayrılır ve süpernatant uygun yöntemler kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılır.
- 2) Manyetik kompleks ortamdaki istenmeyen unsurların uzaklaştırılması için bir iki kez uygun tamponlar kullanılarak yıkanır. Bu aşamadan sonra hücreler istenilen amaca uygun olarak kullanılabilir.
- 3) Seçilen uygulamanın amacına uygun olarak manyetik etiketin hedef hücre saflaştırılması gerçekleştikten sonra hedef hücreden ayrılması da gerçekleştirilebilmektedir.

Literatürdeki çalışmalarda göstermektedirki manyetik ayırıcı olarak kullanılan sistemler genellikle kesikli sistemlerdir ve hedef hücre çalışmalarında kromatografik ve elektroforik göç metodları öncesi ön ayırma süreci olarak değerlendirilebilirler. Fakat daha karmaşık olan manyetik kararlı akışkan yataklar saflaştırmada kromatografik ve elektroforik göç yöntemlerinden üstün yöntemlerdir.

2.3.2 Hücrelerin Manyetik Ayırımını İçin Gerekli Donanımlar

Hücrelerin manyetik yöntemler kullanılarak buldukları ortamdan izolasyonu ve saflaştırılması için manyetik ayırım sistemlerinde çeşitli elemanlara gereksinim duyulmaktadır. Bu elemanlar aşağıda sırası ile verilmektedir.

2.3.2.1 Manyetik etiketleme ajanı

Manyetotaktik bakteriler ve eritrositler dışında tüm hücrelerin ortamdan ayırabilmek için hedef hücreler ile ortam arasında hedef hücre lehinde bir manyetik fark yaratılması gerekmektedir. Bu bağlamda hücre tipi ve sonrasında ortaya çıkacak süreç için çeşitli ayırma stratejileri seçilebilir. Manyetik işaretleme manyetik ve süperparamanyetik partiküller, manyetik kolloidler, manyetolipozomlar veya moleküler manyetik etiketler ile gerçekleştirilebilir. Literatürdeki çalışmalarda etiketin manyetik özelliği küçük manyetit (Fe_3O_4) veya maghemit ($-Fe_2O_3$) partiküller ile bazı durumlarda ise ferrit partiküller veya krom dioksit partiküller ile sağlanmıştır (Zborowski, 1995).

Bu ayırım işleminde kullanılan partiküllerin büyüklükleri konusunda süregelen bir fikir çatışması bulunmaktadır. Genellikle çapı $1 \mu m$ üzerindeki partiküller büyük, çapı 50-200nm arasında olan partiküller ise küçük manyetik partiküller olarak kabul edilmektedirler. Partikül büyüklüğü, partikülün davranışını ve partikül üzerinde yapılabilecek kısmi müdahaleleri belirlemektedir. Hücrelerin etiketlenmesindeki kinetik davranışı dikkate alırsak, ferrosiviler etkileşimde diğerlerine göre oldukça üstündür ve etiketleme sırasında karıştırmaya gereksinim duyulmamaktadır. İstenen hücrenin ortamdan ayrılması esasına dayanan pozitif seçimde büyük manyetik partiküller istenen hücre etrafında bir kafes oluşturmaktadır. Uygulama amacına bağlı olarak bu manyetik partiküllerin

bağlandıkları hücreden de sökülmesi gerekebilmektedir. Göreceli olarak büyük ve yoğun partiküller çökme davranışı gösterdiklerinden bunlarla yapılan uygulamalarda ilave bir karıştırmaya gereksinim yoktur. Kolloyidlerin veya moleküler işaretlerlerde izolasyon sırasında meydana gelen affinite reaksiyonlar basit difuzyon kurallarına uymaktadır. Ayrıca bir moleküler işaret birden fazla hücre reseptörü ile etkileşebilmektedir. Büyük partiküller ile yapılan hücre ayırımında basit ve ucuz miknatıslar işe yararken; kolloyid ve küçük boyutlu manyetik moleküler işaretler ile yapılan ayırımın yüksek dereceli manyetik ayırıcılar kullanılmaktadır.

2.3.2.2. Manyetik ve süperparamanyetik partiküller

Hücre ayırmasında kullanılacak ideal bir manyetik partikülün şu özellikleri taşıması beklenir: hücreleri spesifik olmayan şekilde bağlamamalı, ligand üzerinden spesifik bağlanma oluşturmamalı, hücreleri hızlı ve etkin bağlamalı, fagosite edilmemeli; depolamada ve uygulamada biyolojik ligand sızması çok az ya da olmamalı, kimyasal olarak kararlı olmalı, manyetik alan uygulandıktan sonra manyetik remanensansı düşük olmalı, ortamda yığın oluşturmamalı ve hücrelerden ayrılması kolay olmalıdır (Ugelstad, 1993).

Hücre ayırımında kullanılan partiküllerin çapları genellikle 1-5 µm arasında olup hücre çapı ile uyumludur. Kullanılan birçok partikül süperparamanyetik özelliktedir yani ancak bir manyetik etki çevrede olduğu zaman manyetik özellik gösteren partiküllerdir. Bu tip partiküller sahip oldukları özellik sayesinde buldukları ortamdaki basit manyetik ayırıcılar kullanılarak ayrılabilirler (Lea,1988). Kullanılan manyetik partiküller tipik olarak polimer ile kaplanmış, içinde iyi dağıtılmış demir oksit taneleri içermektedir (çoğu durumda homojen dağılımlıdır). Manyetik partiküllerin yüzeylerinin polimer ile kaplanması demir partiküllerinin hücrede oluşturabilecek olası toksik etkilerini ortadan kaldırır. Aynı zamanda sahip oldukları yüzey özellikleri ile değişik bağlama metodları kullanılarak, farklı fonksiyonel gruplar üzerinden değişik uygulamalarda kullanılabilirler.

Manyetik işaretlemede kullanılan üzere ticari örnekler mevcuttur. Ticari olarak Dynabeads (Dyna, Oslo, Norveç) manyetik partikülleri mikron boyutludur ve bir

çok değişik uygulamada kullanılabilir. Dynabeads partikülleri homojen olarak dağıtılmış ferrimanyetik materyalin makrogözenekli polistiren ile kaplanması ile oluşturulmaktadır. Genel olarak 2-8µm (Dynabeads M-280) 4,5µm (Dynabeads M-450) ve 5µm (Dynabeads M-500) sayılabilir. Mikron boyutlu ticari örnekleri ve uygulamaları Çizelge 2.5’de görölmektedir.

Çizelge 2.5. Mikron boyutlu manyetik partiküllere ticari örnekler.

İsim	Çap (µm)	Polimer/Fonksiyonel Grup	İmmobilize Ligand	Üretici
BioMag	~1	Silanize demiroksit/-COOH; -NH ₂	Antibadiler, Protein A, Protein G, streptavidin, biotin	PerSeptive,
Dynabeads	2-5	Polistiren/Tosil aktive	Antibadiler, streptavidin	Dynal, Norveç
Estapor	~1	Polistiren/-COOH; -NH ₂		Prolabo, Fransa
Iobeads	~1		Antibadiler, avidin	Immunotech
M 100,104,108	1-10	Selüloz/-OH		Scigen, İngiltere
MagaBeads	3.2	Polistiren/-COOH; -NH ₂	Antibadiler, Protein A Protein G, streptavidin	Cortex Biochem
Magne-Sphere	<1		streptavidin	Promega, ABD
Magnetic beads	0.8	Latex	Protein A, Protein G, streptavidin	ProZyme, ABD
Magnetic Microparticles	1-2	Polistiren/-COOH; -NH ₂	Protein A	Polyscience, ABD
Magnetic Particles	1	Polistiren	Antibadiler, streptavidin	Boehringer
Magnetic Particles	~1			Bang Labs., ABD
MPG	5	Poröz cam/hidrazid, gliseril, -NH ₂	Sterptavidin, avidin	CPG, ABD
Sera-Mag	1	Polistiren/-COOH;	Sterptavidin	Seradyn, ABD
SPHERO Magnetic Particles	1-5	Polistiren/-COOH; -NH ₂	Sterptavidin, biotin	Spherotech, ABD
XM200 Microspheres	3.5	Polistiren/-COOH;	Antibadiler, Protein A	Advanced Biotech

2.3.2.3. Kolloidal manyetik etiketler

Kolloidal manyetik etiketler genellikle 50- 200nm çapında manyetit ya da demir oksit kristali içeren polimer kaplı partiküllerdir. Polimer kaplama olarak genellikle ticari örneklerde dekstran, nişasta kullanılmaktadır. Değişik sentez mekanizmaları bulunmaktadır. Molday ve Mackenzie, dekstran kaplı süperparamanyetik partikülleri polisakkarit ortamında çökelti formunda elde ettiklerini rapor etmişlerdir (Molday, 1982). Daha çok kullanılan bir yöntemde ise nanopartiküller, ferrik ve ferröz tuzların NaOH ortamında çöktürülmesi ile elde edilmektedir. Literatürde polisakkarit ve sentetik polimer kaplı örnekler mevcuttur. (Grüttner,1997; Sayar,2005) Genellikle bu tür küçük manyetik partiküllerin ayırımında yüksek dereceli manyetik ayırıcılardan yararlanılmaktadır. Çizelge 2.6'da nano boyutlu kolloidal manyetik partiküllere ait ticari örnekler görülebilmektedir. Aynı zamanda manyetotaktik bakterilerden elde edilen partiküllerde (50-100nm çapında) immobilizasyon uygulamalarında başarı ile kullanılabilirler.

Çizelge 2.6. Nano boyutlu koloidal manyetik partiküllere ticari örnekler.

İsim	Çap (µm)	Polimer/Fonksiyonel Grup	İmmobilize Ligand	Üretici
Ferrofluid	135,175	Modifiye hidrofilik protein -COOH; -NH ₂	Antibadiler, Protein A, streptavidin	Immunocon, ABD
MACS Microbeads	50	Dekstran/-OH	Antibadiler, streptavidin, biyotin	Miltenyi Biotec., Almanya
Magnetic Nanoparticles	90-600	Nişasta, dekstran kitosan/ -COOH; -OH	Protein A, streptavidin, biyotin	Micro-caps, Almanya
MagNIM	50,250,500	-COOH; -NH ₂	Antibadiler, Protein A, streptavidin	Cardinal , ABD

2.3.2.4. Manyetolipozomlar

Manyetolipozomlar sıradan lipozom yapılarının manyetik olarak yönlendirilmesi ile elde edilmiş lipid kaplı kolloidal manyetik partiküllerdir. Manyetolipozomlar genellikle ilaç taşıma sistemlerin (Viroonchatapan,1997) ve membrana bağlı enzim

sistemi uygulamalarında (De Cuyper, 1983) kullanılmaktadırlar. Manyetolipozomlar yüzeylerine özgün antibadiler bağlanarak hücre ayırımında da kullanılabilirler (Margolis, 1983; M. Shinkai, 1995)

2.3.2.5. Moleküler manyetik etiketler

Lantatitler özellikle erbium [erbium klorür formu (ErCl_2)] çeşitli hücrelerin manyetik işaretlenmesinde kullanılmaktadır. Erbium iyonları hücre yüzeyine karşı yüksek affinitesi bulunmaktadır ve birçok değişik kimyasal formda sahip olduğu yüksek atomik manyetik dipol momentini (9.3 Bohr magnetom) koruyabilmektedir (Zborowski,1991). Er^{3+} iyonlarının hücre yüzeyine bağlanması genellikle iyonik kuvvetlerin etkisi ile olmaktadır. Bu iyonlar birçok farklı bağlanma bölgesi ile, örneğin glikoproteinler için karboksil gruplarından, etkileşme özelliğine sahiptirler. Hücrelerde diğer çok bilinen lanthanit bağlanma bölgeleri ise hücre duvarındaki Ca^{++} reseptör bölgeleridir (Zborowski,1991)

Ferritin, memelilerde demir depolamak için sentezlenen çözünebilen bir proteindir. 13nm çapında oyuk bir protein kılıfa sahiptir ve oyuktaki boşluğun çapı yaklaşık 7 nm'dir. Demir hidröz ferritoksit formunda ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 0 dan 4500'e kadar Fe(III) atomu bu oyukta depolanmaktadır.

Ferritinin manyetik türevlerinden manyetoferritin sentezlenebilmektedir. At dalağından elde edilen ferritinden, kontrollü yeniden oluşturma koşulları altında manyetik mineraller sentezlenmektedir. Geçirmeli Elektron Mikroskopu (TEM) ve elektron kırınım analizleri sonuçları, Mössbauer spektroskopik analiz sonuçları ile birleştirildiğinde bu minerallerin 6-7 nanometre çapında tek kristal ferrimanyetik demir oksit maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) yapıda olduğu ve superparamanyetik özellik gösterdikleri sonucuna varılmıştır (Safarik, Meldrum, 1997)

2.3.3. Manyetik Ayırıcılar

Günümüzde çok basit tek tüp sistemlerinden çok karmaşık otomatik çoklu sistemlere kadar çok sayıda değişik kullanım amacına yönelik ticari manyetik ayırıcılar bulunmaktadır. Çoğu durumda özellikle büyük etiketler ile çalışıldığı durumlarda çok basit ve ucuz manyetik ayırıcılar rahatlıkla kullanılabilir. Laboratuvar ölçekli manyetik ayırıcılar yapılarına, ve işleme özelliklerine göre temel olarak ikiye ayrılırlar.

2.3.3.1. Kesikli manyetik ayırıcılar

Kesikli manyetik ayırıcılar çoğu durum için en çok kullanılan ayırıcı sistemlerdir. Ayırma sistemi genellikle kalıcı doğal mıknatıstan yapılmaktadır. Mıknatıs sistemi üzerinde bulunan askılar bir veya daha fazla sayıda tüpü alabilecek şekilde dizayn edilmişlerdir. Bazı manyetik ayırıcılarda yıkama işleminin kolay yapılabilmesi için mıknatısın yerleştirildiği ve sonradan çıkarılabildiği özel bir bölme bulunmaktadır. Kesikli tipte manyetik ayırıcılarda test tüpünde kullanılan manyetik partikül miktarı 5 µl ile 50 ml arasında değişebilmektedir. Bazı kesikli sistemlerde mikro kuyucuklar ile çalışmakta mümkündür. 50-1000 ml arasında yüksek hacimli ayırma isteniyorsa bu işlem kesikli olarak düz manyetik ayırıcılarda gerçekleştirilmektedir. Ticari olarak mevcut bazı kesikli manyetik ayırıcı sistemler Çizelge 2.7'de görülebilmektedir.

2.3.3.2. Kesintisiz akışlı manyetik ayırıcılar

Kesintisiz akışlı manyetik ayırıcılar, hücre süspansiyonunu uygun tampon sistemleri ile birlikte sürekli olarak sistemden geçiren ayırıcılardır. Kesikli sistemler ile karşılaştırıldığında bu ayırıcı sistemler daha pahalı ve daha karmaşık yapıdadırlar. Bu yüksek ölçekli manyetik ayırıcıları özellikle laboratuvar ölçeğinden endüstri ölçeğine kadar geniş ölçekte aralığında kullanma imkanı bulunmaktadır. Genellikle çelik yünü ile dolu küçük bir kolon içerisine, kaliteli paslanmaz çelik manyetik taneciklerin gevşek bir şekilde dizilmesi ile oluşan sistem, kalıcı bir mıknatıs içine yerleştirilmektedir ve hücre süspansiyonunun tampon içersinde

kolon içerisinde geçmesi sağlanmaktadır. Geçiş sırasında manyetik etiketli hücreler kolonda kalırken,

Çizelge 2.7. Kesikli manyetik ayırıcı sistemlerden ticari örnekler

Firma	Ayırıcı ismi	Tanım
Advanced Biotechnologies, Epsom, UK	Temel ayırıcı 10/20 yerlik ayırıcı	10 veya 20 adet 1,5ml'lik tüp için ayırıcı 15ml 2 tüp veya 50 ml tek tüp için yüksek ölçekli ayırıcı
Biometra Biomedizinische Analytik, Göttingen, Almanya	Manyetik ayırıcı	10 adet 1,5ml reaksiyon tüpü için veya 2 adet 15 ml ve 1 adet 50 ml'lik tüp için ayaklı sistem
Boehringer, Mannheim, Almanya	Manyetik ayırıcı	1,5ml'lik 4 adet reaksiyon tüpü için ayırıcı
CPG, Lincoln Park, NJ, ABD	3 özelliği bir arada bulunduran manyetik partikül ayırıcı sistemi	8 adet 1,5 ml'lik reaksiyon tüpü 1 adet 15 ml'lik, bir adet 50ml'lik tüp için ayırıcı
Dynal, Oslo, Norveç	MPC-1, MPC-2, MPC-6 MPC-E-1, MPC-E-6, MPC-M	1, 2 ve 6 test tüpü için 1, 6, ve 10 adet ependorf tipi mikrosantrifüj tüpü için ayırıcı sistem
Immunicon, Huntingdon Valley, PA, ABD	XS4200 PS4100	Mikrotitre kuyucuklarından ve benzer kanallardan hücre ayırımı sağlamak için "iğne uçlu" ayırıcı sistem Dört uçlu manyetik ayırıcı
Immunotech, Marsilya, Fransa	1 tüp için manyetik tutucu 4 tüp için manyetik tutucu	1ve 4 tüp için ayırıcılar
Promega, Madison, WI, ABD	MagneSphere manyetik ayırıcı ayaklar	2 ve 12 test tüpü için farklı çaplarda manyetik ayırıcı ayaklar
Quantum Magnetics, Madison, CT, ABD	Çok yönlü ayırıcı	Ayırıcı aynı anda çok sayıda değişik boyutlardaki tüplerde ayırımı sağlayabilmektedir
Sigris Research, Brea, CA, ABD	MixSep	Manyetik partikülleri karıştırırken ayırımı sağlayan cihaz

manyetik etiketli olmayanlar kolondan akış ile uzaklaşmaktadırlar. Etiketli hücreler ise kolonun mıknatıstan ayrılmasından sonra tekrar akış ile toplanır. Ticari olarak

en gelişmiş örnekler Miltenyi Biotech/Almanya firmasının geliştirdiği “MACS Cell Sorter” sistemlerdir. Şekil 2.5’de Miltenyi Biotech/Almanya firmasının ürettiği laboratuvar ölçekte çalışılabilen MidiMacs ve hastaneler için daha büyük ölçekte çalışmayı sağlayan AutoMacs sistemleri görülmektedir (Miltenyi, 1990)



(A)



(B)

Şekil 2.4. Kesikli manyetik çöktürmeli sistemler
(A) EasySep (Stem Cell Tech.) (B) Sigris Research

Hartig ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda karşı-akışklı (counter flow) elektroforez sistemine dayanan karşı immunomanyetik ayırma sistemi geliştirmişlerdir (Hartig, 1995). Bu sistemde manyetik etiketli ve etiketsiz hücreler tampon içerisinde sürekli bir akışta homojen olmayan meyilli bir elektromagnetik alan yavaş akımda geçmektedirler. Manyetik alan etkisinde oluşan manyetik momentler manyetik etiketli hücrelerin akış esnasında hareketlerini saptırarak manyetik etiketsiz hücrelerden ayrılmasını sağlamaktadırlar.

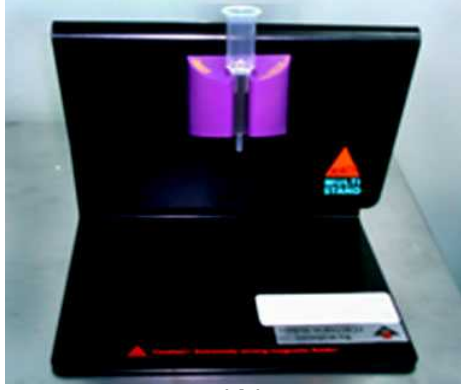
Chalmers ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda dört uçlu manyetik ayırıcı sistemi geliştirmişlerdir (Chalmers, 1998). Bu manyetik ayırıcı sistemde silindirik alanda oluşan manyetik alanın merkezine odaklı 4 adet manyetik delik bulunmaktadır. Dört uçlu manyetik ayırıcıdan hücreler tek bir girişten girdikten sonra manyetik etiketli ve etiketsiz hücreler iki farklı çıkıştan sistemi terk etmektedir. Çizelge 2.8’de ticari olarak satılan kesintisiz akışlı manyetik ayırıcılar verilmektedir.

2.3.3.3. Manyetik kararlı akışkan yataklar

Bu cihazlar genellikle uygun bir dolgu malzemesi [nikel küreler (Terranova,1991), manyetik poliakrilamid tanecikler (Cocker,1997) doldurulmuş kolonun manyetik alana yerleştirilmesi ile oluşturulmaktadır. Bu alan tipik olarak sarmal bobin tarafından çevrelenen hareketli fazla eş doğrusal olarak uygulanmaktadır. Sarmal bobin kullanımını araştırmacıya farklı akımlarda, dolayısı ile farklı güçte manyetik alanlarda çalışma imkanı vermektedir. Bu cihazda meydana gelen manyetik alan dolgu malzemesini eksensel hareketini kısıtlayarak yatağın genleşmesini azaltarak akışkan yataklı manyetik ayırıcının performansını arttırmakta ve daha az basınç ile işlemin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Lochmüller, 1988).

Çizelge 2.8. Kesintisiz akışlı manyetik ayırıcı sistemlerden ticari örnekler

Firma	Ayırıcı ismi	Tanım
Baxter Healthcare, ABD	Isolex 300i	CD34+ hücre ayırıcımı için otomatik sistem
Dr. Weber, Almanya	Sürekli İmmünomanyetik ayırıcı CIMSII	Modüler sürekli ayırım
Immunicon,ABD	HG4100	Yüksek dereceli manyetik ayırıcı
Miltenyi Biotech, Almanya	Değişik tipte MACS ayırıcılar	Yüksek dereceli manyetik ayırıcı
Quantum Magnetics, ABD	Akan hücre ayırıcı	Dikdörtgen akış hücresi veya sabit tüpte ayırım sağlayan nadir miktandan yapılmış ayırıcı sistem



(A)



(B)

Şekil 2.5. Akışlı manyetik ayırma sistemleri

(A) Midimacs (B) Automacs

2.3.4. Hücrelerde Manyetik Ayırmada Uygulanan Yöntemler

Manyetik teknikler ile hücre ayırımını uygulama aşamasında çok çeşitli uygulama yöntemleri tercih edilebilir. Bu yöntemlere aşağıda kısaca değinilmiştir.

2.3.4.1. Doğrudan ve dolaylı ayırım metodları

Doğrudan ayırım metodunda ortamdan izole edilemesi istenen hücreye özgün primer ligand taşıyan manyetik etiketler ile işaretlenir. Belirli süre inkübasyondan sonra manyetik partiküllere bağlı primer ligand spesifik hücre reseptörü ile etkileşir ve etkileşim kompleksi bir mıknatıs kullanılarak ortamdan ayrılır.

Dolaylı ayırım metodunda ise ortamdan izole edilemesi istenen hücre uygun bir primer affinite ligandı ile işaretlenir. Bu primer liganda özgün sekonder affinite ligandı taşıyan manyetik partikül inkübasyon süresince primer ligand ile birleşir ve manyetik ayırıcı yardımı ile istenilen hücrenin ortamdan izole edilemesini sağlar.

2.3.4.1.1. Pozitif ve negatif seçim metodları

Pozitif ve negatif seçim metodları ortamda hangi hücrenin önce seçileceği esasına dayanmaktadır. Negatif seçimde izolasyonu istenmeyen hücreler manyetik işaretlenir, böylece mıknatıs altında istenmeyen hücreler tutunurken, izolasyonu istenen hücreler manyetik işaretlenmedikleri için yıkama işlemleri ile birlikte sistemi terk ederler. Hem doğrudan hem de dolaylı ayırım metodları negatif seçim metodu ile kullanılabilir. Negatif seçimin kendi içinde birtakım kısıtlamaları bulunmaktadır. Eğer izolasyonu istenen hücre ortamda oldukça az bulunuyorsa, negatif seçim metodu izolasyonda yabancı hücre kontaminasyonuna ve dolayısı ile düşük verime neden olabilmektedir.

Pozitif seçim yönteminde ortamdan izole edilmesi istenen hücre manyetik olarak işaretlenir ve böylelikle mıknatıs altında tutulabilmektedirler. Yıkama işlemleri sonucunda istenmeyen hücreler ortamdan uzaklaştırılır. Sistemden en son çıkan izole edilmesi istenen özgül hücredir. Bu seçim yönteminde de hem doğrudan hem de dolaylı ayırım yöntemleri ile birlikte kullanılabilir.

2.3.5. İmmüno manyetik Ayırım

İmmüno manyetik ayırım (IMS), hem ökaryotlar hücrelerde hem de prokaryot hücrelerde spesifik hücreye özgü antibadi bağlı manyetik partiküllerin ya da manyetik kolloidlerin kullanıldığı ayırım sistemi olarak tanımlanabilir. Bu sistemde yüzeyinde ilgili hücreye özgün antibadi taşıyan manyetik partiküller hücre süspansiyonları ile belirli süre inkübasyona bırakılırlar. İnkübasyondan sonra manyetik partiküllere bağlanan hücreler ve ortamda fazla kalan manyetik partiküller manyetik ayırıcı ile ayrılabilirler. Kullanılan yöntemlere göre monoklonal (MAb) ya da poliklonal antibadiler kullanılabilir. Sistemin düzgün işlemesi, antijen antibadi eşleşmesinin gerçekleşebilmesi, ayırım tam ve doğru yapılabilmesi için Antibadi Fc kısmından manyetik partiküle bağlanmalı ve özgün Fab kısımlar dışarıya doğru bakmalıdır. Antibadi kullanılarak yapılan doğrudan immüno manyetik ayırım yöntemlerinden bazılarında aşağıda örnekler verilmiştir.

- Streptavidin immobilize edilmiş manyetik taşıyıcılara biyotin bağlanması (Lea, 1988)
- IgG saflaştırılması için Protein A ve Protein G immobilize edilmiş manyetik partiküller (Widjoatmodjo, 1993).
- İstenilen antibadi yapısının tosilenmiş, karboksil, amino, hidroksil fonksiyonel grupları taşıyan manyetik partiküllere kovalent bağlanması (DynaL Booklet, 1996)
- Boronik asit türevleri immobilize edilmiş manyetik taşıyıcıları antibadinin Fc kısmındaki karbohidrat birimlerine geri dönüşümlü olarak bağlanması (Halbreich, 1997)
- *Escherichia coli* DNA(lac operon bölgesi)'sı içeren manyetik taşıyıcıların füzyon proteinlerine bağlanması (Ljungquist, 1993)

İmmünomanyetik ayırimda doğrudan ayırım metodlarının yanında dolaylı ayırım metodlarında kullanılabilmektedir. Dolaylı ayırım metodunda istenen hücre bir primer antibadi ile işaretlenir. Belirli bir inkübasyondan sonra yüzeyine bağlı, primer antibadiye özgün sekonder antibadi taşıyan manyetik partiküller ile hücre süspansiyonu etkileştirilir. Belirli bir inkübasyondan sonra bağlanmayan fazla antibadi ve manyetik partikül yıkama ile uzaklaştırılır ve izolasyonu istenen hücre ortamdaki mikrotis yardımı ile toplanır.

Çoğu monoklonal antibadi hücre süspansiyonu içerisinde özgün hücrenin ayılması için çok etkin bir bağlanma göstermektedir. Dolaylı ayırım yöntemi ise hücrenin düşük yüzey antijen yoğunluğu varsa tercih edilmelidir. Doğrudan ve dolaylı ayırım yöntemleri karşılaştırıldığında doğrudan ayırım dolaylı ayırma göre daha kısa sürmektedir ve doğrudan ayırimda yüzeydeki diğer antijen yüzeyleri kapatılmamaktadır.

İmmünomanyetik ayırım tekniğinde kullanılan ticari örneklerde negatif ve pozitif seçimde hücre canlılığı %95-99, saflık ise %60-90 arasındadır. Saflık oranı çalışılan hücrenin hücre süspansiyonundaki oranı ile değişebilmektedir. Süspansiyon içindeki konsantrasyonu düşük hücrelerin ayırimında ayırım veriminin düşük olması beklenmektedir. Bazı durumlarda elde edilen manyetik

partikül bağı hücrelerden, bu manyetik partikülün çıkarılması gerekmektedir. Çıkarma işlemi çeşitli yollardan yapılabilmektedir. Aşağıda bazı yöntemlerden örnekler verilmiştir.

- Manyetik partikül bağı CD34 hematopoietik hücrelerden manyetik partiküller trypsin gibi proteolitik enzimler kullanılarak ayrılabilirler.
- Ticari olarak Dynal firmasının ürettiği “DETACHaBEAD” ürünü antijen-antibadi bağlanma bölgesini direk olarak ayırarak partikülün hücreden ayrılmasını sağlamaktadır .
- DNA-Ab kompleks yapısı DNA linker ayırıcı enzim (Dnase) ile parçalanabilir. Böylelikle DNA bağı manyetik partikül ile özgün hücre birbirinden ayrılabilir.
- Cryptosporidium oositleri immünomanyetik ayırımdan sonra ortamın pH'sının düşürülmesi ile manyetik partikülden ayrılırlar.
- Transferrin reseptörü (CD71) içeren hücreler ortama yeterli miktarda otolog plazma ilavesi ile manyetik partikülden ayrılırlar. Plazmadaki çözülmüş haldeki transferrin transferrin reseptörüne bağı Ab-manyetik partikül kompleksi ile rekabete girerek kompleksi hücreden ayırır.

2.4. Akışlı Hücre Ölçer ve Hücre Özelliklerinin Belirlenmesi

Akışlı Hücre Ölçer (Flow Cytometry) hücrelerin büyüklüğü, vizkositesi, granülositesi, yüzey özellikleri ve DNA içerikleri gibi biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin tek hücre seviyesinde araştırılmasına olanak sağlayan bir analiz sistemidir. Modern akışlı hücre ölçer bilgisayar teknolojisi, optik ve elektronik alandaki gelişmeler, monoklonal antibadilerin üretimi, sitokimyasal boyamalar ve florokrom kimyasındaki gelişmelerin birarada uygulanması sonucu ortaya çıkmıştır (Norman 1980).

Akışlı hücre ölçer genel kullanım amaçlarını aşağıda genel olarak özetlenmiştir (Muirhead, 1987).

- Kantitatif, tek hücre seviyesinde hızlı, çok parametrelili analiz imkanı sağlamaktadır.

- Hücre alt gruplarının sayısal ve yapısal farklılaşmasında kullanılabilir.
- Hücrelerin fonksiyonel, biyokimyasal, morfolojik veya sitogenetik karakterizasyonuna ek olarak, hücre alt gruplarının “sorting işlemi ile ayrılmasına olanak sağlamaktadır.

Bir hücrenin akışlı hücre ölçer ile analizi hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve monoklonal antikorlar ile işaretlenmesi gerekmektedir.

Hücrelerin izolasyonu ve saf olarak elde edilmesinden sonra bir veya daha fazla floresan bağlı monoklonal antikor veya daha kromoforlar hücre ile konjuge edilir. Bu floresan bağlı monoklonal antikorlar ve kromoforlara “prop” adı verilmektedir. Problemler genellikle hücrenin yüzey antijenlerine özgündür.

Hücrelerin akışlı hücre ölçerde işaretlenmesinde iki farklı immünfloresans teknik kullanılmaktadır. Doğrudan işaretleme metodunda antikor ile konjuge olmuş florokrom madde kullanılır. Bu florokrom maddeler FITC (fluoresceinisothiocyanate), Rhodamin, Fikoeritrin (PE) vb'dir. Bu sistemin avantajı, kullanılan antikorun mono-spesifik olması nedeni ile, özgün olmayan bağlanmanın ihmal edilecek kadar az olmasıdır. Çok düşük yoğunluklara sahip yüzey antijenlerinin gösterilememesi ise dezavantajdır. Dolaylı işaretleme metodunda ise; süspansiyon halindeki hücrelere ilk olarak işaretsiz monoklonal antikor bağlanır. İşaretsiz monoklonal antikora birleşmiş bu hücrelerin aletle analizi için ikinci bir işaretli monoklonal antikora ihtiyacı vardır. Bu ikinci antikor, hücre ile bağlı durumda olan birinci antikora bağlanır. Bu metodun avantajı, çok düşük yoğunluğa sahip yüzey antijenlerinin gösterilebilmesi, dezavantajı ise özgün olmayan bağlanmanın doğrudan metoda göre daha yüksek oranda görülebilmesidir (Riley, 1989).

Akışlı hücre ölçerde yapılan analiz birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi, lazer ışık kaynağı, sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik ve elektrik sinyal), bilgisayar (veri toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizmasıdır.

Süspansiyon halindeki hücreleri cihaza vermeden önce cihaz polistiren kaplı partiküller ile kalibre edilir ve cihazın lazer ayarı yapılır. Standart ve kontrol grubunun cihaza verilmesi ile örneğin kalibrasyonu yapılır ve örnek cihazdan geçirilir. Hücreler hava basıncı ile akış sisteminden geçirilir. Buradaki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturur ve bu basınç ile hücreler cam ve kuarzdan yapılmış akış odasına gelirler. Bu odanın geometrik şekli ve sıvının laminar akışı, hücrelerin tek bir sıra halinde geçmesini sağlar. Tek sıra halinde geçen hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak, argon iyonu, kripton, helyum-kadmiyum, helyum-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. İşaretlemede kullanılan problemler lazer kaynağı ile aktive olduklarından ışımaya yaparlar ve bu sayede tespit edilebilirler. Genellikle lazer kaynağı olarak argon iyonu kullanılır ve FITC, PI (Propidium iodide), Ethidium Bromid, Akridin oranj, Fikoeritrin (PE)'in 488'nm'de aktivasyonunu sağlar. Bu problemlerin emisyonları farklıdır. Hücreye bağlı florokrom, lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerjiyle ışımaya yapar. Bu yayılan ışının yoğunluğuna göre hücre boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir. Aktiflenme sonucunda açığa çıkan floresans fotodiyodlarla toplanır. Fotomultiplier tüpler (PMT) ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara iletilir (Fuller, 1980).

Akışlı hücre ölçerinde 4 fotodiyod vardır: Önden saçılımı gösteren FALS (forward angle light scatter), yandan saçılımı gösteren RALS (right angle light scatter), yeşil ve kırmızı floresans dedektörleri. FALS önden saçılımı sağlar ve hücre boyutunu gösterir. RALS yandan saçılımı sağlayarak hücrenin iç yapısı yani granülositesini gösterir. FALS/RALS histogramı ile hücre süspansiyonunda kapılama özelliği (gating) kullanılarak farklı populasyonlar seçilebilir. Multiparametrik analizler yapılacaksa 2 veya daha fazla renkli immunfloresans boya kullanılır. Genellikle yeşil floresans veren FITC ve kırmızı floresans veren PE kullanılmaktadır (Deniz; 2004). Bu özelliklerden yararlanılarak akışlı hücre ölçer ile hücrenin hem boyut ve granülositesi hakkında bilgi edinilirken hemde farklı immunfloresans boyalar kullanılarak hücrelerin yüzey özellikleri ve immunfenotipleri hakkında bilgi edinilebilmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında ilk bölümünde nano boyutta ve manyetik özellikte inorganik çekirdek materyalinin sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu sentez çalışması için çalışma grubumuzda bulunan Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek lisans tezinde uyguladığı yöntem temel alınmıştır (Sayar, 2004). Bunun için ikili çöktürme yöntemiyle süperparamanyetik özellik gösteren “manyetit” (Fe_3O_4) nanopartiküller üretilmiştir. Sentezlenen 70-500nm boyutlu manyetit nanopartiküller polimer ile kaplama aşamalarında kullanılmıştır.

Sentezlenen manyetit partiküller mikroemülsiyon polimerizasyonu ile MMA/AAC ve yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile PEG/MA kaplanmıştır. Elde edilen polimerik manyetik partiküllerin hücre üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Nanopartiküller FTIR, DSC, XRD ve ZETA sizer analizleri karakterize edilmiş ve önceki çalışmalarla uygunluğu araştırılmıştır.

Karakterizasyon çalışmalarını takiben sentezlenen polimerik nanopartiküllere mezenkimal özgün CD 105 ve CD 73 antibadilerinin bağlanması ve ilgili optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen nanosorbentleri ile hem akışlı manyetik ayırıcı sistemde hem de çöktürmeli manyetik ayırıcı sistemde hücre süspansiyonundan mezenkimal kök hücrelerin ayırma gerçekleştirilmiştir. Ticari örnek ile yapılan saflaştırma işlemleri ile karşılaştırılmıştır.

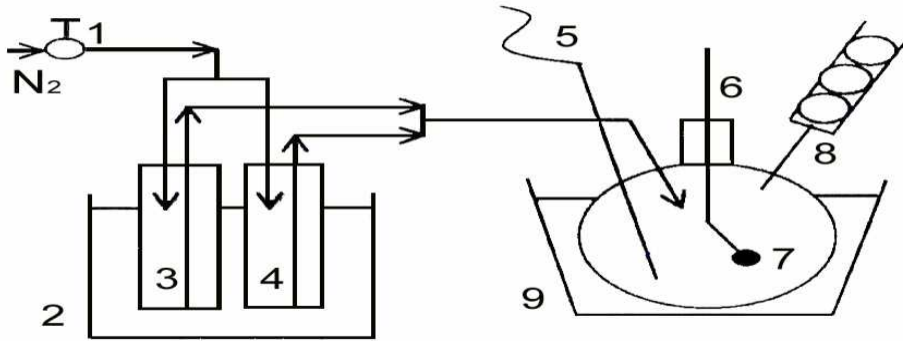
Bu çalışmalar ile ilgili deneysel yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak ayrı bölümler halinde sunulmuştur.

3.1. Manyetit Nanopartikül Üretimi

Manyetit nanopartiküllerin üretiminde Sigma (ABD) dan temin edilen $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ reaktif tuzlar ve NaOH çöktürme ajanı olarak kullanılmıştır. Fe^{2+} tuzları kararsız olduğu ve havada renk değişimi ile gözlenen “akaganeite” (β - $FeOOH$) yapısına oksitlendiği bilinmektedir. Reaktiflerin saflığı manyetit oluşumunda önemli bir parametre olduğu için reaktifler azot altında depolanmış, hazırlanmış çözeltilerin kullanılmadan önce bu kararsızlıklarını önlemek için

çözeltiler çalışma öncesi 15 dakika azot ortamında bekletilerek oksijeni giderilmiştir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının oksidasyonunu ve yan reaksiyonların oluşumunu önlemek için reaksiyonlar da N_2 atmosferinde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.1'de şematik olarak verilen deney düzeneğinde nanopartiküllerin üretimi için izlenen yöntem şöyledir: Reaksiyonlar dört boyunlu bir reaktörde geri soğutucu altında, mekanik karıştırıcı ve su banyosu kullanılarak, N_2 atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Tipik bir reaksiyonda, $80^{\circ}C$ 'deki 160 ml deionize su içine yüksek karıştırma hızında 120 ml 1.25 M Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuz çözeltisi ile 120 ml 5M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyonun hemen başında siyah bir çökelek oluşumu gözlenmiştir. Bu çözelti $80^{\circ}C$ 'de 2 saat çok yüksek karıştırma hızında karıştırılmıştır.



Şekil 3.1. Deney düzeneği. (1) Vana, (2) Su Banyosu, (3) Demir Çözeltisi, (4) NaOH Çözeltisi, (5) Termometre, (6) Reaktör, (7) Mekanik Karıştırıcı, (8) Geri Soğutucu ve (9) Elektrikli Isıtıcı.

Manyetik ayırıcı (MCB 1200 Biomagnetic Processing Platform, Sigris, İngiltere) yardımıyla manyetik olan partiküllerle olmayan partiküller birbirinden ayrıldıktan sonra birkaç defa su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Manyetit nanopartikülleri manyetik çekim kuvvetleri nedeniyle topaklanmaktadır. Bunun önüne geçilmek üzere 1M'lık tetrametilamonyum hidroksit (TMAOH, Sigma, ABD) çözeltisinden 10 ml ilave edilerek, pozitif yüklü $N(CH_3)_4^+$ iyonları ile manyetit nanopartiküllerinin stabilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentez aşamasında ön denemelerde belirlenen

şu koşullarda çalışılmıştır: Fe^{2+}/Fe^{3+} mol oranı 0.5, pH 12, sıcaklık 80°C' ve NaOH konsantrasyonu 5M olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında temel alınan protokolde yalnızca karıştırma hızı 500-2000rpm arasında değiştirilerek partikül boyu ayarlanmıştır.

3.2. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Üretimi

Fonksiyonel gruplu manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin üretilmesi için sentezlenen 70 nm boyutlarında manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülleri kullanılmıştır. Bu partiküllerin polimer ile kaplanması için şu iki polimerizasyon sistemi seçilmiştir: (a) metil metakrilat/akrilik asit (MMA/Aac) komonomeri kullanılarak mikroemülsiyon polimerizasyonu ve (b) polietilenglikol-metakrilat (PEG-MA) komonomeri kullanılarak yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu denenmiştir.

3.2.1. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Mikroemülsiyon Polimerizasyonu ile Üretimi

3.2.1.1. Kullanılan maddeler

Ana monomer olan metil metakrilat (MMA, Fluka, İsviçre) içindeki inhibitörü uzaklaştırmak için %10'luk sulu sodyum hidroksit (NaOH) (Aldrich, ABD) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Komonomerler, akrilik asit (AAc) (Fluka, ABD), yüzey aktif madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS, Aldrich, ABD), suda çözünen başlatıcı potasyum persülfat (KPS, Aldrich, ABD) satın alınma yolu ile temin edilmiş, herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır. Bütün deneylerde deiyonize su kullanılmıştır.

3.2.1.2 Mikroemülsiyon Polimerizasyonu

Mikroemülsiyon polimerizasyonu çalışmaları 100 ml hacminde sızdırmaz cam reaktörlerde yürütülmüştür. 70 nm'lik manyetit nanopartiküller deionize suda bir sonikatör (Bransonic 221, ABD) yardımıyla süspansiyon edilmiştir. Yüzey aktif madde

(SDS) deionize suda süspansiyon edilmiş olan manyetit nanopartiküllerine ilave edilerek sonikatör yardımıyla miseller oluşturulmuştur. Monomer ve/veya komonomer karışımları oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Kullanılan AAc komonomerinin miktarı MMA'ya göre ağırlıkça %10'dur. Monomer karışımı polimerizasyon reaktörü içindeki sulu faz üzerine eklenmiştir. İlave edilen toplam monomer miktarı yapılan ön çalışmalarda belirlenmiştir., Ortamdaki monomer konsantrasyonu ağırlıkça %6.34 olacak şekilde olup, tüm çalışmalarda bu değer kullanılmıştır. Daha sonra ortama başlatıcı su temelinde 1.5 mM olacak şekilde suda çözünen KPS eklenmiştir. Polimerizasyon öncesi reaktörden su fazındaki çözülmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 1 dk süreyle ortamdaki saf azot gazı geçirilmiştir. Mikroemülsiyon polimerizasyonları 60° C'de, sıcaklık kontrollü çalkalayıcı su banyosunda (Köttermann Laboratörleri, Almanya) 70 vuru/dk hızda çalkalanan reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon süresi 24 saattir.

Polimerizasyon sonrası elde edilen lateks ortamda fazla miktarda bulunan yüzey aktif maddeden uzaklaştırmak için sırasıyla metanol ve su ile yıkanmıştır. 20 000 devir/dk'da çalıştırılan santrifüj yardımıyla çöktürülen manyetik yüklü polimerik nanopartiküller manyetik ayırıcı yardımıyla manyetik yüklü olmayanlardan ayrılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra polimerle kaplanmamış olan manyetit nanopartikülleri ile kaplanmış olanları ayırmak için 0.01 N'deki H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılarak 48 saat bekletilmiştir. Manyetit nanopartikülleri 0.01N'deki H₂SO₄ çözeltisinde çözünürken polimerle kaplı olan nanopartiküllerde hiçbir değişiklik olmamıştır. Süpernatant kısmında çözülmüş manyetit nanopartiküllerin olması nedeniyle çöken kısımdan ayrılarak polimerle kaplı manyetik nanopartiküller tekrar su ile yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Ortamda bulunabilecek poliakrilik asit (PAAc) homopolimerlerde su ile yıkama işlemiyle suda çözünerek uzaklaştırılmıştır.

3.2.2. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Yüzey Aktif Madde İçermeyen Emülsiyon Polimerizasyonu ile Üretimi

3.2.2.1. Kullanılan maddeler

Ana monomer olan polietilen glikol (Sigma, ABD) ve komonomer metilakrilat (Sigma, ABD) ve 2-Dimethylamino-2-methylpropanol (DMAPM) (Sigma-Aldrich, ABD) satın alındığı gibi doğrudan kullanılmıştır. PEG-MA içerdiği hidroksil gruplarıyla daha sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere partiküle fonksiyonel grup sağlamıştır. Satın alınan stiren (Aldrich, ABD) distile edilerek inhibitörü uzaklaştırılmıştır. Suda çözünen başlatıcı V50 (Aldrich, ABD) herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır. Bütün deneylerde deiyonize su kullanılmıştır.

3.2.2.2. Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu

Tez kapsamında yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu uygulama yöntemi şöyledir: 100 ml hacminde sızdırmaz cam reaktör içinde karışım bir sonikatör (Bransonic 221, ABD) yardımıyla iyice dağıtılmıştır. Ortam pH'sı 0.1 N'lik standart hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2.5-3'e ayarlanmıştır. Polimerizasyon öncesi reaktörden su fazındaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 1 dk süreyle saf azot gazı geçirilmiştir. Polimerizasyonları 65°C'de, sıcaklık kontrollü çalkalayıcı su banyosunda (Köttermann Labor teknik, Almanya) 70 vuru/dk hızda çalkalanan reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon süresi yaklaşık 24 saattir.

Polimerizasyon sonrası elde edilen lateks ortamda bulunan reaksiyona girmemiş monomerlerden uzaklaştırmak için sırasıyla metanol ve su ile yıkanmıştır. 20 000 devir/dk'da çalıştırılan santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Bu yıkama işlemi en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan manyetit nanopartiküllerinin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için bir Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Cihaz ölçüm

yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanıp, santrifüjlenen partiküller distile-deionize su kullanılarak seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözeltisi polistiren küvet içersine konulmuştur. Deneyle, sıcaklık kontrollü bir bölme içersine yerleştirilen polistiren küvetin içersindeki çözeltiden 633 nm'lik kırmızı lazer ışığının geçirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Örnek içersinden geçirilen lazer ışığından saçılan ışık 90° 'ye yerleştirilen detektör tarafından ölçülmüştür. Dedektörde ölçülen ışık şiddeti, elektronik sinyallere dönüştürülüp korelatöre gelmektedir. Korelatörde küçük zaman aralıklarında saçılan ışık şiddeti değerleri karşılaştırılır ve ışık şiddetinin değişim hızı belirlenmektedir. Saçılan ışığın şiddetindeki değişimler, çalışılan bölgenin içinde ve dışındaki moleküllerin difüzyon hızıyla ilgilidir (Brownian hareketi) ve analiz edilen veriler direkt olarak ışık saçılmasına neden olan partiküllerin difüzyon katsayılarını vermektedir. Difüzyon ile partikül büyüklüğü arasındaki ilişki, küresel partiküller için Einstein tarafından geliştirilen ve Brownian hareketi ile açıklanan teorik denklikle açıklanmaktadır. Bu denklikten, küresel partiküllere ait difüzyon katsayıları fonksiyonlaştırılıp, hidrodinamik çap hesaplanmaktadır.

Partikül boy ve boy dağılımının ölçülmesinde kullanılan cihaz, partiküllerin zeta potansiyallerini de vermektedir. Partikül yüzeyinden belli bir uzaklıkta bulunan iyonlar hareket eden partikül ile birlikte sürüklenmektedir. Bu uzaklığa kayma düzlemi denilmekte bu aralıkta ölçülen elektrik potansiyali zeta potansiyali olarak tanımlanmaktadır. Cihaz mikroeletroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyali ölçmektedir. Bu teknik bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Nanopartiküllerinin kimyasal yapısı Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR, Shimadzu, DR 8101, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenmiş olan partiküller vakum etüvünde kurutulduktan sonra KBr ile (ağırlıkça %1 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spekturumları oda sıcaklığında çekilmiştir. Elde edilen sonuçların önceki çalışmalar ile uygunluğu saptanmıştır.

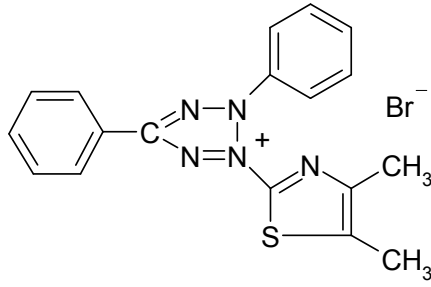
Üretilen manyetit (Fe_3O_4) partiküllerinin karakterizasyonu ve kristal yapısının belirlenebilmesi için X-ışını kırınım difraktometresi (Rigaku RU-200, Japonya) kullanılmıştır. 0.5 mm Pyrex kapilerde hazırlanan örneklerin (50Kvx150Ma) gücünde, 60 dakika ölçümlerle, 20-100° 2 θ açısında spektrumları çekilmiştir.

Nanopartiküllerin ısı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC, Shimadzu DSC-50, Japonya) kullanılmıştır. Ölçüm için yaklaşık 8-10 mg manyetit alüminyum kapsüle konarak preslenmiştir. DSC termogramları 10°C/dakısıtma hızıyla 20 -500°C sıcaklık aralığında ve 100ml/dk akış hızıyla beslenen azot atmosferinde çekilmiştir.

Nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin bulunmasında bir Titreşimli Manyetometre (Vibrating Sample Magnetometer, Fieldial Mark II Varian, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Vakum etüvünde kurutulmuş olan örneklerin 0 ile 1.5 Tesla'lık bir manyetik alandaki mıknatıslık değerleri, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Bu ölçüm tekniğinde kurutulmuş olan örneğe sabit frekansta manyetik alan uygulanmaktadır. Eğer örnek manyetik özelliğe sahipse bir mıknatıs gibi davranır ve geçici bir manyetik akış nedeniyle iletken çubuğun içinde potansiyel farkı oluşur. Titreşimli manyetometre bu potansiyel farkı ölçerek örneğin manyetik özelliğini belirlemektedir.

3.4. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküllerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Mezenkimal kök hücrelere özgün CD 105 ve CD 73 antibadileri taşıyan polimerik nanosorbent üretimine geçmeden önce daha önce iki farklı polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen manyetik yüklü polimerik partiküllerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma, ABD) 'den temin edilmiştir. Yapılan çalışmada MTT, sentezlenen manyetik yüklü iki farklı polimerik nanopartiküllerin (PMMA/AAC ve PEG/MA) farklı konsantrasyonları ile etkinleştirilmiş hücrelerin canlılıkları ve polimerin hücreler üzerindeki toksik etkisi incelenmiştir.



MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5- difeniltetrazolium

MTT testi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu plakların satırında 12 kuyucuk, sütununda ise 8 kuyucuk bulunur. İlk sütuna yalnız hücre ekilmiş ve hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiştir. Bu sütun pozitif kontrol olarak kullanılmış ve en yüksek absorbans bu sütunda elde edilmiştir.

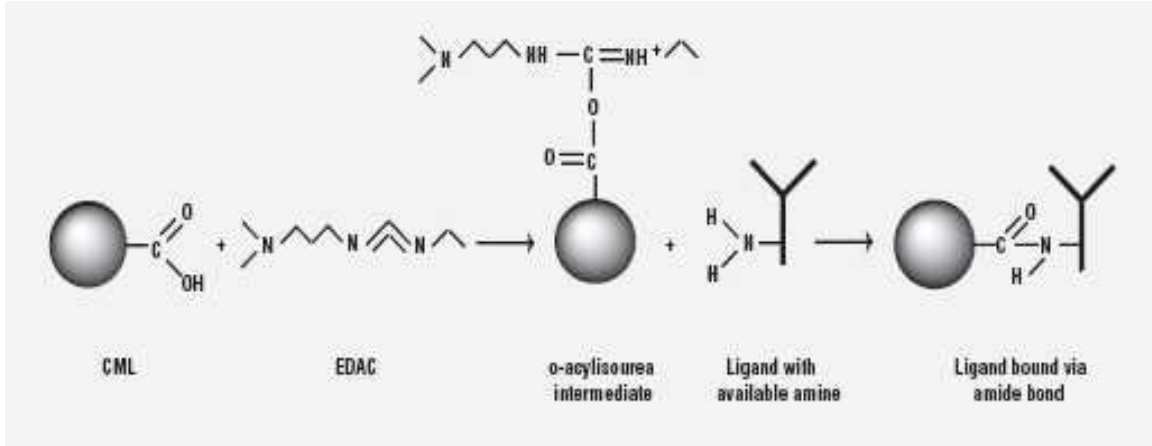
Çalışmada 4 farklı konsantrasyonda nanoparikül kullanılmış ve sitotoksisite araştırması yapılmıştır. Bu konsantrasyonlar her iki polimer türü için sırası ile hücre başına 1ng, 10ng, 50ng ve 100ng'dır. Her bir konsantrasyon için 4 kuyucuk kullanılmıştır. Yüzde canlılık hesaplanırken bu 4 kuyucuktan alınan absorbans değerleri değerlendirilmiştir. Manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin 24 ve 48 saat süre sonucunda oluşan sitotoksisiteleri belirlenmiştir.

3.5. Mezenkimal Kök Hücreye Özgün Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Modifikasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin uygun kaynaktan saflaştırılmasını sağlayacak manyetik yüklü polimerik nanosorbentler, fonksiyonel uçlu, manyetik özellik taşıyan polimerik nanopartiküllere mezenkimal kök hücrelere özgün olan CD 105 ve CD73 antibadilerinin kovalent olarak bağlayarak elde edilmiştir. CD 105 ve CD 73 antibadileri saf olarak BD Pharmingen, ABD firmasından temin edilmiştir.

Nanosorbentlerin üretiminde daha önce ayrıntısı ile anlatılan yöntem ile sentezlenen ve daha sonra MMA/AAC kopolimeri ile kaplanan superparamanyetik manyetit nanopartiküller kullanılmıştır. Bu partiküller kopolimer olan akrilik asitten (AAC) gelen karboksil (-COOH) fonksiyonel uç taşımaktadır. Kovalent bağlanma nanopartikülün karboksil (-COOH) ucu ile bir protein olan antibadinin amino (NH₂)

terminali arasında olmaktadır. Nanopartikül yüzeylerine antibadi moleküllerinin kovalent bağlanma mekanizması Şekil 3.2.'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.2. Nanopartiküllere antibadi bağlanmasının şematik gösterimi

Nanopartikülleri aktive etmek amacıyla 5 mg MMA/AAC kaplı manyetik nanopartikül 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanmış ve aynı hacimde süspansiyon edilmiştir. Aktive nanopartiküller ile 8 mg/ml EDAC 30 dk. oda sıcaklığında uygun hızlı dönen karıştırıcıda karıştırılmış ve böylelikle yapıda, antibadideki amine özgün aktif ara formun oluşması sağlanmıştır. Ortamdaki fazla EDAC, partiküllerin 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanması ile uzaklaştırılmıştır. Partiküller aynı hacimde MES tamponu ile tekrar süspansiyon hale getirilmiştir. 500 g/ml antibadi süspansiyonu MES tamponunda hazırlanmıştır ve bağlanmanın tespitini sağlamak amacıyla sonradan yapılacak ölçümler için antibadi süspansiyonundan 50 l alınarak 1950 l MES tamponunda çözülmüş ve "bağlanma öncesi örnek" elde edilmiştir. Kalan antibadi süspansiyonu ile aktive nanopartiküller 24 saat oda sıcaklığında sabit hızda karıştırılmıştır. 24 saat sonunda partiküller bir mıknatıs yardımı ile ayrılmıştır. Ayrılan sıvı faz "bağlanma sonrası örnek" olarak teste alınmıştır. 280nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometrede (Jasco V-500), her iki örnek arasında ölçülen absorbans farkından yüzde bağlanma hesaplanmıştır.

Partiküller 1 kez pH 5.2 MES tamponu ile yıkanıp mıknatis ile ayrılmıştır. Daha sonra devam eden reaksiyonu durdurmak amacıyla ortama fazla amin kaynağı olarak pH 8.0 1M Glisin çözeltisi eklenmiş ve partiküller 30dk. oda sıcaklığında sabit hızda dönen karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma sonunda partiküller mıknatis ile ayrılıp pH 7.4 fosfat tamponu ile 3 defa yıkanmış ve 2 ml fosfat tomponunda süspansiyon edilmiştir. Böylelikle mezenkimal kök hücreler özgün yüzeylerinde CD105 ve CD73 antibadilerini taşıyan nanosorbentler elde edilmiştir. Bu elde edilen modifiye nanopartiküller, kullanımları öncesi +4°C'de saklanmışlardır.

3.6 Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırılması İçin Modifiye Nanopartiküllerin Pratikte Uygulaması ve Ticari Örnekler ile Karşılaştırılması

Mezenkimal kök hücre saflaştırılması için yüzeylerinde (Mouse Anti Human)-CD 105 ve CD 73 özgün antibadi taşıyan modifiye nanopartiküller elde edildikten sonra pratikte uygulamasına geçilmiştir. Bunun için çevre kanı ile kemik iliğinden izole hücrelerinden oluşan hücre süspansiyonundan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) amonyum klorür çözeltisi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Beyaz kan hücreleri (lökositler) süspansiyon halinde elde edilmiştir. Saflaştırma işleminde ticari olarak satılan Milyenyi Biotech, Almanya firmasının "CD 105 Microbeads (130-051-201)" ürününe ait saflaştırma protokolü izlenmiştir. Saflaştırma işlemi hem CD 105 taşıyan hem de CD 73 taşıyan nanosorbentler ile yapılmıştır. Saflaştırma işleminde iki farklı ayırma sistemi izlenmiştir. Birinci sistemde kesintisiz akışlı manyetik kolon olarak Miltenyi firmasına ait "LS ayırma kolonları" kullanılmıştır. İkinci sistemde manyetik nanosorbentlerin sahip oldukları manyetik özelliklerden yola çıkarak oluşturulan çökme esaslı, ticari olarak Stem Cell Technologies, Kanada firmasının EasySep ürününe benzer formda tasarlanan yüksek güçte mıknatis içeren kesikli sistem olan çöktürmeli manyetik ayırıcı kullanılmıştır. Her iki sistemde de ortaya çıkan sonuçlar akışlı hücre ölçer ile analiz edilmiş ve ticari örnekler ile karşılaştırılmıştır.

3.7. Akışlı Hücre Ölçer (Flow Cytometry) Analizi

Saflaştırma veriminin saptanabilmesi için saflaştırma öncesi ve sonrası hücre süspansiyonu örnekleri Akışlı Hücre Ölçer (Becton Dickinson, ABD) ile analiz edilmiştir. Bunun için örnekler süspansiyon haline getirildikten sonra, saflaştırma öncesi hücre yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla toplam hücre süspansiyonunun (25×10^7 hücre) bir kısmı (2×10^6 hücre) 20 µl CD 105-PE ve CD 73-PE ile boyanmıştır. Saflaştırma sonrası hücrelerin yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla akışlı hücre ölçerde yapılacak analiz öncesi literatürde de belirtildiği gibi hücreler 10 µl Goat Anti Mouse-FITC ile boyanmıştır (MACS kullanıcı el kitabı, Almanya). 10 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübasyondan sonra örnekler analiz edilmiştir. Akışlı hücre ölçer analizi ile saflaştırma öncesi ve sonrası CD 105 ve CD 73 % hücre değerleri elde edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Sunulan tezin amacı daha önce belirtildiği gibi mezenkimal kök hücreleri çeşitli kaynaklardan saflaştırmayı sağlayacak, yüzeylerinde mezenkimal kök hücre özgün antibadiler (CD 105 ve CD 73) taşıyan nanosorbentler üretmektir. Yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda üç bölümde sunulmuştur. İlk bölümde manyetik yüklü nanopartiküllerin üretim ve karakterizasyonu verilmiştir. İkinci bölümde sentezlenen nanopartiküllerin polimer ile kaplama çalışmaları, hücre üzerindeki sitotoksik etkileri ve karakterizasyon ile ilgili çalışmaların sonuçları verilmiştir. Son bölümde ise mezenkimal kök hücre özgün antibadi taşıyan polimerik nanosorbent ile yapılan optimizasyon ve saflaştırma çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

4.1. Manyetit Nanopartiküller

Manyetik özellik taşıyan nanopartiküllerin üretiminde daha önce bölüm bünyesinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda ortaya çıkan manyetit nanopartikül üretim protokolü izlenmiştir. Farklı boylarda manyetit nanopartikül üretimi için ilgili protokolde sadece karıştırma hızı değiştirilmiştir. Karıştırma hızının artışıyla ilgili olarak manyetit partikül çapında küçülme olmaktadır. Çizelge 4.1'de farklı karıştırma hızlarında elde edilen partikül çapları görülebilmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen partikül özellikleri

Karıştırma hızı (rpm)	Partikül Çapı (nm)	PI (boy dağılımı)
1200 rpm	575 nm	0,593
1500 rpm	215nm	0,293
2000 rpm	75nm	0,215

Ortaya çıkan davranış karıştırma hızının artmasıyla çok sayıda çekirdeklenme noktası oluşturulduğu ve homojen dağılım sağlandığı bununda hem partüküllerin daha küçük hem de boy dağılımının dar olmasına yol açtığı şeklinde

yorumlanabilir. Elde edilen sonuçlar literatür ile benzerdir. (Morais ve ark, 2001, Sayar, 2004). Tez kapsamında 70-500nm çapta farklı boylarda manyetiti nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller FITR, Zeta-Sizer, DSC, XRD, VSM kullanılarak karakterize edilmiştir.

4.1.1. Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

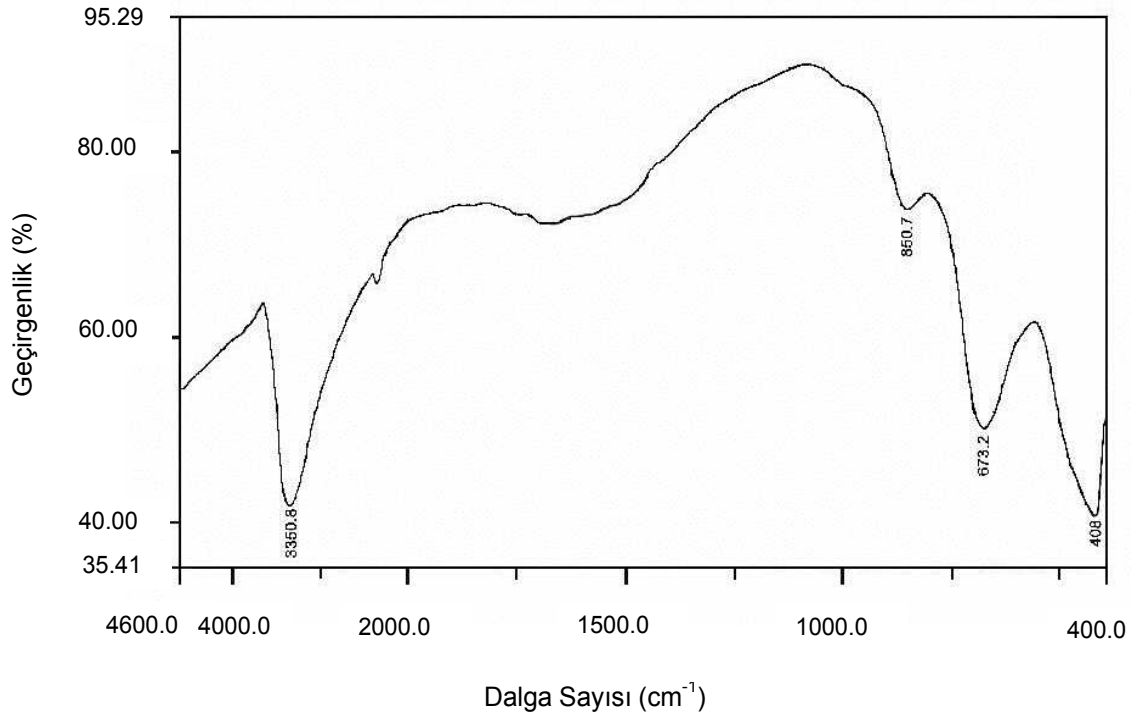
4.1.1.1. FTIR analizi

Manyetit nanopartiküllerin kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Şekil 4.1'de tipik bir FTIR spektrumu verilmiştir. Spektrumdaki manyetiti temsil eden karakteristik pikler ise Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi Fe-O gerilme titreşimi ile ilgili karakteristik pik grupları 673 ve 408 cm^{-1} dalga sayısında gözlenmiştir. Bu pikler manyetitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O gerilimini gösteren manyetitin karakteristik pikleridir. 3350 cm^{-1} 'deki pik serbest su moleküllerine aittir. FTIR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatürde rapor edilenlerle uyum içindedir.

Çizelge 4.2. Manyetit nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler

Dalga Sayısı (cm^{-1})	Karakteristik Pik
3350	OH ⁻ piki
673	Fe-O gerilme titreşim modu
408	Fe-O gerilme titreşim modu



Şekil 4.1. Manyetit nanopartikülünün FTIR spektrumuna ait bir örnek

4.1.1.2. X-Işını kırılması analizi

Sentezlenen manyetit nanopartiküllerinin kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (XRD) analizi yapılmış ve ilgili spektrumlar elde edilmiştir. Tipik bir spektrum Şekil 4.2'de sunulmuştur.

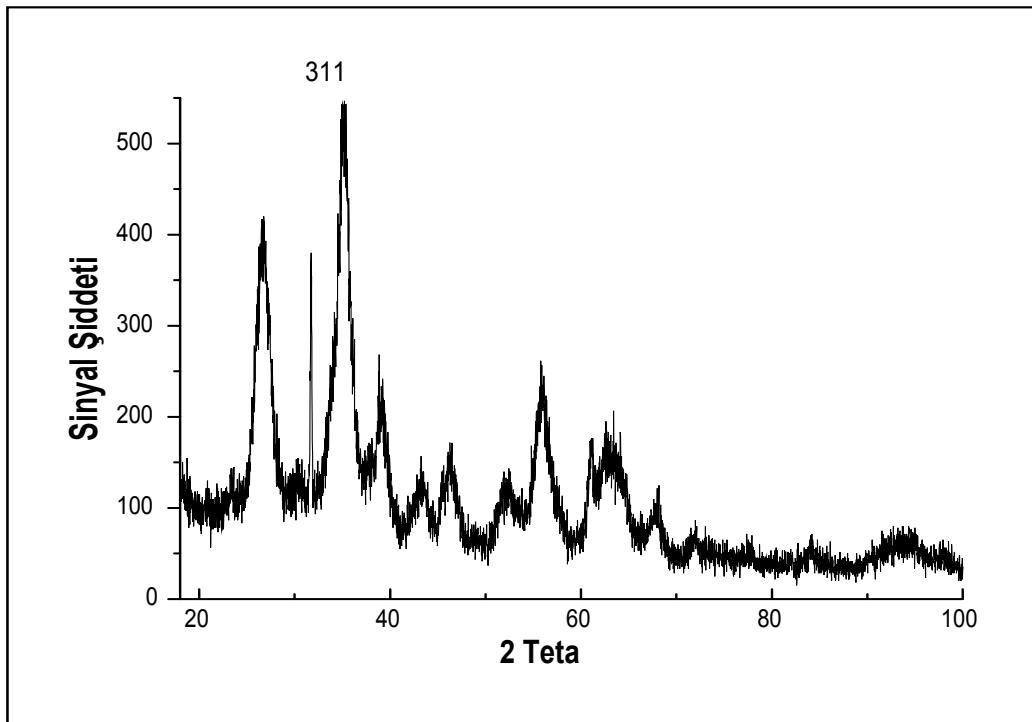
ASTM kartlarında demir oksit kristalleri için "d"(atomlar arası uzaklık, Å) değerleri tanımlanmıştır (Deng ve ark., 2002). Bu referansta demir oksitlerin kristal formları kart numaralarıyla anılmaktadır ve şöyledir: Kübik manyetit (Fe_3O_4) (kart no: 74-0748), kübik maghemit (Fe_2O_3) (kart no: 75-1550), hegzagonal hematit (Fe_2O_3) (kart no:72-0469) ve rombohedral hematit (Fe_2O_3) (kart no:73-2234).

Çizelge 4.3'de farklı 2θ değerlerine karşılık deneysel olarak bulunan "d" değerleri ve kübik manyetit için ilgili karttan alınan değerler verilmiştir. Bu değerler

karşılaştırıldığında, yukarıda belirtilen optimum koşullarda tarafımızca sentezlenen demir oksit nanopartiküllerin kübik manyetit (Fe_3O_4) olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3. XRD spektrumundaki “d” değerleri ile kübik manyetit için ASTM kartındaki “d” değerleri.

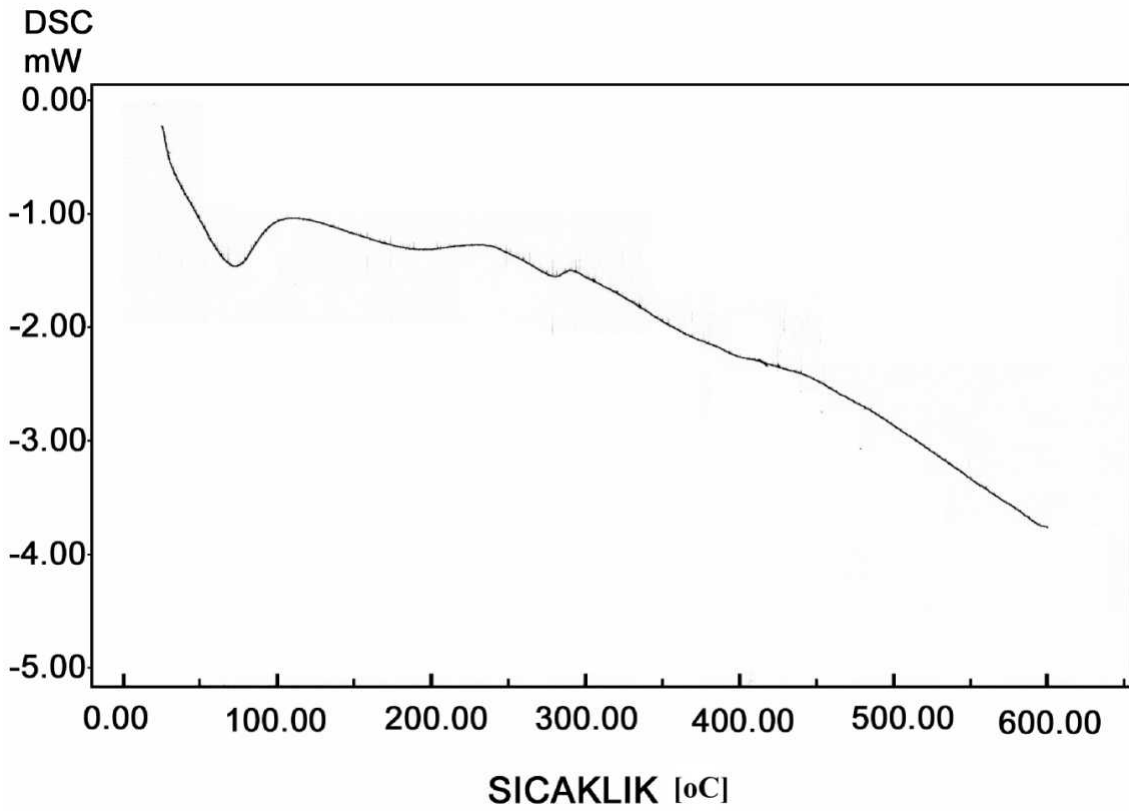
2θ (deneysel)	“d” (deneysel)	“d” (literatür)
17.460	5.07	4.852
30.200	2.96	2.967
35.40	2.5335	2.532
43.120	2.0961	2.0993
56.720	1.6216	1.6158
62.500	1.4848	1.4845



Şekil 4.2. Manyetit nanopartiküllerinin tipik bir XRD spektrumu.

4.1.1.3. DSC analizi

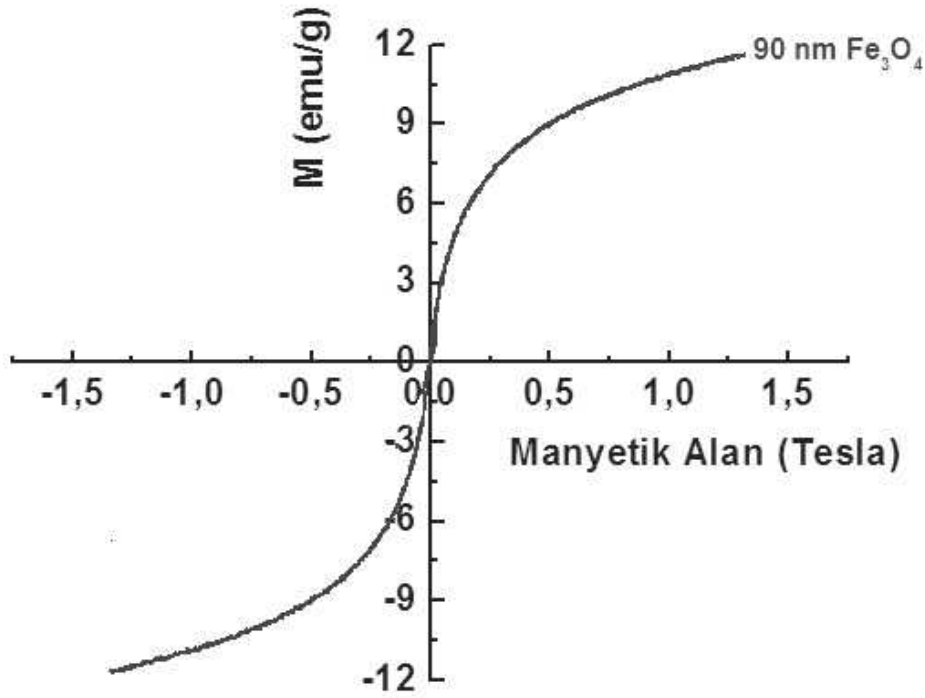
Çalışma kapsamında sentezlenen manyetit nanopartiküllerin ısı özellikleri DSC ile belirlenmiştir. Şekil 4.3.'de tipik bir DSC termogramı verilmiştir. Burada ilk olarak 71.5°C sıcaklıkta fiziksel olarak adsorplanmış su yapıdan ayrılmaktadır. 193.87°C'deki ekzotermik pik manyetit (Fe₃O₄) maghemite (γ-Fe₂O₃) geçişini göstermektedir. 300°C üzerindeki sıcaklıklarda maghemitin (γ-Fe₂O₃) hematite (α-Fe₂O₃) oksitlendiği rapor edilmiştir (Lauer ve ark., 2000). Dolayısıyla 308.7°C'deki ikinci ekzotermik pik de maghemitin hematite oksidasyonunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Manyetit nanopartiküllerinin tipik bir DSC termogramı

4.1.1.4. Manyetometre ile manyetik özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında sentezlenen manyetit nanopartiküllerinin manyetik özellikleri titreşimli manyetometre cihazı ile belirlenmiştir. Bir manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Şekil 4.4'de farklı boydaki manyetit nanopartiküllerinin manyetik alana karşı doygunluk mıknatıslığı eğrisi gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Manyetit partiküllerinin mıknatıslık eğrisi

Bir manyetik partiküldeki manyetik momentlerin hepsi uygulanan alan yönünde yönlendiğinde ölçülen toplam manyetik moment sabit kalır. Bu noktaya doygunluk, bu noktada ölçülen manyetik momente doygunluk mıknatıslığı, doygunluğa ulaşıldığındaki alan doygunluk manyetik alanı olarak tanımlanmaktadır (Bruce, M., 2001). Şekil 4.4'de görüldüğü gibi 90 nm partikül boyundaki manyetit nanopartikülü 1.315 tesla manyetik alanda 11.68 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı göstermiştir. Elde edilen bulgular ilgili literatürdekiler ile uyumludur. (Liu ve ark., 2002, Sayar, 2004).

Ayrıca nanopartikülde histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği düşünülmektedir.

4.2. Manyetit Yüklü Polimerik Nanopartiküller

Manyetik özellik taşıyan polimerik partikülleri çok çeşitli alanlarda kullanılmak üzere üretmek ve bunları ticari olarak bulmak mümkündür. Sentetik polimer bazlı manyetik partiküller, manyetik hücre ayrılması ve saflaştırılması, ilaç salımı, manyetik hedefleme (ilaçlar ve radyofarmösetikler), immunotestler, moleküler biyoloji, RNA-DNA saflaştırılması, manyetik rezonans görüntüleme ajanı ve diagnostik kitler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Chatterjee, J., 2002). Bu amaçla literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Ramirez ve arkadaşları miniemülsiyon yöntemi ile yüksek manyetit içerikli manyetik polistiren nanopartikülleri sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir (Ramirez ve ark., 2003). Kondo ve arkadaşları, emülsiyon polimerizasyonu ile sıcaklık duyarlı manyetik poli(St/NIPAM/MAA) terpolimerini sentezleyip bunların biyoproseslerdeki uygulamalarını incelemişlerdir (Kondo ve ark., 1999). Arias ve arkadaşları, ilaç salımında kullanılmak üzere manyetik bir çekirdek ve biyobozunur PE-2-CA kabuktan oluşan polimerik nanopartiküller sentezlemişlerdir (Arias ve ark., 2001). Dresco ve arkadaşları mikroemülsiyon polimerizasyonu ile manyetit-MAA/HEMA kopolimerini sentezleyip manyetik özelliklerini incelemişlerdir. Ayrıca monomer konsantrasyonunun ve su/yüzey aktif madde oranının partikül boyuna etkisini araştırmışlardır (Dresco ve ark., 1999).

Manyetik özellik taşıyan polimerik partiküller ile hücre saflaştırması çalışmaları 1980'li yıllara kadar dayanmaktadır (Miltenyi.,1989). Özellikle saf hücre ihtiyacının gereksinimi nedeniyle birçok farklı teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerin ayrıntıları literatürde ayrıntısı ile verilmektedir (Safarik ve ark. 1999).

Sunulan çalışmada önceki bölümde sentezi ayrıntılı olarak açıklanan, sunulan tez kapsamında üretilen, ortalama partikül boyu 70-150 nm olan manyetit nanopartiküller çekirdek olarak kullanılarak, bunları taşıyan polimerik nanopartiküller üretilmiştir. Mikroemülsiyon polimerizasyonu ile üretilen bu nanopartiküllerde ana monomer MMA ve PEG'dir. Partiküllere fonksiyonel grup

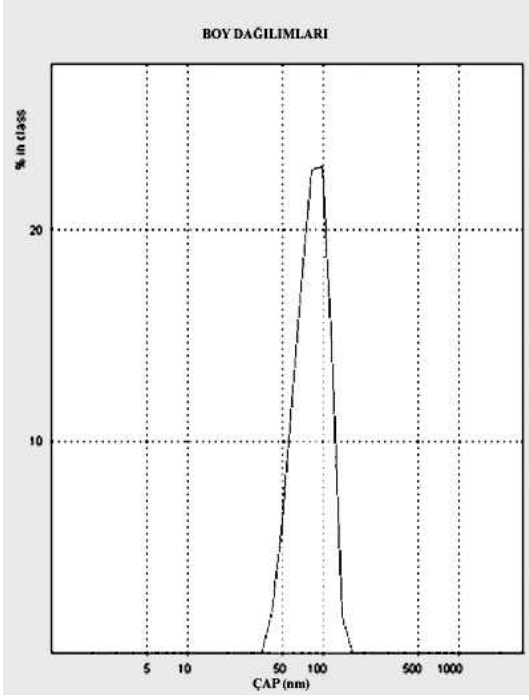
kazandırmak üzere, komonomer olarak sırası ile AAc ve MA kullanılmıştır. Ağırlıkça 90/10 oranlarında ana monomer/komonomerler kullanılarak gerçekleştirilen mikroemülsiyon polimerizasyonlarıyla hem manyetik yüklü olmayan (manyetit kullanılmadan gerçekleştirilen) hem de manyetik yüklü MMA-AAc ve PEG-MA nanopartikülleri üretilmiştir. Farklı boylarda manyetik polimerik partiküller elde edebilmek için farklı çaplarda manyetit partiküller kullanılmıştır. Sentezlenen partiküllerin partikül büyüklükleri ve dağılımları Zeta Sizer (Malvern 3000 HSA, İngiltere) ile belirlenmiştir. İlgili Zeta Sizer sonuçları Şekil 4.5.'de görülebilmektedir. Çizelge 4.4.'de sentezlenen farklı boylarda partiküllerin boy ve boy dağılımları ile zeta potansiyelleri görülebilmektedir.

Çizelge 4.4. Sentezlenen manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin özellikleri

	Fe₃O₄ manyetit çapı (nm)	Kaplama sonrası nanopartikül çapı (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	Boy Dağılımı (PI)
MMA/AAc kaplı manyetik nanopartikül	75	153	-42,72	0,229
	156	250	-41,05	0,478
	183	489	-54,6	0,484
PEG/MA kaplı manyetik nanopartikül	75	210	22,8	0,112

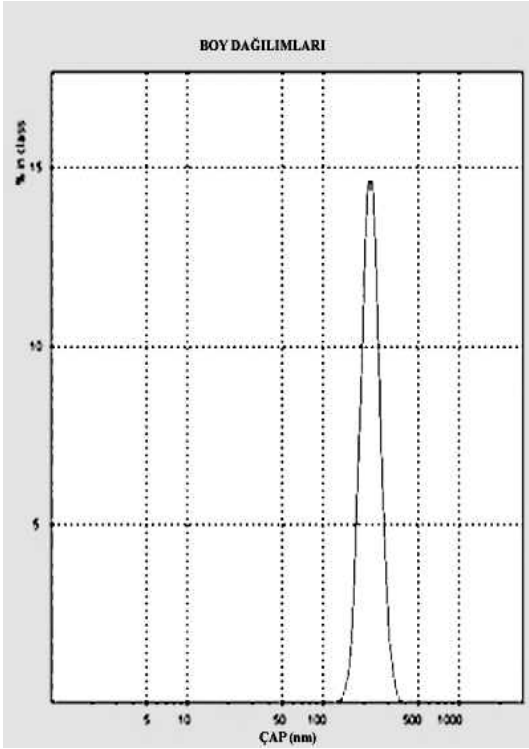
4.2.1 Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi

Tez kapsamında mezenkimal kök hücre saflaştırılması için kullanılacak nanosorbent üretimini gerçekleştirilmeden önce önceki bölümlerde ayrıntısı ile anlatılan polimerizasyon teknikleri ile manyetik yüklü 90/10 monomer/komonomer oranında fonksiyonel uç olarak karboksil grubu (-COOH) taşıyan MMA/AAc ve hidroksil grubu (-OH) taşıyan PEG/MA polimerik nanopartikülleri sentezlenmiş ve bu partiküllerin hücre ile etkileşimleri gerçekleştirilerek hücre canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.



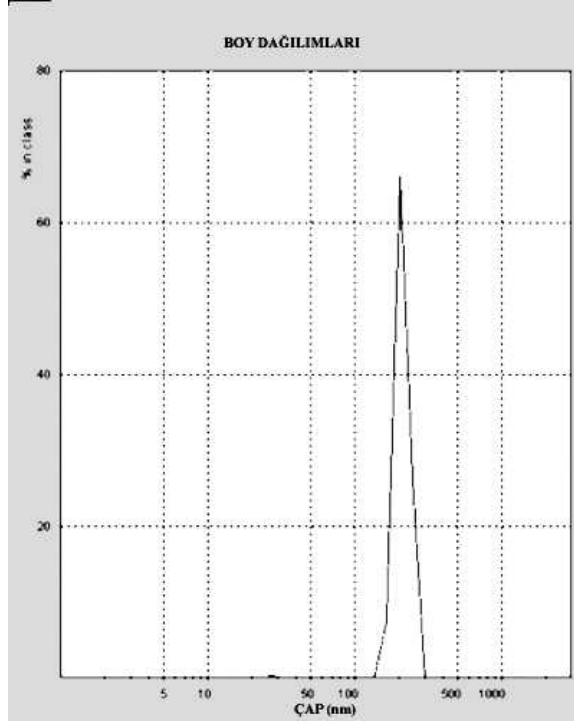
(A)

Fe₃O₄ manyetit nanopartikül	
Çap (nm)	76.2
Boy dağılımı (PI)	0.215



(B)

MMA/AAC kaplı manyetit nanopartikül	
Çap (nm)	222.8
Boy dağılımı (PI)	0.0246



PEG/MA kaplı manyetit nanopartikül	
Çap (nm)	210.9
Boy dağılımı (PI)	0.112

(C)

Şekil 4.5. Sentezlenen manyetik özellikte polimerik partikülerin Zeta sonuçları

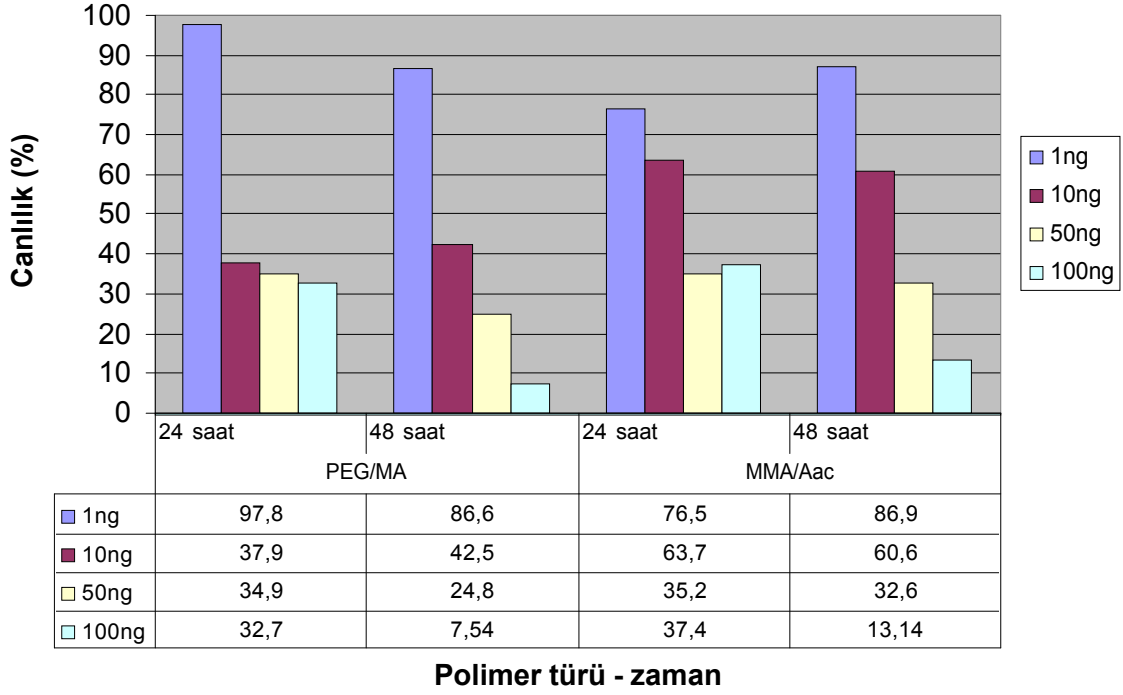
(A) Manyetit nanopartikül (B) MMA/AAC kaplı manyetit nanopartikül (C)

PEG/MA kaplı manyetit nanopartikül

(B)

Hücre canlılığının araştırılması için kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücreler (Genkord Sağlık Hizmetleri, İstanbul) hücre kaynağı olarak kullanılmıştır ve sitotoksitesite araştırmasında MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium) testi uygulanmıştır. MTT testi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. İlk sütuna sadece hücre ekilerek ve hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiştir. Bu sütun pozitif kontrol olarak kullanılmış ve en yüksek absorbans bu sütunda elde edilmiştir.

Çalışmada 4 farklı konsantrasyonda sitotoksitesite saptanması yapılmıştır. Bu konsantrasyonlar her iki polimer türü için sırası ile hücre başına 1ng, 10ng, 50ng ve 100ng'dır. Her bir konsantrasyon için 4 kuyucuk kullanılmıştır. Yüzde canlılığın hesaplanırken bu 4 kuyucuktan alınan absorbans değerleri değerlendirilir. Manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin sitotoksitesitesinin belirlenmesi çalışmasında hem 24 hem de 48 saat sonuçları alınıp değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6. Sentezlenen polimerik nanopartiküllerin mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması için yapılan MTT testi sonucu

Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi MTT testi sonucunda hücre başına 1ng düzeyinde manyetik özellik taşıyan polimerik partikül kullanıldığında hem PEG/MA ile etkileştirilen hücrelerde hem de MMA/Aac ile etkileştirilen hücrelerde %75'in üzerinde canlılık belirlenmiştir. Hücre başına 1ng kullanıldığında elde edilen 48 saat sonuçlarında her iki polimer bakımından birbirine yakın ve %85'in üzerindedir. Dikkat edileceği gibi manyetik özellik taşıyan polimerik partikül miktarı arttığında hem 24 saat hem de 48 saat sonuçlarında hücre canlılığı azalmaktadır. Hücre canlılığındaki bu azalma PEG/MA partiküllerinde daha belirgin olarak görülmektedir. Elde edilen sonuçların ışığında MMA/Aac kaplı manyetik özellik taşıyan polimerik nanopartiküllerin hücre canlılığı bakımından daha uygun olduğuna karar verilmiştir ve tez çalışmasının kalan kısmındaki çalışmalara 90/10 monomer /komonomer oranı olan manyetik yüklü karboksil uçlu fonksiyonel grup taşıyan (-COOH) MMA/Aac polimerik nanopartiküller kullanılmıştır.

4.2.2. Nanopartikül Karakterizasyonu

Tez çalışmaları sırasında sentezlenen 150-500nm arasındaki manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 partikülleri ile mezenkimal kök hücre saflaştırılmasında kullanılacak nanosorbent üretimine geçmeden önce karakterizasyonları yapılmıştır. Elde edilen sonuçların literatür ile karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Manyetik ve manyetik yüklü olmayan PMMA/AAc-90/10 nanopartikülleri birlikte karakterize edilmiş ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.2.2.1. FTIR Analizi

Araştırma kapsamında sentezlenen manyetik ve manyetik yüklü olmayan PMMA/AAc-90/10 kopolimerlerinin FTIR spektrumları çekilmiştir. PMMA/AAc-90/10 kopolimeri ile manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.7. A ve B de verilmiştir. Kopolimerlerin FTIR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri Çizelge 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.5. PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Karakteristik pik
3550	OH gerilimi
2922-2853	-C-H gerilimi
1736	-C=O gerilimi
1466	-CH ₂ grup bükülümü
1392	- CH ₃ grup bükülümü
1223	-C-O gerilimi
1149	Asimetrik -C-O-C- gerilimi
1080	Simetrik -C-O-C- gerilimi
991	-C-C- gerilimi
835	-C-H- deformasyon

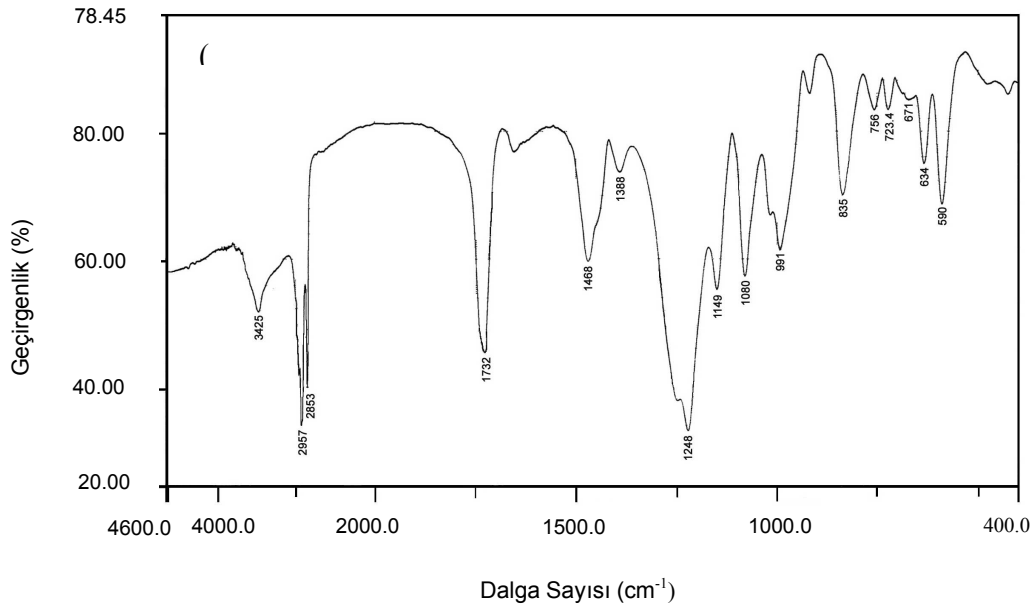
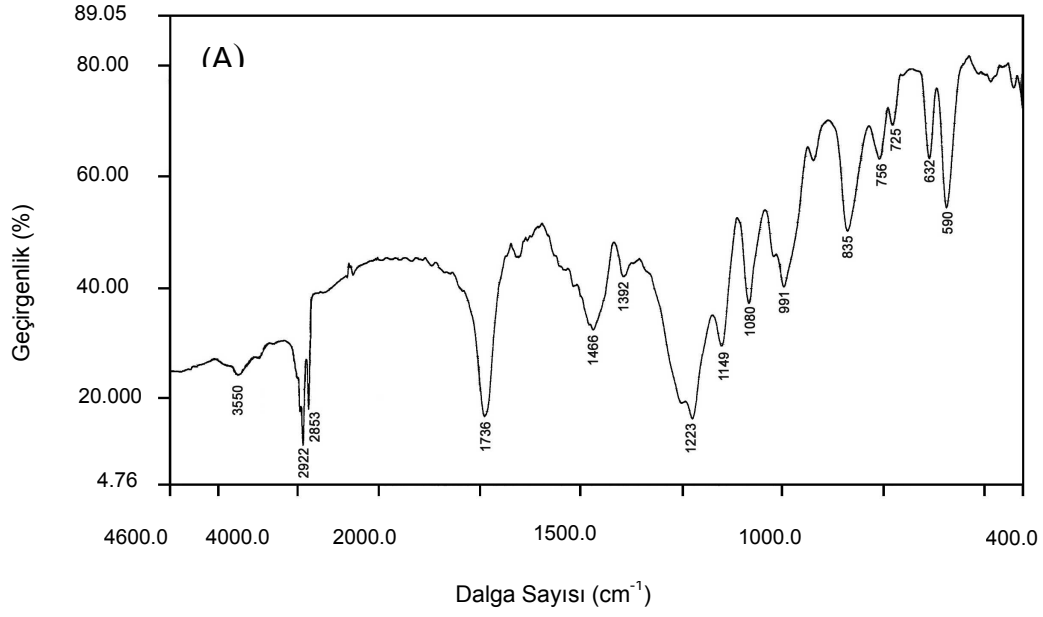
Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi, PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda, akrilik asitten gelen karboksil grupları frekansı, spektrumda 3500 cm^{-1} civarında açığa çıkmaktadır. 1736 cm^{-1} dalga sayısında görülen keskin pik asit gruplarındaki karakteristik -C=O karbonilindeki gerilimdir. Ayrıca 1250-1080 cm^{-1} dalga sayılarında ester gruplarına ait -C-O gerilimin piki gözlenmektedir. Kopolimer üzerinde bulunan hidrokarbonlara ait görülen pikler 2922-2853 cm^{-1} ’de -C-H gerilimi, 1466-1392 cm^{-1} ’de -CH_3 grup bükülümüdür. Gözlenen spektrumlara ait yorumlar literatür ile tamamen uyuşmaktadır (Özer, 2001, Sayar, 2004).

Çizelge 4.6. Manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.

Dalga Sayısı (cm^{-1})	Karakteristik pik
3466	OH gerilimi
2957-2853	-C-H gerilimi
1732	-C=O gerilimi
1468-1388	-CH ₃ grup bükülümü
1248	-C-O gerilimi
1149-1080	-C-O-C- gerilimi
991	-C-C- gerilimi
835	-C-H- deformasyon
671	Fe-O gerilimi

Birinci gruptaki deneylerde sentezlenen manyetitin FTIR spektrumunda 673 cm^{-1} dalga sayısında Fe-O gerilim piki gözlenirken Şekil 4.7 A’da görüldüğü gibi PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda 673 cm^{-1} dalga sayısında pik görülmemektedir. Fakat manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda 671 cm^{-1} dalga sayısında küçük bir pik görülmektedir. Bu da manyetitin 673 cm^{-1} dalga sayısındaki Fe-O geriliminden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla FTIR spekturumuna dayanarak manyetit nanopartiküllerinin

PMMA/AAC-90/10 kopolimeri ile kaplandığı söylenebilir. Ayrıca manyetik yüklü PMMA/AAC-90/10 kopolimeri ile manyetit içermeyen aynı kopolimerinin FTIR spektrumundaki karakteristik piklerinin aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Örnek FTIR spektrumları: (A) PMMA/AAC-90/10 kopolimerinin; B) Manyetik yüklü PMMA/AAC-90/10 kopolimerinin

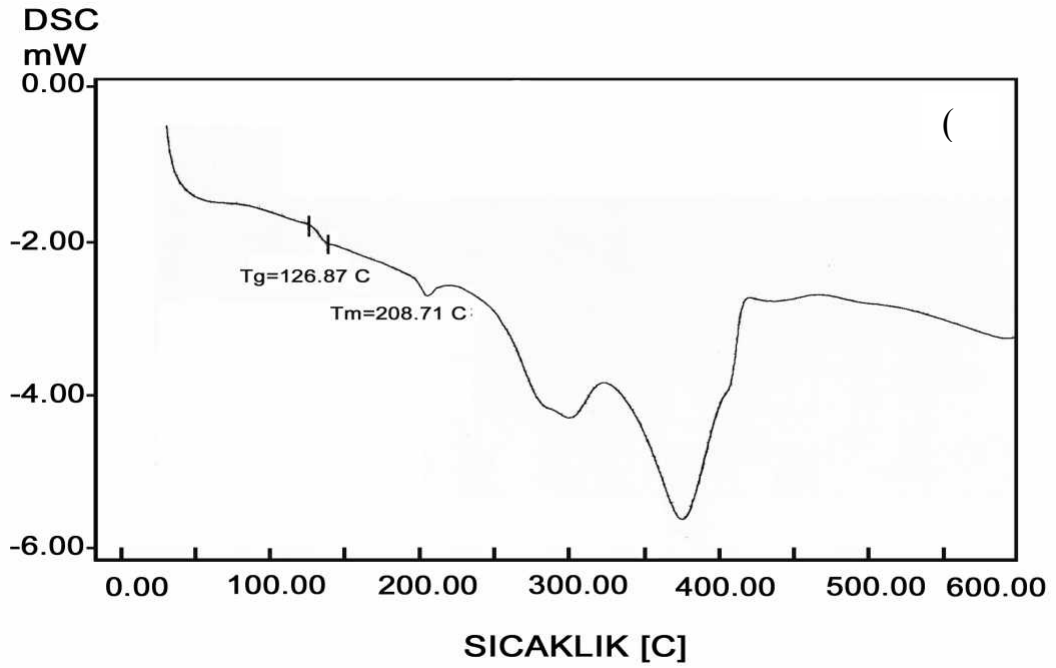
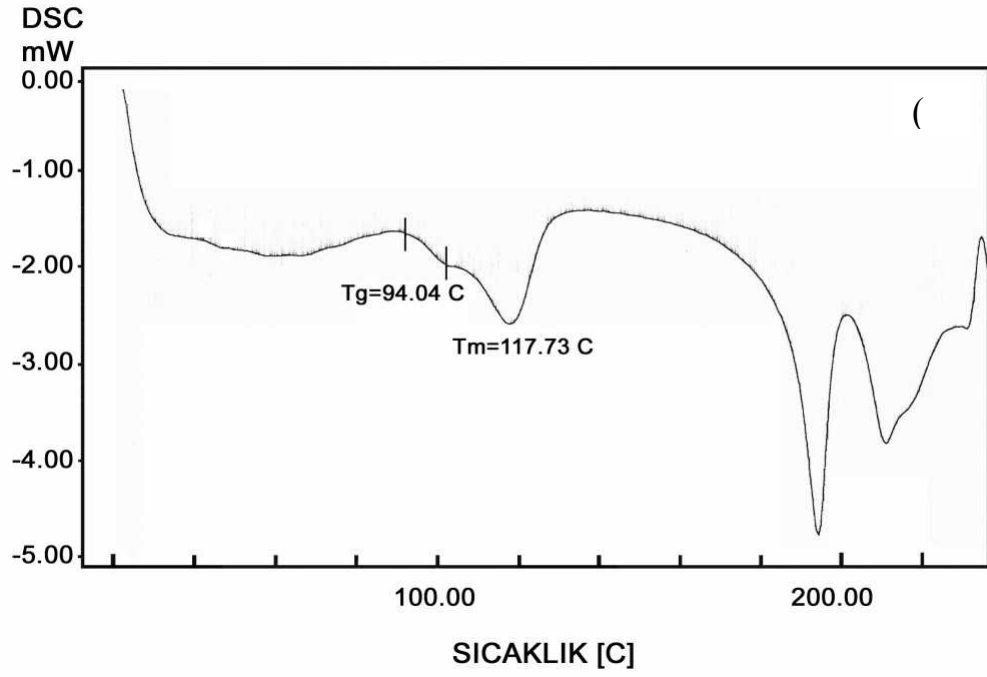
4.2.2.2. DSC Analizi

Çalışma kapsamında sentezlenen manyetik yüklü olmayan nanopartiküller ile manyetik yüklü nanopartiküllerinin camsı geçiş sıcaklığı ve erime sıcaklığı gibi iki önemli ısıl özelliği DSC ile belirlenmiştir. Şekil 4.8. A ve B' de manyetik ve manyetik yüklü olmayan PMMA/AAc-90/10 nanopartiküllerinin DSC termogramları verilmektedir. Çizelge 4.6.'da bu nanopartiküllere ait ısıl geçişler topluca sunulmuştur.

Şekil 4.8.A'da görüldüğü gibi PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin DSC termogramından camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 94.04°C, erime sıcaklığı (T_m) 117.73°C'dir. Şekil 4.8.B'de manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin ise camsı geçiş sıcaklığı 126.87°C ve erime sıcaklığı 208.71°C'dir. Manyetik içeren aynı kopolimerin camsı geçiş ve erime sıcaklığının arttığı görülmektedir. Bu da yapı içindeki manyetik nanopartiküllerinin ısıl kararlılığının artırdığını göstermektedir. Ayrıca yapıya manyetik girmesi nedeniyle yapının daha katı olduğu bunun sonucunda erimenin zorlaştığı ve erime sıcaklığının arttığı söylenebilir. DSC termogramlarına bakıldığında PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin bozunma sıcaklıkları 195°C ve 210°C iken manyetik içeren aynı kopolimerin bozunma sıcaklıkları 300°C ve 375°C'de gözlenmektedir. Bu da kopolimer içindeki manyetitin ısıl kararlılığı artırdığını göstermektedir. Literatürde de benzer sonuçlar bulunmuştur (Morris ve ark., 1991; Lauer ve ark., 2000; Lauer ve ark 2003).

Çizelge 4.7. PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin ve manyetik yüklü PMMA/AAc -90/10 kopolimerinin camsı geçiş (T_g), erime (T_m) ve bozunma (T_d) sıcaklıkları

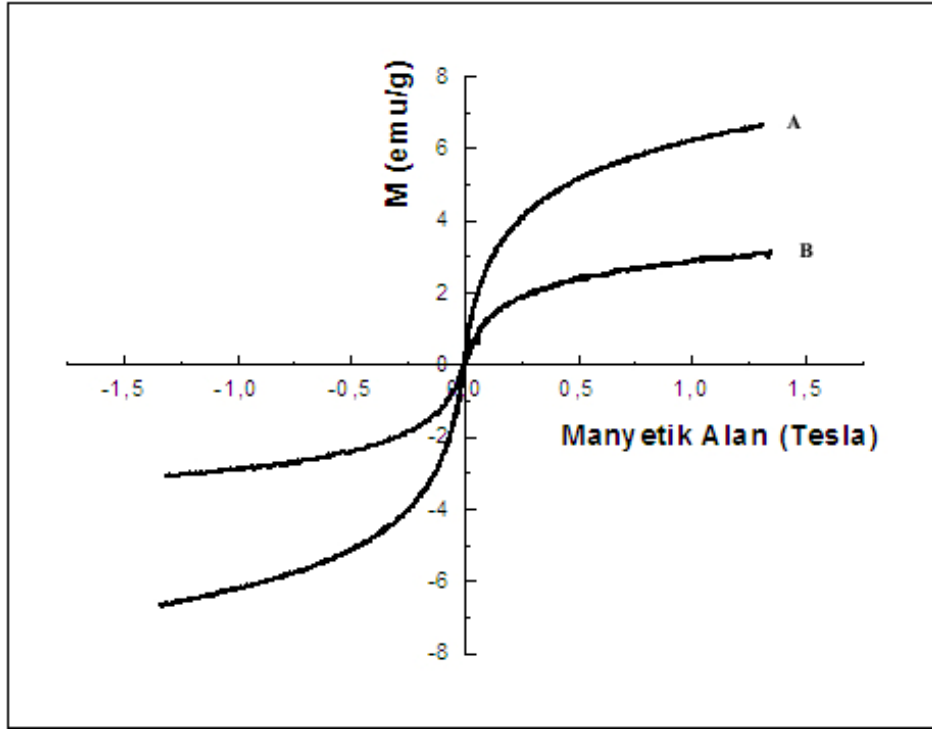
Polimer	T_g (°C)	T_m (°C)	T_d (°C)
PMMA/AAc -90/10	94.04	117.73	195-210
Manyetik yüklü PMMA/AAc -90/10	126.87	208.71	300-375



Şekil 4.8. Örnek DSC termogramları: (A) PMMA/Ac-90/10 kopolimerinin; (B) manyetik yüklü PMMA/Ac-90/10 kopolimerinin

4.2.2.3. Manyetometre ile Manyetik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında sentezlenen manyetit nanopartiküllerinin ve manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin manyetik özellikleri titreşimli manyetometre cihazı ile belirlenmiştir. Partiküllerin bir manyetik alan içindeki manyetik özellikleri kütle başına manyetik moment olarak ifade edilmiştir (emu). Şekil 4.9 'da manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülü ile manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin manyetik alana karşı doyumluk mıknatıslığı eğrisi birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Örnek mıknatıslık eğrileri: A) manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün; B) manyetik yüklü PMMA/AAc- 90/10 kopolimerinin

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi manyetit nanopartikülü 1.237 tesla manyetik alanda 6.601 emu/g (M_s) doyumluk mıknatıslığı gösterirken manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin 1.345 tesla manyetik doyumluk mıknatıslığı alanda 3.190 emu/g (M_s). Dolayısıyla manyetit nanopartiküllerinin polimer ile kaplanması sonucu doyumluk mıknatıslığının azaldığı görülmüştür. Benze olarak Zhang ve arkadaşları da sentezledikleri manyetit nanopartiküllerinin yüksek doyumluk

mıknatıslığı gösterirken bu partiküllerin polianilin (PANI) ile kaplanmasından sonra daha küçük bir doygunluk mıknatıslığı gösterdiğini belirtmişlerdir (Zhang ve ark., 2003).

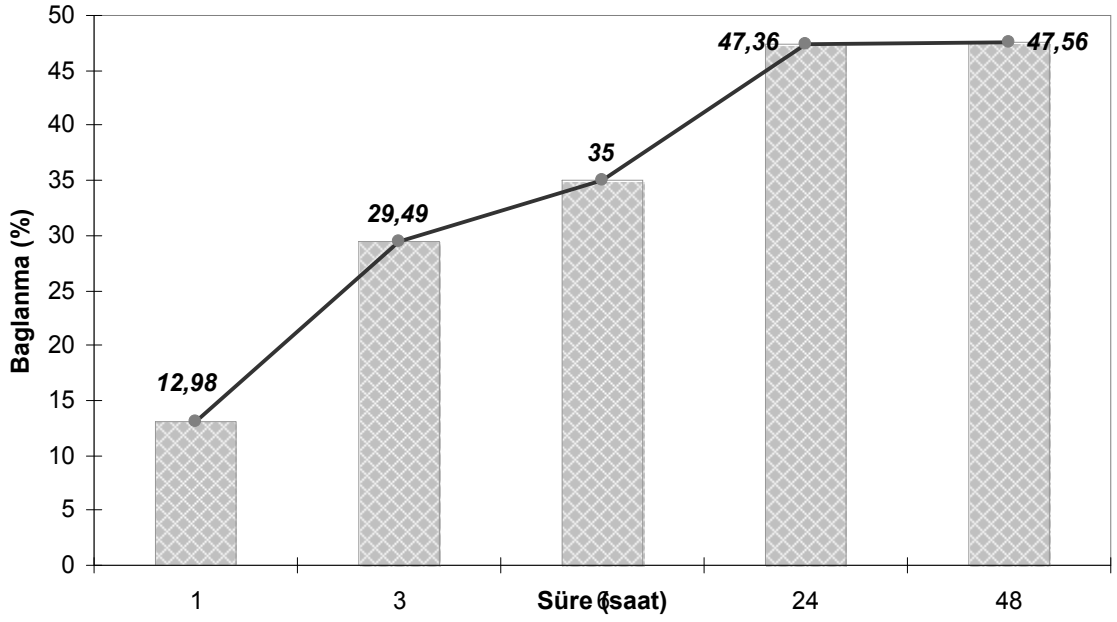
Manyetit nanopartikülü, manyetik alana karşı mıknatıslık eğrisinde histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca bu nanopartiküllerin polimer ile kaplanması sonucunda elde edilen manyetik kopolimerinde histerisis eğrisi gösterdiği dolayısı ile süperparamanyetik özellik taşıdığı söylenebilir.

4.3. Nanosorbentler ile Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırılması

Tez kapsamında sentezlenen manyetik özellik taşıyan polimerik MMA/AAC nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarından sonra mezenkimal kök hücre saflaştırması için yüzeylerinde spesifik antibadi (CD105 ve CD73, BD Pharmingen, ABD) taşıyan nanosorbent üretim çalışmalarına geçilmiştir. Bu çalışmalarda en uygun bağlanma koşullarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda örnek antibadi olarak Human IgG (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

4.3.1. Reaksiyon Süresinin Bağlanma Üzerindeki Etkisi

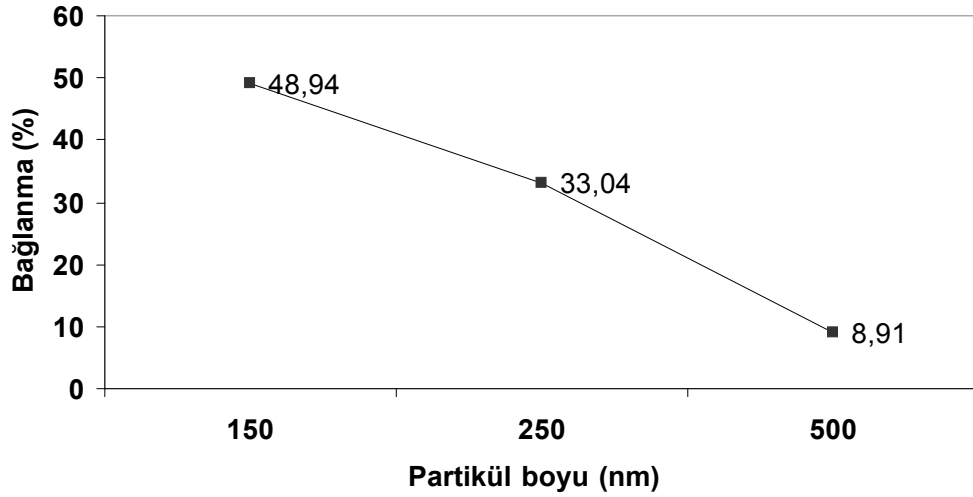
Kovalent bağlanmada reaksiyon süresinin etkisini araştırmak amacıyla ilgili literatürde ayrıntısı ile verilmiş olan protokol üzerinden reaksiyon süresinin bağlanma üzerindeki etkisi incelenmiştir. 150nm MMA/AAC kaplı manyetik nanopartiküller ile antibadi bağlanması belirli zamanlarda gerçekleştirilerek bağlanma yüzdeleri hesaplanmıştır. Şekil 4.10'da bağlanma yüzdesinin zamana bağlı grafiği verilmiştir. Ortalama sayısal değerlerde aynı grafikte sunulmuştur. Reaksiyon oda ısısında gerçekleştirilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi ilk bir saatlik bölümde bağlanma yüzdesi çok düşük kalmıştır. Geçen zamana bağlı olarak bağlanma yüzdeside artmaktadır. 24 ve 48 saatlik sonuçlar birbirine çok yakındır. Bu nedenle reaksiyonun 24 saatte dengeye ulaştığı varsayılmıştır. Bundan sonraki optimizasyon çalışmalarında ilgili bu bulgu üzerinden gidilerek 24 saat reaksiyon süresi temel alınmıştır.



Şekil 4.10. Reaksiyon süresinin bağlanma üzerindeki etkisi

4.3.2. Nanopartikül Büyüklüğünün Bağlanma Üzerindeki Etkisi

Partikül büyüklüğünün bağlanma üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile daha önce mikroemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen değişik boyutlarda (150, 250 ve 500nm) manyetik özellik taşıyan PMMA/AAC partikülleri kullanılmıştır. Bağlanma yöntemi olarak daha önceki bölümde ayrıntısı ile verilen reçete kullanılmış, yalnızca partikül büyüklüğü değiştirilmiş, diğer parametreler sabit tutulmuştur. Çalışmada 150, 250 ve 500 nm boyutlarında PMMA/AAC partikülleri kullanılmıştır. Şekil 4.11. 'de 3 farklı çapta PMMA/AAC partiküllün bağlanma üzerindeki etkisi yüzde (%) olarak verilmiştir.

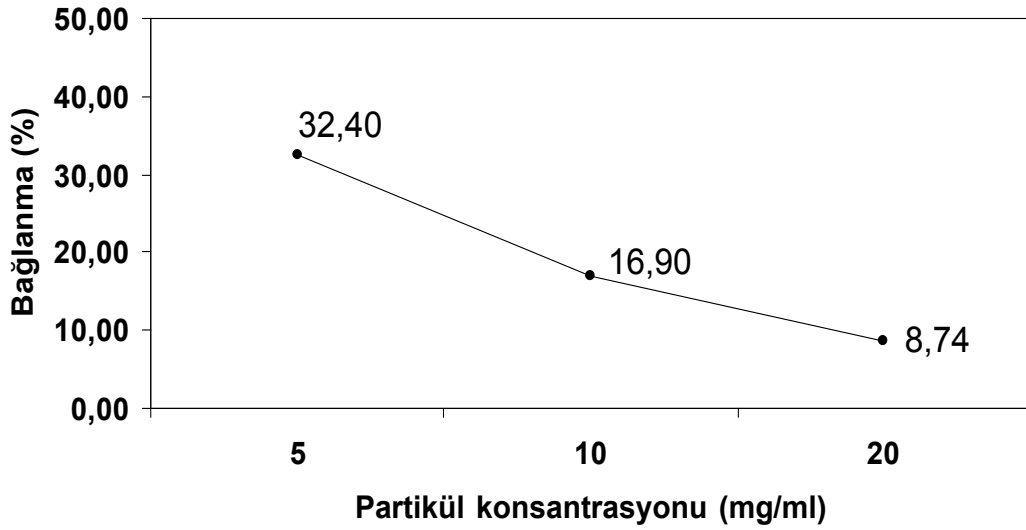


Şekil 4.11. Nanopartikül büyüklüğünün bağlanma üzerindeki etkisi

Şekilde görüldüğü gibi partikül büyüklüğü arttıkça antibadi bağlanma yüzdesi düşmektedir. Partikül çapı azaldıkça yüzey alanı artmaktadır ve artan yüzey alanı bağlanma için varolan alanı arttırmakta ve daha çok antibadi molekülü bağlanabilmektedir. Bu nedenle küçük çaplı partiküllerde bağlanma verimi daha yüksek olmaktadır.

4.3.3. Nanopartikül Konsantrasyonunun Bağlanma Üzerindeki Etkisi

Nanopartikül konsantrasyonu ile bağlanma verimi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla daha önce literatürde belirtilen (Polysciences, Teknik Notlar 618, 2005) konsantrasyonlardan farklı olarak 3 farklı konsantrasyonda (5mg/ml, 10mg/ml ve 20mg/ml) bağlanma yüzdesi incelenmiştir. Bu çalışmada daha önceki incelemelerde en iyi bağlanma yüzdesine sahip partikül çapı olarak 150 nm çaplı PMMA/AAc partükülleri kullanılmıştır. Kullanılan nanopartikül konsantrasyonlarında fonksiyonel grup olarak yapıya karboksilik uç (-COOH) kazandıran ve böylelikle antibadi bağlanmasını daha olanaklı kılan akrilik asit komonomerinin ağırlığı temel alınmıştır (90/10 monomer/ko-monomer oranından). Partikül konsantrasyonun bağlanma üzerindeki etkisi Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Nanopartikül konsantrasyonunun bağlanma üzerindeki etkisi

Şekilde görüldüğü gibi partikül konsantrasyonu arttıkça bağlanma yüzdesi azalmaktadır. En iyi bağlanma %32,40 ile 5 mg/ml akrilik asit (AAc) konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Partikül konsantrasyonunun artması manyetik özellik taşıyan bu partiküllerin deney sırasında yığılmalara (çökmeye) yol açtığı not edilmelidir. Partiküllerde görülen yığılma, partikül yüzeylerindeki akrilik asit gruplarının diğer manyetik partiküller tarafından kapanmasına neden olduğundan, yüzeylerine antibadi bağlanmasını engellemektedir. Bu nedenle yüksek partikül konsantrasyonunda bağlanma yüzdesi göreceli olarak düşük kalmaktadır.

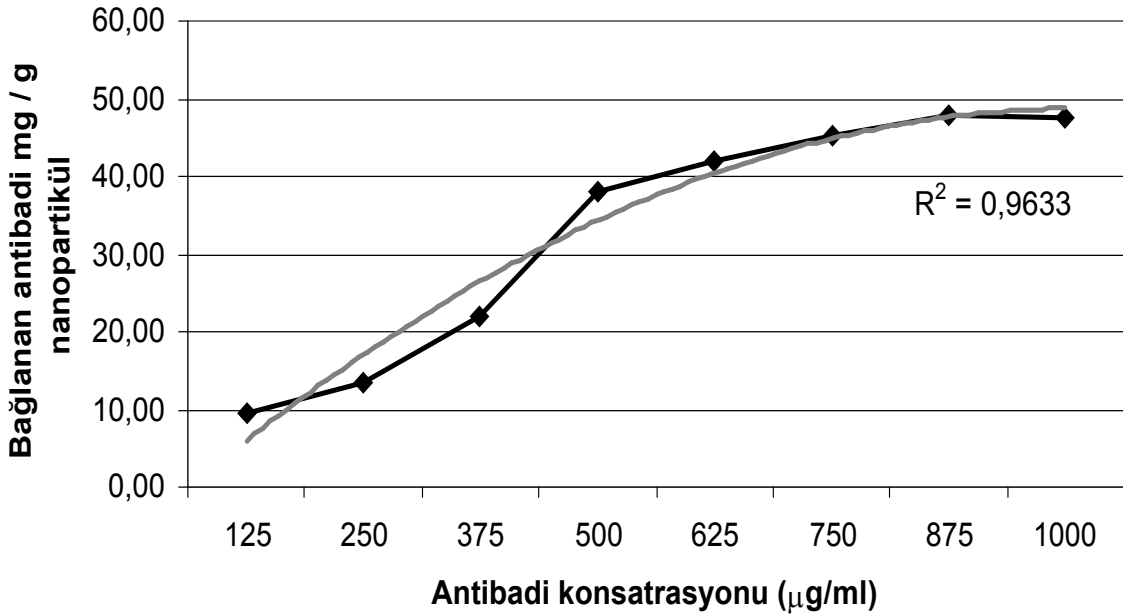
4.3.4. Antibadi Konsantrasyonun Bağlanma Üzerindeki Etkisi

Antibadi konsantrasyonunun bağlanma üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla 125-1000 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişik konsantrasyonlarda antibadi kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda nanopartikül miktarı 500 μg antibadi/5mg partikül olarak belirlenmiştir. Antibadi konsantrasyonunun bağlanma verimi ile olan ilişkisini açıklamak amacıyla ölçülen absorpsiyon değerlerinden elde edilen değerler kullanılmıştır. Gram nanopartikül başına bağlanan mg antibadi miktarını

bulabilmek amacıyla aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır ve elde edilen değerler Şekil 4.13'de verilmiştir.

$$Q = [(C_0 - C)V] / m \quad (4.1)$$

Burada Q, birim nanopartiküle bağlanan antibadi konsantrasyonu (mg/g), C₀ ve C sırasıyla bağlanma öncesi ve sonrası antibadi konsantrasyonları (mg/ml), V sıvı fazın hacmi (ml), ve m, kullanılan nanopartikül miktarını (g) temsil etmektedir.



Şekil 4.13. Antibadi konsantrasyon bağlanma üzerindeki etkisi

150nm çaplı PMMA/AAC partikülleri ile yapılan çalışmada antibad konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak birim gram nanopartikül başına bağlanan antibadi miktarıda artmaktadır. Bu artış 750 µg/ml antibadi konsantrasyonuna kadar belirgin şekilde artmış, 875 µg/ml antibadi konsantrasyonunda platoya ulaşmıştır. Derişimin artması ile bağlanma için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) da artmaktadır. Sürücü kuvvetin artmasına bağlı olarak bağlanma kapasitesi de artmaktadır. Bu davranış beklenen bir durumdur.

Yapılan çalışmada maksimum bağlanma kapasitesi 48 mg antibadi /g nanopartikül olarak bulunmuştur.

4.4. Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırılması için Nanosorbentlerin Üretimi

Önceki bölümlerde belirlenen en uygun koşullarda, HIgG yerine CD 105 ve CD 73 monoklonal antibadileri kullanılarak MMA/AAC kaplı süperparamanyetik nanosorbentlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar şöyledir: Partikül çapı: 150nm (70nm manyetit çap), partikül konsantrasyonu 5mg/ml; antibadi konsantrasyonu 500 µg/ml ve reaksiyon süresi 24 saat'tir. MMA/AAC kaplı nanopartiküllerin üzerine CD 105 ve CD 73 antibadilerinin yüzeye kovalent olarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar birim nanopartikül başına bağlanan antibadi değerinde tepe noktası 875 µg/ml olarak bulunsada mevcut antibadilerin oldukça pahalı olmaları nedeniyle bağlama çalışmalarında kullanılabilir en uygun değer olan 500 µg/ml konsantrasyon seçilmiştir.

Bağlama işlemi öncesi ve sonrası antibadi konsantrasyonları üzerinden ölçülen 280nm absorbans değerlerinden % bağlanma değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler CD 73 ve CD 105 için sırası ile %79,85 ve %77,98 olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında gram nanopartikül başına bağlanan CD 73 değeri 55.5 mg ve CD 105 değeri 53,5 mg olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmanın önceki bölümlerde en uygun koşulların aranmasında kullanılan HIgG ile benzer olduğu görülmektedir.

Elde edilen nanosorbentler PBS içinde süspansiyon edilerek kullanılabileceği kadar +4°C'de saklanmıştır.

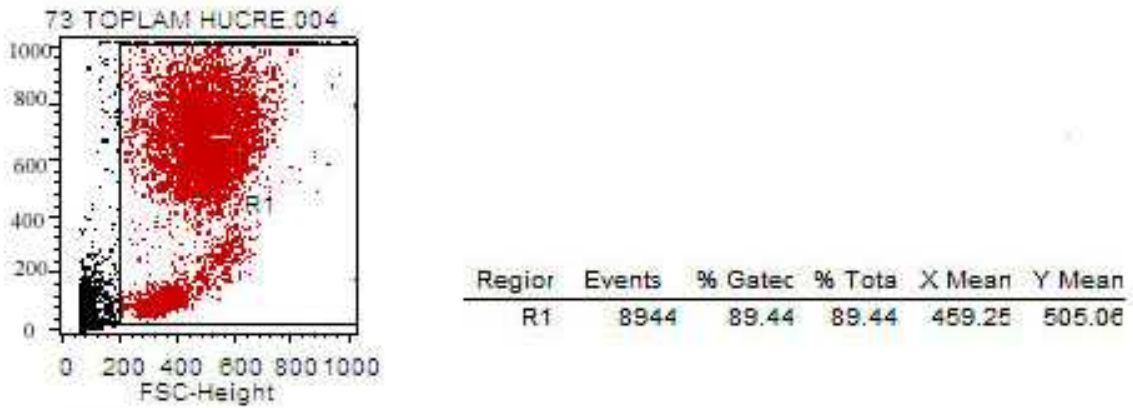
4.5. Nanosorbentler ile Mezenkimal Kök Hücre Saflaştırılması

Yüzeylerinde CD 105 ve CD 73 mezenkimal kök hücre özgün antibadi taşıyan manyetik yüklü polimerik nanosorbentlerin üretimi gerçekleştirildikten sonra, elde edilen bu nanosorbentler ile uygun hücre süspansiyonundan mezenkimal kök hücre saflaştırma çalışmalarına geçilmiştir. Hücre süspansiyonundan saflaştırma işlemi hem Miltenyi firmasına ait akışlı sistem oldan LS kolonları hem de blok

mıknatıs kullanılarak yapılan çöktürmeli sistem ile gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonundan mezenkimal kök hücrelerin saflaştırılması işleminde ticari örnek ile kıyaslama yapabilmek amacıyla ticari örneğin uyguladığı protokol aynen izlenmiştir.

4.5.1. Saflaştırma Öncesi Hücre Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

Saflaştırma işlemleri öncesi ve sonrası hücre yüzey özelliklerinin analizi akışlı hücre ölçer (Flow Cytometry) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler 10000 hücre üzerinden yapılmıştır ve debris gibi analizi olumsuz etkileyecek veriler dışarıda tutulmuştur. Analiz tüm lökosit grupları üzerinden yapılmış olup bu sonuçlarda R1 kapısı olarak yer almaktadır. Şekil 4.14’de saflaştırma öncesi tüm hücrelerin genel görünümü verilmiştir.

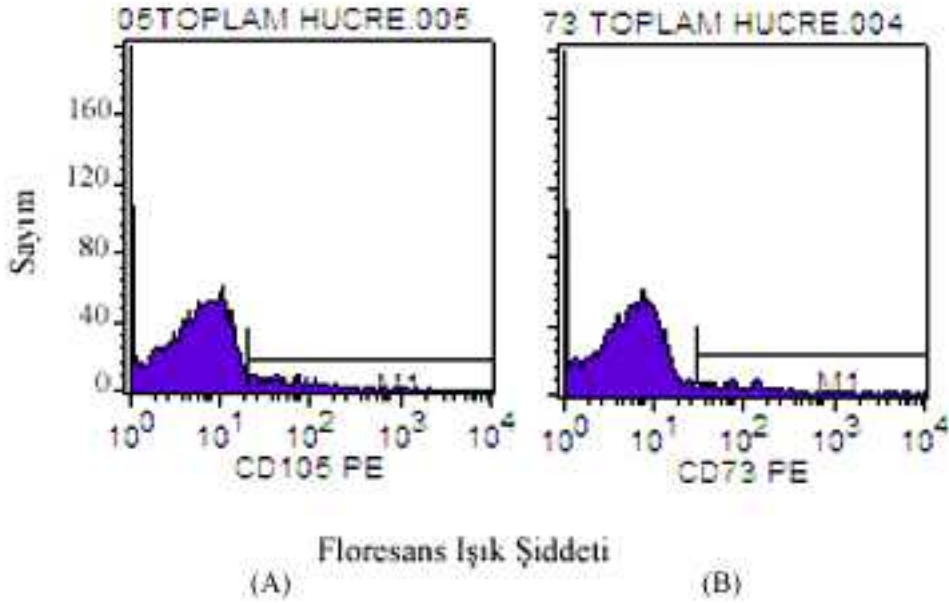


Şekil 4.14. Saflaştırma öncesi hücre özelliklerinin analizi

Şekilden görülebildiği gibi çıktı üzerinde Şekil 4.14’de kapılama işlemi ile alınan R1 kapısı ile analizi gerçekleştirilmek istenen hücreler olan lökosit grupları seçilmiştir. Bu şekilde X eksenini hücrelerin boy dağılımını, Y eksenini ise granüllülük özelliklerinin göstermektedir. Çıktıda verilen “Region” değeri seçilen R1 kapısını, “Events” kapı içerisindeki hücre sayısını, “% Gated” kapı içerisindeki hücrelerin yüzde oranını, “% Total” kapı içerisindeki hücrelerin toplam hücre sayısına oranını, “X mean” ortalama boy uzunluğunu ve “Y mean” ortalama granüllülüğü belirtmektedir.

Saflaştırma işlemlerine geçmeden önce süspansiyon halindeki hücrelerin yüzey özellikleri akışlı hücre ölçer yardımıyla belirlenmiştir. Bunun için hücreler analiz

öncesi CD 73-PE ve CD 105-PE antibadisi (BD, ABD) ile işaretlenmiştir ve analizde floresans ışık şiddetine bağlı olarak CD 105 ve CD 73 pozitif hücre oranları saptanmıştır. Elde edilen analiz sonucu Şekil 4.15.A ve Şekil 4.15.B'de ve Çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Saflaştırma öncesi hücre süspansiyonunda

(A) CD 105 analizi sonucu (B) CD 73 analizi sonucu

Çizelge 4.8. Saflaştırma öncesi CD 105 (+) ve CD 73 (+) hücre değerleri

Saflaştırma öncesi toplam hücre üzerinden CD 105 (+) hücre (%)	Saflaştırma öncesi toplam hücre üzerinden CD 73 (+) hücre (%)
5,86	6,56

10000 hücre baz alınarak yapılan CD 105 analiz sonucu toplam lökosit grubu üzerinden yapılan analiz sonucunda CD 105 (+) ve CD 73 (+) hücre oranı saflaştırma öncesi sırasıyla yaklaşık % 6 ve % 7 seviyelerindedir. Analiz sonucunun orjinal çıktıları Ek:1'de verilmiştir.

4.5.2. Akışlı Manyetik Ayırma Sistemi ile Saflaştırma İşlemi

Her iki değerde elde edildikten sonra süpansiyon halindeki hücreler ilk olarak akışlı sistemde saflaştırma işlemine tabi tutulmuşlardır. Saflaştırma işleminde öncelikle ticari örnek olan MACS CD 105 MicroBeads (130-051-201, Miltenyi, Almanya) kullanılmış, daha sonra tez kapsamında üretilen, yüzeylerinde CD 105 ve CD 73 mezenkimal özgün antibadileri taşıyan nanosorbentler kullanılmıştır. Akışlı sistem olarak MidiMACS manyetik ayırma sistemi ve LS ayırma kolonları kullanılmıştır (Miltenyi,Almanya).

LS akışlı manyetik kolonlar saflaştırma işlemi için yüksek saflık amacıyla tasarlanmış kolon sistemleridir. 1×10^8 manyetik işaretli hücre ve 2×10^9 toplam hücre kapasiteli bu kolonlar ile toplam hücre üzerinden istenilen hücrenin geri kazanımı oldukça yüksek olmaktadır.

Ticari örnek olan MACS MicroBeads 'de çapı 50 nm olan manyetit nanopartiküller kullanılmaktadır. Bu partiküller yüzeylerinde hidroksil grupları (-OH) taşıyan dekstran ile kaplıdır. Genel olarak yüzeylerine immobilize antibadi sistemleri ile manyetik hücre saflaştırma işlemlerinde kullanılmakla birlikte, biyotin ve streptavidin bağlı MACS manyetik partikülleride ticari olarak mevcuttur.

Şekil 4.16.'da ve Çizelge 4.9.'da akışlı manyetik ayırıcıda ve LS manyetik kolonda gerçekleştirilen saflaştırma işleminin sonrasında CD 105 ve CD 73 pozitif hücre analiz sonuçları verilmiştir.

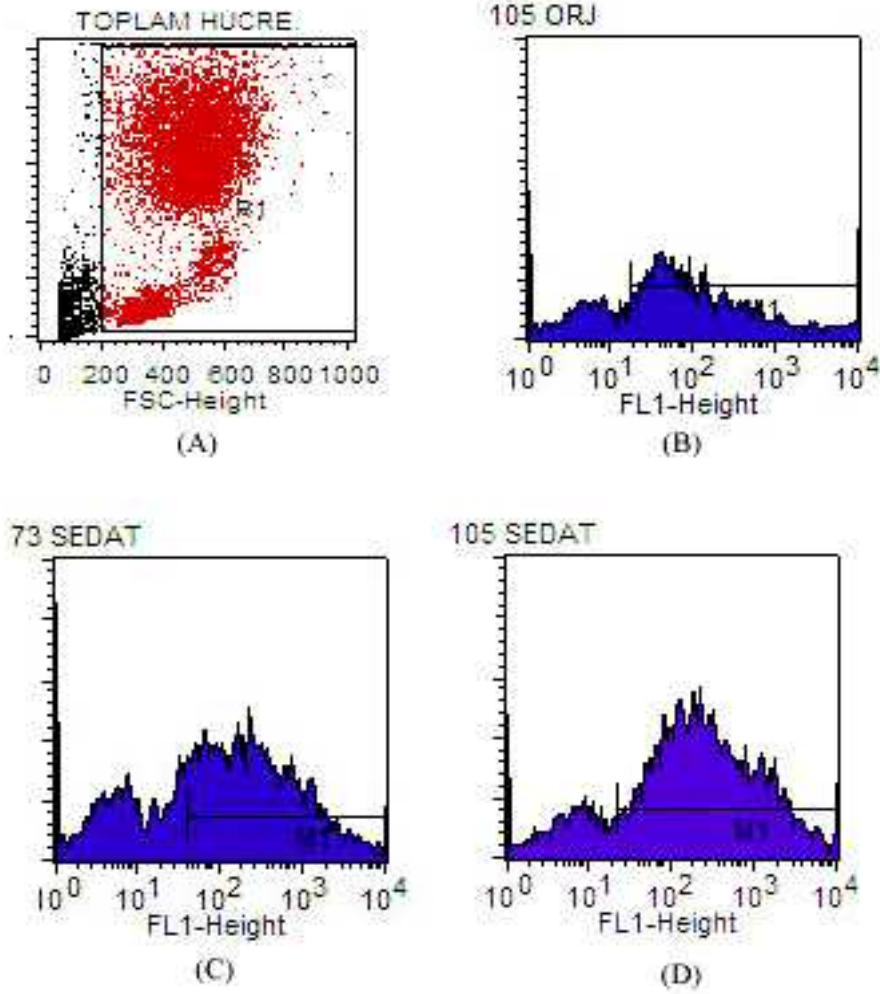
10000 hücre baz alınarak yapılan akışlı hücre ölçer analizi sonucunda ticari örnek kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda hücre süpansiyonundaki CD 105 pozitif hücrelerin oranı % 78 seviyelerinde olmuştur. Saflaştırma öncesi tüm

hücreler üzerinden alınan CD 105 pozitif hücre değeri göz önüne alındığında ticari ürün ile saflaştırma işlemi ile hücre süspansiyonundaki CD 105 pozitif hücre oranında yaklaşık 13 kat artış sağlanmıştır. Aynı şekilde tez kapsamında üretilen CD 105 taşıyan nanosorbentler ile yapılan saflaştırma işlemi sonucu hücre süspansiyonundaki CD 105 pozitif hücre oranı % 87 seviyelerindedir. Saflaştırma öncesi tüm hücreler üzerinden alınan CD 105 pozitif hücre değeri göz önüne alındığında üretilen CD 105 taşıyan nanosorbentler ile saflaştırma işlemi ile hücre süspansiyonundaki CD 105 pozitif hücre oranında yaklaşık 15 kat artış sağlanmıştır.

Çizelge 4.9. Akışlı manyetik kolonda saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen hücrelerde CD 105 ve CD 73 pozitif hücre analizi sonucu.

Ticari örnek ile saflaştırma sonrası CD 105 (+) hücre oranı	Üretilen nanosorbentler ile saflaştırma sonrası CD 105 (+) hücre oranı	Üretilen nanosorbentler ile saflaştırma sonrası CD 73 (+) hücre oranı
%77,90	%86,90	%70,22

Tez kapsamında üretilen CD 73 mezenkimal özgün antibadi taşıyan nanosorbentler ile akışlı manyetik ayırma sisteminde yapılan saflaştırma işlemi sonucunda hücre süspansiyonunda akışlı hücre ölçer analizi ile elde edilen CD 73 pozitif hücre değeri % 70 seviyelerindedir. Saflaştırma öncesi değer CD 73 pozitif hücre değeri dikkate alındığında akışlı manyetik ayırma sisteminde tez kapsamında üretilen nanosorbentler ile CD 73 pozitif hücre oranında yaklaşık 11 kat artış sağlanmıştır.



Şekil 4.16. Akışlı manyetik ayırma sisteminde saflaştırma sonrası akışlı hücre ölçer analiz sonuçları

(A) Toplam hücre özellikleri

(B) Ticari örnek (CD 105) ile saflaştırma sonucunda CD 105 (+) hücre

(C) CD 73 taşıyan nanosorbent ile saflaştırma sonucunda CD 73 (+) hücre

(D) CD 105 taşıyan nanosorbent ile saflaştırma sonucunda CD 105 (+) hücre

Hücre süspansiyonlarından CD 73 (+) hücrelerin saflaştırılmasını sağlayacak ticari örnek henüz mevcut olmadığından ticari partikülün kullanıldığı herhangi bir saflaştırma işlemi ve karşılaştırma yapılamamıştır.

Akışlı sistemde yapılan saflaştırma sonucundaki analiz sonuçlarının orjinal çıktıları Ek:2'de verilmiştir.

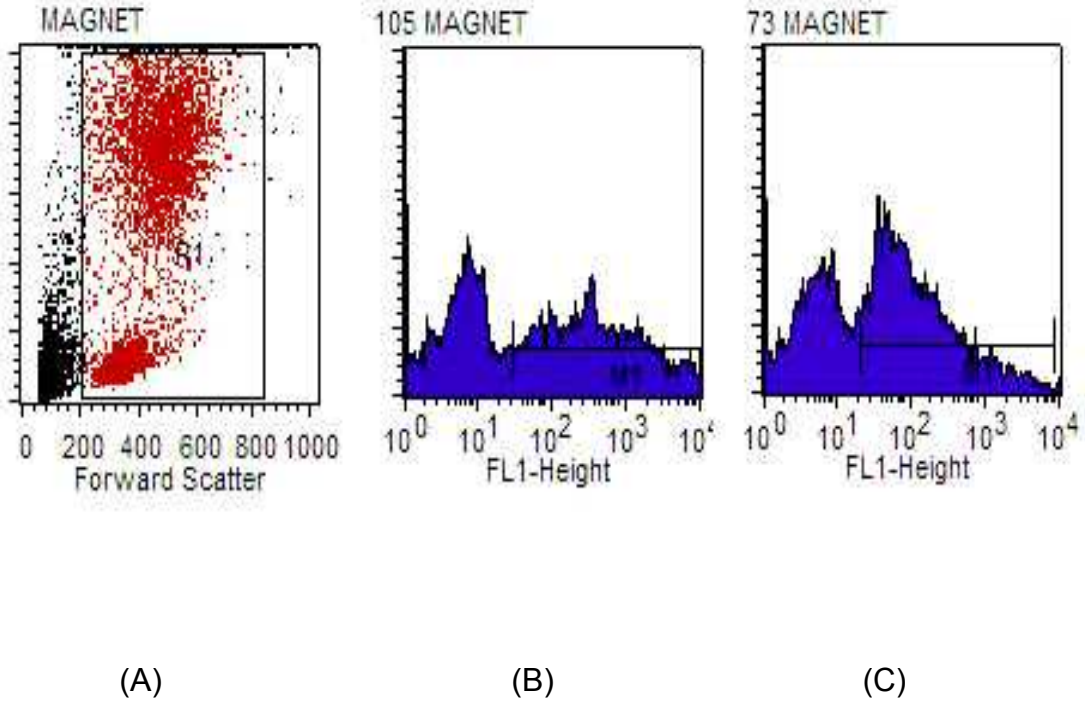
4.5.3. Çöktürmeli Manyetik Ayırma Sistemi ile Saflaştırma İşlemi

Tez kapsamında üretilen nanosorbentler ile akışlı manyetik kolonda yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra üretilen nanosorbentler ile kesikli manyetik ayırıcı sistemde saflaştırma işlemleri yapılmıştır.

Kesikli manyetik ayırıcı sistemdeki saflaştırma işlemleri, tez kapsamında tasarımı gerçekleştirilen, ticari örneklerle paralellik gösteren, içerdiği kalıp mıknaş ile yüksek manyetik güç sağlayan çöktürmeli kolon sistemi kullanılmıştır. Saflaştırma protokolünde akışlı kolon sisteminde olduğu gibi ticari olarak satılan ürünün uygulama protokolü izlemiştir.

Şekil 4.17'de tez kapsamında üretilen nanosorbentler ile çöktürmeli sistemde yapılan saflaştırma işlemi sonucunda hücre süspansiyonunda akışlı hücre ölçer ile yapılan analiz sonuçları verilmiştir. Çizelge 4.10.'da ise buradan elde edilen sonuçlar önceki bölümlerde yapılan analizler ile birlikte toplu olarak sunulmuştur. 10000 hücre baz alınarak yapılan analizde saflaştırma sonrası hücre süspansiyonundaki CD 105 pozitif hücre oranı yaklaşık %55 olmuştur. Saflaştırma öncesi hücre süspansiyonundaki CD 105 pozitif hücre değeri dikkate alındığında CD 105 mezenkimal kök hücre özgün antibadi taşıyan nanosorbentler ile çöktürmeli manyetik ayırma sisteminde yapılan saflaştırma işlemi ile hücre süspansiyonundaki CD 105 pozitif hücre oranı yaklaşık 9 kat arttırılmıştır.

Aynı şekilde CD 73 mezenkimal özgün antibadi taşıyan nanosorbentler ile çöktürmeli sistemde yapılan saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen akışlı hücre ölçer analizine göre hücre süspansiyonundaki CD 73 pozitif hücre oranı yaklaşık % 64 olmuştur. Saflaştırma öncesi değer dikkate alındığında tez kapsamında üretilen nanosorbentler ile hücre süspansiyonundaki CD 73 pozitif hücre oranı yaklaşık 10 kat arttırılmıştır.



Şekil 4.17. Çöktürmeli manyetik ayırma sisteminde saflaştırma sonrası akışlı hücre ölçer analiz sonuçları

(A) Toplam hücre özellikleri

(B) CD 105 taşıyan nanosorbent ile saflaştırma sonucunda CD 105 (+) hücre

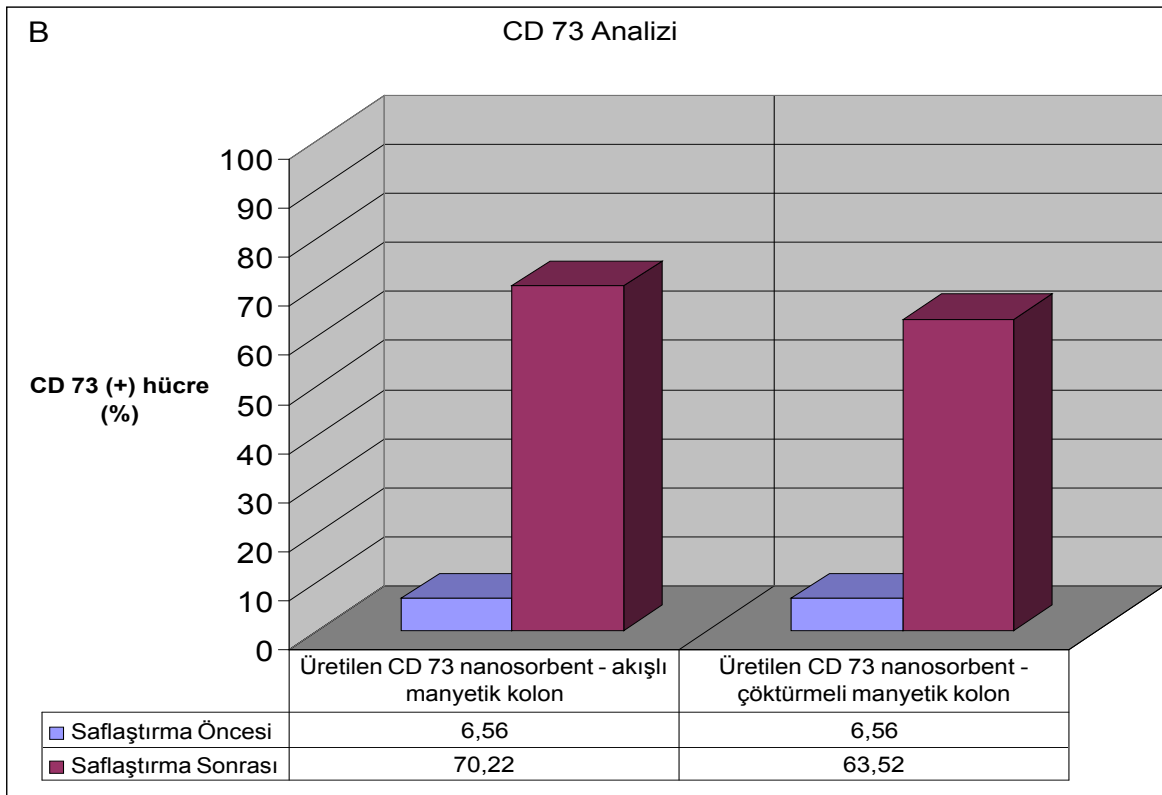
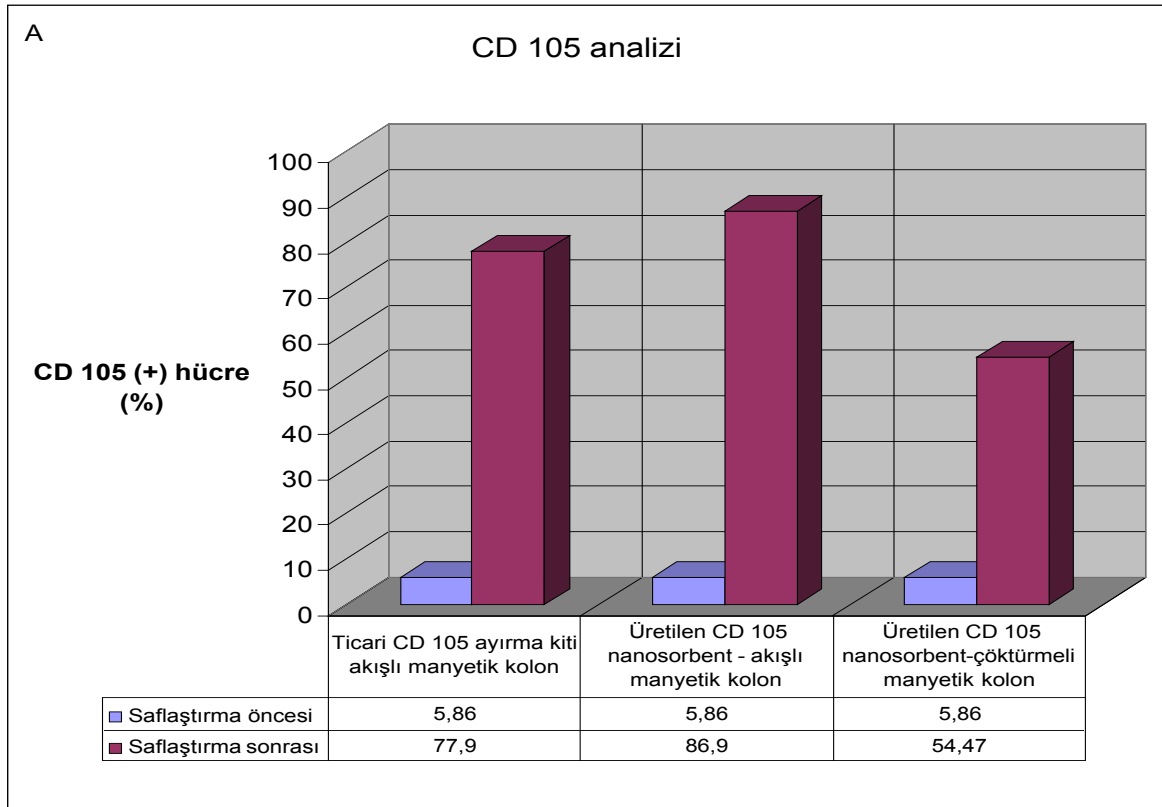
(C) CD 73 taşıyan nanosorbent ile saflaştırma sonucunda CD 73 (+) hücre

Çöktürmeli sistemde yapılan saflaştırma sonucundaki analiz sonuçlarının orjinal çıktıları Ek:2'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Saflaştırma işlemleri öncesi ve sonrasında elde edilen hücrelerde CD 105 ve CD 73 pozitif hücre analizi sonuçları.

	CD 105 (+) hücre (%)	CD 73 (+) hücre (%)
Saflaştırma öncesi	5,86	6,56
Akışlı manyetik sistemde ticari örnek ile saflaştırma sonucu	77,90	Ticari örnek mevcut değil
Akışlı manyetik sistemde üretilen nanosorbent ile saflaştırma sonucu	86,90	70,22
Çöktürmeli manyetik sistemde, üretilen nanosorbent ile saflaştırma sonucu	54,47	63,52

Tüm saflaştırma işlemlerinde sonra; saflaştırma öncesi ve saflaştırma sonrası kesikli ve akışlı manyetik kolonlardan ticari ve tez kapsamında üretilen nanosorbentler ile elde edilen akışlı hücre ölçer değerleri özet halinde Şekil 4.18. (A) ve Şekil 4.18. (B)'de sunulmuştur.



Şekil 4.18. Saflaştırma işlemleri ile ilgili özet sonuçları. (A) CD 105 analiz sonuçları, (B) CD 73 analiz sonuçları

Şekil 4.18'den de görüldüğü gibi tez kapsamında üretilen nanosorbentler, uygun hücre süspansiyonundan mezenkimal kök hücreleri saflaştırmayı yüksek verimlilik ile gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırma sonrası yapılan akışlı hücre ölçer analizleri sonucunda hem akışlı hem çöktürmeli (kesikli) manyetik ayırma sistemlerinde çalışabildikleri, ticari örnek ile rekabet edebilecek seviyede saflaştırma sağladıkları saptanmıştır.

5. SONUÇLAR

- İkili çöktürme yöntemi ile 70-500nm arasında değişen boyutlarda Fe₃O₄ manyetit nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Sentezlenen Fe₃O₄ nanopartiküller Zeta Sizer, FTIR, DSC, XRD, VSM ile karakterize edilmiştir.
- FTIR spektrumunda manyetitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O gerilimini gösteren karakteristik pikleri gözlenmiştir.
- Sentezlenen manyetit nanopartiküllerinin XRD grafiğinde manyetite ait spesifik pikler görülmüştür. Sentezlenen manyetitin XRD grafiği ASTM kartlarıyla karşılaştırılarak kübik manyetit olduğu belirlenmiştir.
- Manyetitin DSC termogramından 71.5 °C sıcaklıkta fiziksel olarak adsorplanmış suyun uzaklaştığı , 193.87 °C'de maghemite ve 308.7 °C'de hematite dönüşümü belirlenmiştir.
- Titreşimli manyetometre ile manyetit partiküllerinin boyu arttıkça partikül içindeki manyetik birimlerin sayısının artmasından doygunluk mıknatıslığının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği görülmüştür.
- Sentezlenen farklı boydaki nanopartiküller mikroemülsiyon polimerizasyonu ile MMA/AAC, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile PEG/MA kaplanmıştır.
- MMA/AAC ve PEG/MA kaplı nanopartiküllerin mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak amacıyla MTT testi yapılmıştır.
- MTT testi sonuçlarına göre mezenkimal kök hücre özgün antibadi taşıyan nanosorbent üretimi için MMA/AAC kaplı nanopartiküller seçilmiş ve bu partiküller Zeta Sizer, FTIR, DSC, VSM ile karakterize edilmişlerdir.

- Sentezlenen manyetik yüklü PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda manyetitten gelen 671 cm^{-1} dalga sayısında Fe-O gerilim piki gözlenirken manyetik yüklü olmayan PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin FTIR spektrumunda bu pik gözlenmemiştir.
- DSC termogramından PMMA/AAc-90/10 kopolimerinin camsı geçiş sıcaklığının $94.04\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve erime sıcaklığının $117.73\text{ }^{\circ}\text{C}$ olduğu saptanmıştır. Yapısında manyetit içeren aynı kopolimerinin camsı geçiş ve erime sıcaklığı sırasıyla $126.87\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $208.71\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak bulunmuştur. Dolayısıyla yapı içindeki manyetit nanopartiküllerin kopolimerin termal stabilitesini artırdığı görülmüştür.
- Mezenkimal kök hücre özgün CD 105 ve CD 73 antibadilerini taşıyan nanosorbentlerin üretiminde ve optimizasyon çalışmalarında 70nm manyetit çapı (Fe_3O_4), 153 nm partikül çapında $\text{PI} = (0,229)$ ve Zeta değeri = (-42.72 mV) olan manyetik yüklü MMA/AAc nanopartikülleri kullanılmıştır.
- HlgG ile yapılan bağlanma ile ilgili optimizasyon çalışmalarında öngörülen 24 saatlik reaksiyon süresinde reaksiyonun dengeye geldiği görülmüştür.
- Manyetik yüklü polimerik nanopartikül çapının artması ile bağlanma yüzdesinin düştüğü gözlemlenmiştir.
- Ortamdaki partikül miktarı arttıkça ortaya çıkan agglomerasyon sonucunda bağlanma yüzdesinin düştüğü gözlemlenmiştir.
- Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda birim gram nanopartikül başına mg antibadi konsantrasyonu maksimum 875 g/ml antibadi konsantrasyonunda 48 mg antibadi/g nanopartikül olarak bulunmuştur.
- Optimizasyon çalışmaları sonucunda 150 nm partikül boyuna sahip, 5mg/ml konsantrasyonda partiküllere 500 g/ml konsantrasyonda CD 105 ve CD 73 mezenkimal kök hücre özgün antibadileri kovalent olarak bağlanarak hücre kaynaklarından mezenkimal kök hücre saflaştırılmasını sağlayacak manyetik yüklü nanosorbentler elde edilmiştir.

- İki farklı manyetik ayırıcı sistemde yapılan saflaştırma işlemi öncesi süspansede halindeki hücreler üzerinde yapılan % CD 105 (+) ve CD 73 (+) hücre analizi sonucunda saflaştırma öncesi süspansede halindeki hücrelerin %5,86'sı CD 105 (+) % 6,56 sı CD 73 (+) özellik taşıdığı saptanmıştır.
- Akışlı manyetik kolon sisteminde ticari örnek ile yapılan saflaştırma işlemi sonucunda CD 105 (+) hücre oranı başlangıca göre yaklaşık 13 kat artarak % 77,90 olarak ölçülmüştür.
- Akışlı manyetik kolonda, üretilen CD 105 saf antibadi bağlı nanosorbentler ile yapılan saflaştırma işlemi sonucunda CD 105 (+) hücre oranı başlangıca göre yaklaşık 15 kat artarak % 86,90'a ulaştığı görülmüştür.
- Akışlı manyetik kolonda, üretilen CD 73 saf antibadi bağlı nanosorbentler ile yapılan saflaştırma işlemi sonucunda CD 73 (+) hücre oranı başlangıca değeri olan % 6,56'ya göre yaklaşık 11 kat artarak % 70,22'ye ulaştığı görülmüştür.
- Çöktürmeli manyetik kolon sisteminde CD 105 nanosorbentler ile yapılan saflaştırma işlemi ile hücre süspansiyonundaki CD 105 (+) hücre oranı saflaştırma öncesi oran olan % 5,86'ya göre yaklaşık 9 kat artarak % 54,47'e ulaşmıştır.
- Çöktürmeli kolon sisteminde mezenkimal kök hücre özgün antibadilerden CD 73 bağlı nanosorbentler ile yapılan saflaştırma işlemi ile hücre süspansiyonundaki CD 73 oranı saflaştırma işlemi öncesine göre yaklaşık 10 kat artarak % 63,52 olarak ölçülmüştür.
- Sonuç olarak tez kapsamında çeşitli kaynaklarda mezenkimal kök hücrelerin saflaştırılmasını sağlayacak, ticari ile rekabet edebilecek, hem kesikli-çöktürmeli hem de akışlı manyetik ayırma sistemlerinde kullanılabilen manyetik yüklü PMMA/AAC bazlı nanosorbentler üretilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Arias, J.L., Gallardo, V., Gomez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V., 2001, Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core, *Journal of Controlled Release*, 77, 309-321.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan A., 1997, *et al.*, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275, p. 964.
- Barry, F. P., Boynton, R. E., Haynesworth, S., Murphy, J. M., Zaia, J., 1999, The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 134–139.
- Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B., & Murphy, J. M., 2001, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components, *Experimental Cell Research*, 268, 189–200.
- Barry, F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S., & Zaia, J. (2001). The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 519–524.
- Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S., 2004, *J Cell Mol. Med.* 8:301.
- Brabers, V.A.M., 1995, in *Handbook of Magnetic Materials*, Vol. 8 (Ed.: K. H. J. Buschow), Elsevier Science, pp. 189.
- Brivanlou, A.H., *et al.* 2003. Stem cells: setting standards for human embryonic stem cells. *Science* 300, 913–916.
- Cell Separation and Protein Purification, Information Booklet, 1996, Dynal, Oslo, Norway,

Chalmers, J.J., Zborowski, M., Sun, L.P., Moore, L., 1998, *Biotechnol. Prog.* 14,141.

Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C., 2002, Polyethylene magnetic nanoparticles: a new magnetic material for biomedical applications, *Journal of Magnetic Materials*, 246, 382-391.

Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera S., 1992, Endoglin is a component the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells, *J.Biol. Chem*, 267, 19027-19030.

Cocker, T.M., Fee, C.J., Evans, R.A., 1997, *Biotechnol. Bioeng.* 53, 79.

Cornell, R. M., Schertmann, U., 1996, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, VCH Publishers, Weinheim.

Cornell, R.M., Schertmann, U., 1991, *Iron Oxides in the Laboratory; Preparation and Characterization.*, VCH, Weinheim.

Deniz, G., Yılmaz, T.M., Yıllar. G., 2004, *Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı*, s 1-9

Dominici, M., Hofmann, T.J., Horwitz. E.M., 2001, *J. Biol.Regul & Homeost Agents.* 15: 28.

Dresco, P.A., Zaitsev, V.S., Gambino, R. J., Chu, B., 1999, Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles, *Langmuir*, 15, 1945-1951.

Ferrari, G., Cusella-De Angelis, Coletta, M., *et al.*, 1998, Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science* 279, p. 1528.

Fuller, TA., 1980, The physics of surgical lasers, *Laser Surg. Med.* 1:15

Goto, M., Imamura, T., Hirose, T., 1995, *J. Chromatogr. A* 690, 1.

Gribanov, N.M., Bibik, E.E., Buzunov, O.V., Naumov, V.N., 1990, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 85, 7.

Grüttner, C., Teller, J., Schütt, W., Westphal, F., Schümichen, C., Paulke, B.R., in: Hafeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., (Eds.), 1997, *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, New York, London, p. 53.

Güven G., 2006, Eş boyutlu, katyonik, fonksiyonel grup içeren/içermeyen manyetik nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve nükleik asit uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi.

Halbreich, A., Roger, J., Pons, J.N., Da Silva, M.D., 1997, *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, . New York, London, p. 399

Handbook of Stem Cells Volume 2 "Adult and Fetal Stem Cells" Elsevier Academic Press, 2004

Hartig, R., Hausmann, M., Cremer, C., 1995, *Electrophoresis* 16, 789.

Houck, J.C., Sharma, V.K., and Hayflick, L. 1971. Functional failures of cultured human diploid fibroblasts after continued population doublings. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137, 331–333.

Javazon, E.H., Kirstin J.B., *Exp Hematol* 32:414, 2004

Keller, R., 2002, *Immunology Letters* 83:1

Kondo,A., Kamura, H., Higashitani, K.,1994, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 99.

- Kondo, A., Fukuda, H., 1999, Preparation of thermo-sensitive magnetic microspheres and their application to bioprocesses, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 153, 435-438.
- Krause, D.S., Theise N.D., Collector M.I., *et al.*, 2001, Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell, *Cell* 105, p. 369.
- Lagasse, E., Connors H., Al-Dhalimy M., *et al.*, 2000, Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo, *Nat. Med.* 6, p. 1229.
- Lea, T., Vartdal F., Nustad, K., Funderud, S., Berge, A., Ellingsen, T., Schmid, R., Stenstad, P., Ugelstad, J., 1988, *J. Mol. Recognit.* 1, 9.
- Lee, M.S., Lill, M., Makkar, R.R., 2004, *Rev in Cardiovascular Med.* 5:82.
- Lin, L., Weisdorf, D.J., Solovey, A., *et al.*, 2000, Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood, *J. Clin. Invest.* 105, p. 71.
- Ljungquist, C., Lundeberg, J., Rasmussen, A.M., Hornes, E., Uhlen, M., 1993, *DNA Cell Biol.* 12, 191.
- Lochmüller, C.H., Ronsick, C.S., Wigman, L.S., 1988, *Preparat. Chromatogr.* 1, 93.
- Macs Separators User Manual, Miltenyi Biotec, Almanyia
- Margolis, L.B., Namiot, V.A., Kliukin, L.M., 1983, *Biochim. Bio- phys. Acta* 735 - 193.
- Margolis, L.B., Namiot, V.A., Kljukin, L.M., 1983, *Biofizika* 28 884.
- Meldrum, F.C., Heywood, B.R., Mann, S., 1992, *Science* 257 ,522.

- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., *et al.*, 2000, Turning blood into brain cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow, *Science* 290, p. 1779
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch A., 1990, High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS, *Cytometry* 11:231-238
- Molday, R.S., Mackenzie, D., 1982 *J. Immunol. Methods* 52 353.
- Muirhead, K., 1987, Introduction to Flow Cytometry. Annual course in flow cytometry: Applications in Immunobiology and Cell Biology, Los Alamos.
- Mykhaylyk, O.M., Razumov, O.N., Dudchenko, A.K., Pankratov, Y.V., Dobrinsky, E.K., 1997, Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Plenum Press, New York, London, p. 177.
- Norman, A., 1980, Flow Cytometry, *Med. Phys* 7:609.
- Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K.S., Hornes, E., Ugelstad, J., Uhlen, M., 1994, *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 43.
- Ozaki, M., 2000, in *Fine Particles: Synthesis, Characterization, and Mechanisms of Growth*, Vol. 92 (Ed.: T. Sugimoto), Marcel Dekker, Inc., New York.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., *et al.*, 1999, Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, *Science* 284, p. 1168.
- Pittenger, M.F., Mackay A.M., Beck S.C., 1999, Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells, *Science*, 284, 143-147
- Rafii, S., Shapiro F., Rimarachin J., 1994, *et al.*, Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells hematopoietic progenitor cell adhesion, *Blood* 84.

- Ramirez, P.L., Landfester, K., 2003, Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes, *Macromol Chem. Phys.* 204, 22-31.
- Riley, RS., Mahin, EJ., 1989, *Flow Cytometry Clinical Applications*, ASCP 3-15
- Rye, P.D., 1996, *BioTechnology* 14,155.
- Safarik, I., Safarikova, M., Forsythe, S.J., 1995, *J. Appl. Bacteriol.* 78, 575.
- Safarik, I., Safarikova, 1995, *Biotechnol. Tech.* 9,137.
- Safarik, I., Safarikova, M., in: Hafeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., (Eds.), 1997, *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, New York, London,p. 323
- Sayar, F., 2004, *Mikroemülsiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle MMA/AAc/PEG-MA Esaslı Manyetik Nanopartiküllerin Üretimi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Sayar, F., Guven, G., Piskin, E., 2005, Magnetically loaded poly (methylemethacrylate-co-acrylic acid) nanoparticles, *Colloid. Polym. Sci.*, (Baskıda)
- Shinkai, M., Suzuki, M., Iijima, S., Kobayashi, T., 1995, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21,125.
- Sorensen, C. M., 2001, in *Nanoscale Materials in Chemistry* (Ed.: K. J. Klabunde), John Wiley and Sons, Inc., New York,169.
- Stem Cells - Scientific Progress And Future Research Directions*, 2001, NIH press,
- Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine* 2002, Copyright © 2003 National Academy of Sciences. National academy Press p.15

Technical Data Sheet 618, 2005, Polysciences, Inc.

Terranova, B.E., Burns, M.A., 1991, *Biotechnol. Bioeng.* 37, 110.

Theise, N.D., Badve, S., Saxena R., *et al.*, 2000, Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation, *Hepatology* 31, p. 235.

Tsai, M.S., Lee, J.L., Chang, Y.J., Hwang, S.M., 2004, *Human Reproduction* 19: 1450.

Ugelstad, J., Mork, P.C., Schmid, R., Ellingsen, T., Berge, A., 1993, *Polymer Int.* 30 157.

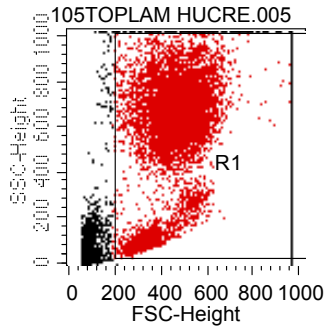
Wang, H.S., Hung, S.C., Peng, S.T., Huang, C.C., Wei, H.M., Guo, Y.J., Fu, Y.S., Lai, M.C., Chen, C.C., 2004, Mesencymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Umbilical Cord, *Stem Cells*, 22, 1330-1337

Widjoatmodjo, M.N., Fluit, A.C., Torensma, R., Verhoef, J., 1993, *J. Immunol. Methods* 165, 11.

Zborowski, M., Fuh C.B., Green, R., Sun, L., Chalmers, J.J., 1995, *Anal. Chem.* 67-3702.

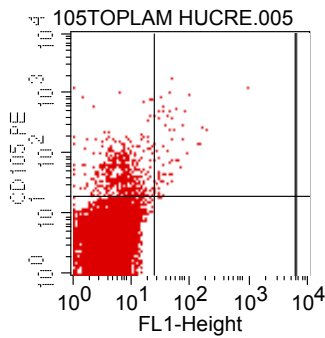
Zborowski, M., Malchesky, P.S., Jan, T.F., Hall, G.S., 1992, *J. Gen. Microbiol.*, 138 63.

EK:1



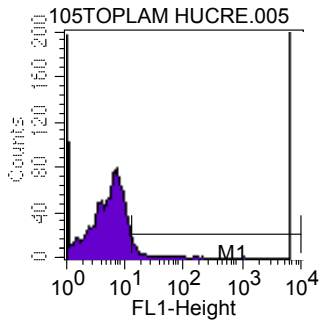
File: 105TOPLAM HUCRE.005 Tube: CD105 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FSC-Height (L)
 Y Parameter: SSC-Height (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	8785	87.85	87.85	454.87	496.15



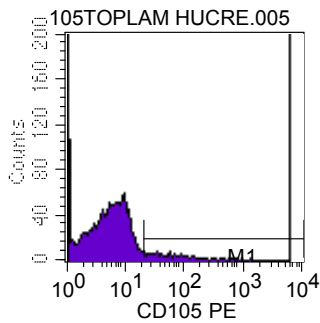
File: 105TOPLAM HUCRE.005 Tube: CD105 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 8785
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (Lo)
 Y Parameter: CD105 PE (Log) Quad Location: 24, 19

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	477	5.43	4.77	8.48	67.29
UR	71	0.81	0.71	75.68	238.80
LL	8230	93.68	82.30	6.26	6.36
LR	7	0.08	0.07	27.89	15.91



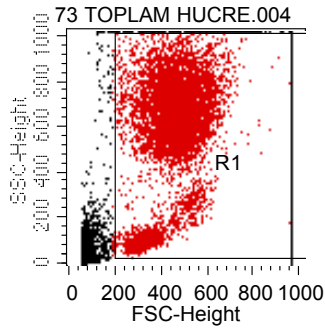
File: 105TOPLAM HUCRE.005 Tube: CD105 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 8785
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (L)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Cr
All	8785	100.00	87.85	6.96	237.01	1
M1	467	5.32	4.67	24.60	276.78	13



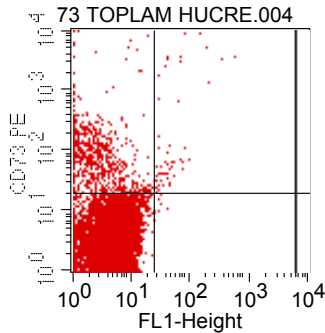
File: 105TOPLAM HUCRE.005 Tube: CD105 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 8785
 Total Events: 10000 X Parameter: CD105 PE (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Cr
All	8785	100.00	87.85	11.56	401.35	1
M1	515	5.86	5.15	93.99	181.99	20



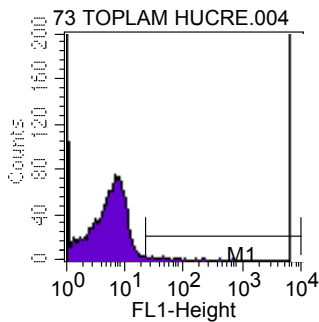
File: 73 TOPLAM HUCRE.004 Tube: CD73 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: FSC-Height (L)
 Y Parameter: SSC-Height (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	8944	89.44	89.44	459.25	505.06



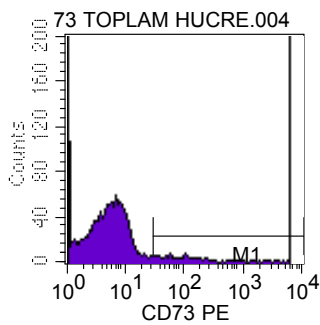
File: 73 TOPLAM HUCRE.004 Tube: CD73 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 8944
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (Log)
 Y Parameter: CD73 PE (Log) Quad Location: 24, 19

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	671	7.50	6.71	4.10	243.63
UR	61	0.68	0.61	80.84	888.12
LL	8196	91.64	81.96	6.68	5.86
LR	16	0.18	0.16	30.53	10.97



File: 73 TOPLAM HUCRE.004 Tube: CD73 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 8944
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (L)

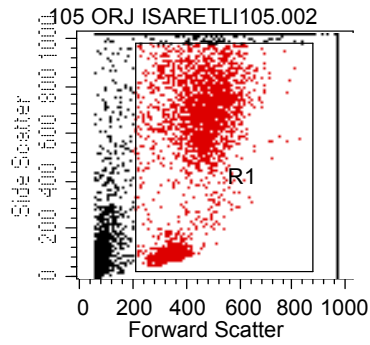
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ctr
All	8944	100.00	89.44	7.04	181.18	1
M1	92	1.03	0.92	62.67	171.81	22



File: 73 TOPLAM HUCRE.004 Tube: CD73 PE
 Panel: MSC PANEL Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 8944
 Total Events: 10000 X Parameter: CD73 PE (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ctr
All	8944	100.00	89.44	29.72	1077.40	1
M1	587	6.56	5.87	365.06	329.17	67

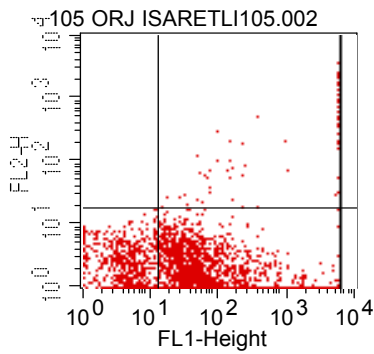
EK: 2



File: 105 ORJ ISARETLI105.002
 Panel: Anti Notrofil Antikoru
 Gate: No Gate
 Total Events: 5040
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Tube: Anti notrofil antikoru OT
 Acquisition Date: 03-May-06
 Gated Events: 5040
 X Parameter: Forward Scatter (L

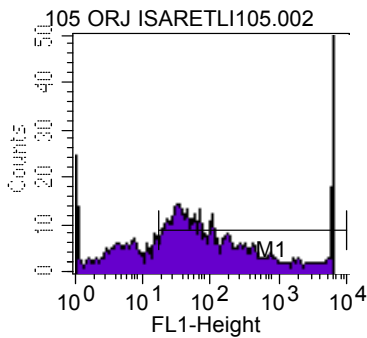
Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	2833	56.21	56.21	460.72	566.65



File: 105 ORJ ISARETLI105.002
 Panel: Anti Notrofil Antikoru
 Gate: G1
 Total Events: 5040
 Y Parameter: FL2-H (Log)

Tube: Anti notrofil antikoru OT
 Acquisition Date: 03-May-06
 Gated Events: 2833
 X Parameter: FL1-Height (Log
 Quad Location: 13, 17

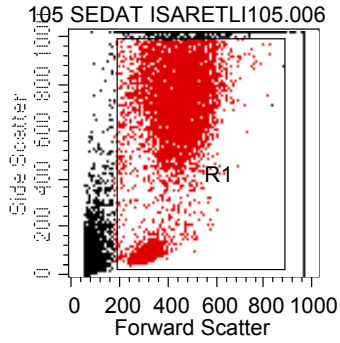
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1	0.04	0.02	12.75	17.31
UR	61	2.15	1.21	4653.54	453.48
LL	555	19.59	11.01	5.42	3.04
LR	2216	78.22	43.97	519.26	2.22



File: 105 ORJ ISARETLI105.002
 Panel: Anti Notrofil Antikoru
 Gate: G1
 Total Events: 5040

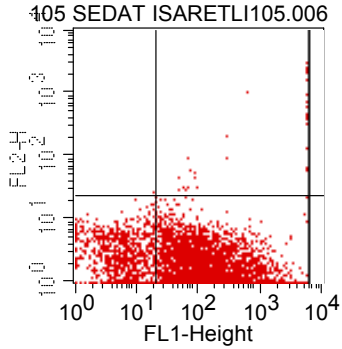
Tube: Anti notrofil antikoru C
 Acquisition Date: 03-May-06
 Gated Events: 2833
 X Parameter: FL1-Height (L

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ch
All	2833	100.00	56.21	507.44	322.18	9910
M1	2207	77.90	43.79	649.52	281.36	9910



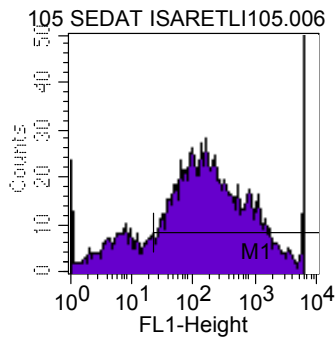
File: 105 SEDAT ISARETLI105.006 Tube: Anti notrofil antikor
 Panel: Anti Notrofil Antikoru Acquisition Date: 03-May-0
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: Forward Scal
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	6710	67.10	67.10	455.69	638.31



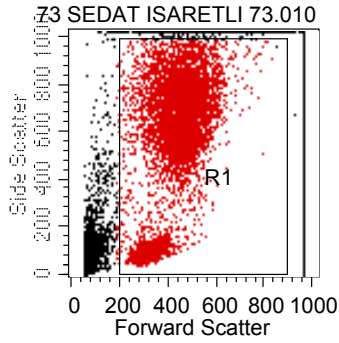
File: 105 SEDAT ISARETLI105.006 Tube: Anti notrofil antikor
 Panel: Anti Notrofil Antikoru Acquisition Date: 03-May
 Gate: G1 Gated Events: 6710
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height
 Y Parameter: FL2-H (Log) Quad Location: 20, 23

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***
UR	30	0.45	0.30	5036.82	597.85
LL	850	12.67	8.50	7.43	3.12
LR	5830	86.89	58.30	601.55	1.86



File: 105 SEDAT ISARETLI105.006 Tube: Anti notrofil antik
 Panel: Anti Notrofil Antikoru Acquisition Date: 03-M
 Gate: G1 Gated Events: 6710
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height

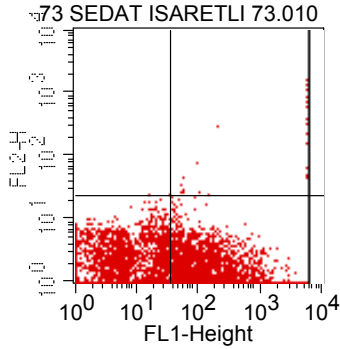
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ch
All	6710	100.00	67.10	546.12	212.54	199
M1	5831	86.90	58.31	627.26	195.26	199



File: 73 SEDAT ISARETLI 73.010
 Panel: Anti Notrofil Antikoru
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Tube: Anti notrofil antikoru C
 Acquisition Date: 03-May-06
 Gated Events: 10000
 X Parameter: Forward Scatt

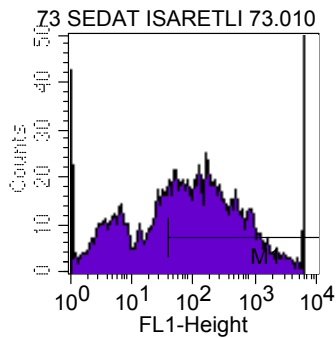
Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	6962	69.62	69.62	444.87	525.27



File: 73 SEDAT ISARETLI 73.010
 Panel: Anti Notrofil Antikoru
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL2-H (Log)

Tube: Anti notrofil antikoru
 Acquisition Date: 03-May-06
 Gated Events: 6962
 X Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 35, 23

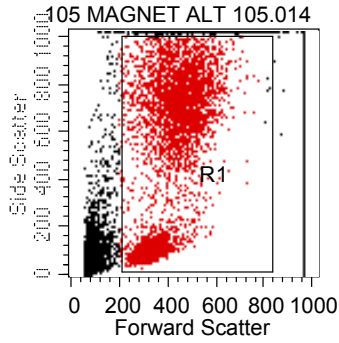
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1	0.01	0.01	18.43	24.58
UR	28	0.40	0.28	5352.44	382.45
LL	1980	28.44	19.80	12.04	2.74
LR	4953	71.14	49.53	508.74	1.62



File: 73 SEDAT ISARETLI 73.010
 Panel: Anti Notrofil Antikoru
 Gate: G1
 Total Events: 10000

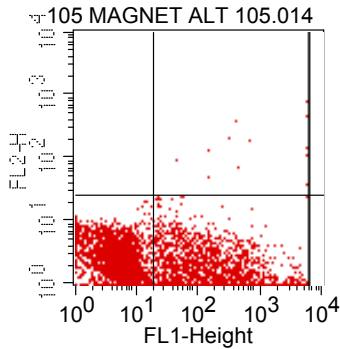
Tube: Anti notrofil antikoru
 Acquisition Date: 03-May-06
 Gated Events: 6962
 X Parameter: FL1-Height (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ch
All	6962	100.00	69.62	386.89	240.40	1
M1	4889	70.22	48.89	545.37	196.42	198



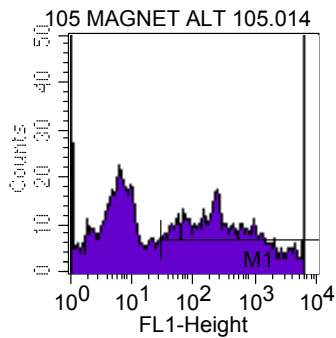
File: 105 MAGNET ALT 105.014 Tube: Anti notrofil antikoruu C
 Panel: Anti Notrofil Antikoruu Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: Forward Scatt
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	5509	55.09	55.09	414.52	415.20



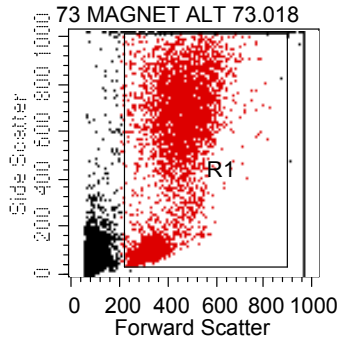
File: 105 MAGNET ALT 105.014 Tube: Anti notrofil antikoruu C
 Panel: Anti Notrofil Antikoruu Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 5509
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (L
 Y Parameter: FL2-H (Log) Quad Location: 18, 25

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***
UR	14	0.25	0.14	4447.82	199.63
LL	2361	42.86	23.61	6.45	2.91
LR	3134	56.89	31.34	843.52	1.84



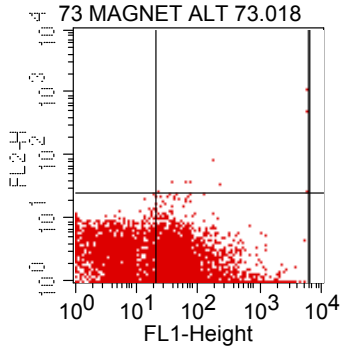
File: 105 MAGNET ALT 105.014 Tube: Anti notrofil antikoruu
 Panel: Anti Notrofil Antikoruu Acquisition Date: 03-May-
 Gate: G1 Gated Events: 5509
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ch
All	5509	100.00	55.09	493.94	256.64	1
M1	3001	54.47	30.01	900.49	178.62	296



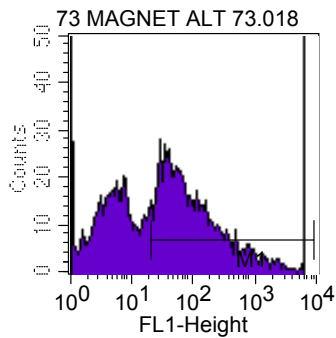
File: 73 MAGNET ALT 73.018 Tube: Anti notrofil antikoruu C
 Panel: Anti Notrofil Antikoru Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: No Gate Gated Events: 10000
 Total Events: 10000 X Parameter: Forward Scatt
 Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	6659	66.59	66.59	424.59	408.45



File: 73 MAGNET ALT 73.018 Tube: Anti notrofil antikoruu OT
 Panel: Anti Notrofil Antikoru Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 6659
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (Log)
 Y Parameter: FL2-H (Log) Quad Location: 20, 25

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***
UR	12	0.18	0.12	2559.60	170.86
LL	2431	36.51	24.31	6.53	3.01
LR	4216	63.31	42.16	233.41	2.09



File: 73 MAGNET ALT 73.018 Tube: Anti notrofil antikoruu O
 Panel: Anti Notrofil Antikoru Acquisition Date: 03-May-06
 Gate: G1 Gated Events: 6659
 Total Events: 10000 X Parameter: FL1-Height (Lc)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Peak Ch
All	6659	100.00	66.59	154.77	336.05	1
M1	4230	63.52	42.30	228.48	239.87	32

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sedat Odabaş

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1982

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1997-2000 Milli Piyango Anadolu Lisesi

Lisans : 2000 – 2004 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce